

**Charakterisierung der Bedeutung von Interleukin-6
und Prostaglandinen bei der Fieberentstehung
nach systemischer oder lokaler Stimulation mit
bakteriellem Lipopolysaccharid bei
Meerschweinchen**

CHRISTOPH RUMMEL

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet.

beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

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

1. Auflage 2005

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 2005

© 2005 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.doktorverlag.de

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

Betreuer: PD Dr. Joachim Roth

**Charakterisierung der Bedeutung von Interleukin-6 und
Prostaglandinen bei der Fieberentstehung nach
systemischer oder lokaler Stimulation mit bakteriellem
Lipopolysaccharid bei Meerschweinchen**

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

Eingereicht von

Christoph Rummel

Tierarzt aus Frankfurt am Main (Hessen)

Gießen 2005

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

Dekan: Prof. Dr. Manfred Reinacher

Gutachter: PD Dr. Joachim Roth

Prof. Dr. Dr. h.c. Rudolf Leiser

Tag der Disputation: 04.03.2005

meinen Eltern und meiner Schwester

I. EINLEITUNG	8
1. Lokale und systemische Entzündungsreaktionen.....	8
2. Akute-Phase-Reaktion	11
2.1. Zentralnervös gesteuerte Akute-Phase-Reaktion	13
2.1.1. „Sickness Behavior“	13
2.1.2. Fieber	14
2.1.3. Biologischer Nutzen	16
II. LITERATURÜBERSICHT.....	18
1. Thermoregulation.....	18
1.1. Regelkreis	19
1.1.1. Kalt- und Warmsensoren.....	20
1.1.2. Effektororgane	23
1.1.2.1. Wärmeproduktion / Wärmekonservierungsmechanismen	23
1.1.2.2. Wärmeabgabemechanismen.....	24
1.1.3. Definition Fieber.....	24
2. Fiebermodelle.....	26
2.1. Nicht infektiös	27
2.2. Infektiös	27
2.2.1. LPS/Gram negativ	28
2.2.2. Andere exogene Pyrogene.....	29
3. Zytokine.....	30
3.1. Definition und Vorkommen	30
3.2. Zytokine als endogene Pyrogene.....	33
3.3. Inflammatorisch.....	34
3.3.1. IL-6	35
3.4. Antiinflammatorisch.....	36
4. Signaltransduktionswege auf zellulärer und molekularer Ebene	37
4.1. gp130 Rezeptorfamilie	37
4.1.1. STAT3	40
4.1.2. SOCS	42
4.2. NF- κ B.....	44

4.3.	FOS	46
5.	Potenzielle Zielgene	47
5.1.	Zyklooxygenasen (COX-1, COX-2, COX-3).....	48
5.1.1.	PGE ₂	51
5.1.2.	PGE-Rezeptoren	54
5.2.	NO-Synthasen (nNOS, eNOS, iNOS).....	56
5.3.	Andere.....	58
6.	Fieberentstehungshypothesen	58
6.1.	Humorale Hypothese	58
6.1.1.	Diffusion	59
6.1.2.	Transport.....	59
6.1.3.	Passage von Immunzellen als Informationsträger in das ZNS.....	60
6.1.4.	Rezeptor vermittelt am Endothel.....	60
6.1.5.	Sensorische CVOs	61
6.2.	Nervale Hypothese	63
6.2.1.	Der <i>Nervus vagus</i>	64
6.2.2.	Andere.....	66
7.	Hintergrund und Fragestellung der wissenschaftlichen Arbeit	67
III.	MATERIAL UND METHODEN.....	69
1.	Tiermodell.....	69
1.1.	Material.....	69
1.1.1.	Versuchstiere	69
1.1.2.	Die subkutane Kammer	70
1.1.3.	Der intraarterielle Katheter.....	70
1.1.4.	Der Sender	71
1.1.5.	Verwendete Substanzen.....	72
1.1.5.1.	Für die Narkosen	72
1.1.5.2.	Für die Versuche	73
1.1.5.2.1.	Lipopolysaccharid (LPS).....	73
1.1.5.2.2.	Diclofenac	73
1.1.5.2.3.	NaCl	74
1.1.5.2.4.	Ethanol	74

1.1.5.2.5.	Solvent.....	74
1.1.5.2.6.	Heparin.....	74
1.1.5.3.	Für die Perfusion.....	74
1.1.5.4.	Phosphatpuffer (PB 0,1M).....	75
1.1.5.5.	Physiologische Kochsalzlösung (0,9 %).....	75
1.1.5.6.	Paraformaldehyd-Lösung (PFA 4 %).....	75
1.1.5.7.	Saccharoselösung (20 %).....	75
1.1.6.	Vorbereitung der Injektionen.....	75
1.2.	Methoden.....	76
1.2.1.	Prämedikation und Narkose.....	76
1.2.2.	Operationstechnik.....	76
1.2.2.1.	Implantation eines Verweilkatheters in die <i>A. carotis</i>	77
1.2.2.2.	Implantation der subkutanen Kammer.....	79
1.2.2.3.	Implantation des Senders in die Bauchhöhle.....	79
1.2.3.	Schematische Darstellung des Versuchsprotokolls.....	80
1.2.4.	Stimulation der Versuchstiere.....	81
1.2.5.	Biologisches Material.....	82
1.2.5.1.	Blut/Plasma.....	82
1.2.5.2.	Lavage.....	82
1.2.5.3.	Gehirne.....	83
1.2.5.3.1.	Gehirnentnahme für die Immunhistologie (Free Floating).....	83
1.2.5.3.2.	Gehirnentnahme für die Immunfluoreszenz.....	84
1.2.5.3.3.	Gehirnentnahme für die <i>in situ</i> Hybridisierung.....	84
2.	Telemetrie.....	85
2.1.	Material.....	85
2.2.	Methoden.....	85
2.2.1.	Versuchsdurchführung.....	85
2.2.1.1.	Schematische Darstellung des Versuchsprotokolls.....	86
3.	Interleukin-6 Bioassay.....	86
3.1.	Material.....	87
3.1.1.	Verwendete Substanzen.....	87
3.1.2.	B9 Zelllinie.....	87
3.1.3.	Vorbereitung.....	88
3.2.	Methoden.....	88
3.2.1.	Durchführung des Assays.....	88

4. Prostaglandin E₂ ELISA	90
4.1. Material.....	91
4.1.1. Verwendete Substanzen.....	91
4.1.2. Lavageproben	91
4.1.3. Vorbereitung	91
4.2. Methoden	92
4.2.1. Versuchsablauf/Auswertung.....	92
5. Immunhistochemie (Free Floating).....	93
5.1. Material.....	93
5.1.1. Gewebe	93
5.1.2. Antikörper.....	93
5.1.2.1. Primäre Antikörper.....	93
5.1.2.2. Sekundärer Antikörper	96
5.1.2.3. Amplifizierungsmethoden.....	96
5.1.2.4. DAB-Detektionssystem nach Amplifizierung	96
5.1.3. Kernfarbstoff	97
5.1.4. Verbrauchsmaterialien.....	97
5.1.5. Mikroskop.....	97
5.2. Methoden	98
5.2.1. Herstellung der Gefrierschnitte	98
5.2.2. Versuchsprotokoll.....	99
5.2.3. Mikroskopie.....	100
5.2.4. Quantifizierung der STAT3-positiven Zellen	100
6. Immunfluoreszenz für Doppelmarkierungen	101
6.1. Material.....	101
6.1.1. Gewebe	101
6.1.2. Antikörper.....	101
6.1.2.1. Primäre Antikörper.....	101
6.1.2.2. Sekundäre Antikörper	101
6.1.2.3. Detektionssystem	102
6.1.3. Fluoreszenz-Kernfarbstoff.....	102
6.1.4. Verbrauchsmaterialien.....	103
6.1.5. Mikroskop.....	103

6.2.	Methode	104
6.2.1.	Herstellung der Gefrierschnitte	104
6.2.2.	Arbeitsprotokoll.....	105
6.2.3.	Mikroskopie.....	106
6.2.4.	Quantifizierung der Ergebnisse	107
7.	Erstellung von „Brain maps“ des Meerschweinchengehirns	107
7.1.	Material.....	107
7.2.	Methode	108
8.	Enzymatischer Nachweis der NADPH-Diaphorase.....	109
8.1.	Material.....	109
8.1.1.	Gewebe	109
8.1.2.	Verbrauchsmaterialien.....	109
8.2.	Methode	110
8.2.1.	Arbeitsprotokoll.....	111
8.2.2.	Mikroskopie.....	111
9.	<i>In situ</i> Hybridisierung von COX-2 mRNA.....	111
9.1.	Material.....	112
9.1.1.	Gewebe	112
9.1.2.	Verbrauchsmaterialien.....	112
9.1.2.1.	Herstellung der Sonden	112
9.2.	Methode	113
9.2.1.	Arbeitsprotokoll.....	114
10.	Auswertung und Statistik	114
10.1.	Daten zur Körperkerntemperatur.....	114
10.2.	Daten zu den IL-6 Bioassays.....	116
10.3.	Daten zum PGE ₂ Immunoassay.....	117
10.4.	Daten zu der STAT3 Signal-Zählung.....	118
IV.	ERGEBNISSE	119
1.	Nukleäre Translokation des Transkriptionsfaktors STAT3 im Meerschweinchengehirn während systemischer oder lokaler Inflammation	119

1.1.	Fieber und zirkulierendes IL-6 nach systemischer oder lokaler Gabe von LPS	119
1.2.	Nukleäre STAT3-Translokation in Gehirnzellen nach systemischer oder lokaler Gabe von LPS.....	126
1.2.1.	Verteilung der nukleären STAT3-Signale im Meerschweinchenhirn	128
1.2.2.	STAT3-Signalverteilung in den sensorischen CVOs und dem hypothalamischen <i>Nucleus supraopticus</i> (SON).....	133
1.2.2.1.	Qualitative Analyse	133
1.2.2.2.	Quantitative Analyse	138
1.2.2.3.	Zusammenfassung.....	139
2.	Charakterisierung des zellulären Phänotyps der potenziell durch IL-6 aktivierten Zellen	141
2.1.	vW-positive Endothelzellen und GFAP-positive Astrozyten	143
2.1.1.	Verteilung vW-positiver Endothelzellen und GFAP-positiver Astrozyten in den CVOs.....	146
2.2.	NADPH-Diaphorase-positive Zellen.....	151
3.	Die Rolle von Prostaglandinen bei der Fieberentstehung im Modell der lokalen Inflammation	152
3.1.	Induktion von COX-2 im Gehirn	152
3.2.	Dosis-abhängige Modulierung der lokal induzierten Fieberreaktion durch Diclofenac.....	157
3.2.1.	Contralaterale Gabe von Diclofenac	164
3.3.	Lokale Bildung von PGE ₂	167
4.	Zusammenfassung der Ergebnisse.....	169
V.	DISKUSSION	171
1.	Humorale Hypothese zur Fieberentstehung	171
1.1.	Rolle von IL-6	171
1.2.	Rolle der zirkumventrikulären Organe (CVOs)	172
1.3.	Rolle der einzelnen aktivierten Zellfraktionen.....	177
1.3.1.	Astrozyten.....	177
1.3.2.	Endothelzellen	178
1.3.3.	Andere Zell-Phänotypen.....	181

2. Grenzen der Aussagekraft der Studie	182
2.1. Problem der Detektion.....	182
2.1.1. SOCS als Alternative zum Aktivierungsmarker STAT3	183
2.2. Problem der physiologischen Bedeutung	184
2.2.1. Pharmakologische Blockade der IL-6 Wirkung.....	184
3. Nervale Hypothese zur Fieberentstehung	185
3.1. Nachweis und Bedeutung von COX-2 und PGE ₂	185
3.2. Nachweis und Bedeutung von peripheren Thermorezeptoren	189
4. Mechanismen des Zusammenspiels humoraler und neuronaler Signale	191
4.1. Abhängigkeit vom Ausmaß des Entzündungsreizes	193
4.2. Bedeutung bei akuten lokalen Verletzungen.....	194
5. Schlussfolgerung und Zukunftsperspektiven.....	195
VI. ZUSAMMENFASSUNG.....	196
VII. SUMMARY.....	198
VIII. ABKÜRZUNGEN.....	200
IX. LITERATURVERZEICHNIS	203
X. ANHANG	247
1. Publikationen	247
1.1. Originalarbeiten in Fachzeitschriften	247
1.2. Veröffentlichte Abstrakts	247
1.3. Buchkapitel.....	248
2. Danksagung.....	249
3. Erklärung.....	250

I. EINLEITUNG

Entzündungsprozesse unterschiedlicher Schweregrade sind bei Mensch und Tier häufig vorkommende Reaktionen des Organismus auf Verletzungen oder Infektionen. Entzündungen kennt man aus eigener Erfahrung, beispielsweise als Folge einer Wunde am Finger. Gemeint sind dabei im Allgemeinen Prozesse, die aufgrund besonderer Symptome auffallen. Man kennt die lokal entstehende Rötung (*Rubor*), die Überwärmung (*Calor*), die Schwellung (*Tumor*), den Schmerz (*Dolor*) und die damit verbundene gestörte Funktion des betroffenen Körperteils (*Functio laesa*), wie zum Beispiel der entzündete Finger, den man nicht mehr normal bewegen kann. Es handelt sich dabei also meistens um lokal begrenzte Veränderungen. Auch das Phänomen Fieber ist jedermann aus eigener Erfahrung bekannt. Dieser Zustand ist häufig verbunden mit Müdigkeit, Appetitlosigkeit, reduzierter Aktivität und allgemeinem Krankheitsgefühl. Beim Fieber handelt es sich um das klassische Allgemeinsymptom einer Entzündung, das nicht mehr nur lokal auf einen Körperteil, wie z.B. den Finger, begrenzt ist. Vielmehr handelt es sich um eine Reaktion des ganzen Körpers. Im Rahmen der Einleitung zu dieser Arbeit sollen zunächst die Mechanismen lokaler und andererseits systemischer Entzündungsprozesse dargestellt werden. Über den neuesten Stand der Forschung im Literaturteil leiten sich schließlich daraus die Fragestellungen dieser Arbeit her.

1. Lokale und systemische Entzündungsreaktionen

Worum handelt es sich bei einer lokalen Entzündungsreaktion? Aus dem lateinischen Wort „*inflammare*“ hergeleitet hat der Begriff Entzündung die Bedeutung von „brennen“ oder „inneres Feuer“. Damit wird der schon vorher beschriebene Komplex an charakteristischen Symptomen (*Rubor, Tumor, Dolor, Calor und Functio laesa*) bildlich sehr gut beschrieben. Als Auslöser dieser Prozesse unterscheidet man verschiedene Noxen.

Prinzipiell können solche Noxen entweder von außen (exogen) oder von innen durch körpereigene (endogene) Prozesse und Mediatoren verursacht werden. Neben chemischen und physikalischen Reizen können auch belebte infektiöse Reize oder auch Hypoxidosen zu einer Entzündung führen. In wie weit eine Inflammation lokal begrenzt ist oder bleibt, hängt von Ausmaß und Art der Noxe ab. Zu den chemischen Noxen gehören anorganische Verbindungen, wie z. B. starke Basen und Säuren, aber auch verschiedene Schwermetallverbindungen (zum Beispiel Blei). Auch organische Verbindungen wie Schlangen- und Insektengifte können Entzündungsreize darstellen. Ob physikalisch über thermische Schädigung und Strahlung, ob chemisch oder durch belebte Noxen, es kommt schließlich zu einer Gewebeschädigung oder zur Abgabe von Fremdeiweißen bzw. zum Auftreten von Fremdkörpern im Organismus, was letztendlich zur Entzündung (Inflammation) führt. Belebte Noxen sind unter anderem Bakterien, Pilze, Protozoen, Würmer und Viren (Thews, 1999). Bei den endogenen Mechanismen sind Autoimmunreaktionen wie z.B. bei der rheumatoiden Arthritis zu nennen. Im Rahmen der Vorstellung von

Fiebermodellen wird noch detaillierter auf einige dieser Entzündungsreize eingegangen (Kapitel II 2).

Es gibt zwei primäre Funktionen, denen eine Inflammation im Rahmen der Homöostase dient. Zur Aufrechterhaltung eines konstanten inneren Milieus soll in einer frühen Phase der Reiz beziehungsweise das Agens zerstört, inaktiviert oder neutralisiert werden, um weiteren Schaden zu verhindern. Prinzipiell können alle Zellen des Körpers potenziell in die Entstehung und Entwicklung dieses wichtigen, der Homöostase dienenden Prozesses einbezogen sein. In einer späteren Phase soll im Dienste des Heilungsprozesses die betroffene Körperregion von Zelltrümmern gesäubert werden, damit es zu einer vollständigen Regeneration des Gewebes kommen kann.

Man unterscheidet nach dem zeitlichen Verlauf zwischen perakuten, akuten, subakuten und chronischen Entzündungen. Es soll hier allerdings nur die akute Entzündung näher beschrieben werden, die sich durch eine starke, allerdings zeitlich begrenzte Reaktion des Körpers auf den Reiz auszeichnet (Thews, 1999).

Eine Inflammation lässt sich wie folgt charakterisieren. Eine Entzündung kann prinzipiell in allen durchbluteten Geweben auftreten und geht mit vaskulären Effekten einher, die über Entzündungsmediatoren vermittelt sind. Es handelt sich dabei einerseits um Vasodilatation, die eine Verlangsamung des Blutstromes zur Folge hat, was man als Stase bezeichnet. Andererseits kommt es zur erhöhten Gefäßpermeabilität, die wiederum zum Ausströmen von Flüssigkeit und Plasmaproteinen aus dem Gefäßsystem in das interstitielle Kompartiment des Gewebes führt.

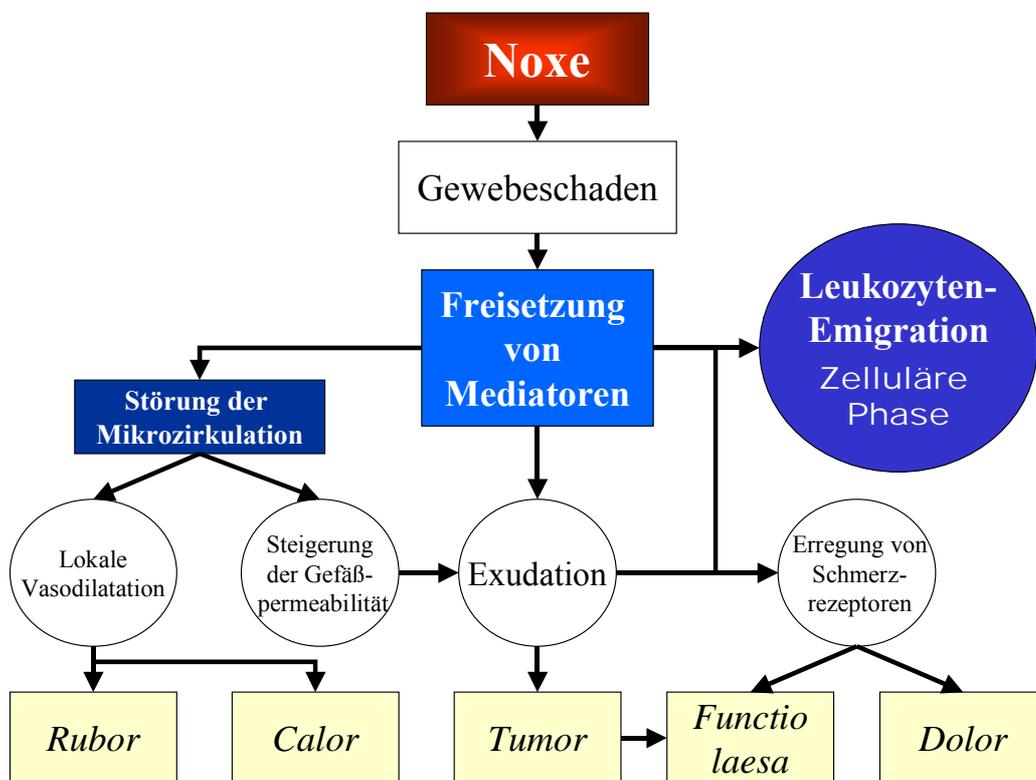


Abbildung 1
Modell zur Beschreibung der Entstehung von lokalen Entzündungssymptomen.

Es lassen sich anhand dieser Reaktion bereits die klassischen Entzündungssymptome der akuten lokalen Inflammation hinreichend erklären, was in der Abbildung 1 schematisch dargestellt ist. Die interstitielle Ansammlung an Flüssigkeit und Plasmaproteinen entspricht einem Ödem, welches sich als **Schwellung** (*Tumor*) bemerkbar macht, die gleichzeitig auch die **Funktion** des betroffenen Körperteils einschränkt. Außerdem haben verschiedene Entzündungsmediatoren (Histamin, Bradykinin, Prostaglandine) **schmerzauslösende** Effekte (*Dolor*). An dünn myelinisierten und unmyelinisierten Nervenfasern, deren Endigungen über spezifische Rezeptoren verfügen, wirken diese Mediatoren direkt über eine Generierung von Aktionspotentialen oder indirekt über die Induktion einer Sensibilisierung. Bradykinin (B2-Rezeptor) und Histamin (H1-Rezeptor) erhöhen dabei die Phospholipase C und Proteinkinase C Aktivität, Prostaglandine erhöhen (EP₂-Rezeptor) oder senken (EP₃-Rezeptor) unter anderem die Bildung von cAMP. Das klinische Korrelat für die Vasodilatation im Kapillarnetzwerk und den postkapillaren Venolen erkennt man in der **Rötung** (*Rubor*) und **Überwärmung** (*Calor*) des entzündeten Gewebes (Fölsch, 2000).

Die frühe, exsudative Phase der lokalen akuten Entzündung wird vor allem durch vasoaktive und chemotaktische Substanzen aus verletzten Zellen im Gewebe getragen (Histamin, Bradykinin, Arachidonsäuremetabolite, Interleukin-8). Insbesondere sind Gewebsmakrophagen oder Monozyten, bei allergischen Reaktionen auch Mastzellen, an der frühen Bildung von Entzündungsmediatoren beteiligt (Baumann & Gauldie, 1994). Es kommt somit zur Freisetzung von Serotonin oder Histamin zum Beispiel aus Mastzellen, was über einen Zeitraum von etwa 12 h eine gefäßdilatierende und permeabilitätssteigernde Wirkung hat. Kinine, die über einen Zeitraum von ca. 6 Stunden wirksam sind, werden langsamer gebildet. Im Rahmen der Infiltrationsphase einer Entzündung spielen so genannte Chemokine wie Interleukin-8 (IL-8) und Eotaxin, die über ihr Konzentrationsgefälle hinweg Zellen gerichtet anlocken können, eine große Rolle bei der Extravasation. Diese Substanzen werden von Zellen des Monozyten-Makrophagen-Systems (MPS) gebildet. Schließlich schütten mehrere Zelltypen (Polymorphkernige Leukozyten, Monozyten, Lymphozyten, Fibroblasten, Endothelzellen, Gliazellen u.a.) parallel dazu fortwährend inflammatorische Botenstoffe, so genannte Zytokine, aus. Hierzu gehören Interleukin-1 β (IL1 β) und Tumor Nekrose Faktor {TNF, (Gaehtgens, 1999)}.

Es kommt zur Infiltrationsphase der Entzündungsreaktion, die zeitlich nicht deutlich von der exsudativen Phase zu trennen ist, in deren Rahmen vermehrt Zellen in das Entzündungsgebiet einwandern. Es handelt sich hierbei um einen Prozess, bei dem es über den verlangsamten Blutstrom während der Stase zu einer hydrodynamischen Margination der Leukozyten, vor allem der neutrophilen Granulozyten, kommt. Zusätzlich kommt es zur Aktivierung des Gefäß-Endothels durch proinflammatorische Zytokine (TNF, IL-1, IL-4), was zur Extoriation von Selektinen und zur Kontraktion der Endothelzellen führt, wodurch größere Zellzwischenräume entstehen (Baumann & Gauldie, 1994; Silbernagel, 1998). Mit den Oberflächenkontaktmolekülen (Selektinen) interagieren nun die randständigen neutrophilen Granulozyten, was zu einem Entlangrollen dieser Zellen am Endothel führt. Dieses Phänomen wird als „rolling“ bezeichnet. Schließlich kommt es zur Anlagerung (Adhäsion) von Neutrophilen an spezifische Integrine des Endothels. Das bedeutet, dass die

polymorphkernigen, neutrophilen Granulozyten über die geweiteten interzellulären Spalten des Endothels in den extravasalen, interstitiellen Raum migrieren können. Die gerichtete amöboide Wanderung von Leukozyten durch Gefäße in entzündete Gewebe hinein wird als Leukodiapedese, die Zellinfiltration ins Gewebe als Extravasation bezeichnet. Dabei werden phagozytosefähige Zellen des mononukleären Phagozytosesystems in das Entzündungsgebiet gelockt und sorgen dort für die Beseitigung des inflammatorischen Reizes.

Neben ihrer phagozytotischen Aktivität werden durch solche Zellen Proteasen, oxidative Sauerstoffderivate und Radikale freigesetzt, die zu einer Auslöschung des Pathogens, aber auch zur Zerstörung körpereigener Zellen führen. Zunehmend sinkt am Entzündungsort dabei der pH-Wert (Silbernagel, 1998; Fölsch, 2000). Auf die späteren Prozesse, die schließlich in der Proliferations- und Reparationsphase der Entzündung münden, soll hier nicht näher eingegangen werden, da sie für die Fragestellung dieser Arbeit nicht von zentraler Bedeutung sind.

2. Akute-Phase-Reaktion

Im späteren Verlauf der lokalen Entzündungsreaktion kommt es schließlich vermehrt zur Ausschüttung weiterer löslicher Mediatoren, wie z.B. von Prostaglandinen, proinflammatorischen Zytokinen (IL1 β ; TNF; Interleukin-6, IL-6) und Chemokinen (Eotaxin, IL-8). Wenn die lokale inflammatorische Antwort eine bestimmte Stärke überschreitet, generalisiert die Entzündung. Man spricht dann von einer systemischen, allgemeinen Entzündungsreaktion. In diesem Fall induzieren proinflammatorische Zytokine, die auch als endogene Pyrogene bezeichnet werden, die Akute-Phase-Reaktion (APR), was eine Bezeichnung für die komplexen Prozesse einer akuten generalisierten Entzündung beinhaltet (Abbildung 2). Während bakterieller Infektionen ist die APR eine straff organisierte Wirtsreaktion, die von akuten unspezifischen Abwehrmechanismen bis zur antigenspezifischen Immunabwehr reicht. Die proinflammatorischen Zytokine gelangen hierbei vermehrt in die Zirkulation und wirken daher humoral auf zahlreiche Organsysteme des Körpers (Baumann & Gauldie, 1994; Zeisberger, 1999). Dabei reagieren solche Mediatoren wie IL-1 und TNF lokal am Entzündungsursprung mit Fibroblasten und Endothelzellen und provozieren die Freisetzung einer zweiten Welle an Zytokinen. Dieser zweite Schub vermittelt dann sowohl die lokalen als auch die systemischen und zentralen Effekte der APR (Abbildung 2).

Eine der wichtigsten Komponenten der APR ist die Induktion von Akute-Phase-Proteinen in der Leber. Bei allgemeinen Entzündungsreaktionen konnte eine protektive Rolle von Akute-Phase-Proteinen zum Beispiel in transgenen Mäusen gezeigt werden, die das C-reaktive Protein überexprimierten (Xia & Samols, 1997). Circa 90 min. nach dem Beginn einer Infektion erscheint diese Gruppe von etwa 30 verschiedenen Proteinen vermehrt (z.B. Haptoglobin, Komplementfaktoren, Fibrinogen, Ceruloplasmin, Ferritin) oder vermindert (z.B. Lipoproteinlipase, Albumin, Cytochrom P₄₅₀) im Blutplasma. Sie regulieren die Immunantwort, fungieren als Inhibitoren oder Mediatoren inflammatorischer Prozesse und agieren als Transportmoleküle für Produkte, die bei der Entzündung entstehen. Sie spielen auch eine Rolle bei der Gewebeheilung und deren Modulierung. Manche der APR-Proteine

haben Zytokin-ähnliche Funktionen oder wirken chemotaktisch. Es werden dabei unter anderem der Komplementfaktor 3-Rezeptor, das C-reaktive Protein und das Lipopolysaccharid-bindende Protein nach Stimulation durch IL-1 β , IL-6 und TNF- α in Hepatozyten gebildet (Baumann & Gauldie, 1994; Wan *et al.*, 1995; Kirschning *et al.*, 1997). Das C-reaktive Protein bindet dabei an Zellwände von so genannten C-Typ Pneumococcen, während das LPS-Bindungsprotein an LPS-Komponenten der äußeren Membran gram-negativer Bakterien anknüpft. Zusätzlich wird über IL-1 β in der Leber die Aufnahme von Eisen und die Produktion von Ferritin, einem Eisen-transportierenden Plasmaprotein, gesteigert. Damit wird vermehrt freies Eisen gebunden und der Serumspiegel an für Bakterien verfügbarem Eisen sinkt (Dinarello, 1991). Niedrige Eisenspiegel im Blut können jedoch an sich ein bakterielles Wachstum nicht beeinflussen. Zusammen mit der erhöhten Temperatur, dem infektionsbegleitenden Fieber, wird das Wachstum solcher Mikroorganismen hingegen gehemmt (Kluger & Rothenburg, 1979). Dies liegt wahrscheinlich daran, dass bei Bakterien die Synthese an Eisenchelat-bildenden Komponenten bei einer Temperatur höher als 37°C reduziert ist (Garibaldi, 1972). Abgesehen davon wird im Zuge der APR das Knochenmark zur vermehrten Leukozytenausschüttung veranlasst, das Immunsystem stimuliert, im Fettgewebe Lipolyse ausgelöst und die Muskulatur in einen katabolen Zustand versetzt. Bei dem Gehirn handelt es sich um ein weiteres sehr wichtiges Organsystem, welches im Rahmen dieser Allgemeinreaktion betroffen ist. Man fasst die damit verbundenen Effekte als zentralnervös gesteuerter Anteil der APR zusammen.

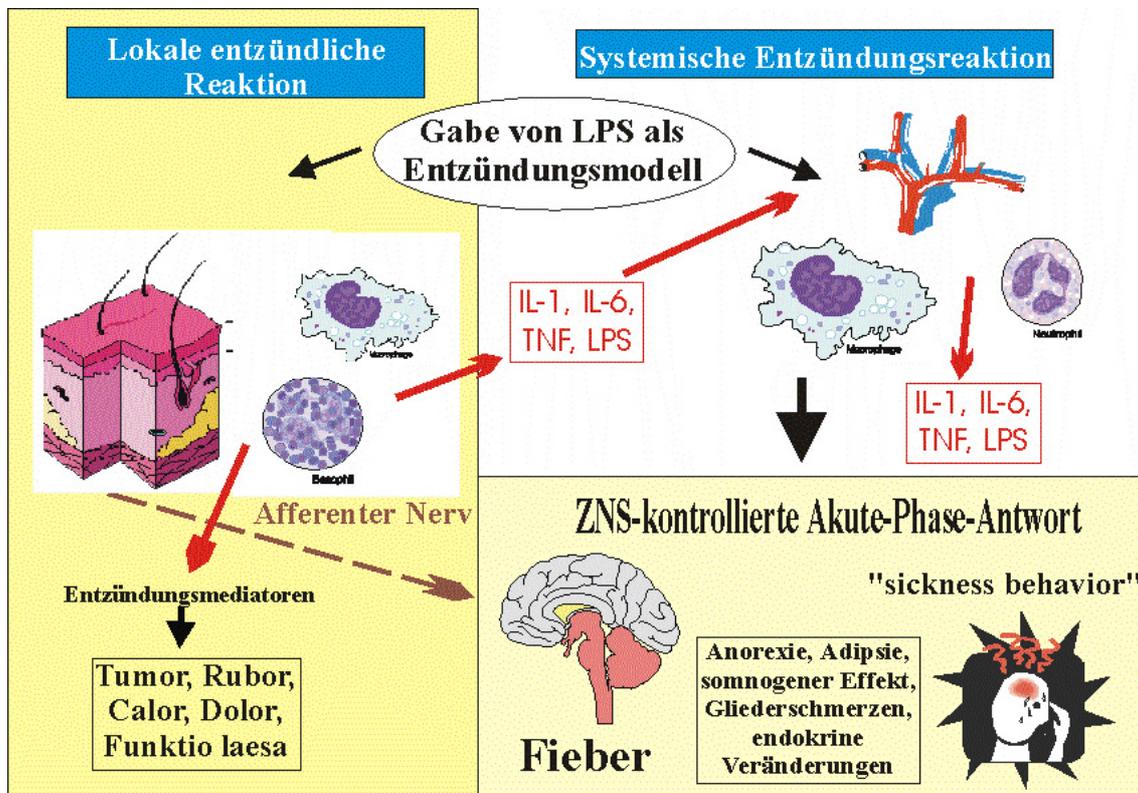


Abbildung 2

Schematische Gegenüberstellung von LPS-induzierten systemischen und lokalen Entzündungsprozessen und der damit verbunden Entstehung der zentralnervös kontrollierten Akute-Phase-Reaktion (APR).

2.1. Zentralnervös gesteuerte Akute-Phase-Reaktion

Tiere und Menschen zeigen im Zuge verschiedenster Genesen einer akuten generalisierten Entzündung (APR) Symptome, die weitgehend ähnlich oder gar identisch zu sein scheinen. Solche Symptome unterscheiden sich zumeist nur in der Stärke der Ausprägung. Es handelt sich dabei um Effekte der APR, die durch das Gehirn gesteuert werden. Darunter werden all die Symptome verstanden, die gewöhnlich beim Auftreten von Fieber zu beobachten sind. Fieber selbst ist ebenfalls ein durch das zentrale Nervensystem (ZNS) induzierter Prozess, der sehr gut dokumentierbar und objektivierbar ist. Fieber-begleitende Symptome der ZNS-kontrollierten APR sind Anorexie, Adipsie, Somnolenz (beziehungsweise verändertes Schlafverhalten), Abgeschlagenheit, Lustlosigkeit, Konzentrationsschwäche, Bewegungsarmut, Aktivitätsminderung, endokrine Veränderungen, verringerte Libido und reduzierte soziale Interaktion {Abbildung 2, (Kushner, 1988)}. Diese schwerwiegenden unspezifischen Veränderungen in der Psyche und dem Verhalten von Tier und Mensch werden kollektiv als „Sickness Behavior“ bezeichnet (Kent *et al.*, 1992; Dantzer, 2001a, b; Kelley *et al.*, 2003). Im Folgenden soll kurz auf die beiden Symptome Fieber und „Sickness Behavior“ eingegangen werden.

2.1.1. „Sickness Behavior“

Der Definition nach stellt „Sickness Behavior“ eine Gruppe von Symptomen und Anzeichen dar, die Situationen begleitet, bei denen vermehrt Zytokine auftreten. Unter normalen Umständen steigt zusätzlich gleichzeitig die Körpertemperatur an {Glossary of terms of thermal physiology (IUPS, 2001)}. Interessanterweise konnte festgestellt werden, dass viele der unspezifischen Krankheitssymptome bei Labortieren in Infektionsmodellen denjenigen Symptomen ähneln, die als Nebenwirkung bei Zytokintherapien krebserkrankter Patienten beobachtet wurden (Dantzer & Kelley, 1989). Dadurch und durch Untersuchungen der Wirkung der einzelnen Zytokine auf das Verhalten von Tieren konnte die Kausalität zwischen erhöhten Zytokinspiegeln im Blutplasma und dem Auftreten von „Sickness Behavior“ nachgewiesen werden (Bluthé *et al.*, 1992).

Man kann „Sickness Behavior“ auch als eine Anpassung von Verhaltensmustern an Perioden der Infektion des Organismus definieren (Konsman *et al.*, 2002). Es handelt sich hierbei nicht, wie man vermuten könnte, um ein (reaktives) passives Verhalten aufgrund von Schwäche, die sich sekundär als Folge der Energie-raubenden Prozesse der Immunabwehr entwickelt (Holmes & Miller, 1963). Vielmehr ist „Sickness Behavior“ ein Teil der natürlichen Reaktionen, die zur Erhaltung der Homöostase und der Bekämpfung von Infektionen dienen. Während der APR führten bei Ratten der vermehrte Schlaf, die zusammengerollte Position und das veränderte Verhalten zur Einsparung von Wärme und Energie zur Bekämpfung der entzündungsauslösenden Noxe (Hart, 1988). Diese Verhaltensveränderungen werden als Ausdruck für einen Status der Motivation angesehen, welcher die Priorität des Organismus dahin richtet, Resistenz und Gegenwehr für pathogene Eindringlinge zu erbringen. Es kommt damit gleichzeitig auch zu einer zügigen Erholung von der Infektion, da sich der betroffene Organismus ausruht und Energie einspart. Die

Verbreitung der Krankheit kann zudem verhindert werden, weil nicht mehr dem normalen Fressverhalten nachgegangen wird, welches einerseits einen zusätzlichen Energieverbrauch zur Folge hätte, andererseits auch die Übertragung des Erregers auf andere Tiere vereinfachen würde (Johnson, 2002).

Inflammatorische Erkrankungen führen dazu, dass der Organismus durch Mobilisierung von Energiereservoirs (Fettgewebe, Muskulatur) in einen katabolen Zustand gerät. Deshalb wirkt es auf den ersten Blick paradox, dass die Nahrungsaufnahme gehemmt wird, obwohl sie ja primär zur Energieversorgung dient. Anorexie hat jedoch anscheinend einen schützenden Effekt für den infizierten Organismus. So konnte gezeigt werden, dass Mäuse, die mit *Listeria monocytogenes* infiziert wurden, bei Zwangsfütterung wesentlich niedrigere Überlebensraten aufwiesen als die Tiere, die *ad libitum* gehalten wurden, obwohl sie stark an Gewicht verloren und anorektisch waren (Murray & Murray, 1979). Ebenso erhöhte ein Futterentzug einige Tage vor einer bakteriellen Infektion die Überlebensraten von Ratten (Wing & Young, 1980). Auch vermehrter Schlaf als weitere Komponente des „Sickness Behavior“ scheint einen positiven Effekt bei der Überwindung einer Infektion zu haben. Bei einem Infektionsversuch starben zum Beispiel vor allem diejenigen Kaninchen, die weniger geschlafen hatten als andere (Toth *et al.*, 1993).

Interessanterweise beschreibt man den aktiven Anteil an den Verhaltensänderungen im Zuge einer APR oder Infektion als eine Veränderung der Motivation des Individuums. Motivation wird als zentrale Flexibilität des Organismus bezeichnet, auf verschiedene Arten auf einen Stimulus zu reagieren. Das bedeutet, dass auf einen Reiz nicht immer gleich reagiert wird, sondern den äußeren Umständen entsprechend, die durch die Umwelt getragen sind. Dies zeigten zum Beispiel Untersuchungen zum mütterlichen Verhalten von Ratten und Mäusen im Umgang mit ihren noch poikilothermen Welpen. Je nach aktueller Umgebungstemperatur wurden die Welpen eines laktierenden Muttertieres nach einer LPS-Behandlung von ihr in unterschiedlicher Weise betreut. Bei Kälte wurden die Welpen eingesammelt und ein Nest zum Wärmen des Nachwuchses gebaut. Bei höheren Temperaturen war die Motivation nicht groß genug, neben dem Einsammeln der Welpen noch zusätzlich ein Nest zu bauen (Aubert *et al.*, 1997). Anhand der geschilderten Beispiele wird deutlich, dass es sich bei dem Symptom „Sickness Behavior“ um eine sehr komplexe Palette an Verhaltens-Symptomen handelt, deren zentralnervöse Steuerung intensiv erforscht wird (Dantzer, 2001a, b).

2.1.2. Fieber

Beim Fieber handelt es sich um das wohl bekannteste zentralnervös kontrollierte Krankheitssymptom. Im Rahmen der APR ist dieses Symptom von einer Reihe koordinierter autonomer, neuroendokriner Reaktionen sowie zweckmäßigen Verhaltensänderungen begleitet. Fieberreaktionen sind relativ stereotyp, kommen bei fast allen Vertebraten vor und können unabhängig davon durch unterschiedlichste Noxen erzeugt werden. Thermophysiologen definieren Fieber bei ruhenden Tieren durch eine Erhöhung der Körperkerntemperatur von 1 bis zu 4°C über den Normalwert (Saper, 1998). Fieber tritt nicht nur bei Säugetieren und Vögeln sondern auch bei wechselwarmen Tieren auf, die im

Krankheitsfall eine wärmere Umgebung aufsuchen, um hierdurch eine Körpertemperaturerhöhung zu erzielen (Kluger *et al.*, 1975). Mittlerweile wurde bei über 26 nicht-homeothermen Tierarten eine, durch Verhaltensmaßnahmen induzierte, infektionsbedingte Fieberreaktion nachgewiesen (Kluger, 1991). Fieber ist allerdings zusätzlich im Zusammenhang mit den Abwehrmechanismen einer APR als adaptive Reaktion im Rahmen der Immunantwort zu sehen. Es handelt sich demzufolge um mehr als nur eine aktive Erhöhung der Körpertemperatur (Zeisberger, 1999). Trotzdem ist Fieber nicht die sich quantitativ am stärksten ändernde physiologische Variable im Rahmen der APR. Vielmehr erhöht sich die Rektaltemperatur von Kälbern bei einem durch Zeisberger 1999 durchgeführten Vergleich der Daten von Bieniek *et al.*, 1998 lediglich um 2 %. Solch ein Krankheitsverlauf hingegen ist von einem 15-25 tausendfachen Anstieg der Zytokin-Plasmaspiegel (TNF, Interferon), einer 50 %igen Erhöhung der Herzfrequenz und einer 150 %igen Erhöhung der Plasmaglukosewerte begleitet. Selbst wenn man davon ausgeht, dass die Körperkerntemperatur bei erkrankten Kälbern um bis zu 5°C ansteigen kann, so handelt es sich trotzdem nur um eine Steigerung der normalen Körperkerntemperatur von weniger als 20 %. Beim Fieber scheint es sich also nicht um die bedeutendste Änderung eines physiologischen Parameters im Rahmen der APR zu handeln. Dennoch ist zu betonen, dass in vielen Fällen eine Genesung von Fieber begleiteten Krankheiten schneller und erfolgreicher erzielt wird (Klein & Cunha, 1996). Gleichwohl handelt es sich beim Fieber um einen sehr Energie-raubenden Prozess. Jede Erhöhung der Körpertemperatur um 1°C hat eine Zunahme der metabolischen Rate um 13 % zur Folge (Dubois, 1936, 1948). Anders ausgedrückt, steigt der Energieumsatz bei einem Anstieg der Körpertemperatur von 2-3°C um bis zu 20 % an (Roth, 2002). Man interpretiert diesen Effekt als Resultat des Temperaturkoeffizienten stoffwechselabhängiger Prozesse (Q10-Effekt). Für das Symptom Fieber im lebenden Organismus bedeutet dies, dass schon allein durch den physikalischen Zustand der Temperaturerhöhung metabolische Prozesse beschleunigt ablaufen. Es wird zum Beispiel die Herzkreislaufarbeit gesteigert, der Puls steigt so pro °C fieberhafter Temperaturerhöhung um 9 Schläge pro min. an (Karjalainen & Viitasalo, 1986). Es stellt sich eine katabole Stoffwechsellaage ein. Einige Komponenten der Immunabwehr können alleine aufgrund dieser Tatsache durch beschleunigte Reaktionen verstärkt ablaufen.

Ein Mechanismus, durch den Fieber bei der Überwindung bakterieller Infektionen beiträgt, beruht auf der Tatsache, dass viele Mikroorganismen über ein Temperaturoptimum bezüglich ihres Wachstums verfügen. Dies bedeutet, dass der Wirtsorganismus einen Vorteil gegenüber den eindringenden Bakterien gewinnen kann, wenn deren Wachstum gehemmt wird. So liegt z.B. unter *in vitro* Bedingungen das Wachstumsoptimum von Pneumococcen bei 37°C, während bei 41°C kein Wachstum dieser Bakterien mehr stattfindet (Small *et al.*, 1986). Hingegen bleibt das Wachstum von *E. coli* und *Pasteurella multocida* über die ganze Spanne der physiologisch vorkommenden Körperkerntemperaturen unbeeinflusst (Kluger & Vaughn, 1978; Mackowiak *et al.*, 1981). Bei einigen Bakterien bewirkt eine Temperaturerhöhung zumindest eine Verlangsamung des Wachstums (Small *et al.*, 1986). Diese Art-spezifischen Unterschiede des bakteriellen Wachstums bei Fieber können zum einen teilweise mit dem bereits beschriebenen Effekt des verringerten Plasma-Eisenspiegels erklärt werden. Zum

anderen wirkt sich ein zweiter Effekt der erhöhten Körperkerntemperatur auf die Spezies-spezifische Syntheseleistung zum Beispiel Gram negativer Bakterien aus. Fieber hemmt bei höheren Temperaturen die Bildung protektiver Membran-Lipopolysaccharide (LPS). Dadurch wird es dem Serum-Komplement-System ermöglicht, die Bakterien leichter zu perforieren und abzutöten (Green & Vermeulen, 1994). Prinzipiell wird das Immunsystem durch Fieber stimuliert, wenn es in den physiologischen Grenzbereichen liegt und nicht zu hoch ist. Gesteigert werden beim Fieber unter anderem die Antigenerkennung sowie die Mobilität und Phagozytoseaktivität von Leukozyten (Chen *et al.*, 2004). Es gibt auch Hinweise dafür, dass die Temperaturerhöhung an sich die Expression pyrogener Zytokine hochreguliert (Hasday, 1996; Jiang *et al.*, 1999a; Jiang *et al.*, 1999b).

Ob und wie stark sich ein Fieber auf einen gegebenen Stimulus manifestiert, hängt von unterschiedlichen Randbedingungen ab. Neben individuellen Unterschieden ist die Fieberreaktion bei Schwangeren und Neonaten beispielsweise prinzipiell unterdrückt (Zeisberger *et al.*, 1981; Cooper *et al.*, 1988). Genauso wie die Immunabwehr eines jeden Individuums in Ausmaß und Effektivität sehr unterschiedlich ausfällt, sind solche Unterschiede auch bei der Ausbildung des Fiebers zu beobachten.

Eine besondere Bedeutung wird der experimentellen Fieberforschung nicht zuletzt dadurch zu Teil, dass speziell im Bereich der Intensivmedizin weitreichende Probleme im Zusammenhang mit der Thermoregulation auftreten. Vor allem sehr schwache Menschen oder Tiere überleben diesen Energie-raubenden Prozess manchmal nicht. Durch die instrumentelle Medizin ist es zudem häufig nicht einmal mehr möglich, ein Fieber festzustellen, da die aktuelle Körpertemperatur bereits stark von der Therapie und den eingesetzten Geräten derart beeinflusst wird, dass eine Temperaturerhöhung oder Erniedrigung nicht immer eintritt. Damit fehlt dieses so wichtige Symptom, mit dessen Hilfe ein Monitoring der APR erst möglich ist. Fieber stellt nach Erfindung des Thermometers im 17. Jahrhundert seit dem letzten Jahrhundert ein Instrument dar, Diagnosen zu unterstützen und den Verlauf von Infektionen zu kontrollieren (Roth, 2002). Zusätzlich könnte ein besseres Verständnis der Prozesse in der APR und ein selektives Eingreifen, eine höhere Lebensqualität für chronisch Kranke und vor allem Krebspatienten im Zuge von Therapieansätzen mit Hilfe von Zytokinen bieten.

2.1.3. Biologischer Nutzen

Der biologische Nutzen der zentralnervös gesteuerten Akute-Phase-Reaktion liegt offensichtlich darin, dass sich der Organismus zusätzlich zu den angeborenen und erworbenen Mechanismen der Immunabwehr der Situation einer Infektabwehr adäquat anpasst. „Sickness Behavior“ scheint hierbei vor allem Strategien der Energieeinsparung zu unterstützen. Die Priorität wird also ganz und gar auf eine möglichst ungestörte und effektive Abwehr gelegt, die eine schnelle Genesung gewährleisten soll.

Fieber als Energie-verschwendender Prozess wurde schon seit dem Altertum als adaptive Wirtsantwort angesehen, aber bezüglich seines Nutzens auch kontrovers diskutiert (Roth, 2002). Da es in der Evolution stark konserviert ist, könnte man darauf schließen, dass es sich beim Fieber um einen überlebenswichtigen Faktor handelt. Mit wenigen Ausnahmen können

alle endothermen und ektothermen Vertebraten, aber auch zahlreiche Invertebraten wie z.B. die Kakerlake, nach Stimulation mit LPS Fieber entwickeln (Kluger & Rothenburg, 1979; Kluger, 1991). Bei vielen ektothermen Tieren steht Fieber im direkten Zusammenhang zur Umgebungstemperatur (Kluger *et al.*, 1975). Indem solche Tiere vermehrt warme Plätze aufsuchen, können sie aktiv ihre Körpertemperatur steigern. Die Thermoregulation geschieht hierbei also vornehmlich über Verhaltensänderungen. Wird Fieber allerdings pharmakologisch verhindert, steigt beispielsweise bei Eidechsen aber auch anderen Tieren die Mortalität bei Infektionen mit für die jeweilige Tierart pathogenen Bakterien drastisch an (Bernheim & Kluger, 1976; Kluger *et al.*, 1998; Jiang *et al.*, 2000). Ähnliche Studien wurden auch mit Kaninchen durchgeführt (Kluger & Vaughn, 1978; Vaughn *et al.*, 1980; Kurosawa *et al.*, 1987). Man beobachtete zudem, dass Fieber bis zu einer Erhöhung der Körpertemperatur um 2,25°C die Überlebensrate steigerte, darüber hinaus allerdings verringerte (Kluger & Vaughn, 1978). Daraus geht hervor, dass zumindest moderates Fieber bei Infektionen wichtig für das Überleben des Organismus ist. Gleichermaßen konnten retrospektive Studien bestätigen, dass Patienten, die ein moderates Fieber entwickelten, eine bakterielle Peritonitis (Weinstein *et al.*, 1978) oder Sepsis (Bryant *et al.*, 1971; Mackowiak *et al.*, 1980) zu einem höheren Prozentsatz überlebten als solche, bei denen sich kein Fieber manifestierte.

Letztendlich ist jedoch einzuräumen, dass es noch keinen empirischen Beweis dafür gibt, dass Fieber zur Erhaltung der Homöostase immer von Nutzen ist. Gerade Fehlregulationen der Fieberantwort führen im Rahmen der APR häufig zu lebensbedrohlichen Situationen. Es kann zum Beispiel zu einem Endotoxinschock, zum systemischen inflammatorischen Syndrom (SIRS) oder zu Sepsis kommen, was schließlich im Zusammenbruch des Abwehrmechanismus als multiples Organversagen enden kann (Zeisberger, 1999). Neuere Studien haben für Patienten mit schwerer Sepsis Mortalitätsraten von bis zu 40 % festgestellt (Bone *et al.*, 1989; 1990). Gerade deshalb ist es wichtig, die genaueren zellulären und molekularen Mechanismen dieser Prozesse näher zu analysieren. Obwohl Zytokin-induziertes Fieber und „Sickness Behavior“ bei akuten Infektionskrankheiten adaptiv zu sein scheinen, so werden sie maladaptiv, wenn sie länger andauern bzw. chronisch werden oder einen bereits geschwächten Organismus zu viel Energie kosten (Konsman *et al.*, 2002). Deshalb erscheint es auch sinnvoll, dass bei Schwangerschaft beziehungsweise Trächtigkeit Fieber physiologisch unterdrückt ist, um nicht zusätzlich ein biologisches System zu überlasten, das ausreichend energetisch versorgt werden muss.

Der genaue Zusammenhang zwischen Depressionen und „Sickness Behavior“ ist noch immer unbekannt, wird aber postuliert (Dantzer, 2001b). Das postvirale Müdigkeitssyndrom ist beispielsweise von psychischen Veränderungen begleitet. Depressionen entwickeln sich häufig nach der Erholung von viralen Infektionen (Komaroff *et al.*, 1996). Bei Krebspatienten wäre eine Verbesserung des häufig hoffnungslosen und hilflosen Gemütszustandes, der sich bei Zytokintherapie noch zusätzlich (Depressionen) verschlimmert, ebenfalls wünschenswert. Ziel wäre die potenziell schädlichen oder unangenehmen Begleiterscheinungen von Infektionen und anderen Krankheitszuständen zu modulieren, ohne dabei die vom Patienten aktiv eingestellten Veränderungen des Thermoregulationssystems zu manipulieren.

II. LITERATURÜBERSICHT

1. Thermoregulation

Sowohl der Fieberanstieg als auch die Phase der Entfieberung sind in der Regel von Reaktionen begleitet, die im Dienste der Thermoregulation stehen (Schüttelfrost, starkes Schwitzen). Dies bedeutet, dass es beim Fieber zu aktiv eingestellten Veränderungen im Thermoregulationssystem kommt. Prinzipiell ist die Konstanz der Körpertemperatur als Resultat einer ausgeglichenen Wärmebilanz anzusehen; das heißt, sie setzt eine Gleichheit von Wärmeproduktion und Wärmeabgabe voraus.

Bei Mensch und Tier erfolgt die Energiezufuhr über exogen zugeführte chemische Energie. Diese wird in Form von Nahrung aufgenommen und dazu genutzt, um durch biologische Oxidation körpereigene Energielieferanten zu produzieren. Im Rahmen biologischer Oxidationen wird in erster Linie Adenosintriphosphat (ATP) gebildet. Bei dieser Reaktion, weiteren Biosynthesen, Muskelkontraktionen und aktiven Transportprozessen wird ein Großteil der ursprünglich eingesetzten chemischen Energie in Form von Wärmeenergie frei. Dies bedeutet, dass der homeotherme Organismus darauf angewiesen ist, über verschiedene Mechanismen permanent Wärme abzugeben, um sich nicht kontinuierlich aufzuheizen. Rein physikalisch ist eine Wärmeabgabe evaporativ, konduktiv, konvektiv und über Wärmestrahlung möglich (Roth, 2003). Das hängt jedoch entscheidend von der jeweiligen Umweltsituation ab. Ein bestehender Temperaturgradient zwischen dem Organismus und der Außenwelt ermöglicht eine Wärmeabgabe, kann aber unter Umständen auch schnell zu einem zu großen Wärmeverlust führen. Dies macht das Einbeziehen verschiedener Wärmespar- und Wärmebildungsmechanismen erforderlich. Schon allein durch die sich permanent ändernde Variable Außentemperatur ist zum Erreichen einer gleichbleibenden Körperkerntemperatur eine permanente Wärmeregulation notwendig. Physiologisch erfolgt die Konstanthaltung der Körpertemperatur in einem definierten Normalbereich über autonome und verhaltensgesteuerte Regelmechanismen. Dafür gibt es einen gerichteten, vom Gehirn organisierten und kontrollierten Regelkreis (Zeisberger, 1999).

Das Konstanthalten der Körperkerntemperatur ist sehr wichtig, wobei zwei Extreme der Körpertemperaturentwicklung verhindert werden sollen. Es handelt sich dabei zum einen um die Vermeidung von Körpertemperaturen von über 41°C, die unter anderem zu dem so genannten Hitzeschlag-Syndrom führen. Hierbei kommt es zu einer toxischen Wirkung auf Nervenzellen, zum Denaturieren von Proteinen und zu Krämpfen. Weiterhin hat eine Wärmeinduzierte vermehrte Depolarisation erregbarer Zellen eine Kaliumfreisetzung zur Folge, welche wiederum zu lebensgefährlichen Herzrhythmusstörungen führen kann (Roth, 2002). Die mikrovaskuläre Permeabilität ändert sich, damit verbunden entstehen zerebrale Ödeme, lokale Blutungen und letztendlich Zerstörungen von Nervenzellen.

Ebenso gilt es, eine starke Verringerung der normalen Körpertemperatur (bei Mensch unter 35°C) zu verhindern. Eine so genannte Hypothermie kann zum Beispiel im Rahmen einer Sepsis, nach Medikamentengabe und Kälteexposition auftreten. Sie kann ebenfalls lebensbedrohliche Zustände verursachen. Beim Menschen führen Körpertemperaturen unter

26°C in der Regel zum Tod. Es treten Störungen im Säure-Base-Haushalt, Herzrhythmusstörungen, und Bewusstseinsstörungen auf (Roth, 2003).

1.1. Regelkreis

Abhängig von individuellen und Spezies-abhängigen Voraussetzungen und Erfahrungen gibt es verschiedene Strategien und Mechanismen, wie die thermoregulatorische Einstellung einer dem Sollwert entsprechenden Körpertemperatur erreicht wird (Zeisberger, 1994, 1996). Analog zu einem technischen Regelkreis wurde versucht, eine Modellvorstellung zu entwickeln, mit der die komplizierten aktiven Prozesse der Thermoregulation beschrieben und erklärt werden können (Abbildung 3). Im Körperkern und in der so genannten Körperschale gibt es spezialisierte Sinneszellen, die als Thermosensoren bezeichnet werden. Sie stellen die Messglieder des Regelkreises dar, die über sensorische Afferenzen dem Regler im Gehirn den Istwert der Körpertemperatur vermitteln. Der Regler ist im Hypothalamus lokalisiert. Der exakte zelluläre Mechanismus, wie der gemessene Istwert mit dem Sollwert verglichen wird, konnte trotz intensiver Suche bislang nicht identifiziert werden. Jedoch kommt es bei Abweichung von einer Spezies-spezifischen geregelten Körpertemperatur zur Aktivierung efferenter Signale neuroendokriner, autonom vegetativer und somatomotorischer Natur, wodurch letztendlich die jeweils verfügbaren Stellglieder (Thermoeffektoren) derart beeinflusst werden, dass sie der Temperaturabweichung entgegen wirken. Dies resultiert dann entweder in der Stimulierung von Wärmebildungs- und Wärmekonservierungsmechanismen oder in einer gesteigerten Wärmeabgabe, bis der Istwert dem Sollwert wieder entspricht. Solange keine Störgröße in das System eingreift, bleibt bei Konstanz der Wärmebildung und Wärmeabgabe die Körperkerntemperatur in ihrem definierten Sollbereich. Der so genannte Sollwert, ein Begriff aus der Regeltechnik, ist hier allerdings vielmehr als Thermoindifferenzbereich zu sehen. Man nennt ihn auch Zwischenschwellenzone. Es handelt sich dabei um einen Bereich der mittleren Körpertemperatur, in dessen Rahmen weder Wärmebildung noch Wärmeabgabereaktionen ablaufen (Brück, 1985). Dieser Bereich ist dadurch charakterisiert, dass sich die Signale der Warm- und Kälterezeptoren, bzw. der warm- und kaltsensitiven Neurone, aufheben. Dementsprechend ist kein stabiles Referenzsignal notwendig (Bligh, 1976). Diejenige mittlere Körpertemperatur, bei der der Organismus Wärmebildung aktiviert, wird als die untere Grenze des Sollwertes, die mittlere Körpertemperatur, bei der thermoregulatorische Wärmeabgabe induziert wird, als Obergrenze des Sollwertes bezeichnet. Dazwischen hält sich das System die Waage.

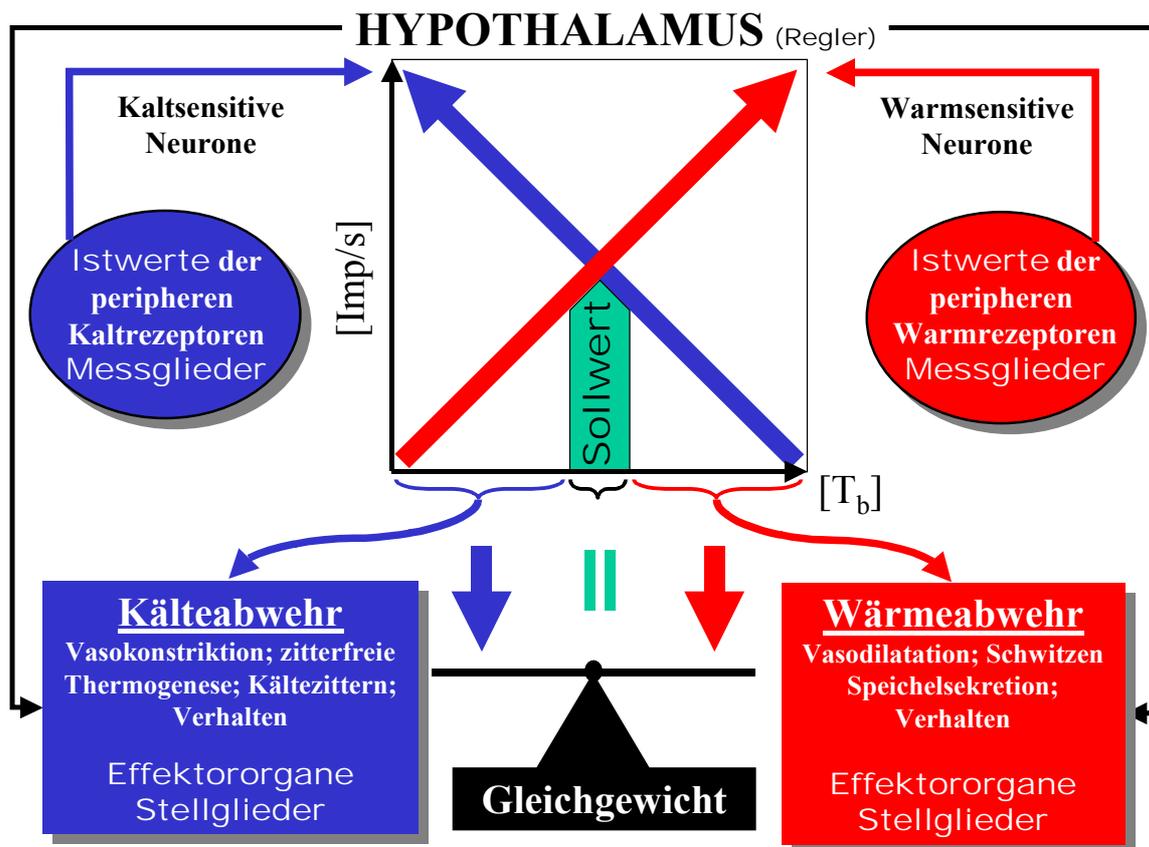


Abbildung 3

Schema zur biologischen Regulation der Körpertemperatur (T_b), dargestellt als Regelkreis. Wenn Wärmebildung und Wärmeabgabe gleich sind, bleibt die Körperkerntemperatur stabil. Der Hypothalamus stellt dabei den thermoregulatorischen Regler dar, in dem die Temperatursignale integriert werden. Als Impulsfrequenzen (Imp/s) kodiert werden die Istwerte der peripheren Warm- und Kaltrezeptoren (Messglieder) zum Hypothalamus geleitet. Dabei steigen die Impulsfrequenzen der wärmsensitiven Neurone (rote Pfeil, mittlere Graphik) mit steigender, die der kaltsensitiven Neurone (blaue Pfeil, mittlere Graphik) mit abnehmender Temperatur an. Im Bereich des „Sollwertes“ heben sich die Signale auf. Bei Dominanz eines der beiden Signale werden die entsprechenden Effektororgane aktiviert. Beispielsweise folgt aus der Dominanz von Signalen der Warmrezeptoren eine Aktivierung von Mechanismen zur Wärmeabgabe. Gleichzeitig werden inhibitorische Interneurone aktiviert, welche die Mechanismen der Wärmeproduktion unterdrücken. Ein Überwiegen der Signale der Kaltrezeptoren führt zur Wärmeproduktion und wiederum zu einer Unterbindung der Wärmeabgabe. Nähere Erläuterungen sind im Text zu finden. T_b , Körperkerntemperatur; Imp/s, Entladungsrates der Warm- bzw. Kaltrezeptoren {Abbildung modifiziert (Roth, 2003)}.

1.1.1. Kalt- und Warmsensoren

Bei Kalt- und Warmsensoren handelt es sich um freie Nervenendigungen langsam leitender Nervenfasern. Somit ist die Membran der Axonterminalen als Sensor spezialisiert. Diese spezialisierten Sinneszellen dienen der Temperaturwahrnehmung und somit der Thermoregulation (Abbildung 4). Prinzipiell wurden solche Thermosensoren über empirische funktionelle Messungen von Kälte- und Wärmepunkten in der Haut charakterisiert. Es handelt sich dabei um langsam leitende unmyelinisierte C-Fasern von dünnem Durchmesser und etwas größere schnellere dünn myelinisierte Fasern vom Typ A-Delta. In der Peripherie findet

man vor allem Kältsensoren. Die Information über die aktuelle Temperatur wird schließlich zum Gehirn, genauer zum Hypothalamus geleitet. Zentral findet sich im anterioren Teil des Hypothalamus, der *Area praeoptica*, eine hohe Anzahl an Wärmensensoren (Hammel, 1965, 1968; Boulant, 2000). Genauer betrachtet weist diese Gehirnstruktur 30 % Wärmensensoren (Griffin, 2004), 5 % Kältsensoren und 65 % temperaturunempfindliche Neurone auf (Boulant, 1998; Conti *et al.*, 2004). Die Informationsvermittlung findet schließlich über die Impulsfrequenzen statt, die sich mit steigender Temperatur bei wärmsensitiven Neurone erhöhen (Wärmensensoren, Abbildung 3, 4; roter Pfeil/Kurve) und bei kaltsensitiven Neuronen (Kältsensoren, blaue Pfeil/Kurve) verringern. Für die Zuleitung der Temperatursignale aus der Körperperipherie zum Hypothalamus, in dem sich der Regler des biologischen Thermoregulationssystems befindet, werden Axon-Kollaterale des *Tractus spinothalamicus* mit hypothalamischen Projektionen verantwortlich gemacht.

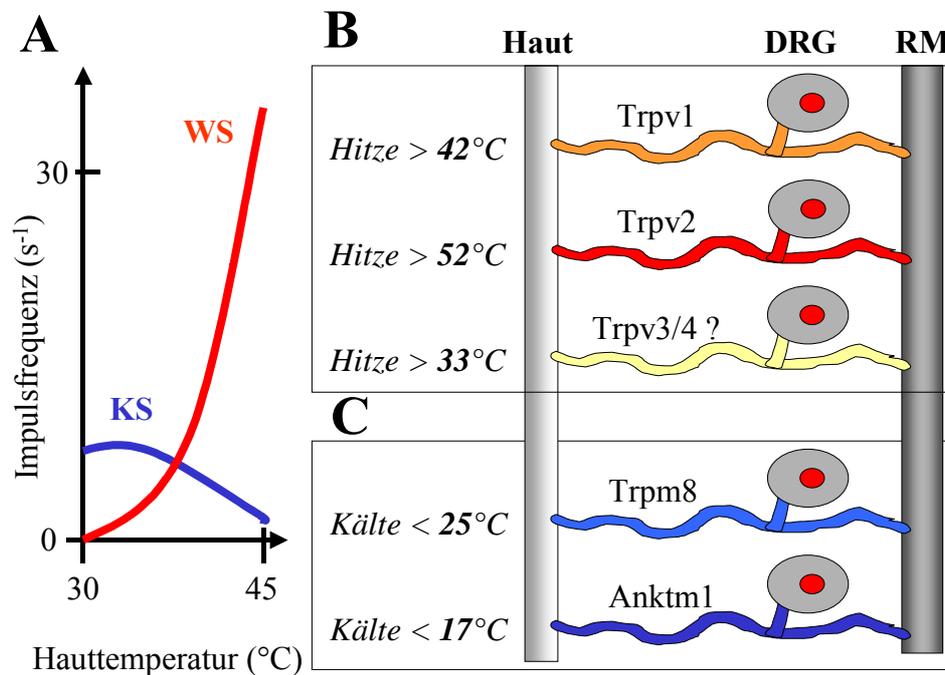


Abbildung 4

Schematische Übersicht über die Funktion von Warm- und Kältsensoren. Bei steigender Temperatur nimmt die Impulsfrequenz von wärmsensitiven Neuronen (WS) zu und der kaltsensitiven Neurone (KS) ab (A). Bei sinkender Temperatur steigt dagegen die Entladungsrates kaltsensitiver Neurone an. Die Thermozeption der Warm- (B) und Kältsensoren (C) der Haut erfolgt über unspezifische Kationenkanäle, die zu der Familie der TRPs (transient receptor potential) gehören. Hautafferenzen thermosensibler Neurone können über derartige Kanäle bei bestimmten Temperaturen stimuliert werden und diese Signale über die Spinalganglien (DRG) und das Rückenmark (RM) zu den thermointegrativen Arealen des Hypothalamus weiterleiten.

Zusammen mit den hauptsächlich in der präoptischen Region generierten neuronalen Impulsen zur Charakterisierung der Körpertemperatur werden diese Signale von Neuronenverbänden des thermointegrativen Areals im caudalen Anteil des Hypothalamus verrechnet (Brück & Zeisberger, 1987).

Der Erregungsmechanismus von Kältsensoren ist noch nicht vollständig aufgeklärt. Es handelt sich hierbei wahrscheinlich um spezifische Ionenkanäle, die zur Familie der

thermoTRPs (transient receptor potential) gehören {Abbildung 4, C; (Okazawa *et al.*, 2002)}. Vereinfacht unterscheidet man zwei verschiedene Kanaltypen. Zum einen gibt es den Trpm8, welcher durch Abkühlung und Menthol aktiviert werden kann, was zu einem depolarisierenden Kationeneinwärtsstrom führt (McKemy *et al.*, 2002; Peier *et al.*, 2002). *In vitro* wurde für dieses Kanalprotein ein temperaturabhängiger Aktivierungsbereich zwischen 25-28°C festgestellt und bestätigt, dass dieses Kanalprotein tatsächlich in Kälte- und Menthol-responsiven Neuronen exprimiert werden (Patapoutian *et al.*, 2003). Zum anderen wurde ein zweiter Kälterezeptor in Form des Ionenkanals Anktm1 beschrieben, der *in vitro* bei Temperaturen unterhalb von 17°C aktiviert wird (Patapoutian *et al.*, 2003). Dies stellt beim Menschen die Reizschwelle zu schmerzhaftem Kälteempfinden dar. Neben diesen Kanaltypen ist an der Depolarisation von Kälterezeptorneuronen durch Abkühlung vermutlich eine Inaktivierung von Kaliumkanälen beteiligt (Reid & Flonta, 2001a), die allerdings wahrscheinlich von zweitrangiger Bedeutung ist (Reid & Flonta, 2001b).

Die Erregung von Warmsensoren ist ebenfalls mit einer Aktivierung unspezifischer Kationenkanäle verbunden, die sich bei Erwärmung öffnen, wodurch es wiederum zu einem Einstrom von Kationen kommt. Solche so genannten thermoTRPs sind Kanalproteine, die spezialisiert sind, nur jeweils auf bestimmte Temperaturbereiche anzusprechen. Man unterscheidet vier TRP Rezeptor-Subtypen die nach ihrer Entdeckung von 1-4 durchnummeriert wurden (Trpv1 bis Trpv4; Abbildung 4, B). Alle zusammen decken bei Säugetieren die Spannweite physiologisch vorkommender Körpertemperaturen ab (Patapoutian *et al.*, 2003). Trpv1 wird bei Temperaturen über 42°C aktiviert und stellt damit vielmehr einen Schmerzrezeptor dar, der auf Hitze reagiert (Clapham *et al.*, 2001). Interessanterweise wird dieser Ionenkanal auch durch moderat saure pH-Werte (Tominaga *et al.*, 1998), Bradykinin und NGF (nerve growth factor) (Chuang *et al.*, 2001), Lipoxygenaseprodukte (Hwang *et al.*, 2000), Prostaglandine (Hu *et al.*, 2002), Proteinkinase A und C und ATP aktiviert (Tominaga *et al.*, 2001). Wie schon in Kapitel I 1 beschrieben, handelt es sich bei diesen Stoffen um Mediatoren, die im inflammatorischen Milieu vorkommen. Darüber hinaus wird der Trpv1-Kanal durch Ethanol oder Capsaicin (die Substanz, die die Schärfe in der Chili-Schote ausmacht) stimuliert (Trevisani *et al.*, 2002). Abgesehen vom peripheren Nervensystem findet man Trpv1 im Gehirn, im Rückenmark, in der Haut, in der Zunge und in der Blase. Trpv2 hat seinen Aktivierungsbereich bei 52°C und höher. Für Trpv3-4 gibt es noch keine Beweise, dass diese Ionenkanäle eine physiologische Rolle bei der Wahrnehmung von Wärme *in vivo* besitzen (Patapoutian *et al.*, 2003). *In vitro* wurde ein Temperatur-responsiver Bereich zwischen 34-38°C (Trpv3) und 27-34°C (Trpv4) festgestellt. Diese Kanalproteine sind insgesamt von besonderem Interesse, da sie bei physiologischen Körpertemperaturen aktiviert werden können.

Der Organismus ist somit in der Lage, über Kalt- und Warmsensoren die Körperschalen- und Körperkerntemperatur wahrzunehmen. Immer wenn im thermointegrativen Areal eine Abweichung des Istwertes der Körpertemperatur vom Sollwert ermittelt wird, werden schließlich im Dienste der Wärme- oder der Kälteabwehr Effektororgane aktiviert.

1.1.2. Effektororgane

Homeotherme Lebewesen können sich prinzipiell über morphologische und funktionelle Mechanismen an veränderte thermoregulatorische Anforderungen anpassen (Brück, 1981). Morphologische Adaptation kann längerfristig über Pelzwachstum oder vermehrte subkutane Fetteinlagerung erfolgen. Eine gezielte den Bedürfnissen entsprechende Aktivierung von Effektororganen zur Thermoregulation geschieht kurzfristig über somatomotorische und sympathische Nerven. Dies beinhaltet eine über warmsensitive und thermoinsensitive Effektorneurone vom Hypothalamus (*Regio praeoptica*) ausgehende Aktivierung verschiedener autonomer, thermoregulatorischer Prozesse (Nagashima *et al.*, 2000; Nakamura, 2004) sowie die Induktion von Verhaltensänderungen (Boulant, 1989). Diese Reaktionen werden jeweils zur Kälteabwehr bzw. Wärmeabwehr genutzt. Beim Menschen dominiert die Verhaltensregulation (Roth, 2003), aber auch das Meerschweinchen scheint über die Wahl einer optimalen Umgebungstemperatur autonome thermoregulatorische Reaktionen zu minimieren (Fewell *et al.*, 1997). Es wird angenommen, dass damit Energie gespart werden kann, was zum Beispiel für Neugeborene sehr wichtig ist. Es gibt allerdings den Bedürfnissen in der Tierwelt entsprechend starke Unterschiede im Vorhandensein und der Ausprägung der Effektororgane und ihrer Aktivierung. So tolerieren zum Beispiel Meerschweinchen Kälte viel besser als Hitze, da sie mit ihrer kompakten Körperform Wärme besser speichern als abgeben können (Wagner, 1976). Sie besitzen keine Schweißdrüsen und können im Gegensatz zu anderen Spezies (Hund) auch ihre evaporative Wärmeabgabe über den Respirationstrakt (Hecheln) nur begrenzt steigern (Brück & Zeisberger, 1987; Roth, 1989).

1.1.2.1. Wärmeproduktion / Wärmekonservierungsmechanismen

Steigerung der Wärmeproduktion wird über caudale Komponenten des Hypothalamus gesteuert. Sie erfolgt zum einen über eine Erhöhung der metabolischen Rate, zum anderen kann die Wärmeproduktion auch über körperliche Aktivität erhöht werden. Autonom reguliert kommt es hierbei zunächst zu einer Erhöhung des Muskeltonus und schließlich zum Kältezittern. Willkürliche Muskelarbeit als adaptatives Verhalten erhöht ebenfalls die Wärmebildung. Zitterfreie Thermogenese wird vor allem bei Neugeborenen und kleinen Säugetieren durch β -Rezeptor vermittelte noradrenerge Stimulierung des braunen Fettgewebes über das sympathische Nervensystem erreicht. Dieses sympathisch sehr gut innervierte Gewebe generiert Wärme über eine Entkopplung der Atmungskette von der ATP Synthese. Der die ATP-Synthese normalerweise antreibende Protonenfluss wird in diesem spezialisierten Gewebe über ein Entkopplungsprotein (UCP1) kurzgeschlossen, das in der inneren Mitochondrienmembran sitzt (Cannon *et al.*, 1998; Nedergaard *et al.*, 2001).

Eine Wärmeeinsparung erfolgt einerseits über Verhaltensänderungen wie z.B. Nestbau, Aufsuchen einer wärmeren Umgebung oder einer Einnahme vor Kälte schützender Körperhaltung. Andererseits tragen vegetativ innervierte Effektororgane auch zur Konservierung von Wärme bei. Hierbei handelt es sich in erster Linie um das Kreislaufsystem, mit dessen Hilfe der Wärmestrom vom Körperkern zur Körperschale gesteuert werden kann. Durch eine Konstriktion peripherer Hautgefäße kann somit die

Durchblutung der zur Außenwelt exponierten Oberfläche reduziert und ein Wärmeverlust verringert werden.

1.1.2.2. Wärmeabgabemechanismen

Trockene Wärmeabgabe ist bei einem vorhandenen Temperaturgradienten vom Körper zur Umwelt in Form von Radiation, Konduktion und Konvektion vorhanden. Es gibt allerdings verschiedene Effektororgane der Thermoregulation, die diese Prozesse beeinflussen und erhöhen können. Die Steuerung erfolgt über die präoptische Region, dem anterioren Teil des Hypothalamus (Roth, 2003).

Eine autonom regulierte Vasodilatation der peripheren Hautgefäße hat eine Erhöhung des Wärmetransfers über das Blut an die Umwelt zur Folge. Zusätzlich haben die meisten Tiere die Möglichkeit, über Evaporation von Wasser Wärme an die Umwelt abzugeben. Eine so genannte Verdunstungskälte entsteht permanent an den Oberflächen der feuchten Schleimhäute aber auch der Haut. Über die Atemwege verdunstet kontinuierlich Wasser, was vom Individuum nicht bewusst wahrgenommen wird (*Perspiratio insensibilis*). Hunde können zum Beispiel beim Hecheln über ein kurzatmiges häufiges Austauschen des Totraumvolumens der Atemwege diesen Mechanismus verstärken. Zusätzlich kann tierartlich unterschiedlich eine Sekretion von Wasser über Schweißdrüsen als thermoregulatorischer Effektor genutzt werden. Über cholinerge sympathische Nervenfasern gesteuert, werden vermehrt Wasser aber auch Elektrolyte abgegeben. Der Effekt der Kühlung durch Verdampfen von Wasser ist nicht bei zu hoher Luftfeuchtigkeit möglich. Einige Tierarten besitzen jedoch keine (Meerschweinchen), beziehungsweise nur wenige (Hund an den Pfoten) derartiger Schweißdrüsen.

Zusätzlich können auch zur Steigerung der Wärmeabgabe gezielte Verhaltensänderungen induziert werden. Dies geschieht zum Beispiel über aktives Befeuchten der Körperoberfläche, wie beim Suhlen der Schweine im Schlamm oder bei Ratten, die ihr Haarkleid mit Speichel befeuchten (Zeisberger, 1999).

1.1.3. Definition Fieber

Fieber stellt einen Sonderfall der Thermoregulation dar, bei dem eine Sollwert-Erhöhung stattfindet und der Körper versucht, aktiv eine höhere Körperkerntemperatur einzustellen (Snell, 1968; Kluger, 1991). Der Organismus hat die Temperatur des neuen Sollwertes erreicht (Fieber), wenn weder Wärme- noch Kälteabwehrmechanismen aktiviert werden müssen, um die erreichte Temperatur zu verteidigen (Hensel, 1981). Fieber ist damit von drei weiteren Begriffen aus der Thermoregulation zu unterscheiden. **1)** Eine Normothermie liegt vor, wenn der normalerweise vorliegende Sollwert und die aktuelle Körperkerntemperatur gleich sind. Dies ist die meiste Zeit der Fall. Dazu werden auch die Variationen der zirkadianen Rhythmik mit einbezogen. **2)** Eine Hypothermie liegt unabhängig von der Höhe des thermoregulatorischen Sollwertes vor, wenn die aktuelle Körperkerntemperatur unter dem des Thermoindifferenzbereiches liegt. **3)** Entsprechend bezeichnet man den Zustand, bei dem die Körperkerntemperatur höher ist als der Sollwert als Hyperthermie (Snell, 1968; Kluger, 1991).

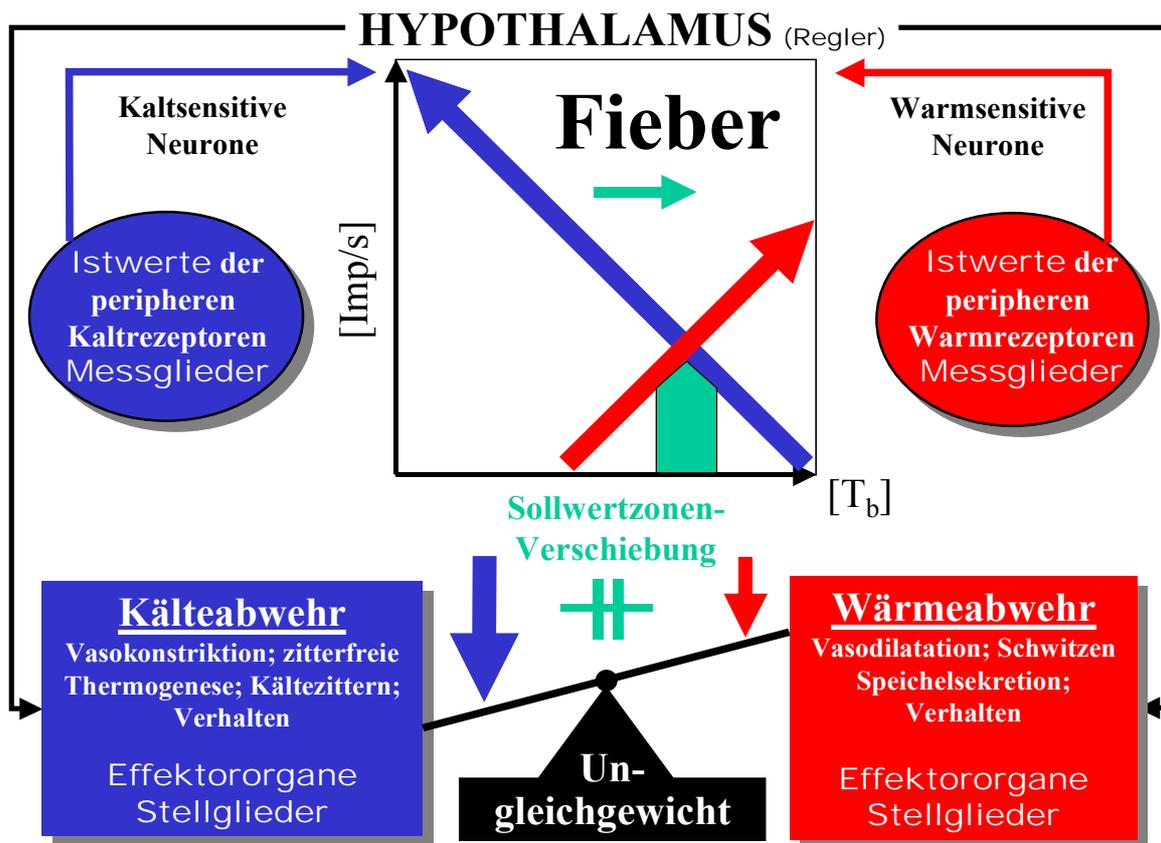


Abbildung 5

Schema zur biologischen Regulation der Körpertemperatur dargestellt als Regelkreis. Durch Pyrogene wird die Aktivität von zentralen Wärmerezeptoren gehemmt. Dadurch verschiebt sich die rote Kennlinie im Graphen nach rechts. Der Bereich des „Sollwertes“, bei dem sich die Signale der Warm- und Kaltrezeptoren aufheben, ist auf eine höhere Temperatur verlagert. Es entsteht ein Ungleichgewicht, es kommt zur Fieberentwicklung. Durch kurzfristige Dominanz der kaltsensitiven Signale werden die entsprechenden Effektororgane zur Wärmeproduktion und Einsparung, also zur Kälteabwehr, angeregt (Schüttelfrost zu Beginn einer Fieberreaktion). Der neue Sollwert wird also aktiv eingestellt. Bei überschießender Fieberreaktion oder zurückgehendem Fieber setzt Wärmeabwehr z.B. in Form vermehrter Schweißproduktion ein, weil die Körperkerntemperatur dem jeweiligen neuen oder alten Sollwert angepasst wird. Es überwiegen dann die Signale der zentralen Wärmerezeptoren und somit kommt es zur Aktivierung von Mechanismen der Wärmeabgabe (Schwitzen am Ende der Fieberreaktion). Nähere Erläuterungen sind im Text und in Abbildung 3 zu finden. T_b , Körperkerntemperatur; Imp/s, Entladungsrates der Warm- bzw. Kaltrezeptoren.

Prinzipiell können einige nicht thermische Faktoren die als Sollwert definierte Zwischenschwellenzone verändern. Bei einer Narkose wird zum Beispiel der untere Grenzwert dieses Bereiches um ca. 3°C nach unten verschoben. Das Progesteron-Östrogen Verhältnis soll hingegen in der entsprechenden Zyklusphase die Körperkerntemperatur erhöhen können (Kluger, 1991). Schließlich nimmt man an, dass über Pyrogene (LPS, PGE_2 , proinflammatorische Zytokine) bei der Fieberentstehung zentrale Wärmerezeptoren gehemmt werden, so dass sie erst bei einer höheren Körpertemperatur ihre Impulsrate steigern (Hori *et al.*, 1988; Nakashima *et al.*, 1989; Nakashima *et al.*, 1991; Xin & Blatteis, 1992). Dadurch verschiebt sich die rote Kennlinie im Graphen der Abbildung 5 nach rechts. Der Bereich des „Sollwertes“, an dem sich die Signale der Warm- und Kaltrezeptoren aufheben, ist auf eine

höhere Temperatur verlagert. Entsprechend wird die Kälteabwehr aktiviert und die Körpertemperatur aktiv auf diesen neuen Temperaturbereich eingestellt und verteidigt.

2. Fiebermodelle

Prinzipiell sind zur experimentellen Erzeugung von Fieber alle bereits in Kapitel I 1 beschriebenen Noxen verwendbar, solange sie exogen zugeführt werden können. Der Organismus reagiert dabei auf die Noxe mit der Entwicklung von Fieber, was im Rahmen der APR als ein Teil der Immunabwehr zu betrachten ist. Vor allem die angeborene unspezifische Abwehr spielt hierfür eine große Rolle. Sie reagiert auf infektiöse und nicht infektiöse Stimuli. Substanzen, die Fieber erzeugen und von außen in einen Organismus eindringen, werden allgemein als exogene Pyrogene bezeichnet. Sie können direkt oder indirekt über vom Körper gebildete Mediatoren wirken. Solche körpereigene Substanzen, die Fieber erzeugen, werden wiederum als endogene Pyrogene bezeichnet.

Zur experimentellen Untersuchung von Fieberreaktionen und deren Entstehungsmechanismen werden verschiedene Fiebermodelle angewendet. Es wird zwar angenommen, dass es prinzipiell einen allgemeingültigen Mechanismus der Fieberentwicklung gibt. Trotzdem ist es wichtig, die verschiedenen Versuchsbedingungen und deren Unterschiede zu berücksichtigen, da es vielerlei Wege der Aktivierung dieses Mechanismus geben könnte.

Wie stark eine Fieberreaktion auf einen gegebenen Stimulus stattfindet, hängt jeweils auch von weiteren Faktoren und Randbedingungen ab. So spielt z.B. das Geschlecht der Versuchstiere eine wichtige Rolle, weil ovarielle Hormone weiblicher Tiere eine modulierende Wirkung auf exogene und endogene Pyrogene haben und es zu einer Abschwächung von Fieber kommt (Mouihate & Pittman, 2003). Zusätzlich gibt es Zyklusbeeinflussungen, die zu einer Erhöhung der Körpertemperatur in der Lutealphase führen können (Graham *et al.*, 1977). Im Rahmen dieser Arbeit wurden daher nur männliche Meerschweinchen in der Versuchsplanung berücksichtigt. Außerdem sind immer die Dosierung, die Außentemperatur und andere Faktoren bei Fiebermodellen zu berücksichtigen (Romanovsky, 2004b). Es kann nämlich sein, dass eine Noxe je nach den Haltungsbedingungen bei niedrigeren Temperaturen eine Hypothermie und nur bei höheren thermoneutralen Umgebungstemperaturen Fieber erzeugt (Romanovsky *et al.*, 2002; Boisse *et al.*, 2004). Weiterhin spielt auch die gewählte Tierart für das ausgewählte Versuchsmodell zur Fieberuntersuchung eine wichtige Rolle. Traditionell wurde das Kaninchen sehr häufig als Versuchstier eingesetzt, weil es eine extreme Sensitivität gegenüber Endotoxinen zeigte (Seibert, 1925). Ratten und Mäuse, genauso wie die in dieser Arbeit verwendeten Meerschweinchen, sind wesentlich unempfindlicher gegenüber Endotoxinen. Dadurch sind beim Vergleich von unterschiedlichen Studien die verwendeten Dosierungen in verschiedenen Tierspezies immer relativ schwierig zu beurteilen. Es gilt zusätzlich, dass bei allen Studien Stress-erzeugende Zustände der Versuchstiere vermieden werden müssen, da es ansonsten zumindest bei einigen Spezies zu einer Stress-induzierten Hyperthermie kommt. So zeigen z.B. Ratten eine derartige Stress-induzierte Erhöhung der Körpertemperatur von bis zu 2°C. Sogar beim Menschen konnte ein solches Phänomen bei psychischen Stress beobachtet

werden (Hasan & White, 1979; Singer *et al.*, 1986). Im Folgenden sollen nun kurz die unterschiedlichen Ansätze der Entzündungsmodelle zur Untersuchung der Fieberentstehung beschrieben werden.

2.1. Nicht infektiös

Neben den physikalischen kommen hauptsächlich die chemischen Noxen in Frage, um nicht infektiöse Fiebermodelle zu erzeugen. Diesbezüglich tauchen in der Literatur Carrageenan (Ibuki *et al.*, 2003), Terpentin (Kozak *et al.*, 1998) oder Formalin als exogene Pyrogene auf. Solche Substanzen wie Carrageenan haben den Vorteil, dass man lokale Entzündungsprozesse induzieren kann und nicht befürchten muss, dass die Substanz in die Zirkulation gerät und sich dort durch Effekte des Stoffes selbst eine allgemein entzündliche Reaktion entwickelt. Es werden mit Hilfe derartiger Substanzen somit hauptsächlich sekundär produzierte, endogene Mediatoren als potenzielle Auslöser der Fieberreaktion untersucht. Terpentin provoziert zum Beispiel eine lokalisierte Gewebeerstörung und eine spezifische Induktion von IL-1 β und IL-6 (Rivest, 2003). Es handelt sich um ein Modell der sterilen lokalisierten Entzündung, die zu einer starken Schwellung im Bereich der Injektion führt (Rivest *et al.*, 2000; Rivest, 2003). Die körpereigenen Substanzen, die unter anderem zur Fieberreaktion führen, werden als endogene Pyrogene bezeichnet. Es handelt sich dabei um hitzelabile Proteine und Lipide, die allerdings auch bei Verletzungen, Traumata und Stress produziert werden.

2.2. Infektiös

Das angeborene Immunsystem von Säugetieren erkennt, abgesehen von der relativ unspezifischen, phagozytotischen Abwehr, eine Invasion von Mikroorganismen über spezifische so genannte Toll-Like-Rezeptoren (TLR). Dies hat eine Aktivierung von Schutzmechanismen des Wirtes zur Folge. Für die erstmals bei der Fruchtfliege *Drosophila* entdeckte Klasse der Toll-Rezeptoren wurde eine dementsprechende Nomenklatur für TLR entwickelt (Medzhitov *et al.*, 1997). Man kennt bei Säugetieren inzwischen 13 verschiedene Typen an Toll-Like-Rezeptoren {TLR-1 bis 13; (Rock *et al.*, 1998; Takeda *et al.*, 2003; Tabeta *et al.*, 2004)}. Sie erkennen spezifische hoch konservierte Komponenten der Mikroorganismen, die man Pathogen-assoziierte Molekülstrukturen nennt (**p**athogen-**a**ssociated **m**olecular **p**atterns, PAMPs). Nach Interaktion einer PAMP mit ihrem spezifischen Toll-Like-Rezeptor kommt es zur Aktivierung einer unspezifischen Entzündungsreaktion, aber auch teilweise zu einer Antigen-spezifischen adaptiven Immunantwort (Anderson, 2000). Die Signaltransduktion erfolgt entsprechend der Aktivierung des Interleukin-1 Rezeptors (IL-1R) (Laflamme & Rivest, 2001; Kandimalla *et al.*, 2003; Takeda *et al.*, 2003). Im Detail wird in Kapitel II 4.2 darauf näher eingegangen. Vor allem Monozyten, Makrophagen (Muzio *et al.*, 2000) und neutrophile Granulozyten, aber auch Epithelzellen (Hornef *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2002; Wolfs *et al.*, 2002) aller großen Grenzflächen des Organismus und wahrscheinlich Endothelzellen (Ulevitch & Tobias, 1999; Faure *et al.*, 2000) exprimieren derartige Toll-Like-Rezeptoren. Die Ausstattung an solchen Rezeptortypen ist allerdings

unterschiedlich und kann über Zytokine (IL1, TNF) und andere Stoffe induziert bzw. moduliert werden (Takeda *et al.*, 2003). Allgemein kommt es als direkte Folge der Aktivierung von Toll-Like-Rezeptortypen unter anderem zur Bildung und Freisetzung proinflammatorischer Zytokine (Kopp & Medzhitov, 1999; Rivest, 2003) als endogene Mediatoren und schließlich im Rahmen der Immunabwehr auch zur Fieberentstehung.

Prinzipiell ist es möglich, direkt teilungsfähige lebende Mikroorganismen Tieren zum Zweck der Fieberinduktion zu applizieren (Campisi *et al.*, 2003; Mphahlele *et al.*, 2004). Dies hat den Vorteil, dass die damit verbundene Reaktion den natürlichen Fieberentstehungsprozess relativ gut widerspiegelt. Die Gabe von lediglich einigen Komponenten der PAMPs an Stelle der lebenden Erreger ist allerdings besser dosierbar, reproduzierbar und unter Umständen auch ungefährlicher in der Handhabung.

2.2.1. LPS/Gram negativ

Bei dem auch im Rahmen dieser Arbeit zur Fieberinduktion verwendeten LPS handelt es sich um eines der am häufigsten verwendeten und am besten bekannten Entzündungsmodelle. Als Membranbestandteil gram-negativer Bakterien wird LPS bei Lyse, aber auch von lebenden Bakterien freigesetzt (Freundenberg & Galanos, 1990) und als „bakterielles Endotoxin“ bezeichnet. Von Geburt an kommen Säugetiere durch die Darmflora mit diesen Substanzen in Kontakt. Genauso wie lebende *E. coli* Bakterien (Campisi *et al.*, 2003) induziert LPS als pyrogener Bestandteil solcher Bakterien Fieber (Blatteis, 1974; Dinarello, 1983; Kluger, 1991; Mackowiak, 1998) und eine Vielzahl weiterer Krankheits-begleitender Symptome, wie beispielsweise „Sickness Behavior“. Es handelt sich hierbei um hitzestabile Substanzen mit einem Molekulargewicht von 5 bis 9000 kDa. LPS besteht prinzipiell aus einem die Antigenität vermittelnden Polysaccharidanteil und einem Lipid-A-Anteil. Das Lipid A stellt die Wirkungs-vermittelnde hochkonservierte Komponente dieses Moleküls dar {PAMP; (Rietschel *et al.*, 1994; Holst *et al.*, 1996)}. Bakterielle Endotoxine aktivieren Zellen des Immunsystems bereits in sehr geringen Konzentrationen {< 1ng/ml Serum, (Forth, 2001)}. Es können durch Verwendung von LPS einheitlichere Effekte erzielt werden als durch Gabe von lebenden oder abgetöteten Bakterien. Schließlich ist es kommerziell in hoch reiner Form erhältlich und einfach zu handhaben. Es scheint, dass sich LPS als Erkennungsmolekül für gram-negative Bakterien in der Evolution gut konserviert bzw. bewährt hat. Zumindest reagieren alle Säugetiere, aber auch Invertebraten wie Krabben und einige Molluskenarten sowie die Tabakpflanze auf den Stimulus LPS (Kluger, 1991; Grunwald *et al.*, 1993; Clatworthy, 1998). Deshalb ist die Verwendung dieser Substanz ein sehr gut geeignetes Modell um Signalwege zur Fieberentstehung zu untersuchen.

Der Mechanismus der LPS Wirkung wird wie folgt beschrieben: nach Applikation bindet LPS an ein im Serum vorhandenes LPS-Bindungsprotein (LPS-B) (Schumann *et al.*, 1990), welches zu den APR-Proteinen gehört und bei systemischen inflammatorischen Prozessen vermehrt gebildet wird. Dieser Komplex wird mit erhöhter Affinität an lösliche (sCD14) oder auf Monozyten und Makrophagen vorhandene CD14 Rezeptoren (Cluster of Differentiation, CD) gebunden (Chen *et al.*, 1992; Mathison *et al.*, 1992; Arditi *et al.*, 1993; Schletter *et al.*, 1995). Es wird dann über ein Signaltransduktionsmolekül die Expression spezifischer Gene,

wie z.B. der proinflammatorischen Zytokine, induziert (Wright *et al.*, 1990; Ulevitch & Tobias, 1994; Degre, 1996; Ulevitch & Tobias, 1999). Diese Informationsübertragung geschieht bei diesem LPS-LPS-B-CD14-Komplex vor allem durch den TLR4, welcher über das Adaptermolekül MyD88 die gleiche Signalkaskade aktiviert wie IL-1 (Laflamme & Rivest, 2001; Laflamme *et al.*, 2003; Rivest, 2003). Zusätzlich erhöht das so genannte MD-2 Protein (myeloid differentiation protein-2, MD-2) die Antwort auf den Stimulus LPS, indem es sich an extrazelluläre Teile des TLR4 assoziiert (Shimazu *et al.*, 1999). Die Beteiligung von TLR2 an der LPS Erkennung wird kontrovers diskutiert (Romanovsky, 2004a; von Meyenburg *et al.*, 2004). Eine Kontamination mit hoch bioaktiven Substanzen der LPS Präparation hatte wahrscheinlich dazu geführt, dass TLR2 als Rezeptor für PAMPs gram-negativer Bakterien vermutet wurde (Hirschfeld *et al.*, 2000). Für TLR4 konnte allerdings klar gezeigt werden, dass Mäuse mit einer Mutation im TLR4 Gen nicht mehr auf LPS reagieren (Poltorak *et al.*, 1998).

Zusätzlich könnten aber auch andere Rezeptoren außer TLR4/2 an der LPS-Erkennung beteiligt sein (Perera *et al.*, 2001). Da LPS die Lipidmembranen von Zellen überwinden kann, wird angenommen, dass beispielsweise Nod1 über den NF- κ B Weg als zytoplasmatischer Rezeptor von LPS fungiert (Inohara *et al.*, 2001). Nod1 war ursprünglich ausschließlich mit der Regulation der Apoptose in Verbindung gebracht worden. Es wird in der Arbeit von Inohara *et al.* (2001) aber vorgeschlagen, dass diese Gruppe intrazellulärer Proteine als zytoplasmatische Rezeptoren für pathogene Komponenten invasiver Bakterien fungieren könnten.

Wichtig für Versuchsdurchführungen ist weiterhin, dass es bei wiederholter Gabe von LPS in kurzen Zeitabständen zu Toleranzeffekten kommt (Atkins, 1960; Soszynski *et al.*, 1991; Roth & Zeisberger, 1995). Bei einer dreimaligen Gabe von LPS im Abstand von drei Tagen verringert sich die Fieberantwort signifikant. Dies ist von einer dazu korrelierenden Verringerung der LPS-induzierten Bildung proinflammatorischer Zytokine (TNF- α , IL-6) begleitet (Roth *et al.*, 1994; Roth *et al.*, 1997a). Schließlich scheint auch ein der LPS-Gabe vorangehender Stress die Fieberantwort zu verändern. Neben einer erhöhten Konzentration an Zytokinen in der Zirkulation ergab sich durch Stress vor der LPS-Injektion auch eine verstärkte Fieberreaktion (Johnson *et al.*, 2002; Johnson *et al.*, 2003b).

2.2.2. Andere exogene Pyrogene

Prinzipiell werden sowohl Bakterien als auch Viren und Pilze bzw. deren Bestandteile zur Fiebererzeugung eingesetzt. Muramyldipeptide sind die kleinsten Bausteine von Peptidoglycanen aus der Zellwand gram-positiver Bakterien. Diese Substanzen erzeugen ebenfalls Fieber (Atkins, 1960; Roth *et al.*, 1997a; Roth *et al.*, 1997b). Sie werden neben einer ganzen Bandbreite an anderen Molekülen verschiedener Mikroorganismen über den TLR2 erkannt. Auch Lipoproteine gram-negativer Bakterien oder Zymosan von Pilzen haben pyrogene Wirkung. Bei Zymosan handelt es sich um einen Zellwandbestandteil von Hefen (z.B. *Saccharomyces cerevisiae*). Es gehört ebenfalls zu den exogenen Pyrogenen, die häufiger für experimentelle Untersuchungen eingesetzt werden (Cremeans-Smith & Newberry, 2003). Auch bakterielle DNA sowie doppelsträngige RNA können über die

Aktivierung von TLR5/TLR9 bzw. TLR3 inflammatorische Reaktionen erzeugen (Kandimalla *et al.*, 2003; Takeda *et al.*, 2003). Hierbei stellt Poly I : Poly C (Polyinosinic : polycytidylic acid), eine synthetische doppelsträngige RNA, ein Modell für virale Infektionen dar. Einzelsträngige RNA kann endosomal mit Hilfe von TLR7 erkannt werden und dient als Modell für Infektionen mit RNA-Viren (Diebold *et al.*, 2004). *Mycoplasma fermentans* besitzt ein 2 kDa. großes Lipopeptid welches „Makrophagenaktivierendes Lipopeptid-2“ (MALP-2) genannt wird. Es stellt einen Vertreter der für Eubakterien untypischen, zellwandlosen Bakterien dar (Mühlradt & Frisch, 1994). Das bedeutet, dass man bereits über eine Vielzahl an exogenen Pyrogenen verfügt, die auch ohne Verwendung des infektiösen Erregers eine gute und reproduzierbare Untersuchung von Fieberentstehungsmechanismen ermöglichen.

3. Zytokine

Bei den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen zur Fieberentstehung bei lokalen bzw. systemischen inflammatorischen Prozessen spielen Zytokine eine entscheidende Rolle. Ebenso wie das Nervensystem oder das endokrine System benötigt auch das aktivierte Immunsystem Mechanismen der Signalübertragung zur Beeinflussung unterschiedlicher Organe. Diese Funktion wird von freigesetzten Zytokinen erfüllt, die neben zahlreichen Organen in der Körperperipherie auch das Gehirn beeinflussen. Die drei großen Regelsysteme des Organismus (Nervensystem, endokrines System und Immunsystem) stehen offensichtlich in vielfältiger Wechselwirkung zueinander, die man als „Neuro-Immun-Endokrine Interaktionen“ bezeichnet {Abbildung 6, (Blalock, 1989, 1994)}. Die Rolle der Zytokine im Rahmen derartiger Interaktionen soll unter besonderer Berücksichtigung von IL-6 im folgendem näher betrachtet werden.

3.1. Definition und Vorkommen

Zytokine beinhalten eine strukturell sehr heterogene Gruppe von Substanzen, die traditionell mit dem Immunsystem in Verbindung gebracht werden. Eine Definition und Einteilung ist, wenn auch über ihre Funktionen und Eigenschaften möglich, relativ ungenau.

Man könnte Zytokine zum Beispiel in folgender Weise definieren: Es handelt sich bei Zytokinen um regulatorische lösliche Proteine, Glykoproteine und Polypeptide, die von weißen Blutzellen und einer ganzen Bandbreite anderer Körperzellen abgegeben werden. Die pleiotrope Wirkung von Zytokinen in nano- bis pikomolaren Konzentrationen beinhaltet zahlreiche Effekte auf das Immunsystem sowie einer Modulation inflammatorischer Prozesse. (Thomson, 1991, 1994; Ibelgaufits, 1995). Mit einem Molekulargewicht von 8-30 kDa. sind Zytokine vergleichsweise große wasserlösliche Substanzen, die Wachstum, Differenzierung und Funktion unterschiedlichster Zelltypen regulieren. Neben einer lokalen so genannten parakrinen oder autokrinen Wirkung in allen Geweben des Körpers können sie bei stark erhöhter Produktion auch in die Blutbahn übertreten. Dort verhalten sie sich wie klassische Hormone und agieren auf systemischer Ebene. Zytokine gehören im Allgemeinen zu den am besten und am schnellsten induzierbaren Proteinen. Ihr Expressionslevel kann dabei durch bakterielle, virale, inflammatorische und Stress-induzierte Stimuli von kaum detektierbaren Werten (10^{-15} - 10^{-12} M) innerhalb von 30-90 Minuten auf 100-10.000fach erhöhte Werte (10^{-9}

- 10^{-7} M) ansteigen (Pollmächer *et al.*, 2002; Conti *et al.*, 2004). Zudem ist die Bildung streng reguliert. Zytokine werden hauptsächlich von aktivierten Zellen produziert, obwohl für einige Zytokine auch eine basale (10pg/ml) konstitutive Expression gezeigt werden konnte {IL-6, (Roth *et al.*, 1993; Pollmächer *et al.*, 2002)} Nur für Mastzellen wurde beschrieben, dass sie präformierten Tumor-Nekrose-Faktor- α (TNF- α) beinhalten (McCurdy *et al.*, 2001). Ansonsten werden Zytokine ausschließlich vor ihrer Ausschüttung neu synthetisiert und dann sehr schnell wieder abgebaut, wodurch sie nur einen kurzen Wirkungszeitraum besitzen. Da gleiche Zytokine von vielen verschiedenen Zellen produziert werden und andererseits bei verschiedenen Zelltypen (Ambiguität) unterschiedliche Wirkungen hervorrufen können (Pleiotropie), ist es schwierig, sie anhand ihrer Effekte zu beurteilen und zu charakterisieren (siehe auch Abbildung 6).

- Verschiedene Zellen
- Pleiotropie
- Ambiguität

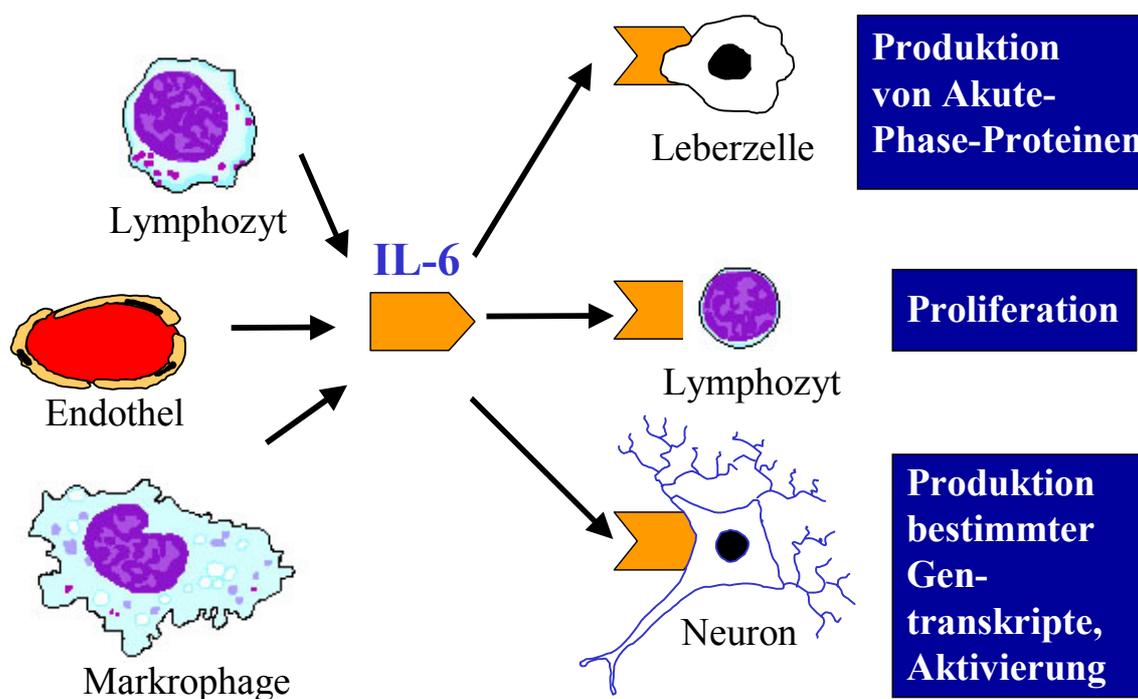


Abbildung 6

Funktionelle Eigenschaften von Zytokinen I: IL-6 wird von einer ganzen Reihe von Körperzellen produziert und hat über seinen spezifischen Rezeptor sowohl Auswirkungen auf das Immun- als auch auf das Nervensystem und auf die Leber als Produktionsstätte der AP-Proteine. IL-6 kann sogar über eine Aktivierung von Nervenzellen zu einer Stimulierung der HPA-Achse (Hypothalamo-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse) führen (Ambiguität, Pleiotropie). Damit ist es ein Vermittler „Neuro-Immuno-Endokrinen-Interaktion“ (Gruol & Nelson, 1997).

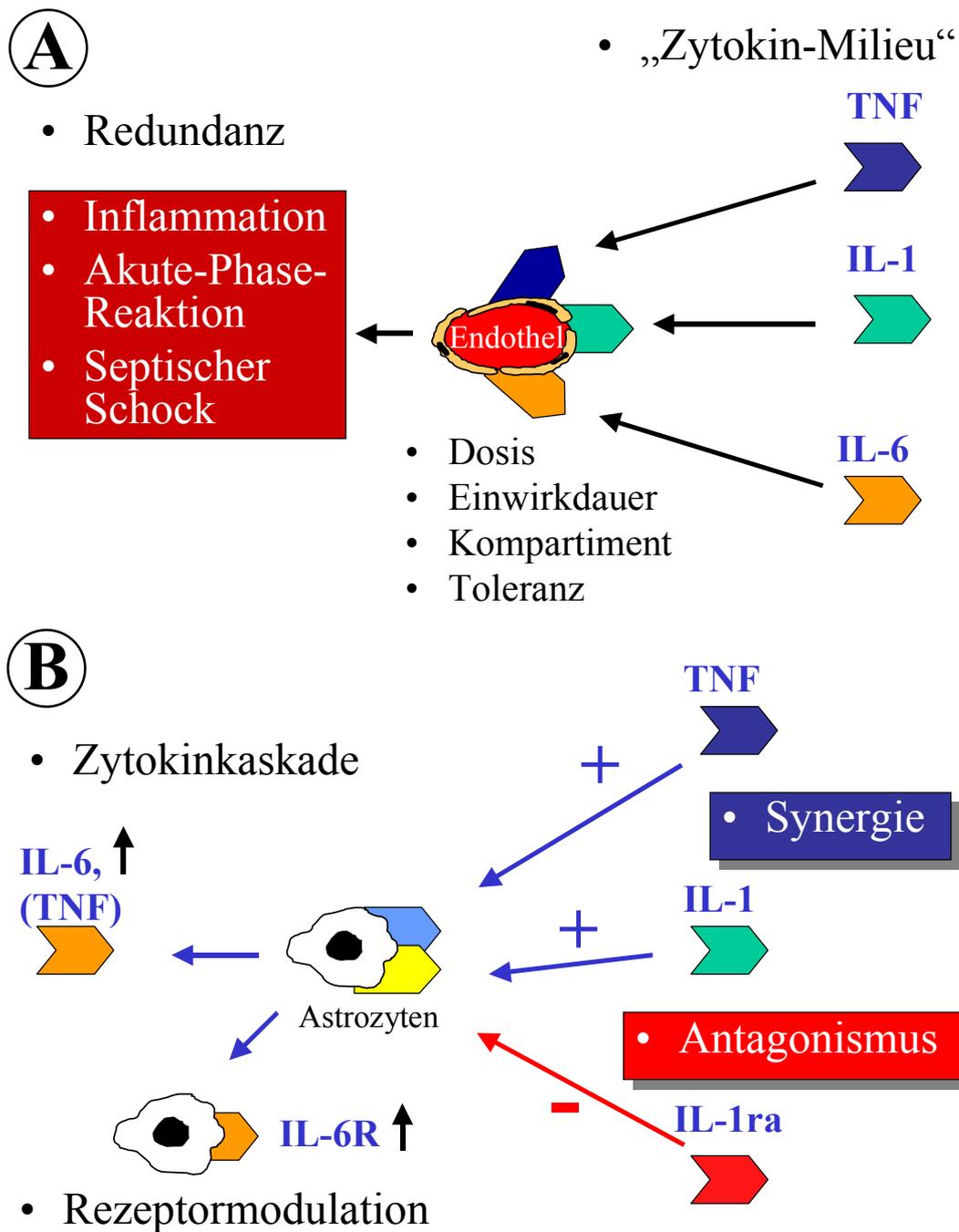


Abbildung 7

Funktionelle Eigenschaften von Zytokinen II: (A) Man spricht von einem „Zytokin-Milieu“, weil *in vivo* immer eine ganze Reihe von Zytokinen Wirkungen hervorrufen, die über verschiedene Rezeptoren vermittelt trotzdem zu einem einheitlichen Resultat führen können. Die Konzentration, Wirkdauer und Ort der Wirkung bestimmt den endgültigen Effekt. Es sind dabei mehrere Variationen von lokalen Entzündungen über systemische APR bis hin zur Sepsis möglich. Neben Toleranzeffekten beeinflussen sich die Zytokine gegenseitig (B). TNF und IL-1 wirken synergetisch stärker als jeweils ein Mediator alleine. Beide Zytokine können dabei im Rahmen der Zytokin-Kaskade die Produktion von IL-6 induzieren (Benveniste *et al.*, 1990). IL-6 und sein IL-6 Rezeptor (IL-6R) werden zum Teil von derselben Zelle gebildet, was eine autokrine und parakrine Wirkung von IL-6 vermuten lässt (Gruol & Nelson, 1997).

TNF, Tumor-Nekrose-Faktor; IL-1, Interleukin-1; IL-1ra, IL-1 Rezeptor-Antagonist

Zusätzlich können aber auch verschiedene Zytokine überlappende oder sogar gleiche Wirkungen hervorrufen {Redundanz, Teilbild A in Abbildung 7 (Paul, 1989)}. Dieses wird teilweise über die Aktivierung gleicher Signaltransduktionsmechanismen durch unterschiedliche Zytokine erklärt. Außerdem beeinflussen sich Zytokine in ihrer Wirkung untereinander. Es treten synergetische und antagonistische Effekte auf (Teilbild B in Abbildung 7). Aufgrund der vielseitigen Wechselwirkungen (Zytokine, Hormone, Neurone) ist prinzipiell immer die Einzelbetrachtung eines Zytokins mit Vorsicht zu interpretieren. Es muss davon ausgegangen werden, dass es sich immer um ein komplexes „Zytokin-Milieu“ handelt, das für die Auslösung physiologischer und pathophysiologischer Prozesse verantwortlich ist, und zusätzlich hormonell und neuronal reguliert wird {Abbildung 7, (Vilcék, 1994)}.

Man unterscheidet prinzipiell zwischen Interleukinen, Tumor Nekrose Faktoren, Interferonen, Chemokinen, Hämatopoetinen und Kolonie stimulierenden Faktoren. Schließlich werden auch Wachstumshormone und Neurotrophine wegen ihrer ähnlichen Wirkungen zu den Zytokinen gezählt. Neben einer funktionellen Einteilung kann man Zytokine nach ihrer dreidimensionalen Gesamtstruktur, nach ihren Induktionsmechanismen und bezüglich verschiedener Rezeptoruntereinheiten einteilen (Turnbull & Rivier, 1999).

3.2. Zytokine als endogene Pyrogene

Eine humorale bzw. parakrine Wirkung von Zytokinen konnte auch für das ZNS gezeigt werden. Viele Gliazellen und Neurone exprimieren sowohl Zytokine als auch deren Rezeptoren. Den Zytokinen wird im ZNS eine Rolle bei der Gehirnentwicklung, eine trophische Wirkung und eine funktionelle Bedeutung bei entzündlichen Prozessen zugeschrieben. Einige Zytokine zeigen darüber hinaus auch pyretische oder antipyretische Wirkungen (Conti *et al.*, 2004).

Bereits seit langer Zeit wurde postuliert, dass endogene Moleküle als Pyrogen wirken könnten, um Fieber zu erzeugen (Beeson, 1948). Durch die Gabe von exogenen Pyrogenen (z.B. LPS) identifizierte man schließlich endogen gebildete zirkulierende Zytokine als potenzielle endogene Pyrogene. Für dieses Konzept der Fieberentstehung wurden den Koch'schen Postulaten entsprechend Kriterien aufgestellt, die solche endogene Pyrogene erfüllen sollten (Kluger, 1991). Drei Punkte werden in der Literatur zur Unterstützung dieser Hypothese genannt.

Zum einen konnte wiederholt gezeigt werden, dass zirkulierende Zytokine mehr oder weniger simultan und parallel zum Verlauf der Fieberreaktion in der Blutbahn auftauchen. Bei der Gabe von LPS als exogenes Pyrogen ist je nach Applikationsform eine so genannte Zytokin-Kaskade zu beobachten (Zeisberger, 1999; Roth & De Souza, 2001). TNF- α ist als erstes Zytokin im Blut messbar (Kluger, 1991; Roth *et al.*, 1993; Jansky *et al.*, 1995), gefolgt von Spuren an IL-1- β (Jansky *et al.*, 1995) und mit etwas Verzögerung von großen Mengen an zirkulierendem IL-6 (LeMay *et al.*, 1990; Roth *et al.*, 1993) und anderen Zytokinen (z.B. IL-8 oder IL-10), auf die hier nicht weiter eingegangen werden soll. Dieser zeitliche Verlauf konnte für mehrere Tierspezies und den Menschen dokumentiert werden (Zeisberger, 1999; Johnson *et al.*, 2003b). Dabei scheint bei Mensch (Nijsten *et al.*, 1987) und Tier (LeMay *et*

al., 1990; Kluger, 1991; Roth *et al.*, 1993; Roth *et al.*, 1994; Jansky *et al.*, 1995) IL-6 am besten mit den fieberbedingten Änderungen der Körperkerntemperatur zu korrelieren.

Zum anderen erzeugt die Gabe der Zytokine selbst bei verschiedenen Tierspezies aber auch beim Menschen Fieber. Für die nach LPS-Gabe in der Zirkulation auftauchenden Zytokine IL-1 β (Anforth *et al.*, 1998), TNF- α (Goldbach *et al.*, 1996) und IL-6 (Blatteis *et al.*, 1990; Dinarello *et al.*, 1991; Rothwell *et al.*, 1991; Harre *et al.*, 2002) konnte dies jeweils gezeigt werden.

Der dritte Punkt des Nachweises einer Rolle von Zytokinen als endogene Pyrogene basiert auf experimentellen Strategien zur Hemmung einer LPS-induzierten Zytokinbildung oder zur Blockade der Zytokin-Wirkung. Derartige „Anti-Zytokin-Strategien“ führten sowohl für TNF- α über ein TNF-Bindungsprotein (TNF-bp) (Roth *et al.*, 1998a) als auch für IL-1 β über IL1-ra, einem endogenen Rezeptor-Antagonisten (Roth & De Souza, 2001), zu einer Reduktion der Fieberantwort. Diese war auf die zweite Fieberphase beschränkt. Eine reduzierte Fieberantwort konnte bei einer lokalen Entzündung durch LPS auch über eine Vorbehandlung mit IL-6-Antiserum erzielt werden (Cartmell *et al.*, 2000).

Weitere Befunde wurden durch den Einsatz von Zytokin „Knockout“-Mäusen erhoben. Obwohl diesbezüglich kontroverse Ergebnisse vorliegen, gibt es doch vor allem für IL-6 den Hinweis, dass ein mit einer moderaten LPS-Dosis induziertes Fieber bei Wildtiermäusen, nicht aber bei den IL6-defizienten Mäusen erzeugt werden kann (Chai *et al.*, 1996). Bei IL-1 β -Knockout-Mäusen ist die Fieberreaktion nach LPS-Gabe in niedriger Dosierung nicht völlig unterdrückt. Es wurde daher postuliert, dass bei LPS-induziertem Fieber IL-6 notwendig ist (Conti *et al.*, 2004) bzw. außer IL-1 noch andere pyrogene Substanzen wirken müssen. Zusätzlich scheinen IL-6 und IL-1 β vor allem bei lokalen Entzündungsreaktionen (Modell Terpentin) eine entscheidende Rolle bei der Fieberentstehung zu spielen. Bei der systemischen Applikation von LPS in hoher Dosierung zeigten IL-6-Knockout-Mäuse jedoch eine normale Fieberreaktion und nur bei IL-1 β -Knockout-Mäusen konnte noch eine Reduzierung des Fiebers festgestellt werden. In Fällen einer besonders starken LPS-induzierten systemischen Inflammation scheinen Zytokine demzufolge nur teilweise an der Fieberentwicklung beteiligt zu sein (Kozak *et al.*, 1998). Bei der Induktion einer Sepsis durch Ligation des Caecums und anschließender Punktion entsteht eine initiale Hypothermie gefolgt von einem verlängerten Fieber. Die Fieberkomponente dieser Reaktion entwickelte sich in IL-6-Knockout-Mäusen nicht mehr (Leon *et al.*, 1998). IL-6 scheint also insgesamt ein notwendiges pyrogenes Zytokin in einigen, aber nicht in allen experimentellen Fiebermodellen zu sein. Dies hängt von der verwendeten Dosierung und der Applikationsform des Entzündungsreizes ab.

3.3. Inflammatorisch

Die wichtigsten proinflammatorischen Zytokine oder endogenen Pyrogene sind IL-1 β und TNF- α (Dinarello, 1997). Zusammen mit IL-6 werden sie generell als die Hauptmediatoren der Fieberreaktion bei bakteriellen Infektionen (gram-negative Bakterien) angesehen (Xin & Blatteis, 1992; Blatteis, 2004a). Es soll hier allerdings nur auf die Rolle von IL-6 näher eingegangen werden.

3.3.1. IL-6

IL-6 gehört zu einer Zytokinfamilie, bei der alle Zytokine eine gemeinsame Rezeptoruntereinheit, das so genannte gp130-Molekül, besitzen (Kishimoto *et al.*, 1994). Diese Gruppe von Zytokinen beinhaltet neben IL-6 auch IL-11, CNTF (ciliary neurotrophic factor), LIF (leukemia inhibiting factor), Leptin, OSM (oncostatin M), CT-1 (cardiotropin-1) und CLC (cardiotropin-like cytokine) (Kishimoto *et al.*, 1995; Taga & Kishimoto, 1997; Heinrich *et al.*, 1998; McCowen *et al.*, 1998; Heinrich *et al.*, 2003).

IL-6 ist ein wichtiger Mediator der Wirtsantwort auf Krankheiten. Das humane Gen von IL-6 ist auf Chromosom 7p15-p21 gelegen und wird von einer Vielzahl von Zellen transkribiert. Hierzu gehören Monozyten, Makrophagen, Fibroblasten, Synoviozyten und Endothelzellen, die im Rahmen von Infektionen, Verletzungen und anderen Noxen zur Bildung von IL-6 stimuliert werden (Kishimoto *et al.*, 1995). Im ZNS wird IL-6 auf entsprechende Reize in Gliazellen und Neuronen gebildet (Frei *et al.*, 1989; Maimone *et al.*, 1993). Humanes IL-6 wird als Vorstufe produziert (212 Aminosäuren, AS) und durch Proteolyse in eine aktive Form (184 AS) umgewandelt. Dieses Glykoprotein kommt im Plasma mit einem Molekulargewicht von 23-30 kDa. vor, was mit dem Vorhandensein von unterschiedlichen Zuckeranteilen zusammen hängt (May *et al.*, 1988). IL-6 hat eine wichtige Vermittlerfunktion zwischen Zellen des Immunsystems und anderen Geweben. Es induziert die Produktion von AP-Proteinen in der Leber, ist ein wichtiger Wachstums- und Differenzierungsfaktor des Immun- und Blutbildungssystems und wird in zelluläre Funktionen des ZNS einbezogen, wie Zell zu Zell Kommunikation, Regulation von neuro-immunen Interaktionen und Neuroprotektion (Gruol & Nelson, 1997). Studien zeigten, dass IL-6 im Gehirn sowohl neurotrophische als auch neurotoxische Effekte hat. Es wurden unter anderem zwei verschiedene transgene Mäuse gezüchtet, die IL-6 überexprimieren (Campbell *et al.*, 1993; Fattori *et al.*, 1995). Nur in einem dieser Mäusemodelle traten schwere neuronale und vaskuläre Veränderungen auf, die mit starken Verhaltensänderungen einhergingen. Es scheint also zumindest teilweise eine chronische Exposition des Gehirns mit erhöhten Mengen an IL-6 zu schweren Störungen der normalen ZNS-Funktionen zu führen (Gruol & Nelson, 1997). Andererseits sind IL-6 Konzentrationen im Blut auch bei Hirntraumata (Kossmann *et al.*, 1995; Kossmann *et al.*, 1996) und Erkrankungen wie Parkinson (Mogi *et al.*, 1994) oder Alzheimer (Wood *et al.*, 1993) erhöht.

IL-1 und TNF- α können potenziell die Bildung von IL-6 induzieren (Van Damme *et al.*, 1987; Zhang *et al.*, 1990; Zetterström *et al.*, 1998). Man spricht hier wiederum von einer Zytokin-Kaskade, bei der IL-6 erst als distaler Mediator auftritt (Teilbild B in Abbildung 7). IL-6 Konzentrationen im Blut fallen beim Einsatz von IL-1ra (IL-1-Rezeptor-Antagonist) oder TNF- α Antikörpern deutlich niedriger aus (Elliott *et al.*, 1994; Fisher *et al.*, 1994; Fantuzzi & Dinarello, 1996) oder steigen durch Applikation von Antikörper gegen IL-1ra an (Cartmell *et al.*, 2001). Dies sind weitere experimentelle Beweise für die Existenz der erwähnten Zytokin-Kaskade. IL-6 wiederum hemmt die Expression von TNF- α und IL-1 β (Schindler *et al.*, 1990; Dinarello, 1997), ein Phänomen, das als negative Rückkopplung interpretiert werden kann.

Abgesehen davon, dass Messungen von IL-6 im Blut im Vergleich zu TNF- α und IL-1 β verlässlicher sind, so handelt es sich bei IL-6 auch um das Zytokin, welches am besten mit fieberhaften akuten Krankheitsstadien korreliert. Zusätzlich steigen die zirkulierenden IL-6 Werte um mindestens eine Zehnerpotenz stärker an als TNF- α oder IL-1 β (Dinarello, 1999) und sind während der ganzen Fieberreaktion in erhöhten Konzentrationen messbar (Roth *et al.*, 1993; Miller *et al.*, 1997b; Cartmell *et al.*, 2000). IL-1 β ist häufig kaum zu detektieren und TNF- α Konzentrationen sinken bereits in der Frühphase der Fieberreaktion wieder ab (Roth *et al.*, 1993). Im so bezeichneten subkutanen „Air-pouch“-Modell oder der im Rahmen dieser Arbeit verwendeten subkutanen Kammer (siehe Kapitel III 1.1.2) werden lokale inflammatorische Prozesse imitiert. LPS, TNF- α und IL-1 β treten dabei kaum vom Ort der lokalen Entzündung in die Zirkulation des Blutes über, IL-6 allerdings ist, wenngleich moderat konstant im Plasma erhöht (Miller *et al.*, 1997b; Cartmell *et al.*, 2000; Ross *et al.*, 2000; Cartmell *et al.*, 2001; Ross *et al.*, 2003; Turnbull *et al.*, 2003). IL-6 könnte also das einzige Zytokin sein, welches LPS-induziert in größeren Mengen in der Zirkulation bei systemischen und lokalisierten Entzündungsprozessen zu finden ist. Im Gegensatz dazu treten TNF- α und IL-1 β in messbaren Konzentrationen nur nach systemischer Gabe von LPS im Plasma auf. Folglich wird IL-6 als wichtiger Faktor der Informationsweiterleitung zum ZNS betrachtet, welcher die zentralnervös kontrollierte APR mit Fieber, „Sickness Behavior“ und der Aktivierung der Hypothalamo-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse (HPA Achse) vermittelt (Cartmell *et al.*, 2000; Dantzer, 2001b; Turnbull *et al.*, 2003). Die Bedeutung von IL-6 als Botenstoff wird dadurch unterstrichen, dass neben der Fieberreaktion auch die HPA-Aktivierung bei IL-6-Knockout-Mäusen unterdrückt ist (Turnbull *et al.*, 2003). Trotzdem hat IL-6 in mehreren Studien je nach Dosierung und Applikationsroute eher moderate oder sogar keine pyrogene Eigenschaften gezeigt (Helle *et al.*, 1988; Blatteis *et al.*, 1990; Sakata *et al.*, 1991; Cartmell *et al.*, 2000; Harre *et al.*, 2002). IL-6 wirkt allerdings stark pyrogen, wenn es in Kombination mit anderen Zytokinen wie IL-1 appliziert wird, auch dann wenn beide Zytokine in weit subpyrogener Dosis zusammen injiziert wurden (Cartmell *et al.*, 2000). Es scheint also, dass es sich bei IL-6 zumindest unter speziellen experimentellen Bedingungen um ein für die Fieberentwicklung essenzielles pyrogenes Zytokin handelt (Roth *et al.*, 2004).

3.4. Antiinflammatorisch

Abgesehen von dem endogenen Liganden IL-1ra (Eisenberg *et al.*, 1990; Hannum *et al.*, 1990) und den löslichen Rezeptoren für IL-1 und TNF werden im LPS-induzierten Entzündungsmodell auch so genannte antiinflammatorische Zytokine gebildet (Fernandez-Botran, 2000). Diese Stoffe gegenregulieren inflammatorische Prozesse und verhindern eine Überreaktion. Zu den antiinflammatorischen Zytokinen gehören unter anderem IL-4, IL-10, IL-13 und TGF- β (transforming growth factor- β) (Cartmell *et al.*, 2003). Sie modulieren Immun- und inflammatorische Prozesse, was schließlich zu einem Abklingen der Entzündung und zu einer Rückkehr der Integrität von entzündeten Geweben führt (Opal & DePalo, 2000). Auch IL-6 hat abgesehen von seinen proinflammatorischen Eigenschaften auch antiinflammatorische Wirkungen und protektive Funktionen im Verlauf kritischer Krankheitsstadien (Xing *et al.*, 1998).

IL-6 hemmt zum einen die Produktion von IL-1 und TNF (Kapitel II 3.3.1). Zum anderen konnte gezeigt werden, dass Infusionen von kleinen Mengen an IL-6 beim Menschen zu einer Produktion von IL1ra, löslichen TNF-Rezeptoren, IL-10 und Kortisol führt (Tilg *et al.*, 1994; Steensberg *et al.*, 2003). All diese Substanzen vermitteln antipyretische Effekte (Roth *et al.*, 1998a; Conti *et al.*, 2004; Roth *et al.*, 2004). Deshalb könnte IL-6 auch teilweise den Fiebrückgang und nicht nur die Entstehung beziehungsweise Erhaltung von Fieber beeinflussen. Zusätzlich scheinen auch die APR induzierenden Eigenschaften von IL-6 teilweise von antiinflammatorischer Natur zu sein (Tilg *et al.*, 1997; Dinarello, 1999). Dies wird vor allem daraus geschlossen, dass viele AP-Proteine „Sauerstoffradikalfänger“ und Antiproteasen sind (Dinarello, 1999). Antitrypsin verhindert beispielsweise die Superoxidbildung von Neutrophilen und damit wahrscheinlich Gewebeschäden durch Superoxidradikale (Bucurenci *et al.*, 1992), reduziert aber hierdurch auch die inflammatorische Abwehr von Mikroorganismen.

4. Signaltransduktionswege auf zellulärer und molekularer Ebene

Die Wirkung von Zytokinen hängt von der spezifischen Ausstattung der jeweiligen Körperzellen an Rezeptoren und den damit verbundenen Signaltransduktionsprozessen ab. Zytokine als hydrophile Makromoleküle wirken nicht in der Zelle sondern durch Bindung an Membranrezeptoren. Durch transmembranäre Strukturen kann die Zytokin-vermittelte Information in das Zytoplasma übertragen werden. Schließlich kommt es direkt oder indirekt über so genannte „second messenger“ Moleküle zu einer strukturellen oder funktionellen Veränderung in der aktivierten Zelle. Solche Second-Messenger-Systeme haben den Vorteil, dass eine Information potenziert, also verstärkt, und dem Bedarf entsprechend moduliert werden kann. Zytokine wirken über derartige Systeme. Entsprechend der jeweiligen Zellausstattung und Funktion im Zellverband kann die Auslösung des gleichen Signaltransduktionsmechanismus sehr verschiedene, an die Situation angepasste Effekte haben. Zum Verständnis der Zytokin-vermittelten biologischen Antworten, zu denen Fieber gehört, soll beispielhaft die Aktivierung von Zielzellen mittels der Pyrogen-aktivierten Transkriptionsfaktoren STAT3 (durch IL-6), NF- κ B (durch LPS/IL-1) und FOS (durch LPS und Zytokine) etwas näher betrachtet werden.

4.1. gp130 Rezeptorfamilie

Die Zytokine der so genannten IL-6-Familie, zu der IL-6, IL-11, LIF, OSM, CNTF, CT-1 und CLC gehören, beinhalten eine wichtige Gruppe von Mediatoren, die an der Regulation der APR, Verletzungen und Infektionen beteiligt sind (Heinrich *et al.*, 2003). Sie zeichnen sich dadurch aus, dass eine Signaltransduktion über einen komplexen bestehenden Mechanismus in mehreren Schritten erfolgt. Gemeinsam ist allen die Beteiligung des Glykoproteins 130 (gp130) in dem Informations-übermittelnden Plasmamembran-Rezeptorkomplex. Leptin beispielsweise besitzt letztendlich den gleichen „second messenger“ (STAT3) wie IL-6, hat allerdings keinen zusammengesetzten, sondern einen einzelnen spezifischen Membran-durchspannenden Rezeptor, der nicht mit gp130 identisch ist (Hegyí *et al.*, 2004). Genauso wie Prolaktin und das Wachstumshormon (GH) teilen solche Hormone

mit der gp130 Rezeptorfamilie die Signaltransduktion über die JAK-STAT-Kaskade (Auernhammer & Melmed, 2001).

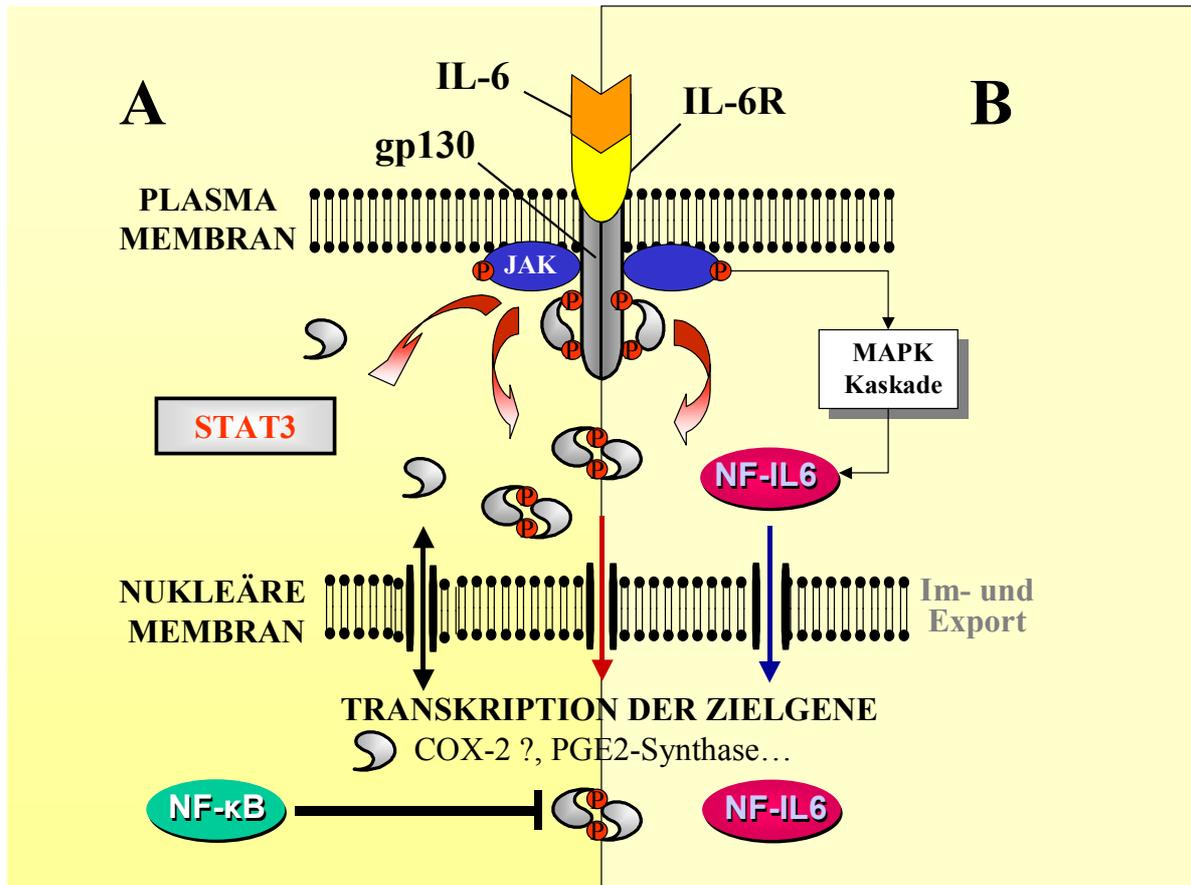


Abbildung 8

Schematische Übersicht der Signaltransduktion von IL-6 über zwei verschiedene Wege: (A, linke Hälfte) Neben einem basalen Im- und Export von STAT3 Monomeren kommt es bei Anlagerung von IL-6 an seinen Rezeptor (IL-6R) zu einer Dimerisierung von zwei gp 130 Untereinheiten. Am entstehenden Rezeptorkomplex assoziierte Janus Kinasen (JAK) werden dadurch aktiviert (autophosphoryliert) und phosphorylieren die gp 130 Untereinheiten. STAT3 Moleküle assoziieren sich an den Komplex und werden ebenfalls durch JAKs phosphoryliert. Die aktivierten STAT3 Monomere dissoziieren, dimerisieren und wandern daraufhin in den Kern der aktivierten Zelle. Dort regulieren sie die Genexpression über Bindungen an spezifische Promotoren. (B) Alternativ kann die MAPK-Kaskade (mitogen activated protein kinase) ablaufen, bei der unter anderem der Transkriptionsfaktor NF-IL6 aktiviert wird, der ebenfalls im Kern die Genexpression reguliert. NF-κB kann die STAT3 Anlagerung an die DNA hemmen.

Man unterteilt bei der Rezeptorfamilie gp130 zwei Untergruppen. Die eine verwendet einen nicht direkt das Signal vermittelnden α -Rezeptor, wozu IL-6, IL-11 und CNTF gehören. Eine andere Gruppe besitzt Membran-durchspannende Rezeptoren. Die α -Rezeptoren verfügen zwar über die Bindungsstelle für den Liganden (z.B. IL-6), benötigen aber ein Homodimer (IL-6, IL-11) oder ein Heterodimer (CNTF) einer β -Rezeptoruntereinheit, die bis in das Zytosol der Zelle reicht und damit Informations-vermittelnd wirkt. Für IL-6 gibt es demzufolge einen Rezeptorkomplex aus zwei gp130 Molekülen verbunden mit dem α -Rezeptor (IL-6R). Der Ablauf der Wirkung von IL-6 ist wie folgt zu beschreiben: nach Bindung von IL-6 an die α -Untereinheit (IL-6-Rezeptor, IL-6R) kommt es zu einer

Homodimerisation von zwei gp130 β -Untereinheiten. gp130-assoziierte Kinasen (Januskinase, JAK) werden aktiviert, was mit einer Autotyrosinphosphorylierung einhergeht. Außerdem werden die gp130 Untereinheiten phosphoryliert, wodurch Bindungsstellen für STAT3 Moleküle („Signalübersetzer und Aktivator der Transkription“, „signal transducer and activator of transcription“) freigelegt werden und diese sich dort an den Rezeptorkomplex assoziieren. Diese STAT3 Monomere werden gleichermaßen durch die JAKs phosphoryliert, dissoziieren und bilden Dimere. Es handelt sich dabei um Homodimere (STAT3/STAT3) oder seltener um Heterodimere (STAT3/STAT1), die schließlich in den Zellkern wandern („nukleäre Translokation“) und dort als Transkriptionsfaktoren die Genexpression regulieren { Abbildung 8 Teilbild A, (Gruol & Nelson, 1997; Heinrich *et al.*, 1998; Takeda & Akira, 2000; Kisseleva *et al.*, 2002; Heinrich *et al.*, 2003)}.

Neben den in der Zellmembran verankerten IL-6R und gp130 kommen auch lösliche (sIL-6R, sgp130) Rezeptorformen im Blut vor. Im Unterschied zu anderen löslichen Rezeptortypen wie für TNF (sTNFR) konnte für den sIL-6R in einigen Studien eine agonistische Wirkung gezeigt werden (Schöbitz *et al.*, 1995; Romano *et al.*, 1997; Jones *et al.*, 2001). Für den sIL-6R nimmt man an, dass er zum Teil durch ein so genanntes „shedding“, einer begrenzten Proteolyse der Membran-gebundenen Form, entsteht (Müllberg *et al.*, 1993). Vorwiegend scheint er allerdings über alternatives „splicing“ der mRNA und Sekretion nach der Translation produziert zu werden (Lust *et al.*, 1992; Müller-Newen *et al.*, 1996; Heinrich *et al.*, 1998). Der sIL-6R bindet IL-6 mit gleicher Affinität wie der Membran-gebundene IL-6R (Stoyan *et al.*, 1993) und kann mit ubiquitär vorkommenden gp130 Molekülen assoziieren und eine normale Signaltransduktion gewährleisten. Die antagonistische Wirkung auf eine IL-6 Signaltransduktion von löslichen gp130 (sgp130) wird durch sIL-6R wiederum potenziert. Die Kombination beider Moleküle scheint eine Art Puffer zur Modulation der Antwort auf IL-6 darzustellen (Müller-Newen *et al.*, 1998).

Zusätzlich wird über die gp130 Rezeptorfamilie ein zweiter Signalweg aktiviert. Es handelt sich um die MAPK Kaskade (mitogen-activated protein kinase), die unter anderem zu einer Phosphorylierung von NF-IL-6 (nuclear factor IL-6) führt. Dieser ist wiederum ein Transkriptionsfaktor (Abbildung 8 Teilbild B).

Um eine Überstimulierung zu verhindern, gibt es hoch entwickelte Mechanismen, um eine Zytokin-induzierte Signaltransduktion wieder auszuschalten. Dabei spielt die Halbwertszeit aller einzelnen Faktoren eine entscheidende Rolle {IL-6R, 2-3 h; gp 130, 2.5 h, JAK, 1.9 h; STAT3, 4-8 h; SOCS3, 1.6 h (Heinrich *et al.*, 2003)}. Der Rezeptorkomplex wird internalisiert, zum Teil auch abgebaut oder einfach dephosphoryliert und wieder verwendet. Innerhalb von 30-60 Minuten internalisieren alle IL-6 Bindungsstellen an der Zelloberfläche (Nesbitt & Fuller, 1992). Im lysosomalen Kompartiment wird der IL-6 Rezeptor abgebaut (Graeve *et al.*, 1996). Die gp130 Untereinheiten können in der Zellmembran wieder verwendet werden (Heinrich *et al.*, 1998). Ein schnelles Verschwinden der inflammatorischen Zytokine aus der Zirkulation ist ebenfalls wichtig für das Wiederherstellen der Homöostase. Radioaktiv markiertes, zirkulierendes IL-6 ist zum Beispiel bereits 2 min. nach einer Bolusinjektion nicht mehr im Blut nachweisbar (Castell *et al.*, 1988). Es wird hauptsächlich in der Leber aus der Zirkulation herausgefiltert (Castell *et al.*, 1990). Außerdem wird die IL-6

Verfügbarkeit über Zytokin-Proteolyse reguliert. Im entzündeten Gewebe induziert IL-6 zum Beispiel die Ausschüttung von Elastase und anderen Proteasen aus neutophilen Granulozyten, welche wiederum IL-6 abbauen (Bank *et al.*, 1999).

Zusätzlich gibt es endogene „negative Feedbackmechanismen“, die ein Überschießen der Reaktion verhindern und die Signaltransduktion schließlich beenden. Dazu gehören eine ganze Reihe ubiquitär vorkommender Phosphatasen, die sowohl im Kern als auch im Zytoplasma die aktivierenden Phosphorylierungen der einzelnen Komponenten wieder abspalten (Heinrich *et al.*, 2003). Dadurch wird eine Inaktivierung erreicht. Zusätzlich gibt es zwei verschiedene Proteine, die weitere Phosphorylierungen von gp130, STATs und JAKs verhindern. Es handelt sich um ubiquitär tätige, induzierbare PIAS (protein inhibitor of activated STAT) und um spezifischer wirkende SOCS {supressor of cytokine signaling, Kapitel II 4.1.2, Abbildung 9, (Naka *et al.*, 1997; Starr *et al.*, 1997)}. PIAS-3 hemmt dabei beispielsweise die STAT3 regulierte Genexpression. Hierzu interagieren diese Moleküle mit den phosphorylierten STAT3-Dimeren und verhindern deren Bindung an die DNA {Abbildung 8, (Chung *et al.*, 1997)}.

Zur Erfassung der biologischen Bedeutung dieser Rezeptorfamilie ist eine Betrachtung der aktivierten Zielgene nötig (siehe STAT3, NF- κ B). Allgemein ist die gp130 Rezeptorfamilie in Differenzierung, Überleben, Apoptose und Proliferation von Zellen involviert. Neben pro- und antiinflammatorischen Funktionen spielen Zytokine der IL-6 Familie bei der Hämatopoese, der APR und der Immunantwort eine wichtige Rolle. Viele Untersuchungen zur Charakterisierung der Eigenschaften der IL-6-Signaltransduktion wurden mit Knockout-Mäusen oder transgenen Mäusen (die gewisse Gene überexprimieren) durchgeführt. Im Gegensatz zu IL-6-Knockout-Mäusen führte eine Deletion des STAT3, gp130 und des JAK Genes zu letalen Phänotypen (Yoshida *et al.*, 1996; Takeda *et al.*, 1997). Diese Faktoren scheinen also unentbehrlich für die Entwicklung und das Überleben der Mäuse zu sein.

Interessanterweise konnte erst kürzlich gezeigt werden, dass die Signaltransduktions-Maschinerie für IL-6 auch durch alternative Reize stimuliert werden kann. Eine Temperaturerhöhung bis auf 40°C verstärkte die L-Selektin vermittelte Adhäsion von Lymphozyten im Gewebe über eine Aktivierung des IL-6 abhängigen Signaltransduktionsweges (Chen *et al.*, 2004). Damit stellt Fieber als „Alarmsignal“ des Körpers einen Mechanismus dar, direkt Lymphozyten zum Beispiel im Rahmen der Extravasation zu mobilisieren (Evans *et al.*, 2001). Die Temperaturerhöhung an sich stimuliert dabei also das Immunsystem.

4.1.1. STAT3

Bislang wurden sieben verschiedene STAT Moleküle beschrieben (STAT1, 2, 3, 4, 5a, 5b, 6). STAT3 ist davon der am weitesten verbreitete Transkriptionsfaktor (Bhattacharya & Schindler, 2003). Dadurch wird die pleiotrope Wirkung von Zytokinen erklärt, die über diesen Faktor die Genexpression in verschiedensten Zelltypen beeinflussen können. Solche Zytokine gehören zu der IL-6-, IL-10- aber auch der Interferon-Familie (Kisseleva *et al.*, 2002). Bisher hat man STAT-Transkriptionsfaktoren nur in mehrzelligen Organismen nachgewiesen. Für die IL-6 getragenen Signaltransduktion bildet STAT3 nach entsprechender

Aktivierung Homo- oder Heterodimere, die daraufhin in den Kern wandern (Heinrich *et al.*, 1998). Für einen Teil dieser nukleären Translokation wurde ein Rezeptor-vermittelter, endozytotischer, Vesikel-betriebener Transport der STAT3-Dimere von der Zellwand-nahen Region der Aktivierung in eine perinukleäre Region beschrieben (Bild *et al.*, 2002). Für eine einfache Passage durch Nukleoporen sind die STAT-Moleküle allerdings zu groß (90 kDa.). Sie müssten also aktiv in den Kern eingeschleust werden. Prinzipiell scheint es zumindest auch einen permanenten Im- und Export von STATs in Zellkerne zu geben. Es sind beispielsweise nicht phosphorylierte STAT Moleküle immer im Kern zu finden (Meyer *et al.*, 2002). Diese werden als Koaktivatoren der eigentlichen phosphorylierten Dimere angesehen (Chatterjee-Kishore *et al.*, 2000). Potenzielle nukleäre Import- oder Exportsignale wurden allerdings bisher nur zum Teil identifiziert (McBride *et al.*, 2002). Für STAT3 wurde erst kürzlich der Export über spezifische NES (nuclear export signal) Elemente beschrieben (Bhattacharya & Schindler, 2003). Zudem hat sich der Verdacht erhärtet, dass es einen basalen kontinuierlichen Im- und Export von nicht phosphorylierten STAT3 in und aus dem Kern gibt, der in ruhenden Zellen ebenfalls auftritt (Abbildung 9). Bei Rezeptoraktivierung akkumulieren über eine schnelle Translokation schließlich phosphorylierte STAT3 Moleküle im Kern. Sie werden dephosphoryliert, wieder zügig in das Zytoplasma exportiert (Haspel & Darnell, 1999) und können dort prinzipiell wieder verwendet werden (Bhattacharya & Schindler, 2003). Ein Abbau über das Proteasom ist allerdings auch möglich. Die Halbwertszeit von STAT3 Molekülen beträgt zwischen 4,5 bis 8,5 Stunden, wodurch ihre Wirkung begrenzt wird und dann von einer Neusynthese abhängig ist (Heinrich *et al.*, 2003).

In ruhenden Zellen findet man STAT Moleküle hauptsächlich im Zytoplasma. Zur Sicherung der Signaltransduktion über STATs gibt es lediglich eine transiente Translokation in den Kern, welche durch eine Reihe von Mechanismen gesteuert ist (Bhattacharya & Schindler, 2003). Im Zusammenhang mit einem nicht aktivierten basalen STAT3 Austausch zwischen Zytoplasma und Kern könnte die einmalige Regulation dieser Prozesse die Wachstumsfunktion widerspiegeln, die diesen Stoffen zugeschrieben wird (Bowman *et al.*, 2000). So wurde eine konstitutive Aktivierung von STAT3 mit der Entstehung von Krebs als Zustand überstimulierten Wachstums in Verbindung gebracht (Bromberg *et al.*, 1999). Entscheidend für die Beurteilung der Rolle derartiger Transkriptionsfaktoren sind natürlich die Gene, die durch sie reguliert bzw. aktiviert werden können. Es handelt sich dabei um AP-Proteine, andere Transkriptionsfaktoren und eine ganze Reihe von zum Teil noch unbekannt Genen. Zu den STAT3-induzierten Transkriptionsfaktoren gehört unter anderem auch c-fos (Kapitel II 4.3).

Hinzu kommt, dass es einige Interaktionen von STAT3 mit anderen Transkriptionsfaktoren gibt, durch die eine wechselseitige Beeinflussung entsteht. So hemmen LPS und TNF beispielsweise die IL-6 induzierte STAT3-Aktivierung in Makrophagen über eine Produktion von Inhibitoren der Zytokin-Signalübertragung, so genannten SOCS {supressor of cytokine signaling, siehe auch Kapitel II 4.1.2, Abbildung 9, (Bode *et al.*, 1999)}. Für solche Hemmstoffe gibt es eine Induktion der Neusynthese durch LPS- bzw. TNF-induzierte Transkriptionsfaktoren. Zusätzlich erfolgt eine Interaktion von IL-6 mit IL-1, TNF und LPS auch ohne eine Neusynthese von Proteinen (Niemand *et al.*, 2003).

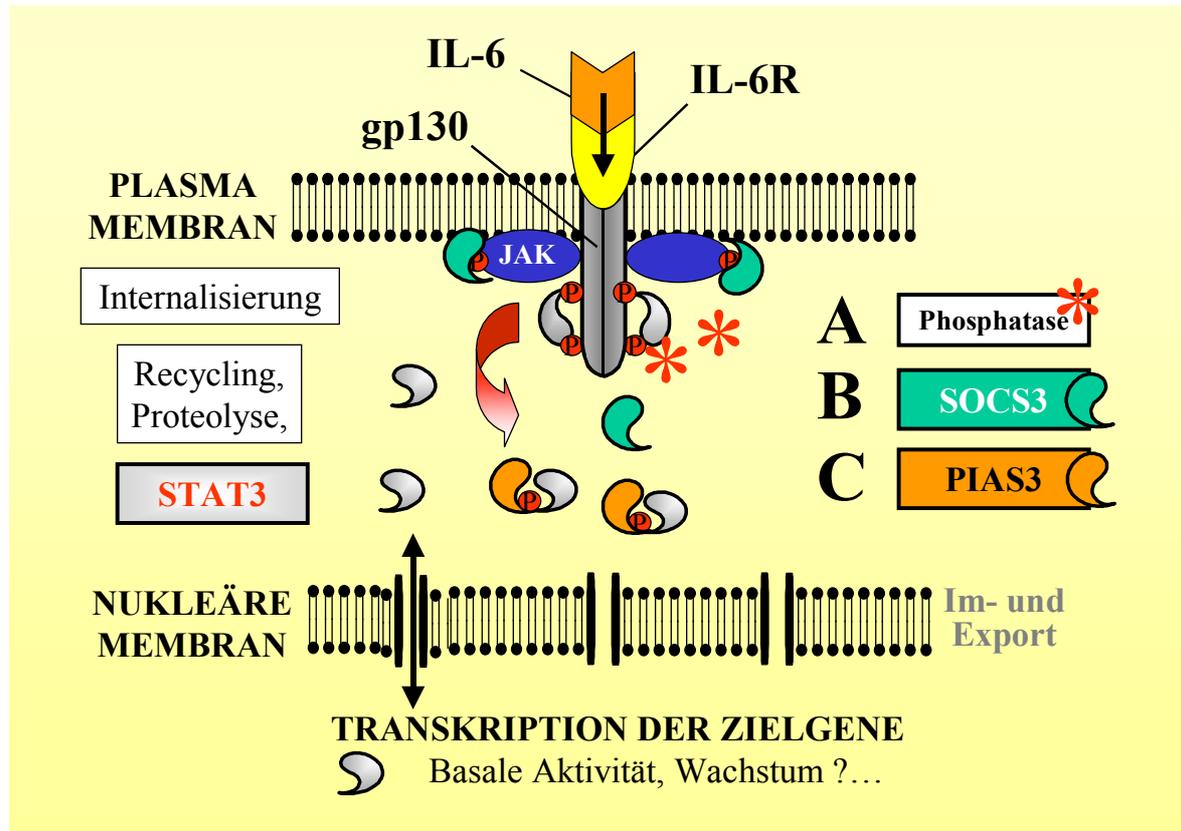


Abbildung 9

Terminierung der IL-6 Signaltransduktion: Der Rezeptorkomplex wird internalisiert, abgebaut und zum Teil wiederverwendet. Phosphatasen spalten die aktivierenden Phosphorylierungen der einzelnen Komponenten wieder ab (A). Inhibitoren der Zytokin Signalkaskade (SOCS) inhibieren die JAKs (Janus Kinasen, B) ebenso wie STAT3 Bindungsstellen und führen STAT3 Moleküle dem Abbau im Proteasom zu. Proteininhibitoren (PIAS) binden an bereits aktivierte STAT3 Monomere und verhindern damit deren Translokation in den Zellkern (C).

Eine kompetitive Hemmung von STAT3 durch NF- κ B, einem anderen Transkriptionsfaktor, induzierbar durch LPS, IL-1 und TNF, konnte anhand der Expression des AP-Proteins α 2-Makroglobulin gezeigt werden {Abbildung 9, (Bode *et al.*, 2001)}. Auch wenn viele potenzielle Zielgene noch nicht bekannt sind, so ist hervorzuheben, dass z.B. gp130 (O'Brien & Manolagas, 1997) als ein Teil des eigenen Aktivierungsrezeptorkomplexes und Proopiomelanocortin (POMC) (Ray *et al.*, 1996) eine Vorstufe von ACTH (Adrenocorticotropes Hormon) unter den Produkten STAT3-aktivierter Gene zu finden sind.

Die biologische Wirkung der Aktivierung der STAT3-Signalkaskade hängt also von vielen Faktoren ab. Zum einen spielen die mehrfachen Interaktionen mit anderen Transkriptionsfaktoren eine Rolle. Zum anderen hängt die resultierende Antwort vom Zelltyp und dessen Entwicklungsstatus ab, der das Resultat wiederum maßgeblich beeinflussen kann.

4.1.2. SOCS

Es sind bislang 8 verschiedene SOCS Proteine (suppressor of cytokine signaling) bekannt {SOCS-1-7; CIS 1, cytokine inducible SH2 protein, (Auernhammer & Melmed, 2001; Croker *et al.*, 2003; Hanada *et al.*, 2003)}. Es handelt sich hierbei um Feedback-Regulatoren der JAK-STAT Signalkaskade für viele Zytokine und Hormone inklusive der gp130 Zytokine,

Leptin und des Wachstumshormons GH. SOCS Proteine wirken im Netzwerk der intrazellulären Moleküle und dämpfen beziehungsweise hemmen pleiotrope Faktoren wie STATs. Damit spielen sie beispielsweise eine große Rolle bei der Regulation inflammatorischer und antiinflammatorischer Zytokin-Signale. SOCS Proteine hemmen also nicht nur spezifische Zytokin-Signale sondern koordinieren entsprechend eine angemessene biologische Antwort (Croker *et al.*, 2003). SOCS1 und SOCS3 wirken ähnlich und repräsentieren die potentesten, weit übergreifend wirkenden Inhibitoren der Zytokin-Signalkaskaden. Sie werden sogar als Regulatoren der Plastizität von gp130 Informationsvermittlung betrachtet (Lang *et al.*, 2003).

Die Funktion von SOCS besteht zum einen darin, dass sie direkt mit den Janus Kinasen interagieren und deren enzymatische Aktivität behindern. Zusätzlich können SOCS an phosphorylierte Tyrosinreste von intrazellulären Domänen der Rezeptoruntereinheiten (gp130, Leptinrezeptor, etc.) binden, was indirekt die Rezeptorfunktion inhibiert (Bjorbaek *et al.*, 2000; Nicholson *et al.*, 2000), da sich dann keine neuen STATs mehr anlagern können. Zum anderen leiten SOCS den Abbau von Signalproteinen ein, indem sie solche Proteine der Polyubiquitinylierung zuführen (Okabe *et al.*, 1999; Zhang *et al.*, 1999). Eine damit verbundene Anheftung mehrerer Ubiquitinmoleküle stellt das Signal für die Degradation von Proteinen im Proteasom dar. Neben IL-6 stimuliert auch LPS (über den TLR4) und Terpentin (Auernhammer & Melmed, 2001) die Bildung von SOCS (Bode *et al.*, 1999; Cassatella *et al.*, 1999; Stoiber *et al.*, 1999; Boisclair *et al.*, 2000). Dabei scheint SOCS3, wenn es durch IL-6 stimuliert wurde, lediglich spezifisch auf IL-6 induziertes STAT3 und beispielsweise nicht auf IL-10 induzierte STAT3 Aktivität zu wirken (Lang *et al.*, 2003; Yasukawa *et al.*, 2003). Das heißt, dass es verschiedene Isomere von SOCS3 geben muss, die sich in ihrer Spezifität unterscheiden. Man erklärt demnach den Unterschied in der jeweiligen Affinität zur Inhibition von IL-6 oder IL-10 induzierten STAT3 über posttranslationale Regulation der SOCS3-Moleküle (Sasaki *et al.*, 2003). Interessant ist allerdings, dass LPS nicht über STAT3 Signaltransduktion wirkt, sondern z.B. über NF- κ B (siehe Kapitel II 4.2). Es muss also noch eine andere Funktion von SOCS geben, wie beispielsweise die Hemmung des NF- κ B Signalweges (Nakagawa *et al.*, 2002). Damit wäre denkbar, dass LPS die IL-6-vermittelte STAT3 Kaskade hemmen kann (Lang *et al.*, 2003). Offensichtlich beeinflussen sich also unterschiedliche Signalkaskaden untereinander.

Ein wichtiges STAT1/STAT3 Bindungselement liegt im Promotor für SOCS3. Die Expression wird also durch STATs induziert und folgt entsprechend etwas später der STAT3 Induktion. Damit besitzt der Zytokin-Inhibitor SOCS3 einen negativen Rückkopplungsmechanismus für seine eigene Genexpression (Auernhammer *et al.*, 1999). Gleichzeitig wird ein schnelles Abschalten und Anschalten der Signalkaskade ermöglicht, was Zellen dazu befähigt, wiederholt auf aktivierende Reize in kurzen Zeitabständen zu reagieren. Bereits 30-60 Minuten nach einer systemischen LIF oder IL-1 β Gabe kann eine SOCS3 mRNA Expression induziert werden (Auernhammer *et al.*, 1998). Nach einem Peak der LIF induzierten Expression nach 40-60 min., fällt die Produktion von SOCS zum Zeitpunkt 90 min. wieder ab.

LPS und IL-1 β induzieren eine massive SOCS3 Expression in der Leber. Im Zusammenhang mit chronischen Krankheiten bei Kindern wird diskutiert, dass eine Zytokin-induzierte, erhöhte SOCS3 Genexpression über eine intrazelluläre Hemmung der Wirkung des GH zu verringertem Wachstum führt (Mao *et al.*, 1999; Colson *et al.*, 2000). SOCS3-Knockout-Mäuse sterben in der Embryonalphase, was mit einer dysregulierten fetalen Erythropoese und einer defekten Plazentafunktion zusammenhängt (Marine *et al.*, 1999; Roberts *et al.*, 2001). In adulten Geweben ist die Rolle von SOCS3 unterschiedlich. Es könnte an Mechanismen beteiligt sein, die die inflammatorische Reaktion von Koliden und Arthritiden negativ regulieren. Auch eine Rolle bei autoimmunen Krankheiten wird angenommen (Hanada *et al.*, 2003).

4.2. NF- κ B

Die Gruppe der NF- κ B (nuclear factor κ B) Proteine besteht bei Säugetieren aus 5 verschiedenen, eng verwandten Transkriptionsfaktoren (Rel, RelB, p65, p50 und p52). p50 und p52 liegen zunächst als Vorstufen (p105, p100) vor. Sie können mit den Rel-Komponenten dimerisieren und damit deren Aktivität blockieren, beziehungsweise stellen eine Reserve ihrer prozessierten Endprodukte dar. p105 wird dabei allgemein unter konstitutiven Bedingungen zu p50 umgewandelt. p100 allerdings wird nur im Rahmen einer Signalkaskade durch spezifische Signale aktiviert. Es handelt sich dabei um einen alternativen Signalweg auf den nicht näher eingegangen werden soll (Karin *et al.*, 2004). Gemeinsam ist allen NF κ B Transkriptionsfaktoren, dass sie nach adäquater Stimulation als Homo- oder Heterodimere in den Kern wandern und dort über Bindung an spezifische Promotoren die Gentranskription regulieren (Ghosh & Karin, 2002). Dieser Signalweg wird durch eine ganze Reihe von Faktoren aktiviert. Hierzu gehören unter anderem LPS, IL-1 und TNF. Es sind hier unterschiedliche Rezeptoren beteiligt, die schließlich die gleiche Signalkaskade aktivieren (siehe Abbildung 10 für TLR und IL-1RI).

Nach der Bindung von IL-1 β an seinen Rezeptor (IL-1RI) dimerisiert dieser mit seinem assoziierten Protein, gefolgt von einer Rekrutierung und Phosphorylierung von Rezeptor-assoziierten Kinasen (IRAK1 und IRAK2) über das Adaptermolekül MyD88. Das Enzym IRAK1 interagiert mit dem TNF Rezeptor assoziierten Faktor 6 (TRAF6), was zu einer Phosphorylierung und Aktivierung der NIK (NF- κ B induzierende Kinase) führt. Diese phosphoryliert wiederum den I κ B Kinase Komplex (IKK, inhibitorischer Faktor κ B Kinase). Er besteht aus drei Teilen, wobei die α - und β -Untereinheiten katalytisch wirken und die γ -Einheit regulatorische Funktion hat. Das p50/p65 Heterodimer von NF- κ B Monomeren ist die häufigste Form (Beg & Baldwin, 1993; Karin *et al.*, 2004). Es bildet mit einem I κ B (inhibitorischer Faktor κ B) Protein einen Komplex und liegt damit inaktiv vor. Eine Aktivierung bedingt eine durch Phosphorylierung induzierte Ubiquitylierung durch einen Ubiquitin-Ligase-Komplex. Dies geschieht, wenn eine aktivierte IKK das I κ B phosphoryliert. Im Zuge dessen kommt es zu einer Polyubiquitylierung von I κ B, welches sich vom Dimer (p50/p65) ablöst und einem schnellen Abbau im Proteasom unterzogen wird. Das

freiwerdende p50/p65 wandert in den Kern und wirkt dort Gen-regulierend {Abbildung 10, (Aggarwal, 2003; Nadjar *et al.*, 2003)}.

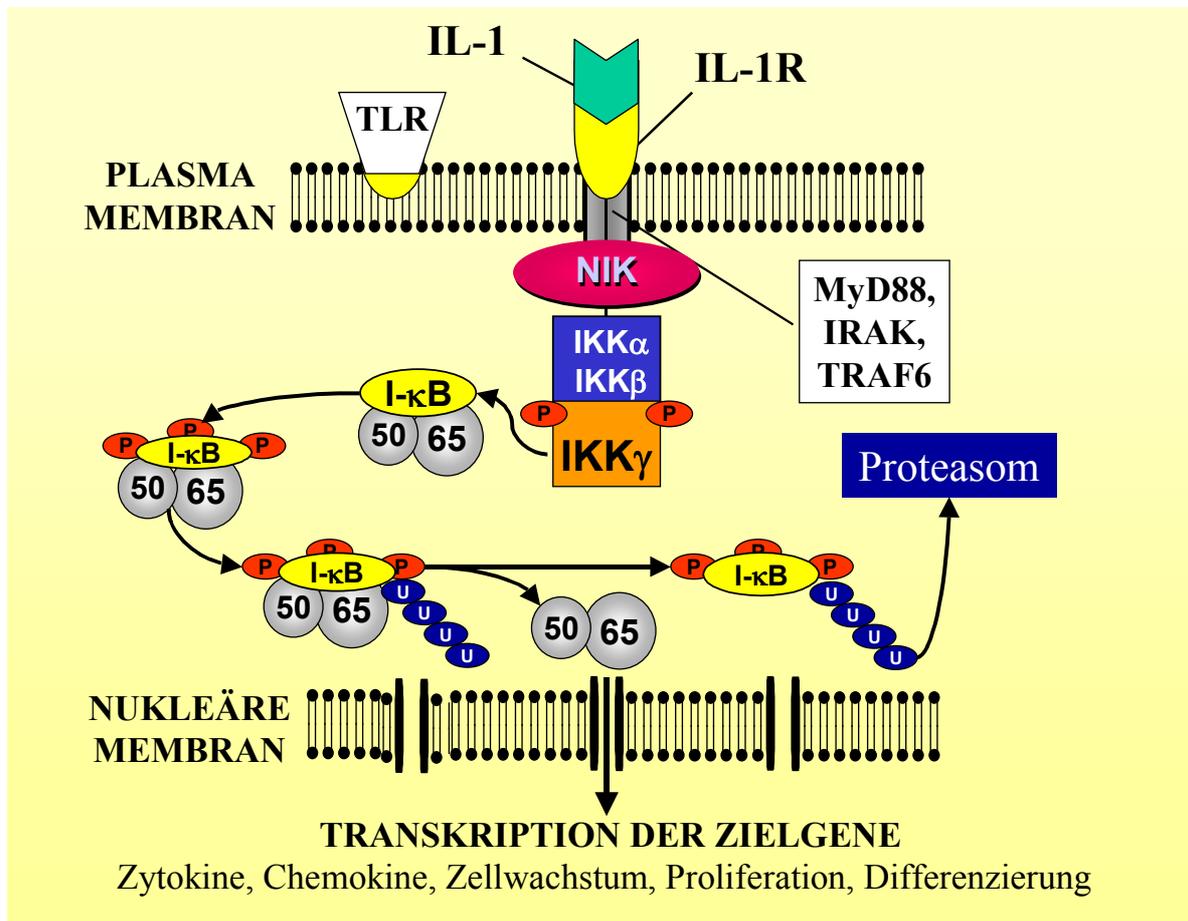


Abbildung 10

NF- κ B Signalkaskade vorgestellt anhand der Wirkung von IL-1: IL-1 bindet an seinen Rezeptor und aktiviert über ein Adaptermolekül (MyD88) die IL-1 Rezeptor-assoziierte Kinase (IRAK), die wiederum den TNF Rezeptor-assoziierten Faktor 6 (TRAF6) stimuliert. Eine NF- κ B induzierende Kinase (NIK) phosphoryliert (P) und aktiviert schließlich die I κ B Kinase (IKK) welche das inhibitorische Protein I κ B phosphoryliert. Dieses Protein ist mit zwei Untereinheiten von NF- κ B (50, p50; 60, p65) verbunden und wird über eine Ubiquitin-Ligase mit mehreren Ubiquitin-Molekülen (U) gebunden und über das Ubiquitin-Signal im Proteasom abgebaut. Das freiwerdenden NF- κ B (aus p50 und p65) wandert in den Zellkern und reguliert die Genexpression über spezifische Promotoren.

Kortison wirkt über eine Hemmung des Transkriptionsfaktors NF- κ B. Pathogen-assoziierte Erkennungsstrukturen (z.B. LPS) werden über Toll-Like-Rezeptoren erkannt, die ebenfalls über das Adaptermolekül MyD88 die NF- κ B Signalkaskade aktivieren können.

Eine Konsensussequenz dieses Transkriptionsfaktors ist in der Promotorregion einer Vielzahl von Genen lokalisiert. Es handelt sich dabei um Zytokine, Immunrezeptoren, Chemokine, Proteine des Komplementsystems, einige Neuromediatoren, Enzyme (iNOS, COX-2), Adhäsionsmoleküle aber auch I κ B (Vane *et al.*, 1994; Miyamoto & Verma, 1995; Rivest, 2003). Dieser Transkriptionsfaktor induziert also ebenfalls wie STAT3 mittels SOCS3 den Hemmstoff I κ B, der im Sinne eines negativen Feedback-Mechanismus wirkt. Diese Signalkaskade ist wichtig für die angeborene, unspezifische Immunantwort, für

Entzündungsprozesse und für die Hemmung der Apoptose, dem programmierten Zelltod. NF- κ B wird daher auch als antiapoptotischer Faktor bezeichnet (Karin & Lin, 2002). Die Rolle von NF- κ B im Verlauf einer Entzündung ändert sich jedoch wahrscheinlich. Wie bei dem Phänomen der LPS-induzierten Toleranz (am Anfang p50/p65 und bei Toleranz p50/p50) finden sich bei der Entstehung einer Entzündung Heterodimere (p50/65) und bei Auflösung der Entzündungsreaktion Homodimere (p50/p50). Die Heterodimere führen zu einer Bildung von proinflammatorischen Zytokinen aber auch zur Expression der induzierbaren NO-Synthase (iNOS) und Zyklooxygenase-2 (COX-2) (Lawrence *et al.*, 2001). P50 Homodimere hingegen hemmen die Transkription der proinflammatorischen Gene (Bohuslav *et al.*, 1998; Ishikawa *et al.*, 1998). Homo- und Heterodimere von NF- κ B haben verschiedene Bindungsstellen am COX-2 Promotor (Thomas *et al.*, 2000). Man nimmt an, dass auch zyklische Prostaglandine (CyPGs) bei der Auflösung der Entzündung beteiligt sind (Gilroy *et al.*, 1999) und über das Homodimer vermehrt induziert werden (Lawrence *et al.*, 2001). Schließlich findet man wiederum Hinweise auf Interaktionen zwischen verschiedenen Signalwegen. Es gibt allerdings nur wenige Beweise für eine durch den JAK-STAT Signalweg induzierte NF- κ B Induktion (Rivest, 2003).

Glukokortikoide als potente antiinflammatorische Moleküle können direkt und indirekt NF- κ B hemmen. Entweder hemmen sie die Interaktion dieses Transkriptionsfaktors mit der DNA (Scheinman *et al.*, 1995; Almawi & Melemedjian, 2002) oder induzieren eine I κ B mRNA Expression (Quan *et al.*, 2000). Damit kann eine Hemmung der Induktion einiger proinflammatorischer Zytokine erklärt werden. Durch LPS werden unter anderem über den NF- κ B Signalweg die proinflammatorischen Zytokine IL-1 und TNF induziert, die wiederum stimulierend auf diesen Transkriptionsfaktor wirken. Es kommt also zu einem positiven Feedback, der die inflammatorische Reaktion verstärkt (Yamamoto & Gaynor, 2001). Eine pharmakologische Blockade von NF- κ B wirkt antipyretisch, wahrscheinlich weil die Bildung proinflammatorischer Zytokine gehemmt wird (Lee *et al.*, 2003).

4.3. FOS

Bei FOS handelt es sich wie bei den bereits angesprochenen Proteinen NF- κ B und STAT3 ebenfalls um einen Transkriptionsfaktor. FOS in Kombination mit einem anderen Transkriptionsfaktor, dem so genannten Leucin-Zipper Protein Jun wird als Heterodimer AP-1 (activator protein-1) bezeichnet, welches im Kern Gen-regulierende Eigenschaften besitzt. Dieser Transkriptionsfaktor-Komplex (AP-1) spielt sowohl bei Entwicklungsprozessen als auch bei der schnellen Antwort auf Wachstum-induzierende und Stress-verursachende Stimuli eine Rolle. Die Untereinheiten (c-fos, c-jun) werden nach Stimulation verstärkt exprimiert, und innerhalb einer Stunde bereits wieder abgeschaltet. Wegen ihrer schnellen Induzierbarkeit werden diese Faktoren auch als „immediate early response genes“ bezeichnet. Das Gen c-fos wird über einen weiteren dimeren Transkriptionsfaktor abgelesen. Beispielsweise bei einer Wachstumsstimulation wird dieser Transkriptionsfaktor durch eine MAPK Kaskade abhängige Proteinkinase phosphoryliert, was zur Produktion des FOS-Proteins führt (Wirth, 2003). Da FOS eine Rolle beim Wachstum der Zelle spielt und bei unkontrollierter Expression zu Tumoren führen kann, wird es auch als Protoonkogen bezeichnet (Forth, 2001).

Der immunhistochemische Nachweis des Proteins FOS oder die Detektion der c-fos mRNA durch *in situ* Hybridisierung wird in funktionell-neuroanatomischen Studien als Nachweis für eine neuronale Aktivierung eingesetzt. Nach einer ganzen Reihe von Noxen, die zur Stimulierung des Immunsystems führen, kann dieses Protein transient in einer Situations-spezifischen Art und Weise in Zellkernen nachgewiesen werden. Bei verschiedenen kutanen oder elektrischen Stimuli konnte in Neuronen eine transiente Expression des c-fos Gens beobachtet werden (Hunt *et al.*, 1987; Sagar *et al.*, 1988). Außerdem wurde FOS-Immunreaktivität (FOS-IR) nach verschiedenen osmoregulatorischen (Miyata *et al.*, 1994; Oldfield *et al.*, 1994; Patronas *et al.*, 1998) und thermoregulatorischen (Scammell *et al.*, 1993; Kiyohara *et al.*, 1995) Stimulationen sowie beim Fieber (Sagar *et al.*, 1995; Elmquist *et al.*, 1996; Scammell *et al.*, 1996a) untersucht. Eine Spezifität dieses Markers für Neurone ist allerdings nicht mehr aufrecht zu erhalten, da er ebenfalls in Gliazellen nach Ischämie (Herrera & Robertson, 1989) und Axotomie (Roivainen & Koistinaho, 1990) beziehungsweise in nicht neuronalen Zellen im Bereich der Blut-Hirn-Schranke nach IL1- β Gabe nachgewiesen werden konnte (Herkenham *et al.*, 1998). Trotzdem stellt der Nachweis der FOS Induktion eine Möglichkeit dar, die Aktivierung von Zellen als Antwort auf einen Stimulus nachzuweisen. Auch IL-6 induziert, wie bereits in Kapitel II 4.1.1 beschrieben, c-fos Transkription. Beispielsweise fand man in einer neuroanatomischen Studie mit Hilfe der FOS-IR Hinweise, dass Zellen im *Nucleus paraventricularis* (PVN), im *Nucleus supraopticus*, im *Nucleus tractus solitarius* (NTS), im *Nucleus amygdaloidales centrales* und im *Locus coeruleus* durch IL-6 aktiviert werden (Niimi *et al.*, 1997).

5. Potenzielle Zielgene

Zytokine wirken über verschiedene Signaltransduktionsmechanismen, die schließlich zu einer differenzierten und stark regulierten Expression von Genen führen. Im Rahmen der Fieberentstehung sind einige potenzielle Mediatoren und Enzyme von besonderer Bedeutung. Zu den Genen, deren Expression während systemischer Inflammation induziert bzw. gesteigert werden, gehören beispielsweise COX-2 (Matsumura & Kobayashi, 2004) oder die NO-Synthasen (Gath *et al.*, 1999). Bisher ist allerdings noch nicht klar, ob die Transkription solcher Gene direkt oder indirekt im Zusammenhang mit der im Rahmen dieser Arbeit untersuchten IL-6 induzierten nukleären Translokation von STAT3 zu sehen ist.

5.1. Zyklooxygenasen (COX-1, COX-2, COX-3)

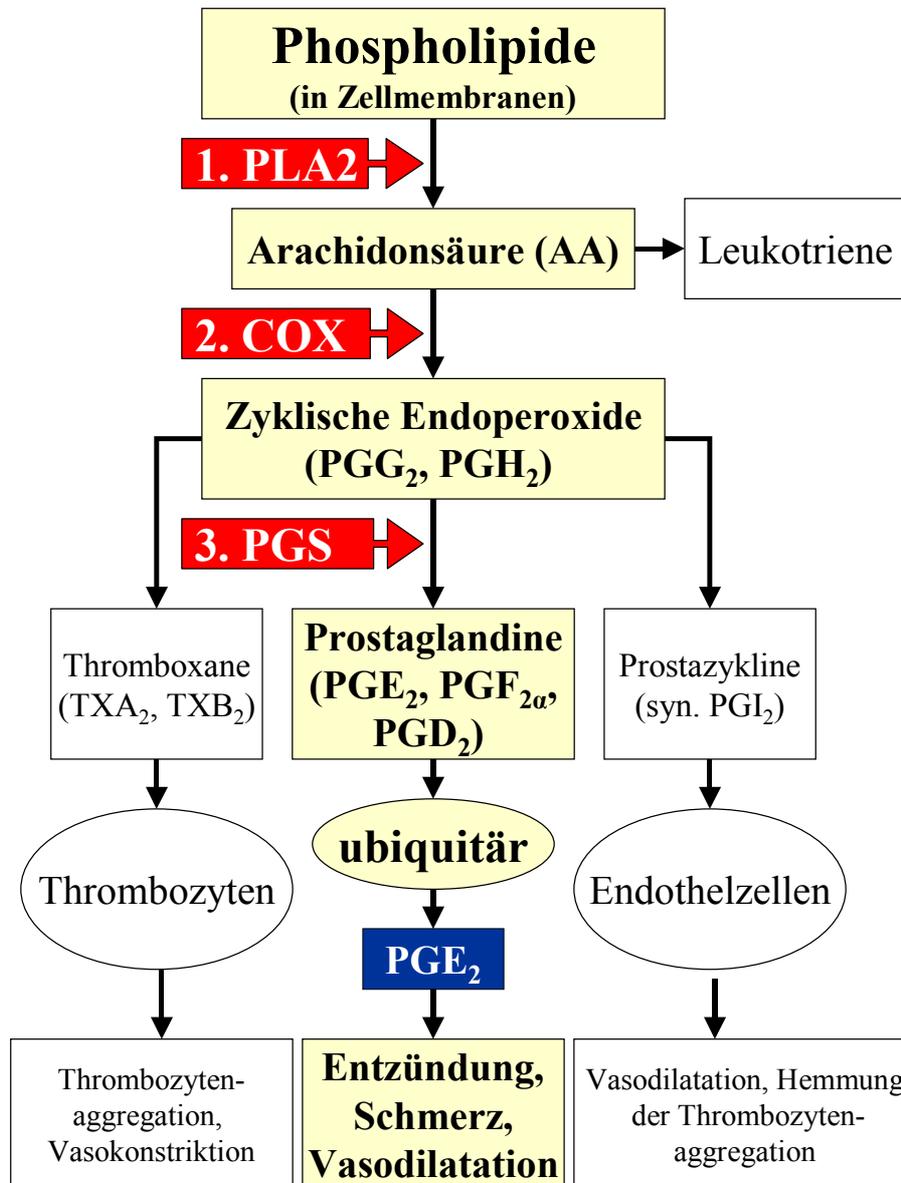


Abbildung 11

Die Prostaglandin-Synthese im Rahmen akuter Entzündungen erfolgt in drei Schritten: (1) Die Phospholipase A2 {PLA₂ (zytosolisch Form, cPLA₂-α; sekretorische Form, sPLA₂)} spaltet hydrolytisch Arachidonsäure (AA) aus Zellmembranen. (2) Durch Zyklooxygenasen (COX-1, COX-2, COX-3) werden so genannte zyklische Peroxide (PGG₂, PGH₂) aus AA produziert. Unter anderem werden ausgehend von der AA durch die 5-Lipoxygenase Leukotriene und durch die Tromboxan- und Prostazyklin-Synthasen aus der Vorstufe PGH₂ Thromboxane und Prostazykline hergestellt. (3) Die Prostaglandin-Synthasen (PGS) katalysieren schließlich die Entstehung der Prostaglandine. Speziell für die Bildung von Prostaglandin-E₂ (PGE₂) ist die Prostaglandin-E-Synthase zuständig (PGES), die als zytosolische (c) und mikrosomale Form (m) existiert.

Der Aktivierung der Prostaglandin-Synthese über den Zyklooxygenase-Weg wird eine Schlüsselrolle bei Zytokin-vermittelten inflammatorischen Prozessen zugeschrieben. Die Bildung von Prostaglandinen führt unter anderem zu Fieber, „Sickness Behavior“ und Schmerz (Rivest *et al.*, 2000). Der Mensch benutzt bereits seit über 3500 Jahren

antiinflammatorische Wirkstoffe aus der Gruppe der nicht steroidalen Entzündungshemmer (NSAIDs), die entsprechende Symptome zumindest anteilig lindern oder beseitigen können (Vane, 2000). Heute weiß man, dass derartige Pharmaka unter anderem Zyklooxygenasen (COX) hemmen (Abbildung 12).

Die Prostaglandin-Synthese erfolgt in drei Schritten (Abbildung 11). Zunächst wird über die Phospholipase A₂ (PLA₂) Arachidonsäure (AA) aus Phospholipiden der Zellmembran freigesetzt. Im zweiten Schritt wird die AA in zwei Stufen durch das Enzym Zyklooxygenase (COX) über PGG₂ zu PGH₂ umgewandelt. Alternativ kommt es auch zu einer Umsetzung von AA zu Leukotrienen durch die 5-Lipoxygenase. Schließlich konvertieren terminale Synthasen PGH₂ zu Prostaglandinen (PGE₂, PGF_{2α}, PGD₂), Thromboxanen (TXA₂, TXB₂) und Prostazyklinen (PGI₂) (Thews, 1999; Engblom *et al.*, 2002). Die zwei Geschwindigkeitsbestimmenden Schritte der Prostaglandin-Synthese sind die Freisetzung von AA (durch PLA₂) und die Umsetzung dieser zur Prostaglandinvorstufe PGH₂ durch COX (O'Banion, 1999). Prinzipiell handelt es sich also bei COX um ein kritisches Enzym bei der Synthese von Prostaglandinen (Zhang *et al.*, 2003).

Die Superfamilie der Phospholipasen spaltet die Esterbindungen der Membran-gebundenen Phospholipide durch Hydrolyse. Man unterscheidet hierbei die 4 folgenden Enzymgruppen: Es gibt zwei Kalzium abhängige Enzyme, die sich in zytosolische (cPLA₂) und sekretorische Enzyme (sPLA₂) aufteilen lassen. Die beiden anderen Enzymgruppen sind Kalzium unabhängig {cPLA₂; platelet activating factor, (PAF)}. Zusätzlich werden noch Isoformen beschrieben (Ivanov & Romanovsky, 2004). In unstimulierten Zellen liegt bereits cPLA₂-α inaktiv im Zytosol vor. Durch inflammatorische Stimuli wie LPS oder Zytokine wird dieses Enzym innerhalb von wenigen Minuten phosphoryliert und zum Golgiapparat, Endoplasmatischen Retikulum (ER) und der Kernmembran transportiert, wo AA aus den intrazellulären Membranen freigesetzt wird (Kudo & Murakami, 2002). LPS-induziert allerdings lediglich einen moderaten Anstieg der Transkription der cPLA₂-α um den Faktor 3 (Ivanov *et al.*, 2002). Scheinbar ist dieses Enzym funktionell in der Rolle als Substratlieferant (AA) selektiv mit COX-2 gekoppelt (Murakami *et al.*, 2002a; Ivanov & Romanovsky, 2004). Die sekretorische Variante sPLA₂ gehört zu eine Familie von 10 Enzymen die AA aus der äußeren Plasmamembran von Zellen gewinnen (Murakami *et al.*, 1997; Kudo & Murakami, 2002). Auch für dieses Enzym wird eine funktionelle Kopplung an COX-2 vermutet (Naraba *et al.*, 1998; Scott *et al.*, 1999). Sowohl cPLA₂ als auch sPLA₂ spielen bei Fieber eine wichtige Rolle. Sie sind zum einen mit COX-2 funktionell gekoppelt und zum anderen in ihrer Expression durch Pyrogene zumindest teilweise induzierbar. Schließlich sind auch neuronale Stimuli beschrieben worden, die die PLA₂ aktivieren und zu einer Freisetzung von AA führen (Dinarello *et al.*, 1999), was ebenfalls im Rahmen der Fieberentstehung von Bedeutung sein könnte.

Zwei Isoformen COX-1 und COX-2 wurden in Ihrer Funktion weitgehend charakterisiert (Smith *et al.*, 2000). Für eine Variante der COX-1, die so genannte COX-3, steht hingegen eine nähere Charakterisierung noch aus (Chandrasekharan *et al.*, 2002). COX-1 und COX-2 besitzen eine 60 %ige Sequenzhomologie und katalysieren prinzipiell die gleiche Reaktion. Trotzdem sind sie verschieden reguliert und unterscheiden sich in ihrer physiologischen /

pathophysiologischen Funktion (Abbildung 12). Dies hat folgende Gründe: Zum einen werden sie durch hohe Konzentrationen an AA mit unterschiedlicher Effektivität allosterisch gehemmt. Zum anderen haben sie wahrscheinlich verschiedene „Präferenzen“ zu den terminalen Synthesen und sind unterschiedlich in der Zelle verteilt. So wird COX-2 häufig mehr intranukleär beschrieben, COX-1 dagegen vermehrt extranukleär (Parfenova *et al.*, 2001; Murakami & Kudo, 2004). COX-1 wird konstitutiv in verschiedensten Geweben exprimiert und scheint eine kontinuierliche Rolle bei der Aufrechterhaltung wichtiger physiologischer Funktionen zu spielen. Es findet allerdings keine erhöhte Induktion der Expression von COX-1 nach inflammatorischer Stimulation statt (Smith *et al.*, 2000; Shaftel *et al.*, 2003).

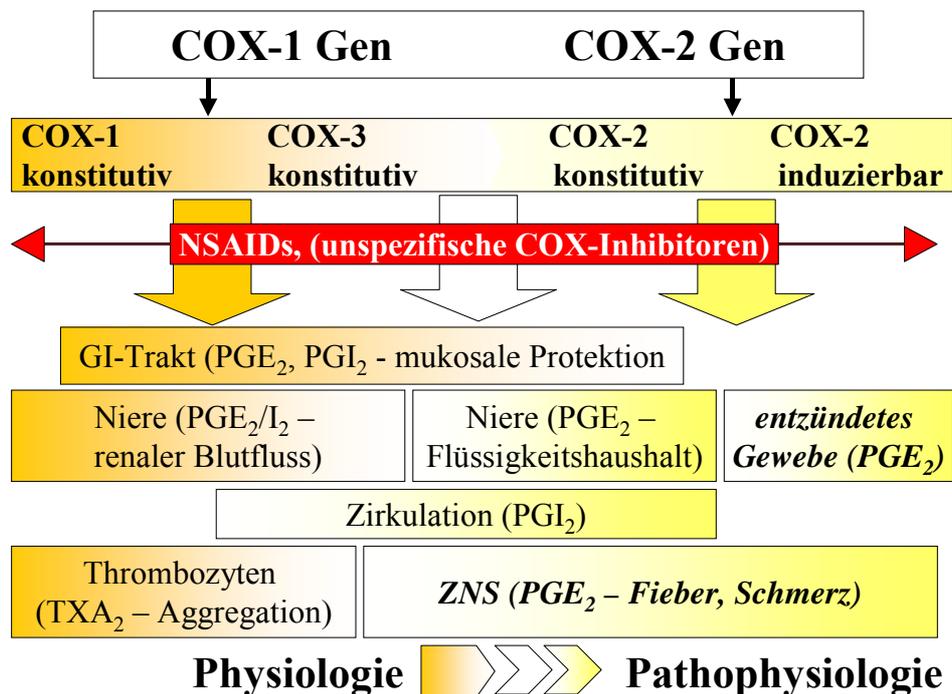


Abbildung 12

Multiple Isoformen von COX bilden wahrscheinlich ein Kontinuum. Über die beiden Genorte zur Bildung von COX-1 und COX-2 werden verschiedene COX-Typen generiert, die unterschiedliche, sich überlappende Funktionen für physiologische und pathophysiologische Prozesse haben. PGE₂ spielt vor allem pathophysiologisch in entzündeten Geweben und bei der Entstehung von Fieber eine Rolle. Nicht selektive Zylooxygenase-Inhibitoren (z.B. Diclofenac) wirken als NSAIDs auf die ganze Bandbreite der regulierten Funktionen. Dadurch kommen mannigfaltige zum Teil unerwünschte Nebenwirkungen zustande.

COX-x, Zylooxygenase; GI-Trakt, Gastrointestinal-Trakt; PGE₂, Prostaglandin E₂; PGI₂, Prostazyklin; TXA₂, Thromboxan A₂

COX-2 hingegen wird erst über eine Reihe inflammatorischer Stimuli wie z.B. Zytokine (TNF, IL-1), LPS oder andere (Terpentin, Carrageenan) induziert (Matsumura & Kobayashi, 2004). Die Bildung neuronaler COX-2 kann zudem über synaptische Aktivität reguliert werden (Yamagata *et al.*, 1993). Man findet allerdings auch eine konstitutive COX-2-Expression in der Niere und in Teilen des Gehirns, zum Beispiel in Neuronen des Telenzephalons {Abbildung 12, (Vane *et al.*, 1998; Yamagata *et al.*, 2001)}. Die Struktur des

COX-2 Genpromotors beinhaltet mehrere Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren. Entsprechend verhält sich COX-2 in mehreren Gewebetypen wie ein „immediate early response gene“, die Expression dieses Gens kann rasch induziert werden (Maier *et al.*, 1990). Der Nachweis von COX-2 stellt somit eine interessante Möglichkeit dar, eine stimulierte Bildung von Prostaglandinen während entzündlicher Prozesse nachzuweisen. Dabei ist hervorzuheben, dass die COX-2 Induktion außerdem zeitlich gesehen sehr gut mit Fieberreaktionen korreliert, sich also auch dazu eignet, Prostaglandin-abhängiges Fieber neuroanatomisch zu untersuchen (Cao *et al.*, 1995; Matsumura *et al.*, 1998b).

Einige experimentelle Befunde sprechen dafür, dass COX-2 und nicht COX-1 bei der Entstehung von Fieber eine wichtige Rolle spielt. Beispielsweise können durch Behandlung mit einem selektiven COX-2-Inhibitor LPS-induziertes Fieber und LPS-induzierte gesteigerte Bildung von PGE₂ im Gehirn unterdrückt werden (Cao *et al.*, 1997b; Yamagata *et al.*, 2001). Im Gegensatz zu COX-1-spezifischen Knockout-Mäusen entwickeln COX-2 defiziente Mäuse kein Fieber, wenn sie mit LPS (Li *et al.*, 1999) oder IL-1 β (Li *et al.*, 2001) stimuliert wurden. Eine selektive pharmakologische Hemmung von COX-1 erbrachte zudem keinen Zusammenhang für diese Isoform mit der Fieberreaktion (Dogan *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2003). Die Expression beider Enzymformen wird allerdings in einer späten Fieberphase simultan reduziert (Ivanov *et al.*, 2002). Bekanntlich gibt es große individuelle Unterschiede bezüglich der Wirksamkeit verschiedener NSAIDs bei Mensch und Tier. In diesem Zusammenhang wird eine differenzierte Ausprägung eines so genannten „COX-Enzym-Kontinuums“ mit der Bildung von Produkten erwogen, welche über die beiden bekannten Genorte für COX-1 und COX-2 als multiple Isoformen existieren könnten (Abbildung 12). Damit wären die unterschiedlichen Funktionen einzelner Enzyme in physiologischen oder pathophysiologischen Prozessen besser erklärbar (Warner & Mitchell, 2002).

5.1.1. PGE₂

Bei Prostaglandinen handelt es sich um weit verbreitete, schnell und kurzlebig wirkende, lokale Hormone, die parakrin oder autokrin auf das direkt umgebende Gewebe wirken. Physiologische Effekte werden durch Prostaglandine typischerweise nur innerhalb von wenigen Minuten erzielt (Ivanov & Romanovsky, 2004). Wie in Abbildung 11 dargestellt, werden eine Vielzahl unterschiedlicher Prostaglandine enzymatisch aus der AA hergestellt. Unter die Gruppe der Prostaglandine fällt unter anderem Prostaglandin E₂ (PGE₂), dessen Struktur wie bei allen Prostaglandinen bei Säugetieren sehr hoch konserviert ist (Serhan & Levy, 2003). Charakteristischer Weise zeichnet sich diese Substanzklasse durch einen Cyclopentanring sowie eine Carboxyl- und eine Alkyl-Seitenkette aus (Forth, 2001). Es handelt sich im Vergleich zu den Zytokinen also um kleine (ca. 350 Da) prinzipiell lipophile Substanzen. Dabei ist interessant, dass Prostaglandine im leicht sauren Milieu des Zytosols an der Carboxylgruppe protoniert sind und damit passiv aus der Zelle durch die Lipidmembran diffundieren können, da sie ladungsfrei vorliegen (Schuster, 2002). Im extrazellulären Kompartiment hingegen liegt ein neutraler pH vor (pH 7,4 \pm 0,04), in dem Prostaglandine an der Carboxylgruppe negativ geladen und damit anionisch sind. Die Fähigkeit, Plasmamembranen zu durchqueren, wird dadurch stark eingeschränkt. Dies konnte in

mehreren Studien an Erythrozyten, Nierenepithelzellen und anderen Zellkulturen gezeigt werden (Schuster, 1998) und spielt bei der Betrachtung eines eventuellen Durchtritts von PGE₂ durch die Blut-Hirn-Schranke (BBB) mittels Diffusion eine wichtige Rolle. Auf diese Fragestellung wird in Kapitel II 6 näher eingegangen.

Der Einsatz von NSAIDs ist nicht zuletzt deshalb häufig problematisch, da Prostaglandine verschiedene physiologische Funktionen im Kreislaufsystem, bei der Thrombozytenaggregation, der Nierenfunktion, der gastrointestinalen Sekretion, der Luteolyse und natürlich bei Entzündungsreaktionen haben. Neben der erwünschten Wirkung der NSAIDs werden somit zusätzlich andere physiologische Systeme beeinträchtigt. PGE₂ beeinflusst im Rahmen inflammatorischer Reaktionen die meisten zentralnervös kontrollierten Krankheitssymptome. Verhaltensdepressionen und das verstärkte Auftreten von „slow wave sleep“ gehören nicht dazu. Diese Krankheitssymptome sind resistent gegen eine Behandlung mit NSAIDs (Matsumura & Kobayashi, 2004). Was jedoch die Fieberentstehung betrifft, so scheint es sich bei PGE₂ um den entscheidenden zentral wirksamen Faktor zu handeln (Zeisberger, 1999; Conti *et al.*, 2004; Oka, 2004). Dies hat folgende Gründe:

- Prostaglandine (PGE₂) erzeugen Fieber, wenn sie in die Gehirnventrikel (Milton & Wendlandt, 1971) oder direkt in die *Area praeoptica hypothalami* (POA) injiziert werden (Nakamura *et al.*, 2002).
- Erhöhte Prostaglandin-Konzentrationen (PGE₂) wurden in der zerebrospinalen Flüssigkeit (CSF) (Coceani *et al.*, 1988; Sehic *et al.*, 1996b), in Mikroporusaten der POA (Blatteis, 1997) und im Blut (Rotondo *et al.*, 1988) relativ parallel zu den fieberhaft veränderten Körpertemperaturen gemessen.
- Zytokine induzieren Dosis-abhängig die PGE₂ Synthese in der POA (Blatteis, 2004a).
- Medikamente, die die Prostaglandin-Synthese blockieren, hemmen die Fieberantwort auf endogene und exogene Pyrogene (Vane, 1971; Cao *et al.*, 1997a; Vane & Botting, 1998; Stichtenoth *et al.*, 2001).
- Knockout-Mäuse, die einen der vier PGE Rezeptoren nicht besitzen (den EP3-Rezeptor, siehe Kapitel II 5.1.2), können nach LPS-Gabe kein Fieber entwickeln (Ushikubi *et al.*, 1998; Oka *et al.*, 2003).

Der letzte Schritt bei der PG-Synthese wird durch die terminalen Synthasen vermittelt. Es handelt sich bei der Umwandlung von PGH₂ zu PGE₂ um einen nicht oxidativen Umbau (Isomerisation), der über PGE Synthasen (PGES) mit reduziertem Gluthathion als Kofaktor katalysiert wird (Urade *et al.*, 1995; Murakami *et al.*, 2002b). Man unterscheidet mikrosomale (mPGES-1, mPGES-2) und zytosolische (cPGES) Varianten dieser Enzymklasse (Jakobsson *et al.*, 1999; Tanioka *et al.*, 2000). Wie für die PLA zeigen Koexpressionsexperimente funktionelle Kopplungen der PGES mit Enzymen, die das Substrat aus einem vorangehenden Schritt der Reaktionskette zur Verfügung stellen. Die cPGES findet man in der Zelle zusammen mit COX-1 vorwiegend außerhalb des Kernes (Parfenova *et al.*, 2001; Murakami

& Kudo, 2004). Sie ist wahrscheinlich für eine basale Synthese von PGE₂ zuständig (Tanioka *et al.*, 2000). Im Gegensatz dazu ist COX-2 bevorzugt mit mPGES-1 im Kern (perinukleäre Hülle bei Endothelzellen) zu finden (Yamagata *et al.*, 2001). Diese Kombination führt zu einer verzögerten Synthese von PGE₂ nach proinflammatorischer Stimulation z.B. durch LPS oder IL-1 β (Dieter *et al.*, 2000; Murakami *et al.*, 2000; Ek *et al.*, 2001; Yamagata *et al.*, 2001). Die vorwiegende Kopplung von mPGES-1 mit COX-2 und die Entzündung-induzierte Expression sprechen dafür, dass dieses Enzym der wichtigste Typ für den letzten Schritt der PGE₂-Synthese zur Induktion zentralnervös kontrollierter Reaktionen wie Fieber ist. Durch die Verwendung von Knockout-Mäusen konnte außerdem eine maßgebliche Rolle für dieses Enzym bei LPS-induziertem Fieber bestätigt werden (Uematsu *et al.*, 2002; Engblom *et al.*, 2003; Trebino *et al.*, 2003). Tatsächlich steigt die LPS-induzierte Expression der mPGES-1 Gewebe-spezifisch unterschiedlich stark an und besitzt eine eigene Dynamik. In der Leber (1.200-fach) aber auch in der Lunge und im Hypothalamus (30-fach) konnte nach LPS-Stimulation eine unterschiedliche lang anhaltende Überexpression dieses Enzyms festgestellt werden (Ivanov *et al.*, 2002). Im Gegensatz dazu wurde in derselben Studie keine LPS-induzierte Induktion der cPGES festgestellt. Hierdurch wurde wiederum bestätigt, dass diese konstitutive Form des Enzyms bei pathophysiologischen Prozessen keine entscheidende Rolle zu spielen scheint.

Für die Wirkung von Prostaglandinen ist neben ihrer Bildung auch ihr Abbau von entscheidender Bedeutung. Die Halbwertszeit von Prostaglandinen im Blut ist relativ kurz. Für exogen zugeführtes PGE₂ beträgt sie 60 s (Hamberg & Samuelsson, 1971). Im Gegensatz zu anderen Prostanoiden wie TXA₂, welches nichtenzymatisch hydrolysiert (Halbwertszeit 30 s), erfolgt der PGE₂-Abbau in zwei Schritten. Zunächst wird PGE₂ Transporter-vermittelt in Zellen aufgenommen und intrazellulär enzymatisch metabolisiert (Schuster, 1998, 2002). Dies geschieht vorwiegend in der Lunge, wo bis zu 95 % einer injizierten Dosis an PGE₂ metabolisiert werden, aber auch in der Niere und in der Leber (Samuelsson, 1964; Piper *et al.*, 1970; Forth, 2001). Interessanterweise wird PGE₂ bei adulten Säugern allerdings nicht im Gehirn abgebaut (Nakano *et al.*, 1972). Vielmehr muss es wahrscheinlich über den *Plexus choroideus* an das Blut abgegeben werden (DiBenedetto & Bito, 1986). Dabei scheint der Konzentrationsgradient zwischen Blut und dem Gehirnparenchym eine wichtige Rolle zu spielen. Niedrige Gefälle wirken dem Entweichen von PGE₂ aus dem Gehirn entgegen und sorgen für relativ langanhaltende erhöhte Konzentrationen im ZNS (Bito *et al.*, 1976). Dies hat möglicherweise Auswirkungen auf den Mechanismus der Fieberentstehung.

Geschwindigkeitsbestimmend für den Abbau von PGE₂ ist die Aufnahme in die Zelle. Diese erfolgt über spezifische PG-Transporter (PGT) und multispezifische Anionen Transporter (MOAT) (Kanai *et al.*, 1995; Nishio *et al.*, 2000). Der PGT findet sich in vielen peripheren Geweben und im Gehirn von Säugetieren. Eine LPS-Stimulation ruft in der späten Phase der Fieberreaktion eine reduzierte Expression der beiden genannten Transportertypen in der Leber und der Lunge, nicht aber im ZNS, hervor (Ivanov *et al.*, 2003). Vielmehr wurde nach LPS-Gabe im Gehirn von Ratten eine Induktion der Transkription von PGT nachgewiesen (Matsumura, 2003). Dadurch könnte in späteren Fieberphasen möglicherweise der Blutspiegel von PGE₂ länger erhöht, dadurch die Aufnahme ins Gehirn verbessert und die

Wirkdauer von PGE₂ auf thermoregulatorische Zentren für einen längeren Zeitraum aufrecht erhalten werden (Ivanov & Romanovsky, 2004).

Der intrazelluläre Abbau von PGE₂ beginnt mit einer enzymatischen Oxidation (15-Hydroxy-PG-Dehydrogenase, 15-PGDH) der 15-Hydroxylgruppe. Die daraus resultierende 15-Keto-Verbindung besitzt kaum mehr biologische Aktivität (Anggard, 1966; Forth, 2001). Zusätzlich kann die Carbonyl-Reduktase (CR) PGE₂ inaktivieren, indem es diese Substanz in PGF₂α umwandelt, welches wesentlich geringere pyrogene Aktivität besitzt. Beide Enzyme findet man ebenfalls weit verbreitet in allen Geweben, im Gehirn allerdings in relativ schwacher Ausprägung (Ivanov & Romanovsky, 2004). Dem Gehirn werden zudem fast keine PG-oxidativen Fähigkeiten zugesprochen (Nakano *et al.*, 1972), wodurch die Hypothese unterstützt wird, dass eine Verminderung der PGE₂-Konzentration im Gehirnparenchym von dessen Abgabe ins Blut über den *Plexus choroideus* abhängig ist. Entsprechend der bereits erwähnten Hemmung der Transkription von PGE-Transportern, konnte bei LPS-induziertem Fieber auch eine schnelle Abnahme der Expression von CR und 15-PGDH beobachtet werden (Ivanov *et al.*, 2003). Die Autoren dieser Studie postulieren, dass dadurch die Konzentration an PGE₂ im Blut ebenfalls ansteigt und dem steigenden Gradienten zwischen Gehirn und Peripherie entsprechend, der Transport von Prostaglandinen in das ZNS gefördert wird.

Neben den inflammatorischen Prostaglandinen (PGE₂) gibt es auch so genannte Lipoxine und zyklische Prostaglandine (cyPGs) mit antiinflammatorischen Eigenschaften (Serhan & Levy, 2003). Sie gehören zu den so genannten „Stopp-Signalen“ einer Entzündung, die zu einer Wiederherstellung der Homöostase beitragen (Lawrence *et al.*, 2002). Lipoxine werden über Lipoxygenasen und Zyklooxygenasen gebildet, hemmen die Entstehung von Sauerstoffradikalen durch neutrophile Granulozyten und Makrophagen und sorgen über Chemotaxis für die Phagozytose von zerstörtem Gewebe und Zelltrümmern. Die cyPGs sind spontan entstehende Metabolite von PGD₂ der J₂ Serie (15dPGJ₂), die über COX-Enzyme produziert werden können. Sie unterdrücken in einer späten Phase der Entzündung ebenfalls den „Oxidative burst“, hemmen aber gleichzeitig auch proinflammatorische Signalwege (NF-κB, AP-1, STATs) (Ricote *et al.*, 1998). Während der Auflösung der Entzündungsreaktion kommt es somit zu einem Wechsel von proinflammatorischen (PGE₂) zu antiinflammatorischen Lipidmediatoren (Lipoxine, cyPGs) (Levy *et al.*, 2001).

5.1.2. PGE-Rezeptoren

Die Wirkung von PGE₂ im Rahmen der hier angesprochenen inflammatorischen Prozesse hängt außer von dessen Bildung und Abbau von der Expression und Verteilung der PGE-Rezeptoren ab. Es gibt vier verschiedene Subtypen der PGE-Rezeptorfamilie (EP1, EP2, EP3, EP4) (Breyer *et al.*, 2001). Von EP3 liegen zusätzlich Tierart spezifisch mehrere Isoformen vor (3 bei der Ratte; 3 bei der Maus; 4 bei der Kuh und beim Mensch). Es handelt sich hierbei um G-Protein gekoppelte Rezeptoren mit sehr unterschiedlichen Signaltransduktionswegen. Aktivierung von EP1 erhöht die intrazelluläre Kalziumkonzentration, über EP2 und EP4 wird die Adenylatzyklase stimuliert, wodurch die intrazelluläre Bildung von cAMP ansteigt. Aktivierung aller EP3-Subtypen führt zu einer Hemmung der Adenylatzyklase (Oka, 2004).

Da der Wirkung von PGE₂ im ZNS eine Schlüsselrolle bei der Vermittlung zentralnervös kontrollierter Krankheitssymptome zukommt, waren und sind die Verteilung der einzelnen PGE-Rezeptoren im Gehirn sowie die Analyse ihrer funktionellen Bedeutung Gegenstand zahlreicher Untersuchungen (Scammell *et al.*, 1996a; Ericsson *et al.*, 1997; Oka, 2001). So ist es nicht verwunderlich, dass sich die so genannten „Prostaglandin-sensitiven“ Regionen des Gehirns, wie das *Organum vasculosum laminae terminalis* (OVLT) und die *Area praeoptica* (POA) durch eine besonders hohe Dichte an PGE-Rezeptoren auszeichnen (Nakamura *et al.*, 1999; Zhang & Rivest, 1999; Oka *et al.*, 2000).

Speziell bei der Fieberentstehung scheint der EP3-Rezeptor von entscheidender Bedeutung zu sein. Dies ergaben Studien mit EP3-Rezeptor defizienten Mäusen, bei denen die Fähigkeit zur Fieberentwicklung stark eingeschränkt zu sein scheint (Ushikubi *et al.*, 1998; Oka, 2001). Weitere Unterstützung für eine wichtige Rolle des EP3-Rezeptors beim Fieber ergab sich aus funktionell-neuroanatomischen Untersuchungen (Nakamura *et al.*, 2002; Yoshida *et al.*, 2003). In diesen Studien konnte gezeigt werden, dass die bei Ratten zur Fiebererzeugung essenzielle Neuronenkette von der *Area praeoptica* zum thermogenetischen braunen Fettgewebe an ihrem Ausgangspunkt in der präoptischen Region über einen dichten Besatz an EP3-Rezeptoren verfügt. Aus folgendem Grund ist jedoch nicht auszuschließen, dass auch der EP1-Rezeptor an der Fieberinduktion beteiligt ist.

Die thermoregulatorische Wirkung von PGE₂ beruht vorwiegend auf einer Inhibition warmsensitiver und Aktivierung kaltsensitiver Neurone. Dies führt zu einer Verstellung des Sollwertes und damit zu Fieber (Morimoto *et al.*, 1988; Matsuda *et al.*, 1992; Ranelis & Griffin, 2003). EP1 scheint dabei an der Hemmung warmsensitiver Neurone im OVLT und der POA beteiligt zu sein (Matsuda *et al.*, 1992). Generell ist jedoch zu sagen, dass die funktionelle Bedeutung der unterschiedlichen PGE-Rezeptoren bei der Fieberentstehung bislang erst unvollständig verstanden und daher zum Teil noch kontrovers diskutiert wird (Oka, 2004).

Der letzte in diesem Zusammenhang zu erwähnende Punkt bezieht sich auf die Erreichbarkeit dieser Rezeptoren für PGE₂. Wie bereits erwähnt, ist die Fettlöslichkeit von PGE₂ wegen der im wässrigen Milieu (Blut, extrazelluläre Flüssigkeit) ausgebildeten negativen Ladung limitiert. Neben den bekannten PGE₂-Transportern wird diskutiert, ob sich die Durchlässigkeit der Blut-Hirn-Schranke im Rahmen der APR ändert. In einem Experimentalmodell der Blut-Hirn-Schranke (BBB) mit kultivierten Zellen konnte gezeigt werden, dass TNF- oder PGE₂-Behandlungen eine Veränderung der Zytoskelett-Struktur dieser Zellen zur Folge haben (Mark *et al.*, 2001). Hierdurch scheint sich eine Permeabilitätssteigerung durch Ausbildung extrazellulärer Spalträume zu entwickeln. Demnach wäre bei systemischen Entzündungsreaktionen über einen derartigen Mechanismus ein vermehrter Durchtritt von PGE₂ durch die BBB ohne Transportvorgänge denkbar. Eine andere Studie, bei der LPS-, IL-1 β - und TNF- α -Applikationen beim Kaninchen den PGE₂ Eintritt aus dem Blut in das Gehirn deutlich steigerten, bestätigt diese Vermutung (Davidson *et al.*, 2001). Diese Frage ist jedoch noch nicht hinreichend geklärt und bedarf weiterer Untersuchungen.

5.2. NO-Synthasen (nNOS, eNOS, iNOS)

Stickstoffmonoxid (NO) ist ein gasförmiges Radikal mit einem dafür charakteristischen freien Elektron. NO diffundiert gleichermaßen sowohl durch wässrige als auch lipophile Medien. Dadurch ist eine dreidimensionale Ausbreitung möglich, die, von einer punktförmigen Quelle ausgehend, auf 200 µm berechnet werden konnte. Es wurde dabei von einer durchschnittlichen Ausschüttungsdauer von 1-10 sec und einer Halbwertszeit von 0,5-5 s ausgegangen (Schuman & Madison, 1994). An neuronalen Zellen konnte außerdem gezeigt werden, dass die Diffusion von NO aus dem ganzen Zellkörper des Neurons bis in die Zellausläufer stattfindet (Wiklund *et al.*, 1997). NO kann also relativ große Distanzen in der Umgebung der produzierenden Zelle beeinflussen, obwohl die Halbwertszeit von NO als sehr kurz zu bezeichnen ist und im Millisekunden-Bereich liegt. Außerdem kommt es zur passiven Konzentrierung von NO in Lipidmembranen.

Im Organismus wird Stickstoffmonoxid durch die NO-Synthase aus der Umsetzung von L-Arginin mit Sauerstoff (O₂) und der Nicotinamid-Adenosin-Dinucleotid-Phosphat-Diaphorase (NADPH-d) zu L-Citrullin hergestellt {Kapitel III 8, (Moncada & Higgs, 1993)}. Man unterscheidet drei verschiedene Formen dieses Enzyms. Zum einen gibt es den Typ I der auch als neuronale NOS (nNOS) bezeichnet wird. nNOS ist ein kalziumabhängiges, konstitutives Enzym, welches vorwiegend in Neuronen des zentralen und peripheren Nervensystems zu finden ist. Zusätzlich wurde dieses Enzym auch in Skelettmuskelzellen und der Niere gefunden. Bei dem Subtyp II handelt es sich um eine induzierbare, kalziumunabhängige Form der NOS (iNOS), welche basal kaum detektierbar ist. Verschiedene pathophysiologische Prozesse können die iNOS Expression direkt induzieren {hierzu gehören Ischämie, Trauma oder Multiple Sklerose (Licinio *et al.*, 1999)}. Nach Stimulation mit Zytokinen wie IL-1β (McCann *et al.*, 1994) oder LPS findet man iNOS im Zytosol von Zellen des Immunsystems (Makrophagen), der glatten Muskulatur, der Leber, in Mikroglia und Astrozyten des ZNS und im Endothel (Moncada *et al.*, 1991; Xie *et al.*, 1992; Van Dam *et al.*, 1995; Zeisberger, 1999). iNOS ist allerdings erst mehrere Stunden nach Pyrogen-Gabe detektierbar (Van Dam *et al.*, 1995; Minano *et al.*, 1997); speziell im Gehirn tritt iNOS erst nach Applikation septischer LPS-Dosierungen auf (Gath, 1999). Auch wenn die Induktion von iNOS im ZNS quantitativ nicht so hoch erscheint, bleibt zu betonen, dass die durch iNOS bewirkte NO-Bildung in nanomolaren Konzentrationen um 100- bis 1000-fach höher sind als die durch nNOS (Kuo & Abe, 1995). Der Subtyp III dieses Enzyms wird generell in Endothelzellen gefunden und deshalb auch als endotheliale NOS (eNOS) bezeichnet. eNOS wiederum gehört zu den konstitutiven Kalzium-abhängigen Enzymen.

Prinzipiell kann NO alle Zellbarrieren durchdringen und ist damit nur über seine relativ kleine Reichweite in seinem Aktionsradius beschränkt. Seine Wirkung beruht auf intrazellulären Effekten, sind also nicht über Membran-gebundene Rezeptorstrukturen an der Zelloberfläche vermittelt. NO bindet an Eisen von Häm-Gruppen. Es kommt zu einer räumlichen Umstrukturierung des Häms einer löslichen Guanylat-Zyklase (GC), wodurch diese aktiviert wird. Dabei wird Guanosin-Triphosphat (GTP) zu zyklischem Guanosin-Monophosphat (cGMP) umgewandelt. cGMP vermittelt wiederum physiologische Effekte in

der Zelle, in der es produziert wurde (Stahl, 1998). In Gefäßen ist eNOS produziertes NO für Vasodilatation aufgrund der relaxierenden Wirkung von cGMP auf glatte Muskelzellen verantwortlich. Dieser Effekt wurde schon 1980 beschrieben und die auslösende Substanz zunächst als EDRF (endothelial-derived relaxing factor) bezeichnet (Furchgott & Zawadzki, 1980). NO spielt insgesamt in sehr vielen Organsystemen eine Rolle. Darunter fallen beispielsweise das Herz-Kreislaufsystem, das Immunsystem, das Reproduktionssystem und das Nervensystem. Im Gehirn entstehendes NO wird mit der Modulation neuronaler Aktivität, der Regulation und Sekretion von Neurotransmittern und mit inhibitorischen oder fördernden Effekten auf die Hormonsekretion in Verbindung gebracht (Licinio *et al.*, 1999). NO führt sogar auch direkt zu einer Aktivierung von COX und dadurch zu einer PGE₂-Produktion (Rettori *et al.*, 1992). Das instabile NO kann zudem in hohen Konzentrationen zytotoxisch wirken und könnte dabei an inflammatorischen, neurodegenerativen und ischämischen Prozessen beteiligt sein. Es hemmt beispielsweise die mitochondriale Atmung kompetitiv und reversibel (Cytochromoxidase) und interagiert mit verschiedenen Transkriptionsfaktoren. Dazu gehören Redox-regulierte Gene, die über AP-1, und NF-κB abgelesen werden (Licinio *et al.*, 1999).

Die Rolle von NO im Rahmen der Fieberreaktion wird kontrovers diskutiert. Dabei scheinen vor allem Spezies-Unterschiede, aber auch die Dosierung und das jeweils untersuchte Fiebermodell eine große Rolle zu spielen. Das Kaninchen nutzt zur Fiebererzeugung hauptsächlich kardiovaskuläre Mechanismen (periphere Vasokonstriktion). Deshalb wirkt NO bei dieser Tierart antipyretisch, da der Wärmetransfer über die periphere Vasodilatation in die Körperschale verstärkt und demzufolge eine Abgabe von Wärme erhöht wird (Gourine, 1995; Weihrauch & Riedel, 1997). Bei vielen kleinen Tierspezies, z.B. bei Ratten, spielt die Wärmebildung durch das braune Fettgewebe (BAT) eine größere Rolle bei der Fieberentstehung. Hier scheint peripheres NO eine stimulierende Wirkung auf die sympathische Innervation zu bewirken und zur metabolischen Wärmeproduktion zu führen (De Luca *et al.*, 1995). Bei Ratten, Meerschweinchen und Schweinen wurden pro-pyrogene Eigenschaften von NO über verschiedene nicht selektive oder selektive Inhibitoren der NOS ermittelt (Reimers *et al.*, 1994; Scammell *et al.*, 1996b; Parrott *et al.*, 1998; Roth *et al.*, 1998c, b; Roth *et al.*, 1999). Dabei kann nicht unterschieden werden, ob es sich um zentrale oder um periphere Effekte handelt, da sowohl die iNOS als auch die konstitutiven Formen (nNOS, eNOS) ubiquitär vorkommen. Prinzipiell wurde keine signifikante Induktion von NOS in Fieber-relevanten Strukturen nach LPS-Gabe gefunden (Sehic *et al.*, 1997). Außerdem dauert es, wie bereits erwähnt, mehrere Stunden, bis iNOS induziert wird. Deshalb wird angenommen, dass für die schnelle Fieberentstehung nur die konstitutiven Formen eNOS und nNOS in Frage kommen. iNOS könnte dagegen bei der zweiten Fieberphase eine Rolle spielen (Roth *et al.*, 1998b; Roth *et al.*, 1999; Kozak & Kozak, 2003). Zirkulierende Zytokin-Konzentrationen blieben bei der Gabe von NOS-Inhibitoren in diesen Studien unbeeinflusst. Dies unterstreicht die mögliche Rolle von NO im Rahmen der Fieberreaktion in einer den Zytokinen nachgeschalteten Reaktion, wie der Induktion von PGE₂. Schließlich geben Versuche mit Knockout-Mäusen weitere Hinweise. Prinzipiell sind solche Tiere lebensfähig. Dabei konnte eine Rolle von iNOS und nNOS bei LPS-induziertem Fieber bestätigt werden.

eNOS hingegen ist nach diesen Befunden nicht bei Fieberreaktionen beteiligt. Interessanterweise scheint bei lokalen Entzündungsprozessen (Terpentin-Modell) keine der drei NO produzierenden Formen für die hierbei auftretende Fieberreaktion von Bedeutung zu sein (Kozak & Kozak, 2003).

5.3. Andere

Neben den bereits genannten so genannten terminalen Fiebermediatoren (PGE₂, NO) finden sich natürlich auch die proinflammatorischen Zytokine (TNF- α , IL-1 β , IL-6) unter den im Rahmen einer Entzündungsreaktion induzierten, potenziell Fieber-erzeugenden Stoffen. Die LPS-induzierte und auch durch proinflammatorische Zytokine vermittelte, gesteigerte Expression von Enzymen führt unter anderem auch zur Bildung von Kohlenstoffmonoxid (CO). CO gehört ebenfalls zu der Gruppe der kleinen Signalmoleküle, die neuronale Aktivität beeinflussen und dabei gleichzeitig thermoregulatorisch relevante Veränderungen hervorrufen können, die zu einer Fieberentstehung beitragen könnten. Wie NO wird dieser Botenstoff über induzierbare und konstitutionelle Enzyme (Häm-Oxygenasen) gebildet, aktiviert die GC und wirkt über cGMP. Es konnte gezeigt werden, dass auch CO Fieber erzeugen kann (Steiner *et al.*, 1999).

6. Fieberentstehungshypothesen

Vielerlei Mediatoren werden bei lokalen und systemischen inflammatorischen Prozessen produziert und freigesetzt. Dazu gehören unter anderem lokal über Leukozyten produzierte proinflammatorische Zytokine, welche bereits in Kapitel II 3.2 als endogene Pyrogene beschrieben wurden. Wie können diese Botenstoffe, exogene Pyrogene (z.B. LPS) und andere lokale Mediatoren die zentralen Mechanismen der Fieberentstehung beeinflussen?

Es gibt verschiedene Hypothesen, die mögliche Signalwege hierfür beschreiben. Dabei ist noch keine allgemeingültige, alle Vorgänge erklärende Theorie vorhanden. Vielmehr werden alle Hypothesen in ihrer Bedeutung kontrovers diskutiert. Sie unterscheiden sich nicht nur in der Lokalisation und Ausprägung der angesprochenen Entzündungsreaktionen, sondern auch bezüglich des zeitlichen Verlaufs und der Manifestierung der beschriebenen Krankheitssymptome (Engblom *et al.*, 2002).

Prinzipiell werden zwei Kommunikationswege des aktivierten Immunsystems mit dem ZNS beschrieben. Zum einen gibt es einen nachweisbaren Übertritt von Mediatoren in den Blutkreislauf, die als so genannte humorale Botenstoffe von der Peripherie zum Gehirn gelangen könnten. Zum anderen könnten daneben auch nervale Übertragungswege die Information direkt zu den thermoregulatorischen Zentren im Hypothalamus leiten und dort zu einer Sollwertverstellung führen.

6.1. Humorale Hypothese

Die humorale Theorie der Fieberentstehung gibt es schon lange und beruht auf 1948 durchgeführten Untersuchungen durch Beeson, der bereits zu dieser Zeit die Existenz „endogener Pyrogene“ postulierte (Beeson, 1948). Heute gelten die proinflammatorischen

Zytokine (TNF- α , IL-1 β , IL-6), neuerdings aber auch die exogenen Pyrogene selbst, als humorale Botenstoffe, die bei systemischen und zum Teil auch bei lokalen Entzündungsprozessen in die Zirkulation gelangen (Abbildung 14). Das Gehirn besitzt allerdings eine Blut-Hirn-Schranke (BBB), welche normalerweise den Durchtritt solcher relativ großen, hydrophilen Moleküle verhindert. Sie besteht aus einem spezialisierten Endothel und Gliazell-Elementen aus Astrozyten und Mikroglia, die in unmittelbarer Nähe des Endothels und der Basalmembran liegen. Endothelzellen der Gehirngefäße sind mit interendothelialen *Zonulae occludentes* so genannten „tight junctions“ ausgeprägt verbunden. Diese stellen eine dichte Barriere für lösliche Substanzen dar. Sie besitzen eine sehr hohe Resistenz, wie beispielsweise über transmembranär aufgenommene elektrische Widerstände dargestellt werden kann. Peripheres Endothel hingegen ist zum Teil fenestriert und erlaubt zusätzlich über pinozytotische Vesikel fast jeglichen para- und transzellulären Stoffaustausch sowohl lipophober als auch lipophiler Substanzen. In der BBB bilden Astrozyten Ausläufer, die die komplette abluminale Seite des Endothels bedecken. Zusätzlich haben Perizyten und perivaskuläre Mikroglia über Fortsätze direkten Kontakt zum Endothel. Zusammen stellen diese Zellen die *Membrana gliae limitans perivascularis* dar. Vor dieser zweiten Barriere der BBB befindet sich ein perivaskulärer Raum, der über die Basalmembran zum Endothel hin abgegrenzt ist (Prat *et al.*, 2001). Zusammen stellt dieses System eine Übergangsschwelle der Informationsübertragung zwischen dem zirkulierenden Blut und dem Gehirn dar, welche für Moleküle mit einem Radius größer als 0,2nm nicht durchlässig ist. Wie allerdings schon in Kapitel II 5.1.2 erwähnt, können pathophysiologische Vorgänge diese Permeabilität maßgeblich verändern. Es folgt nun die Beschreibung mehrerer Hypothesen für eine mögliche humorale Informationsvermittlung.

6.1.1. Diffusion

Ein nicht sättigbarer Übertritt von Substanzen aus dem Blut durch die BBB in das Gehirnparenchym ist vor allem für lipophile Stoffe, niedermolekulare Substanzen oder sogar einige Peptide mittels Diffusion möglich (Banks & Kastin, 1985). Es können allein durch Diffusion möglicherweise im Gehirn ausreichend hohe Konzentrationen solcher Stoffe erreicht werden, um zentral-kontrollierte Funktionen zu beeinflussen. Wie schon erwähnt, könnte peripher gebildetes lipophiles PGE₂ als Fiebermediator über diesen Weg ins Gehirn gelangen. Prinzipiell nimmt allerdings die Diffusion durch die BBB mit dem Quadrat zur Molekülmasse der Substanzen ab. Für Stoffe mit einem Molekulargewicht über 400Da wurde ein nicht sättigbarer Übertritt in das Gehirn nur noch selten beschrieben (Banks *et al.*, 2002). Lediglich für ein Zytokin, das Cytokine-induced neutrophil chemoattractant-1“ mit einem Molekulargewicht von 7.8 kD, konnte ein Übergang ins ZNS ohne sättigbaren Transport beschrieben werden (Pan & Kastin, 2001). Es stellt allerdings kein bisher bekanntes endogenes Pyrogen dar.

6.1.2. Transport

Ein aktiver sättigbarer Transport wurde inzwischen Spezies-spezifisch für mehrere Zytokine beschrieben. Dazu zählen unter anderem die proinflammatorischen Zytokine TNF- α

(Gutierrez *et al.*, 1993), IL-1 β (Banks *et al.*, 1991) und IL-6 (Banks *et al.*, 1994), aber auch LIF (Pan *et al.*, 2000) und Interferone (Pan *et al.*, 1997). Die entsprechenden Transporter sind in den meisten Fällen von den eigentlichen Zytokin-Rezeptoren unterscheidbar, allerdings noch nicht genau charakterisiert worden. Lediglich für die TNF-Rezeptoren konnte mittels Knockout-Mäusen gezeigt werden, dass diese für den aktiven Transport notwendig sind (Pan & Kastin, 2002). Neben den Spezies-Unterschieden finden sich in entsprechenden Gehirnregionen auch unterschiedliche regionale Transportkapazitäten. TNF wird beispielsweise in den Hypothalamus 9-fach besser aufgenommen, als in den Kortex (Banks *et al.*, 2002). Schließlich konnte in einer Studie über Lernverhalten bei Ratten gezeigt werden, dass die aktive sättigbare Aufnahme von Zytokinen tatsächlich Effekte auf ZNS-Funktion haben kann (Banks *et al.*, 2002). Die Kapazität der Transporter ist allerdings sehr begrenzt. Deshalb ist es nach Ansicht vielen Autoren unwahrscheinlich, dass sie im Rahmen der APR für die relativ schnellen Wirkungen auf das ZNS eine große Rolle spielen (Engblom *et al.*, 2002; Conti *et al.*, 2004), beziehungsweise durch die Tätigkeit solcher Transporter biologisch signifikante Konzentrationen an transportierten Mediatoren im Gehirn erreicht werden (Sehic & Blatteis, 1996; Schiltz & Sawchenko, 2003). Etwa 0,08 % systemisch applizierter Zytokine gelangen durch die BBB in das Gehirn (Banks *et al.*, 1991). Diese Menge wird als zu niedrig betrachtet, um beispielsweise das neuroendokrine System zu aktivieren. Lediglich nach schweren systemischen Traumata könnten bedeutend höhere zirkulierende Zytokin-Konzentrationen über Transportprozesse mit niedriger Kapazität eine Wirkung im Gehirn erzielen (Buller, 2001).

6.1.3. Passage von Immunzellen als Informationsträger in das ZNS

Das Fiebersignal des aktivierten Immunsystems könnte direkt über Lymphozyten in das Gehirn transportiert werden (Neumann & Wekerle, 1998). Neben der Möglichkeit des Patrouillierens nicht reaktiver T-Lymphozyten aus dem Blut durch die BBB in das Gehirn (Hickey *et al.*, 1991) besitzen aktivierte T-Lymphozyten die Fähigkeit, die BBB zu durchtreten. Das geschieht unabhängig von ihrer Antigen-spezifität, allerdings können lediglich aktivierte Zellen im Krankheitsfall auch im Gewebe persistieren (Prat *et al.*, 2001). Solche aktivierten T-Lymphozyten können dann im Gehirn proinflammatorische Zytokine abgeben, die wiederum Gliazellen zur Produktion von immunologisch relevanten Molekülen stimulieren. Dazu gehören Adhäsionsmoleküle, aber auch Zytokin-Rezeptoren (TNF- α R) und lösliche Mediatoren (NO, PGE₂), was schließlich direkt oder indirekt zu einer Verschiebung des Sollwertes im Hypothalamus und zu Fieber führen könnte (Zeisberger, 1999).

6.1.4. Rezeptor vermittelt am Endothel

Es ist möglicherweise nicht notwendig, dass humorale Botenstoffe aus der Peripherie direkten Zugang zu den thermosensiblen Arealen im Gehirn haben. Vielmehr könnten sekundär in der BBB produzierte Mediatoren die Information in das Gehirn weitervermitteln. Über entsprechende Rezeptoren (Toll-Like-Rezeptoren, Zytokin-Rezeptoren) auf dem Endothel würden dann periphere Zytokine oder exogene Pyrogene lokal die Bildung von weiteren Botenstoffen (NO, PGE₂) und Zytokinen (TNF- α , IL-1 β , IL-6) induzieren. Durch

Abgabe dieser Botenstoffe auf der abluminalen Seite des Endothels wäre eine Stimulation von Gliazellen und Neuronen oder eine weitere Diffusion ins Gewebe möglich (Zeisberger, 1999; Conti *et al.*, 2004; Matsumura & Kobayashi, 2004).

Alternativ zu löslichen humoralen Botenstoffen könnten endogene Pyrogene Membran-gebunden an Monozyten zum Gehirn gelangen. Damit wäre auch zu erklären, warum teilweise die messbaren Plasmakonzentrationen mancher Mediatoren zu gering erscheinen, oder bei septischen Patienten nicht sehr lange im Blut zu finden sind, um Fieber erzeugen zu können. Zell-assoziierte Zytokine (IL-1 α , TNF) wurden nach bakterieller Stimulation beschrieben. Sie könnten Endothelzellen im Hypothalamus stimulieren und entsprechend über induzierte sekundäre Mediatoren wie IL-1 β oder PGE₂ zu Fieber führen (Netea *et al.*, 1999; Netea *et al.*, 2000).

Schließlich werden in diesem Zusammenhang perivaskuläre Zellen (PVC), beziehungsweise Mikroglia (Elmqvist *et al.*, 1997) oder vaskulär assoziierte Makrophagen (Graeber *et al.*, 1989) genannt. Es handelt sich dabei wahrscheinlich um eine aus dem Knochenmark stammende Zellpopulation, die sich in der frühen postnatalen Phase im Gehirn ansiedelt und dort in perivaskulären Spalten von Gefäßen und Meningen persistiert (Bechmann *et al.*, 2001; Vallières & Sawchenko, 2003). Sie stellen wahrscheinlich die wichtigsten Antigen-präsentierenden Zellen im Gehirn dar. Diese PVCs könnten bei Stimulation mit niedrigen LPS-Dosierungen eine Aktivierung von Zellen der *Glia limitans perivascularis* bewirken, indem sie Mediatoren wie Prostaglandine oder Zytokine ausschütten. Dies hätte wiederum eine Weiterleitung der Information über Diffusion, Aktivierung von Neuronen und anderen Zellen und schließlich Fieber zur Folge. Außerdem wird den PVCs eine Rolle bei der Hemmung der Aktivität von Endothelzellen beigemessen (Schiltz & Sawchenko, 2002). In einer anderen Studie konnte nach IL-1 β -Stimulation lediglich in Endothelzellen und nicht in perivaskulären Zellen eine COX-2-Expression gezeigt werden (Konsman *et al.*, 2004). Die Gabe von LPS in hohen Dosierungen induziert übereinstimmend in allen genannten Studien COX-2 vorwiegend im Endothel. COX-2 wiederum führt zu einer endothelialen Produktion von PGE₂ und damit letztendlich direkt oder indirekt zur Entstehung von Fieber. Deshalb wird vor allem Endothelzellen eine entscheidende Rolle bei der Informationsübermittlung bei der Induktion zentralnervös kontrollierter Krankheitssymptome zugeschrieben. Eine Aktivierung der im perivaskulären Spalt liegenden Zellen wäre ohne initiale Beteiligung der Endothelzellen aufgrund der BBB zudem unwahrscheinlich (Schiltz & Sawchenko, 2003).

6.1.5. Sensorische CVOs

Um den dritten und vierten Ventrikel herum gibt es Gehirnstrukturen, in denen die BBB unvollständig ist. Sie werden als zirkumventrikuläre Organe (CVOs) bezeichnet und stellen Bereiche dar, in denen das Gehirnparenchym über ein fenestriertes Endothel in direkten Kontakt mit dem Blut und seinen Inhaltsstoffen tritt (Abbildung 13). Dort wäre folglich ein Übertritt von humoralen Signalen in das Gehirn möglich. Am Rattengehirn sind sieben verschiedene CVOs klassifiziert worden, die sich zusätzlich durch eine dichte Vaskularisierung auszeichnen (Hofer, 1958). Es handelt sich um das *Organum subfornicale*

(SFO), das *Organum vasculosum laminae terminalis* (OVLT), die Epiphyse, die *Eminentia mediana* (ME), die *Area postrema* (AP), die Neurohypophyse, das *Organum subcommissurale* (SCO), und im weiteren Sinne auch den *Plexus choroideus* (ChP).

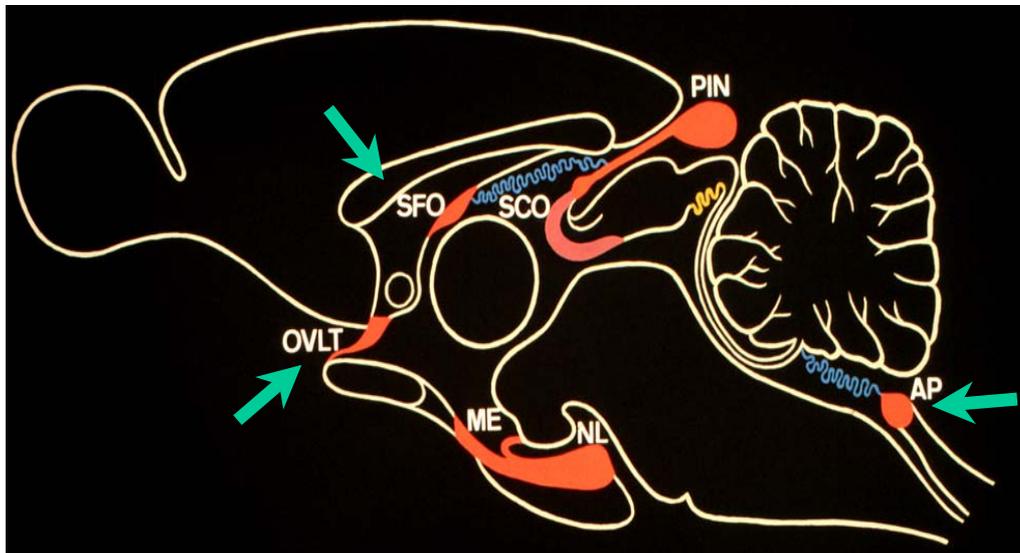


Abbildung 13

Schematische Übersicht der zirkumventrikulären Organe (CVOs) im Sagittalanschnitt eines Rattengehirns: Der *Plexus choroideus* ist blau hervorgehoben, die sensorischen CVOs (sCVOs) sind mit grünen Pfeilen gekennzeichnet. OVLT, *Organum vasculosum laminae terminalis*; SFO, *Organum subfornicale*; AP, *Area postrema*, SCO, *Organum subcommissurale*; ME, *Eminentia mediana*; NL, Neurohypophyse; PIN, *Organum pineale*.

Das SCO besitzt im Gegensatz zu den anderen CVOs noch eine BBB, und beim ChP ist diese Barriere zur epithelialen Abgrenzung hin verschoben und wird hier vielmehr als Blut-Liquor-Schranke bezeichnet. Die Funktion des SCO ist unbekannt, wird aber mit der embryonalen Entwicklung des Rückenmarks in Verbindung gebracht, da Schädigungen dieses Organs bei niederen Tieren zu Veränderungen im Achsenskelett führen. Dieses Organ sezerniert ein Glykoprotein, was als „Reissnerscher Faden“ vom SCO ausgehend bis in den vierten Ventrikel und den Zentralkanal des Rückenmarks reicht. Der ChP dient unter anderem der Bildung des *Liquor cerebrospinalis* (Seiferle, 1992; Oldfield, 1995). Strukturähnlichkeiten auf zellulärer Ebene finden sich in einer CVO-Untergruppe, die als sensorische CVOs bezeichnet werden. Es handelt sich um das SFO, das OVLT und die AP, die als Besonderheit nicht nur Gliazellen, Dendriten und Axone, sondern auch neuronale Zellkörper enthalten. Bei allen CVOs ist im Gegensatz zu anderen Gehirnregionen das Ependym modifiziert und besitzt „tight junctions“. Solche Zellen werden als Tanyzyten bezeichnet (Oldfield, 1995). Dadurch und über weitere solcher dichten Verbindungen zwischen Zellen an den Übergängen der CVOs zum normalen Gehirnparenchym sind diese Strukturen vom restlichen Gehirn abgegrenzt und isoliert (Krisch *et al.*, 1978; Krisch *et al.*, 1987). Speziell die sensorischen CVOs gelten als rezepptive Strukturen für humorale Botenstoffe. Sie sind direkt zirkulierenden Signalmolekülen ausgesetzt, die über Rezeptoren entweder Neurone aktivieren oder die Produktion weiterer Mediatoren induzieren können (Roth *et al.*, 2004). Das OVLT und das SFO liegen beide in der so genannten *Lamina terminalis*, welche die rostrale Begrenzung des dritten Ventrikels darstellt. In der

Embryogenese entstehen diese beiden Organe aus dem gleichen anterioren Pol des Neuralrohrs und haben folglich eine ähnliche Struktur, vergleichbare Aufgaben und verfügen über neuronale Verbindungen untereinander (Landas, 1987). Sie erfüllen Funktionen bei der Aufrechterhaltung des Flüssigkeits- und Elektrolythaushaltes, der Körpertemperatur und der kardiovaskulären Homöostase. Die AP ist zusätzlich in die Kontrolle des Körpergewichts und der Futtermittelaufnahme eingebunden (Oldfield, 1995). Durch neuronale Verbindungen und die unmittelbare Nähe zu lebenswichtigen hypothalamischen Kontrollzentren, die im Dienste der Homöostase stehen, wird den sensorischen CVOs (sCVOs) eine entscheidende Rolle bei der Signalübertragung zum Hypothalamus beigemessen (Roth *et al.*, 2004).

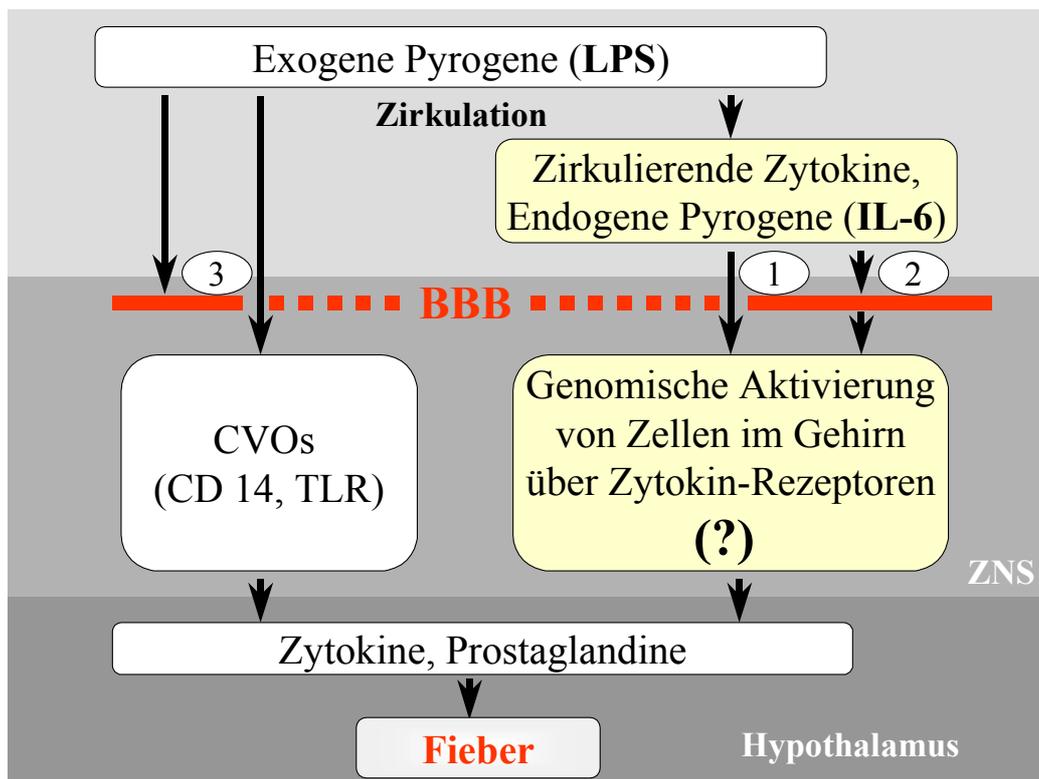


Abbildung 14

Übersicht zur humoralen Hypothese der Fieberentstehung: Allgemein führen exogene Pyrogene (LPS) zur Freisetzung von endogenen Pyrogenen (IL-6) durch Makrophagen und andere Zellen. Diese Hypothese besagt nun, dass sowohl endogene als auch exogene Pyrogene als zirkulierende Botenstoffe die Information des aktivierten Immunsystems an das Gehirn weiterleiten. In Regionen mit unvollständiger BBB (CVOs) kommt es zu einer genomischen Aktivierung von Zellen (1,3). Diese wiederum produzieren zentrale Mediatoren (Zytokine, Prostaglandine), die in den thermoregulatorischen Zentren schließlich zu einer Sollwert-Verstellung, also zu Fieber, führen. Abgesehen davon könnte auch über Diffusion, aktiven Transport, Lymphozytenmigration oder Aktivierungsprozesse am Endothel die Information des Immunsystems ins Gehirn gelangen (2). CD, cluster of differentiation; TLR, Toll-Like-Rezeptor

6.2. Nervale Hypothese

Die humorale Hypothese erklärt die Phänomene der Fieberentstehung nicht in allen Punkten hinreichend. Aus folgenden Gründen wird angenommen, dass es neben einem über die Blutzirkulation getragenen Transfer infektiöser, inflammatorischer Signale zu den

spezifischen Sensoren im Bereich des ZNS einen alternativen (nervalen) Signalweg geben müsste. Bei lokalen peripheren inflammatorischen Prozessen treten begleitende Veränderungen vitaler ZNS-Symptome in Abwesenheit detektierbarer oder erhöhter Konzentrationen von LPS oder zirkulierenden Zytokinen auf (Kluger, 1991; Watkins *et al.*, 1995b; Blatteis, 1997). Dies könnte zwar zum Teil mit einer unzureichenden Sensitivität der entsprechenden Nachweismethoden erklärt werden, dagegen spricht jedoch die schnelle Fieberentstehung im Tiermodell innerhalb von 15 min. (Elmquist *et al.*, 1996; Sehic *et al.*, 1996a). Der humorale Signalweg erfordert zudem an mehreren Schaltstellen der Signalverarbeitung die Genexpression von Botenstoffen (z.B. Zytokine, COX-2), Vorgänge, die einen gewissen zeitlichen Rahmen benötigen. Für TNF- α , welches im Rahmen der Zytokin-Kaskade als erstes ausgeschüttet wird, beträgt *in vitro* die Zeit von der LPS-Stimulation bis zur Ausschüttung mindestens 30 min. (Lichtman *et al.*, 1996). Dies ist demnach bereits länger als die Wirkdauer, die bei systemischer Gabe von LPS zu Fieber führt (Blatteis *et al.*, 1998). Die frühe Phase der Fieberreaktion und der HPA-Aktivierung kann somit schneller initiiert werden, als erhöhte Zytokin-Konzentrationen im Blut vorkommen beziehungsweise als die Expression von Signalmolekülen innerhalb und außerhalb des Gehirns erfolgen könnte (Givalois *et al.*, 1994; Blatteis, 1997; Blatteis *et al.*, 1998; Roth *et al.*, 1998a). Es wird daher postuliert, dass eine lokale Wirkung inflammatorischer Mediatoren in der Körperperipherie auf rezepptive Strukturen peripherer Nervenendigungen unter Umständen zur Beeinflussung vitaler ZNS-Funktionen beiträgt. Folglich könnte in entzündeten Geweben eine schnelle Aktivierung afferenter neuronaler Signalwege zum zentralen vegetativen System im Gehirn erfolgen (Abbildung 15).

6.2.1. Der *Nervus vagus*

Die nervale Hypothese der Fieberentstehung beruht vor allem auf Untersuchungen des *Nervus vagus* (*N. vagus*). Dieser enthält neben den klassisch bekannten parasympathisch efferenten Anteilen zum größten Teil sensorische afferente Fasern, die Informationen aus der Peritonealhöhle zum Gehirn übermitteln (Ritter, 1992). Durch verschiedene Studien konnte für den *N. vagus* eine wichtige Rolle bei der Übertragung von Immunsignalen zum ZNS nachgewiesen werden. Diese Untersuchungen zeigten, dass Hyperthermie (Watkins *et al.*, 1995a), konditionierte Geschmacks-Aversion (Goehler *et al.*, 1995), „Sickness Behavior“ (Bluthé *et al.*, 1996) und erhöhtes zirkulierendes Kortikosteron (Fleshner *et al.*, 1995) nach i.p. IL-1-Gabe durch subdiaphragmale Vagotomie stark abgeschwächt oder verhindert werden konnten. Ebenfalls wurden im Zuge einer solchen Vagotomie die LPS-induzierte Aktivierung der HPA-Achse (Gaykema *et al.*, 1995), Hyperalgesie (Watkins *et al.*, 1994), Verhaltensdepression (Marvel *et al.*, 2004) oder vermehrter δ -Schlaf (Hansen & Krueger, 1997) verringert. Schließlich wurde eine Unterdrückung von LPS-Fieber durch Vagotomie bei Meerschweinchen (Blatteis, 1997; Goldbach *et al.*, 1997) und der Ratte (Romanovsky *et al.*, 1997) beschrieben. Allerdings ist dieser Effekt für LPS und MDP nur nach i.p. und nicht nach i.m. Injektion zu beobachten, was auf eine Abhängigkeit vagaler Beteiligungen an der Fieberentstehung von der Applikationsform des pyrogenen Stimulus hinweist (Goldbach *et al.*, 1997). Ansonsten scheint der vagale Kommunikationsweg zwischen dem Gehirn und dem

Immunsystem z.B. bei i.m. Injektionen von Pyrogenen umgangen zu werden. Es ist bei i.p. Injektionen von LPS nur in niedriger Dosierung das entstehende Fieber durch eine Vagotomie blockierbar (Romanovsky, 2004b). Außerdem hatte bei einer differenzierteren Untersuchung einzelner Anteile des *N. vagus* nach LPS-Applikation nur die Durchtrennung der hepatischen Anteile einen Fieber-senkenden Effekt (Simons *et al.*, 1998). Abgesehen von der chirurgischen Durchtrennung konnte durch eine Capsaicin-Desensibilisierung von afferenten C-Fasern Fieber und die Aktivierung der HPA-Achse signifikant abgeschwächt werden (Watanabe *et al.*, 1994; Szekely *et al.*, 1997; Szekely *et al.*, 2000).

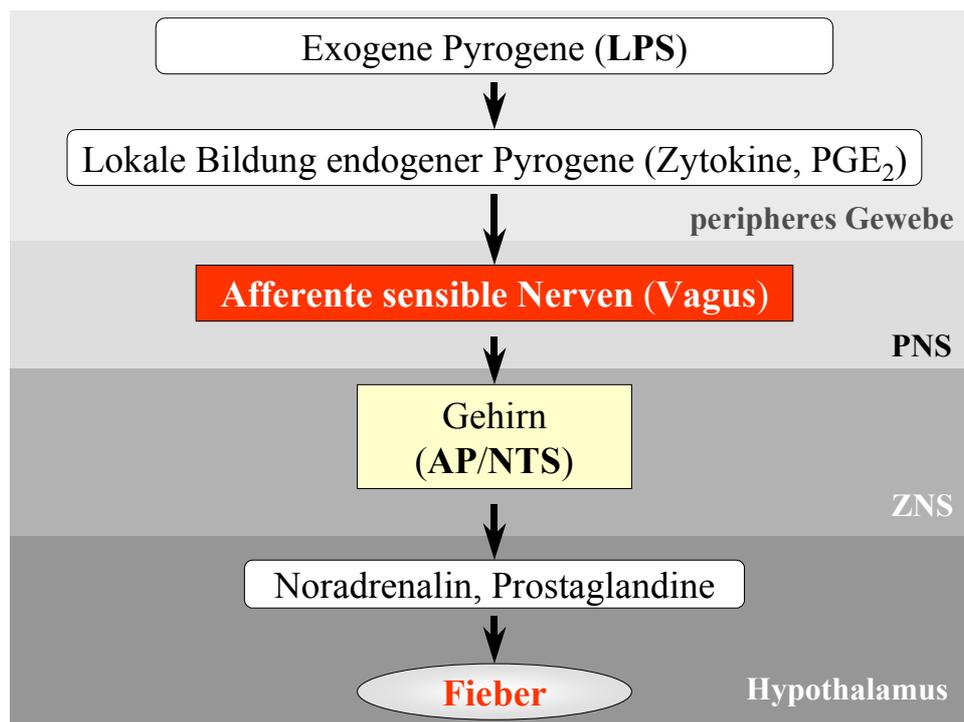


Abbildung 15

Schematische Übersicht zur neuralen Hypothese der Fieberentstehung: Nach LPS-Applikation (z.B. i.p.) kommt es zur lokalen Bildung von endogenen Pyrogenen (Zytokine). Diese aktivieren direkt oder indirekt (PGE_2) sensible Nerven (*N. vagus*) die eine schnelle Überleitung der Information des aktivierten Immunsystems in das Gehirn (*Area postrema*, AP; *Nucleus tractus solitarius*, NTS) ermöglichen. Durch neuronale Konnektivitäten zu den thermoregulatorischen Regionen im Hypothalamus wird schließlich über zentrale Mediatoren (Noradrenalin, Prostaglandine) der Temperatur-Sollwert verschoben. Es kommt zu einer Fieberreaktion. PNS/ZNS, peripheres/zentrales Nervensystem

Der Weg der Informationsübertragung durch den *N. vagus* wird wie folgt beschrieben (Abbildung 15). Glomerulumzellen vagaler Paraganglien konnten mit biotinylierten IL-1ra markiert werden, was darauf hinweist, dass dort Bindungsstellen für IL-1 vorliegen (Goehler *et al.*, 1997). Eine Infusion von IL-1 β in die *Vena portae* in physiologischen Dosierungen (10-100pg/Tier) wiederum erzeugte eine Aktivierung hepatischer Afferenzen des *N. vagus* (Nijima, 1996). Folglich wird angenommen, dass LPS-induzierte endogene Pyrogene (IL-1 β) den *N. Vagus* stimulieren, was zu einer Weiterleitung der Information in das ZNS führt. Dort wiederum werden IL-1 β mRNA- (Layé *et al.*, 1995) und FOS-Expression (Gaykema *et al.*, 1995; Marvel *et al.*, 2004) induziert. Diese Expression ist durch Vagotomie reduzierbar, was

auf eine direkte inflammatorische Wirkung des *N. vagus* hinweist. Zudem wurde nach Stimulation ebenfalls eine Expression von FOS direkt in den afferenten Neuronen des *N. vagus* beschrieben (Gaykema *et al.*, 1998). Vorwiegend im *Nucleus tractus solitarius* (NTS) terminieren die afferenten vagalen Fasern, woraufhin ankommende viszerale Signale dort integriert werden. Über eine Aktivierung noradrenerger Zellgruppen wird das Signal dann zur *Area praeoptica* (POA) geleitet, wo es schließlich, über Noradrenalin vermittelt, zur Ausschüttung von PGE₂ und zur Entstehung von Fieber kommt (Sehic & Blatteis, 1996; Blatteis, 2004b).

6.2.2. Andere

Es gibt mehrere Untersuchungen zur Entstehung von Hyperalgesie, in denen kutane, sensible Nerven durch endogene Pyrogene (IL-1 β , IL-6, TNF- α) aktiviert wurden (Watkins *et al.*, 1995b). Es lag schließlich die Vermutung nahe, dass neben dem *N. vagus* auch Afferenzen von Hautnerven einen neuronalen Signalweg zwischen aktiviertem Immunsystem und Gehirn darstellen könnten (Zeisberger, 1999). In einer vorangehenden Studie in einem Modell einer lokalisierten Inflammation im Bereich einer subkutanen Kammer wurde schließlich ein solcher nervaler Weg der Informationsübertragung zum Gehirn diskutiert, der zumindest anteilig bei kleineren lokalen Entzündungsprozessen eine Rolle spielen könnte (Ross *et al.*, 2000). Es wurde die LPS-erzeugte Fieberreaktion durch die zusätzliche Gabe eines Lokalanästhetikums in die Kammer signifikant reduziert. Dieser Effekt des Lokalanästhetikums manifestierte sich jedoch nur dann, wenn die gewählte LPS-Dosis so niedrig war, dass keine relevanten Konzentrationen proinflammatorischer Zytokine im systemischen Kreislauf erschienen.

7. Hintergrund und Fragestellung der wissenschaftlichen Arbeit

Im Rahmen der Einleitung und der ausführlichen Literaturübersicht wurde der Hintergrund der wissenschaftlichen Fragestellungen dargestellt. Prinzipiell reduziert sich die Betrachtung systemischer und lokaler inflammatorischer Prozesse vor allem auf zwei zentrale Mediatoren. Sowohl IL-6 als auch Prostaglandine und hierbei vor allem PGE₂ spielen eine entscheidende Rolle in den Signalwegen zur Fieberentstehung (Kapitel II 3.3.1, 5.1.1). Fieber als objektiv messbares Symptom der APR ist von großer medizinischer Bedeutung (Kapitel I 2). Von der Vielzahl der Mediatoren der APR sollen im Rahmen dieser Arbeit die funktionellen Beteiligungen von IL-6 und PGE₂ an den Signalwegen zur Fieberentstehung bei systemischen *versus* lokalen Entzündungsprozessen näher analysiert werden. Dies bezieht sich auf die Mechanismen der Signalweiterleitung zum ZNS (humoraler, neuronaler Signalweg, Kapitel II 6) und auf die beteiligten zellulären und molekularen Prozesse (Transkriptionsfaktoren, STAT3; aktivierte Zelltypen und Induktion bestimmter Gene, COX-2). Besonderes Interesse wird der Frage gewidmet, ob sich neben dem *N. vagus* auch andere sensible Afferenzen (Hautnerven) an der Vermittlung von Informationen des aktivierten Immunsystems zum Gehirn beteiligen.

A Charakterisierung der LPS-induzierten lokalen und systemischen Entzündungsreaktionen im Tiermodell des Meerschweinchens anhand der humoralen Hypothese der Fieberentstehung.

- Wie verläuft die Fieberreaktion als ein gut messbares Symptom der zentralnervös kontrollierten APR bei systemischer und lokaler Stimulation mit bakteriellem LPS bei Meerschweinchen?
- IL-6 stellt das Zytokin dar, welches über die gesamte Dauer von Fieberreaktionen in der Zirkulation messbar ist. Es wird als ein entscheidendes endogenes Pyrogen im Rahmen der humoralen Hypothese der Fieberentstehung angesehen. Wie hoch sind die Konzentrationen von IL-6 im Blut der Tiere unter lokaler im Vergleich zur systemischen LPS-stimulierten Entzündungsreaktion?
- Kommt es zu einer genomischen Aktivierung (nukleäre Translokation des Transkriptionsfaktors STAT3) von Zellen im Gehirn des Meerschweinchens im Verlauf systemischer oder lokaler Inflammation? Damit soll die Rolle von IL-6 als endogenem Pyrogen beziehungsweise als humoralem Botenstoff zur Vermittlung zentralnervöser Prozesse näher untersucht werden. Außerdem ist von besonderem Interesse, inwieweit lokale Entzündungsprozesse, die mit Fieber einhergehen, über die gleichen Mechanismen wie systemische inflammatorische Prozesse auf das Gehirn wirken.
- Welche Rolle spielen dabei die zirkumventrikulären Organe, denen eine entscheidende Bedeutung in der Perzeption von Signalen endogener Pyrogene beigemessen wird?

B Charakterisierung des zellulären Phänotyps IL-6-aktivierter Gehirnzellen

- Welche Zelltypen werden durch den humoralen Botenstoff IL-6 genomisch aktiviert? Hiermit könnten Hinweise über die Funktion und die Bedeutung einzelner Zell-Phänotypen im Rahmen von zentralnervös kontrollierten Anteilen der APR gewonnen werden.
- Können anhand der bekannten Ausstattung einzelner aktivierter Zelltypen an Rezeptoren und biochemischen Produktionsfähigkeiten Hinweise auf den Mechanismus der Signalweiterleitung zu den thermoregulatorisch relevanten Arealen im Gehirn gefunden werden?

C Bedeutung von Prostaglandinen bei der Fieberentstehung im Modell der lokalen Inflammation. Gewinnung weiterer Hinweise für die Existenz neuronaler Signalübertragung zur Fieberentstehung über Hautafferenzen.

C₁ Lokale COX-2-abhängige Bildung von Prostaglandinen im Gehirn des Meerschweinchens.

- Stellen Prostaglandine Signalmoleküle dar, die am Endpunkt humoraler oder neuronaler Signalwege zum zentralen vegetativen ZNS bei inflammatorischer Stimulation mit LPS aktiviert werden? Es wurde postuliert, dass Prostaglandine, vor allem PGE₂ zu den terminalen Fieber-erzeugenden Stoffen im Gehirn zählen. Außerdem wurde die Vermutung geäußert, dass lokale inflammatorische Prozesse anteilig über den nervalen Signalweg zu Fieber führen. In diesem Zusammenhang stellt sich die Frage ob dabei die zentrale COX-2-abhängige Bildung von Prostaglandinen eine Rolle spielt.

C₂ Dosis-abhängige Modulation der Fieberreaktion durch Diclofenac. Lokale Bildung von PGE₂ im entzündeten Gewebe.

- Wie hoch muss die Dosierung eines nicht selektiven COX-Inhibitors (Diclofenac) gewählt werden, damit dieser, mit LPS koappliziert, nur die lokale Bildung von Prostaglandinen im entzündeten Gewebe hemmt und nicht systemisch wirkt?
- Kann diese ermittelte Dosis an Diclofenac die Fieberreaktion verringern? Dadurch könnte ein Indiz für die Beteiligung lokal gebildeter Prostaglandine an der Fieberentstehung ermittelt werden.
- Wird durch die Applikation von Diclofenac tatsächlich die lokale Bildung von Prostaglandinen gehemmt?
- Ergeben sich aus diesen Untersuchungen weitere Hinweise für die Existenz eines neuronalen Transfers inflammatorischer Signale ins Gehirn?

III. MATERIAL UND METHODEN

1. Tiermodell

1.1. Material

1.1.1. Versuchstiere

Als Versuchstiere wurden männliche Meerschweinchen (*Cavia aperea porcellus*) mit einem bestimmten Körpergewicht, das am Operationstag 350-400 g betrug, genutzt. Zum Zeitpunkt des Versuches wogen die Tiere zwischen 380-480 g. Sie entstammten einer institutseigenen Zucht. Die Haltung erfolgte in Gruppen von 6-10 Tieren in 2,28 m² großen Käfigen. Bei konstanter Raumtemperatur von 22 ± 2 °C wurde ein Tag-Nacht-Rhythmus von jeweils 12 Stunden eingestellt (Licht aus um 19:00). Die Tiere hatten während der ganzen Versuchsdauer freien Zugang zu Futter und Wasser (*ad libitum*). Zweimal wöchentlich wurde frisches Wasser nachgefüllt und die Futterbehältnisse mit handelsüblichem Heu und pelletiertem Meerschweinchen-Zuchfutter (Fa. Altromin GmbH, D-Lage) aufgefüllt. Einmal monatlich wurden zur Deckung des Vitamin-C-Bedarfes mit Vitamin-C-Pulver (Ascorbinsäure Pulver, Ph Eur1, AGA MED Giessen) bestreute Mohrrüben angeboten. Als Einstreu diente Animal-Bedding (Granulat) der Fa. Altromin GmbH; D-Lage. Nach Erreichen des Absatzgewichtes von ca. 235 ± 15 g wurden die Tiere in transparente Polycarbonat-Käfige {38 x 29 x 59 (BreitexHöhexLänge), Marco 2808} Typ IV (Fa. Dipl.-Ing.W. Ehret GmbH, D-79312 Emmendingen) in Gruppen bis zu 7 Tieren und schließlich ab 350-400 g Körpergewicht einzeln in transparente Polycarbonat-Käfige {Abbildung 16, 26,5 x 42 x 15 {cm} (BreitexHöhexTiefe), Marco 2808} Typ III (Fa. Dipl.-Ing.W. Ehret GmbH, D-Emmendingen) umgesetzt. Zehn Tage vor dem Experiment wurde die Operation vorgenommen und die Tiere in dieser Zeit mindestens zweimal an das „Handling“ gewöhnt. Zu diesem Zeitpunkt befanden sich die Meerschweinchen unter einheitlichen Haltungsbedingungen bereits im Versuchsraum. Täglich wurden der allgemeine Gesundheitszustand und die Versorgung der Tiere mit Futter und Wasser überprüft

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



Abbildung 16

Einzeltierkäfig mit Einstreu, Kraftfutter, Heu und Wasser *ad libitum* (links) und ein Meerschweinchen mit implantiertem subkutaner Kammer und i.a. Katheter (rechts).

1.1.2. Die subkutane Kammer

Die subkutane Kammer (Ross *et al.*, 2000) stellt eine Weiterentwicklung der so genannten „Air-pouch“ dar (Miller *et al.*, 1997a; Miller *et al.*, 1997b; Cartmell *et al.*, 1999; Roth *et al.*, 2000). Sie bestand aus einem 1 mm starkem Rohr aus Polytetrafluoroethen (Teflon[®]). Dieser Kunststoff wurde gewählt, weil er zum einen leicht zu verarbeiten und trotzdem chemisch bzw. thermisch und widerstandsfähig ist und zum anderen, weil er nur eine minimale Fremdkörperreaktion im Körper auslöst (Ehmer, 1996). Die subkutane Kammer hatte ein Volumen von 1,3 ml und wurde in der institutseigenen Werkstatt für Feinmechanik hergestellt. An Vorder- und Hinterende war der Zylinder in einem Winkel von 45° abgeschrägt. Die Öffnungen an den beiden Enden hatten dadurch einerseits eine größere Kontaktfläche zum umgebenden Gewebe, andererseits wurde die Reibung der Kanten mit der Haut und damit ebenfalls die mechanische Irritation vermindert. Die Kontaktfläche zum umgebenden Gewebe betrug 1,02 cm², also beide Flächen zusammen 2,04 cm². Alle Kanten der Kammer waren abgerundet. Zur späteren Applikation von Substanzen beziehungsweise zur Gewinnung von Lavage wurde entsprechend der Abbildung 17 zusätzlich ein Katheter durch ein Loch an der schmaleren Längsseite der Kammer eingebracht. Dabei handelte es sich um den gleichen Mikroschlauch aus Polyethylen der auch für den intraarteriellen Katheter verwendet wurde. Das Vorgehen erfolgte gemäß den Erläuterungen unter Punkt 1.1.3 Kapitel III. Lediglich musste der Schlauch am Beginn durch ein 1 mm großes Loch an der beschriebenen Stelle geführt werden. Durch Erzeugen der Blase an dem Ende des Katheters, das in die Kammer hineinreicht, konnte man den Katheter an der Kammer fixieren.

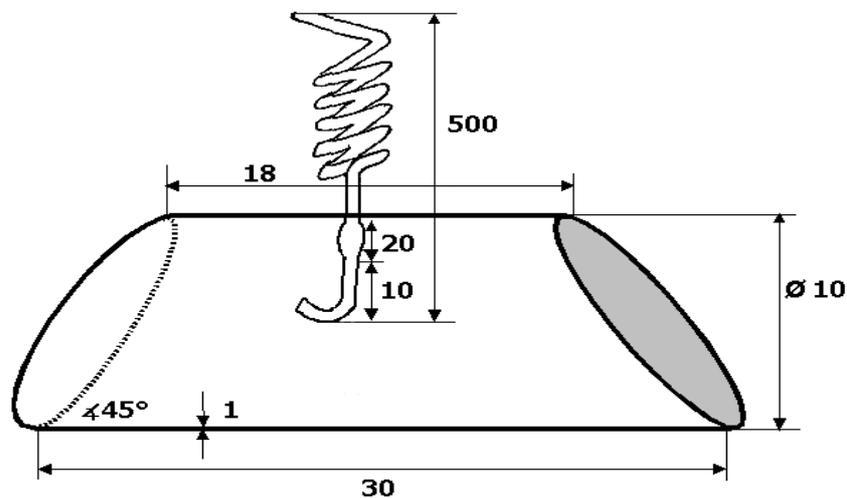


Abbildung 17

Subkutane Kammer: Die Maße sind in mm angegeben (nicht maßstabsgetreu).

1.1.3. Der intraarterielle Katheter

Bei der Herstellung des Verweilkatheters wurde ein Mikro-Schlauch aus Polyethylen (PE-10; Ref. 800/140/100; Fa. Portex Ltd; Kent England) mit einem Innendurchmesser von 0,4 mm und einem Außendurchmesser von 0,8 mm verwendet. Durch Erwärmen mit einer einfach gewundenen Glühdrahtspirele und rasches Wiederabkühlen im Wasserbad entstand an

dieser Stelle eine Blase. Das Ende des Mikro-Schlauches, welches näher an der Blase lag, wurde über eine stumpfe gebogene Nadel gesteckt und in einem Wasserbad erwärmt. Nach Abkühlung blieb diese Biegung des Schlauches bestehen. Der Abstand von diesem Ende bis zum Beginn der Blase betrug 38 mm. An dem anderen Ende wurde der Schlauch in einer Entfernung von 85 mm von der Blase um eine 1 ml Spritze gewickelt und ebenfalls im Wasserbad erwärmt und abgekühlt. Es entstand dadurch auf dieser Seite eine Spirale.

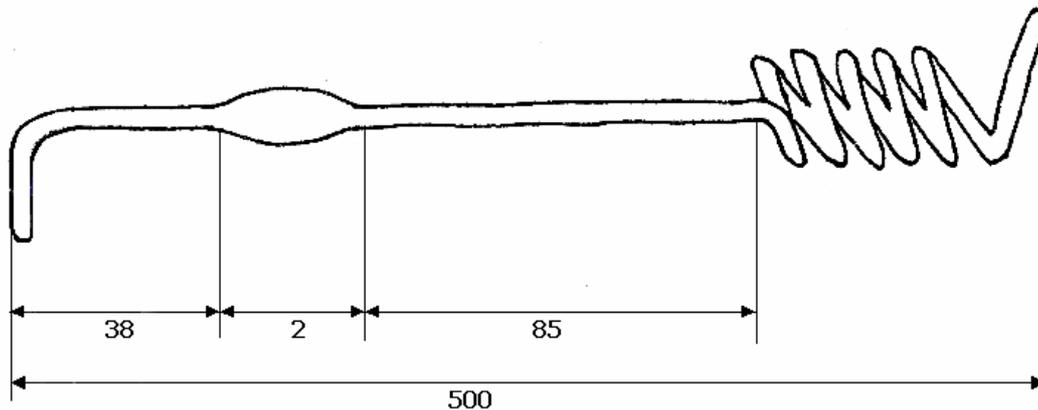


Abbildung 18

Katheter zur Blutabnahme beim Meerschweinchen (nicht maßstabsgetreu): Die Maße sind in mm angegeben.

1.1.4. Der Sender

Der Sender (Abbildung 19, links; Transmitter; PDT-400 E-Mitter; Fa. Mini-Mitter Company Inc., Sunriver, OR, USA) diente während der Versuche zur telemetrischen Aufzeichnung der abdominalen Körperkerntemperatur. Es handelte sich dabei um einen Zylinder-förmigen Sender, bestehend aus einem Plastikmantel mit einem Silikonüberzug und darin dem eigentlichen Transmitter mit Thermistor. Durch die Ummantelung konnten Fremdkörperreaktionen minimiert und das Eintreten von Flüssigkeiten verhindert werden. Die Sender waren ca. 1 cm lang, hatten ein Gewicht von 7 g und einen Durchmesser von 0,5 cm. Bei dem Thermistor handelte es sich um einen Wärme-empfindlichen Transistor mit negativem Temperaturkoeffizienten (NTC). Proportional zur Temperaturänderung änderte sich das Radiofrequenzsignal {Frequenz in Herz (Hz)} des Senders. Eine ansteigende Temperatur resultierte in einer zunehmenden, ein Absinken in einer abfallenden Impulsrate. Der Betrieb der Sender erfolgte über Induktion an einer Kupferspirale, Batterien wurden also nicht benötigt. Der Empfänger (Abbildung 19 rechts, ER-4000 Receiver, Fa. Mini-Mitter Company Inc., Sunriver, OR, USA) hatte die Form einer Platte und war etwa so groß wie die Einzelkäfige, die darauf platziert wurden.

Ein Datenerfassungssystem (Vital View, Fa. Mini-Mitter Company Inc., Sunriver, OR, USA) wurde für die automatische Datenaufzeichnung und -analyse verwendet.

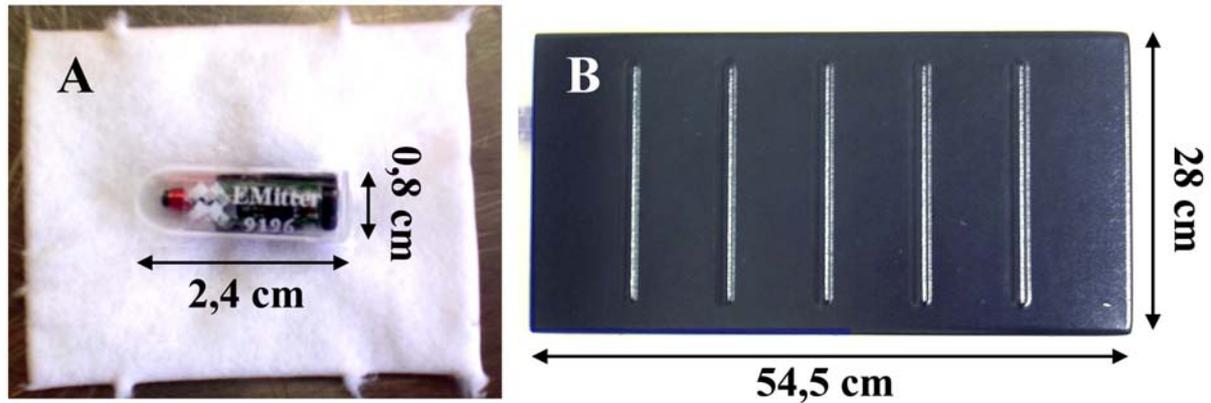


Abbildung 19

Sender (linkes Bild) auf einem Zellstofftupfer und Empfängerplatte (rechtes Bild): Die Maße sind in cm angegeben.

1.1.5. Verwendete Substanzen

1.1.5.1. Für die Narkosen

Abkürzung	Substanz	Dosierung	Hersteller
Domitor [®]	Medetomidinehydrochloride	0,25 µg/kg i.m.	Pfizer GmbH, D-Karlsruhe,
Ketavet [®]	Ketamin hydrochlorid	100 mg/kg i.p.	Pjarmacia Upjohn, D-Erlangen,
Antisedan [®]	Atipamezolhydrochlorid	0,25 µg/kg i.m.	Pfizer GmbH, D-Karlsruhe,
Narkoren [®]	Pentobarbital	200 mg/kg i.p.	Merial GmbH, D-Hallbergmoos
Metacam [®]	Meloxicam	250 µg/kg s.c.	Boeringer Ingelheim GmbH, S-Terassa

Tabelle 1

Übersicht über die verwendeten Substanzen für die Narkosen

1.1.5.2. Für die Versuche

Abkürzung	Substanz	Dosierungen	Hersteller
LPS	Lipopolysaccharid von <i>Escherichia coli</i> (Stamm 0111:B4)	10, 30, 100 µg/kg KG	Sigma Sigma Chemicals Co. St. Louis, MO 63178 USA
Diclofenac	Diclofenac Natrium, Lot B19360	5, 50, 500, 5000 µg/kg KG	Calbiochem-Novabiochem Coporation, La Jolla, Ca 92039-2087
NaCl	Pyrogen-freie isotone Natriumchloridlösung 0,9 %, Solvent und Lösungsmittel	0,1 ml/kg KG	B. Braun Melsungen AG, D-34209 Melsungen
Ethanol	Ethanol absolut, Lösungsvermittler (C ₂ H ₅ OH)	10 %	RdH Laborchemikalien GmbH & Co. KG D-Seelze
Solvent	Ethanol 10 % NaCl 90 %	0,1 ml/kg KG	Merck, D-Darmstadt
Heparin	Heparin-Natriumlösung (Liquemin [®] N 25000)	5000 I.E./ml	Hoffmann-La Roche AG, D-79630 Grenzach-Wyhlen

Tabelle 2

Übersicht über die in der Studie verwendeten Substanzen, Abkürzungen und Herkunft

1.1.5.2.1. Lipopolysaccharid (LPS)

Es wurde hier (beim Meerschwein) LPS des *E. coli* Serotyp O111 : 4B verwendet und Dosierungen gewählt, die je nach Injektionsart gerade noch eine maximale Fieberantwort induzieren (Goldbach *et al.*, 1997; Roth *et al.*, 1998a; Ross *et al.*, 2000; Ross *et al.*, 2003). Je nach Applikationsart und Versuch war die eingesetzte Dosis daher verschieden (LPS 10 µg/kg i.a., 30 µg/kg i.p., 100 µg/kg s.c., 10 µg/kg s.c.). Gebrauchslösungen waren immer zu einem Injektionsvolumen von 1 ml/kg KG angesetzt. Wie im Kapitel II 2.2.1 beschrieben, wurde LPS als Fieber- und Entzündungsinduktor am Tiermodell des Meerschweinchens gewählt.

1.1.5.2.2. Diclofenac

Diclofenac gehört zu der Gruppe der NonSteroidal Anti-Inflammatory Drugs (NSAID). Die durch Diclofenac vermittelten antipyretischen Effekte wurden in der vorliegenden Arbeit näher untersucht. Analgetische und antiinflammatorische Effekte wurden nicht speziell überwacht. Bei Diclofenac handelt es sich um ein Phenyllessigsäurederivat. Es besitzt eine Plasmaproteinbindung von 95 % und eine Bioverfügbarkeit von 50 %. Als unspezifischer COX-Hemmer werden durch Diclofenac beide Formen COX-1 und COX-2 in ihrer Wirkung vollständig blockiert.

Diclofenac lag zunächst pulverförmig vor. Es wurde in einer Kombination aus 10 % Ethanol und 90 % NaCl 0,9% gelöst. Die Konzentration der Stocklösung betrug 5 mg/ml Diclofenac. Bei einem Injektionsvolumen von 1 ml/kg entspricht dies etwa der doppelten Dosis, die postoperativ zur Analgesie beim Meerschweinchen im Allgemeinen gegeben werden sollte. Als Einzeltierdosis wurden 5, 50, 500, 5000 µg/kg KG verabreicht. Diclofenac wurde dem Versuchprotokoll entsprechend in Kombination mit der niedrigen und hohen LPS-

Dosis oder zusammen mit NaCl verabreicht. Die Gebrauchslösungen waren so dosiert, dass ein Volumen von 1 ml/kg KG appliziert werden konnte.

1.1.5.2.3. NaCl

Die physiologische, Pyrogen-freie Kochsalzlösung (0,9 %) diente als Lösungsmittel für LPS und in Kombination mit Ethanol auch für Diclofenac. Damit wurde es als Kontrolle für LPS eingesetzt. Es wurden mit 1 ml/kg KG gleiche Volumina wie bei der Pyrogen-Applikation eingesetzt.

1.1.5.2.4. Ethanol

Es handelt sich hier um unvergällten, reinen Alkohol, dem mit Hilfe von Trockenmitteln das restliche Wasser entzogen wurde (99,8 %). Aufgrund seiner hydrophilen OH-Gruppen und dem hydrophoben Kohlenstoffkettenrest wurde ETOH als Lösungsvermittler für Diclofenac eingesetzt. Diclofenac konnte so über die Wechselwirkung mit dem hydrophoben Anteil und den polaren OH-Gruppen in NaCl gelöst werden.

1.1.5.2.5. Solvent

Es handelt sich hierbei um den Lösungsvermittler von Diclofenac, der aus 10 % Ethanol und 90 % NaCl besteht.

1.1.5.2.6. Heparin

Heparin-Natrium ist ein Gerinnungshemmer. In seiner Wirkung als Antithrombin ist es 1000-mal effektiver als das endogene Äquivalent Heparansulfat. Er wurde für die Pflege der Verweilkatheter verwendet, um ein Gerinnen des Blutes im Schlauch zu verhindern. Alle drei Tage wurde der Katheter mit einer heparinhaltigen Kochsalzlösung gespült, um seine Funktionstüchtigkeit zu erhalten. Damit gewährleistete man die Durchführbarkeit von bis zu drei Versuchen mit LPS bzw. deren Kontroll-Lösungen pro Tier über einen Zeitraum von bis zu zwei Monaten. Zur Gerinnungshemmung der Blutproben wurde ebenfalls Heparin benutzt.

1.1.5.3. Für die Perfusion

Abkürzung	Substanz	Hersteller
PB	Phosphatpuffer (0,1M) aus Dinatriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4), Natriumdihydrogenphosphat (NaH_2PO_4) in.Lösung	Merck, D-Darmstadt
NaCl	Natriumchlorid	Merck, D-Darmstadt
PFA	Paraformaldehyd-Lösung (CH_2O)	Merck, D-Darmstadt
Saccharose	Saccharose ($\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$)	Merck, D-Darmstadt

Tabelle 3

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

1.1.5.4. Phosphatpuffer (PB 0,1M)

Für die Immunhistochemie wurde ein Phosphatpuffer (PB) eingesetzt, zu dessen Herstellung Stocklösungen verwendet wurden. Es wurden dazu 28 Teile Stocklösung A mit 72 Teilen Stocklösung B gemischt und mit 100 Teilen *Aqua bidest.* verdünnt. Stocklösung A bestand aus einer 0,2 M Na₂HPO₄-Lösung {(MG:137,99 g/mol); 55,2 g ad 2 Liter *Aqua dest.*} und Stocklösung B aus einer 0,2 M NaH₂PO₄-Lösung (MG: 177,99 g/mol; 71,2 g ad 2 Liter *Aqua dest.*). Der pH-Wert betrug 7,2-7,4 und wurde mit einem pH-Papier (Fa. Macherey-Nagel D-Düren) überprüft.

1.1.5.5. Physiologische Kochsalzlösung (0,9 %)

Zur Herstellung wurden 9 g NaCl (Merck, D-Darmstadt) pro Liter in *Aqua bidest.* gelöst.

1.1.5.6. Paraformaldehyd-Lösung (PFA 4 %)

Das Paraformaldehyd wurde unter dem Abzug abgewogen (40 g/l) und unter Rühren und Erhitzen auf 120-150°C in PB gelöst. Nach Aufklaren der Lösung wurde sie abfiltriert und auf Eis (4°C) abgekühlt.

1.1.5.7. Saccharoselösung (20 %)

Die Saccharose (20 g/100 ml) wurde ebenfalls in PB unter Rühren gelöst und bei 4°C im Kühlschrank gelagert.

1.1.6. Vorbereitung der Injektionen

Bezeichnung	Enthaltene Substanzen
Aspirationsspritze	leer
Spülspritze	NaCl
Heparinspritze	ein Teil Heparin und 5 Teile NaCl
Probenspritze-Blut	0,01 ml Heparin
Probenspritze-Lavage	1 ml NaCl
Injektionsspritze-LPS	LPS in jeweiliger Dosierung, Volumen 1 ml/kg KG
Injektionsspritze-Diclofenac	Diclofenac in jeweiliger Dosierung, Volumen 1 ml/kg KG
Injektionsspritze-NaCl/Solvent	NaCl/Solvent, Volumen 1 ml/kg KG

Tabelle 4**Vorbereitungen zur Probenentnahme in entsprechenden Einmalspritzen.**

Für die Gewinnung der Proben wurden zunächst pro Blutentnahme vier Spritzen zu 1 ml (Becton Dickinson GmbH, Tullastr. 8-12, D-Heidelberg) vorbereitet. Auf alle Spritzen wurden Luer-Kanülen mit einem Durchmesser von 0,45 mm und einer Länge von 12 mm

(Terumo Europe N.V. 3001 Leuven-Belgium) aufgesetzt. In die erste Spritze (Spülspritze) wurde isotonische Kochsalzlösung (Fa. B. Braun Melsungen AG; D-Melsungen) aufgezogen. Die zweite (Heparinspritze) wurden mit einer Mischung aus isotoner Kochsalzlösung 0,9 % (Fa. B. Braun Melsungen AG; D-Melsungen) und Heparin-Natrium (Liquemin[®] N 25000; Hoffmann-La Roche AG; D-Grenzach-Wyhlen) in einem Mischverhältnis von 1 Teil Heparin-Natrium zu 5 Teilen 0,9 % NaCl gefüllt. Die dritte Spritze (Aspirationsspritze) blieb leer, die vierte (Probenspritze) wurde durch Aspiration von einem Tropfen (0.01 ml) Heparin-Stocklösung in den Konus für die Blutentnahme vorbereitet.

Für die Gewinnung der Lavage aus der subkutanen Kammer brauchte man keine Heparinspritze. Hierzu wurde eine mit 1 ml NaCl gefüllte Probenspritze-Lavage vorbereitet.

1.2. Methoden

1.2.1. Prämedikation und Narkose

Zu Beginn wurde eine allgemeine Untersuchung durchgeführt und nur Tiere verwendet, die keine Auffälligkeiten aufwiesen und normale Gewichtszunahmen verzeichneten. Die Meerschweinchen wurden mit 0,25 mg/kg Medetomidin intramuskulär (i.m.) (Domitor[®], Pfizer GmbH, D-Karlsruhe) prämediziert. 5-10 Minuten später wurde durch die Zugabe von Ketamin 100 mg/kg intraperitoneal (i.p.) (Ketavet[®], Pharmacia Upjohn, Erlangen, Deutschland) die Narkose eingeleitet. Eine ausreichende Narkosetiefe war vorhanden, wenn durch Zwicken mit einer anatomischen Pinzette in die Kniefalte keine motorischen Reflexe ausgelöst wurden. Zum Schutz der Kornea vor Austrocknung wurde eine Augensalbe (Bepanthen[®], Dexpanthenol, Fa. Hoffmann- La Roche AG D-Grenzach-Wyhlen) in beide Lidspalten eingegeben. Es wurden 30 min. bis 60 min. für den Eingriff benötigt.

Durch Gabe von 25 mg/kg i.m. an Atipamezolhydrochlorid (Antisedan[®]) wurde das Medetomidinhydrochlorid antagonisiert. Daraufhin erwachten die Tiere innerhalb von 10 bis 60 min. wieder. Entsprechend den Bestimmungen des Tierschutzgesetzes bekamen alle Meerschweinchen, denen kein intraarterieller Katheter implantiert worden war, Metacam[®] zur postoperativen Schmerzbekämpfung. Die Gerinnungs-hemmende Wirkung dieses NSAID verbot den Einsatz bei Implantation eines Verweilkatheters.

1.2.2. Operationstechnik

Das Operationsfeld wurde mit einem Langhaarschneider rasiert und unter Einwirkung einer Enthaarungspaste (Veet[®], Fa. Reckitt Benckiser, D-Mannheim) von Haaren befreit. Nach Säubern mit einer alkoholischen Lösung aus 70 % Ethanol und destilliertem Wasser (eigene Herstellung) wurde mit einer anderen alkoholischen Lösung (Softasept N; Fa. B. Braun, Melsungen AG, D-Melsungen) die Hautoberfläche desinfiziert.

1.2.2.1. Implantation eines Verweilkatheters in die *A. carotis*

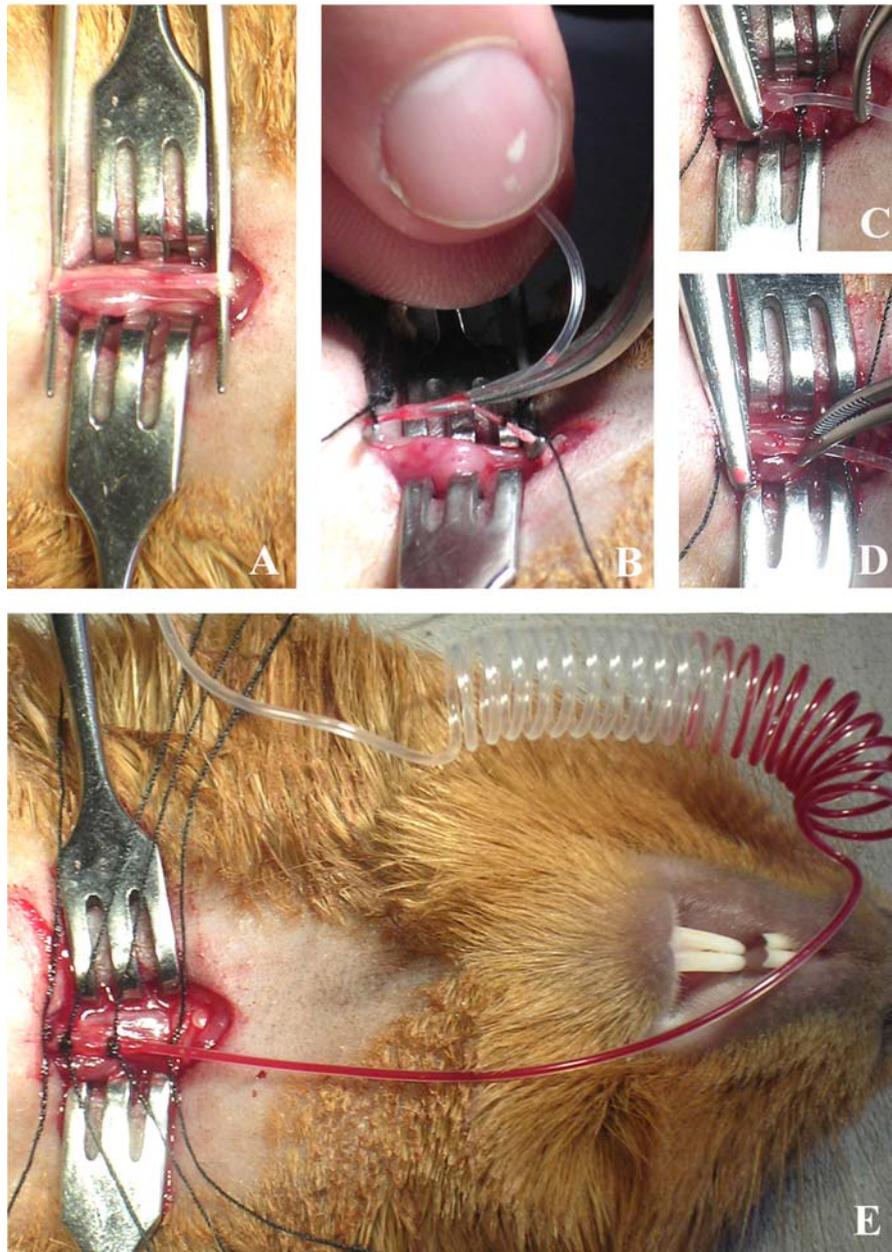


Abbildung 20

Implantation des intraarteriellen Katheters: In Teil A wird die Arterie dargestellt; Bild B zeigt die Einführung des Katheters in die schlitzförmige Öffnung mit Hilfe einer sehr spitz zulaufenden, anatomischen Pinzette; In C und D ist das Verschieben der Blase bis in das Arterienlumen dargestellt.; Abbildung E gibt Aufschluss über die Fixierung des Katheters an seiner Blase durch Ligaturen davor und dahinter. Gleichzeitig ist die Position der Inzision und der Test auf Funktionalität durch Blutaspiration veranschaulicht.

Die Implantation des Katheters erfolgte in modifizierter Form nach Shradler und Everson (1968) als *Arteriae sectio* mit Tieren, die mindestens 400 g wogen. Vor der Implantation wurde der Katheter, der ein Volumen von ca. 0,1 ml fasst, mit der Heparinspritze und dann mit einer Spülspritze bis zur vollständigen Entfernung aller im Katheter vorhandenen Luftblasen durchgespült. Zur Desinfektion wurde er in 70 % Alkohol getaucht.

Der Polyethylenkatheter wurde in die linke *Arteria carotis* bis zum Aortenbogen eingeführt. Dazu wurde im Halsbereich (*Regio thyreoidea et suprafacialis*) eine 2 cm lange Hautinzision median in cranio-caudaler Richtung gesetzt, der darunter liegende Hautmuskel in Längsrichtung auf gleicher Länge durchtrennt und die *Arteria carotis sinister* durch stumpfe Präparation vom Bindegewebe gelöst und auf einer Länge von 1 cm dargestellt (Abbildung 20 A). Durch eine rostrale Ligatur der Arterie mit nicht resorbierbarem Nahtmaterial wurde das Gefäß gestaut. Danach wurde caudal der Ligatur die Arterie mit einer Mikroschere transversal eingeschnitten, so dass der Verweilkatheter mit dem gebogenen Ende voran durch den entstandenen Schlitz eingeführt werden konnte. Dazu wurde eine besonders feine, spitze anatomische Pinzette in die Öffnung eingeführt und die elastische Arterienwand gedehnt, wodurch das Katheterende an der Pinzette entlang in das Gefäß hinein geschoben werden konnte (Abbildung 20 B). Der Katheter wurde bis einschließlich der oben beschriebenen Blase in der Arterie vorgeschoben (Abbildung 20 C-D). Anschließend wurde intraoperativ die Position des Katheters durch Aspiration von Blut kontrolliert (Abbildung 20 E). Gegebenenfalls erfolgte eine Lagekorrektur. Bei richtigem Sitz des Katheters wurde zur Fixierung rostral und caudal direkt neben der Blase eine Ligatur um die Arterie und den Katheter mit nicht resorbierbarem Nahtmaterial gelegt. Ein weiteres Einzelheft wurde noch 1 cm caudal der Blase gesetzt (Abbildung 20 E). Danach wurde der Katheter mit 0,3 ml einer Mischung aus isotonischer Kochsalzlösung 0,9 % und Heparin-Natrium in einem Mischverhältnis von 1 Teil Heparin-Natrium und 5 Teilen Natriumchlorid (NaCl) 0,9 % gespült. Dadurch wurde ein Austausch der vorher enthaltenen Kochsalzlösung mit der Gerinnungshemmer enthaltenden Mischung sichergestellt. Anschließend wurde das andere Ende des Katheters durch Erhitzen verschlossen. Den Hautmuskel vernähte man hiernach mit resorbierbarem Nahtmaterial (Vicryl[®], 1,5 metric, Fa. ETHICON, D-Norderstedt) durch Einzelhefte.



Abbildung 21

Extorisation des Katheters im Bereich des Nackens und entsprechende Verpackung desselben.

Für den Katheter wurde linksseitig zur *Regio cervicalis dorsalis* ein subkutaner Gang stumpf präpariert und der Katheter anschließend über einen Hautschnitt nach außen geführt (Abbildung 21 A). Anschließend wurde die Haut mit nicht resorbierbarem Nahtmaterial (Mersilene[®], 3 metric, Fa. ETHICON, D-Norderstedt) mit Einzelheften genäht und der Katheter noch zusätzlich mit dem gleichen Nahtmaterial an seiner Austrittsstelle fixiert. Der

Wundbereich wurde hiernach mit Sprühverband (Band-AID[®], Johnson & Johnson Medical GmbH, D–Norderstedt) abgedeckt.

Der freie Teil des Katheters (Spirale) wurde danach mit einem Pflaster umwickelt, um zu verhindern, dass der Katheter von dem Tier direkt oder indirekt aus seiner Fixierung gezogen werden konnte (Abbildung 21B).

1.2.2.2. Implantation der subkutanen Kammer

Das Tier war hierzu auf der rechten Seite gelagert. In einem Hautareal auf der linken Körperseite im Bereich der Skapula wurde etwa 2 cm unterhalb der Wirbelsäule beginnend ein Hautschnitt gesetzt und nach *distal* auf eine Länge von ca. 2 cm verlängert. Anschließend wurde mit einem konisch zulaufenden Plexiglasstab der Bereich für den späteren Sitz der Kammer präformiert. Die erzeugte Höhlung hatte denselben Durchmesser und die gleichen Ausmaße wie die subkutane Kammer, welche dort anschließend platziert wurde.

Für den Katheter wurde linksseitig zur *Regio cervicalis dorsalis* ein subkutaner Gang stumpf präpariert und dieser anschließend über einen Hautschnitt nach außen geführt. Die Austrittsstelle des Katheters der subkutanen Kammer lag durchschnittlich etwa 2 cm caudal der Austrittsstelle des Verweilkatheters, wenn dieser gleichzeitig implantiert wurde. Der Hautschnitt wurde mit dem Haut-Klammergerät (Appose[®], ULC 35W) verschlossen. Danach folgte eine Abdeckung des Operationsbereiches mit Sprühverband (Band-AID[®]). Anschließend wurde der Hautschnitt für die Austrittsstelle des Katheters mit nicht resorbierbarem Nahtmaterial (Mersilene[®]) durch ein Einzelheft verschlossen und der Katheter noch zusätzlich mit dem gleichen Nahtmaterial an seiner Austrittsstelle fixiert. Der Wundbereich wurde hiernach mit Sprühverband (Band-AID[®]) abgedeckt. Der freie Teil des Katheters (Spirale) wurde danach mit einem Pflaster umwickelt, um zu verhindern, dass sich das Tier direkt oder indirekt den Katheter ziehen konnte. Die Klammern wurden nach 10 Tagen mit einem Klammerentferner (Fa. Albrecht) entfernt.

1.2.2.3. Implantation des Senders in die Bauchhöhle

Die Implantation des Senders erfolgte bei jedem Tier je nach Versuchstiergruppe zusammen mit der Implantation des Verweilkatheters oder der subkutanen Kammer.

In Rückenlage wurde in einem supraumbilicalen Hautareal in der Medianen ein ca. 2 cm langer Hautschnitt gesetzt, die Haut seitlich etwas unterminiert und die *Linea alba* dargestellt. Entlang der *Linea alba* wurde anschließend das Abdomen eröffnet und der Sender im Bauchraum platziert. Die Bauchmuskulatur und das Peritoneum wurden mit resorbierbarem Nahtmaterial (Vicryl[®], 1,5 metric, Fa. ETHICON, D–Norderstedt) mit drei Diagonalleisten (Sultannaht) verschlossen. Die Hautinzision wurde anschließend mit einem Haut-Klammergerät (Appose[®] ULC 35W) verschlossen. Danach wurde der Operationsbereich mit Sprühverband (Band-AID[®]) abgedeckt. Die Klammernentfernung erfolgte nach ca. 10 Tagen mit einem Klammerentferner (Fa. Albrecht).



Abbildung 22

Lokalisation der Bauchinzision für die Implantation des Senders 1 cm cranial des Nabels (linker Bildrand)

1.2.3. Schematische Darstellung des Versuchsprotokolls

Der Zeitplan zur Blutentnahme orientierte sich an zwei Studien (Roth *et al.*, 1993; Jansky *et al.*, 1995) und berücksichtigte die Verläufe der Zytokinspiegel beim Meerschweinchen nach systemischer Endotoxingabe. Während der Probengewinnung waren die Tiere wach und frei beweglich. Bei der Abnahme wurde darauf geachtet, dass die Tiere möglichst stressfrei blieben, um Stress-bedingte Veränderungen der Körpertemperatur zu vermeiden. Um Einflüsse der zirkadianen Rhythmik zu minimieren, wurden alle Versuche zu gleichen Uhrzeiten durchgeführt (Injektionen 11:00-12:00).

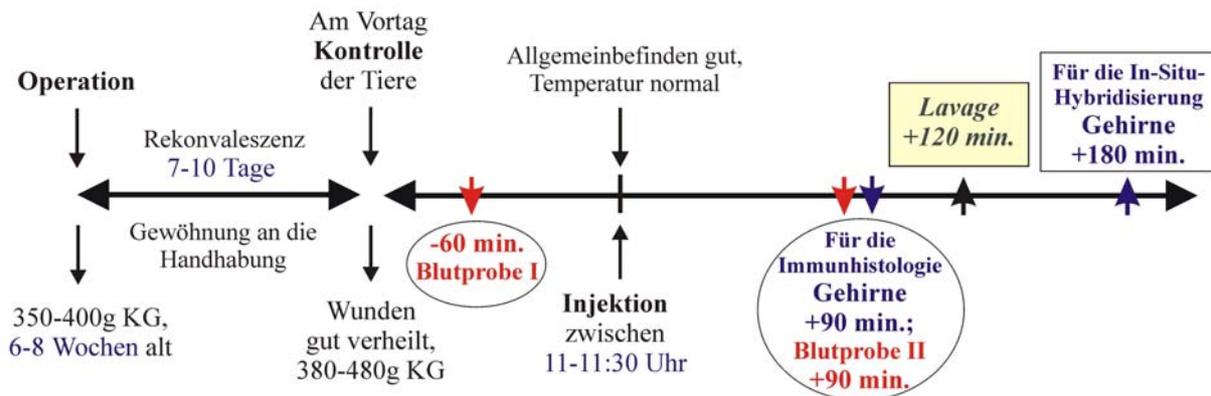


Abbildung 23

Schematische Darstellung des zeitlichen Ablaufes zur Vorbereitung und Versuchsdurchführung.: Die Blutprobenentnahme fand 60 min. vor (Probe I) und 90 min. nach (Probe II) der Injektion statt. Die Sammlung von Lavage wurde 120 min. nach Injektion mit anderen Tiergruppen vorgenommen.

Der Zeitpunkt der Perfusion von Tieren 90 min. nach Injektion zur immunhistologischen Untersuchung der nukleären STAT3-Translokation war in eigenen Vorversuchen festgelegt worden. Ein Vergleich einzelner Gehirne zu den Zeitpunkten 30, 60, 90, 120 und 180 min. nach LPS-Gabe, ergab ein Maximum der nukleären STAT3-Signale (siehe Kapitel V 1.2) nach 90 min. (Rummel *et al.*, 2004).

Unter Berücksichtigung der Zeitpunkte des Auftretens erhöhter Konzentrationen an proinflammatorischen Zytokinen nach LPS-Stimulation im Bereich der subkutanen Kammer, wurde Lavage zur Messung einer möglichen Induktion der Bildung von Prostaglandin E₂ zum Zeitpunkt 120 min. nach LPS-Applikation gewählt (Ross *et al.*, 2000, Ross *et al.*, 2003).

Schließlich wurden entsprechend vorhergehender Studien 180 min. nach Setzen des Entzündungsreizes, Gehirne zur Untersuchung mit Hilfe der *in situ* Hybridisierung entnommen. Verschiedene Zeitintervalle von mRNA Expressionen der COX-2 im Gehirn der Ratte fanden sich in der Literatur: Ab 45-60 min. wurden erste Signale entdeckt und bei 2,5 h, 4 h oder bis 6 Stunden maximale Konzentrationen gefunden (Cao *et al.*, 1995; Breder & Saper, 1996; Cao *et al.*, 1997b). Erste COX-2-Expression auf Proteinebene konnten ab 1,5 h mit einem Maximum bei 5 Stunden immunhistochemisch nachgewiesen werden (Matsumura *et al.*, 1998a), was gut mit dem zeitlichen Verlauf der Transkription und Translation zu erklären ist. Der hier gewählte Zeitpunkt bei 180 min. liegt also zu Beginn der maximalen COX-2-Expression im Gehirn, für den zu erwarten ist, dass COX-2 bereits anteilig als Protein vorliegt.

1.2.4. Stimulation der Versuchstiere

Für jede Injektion, Lavage oder Blutprobe wurden die Tiere zur Manipulation in einen 50 cm durchmessenden und 30 cm hohen Glaszylinder gesetzt (Abbildung 24), was eine Stress-arme Handhabung der Tiere ermöglichte. Zusätzlich wurde vor jeder Injektion das Gewicht mit einer Präzisionswaage (Sartorius universal) bestimmt. Die Tiere hatten dabei Bewegungsfreiheit und Sichtkontakt zur Umgebung und waren daran mindesten zweimal vor dem ersten Versuch gewöhnt worden.

Die Substanzen (LPS, Diclofenac oder NaCl) wurden zum Zeitpunkt $t = 0$ min. intraperitoneal, in die subkutane Kammer, den intraarteriellen Katheter oder contralateral subkutan im Bereich der Skapula injiziert. Dies geschah mittels der in Kapitel III 1.1.6 beschriebenen Einmalspritzen, wobei einzelne Substanzen nicht in einer Mischspritze, sondern bei Gabe von mehreren Substanzen zum gleichen Zeitpunkt in jeweils separaten Spritzen appliziert wurden. Sowohl bei der Injektion in die Kammer oder in den intraarteriellen Katheter wurde zuvor die Aspirationspritze aufgesetzt.

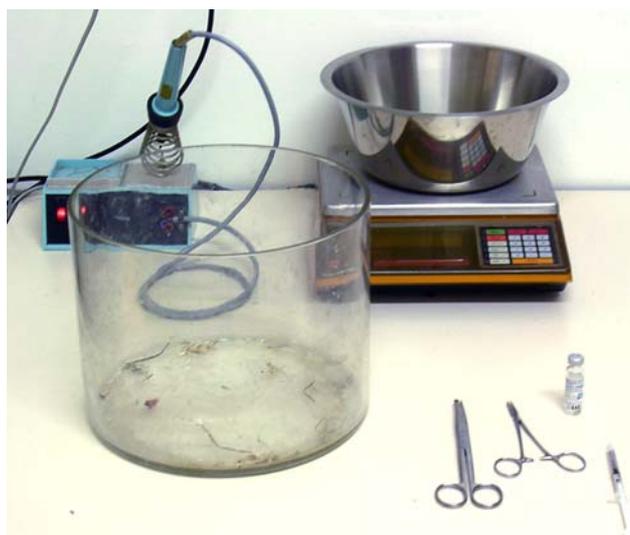


Abbildung 24

Arbeitsplatz zur Stimulation der Versuchstiere. In der linken Ecke ist der LötKolben zu sehen, mit dem die Katheter zugeschweißt wurden; rechts davon befindet sich die Präzisionswaage; vorne links sieht man den Glaszylinder zur Stress-freien Handhabung der Tiere.

Aus der subkutanen Kammer konnten zunächst in einigen Fällen 0,1-0,3 ml Flüssigkeit abgezogen werden. Abschließend wurde mit einer neuen leeren Aspirationsspritze der Katheter zur Kammer mit Luft durchgespült.

Beim intraarteriellen Verweilkatheter wurde bis zum Konus der Spritze Blut angesaugt, injiziert, mit einem Volumen von 0,3 ml der Spülspritze gespült und schließlich der Katheter mit 0,2 ml aus der Heparinspritze gegen Zugerinnung behandelt. Die Katheter wurden danach in beiden Fällen zugelötet.

1.2.5. Biologisches Material

Die Gewinnung des biologischen Materials (Blut, Lavage oder Gehirne für Immunhistologie und *in situ* Hybridisierung) erfolgte nach dem in Abbildung 23 dargestellten Schema. In der dafür vorgesehenen Grundgesamtheit der Tiergruppen wurden Proben immer zu gleichen Uhrzeiten entnommen.

1.2.5.1. Blut/Plasma

Der Verweilkatheter wurde von seiner Verpackung mit Klebeband befreit und am Ende abgeklemmt. Dazu wurden speziell präparierte Arterienklemmen benutzt, die eine Beschädigung des Katheters verhinderten. Über die Verzahnung der Klemme stülpte man hierzu kleine Gummischläuche. Bei jedem Wechsel einer Spritze konnte durch Öffnen und wieder Abklemmen ein unkontrollierter Blutaustritt vermieden werden.

Nach Abschneiden des verschweißten Endes wurde die Kanüle der Aspirationsspritze auf den Katheter aufgesetzt. Es wurde so lange aspiriert, bis Blut den Konus der Spritze erreicht hatte. Mit der Probenspritze wurden dann 0,7 ml Blut aufgezogen und in ein Eppendorfgefäß (Reaktionsgefäße 3810, 1,5 ml; Fa. Eppendorf-Netheler-Hinz-GmbH, D-Hamburg) zur Zentrifugation überführt. Nach Injektion von 0,3 ml NaCl mit der Spülspritze wurden 0,2 ml aus der Heparinspritze in den Katheter gegeben. Damit konnte mit minimaler Heparinmenge der Katheter ausreichend durchspült und gegen Zugerinnung geschützt werden. Der ganze Vorgang dauerte höchstens 5 min.

Zusätzlich wurden bei Perfusionen ca. 0,9 ml Blut direkt aus dem Herzen mit einer Probenspritze-Blut entnommen.

Direkt nach Gewinnung der Blutprobe folgte die Zentrifugation in den Eppendorfgefäßen bei 5000 U/min. für fünf Minuten (Zentrifuge 5414S, Fa. Eppendorf-Netheler-Hinz-GmbH, D-Hamburg). Die Überstände wurden jeweils abpipettiert, bei einer Temperatur von -60 °C eingefroren und bis zur weiteren Analyse gelagert.

1.2.5.2. Lavage

Auch hierbei waren die Tiere nicht in ihrer Bewegungsfreiheit eingeschränkt. Der Katheter wurde von seiner Verpackung mit Klebestreifen befreit und an seinem Ende gekappt. Die Probenspritze wurde aufgesetzt und 1 ml isotoner Kochsalzlösung langsam über einen Zeitraum von 1-2 min. in die Kammer injiziert. Danach veränderte man vorsichtig mehrmals die Lage des Tieres zur verbesserten Durchmischung der Flüssigkeit und aspirierte anschließend die Lavage wieder. Durch dieses Vorgehen konnten ca. 0,7–1,0 ml der

injizierten Flüssigkeit rückgewonnen werden. Schließlich wurde die Spritze samt Kanüle abgesetzt und der Katheter mit einer leeren Aspirationsspritze mit Luft gespült. Die Spritze wurde wieder entfernt und der Katheter, wie vorher beschrieben, zugelötet und verpackt. Die Zentrifugation und Lagerung erfolgte entsprechend der Plasmaprobengewinnung unmittelbar nach der Lavagegewinnung.

1.2.5.3. Gehirne

Zur Durchführung der Immunhistologie wurden Perfusionen durchgeführt. Die Tiere wurden mit einer Überdosis Barbiturat (Pentobarbital, Narkoreen[®], Fa. Merial) in eine tiefe Narkose gelegt und die Narkosetiefe durch Zwicken der Tiere in der Kniefalte mit einer Pinzette überprüft.

- Perfusion

Das Tier wurde in Rückenlage auf einer Perfusionswanne fixiert, die Bauchhöhle präumbilikal eröffnet und der Schnitt zügig bis in den Rippenbereich verlängert. Das Diaphragma wurde mit einer Schere vom Rippenbogen gelöst und die Rippen auf beiden Seiten im ventralen Drittel durchtrennt, ohne dabei die Lunge, oder das Herz zu beschädigen. Es folgte die Fixation des Sternums nach cranial, um eine ausreichende Übersicht zu schaffen und das Herz darzustellen. Nach Einreißen und Befreien des Herzens vom Herzbeutel, wurde mit einer 40 mm langen 18 G Einmal-Kanüle (Sterican 1.2 x 40; Braun D-Melsungen) in den linken Ventrikel im Bereich der Herzspitze ca. 0,5 cm tief eingestochen. Die Kanüle war mit dem Perfusionssystem verbunden. Mit einer Knieschere wurde nun der rechte Vorhof großzügig eröffnet und gleichzeitig das Ventil zur Zimmer-warmen Kochsalzlösung (0,9 %) geöffnet. Mit einem Druck von ca. 120 mmHg wurden 400-500 ml dieser Lösung durch den Kreislauf des Tieres gespült, bis keine Erythrozyten mehr sichtbar aus dem rechten Vorhof zu fließen schienen. Als zusätzliches Anzeichen für eine ausreichende Entblutung wurde die Farbe der Leber genutzt. Sie musste gleichmäßig blass sein. Dann wurde das Ventil auf die gekühlte Fixierungslösung Paraformaldehyd (PFA 4 % und 4°C) umgestellt. Zur ausreichenden Fixierung brauchte man 400-500 ml des Fixativs. Die fester werdende Konsistenz der Leber und das Steifwerden des Tierkörpers waren gute Indizien für eine erfolgreich durchgeführte Perfusion.

1.2.5.3.1. Gehirnentnahme für die Immunhistologie (Free Floating)

Das Tier befand sich in Bauchlage. Zur Entnahme der Gehirne wurde zunächst im Nackenbereich die Haut mit einem Skalpell eingeschnitten. Nach Abpräparieren der Haut bis über die Schädelkalotte zum *Os nasale* wurde das Meerschwein mit einer Schere zwischen dem zweiten und vierten Wirbel dekapitiert. Mit einer Luer Knochenzange wurde vorsichtig die *Medulla oblongata* von den Wirbelkörpern befreit und die Schädeldecke abpräpariert. Nach einer Durchtrennung der Hirnhäute, der großen Gehirnnerven und der Hypophyse konnte das Gehirn mit einem Spatel von den *Filae olfactoriae* befreit und aus seiner knöchernen Begrenzung vorsichtig entnommen werden.

Das Gehirn wurde dann am Übergang vom *Cerebrum* zum *Cerebellum* mit einem Skalpell in zwei Teile geteilt und in 40 ml Plastiksraubgefäße zum Nachfixieren für 2 Stunden bei 4°C in die PFA-Lösung überführt. Nach ausreichender Fixierung legte man die Gehirne in neue Plastiksraubgefäße, die mit 30 ml Saccharoselösung (20 %) gefüllt waren und inkubierte über Nacht bei 4°C. Damit konnte dem Gewebe Wasser entzogen und das Gehirn vor Gefrierschäden geschützt werden. Bis zur weiteren histologischen Verarbeitung mussten die Gehirne auf den Boden der Gefäße absinken, was auf eine ausreichende Einwirkzeit hinwies.

1.2.5.3.2. Gehirnentnahme für die Immunfluoreszenz

Für die Immunfluoreszenz wurde eine geringfügig abgeänderte Perfusionsmethode angewendet. Es wurde nur der erste Schritt mit der Zimmer-warmen Kochsalzlösung (0,9 %) durchgeführt. Eine Fixierung des Gewebes durch Perfusion mit PFA und folgender Nachfixierung sowie die Saccharose-Behandlung entfielen. Stattdessen wurden die entnommenen Gehirne direkt für die weitere Behandlung schockgefroren.

Dazu wurden Alufolie und Parafilm (Parafilm „M“, American National ConTM, Chicago) in ausreichend große Rechtecke zugeschnitten und leere Plastiksraubgefäße bereitgestellt. Trockeneis wurde in einem großen Keramikmörser pulverfein gerieben, die Gefäße vorgekühlt und Mulden in das Eis gedrückt. Die zwei Gehirnteile gab man dann einzeln mit der dorsalen bzw. kortikalen Seite zuerst in die präformierten Mulden. Zum gleichmäßigen und schnellen Einfrieren wurde mit einem Spatel vorsichtig das Pulver-förmige Trockeneis über die Gehirne geschoben, so dass sie völlig bedeckt waren. Schließlich wurden sie in Parafilm, dann in Alufolie eingewickelt, in die Schraubgefäße verpackt und bei -80°C gelagert. Damit waren die Gehirne bis zur weiteren histologischen Verarbeitung vor Austrocknung geschützt

1.2.5.3.3. Gehirnentnahme für die *in situ* Hybridisierung

Prinzipiell war die Behandlung der Gehirne ähnlich wie bei der Immunfluoreszenz-Methode. Allerdings erfolgte hier keine Perfusion. Es musste hierbei sehr sauber und mit frischen Handschuhen gearbeitet werden. Zur Vermeidung der Kontamination mit RNAsen wurde jeglicher Kontakt von Haut oder Haaren mit dem Probenmaterial oder den verwendeten Instrumenten weitestgehend vermieden. Nur neue Gefäße und frisch abgeschnittene Verpackungsmaterialien kamen zum Einsatz. Die Lagerung bis zur Verarbeitung erfolgte ebenfalls bei -80°C. Zur weiteren Untersuchung wurden die Gehirne auf Trockeneis in ein Labor gesandt, mit dem eine diesbezügliche Kooperation bestand.

2. Telemetrie

2.1. Material

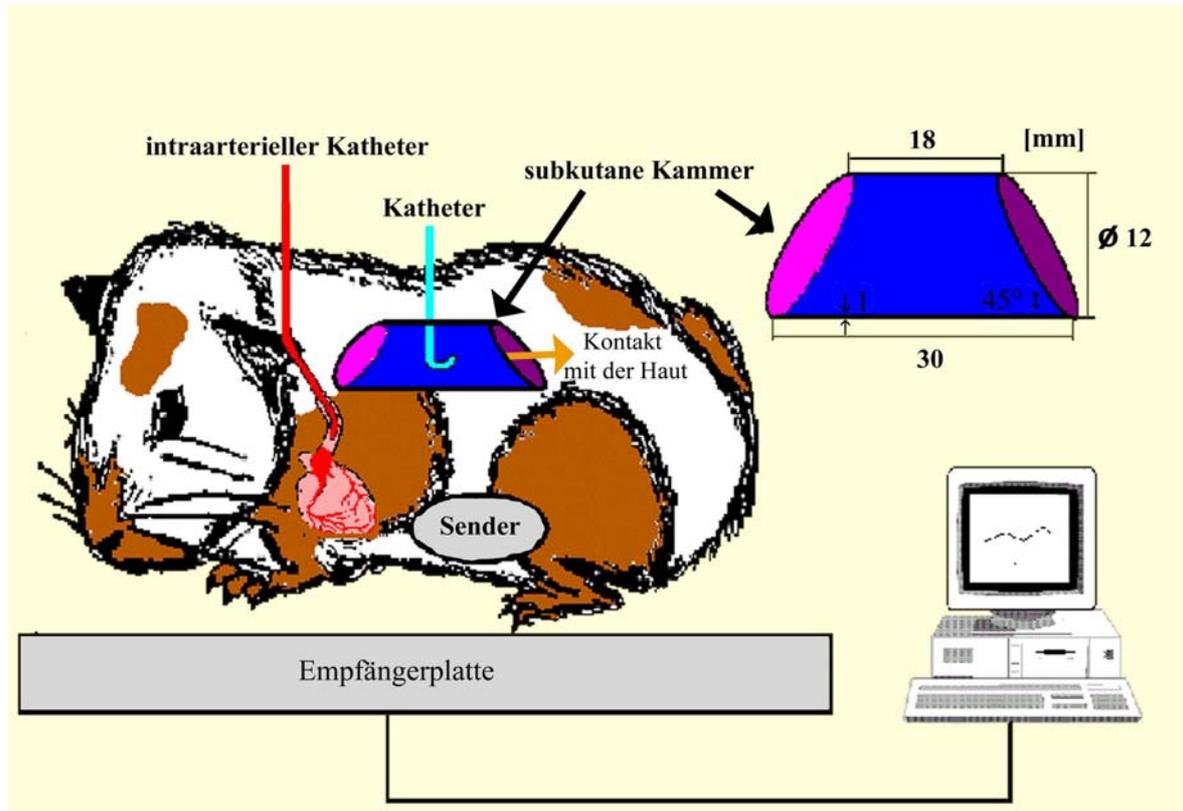


Abbildung 25

Schematische Übersicht des telemetrischen Systems zur Aufzeichnung der abdominalen Körpertemperatur. Die Meerschweinchen befanden sich frei beweglich in ihren gewohnten Käfigen, die über den Empfängerplatten platziert waren. Damit war eine stressfreie Aufzeichnung der Temperaturkurven möglich.

Wie schon in Kapitel III 1.1.4 beschrieben wurde zur telemetrischen Aufzeichnung der Körpertemperatur ein intraperitoneal implantierter Sender verwendet, der über eine Empfängerplatte die Temperaturdaten zum Speichern zu einem Computersystem übermittelte. Zur Pyrogen-Applikation waren die Tiere dementsprechend je nach Versuchsgruppe mit einem intraarteriellen Katheter, oder bzw. und einer subkutanen Kammer bestückt worden. Folglich konnten nach s.c., i.a. oder i.p. Injektion von LPS oder Vehikel Temperaturkurven aufgezeichnet werden.

2.2. Methoden

2.2.1. Versuchsdurchführung

Nach Rekonvaleszenz von der Implantation der Miniatursender und Gewöhnung der Tiere an die Handhabung beim Ablauf konnte mit den Versuchen begonnen werden. Dazu programmierte man das Telemetrie-System am Vortag so, dass die Aufzeichnung der Temperatur in fünf Minuten Intervallen um 7:00 morgens des Versuchstages begann und

mindestens bis 19:00 desselben Tages anhielt. Da die Injektionen der Substanzen zwischen 10:00 und 11:00 erfolgten, war immer ein Vorlauf von mehr als 2 Stunden gewährleistet. Vor Beginn der Injektion konnte so anhand der abdominalen Körpertemperatur der letzten Stunden, sowie des Allgemeinzustandes und der Gewichtsentwicklung der Tiere deren Gesundheitsstatus überprüft werden. Bei fieberhaften Erscheinungen und schlechtem Allgemeinbefinden mussten solche Tiere vom Versuch ausgeschlossen werden, was allerdings nur vereinzelt der Fall war. Prinzipiell wurden bei allen Versuchen zur Kontrolle der Fieberreaktion die Temperaturkurven aufgezeichnet. Zur Auswertung und Erstellung der Fieberkurven zog man den Zeitraum 2 h vor bis 6 h nach der Injektion heran.

2.2.1.1. Schematische Darstellung des Versuchsprotokolls

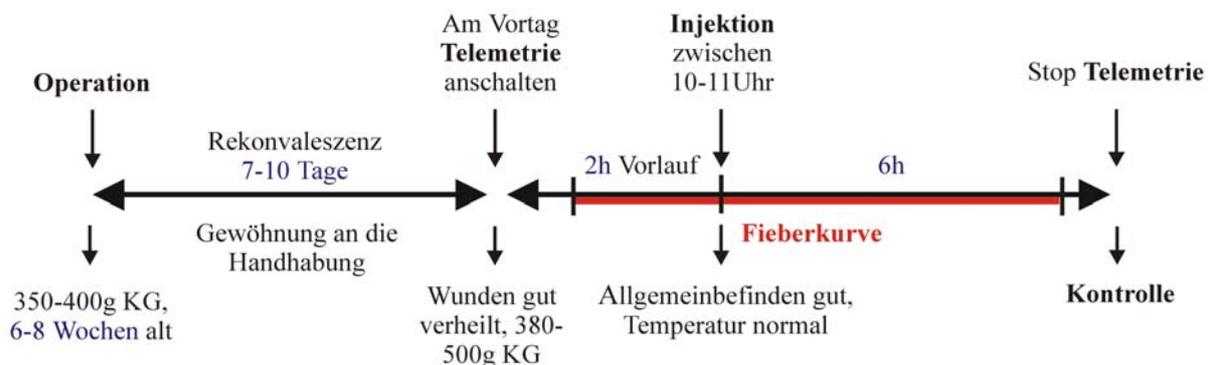


Abbildung 26

Schematische Darstellung des Versuchsablaufes zur Aufzeichnung der Fieberkurven mit Hilfe des Telemetrie-Systems: Rot markiert ist die Zeitspanne, die schließlich zur Auswertung jedes Versuches herangezogen wurde.

3. Interleukin-6 Bioassay

Das Prinzip des IL-6-Bioassays beruht auf der Förderung der Proliferation der Hybridoma Zelllinie B9 (Aarden *et al.*, 1987; Van Oers *et al.*, 1988) durch IL-6. Diese Zelllinie wird hochspezifisch und Dosis-abhängig durch IL-6 zum Wachstum stimuliert. Zytokine können allerdings allgemein mittels zwei prinzipiell verschiedener Methoden nachgewiesen werden.

Zum einen ist ein Nachweis mit Immunoassays möglich. Es handelt sich dabei, der Antigenität der Zytokine entsprechend, um eine Antikörper-vermittelte Detektion. Sie ist Zytokin- und Spezies-spezifisch und weist Zytokinproteine sowohl in ihrer biologisch aktiven wie auch inaktiven Form nach. So genannte ELISA-Kits sind hierfür kommerziell erhältlich, allerdings bislang nicht für Zytokine des Meerschweinchens. Die Immunoassays, die in der Zytokinanalytik verwendet werden und auf dem Markt verfügbar sind, weisen in ihrer Sensitivität teilweise erhebliche Unterschiede auf (Mire-Sluis *et al.*, 1995).

Zum anderen sind bestimmte Zelllinien gegenüber Zytokinen empfindlich und lösen bei diesen eine spezifische biologische Reaktion aus. Diese biologische Aktivität kann in Bioassays quantitativ bestimmt werden (Gearing, 1994). Es können hiermit die biologisch aktiven Quantitäten eines Zytokines Spezies-übergreifend detektiert werden. Sie sind allerdings mit einem höheren Arbeits- und Zeitaufwand verbunden und die Zellreaktionen können unter Umständen auch von anderen Faktoren beeinflusst werden. Um eine gute

Vergleichbarkeit zu garantieren, wurden Proben einer Serie immer zusammengefasst und in einem Assay ausgewertet. Die zu untersuchenden Plasmaproben wurden vor Beginn der Bestimmung nach Bedarf vorverdünnt. Hierzu wurde das jeweilige Assaymedium des IL-6-Bioassays benutzt.

3.1. Material

3.1.1. Verwendete Substanzen

Abkürzung	Substanzen	Hersteller
Assay Medium (Medium)	100 ml RMPI Medium 7 % FCS (Fetales Kälberserum) 1 ml Glutamin {1 mmol/ml} 250 µl Mercaptoethanol 125 µl Gentamycin	Rothwell Park Memorial Institute Medium 1640, Fa. Life Technologies, Paisley, Scotland
Wachstumsmedium	Assay Medium IL-6 {500 IU/100 ml Medium}	(Fa. Life Technology)
QK1/QK2	Qualitätskontrolle (QK1): IL-6 {10IU/ml} Qualitätskontrolle (QK2): IL-6 {30IU/ml}	Referenz-Code 89/548, National Institute for Biological Standards and Control (NIBSC), Potters Bar, Großbritannien
Standard	500 µl IL-6-Standard {50IU/ml}	
MTT	(3-{4,5-Dimethylthiazol-2-yl}2,5-Diphenyl-Tetrazoliumbromid)-Lösung 0,1g MTT/20 ml PB (5 mg/ml)	Sigma Chemicals, St. Louis, MO, USA
Isopropanol/HCL-Lösung	4 ml 2N HCL 196 ml Isopropanol	Merck, D-Darmstadt

Tabelle 5

Verwendete Substanzen und Lösungen für das IL-6 Assay

3.1.2. B9 Zelllinie

Die Hybridoma Zelllinie wurde von Lansdorp et al. 1986 entwickelt. Durch die Injektion von Pristane (2,6,10,14-Tetramethylpentacane) in die Bauchhöhle von Balb/c Mäusen wurde die Entstehung von Plasmazytomen induziert (Lansdorp *et al.*, 1986). Durch die Verschmelzung von Milzzellen von Balb/c Mäusen mit Hybridplasmazytomzellen (Sp2/0Ag14) entstand die Hybridoma Zelllinie B 13.29. Eigentliches Ziel der Forschergruppe war es, eine Zelllinie zu entwickeln, die Antikörper gegen menschliche Oberflächenantigene produziert. Zur Kultivierung dieser Zellen mussten dem Ansatz noch Helferzellen bzw. „feeder-cells“ (Humane-Endothel-Zellen-HEC) zugesetzt werden. Diese Zellen lieferten den Wachstumsfaktor (Hybridoma-Growth-Factor) HGF. Dieser Wachstumsfaktor HGF ist identisch mit Interleukin-6 {IL-6; (Van Oers *et al.*, 1988)}. Bei den B 9-Zellen handelt es sich um einen Subklon der B 13.29 Zelllinie. Diese Zelllinie verfügt im Vergleich zu den B 13.29 über eine wesentlich größere Sensitivität gegenüber IL-6.

Mit Hilfe der B 9-Zellen kann schon die Menge an IL-6 nachgewiesen werden, die ein einziger menschlicher Monozyt produziert (Aarden *et al.*, 1987). Die B9-Zellen wurden in einem speziellen Kulturmedium kultiviert. Das Medium bestand aus **Rothwell Park Memorial Institute Medium** (RPMI 1640, Fa. Life Technologies, Paisley, Scotland) mit einem Zusatz von 5,5 % fetalem, Hitze-inaktiviertem Kälberserum, 1 ml L-Glutaminsäure (Konzentration 1 mmol/ml), 100 µl Gentamycin sowie 250 ml Mercaptoethanol. Für das Wachstum der Zellen wurde dem Medium noch IL-6 in einer Konzentration von 500 IU/100 ml zugesetzt. Dieser Zusatz fehlte bei der Verwendung des Mediums im Assayansatz. Die Kultivierung erfolgte in einem Brutschrank bei einer Temperatur von 37 °C, einem CO₂-Gehalt von 5 % und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 95 %. Nach 3 Tagen wurden die Zellen in neues Medium in eine 50 ml Kulturflasche (Greiner GmbH, Maybachstr. 2, D-Frickenhausen) passagiert. Zum Passagieren wurden in eine neue Kulturflasche 9 ml des oben beschriebenen Kulturmediums (inkl. IL-6) pipettiert und anschließend hierzu 1 ml der Zellsuspension aus der alten Kulturflasche hinzugefügt.

3.1.3. Vorbereitung

Die Durchführung der IL-6-Assays erfolgte in sterilen Mikrotiterplatten (Cellstar®, Greiner, D-Frickenhausen, Abbildung 27) mit 96 Vertiefungen. Dem Schema entsprechend wurde ein Protokollvordruck mit den zu bestimmenden Probenbezeichnungen beschriftet.

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

Abbildung 27

Schema zum Beschieken einer Mikrotiterplatte bzw. zur Beschriftung des Protokollvordruckes: B, Nullwert („Blank“); IU, International Units; 50 IU, Standard; Medium, Assay Medium; QK, Qualitätskontrolle; x:y, Verdünnungsfaktoren; A2-J8, Probenverdünnungen

3.2. Methoden

3.2.1. Durchführung des Assays

Zunächst wurden in Spalten A und B (Abbildung 27) der Versuchsplatte außer in den Nullwert (Blank) jeweils 200 µl der entsprechenden Substanz oder Probe pipettiert. Alle anderen Vertiefungen der Spalten C bis L befüllte man mit 100 µl Assaymedium. In einer Doppelbestimmung wurden die Verdünnungsreihen für die QKs und die Proben (Übersicht in Tabelle 5) in fünf Schritten durchgeführt und nach der letzten Verdünnung die überflüssigen 100 µl verworfen. In der ersten Reihe verdünnte man den Standard kontinuierlich in 10

Schritten als Einzelbestimmung. Die Proben in der Verdünnungsreihe wurden immer um den Faktor 1:2 verdünnt.

Zur Durchführung des Nachweises der in den Plasmaproben enthaltenen biologisch aktiven IL-6 Spiegel mussten die B9-Zellen zunächst von restlichem IL-6 aus dem Wachstumsmedium befreit werden. Es wurden nur Zellen verwendet, die sich gerade in der exponentiellen Wachstumsphase befanden, was drei Tage nach dem Passagieren der Fall war. Der erste Schritt bei der Aufbereitung der Zellsuspension bestand also darin, die Zellsuspension aus der Kulturflasche 3 Minuten bei 2000 U/min zu zentrifugieren. Der Überstand wurde anschließend dekantiert, um die Zellen durch die Zugabe von 9 ml IL-6-freiem Assaymedium wieder zu resuspendieren. Dieser Vorgang wurde noch zweimal wiederholt. Zum Schluss resuspendierte man die Zellen mit 3 ml Assay Medium, entnahm einen Tropfen der gut durchmischten Zellsuspension, und überführte ihn in eine Zählkammer (Hämozytometer nach Thoma). Es wurden nun die lebenden Zellen gezählt, keine Berücksichtigung fanden also Zellen mit offensichtlich morphologisch sichtbaren Defekten. Aufgrund der ermittelten Zellanzahl wurde eine Zellsuspension mit einer Konzentration von 5000 Zellen/100 μ l Medium hergestellt.

In jede Vertiefung der Mikrotiterplatte wurden 100 μ l der aufbereiteten Zellsuspension gegeben. Bei jedem Assay wurden ein Standard pro Platte und zwei Qualitätskontrollen pro Assay erstellt. Die Qualitätskontrollen und Standards bestanden aus festgelegten Mengen von humanem rekombinantem IL-6 (Referenz-Code 89/548, National Institute for Biological Standards and Control (NIBSC), Potters Bar, Großbritannien). Die IL-6 Konzentration des Standards betrug 50 IU/ml, die der Qualitätskontrollen 10 und 30 IU/ml.

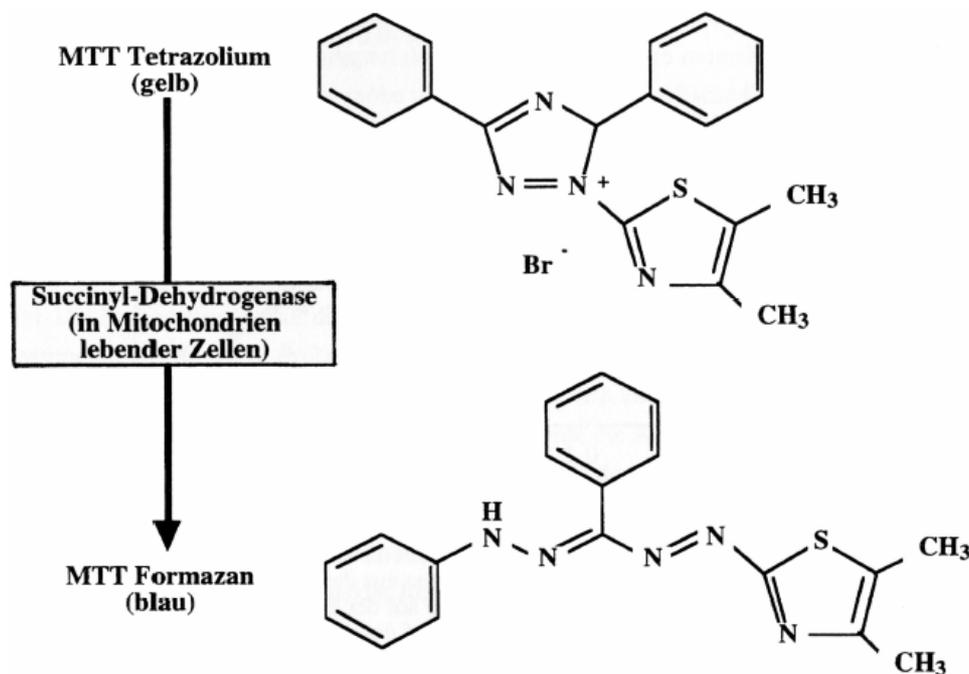


Abbildung 28

Chemische Struktur von MTT-Tetrazoliumbromid und seinem Reaktionsprodukt MTT-Formazan nach Umwandlung durch mitochondriale Enzyme

Nach einer Inkubationszeit von 72 Stunden wurden in jede Vertiefung 25 µl MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyl-Tetrazoliumbromid, Sigma Chemicals, St. Louis, MO, USA) in einer Konzentration von 5 mg/ml PB-Lösung pipettiert und inkubiert. Während dieser Zeit wandelten Succinyl-Dehydrogenasen in den Mitochondrien der lebenden Zellen das gelbe MTT-Tetrazoliumsalz in dunkelblaue bis violette MTT-Formazan-Kristalle um (Mosmann, 1983; Ibelgaufts, 1995).

Je mehr IL-6 in der Probe enthalten war, desto mehr Zellen waren vorhanden und desto mehr MTT wurde in den Mitochondrien verstoffwechselt. Bis zu diesem Zeitpunkt wurden alle Arbeiten unter sterilen Bedingungen unter einer Reinheitsbank (VFR 1206, LAF Bank, Fa. Tecnormara, Fernwald) durchgeführt. Nach vier Stunden wurden aus jeder Vertiefung 125 µl abpipettiert und verworfen. Anschließend wurden in jede Vertiefung 100 µl eines Gemisches aus Isopropanol mit 0,04 N Salzsäure (HCl) pipettiert. Dieser Zusatz ist zum Auflösen der Zellen und der Formazan-Kristalle notwendig. Dazu wurden die Platten für weitere 12 Stunden im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert.

Nach Ablauf dieser Zeit wurden die Farbreaktionen in den Mikrotiterplatten bei einer Wellenlänge von 550 nm mit einem ELISA-Reader (Digiscan, Asys Hitech, A-Eugendorf) photometrisch bestimmt und aufgezeichnet (Mikrowin 2000, Asas Hitech, A-Eugendorf).

4. Prostaglandin E₂ ELISA

Dieses Assay (ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay) basierte auf einer kompetitiven Bindungstechnik. Dabei konkurrierte das in der Lavage enthaltene PGE₂ mit einer festgelegten Menge an mit alkalischer Phosphatase markierten PGE₂ um Bindungsstellen an einem monoklonalen Antikörper aus der Maus. Die Mikrotiterplatte trug fest gebundene anti-Maus Antikörper aus der Ziege. An diese lagerte sich der monoklonale Maus-Antikörper während der Inkubation an. Es entstand ein bestimmtes Mischungsverhältnis aus gebundenen markierten und unmarkierten PGE₂-Molekülen auf der Platte. Überschüssige markierte PGE₂ Moleküle und ungebundene Probenprostaglandine entfernte man durch Waschen. Eine Substratlösung wurde hinzugefügt, um die auf der Platte gebundene Enzymaktivität nachzuweisen. Sofort nach der erreichten Farbreaktion wurde die Absorption bei 405 nm im ELISA-Reader gemessen. Damit war die Intensität der Färbung umgekehrt proportional zur Konzentration an PGE₂ in der Probe. Es handelte sich also um eine indirekte Nachweismethode von Prostaglandinen. Prostaglandine unterscheiden sich nicht Spezies-spezifisch. Deshalb konnte hier im Gegensatz zur Bestimmung von IL-6 beim Meerschweinchen ein Immunoassay zur Detektion eingesetzt werden. Die Sensitivität dieses Nachweisverfahrens lag bei 36,2 pg/ml. Weiterhin waren Kreuzreaktionen zu anderen Prostaglandinen und Substanzen bekannt. Ins Gewicht fielen dabei vor allem andere Formen der Prostaglandin E Familie. Demnach konnte es bis zu 70 % Kreuzreaktionen mit PGE₁ und bis zu 16,3 % zu PGE₃ kommen. Dieses war bei der Beurteilung und Interpretation zu berücksichtigen. Andere Prostaglandine lagen unter einem Prozent und konnten vernachlässigt werden. Das Immunoassay war nicht für diagnostische Verfahren geeignet. Es wurde hier lediglich für Forschungszwecke eingesetzt.

4.1. Material

4.1.1. Verwendete Substanzen

Alle Substanzen und Lösungen wurden am Vortag zum Auftauen in den Kühlschrank gelegt. Am Versuchtag mussten dann alle Substanzen, Lösungen und Proben vor Durchführung des Assays Raumtemperatur besitzen.

Reagenzien	Beschreibung	Hersteller
PGE ₂ Konjugat	PGE ₂ mit alkalischer Phosphatase konjugiert, Konservierungsmittel, blauer Farbstoff	Prostaglandin E ₂ Immunoassay DE0100 R&D Systems GmbH D-Wiesbaden- Nordenstadt
PGE ₂ Standard	PGE ₂ {50.000 pg/ml}, Puffer, Konservierungsstoff	
PGE ₂ Antikörper	Monoklonaler Antikörper aus der Maus gegen PGE ₂ , Konservierungsstoff, gelbe Farbe	
Assaypuffer (ED1)	Puffer mit Proteinen	
Waschpuffer	10-fach konzentrierter Puffer mit Surfactant	
pNPP Substrat	p-Nitrophenylphosphat in Puffer	

Tabelle 6

Substanzen, die im ELISA-Kit enthalten waren.

- Verdünnung der Standardreihe
Es wurden zweimal acht Eppendorfgefäße (1,5 ml) beschriftet und Assaypuffer (ED1) zur Verdünnung vorgelegt. Im ersten Schritt verdünnte man 1:10. Es folgten sieben weitere Verdünnungsstufen als Doppelbestimmung in 1:2 Schritten.
- Verdünnung des Waschpuffers
Durch zehnfache Verdünnung mit *Aqua bidest.* wurden 200 ml Waschpuffer angesetzt.

4.1.2. Lavageproben

Die zuvor gewonnenen Proben wurden kurz vor Versuchbeginn aufgetaut und mit dem Assaypuffer ED1 zehnfach verdünnt.

4.1.3. Vorbereitung

Die Durchführung der PGE₂-Immunoassays erfolgte in sterilen Mikrotiterplatten mit 96 Vertiefungen (Part R80002 R&D Systems GmbH, D-Wiesbaden-Nordenstadt). Dem Schema entsprechend wurde ein Protokollvordruck mit den zu bestimmenden Probenbezeichnungen beschriftet.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	B	S1	S5	L1	L5	L9	L13	L17	L21	L25	L29	L33
B	B	S1	S5	L1	L5	L9	L13	L17	L21	L25	L29	L33
C	B0	S2	S6	L2	L6	L10	L14	L18	L22	L26	L30	L34
D	B0	S2	S6	L2	L6	L10	L14	L18	L22	L26	L30	L34
E	NSB	S3	S7	L3	L7	L11	L15	L19	L23	L27	L31	L35
F	NSB	S3	S7	L3	L7	L11	L15	L19	L23	L27	L31	L35
G	TA	S4	S8	L4	L8	L12	L16	L20	L24	L28	L32	L36
H	TA	S4	S8	L4	L8	L12	L16	L20	L24	L28	L32	L36

Abbildung 29

Schema zum Beschicken einer Mikrotiterplatte für ein PGE₂ Assay und zum Beschriften des Protokollvordruckes: B, Nullwert; B0, maximale Bindung; NSB, nicht spezifische Bindung; TA, totale Aktivität; L1-L36, Proben; S1-S8, Standardverdünnungsreihe

4.2. Methoden

4.2.1. Versuchsablauf/Auswertung

	Arbeitsschritt	Reagenz	Well	Temp.	Zeit
1	Substanzen in die Wells auftragen	150 µl Assaypuffer	NSB	RT	ca. 20 min.
		100 µl Assaypuffer	B0		
		100 µl Standardverdünnungen	S1-S8		
		100 µl Probenverdünnungen	L1-L36		
2	1. Inkubation	50 µl PGE ₂ Konjugat	B0, NSB, S1-S8, L1-L36	RT	2 h auf einem Horizontal-schwenker bei niedriger Stufe
		50 µl PGE ₂ Antikörper	B0, S1-S8, L1-L36		
3	Waschen	200 µl Waschpuffer	alle	RT	3 x 2min.
4	2. Inkubation	5 µl PGE ₂ Konjugat	TA	RT	1 h
		200 µl pNPP Substrat	alle		
5	Messung	ELISA-reader		RT	sofort
6	Auswertung	Microsoft-Excel			

Tabelle 7

Versuchsprotokoll zum PGE₂ Immunoassay

Die Beschickung der Platte erfolgte nach dem in Tabelle 7 dargestellten Schema. Dabei waren beim Pipettieren die Standardverdünnungen und die Proben am Grund, alle anderen Lösungen an der Wand der Vertiefungen abzusetzen. Durch die Nutzung von Mehrfachpipetten konnte das Verfahren vereinfacht werden. Zur ersten Inkubation wurde die Mikrotiterplatte mit einer mitgelieferten selbstklebenden Folie sorgfältig abgedeckt und in Alufolie eingepackt, um eine Vermischung verschiedener Proben zu verhindern. Beim Waschschrift war darauf zu achten, die Platten gründlich abzugeben. Dazu wurden die Platten auf Zellstofftücher geklopft, bis keine Flüssigkeit mehr in den Wells zu sehen war.

Das Prinzip des kompetitiven ELISAs wurde bereits in Kapitel III 4 beschrieben. Zur Kontrolle der Qualität, Vergleichbarkeit und Aussagekraft wurden in der ersten Spalte mehrere Kontrollen durchgeführt.

- Der Null- oder Leerwert (B) enthielt nur das Substrat pNPP und war für die Negativkontrolle bei der photometrischen Messung notwendig.
- Die totale Aktivität (TA) entstand durch Vorlegen von PGE₂-Konjugat, welches nicht dem Waschschrift unterzogen wurde und dem keine PGE₂-Antikörper zugesetzt waren. Damit wurde die Reaktion der ganzen Menge an alkalischer Phosphatase mit dem Substrat pNPP simuliert, ohne auf die Bindung des Konjugates an der Platte Rücksicht zu nehmen. Es wurde also die Funktionstüchtigkeit dieser Reaktion kontrolliert.
- Die maximale Bindung (B₀) stellte die Positivkontrolle des Assays dar. Dabei bindet die maximale Menge an PGE₂-Konjugat mit Hilfe des PGE₂ Antikörpers (anti-Maus) an den monoklonalen Antikörpern (aus der Maus) der Mikrotiterplatte. Das gekoppelte Enzym setzt das Substrat um, was sich in der stärksten Farbreaktion zeigt. Gleichzeitig bedeutet dies, dass hier kein Proben-Prostaglandin enthalten ist. Der Wert entspricht also damit dem Probennullwert. Der umgekehrten Proportionalität entsprechend gibt eine starke Färbung an, dass in einer Probe keine Prostaglandine enthalten waren.
- Zur Überprüfung von nicht spezifischen Bindungen (NSB) wurde in diesem Ansatz bei normalem Vorgehen nur der PGE₂ Antikörper weggelassen. Durch den Waschschrift sollten alle PGE₂-Konjugate entfernt werden. Dennoch ist der NSB-Wert immer etwas höher als der Leerwert (B). Dies weist auf ein Vorkommen von nicht spezifischen Bindungen des Konjugates mit der Platte oder den dort gebundenen Antikörpern hin. Zur Korrektur dieses Fehlers in der Auswertung musste der NSB-Wert von allen Probenergebnissen und Standards abgezogen werden, um die eigentlichen Werte nicht zu überschätzen.

5. Immunhistochemie (Free Floating)

5.1. Material

5.1.1. Gewebe

Für diese immunhistochemischen Untersuchungen wurden Perfusions-fixierte und Gefrierschutz-behandelte Gehirne (siehe Kapitel III 1.2.5.3.1) verwendet.

5.1.2. Antikörper

5.1.2.1. Primäre Antikörper

Zur Detektion von spezifischen STAT3-Molekülen wurde bei den Versuchsreihen ein polyklonaler anti-STAT3 Antikörper eingesetzt (Wirt: Kaninchen, Kan.). Zum Nachweis

zytoplasmatischer und / oder nukleärer STAT3-Immunreaktivität in den Gehirnschnitten wurde ein etablierter STAT3-Antikörper (sc-482, Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg) in einer Verdünnung von 1:12000 verwendet. Dieser STAT3-Antikörper erkennt am Carboxy-terminalen Ende des STAT3-Proteins eine distinkte Peptidsequenz (AS 750-769). Dieses Epitop liegt außerhalb der TYR705 Phosphorylierungsstelle, so dass sowohl phosphorylierte als auch unphosphorylierte Formen von STAT3 gebunden werden können. Es handelt sich hierbei um STAT3-Monomere und -Dimere im Zytoplasma (zytoplasmatische STAT3-Immunreaktivität) und STAT3-Dimere im Karyoplasma (nukleäre STAT3-Translokation), die detektiert werden können (Kapitel II 4.1.1).

Zuvor war in der eigenen Arbeitsgruppe (Hübschle *et al.*, 2001a; Hübschle *et al.*, 2001b) und durch andere (Stromberg *et al.*, 2000) die Spezifität des STAT3 Antikörpers in der Ratte bereits überprüft worden. Die Spezifität dieses Antikörpers im Meerschweinchen musste zunächst im Rahmen dieser Arbeit abgesichert werden (Rummel *et al.*, 2004).

Die systemische Gabe von LPS (30 µg/kg, i.p.) induziert eine nukleäre Translokation von STAT3-Immunreaktivität in den Zellkern der sensorischen CVOs (Abbildung 30: AP, A; OVLT, C; SFO, E) und dem hypothalamischen *Nucleus supraopticus* (SON, G). Zur Abklärung der Spezifität wurde von zwei Tieren jeweils eine Schnittserie dem normalen STAT3-Protokoll, und eine weitere Schnittserie einer Spezifitäts-Überprüfung durch Präabsorption mit dem antigenen Peptid unterzogen. Dazu wurde der STAT3-Antikörper für jeweils eine Schnittserie über Nacht mit einem Blockungspeptid im 75-fachen Überschuss seines Molekulargewichtes koinkubiert (Blockungspeptid sc-482, Santa Cruz Biotechnology, D-Heidelberg). Diese Inkubation mit dem Antigen (Blockungspeptid) erzeugte eine Präabsorption des STAT3 Antikörpers mit dem Ergebnis, dass fast keine STAT3-positiven Zellkerne mehr in den untersuchten Hirnregionen zu beobachten waren (Abbildung 30: AP, B; OVLT, D; SFO, F; SON, G). Im Gegensatz dazu konnten in den normal prozessierten Schnitten derselben Tiere nukleäre Signale beobachtet werden.

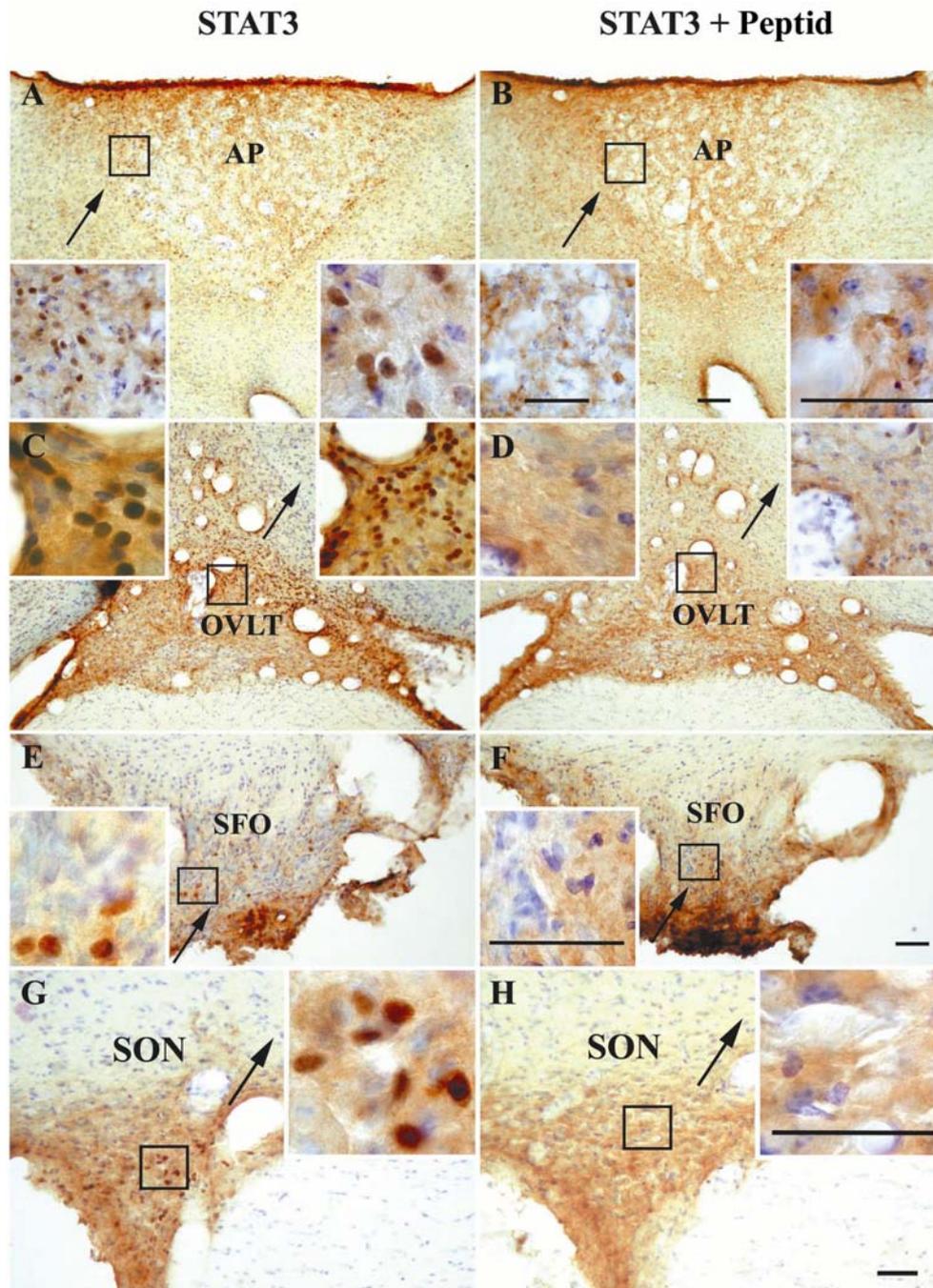


Abbildung 30

Spezifität des STAT3-Antikörpers nachgewiesen durch Präabsorption mit seinem Blockungspeptid: Es sind die sensorischen CVOs (AP, A-B; OVLt, C-D; SFO, E-F) und der *Nucleus supraopticus* (SON, G-H) dargestellt. In der linken Spalte sind die genannten Hirnregionen 90 min. nach LPS-induzierter nukleärer STAT3-Translokation gezeigt. Fast keine nukleären Signale sind nach der Präinkubation des primären Antikörpers mit dem Peptid zu sehen (rechte Spalte). Die STAT3-Immunreaktivität ist in braun durch Diaminobenzidinhydrochlorid sichtbar gemacht. Die spezifischen STAT3-Signale sind in zwei weiteren vergrößerten Ausschnitten in jedem Bild gezeigt. Der Balken im Bild B repräsentiert 100 µm und gilt für Bild A-D. Die Balken in F und H und allen Vergrößerungen entsprechen 50 µm. Eine Kresylviolett-Gegenfärbung wurde zur besseren neuroanatomischen Übersicht und zum Anfärben der Zellkerne eingesetzt.

5.1.2.2. Sekundärer Antikörper

Der Biotin-konjugierte Sekundärantikörper dieser Studie richtete sich nach dem Wirt (Kaninchen) des zuvor benutzten Primärantikörpers. Es handelte sich um einen in der Ziege hergestellten anti-Kaninchen Antikörper (Vector BA-1000, Linaris Biologische Produkte, D-Wertheim-Bettingen) der in einer Verdünnung von 1 : 200 eingesetzt wurde. Zur Detektion von unspezifischen Bindungsreaktionen des Sekundärantikörpers wurden in einer nicht gezeigten Studie Schnittserien ohne ersten Antikörper bzw. stattdessen mit Kaninchen-Prä-Immunserum als primären Antikörper eingesetzt (Negativkontrolle). Unspezifische Bindungen am Gehirnschnitt konnten so ausgeschlossen werden.

5.1.2.3. Amplifizierungsmethoden

Zunächst erfolgte der **Tyramin-Amplifizierungsschritt** mit einem kommerziell erhältlichen Tyramin-Amplifizierungskit (NEL700, NEN Life Science Products, D-Köln). Der Amplifizierungsschritt setzte sich aus mehreren Einzelschritten zusammen. Zuerst wurden die Schnitte mit Streptavidin-Horseradish-Peroxidase (Streptavidin-HRP, Merrettich-Peroxidase; 1 : 100, 0.1M PB, 0.1 % Triton X-100) unter Lichtausschluss bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Während dieser ersten Inkubation reagierten freie Streptavidin-Moleküle mit den biotinylierten Stellen des zweiten Antikörpers, und an Streptavidin konjugierte HRP wurde so als Enzymwolke an den Antigen-Antikörper-Komplex gebunden. Danach erfolgte die Inkubation mit biotinyliertem Tyramin in einer Verdünnung von 1 : 100 im Dunkeln bei RT. Die Enzymaktivität der HRP setzte nun die biotinylierten Tyraminderivate zu hochreaktiven und kurzlebigen Tyraminradikalen um, die mit nukleophilen Molekülen eine kovalente Bindung eingingen. Somit kam es im Bereich der Enzymwolke zur Dimerisierung des biotinylierten Tyramins mit tyrosinhaltigen Protein- bzw. Peptidstrukturen des Antigen-Antikörper-Komplexes. Die Bindungs- oder Interaktionsmöglichkeiten des Tyramins waren durch die vorangegangene Absättigung der unspezifischen Tyraminbindungsstellen an den Schnitten eingeschränkt. Dadurch konnte das Tyramin nur am oder in unmittelbarer Umgebung der HRP-Enzymwolke und damit des Antigen-Antikörper-Komplexes binden. Nach Abschluss des Tyramin-Amplifizierungsschrittes war nun eine Vielzahl von Biotinmolekülen am Antigen-Antikörper-Komplex vorhanden.

Im **zweiten Amplifizierungsschritt** wurden die Schnitte mit einem Komplex aus Avidin und biotinylierter HRP {(ABC-Komplex) Vector Elite Kit, A-2100, Linaris Biologische Produkte, D-Wertheim-Bettingen} bei einer Verdünnung von 1 : 100 inkubiert. Dieser Komplex lagerte sich während der Inkubationszeit bei RT an die vielen freien Biotinstellen an. Mit diesem Schritt war die Amplifizierung des Antigen-Antikörper-Komplexes abgeschlossen und eine große Anzahl an HRP Enzymen spezifisch an der Antigen-Lokalisation gebunden.

5.1.2.4. DAB-Detektionssystem nach Amplifizierung

Diaminobenzidin-Tetrahydrochloride (DAB, D-5637, Sigma Aldrich, D-Steinheim) wurde als Detektionssystem zur Darstellung des gebundenen Antigen-Antikörper-Komplexes nach

der Signalamplifizierung verwendet. Dabei wurde DAB als flüssiges Substrat enzymatisch durch die Merrettich-Peroxidase (HRP) katalysiert in eine feste Substanz überführt, die an Orten hoher Enzymaktivität als brauner Niederschlag ausfiel. Durch Zugabe von Wasserstoffperoxid (10 µl H₂O₂ 10 %/100 ml) startete man die Reaktion.

5.1.3. Kernfarbstoff

Die Zellkerne wurden zur besseren neuroanatomischen Übersicht und zur Kolokalisation der nukleären Signale mit Kresylviolett (Tabelle 8, C-6402, Sigma D-Steinheim) dargestellt.

5.1.4. Verbrauchsmaterialien

Lösungen	Beschreibung	Hersteller
Blockungslösung der unspezifischen Antikörper-Bindungsstellen (Block I)	0.3 % Triton X-100	T 9284, SigmaAldrich, D-Steinheim
	10 % Normal Horse Serum (NHS)	B15-122, PAA Laboratories, A
	In PB	Siehe Perfusion
Blockungslösung der unspezifischen Tyramin-Bindungsstellen (Block II)	0.5 % Blockungspulver in 0.1 M PB	NEL700, NEN Life Science Products, D-Köln
Verdünnungs-Lösung I (V-Lösung I)	0.1 % Triton X-100	Siehe oben
	2 % Normal Horse Serum (NHS)	
	In PB	
Verdünnungs-Lösung II (V-Lösung II)	0.1 % Triton X-100	Siehe oben
	In PB	
DAB-Lösung	50 mg Diaminobenzidin-Tetrahydrochloride (DAB)/100 ml PB (lichtempfindlich, giftig)	D-5637, Sigma Aldrich, D-Steinheim
Kresylviolett-Färbelösung	0.1 % Kresylviolettacetat	C-6402, Sigma Aldrich, D-Steinheim
	0,25 % Eisessig, wasserfreie Essigsäure, (CH ₃ COOH)	(Merck, D-Darmstadt)
	In <i>Aqua bidest.</i>	

Tabelle 8

Benötigte Verbrauchsmaterialien: Zur Herstellung der Kresylviolett-Färbelösung musste das Kresylviolettacetat unter Rühren in *Aqua bidest.* auf 100°C erhitzt und danach filtriert werden. Der leichtflüchtige Eisessig wurde erst danach hinzugefügt. Die Verdünnungslösung I diente zur Herstellung der Antikörper-Endkonzentrationen für die Inkubation. Die Verdünnungslösung II wurde für die Gebrauchskonzentrationen der Amplifizierungslösungen verwendet (Streptavidin-HRP, biotinyliertes Tyramin, ABC-Komplex).

5.1.5. Mikroskop

Es wurde ein Olympus BX50 Mikroskop (Olympus Optical, Hamburg) im Durchlichtverfahren zur Auswertung der DAB-gefärbten Schnitte verwendet. Digitale Bilder

wurden mit einer Olympus Camedia C-3030 Kamera aufgenommen, wofür die Olympus Camedia Master 2.0 Software benutzt wurde.

5.2. Methoden

5.2.1. Herstellung der Gefrierschnitte

Die Gefrierschutz-behandelten Gehirne (Kapitel 1.2.5.3.1) wurden auf einem Filterpapier zum Abtropfen der überschüssigen Saccharoselösung gelegt. Zum Schneiden verwendete man ein Gefriermikrotom (Modell 1205, Jung, D-Heidelberg), das mit CO₂-Gas betrieben wurde. Das Gas steht in einer Stahlflasche unter Druck und strömt durch eine Düse am metallenen Objekthalter nach außen. Dabei dehnt sich das Gas plötzlich aus und entzieht hierdurch der Umgebung Wärme. Das wurde ausgenutzt, um über den metallenen Objekthalter als Wärmeleiter die Gehirne mit Gefrier-Einbettmedium (Tissue Tec®, Leica Instruments GmbH, D-Nussloch) in ventrodorsaler Ausrichtung aufzublocken und durchzufrieren. Das Vorderhirn legte man mit seiner caudalen Schnittfläche auf den Objekthalter, den hinteren Teil mit seiner cranialen Schnittfläche. In den Versuchsreihen wurden von den tiefgefrorenen Gehirnen 40 µm dicke Schnittpräparate angefertigt, die in 0.1M PB sektoriell in geeigneten Gefäßen gesammelt wurden. Dabei handelte es sich um so genannte "Karussells" (eigene Herstellung) mit einem Durchmesser von ca. 15 cm. 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. 16 cm), die mit 200 ml des 0.1M PB gefüllt waren, so dass die Schnitte in den Karussells ausreichend von Flüssigkeit bedeckt waren. Eine optimale Arbeitstemperatur zur Anfertigung von Gefrierschnitten war dann vorhanden, wenn sich die Schnitte auf dem Messer rollten und mit einem Pinsel einfach aufzunehmen waren. Dazu musste während des Schneidens mehrfach durch Öffnung des Gasventils nachgekühlt werden. Die Schnitte befanden sich dann frei schwimmend (Free Floating) im Puffer der Gefäße.

5.2.2. Versuchsprotokoll

	Arbeitsschritt	Reagenz	Temp.	Zeit
1	Waschen	PB	RT	3 x 5 min.
2a	1. Blockung	Block I	RT	1 h
2b	2. Blockung	Block II	RT	30 min.
3	1. Inkubation	1. Antikörper in V-Lösung I	4°C	36-48 h
4	Waschen	PB	RT	3 x 5 min.
5	2. Inkubation	2. Antikörper in V-Lösung I	RT	1 h
6	Waschen	PB	RT	3 x 5 min.
7	1. Tyramin-Amplifikation	Streptavidin-HRP in V-Lösung II	RT	30 min.
		Waschen in PB	RT	3 x 5 min.
		Biotinyl.-Tyramin in V-Lösung II	RT	10 min.
8	Waschen	PB	RT	3 x 5 min.
9	2. ABC-Amplifikation	ABC-Komplex in V-Lösung II	RT	1 h.
10	Waschen	PB	RT	3 x 5 min.
11	Färbereaktion	DAB-Lösung vorinkubiert (dunkel)	RT	15 min.
		Zugabe von 10 µl 10 %er H ₂ O ₂ -Lsg.	RT	ca. 6 min.
12	Waschen	PB	RT	3 x 5 min.
13	Aufziehen	Aufziehen der Schnitte auf Gelatine beschichtete Objektträger.	RT	nach Bedarf
14	Trocknung	Staub-geschützt an der Luft	RT	über Nacht
15	Gegenfärbung	Zur Reinigung in HistoClear (HS 200, Plannet GmbH, Wetzlar)	RT	2 h
		Absteigende Alkoholreihe (100 %, 100 %, 90 %, 70 %, 50 %) zum Rehydrieren	RT	jeweils 2 min.
		<i>Aqua dest.</i>	RT	20 sek.
		Kresylviolett-Färbelösung	RT	5 sek.
		Aufsteigende Alkoholreihe (50 %, 90 %, 95 %, 100 %) zum Dehydrieren	RT	jeweils 2 min.
16	Deckeln	HistoClear	RT	2 min.
		Xylol (Braun, D-Melsungen)	RT	2 min.
		2-3 Tropfen Entellan® (Merck, D-Darmstadt), abdecken mit Deckgläschen	RT	

Tabelle 9

Arbeitsprotokoll zur Immunhistochemie: Der ABC-Komplex musste 30 min. vor der Inkubation angesetzt werden, damit die Einzelsubstanzen A (Avidin) und B (biotinylierte Merrettich-Peroxidase) genügend Zeit hatten, den Komplex zu bilden. Die Färbung wurde unter Abdeckung durchgeführt, da die Reaktion lichtempfindlich war. Zusätzlich war dabei und auch bei der Gegenfärbung auf die Stärke der Farbreaktion zu achten, und dementsprechend die Reaktion zu stoppen.

Die Immunhistochemie mit Gegenfärbung wurde dem Protokoll entsprechend ausgeführt. Die Zusammensetzung der einzelnen Lösungen ist der Tabelle 9, die Verdünnungen und Hersteller der Antikörper dem Kapitel III 5.1.2 zu entnehmen. Zur Reduktion der Substanzmengen dienten für die Inkubationen anstelle der Karussells 5 ml-Gefäße (58/485, Sarstedt GmbH, D-Nümbrecht). Sämtliche Inkubationslösungen wurden je nach Volumen in 15 ml- oder 50 ml-Röhrchen (62.554.502 oder 62.547.254, Sarstedt GmbH, D-Nümbrecht) angefertigt. Sowohl Waschschritte als auch Inkubationen wurden bei Raumtemperatur (RT) unter kontinuierlichem Schwenken (GFL 3011, Gesellschaft für Labordiagnostik mbH, D-Burgwedel) durchgeführt. Zum Färben und Deckeln arbeitete man unter dem Abzug. Beim Eindecken wurden 2-3 Tropfen Entellan® (Merck, D-Darmstadt) auf die Gewebeschnitte getropft und die Deckgläschen (Menzel GmbH, D-Braunschweig) vorsichtig auf den Rand der Objektträger gesetzt. Mit einer Pinzette drückte man das Deckgläschen auf den Objektträger und entfernte gleichzeitig alle eventuell vorhandenen Luftbläschen unter dem Deckglas. Das Entellan® polymerisierte über Nacht unter dem Abzug aus und bildete einen sicheren Schutz. Zur weiteren Analyse wurden diese so genannten Dauerpräparate verwendet.

5.2.3. Mikroskopie

Die Analyse der Schnittpräparate erfolgte im Durchlichtverfahren. 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. Durch Beurteilung der nukleären Signalverteilung aller Schnitte und Bewertung dieser nach Stärke konnte qualitativ zur Einordnung der im Mittel gefundenen Signalverteilung eine Tabelle für jede Tiergruppe und Hirnregion erstellt werden. Zur Einstufung wurde ein fünf Stufen Bewertungssystem genutzt: +++ = hohe Dichte nukleärer STAT3-Signale, ++ = mittlere bis moderate Dichte, + = niedrige Dichte, -+ = einzelne nukleäre Signale in manchen Fällen, - = keine nukleären Signale. Die Nomenklatur der Hirnregionen des Meerschweinchens war angepasst und geringfügig nach jener modifiziert, die von Paxinos & Watson (1998) für das Rattenhirn beschrieben war.

5.2.4. Quantifizierung der STAT3-positiven Zellen

Die Anzahl STAT3-immunreaktiver Zellkerne wurde quantitativ für die AP, das OVLT, das SFO und den SON ermittelt. Dafür wurden zum Zeitpunkte 90 min. nach Stimulation mit LPS (10 µg/kg i.a. = L10 i.a., N = 4; 30 µg/kg i.p. = L30 i.p. N = 3; 100 µg/kg s.c. = L100 s.c., N = 4; oder 10 µg/kg s.c. = L10 s.c., N = 4) und entsprechender Kontrolle (NaCl i.a., N = 3; NaCl i.p., N = 3; oder NaCl s.c., N = 3) jeweils drei Schnitte pro Tier und Hirnregion ausgewählt. Dafür nahm man die AP in caudalen bis medialen Anteilen, für das OVLT rostrale Schnitte, mediale für das SFO und Schnitte aus dem rostralen Abschnitt des SON. Sie besaßen innerhalb der jeweiligen Region stereotaktisch ähnliche Koordinaten. Ein mikroskopisches Zählfeld (200 x 200 µm) wurde benutzt, um bei 400-facher oder 200-facher Vergrößerung die STAT3-positiven Zellen bzw. ihre Kerne zu zählen.

6. Immunfluoreszenz für Doppelmarkierungen

6.1. Material

6.1.1. Gewebe

Für diese immunhistochemischen Untersuchungen wurden die schockgefrorenen Gehirne (siehe Kapitel III 1.2.5.3.2) verwendet.

6.1.2. Antikörper

6.1.2.1. Primäre Antikörper

Zur Detektion von einerseits Zelltyp-spezifischen Proteinen und andererseits den STAT3 Molekülen wurden bei den Versuchsreihen verschiedene monoklonale (Wirt: Maus) und polyklonale (Wirt: Kaninchen oder Schaf) Primärantikörper eingesetzt.

Primärantikörper	Klon	Wirt	Verd.	Hersteller
STAT3-Antikörper	sc-482	Kan.	1 : 4.000	Santa Cruz Biotechnology, D-Heidelberg
anti-GFAP	MAB 3408	Maus	1 : 2.000	MoBiTec GmbH, D-Göttingen
anti-vWF	SARTW-IG	Schaf	1 : 3.000	Haemochrom Diagnostica GmbH, D-Essen
anti-rat-CD11b	MCA 275R	Maus	1 : 500	Serotec GmbH, D-Düsseldorf
anti-NeuN	MAB377	Maus	1 : 200	MoBiTec GmbH, D-Göttingen
anti-APC	OP 80	Maus	1 : 200	Calbiochem, D-Bad-Soden
Anti-Oxytocin	MAB5296	Maus	1 : 5.000	Chemicon International, Ltd. D-Hofheim
Anti-rat CD68	MCA341R	Maus	1 : 15	Serotec Ltd, Oxford, England

Tabelle 10

Genutzte primäre Antikörper: GFAP, Glial Fibrillary Acidic Protein (Saures Gliales Faserprotein) für Astrozyten; vWF, von-Willebrand-Faktor für Endothelzellen; CD11b, Cluster of Differentiation 11b für Mikroglia; NeuN, Neuron-Specific Nuclear-Protein oder Neuronal Nuclei (Neuronen-spezifischer Zellkernmarker) für Zellkerne neuronalen Ursprungs; APC, Adenomatous Polyposis Coli für Oligodendrozyten; Oxytocin für oxytocinerge Neurone; CD68, Cluster of Differentiation 68 für Mikroglia.

6.1.2.2. Sekundäre Antikörper

In dieser Studie wurden Biotin-konjugierte Sekundärantikörper zur Detektion des STAT3-Proteins verwendet. Die Auswahl dieses Antikörpers richtete sich wie auch bei den anderen sekundären Antikörpern nach dem Wirt des zuvor benutzten Primärantikörpers. Die anderen Zweitantikörper waren direkt Fluorochrom-gekoppelt (Alexa 488 Sigma-Aldrich, D-München)

Sekundärantikörper	Wirt	Verd.	Hersteller
Biotin-conjugated AffiniPure Goat Anti-Rabbit IgG (<i>STAT3</i>)	Ziege	1 : 200	Vector BA-1000, Linaris Biologische Produkte, D-Wertheim-Bettingen
Alexa Flour [®] 488-Donkey Anti-sheep IgG (<i>vWF</i>)	Esel	1 : 400	Molecular Probes
Alexa Flour [®] 488-Goat Anti-Mouse IgG (<i>GFAP, APC, CD11b, NeuN, CD68, Oxytocin</i>)	Ziege	1 : 500	Molecular Probes, MoBiTec GmbH, D-Göttingen

Tabelle 11

Benutzte sekundäre Antikörper. In kursiver Schrift ist beim Antikörper die zu detektierende Zielstruktur zur besseren Übersicht hinzugefügt.

6.1.2.3. Detektionssystem

Bezeichnung	Verd.	Hersteller
Cy3-conjugated Streptavidin	1 : 800	016-160-084, Jackson Immuno-Research West-Grove, USA

Tabelle 12

Cy3 ist ein sehr stabiles rotfluoreszierendes Carbocyanin, das sich mit Hilfe des konjugierten Streptavidins an das Vitamin Biotin bindet. Durch den Einsatz der Streptavidin-Biotin-Methode kommt es zur Amplifizierung der Fluoreszenz.

6.1.3. Fluoreszenz-Kernfarbstoff

Die Zellkerne wurden mit einem Fluoreszenz-Kernfarbstoff dargestellt. DAPI (4',6-diamidino-2-di-phenylindol-dilaktat, D3751, Molecular Probes, MoBiTec GmbH, D-Göttingen), der in einer Verdünnung 1 : 800 eingesetzt wurde. DAPI ist ein unspezifischer Zellkernmarker und markiert unabhängig vom Zelltyp alle Zellkerne im Gehirnschnitt.

DAPI war in Aliquots bei -20°C tiefgefroren und wurde vor Inkubationsbeginn in 0.1M PB mit 0.1 % Triton X-100 (Verdünnungslösung II) gelöst und in einer Konzentration von 1 : 800 eingesetzt (DAPI-Lösung). Die Inkubation erfolgte lichtgeschützt bei RT für 5 min.

6.1.4. Verbrauchsmaterialien

Lösungen	Beschreibung	Hersteller
Blockungslösung der unspezifischen Antikörper-Bindungsstellen (Block I)	0.3 % Triton X-100	T 9284, SigmaAldrich, D-Steinheim
	10 % Normal Horse Serum (NHS)	B15-122, PAA Laboratories, A
	In PB	Siehe Perfusion
Blockungslösung der unspezifischen Avidin-Biotin-Bindungsstellen (Block III-A/B)	Avidin-Solution (Block III A) in PB Biotin-Solution (Block III B) in PB	Blocking kit SP-2001, Vector Laboratories, Inc., Burlingame, USA
Verdünnungs-Lösung I (V-Lösung I)	0.1 % Triton X-100	Siehe oben
	2 % Normal Horse Serum (NHS)	
	In PB	
Fixierungslösung	2 % Paraformaldehyd (PFA) in PB	Merck, D-Darmstadt

Tabelle 13

Verwendete Lösungen zur Vorbereitung von Schnitten für die Immunfluoreszenz.

Manche Gewebe können Avidin oder biotinylierte Antikörper binden. Diese Bindung kann sich aufgrund von endogenem Biotin oder Biotin-bindenden-Proteinen, Lectinen oder unspezifisch bindenden Substanzen im Gewebe ereignen. Dies kann durch den Einsatz des Blockungs-Kits verhindert werden. Zur Gebrauchslösung wurden 50 µl der jeweiligen Blockungslösung in 1 ml PB verdünnt.

Die Fixation der Schnitte erfolgte hier nur mit 2 % Formalin. Ansonsten gleichen die Verbrauchsmaterialien denen, welche im vorherigen Kapitel für die Free Floating Methode beschrieben wurden.

6.1.5. Mikroskop

Die Gehirnschnittpräparate wurden mit einem Olympus BX50 Mikroskop analysiert. Eine Anregung von Fluorophoren mit Licht geeigneter Wellenlänge führte zu einer längerwelligen Emissionsstrahlung. Spezielle Filter dienten dabei zur Erzeugung der notwendigen Wellenlänge für die Anregung des entsprechenden Fluorophors. Die Alexa Fluor[®]488 (Fluoreszeinisothiocyanat Konjugat) konjugierten Antikörper wurden durch gefiltertes Licht mit einer Wellenlänge von 450-490 nm angeregt und emittierten grünes Licht einer Wellenlänge von 510-530 nm. Das an Streptavidin gekoppelte Cy3 (Carboxymethylindocyanin) konnte durch gefiltertes Licht mit einer Wellenlänge von 510-530 nm angeregt werden. Es emittierte rotes Licht einer Wellenlänge von 630-660 nm. Die Anregung von DAPI, dem Marker für Zellkerne, erfolgte durch gefiltertes Licht einer Wellenlänge von 358 nm. Es strahlte daraufhin blaues Licht einer Wellenlänge von 461 nm ab. Durch die Möglichkeit der unterschiedlichen Anregung der verschiedenen Antikörper war eine Mehrfachmarkierung möglich.

6.2. Methode

6.2.1. Herstellung der Gefrierschnitte

Die Herstellung der Gefrierschnitte für diese Versuchsreihe erfolgte am Kryostaten (HM 500 O, Fa. MICROM, D-Walldorf). Es handelte sich dabei um ein Gefriermikrotom, welches für diese Untersuchungen auf eine Betriebstemperatur von -21°C in der Kühlkammer und -12°C für den Objekthalter eingestellt wurde. Das Aufblocken geschah nach dem in Kapitel III 5.2.1 beschriebenen Prinzip. Allerdings wurden die Gehirne im Kryostaten auf einem beweglichen Objektblock durchgefroren, der in einer speziellen Vorrichtung schnell auf -40°C heruntergekühlt werden konnte. Es wurden $20\ \mu\text{m}$ Gehirnschnitte mit vorgekühlten (-20°C) Poly-L-Lysin (Poly-L-Lysin Solution, P 8920, Sigma, St. Louis, USA) beschichteten Objektträgern angefertigt und auf Eis gesammelt. Durch diese Poly-L-Lysin Vorbehandlung werden Ladungsverhältnisse geschaffen, die das Haften (Adhäsion) der Schnitte auf dem Objektträger verbessern. In Folge einer Vermehrung der positiven Ladungsträger aufgrund der Beschichtung können anionisch geladene Gruppen der Gewebeschnitte besser mit ihrem Träger in Wechselwirkung treten. Ansonsten könnte es bei diversen Inkubationsschritten vermehrt zum Abschwimmen der Schnitte von den Objektträgern kommen. Die Schnitte sollten vor Beginn der Immunhistologie an den Objektträgern antrocknen, was die Haftung zusätzlich verbesserte.

6.2.2. Arbeitsprotokoll

	Arbeitsschritt	Reagenz	Temp.	Zeit
1	Fixation	Fixierungslösung (PFA 2 %)	RT	10 min.
2	Waschen	PB	RT	3 x 5 min.
3	1. Blockung	Block I	RT	1 h
4	1. Ko/Inkubation	1. Antikörper in V-Lösung I a. STAT3 + ein Zellmarker b. nur STAT3 (für vWF)	4°C	über 2 Nächte
5	Waschen	PB	RT	3 x 5 min.
6	2. Blockung	Block III A	RT	15 min.
		Waschen		3 x 5 min.
		Block III B		15 min.
7	Waschen	PB	RT	3 x 5 min.
8	2. Ko/Inkubation	2. Antikörper in V-Lösung I a. STAT3 b. STAT3 + erste Antikörper vWF	RT	90 min.
9	Waschen	PB	RT	3 x 5 min.
10	3. Inkubation / Detektion	3. in V-Lösung I a.,b. Alexa 488-IgG-Zellmarker / + Cy3-gekoppeltes Streptavidin	RT (ab jetzt im Dunkeln)	90 min.
11	Waschen	PB	RT	3 x 5 min.
12	Kernfärbung	DAPI-Lösung	RT	10 min.
13	Waschen	PB	RT	3 x 5 min.
14	Deckeln	3-4 Tropfen Cityflour (Citifluor AF1, Cityfluor Products, GB-Kent), Deckgläschen blasenfrei auftragen	RT	
15	Lagerung	Dunkel	4°C	Monate

Tabelle 14

Arbeitsprotokoll zur Fluoreszenzimmunhistochemie: Ab der Anwendung der gekoppelten Fluorochrome erfolgten die weiteren Arbeitsschritte soweit möglich unter Abdeckung, da die Reaktion lichtempfindlich war. Es gab zudem zwei verschiedene Protokolle, die hier mit „a“ und „b“ bezeichnet sind, da für den Nachweis von vWF ein geringfügig verändertes Protokoll notwendig war.

Die Durchführung der Versuchsreihen erfolgte mittels oben gezeigtem Versuchsprotokoll, welches in Anlehnung an Versuche zur Determinierung des Zelltypus bei der Ratte (Harre *et al.*, 2003) leicht abgeändert wurde. Die Schnitte wurden auf Eis in Objektträgerhalter für 24 Objektträger gesammelt und darin auch zum Waschen und Fixieren belassen. Als Reaktionsgefäße dienten hierbei 200 ml fassende schwarze Färbeküvetten, die man zum Schutz vor Lichteinwirkung auch verschließen konnte. Alle Inkubationen und Blockungsschritte wurden zur Einsparung von Substanzen auf Plastikplatten mit aufgeklebten Abstandhaltern durchgeführt. Deren Herstellung erfolgte in der institutseigenen Werkstatt. Zur Inkubation legte man nun die Objektträger mit den Schnitten nach unten auf die Platten, so dass ein kapillärer Spalt zwischen den Objektträgern und den Platten entstand. Dieser Spalt

umfasste ein Volumen von ca. 200 µl pro Objektträger, worin die Schnitte dann in Kontakt mit den Reaktionssubstanzen kamen. Nach der Anzahl an Objektträgern erfolgte dementsprechend auch die Kalkulation der Mengen an Gebrauchslösungen. Besondere Vorsicht bei der Handhabung der Gewebeschnitte war geboten, damit sie nicht zerstört wurden oder von der behandelten Glasoberfläche abschwimmen konnten.

6.2.3. Mikroskopie

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.

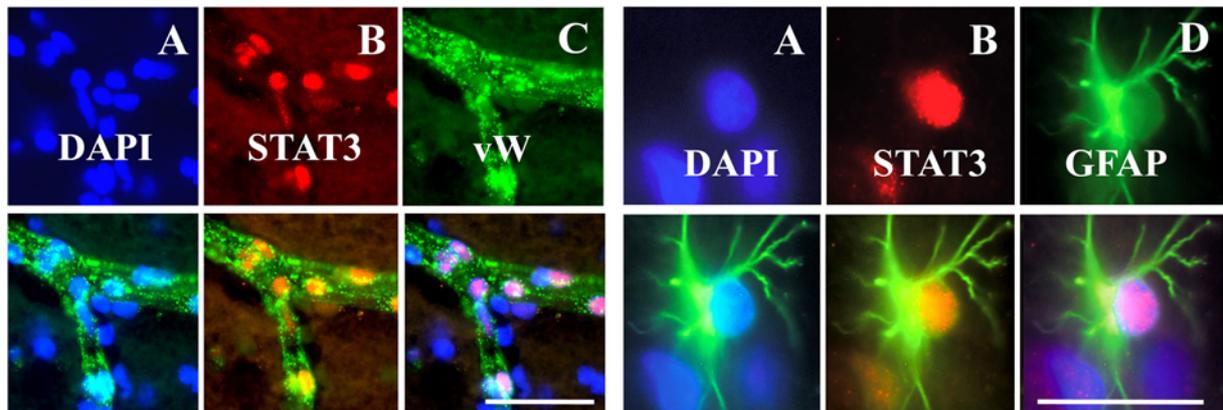


Abbildung 31

Darstellung der einzelnen Bild- und Farbkomponenten und deren Überlagerung in zwei Bildtafeln (links vW, rechts GFAP): Bild A entspricht der DAPI-Kernfärbung (blau), Teilbild B jeweils den nukleären STAT3-Signalen (rot), die spezifischen Zellmarker sind in C der vW-Faktor und in D das GFAP (grün). Beide zusammengesetzten Bildtafeln auf der rechten und linken Seite zeigen entsprechend von links nach rechts in der unteren Reihe eine Überlagerung vom Zellmarker (vW, GFAP) und dem DAPI-Signal (Kern), es folgt die Kombination von STAT3-Signalen (rot) mit den Zellmarkern (grün). Schließlich sind Bilder rechten unten der jeweiligen Bildtafel alle drei Einzelbilder übereinander gelagert zu sehen. Der Eichbalken für die linke Bildtafel (vW, Endothel) entspricht 50 µm, der für die rechte Bildtafel (GFAP, Astrozyten) 25 µm.

Entsprechend der emittierten Lichtfarbe wurden mit Hilfe eines Softwareprogramms (Metamorph, Visitron Systems GmbH, D-Puchheim) die schwarz-weiß Bilder eingefärbt. Zur Dokumentation erhielten demnach die STAT3-Signale eine rote, DAPI eine blaue und die anderen Zell-spezifischen Marker eine grüne Farbe. Zusätzlich konnte durch Hintereinanderlegen der Einzelbilder einer Region eine Kollokalisierung der Einzelsignale dargestellt werden. Dazu wurden gleiche Ausschnitte mit den drei Filtern photographiert, eingefärbt und übereinander gelagert. Dies ermöglichte zum einen den Nachweis von spezifischen Zellmarkern in Zellen mit nukleären STAT3-Signalen. Zum anderen war ein Beweis des nukleären Ursprungs von STAT3 in gleichen Ausschnitten von STAT3 und DAPI möglich. Zur endgültigen Bildbearbeitung wurde die Adobe Photoshop Imaging-Software benutzt. Eine Befunddokumentation, wie die Erstellung von Bildtafeln, erforderte gegebenenfalls einen Farbabgleich oder eine Kontrastverstärkung mit dieser Software. Analog zur Auswertung der Immunhistologiebilder aus den Free Floating Versuchen wurde ein

tabellarisches Auswertungsschema angelegt, welches ebenfalls qualitativ die Dichten der nukleären STAT3-Signale in den entsprechenden Hirnregionen aufzeigte.

6.2.4. Quantifizierung der Ergebnisse

Es wurde eine quantitative Auswertung vorgenommen. Zur Bestimmung der Anzahl von STAT3-positiven Kernen in den sensorischen CVOs zählte man zunächst alle DAPI positiven Kerne und danach den Anteil, der zusätzlich STAT3-Signale aufwies. Hierfür wurden pro CVO (AP, SFO, OVLT) jeweils 3-4 Ausschnitte photographisch (dreifarbig: rot, STAT3; blau, DAPI; grün, vW oder GFAP) dokumentiert. Insgesamt wurden 5 Tiere für die vW und GFAP Analyse verwendet. Mittels Metamorph Colour Align wurde zur besseren Kolokalisation zunächst die rote (STAT3) und dann die grüne (Zellmarker) Farbe ausgeblendet. Per Mausklick auf jeden DAPI gefärbten Kern war es mit einer manuellen Zählhilfe des Programms Metamorph möglich, die Zahl „1“ zu schreiben. Nach Einblenden der roten Farbe (STAT3) wurde wiederum jeder rote Kern zusätzlich mit der Zahl „2“ beschrieben. Die Anzahl an Kernen (1) bzw. Signalen (2) zeichnete das Programm automatisch auf. Durch Einblenden der grünen Farbe (vW oder GFAP) konnte schließlich über die Markierung mit der Zahl 3 der Anteil an dreifach positiven Zellen (1, 2, 3) ermittelt werden. Es wurden Mittelwerte (der Schnitte einer Region) der Mittelwerte (der fünf Tiere) gebildet und mit dem Programm Sigmaplot mit ihren Standardfehlern graphisch dargestellt.

7. Erstellung von „Brain maps“ des Meerschweinengehirns

7.1. Material

Bisher gibt es lediglich einen einzigen Stereotaktischen Atlas des Vorderhirns des Meerschweinchens von Thomas J. Luparello aus dem Jahr 1967. Dieser war für die hier gezeigte neuroanatomische Analyse nicht geeignet. Zusätzlich hat sich inzwischen die Nomenklatur einiger Gehirnregionen maßgeblich verändert.

Erstellung von eigenen Gehirnkartierungen des Meerschweinchens, so genannten „Brain maps“, wurden immunhistochemisch mit DAB gefärbte und gedeckelte Gehirnschnitte aus Kapitel III 5 verwendet. Es handelte sich um Transversalschnitte aus den sechs Gehirnbereichen, in denen die wichtigsten Strukturen mit hoher STAT3 Signaldichte gefunden wurden. In Tabelle 15 sind relevante Gehirnstrukturen zu den entsprechenden Schnittebenen und die jeweilige Lokalisation, wie sie bei der Ratte beschrieben wird, aufgezeigt.

Schnittebene		Relevante Gehirnstrukturen	Bregma	Interaural
			entspricht bei der Ratte {in mm}	
1	A	OVLT , VMPO	0.2	9.2
2	D	VMPO, SON , Pe, MnPO	-0.4	8.6
3	B	SON , Pe, PVN, SFO	-0.92	8.08
4	E	Pe, CA1-3, ARC, ME	-3.6	5.4
5	F	ARC, ME	-4.16	4.84
6	C	AP , NTS	-13.68	-4.68

Tabelle 15

Gehirnschnittebenen des Meerschweinchens aufgelistet von cranial nach caudal, in denen Gehirnareale mit hoher nukleärer STAT3-Dichte zu finden sind. Die Abweichungen vom Bregma-Punkt bzw. der Interaural-Linie sind nach stereotaktischen Daten einer ca. 250g schweren Ratte in mm vergleichend angegeben (Paxinos & Watson, 1998). Die sensorischen CVOs sind in fett hervorgehoben.

AP: Area postrema; **Arc**, Nucleus arcuatus hypothalami; **CA1-3**, Felder 1-3 des Hippocampus; **ME**, Eminentia mediana; **MnPO**, Nucleus praeopticus medianus; **NTS**: Nucleus tractus solitarius; **OVLT**: Organum vasculosum laminae terminalis; **Pe**: Nucleus periventricularis hypothalami; **PVN**: Nucleus paraventricularis hypothalami; **SFO**: Organum subfornicale; **SON**: Nucleus supraopticus hypothalami; **VMPO**: Nucleus praeopticus ventromedialis.

7.2. Methode

Mit Hilfe eines Diascanners (SprintScan 35 Plus, Polaroid) wurden mit einer von der institutseigenen Werkstatt hergestellten Schiebevorrückung die Objektträger durchleuchtet und ein digitales Bild mit hoher Auflösung erzielt. Über Kontrastverstärkung und Helligkeitsabgleich konnten hiermit alle wichtigen Hirnstrukturen neuroanatomisch in der Übersicht deutlich abgegrenzt werden. Durch Überlagern einzelner Ebenen des digitalen Gehirnatlas Paxinos & Watson (1998) der Ratte mit den entsprechenden Transversalebene des Meerschweinchens konnte durch Anpassen der Linien die Kartierung der Gehirnstrukturen von der Ratte auf das Meerschwein übertragen werden. Dafür wurde das Programm Corel Draw benutzt.

Diese „Brain maps“ wurden dann zur bildlichen Dokumentation der Verteilung der nukleären STAT3-Signale in Endothelien des Gehirns genutzt (Kapitel IV 1.2). Dazu legte man ein Pauspapier über eine entsprechende Gehirnkartierung des unter dem Mikroskop betrachteten Gehirnschnittes und zeichnete mit schwarzer Tusche schematisch die Gefäße mit solchen Signalen auf das Papier in vergleichbarer Lokalisation und Größe ein. Durch Einscannen der Skizze auf dem Pausblatt konnte schließlich ein digitales Bild der Gefäßverteilung erzielt werden.

Weiterhin dienten die digitalen Gehirnkartierungen zur Übersichtsdarstellung in den Bildtafeln des Kapitels IV (Abbildung 57) und zur besseren Beschreibung der Signallokalisation der Abbildung 65 zu den *in situ* Hybridisierungen aus Kapitel IV.

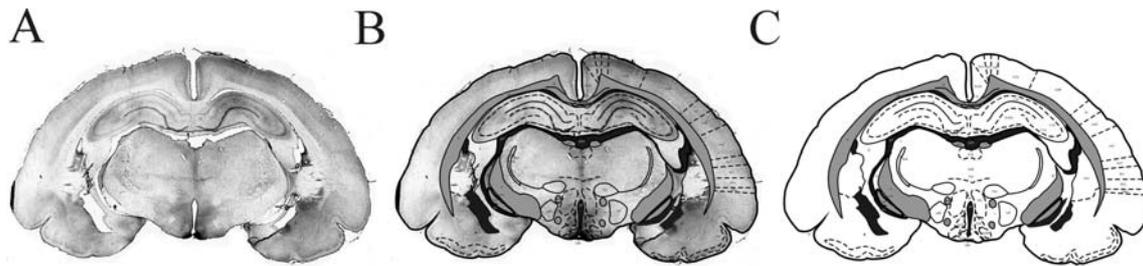


Abbildung 32

Übersicht zur Entstehung der Gehirnkartierungen anhand von eingescannten Gehirnschnitten (Teilbild A) am Beispiel der Ebene 4. Die Linien der Kartierung wurden an die Meerschweinstruktur angepasst (Teilbild B) und hiermit ein schematisches „Brain map“ erzeugt (Teilbild C). Gestrichelte Linien geben eine nicht genaue Abgrenzbarkeit an. Graue Flächen stellen Nervenfaserbündel, schwarze Flächen Abgrenzungen und Ventrikelanteile dar

8. Enzymatischer Nachweis der NADPH-Diaphorase

8.1. Material

8.1.1. Gewebe

Für diesen Nachweis wurden bereits vorab doppelt Fluoreszenz-gefärbte Schnitte aus der in Kapitel III 6 beschriebenen Versuchsreihe genutzt. Jeweils 2 Objektträgern (mit 2-4 Gewebeschnitten) pro Tier ($n = 5$) aus der Region des SFO wurden abgedeckt. Dazu wurden die Objektträger 10 min. in PB (0,2 M) inkubiert und die Deckgläschen vorsichtig abgezogen. Zum Abwaschen der Cityfluorreste und zum Rehydrieren des Gewebes wurde über Nacht bei 4°C in Verdünnungs-Lösung II (0,2 M PB; 0,1 % Triton-x) inkubiert und die Lösung zweimal gewechselt.

8.1.2. Verbrauchsmaterialien

Abkürzung	Beschreibung	Verd.	Hersteller
β -NADPH+H	β -Nicotinamid-dinucleotidphosphat (reduzierte Form)	1 : 200	SIGMA 205-201; Sigma Aldrich, D-Deisenhofen
NBT	Nitroblau-Tetrazolium	1 : 100	SIGMA N-6876; Sigma Aldrich, D-Deisenhofen
Verdünnungs- Lösung II (V-Lösung II)	0.1 % Triton X-100		Siehe oben
	In PB		
PB 0,1 M	95 % Stamm A + 5 % Stamm B, (pH 8,0), 1 : 2 mit <i>Aqua bidest.</i> verdünnen		Siehe oben

Tabelle 16

Verbrauchsmaterialien zum Nachweis der neuronalen Stickstoffmonoxidsynthase (nNOS) nitrerger Neurone. Dieses Enzym hat sein pH-Optimum bei pH 8,0, die Schnitte mussten also umgepuffert werden. Die Triton-X-Behandlung gewährleistet eine bessere Penetration der Substrate zum Ort der Enzymwirkung.

8.2. Methode

Es handelt sich hierbei um eine enzymhistochemische Methode. Bei der NADPH-Diaphorasefärbung wird die Aktivität des konstitutiv in Neuronen zum Teil auch Astrozyten vorkommende Enzym neuronale Stickstoffmonoxidsynthase (nNOS) ausgenutzt. Die Farbreaktion basiert auf der Reduktion von Tetrazoliumfarbstoffen durch dieses Enzym und wird als endogene NADPH-Diaphoraseaktivität bezeichnet. Auch im fixierten Gewebe besitzt nNOS noch Aktivität. Diese enzymhistochemische Untersuchung wurde hier also zur Lokalisation der NOS-Isoenzyme, vornehmlich nNOS, genutzt. Für die lichtmikroskopische Analyse hat sich der Einsatz von Nitroblau-Tetrazolium (NBT) als Protonenakzeptor bewährt, das bei der NADPH-Diaphorasefärbung einen wasserunlöslichen, tiefblauen NBT-Formazanniederschlag am Ort der enzymatischen Reaktion hinterlässt (siehe Abbildung 33). 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 Wasserstoff-übertragender Kofaktoren gebildet wird (Schmidt *et al.*, 1993). Die NADPH-Diaphorasefärbung wurde somit zum Nachweis und zur Lokalisation von Stickstoffmonoxid-produzierenden Neuronen und Nervenfasern eingesetzt.

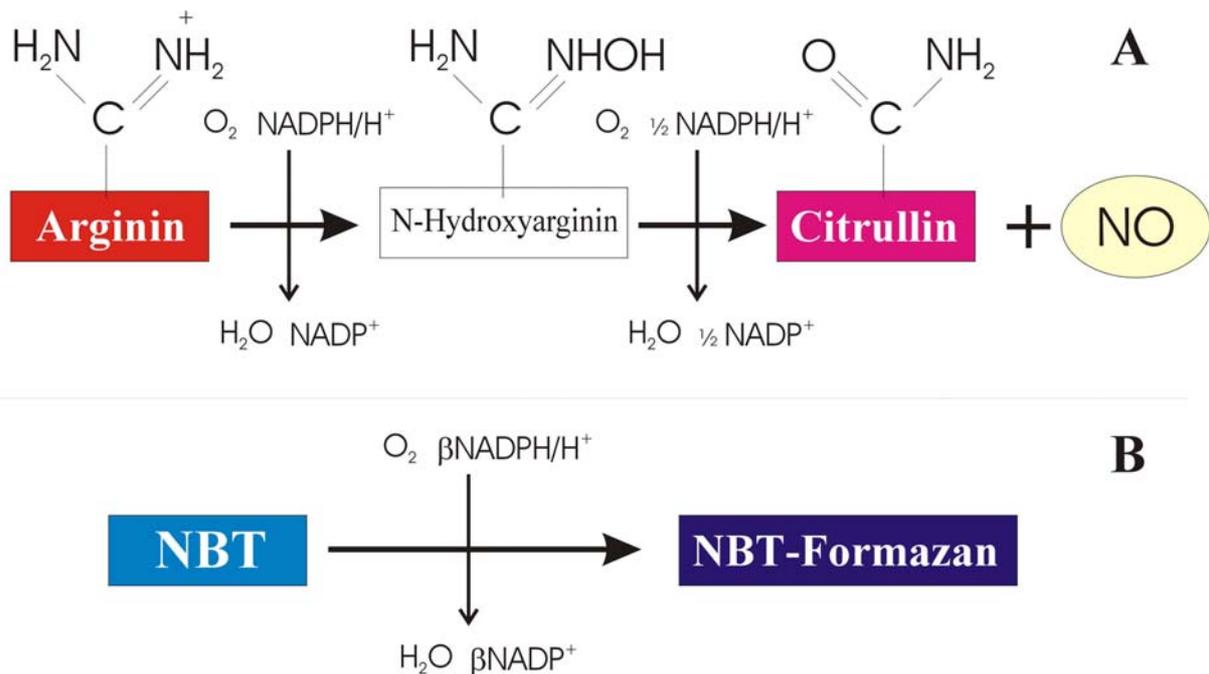


Abbildung 33

Der Mechanismus der Wirkung der NO-Synthase ist in Teilbild A dargestellt. Dieses Enzym katalysiert einen Prozess, bei dem schließlich Wasser und gasförmiges Stickstoffmonoxid entstehen. Die Reaktion ist durch den Protonenübergang auf die Aminosäure Arginin vermittelt. In Teilbild B ist die hier zum Nachweis von Neuronen ausgenutzte Reaktion gegenüber gestellt. Dabei wurde das β-Nicotinamid-dinucleotid-phosphat als Protonendonator und Nitroblau-Tetrazolium (NBT) als Protonenakzeptor eingesetzt. Es entsteht der tiefblaue NBT-Formazanniederschlag am Ort der NO-Synthase-Wirkung im Gewebe.

8.2.1. Arbeitsprotokoll

	Arbeitsschritt	Reagenz	Temp.	Zeit
1	Umpuffern	0,1 M PB; pH 8,0	RT	3 x 10 min.
2	Färben	5 mg β -NADPH+H, 10 mg NBT, 0,3 % Tritin-X in 100 ml PB (0,1 M; pH 8,0)	37°C	über Nacht
3	Waschen	PB (0,1 M; pH 8,0)	RT	3 x 10 min.
4	Deckeln	3-4 Tropfen Citifluor (Citifluor AF1, Citifluor Products, GB-Kent), Deckgläschen blasenfrei auftragen	RT	
5	Lagerung	Dunkel	4°C	Monate

Tabelle 17

Durchführung der NADPH-Diaphorasefärbung: Es wurde bei allen Schritten soweit möglich unter Lichtausschluss gearbeitet, um die vorhandenen Fluoreszenzmarkierungen nicht abzuschwächen.

Die Gewebeschnitte wurden entsprechend des Arbeitsprotokolls prozessiert. Die Färbelösung stellte man 30 min. vor der eigentlichen Inkubation her, damit sich die ursprünglich pulverförmigen Substanzen unter Rühren bei 37°C lösen konnten.

8.2.2. Mikroskopie

Durch Kombination der Techniken der Durchlichtmikroskopie und der Fluoreszenzmikroskopie, wie in den Kapiteln III 5.2.3 und 6.2.3 beschrieben, konnten die Schnitte ausgewertet werden. Der tiefblaue NBT-Formazanniederschlag wurde mit Durchlicht dokumentiert (Abbildung 34), die Kerne (DAPI; blau) und die nukleären STAT3-Signale (Cy3; rot) photographierte man extra mit Hilfe der Lichtfilter. Entsprechend der anderen Doppelmarkierungen wurden zusammengesetzte und Einzel-Bilder mit Farben (NADPH-d grün, DAPI-Kerne blau, STAT3-Signale rot) hinterlegt.

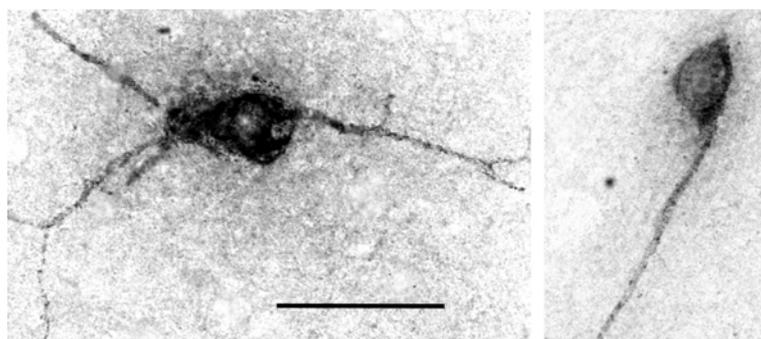


Abbildung 34

Sichtbarmachung kortikaler Neurone durch den tiefblauen NBT-Formazanniederschlag im durchlichtmikroskopischen Bild als schwarze Kontur der Zellen. Der Skalierungsbalken entspricht einer Länge von 50 μ m.

9. *In situ* Hybridisierung von COX-2 mRNA

Der Nachweis von COX-2 mRNA im Gehirn des Meerschweinchens mittels *in situ* Hybridisierung erfolgte in Kooperation mit Herrn Dr. Stephan Barth (Institut für Ernährungsphysiologie, Bundesforschungsanstalt für Ernährung und Lebensmittel, Karlsruhe).

Die experimentelle Stimulierung der Versuchstiere sowie die Gewinnung der Gehirne erfolgten im Institut für Veterinärphysiologie. Anschließend wurden die Gehirne im tiefgefrorenem Zustand an Herrn Dr. Barth weitergeleitet, in dessen Labor in Karlsruhe die *in situ* Hybridisierung durchgeführt wurde.

9.1. Material

9.1.1. Gewebe

Für die *in situ* Hybridisierung wurden schockgefrorene nicht perfundierten Gehirne verwendet (siehe Punkt 1.2.5.3.3). 20 µm Schnitte wurden am Kryostaten (HM 500-O, Microm, D-Walldorf) geschnitten und auf silanisierte Objektträger aufgezogen.

9.1.2. Verbrauchsmaterialien

Lösungen	Beschreibung	Hersteller
Proben	7,5-10 x 10 ⁵ cpm/ul je Oligonukleotid	Siehe III 9.1.2.1
Hybridisierungs-Puffer	50 % deionisiertes Formamid	Sigma Aldrich, D-Deisenhofen
	5 x Denhardt's Lösung	
	10 % (w/v) Dextransulfat	
	0,75 M NaCl	
	25 mM PIPES	
	25 mM EDTA	
	0,2 % (w/v) SDS	
	250 µg/ml Herringsperma DNA	Boeringer, D-Mannheim
SSC	Standard Saline Citrate	Sigma
Kodak Biomax	Detektionsfilm der Radioaktivität	Amersham, Freiburg
Ilford Phenisol, Hypam	Entwickler und Fixierer	E-Cheshire

Tabelle 18

Verbrauchsmaterialien zur Durchführung der *in situ* Hybridisierung.

9.1.2.1. Herstellung der Sonden

ORIGIN

```

15 atgctc gccgcgcgcg tgctgctctg cgcagcgctg gctctcggcc
61 aggcagcaa tccttgctgt tccaaccgt gtcaaaaccg aggggaatgt ctgagttag
121 gatttgaccg gtacaagtgc gactgcaccc ggacaggcta ttacggtgaa aactgtacca
181 cacctgaatt tctaacaaga ataaaattac tgctgaagcc cacccccaac acggtgcact
241 atatactgac ccactcaaaa ggagtctgga acatcgtcaa taacattccc ttctgcgca
301 atgcaatcat gatatatgtg ttgactcca gatctcatct gatcgacagt ccaccaactt
361 acaatgcgca ttatggctac aaaagctggg aagccttctc taacctctcc tactacacca
421 gagcgctcc tcccgtagcg gatgactgcc ccaactccat ggggtgtaa gggaagaagg
481 agcttctga tcaaatgag gttctgaaa aagttctct aagaaggaag tcatccctg
541 atcccaagg cacaaatag atgttcgctt tcttgccca gcattttact catcagttt
601 tcaagtcaga tcaaaaaccg ggaccagctt tcaccacggg actggccat ggggtggacc
661 taagtcatat ttatggtgaa actctagata gacagcaca actgcgctt tcaaggatg
721 gaaaaatgaa ataccagata atgatggag agatgtacc tccactgtc aaagaaact

```

781 aagtagagat gatgtaccca ccctacatcc ccgagcatgc acgctttgct gtgggccagg
 841 aggtcttcgg tctggtgccca ggctgatga tgtacgccac catctggctg cgggagcata → **Sonde A**
 901 acagagtgtg cgatgtgctt aaacaggagc atccagagtg ggatgatgaa cgctgttcc
 961 agacaagccg gctaataattg ataggagaaa cgattaagat agtgattgaa gactatgtac → **Sonde B**
 1021 agcatttgag cgggtatcat ttcaaaactg a agttgaccc agagctgctt ttcaaccagc
 1081 aattccagta ccagaaccgc attgcttccg agtttaacac gctgtatcac tggcatcccc
 1141 ttctgcctga cacctttcaa attgatgacc aagtttataa cttcaacag ttctctaca
 1201 acaactctat attagtagaa catggactta cccagtttgt tgaatcattc accaagcaaa
 1261 ttgccggcag ggtcgtggc ggttaggaatg ttccccttgc agtccaaagg gtggcaaagg → **Sonde C**
 1321 ttccattga gcacagcaga aagatgaaat accaatctct gaatgaatac cgcaaaccgt
 1381 tcttgatgaa accgtatacg tcatttgaag aacttacagg tgagaaggaa atggctgcag
 1441 gattggaagc cctctacggt gacattgatg cgatggagct gtatcccgcc cttctctggt
 1501 aaaaacctcg gccagacgct attttcgggg agaccatggt ggagatggga gcaccattct
 1561 ccttgaaagg acttatgggt aaccctatat gctcacctca ctactggaag ccgagtactt
 1621 ttggaggaga agtgggtttt cagatcgtca acactgctc catccagtct ctcatctgca
 1681 ataacgtgaa gggctgtcct gtcactgctt ttaatctccc agatccgcag cttgccaaaa
 1741 cagtaccat taacgcgagt gcttcccact ccagactgga agacctcagc cccactgtac
 1801 tgctaaaagg acgttcgacg gagctgtag

Abbildung 35

Kodierende cDNA-Sequenz der Cyclooxygenase-2 (COX-2) des Meerschweinchens (*Cavia porcellus*, (Bracken *et al.*, 1997): Zu den gelb hinterlegten Sequenzen wurden drei Oligonukleotide erstellt, die 3' P markiert als Sonden-Mix im Verhältnis 1:1:1 zum Nachweis der mRNA in der *in situ* Hybridisierung eingesetzt wurden.

Die spezifischen komplementären Oligonukleotide, deren Sequenzen in Abbildung 35 hervorgehoben sind, besaßen zur COX-1 cDNA eine Homologie von unter 10 %. Damit waren Kreuzreaktionen mit der mRNA dieser Enzym-Isoform nicht zu erwarten. Die Sonden wurden am 3'-Ende mit Hilfe der terminalen Desoxynucleotidyltransferase (Amersham, D-Braunschweig) mit ($\alpha^{33}\text{P}$) dATP, einem dATP-Analog, radioaktiv markiert. Schließlich wurden markierte Sonden mittels Säulen-Chromatographie (Amersham, D-Freiburg) von nicht in Sondenmolekülen eingebautem ($\alpha^{33}\text{P}$) dATP getrennt. {weitere Einzelheiten siehe: (Barth & Gerstberger, 1999)}

9.2. Methode

Mit Hilfe der *in situ* Hybridisierung wird die induzierte Bildung bestimmter Genprodukte auf der Ebene der mRNA direkt im Gewebeschnittpräparat nachgewiesen. Ein erstmaliges Auftreten oder eine deutliche Zunahme der Menge einer spezifischen mRNA kann somit als Nachweis für eine stimulierte Transkription eines bestimmten Gens genutzt werden. Es ist allerdings immer zu bedenken, dass die Methode keine Aussagekraft für eine weitere Regulation der Translation sowie der Enzymaktivität (hier des Enzyms COX-2) besitzt. Es gibt zwar bereits Studien in anderen Tierspezies, die das Enzym COX-2 auf Proteinebene nachweisen (Matsumura *et al.*, 1998a; Konsman *et al.*, 2004). Da jedoch für die COX-2 des Meerschweinchens noch keine spezifischen Antikörper verfügbar sind, war der Nachweis auf der Ebene der mRNA mittels *in situ* Hybridisierung hier die Methode der Wahl.

Allgemein teilt man diese Hybridisierungstechnik anhand der Detektionssysteme in radioaktive und nicht radioaktive Verfahren ein. Die Sensitivität der Markierung mit radioaktiven Isotopen ist vergleichsweise hoch und wurde aufgrund der zu erwartenden niedrigen Expressionsrate von COX-2, auch nach Stimulation, in dieser Studie genutzt.

Anstelle des direkten Nachweises der mRNA innerhalb der Gewebeschnitte wurde auf die Gewebeschnitte ein hochempfindlicher, hochauflösender Röntgenfilm aufgelegt, der durch die beta-Partikel der spezifisch hybridisierten Sondenmoleküle an entsprechender Stelle "belichtet" wurde und somit nach photographischer Entwicklung in Form einer Schwärzung eine Abbildung und Verteilung der COX-2-Expression wiedergibt. Schließlich konnten spezielle Gehirnstrukturen durch Vergrößerungen der entwickelten Filme hervorgehoben werden, ohne allerdings eine direkte morphologische Zuordnung oder zelluläre Auflösung der Hybridisierungssignale zu erreichen.

9.2.1. Arbeitsprotokoll

	Arbeitsschritt	Reagenz	Temp.	Zeit
1	Fixation	Fixierungslösung (PFA 4 %)	RT	5 min.
2	Waschen	PB	RT	2 x 5 min.
3	Dehydrierung	Aufsteigende Alkoholreihe (Ethanol) (60 %, 80 %, 100 %)	RT	Jeweils 5 min.
		Trocknung unter Vacuum		
4	Hybridisierung	Hybridisierungspuffer 50 µl / Schnitt	52°C	16 h in einer feuchten Kammer
		Sonden		
5	Post- hybridisierungs- waschen	4 x SSC	RT	3 x 5 min.
		2 x SSC	37°C	3 x 5 min.
6	Trocknung	unter Vacuum	RT	3 h
7	Belichtung	Kodak Biomax	4°C	7 Tage
8	Entwicklung	Ilford Phenisol	RT (ab jetzt im Dunkeln)	
9	Fixierung	Ilford Hypam		

Tabelle 19

Arbeitsprotokoll zur *in situ* Hybridisierung der COX-2 mRNA des Meerschweinchens.

Die *in situ* Hybridisierung wurde diesem Protokoll entsprechend durchgeführt. Die Zusammensetzungen der einzelnen Lösungen sind Tabelle 19 zu entnehmen.

Aufgrund der Verwendung radioaktiv markierter Sonden für den Nachweis der COX-2 mRNA mussten die dafür geltenden Sicherheitsvorschriften eingehalten werden und erfolgte daher im "Innerbetrieblichen Überwachungsbereich" in Karlsruhe (siehe oben).

10. Auswertung und Statistik

10.1. Daten zur Körperkerntemperatur

Die über den Zeitraum von -120 min. bis 360 min. aufgezeichneten Daten der Körperkerntemperaturen wurden aus dem Messprogramm Vital View in Excel[®]-Tabellen überführt und ausgewertet. Die Werte der abdominalen Körpertemperatur der verschiedenen

Gruppen wurden als Mittelwerte mit Standardfehler zur besseren Übersichtlichkeit in Intervallen von 15 min. dargestellt. Die statistische Auswertung erfolgte mit SigmaStat (Jandel Scientific, CA-Corte Madera). Die Körpertemperaturen der LPS-stimulierten Tiere wurden dabei mit den Körpertemperaturen ihrer entsprechenden Kontrollen bzw. pharmakologisch behandelte Tiere verglichen. Dies erfolgte mittels einer zweifaktoriellen Varianzanalyse (ANOVA), der sich ein post-hoc-Test nach Bonferroni anschloss. Bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $P < 0.05$ lagen statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Vergleichsgruppen vor.

Zusätzlich wurde zur Beurteilung der Stärke der Fieberreaktionen der Fieberindex herangezogen. Dabei handelt es sich um eine Größe, die durch Integration der Fläche unter der Fieberkurve ermittelt wird. Als Basis verwendete man den Mittelwert aller Körpertemperaturen der beiden Stunden vor dem Injektionszeitpunkt. Die darüber liegenden Flächen wurde als Wert dann graphisch mit Prism (Graphpath Software) ausgewertet und ebenfalls als Mittelwert mit Standardfehler dargestellt (Abbildung 36). Die einzelnen Tiergruppen wurden hierbei mittels einer einfaktoriellen Varianzanalyse verglichen. Im Anschluss an jede Varianzanalyse schlüsselte man signifikant unterschiedliche Gruppen auf (Statview, Abacus Concepts, Berkley, Kalifornien, 1992). In der ANOVA wurde dies mit Hilfe des Scheffé-Tests als post-hoc-Test auf dem 5 % Niveau ermittelt (Bortz, 1989). Signifikante Unterschiede wurden in den entsprechenden Dokumentationen durch unterschiedliche Buchstaben über den Balken angezeigt.

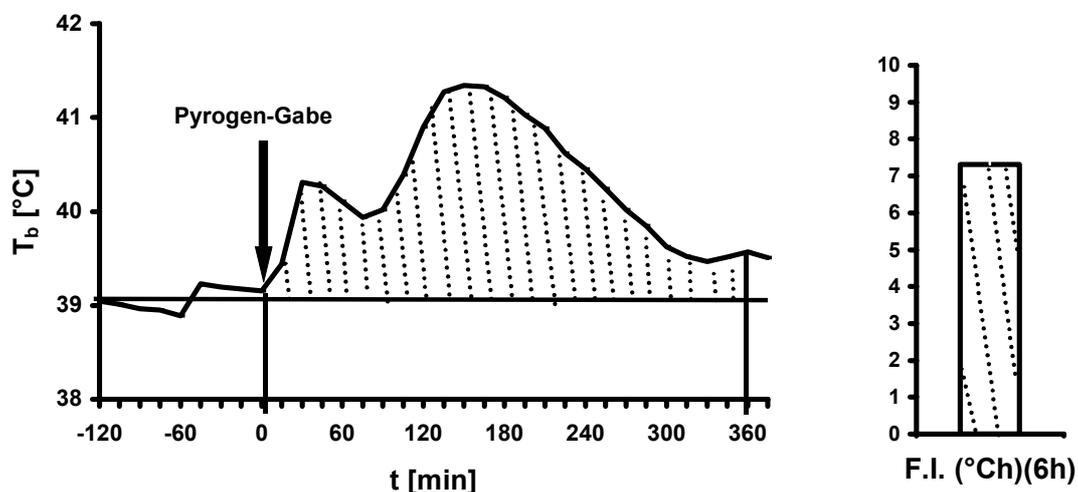


Abbildung 36

Ermittlung des Fieberindex: (linke Abbildung) Die horizontale Linie gibt die durchschnittliche Ausgangstemperatur als den Mittelwert der Temperaturen der beiden Stunden vor der Pyrogen-Gabe an. Über den Zeitraum von 6 Stunden errechnet sich der Fieberindex aus dem Integral der schraffierten Fläche zwischen der Fieberkurve und der basalen Ausgangstemperatur (rechte Abbildung). Der Fieberindex ist damit ein Maß für die Stärke des Fiebers und kann wie hier als Balkendiagramm graphisch dargestellt werden.

Im Versuchsansatz vom Ergebnisteil 3 zur Rolle von Prostaglandinen wurden zur besseren Anschaulichkeit nicht die absoluten Temperaturwerte in den Fieberkurven aufgetragen.

Vielmehr wurde aus der Vorlaufzeit der Mittelwert der Temperatur als Nulllinie festgelegt und von den gemessenen Absolutwerten abgezogen. Diese Temperaturkurven wurden in gleicher Weise dargestellt wie bereits beschrieben $\{\Delta T_b (\text{°C})\}$.

10.2. Daten zu den IL-6 Bioassays

Mit Hilfe des mitgemessenen Standards (Kapitel III 3.1.3) in seinen unterschiedlichen Verdünnungen konnte für jedes Assay eine spezifische Eichkurve erstellt werden. Dabei wurde die optische Dichte (auf der Ordinate) gegen ihre jeweilige IL-6-Konzentration (auf der Abszisse) aufgetragen. Exemplarisch ist hier eine Kurve dargestellt, welche mit Hilfe des Kalkulationsprogramms Microsoft Excel 7.0 erstellt wurde (Abbildung 37).

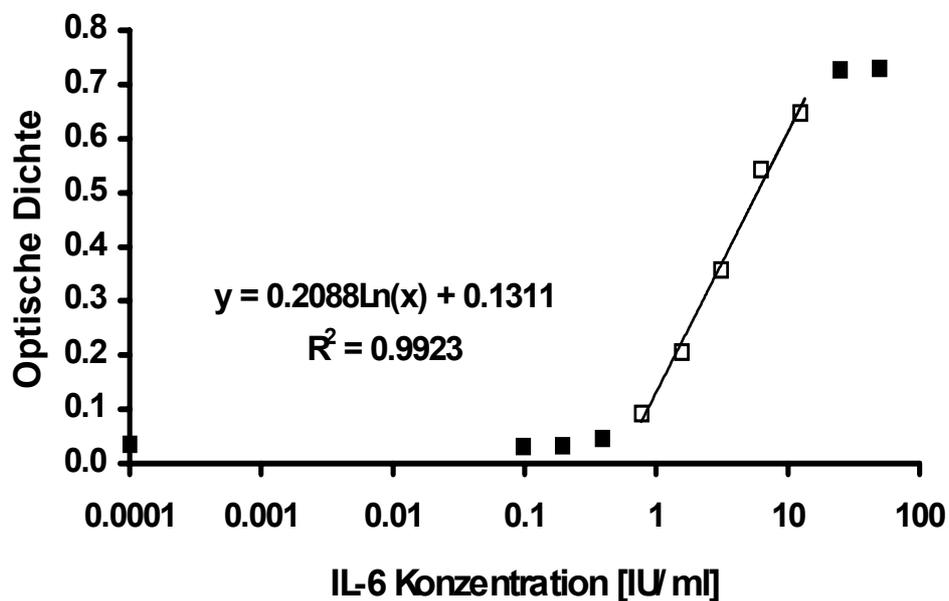


Abbildung 37

Darstellung einer Eichkurve eines IL-6-Assays.

Der wachstumsfördernde Effekt von IL-6 ist konzentrationsabhängig. Charakteristischer Weise erhält man in einem bestimmten Bereich einen linearen Anteil der Kurve, da bei steigender Konzentration um einen konstanten Faktor auch das Wachstum (Vermehrung) der Zellen ansteigt. Schließlich ist dies wiederum direkt proportional zur Menge an umgesetzten Formazan-Kristallen, was sich in einer Zunahme der optischen Dichte widerspiegelt. Bei geringen IL-6-Werten ist der Effekt kleiner, es wird keine Linearität beobachtet. Bei sehr hohen Dosen ändert sich der Kurvenverlauf ebenfalls, solche Konzentrationen steigern das Wachstum nicht mehr, oder hemmen es sogar bzw. können dann auch toxisch auf die Zellen wirken. Dementsprechend konnte jedes Assay lediglich im Bereich des linear ansteigenden Teils des Kurvenverlaufs zur Auswertung der Proben herangezogen werden. Proben mit höheren oder niedrigeren Gehalten, als durch die Gerade jeweils abgedeckt, mussten von der Auswertung ausgeschlossen und anders vorverdünnt werden. Die zugehörige Regressionsgleichung konnte also nur vom Anfangspunkt zum Endpunkt der Geraden in

einem klar definierten Konzentrationsbereich zur Errechnung der biologisch aktiven IL-6 Konzentrationen genutzt werden {IU/ml}. Zur Qualitätskontrolle wurden zusätzlich definierte Mengen an IL-6 eines international festgelegten Standards mitgemessen. Die ermittelten Konzentrationen im Blutplasma zu den unterschiedlichen Zeitpunkten (-60 min., +90 min.) unter den verschiedenen Versuchsbedingungen (LPS 10 µg/kg i.a., 30 µg/kg i.p., 100 µg/kg s.c., 10 µg/kg s.c.; NaCl s.c., i.p., i.a.) wurden wie die Fieberindices mittels einfaktorieller ANOVA und post-hoc-Test nach Scheffé verglichen und mit Hilfe von Prism (Graphpath Software) graphisch dargestellt. Da die Werte allerdings nicht normalverteilt waren, wurde eine Logarithmierung vor der Durchführung der Statistik vorgenommen. Signifikante Unterschiede zwischen einzelnen Gruppen wurden in den entsprechenden Abbildungen mit unterschiedlichen Buchstaben gekennzeichnet.

10.3. Daten zum PGE₂ Immunoassay

Die im kompetitiven ELISA ermittelten optischen Dichten wurden nach dem gleichen Prinzip wie die IL-6-Konzentrationen ausgewertet. Hierbei musste lediglich der umgekehrten Proportionalität Rechnung getragen werden. Bei hohen optischen Dichten war dementsprechend wenig Proben-PGE₂ enthalten. Die Regressionsgerade, die aus den Werten der Standardverdünnungsreihe ermittelt wurde, hat somit eine negative Steigung. Die Mittelwerte mit Standardfehler der Lavageproben-Konzentrationen jeder Tiergruppe wurden mit Prism (Graphpath Software) dargestellt. Die Werte wurden mit einer einfaktoriellen ANOVA und post-hoc-Test nach Scheffé verglichen und signifikante Unterschiede mit verschiedenen Buchstaben ausgewiesen.

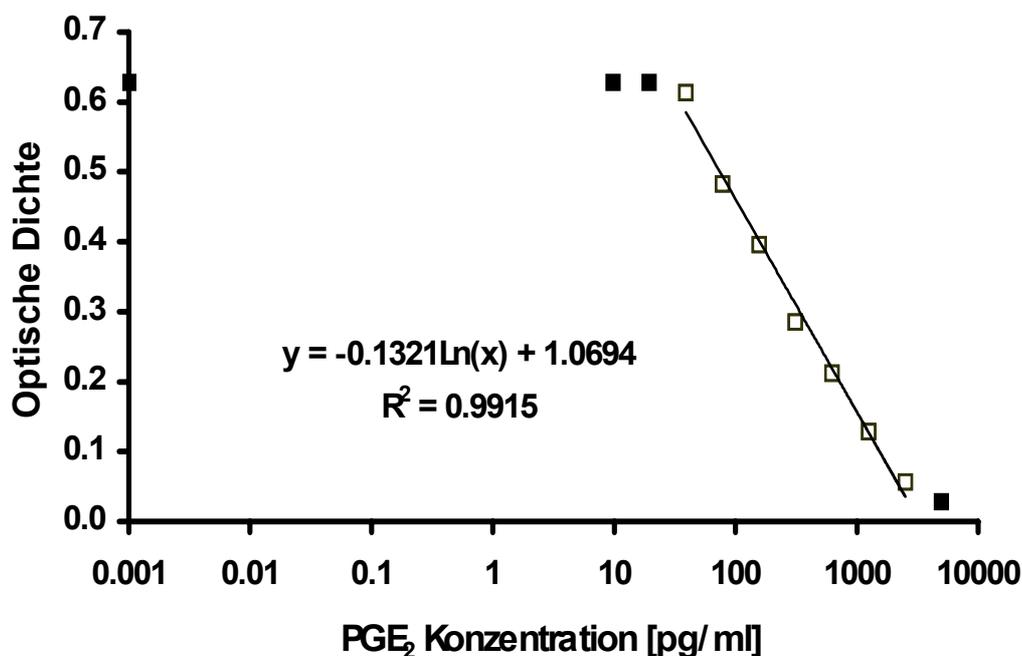


Abbildung 38

Eichkurve für ein PGE₂-Immunoassay

10.4. Daten zu der STAT3 Signal-Zählung

Die Anzahl der gezählten STAT3-immunreaktiven Zellkerne aus der Versuchreihe im Kapitel III 5.2.4 und 6.2.4 wurde mit Prism (Graphpath Software) als Mittelwert mit Standardfehler graphisch dargestellt. Es handelte sich also um Mittelwerte der Tiergruppen vom Mittelwert der einzelnen Tiere. Die gewonnen Daten dieser Gruppen wurden als Mittelwerte mit Standardfehler angegeben, wobei die einzelnen Gruppen für Kapitel III 5.2.4 mit einer einfaktoriellen ANOVA und anschließendem post-hoc-Test nach Scheffé statistisch verglichen wurden. Vor der statistische Auswertung mit Statview (Abacus Concepts, Berkley, Kalifornien, 1992) erfolgte eine Logarithmierung der Werte, da keine Normalverteilung vorlag. Eine statistisch signifikanter Unterschied lag bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $P < 0.05$ vor.

Es sollte zusätzlich überprüft werden, ob es einen Zusammenhang zwischen der Menge an STAT3-immunreaktiven Zellkernen im Gehirn und der jeweils gemessenen IL-6 Konzentrationen in der Zirkulation gab. Dazu wurden die gezählten Mengen an nukleären STAT3-Translokationen der Einzeltiere aus den vier verschiedenen LPS-behandelten Tiergruppen mit den entsprechend gemessenen IL-6 Mengen mit Hilfe des Programms SigmaPlot (Jandel Scientific, CA-Corte Madera) statistisch ausgewertet. Eine graphische Darstellung der IL-6 Werte im Verhältnis zur Anzahl an nukleären STAT3-Signalen erfolgte jeweils logarithmisch, der Korrelationskoeffizient wurde ermittelt und angegeben.

IV. ERGEBNISSE

1. Nukleäre Translokation des Transkriptionsfaktors STAT3 im Meerschweinengehirn während systemischer oder lokaler Inflammation

1.1. Fieber und zirkulierendes IL-6 nach systemischer oder lokaler Gabe von LPS

Versuchstiergruppe	Substanz	Injektion/ Abkürzung	Dosis	Anzahl der Tiere	Untersuchung
Systemische Inflammation	LPS	i.p.	30 µg/kg	6	1. Fieber -60 - +360 min. 2. IL-6 Werte {IU/ml} bei -60, +90 min.
		i.a.	10 µg/kg	5	
Lokale Inflammation		s.c.	100 µg/kg	6	
			10 µg/kg	5	
Kontrolle System. Inflammation		NaCl	i.p.	1 ml/kg KG	
	i.a.		5		
Kontrolle Lokale Inflammation	s.c.		5		

Tabelle 20

Übersichtstabelle der Versuchsreihen mit Dosierung, Applikationsform, Anzahl der Tiere und betrachteten Messwerten

Die obige Tabelle (Tabelle 20) gibt Auskunft über die sieben Versuchsgruppen. Zur Simulierung einer lokalen Entzündung durch das exogene Pyrogen LPS wurden zwei verschiedene Dosierungen in die subkutane Kammer injiziert (LPS, 10 µg/kg und 100 µg/kg s.c.). Eine systemische Inflammation induzierte man durch intraarterielle oder intraperitoneale Applikation von LPS (LPS, 10 µg/kg i.a.; LPS, 30 µg/kg i.p.). I.a., i.p., und s.c. (höhere Dosis) Injektionen resultierten im Vergleich zu den entsprechenden Kontrollgruppen (NaCl 0,9 %, i.a., i.p., s.c.) in einer robusten Fieberreaktion (Teilbild A in Abbildung 39, Abbildung 40, Abbildung 41 und Abbildung 42). Diese war in beiden Fällen der systemischen Inflammation und bei der höheren Dosis im lokalen Entzündungsmodell deutlich biphasisch. Ein erstes Maximum wurde bei intraarterieller Gabe bereits nach 30 min. (i.a., 40,31°C ± 0,20) in den beiden anderen Fällen erst nach 60 min. erreicht (i.p., 40,73°C ± 0,19; s.c., 40,46°C ± 0,12). Das zweite Maximum lag in den zwei systemisch behandelten Gruppen bei 150 min. (i.a., 41,34°C ± 0,10; i.p., 40,80°C ± 0,16) und nach Gabe der höheren subkutan gegebenen Dosis bei 165 min. (100 µg/kg s.c., 40,63°C ± 0,36). Für die Tiere, denen die niedrige LPS-Dosis (10 µg/kg s.c.) in die subkutane Kammer injiziert wurde, war ein Plateau mit den höchsten Körperkerntemperaturen zwischen 120-150 min. zu verzeichnen (10 µg/kg s.c., 39,99°C ± 0,37). Eine Zusammenfassung der Stärke der Fieberreaktionen ist anhand der Fieberindices aller sieben Tiergruppen in Abbildung 43 dargestellt.

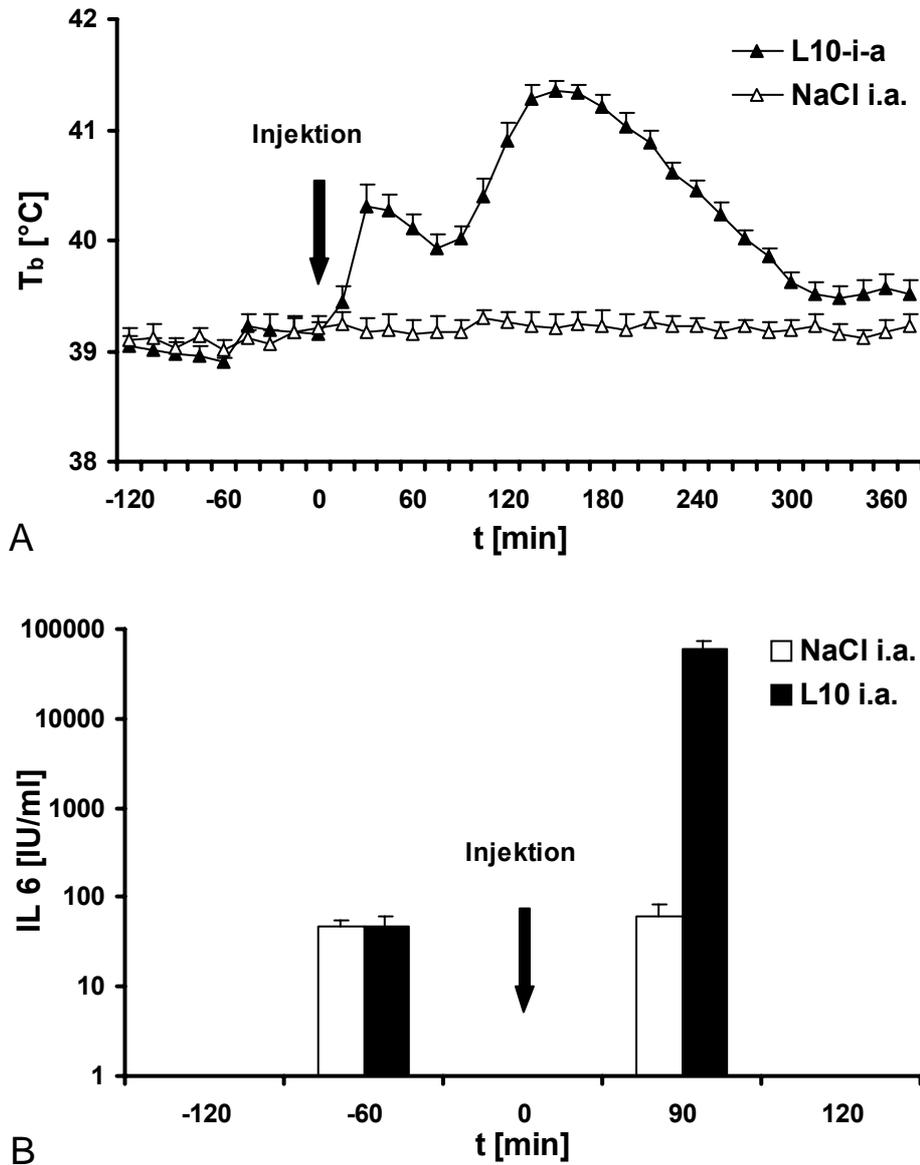


Abbildung 39

Fieberreaktion (A; T_b, body temperature) und zirkulierendes Interleukin-6 (B; IL-6) von Meerschweinchen vor und nach Gabe von LPS (10 µg/kg, i.a.; A, schwarze Dreiecke; B, schwarze Säulen) oder Lösungsmittel (NaCl; A, weiße Dreiecke; B, weiße Säulen): Im Zeitraum von 30-300 min. ist die Pyrogen-induzierte Fieberkurve signifikant gegenüber der Temperaturkurve der Kontrollgruppe erhöht. Die Temperaturwerte wurden dazu mit einer zweifaktoriellen ANOVA und einem post-hoc-Test nach Bonferroni verglichen. IL-6 im Plasma wurde 60 min. vor und 90 min. nach der Injektion von LPS und NaCl gemessen. Unterschiedliche Buchstaben über den Säulen zeigen signifikante Unterschiede gegenüber den anderen Säulen an (P < 0.05). Alle Werte sind als Mittelwerte ± Standardfehler dargestellt.

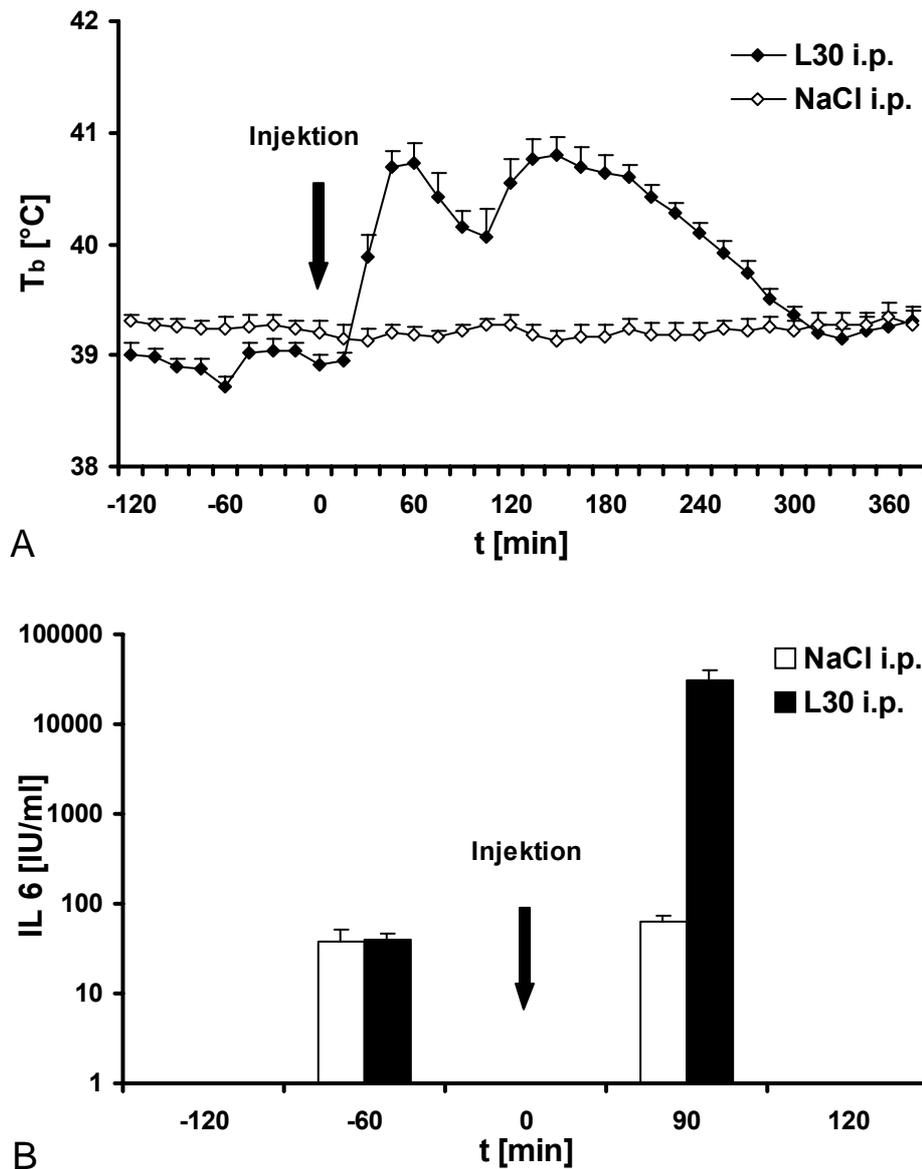


Abbildung 40

Fieberreaktion (A; T_b , body temperature) und zirkulierendes Interleukin-6 (B; IL-6) von Meerschweinchen nach Gabe von LPS (30 $\mu\text{g}/\text{kg}$, i.p.; A, schwarze; B, schwarze Säulen) oder Lösungsmittel (NaCl; A, weiße Rauten; B, weiße Säulen). Im Zeitraum von 30-270 min. ist die Pyrogen-induzierte Fieberkurve signifikant gegenüber der Temperaturkurve der Kontrollgruppe erhöht. Die Temperaturwerte wurden dazu mit einer zweifaktoriellen ANOVA und einem post-hoc-Test nach Bonferroni verglichen. Zirkulierende Werte an bioaktivem IL-6 wurden 60 min. vor und 90 min. nach der Pyrogen-Gabe gemessen. Unterschiedliche Buchstaben über den Säulen zeigen signifikante Unterschiede gegenüber den anderen Säulen an ($P < 0.05$). Alle Werte sind als Mittelwerte \pm Standardfehler dargestellt.

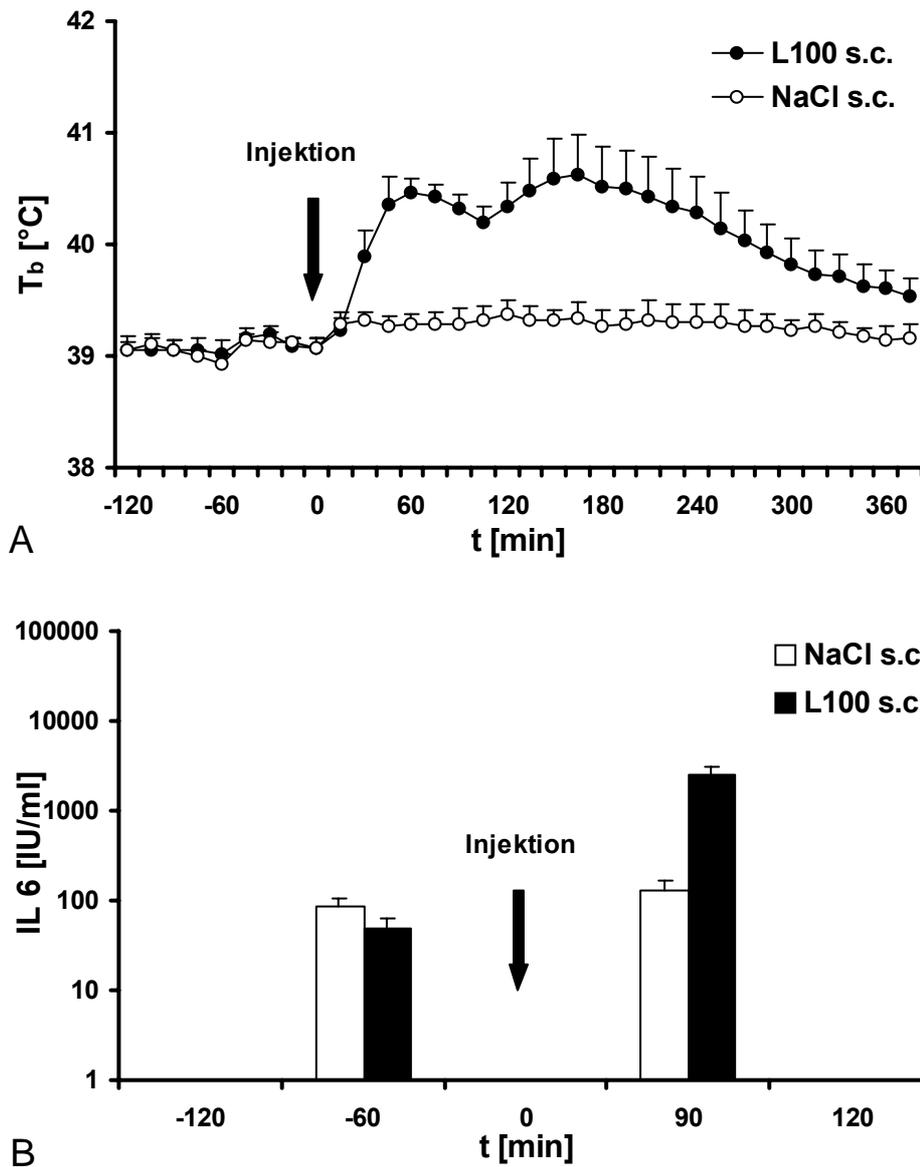


Abbildung 41

Fieberreaktion (A; T_b, body temperature) und zirkulierendes Interleukin-6 (B; IL-6) von Meerschweinchen nach Gabe von LPS (100 µg/kg, s.c.; A, schwarze Kreise; B, schwarze Säulen) oder Lösungsmittel (NaCl; A, weiße Kreise; B, weiße Säulen). Im Zeitraum von 30-360 min. ist die Pyrogen-induzierte Fieberkurve signifikant gegenüber der Temperaturkurve der Kontrollgruppe erhöht. Die Temperaturwerte wurden dazu mit einer zweifaktoriellen ANOVA und einem post-hoc-Test nach Bonferroni verglichen. Zirkulierende Werte an bioaktivem IL-6 wurden 60 min. vor und 90 min. nach der Pyrogen-Gabe gemessen. Unterschiedliche Buchstaben über den Säulen zeigen signifikante Unterschiede gegenüber den anderen Säulen an (P < 0.05). Alle Werte sind als Mittelwerte ± Standardfehler dargestellt.

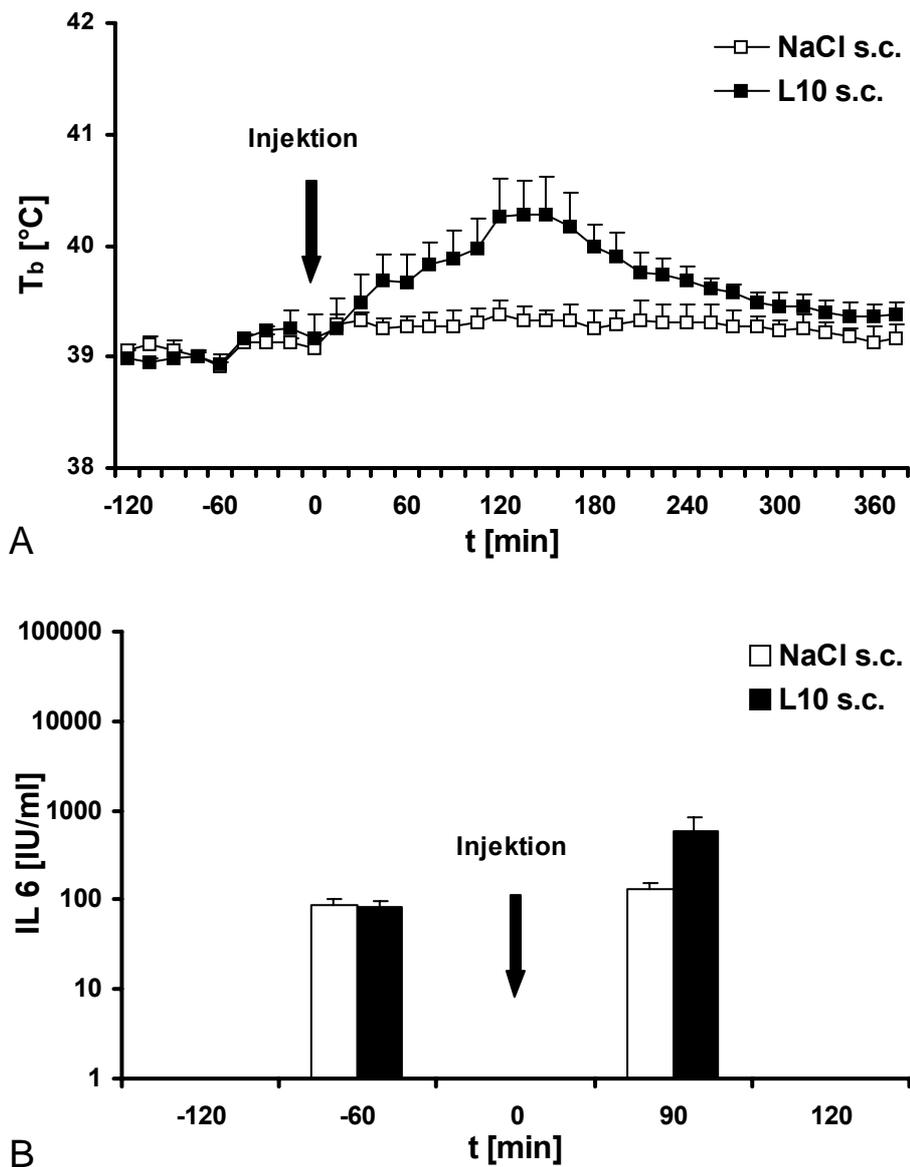


Abbildung 42

Fieberreaktion (A; T_b, body temperature) und zirkulierendes Interleukin-6 (B; IL-6) von Meerschweinchen nach Gabe von LPS (10 µg/kg, s.c.; A; schwarze; B, schwarze Säulen) oder Lösungsmittel (NaCl; A, weiße Quadrate; B, weiße Säulen). Im Zeitraum von 135-165 min. ist die Pyrogen-induzierte Fieberkurve signifikant gegenüber der Temperaturkurve der Kontrollgruppe erhöht. Die Temperaturwerte wurden dazu mit einer zweifaktoriellen ANOVA und einem post-hoc-Test nach Bonferroni verglichen. Zirkulierende Werte an bioaktivem IL-6 wurden 60 min. vor und 90 min. nach der Pyrogen-Gabe gemessen. Unterschiedliche Buchstaben über den Säulen zeigen signifikante Unterschiede gegenüber den anderen Säulen an (P < 0.05). Alle Werte sind als Mittelwerte ± Standardfehler dargestellt.

Alle sieben untersuchten Versuchsgruppen zeigten eine Stunde vor der Injektion mit LPS oder Lösungsmittel mittlere Plasmaspiegel an IL-6 in einem Bereich von 30-80 I.U./ml. Verglichen mit diesen Basalwerten vor der Pyrogen-Behandlung stiegen die biologisch aktiven IL-6-Werte innerhalb von 90 min. nach der Applikation in allen vier LPS-behandelten Gruppen signifikant an (P < 0,0001 für die Gruppen: LPS 10 µg/kg i.a., 30 µg/kg i.p. oder 100 µg/kg s.c.; P = 0,0069 für die Gruppe: LPS 10 µg/kg s.c.; ANOVA). 90 min. nach lokaler

Gabe der niedrigen Dosis (10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ s.c.) waren dagegen die mittlere IL-6-Plasmakonzentration im Vergleich zu den Werten der entsprechenden Kontrollgruppe nicht signifikant erhöht (Abbildung 42). Bei keiner der drei Kontrollgruppen stieg der mittlere IL-6-Plasmaspiegel 90 min. nach i.a., i.p. oder s.c. Gabe des Lösungsmittels signifikanten über den Basalwert vor der jeweiligen Injektion an (Teilbilder B der Abbildung 39, Abbildung 40, Abbildung 41 und der Abbildung 42). Eine Zusammenfassung der IL-6-Werte aller sieben Tiergruppen, gemessen 90 min. nach Gabe von LPS oder NaCl, ist in Abbildung 44 gezeigt.

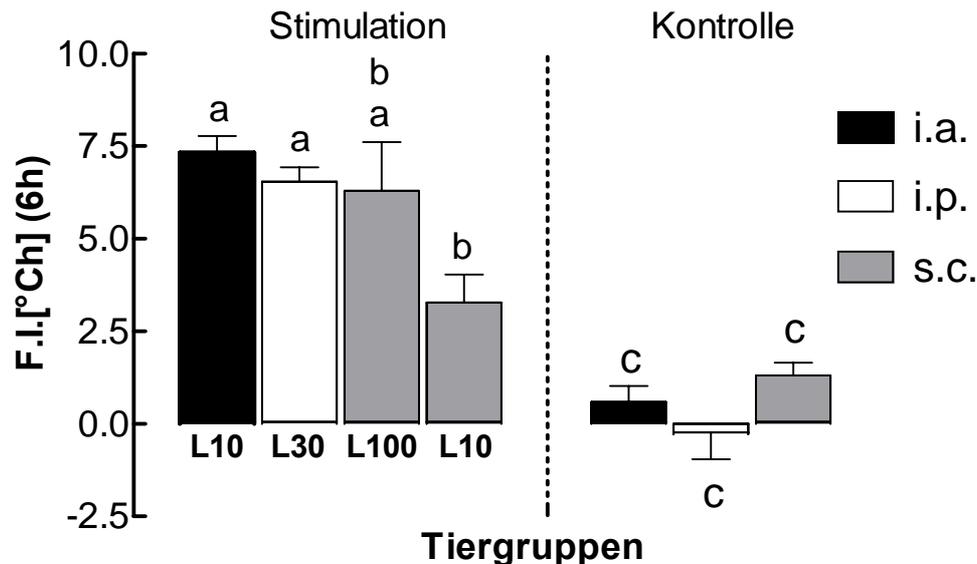


Abbildung 43

Vergleichende Zusammenfassung der integrierten Fieberreaktionen (F.I. {°Ch} (6h)) von Meerschweinchen nach Gabe von LPS oder Lösungsmittel in verschiedenen Applikationsformen (i.a., schwarze Säule; i.p., weiße Säule; s.c., graue Säulen) Die unterschiedlichen Gruppen sind identisch zu den in den Abbildungen 39-42 gezeigten Gruppen. Unterschiedliche Buchstaben über den Säulen zeigen signifikante Unterschiede gegenüber den anderen Säulen an ($P < 0.05$). Alle Werte sind als Mittelwerte \pm Standardfehler dargestellt.

Die Berechnung der Fieberindices (Fläche unter der Fieberkurve als Maß für die Stärke des Fiebers, Abbildung 43) ergab, dass die Stärke und Dauer des LPS-induzierten Fiebers in den beiden systemischen (i.a., i.p.) und in einer lokalen Versuchsgruppe (höhere Dosis 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ s.c.) gleichwertig waren. Die integrierte Fieberantwort nach Gabe der niedrigen Dosis in die subkutane Kammer zeigte sich im Vergleich zur i.a. und i.p. Gruppe signifikant kleiner. Dies galt nicht, wenn man die Reaktionen bei lokaler Applikation in den zwei unterschiedlichen Dosierungen gegenüberstellte (100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ LPS s.c. *versus* 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ s.c.). Hierbei war, was die integrierte Fieberantwort betrifft, keine kennzeichnende Abweichung vorhanden. Ein Vergleich der Fieberkurven der mit 100 bzw. 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ s.c. behandelten Gruppen ergab jedoch in den Zeiträumen 30-105 und von 130-330 min. nach Injektion signifikante Unterschiede der mittleren Körperkerntemperatur (zweifaktorielle ANOVA mit wiederholten Messungen mit einem Bonferroni's post-hoc-Test).

Die i.a. und i.p. Behandlung von Meerschweinchen mit LPS resultierte nach 90 min. in einem erheblichen Anstieg an zirkulierendem IL-6. Mittlere Plasmakonzentrationen von 57.772 IU/ml (i.a.-Gruppe), oder 30.617 IU/ml (i.p.-Gruppe) wurden zu diesem Zeitpunkt

gemessen. Nach der subkutanen Applikationen von LPS wurde ein wesentlich geringerer Anstieg an IL-6 in der Zirkulation von 2.527 IU/ml (100 µg/kg) oder 592 IU/ml (10 µg/kg) festgestellt. Die in den vier Gruppen gemessenen Mengen an biologisch aktivem IL-6 unterschieden sich jeweils signifikant (Abbildung 44).

Verglichen mit den i.a. und i.p. mit steriler NaCl-Lösung behandelten Gruppen, zeigten Meerschweinchen, die s.c. die Lösungsmittelinjektion erhielten, geringe, aber signifikant erhöhte IL-6-Plasmakonzentrationen 90 min. nach der Injektion (114 IU/ml; $P = 0,0288$, NaCl s.c. versus NaCl i.a.; $P = 0,0278$, NaCl s.c. versus NaCl i.p.).

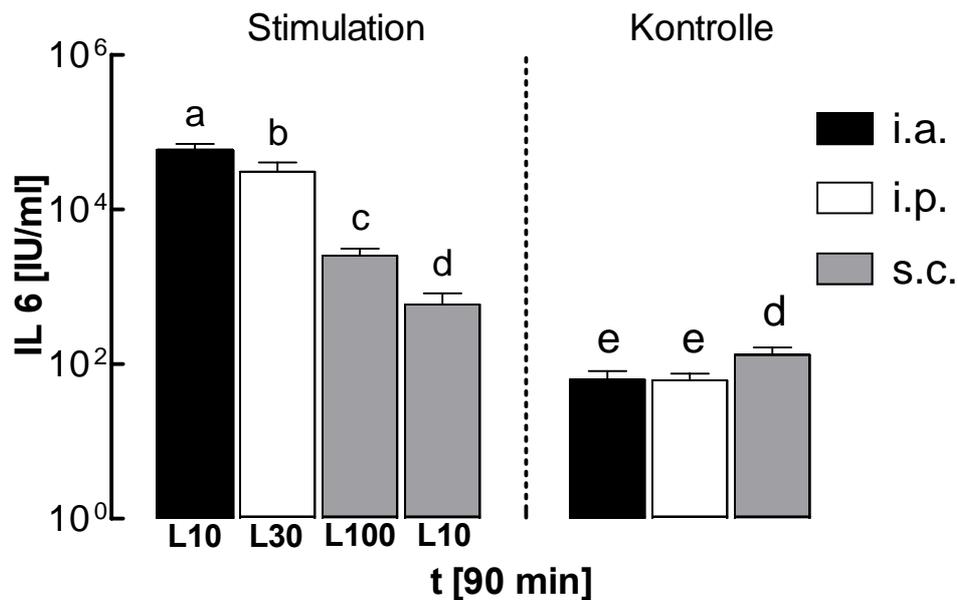


Abbildung 44

Vergleichende Zusammenfassung zirkulierender Spiegel an bioaktivem IL-6 von Meerschweinchen nach Gabe von LPS oder Lösungsmittel in verschiedenen Applikationsformen (i.a., schwarze Säule; i.p., weiße Säule; s.c., graue Säulen) Die unterschiedlichen Gruppen sind identisch zu den in den Abbildungen 39-42 gezeigten Gruppen. Unterschiedliche Buchstaben über den Säulen zeigen signifikante Unterschiede gegenüber den anderen Säulen an ($P < 0.05$). Alle Werte sind als Mittelwerte \pm Standardfehler dargestellt.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass ungeachtet des Injektionsorts die Applikation von LPS beim Meerschwein Fieber erzeugte. Diese Fieberreaktion war begleitet von einer drastischen Erhöhung an IL-6 bei systemischer Applikation. Ein moderaterer Anstieg der Körpertemperatur und besonders der IL-6 Induktion war vorhanden, wenn LPS lokal in die subkutane Kammer injiziert wurde.

1.2. Nukleäre STAT3-Translokation in Gehirnzellen nach systemischer oder lokaler Gabe von LPS

Versuchstiergruppe	Substanz	Injektion/Abkürzung	Dosis	Anzahl der Tiere	Untersuchung
Systemische Inflammation	LPS	i.p.	30 µg/kg	3	1. Kontrolle der Fieberreaktion von -60 - +90 min. 2. Kontrolle der IL-6-Werte {IU/ml} bei +90 min. 3. Immunhistochemie für STAT3 mit DAB Gegenfärbung
		i.a.	10 µg/kg	5	
Lokale Inflammation		s.c.	100 µg/kg	4	
			10 µg/kg	3	
Kontrolle system. Inflammation	NaCl	i.p.	1 ml/kg KG	3	
		i.a.		3	
Kontrolle lokale Inflammation		s.c.		3	

Tabelle 21

Übersichtstabelle der Versuchsreihe zur Untersuchung nukleärer STAT3-Translokationen mit Dosierung, Applikationsform, Anzahl der Tiere und betrachteten Messwerten

Auch diese Versuchsreihe wurde mit 7 Gruppen durchgeführt, die entsprechend wie in Kapitel IV 1.1 behandelt werden. Zur Kontrolle der Versuche zeichnete man die Fieberreaktion auf und ermittelte die biologisch aktiven IL-6-Werte zum Zeitpunkt der Perfusion (90 min. nach Stimulation). Dies ermöglichte eine Überprüfung der Wirksamkeit der durchgeführten Injektionen. Hingegen konnte hier durch den kleineren Stichprobenumfang eine statistische Auswertung nicht durchgeführt werden. Es ist also festzustellen, dass die hier aufgezeichneten Daten lediglich zur Kontrolle für die Aussagekraft der Immunhistologie dienen.

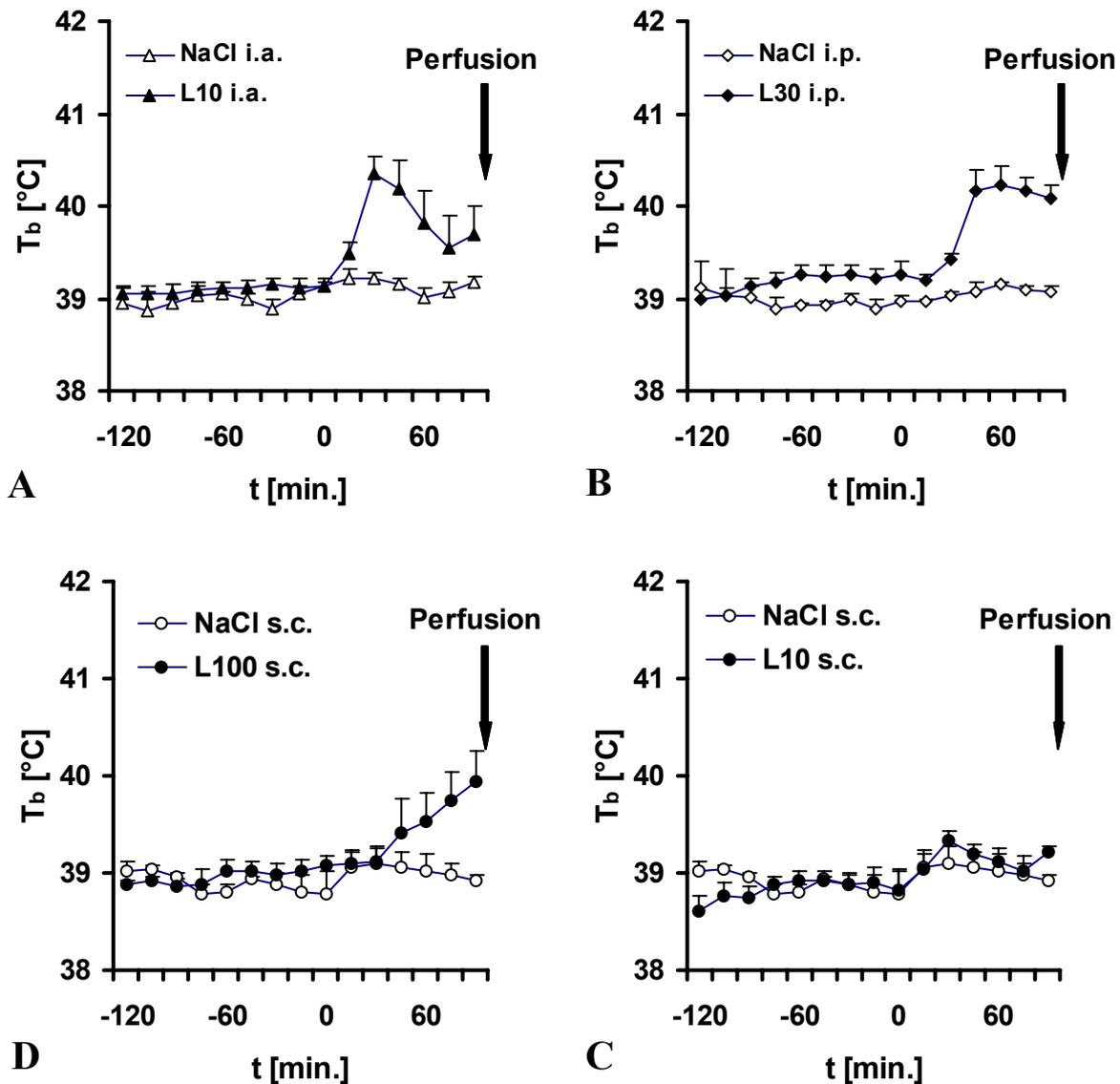


Abbildung 45

Zur Überprüfung der Fieberreaktion (T_b , body temperature) nach systemischer (A, LPS $10 \mu\text{g/kg i.a.}$; B, LPS $30 \mu\text{g/kg i.p.}$) oder lokaler LPS-Stimulation (C, LPS $100 \mu\text{g/kg s.c.}$; D, LPS $10 \mu\text{g/kg s.c.}$) wurden Temperaturkurven im Vergleich zu entsprechenden Kontrollsituation (leere Symbole) aufgezeichnet. Zum Zeitpunkt 90 min. nach Applikation führte man die Perfusion der Meerschweinchen durch. Alle Werte sind als Mittelwerte \pm Standardfehler dargestellt.

Den Abbildung 45 Abbildung 46 ist zu entnehmen, dass die in Kapitel IV 1.1 vorher beschriebenen Verhältnisse auch bei den immunhistologisch untersuchten Tieren vorlagen. Die Stärke des Fiebers korreliert mit der LPS-induzierten Höhe an zirkulierendem IL-6.

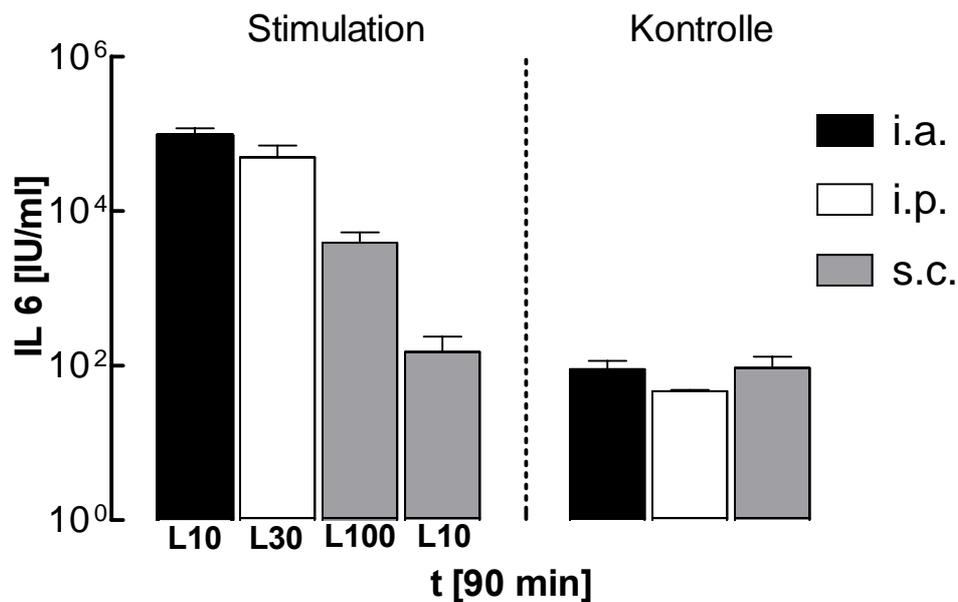


Abbildung 46

Kontrolle der IL-6 Messwerte für die entsprechenden Tiergruppen aus Tabelle 21 und den Fieberreaktionen aus Abbildung 45: Die IL-6 Werte wurden auf einer logarithmischen Skala \pm Standardfehler aufgetragen.

1.2.1. Verteilung der nukleären STAT3-Signale im Meerschweinengehirn

Es sollte getestet werden, ob die Menge an zirkulierendem IL-6, die nach i.a., i.p. und s.c. Gabe von LPS messbar war, ausreichte, um möglicherweise als humorales Signal im Gehirn zu wirken und somit eventuell zur Fieberentstehung beizutragen. Die durch IL-6 erzeugte genomische Aktivierung von Zellen konnte anhand der STAT3-Immunhistochemie kontrolliert werden. Zur Überprüfung der humoralen Hypothese zur Fieberentstehung wurden also Gehirnschnitte 90 min. nach systemischer und lokaler Injektion von LPS oder Lösungsmittel nach dem beschriebenen Protokoll prozessiert (Kapitel III 5).

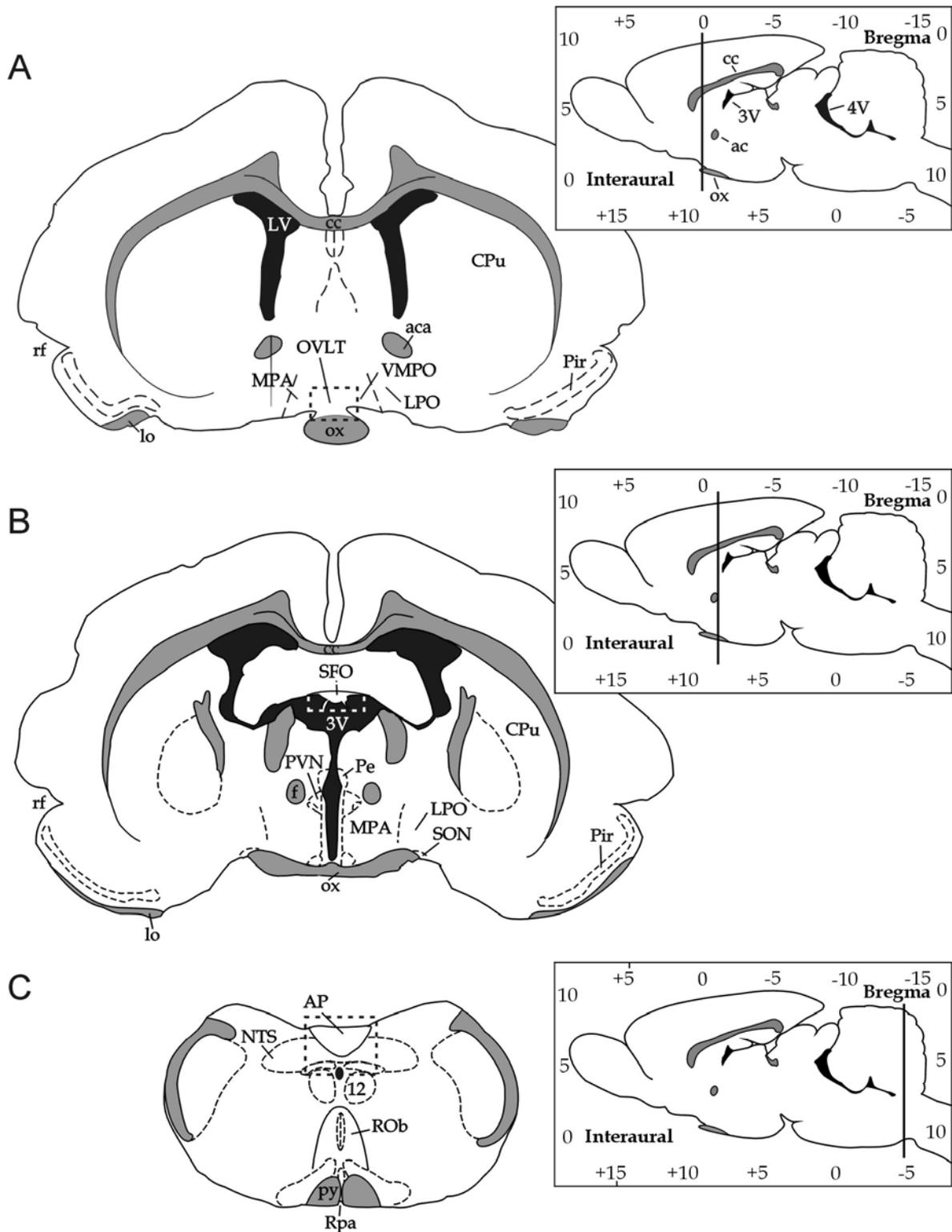


Abbildung 47

Gehirnkartierungen, die transversale Meerschweinchengehirnschnitte repräsentieren. Es werden von rostral nach caudal Ebenen gezeigt, in denen die sensorischen zirkumventrikulären Organe (CVOs) lokalisiert sind {linke Spalte, *Organum vasculosum laminae terminalis* (OVLt); *Organum subfornicale* (SFO); *Area postrema* (AP)}. Die korrespondierenden Ebenen des Rattengehirns (rechte Spalte, schwarze vertikale Linien) sind schematisch in Sagittalansicht rechts illustriert. Die obere Skala der mittleren Sagittalebene des Rattengehirns hat ihren Ursprung im Bregmapunkt, die untere bezieht sich auf die Position der intraauralen Linie. (siehe auch Kapitel III 7.1)

3V: 3. Ventrikel; 4V: 4. Ventrikel; 12: *Nucleus hypoglossus*; AP: *Area postrema*; cc: *Corpus callosum*; CPu: *Caudate putamen (striatum)*; f: Fornix; lo: *Tractus olfactorius lateralis*; LPO: *Area paeoptica lateralis*; LV: *laterale Ventrikel*; MPA: *Area paeoptica medialis*; NTS: *Nucleus tractus solitarius*; ox: *Chiasma opticum*; OVLT: *Organum vasculosum laminae terminalis*; Pe: *Nucleus periventricularis hypothalami*; Pir: *Cortex piriformis*; PVN: *Nucleus paraventricularis hypothalami*; py: *Tractus pyramidalis*; rf: *Fissura rhinalis*; ROb: *Nucleus raphe obscurus*; RPa: *Nucleus raphe pallidus*; SFO: *Organum subfornicale*; SON: *Nucleus supraopticus hypothalami*; VMPO: *Nucleus praeopticus ventromedialis*.

Es wurden beim Meerschweinchen verteilt über das ganze Gehirn nukleäre Translokationen des Transkriptionsfaktors STAT3 gefunden (Tabelle 22). Zur besseren Übersicht sollen nun anhand von „Brainmaps“ in den relevantesten Ebenen die wichtigsten Hirnregionen dargestellt und anhand einzelner ausgesuchter histologischer Schnitte später demonstriert werden. Es handelt sich dabei um eigens hergestellte Gehirnkartierungen von histologischen Transversalschnitten (siehe Kapitel III 7, Abbildung 47). Die hier verwendete Nomenklatur für das Meerschweinchengehirn wurde mit leichten Modifikationen an die des Rattengehirns (Paxinos, 1998) angepasst.

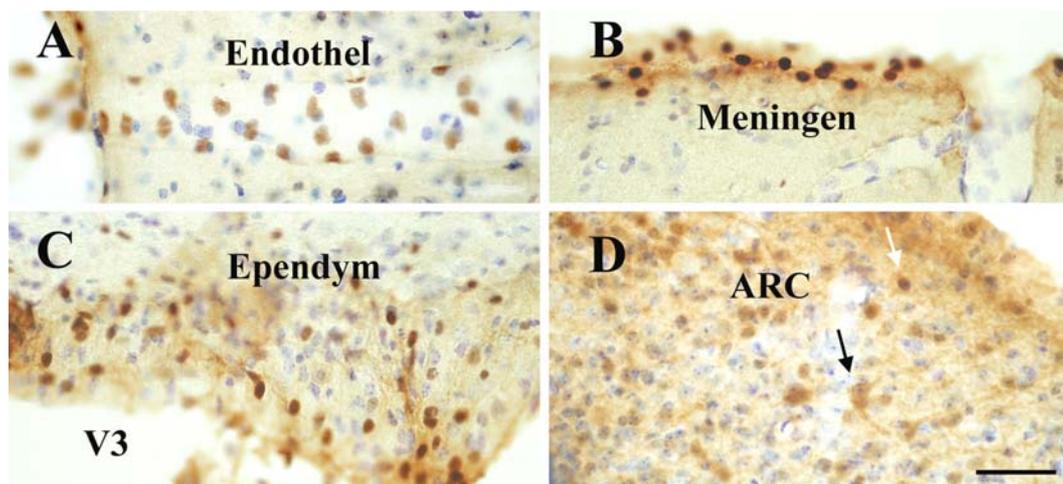


Abbildung 48

Nukleäre STAT3-Signale im Endothel (A), in den Meningen (B) und im Ependym (C), sowie zytoplasmatische (schwarzer Pfeil) und nukleäre (weißer Pfeil) Signale im *Nucleus arcuatus* (ARC). In den Teilbildern A-C sind exemplarisch Signale von Tieren nach i.a. Injektion von LPS gezeigt (10 µg/kg KG). In Teilbild D wurden 10 µg/kg LPS in die subkutane Kammer injiziert. Es finden sich hier auch in Kontrollen zytoplasmatische STAT3-Signale und je nach Tiergruppe auch vereinzelte nukleäre Signale. Der Eichbalken für alle Teilbilder entspricht 50 µm.

Zur Auswertung der Ergebnisse verwendete man das in Kapitel III 5.2.3 erläuterte semiquantitative Schema, um die Verteilung der Signaldichten im Gehirn unter den verschiedenen Versuchsbedingungen aufzuzeigen und miteinander vergleichen zu können. In einigen Hirnstrukturen, wie dem Hippocampus, dem hypothalamischen *Nucleus periventricularis* und dem *Nucleus ventromedialis*, war eine nukleäre Translokation lediglich bei systemischen Applikationsformen (i.a., i.p.) des Pyrogens LPS nachzuweisen. Strukturen wie der *Nucleus arcuatus*, die *Eminentia mediana*, die Meningen, oder endotheliale Zellen zeigten selbst unter Kontrollbedingungen einige wenige nukleäre STAT3-Signale (i.a., i.p.

oder s.c. Injektion von steriler Kochsalzlösung. Die STAT3-Aktivierung erschien in diesen Strukturen durch systemische und zum Teil durch lokale LPS-Behandlung vermehrt stattzufinden (Abbildung 48). Die sensorischen CVOs (AP, OVLT, SFO) und der hypothalamische SON gehörten zu den Regionen, welche verglichen mit den Kontrollen die stärkste nukleäre STAT3-Translokation aufwiesen. Deshalb wurde für diese Regionen sowohl eine qualitative (Kapitel IV 1.2.2.1) als auch eine quantitative (Kapitel IV 1.2.2.2) Dokumentation vorgenommen.

Nukleäre STAT3 Expression

Gehirnstrukturen

10 µg/kg i.a. 30 µg/kg i.p. 100µg/kg s.c. 10 µg/kg s.c. i.a. NaCl NaCl NaCl NaCl s.c.

	LPS	LPS	LPS	LPS	LPS	LPS	NaCl	NaCl	NaCl	NaCl
Vorderhirn										
Hippocampus (CA1-CA3)	++	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Caudate putamen (CPu)	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hypothalamus und präoptische Region										
Nucleus supraopticus (SON)	+++	++	+	-	-	-	-	-	-	-
Nucleus paraventricularis (PVN)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Nucleus periventricularis (Pe)	+++	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Nucleus praeopticus ventromedialis (VMPO)	++	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Nucleus arcuatus (Arc)	++	++	++	+	+	+	+	+	+	+
Zirkumventrikuläre Organe (CVO's)										
Organum vasculosum laminae terminalis (OVLT)	+++	+++	+	-	-	-	-	-	-	-
Organum subformicale (SFO)	++	++	+	-	-	-	-	-	-	-
Area postrema (AP)	+++	+++	++	-	-	-	-	-	-	-
Eminencia mediana (ME)	++	++	++	+	+	+	+	+	+	+
Hirnstamm										
Nucleus tractus solitarius (NTS)	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Anderer										
Meninges	+++	+++	++	+	+	+	+	+	+	+
Endotheliale Zellen	++	++	+	+	+	+	-	-	-	-
Ependymale Auskleidung aller Ventrikel	+++	++	+	-	-	-	-	-	-	-
Plexus choroideus	++	+	+	-	-	-	-	-	-	-

Tabelle 22

Verteilung der nukleären STAT3-Signale im Gehirn des Meerschweinchen nach 90 min. während Kontrollsituation (NaCl-Behandlung) und LPS-Stimulation. Eine Bewertung der relativen Dichten an Signalen wurde anhand eines Fünfpunkteschemas vollzogen: +++ = hohe Dichte, ++ = mittlere bis moderate Dichte, + = niedrige Dichte, - = keine Signale.

1.2.2. STAT3-Signalverteilung in den sensorischen CVOs und dem hypothalamischen *Nucleus supraopticus* (SON).

1.2.2.1. Qualitative Analyse

Ein anschaulicher qualitativer Nachweis einer genomischen Aktivierung von Zellen im Gehirn wurde mittels Dokumentation gefärbter Schnittpräparate geführt (AP, Abbildung 49; OVLT, Abbildung 50; SFO, Abbildung 51; SON, Abbildung 52). Diese Illustrationen wurden für die unterschiedlichen Hirnstrukturen jeweils in gleicher Weise angefertigt. Das Teilbild A gibt dabei einen Überblick über die Lokalisation der betrachteten Hirnregion, in B wird die entsprechende Kontrollsituation dargestellt (für die AP nach s.c. Injektion des Lösungsmittels, für das OVLT nach i.a. Injektion des Lösungsmittels, für das SFO und den SON nach i.p. Injektion des Lösungsmittels). Ungeachtet des jeweiligen Administrationsweges induzierte die Behandlung mit steriler NaCl-Lösung keine nukleäre STAT3-Translokation in den gezeigten Hirnregionen. Eine systemische Pyrogen-Gabe (i.a., i.p.) hingegen resultierte in einer massiv erhöhten Anzahl an STAT3-positiven Zellkernen in den CVOs und dem SON (Teilbilder C und D). Nukleäre STAT3-Signale sind in zwei Vergrößerungen als braune Kerne in jedem Teilbild links und rechts unten genauer dargestellt. Sie unterscheiden sich deutlich von den blau gefärbten Kernen ohne nukleäre STAT3-Immunreaktivität der Kontrollsituation (Teilbilder B-F). Nach Injektion von LPS in die subkutane Kammer in der höheren Dosis (100 µg/kg) wurde eine moderate bis hohe (AP) oder kleine Anzahl (OVLT, SFO) an nukleären STAT3-Signalen beobachtet (Teilbilder E). Geringfügige bzw. gar keine (SFO) genomische Aktivierung von Zellen konnte nach s.c. Injektion von 10 µg/kg LPS festgestellt werden.

Von allen betrachteten CVOs wies die AP die höchsten Zahlen an STAT3-positiven Zellkernen auf (Abbildung 49). Sowohl in den Kontrollen als auch in den LPS-behandelten Meerschweinchen fand man am Rand der AP zum vierten Ventrikel im hohen Maß eine starke STAT3-Immunoreaktivität, die sich wahrscheinlich auf einen so genannten „Randeffekt“ zurückführen lässt. Dabei handelt es sich um eine grundsätzlich erhöhte unspezifische Anfärbbarkeit durch DAB an Schnitträndern und Gewebekanten. Diese Markierungen beinhalteten teilweise auch nukleäre STAT3-Signale wahrscheinlich in Zellen der so genannten *Glia limitans* lokalisiert waren. Im Gegensatz zu LPS-behandelten Tieren konnten in Tieren der Kontrollgruppen nur vereinzelte solcher Signale entdeckt werden. Im dorsalen, motorischen Vaguskomplex, eine unmittelbar der AP angrenzende Hirnregion, zeigte sich eine starke zytoplasmatische STAT3-Immunreaktivität. Darin enthalten war der *Nucleus tractus solitarius* (NTS) und der *Nucleus dorsalis nervi vagi*, in dem lediglich nach i.a. LPS-Gabe einige wenige nukleären Signale gefunden wurden. Aufgrund des überwiegend zytoplasmatischen Ursprungs war eine Aktivierung von Zellen in diesen Hirnstrukturen hieraus nicht abzuleiten. Die Verteilung der nukleären STAT3-Signale innerhalb der AP war nicht homogen. Die Analyse rostraler und caudaler Anteile der AP ergab ein Bild einer gleichmäßigen Verteilung an solchen Signalen über die ganze Struktur hinweg. Speziell in

mittleren Abschnitten konnte eine V-förmige Verteilung an nukleären Signalen am Rande des Übergangs der AP zum NTS festgestellt werden (Teilbild D).

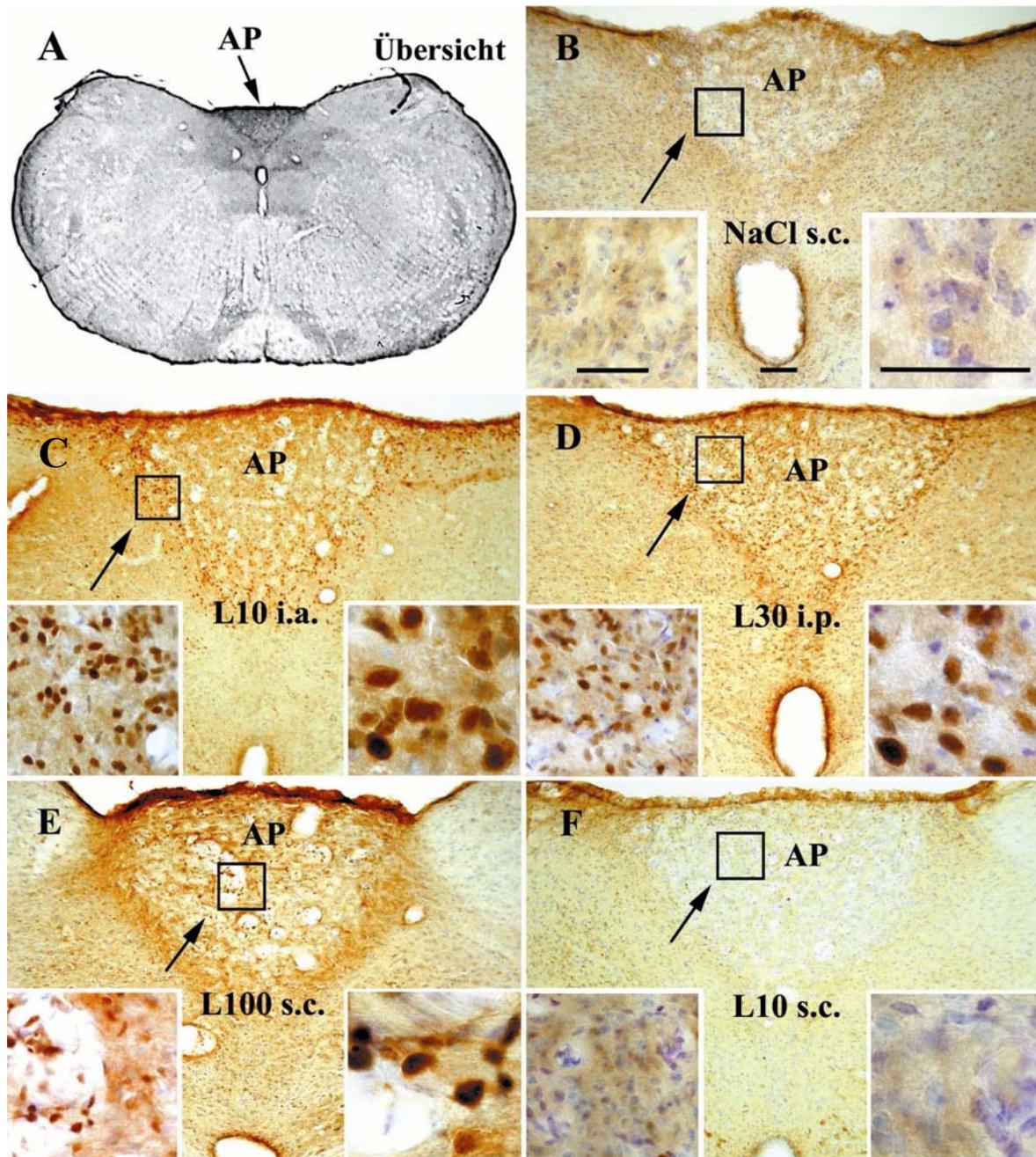


Abbildung 49

STAT3-Immunreaktivität in der *Area postrema* (AP) nach systemischer oder lokaler Applikation von LPS (C, L10, LPS 10 µg/kg i.a.; D, L30, LPS 30 µg/kg i.p.; E, L100, LPS 100 µg/kg s.c.; F, L10, LPS 10 µg/kg s.c.) oder Lösungsmittel (B) beim Meerschweinchen 90 min. nach Injektion: Es sind repräsentative histologische Aufnahmen aus dem mittleren bis caudalen Bereich der AP gezeigt. Teilbild A stellt dabei einen Überblick dar. Die spezifische STAT3-Immunoreaktivität sieht man als braunes Reaktionsprodukt. Die zusätzliche Anfärbung der Schnitte mit Kresylviolett markiert die Kerne und gibt einen allgemeinen Überblick über die neuroanatomischen Strukturen. Der Balken in B entspricht 100 µm, die Balken aus den Vergrößerungen entsprechen 50 µm.

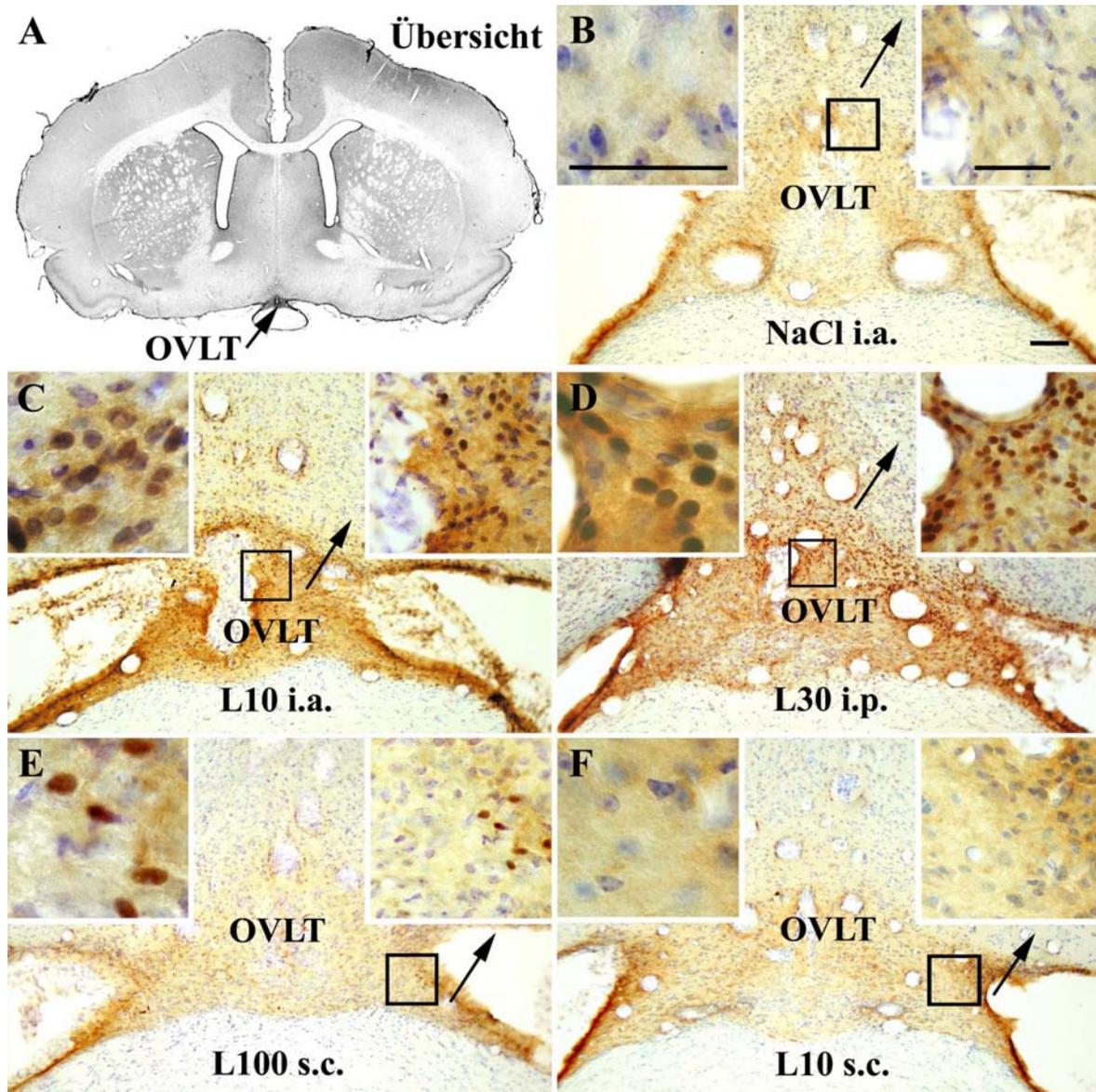


Abbildung 50

STAT3-Immunreaktivität im *Organum vasculosum laminae terminalis* (OVLT) nach systemischer oder lokaler Applikation von LPS (C, L10, LPS 10 µg/kg i.a.; D, L30, LPS 30 µg/kg i.p.; E, L100, LPS 100 µg/kg s.c.; F, L10, LPS 10 µg/kg s.c.) oder Lösungsmittel (B) beim Meerschweinchen 90 min. nach Injektion: Es sind repräsentative histologische Aufnahmen aus dem rostralen bis mittleren Bereich des OVLT gezeigt. Teilbild A stellt dabei einen Überblick dar. Der Balken in B entspricht 100 µm, die Balken aus den Vergrößerungen entsprechen 50 µm.

Nach der AP repräsentierte das OVLT diejenige Hirnstruktur mit den zweitmeisten nukleären STAT3-Signalen nach Stimulation mit LPS (Abbildung 50). Intensive nukleäre STAT3-Markierungen wurden in rostralen und medialen Anteilen dieses CVOs gefunden. Besonders hohe Dichten dieser Signale konnten in dorsolateralen Bereichen des OVLT beobachtet werden, welche an die *Regio paeoptica ventromedialis* angrenzen und übergehen (Teilbild C, D). Bei Tieren, die lokal mit LPS in die subkutane Kammer behandelt wurden, traten nur selten nukleäre Signale auf, die sich dann vorwiegend im lateralen Teil des OVLT befanden. Ähnlich wie bereits für die AP beschrieben zeigten meningeale Zellen hohe

STAT3-Immunreaktivität. Dies beobachtete man vor allem bei Tieren, die systemisch (i.a., i.p.) mit LPS-behandelt wurden.

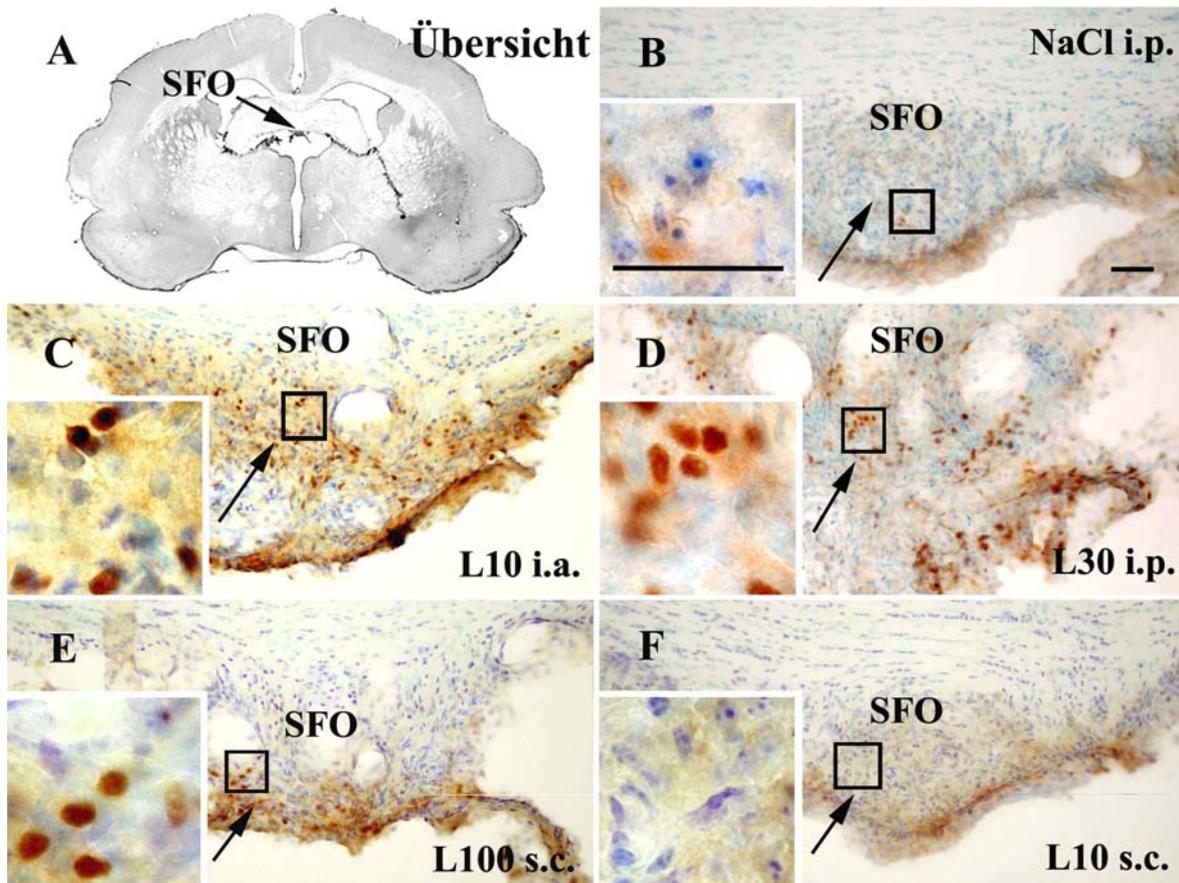


Abbildung 51

STAT3-Immunreaktivität im *Organum subfornicale* (SFO) nach systemischer oder lokaler Applikation von LPS (C, L10, LPS 10 µg/kg i.a.; D, L30, LPS 30 µg/kg i.p.; E, L100, LPS 100 µg/kg s.c.; F, L10, LPS 10 µg/kg s.c.) oder Lösungsmittel (B) beim Meerschweinchen 90 min. nach Injektion: Es sind repräsentative histologische Aufnahmen aus dem mittleren Bereich des SFO gezeigt. Teilbild A stellt dabei einen Überblick dar. Der Balken in B und in der Vergrößerung entspricht 50 µm.

Von allen drei sensorischen CVOs fand man im SFO nach LPS-Behandlung die niedrigste Dichte an STAT3-positiven Zellkernen (Abbildung 51). Während systemische LPS-Gabe zu einer nukleären Translokation über das ganze SFO hinweg führte (Teilbild C und D), verursachten s.c. Injektionen Aktivierungen mehr in lateralen Anteilen dieses CVOs. Als Reaktion auf s.c. Injektion der niedrigeren Dosis an LPS (10 µg/kg) konnten keine nukleären STAT3-Signale nachgewiesen werden.

Interessanterweise resultierte eine LPS-Behandlung in nukleärer STAT3-Aktivierung auch in Zellen von Gehirnregionen, die eine vollständige Blut-Hirn-Schranke besitzen. Zwei Strukturen mit solchen Eigenschaften wurden als der *Nucleus praeopticus ventromedialis* (VMPO) und der hypothalamische SON identifiziert und sind hervorzuheben (Abbildung 52).

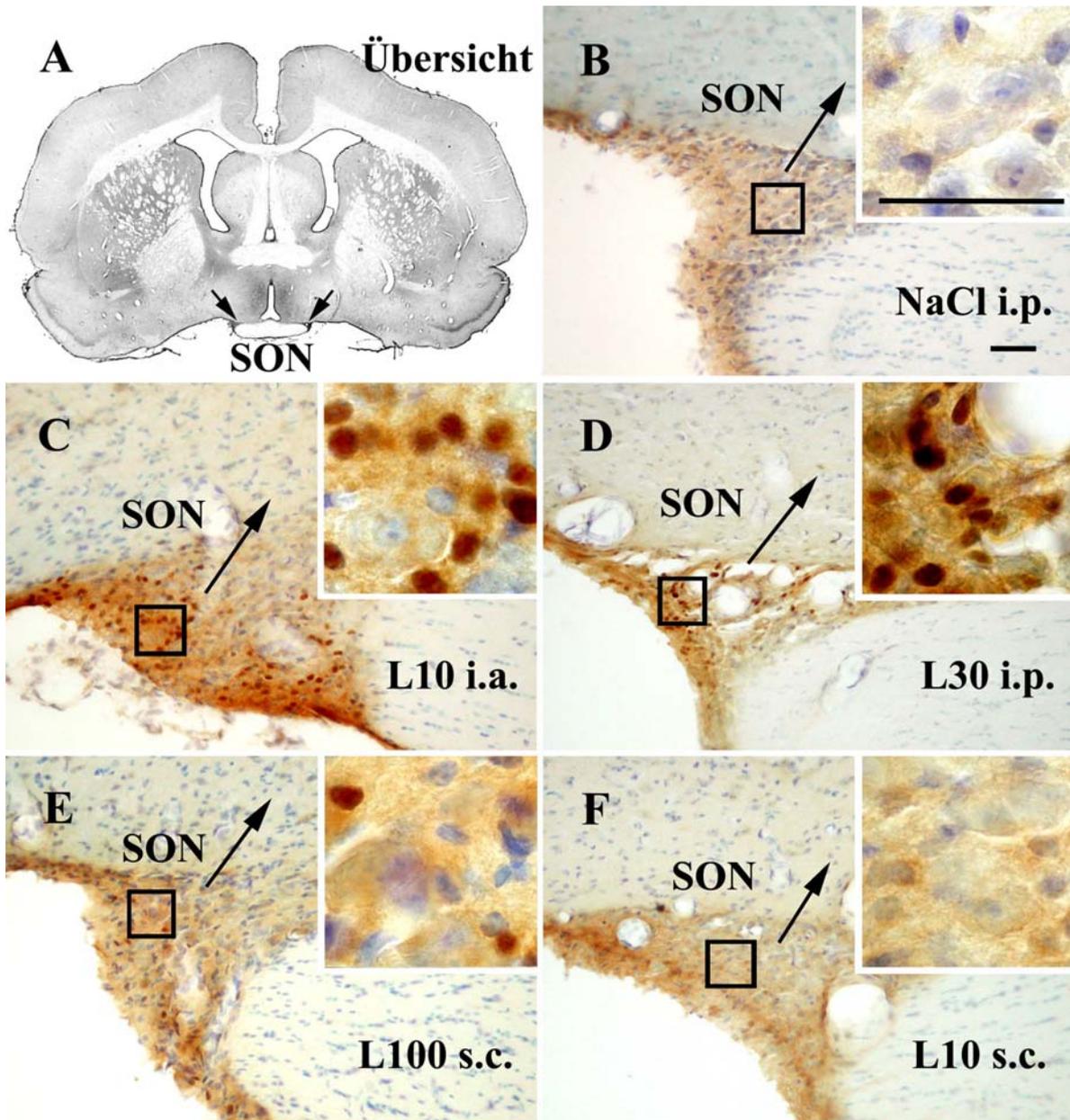


Abbildung 52

STAT3-Immunreaktivität im hypothalamischen *Nucleus supraopticus* (SON) nach systemischer oder lokaler Applikation von LPS (C, L10, LPS 10 µg/kg i.a.; D, L30, LPS 30 µg/kg i.p.; E, L100, LPS 100 µg/kg s.c.; F, L10, LPS 10 µg/kg s.c.) oder Lösungsmittel (B) beim Meerschweinchen 90 min. nach Injektion: Es sind repräsentative histologische Aufnahmen aus dem mittleren Bereich des SON gezeigt. Teilbild A stellt dabei einen Überblick dar. Der Balken in B und der Vergrößerung entspricht 50 µm.

Auch wenn diese zwei Strukturen als unterschiedliche Regionen getrennt von einander aufgelistet wurden, so konnte nach systemischer LPS-Applikation ein kontinuierliches Band an nukleären Signalen vom rostralen VMPO zum caudaler gelegenen SON beobachten werden. In rostralen Anteilen des SON wurde die dichteste nukleäre STAT3-Immunreaktivität beobachtet (Teilbilder C und D).

1.2.2.2. Quantitative Analyse

Zur quantitativen Analyse wurden die detektierten nukleären STAT3-Signale von Hirnschnitten der CVOs und des SON gezählt und ausgewertet. Ungeachtet des Applikationsweges traten höchste Dichten an solchen Signalen in der AP auf. Im Mittel wurden um die 450 STAT3-positive Zellkerne in der AP nach systemischer Gabe von LPS pro Hirnschnitt gezählt. Diese Anzahl reduzierte sich auf 97 positive Kerne in Hirnschnitten von Tieren, die mit 100 µg/kg LPS s.c. behandelt wurden.

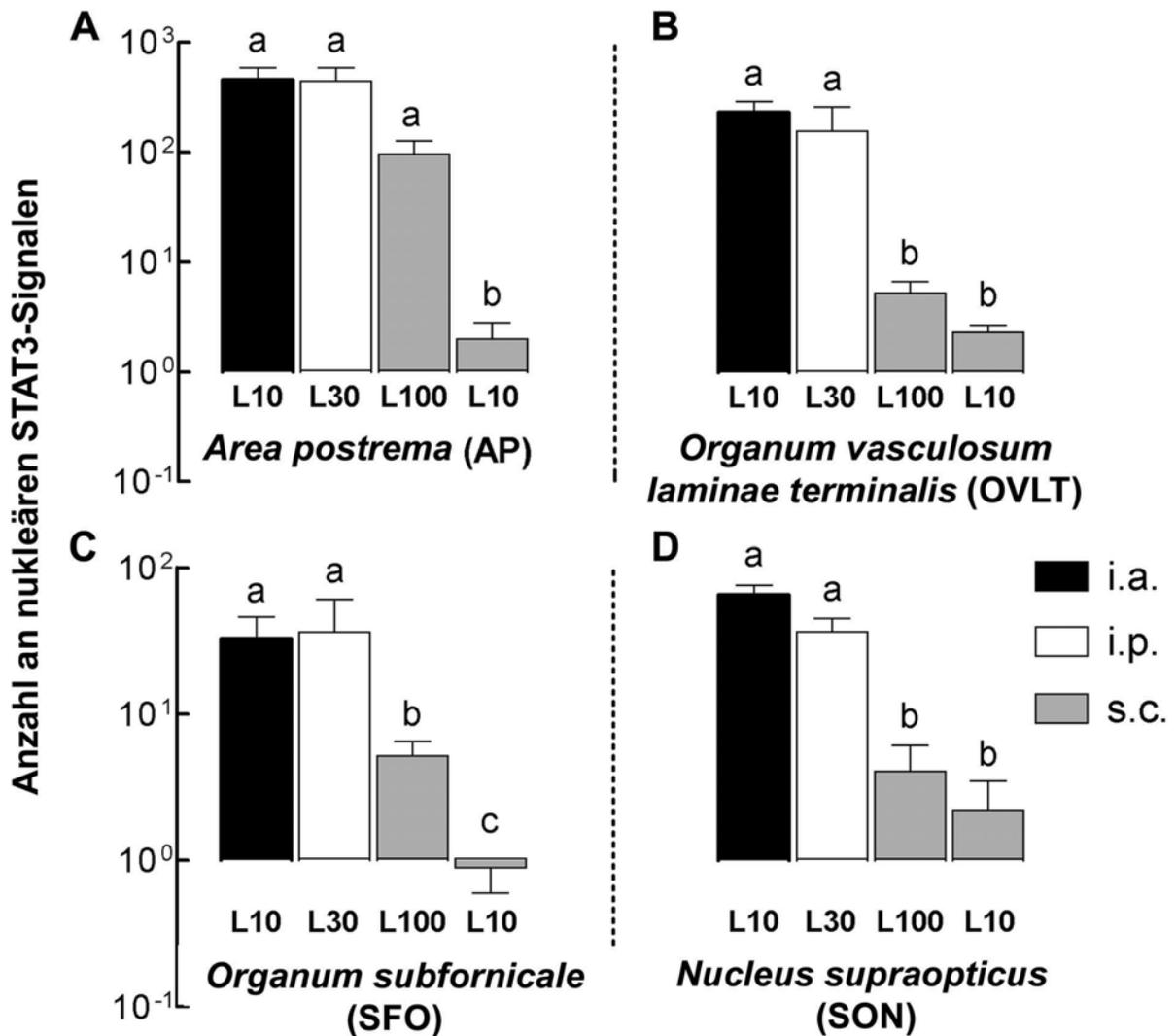


Abbildung 53

Quantitative Auswertung anhand der Anzahl an nukleären STAT3-Signalen in den sensorischen zirkumventrikulären Organen (CVOs) 90 min. nach i.a., i.p. oder s.c. LPS-Injektion: Die Erfassung der Anzahl an STAT3-immunreaktiven Zellkernen in der AP (A), dem OVLT (B), dem SFO (C) oder dem SON (D) ist in den vier verschiedenen LPS-stimulierten Gruppen anhand verschiedenfarbiger Säulen dargestellt (L10, LPS 10 µg/kg i.a., schwarze Säulen; L30, LPS 30 µg/kg i.p., weiße Säulen; L100, LPS 100 µg/kg s.c., linke graue Säule; L10, LPS 10 µg/kg s.c., rechte graue Säule). In den entsprechenden Kontrollgruppen wurden keine nukleären Signale beobachtet. Unterschiedliche Buchstaben über den Säulen zeigen signifikante Unterschiede gegenüber den anderen Säulen an ($P < 0,05$). Alle Werte sind als Mittelwerte \pm Standardfehler dargestellt.

Bei Applikation der niedrigeren LPS-Dosis in die subkutane Kammer (10 µg/kg) wurde eine signifikant niedrigere Zahl von im Mittel nur 3 STAT3-positiven Zellkernen in der AP gezählt. Die Auswertung der nukleären STAT3-Signale im OVLT, dem SFO oder dem SON ergaben ähnliche Resultate. Allerdings waren verglichen mit der AP pro Gehirnschnitt die absoluten Zahlen an STAT3-positiven Kernen kleiner. In diesen drei Strukturen (OVLT, SFO, SON) war der Mittelwert an STAT3-positiven Kernen, nach systemischer Behandlung mit LPS (i.a., i.p.) signifikant höher als bei den Tieren, die lokal mit der höheren (100 µg/kg) oder der niedrigeren Dosis (10 µg/kg) an LPS in die subkutane Kammer stimuliert wurden.

1.2.2.3.Zusammenfassung

Zusammenfassend ist zu sagen, dass das Ausmaß der LPS-induzierten STAT3-Translokation in den CVOs des Meerschweinchenhirnes von der Applikationsform des Pyrogens abhängt und mit den zirkulierenden IL-6-Plasmakonzentrationen korrespondiert. Wie in Abbildung 54 gezeigt, findet man für diesen Zusammenhang in den drei sensorischen CVOs (AP, SFO und AP) einen Korrelationskoeffizienten von 0,69-0,73. Es sind dabei durch entsprechende Symbole die einzelnen Pyrogen-Applikationen und Dosierungen für jedes individuelle Tier und jede Hirnregion aufgeschlüsselt (siehe Legende zu Abbildung 54). Hierbei fällt auf, dass durch die Pyrogen-Applikationsform mit einer gewissen Streuung IL-6 induziert wird und die STAT3-Signale mit den Zytokin-Konzentrationen recht gut korrelieren.

Bemerkenswert ist, dass auch die beim Meerschwein eher moderate zirkulierende IL-6 Werte nach s.c. Injektion von 100 µg/kg LPS durch das Gehirn über die sensorischen CVOs und einige andere Strukturen detektiert werden. Durch die Gabe von 10 µg/kg LPS in die subkutane Kammer wurde zwar Fieber aber keine bzw. fast keine STAT3-Aktivierung induziert.

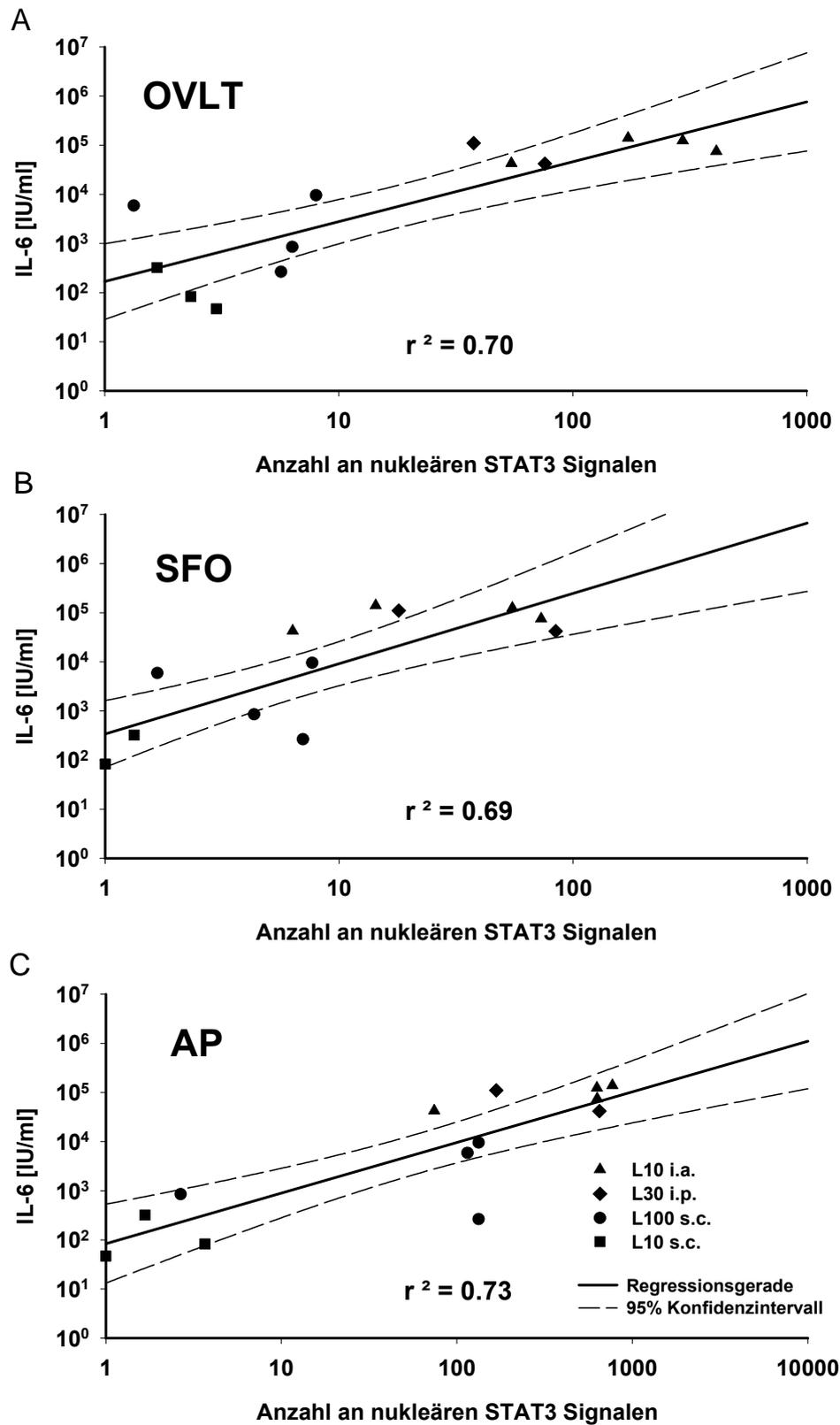


Abbildung 54

Zweifach logarithmische Darstellung der Anzahl an nukleären STAT3-Signalen der einzelnen LPS-behandelten Tiere und die zeitgleich gemessene Konzentrationen an zirkulierendem bioaktivem IL-6 in den sensorischen CVOs (A, OVLT; B, SFO; C, AP). ▲, LPS 10 µg/kg i.a.; ◆, LPS 30 µg/kg i.p.; ●, LPS 100 µg/kg s.c.; ■, LPS 10 µg/kg s.c.; —, 95 % Konfidenzintervall; —, Regressionsgerade

2. Charakterisierung des zellulären Phänotyps der potenziell durch IL-6 aktivierten Zellen

Versuchstiergruppe	Substanz	Injektion/ Abkürzung	Dosis	Anzahl der Tiere	Untersuchung
Systemische Inflammation	LPS	i.p.	30 µg/kg	5	1. Kontrolle der Fieberreaktion -60 - +90 min. 2. Kontrolle der IL-6 Werte {IU/ml} bei +90 min.
Kontrolle	NaCl	i.p.	1 ml/kg KG	2	3. Immunhistochemie mit Doppel- markierungen

Tabelle 23

Übersichtstabelle der Versuchsreihe zur Charakterisierung des Phänotyps potenziell IL-6 aktivierter Zellen mit Dosierung, Applikationsform, Anzahl der Tiere und betrachteten Messwerten

Nach den in Kapitel IV 1 vorgestellten Ergebnissen stellte sich nun die Frage, welche Zelltypen LPS-induziert und IL-6-vermittelt genomisch aktiviert wurden. Es sollte also der Phänotyp derjenigen Zellen ermittelt werden, die eine nukleäre STAT3-Translokation aufwiesen und folglich als Angriffspunkt der Informationsübertragung vom Blut ins Gehirn dienten.

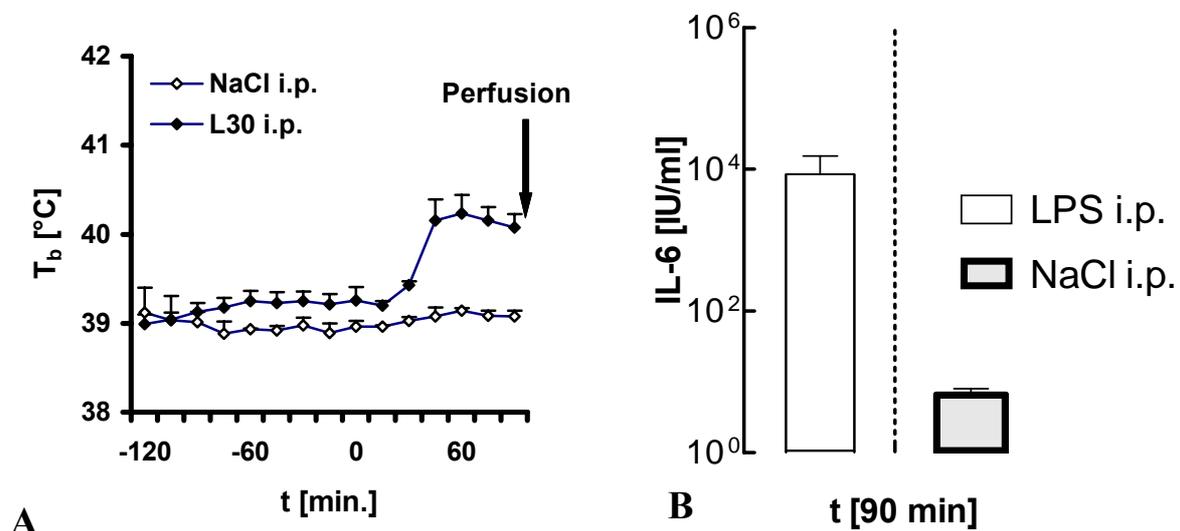


Abbildung 55

Fieberreaktion (A; T_b , abdominale Körpertemperatur) und zirkulierendes Interleukin-6 (B; IL-6) nach Gabe von LPS (30 µg/kg, i.p.; A; schwarze Rauten; B, weiße Säule) oder Lösungsmittel (NaCl; A, weiße Rauten; B, graue Säule). Alle Werte und Säulen sind als Mittelwerte \pm Standardfehler dargestellt.

Bei LPS-behandelten und Kontrolltieren zeichnete man die Körpertemperaturen bis zum Zeitpunkt der Perfusion auf. Zusätzlich wurden die IL-6-Werte 90 min. nach Stimulation zum

Perfusionszeitpunkt der Tiere gemessen. Dadurch konnten Versuchsablauf und die Reaktionen der Tiere überprüft und kontrolliert werden.

Wie bereits festgestellt, waren beide systemischen Applikationsformen bezüglich der Induktion nukleärer STAT3-Signale nicht signifikant unterschiedlich. Deshalb wurde die unkomplizierte Applikationsform der intraperitonealen Injektion gewählt, um den aktivierten Zelltypus beim humoralen Signalweg der Fieberentstehung zu ermitteln. Wie in Abbildung 55 dargestellt, konnte die bereits bekannte Fieber- und IL-6-Induktion festgestellt werden (vgl. Abbildung 41).

Gehirnstrukturen	Nukleäre STAT3-Expression	
	LPS 30 µg/kg i.p.	NaCl i.p.
Vorderhirn		
Hippocampus (CA1-CA3)	n.d.	n.d.
Caudate putamen (CPu)	-+	-
Cortex (C)	+	
Hypothalamus und präoptische Region		
Nucleus supraopticus (SON)	+	-
Nucleus paraventricularis (PVN)	-+	-
Nucleus periventricularis (Pe)	++	-+
Nucleus praeopticus ventromedialis (VMPO)	+	-
Nucleus arcuatus (Arc)	+	-
Zirkumventrikuläre Organe (CVOs)		
Organum vasculosum laminae terminalis (OVLT)	++	-
Organum subfornicale (SFO)	+++	-
Area postrema (AP)	+++	-
Eminencia mediana (ME)	n.d.	n.d.
Hirnstamm		
Nucleus tractus solitarius (NTS)	-+	-
Andere		
Meninges	++	-
Endotheliale Zellen	+++	-+
Ependymale Auskleidung aller Ventrikel	++	-+
Plexus choroideus	++	-

Tabelle 24

Expression der nukleären STAT3-Signale im Gehirn des Meerschweinchen 90 min. nach i.p. Injektion von 0.9 % NaCl-Lösung oder LPS (30 µg/kg i.p.). Eine Bewertung der relativen Dichten an Signalen wurde anhand eines Fünfpunkteschemas vollzogen: +++ = hohe Dichte, ++ = mittlere bis moderate Dichte, + = niedrige Dichte, -+ = einzelne Signale in einigen Fällen, - = keine Signale, n.d. = nicht nachgewiesen.

Zusätzlich wurde auch für diesen Teil der Studie eine Aufschlüsselung über die Expression der nukleären STAT3-Signale angefertigt (siehe Tabelle 24). Im Prinzip entsprach die Stärke der nukleären STAT3-Aktivierungen den in Tabelle 22 zusammengefassten Befunden der ersten Versuchsreihe (Kapitel IV 1.2). Da in dem hier verwendeten Versuchsprotokoll ein anderes Fixierungsprotokoll zugrunde lag (Post-Fixierung) und eine andere Detektionsmethode verwendet wurde, waren die Ergebnisse aus beiden Versuchsreihen nicht uneingeschränkt vergleichbar. Vor allem fiel auf, dass endotheliale Signale weitaus häufiger nach der Fluoreszenzmarkierung zu finden waren. Die Gehirne der mit NaCl-Lösung behandelten Tiere wiesen fast keine nukleären STAT3-Aktivierungen auf, hingegen wurden starke STAT3-Translokationen im Endothel der LPS-behandelten Versuchstiergruppe induziert. Als Gehirnregionen mit STAT3-Aktivierungen erwiesen sich unter anderem der *Cortex* (Abbildung 56, A-C), der *Nucleus arcuatus* (Abbildung 58, E-F), der *Nucleus periventricularis* (Abbildung 58, G-H), der *Plexus choroideus* (Abbildung 58, I-J), die Meninges (Abbildung 58, K-L) und die CVOs, welche die höchsten Mengen an nukleären STAT3-Signalen aufwiesen (Tabelle 22, Abbildung 59). Die *Area postrema* blieb allerdings weiterhin die Region mit den ausgeprägtesten nukleären STAT3-Aktivierungen. Es konnten also prinzipiell die im vorangehenden Abschnitt ermittelten relativen Dichten an über das Meerschweinengehirn verteilten nukleären STAT3-Signalen mit leichten Modifikationen bestätigt werden. Dennoch waren die Ergebnisse nicht identisch zur vorhergehenden Studie (Rummel *et al.*, 2004), speziell was die STAT3-Aktivierung des Hirnendothels betraf.

2.1. vW-positive Endothelzellen und GFAP-positive Astrozyten

Wie bereits in Kapitel III 6.2.3 beschrieben, wurden Bilder durch Überlagerung von Einzelabbildungen erzeugt, die eine Kolo-kalisation von nukleären STAT3-Signalen mit dem Zellmarker vW für Endothelzellen und GFAP für Astrozyten ermöglichten. Wie in der tabellarischen Übersicht der Tabelle 24 ersichtlich, waren endotheliale Signale durch die Lokalisation und Form zu erkennen, was zusätzlich in Abbildung 56 durch die Überlagerung an grünen vW Signalen mit den aktivierten Zellkernen (rosa-rot) dargestellt ist. Es handelte sich hierbei lediglich um Beispiele von kleinen (A) und großen (B) Gefäßen aus dem Bereich des Kortex. Die dicken weißen Pfeile weisen auf nukleäre STAT3-Signale in Endothelzellen dieser Gefäße hin. Verglichen mit den Ergebnissen der vorhergehenden Studie {Kapitel IV 1, (Rummel *et al.*, 2004)} konnte ein großer Unterschied in der Verteilung und Menge an zellulären endothelialen STAT3-Aktivierungen in verschiedenen Gehirnregionen ermittelt werden. In den Bereichen des Kortex, des *Caudate putamen* und in anderen septalen, hypothalamischen oder Hirnstammregionen fand man bei nachträglicher Fixierung der Schnitte geringgradig bis moderate nukleäre STAT3-Translokationen im Endothel des Gehirns (Tabelle 24; Abbildung 56, A-B; Abbildung 57), wo vorher unter Fixierung durch Perfusion keine Signale nachgewiesen werden konnten. Im stark vaskularisierten *Nucleus paraventricularis* (PVN) konnten nur sehr wenige STAT3-Signale ermittelt werden.

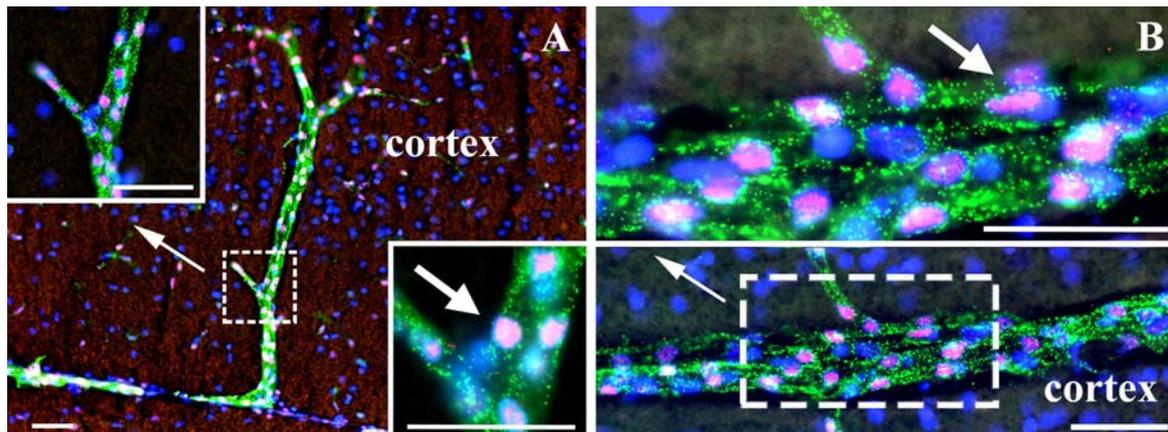


Abbildung 56

Kolokalisation von nukleären (DAPI, blau) STAT3-Signalen (rot) mit dem endothelialen Marker vW (grün) 90 min. nach i.p. Injektion von 30 µg/kg LPS im Gehirn des Meerschweinchens. Es handelt sich hierbei um kleine (A) und große (B) Gefäße. Der Eichbalken in A repräsentiert 100 µm, alle anderen Eichbalken in den Vergrößerungen von A und in den Teilbildern von B entsprechen 50 µm.

Endotheliale STAT3-Signale konnten verteilt über das gesamte Meerschweinchengehirn gefunden werden. Zur Veranschaulichung ist die Verteilung dieser Signale in 3 Schnittebenen des Gehirns in Abbildung 57 dargestellt. Diese Skizzierung der Verteilung an endothelialen nukleären STAT3-Signalen konzentriert sich auf die Gehirnregionen mit den höchsten Mengen an STAT3-aktivierten Zellen, nämlich den drei sensorischen CVOs.

Es ist anhand der großen Zahl aktivierter Endothelzellen deutlich zu erkennen, dass das Endothel ein wichtiger Angriffspunkt der LPS-induziert IL-6-vermittelten Wirkung über STAT3 zu sein scheint.

Es wurden zusätzlich weitere wichtige Gehirnregionen zur qualitativen Beurteilung zusammengestellt. In Abbildung 58 wurden im Vergleich von GFAP-positiven und vW-positiven Zellen der *Nucleus arcuatus* (E, ARC), der *Nucleus periventricularis* (G, Pe), der *Plexus choroideus* (I, choroid plexus) und die Meningen (K, meninges) im Bezug auf ihre nukleäre STAT3-Translokation dargestellt. Endotheliale Signale sind hierbei ebenfalls in allen Regionen zu finden. Astrozyten schienen nur im ARC und in den Meningen eine Rolle bei der STAT3-Informationsübertragung zu spielen. Sowohl periventrikulär (Pe,) als auch im *Plexus choroideus* gab es keine entsprechenden Kolokalisationen. Außerdem war im Pe eine gewisse Zellpopulation weder mit vW noch mit GFAP zu überlagern. Weniger ausgeprägt für den ARC und die Meningen konnte entsprechend zumindest nicht ausgeschlossen werden, dass zusätzlich ein dritter Zell-Phänotyp mit nukleären STAT3-Signalen vorlag. Der *Plexus choroideus* hingegen erwies sich im Bezug auf die STAT3-Responsivität in Form der roten nukleären Signale als fast vollständig endothelial getragen, da sie fast immer mit vW (grün) kolokalisierten (Teilbild I). Insgesamt war die Anzahl der STAT3-aktivierten Astrozyten generell über das ganze Gehirn hinweg viel niedriger als die Menge an nukleären STAT3-Translokationen in Endothelzellen. Im Kortex konnte zum Beispiel nicht dargestellt werden, dass außer endothelialen auch astrozytäre nukleäre STAT3-Aktivierungen stattgefunden hatten. Folglich scheinen im Kortex hauptsächlich Endothelzellen die reaktiven Zelltypen zu sein, die bei der verwendeten LPS-Dosierung mit einer STAT3-Translokation reagieren.

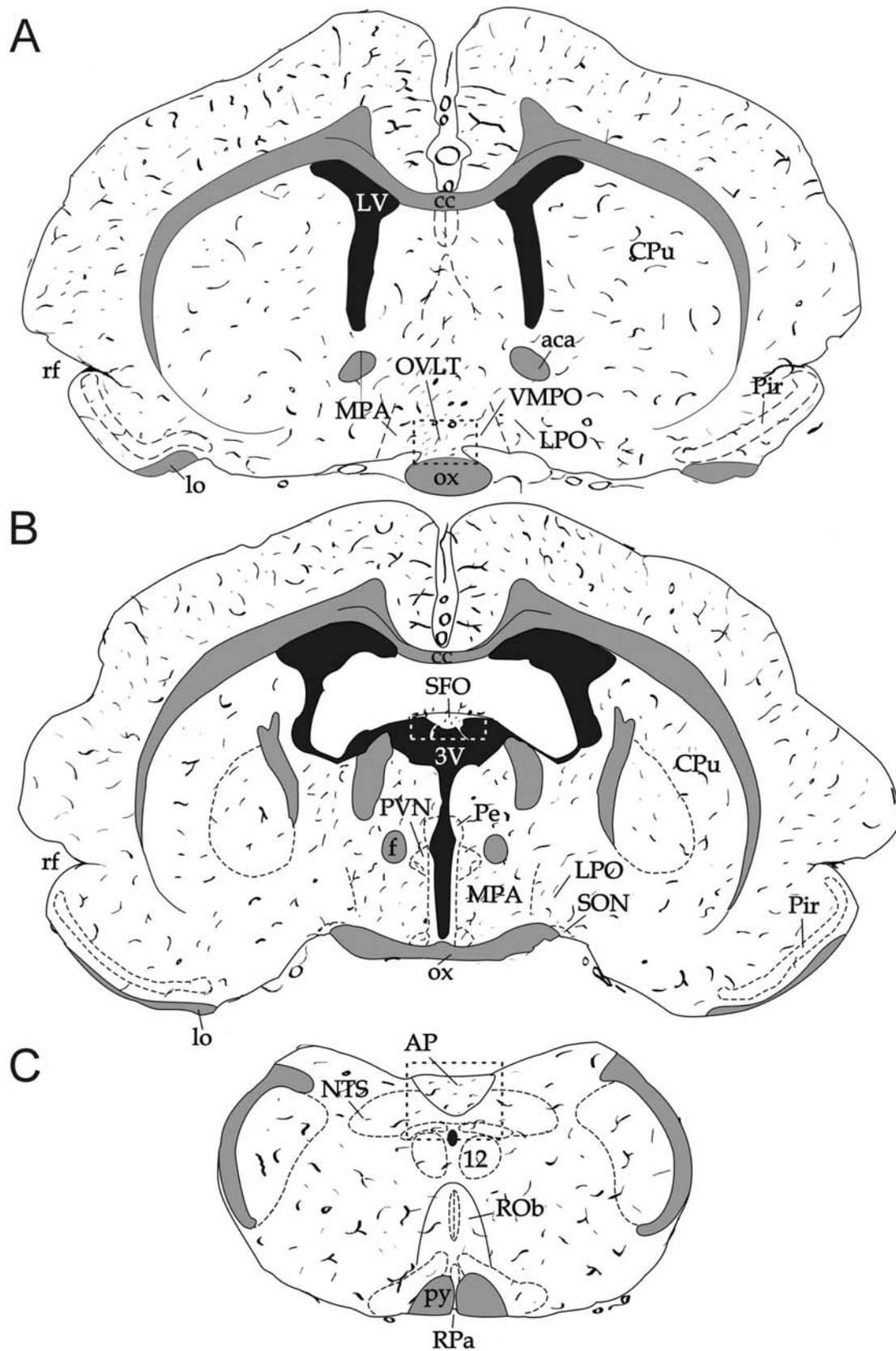


Abbildung 57

Darstellung der Verteilung an nukleären STAT3-Signalen in Gefäßendothelien des Meerschweinergehirns 90 min. nach LPS-Stimulation (30 µg/kg KG i.p.). Es sind „Brainmaps“ der Ebenen 1, 3 und 6 dargestellt. (Siehe Abbildung 47, Kapitel III 7.1)

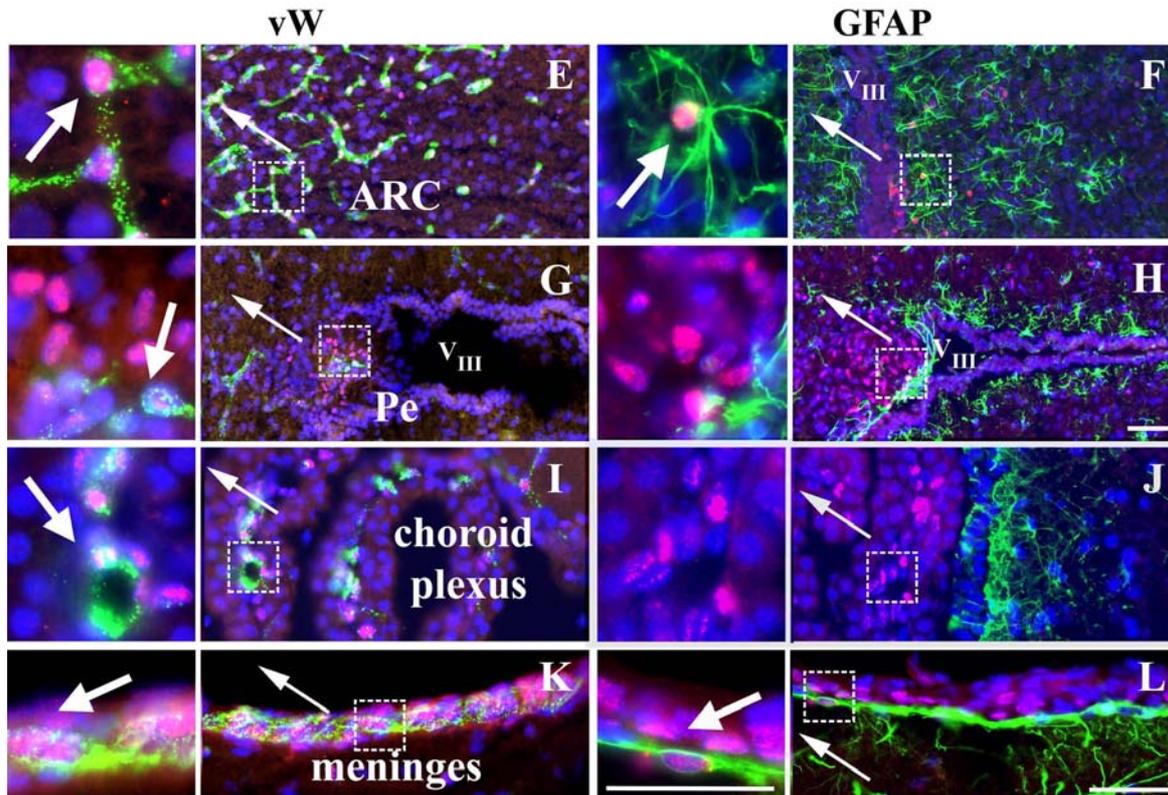


Abbildung 58

Kolokalisation von nukleären STAT3-Signalen mit dem endothelialen Marker vW (dicke weiße Pfeile) im *Nucleus arcuatus* (E, ARC), im *Nucleus periventricularis* (G, Pe), *Plexus choroideus* (I, choroid plexus) und in den Meningen (K, meninges). Gleichzeitig wurden Doppelmarkierungen (dicke weiße Pfeile) derselben Strukturen mit dem astrozytären Marker GFAP vorgenommen (F, H, J, L). Alle Eichbalken entsprechen 50 μm . Der Balken in H gilt für Abbildungen E-H, der in L bezieht sich auf I-L. Alle vergrößerten Teilbilder sind gleichermaßen auf den Balken in L zu beziehen.

Der immunhistochemische Nachweis anderer mikroglialer oder neuronaler Zellmarker funktionierte beim Meerschwein nicht, oder es konnte keine Kolokalisation mit den STAT3-Signalen dokumentiert werden. Da der neuronale Marker NeuN nicht alle Neurone markiert, sind die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Versuche mit fehlender Kolokalisation umgekehrt aber auch kein endgültiger Beweis dafür, dass es keine neuronale STAT3-Aktivierung gab. Neben den markanten Aktivierungen von Endothelzellen und Astrozyten konnten somit in unseren Versuchen keine weiteren STAT3-responsiven Zelltypen nachgewiesen werden.

2.1.1. Verteilung vW-positiver Endothelzellen und GFAP-positiver Astrozyten in den CVOs

Für die sensorischen zirkumventrikulären Organen (CVOs) und den hypothalamischen *Nucleus supraopticus* wurde entsprechend der in Kapitel IV 1.2.2 beschriebenen Versuchsreihe eine Bildtafel angefertigt, in der wiederum die Verteilung an nukleären STAT3-Signalen 90 min. nach LPS-Gabe in einer Dosis von 30 $\mu\text{g}/\text{kg}$ zu sehen ist (Abbildung 59). Dies geschah in der Übereinstimmung mit der Tatsache, dass bereits in früheren Studien an der Ratte und dem Meerschwein (Kapitel IV 1.2.2) die sensorischen

CVOs Gehirnregionen mit den höchsten Mengen an STAT3-aktivierten Zellen darstellten (Harre *et al.*, 2002; Harre *et al.*, 2003; Roth *et al.*, 2004; Rummel *et al.*, 2004). Nun wurde speziell die Verteilung vW- und GFAP- positiver Zellen mit STAT3-aktivierten Zellen verglichen. Es fanden sich gleichmäßig verteilt nukleäre STAT3-Translokationen im Endothel dieser Gehirnregionen (linke Spalte). GFAP-positive Signale waren in der AP allerdings weitaus häufiger zu ermitteln als vW-positive. Anders wiesen das OVLT, das SFO und der SON eher gleichermaßen viele endotheliale wie astrozytäre genomisch aktivierte Zellen auf. Im SFO und im OVLT konnte zusätzlich eine Population von Zellen gefunden werden, die weder mit dem einen noch mit dem anderen Marker zu überlagern war. Ein nicht identifizierbarer Zell-Phänotyp konnte auch für den SON und die AP zumindest nicht ausgeschlossen werden. Hervorzuheben war, dass das SFO sich in zwei anatomische Einheiten aufzuteilen schien. Der äußere Ring konnte von einem inneren Kernanteil unterschieden werden. Dabei zeigte der Randbereich viele astrozytäre nukleäre STAT3-Translokationen, während im zweiten Anteil keine Kolo-kalisation mit GFAP nachweisbar war. Zusätzlich kennzeichneten sich craniale und caudale Regionen des SFO durch weitere astrozytäre genomische Aktivierungen auch in der zentralen Region. Insgesamt stellte sich ein Bild dar, dass ein zentraler Kern des SFO von allen Seiten durch einen Randbereich umschlossen wurde, der astrozytär geprägt war. Diese anatomisch gegebene substrukturelle Verteilung der Astrozyten ist in Abbildung 60 (B, D, F) durch Schnitte aus cranialen, mittleren und caudalen Anteilen des *Organum subfornicale* dargestellt. Es handelte sich hierbei um Präparate, die beispielhaft eine Kontrollsituation darstellen (NaCl i.p.). In den CVOs waren nach NaCl Applikation keine nukleären STAT3-Signale zu finden.

Substrukturen von Gehirnregionen waren bereits für die AP festgestellt worden. Auch bezüglich der LPS-induzierten nukleären STAT3-Signale war in diesem CVO ein charakteristisches Verteilungsmuster festzustellen. Dieses Muster bestand darin, dass sowohl craniale als auch caudale Schnitte eine gleichmäßige Verteilung an solchen Signalen über die ganze Gehirnstruktur hinweg aufwiesen (siehe Abbildung 49, Teilbild D). Mittlere Schnittpräparate zeigten hingegen eine V-förmige Verteilung entlang des Grenzbereiches der AP (Abbildung 49, Teilbild C). Die Beobachtung konnte in dieser Versuchreihe mit modifizierter immunhistochemischer Methode ebenfalls nachgewiesen werden (Abbildung 60, A, C, E). Auch hier war ein zentraler Bereich dieses CVOs von allen Seiten von einer Substruktur umgeben, die sich in diesem Fall jedoch als besonders STAT3-aktiviert darstellte. Die Verteilung an Astrozyten war im Gegensatz dazu gleichmäßig und davon unabhängig (Abbildung 59, B).

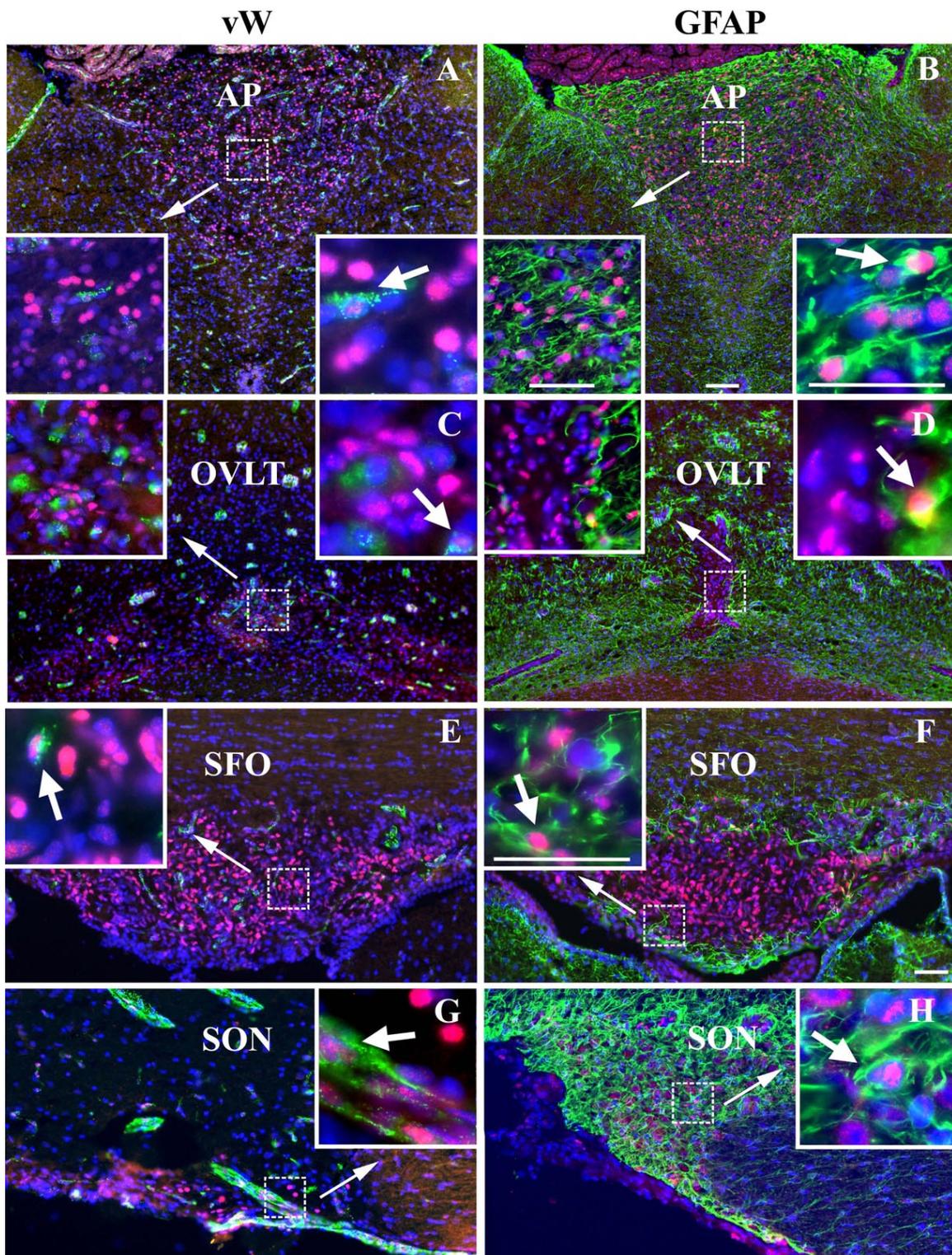


Abbildung 59

Kolokalisation von nukleären STAT3-Signalen mit dem endothelialen Marker vW (dicke weiße Pfeile) im cranialen bis mittleren Anteil der *Area postrema* (A, AP), im mittleren Anteil des *Organum vasculosum laminae terminalis* (C, OVLt), im mittleren Anteil des *Organum subfornicale* (E, SFO) und im *cranio-medialen* Anteil des hypothalamischen *Nucleus supraopticus* (G, SON). In der rechten Bildhälfte sind Doppelmarkierungen (dicke weiße Pfeile) STAT3-positiver Zellkerne derselben Strukturen mit dem astrozytären Marker GFAP dargestellt (B, D, F, H). Der Eichbalken in Abbildung B entspricht 100 μm, alle anderen Balken repräsentieren 50 μm. Gleiche Maßstäbe gelten jeweils für A-D und E-H.

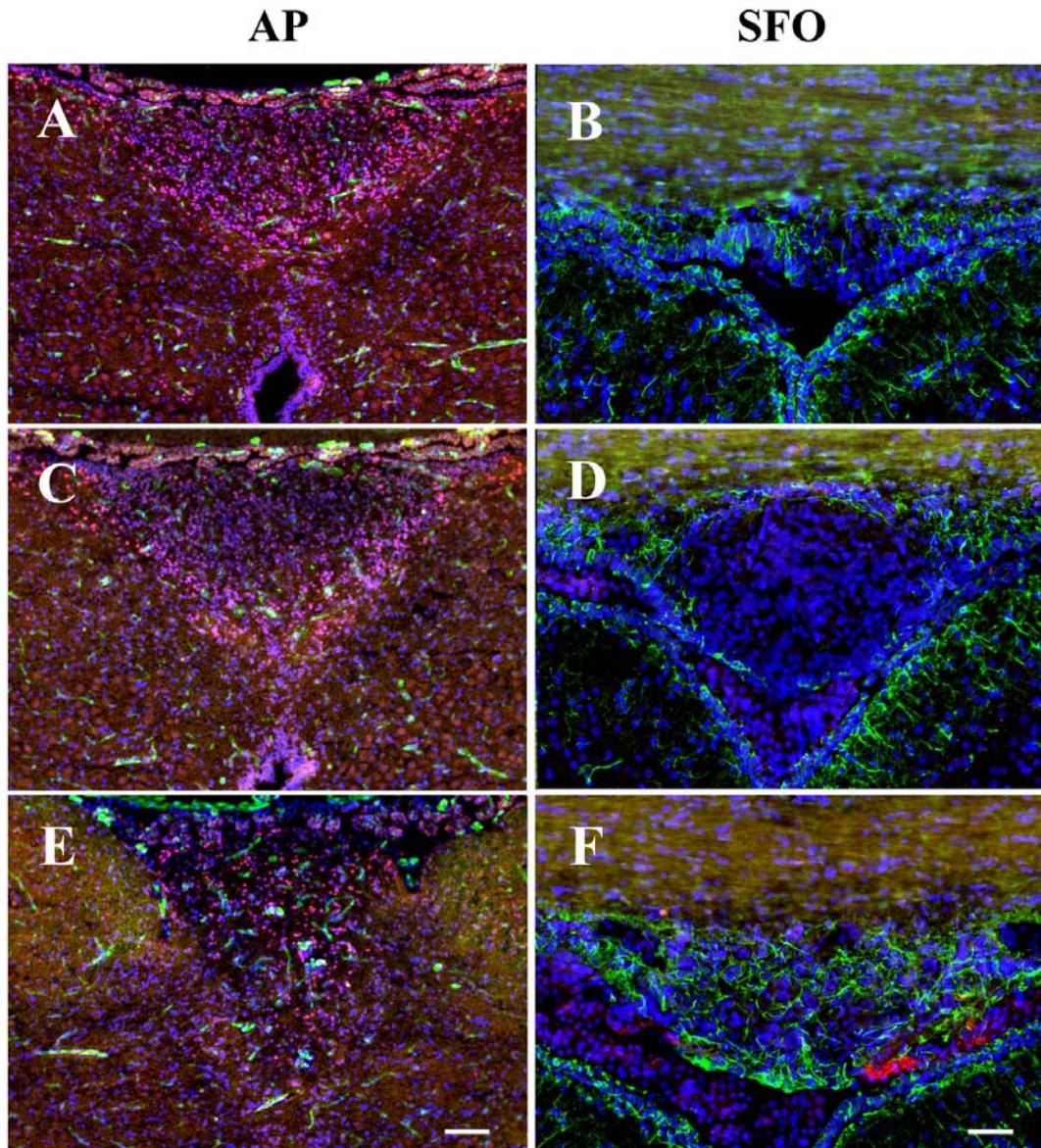


Abbildung 60

Aufteilung der *Area Postrema* (AP, Bild A, C, E) und des *Organum subfornicale* (SFO, Bild, B, D, F) in Substrukturen. Es sind craniale (A-B) mittlere (C-D) und caudale (E-F) Transversalschnitte dieser Gehirnregionen jeweils eines Tieres gezeigt. In der linken Spalte wurde nach Pyrogen-Behandlung, in der rechten nach NaCl-Gabe perfundiert. Damit sind rote nukleäre STAT3-Signale nur in Bildern A, C und E zu sehen, die entsprechend in B, D und F gezeigten Kontrollsituation fehlen. Eine Kolokalisation dieser STAT3-Translokationen wurde (in grün) links mit vW durchgeführt. Rechts ist die Verteilung GFAP-positiver Zellen dargestellt. Kerne wurden (in blau) mit DAPI sichtbar gemacht. Der Eichbalken in Abbildung E entspricht 100 μm , der in Abbildung F 50 μm . Sie gelten jeweils für die darüber liegenden Teilbilder.

Auch in dieser Studie wurde eine quantitative Auswertung vorgenommen. Das in Kapitel III beschriebene Auszählverfahren erbrachte folgende Resultate. Zunächst ist festzustellen, dass in der AP und im SFO etwa 40 % und im OVLT 30-35 % aller DAPI positiven Kerne STAT3-positiv waren. Von diesen Zellen mit einer nukleären STAT3-Translokation erwiesen sich in allen drei untersuchten Gehirnregionen ca. 20 % als vW-positive Endothelzellen. Nur in der zentralen Region des SFO waren es lediglich 10 %. Die Verteilung an GFAP-positiven

Astrozyten war vor allem in der AP besonders hoch. Hier waren ca. 80 %, im Randbereich des SFO 25 % und im OVLT 20 % aller Zellen mit nukleären STAT3-Signalen ebenfalls mit GFAP kolokalisierbar. In der zentralen Region des SFO konnten keine GFAP-positiven Zellen gefunden werden. Folglich waren damit fast alle STAT3 positiven Zellen der AP phänotypisch charakterisiert. Zumindest gab es hierbei im Gegensatz zu den anderen Regionen keine größere Zellpopulation, die nicht identifiziert werden konnte. Im SFO und im OVLT bleibt die Charakterisierung von immerhin ca. 50 % der STAT3-responsiven Zellen zunächst offen.

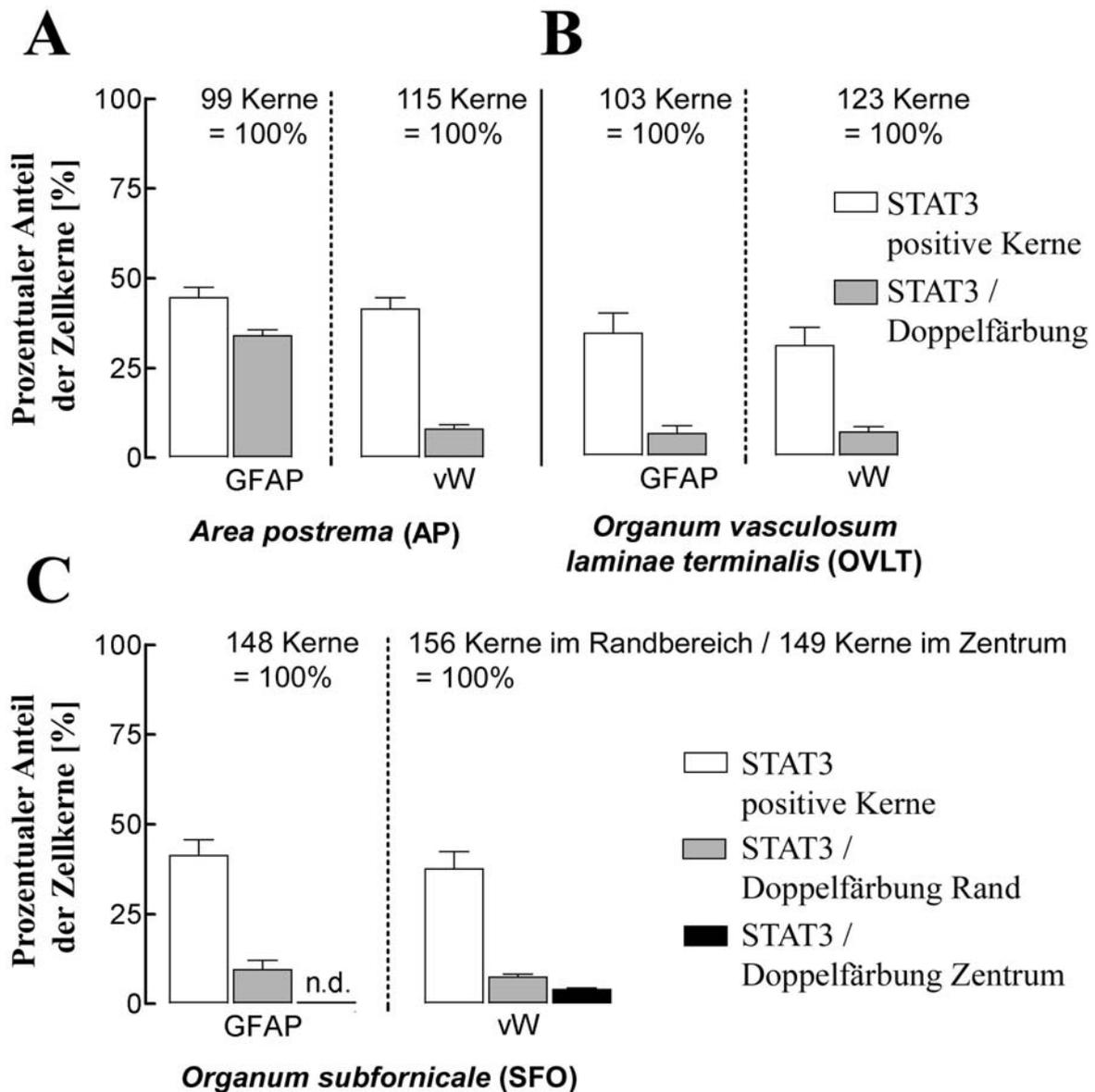


Abbildung 61

Quantitative Analyse des Prozentsatzes an STAT3-positiven Zellkernen (verglichen mit allen DAPI positiven Kernen) und ihres Anteils, der mit dem astrozytären Marker GFAP oder dem endothelialen Marker vW kolokalisierte. Es wurden hierzu fünf Tiere in den sensorischen CVOs 90 min. nach Pyrogen-Gabe (LPS 30 µg/kg KG) untersucht. Die Anzahl an DAPI positiven Kernen wurde dafür als Basis auf 100 % gesetzt. Alle Werte sind als Mittelwerte ± Standardfehler angegeben.

Insgesamt scheinen Astrozyten in den sensorischen zirkumventrikulären Organen eine gleichwertige oder, wie vor allem in der AP festgestellt, sogar größere Bedeutung für die IL-6-vermittelte STAT3-Aktivierung im Gehirn zu haben als Endothelzellen.

2.2. NADPH-Diaphorase-positive Zellen

In dieser Versuchsreihe wurden von jedem Tier (Tabelle 23) 2-3 doppelgefärbte Schnitte aus dem Bereich des SFO wieder verwendet. Es sollten mit dieser Methode des enzymhistochemischen Nachweises von Neuronen versucht werden, die unidentifizierten Zell-Phänotypen in der zentralen Region des SFO weiter zu charakterisieren. Wie schon in Kapitel III 8.2.2 beschrieben, ließen sich mit diesem Verfahren zum Beispiel kortikale Neurone sehr gut nachweisen.

Im Bereich des zentralen Anteils des SFO waren keine NADPH-Diaphorase-positiven Zellen nachweisbar. Im Randbereich dieses sensorischen zirkumventrikulären Organes allerdings konnten, wie in Abbildung 62 dargestellt und mit dicken weißen Pfeilen hervorgehoben, Zellen dargestellt werden.

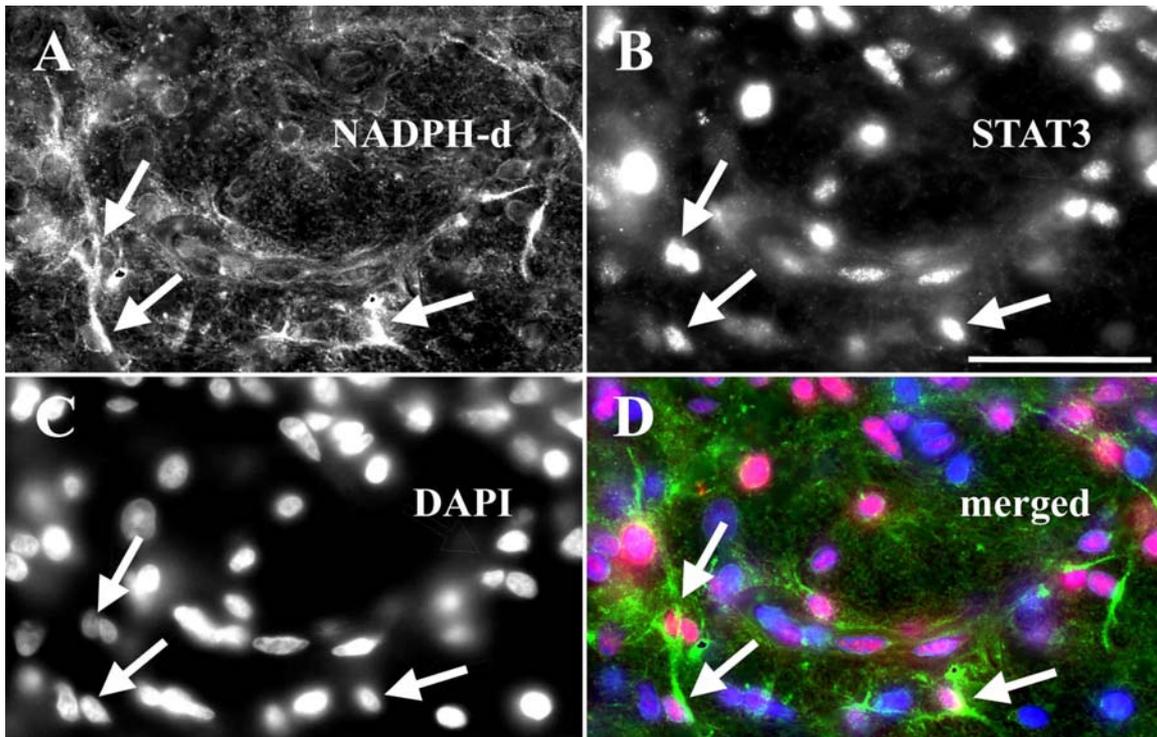


Abbildung 62

Zellen mit NADPH-Diaphorase-Aktivität im annulären Randbereich des *Organum subfornicale* 90 min. nach Pyrogen-Behandlung im Gehirn des Meerschweinchens (LPS 30 µg/kg KG i.p.): Es sind in Einzelphotographien die Diaphoraseaktivität (A), nukleäre STAT3-Signale (B) und mit DAPI angefärbte Zellkerne (C) dargestellt. Durch Übereinanderlagern von A-C erhält man Bild D. DAPI positive Kerne wurden hier in blau, nukleäre STAT3-Signale in rot und eine Diaphoraseaktivität in grün eingefärbt. Die weißen Pfeile zeigen STAT3-positive Zellen, die mit dem Zellmarker NADPH-Diaphorase kolokalisieren.

3. Die Rolle von Prostaglandinen bei der Fieberentstehung im Modell der lokalen Inflammation

Nachdem, wie in Kapitel IV 2 gezeigt, Astrozyten und Endothelzellen offensichtlich über IL-6 aktiviert werden, stellt sich die Frage, ob diese genomische Aktivierung in einem unmittelbaren Zusammenhang zur Fieberentwicklung steht. Die Wirkung des endogenen Pyrogens IL-6 auf Gehirnzellen wurde im Rahmen dieser Doktorarbeit über den Nachweis der Aktivierung des Transkriptionsfaktors STAT3 untersucht. Dieser reguliert über spezifische Promotoren die Genexpression für einige Botenstoffe und Substanzen der aktivierten Zelle. Wie bereits in Kapitel II 5 beschrieben, gibt es bisher nur unzureichende Untersuchungen über die STAT3 vermittelte Genexpression.

Weithin ist akzeptierter Stand der Forschung, dass Prostaglandine an der Entstehung von Fieber beteiligt sind. Diese werden während der Fieberentstehung produziert. Man geht dabei von einer Aktivierung bzw. Hemmung von thermosensiblen Neuronen unter anderem durch Prostaglandin E₂ (PGE₂) aus (siehe Kapitel II 1.1.1, 1.1.3 und 5). Schließlich resultiert dies in einer Temperatur-Sollwertverstellung, also dem Fieber. Man nimmt an, dass durch verschiedene Interaktionen von warm- und kaltsensitiven Neuronen der Thermodifferenzbereich mit seiner Unter- und Obergrenze so beeinflusst wird, dass die Körperkerntemperatur im Ganzen ansteigt. Deshalb konzentriert sich der letzte Abschnitt des experimentellen Teils dieser Arbeit auf eine vergleichende Analyse der Rolle von Prostaglandinen bei der Fieberentstehung im Rahmen systemischer und lokaler inflammatorischer Reaktionen.

3.1. Induktion von COX-2 im Gehirn

Zyklooxygenasen stellen Enzyme dar, die möglicherweise durch Aktivierung von Transkriptionsfaktoren, wie z.B. NF- κ B und STAT3, direkt oder indirekt induziert werden könnten. Sie sind die Schlüsselenzyme der Prostaglandin-Synthese. Da die gesteigerte Produktion von Prostaglandinen im Verlauf inflammatorischer Prozesse von der induzierbaren Form der Zyklooxygenase (COX-2) in Geweben wie dem Gehirn abhängig ist, wurde die Expression dieses Enzyms in Kooperation mit einem Labor aus Karlsruhe (siehe Kapitel III 9) untersucht. Die Bedeutung von COX-2 und der Ablauf der Prostaglandinbiosynthese sind in Kapitel II 5.1, der Ablauf der Untersuchungen in Kapitel III 9 beschrieben. Die Daten zu den einzelnen Versuchstieren und ihrer Behandlungen sind Tabelle 25 zu entnehmen. Es wurde dabei versucht, sowohl bei der systemischen als auch bei der lokalen Inflammation mittels *in situ* Hybridisierung mRNA von COX-2 im Gehirn der Meerschweinchen nachzuweisen. Die Dosierungen des Pyrogens LPS entsprachen denen, die bereits für die immunhistochemischen Untersuchungen in Kapitel IV 1.2 beschrieben wurden. Bei jeder durchgeführten *in situ* Hybridisierung wurden die Gehirne von einem Kontrolltier (i.p., i.a. oder s.c. Injektion von 0,9 % NaCl) und mehreren LPS-behandelten Tieren prozessiert.

Versuchstiergruppe	Substanz	Injektion/ Abkürzung	Dosis	Anzahl der Tiere	Untersuchung
Systemische Inflammation	LPS	i.p.	30 µg/kg	2	1. Fieber -60 - +180 min. 2. IL-6 Werte {IU/ml} bei +180 min. 3. COX-2-Expression anhand von <i>in situ</i> Hybridisierungen der mRNA
		i.a.	10 µg/kg	2	
Lokale Inflammation	LPS	s.c.	100 µg/kg	3	
			10 µg/kg	3	
Kontrolle System. Inflammation	NaCl	i.p.	1 ml/kg KG	1	
		i.a.		2	
Kontrolle Lokale Inflammation		s.c.		1	

Tabelle 25

Übersichtstabelle der für die *in situ* Hybridisierung eingesetzten Versuchstiere mit Dosierung, Applikationsform und der Anzahl der Tiere. Es wurden bei allen Versuchen Temperaturkurven von -60 – +180 min. aufgezeichnet und Messungen der IL-6 Konzentrationen zum Zeitpunkt der Präparation (180 min.) zur Kontrolle durchgeführt.

Entsprechend den vorhergehenden Teilstudien wurde ein Monitoring zur Kontrolle des Versuchsablaufes durchgeführt. Dies geschah über die Aufzeichnung der Körpertemperaturen während der Versuche und über die Messung der IL-6 Konzentrationen zum Zeitpunkt der Gehirnpräparation. Da insgesamt nur vier Kontrolltiere untersucht wurden, wurden diese in Abbildung 63 als Mittelwert aller zusammengefasst.

In allen vier LPS-behandelten Tiergruppen wurden Fieberreaktionen bis zur Perfusion festgestellt, die im Rahmen der erwarteten Bereiche lagen (Abbildung 63). Die Messung an biologisch aktiven zirkulierendem IL-6 ergab ebenfalls Werte, die den vorher beschriebenen entsprachen (Abbildung 64). In beiden Modellen systemischer Inflammation (i.p. bzw. i.a. Injektion von LPS) wurden die höchsten IL-6 Werte im Blut erreicht. Davon unterschieden sich deutlich die Konzentrationen bei den zwei Gruppen nach lokaler LPS-Gabe (Abbildung 64, graue Säulen). Sie waren in Abstufungen wesentlich niedriger. Auch hierbei wurden die Messwerte aller Kontrolltiergruppen der drei Applikationswege i.a., i.p. und s.c. zu einem Mittelwert zusammengefasst (Kontrolle, schwarz umrandete graue Säule). Es konnten insgesamt die erwarteten Resultate bestätigt werden (siehe Abbildung 46). Zur statistischen Auswertung hätte man allerdings höhere Tierzahlen benötigt.

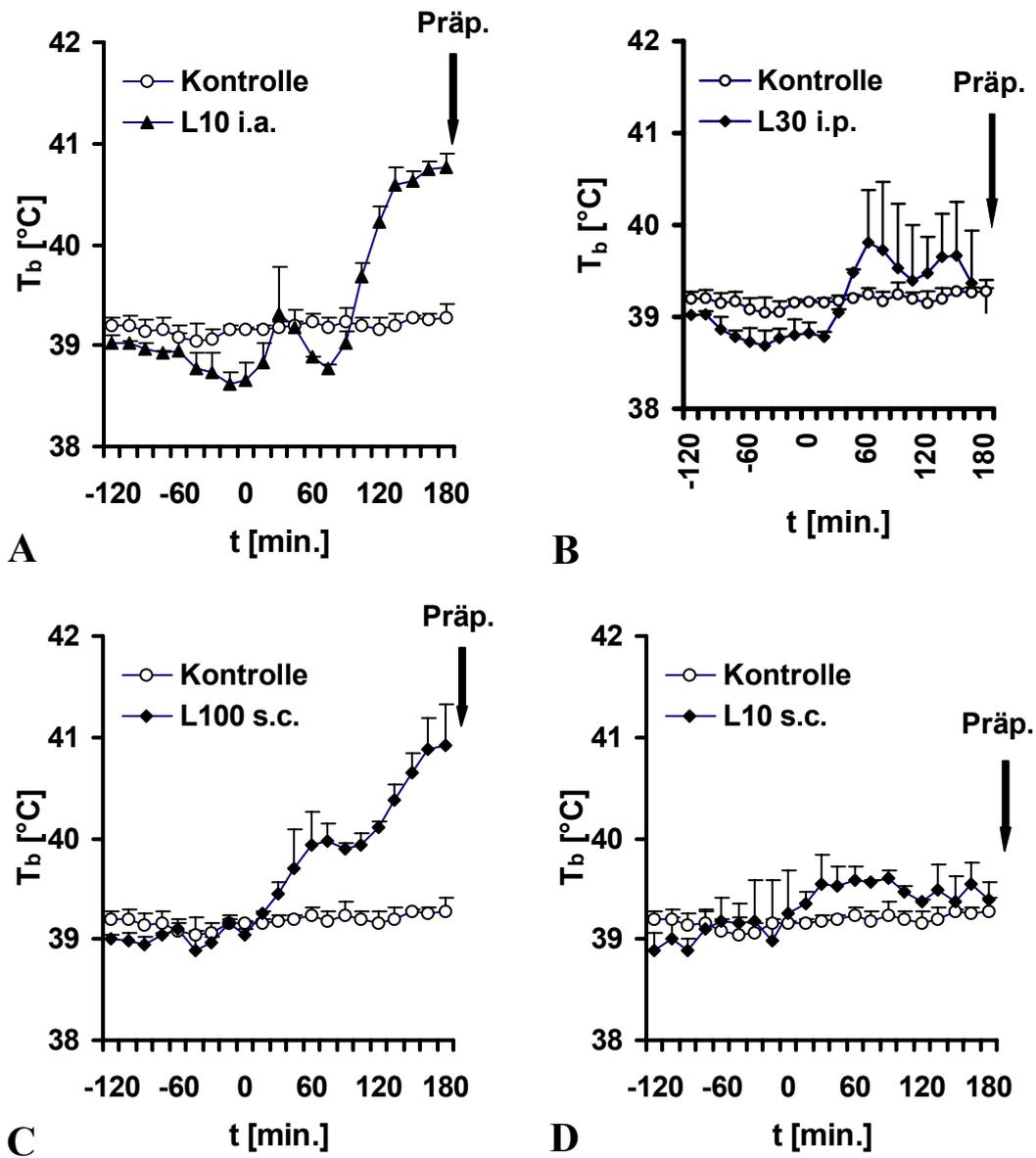


Abbildung 63

Zur Überprüfung der Fieberreaktion (T_b , body temperature) nach systemischer (A, LPS 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ i.a.; B, LPS 30 $\mu\text{g}/\text{kg}$ i.p.) oder lokaler LPS-Stimulation (C, LPS 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ s.c.; D, LPS 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ s.c.) wurden Temperaturkurven mit entsprechender Kontrollsituation (nicht gefüllte Symbole) aufgezeichnet. Zum Zeitpunkt 180 min. nach Applikation führte man die Gewebepräparation durch. Alle Werte sind als Mittelwerte \pm Standardfehler dargestellt.

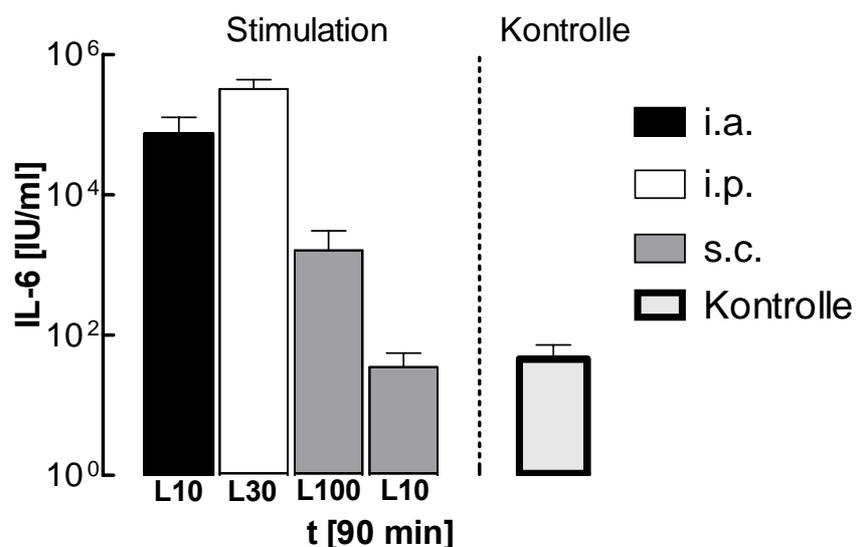


Abbildung 64

Kontrolle der IL-6 Messwerte für die entsprechenden Tiergruppen aus Tabelle 25 und den Fieberreaktionen aus Abbildung 63: Die Konzentrationen an biologisch aktivem IL-6 im Blut wurden als Mittelwert \pm Standardfehler mittels einer logarithmischen Skala dargestellt.

COX-2 mRNA Expression

Gehirnstrukturen	LPS	LPS	LPS	LPS	NaCl
	10 μ g/kg i.a.	30 μ g/kg i.p.	100 μ g/kg s.c.	10 μ g/kg s.c.	i.a., i.p., s.c.
Blutgefäße verteilt über das ganze Gehirn	+	+	+	-	-
Zirkumventrikuläre Organe (CVO's)					
Organum vasculosum laminae terminalis (OVLT)	+	+	+	-	-
Organum subfornicale (SFO)	+	+	+	-	-

Tabelle 26

Verteilung der COX-2 mRNA Expression im Gehirn des Meerschweinchen 180 min. nach Behandlung mit LPS oder 0.9 % NaCl bei unterschiedlichen Applikationsformen. Eine Bewertung der Schwärzungen durch radioaktive Oligonukleotidsonden wurde qualitativ anhand eines Zweipunkteschemas vollzogen: + = Schwärzung, - = keine Schwärzung.

Aus der Bilddokumentation (Abbildung 65) der Expression an COX-2 mRNA und der Tabelle 26 geht hervor, dass nach systemischer Pyrogen-Gabe über das ganze Gehirn des Meerschweinchen verteilt, COX-2 mRNA zu finden war. Diese Expression war vorwiegend im Bereich von Blutgefäßen lokalisiert. Hierbei könnte es sich vorwiegend um Endothelzellen handeln. Zusätzlich erwies sich das *Organum subfornicale* (SFO) als eine Region mit besonders hoher Dichte an solchen Signalen. Dieses Verteilungsmuster war ebenfalls bei der

Injektion der höheren Dosierung an LPS (100 µg/kg KG) in die subkutane Kammer vorzufinden. Hingegen konnte nach der Applikation von 10 µg/kg s.c. keine Expression der mRNA dieses Enzyms nachgewiesen werden (Abbildung 65).

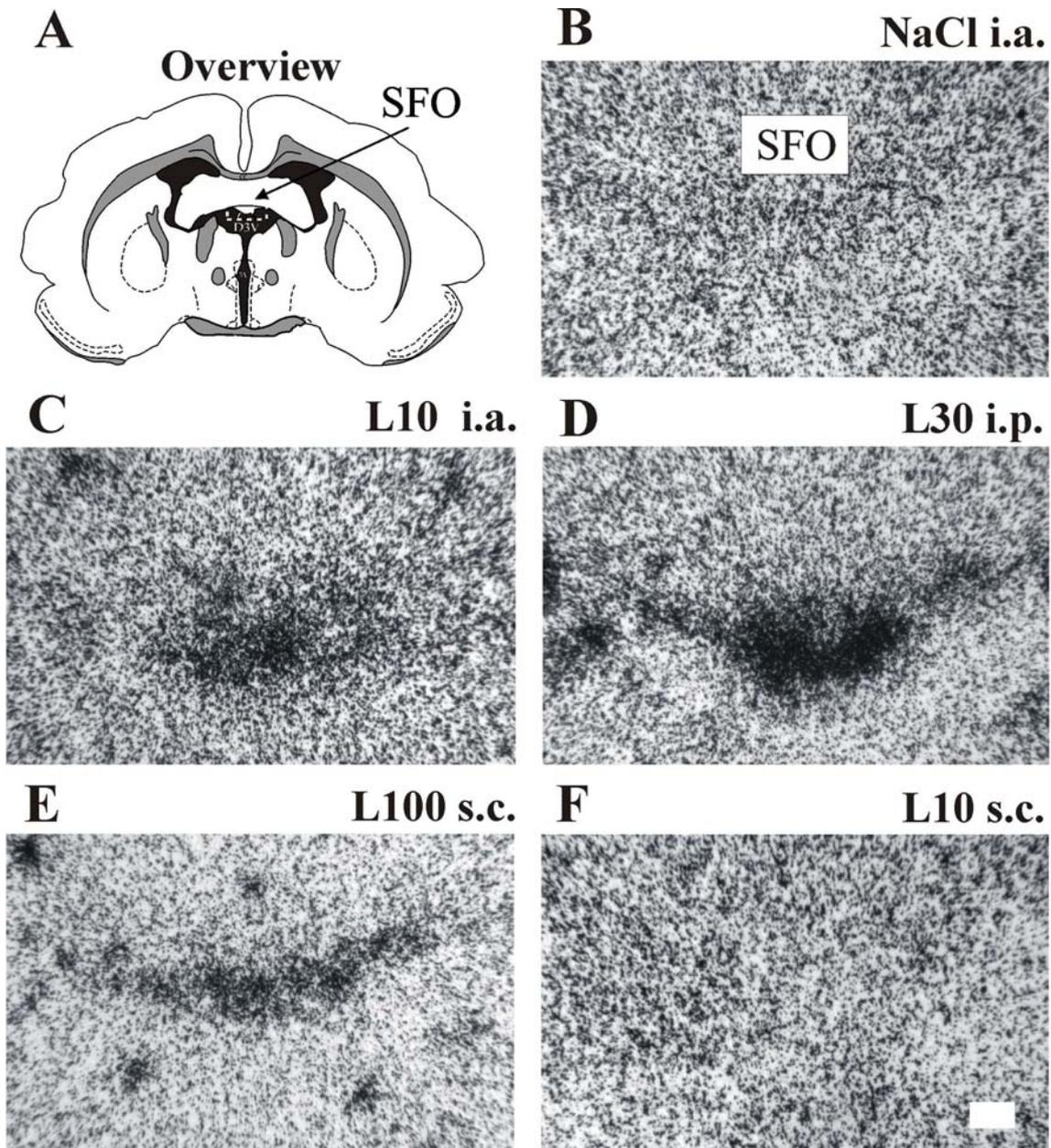


Abbildung 65

Expression der COX-2 mRNA im *Organum subfornicale* des Meerschweinchen (SFO) 180 min. nach systemischer (C, L10, LPS 10 µg/kg i.a.; D, L30, LPS 30 µg/kg i.p.) oder lokaler (E, L100, LPS 100 µg/kg s.c.; F, L10, LPS 10 µg/kg s.c.) Injektion von LPS oder 0,9 % NaCl als Lösungsmittel-Kontrolle (B): Es sind repräsentative Aufnahmen entsprechender Hybridisierungssignale aus dem mittleren Bereich des SFO gezeigt. Teilbild A stellt dabei einen Überblick der Region dar. Die spezifische COX-2-Expression ist nach Autoradiographie anhand der Schwarzfärbung des Filmes sichtbar. Der Balken in B entspricht 100 µm.

Zusammenfassend finden sich als Reaktion auf LPS-induzierte hohe zirkulierende Mengen an IL-6 sowohl genomische Aktivierungen als auch anscheinend die Produktion des Enzyms COX-2 in Endothelzellen des Gehirnes. Ob es sich dabei um dieselben Zellen handelt, konnte

mit Hilfe der uns zur Verfügung stehenden Methodik nicht nachgewiesen werden. Es könnte jedoch sein, dass direkt oder indirekt über die STAT3-Aktivierung auch das Enzym COX-2 gebildet wird und als Informationsvermittler zur Fieberentstehung dient. Trotzdem kann anhand unserer Befunde noch kein kausaler Zusammenhang abgeleitet werden.

Neben dem *Plexus choroideus* zeigten das SFO und das OVLT, welche ebenfalls hohe nukleäre STAT3-Signaldichten aufwiesen, auch vergleichsweise hohe Ansammlungen an COX-2 mRNA. Die anderen zirkumventrikulären Organe waren hingegen nicht in diesem Maße in einen solchen Prozess einbezogen. Die niedrige lokal gegebene Dosis erzeugte Fieber, allerdings weder eine STAT3-Translokation noch eine COX-2-Expression. Unter diesen experimentellen Bedingungen erschien folglich das Modell der humoralen Hypothese zur Fieberentstehung nicht in dieser Form anwendbar zu sein, zumal lediglich sehr moderate Mengen an zirkulierendem IL-6 vorhanden waren und nach subkutaner Applikation von LPS auch TNF nicht als humoraler Botenstoff zu erwarten wäre (Ross *et al.*, 2003). Es könnte sich hierbei zumindest anteilig um eine Vermittlung der Information Fieber über einen anderen Weg der Informationsübertragung handeln. Eine Beteiligung durch sensible Hautnerven als Modell der Fieberentstehung wäre denkbar. Diese Vermutung wurde vor allem auf einer vorhergehenden Studie am Modell der subkutanen Kammer begründet, in der eine Lokalanästhesie im Bereich der subkutanen Kammer Fieber zumindest zum Teil abschwächen konnte {Kapitel II 6.2.2 und V 3, (Ross *et al.*, 2000)}.

3.2. Dosis-abhängige Modulierung der lokal induzierten Fieberreaktion durch Diclofenac

Zusätzlich zu den anhand der COX-2-Expression untersuchten Prostaglandin-vermittelten Vorgängen im Gehirn des Meerschweinchens nach Wirkung von humoralen Botenstoffen wie IL-6 (humorale Hypothese) stellt sich also die Frage, ob Prostaglandine auch bei der lokalen Entzündungsreaktion zur Fieberentstehung beitragen. Da scheinbar zumindest anteilig ein anderes Modell der Fieberentstehung als das humorale bei lokalen Entzündungen eine Rolle spielt, sollte die Rolle der Prostaglandine auch hier genauer untersucht werden. Eine direkte Aktivierung von sensiblen, afferenten Hautnerven über lokal gebildetes PGE₂ wäre denkbar.

Deshalb wurde nun anhand der Blockade des Enzyms Zykllooxygenase der Versuch unternommen, die Rolle von Prostaglandine bei der Fieberentstehung genauer zu charakterisieren. Dazu wurde eine Versuchreihe durchgeführt, in der die Konzentration an dem NSAID Diclofenac ermittelt werden sollte, welche noch ausreicht, um lokal eine Syntheseblockade dieser Eicosanoide zu bewirken. Dies wurde wiederum für das Entzündungsmodell der subkutanen Kammer mit LPS anhand der beiden Dosierungen von 10 und 100 µg/kg durchgeführt.

Versuchstiergruppe	Stimulation s.c.	Diclofenac s.c.	Anzahl der Tiere	Untersuchung
Lokale Inflammation	LPS 100 µg/kg	1 ml/kg Solvent als Kontrolle	5	Fieber -60 - +360 min.
Blockade der lokalen Inflammation		5 µg/kg	5	
		50 µg/kg	5	
		500 µg/kg	6	
		5000 µg/kg	5	
Lokale Inflammation	LPS 10 µg/kg	1 ml/kg NaCl als Kontrolle	5	
Blockade der lokalen Inflammation		5 µg/kg	5	
		50 µg/kg	5	
		500 µg/kg	6	
		5000 µg/kg	5	
Kontrolle der lokalen Inflammation	NaCl 1 ml/kg	Solvent 1 ml/kg	5	
Kontrolle der Blockade der lokalen Inflammation	NaCl 1 ml/kg	5 µg/kg	5	
		50 µg/kg	5	
		500 µg/kg	6	
		5000 µg/kg	5	

Tabelle 27

Übersichtstabelle der Versuchsreihen mit Dosierung, Applikationsform und der Anzahl der Tiere. Es wurden bei allen Versuchen Temperaturkurven von -60 – +360 min. aufgezeichnet.

Über eine abgestufte Reduzierung der empfohlenen Menge an Diclofenac, die beim Meerschweinchen in früheren Studien eingesetzt wurde {5 mg/kg, (Roth *et al.*, 2002; Ross *et al.*, 2003)}, wurden Dosis-Wirkungskurven zur Beeinflussung der Fieberreaktionen gemäß Tabelle 27 erstellt. Die Prozedur der Fieberaufzeichnung entsprach hierbei der gewohnten Vorgehensweise. Aus der Kombination des Pyrogens LPS mit Diclofenac resultierte ein etwas höheres Volumen, welches in die subkutane Kammer injiziert wurde. Es überschritt allerdings nicht das maximal aufnehmbare Volumen der Kammer von ca. 1 ml. Zur Kontrolle der Pyrogen-Applikation verwendete man wiederum NaCl-Lösung, für Diclofenac das Lösungsmittel (Solvent), welches mit 5 % Ethanol in der NaCl-Lösung angereichert war. In einer vorherigen Studie war bereits festgestellt worden, dass es keine signifikante Beeinflussung der Fieberreaktion durch die Zugabe des Lösungsvermittlers für Diclofenac gibt (Ross *et al.*, 2003).

Wie in Abbildung 66 dargestellt, konnte für die Gabe von 100 µg/kg s.c. LPS über die jeweilige Verringerung der applizierten Menge an Diclofenac eine Dosis-abhängige Wirkung festgestellt werden. Von 30-315 min. waren die gemessenen Temperaturwerte der Fieberkurve nach LPS-Stimulation ohne Diclofenac-Gabe signifikant höher als nach NaCl-Gabe. Verglichen mit der entsprechenden Kontrollgruppe zeigte sich die Fieberreaktion für D5 (Diclofenac 5 µg/kg) im Zeitraum von 45-270 min. und für D50 (Diclofenac, 50 µg/kg)

von 30-330 min. statistisch signifikant niedriger als die Temperaturkurve in der Kontrollsituation. Das bedeutet, dass prinzipiell durch diese Dosierungen an NSAID das Fieber nur zum Teil abgeschwächt werden konnte. Die Temperaturwerte wurden dazu mit einer zweifaktoriellen ANOVA und einem post-hoc-Test nach Bonferroni verglichen (Teilbild A).

Über die Fieberindices konnte außerdem gezeigt werden, dass sowohl 5 als auch 50 µg/kg an Diclofenac zumindest eine signifikante Reduzierung des Fiebers bewirkten. Die beiden Fieberkurven selbst waren dabei untereinander nicht statistisch signifikant unterscheidbar (Abbildung 66, Teilbild C).

Eine Gabe von 500 µg/kg Diclofenac reduzierte das Fieber noch deutlicher, sowohl zeitlich als auch bezüglich seines Temperaturmaximums. Über den Vergleich zu der Kontrolle ergab sich eine statistisch relevante Erhöhung der Temperatur nur noch von 135-300 min., also einer vollständigen Unterdrückung des Fiebers zumindest in der ersten Phase. Über das Teilbild C wird nochmals verdeutlicht, dass zumindest verglichen zu der Dosierung von 50 µg/kg das Fieber signifikant stärker reduziert wurde.

Die höchste verabreichte Dosis an Diclofenac (5000 µg/kg KG) führte zu einer vollständigen Unterdrückung des Fiebers über den ganzen Fieberverlauf hinweg. Es wurde sogar eine signifikante Erniedrigung der Temperaturen im Vergleich zu der Kontrolle im Zeitraum von 180-225 und 300-330 min. festgestellt. Ähnliches wird in Teilbild C über die F.I. deutlich. Das Fieber wurde durch diese Dosis an Diclofenac vollständig unterdrückt.

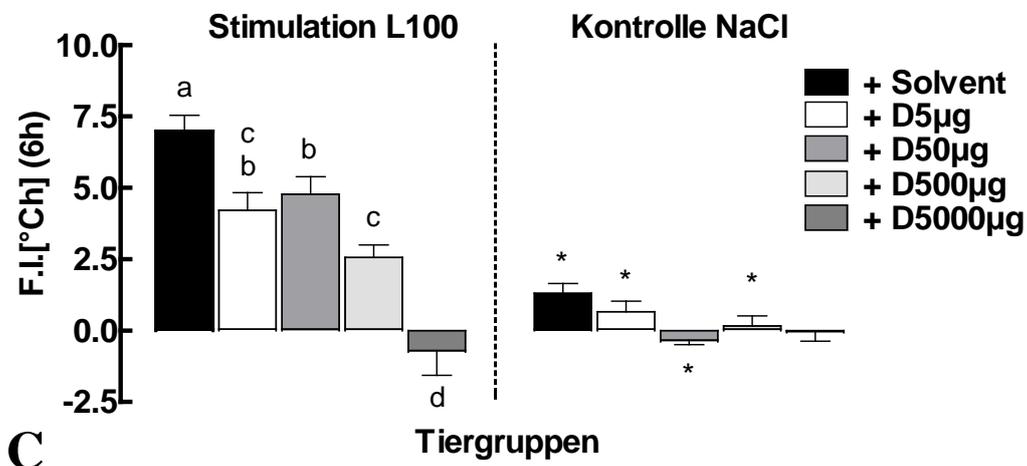
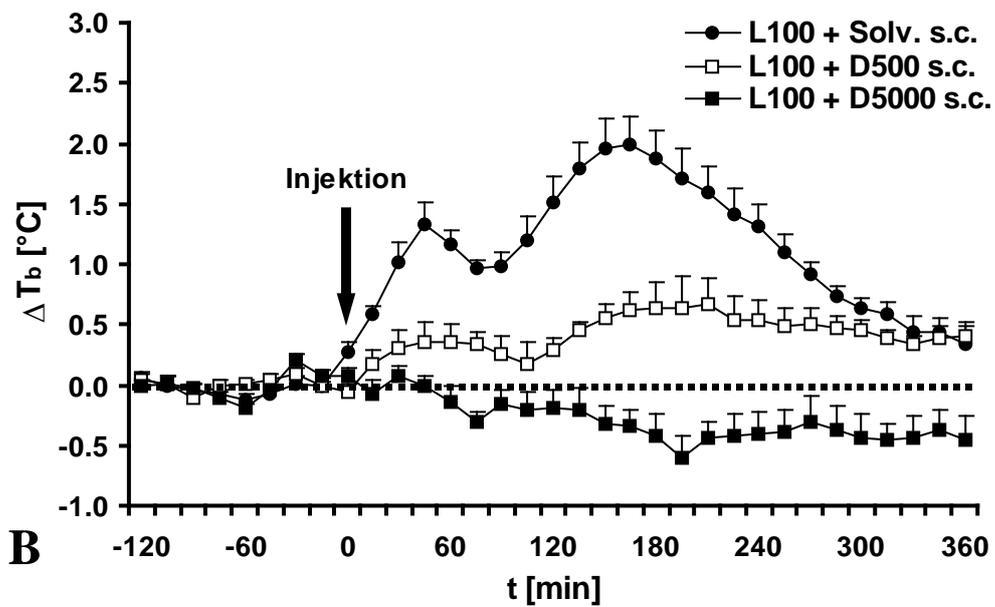
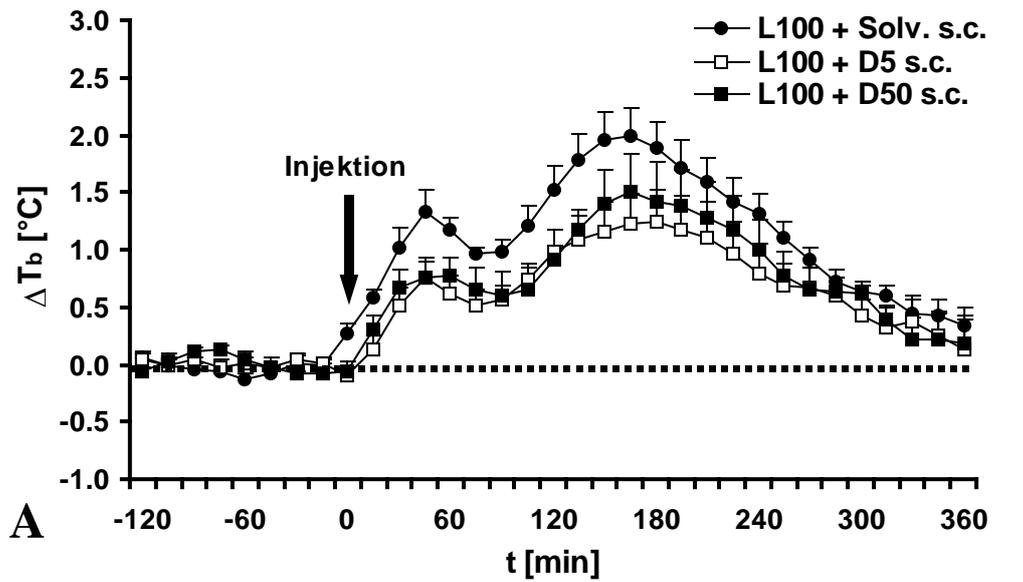


Abbildung 66

Fieberreaktion (A-B; ΔT_b , body temperature) von Meerschweinchen vor und nach Gabe von LPS (100 $\mu\text{g}/\text{kg}$, s.c.) und gleichzeitiger Applikation von Diclofenac (D5, 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$; D50, 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$, D500, 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$, D5000, 5000 $\mu\text{g}/\text{kg}$) oder dessen Lösungsmittel (Solvent). Zusätzlich wurde in Teilbild C eine vergleichende Zusammenfassung der Fieberreaktionen aus A und B anhand der integrierten Flächen unter den Kurven (Fieberindex, F.I.) vorgenommen. Säulen mit gleichen Buchstaben sind nicht, jede Säule mit einem anderen Buchstaben sind signifikant unterschiedlich zu einander ($P < 0.05$). *Signifikante Unterschiede zwischen den 5 Versuchsansätzen der Stimulation mit LPS und ihren jeweiligen Kontrollen sind durch Sterne über den Säulen der Kontrollgruppen dargestellt ($P < 0.05$). Alle Werte sind als Mittelwerte \pm Standardfehler dargestellt.

Analog wurde nun die gleiche Untersuchung mit der lokalen LPS-Applikation von 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ durchgeführt. Die Dosierungen an Diclofenac von 5, 50 und 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ergaben eine signifikante Abschwächung des Fiebers (Teilbild C der Abbildung 67). Die drei Säulen (F.I.; D5, D50, D500) waren allerdings nicht statistisch signifikant voneinander unterscheidbar. Bei der höchsten Dosierung an Diclofenac konnte wiederum zeitlich begrenzt (120-210 min.) eine Hypothermie festgestellt werden. Es ist hierbei besonders hervorzuheben, dass selbst die niedrigste eingesetzte Dosierung an Diclofenac (5 $\mu\text{g}/\text{kg}$) in den Zeiträumen 15-30 min. und 165-375 min. die Fieberreaktion im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant abschwächte. Zur vollständigen Dokumentation sind in Abbildung 68 die entsprechenden Kurven der Kontrollsituationen zu den einzelnen Fieberreaktionen nach Pyrogen-Gabe abgebildet. Zur besseren Übersicht wurde darauf verzichtet, sie direkt in Abbildung 66 und Abbildung 67 einzufügen.

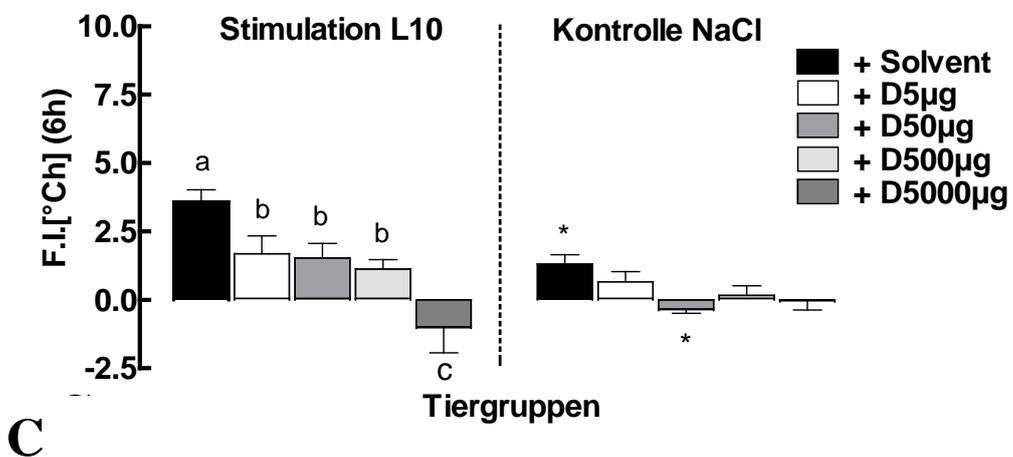
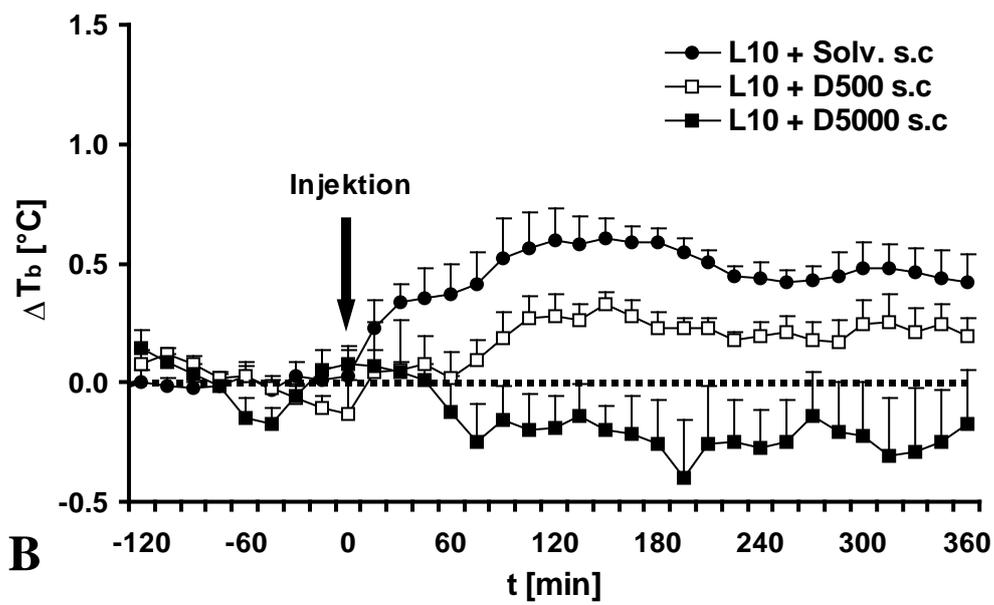
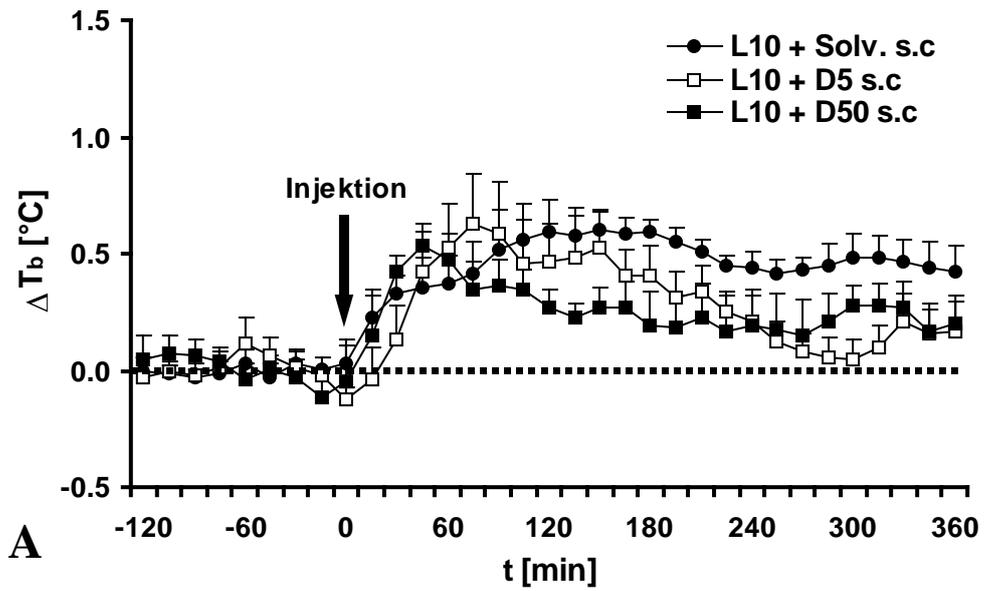


Abbildung 67

Fieberreaktion (A-B; ΔT_b , body temperature) von Meerschweinchen vor und nach Gabe von LPS (10 $\mu\text{g}/\text{kg}$, s.c.) und gleichzeitiger Applikation von Diclofenac (D5, 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$; D50, 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$, D500, 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$, D5000, 5000 $\mu\text{g}/\text{kg}$) oder dessen Lösungsmittel (Solvent). Zusätzlich wurde in Teilbild C eine vergleichende Zusammenfassung der Fieberreaktionen aus A und B anhand der integrierten Flächen unter den Kurven (Fieberindex, F.I.) vorgenommen worden. Säulen mit gleichen Buchstaben sind nicht, jede Säule mit einem anderen Buchstaben sind signifikant unterschiedlich zu einander ($P < 0.05$). *Signifikante Unterschiede zwischen den 5 Versuchsansätzen der Stimulation mit LPS und ihren jeweiligen Kontrollen sind durch Sterne über den Säulen der Kontrollgruppen dargestellt ($P < 0.05$). Alle Werte sind als Mittelwerte \pm Standardfehler dargestellt.

Zusammenfassend ergab die Ko-Applikation von Diclofenac in einer Dosierung von 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ in Kombination mit LPS in beiden Versuchsreihen (LPS 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$, LPS 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$) bereits eine signifikante Reduzierung der Fieberreaktion. Obwohl es sich nicht um eine vollständige Unterdrückung des Fiebers an sich handelte, so ermittelte man hiermit eine sehr geringe Dosis, die dennoch das in diesem Modell induzierbare Fieber beeinflussen konnte. In Anbetracht dieser vergleichsweise niedrigen Dosierung erschien es durchaus möglich, dass es sich hierbei um eine lokale Wirkung von Diclofenac handelte. Ansonsten wären systemische, Fieber-senkende Effekte zu berücksichtigen, wie zum Beispiel durch direkte Beeinflussung der Sollwert-Verstellung im Bereich des Hypothalamus.

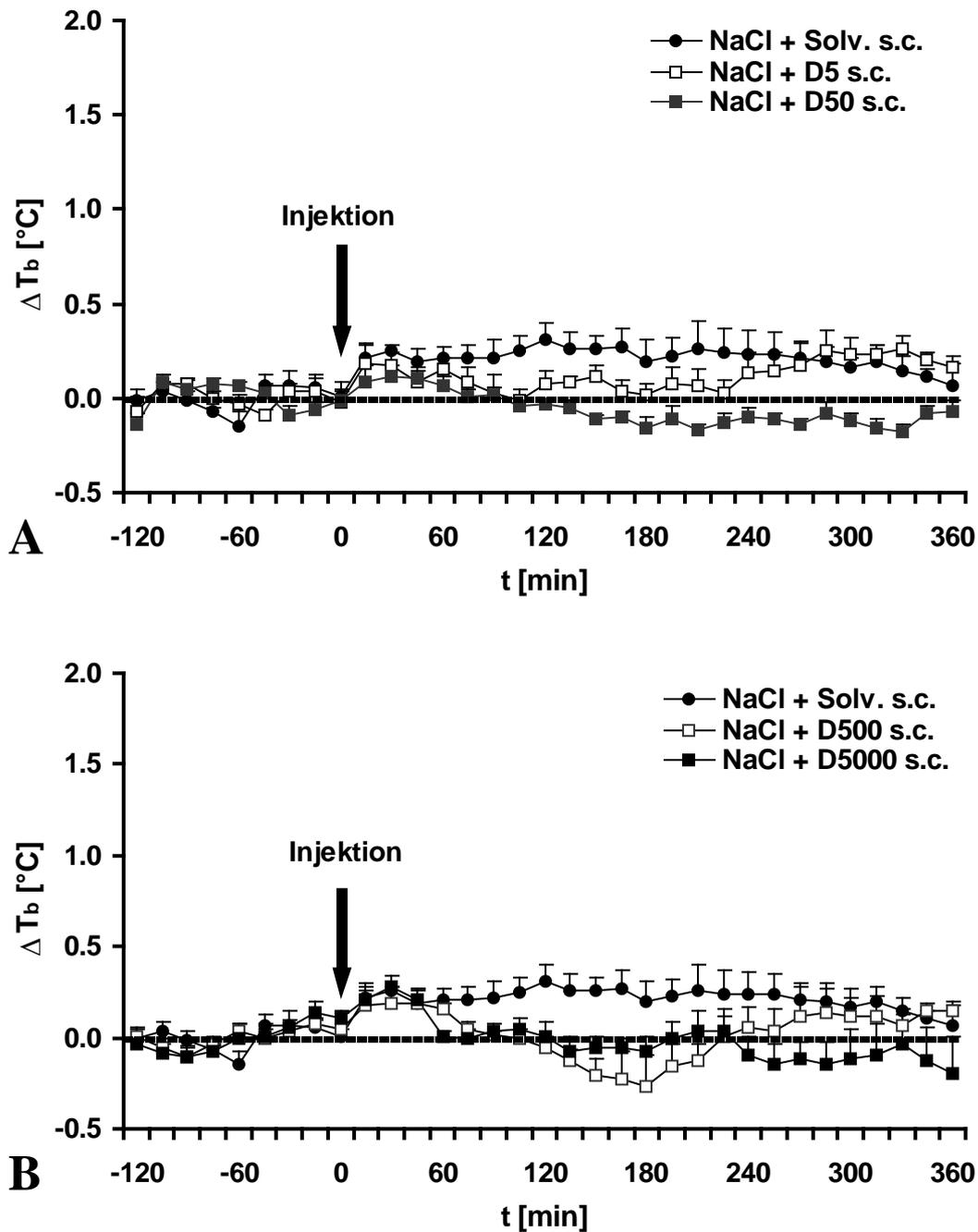


Abbildung 68

Temperaturkurven (A-B; ΔT_b , body temperature) von Meerschweinchen vor und nach Applikation der entsprechenden Kontrolllösungen zu den in Abbildung 66 und Abbildung 67 gezeigten Reaktionen (Diclofenac + NaCl oder Solvent). Alle Werte sind als Mittelwerte \pm Standardfehler dargestellt.

3.2.1. Contralaterale Gabe von Diclofenac

Um festzustellen, ob tatsächlich eine lokale Wirkung des NSAID Diclofenac zur Fiebersenkung beitragen kann, wurde eine zusätzlich Versuchreihe durchgeführt, da es nicht auszuschließen war, dass vielleicht doch systemische Effekte von Diclofenac auch bei einer so niedrigen Dosierung wie 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ KG eine Rolle spielen könnten. Über eine contralaterale

Applikation des Medikamentes Diclofenac zeitgleich zu der Injektion von LPS in die subkutane Kammer sollte überprüft werden, dass es sich hierbei um eine rein lokale Wirkung der COX-Hemmung am Ort der Entzündung handelte.

Versuchstiergruppe	Stimulation s.c.	Diclofenac s.c.c.l.	Anzahl der Tiere	Untersuchung
Lokale Inflammation	LPS 10 µg/kg	1 ml/kg Solvent als Kontrolle	6	Fieber -60 - +360 min.
Blockade der lokalen Inflammation		5 µg/kg	6	
		50 µg/kg	5	
Kontrolle der lokalen Inflammation	NaCl 1 ml/kg	Solvent 1 ml/kg	5	
Kontrolle der Blockade der lokalen Inflammation		5 µg/kg	5	
		50 µg/kg	6	

Tabelle 28

Übersichtstabelle der Versuchsreihen mit Dosierung, Applikationsform und der Anzahl der Tiere. Es wurden bei allen Versuchen Temperaturkurven von -60 – +360 min. aufgezeichnet.

Hiezu wurden entsprechend der Tabelle 28 weitere Versuche durchgeführt und Temperaturkurven aufgezeichnet. Diesmal wurde den Tieren, neben der Pyrogen- oder NaCl-Applikation in die subkutane Kammer, auf der contralateralen Seite im gleichen Hautareal s.c. Diclofenac oder Solvent injiziert. Zum Vergleich wurde auch die Dosierung von 50 µg/kg s.c. untersucht.

Es konnte, wie in Abbildung 70 (Teilbild A) dargestellt, keine signifikante Erniedrigung der Temperaturwerte durch die contralaterale Gabe von 5 µg/kg Diclofenac erzielt werden. Im Gegensatz dazu verringerte die Applikation der höheren Dosis von 50 µg/kg deutlich die Fieberreaktion.

Wie in Kapitel IV 3.2 beschrieben, hatte eine Dosierung von 5 µg/kg KG Diclofenac bei simultaner Gabe mit LPS direkt in die Kammer eine signifikante Reduzierung der integrierten Fieberreaktion zur Folge. Dieser Effekt manifestierte sich hauptsächlich in der zweiten Fieberphase, in der die mittleren Körpertemperaturen unter dem Einfluss des Medikaments signifikant erniedrigt waren. Ein derartiger Effekt war bei subkutanen Injektion derselben Dosis an Diclofenac in das contralaterale Hautareal nicht zu verzeichnen: das Fieber wurde nicht reduziert (Abbildung 69 A). Die entsprechenden Kontrollen sind in Abbildung 69 B dargestellt.

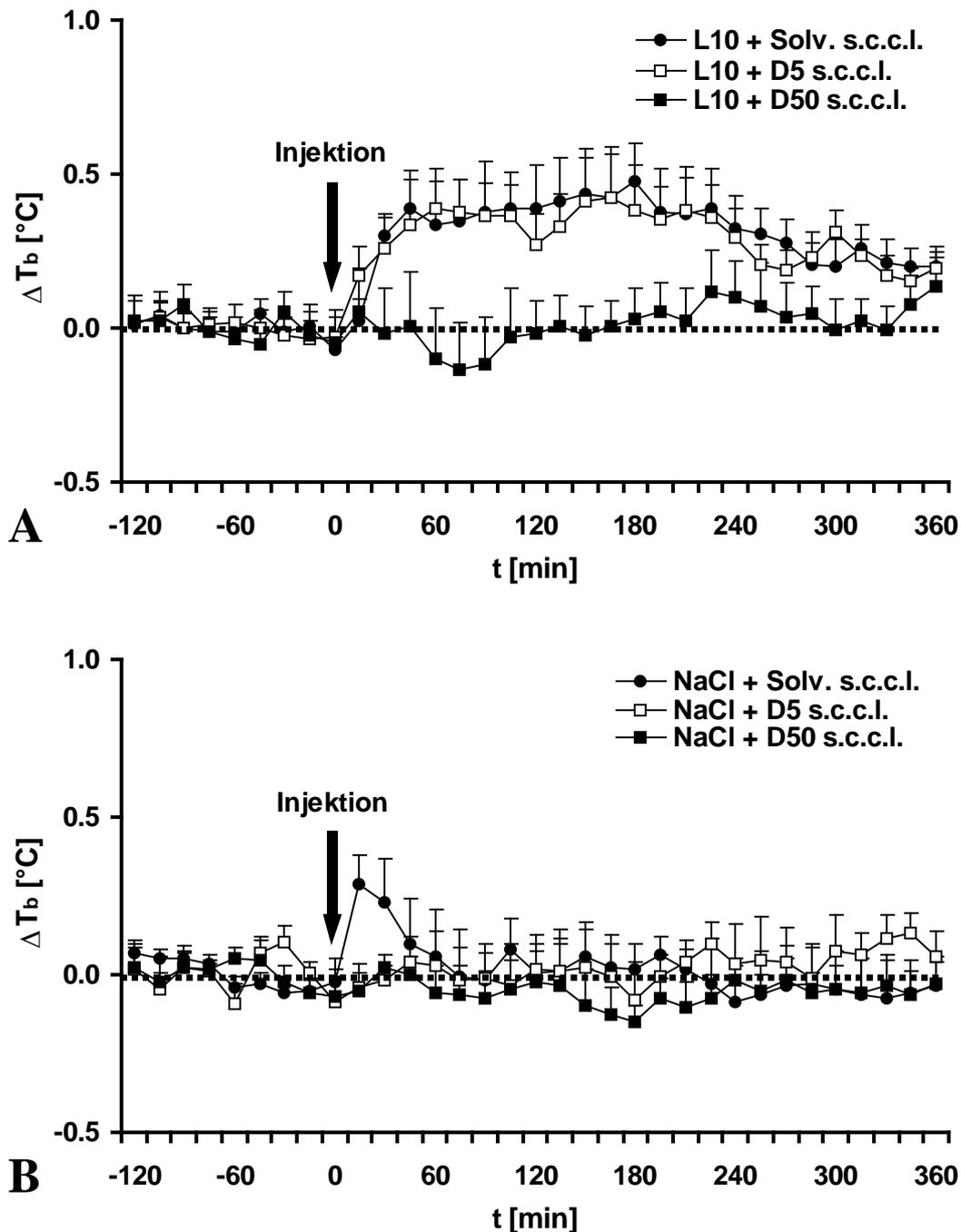


Abbildung 69

Temperaturkurven (ΔT_b , body temperature) von Meerschweinchen vor und nach Applikation von LPS (10 $\mu\text{g}/\text{kg}$) in Kombination mit Diclofenac (D5, 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$; D50, 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$) oder Solvent (Teilbild A) oder der entsprechenden Kontrollösungen (Teilbild B; Diclofenac + NaCl oder Solvent). Solvent oder Diclofenac wurden in diesem Versuch contralateral (c.l.) injiziert. Alle Werte sind als Mittelwerte \pm Standardfehler dargestellt.

Zusammenfassend ergibt sich hiermit ein deutlicher Hinweis, dass es sich hier lediglich um eine lokale Wirkung des Diclofenac in der Dosierung von 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ auf die Reduktion der Fieberantwort handelt. Wenn, wie gezeigt, nur die Applikation auf der gleichen Seite wie die Pyrogen-Gabe das Fieber beeinflusst, könnte Diclofenac dort lokal (im Bereich der

subkutanen Kammer) die Bildung von Prostaglandinen hemmen. Contralateral gegeben würde das Diclofenac nicht am Ort der Entzündung wirken können und keinen Effekt auf einen lokalen Fieberentstehungs-Mechanismus besitzen. Dies kann als ein weiterer Beleg dafür gewertet werden, dass möglicherweise sensible Hautnerven bei der lokalen Entzündungsreaktion aktiviert werden und zumindest anteilig zu einer Fieberreaktion beitragen könnten. Da das Fieber lediglich abgeschwächt wurde, erklärt auf der anderen Seite diese Hypothese nicht den ganzen Fieberentstehungs-Prozess. Es muss also ein Zusammenspiel mehrerer Mechanismen, z.B. Interaktionen zwischen nervalen und humoralen Signalwegen zur Fieberentstehung, postuliert werden. Die humorale Komponente bei diesem Zusammenspiel scheint allerdings vor allem bei starken lokalen Entzündungsreizen eine große Rolle zu spielen (L100 s.c.).

3.3. Lokale Bildung von PGE₂

Nach den vorliegenden Resultaten sollte nun überprüft werden, wie die ortsgebundene Bildung an PGE₂ im lokalen Entzündungsmodell tatsächlich aussah und wie sich die Gabe des COX-Hemmers darauf auswirkte.

Versuchstiergruppe	Stimulation s.c.	Diclofenac s.c.	Anzahl der Tiere	Untersuchung
Lokale Inflammation	LPS 100 µg/kg	1 ml/kg Solvent als Kontrolle	6	1. PGE ₂ Konzentrationen zum Zeitpunkt +120 min. nach Injektion in der Lavage.
Blockade der lokalen Inflammation		5 µg/kg	5	
		500 µg/kg	3	
Kontrolle der lokalen Inflammation	LPS 10 µg/kg	1 ml/kg Solvent als Kontrolle	8	
		5 µg/kg	5	
		500 µg/kg	4	
Kontrolle der lokalen Inflammation	NaCl 1 ml/kg	1 ml/kg Solvent als Kontrolle	8	
Kontrolle der Blockade der lokalen Inflammation		5 µg/kg	5	
		500 µg/kg	4	

Tabelle 29

Übersichtstabelle der Versuchsreihen mit Dosierung, Applikationsform und der Anzahl der Tiere. Es wurde bei jedem Versuchstier die PGE₂-Konzentration in der Lavage der subkutanen Kammer 120 min. nach der jeweiligen Injektion bestimmt.

Für diese Untersuchung wurde die Anzahl der getesteten Diclofenac-Dosierungen von vier auf zwei reduziert. Anhand der beschriebenen Resultate (Kapitel IV 3.2) stellte sich vor allem die Frage, ob die Dosierung von 5 µg/kg KG des NSAID, welche gerade noch einen Effekt auf die Fieberantwort gezeigt hatte, die Prostaglandin-Bildung tatsächlich beeinflusst. Zur Kontrolle wurde zusätzlich eine höhere Dosis von 500 µg/kg eingesetzt. Diese reduzierte deutlich und sicher eine Fieberreaktion in beiden Versuchstiergruppen. Die Versuchsreihen

wurden gemäß des in Tabelle 29 dargestellten Schemas durchgeführt. Da die Prozedur der Spülprobengewinnung (Lavage) nicht völlig stressfrei abläuft, wurde davon abgesehen, die Temperaturkurven unter diesen geänderten Bedingungen aufzuzeichnen (Methode zur Gewinnung von Lavage, siehe Kapitel II 1.2.5.2).

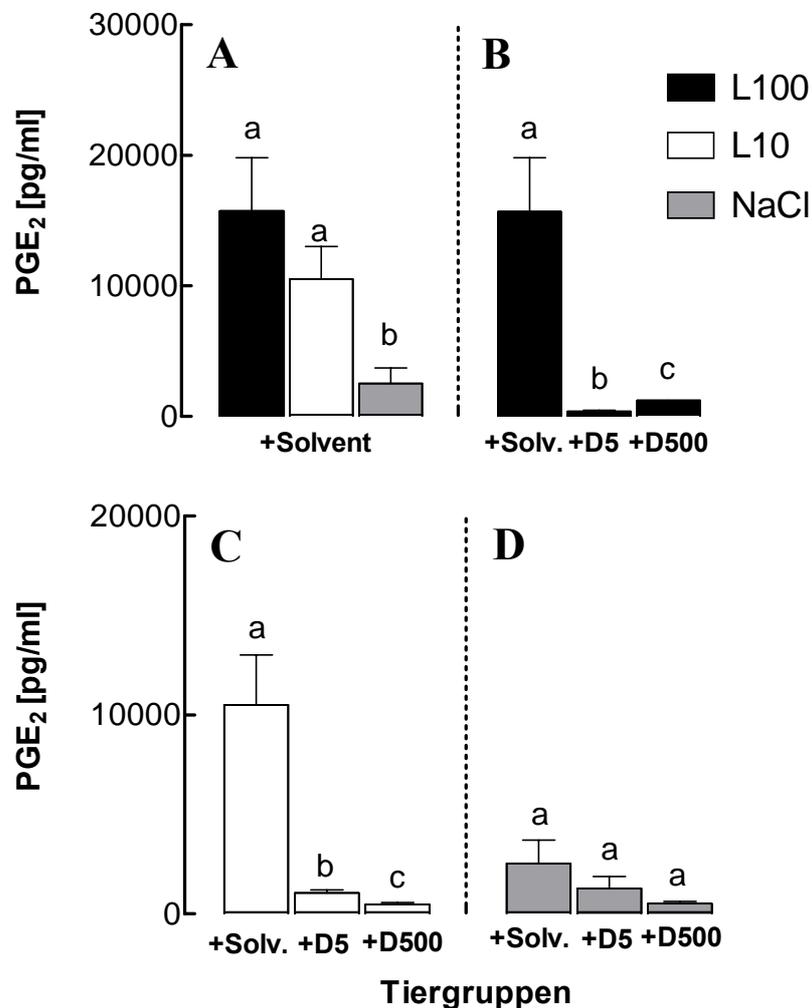


Abbildung 70

Konzentrationen an PGE₂ (pg/ml) in der Lavage aus dem Bereich der subkutanen Kammer 120 min. nach lokaler LPS-Stimulation (LPS 100 µg/kg + Solvent s.c., L100, schwarze Säulen; LPS 10 µg/kg + Solvent s.c., L10, weiße Säulen) oder entsprechender Kontrolle (NaCl + Solvent, 1 ml/kg, NaCl, graue Säule) aufgetragen mit einer logarithmischen Skala (Teilbild A; Teilbilder B-D, linke Säulen). Zusätzlich wurde in anderen Gruppen anstelle des Solvent für das NSAID Diclofenac in den Dosierungen 5 und 500 µg/kg eingesetzt (Teilbilder B-D; +D5, +D500). Säulen mit gleichen Buchstaben sind nicht, jede Säule mit einem anderen Buchstaben sind signifikant unterschiedlich zu einander ($P < 0.05$). Es sind Mittelwerte \pm Standardfehler dargestellt.

Die ermittelten PGE₂-Konzentrationen in der Lavage beider Gruppen LPS-behandelter Tiere (LPS 10 µg/kg und LPS 100 µg/kg) waren jeweils signifikant höher als die Werte in der Kontrollgruppe (Abbildung 70, Teilbild A). Andererseits unterschieden sich die LPS-induzierten PGE₂-Konzentrationen nicht in Abhängigkeit von der eingesetzten LPS-Dosis. Die Konzentrationen an PGE₂ nach Injektion der höheren LPS-Dosierung waren lediglich tendenziell höher. Eine zusätzliche Applikation von Diclofenac mit 5 µg/kg oder 500 µg/kg

KG reduzierte eine lokale PGE₂-Produktion in der subkutanen Kammer in allen Fällen signifikant (Teilbilder B-C). Man konnte selbst beim Einsatz der niedrigen Diclofenac-Dosierung (5 µg/kg) eine vollständige Unterdrückung der LPS-induzierten PGE₂-Bildung verzeichnen.

4. Zusammenfassung der Ergebnisse

A Nukleäre Translokation des Transkriptionsfaktors STAT3 im Gehirn des Meerschweinchens im Verlauf systemischer oder lokaler Inflammation.

- Durch systemische und lokale (hohe Dosis) Gabe von LPS wurde Fieber erzeugt. Dabei konnte eine nukleäre Translokation des Transkriptionsfaktors STAT3 vornehmlich in Gehirnregionen mit offener Blut-Hirn-Schranke (sensorische CVOs) beobachtet werden, die mit der Stärke der LPS-induzierten IL-6-Spiegel im Blut korrelierte.
- Die lokale Gabe von 10 µg/kg LPS s.c. (niedrige Dosis) resultierte in einer moderaten Fieberreaktion; eine genomische Aktivierung von Zellen in den genannten Hirnstrukturen blieb aus.
- *Es muss demzufolge unter diesen Bedingungen anteilig einen anderen als den humoralen Signalübertragungsweg geben, der zur Fieberreaktion führt.*

B Charakterisierung des Phänotyps der IL-6 aktivierten Gehirnzellen

- Durch Einsatz einer Gewebe schonenden Herstellung von postfixierten Gefrierschnitten wurde das Gehirnendothel neben den sensorischen CVOs als Hauptangriffspunkt für LPS-induziertes zirkulierendes IL-6 identifiziert. LPS-behandelte Tiere reagieren mit einer nukleären STAT3-Translokation in Endothelzellen, die über das ganze Gehirn verteilt waren.
- Im Bereich der sensorischen CVOs fand sich dagegen eine vergleichsweise moderate Anzahl an genomisch aktivierten Endothelzellen. In diesen Gehirnstrukturen zeigten nach LPS-Behandlung vornehmlich Astrozyten eine nukleäre STAT3-Aktivierung. Der Phänotyp einer zusätzlichen Zellpopulation konnte nicht identifiziert werden.
- *Perspektivisch stellt sich die Frage, ob es einen kausalen Zusammenhang zwischen der IL-6-induzierten genomischen Aktivierung von Endothelzellen und Astrozyten im Gehirn mit der neuronal vermittelten Fieberreaktion gibt.*

C Die Rolle von Prostaglandinen bei der Fieberentstehung im Modell der lokalen Inflammation.

C₁ Induktion von COX-2 im Gehirn

- Entsprechend der vorliegenden Ergebnisse könnte nach lokaler (hohe Dosis) und systemischer LPS-Gabe das Gehirnendothel eine wichtige Rolle bei einer COX-2 mRNA Expression im ZNS spielen. Pyrogen-behandelte Tiere reagierten verteilt über das ganze Gehirn mit einer COX-2-Expression. Vor allem im SFO und im OVLT

konnten vergleichsweise hohe Dichten an COX-2 mRNA Expression festgestellt werden

- Andererseits konnte bei Tieren nach LPS-Applikation von 10 µg/kg s.c. (niedrige Dosis) keine COX-2-Expression im Gehirn nachgewiesen werden.
- *Eine COX-2-Expression im ZNS scheint demzufolge keine entscheidende Rolle für die Fieberinduktion nach Injektion der niedrigen LPS-Dosis in die subkutane Kammer (lokale Inflammation) zu spielen.*

C₂ Dosis-abhängige Modulation der Fieberreaktion durch Diclofenac

- Im lokalen Entzündungsmodell bei Applikation von 100 µg/kg LPS (hohe Dosis) in die subkutane Kammer verhinderte die gleichzeitige Behandlung mit 5000 oder 500 µg/kg Diclofenac die Ausbildung einer Fieberreaktion, während die Koapplikation von 50 oder 5 µg/kg Diclofenac das Fieber lediglich gering abschwächte.
- Alle vier Diclofenac-Dosierungen verringerten die Fieberantwort graduell, wenn sie zusammen mit der niedrigen LPS-Dosis (10 µg/kg) in die subkutane Kammer appliziert wurden. Die niedrigste Dosis von 5 µg/kg Diclofenac hatte jedoch keinen antipyretischen Effekt, wenn sie contralateral zur implantierten subkutanen Kammer injiziert wurde.
- *Dieses Ergebnis weist darauf hin, dass eine lokale Bildung von Prostaglandinen im Gewebe der Entzündungsreaktion anteilig eine Rolle in der Fieberentstehung spielen könnte. Dies wurde nach der Applikation der niedrigen LPS-Dosis in die subkutane Kammer festgestellt, die kaum von einem systemischen Auftreten endogener Pyrogene im Blut begleitet ist.*

C₃ Lokale Bildung von PGE₂

- Injektionen der hohen und der niedrigen LPS-Dosis in die subkutane Kammer resultierten in einem signifikanten Anstieg an PGE₂ in der Lavage aus der entzündeten subkutanen Region.
- Die LPS-induzierte Bildung von PGE₂ wurde durch die Koinjektion von 5 oder 500 µg/kg Diclofenac in der subkutanen Kammer vollständig unterdrückt.
- Dieses Ergebnis bestätigt, dass bereits die niedrigste Fieber-abschwächende Dosierung von Diclofenac in der Lage war, eine lokale PGE₂ Produktion vollständig zu blockieren.
- *Lokale Mechanismen, wie im Bereich der subkutanen Entzündung die Prostaglandin-Synthese, könnten die Generierung afferenter neuronaler Signale induzieren und auf diesem Weg thermoregulatorische Areale im Gehirn im Sinne einer Fieberreaktion beeinflussen. Dieser Mechanismus scheint lediglich bei moderaten lokalen Entzündungsprozessen quantitativ eine Rolle zu spielen. Der humorale über endogene Pyrogene getragene Signalweg scheint ansonsten den größeren Anteil an der Fieberinduktion auszumachen. Sichtbare Effekte des neuronalen Signalweges werden dadurch verdeckt.*

V. DISKUSSION

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen dienten dem Vergleich lokaler und systemischer LPS-induzierter Entzündungsreaktionen. Dabei wurde die spezielle Bedeutung der beiden zentralen Mediatoren IL-6 und PGE₂ bei der im Rahmen systemischer und lokaler Entzündungsprozesse auftretenden Fieberreaktion näher charakterisiert. Die Diskussion erfolgt anhand der Chronologie der erhobenen Befunde.

1. Humorale Hypothese zur Fieberentstehung

1.1. Rolle von IL-6

Durch systemische und lokale Gabe von LPS wurde Fieber erzeugt, welches in der Stärke seiner Ausprägung zu den jeweils induzierten zirkulierenden IL-6-Konzentrationen gut korrelierte. Dieser in den Abbildungen 39-44 dargestellte Teilbefund steht in Übereinstimmung mit anderen publizierten Studien (Nijsten *et al.*, 1987; LeMay *et al.*, 1990; Roth *et al.*, 1993; Roth *et al.*, 1994; Harré *et al.*, 2002). Nach systemischer Gabe von LPS (i.a., i.p.) findet man Zytokine und LPS selbst in messbaren Konzentrationen in der Zirkulation {Kapitel II 2,3; (Givalois *et al.*, 1994; Roth *et al.*, 1998a; Johnson *et al.*, 2003a). IL-6 als potenzielles endogenes Pyrogen wird also zum einen direkt in der Zirkulation LPS-induziert von verschiedenen Körperzellen in großen Mengen produziert und gelangt über das Blut als humoraler Botenstoff zum Gehirn. Zum anderen wird IL-6 aus dem lokalen entzündeten Bereich der subkutanen Kammer in vergleichsweise moderaten Konzentrationen in die Blutbahn abgegeben. Es wurde bestätigt, dass weder TNF und IL-1 β noch LPS selbst aus der Kammer (Ross, 2001) oder einer diesem Modell vergleichbaren subkutan angelegten Luftblase („air pouch“) in die Zirkulation übertreten (Cartmell *et al.*, 2001). IL-6 scheint also das einzige pyrogene Zytokin zu sein, welches in größeren Mengen vom Bereich der lokalen Entzündung in das Blut übertritt (Miller *et al.*, 1997a; Miller *et al.*, 1997b; Cartmell, 1998; Ross *et al.*, 2000; Ross *et al.*, 2003; Turnbull *et al.*, 2003). Die 50-fache Erhöhung der basalen IL-6 Konzentration, die im Rahmen dieser Arbeit nach subkutaner Injektion der hohen LPS-Dosis (100 μ g/kg) im Blutplasma gemessen wurde, wurde demzufolge lokal in der Kammer produziert und trat von dort in die Zirkulation über. Der Anstieg dieses endogenen Pyrogens im Blut ist wahrscheinlich in diesem Experimentalmodell an der Fieberentstehung beteiligt. Dies wurde durch eine Studie bestätigt, in der eine systemische Vorbehandlung mit IL-6 Antiserum das durch Injektion von LPS in eine subkutan erzeugte Luftblase („air pouch“) signifikant unterdrückte (Cartmell *et al.*, 2000). Es wurde in dieser Studie dieselbe LPS-Dosierung von 100 μ g/kg wie bei einer in dieser Arbeit eingesetzten Tiergruppe appliziert. Es ist folglich davon auszugehen, dass es sich hier um vergleichbare Versuchsbedingungen gehandelt hat, und die Ergebnisse zumindest teilweise auf die hier durchgeführten Untersuchungen übertragbar sind.

90 min. nach LPS-Injektion stiegen bei den Meerschweinchen die IL-6-Plasmakonzentrationen in den beiden systemisch behandelten Tiergruppen ca. 1000-fach und

lediglich 5-fach bei Tieren an, denen die niedrigere LPS-Dosis (10 µg/kg) in die subkutane Kammer injiziert wurde. Wie sind nun diese zirkulierenden IL-6-Konzentrationen zu bewerten? Welche Wirkung haben sie auf die Fieberentstehung? Für IL-6 wurden prinzipiell eher moderate pyrogene Eigenschaften für Meerschweinchen (Blatteis *et al.*, 1990), Ratten (Harré *et al.*, 2002) und Kaninchen (Helle *et al.*, 1988) beschrieben. Es wird daher angenommen, dass es zusätzliche Faktoren gibt, die eine Fieber erzeugende Wirkung von IL-6 verstärken, beziehungsweise erst ermöglichen (Cartmell *et al.*, 2003). Die Gabe einer relativ hohen IL-6 Dosis in die subkutane Luftblase induzierte beispielsweise kein Fieber. Durch Koapplikation subpyrogener Dosierungen von IL-1β änderte sich dies allerdings derart, dass sich eine deutliche Fieberreaktion entwickelte (Cartmell *et al.*, 2000). Auch durch eine intrazerebroventriculäre (icv) Gaben von IL-6 alleine konnten in mehreren Studien robuste Fieberreaktionen erzeugt werden (Blatteis *et al.*, 1990; LeMay *et al.*, 1990; Lenczowski *et al.*, 1999). IL-6 scheint demnach zumindest zentral im Gehirn eine notwendige Komponente der Fieberentstehung dazustellen. IL-6-defiziente Knockout-Mäuse zeigten lediglich normale Fieberreaktionen nach icv Applikation von IL-6, nicht aber nach i.p. Gabe von LPS oder IL-1β (Chai *et al.*, 1996). Insgesamt ist es daher schwierig, aufgrund seiner Eigenschaften, IL-6 als einen grundsätzlich entscheidenden Faktor für die Fieberentstehung zu beurteilen. Für die niedrige in die subkutane Kammer applizierte LPS-Dosierung ergibt sich hieraus, dass der hierbei auftretende moderate Anstieg an IL-6 in der Zirkulation eher kein exklusives humorales Signal für die Fieberentstehung unter diesen Bedingungen darstellt. Im Modell der systemischen Inflammation hingegen sind ausreichend hohe Konzentrationen an IL-6 in der Blutbahn vorhanden, um zentralnervöse Effekte der APR zu beeinflussen. Natürlich darf dabei allerdings nicht vergessen werden, dass auch andere Zytokine wie IL-1 (Desson & Ferguson, 2003) pyrogene Eigenschaften besitzen und ebenfalls in diesem Modell eine Rolle spielen könnten (Kapitel II 3.2, 3.3), auch wenn die Plasmakonzentrationen an IL-1 nur sehr gering sind bzw. sogar unter der Nachweisgrenze liegen. Dennoch kann allein der fehlende Nachweis eines Anstiegs von IL-1 in der Zirkulation nicht zum Ausschluss dieses Zytokins als synergistisch wirksamen, Fieber-erzeugenden Mediator führen (Kluger, 1991). Vielmehr könnten sich pyrogene Eigenschaften von IL-1 durch eine lokale Bildung und Wirksamkeit manifestieren.

1.2. Rolle der zirkumventrikulären Organe (CVOs)

Wenn IL-6 als humoraler Botenstoff an der Induktion zentralnervös kontrollierter Krankheitssymptome beteiligt sein sollte, müssten direkte Effekte dieses Zytokins auf zelluläre Elemente des Gehirns nachweisbar sein. Dies wurde hier über die Wirkung von IL-6 auf die JAK/STAT-Signalkaskade untersucht. 90 min. nach LPS-Stimulation fanden sich nukleäre STAT3-Signale in Zellen der sensorischen CVOs und einigen anderen Gehirnstrukturen wie dem SON, in den Meningen und in Endothelzellen. Andere mit Ratten durchgeführte Studien konnten ebenfalls nukleäre STAT3-Translokationen in Zellen der sCVOs nach systemischer LPS oder IL-6 Gabe nachweisen (Gautron *et al.*, 2002; Harre *et al.*, 2002). Die neuroanatomische Untersuchung von STAT3-Aktivierungen im Gehirn nach LPS-Applikation stellt demnach eine gute Möglichkeit dar, Zellen zu identifizieren, die auf

zirkulierende Zytokine reagieren. Bei Ratten konnte ein zeitabhängiges Verteilungsmuster spezifischer nukleärer STAT3-Translokationen nach i.p. Gabe von LPS oder Ratten-spezifischen IL-6 im Gehirn festgestellt werden (Gautron *et al.*, 2002; Harre *et al.*, 2002). In diesen Studien wurden nukleäre STAT3-Signale vor allem im OVLT und im SFO der Ratte dargestellt. Die Aktivierung von Zellen in diesen beiden sensorischen CVOs trat 120 min. nach LPS- bzw. 60 min. nach IL-6-Applikation auf. Dieses zeitliche Verteilungsmuster nukleärer STAT3-Translokationen korrelierte gut mit den jeweils vorliegenden bioaktiven IL-6-Konzentrationen im Blut. Bei Meerschweinchen scheinen allerdings Fieber und zirkulierende IL-6-Konzentrationen schneller induziert zu werden als bei Ratten (Jansky *et al.*, 1995; Harré *et al.*, 2002). In Vorversuchen zu dieser Arbeit wurden erste LPS-induzierte nukleäre STAT3-Signale 60 min. nach LPS-Applikation beobachtet. Im Zuge der nächsten 30 min. stieg die Anzahl an nukleären STAT3-Translokationen drastisch an und erreichte zum Zeitpunkt 90 min. ein Maximum. Zwei Stunden nach LPS-Behandlung war die LPS-induzierte nukleäre STAT3-Aktivität immer noch hoch, allerdings verglichen mit dem 90 minütigen Zeitpunkt, etwas weniger stark ausgeprägt. Deshalb wurde hier in allen untersuchten Tiergruppen (i.a., i.p. oder s.c. Injektionen) die LPS-induzierte nukleäre STAT3-Translokation im Meerschweinchengehirn 90 min. nach Injektion von LPS oder der Kontrolllösung (0,9 % NaCl) untersucht.

Welche Rolle spielen die sensorischen CVOs bei der Fieberentstehung? Das OVLT war die erste dieser drei Gehirnstrukturen, für die vermutet wurde, dass sie eine rezep tive Funktion für potenzielle endogene Pyrogene besitzt. Diese Hypothese war aufgrund der Beobachtung aufgestellt worden, dass elektrolytische Zerstörung des OVLT, oder die Unterbrechung neuronaler Verbindungen vom OVLT hin zum Hypothalamus Fieber nach systemischer Pyrogen-Gabe unterdrückte (Blatteis *et al.*, 1983; Blatteis *et al.*, 1987; Hashimoto *et al.*, 1994; Romanovsky *et al.*, 2003). Inzwischen lieferten andere Läsions-Studien Hinweise auch für eine Beteiligung des SFO (Takahashi *et al.*, 1997) oder der AP (Lee *et al.*, 1998; Marvel *et al.*, 2004) bei der Signalvermittlung des aktivierten Immunsystems zum Gehirn. Ein Nachteil der Anwendung dieser Läsionen liegt darin, dass eine Zerstörung der genannten Gehirnstrukturen natürlich auch deren physiologische Funktionen ausschaltet. Es wurde deshalb argumentiert, dass Läsionen der *Lamina terminalis*, die das SFO und das OVLT beinhalten, eine Unterdrückung von Fieber durch unerwünschte Nebenwirkungen wie Adipsie, erheblichen Verlust an Körpermasse und Hyperthermie erzielen (Romanovsky *et al.*, 2003). Ein alternativer Ansatz für solche Untersuchungen könnte in der zentralen Applikation von Lokalanästhetika liegen, die eine begrenzte Wirkung haben und vielleicht auch eine Kompensation der induzierten Störungen verhindern (Marvel *et al.*, 2004). Schließlich werden die Befunde aus den Läsions-Versuchen (der Effekt durch die Zerstörung von einzelnen CVOs auf Fieber) durch andere experimentelle Ansätze und Techniken unterstützt. Mittels der Messung extrazellulärer neuronaler Aktivität konnte gezeigt werden, dass die Entladungsrate von OVLT-Neuronen durch Zytokine und PGE₂ in einer Weise beeinflusst wird, die kompatibel mit der Entstehung von Fieber ist (Shibata & Blatteis, 1991; Matsuda *et al.*, 1992). Demnach werden warmsensitive Neurone gehemmt und kaltsensitive Neurone aktiviert (Kapitel II 1.1.1, 1.1.3). Kürzlich wurde eine interessante

Patch Clamp Studie an isolierten Neuronen des SFO publiziert (Desson & Ferguson, 2003). Bei diesen Untersuchungen induzierten physiologische Konzentrationen an IL-1 β eine transiente Depolarisierung und eine Erhöhung der Entladungsfrequenz einer identifizierten Population von Neuronen im SFO. Diese Beobachtungen wurden als ein potenziell initialer Schritt zur Fieberentstehung nach Immunstimulation interpretiert. Zusätzliche Studien sind notwendig, um auch eine mögliche Beteiligung von IL-6 an der Beeinflussung elektrischer Eigenschaften der in den sCVOs lokalisierten Neurone zu charakterisieren. Schließlich ist IL-6 im Gegensatz zu IL-1 β über den ganzen Zeitraum experimentell erzeugter Fieberreaktionen erhöht und stellt neben anderen Zytokinen einen wichtigen humoralen Botenstoff dar {Kapitel II 3.3.1, (Miller *et al.*, 1997b; Cartmell *et al.*, 2000)}.

Zytokine sind die potenziellen endogenen Mediatoren der LPS-induzierten nukleären STAT3-Translokation. IL-6 ist allerdings nicht das einzige Zytokin, welches in der Lage ist, die STAT3-Signalkaskade zu aktivieren. Andere Zytokine der gp130 Rezeptor-Familie wie IL-11, CNTF, LIF oder Leptin können potenziell auch eine nukleäre STAT3-Translokation bewirken {Kapitel II 4.1, (Taga & Kishimoto, 1997; Takeda & Akira, 2000; Hübschle *et al.*, 2001b)}. Deshalb könnte man argumentieren, dass LPS neben anderen Zytokinen auch Leptin induziert (Finck *et al.*, 1998; Francis *et al.*, 1999) und Leptin wiederum zu der dokumentierten nukleären STAT3-Translokation beiträgt. Dagegen spricht aber, dass sich die Leptin-induzierte STAT3-Aktivierung im Gehirn deutlich von den IL-6-induzierten Verteilungsmustern solcher genomisch aktivierten Zellen unterscheidet. Dies konnte unabhängig davon gezeigt werden, ob diese Zytokine zentral {icv., (Hübschle *et al.*, 2001b)} oder peripher (Harré *et al.*, 2002; Hosoi *et al.*, 2002) appliziert wurden. Namentlich in den sCVOs, welche von besonderem Interesse für die vorliegende Arbeit sind, findet offensichtlich keine Leptin-induzierte nukleäre STAT3-Translokation statt (Hübschle *et al.*, 2001b; Hosoi *et al.*, 2002).

Aus folgenden Gründen kann angenommen werden, dass die meisten der hier im Meerschweinengehirn beobachteten LPS-induzierten nukleären STAT3-Signale durch IL-6-vermittelt sind. Nach systemischer Gabe von LPS wurden hohe zirkulierende IL-6 Konzentrationen induziert, es war somit in Gestalt dieses Zytokins ein adäquater humoraler Botenstoff vorhanden, der an seinen spezifischen Rezeptoren wirken könnte. Außerdem korrelieren in allen vier Pyrogen-stimulierten Versuchstiergruppen die IL-6 Konzentrationen im Blut recht gut mit der Zahl an nukleären STAT3-Signalen in den sensorischen CVOs (Abbildung 54). Der IL-6-Rezeptor und die gp130-Untereinheit, beide notwendig für die IL-6 Signaltransduktion, sind in den sCVOs (OVLT, SFO, AP) und in anderen Gehirnregionen, in denen LPS-induzierte STAT3-Aktivierungen im Rahmen dieser Arbeit beobachtet wurden, auch unter basalen Bedingungen vorhanden (Vallières & Rivest, 1997). Injektionen von LPS erhöhen die Expression von IL-6-Rezeptoren und gp130 mRNA in den sCVOs und scheinen somit diese Gehirnstrukturen für eine stärkere Interaktion mit zirkulierendem IL-6 zu sensibilisieren. Es sollte allerdings berücksichtigt werden, dass entlang der Gehirngefäße auch IL-6-Rezeptoren und gp-130-Untereinheiten in LPS-behandelten Tieren exprimiert werden und dass IL-6 daher in der Lage sein müsste auch mit dem Endothel von Gehirnkapillaren zu interagieren. Die basale Ausstattung mit gp130-Untereinheiten ist allgemein in fast allen

Gehirnzellen vorhanden, im Endothel allerdings eher moderat. Außerdem findet sich im Endothel keine konstitutive Expression von IL-6-Rezeptoren, was wiederum die Rolle der sCVOs bei der LPS-induzierten Interaktion von IL-6 mit Gehirnzellen gerade dieser Strukturen befürwortet (Vallières & Rivest, 1997). Zusätzlich könnte LPS die Expression und die Ausschüttung von löslichen IL-6-Rezeptoren stimulieren, welche in der Lage sind, zusammen mit IL-6, gp130 exprimierende Zellen zu aktivieren. Solche löslichen Rezeptoren verstärken und verlängern *in vivo* nach icv-Applikation Fieber und andere zentralnervös kontrollierte Effekte der APR (Schöbitz *et al.*, 1995). Zudem wurden lösliche IL-6-Rezeptoren in mehreren klinischen Krankheitsfällen in erhöhten Konzentrationen gemessen (Jones *et al.*, 2001). Die Rolle der sCVOs bei der Fieberentstehung wurde darüber hinaus in früheren Studien durch immunhistologischer Detektion der Induktion von FOS-Protein untersucht (Kapitel II 4.3). Auf der einen Seite war der Beginn der LPS-induzierten Fieberreaktion vom Auftreten von FOS-Signalen in diesen Strukturen mit einer unvollständigen BBB begleitet (Konsman *et al.*, 1999). Auf der anderen Seite konnte sowohl nach systemischer als auch zentraler IL-6-Applikation ebenfalls eine Aktivierung von Zellen anhand von FOS-positiven Zellen in den sCVOs nachgewiesen werden (Vallières *et al.*, 1997). Dies ist ein zusätzlicher Hinweis darauf, dass IL-6 mit Zellen dieser Gehirnstrukturen interagiert und demnach auch für die in dieser Arbeit dokumentierte STAT3-Translokation verantwortlich sein könnte. Für den Transkriptionsfaktor STAT3 ist entsprechend eine Induktion des FOS-Proteins beschrieben worden (Kapitel II 4.1.1).

Interessanterweise induzierte die systemische Behandlung mit LPS in der vorliegenden Arbeit auch eine nukleäre STAT3-Translokation in einigen Gehirnregionen mit einer vollständigen BBB. Darunter fallen beispielsweise der VMPO und der SON. In der hier durchgeführten Studie fiel ein kontinuierliches Band an nukleären STAT3-Signalen auf, welches von rostralen Anteilen des VMPO startend bis zu caudalen Anteilen des SON reichte. Es wurden im SON zwar bereits nukleäre STAT3-Translokationen beschrieben, allerdings nicht in dieser Form einer derartigen aktivierten Zone (Gautron *et al.*, 2002). Die funktionelle Relevanz dieser Beobachtungen ist bisher allerdings unklar. Trotzdem ist zu erwähnen, dass bei der Ratte der VMPO eine Gehirnstruktur repräsentiert, die auch als „Pyrogen Zone“ bezeichnet wird (Scammell *et al.*, 1996a). Es wird demnach von Bedeutung sein, ob die hier dargestellte IL-6-vermittelte genomische Aktivierung von Zellen in dieser Region als ein Mechanismus mit funktioneller Relevanz für die Fieberentstehung bei Meerschweinchen identifiziert werden kann.

Schließlich bleibt anzumerken, dass der Anstieg der Körpertemperatur bei den Fieberreaktionen dem Auftreten der nukleären STAT3-Signale im Gehirn deutlich voran ging (Abbildung 39-42). Der STAT3-vermittelte Effekt in den sCVOs wird also eher an der Aufrechterhaltung des Fiebers als an der Induktion der frühen Fieberphase beteiligt sein. Demnach scheint IL-6 vor allem für die zweite Phase der biphasischen Fieberreaktion von Bedeutung zu sein.

In Einklang mit den hohen IL-6-Konzentrationen im Plasma nach der systemischen LPS-Applikation wurden bei diesen Tiergruppen ausgeprägt hohe Zahlen an nukleären STAT3-Signalen im Meerschweinchengehirn festgestellt. Interessanterweise erzeugte auch die Gabe

von 100 µg/kg (hohe Dosis) in die subkutane Kammer eine moderate (OVLT, SFO) bis hohe (AP) nukleäre STAT3-Aktivierung in den sCVOs. Dieser Befund unterstützt die Hypothese, dass IL-6, welches aus der subkutanen Kammer in die Zirkulation gelangt, zentralnervös kontrollierte Mechanismen aktivieren könnte (Cartmell *et al.*, 2000). Es scheint also, dass die moderaten Mengen an IL-6, die nach Injektion von 100 µg/kg LPS in die subkutane Kammer in der Blutbahn auftreten, im Bereich der sensorischen CVOs Zugang zum Gehirn und vor allem der AP bekommen und eine direkte genomische Aktivierung von Gehirnzellen bewirken. Eine mögliche Rolle für zirkulierendes IL-6 als afferentes, humorales Signal für die Aufrechterhaltung von Fieber (Cartmell *et al.*, 2000) und die Aktivierung der HPA-Achse (Vallières & Rivest, 1999; Turnbull *et al.*, 2003) auch während lokalisierter Entzündungsreaktion wird demnach durch die hier erhobenen Befunden unterstützt.

In den Kontrolltieren wurden im Rahmen dieser Arbeit zytoplasmatische STAT3-Signale beobachtet (Abbildung 48, D). Lediglich in Einzelfällen waren auch STAT3-positive Zellkerne nachweisbar (Tabelle 22). Dies hängt damit zusammen, dass der hier verwendete Antikörper sowohl phosphorylierte als auch unphosphorylierte Formen dieses Transkriptionsfaktors über das spezifische Epitop des STAT3-Moleküls erkennt. In unstimulierten Zellen liegt das STAT3-Monomer im Zytoplasma vor und wurde dementsprechend auch dort nachgewiesen. Das Vorhandensein einzelner nukleärer Signale könnte mit dem basalen STAT3-Austausch zwischen Kern und Zytoplasma zusammenhängen, der in ruhenden Zellen ständig vorkommt und sich in wenigen Zellen qualitativ über den Antikörper nachweisen lässt {Kapitel II 4.1.1, (Bowman *et al.*, 2000)}. Zusätzlich ist eine genomische Aktivierung von einzelnen Zellen auch über die basalen IL-6 Plasmaspiegel denkbar.

Schließlich kann zumindest für die zwei systemisch mit LPS-behandelten Tiergruppen nicht ausgeschlossen werden, dass neben Zytokinen als humorale Botenstoffe auch das exogene Pyrogen LPS direkt auf Gehirnzellen einwirkt und damit zu Veränderungen in zentralnervös kontrollierten Reaktionen der APR führt. Dadurch wäre zum Beispiel der schnelle Anstieg der Körpertemperatur bei Fieber erklärbar, bevor messbare Konzentrationen an proinflammatorischen Zytokinen im Blut vorhanden sind. Wie bereits in Kapitel II 2.2.1 angesprochen, wirkt LPS über den LPS-LPS-B-CD14-Komplex und vor allem über TLR4-Rezeptoren. Konstitutiv wird sowohl der CD14 Rezeptor, als auch der TLR4-Rezeptor in den sCVOs exprimiert. Nach LPS-Stimulation wird die CD14-Rezeptor-Expression sogar massiv hochreguliert, während sich die Expression der TLR4-Rezeptoren allerdings eher verringert (Lacroix *et al.*, 1998; Laflamme & Rivest, 2001). Demnach kann zumindest für die systemisch behandelten Tiergruppen (i.a., i.p.) LPS selbst als das erste Pyrogen angesehen werden, welches eine Rolle als humoraler Botenstoff für die Induktion der frühen Phase der Fieberreaktion spielen könnte. In dem Maße, wie TLR4-Rezeptoren im Zuge der Fieberreaktion eine Verringerung ihrer Expression erfahren, steigt die Bedeutung zirkulierender Zytokine (IL-6), welche schließlich für die Aufrechterhaltung der zweiten Fieberphase von großer Bedeutung zu sein scheinen. Im Modell der lokalen Entzündung dürfte zirkulierendes LPS allerdings keine Rolle spielen, da LPS nicht ins Blut übertritt (Cartmell *et al.*, 2001; Ross, 2001). Auch der Transkriptionsfaktor NF-κB wird in den sCVOs

nach LPS-Behandlung induziert (Nadjar *et al.*, 2003). Über diesen Signalweg könnte LPS die intrazerebrale Bildung von IL-6 und PGE₂ als terminale Fiebermediatoren induzieren. Die Rolle von direkt im Gehirn gebildetem (zentralem) IL-6 bei Fieberreaktionen wurde durch die bereits erwähnten Studien mit Knockout-Mäusen bestätigt (Chai *et al.*, 1996).

Abschließend stellt sich die Frage wie die terminalen Fiebermediatoren die thermoregulatorischen Strukturen im Hypothalamus beeinflussen können, wenn sie zunächst in den sCVOs wirken. Einerseits wird von einem Netzwerk an neuronalen Verbindungen zwischen sCVOs und Hypothalamus ausgegangen, das für eine Informationsübertragung in die entsprechenden integrativen hypothalamischen Areale verantwortlich sein könnte. Alternativ wurde für kurze Distanzen z.B. zwischen OVLT und Hypothalamus die Volumentransmission von Botenstoffen vorgeschlagen (Konsman *et al.*, 1999). Sie stellt einen möglichen Weg der Informationsübertragung durch Diffusion von Mediatoren im Extrazellulärraum über kurze oder längere Distanzen dar (Agnati *et al.*, 1995).

1.3. Rolle der einzelnen aktivierten Zellfraktionen

Durch Kolokalisation mit spezifischen Zellmarkern (GFAP, vW, NADPH-d) konnte eine markante nukleäre STAT3-Translokation in Endothelzellen des gesamten Meerschweinengehirns, in Astrozyten vor allem im Bereich der sCVOs und möglicherweise für einige Neurone im Randbereich des SFO beobachtet werden. Zusätzlich wurden auch morphologisch-neuroanatomisch endotheliale, meningiale und ependymale Zellen in den DAB-gefärbten Schnitten identifiziert. Dies stimmt prinzipiell mit Befunden früherer Studien im Rattengehirn überein (Gautron *et al.*, 2002; Harré *et al.*, 2002; Harré *et al.*, 2003). Allgemein wurden bereits verschiedenste Gehirnzell-Phänotypen vorgeschlagen, die mit nukleärer Translokation von STAT3 oder STAT3-Phosphorylierung auf unterschiedliche *in vivo* Stimulationen reagieren. Zu diesen Zellen zählen Astrozyten (Justicia *et al.*, 2000; Gautron *et al.*, 2002; Harré *et al.*, 2003), Endothelzellen (Suzuki *et al.*, 2001; Gautron *et al.*, 2002), Ependymzellen (Hübschle *et al.*, 2001b; Lambert *et al.*, 2001; Gautron *et al.*, 2002; Gautron *et al.*, 2003), meningeale Zellen (Hübschle *et al.*, 2001b; Gautron *et al.*, 2002), Mikroglia (Justicia *et al.*, 2000), Neurone (Justicia *et al.*, 2000; Hübschle *et al.*, 2001b; Lambert *et al.*, 2001; Suzuki *et al.*, 2001; Gautron *et al.*, 2002; Hosoi *et al.*, 2002), Zellen der Epiphyse (Takamiya *et al.*, 2002), endokrine Zellen der Hypophyse (Gautron *et al.*, 2003) und Tanyzyten (Lambert *et al.*, 2001). Eine direkte phänotypische Charakterisierung der STAT3-responsiven Zellen wurde jedoch lediglich in wenigen Fällen durchgeführt. Bestätigte Kolokalisationen liegen bislang nur für Astrozyten, Hypophysenzellen, Mikroglia und Neurone vor (Justicia *et al.*, 2000; Gautron *et al.*, 2002; Gautron *et al.*, 2003; Harré *et al.*, 2003).

1.3.1. Astrozyten

In der von Gautron *et al.* (2002) mit Ratten durchgeführten Studie wurden nukleäre STAT3-Signale vorwiegend in Astrozyten lokalisiert. Dies konnte in dieser Arbeit nicht bestätigt werden. In den meisten Gehirnstrukturen wurden nur in Einzelfällen STAT3-Signale in GFAP-postiven Zellen beobachtet. Innerhalb der sCVOs hingegen war eine größere

Subpopulation an nukleären STAT3-Signalen in Astrozyten lokalisiert, die etwa 20 % der Gesamtzahl an responsiven Zellen im SFO (Randbereich) und im OVLT ausmachte. In der *Area postrema* waren sogar etwa 80 % aller STAT3-positiven Zellen auch mit GFAP kolokalisierbar, in der zentralen Region des SFO hingegen überhaupt keine. In diesen spezialisierten Gehirnstrukturen mit einer offenen Blut-Hirn-Schranke und besonders in der AP werden demnach vermehrt Astrozyten aktiviert.

Die Diskrepanz der Zell-Phänotyp-spezifischen Verteilung der nukleären STAT3-Signale zwischen der Studie von Gautron *et al.* (2002) und den hier vorgestellten Befunden könnte durch die unterschiedlichen Spezies (Ratte *versus* Meerschweinchen) und die unterschiedlichen LPS-Dosierungen (250 *versus* 30 µg/kg) erklärt werden.

Eine LPS-induzierte Aktivierung von Astrozyten wurde auch schon in früheren Studien zum Beispiel anhand des immunhistochemischen Nachweises von IκB gezeigt (Quan *et al.*, 1997). Astrozyten werden allgemein bei Infektionen des ZNS (Aschner, 1998) oder bei Gehirn-Traumata stimuliert (Gautron *et al.*, 2002). Sie exprimieren dann vermehrt GFAP, den zellulären Marker reifer Astrozyten. Dies geschieht bei Aktivierungen dieser Zellen über die Anlagerung von STAT3 an ein STAT-responsives Element im Promotor des GFAP-Gens (Takizawa *et al.*, 2001). IL-6 ist demnach also selbst als Induktor des Astrozyten-spezifischen Zytoskelett-Proteins GFAP wirksam. Weithin ist bekannt, dass Astrozyten eine strukturelle und funktionelle Unterstützung von Neuronen bewirken. Sie besitzen neben anderen Rezeptoren den IL-6R und können bei Stimulation proinflammatorische Zytokine wie IL-6 produzieren (Gruol & Nelson, 1997). Astrozyten wären also in der Lage, nach dem Prinzip der in Kapitel II 3 beschriebenen Kaskade, Pyrogen-induzierte Signale in den CVOs durch weitere Bildung von sekundären zentralen Zytokinen zu verstärken. Eine parakrine oder autokrine Wirkung ist hierbei durchaus vorstellbar (Gautron *et al.*, 2002). Interessanterweise produzieren stimulierte Astrozyten aber auch Proteinase-Inhibitoren. Eines dieser Proteine ist Lipocortin-1, ein Kalzium- und Steroid-abhängiges Membran-Bindungsprotein (Johnson *et al.*, 1989), welches anti-PLA₂-Aktivität besitzt. Damit wäre das initiale Enzym der Prostaglandin-Synthese gehemmt und Astrozyten könnten hierdurch sogar antiinflammatorische Effekte erzielen (Aschner, 1998). Möglicherweise kann in den für humorale Botenstoffe exponierten sCVOs somit eine Überreaktion auf lang anhaltende Pyrogen-Stimulation verhindert werden. Die Interaktion von Astrozyten mit Neuronen in diesem Zusammenhang erfordert weitere Untersuchungen.

1.3.2. Endothelzellen

Zum ersten Mal konnte im Rahmen dieser Arbeit bei Meerschweinchen eine LPS-induzierte STAT3-Aktivierung in Endothelzellen über das ganze Gehirn verteilt dokumentiert werden. Dies wurde anhand immunhistochemischer Kolokalisations-Experimente des Transkriptionsfaktors STAT3 mit dem von Willebrand-Faktor (vW) durchgeführt. Das vW-Antiserum wurde bereits in mehreren Studien zur Analyse von Zell-Phänotypen als endothelialer Marker eingesetzt (Laflamme & Rivest, 1999; Lebel *et al.*, 2000; Yamagata *et al.*, 2001; Ibuki *et al.*, 2003; Konsman *et al.*, 2004). Endothelzellen exprimieren Zytokin-Rezeptoren, stellen also potenzielle Zielstrukturen für endogene Pyrogene dar. Konsman *et al.*

(2004) beispielsweise konnte zeigen, dass in der Ratte IL-1R mit vW kolokalisiert. Auch für die Existenz von IL-6R und gp130 in Endothelzellen wurden bereits Beweise erbracht (Vallières & Rivest, 1997; Lebel *et al.*, 2000). Endothelzellen im Gehirn exprimieren den IL-6R jedoch lediglich nach LPS-Stimulation. In Abwesenheit des Membran-gebundenen Rezeptors könnte allerdings alternativ eine Signaltransduktion durch den sIL-6R aus dem Blut über die konstitutiv vorhandenen gp130-Untereinheiten stattfinden. Insgesamt ist damit also die nukleäre STAT3-Translokation in Endothelzellen erklärbar. Das Ausmaß der endothelialen Aktivierungen im ganzen Gehirn fiel jedoch unerwartet hoch aus. Die funktionelle Relevanz dafür ist bisher unklar.

Die hier beschriebene dominante Rolle der Endothelzellen als Zielzellen für das proinflammatorische Zytokin IL-6 im Gehirn wird durch andere Studien unterstützt, in denen nicht STAT3 sondern andere Transkriptionsfaktoren oder aber dem Transkriptionsprozess-assoziierte Moleküle verwendet wurden. Dazu gehören FOS (Elmqvist *et al.*, 1997), Jun (Konsman *et al.*, 2004), SOCS3 (Lebel *et al.*, 2000), I κ B α (Quan *et al.*, 1997) und NF- κ B (Nadjar *et al.*, 2003). Diese Signalmoleküle wurden alle verwendet, um neuroanatomisch die Wirkung von Zytokinen im Gehirn zu untersuchen und die entsprechend reagierenden Zell-Phänotypen zu determinieren. Beispielsweise konnte gezeigt werden, dass nach Pyrogen-Behandlung (LPS, IL-1 β , TNF- α) die meisten I κ B α exprimierenden Zellen Endothelzellen waren (Laflamme & Rivest, 1999). Entsprechend den Befunden dieser Studie wurden Transkriptionsfaktor-aktivierte Endothelzellen in Mikrokapillaren des ganzen Gehirns wie im *Plexus choroideus*, den sCVOs und den Meningen beschrieben. Eine Population parenchymaler Mikrogliazellen konnte als weiterer I κ B α exprimierender Phänotyp identifiziert werden. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit war für das Meerschweinchen ein Nachweis STAT3-aktivierter Mikroglia nicht möglich, da verfügbare Antikörper für mikrogliale Zellmarker bei dieser Tierspezies nicht funktionierten (Tabelle 10). Interessanterweise wurde nach IL-6-Applikation (12 μ g/kg i.p.) kein I κ B α im Gehirn der Ratte induziert (Laflamme & Rivest, 1999). Es gibt auch nur wenige Hinweise dafür, dass IL-6 als Zytokin der gp130 Rezeptorfamilie über den JAK-STAT-Signaltransduktionsmechanismus an der Aktivierung von NF- κ B beteiligt ist. Eine Mitwirkung von IL-6 an der Transkription dieses Mediators ist demnach eher unwahrscheinlich (Rivest, 2003). Im Gegensatz dazu ist, wie in Kapitel II 4.2 beschrieben, IL-1 β ein Auslöser dieses Signalweges. Der IL-1 β -induzierte immunhistologische Nachweis von NF- κ B im Gehirn der Ratte deutet auf zwei wichtige Zielstrukturen für dieses Zytokin hin, nämlich wiederum die sCVOs und Endothelzellen (Nadjar *et al.*, 2003). Die Bedeutung dieser beiden zentralnervösen Zielstrukturen konnte in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden.

Eine wichtige Form der Zytokin-induzierten Wirkung auf Gehirnzellen ist die Stimulation einer lokalen Bildung von Signalmolekülen. Speziell PGE₂ ist ein essenzieller Mediator bei Entzündungsreaktionen und gilt auch als einer der terminalen Fiebermediatoren (Kapitel II 5.1.1). Deshalb ist es nicht verwunderlich, dass die neuroanatomische Detektion von COX-2, dem Schlüsselenzym der inflammatorischen Prostaglandin-Synthese, als Marker für das Verteilungsmuster immunstimulierte Zellen im Gehirn angewendet wurde (Kapitel II 5.1). Tatsächlich ist COX-2 bei systemischen Entzündungsreaktionen in ausgesprochen hohem

Maße in den verschiedensten Zellen entlang der Mikrovaskularisation des Gehirns, aber auch in den Meningen, induzierbar (Cao *et al.*, 1996; Elmquist *et al.*, 1997; Matsumura *et al.*, 1998a; Rivest, 1999; Schiltz & Sawchenko, 2003; Konsman *et al.*, 2004), was ebenfalls in der vorliegenden Arbeit mittels *in situ* Hybridisierung erstmals auch für das Meerschweinchen gezeigt werden konnte (Abbildung 65, Kapitel IV 3.1). Der Grad der Responsivität dieser Zellen scheint sich allerdings je nach Zelltyp zu unterscheiden. Während perivaskuläre Zellen bereits bei niedrigeren pyrogenen Stimuli vergleichsweise spät (120 min. nach LPS-Stimulation) reagieren, durchbrechen Endothelzellen den Schwellenwert für eine Induktion der COX-2-Bildung zu einem früheren Zeitpunkt, doch lediglich nach stärkeren und komplexer wirkenden Immunstimulationen (Schiltz & Sawchenko, 2003; Konsman *et al.*, 2004; Matsumura & Kobayashi, 2004). Zusammengefasst erweist sich unter verschiedenen inflammatorischen Bedingungen trotzdem das Endothel als die Hauptquelle der PGE₂-Produktion (Rivest, 1999; Matsumura & Kobayashi, 2004). Anhand der Befunde dieser Arbeit, in der eine markante LPS-induzierte Aktivierung von IL-6-vermittelten nukleären STAT3-Translokationen im Gehirnendothel festgestellt wurde, stellte sich die Frage, ob STAT3 bei Entzündungsreaktionen ein Transkriptionsfaktor für die Aktivierung des COX-2-Gens in Endothelzellen sein könnte. Folgende Beobachtungen unterstützen eine derartige Hypothese. Zum einen tritt die STAT3-Aktivierung nach systemischer Pyrogen-Gabe mit einem Peak nach 1-2 Stunden auf und geht demnach der COX-2-Induktion mit ihrem Maximum nach 3 Stunden voran. Die Betrachtung dieses zeitlichen Ablaufs würde also eine kausale Sequenz der beiden Vorgänge möglich erscheinen lassen. Zum anderen existiert auch eine Konsensusregion für den Transkriptionsfaktor STAT3 im COX-2-Promotor, die das Ablesen von COX-2 mRNA durch phosphorylierte STAT3-Dimere möglich machen würde (Stephanou *et al.*, 1998). Entsprechend konnte im Modell einer lokalen Inflammation durch intramuskuläre Injektion von Terpentin gezeigt werden, dass nur bei Wildtypmäusen aber nicht bei IL-6-Knockout-Mäusen eine COX-2-Induktion im Gehirngefäßsystem zu beobachten war (Turnbull *et al.*, 2003). Bei genauerer Betrachtung scheinen Pyrogen-aktivierte Endothelzellen vor allem in Venen und Venolen COX-2 zu exprimieren (Konsman *et al.*, 2004; Matsumura & Kobayashi, 2004). Arterien und Arteriolen waren nicht COX-2 immunreaktiv (Yamagata *et al.*, 2001). Ein endgültiger Beweis für die Beteiligung von STAT3 an der Induktion der Prostaglandinsynthese steht demzufolge noch aus.

Ein neuer Hinweis auf die funktionelle Bedeutung einer endothelialen STAT3-Aktivierung im Rahmen inflammatorischer Prozesse ergab sich aus Untersuchungen mit konditionellen Knockout-Mäusen. Prinzipiell sind STAT3-Knockout-Mäuse nicht lebensfähig; hier wurde allerdings gentechnologisch eine aktivierbare Deletion von STAT3 ausschließlich für das Endothel generiert (Kano *et al.*, 2003). 60 % solcher STAT3-defizienten Knockout-Mäusen starben nach LPS-Stimulation, während alle Wildtyp-Mäuse überlebten. Die Endothel-spezifischen STAT3-defizienten Mäuse zeigten allgemein eine verstärkte Entzündungsreaktion sowie Schäden in multiplen Organen. Organ-spezifisch konditionierte Knockout-Mäuse (Hepatozyten-, Kardiozyten-spezifische) hingegen wiesen keine erhöhte Empfindlichkeit für LPS-induzierbare Entzündungsreaktionen auf (Kano *et al.*, 2003). STAT3 scheint demnach auch der Protektion gegen LPS-induzierte Entzündungsreaktionen zu dienen. Es wird dieser

Signalkaskade also gemäß dieser Studie eine antiinflammatorische Rolle beigemessen. Welche Gene dabei eine Rolle spielen, bleibt jedoch nach wie vor offen.

Schließlich stellt sich noch die Frage, warum beispielsweise im PVN, einer der am stärksten vaskularisierten Regionen des Gehirns (Gross, 1992), nur wenige nukleäre STAT3-Signale in Endothelien dokumentiert werden konnten (Kapitel IV 2.1, Tabelle 24). Dies entspricht interessanterweise der Beobachtung von Konsman et al. (2004), dass auch die LPS-induzierte COX-2 Synthese kein im Gefäßsystem ubiquitäres Phänomen darstellt und im PVN ebenfalls vergleichsweise schwach ausfällt. Die Wirkung von Pyrogenen hängt also nicht primär mit der Dichte der Vaskularisation zusammen, sondern eher mit der differenzierten Ausstattung an arteriellen oder venösen Anteilen. In Übereinstimmung mit diesem Befund, dass COX-2 vor allem in Venen und Venolen exprimiert wird (Matsumura & Kobayashi, 2004), finden sich im PVN relativ wenige dünne Venolen, aber viele terminale arterielle Gefäße (Konsman *et al.*, 2004). Auf der anderen Seite konnte nur ein relativ geringer arterieller Anteil von Kapillaren im OVLT festgestellt werden. Hier scheinen verhältnismäßig viele lange venöse Kapillaren vom VMPO und dem *Nucleus praeopticus medialis* in diese Struktur zu ziehen, so dass hier dieser Gefäßtyp mit seiner spezifischen molekularen Ausstattung mehr ins Gewicht fällt (Konsman *et al.*, 2004). Das erklärt auch, warum nach IL-1 β -Gabe die PGE₂-Konzentrationen im OVLT höher sind als im PVN, welcher insgesamt eine viel höhere kapilläre Dichte aufweist (Komaki *et al.*, 1992). Schließlich unterstützen auch die im Rahmen dieser Arbeit beschriebenen Befunde diesen Zusammenhang. Mittels *in situ* Hybridisierung konnte speziell im OVLT und im SFO eine besonders hohe Dichte an COX-2 mRNA nachgewiesen werden (Tabelle 24, Abbildung 65).

1.3.3. Andere Zell-Phänotypen

Entlang der Grenzflächen des Gehirns zu den Ventrikeln oder dem Subarachnoidalraum konnten rein morphologisch und neuroanatomisch nukleäre STAT3-Signale in Meningen und Ependymzellen dargestellt werden. Ein direkter Nachweis des Zell-Phänotyps durch Doppelmarkierungen wurde für diese Zelltypen jedoch nicht durchgeführt. Insgesamt scheinen solche Zonen in besonderem Maße der Wirkung von Pyrogenen oder proinflammatorischen Zytokinen ausgesetzt zu sein.

Für Neurone wurden im Rahmen dieser Arbeit zwei Detektionsmethoden angewendet. Das Neuronen-spezifische Kernprotein (NeuN) ist nicht in allen Nervenzellen zu finden. Im Rahmen dieser Arbeit konnten in den sCVOs keine Zellkerne spezifisch mit diesem Zellmarker angefärbt werden, was allerdings jedoch nicht ausschließt, dass ein Teil der STAT3-responsiven Zellen möglicherweise doch Neurone waren. Deshalb wurde zusätzlich der enzymatische Nachweis der NADPH-d als relativ Neuronen-spezifischer Marker angewendet. Auch mit diesem Verfahren war jedoch vornehmlich in anderen Gehirnstrukturen als den sCVOs ein Nachweis solcher Zellen möglich. Lediglich im Randbereich des SFO wurden einige Zellen mit diesem Marker als potenzielle Neurone identifiziert, die nukleäre STAT3-Signale aufwiesen (Abbildung 62). Lange Zeit war es genereller Konsensus, dass in (mit Aldehyden) fixiertem Gewebe nur neuronale NOS (nNOS) durch die NADPH-d nachgewiesen wird (Krukoff, 1999). Es wurde allerdings schließlich

auch der Nachweis NADPH-d positiver Astrozyten beschrieben (Licinio *et al.*, 1999). Zusätzlich sind morphologisch gesehen Ähnlichkeiten zwischen Neuronen und Astrozyten vorhanden. Deshalb muss der Nachweis von STAT3-responsiven NADPH-d-positiven Neuronen mit Vorsicht interpretiert werden.

In der AP scheinen in der vorliegenden Arbeit die meisten Zellen mit einer nukleären STAT3-Translokation phänotypisch identifiziert worden zu sein (Abbildung 53). Im SFO und dem OVLT handelte es sich allerdings lediglich bei 40 % der STAT3-aktivierten Zellen um Endothelzellen und Astrozyten. Eine Subpopulation dieser Zellen (ca. 60 %) konnte also phänotypisch nicht dargestellt werden. Wahrscheinlich handelt es sich dabei zum Teil um Mikroglia und Neurone. In anderen Studien wurde bereits eine Beteiligung dieser beiden Zelltypen an der JAK/STAT-Signalkaskade beschrieben (Justicia *et al.*, 2000; Hübschle *et al.*, 2001b; Lambert *et al.*, 2001; Suzuki *et al.*, 2001; Gautron *et al.*, 2002; Hosoi *et al.*, 2002). Funktionell könnte eine genomische Aktivierung von Neuronen über neuronale Konnektivitäten zu der erwarteten Sollwert-Verschiebung im Bereich des Hypothalamus beitragen.

Im Gehirn kommen mehrere Typen an Makrophagen vor. Man teilt sie in fünf verschiedene Subpopulationen ein. Neben meningealen Makrophagen, supraependymalen Zellen, Epiplexuszellen und Perizyten gehören hierzu auch Mikroglia (Thomas, 1999). Sie besitzen alle die Fähigkeit, wie zirkulierende oder gewebeständige Makrophagen, proinflammatorische Zytokine zu bilden und stellen somit eine wichtige Quelle für im Gehirn gebildete endogene Pyrogene dar. Solche Zellen befinden sich, abgesehen von der Mikroglia, in den bereits erwähnten Grenzzonen des ZNS zum Blut oder zum Liquor, werden also relativ leicht von Mediatoren aus der Zirkulation oder der Zerebrospinalflüssigkeit erreicht. Außerdem sind diese Makrophagen im Gehirn in die lokale unspezifische Immunabwehr involviert. Insgesamt liegt die Vermutung nahe, dass solche Makrophagen zu einem gewissen Teil im Rahmen der humoralen Hypothese an der Fieberentstehung beteiligt sind.

2. Grenzen der Aussagekraft der Studie

2.1. Problem der Detektion

Bei kritischer Betrachtung der hier gewonnen Ergebnisse müssen mögliche methodische Probleme berücksichtigt werden. Ein wichtiger Punkt hierbei liegt in der Sensitivität des angewendeten immunhistologischen Nachweises. Es stellt sich die Frage, ob tatsächlich alle nukleären STAT-3-Translokationen vollständig erfasst wurden. Waren in der mit 10 µg/kg s.c. LPS-behandelten Tiergruppe wirklich keine nukleären STAT3-Signale vorhanden oder konnten sie nur nicht nachgewiesen werden? Prinzipiell kann nicht ausgeschlossen werden, dass methodische Probleme verhinderten, in der genannten Tiergruppe STAT3-Signale zu detektieren. Der immunhistologische Nachweis erfolgte allerdings unter Verwendung einer zweifachen Amplifizierung (Kapitel III 5.1.2.3). Dies stellt eine Verbesserung der Methodik dar, durch die eine sehr hohe Sensitivität erreicht werden kann, um auch geringe Bindungsaktivität des primären Antikörpers nachzuweisen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde schließlich das Protokoll der Immunhistologie zur Durchführung von Doppelmärierungen leicht abgeändert. Für die DAB-Methode und auch in anderen immunhistochemischen Studien verwendete man eine Perfusions-Fixations-Methode, bei der fast keine nukleären STAT3-Signale in Endothelzellen während LPS-induzierter systemischer Inflammation beobachtet werden konnten (Gautron *et al.*, 2002; Harré *et al.*, 2002; Harré *et al.*, 2003; Konsman *et al.*, 2004). Durch den Einsatz der Postfixations-Methode mit frisch gefrorenen Gehirnschnitten konnte schließlich eine dramatische Änderung des Verteilungsmusters an markierten Signalen festgestellt werden. Überraschenderweise waren jetzt nukleäre, endotheliale STAT3-Translokationen verteilt über das ganze Meerschweinchenhirn nachweisbar. Im Perfusions-fixierten Gehirn scheinen STAT3-Signale in Endothelzellen, welche besonders dem Kontakt mit der Fixierungslösung ausgesetzt waren, durch eine Überfixierung verschwunden zu sein. Folglich könnte die Fixierung durch Perfusion die Epitope in den meisten Gehirnendothelzellen maskieren, während die Postfixierungs-Methode von frisch gefrorenen Gehirnschnitten in der Lage ist, sie nachzuweisen.

Eigentlich wäre für die NADPH-d-Reaktion ein Nachweis vieler nNOS-positiver Neurone im SFO zu erwarten gewesen. Dies war für STAT3-positive und negative Zellen allerdings lediglich im Randbereich dieser Gehirnstruktur der Fall. Bei der Ratte wurden hingegen in einer frühen Studie viele solcher Neurone mit dieser Methode im SFO dargestellt (Jurzak, 1994). Dies könnte an Spezies-Unterschieden zwischen der Ratte und dem Meerschweinchen liegen. Außerdem wurde beschrieben, dass die NADPH-d-Reaktion sensitiv auf starke und länger einwirkende Fixierung reagiert (Dawson *et al.*, 1991). Daher könnte selbst die im Rahmen der hier durchgeführten Untersuchungen eingesetzte Postfixierung der Gefrierschnitte dazu beigetragen haben, dass nNOS-Aktivität nur in Randbereichen des SFO nachweisbar war.

2.1.1. SOCS als Alternative zum Aktivierungsmarker STAT3

Die Analyse der Aktivierung von SOCS3 im Gehirn während systemischer Inflammation stellt einen alternativen Ansatz dar, IL-6-induzierte Stimulation im ZNS zu untersuchen (Lebel *et al.*, 2000). Wie in Kapitel II 4.1.2 beschrieben, ist die Expression von SOCS abhängig von STAT3. Die Produktion von SOCS3 wiederum hemmt die STAT3-Phosphorylierung und bildet somit einen negativen autoregulatorischen Feedback-Mechanismus auf seine eigene Genexpression. Eine robuste Induktion des Genes, welches SOCS3 kodiert, ist bei Ratten und Mäusen 3 h nach i.p. Applikation von LPS im Gehirngefäßsystem und in den sCVOs nachweisbar. Diese Reaktion bleibt in IL-6-Knockout-Mäusen aus und scheint somit IL-6-vermittelt zu sein (Lebel *et al.*, 2000). Der zeitliche Ablauf der nukleären STAT3-Aktivierung in dieser vorliegenden Arbeit auf der Stufe der Proteine (Maximum: 90 min. nach LPS-Behandlung) und in der von Lebel *et al.* (2000) publizierten Studie zur SOCS3-Expression auf der Stufe der mRNA bestätigt, dass es sich bei SOCS3 um ein dem Transkriptionsfaktor STAT3 nachgeschaltetes Signalmolekül handelt. Die Tatsache, dass nukleäre STAT3-Aktivierungen nach ihrem Maximum (90 min.), trotz weiter ansteigender zirkulierender IL-6-Konzentrationen (Roth *et al.*, 1993) wieder

abnehmen, spricht für eine SOCS3 vermittelte Unterdrückung der beschriebenen nukleären STAT3-Translokation.

2.2. Problem der physiologischen Bedeutung

Es muss eingeräumt werden, dass die beobachtete Korrelation zwischen LPS-induziertem zirkulierenden IL-6 und der nukleären STAT3-Translokation auf der einen Seite und Fieber als physiologischem Endpunktparameter auf der anderen Seite nicht unbedingt einen kausalen Zusammenhang beschreiben muss. Selbst wenn die IL-6-vermittelte Aktivierung bestimmter Gene in den sensorischen CVOs und dem Gehirndothel an der Fieberentstehung beteiligt sein sollte, so ist es eher unwahrscheinlich, dass die IL-6-induzierte genomische Aktivierung von Gehirnzellen an der Induktion oder Manifestation der ersten Fieberphase Anteil hat. Aus genannten Gründen wird vielmehr von mehreren Autoren und durch Ergebnisse dieser vorliegenden Arbeit eine Rolle für IL-6 in der zweiten Fieberphase unterstützt. Es ist allerdings bisher nicht möglich zu entscheiden, ob die durch nukleäre STAT3-Translokation aktivierten Gene im Gehirn tatsächlich zur Manifestation der Fieberreaktion beitragen.

Im Gegensatz zu den erwarteten pyrogenen Wirkungen im Zusammenhang mit den inflammatorischen Eigenschaften von IL-6 mehrten sich zudem Hinweise auch für antiinflammatorische Eigenschaften dieses Zytokins (Kapitel II 3.4). Demnach könnte IL-6 auch teilweise den Fiebrückgang und nicht nur die Entstehung beziehungsweise Erhaltung von Fieber beeinflussen. Unterstützt wird diese Hypothese durch die beschriebene potenzielle Beteiligung von STAT3 an antiinflammatorischen Prozessen, die IL-6-vermittelt sein könnten (Kano *et al.*, 2003). Eine neuere Publikation konnte zeigen, dass ein Blockade von SOCS3 in Knockout-Mäusen die Wirkung von IL-6 zu einer IL-10 ähnlichen antiinflammatorischen Wirkung konvertiert (Yasukawa *et al.*, 2003). SOCS scheint in diesem Fall ansonsten spezifisch nur IL-6 induzierte antiinflammatorische Effekte zu unterdrücken. Hierbei soll ebenfalls allein die Dauer der ungehinderten Wirkung des Transkriptionsfaktors STAT3 Unterschiede in der möglichen Expression von Genen bewirken und dadurch Einfluss auf die Entzündungsreaktion erhalten. Demzufolge könnte SOCS je nach angesprochener Zelle Entzündungsreaktionen entweder hemmen oder fördern. SOCS scheint also eine regulatorische Rolle bei der Funktion von STAT3 in der gp130-Rezeptorfamilie von Zytokinen zu besitzen (Yasukawa *et al.*, 2003). Auf der anderen Seite ist auch eine Interaktion verschiedener Transkriptionsfaktoren (NF- κ B, STAT3, NF-IL-6) ebenfalls an der Regulation der Effekte von Zytokinen beteiligt (Kapitel II 4.1.1).

2.2.1. Pharmakologische Blockade der IL-6 Wirkung

Ein kausaler Zusammenhang zwischen IL-6-induzierter STAT3-Aktivierung im Gehirn und Fieber könnte durch eine pharmakologische Blockade eben dieser IL-6-vermittelten Stimulation von Gehirnzellen experimentell nachgewiesen werden. Ein gegen Meerschweinchen-spezifisches IL-6 gerichtetes Antiserum ist bislang nicht verfügbar, so dass ein bereits bei Ratten erfolgreich durchgeführtes Experiment zur Neutralisierung von LPS-induziertem IL-6 (Cartmell *et al.*, 2000) im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt werden konnte.

Kürzlich konnte gezeigt werden, dass ein Fusionsprotein aus den Liganden-Bindungsdomänen der gp130-Untereinheit und dem IL-6R als ein potenter IL-6-Hemmstoff wirkt, indem IL-6-induzierte STAT3-Phosphorylierungen verhindert werden. Dieses Protein ist allerdings für humanes IL-6 spezifisch. Die Verwendung derartig neuer Werkzeuge für *in vivo* Untersuchungen könnten schließlich den Schlüssel zur Demonstration einer Kausalität zwischen STAT3-Aktivierung im Gehirn und einer hierdurch bewirkten Aufrechterhaltung von LPS-induzierten Fieberreaktionen durch IL-6 darstellen.

3. Nervale Hypothese zur Fieberentstehung

Im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit konnten weitere Hinweise für die Beteiligung eines über kutane Hautafferenzen getragenen nervalen Signalweges an der Fieberentstehung gefunden werden. Grundlage dafür waren Hinweise aus der Literatur (Kapitel II 6.2), in denen Möglichkeiten einer nervalen Signalübertragung vor allem für eine schnelle Kommunikation zwischen dem aktivierten Immunsystem und dem Gehirn angenommen wurde. Dies könnte vorwiegend für die erste Phase der Fieberentstehung eine Rolle spielen. Im Einzelnen sollen hier vier verschiedene Beobachtungen näher diskutiert werden.

1) Als Antwort auf die Injektion von 10 µg/kg LPS in die subkutane Kammer wurde ein moderates Fieber induziert. Der hierbei auftretende moderate Anstieg (5-fach) der zirkulierenden IL-6-Konzentrationen hatte allerdings fast keine nukleären STAT3-Aktivierungen im Gehirn zu Folge. In einer früheren Studie konnte gezeigt werden, dass Fieber, welches durch Injektion von 10 µg/kg LPS in die subkutane Kammer induziert wurde, durch die Koapplikation eines Lokalanästhetikums in die Kammer gehemmt werden kann (Ross *et al.*, 2000). Diese Beobachtung unterstützt die Hypothese, dass in diesem experimentellen Modell einer lokalisierten subkutanen Entzündungsreaktion zusätzlich zu humoralen Faktoren wie IL-6 auch afferente Nerven an der Entstehung von Fieber beteiligt sein könnten (Abbildung 73). Im Falle der hohen Dosierung von LPS (100 µg/kg s.c.) könnten die humoralen Komponenten die neuronalen Komponenten der Signale zur Fieberentstehung aufheben beziehungsweise verdecken. Deshalb wäre es möglich, dass die Behandlung mit dem Lokalanästhetikum in diesem Fall ohne Wirkung blieb, weil ausreichend große Mengen an endogenen Mediatoren (z.B. IL-6) in die systemische Zirkulation übergetreten waren (Ross *et al.*, 2000). Diese höhere Konzentration an zirkulierendem IL-6 erwies sich in dieser Arbeit ja auch als ausreichend, um eine signifikante nukleäre STAT3-Aktivierung in einigen Gehirnstrukturen zu induzieren (Tabelle 22, Abbildung 49-54).

3.1. Nachweis und Bedeutung von COX-2 und PGE₂

2) Ein weiterer Hinweis auf die Beteiligung neuronaler Signalwege zur Fieberentstehung ergab sich aus den Ergebnissen der *in situ* Hybridisierung. Die Rolle von Prostaglandinen als wichtigste terminale Mediatoren der Manifestation von Fieber wurde dabei anhand der zentralnervösen Expression von COX-2, dem Schlüsselenzym der Prostaglandin-Synthese, untersucht (Kapitel II 5.1, 5.1.1). Nach Injektion von 10 µg/kg LPS in die subkutane Kammer (niedrige Dosis) wurde keine COX-2 mRNA-Expression im Gehirn beobachtet. Die COX-2-Expression im ZNS und damit auch die zentrale Prostaglandin-Synthese scheint demnach

keine entscheidende Rolle für die Fieberinduktion unter diesen speziellen experimentellen Bedingungen zu spielen. Unter diesen Versuchsbedingungen waren weder LPS noch größere Mengen an IL-6 in der Blutzirkulation vorhanden, welche als humorale Botenstoffe zu einer Induktion von COX-2 in Endothelzellen oder den sCVOs hätten führen können. Zusätzlich war es nicht möglich, eine Aktivierung von STAT3 einem potenziellen Transkriptionsfaktor zur Aktivierung des COX-2 Gens unter diesen Versuchsbedingungen immunhistologisch nachzuweisen. Es würde also im Hinblick auf die humorale Hypothese der Fieberentstehung ein entscheidender Schritt zur Induktion des terminalen Mediators PGE₂ fehlen und somit auf die Beteiligung eines anderen, beispielsweise eines neuronalen, Signalwegs zur Fieberentstehung hinweisen (Abbildung 73). Im Falle der Injektion der hohen LPS-Dosis (100 µg/kg) in die subkutane Kammer war hingegen eine COX-2 mRNA-Expression und eine STAT3-Aktivierung in den genannten Hirnstrukturen nachweisbar. Es könnten unter diesen Bedingungen wiederum die humoralen Komponenten, wie z.B. IL-6, direkt am Gehirndothel und in den sCVOs gewirkt und eventuelle neuronale Komponenten der Signale zur Fieberentstehung hierdurch maskiert haben. Da es sich bei der *in situ* Hybridisierung von COX-2 mRNA mit Hilfe von radioaktiv markierten Sonden um eine sehr sensitive Methode handelt, wird davon ausgegangen, dass, wie bei NaCl-behandelten Kontrolltieren, die niedrige s.c. applizierte LPS-Dosis tatsächlich keine Expression dieses Gens induzierte und methodische Probleme dabei keine entscheidende Rolle spielten. Generell ist allerdings der Nachweis von COX-2 im Gehirn nicht mit der zentralen Prostaglandin-Produktion gleich zu setzen. Weder die Detektion von COX-2 mRNA noch des Proteins selbst korrelierten in allen Fällen mit den Konzentrationen an PGE₂ im ZNS oder der Intensität der PGE₂-vermittelten Effekte wie Fieber (Imai-Matsumura *et al.*, 2002; Inoue *et al.*, 2002; Ivanov *et al.*, 2002; Matsumura & Kobayashi, 2004). Insgesamt gibt es zudem neben Argumenten für (Kapitel II 5.1.1) auch solche gegen eine obligatorische Bedeutung von zentral im Gehirn gebildeten Prostaglandinen bei der Fieberentstehung. So korreliert die PGE₂-Freisetzung in den thermoregulatorischen Strukturen des vorderen Hypothalamus nach peripherer Endotoxingabe nicht immer mit dem Ausmaß der Fieberreaktion. PGE₂-Spiegel in der zerebrospinalen Flüssigkeit (CSF) sind starken Schwankungen unterworfen, wobei sich die gemessenen Konzentrationen im fiebernden und nicht-fiebernden Zustand stark überschneiden. In bestimmten Dosierungsbereichen hemmt Salicylat nach peripherer Gabe von IL-1 den PGE₂-Anstieg in der CSF, nicht aber die Fieberreaktion. Proteinsynthese-Inhibitoren verhindern nach systemischer Gabe von Pyrogenen die Fieberreaktion, nicht aber die erhöhten PGE₂-Spiegel in der CSF {zur Übersicht siehe (Coceani *et al.*, 1986; Mitchell *et al.*, 1986)}. Außerdem ist allein anhand des mRNA-Nachweises keine Aussage über tatsächlich vorliegende, funktionstüchtige COX-Enzyme möglich. Deshalb kann dieser Teil der hier vorliegenden Arbeit lediglich als Hinweis für eine zusätzliche Beteiligung neuronaler Signalwege an der Fieberentstehung angesehen werden.

3) Der Einsatz von NSAIDs wirkt durch die Hemmung von COX antipyretisch. Bei systemischen LPS-induzierten Entzündungsreaktionen blockiert bei Meerschweinchen die Gabe von 5000 µg/kg Diclofenac, einem nicht selektiver COX-Hemmer, die Fieberreaktion

vollständig, hatte aber keinen Einfluss auf zirkulierende IL-6- und Kortisol-Konzentrationen (Roth *et al.*, 2002).

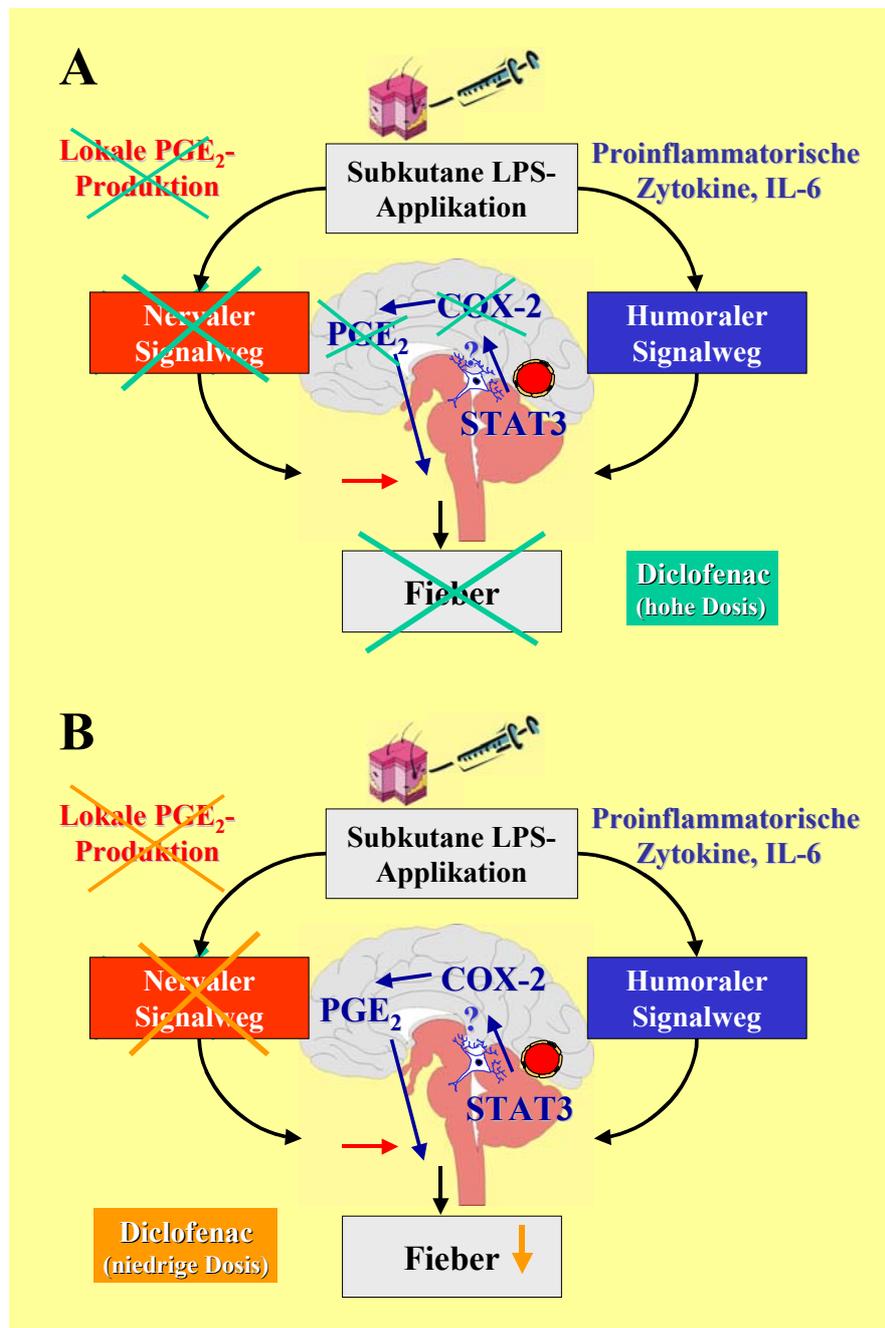


Abbildung 71

Schematisches Modell zum vermuteten Mechanismus der Wirkung von Diclofenac auf nervale und humorale Mechanismen der Fieberentstehung im Modell einer lokalen subkutanen Entzündungsreaktion: Die Koapplikation von LPS (10, 100 µg/kg) mit hohen Dosierungen an Diclofenac (Teilbild A, 5000, 500 µg/kg) hemmen die Fieberreaktion vollständig. Diese Wirkung ist systemisch und unterdrückt sowohl zentral im Gehirn als auch peripher im lokalen Entzündungsareal die Prostaglandin-Produktion. Demnach sind beide Signalwege der Fieberentstehung blockiert. Die niedrigste Dosierung von Diclofenac (5 µg/kg) unterdrückte bei Koapplikation mit LPS (10 µg/kg, niedrige Dosis) den Anteil des nervalen Signalweges zur Fieberentstehung (Teilbild B) und reduzierte dadurch lediglich die Fieberreaktion. Diclofenac wirkt hierbei nur lokal im Bereich der subkutanen Kammer hemmend auf die Prostaglandin-Produktion.

Die Frage, ob Prostaglandine bei der Fieberentstehung zentral produziert (Sehic *et al.*, 1996a; Cao *et al.*, 1997a) oder peripher gebildet werden und über das Blut zum Gehirn gelangen, wird kontrovers diskutiert (Milton, 1998; Romanovsky *et al.*, 1999). Die systemische Applikation von Diclofenac könnte in der Studie von Roth *et al.* (2002) sowohl die zentrale als auch die periphere Prostaglandin-Bildung gehemmt haben (Abbildung 71, A). Schließlich ist Diclofenac in der Lage, die BBB zu passieren und somit auch dort direkt zu wirken (Dehouck *et al.*, 1992). Im lokalen Entzündungsmodell bei Applikation der hohen LPS-Dosis in die subkutane Kammer führte eine gleichzeitige Behandlung mit 5000 oder 500 µg/kg Diclofenac im Rahmen der hier vorgestellten Untersuchungen zur vollständigen Unterdrückung der Fieberreaktion, während durch Koapplikation von 50 oder 5 µg/kg Diclofenac das Fieber lediglich geringgradig abgeschwächt werden konnte. Alle vier Dosierungen von Diclofenac verringerten die Fieberantwort graduell, wenn sie zusammen mit LPS (10 µg/kg, niedrige Dosis) in die subkutane Kammer appliziert wurden. Die niedrigste Dosis von 5 µg/kg hatte jedoch keinen antipyretischen Effekt mehr, wenn sie contralateral zur implantierten Kammer subkutan injiziert wurde. Durch diese Dosis-Wirkungs-Beziehung konnte letztendlich eine Diclofenac-Dosierung ermittelt werden, bei der sich offensichtlich kein systemischer Effekt der Prostaglandin-Hemmung manifestierte. Da die contralaterale Gabe von 5 µg/kg Diclofenac das Fieber nach s.c. Injektion von 10 µg/kg LPS nicht mehr abschwächte, dürfte Diclofenac nicht bzw. nicht in ausreichenden Mengen in die Zirkulation gelangt sein, um systemisch eine Synthese von Prostaglandinen zu hemmen. Man konnte demzufolge erwarten, dass eine Dosis von 5 µg/kg Diclofenac in Koapplikation mit 10 µg/kg LPS lokal in der subkutanen Kammer zu einer Hemmung der Prostaglandin-Synthese führte (Abbildung 71, B). Die LPS-induzierte Fieberreaktion wurde hierdurch abgeschwächt. Somit könnte die lokale Bildung von Prostaglandinen im Gewebe der Entzündungsreaktion anteilig eine Rolle bei der Fieberentstehung spielen. Ob bei der LPS-induzierten subkutanen Entzündungsreaktion Prostaglandine in die Zirkulation übertreten und als humorale Botenstoffe zum Gehirn gelangen, um dort Fieber zu induzieren, bleibt offen. Es wurde zumindest beschrieben, dass die systemische Applikation von an Albumin gebundenem PGE₂ bei Kaninchen Fieber induziert (Romanovsky *et al.*, 1999).

4) Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass in der subkutanen Kammer durch die Injektion der hohen und der niedrigen LPS-Dosis Prostaglandine gebildet werden. Der signifikante Anstieg an PGE₂ in der Lavage aus der subkutanen Kammer konnte durch Koapplikation einer niedrigen (5 µg/kg) und einer hohen (500 µg/kg) Diclofenac-Dosierung unterdrückt werden. Dieses Ergebnis bestätigt, dass der lokale Fieberabschwächende Effekt dieses NSAIDs schon in der nicht systemisch wirkenden Konzentration (5 µg/kg) von einer Hemmung der lokalen Prostaglandin-Bildung begleitet ist. Prostaglandine scheinen somit, ob lokal oder systemisch, an der Vermittlung der Fieberreaktion beteiligt zu sein. Auf der anderen Seite ist allerdings zu beachten, dass Prostaglandine bei einigen Pyrogenen offensichtlich nicht an der Fieberentstehung mitzuwirken scheinen. Dazu gehören MIP-1 (Makrophagen inhibitorisches Peptid-1), IL-8, Substanz P und Endothelin-1 (Roth & De Souza, 2001). Außerdem ist, wie bereits in Kapitel II 5.1.1 beschrieben, nicht auszuschließen, dass neben PGE₂ auch antiinflammatorische

Prostanoide (zyklische PGs, Lipoxine) im lokalen Entzündungsgebiet produziert werden. Es gibt also auch prinzipielle Argumente gegen eine obligatorische Schlüsselrolle von Prostaglandinen in experimentellen Fiebermodellen (Mitchell *et al.*, 1986; De Souza *et al.*, 2002).

Die Bedeutung afferenter Nerven für die Kommunikation zwischen Immunsystem und Gehirn im Verlauf von Entzündungsreaktionen wurde innerhalb der letzten 10 Jahren intensiv diskutiert und experimentell untersucht {Kapitel II 6.2, (Watkins *et al.*, 1995b; Blatteis, 1997; Konsman *et al.*, 2000)}. Weitere Unterstützung der Aktivierung zentralnervös kontrollierter Krankheitssymptome durch einen nervalen Signalweg wird durch neuere Studien erbracht. In einer Untersuchung rief bei Ratten mehrere Stunden bevor Zytokine oder Endotoxin im Blut detektierbar waren, die subkutane Injektion von *E. coli* Fieber, eine Reduzierung der Bewegungsaktivität und einen Anstieg des Kortikosteronspiegels hervor (Campisi *et al.*, 2003). Proinflammatorische Zytokine wurden allerdings bereits vor dem Auftreten der Krankheitssymptome in erhöhten Konzentrationen lokal im Bereich des subkutanen Entzündungsareals gemessen. Eine andere Studie nutzte eine orale Gabe des über Lebensmittel pathogen wirkenden Keims *Campylobacter jejuni* (*C. jejuni*) zur Erzeugung von erhöhtem angstartigem Verhalten bei Ratten. Es konnte hierbei durch FOS-Immunhistologie vor dem Auftreten zirkulierender proinflammatorischer Zytokine im Blut eine nervale Aktivierung des NTS und anderer Hirnstammregionen nachgewiesen werden (Gaykema *et al.*, 2004). Die Information über eine Infektion mit *C. jejuni* im Darm schien somit über nervale viszerosensorische Übertragung zu Strukturen im Gehirn vermittelt worden zu sein. Ein drittes Beispiel der Kommunikation zwischen Immunsystem mit dem Gehirn über nervale Wege liefert eine Studie von Smad *et al.* (2001). Es handelte sich hierbei um ein Entzündungsmodell der Hinterpfote von Ratten durch Freund's Adjuvanz. Die hierdurch induzierte starke lokale Inflammation hatte 6 Stunden später eine Expression von COX-2 im Rückenmark und im Gehirn sowie einen Anstieg von PGE₂ in der CFS zur Folge. Durch pharmakologische Blockade des *Nervus ischiadicus*, der die Pfote sensibel innerviert, reduzierten sich 6 h nach Stimulation mit Freund's Adjuvanz die COX-2-Expression und die PGE₂-Konzentration im CSF signifikant. Dieser Befund unterstützt somit ebenfalls die Hypothese einer nervalen Beteiligung an der Entwicklung zentralnervös kontrollierter Krankheitssymptome, die letztendlich durch PGE₂ vermittelt sind (Samad *et al.*, 2001).

3.2. Nachweis und Bedeutung von peripheren Thermorezeptoren

Es stellt sich nun die Frage, wie sich lokal produzierte Prostaglandine nach LPS-Applikation in die subkutane Kammer an der Fieberentstehung beteiligen könnten. Wie bereits im vorangehenden Abschnitt diskutiert, könnte die Aktivierung nervaler Signalwege hierbei eine Rolle spielen. Neuere Befunde zeigen, dass die Existenz eines solchen Signalweges nicht rein spekulativer Natur ist. Aus dem Bereich der Haut erfolgt ein thermoregulatorisch relevanter Signaltransfer vornehmlich über kaltsensitive Nervenfasern zum Gehirn (Braun, 1980). Derartige kaltsensitive Nervenendigungen können durch tiefe Temperaturen und Menthol angeregt werden (Schäfer *et al.*, 1986). Dies hat eine Stimulation von Kälteabwehrmechanismen zur Folge, was einem Absinken der Körpertemperatur

entgegenwirkt. In den letzten Jahren konnte das für die Kältewahrnehmung verantwortliche Molekül identifiziert werden, es handelt sich um ein Ionenkanalprotein (Reid & Flonta, 2001a). Der Kälte-Thermotransduktionsprozess basiert demzufolge auf einem nicht selektiven Kationen-Strom mit hoher Durchlässigkeit für Kalzium (Okazawa *et al.*, 2002). Dieser Ionenstrom erfolgt über einen der so genannten TRP-Kanäle (McKemy *et al.*, 2002). Interessanterweise konnte zumindest in einer wissenschaftlichen Mitteilung gezeigt werden, dass kutane Kältesensoren offensichtlich durch PGE₂ aktiviert werden können, ein Mechanismus der somit Kälteabwehr induzieren würde, wie es im Stadium des Fieberanstiegs zu beobachten ist (Machida, 2001). Über einen derartigen Mechanismus könnte der hier gezeigte Beitrag von PGE₂ an der Fieberentstehung nach lokaler subkutaner Inflammation erklärt werden. Allerdings wurde durch Blockade der PG-Bildung das Fieber lediglich abgeschwächt nicht jedoch völlig unterdrückt (Diclofenac 5 µg/kg, Abbildung 66, Abbildung 67). Es könnten somit zum einen multiple Mechanismen zur Aktivierung von afferenten Nervenfasern geführt haben, die lediglich teilweise durch Diclofenac gehemmt wurden. Zum anderen wäre in einem gewissen Maß eine Beteiligung humoraler Botenstoffe, z.B. der moderaten zirkulierenden IL-6-Konzentrationen, an der Fieberentstehung denkbar.

Welche multiplen Mechanismen oder Mediatoren könnten in der Lage sein, den neuronalen Signalweg zu stimulieren? Nervenfasern können durch eine Vielzahl der im Rahmen von Entzündungsreaktionen gebildeten Mediatoren aktiviert oder zumindest sensibilisiert werden. In der Lavage, die aus lokalen Kompartimenten gewonnen wurde, wie z.B. einem Hautareal (Miller *et al.*, 1997a; Ross *et al.*, 2000) oder der Peritonealhöhle (Lenczowski *et al.*, 1998) sind höhere Konzentrationen an Zytokinen und anderen inflammatorischen Mediatoren nachweisbar als im Blutplasma. Diese Konzentrationen korrelierten allerdings nicht mit dem Ausmaß der Fieberantwort (Zeisberger, 1999). Im Rahmen der Schmerzforschung wurde für IL-1 β , IL-6 und TNF- α in der Tat ein direkter Rezeptor-vermittelter Effekt auf afferente Nervenfasern beschrieben (Sommer & Kress, 2004). Es handelt sich dabei um eine Verschiebung des Schwellenwertes einer hitzeabhängigen Aktivierung der Neurone zu niedrigeren Temperaturen hin, ohne dabei den intrazellulären Kalziumspiegel zu beeinflussen. Dieser pro-nocizeptive Effekt der Zytokine könnte zwar auch über eine sekundäre Produktion von NO, Bradykinin oder Prostaglandinen vermittelt sein; es wird jedoch eher eine direkte Wirkung der Zytokine auf die Nervenzellen selbst vermutet, da eine Reaktion bereits innerhalb einer Minute zu beobachten war (Sommer & Kress, 2004). Dieser Zeitraum wird als zu kurz betrachtet, als dass hierbei Transkriptionsvorgänge eine Rolle spielen könnten. Es finden sich zwar keine IL-6R auf diesen afferenten Nervenzellen, eine Signaltransduktion über konstitutiv vorhandene gp130-Untereinheiten durch lösliche IL-6-Rezeptoren wurde aber beschrieben (Oprea & Kress, 2000). Auch für IL-1 β und TNF- α konnten entsprechend die Rezeptoren und deren Signaltransduktion in diesem Zusammenhang in den afferenten Neuronen nachgewiesen werden (Sommer & Kress, 2004). Neben diesen direkten Effekten könnten IL-1 β , LPS und IL-6 über die Transkriptionsfaktoren NF- κ B (LPS, IL-1 β) oder STAT3 (IL-6) eine Expression von COX induzieren (Kapitel II 4.1 5.1). Zusätzlich stellt NF-IL-6 einen Faktor dar, durch den die Prostaglandin-Synthese induziert werden kann und der nicht nur durch IL-6 sondern

über multiple Signalwege aktivierbar ist (Akira, 1997). NF-IL-6 Knockout-Mäuse sind nicht mehr in der Lage, nach Stimulation mit LPS PGE₂ zu bilden (Uematsu *et al.*, 2002). Zusätzlich ist interessant, dass NSAIDs wie Diclofenac nicht nur durch eine Hemmung von COX sondern auch durch eine Hemmung von NF-κB ihre Wirkung erzielen können (Karin *et al.*, 2004). Da das injizierte Pyrogen LPS über NF-κB IL-1β, TNF-α, IL-6 und COX induzieren kann, wäre dessen Wirkung zumindest teilweise auch direkt durch Diclofenac beeinflussbar. Die Hemmung der COX scheint hierbei dennoch unabhängig von der Interaktion von Diclofenac mit der NF-κB-Signaltransduktion zu sein. Es ist also insgesamt davon auszugehen, dass es sowohl zu kurzfristigen direkten als auch zu längerfristigen indirekten Wirkungen durch die proinflammatorischen Zytokine im Bereich der lokalen Inflammation auf sensible afferente Hautnerven kommt, die gemeinsam an der Aktivierung Fieber-erzeugender Signale beteiligt sein könnten. Neben anderen Mediatoren, die bei der Aktivierung von Nerven im lokalen Entzündungsmodell eine Rolle spielen könnten, wäre auch der pH-Wert, der bei Inflammationen physiologischerweise absinkt, ein mögliches Signal zur Modulation von Fieberentstehungsmechanismen. Im Bereich der Schmerzforschung wird einer Gewebeansäuerung größere Bedeutung beigemessen. So gilt allein eine Ansäuerung des Gewebes bereits als eine Schmerz-induzierende Noxe (Sommer & Kress, 2004). Analog zu den genannten Kälterezeptoren (TRP-Kanälen) ist der Schmerzrezeptor TRPV1 als ein Kationenkanal beschrieben worden, der durch Hitze aktivierbar ist (Kapitel II 1.1). Interessanterweise ist die Aktivierung von TRPV1 allerdings auch durch Prostaglandine (Hu *et al.*, 2002) oder durch einen saueren pH möglich (Tominaga *et al.*, 1998). Dieser Kanal stellt damit einen molekularen Integrator verschiedener chemischer und physikalischer Stimuli dar. Die Wirkung von Protonen beruht dabei auf einer räumlichen Umstrukturierung des TRPV1 durch Wechselwirkungen mit geladenen Gruppen dieses Kanals, die eine erhöhte Öffnungswahrscheinlichkeit zur Folge haben (Tominaga *et al.*, 1998). Allgemein kommt es zu einer Absenkung der Schwellentemperatur, so dass bei physiologischen pH-Wert von < 5,9 in entzündeten Geweben bereits bei Raumtemperatur der TRPV1 aktiviert wird. Sollten ähnliche Prozesse auch bei den Kälterezeptoren dieser Kanalfamilie vorliegen, wäre bei Entzündungen anteilig eine Beteiligung der erhöhten Gewebe-Azidität an der Fieberentstehung nach dem beschriebenen Mechanismus durchaus denkbar.

4. Mechanismen des Zusammenspiels humoraler und neuronaler Signale

Die hier vorgestellten Ergebnisse unterstützen insgesamt die Existenz sowohl humoraler als auch nervaler Signalwege zur Fieberentstehung (Abbildung 72). Diese sind nur schwer zu charakterisieren und nicht durch einen einzelnen aktivierenden Mediator definierbar. Vielmehr handelt es sich entsprechend der Mannigfaltigkeit der Entzündungs-induzierenden Noxen um eine Vielzahl an unterschiedlichen Mediatoren, die in beiden Signalwegen eine Rolle spielen. IL-6 scheint dabei einen notwendigen, aber nicht existenziellen Faktor der Fieberentstehung darzustellen. Er spielt im Rahmen des humoralen Signalwegs wahrscheinlich eher in der zweiten Fieberphase eine Rolle und besitzt zudem auch in

gewissen Situationen eine antiinflammatorische, Fieber-senkende Wirkung (Roth *et al.*, 2004). Im lokalen Entzündungsmodell könnte IL-6 direkt Nervenfasern aktivieren oder sekundär über die Bildung von Prostaglandinen an der Beeinflussung von Thermorezeptoren mitwirken. Prostaglandine scheinen bei beiden Signalwegen in den meisten Fällen eine entscheidende terminale Rolle bei der Übermittlung inflammatorischer Signale in das Gehirn zu spielen. Dies gilt sowohl für systemische als auch für lokale Entzündungsgeschehen. Allgemein scheint das lokale Netzwerk an Nervenfasern als schnelles „Monitoring-System“ auch bei der Vermittlung von Fieber vor allem in der frühen Phase eine Rolle zu spielen. Die Kombination der neuronalen Kommunikation mit humoral transportierten Immun-Signalen, welche in Qualität, Quantität und verschiedenen Zeitintervallen variieren, ermöglicht es dem Gehirn, das Wesen der Infektion besser zu erkennen und diese Information in eine Form des Langzeitgedächtnisses umzuwandeln (Zeisberger, 1999).

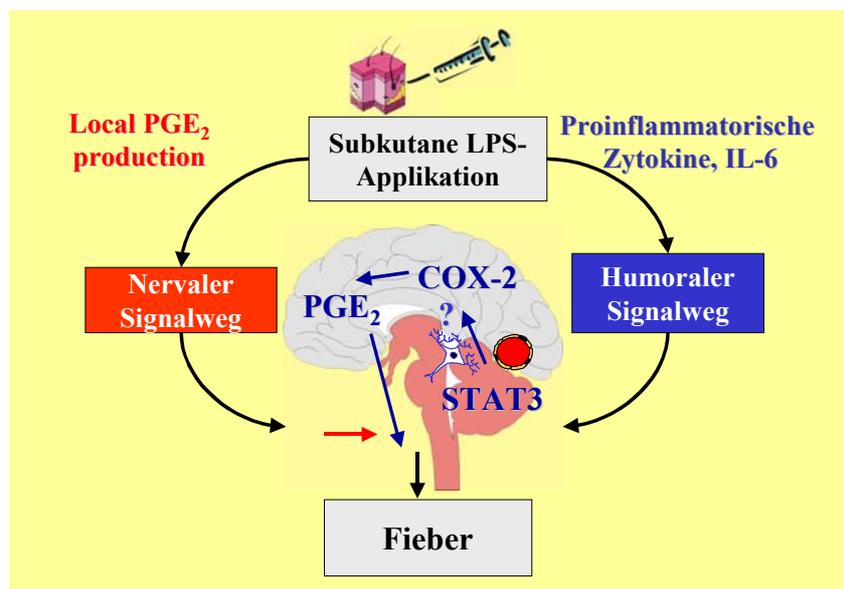


Abbildung 72

Schematische Übersicht über den vermuteten Mechanismus des Zusammenspiels der nervalen und humoralen Signalwege zur Fieberentstehung: Bei fieberhaften lokalen Entzündungsreaktionen werden parallel und unabhängig von einander über zwei Wege Signale zu den thermoregulatorischen Zentren des Gehirns geleitet, die zusammen durch Integration zu der zentralnervös kontrollierten Fieberreaktion führen. Auf der einen Seite aktiviert lokal gebildetes PGE₂ sensible Hautafferenzen, die die Information über die Spinalnerven in das Rückenmark und von dort weiter zum Gehirn leiten. Auf der anderen Seite treten humorale Botenstoffe (IL-6) aus dem Entzündungsgebiet in die Zirkulation über und aktivieren genomisch Zellen (STAT3) in den sCVOs und dem Gehirndothel. Es kommt über die Expression von COX-2 zur Bildung von PGE₂, welches schließlich als terminaler Fiebermediator eine Sollwertverstellung der Körpertemperatur induziert.

Es gibt demzufolge mehrere Wege, über die das aktivierte Immunsystem bestimmte Gehirnstrukturen stimulieren kann (Takahashi *et al.*, 1997). Diese multiplen Signalwege könnten unabhängig voneinander oder in koordinierter Weise miteinander agieren (Goldbach *et al.*, 1997; Marvel *et al.*, 2004). Außerdem scheint das angeborene Immunsystem in großem Maße über Toll-Like-Rezeptoren in der Lage zu sein, sowohl im Gehirn als auch in der

Peripherie direkt auf Pathogen-assoziierte Molekülstrukturen zu reagieren und dadurch die Wirtsantwort schnell und variabel zu steuern.

4.1. Abhängigkeit vom Ausmaß des Entzündungsreizes

Ausgehend von der Beobachtung, dass der neuronale Signalweg nur bei kleinen Entzündungsreizen messbare Effekte verursacht, ist es von entscheidender Bedeutung, die Eintrittspforte und die Infektionsdosis bei der Betrachtung der Fieberentstehungshypothesen zu berücksichtigen (Goldbach *et al.*, 1997). Nervale Signalwege können demnach normalerweise lediglich einen moderaten Anteil der Information liefern, die zur Fieberreaktion führt. Deshalb sind diese Effekte nur dann detektierbar, wenn humorale Signale so schwach sind, dass sie die neuronalen Komponenten der Fieberinduktion vollständig überlagern. Das bedeutet nicht, dass bei stärker stimulierenden Noxen, die im hohen Maße von humoralen Botenstoffen begleitet sind, der nervale Anteil nicht mehr existiert. Diese Komponente ist dann lediglich im Verhältnis zu klein, um experimentell nachweisbar zu bleiben.

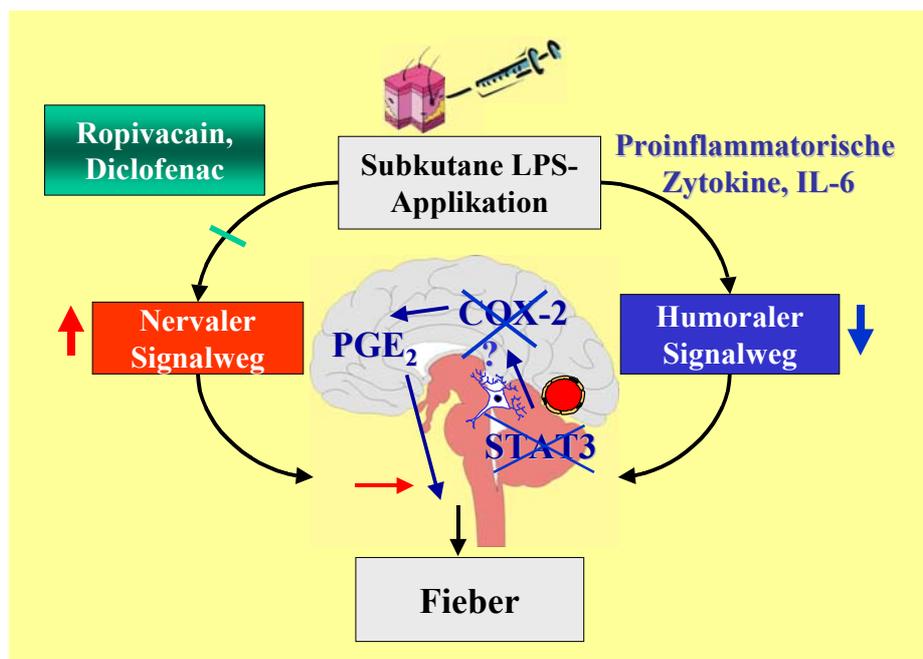


Abbildung 73

Schematische Übersicht über den vermuteten Mechanismus des Zusammenspiels der nervalen und humoralen Signalwege zur Fieberentstehung bei moderaten Entzündungsreaktionen: Die Gabe von 10 µg/kg LPS in die subkutane Kammer induziert eine moderate Fieberreaktion. Diese Reaktion ist kaum (IL-6) oder nicht (LPS, IL-1, TNF) von einem Auftreten humoraler Botenstoffe in der Zirkulation begleitet. Der humorale Anteil der Signalvermittlung ist dementsprechend klein (blauer Pfeil). Außerdem wird weder COX-2 noch STAT3 im Gehirn induziert. Der nervale Signalweg hat also einen größeren Anteil an der Vermittlung der Fieberreaktion und kann entweder durch Injektion von Lokalanästhetika (Ropivacain) oder NSAIDs (Diclofenac) in das lokale Entzündungsareal sichtbar gehemmt werden.

4.2. Bedeutung bei akuten lokalen Verletzungen

Häufig sind lokale Entzündungsreaktionen nicht von Fieber begleitet. Dies geschieht lediglich dann, wenn die Stärke der Inflammation ein gewisses Maß überschreitet. Deshalb könnte das Auftreten von Fieber auch davon abhängen, dass LPS oder endogene Pyrogene in gewissem Umfang in die Zirkulation gelangen und im Rahmen der APR zu den zentralnervös kontrollierten Komponenten wie Fieber führen. Der stark Energie-raubende Prozess der Fieberentstehung könnte demnach nur gravierenderen Entzündungen vorbehalten bleiben, die für den Organismus in seiner Gesamtheit eine gewisse Bedrohung darstellen. Trotzdem scheint der Organismus das Nervensystem als Frühwarnmechanismus in die Kontrolle immunologischer Abwehrreaktionen einzuschalten.

5. Schlussfolgerung und Zukunftsperspektiven

Die Kommunikation des aktivierten Immunsystems mit dem Gehirn scheint eine entscheidende Rolle für die Überlebensfähigkeit von Mensch und Tier zu spielen. Fehlregulationen im Rahmen chronischer Krankheiten, tumoröser Prozesse, Immunschwächekrankheiten, Depressionen und Alterungsprozesse führen zu massiven, die Lebensqualität beeinträchtigenden Prozessen. Schutzmechanismen wie „Sickness Behavior“ können dabei wahrscheinlich nicht mehr adäquat reguliert werden, was unter Umständen zu lebensbedrohlichen Reaktionen führen kann. Deshalb wird in Zukunft weiterhin die Notwendigkeit bestehen, den Informationsaustausch dieser beiden vitalen Regelsysteme in beiden Richtungen genauer zu untersuchen.

Die Anwendung von Transkriptionsfaktoren als neuroanatomische Marker zur Identifizierung der Zielstrukturen von Zytokinen und anderen Botenstoffen dürfte hierbei hilfreich sein. Zusätzlich wird es allerdings nötig sein, die potenziellen Zielgene dieser Transkriptionsfaktoren genauer zu identifizieren und eine direkte Verbindung zu physiologischen und pathophysiologischen Reaktionen des Gesamtorganismus herzustellen. Dazu gehört im weiteren Sinne auch die Phänotypisierung der responsiven Zellen, welche das Verständnis der Zusammenhänge der einzelnen Signaltransduktionsmechanismen verbessern hilft. Schließlich sollte für die weitere Analyse der Bedeutung von IL-6 und STAT3 im Rahmen der Fieberentstehung eine gezielte Blockade der IL-6-Wirkung genutzt werden, um einen endgültigen Beweis für die physiologische Bedeutung des Zytokins in diesem Prozess zu erbringen.

Der Einsatz von anterograden, polytranssynaptischen, viralen Tracern könnte einen direkten Beweis für die Existenz des postulierten nervalen Signalwegs über afferente Hautnerven liefern. Es könnte hiermit durch immunhistologischen Nachweis viraler Moleküle der Weg von den Hautafferenzen über die Spinalganglien ins Rückenmark, zum Hirnstamm und schließlich zu den thermoregulatorischen Zentren im Hypothalamus nachgewiesen werden. Das einzige Virus, welches anterograd in diesem Sinne über Nervenzellen zur Darstellung neuronaler Signalwege bekannt ist, ist jedoch für Menschen pathogen und steht zur Zeit noch nicht zur Verfügung (Rinaman & Schwartz, 2004). Alternativ wäre die Verwendung des Nachweises von FOS als neuronalem Aktivitätsmarker denkbar, um eine Aktivierung des nervalen Signalwegs bei LPS-stimulierten Tieren im Vergleich zu Kontrollen zu untersuchen.

Die Rolle der Prostaglandine bei der Aktivierung von Hautafferenzen könnte durch Infusion von PGE₂ in die subkutane Kammer oder mit Hilfe elektrophysiologischer Methoden (Einzelfaseraktivität unter Einfluss von Kälte bzw. PGE₂) weiterführend untersucht werden.

VI. ZUSAMMENFASSUNG

Ziel dieser Doktorarbeit war die Untersuchung von Signalwegen zur Fieberentstehung im Rahmen lokaler oder systemischer Entzündungsreaktionen. Die spezifische Rolle von Interleukin-6 (IL-6) und Prostaglandinen in diesen beiden Prozessen wurden analysiert. Im Hinblick auf den humoralen Mechanismus der Fieberentstehung wurde während systemischer oder lokaler Entzündungsreaktion eine mögliche Lipopolysaccharid (LPS)-induzierte Aktivierung des pleiotropen Zytokins IL-6 und des IL-6-induzierten Transkriptionsfaktors STAT3 untersucht. Bei Meerschweinchen verursachten intraarterielle (i.a., 10 µg/kg) oder intraperitoneale (i.p., 30 µg/kg) LPS-Injektionen eine systemische Entzündungsreaktion, die von robustem Fieber begleitet war. Eine Fieberreaktion wurde ebenfalls durch LPS-Applikation in eine subkutan implantierte, künstliche Teflonkammer induziert (s.c., 100 oder 10 µg/kg), die ein Experimentalmodell einer lokalen Entzündungsreaktion darstellt. 60 min. vor LPS- oder Lösungsmittel-Injektion waren basale Spiegel an biologisch aktiven IL-6 von 35-80 internationalen Einheiten pro ml. (I.U./ml.) im Blut messbar. 90 min. nach LPS-Gabe erhöhten sich die IL-6-Plasmakonzentrationen in den i.a. oder i.p. behandelten Tiergruppen etwa 1000-fach, 50-fach in der Gruppe, die mit 100 µg/kg LPS s.c. behandelt wurde und lediglich 5-fach bei Meerschweinchen, denen die niedrige LPS-Dosis (10µ/kg) in die subkutane Kammer injiziert wurde. Zu diesem Zeitpunkt konnte in verschiedenen Gehirnstrukturen eine distinkte Verteilung nukleärer Translokationen des Transkriptionsfaktors STAT3 beobachtet werden. Hierzu gehörten Gehirnstrukturen mit einer unvollständigen Blut-Hirn-Schranke (BBB), die als sensorische zirkumventrikuläre Organe (sCVOs) bezeichnet werden: die *Area postrema*, das *Organum vasculosum laminae terminalis*, das *Organum subfornicale* sowie zusätzlich auch der hypothalamische *Nucleus supraopticus*, welche in den i.a. oder i.p. mit LPS behandelten Gruppen starke nukleäre STAT3-Aktivierung aufwiesen. Im Gegensatz dazu wurde nach s.c. LPS-Applikation eine moderate Anzahl (hohe LPS-Dosis, 100 µg/kg) bzw. sogar keine (niedrige LPS-Dosis) nukleären STAT3-Signale in den genannten Hirnstrukturen nachgewiesen. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass STAT3-vermittelte Aktivierung der Transkription von Ziel-Genen in Gehirnzellen nur dann stattfindet, wenn bei systemischen oder lokalen Entzündungsreaktionen ausreichend hohe zirkulierende IL-6-Konzentrationen auftreten.

Zell-Phänotypen der Zytokin-responsiven Zielzellen im Gehirn, die durch IL-6 genomisch aktiviert wurden, konnten durch immunhistologische Analyse des Zytokin-induzierten Transkriptionsfaktors in Kombination mit spezifischen zellulären Markerproteinen nachgewiesen werden. Zwei für die Zytokin-abhängige Vermittlung von Immuneffektorfunktionen kritische Gehirnanteile konnten identifiziert werden. Eine Gruppe responsiver Zellen war entlang der BBB lokalisiert, eine andere Gruppe von Zellen befand sich in den bereits erwähnten sCVOs. Die markanteste STAT3-Aktivierung erfolgte in zwei Zielstrukturen des Meerschweinchengehirns und zwar (1) in Endothelzellen des gesamten Gehirns und (2) in Astrozyten der sCVOs. Beide Strukturen stellen entscheidende Gehirnregionen bzw. Zellen der Zytokin-vermittelten Wirkung bei LPS-induzierten

Entzündungsreaktionen dar. STAT3-kontrollierte transkriptionelle Aktivierung scheint bei diesem Prozess mitzuwirken. Die funktionelle Konsequenz STAT3-abhängiger genomischer Aktivierung von Gehirnzellen nach LPS-Gabe wird bislang nur unvollständig verstanden. Basierend auf neuern Daten aus der Literatur konnte eine Hypothese formuliert werden, welche STAT3 als einen antiinflammatorischen Mediator speziell im Endothel vorschlägt. Die Ergebnisse dieser Doktorarbeit demonstrieren deutlich, dass ganz besonders das Gehirndothel in dieses neue Konzept integriert werden muss.

Zur Untersuchung des nervalen Signalwegs zur Fieberentstehung bei lokalen Entzündungsreaktionen und speziell der Rolle von Prostaglandinen in diesem Experimentalmodell wurden Fieberreaktionen durch Injektionen einer hohen (100 µg/kg) oder niedrigen (10 µg/kg) LPS-Dosis in die künstliche subkutan implantierte Teflonkammer induziert. Beide eingesetzten LPS-Dosierungen riefen außerdem eine im subkutanen Entzündungsareal lokalisierte markante Bildung von Prostaglandin E₂ (PGE₂) hervor. Die Gabe von Diclofenac, einem nicht selektiven Zykllooxygenase-Inhibitor (COX) in unterschiedlichen Dosierungen (5, 50, 500, 5000 µg/kg), verringerte oder unterdrückte LPS-induziertes Fieber und hemmte die LPS-induzierte lokale PGE₂-Bildung. Die niedrigste Diclofenac-Dosierung (5 µg/kg) schwächte das Fieber nach LPS-Applikation von 10 µg/kg s.c. nur dann ab, wenn Diclofenac direkt in die subkutane Kammer injiziert wurde, nicht aber bei subkutaner Applikation in den contralateral zur subkutanen Kammer gelegenen Bereich. Diese Beobachtung wies darauf hin, dass eine lokalisierte PGE₂-Bildung im Entzündungsgebiet einen Teil der Fieberreaktion vermittelte, die durch Injektion von 10 µg/kg LPS in die subkutane Kammer ausgelöst wurde. Eine Erhärtung dieser Hypothese ergab sich aus Beobachtungen, dass es nicht möglich war, COX-2 mRNA im Gehirn des Meerschweinchens nach Injektion von 10 µg/kg LPS in die subkutane Kammer nachzuweisen. Hingegen induzierte eine subkutane Gabe von 100 µg/kg LPS wie auch systemische LPS-Applikation (i.a., i.p.) eine deutliche Expression des COX-2-Genes im Meerschweinchengehirn, was durch *in situ* Hybridisierung dokumentiert wurde. Folglich wurde die Fieberreaktion bei subkutaner Injektion von 10 µg/kg LPS zumindest anteilig durch Aktivierung nervaler Signalvermittlung vom lokalen Entzündungsmodell zum Gehirn hervorgerufen.

Als Schlussfolgerung hieraus ergibt sich, dass Fieberreaktionen bei moderaten lokalen Entzündungsreaktionen anteilig sowohl von humoralen als auch nervalen Komponenten der Kommunikation des aktivierten Immunsystems mit dem Gehirn entstehen. Die nervale Beteiligung ist dann nicht mehr detektierbar, wenn die humoralen Signale so stark sind, dass nervale Komponenten zur Fieberinduktion verdeckt werden. Im Bezug auf die humorale Komponente könnte IL-6 eine zentrale Rolle bei der Regulation der Fieberreaktion spielen, obwohl die präzise funktionelle Konsequenz IL-6-induzierter genomischer Aktivierung von Gehirnzellen noch abzuklären bleibt.

VII. SUMMARY

Purpose of the present study was to investigate signaling pathways for fever induction during localized or systemic inflammation. The specific roles of Interleukin-6 (IL-6) and prostaglandins in both of these processes were analyzed. With regard to the humoral mechanisms of fever generation, a possible lipopolysaccharide (LPS)-induced activation of brain cells mediated by the pleiotropic cytokine IL-6 and its transcription factor STAT3 during systemic or localized inflammation was studied. In guinea pigs, intra-arterial (i.a., 10 µg/kg) or intraperitoneal (i.p., 30 µg/kg) injections of bacterial LPS caused a systemic inflammatory response which was accompanied by a robust fever. A febrile response was also induced by administration of LPS into artificial subcutaneously implanted Teflon chambers (s.c. 100 or 10 µg/kg), which reflects an experimental model that mimics local tissue inflammation. Baseline plasma levels of bioactive IL-6 determined 60 min. prior to injections of LPS or vehicle amounted to 35-80 international units per ml (I.U./ml). Within 90 min. after LPS-injection plasma IL-6 rose about 1000-fold in the groups injected i.a. or i.p., about 50-fold in the group injected s.c. with 100 µg/kg LPS, and only 5-fold in guinea pigs injected with the lower dose of LPS s.c. (10 µg/kg). At this time point, a distinct nuclear translocation pattern of the transcription factor STAT3 became evident in several brain structures. Amongst those the sensory circumventricular organs (sCVOs) known to lack a tight blood-brain barrier, such as the *area postrema*, the vascular organ of the lamina terminalis and the subfornical organ, as well as the hypothalamic supraoptic nucleus showed intense nuclear STAT3 signals in the i.a. or i.p. injected groups. In contrast, a moderate (s.c. group, 100 µg/kg) or even no (s.c. group, 10 µg/kg) nuclear STAT3 translocation occurred in response to s.c. injections of LPS. These results suggest that STAT3-mediated genomic activation of target gene transcription in brain cells occurred only in those cases in which sufficiently high concentrations of circulating IL-6 were formed during systemic (i.a. and i.p. groups) or localized (s.c. group, 100 µg/kg) inflammation.

Cell phenotypes of cytokine-responsive brain target cells that were genomically activated by IL-6 were mapped by histological analysis of cytokine-induced transcription factors in combination with specific cellular marker proteins. Critical sites mediating cytokine-dependent immuneffector functions could be divided into two groups, one group of responding cells situated along the tight blood-brain barrier (BBB), and a second group of cells in the before mentioned sCVOs. A marked STAT3 activation in two target structures of the guinea pig brain (1) within the entire brain endothelium and (2) within astrocytes of the sCVOs were shown. Both structures represent critical brain sites or cells mediating cytokine action during LPS-induced inflammation. STAT3-controlled transcriptional activation seems to be involved in this process. The functional consequences of STAT3-dependent genomic actions during LPS-challenge are still poorly understood. However, based on a recently published study from another laboratory, a new hypothesis is presented, which involves STAT3 as an anti-inflammatory mediator in the endothelium. The results of this thesis clearly

demonstrate that specifically the endothelium of the brain has to be incorporated into this novel concept.

To investigate the potentially involved neuronal signaling pathway for fever induction during localized inflammation and the role of prostaglandins in this experimental model, dose-dependent febrile responses were induced by injection of a high (100 µg/kg) or a low (10 µg/kg) dose of bacterial LPS into artificial subcutaneously implanted Teflon chambers. Both of the applied LPS-doses further induced a pronounced formation of prostaglandin E₂ (PGE₂) at the site of localized subcutaneous inflammation. Administration of diclofenac, a non-selective cyclooxygenase (COX) inhibitor, at different doses (5, 50, 500, 5000 µg/kg) attenuated or abrogated LPS-induced fever and depressed LPS-induced local PGE₂ formation. The lowest dose of diclofenac (5 µg/kg) attenuated fever in response to 10 µg/kg LPS only when administered directly into the subcutaneous chamber, but not when injected into the contralateral subcutaneous site of the chamber position. This observation indicated that a localized formation of PGE₂ at the site of inflammation mediated a portion of the febrile response which was induced by injection of 10 µg/kg LPS into the subcutaneous chamber. Further support for this hypothesis derived from the observation that I failed to detect induction of COX-2 mRNA in the brain of guinea pigs injected subcutaneously with 10 µg/kg LPS, while subcutaneous injections of 100 µg/kg LPS as well as systemic injections of LPS (i.p. or i.a. routes) readily caused expression of the COX-2 gene in the guinea pig brain as demonstrated by *in situ* hybridization. Therefore, fever in response to subcutaneous injection of 10 µg/kg LPS may, in part, have been evoked by a neuronal rather than a humoral pathway from the local site of inflammation to the brain.

In conclusion, fever in response to moderate local inflammatory reactions seems to be due to the participation of a humoral as well as a neuronal component of immune-to-brain communication. The neuronal participation is not detectable at all, when humoral signals are so strong that they are overriding the neural component for fever induction. With regard to the humoral component, IL-6 might play an important role in the regulation of the febrile response although the precise functional consequences of IL-6-induced genomic activation of brain cells still has to be clarified.

VIII. ABKÜRZUNGEN

*	signifikant (p<0,05)	Cy3	rotfluoreszierendes
AA	Arachidonsäure	Carbocyanin
ACTH	Adrenocorticotropes-Hormon	CyPGs	zyklische Prostaglandine
„Air-pouch“	subkutane Luftkammer	D	Diclofenac
ANOVA	Varianzanalyse	DAB	Diaminobenzidin-
AP	<i>Area postrema</i>	Tetrahydrochloride
AP-1	activator protein-1	DAPI	4',6-Diamidino-2-Phenylindol-
APC	Adenomatous Polyposis Coli	Dilacetat, Kernfärbung
.....	Zellmarker für	DNA	Desoxyribonukleinsäure
.....	Oligodendrozyten	DRG	Spinalganglien
APP	Akut-Phase-Protein/AP-Protein	(dorsal root ganglia)
APR	Akute-Phase-Reaktion	E. coli	<i>Escherichia coli</i>
Arc	<i>Nucleus arcuatus hypothalami</i>	ELISA	enzyme-linked immunosorbent
ATP	Adenosintriphosphat	assay
B	Nullwert	eNOS	endotheliale NOS
B0	maximale Bindung	EP(1-4)R	Prostaglandin E-
BAT	braunes Fettgewebe	Rezeptorsubtyp 1-4
BBB	Blood-Brain-Barrier	ER	Endoplasmatisches Retikulum
.....	(Blut-Hirn-Schranke)	ETOH	Ethanol
cAMP	zyklisches	EU	Endotoxin Unit
.....	Adenosinmonophosphat	f	Fornix
cc	<i>Corpus callosum</i>	F.I.	Fieberindex {° C*h}
CD	Cluster of Differentiation	FOS	FOS-Protein,
c-fos	Gensequenz auf der DNA	Transkriptionsfaktor,
.....	für FOS	Onkogenprodukt
cGMP	zyklisches Guanosin-	FOS-IR	FOS-Immunreaktivität
.....	Monophosphat	GC	Guanylat-Zyklase
ChP	<i>Plexus choroideus</i>	GFAP	Glial Fibrillary Acidic Protein
CIS 1	cytokine inducible SH2 protein	Zellmarker für Astrozyten
CLC	cardiotropin-like cytokine	gp130	Glykoprotein 130
CNTF	ciliary neurotrophic factor	GTP	Guanosintriphosphat
CO	Kohlenstoffmonoxid	HCl	Salzsäure
CO ₂	Kohlenstoffdioxid	HGF	Hybridoma-Growth-Factor
COX	Zyklooxygenase	H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
COX-1/2/3	Zyklooxygenase-1/2/3	HPA-Achse	Hypothalamo-Hypophysen-
cPGES	zytosolische	Nebennierenrinden-Achse
.....	Prostaglandin-E-Synthase	HRP	Horseradish-Peroxidase
cPLA2	zytosolische Phospholipase A2	Hz	Frequenz in Herz
CPu	<i>Caudate putamen (striatum)</i>	i.a.	intraarteriell
CR	Carbonyl-Reduktase	icv	intracerebroventrikulär
CSF	zerebrospinale Flüssigkeit	IFN	Interferon
CT-1	cardiotropin-1	IKK	Inhibitorischer Faktor κB Kinase
CVOs	zirkumventrikulären Organe	IκB	Inhibitorischer Faktor κB

IL-(x)	Interleukin-(x)	MPS	Monozyten-Makrophagen-System
IL-1	Interleukin-1	mRNA.....	messenger Ribonukleinsäure
IL-1 β	Interleukin-1 beta	MTT.....	3-{4,5-Dimethylthiazol-2-yl}-2,5
IL-6	Interleukin-6	Diphenyl-Tetrazoliumbromid
IL-1R.....	Interleukin-1 Rezeptor	MyD88.....	Adaptermolekül des IL-1R
IL-6R.....	Interleukin-6 Rezeptor	NaCl.....	Isotone Natriumchloridlösung
IL-1ra.....	IL-1-Rezeptor-Antagonist	NADPH-d	Nicotinamid-Adenosin-.....
iNOS.....	induzierbare NO-Synthase	Dinucleotid-Phosphat-.....
i.m.	intramuskulär	Diaphorase
i.p.	intraperitoneal	NBT	Nitroblau-Tetrazolium
I.U.....	international units	n.d.	nicht detektierbar bzw. unterhalb
IUPS	Commisson for Thermal	der Nachweisgrenze
.....	Physiology of the International	NeuN	Neuronen-spezifischer
.....	Union of Physiologigal Sciences	nukleärer Faktor
i.v.	intravenös	NF-IL-6.....	nuclear factor-IL-6
IRAK.....	Rezeptor-assozierte Kinase	NF- κ B.....	nuclear factor κ B
JAK	Janus-Kinase	NGF	nerve growth factor
kDa.	Kilo Dalton	NHS	Normal Horse Serum
KG	Körpergewicht	NIK.....	NF- κ B induzierende Kinase
KS.....	kaltsensitive Neurone	NL.....	Neurohypophyse
L10	LPS-Dosis 10 μ g/kg	nNOS	neuronale NO-Synthase
L30	LPS-Dosis 30 μ g/kg	NO	Stickstoffmonoxid
L100	LPS-Dosis 100 μ g/kg	NOS	Stickstoffmonoxid-Synthase
LIF.....	leukemia inhibiting factor	n.s.	nicht signifikant (p>0,05)
lo.....	<i>Tractus olfactorius lateralis</i>	NSAIDs	nicht steroidalen
LPO	<i>Area paeoptica lateralis</i>	Entzündungshemmer
LPS.....	Lipopolysaccharid	NSB	nicht spezifische Bindung
LPS-B.....	LPS-Bindungsprotein	NTS.....	<i>Nucleus tractus solitarius</i>
LV.....	laterale Ventrikel	N. vagus.....	<i>Nervus vagus</i>
MALP-2	Makrophagen-aktivierendes	OSM	oncostatin M
.....	Lipopeptid-2	OVLT	<i>Organum vasculosum</i>
MAPK	mitogen activated protein kinase	<i>laminae terminalis</i>
MDP	Muramyldipeptid	ox	<i>Chiasma opticum</i>
ME.....	<i>Eminentia mediana</i>	PAF.....	platelet activating factor
MG	Molekulargewicht	PAMPs.....	pathogen-associated
min.....	Minute	molecular patterns
MIP.....	Makrophagen-.....	PB	Phosphat-gepufferte
.....	Inflammatorisches-Protein	Kochsalzlösung
MnPO	<i>Nucleus praeopticus medianus</i>	Pe	<i>Nucleus periventricularis</i>
MOAT	multispezifische Anionen	<i>hypothalami</i>
.....	Transporter	PFA.....	Paraformaldehyd-Lösung
MPA	<i>Area paeoptica medialis</i>	PG	Prostaglandin
mPGES.....	mikrosomale	PGE ₂	Prostaglandin-E ₂
.....	Prostaglandin-E-Synthase	PGES	Prostaglandin-E-Synthase
MPO	<i>mediale präoptische Region</i>	PGT.....	PG-Transporter

PIAS	protein inhibitor of activated STAT	STAT	Signalübersetzer und Aktivator der Transkription
PIN	<i>Organum pineale</i>	(engl: signal transducer and
Pir	<i>Cortex piriformis</i>	activator of transcription)
PLA ₂	Phospholipase A ₂	STAT3	STAT-Transkriptionsfaktor 3
pNPP	p-Nitrophenylphosphat	sTNFR	löslicher TNFR
PNS	peripheres Nervensystem	t	Zeit (min.)
POA	<i>Area praeoptica hypothalami</i> (Präoptische Region)	TA	totale Aktivität
Poly I : Poly C ...	Polyinosinic : polycytidylic acid	TGF-β	transforming growth factor-β
POMC	Proopiomelanocortin	TLR	Toll-Like-Rezeptor
PVC	perivaskuläre Zellen	TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
PVN	<i>Nucleus paraventricularis</i> <i>hypothalami</i>	TNF-α	Tumor-Nekrose-Faktor-alpha
py	<i>Tractus pyramidalis</i>	TNF-bp	Tumor-Nekrose-Faktor- Bindungsprotein
rf	<i>Fissura rhinalis</i>	TNFR	Tumor-Nekrose-Faktor- Rezeptor
RM	Rückenmark	T _b	abdominale Körpertemperatur
ROb	<i>Nucleus raphe obscurus</i>	TRAF	TNF Rezeptor- assoziierter Faktor
RPa	<i>Nucleus raphe pallidus</i>	TRPs	transient receptor potentials
RT	Raumtemperatur	TX	Thromboxan
s.c	subkutan	VIII/3V	dritter Hirnventrikel
s.c.c.l	subkutan contralateral	VMPO	<i>Nucleus praeopticus</i> <i>ventromedialis</i> ; ventromediale präoptische Region
sCD14	lösliche CD14 Rezeptoren	vW	von-Willebrand-Faktor Zellmarker für Endothelzellen
SCO	<i>Organum subcommissurale</i>	WS	warmsensitive Neurone
sCVOs	senorischen CVOs	QK	Qualitätskontrolle
SFO	Subfornikalorgan (<i>Organum subfornicale</i>)	ZNS	Zentralnervensystem
sgp130	lösliche gp130	12	<i>Nucleus hypoglossus</i>
sIL-6R	lösliche IL-6R	15-PGDH	15-Hydroxy-PG-Dehydrogenase
SIRS	Systemisches- Inflammatorisches-Reaktions- Syndrom	β-NADPH+H	β-Nicotinamid- dinucleotidphosphat (reduzierte Form)
SOCS	supressor of cytokine signaling		
Solv.	Solvent/Lösungsmittel		
SON	<i>Nucleus supraopticus</i>		
sPLA ₂	sekretorische Phospholipase A ₂		

IX. LITERATURVERZEICHNIS

- (1990). Increase in National Hospital Discharge Survey rates for septicemia--United States, 1979-1987. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* **39**, 31-34.
- AARDEN, L. A., DE GROOT, E. R., SCHAAP, O. L. & LANSDORP, P. M. (1987). Production of hybridoma growth factor by human monocytes. *Eur J Immunol* **17**, 1411-1416.
- AGGARWAL, B. B. (2003). Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword. *Nat Rev Immunol* **3**, 745-756.
- AGNATI, L. F., ZOLI, M., STROMBERG, I. & FUXE, K. (1995). Intercellular communication in the brain: wiring versus volume transmission. *Neuroscience* **69**, 711-726.
- AKIRA, S. (1997). IL-6-regulated transcription factors. *Int J Biochem Cell Biol* **29**, 1401-1418.
- ALMAWI, W. Y. & MELEMEDJIAN, O. K. (2002). Negative regulation of nuclear factor-kappaB activation and function by glucocorticoids. *J Mol Endocrinol* **28**, 69-78.
- ANDERSON, K. V. (2000). Toll signaling pathways in the innate immune response. *Curr Opin Immunol* **12**, 13-19.
- ANFORTH, H. R., BLUTHE, R. M., BRISTOW, A., HOPKINS, S., LENCZOWSKI, M. J., LUHESI, G., LUNDKVIST, J., MICHAUD, B., MISTRY, Y., VAN DAM, A. M., ZHEN, C., DANTZER, R., POOLE, S., ROTHWELL, N. J., TILDERS, F. J. & WOLLMAN, E. E. (1998). Biological activity and brain actions of recombinant rat interleukin-1alpha and interleukin-1beta. *Eur Cytokine Netw* **9**, 279-288.
- ANGGARD, E. (1966). The biological activities of three metabolites of prostaglandin E 1. *Acta Physiol Scand* **66**, 509-510.
- ARDITI, M., ZHOU, J., DORIO, R., RONG, G. W., GOYERT, S. M. & KIM, K. S. (1993). Endotoxin-mediated endothelial cell injury and activation: role of soluble CD14. *Infect Immun* **61**, 3149-3156.
- ASCHNER, M. (1998). Astrocytes as mediators of immune and inflammatory responses in the CNS. *Neurotoxicology* **19**, 269-281.
- ATKINS, E. (1960). Pathogenesis of fever. *Physiol Rev* **40**, 580-646.
- AUBERT, A., GOODALL, G., DANTZER, R. & GHEUSI, G. (1997). Differential effects of lipopolysaccharide on pup retrieving and nest building in lactating mice. *Brain Behav Immun* **11**, 107-118.
- AUERNHAMMER, C. J., BOUSQUET, C. & MELMED, S. (1999). Autoregulation of pituitary corticotroph SOCS-3 expression: Characterization of the murine SOCS-3 promoter. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 6964-6969.

- AUERNHAMMER, C. J., CHESNOKOVA, V., BOUSQUET, C. & MELMED, S. (1998). Pituitary Corticotroph SOCS-3: Novel Intracellular Regulation of Leukemia-Inhibitory Factor-Mediated Proopiomelanocortin Gene Expression and Adrenocorticotropin Secretion. *Mol Endocrinol* **12**, 954-961.
- AUERNHAMMER, C. J. & MELMED, S. (2001). The central role of SOCS-3 in integrating the neuro-immunoendocrine interface. *J Clin Invest* **108**, 1735-1740.
- BANK, U., KUPPER, B., REINHOLD, D., HOFFMANN, T. & ANSORGE, S. (1999). Evidence for a crucial role of neutrophil-derived serine proteases in the inactivation of interleukin-6 at sites of inflammation. *FEBS Lett* **461**, 235-240.
- BANKS, W. A., FARR, S. A. & MORLEY, J. E. (2002). Entry of blood-borne cytokines into the central nervous system: effects on cognitive processes. *Neuroimmunomodulation* **10**, 319-327.
- BANKS, W. A. & KASTIN, A. J. (1985). Peptides and the blood-brain barrier: lipophilicity as a predictor of permeability. *Brain Res Bull* **15**, 287-292.
- BANKS, W. A., KASTIN, A. J. & GUTIERREZ, E. G. (1994). Penetration of interleukin-6 across the murine blood-brain barrier. *Neurosci Lett* **179**, 53-56.
- BANKS, W. A., ORTIZ, L., PLOTKIN, S. R. & KASTIN, A. J. (1991). Human interleukin (IL) 1 alpha, murine IL-1 alpha and murine IL-1 beta are transported from blood to brain in the mouse by a shared saturable mechanism. *J Pharmacol Exp Ther* **259**, 988-996.
- BARTH, S. W. & GERSTBERGER, R. (1999). Differential regulation of angiotensinogen and AT1A receptor mRNA within the rat subfornical organ during dehydration. *Brain Res Mol Brain Res* **64**, 151-164.
- BAUMANN, H. & GAULDIE, J. (1994). The acute phase response. *Immunol Today* **15**, 74-80.
- BECHMANN, I., KWIDZINSKI, E., KOVAC, A. D., SIMBURGER, E., HORVATH, T., GIMSA, U., DIRNAGL, U., PRILLER, J. & NITSCH, R. (2001). Turnover of rat brain perivascular cells. *Exp Neurol* **168**, 242-249.
- BEESON, P. B. (1948). Temperature-elevating effect of substance obtained from polymorphonuclear leukocytes. *J Clin Invest* **27**, 524-548.
- BEG, A. A. & BALDWIN, A. S., JR. (1993). The I kappa B proteins: multifunctional regulators of Rel/NF-kappa B transcription factors. *Genes Dev* **7**, 2064-2070.
- BENVENISTE, E. N., SPARACIO, S. M., NORRIS, J. G., GRENETT, H. E. & FULLER, G. M. (1990). Induction and regulation of interleukin-6 gene expression in rat astrocytes. *J Neuroimmunol* **30**, 201-212.
- BERNHEIM, H. A. & KLUGER, M. J. (1976). Fever: effect of drug-induced antipyresis on survival. *Science* **193**, 237-239.

- BHATTACHARYA, S. & SCHINDLER, C. (2003). Regulation of Stat3 nuclear export. *J Clin Invest* **111**, 553-559.
- BIENIEK, K., SZUSTER-CIESIELSKA, A., KAMINSKA, T., KONDRACKI, M., WITEK, M. & KANDEFER-SZERSZEN, M. (1998). Tumor necrosis factor and interferon activity in the circulation of calves after repeated injection of low doses of lipopolysaccharide. *Vet Immunol Immunopathol* **62**, 297-307.
- BILD, A. H., TURKSON, J. & JOVE, R. (2002). Cytoplasmic transport of Stat3 by receptor-mediated endocytosis. *Embo J* **21**, 3255-3263.
- BITO, L. Z., DAVSON, H. & SALVADOR, E. V. (1976). Inhibition of in vitro concentrative prostaglandin accumulation by prostaglandins, prostaglandin analogues and by some inhibitors of organic anion transport. *J Physiol* **256**, 257-271.
- BJORBAEK, C., LAVERY, H. J., BATES, S. H., OLSON, R. K., DAVIS, S. M., FLIER, J. S. & MYERS, M. G., JR. (2000). SOCS3 mediates feedback inhibition of the leptin receptor via Tyr985. *J Biol Chem* **275**, 40649-40657.
- BLALOCK, J. E. (1989). A molecular basis for bidirectional communication between the immune and neuroendocrine systems. *Physiol Rev* **69**, 1-32.
- BLALOCK, J. E. (1994). The syntax of immune-neuroendocrine communication. *Immunol Today* **15**, 504-511.
- BLATTEIS, C. M. (1974). Influence of body weight and temperature on the pyrogenic effect of endotoxin in guinea pigs. *Toxicol Appl Pharmacol* **29**, 249-258.
- BLATTEIS, C. M. (2004a). The cytokine-prostaglandin cascade in fever production: fact or fancy? *J Therm Biol* **29**, 359-368.
- BLATTEIS, C. M., BEALER, S. L., HUNTER, W. S., LLANOS, Q. J., AHOKAS, R. A. & MASHBURN, T. A., JR. (1983). Suppression of fever after lesions of the anteroventral third ventricle in guinea pigs. *Brain Res Bull* **11**, 519-526.
- BLATTEIS, C. M., FELEDER, C., PERLIK, V., SHUXIN, L. (2004b). Possible sequence of pyrogenic afferent processing in the POA. *J Therm Biol* **29**, 391-400.
- BLATTEIS, C. M., HALES, J. R., MCKINLEY, M. J. & FAWCETT, A. A. (1987). Role of the anteroventral third ventricle region in fever in sheep. *Can J Physiol Pharmacol* **65**, 1255-1260.
- BLATTEIS, C. M., QUAN, N., XIN, L. & UNGAR, A. L. (1990). Neuromodulation of acute-phase responses to interleukin-6 in guinea pigs. *Brain Res Bull* **25**, 895-901.
- BLATTEIS, C. M., SEHIC, E. & LI, S. (1998). Afferent pathways of pyrogen signaling. *Ann N Y Acad Sci* **856**, 95-107.
- BLATTEIS, C. M., SEHIC, E. (1997). Fever: how may circulating cytokines signal the brain? *NIPS* **12**, 1-9.

- BLIGH, J. (1976). Is mammalian thermoregulation based on a setpoint mechanism or a dynamic balance mechanism? A consideration based on neuronal evidence and neuronal models. *Isr J Med Sci* **12**, 934-941.
- BLUTHÉ, R. M., DANTZER, R. & KELLEY, K. W. (1992). Effects of interleukin-1 receptor antagonist on the behavioral effects of lipopolysaccharide in rat. *Brain Res* **573**, 318-320.
- BLUTHE, R. M., MICHAUD, B., KELLEY, K. W. & DANTZER, R. (1996). Vagotomy blocks behavioural effects of interleukin-1 injected via the intraperitoneal route but not via other systemic routes. *Neuroreport* **7**, 2823-2827.
- BODE, J. G., FISCHER, R., HAUSSINGER, D., GRAEVE, L., HEINRICH, P. C. & SCHAPER, F. (2001). The inhibitory effect of IL-1 beta on IL-6-induced alpha 2-macroglobulin expression is due to activation of NF-kappa B. *J Immunol* **167**, 1469-1481.
- BODE, J. G., NIMMESGERN, A., SCHMITZ, J., SCHAPER, F., SCHMITT, M., FRISCH, W., HAUSSINGER, D., HEINRICH, P. C. & GRAEVE, L. (1999). LPS and TNFalpha induce SOCS3 mRNA and inhibit IL-6-induced activation of STAT3 in macrophages. *FEBS Lett* **463**, 365-370.
- BOHUSLAV, J., KRAVCHENKO, V. V., PARRY, G. C., ERLICH, J. H., GERONDAKIS, S., MACKMAN, N. & ULEVITCH, R. J. (1998). Regulation of an essential innate immune response by the p50 subunit of NF-kappaB. *J Clin Invest* **102**, 1645-1652.
- BOISCLAIR, Y. R., WANG, J., SHI, J., HURST, K. R. & OOI, G. T. (2000). Role of the suppressor of cytokine signaling-3 in mediating the inhibitory effects of interleukin-1beta on the growth hormone-dependent transcription of the acid-labile subunit gene in liver cells. *J Biol Chem* **275**, 3841-3847.
- BOISSE, L., MOUIHATE, A., ELLIS, S. & PITTMAN, Q. J. (2004). Long-term alterations in neuroimmune responses after neonatal exposure to lipopolysaccharide. *J Neurosci* **24**, 4928-4934.
- BONE, R. C., FISHER, C. J., JR., CLEMMER, T. P., SLOTMAN, G. J., METZ, C. A. & BALK, R. A. (1989). Sepsis syndrome: a valid clinical entity. Methylprednisolone Severe Sepsis Study Group. *Crit Care Med* **17**, 389-393.
- BORTZ, J. (1989). *Statistik*. Springer-Verlag, Berlin.
- BOULANT, J. A. (1998). Hypothalamic neurons. Mechanisms of sensitivity to temperature. *Ann N Y Acad Sci* **856**, 108-115.
- BOULANT, J. A. (2000). Role of the preoptic-anterior hypothalamus in thermoregulation and fever. *Clin Infect Dis* **31 Suppl 5**, S157-161.
- BOULANT, J. A., CURRAS, M.C., DEAN, J.B. (1989). Neurophysiological aspects of thermoregulation. *Adv Comp Environment Physiol* **4**, 117-160.

- BOWMAN, T., GARCIA, R., TURKSON, J. & JOVE, R. (2000). STATs in oncogenesis. *Oncogene* **19**, 2474-2488.
- BRACKEN, K. E., ELGER, W., JANTKE, I., NANNINGA, A. & GELLERSEN, B. (1997). Cloning of Guinea Pig Cyclooxygenase-2 and 15-Hydroxyprostaglandin Dehydrogenase Complementary Deoxyribonucleic Acids: Steroid-Modulated Gene Expression Correlates to Prostaglandin F₂{alpha} Secretion in Cultured Endometrial Cells. *Endocrinology* **138**, 237-247.
- BRAUN, H. A., BADE, H., HENSEL H. (1980). Static and dynamic discharge patterns of bursting cold fibers related to hypothetical receptor mechanisms. *Pflügers Arch - Eur J Physiol* **386**, 1-9.
- BREDER, C. D. & SAPER, C. B. (1996). Expression of inducible cyclooxygenase mRNA in the mouse brain after systemic administration of bacterial lipopolysaccharide. *Brain Res* **713**, 64-69.
- BREYER, R. M., BAGDASSARIAN, C. K., MYERS, S. A. & BREYER, M. D. (2001). Prostanoid receptors: subtypes and signaling. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **41**, 661-690.
- BROMBERG, J. F., WRZESZCZYNSKA, M. H., DEVGAN, G., ZHAO, Y., PESTELL, R. G., ALBANESE, C. & DARNELL, J. E., JR. (1999). Stat3 as an oncogene. *Cell* **98**, 295-303.
- BRÜCK, K. (1981). Basic mechanisms in longtime thermal adaptation. *Adv Physiol Sci* **32**, 263-273.
- BRÜCK, K. (1985). Wärmehaushalt und Temperaturregulation. In *Physiologie des Menschen*. ed. SCHMIDT, R. F., THEWS G., pp. 583-601. Springer Verlag, Berlin Heidelberg New York Tokyo.
- BRÜCK, K. & ZEISBERGER, E. (1987). Adaptive changes in thermoregulation and their neuropharmacological basis. *Pharmacol Ther* **35**, 163-215.
- BRYANT, R. E., HOOD, A. F., HOOD, C. E. & KOENIG, M. G. (1971). Factors affecting mortality of gram-negative rod bacteremia. *Arch Intern Med* **127**, 120-128.
- BUCURENCI, N., BLAKE, D. R., CHIDWICK, K. & WINYARD, P. G. (1992). Inhibition of neutrophil superoxide production by human plasma alpha 1-antitrypsin. *FEBS Lett* **300**, 21-24.
- BULLER, K. M. (2001). Role of circumventricular organs in pro-inflammatory cytokine-induced activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Clin Exp Pharmacol Physiol* **28**, 581-589.
- CAMPBELL, I. L., ABRAHAM, C. R., MASLIAH, E., KEMPER, P., INGLIS, J. D., OLDSTONE, M. B. & MUCKE, L. (1993). Neurologic disease induced in transgenic mice by cerebral overexpression of interleukin 6. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 10061-10065.
- CAMPISI, J., HANSEN, M. K., O'CONNOR, K. A., BIEDENKAPP, J. C., WATKINS, L. R., MAIER, S. F. & FLESHNER, M. (2003). Circulating cytokines and endotoxin are not necessary for

- the activation of the sickness or corticosterone response produced by peripheral *E. coli* challenge. *J Appl Physiol* **95**, 1873-1882.
- CANNON, B., HOUSTEK, J. & NEDERGAARD, J. (1998). Brown adipose tissue. More than an effector of thermogenesis? *Ann N Y Acad Sci* **856**, 171-187.
- CAO, C., MATSUMURA, K. & WATANABE, Y. (1997a). Induction of cyclooxygenase-2 in the brain by cytokines. *Ann N Y Acad Sci* **813**, 307-309.
- 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**, 187-196.
- CAO, C., MATSUMURA, K., YAMAGATA, K. & WATANABE, Y. (1996). Endothelial cells of the rat brain vasculature express cyclooxygenase-2 mRNA in response to systemic interleukin-1 beta: a possible site of prostaglandin synthesis responsible for fever. *Brain Res* **733**, 263-272.
- CAO, C., MATSUMURA, K., YAMAGATA, K. & WATANABE, Y. (1997b). Involvement of cyclooxygenase-2 in LPS-induced fever and regulation of its mRNA by LPS in the rat brain. *Am J Physiol* **272**, R1712-1725.
- CARTMELL, T., BALL, C., BRISTOW, A. F., MITCHELL, D. & POOLE, S. (2003). Endogenous interleukin-10 is required for the defervescence of fever evoked by local lipopolysaccharide-induced and *Staphylococcus aureus*-induced inflammation in rats. *J Physiol* **549**, 653-664.
- CARTMELL, T., LUHESHI, G. N., HOPKINS, S. J., ROTHWELL, N. J. & POOLE, S. (2001). Role of endogenous interleukin-1 receptor antagonist in regulating fever induced by localised inflammation in the rat. *J Physiol* **531**, 171-180.
- CARTMELL, T., 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 (Lond)* **518**, 585-594.
- CARTMELL, T., MILLER, A. J., MISTRY, Y., ROTHWELL, N. J., LUHESHI, G. N. (1998). Circulating IL-6 is derived from the site of inflammation in response to a localized injection of lipopolysaccharide in the rat. *J Physiol*, **513.P**, 146P.
- 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 (Lond)* **526**, 653-661.
- CASSATELLA, M. A., GASPERINI, S., BOVOLENTA, C., CALZETTI, F., VOLLEBREGT, M., SCAPINI, P., MARCHI, M., SUZUKI, R., SUZUKI, A. & YOSHIMURA, A. (1999). Interleukin-10 (IL-10) selectively enhances CIS3/SOCS3 mRNA expression in human neutrophils: evidence for an IL-10-induced pathway that is independent of STAT protein activation. *Blood* **94**, 2880-2889.

- CASTELL, J., KLAPPROTH, J., GROSS, V., WALTER, E., ANDUS, T., SNYERS, L., CONTENT, J. & HEINRICH, P. C. (1990). Fate of interleukin-6 in the rat. Involvement of skin in its catabolism. *Eur J Biochem* **189**, 113-118.
- CASTELL, J. V., GEIGER, T., GROSS, V., ANDUS, T., WALTER, E., HIRANO, T., KISHIMOTO, T. & HEINRICH, P. C. (1988). Plasma clearance, organ distribution and target cells of interleukin-6/hepatocyte-stimulating factor in the rat. *Eur J Biochem* **177**, 357-361.
- CHAI, Z., GATTI, S., TONIATTI, C., POLI, V. & BARTFAI, T. (1996). Interleukin (IL)-6 gene expression in the central nervous system is necessary for fever response to lipopolysaccharide or IL-1 beta: a study on IL-6-deficient mice. *J Exp Med* **183**, 311-316.
- CHANDRASEKHARAN, N. V., DAI, H., ROOS, K. L., EVANSON, N. K., TOMSIK, J., ELTON, T. S. & SIMMONS, D. L. (2002). COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: cloning, structure, and expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 13926-13931.
- CHATTERJEE-KISHORE, M., WRIGHT, K. L., TING, J. P. & STARK, G. R. (2000). How Stat1 mediates constitutive gene expression: a complex of unphosphorylated Stat1 and IRF1 supports transcription of the LMP2 gene. *Embo J* **19**, 4111-4122.
- CHEN, Q., WANG, W. C., BRUCE, R., LI, H., SCHLEIDER, D. M., MULBURY, M. J., BAIN, M. D., WALLACE, P. K., BAUMANN, H. & EVANS, S. S. (2004). Central role of IL-6 receptor signal-transducing chain gp130 in activation of L-selectin adhesion by fever-range thermal stress. *Immunity* **20**, 59-70.
- CHEN, T. Y., LEI, M. G., SUZUKI, T. & MORRISON, D. C. (1992). Lipopolysaccharide receptors and signal transduction pathways in mononuclear phagocytes. *Curr Top Microbiol Immunol* **181**, 169-188.
- CHUANG, H. H., PRESCOTT, E. D., KONG, H., SHIELDS, S., JORDT, S. E., BASBAUM, A. I., CHAO, M. V. & JULIUS, D. (2001). Bradykinin and nerve growth factor release the capsaicin receptor from PtdIns(4,5)P2-mediated inhibition. *Nature* **411**, 957-962.
- CHUNG, C. D., LIAO, J., LIU, B., RAO, X., JAY, P., BERTA, P. & SHUAI, K. (1997). Specific inhibition of Stat3 signal transduction by PIAS3. *Science* **278**, 1803-1805.
- CLAPHAM, D. E., RUNNELS, L. W. & STRUBING, C. (2001). The TRP ion channel family. *Nat Rev Neurosci* **2**, 387-396.
- CLATWORTHY, A. L. (1998). Neural-immune interactions--an evolutionary perspective. *Neuroimmunomodulation* **5**, 136-142.
- COCEANI, F., BISHAI, I., LEES, J. & SIRKO, S. (1986). Prostaglandin E2 and fever: a continuing debate. *Yale J Biol Med* **59**, 169-174.
- COCEANI, F., LEES, J. & BISHAI, I. (1988). Further evidence implicating prostaglandin E2 in the genesis of pyrogen fever. *Am J Physiol* **254**, R463-469.

- COLSON, A., LE CAM, A., MAITER, D., EDERY, M. & THISSEN, J. P. (2000). Potentiation of growth hormone-induced liver suppressors of cytokine signaling messenger ribonucleic acid by cytokines. *Endocrinology* **141**, 3687-3695.
- CONTI, B., TABAREAN, I., ANDREI, C. & BARTFAI, T. (2004). Cytokines and fever. *Front Biosci* **9**, 1433-1449.
- COOPER, K. E., BLAHSER, S., MALKINSON, T. J., MERKER, G., ROTH, J. & ZEISBERGER, E. (1988). Changes in body temperature and vasopressin content of brain neurons, in pregnant and non-pregnant guinea pigs, during fevers produced by Poly I:Poly C. *Pflügers Arch - Eur J Physiol* **412**, 292-296.
- CREMEANS-SMITH, J. K. & NEWBERRY, B. H. (2003). Zymosan: induction of sickness behavior and interaction with lipopolysaccharide. *Physiol Behav* **80**, 177-184.
- CROKER, B. A., KREBS, D. L., ZHANG, J. G., WORMALD, S., WILLSON, T. A., STANLEY, E. G., ROBB, L., GREENHALGH, C. J., FORSTER, I., CLAUSEN, B. E., NICOLA, N. A., METCALF, D., HILTON, D. J., ROBERTS, A. W. & ALEXANDER, W. S. (2003). SOCS3 negatively regulates IL-6 signaling in vivo. *Nat Immunol* **4**, 540-545.
- DANTZER, R. (2001a). Cytokine-induced sickness behavior: mechanisms and implications. *Ann N Y Acad Sci* **933**, 222-234.
- DANTZER, R. (2001b). Cytokine-induced sickness behavior: where do we stand? *Brain Behav Immun* **15**, 7-24.
- DANTZER, R. & KELLEY, K. W. (1989). Stress and immunity: an integrated view of relationships between the brain and the immune system. *Life Sci* **44**, 1995-2008.
- DAVIDSON, J., ABUL, H. T., MILTON, A. S. & ROTONDO, D. (2001). Cytokines and cytokine inducers stimulate prostaglandin E2 entry into the brain. *Pflügers Arch - Eur J Physiol* **442**, 526-533.
- DAWSON, T. M., BREDT, D. S., FOTUHI, M., HWANG, P. M. & SNYDER, S. H. (1991). Nitric oxide synthase and neuronal NADPH diaphorase are identical in brain and peripheral tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 7797-7801.
- DE LUCA, B., MONDA, M. & SULLO, A. (1995). Changes in eating behavior and thermogenic activity following inhibition of nitric oxide formation. *Am J Physiol* **268**, R1533-1538.
- DE SOUZA, G. E., CARDOSO, R. A., MELO, M. C., FABRICIO, A. S., SILVA, V. M., LORA, M., DE BRUM-FERNANDES, A. J., RAE, G. A., FERREIRA, S. H. & ZAMPRONIO, A. R. (2002). A comparative study of the antipyretic effects of indomethacin and dipyron in rats. *Inflamm Res* **51**, 24-32.
- DEGRE, M. (1996). Interferons and other cytokines in bacterial infections. *J Interferon Cytokine Res* **16**, 417-426.

- DEHOUCK, M. P., JOLLIET-RIANT, P., BREE, F., FRUCHART, J. C., CECHELLI, R. & TILLEMENT, J. P. (1992). Drug transfer across the blood-brain barrier: correlation between in vitro and in vivo models. *J Neurochem* **58**, 1790-1797.
- DESSON, S. E. & FERGUSON, A. V. (2003). Interleukin 1beta modulates rat subfornical organ neurons as a result of activation of a non-selective cationic conductance. *J Physiol* **550.1**, 113-122.
- DIBENEDETTO, F. E. & BITO, L. Z. (1986). Transport of prostaglandins and other eicosanoids by the choroid plexus: its characterization and physiological significance. *J Neurochem* **46**, 1725-1731.
- DIEBOLD, S. S., KAISHO, T., HEMMI, H., AKIRA, S. & REIS E SOUSA, C. (2004). Innate antiviral responses by means of TLR7-mediated recognition of single-stranded RNA. *Science* **303**, 1529-1531.
- DIETER, P., SCHEIBE, R., JAKOBSSON, P. J., WATANABE, K., KOLADA, A. & KAMIONKA, S. (2000). Functional coupling of cyclooxygenase 1 and 2 to discrete prostanoid synthases in liver macrophages. *Biochem Biophys Res Commun* **276**, 488-492.
- DINARELLO, C. A. (1983). Molecular mechanisms in endotoxin fever. *Agents Actions* **13**, 470-486.
- DINARELLO, C. A. (1991). Interleukin-1 and interleukin-1 antagonism. *Blood* **77**, 1627-1652.
- DINARELLO, C. A. (1997). Cytokines as endogenous pyrogens. In *Fever: Basic Mechanisms and Management, 2nd edn.* ed. MACKOWIAK, C. A., pp. 87-116. Lippincott-Raven, Philadelphia.
- DINARELLO, C. A. (1999). Cytokines as endogenous pyrogens. *J Infect Dis* **179 Suppl 2**, S294-304.
- DINARELLO, C. A., CANNON, J. G., MANCILLA, J., BISHAI, 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., GATTI, S. & BARTFAI, T. (1999). Fever: links with an ancient receptor. *Curr Biol* **9**, R147-150.
- DOGAN, M. D., ATAOGU, H. & AKARSU, E. S. (2002). Effects of selective cyclooxygenase enzyme inhibitors on lipopolysaccharide-induced dual thermoregulatory changes in rats. *Brain Res Bull* **57**, 179-185.
- DUBOIS, E. F. (1936). Basal metabolism in health and disease. *Philadelphia*, Lea and Fibarger.
- DUBOIS, E. F. (1948). Fever and regulation of body temperature. *Springfield*, Charles C., Thomas.
- EHMER, B. (1996). *Chirurgie*. Schattauer Verlag, Stuttgart.

- EISENBERG, S. P., EVANS, R. J., AREND, W. P., VERDERBER, E., BREWER, M. T., HANNUM, C. H. & THOMPSON, R. C. (1990). Primary structure and functional expression from complementary DNA of a human interleukin-1 receptor antagonist. *Nature* **343**, 341-346.
- EK, M., ENGBLOM, D., SAHA, S., BLOMQVIST, A., JAKOBSSON, P. J. & ERICSSON-DAHLSTRAND, A. (2001). Inflammatory response: pathway across the blood-brain barrier. *Nature* **410**, 430-431.
- ELLIOTT, M. J., MAINI, R. N., FELDMANN, M., KALDEN, J. R., ANTONI, C., SMOLEN, J. S., LEEB, B., BREEDVELD, F. C., MACFARLANE, J. D. & BIJL, H. (1994). Randomised double-blind comparison of chimeric monoclonal antibody to tumour necrosis factor alpha (cA2) versus placebo in rheumatoid arthritis. *Lancet* **344**, 1105-1110.
- ELMQUIST, J. K., BREDER, C. D., SHERIN, J. E., SCAMMELL, T. E., HICKEY, W. F., DEWITT, D. & SAPER, C. B. (1997). Intravenous lipopolysaccharide induces cyclooxygenase 2-like immunoreactivity in rat brain perivascular microglia and meningeal macrophages. *J Comp Neurol* **381**, 119-129.
- 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.
- ENGBLOM, D., EK, M., SAHA, S., ERICSSON-DAHLSTRAND, A., JAKOBSSON, P. J. & BLOMQVIST, A. (2002). Prostaglandins as inflammatory messengers across the blood-brain barrier. *J Mol Med* **80**, 5-15.
- ENGBLOM, D., SAHA, S., ENGSTROM, L., WESTMAN, M., AUDOLY, L. P., JAKOBSSON, P. J. & BLOMQVIST, A. (2003). Microsomal prostaglandin E synthase-1 is the central switch during immune-induced pyresis. *Nat Neurosci* **6**, 1137-1138.
- ERICSSON, A., ARIAS, C. & SAWCHENKO, P. E. (1997). Evidence for an intramedullary prostaglandin-dependent mechanism in the activation of stress-related neuroendocrine circuitry by intravenous interleukin-1. *J Neurosci* **17**, 7166-7179.
- EVANS, S. S., WANG, W. C., BAIN, M. D., BURD, R., OSTBERG, J. R. & REPASKY, E. A. (2001). Fever-range hyperthermia dynamically regulates lymphocyte delivery to high endothelial venules. *Blood* **97**, 2727-2733.
- FANTUZZI, G. & DINARELLO, C. A. (1996). The inflammatory response in interleukin-1 beta-deficient mice: comparison with other cytokine-related knock-out mice. *J Leukoc Biol* **59**, 489-493.
- FATTORI, E., LAZZARO, D., MUSIANI, P., MODESTI, A., ALONZI, T. & CILIBERTO, G. (1995). IL-6 expression in neurons of transgenic mice causes reactive astrocytosis and increase in ramified microglial cells but no neuronal damage. *Eur J Neurosci* **7**, 2441-2449.
- FAURE, E., EQUILS, O., SIELING, P. A., THOMAS, L., ZHANG, F. X., KIRSCHNING, C. J., POLENTARUTTI, N., MUZIO, M. & ARDITI, M. (2000). Bacterial lipopolysaccharide

- activates NF-kappaB through toll-like receptor 4 (TLR-4) in cultured human dermal endothelial cells. Differential expression of TLR-4 and TLR-2 in endothelial cells. *J Biol Chem* **275**, 11058-11063.
- FERNANDEZ-BOTRAN, R. (2000). Soluble cytokine receptors: novel immunotherapeutic agents. *Expert Opin Investig Drugs* **9**, 497-514.
- FEWELL, J. E., KANG, M. & ELIASON, H. L. (1997). Autonomic and behavioral thermoregulation in guinea pigs during postnatal maturation. *J Appl Physiol* **83**, 830-836.
- FINCK, B. N., KELLEY, K. W., DANTZER, R. & JOHNSON, R. W. (1998). In vivo and in vitro evidence for the involvement of tumor necrosis factor-alpha in the induction of leptin by lipopolysaccharide. *Endocrinology* **139**, 2278-2283.
- FISHER, C. J., JR., SLOTMAN, G. J., OPAL, S. M., PRIBBLE, J. P., BONE, R. C., EMMANUEL, G., NG, D., BLOEDOW, D. C. & CATALANO, M. A. (1994). Initial evaluation of human recombinant interleukin-1 receptor antagonist in the treatment of sepsis syndrome: a randomized, open-label, placebo-controlled multicenter trial. The IL-1RA Sepsis Syndrome Study Group. *Crit Care Med* **22**, 12-21.
- FLESHNER, M., GOEHLER, L. E., HERMANN, J., RELTON, J. K., MAIER, S. F. & WATKINS, L. R. (1995). Interleukin-1 beta induced corticosterone elevation and hypothalamic NE depletion is vagally mediated. *Brain Res Bull* **37**, 605-610.
- FÖLSCH, U. R., KOCHSIEK, K., SCHMIDT, R.F. (2000). *Pathophysiologie*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York.
- FORTH, W., HENSCHLER, D., RUMMEL, W., FÖRSTERMANN, K., STARKE, K. (2001). *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*. URBAN & FISCHER, München Jena.
- FRANCIS, J., MOHANKUMAR, P. S., MOHANKUMAR, S. M. & QUADRI, S. K. (1999). Systemic administration of lipopolysaccharide increases plasma leptin levels: blockade by soluble interleukin-1 receptor. *Endocrine* **10**, 291-295.
- FREI, K., MALIPIERO, U. V., LEIST, T. P., ZINKERNAGEL, R. M., SCHWAB, M. E. & FONTANA, A. (1989). On the cellular source and function of interleukin 6 produced in the central nervous system in viral diseases. *Eur J Immunol* **19**, 689-694.
- FREUDENBERG, M. A. & GALANOS, C. (1990). Bacterial lipopolysaccharides: structure, metabolism and mechanisms of action. *Int Rev Immunol* **6**, 207-221.
- FURCHGOTT, R. F. & ZAWADZKI, J. V. (1980). The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* **288**, 373-376.
- GAEHTGENS, P., PRIES, A.R., WALZOG, B. (1999). Blut. In *Physiologie*. ed. DEETJEN, P., SPECKMANN, E.J., pp. 257-295. Urban & Fischer, München.
- GARIBALDI, J. A. (1972). Influence of temperature on the biosynthesis of iron transport compounds by *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol* **110**, 262-265.

- GATH, I. K., BENAMAR, G., JURAT, J. ROTH, E. SIMON & H.A. SCHMID. (1999). Expression of nitric oxide synthase (NOS) isoforms in the rat brain during lipopolysaccharid-induced fever. *Pflügers Arch - Eur J Physiol (Suppl.)* **437**, R 143.
- GAUTRON, L., LAFON, P., CHAIGNIAU, M., TRAMU, G. & LAYE, S. (2002). Spatiotemporal analysis of signal transducer and activator of transcription 3 activation in rat brain astrocytes and pituitary following peripheral immune challenge. *Neuroscience* **112**, 717-729.
- GAUTRON, L., LAFON, P., TRAMU, G. & LAYÉ, S. (2003). In vivo activation of the interleukin-6 receptor/gp130 signaling pathway in pituitary corticotropes of lipopolysaccharide-treated rats. *Neuroendocrinology* **77**, 32-43.
- GAYKEMA, R. P., DIJKSTRA, I. & TILDERS, F. J. (1995). Subdiaphragmatic vagotomy suppresses endotoxin-induced activation of hypothalamic corticotropin-releasing hormone neurons and ACTH secretion. *Endocrinology* **136**, 4717-4720.
- GAYKEMA, R. P., GOEHLER, L. E. & LYTE, M. (2004). Brain response to cecal infection with *Campylobacter jejuni*: analysis with Fos immunohistochemistry. *Brain Behav Immun* **18**, 238-245.
- GAYKEMA, R. P., GOEHLER, L. E., TILDERS, F. J., BOL, J. G., MCGORRY, M., FLESHNER, M., MAIER, S. F. & WATKINS, L. R. (1998). Bacterial endotoxin induces fos immunoreactivity in primary afferent neurons of the vagus nerve. *Neuroimmunomodulation* **5**, 234-240.
- GEARING, A. J. H., CARTWRIGHT, J.E., WADHWA M. (1994). 25. Biological and immunological assays for cytokines. In *The Cytokine Handbook 2nd edn.* ed. THOMSON, A. W., pp. 507-524. Academic Press Ltd., London.
- GHOSH, S. & KARIN, M. (2002). Missing pieces in the NF-kappaB puzzle. *Cell* **109 Suppl**, S81-96.
- GILROY, D. W., COLVILLE-NASH, P. R., WILLIS, D., CHIVERS, J., PAUL-CLARK, M. J. & WILLOUGHBY, D. A. (1999). Inducible cyclooxygenase may have anti-inflammatory properties. *Nat Med* **5**, 698-701.
- GIVALOIS, L., DORNAND, J., MEKAOUCHE, M., SOLIER, M. D., BRISTOW, A. F., IXART, G., SIAUD, P., ASSENMACHER, I. & BARBANEL, G. (1994). Temporal cascade of plasma level surges in ACTH, corticosterone, and cytokines in endotoxin-challenged rats. *Am J Physiol* **267**, R164-170.
- GOEHLER, L. E., BUSCH, C. R., TARTAGLIA, N., RELTON, J., SISK, D., MAIER, S. F. & WATKINS, L. R. (1995). Blockade of cytokine induced conditioned taste aversion by subdiaphragmatic vagotomy: further evidence for vagal mediation of immune-brain communication. *Neurosci Lett* **185**, 163-166.
- GOEHLER, L. E., RELTON, J. K., DRIPPS, D., KIECHLE, R., TARTAGLIA, N., MAIER, S. F. & WATKINS, L. R. (1997). Vagal paraganglia bind biotinylated interleukin-1 receptor

- antagonist: a possible mechanism for immune-to-brain communication. *Brain Res Bull* **43**, 357-364.
- GOLDBACH, J. M., ROTH, J., STORR, B. & ZEISBERGER, E. (1996). Repeated infusions of TNF-alpha cause attenuation of the thermal response and influence LPS fever in guinea pigs. *Am J Physiol* **270**, R749-754.
- GOLDBACH, J. M., ROTH, J. & ZEISBERGER, E. (1997). Fever suppression by subdiaphragmatic vagotomy in guinea pigs depends on the route of pyrogen administration. *Am J Physiol* **272**, R675-681.
- GOURINE, A. V. (1995). Pharmacological evidence that nitric oxide can act as an endogenous antipyretic factor in endotoxin-induced fever in rabbits. *Gen Pharmacol* **26**, 835-841.
- GRAEBER, M. B., STREIT, W. J. & KREUTZBERG, G. W. (1989). Identity of ED2-positive perivascular cells in rat brain. *J Neurosci Res* **22**, 103-106.
- GRAEVE, L., KOROLENKO, T. A., HEMMANN, U., WEIERGRABER, O., DITTRICH, E. & HEINRICH, P. C. (1996). A complex of the soluble interleukin-6 receptor and interleukin-6 is internalized via the signal transducer gp130. *FEBS Lett* **399**, 131-134.
- GRAHAM, C. E., WARNER, H., MISENER, J., COLLINS, D. C. & PREEDY, J. R. (1977). The association between basal body temperature, sexual swelling and urinary gonadal hormone levels in the menstrual cycle of the chimpanzee. *J Reprod Fertil* **50**, 23-28.
- GREEN, M. H. & VERMEULEN, C. W. (1994). Fever and the control of gram-negative bacteria. *Res Microbiol* **145**, 269-272.
- GRIFFIN, J. D. (2004). Central thermosensitivity and the integrative responses of hypothalamic neurons. *J Therm Biol* **29**, 327-331.
- GROSS, P. M. (1992). Circumventricular organ capillaries. *Prog Brain Res* **91**, 219-233.
- GRUNWALD, U., KRUGER, C. & SCHUTT, C. (1993). Endotoxin-neutralizing capacity of soluble CD14 is a highly conserved specific function. *Circ Shock* **39**, 220-225.
- GRUOL, D. L. & NELSON, T. E. (1997). Physiological and pathological roles of interleukin-6 in the central nervous system. *Mol Neurobiol* **15**, 307-339.
- GUTIERREZ, E. G., BANKS, W. A. & KASTIN, A. J. (1993). Murine tumor necrosis factor alpha is transported from blood to brain in the mouse. *J Neuroimmunol* **47**, 169-176.
- HAMBERG, M. & SAMUELSSON, B. (1971). On the metabolism of prostaglandins E 1 and E 2 in man. *J Biol Chem* **246**, 6713-6721.
- HAMMEL, H. T. (1965). Neurones and temperature regulation. *AMRL-TR-65* **232**, 1-32.
- HAMMEL, H. T. (1968). Regulation of internal body temperature. *Annu Rev Physiol* **30**, 641-710.

- HANADA, T., KINJYO, I., INAGAKI-OHARA, K. & YOSHIMURA, A. (2003). Negative regulation of cytokine signaling by CIS/SOCS family proteins and their roles in inflammatory diseases. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* **149**, 72-86.
- HANNUM, C. H., WILCOX, C. J., AREND, W. P., JOSLIN, F. G., DRIPPS, D. J., HEIMDAL, P. L., ARMES, L. G., SOMMER, A., EISENBERG, S. P. & THOMPSON, R. C. (1990). Interleukin-1 receptor antagonist activity of a human interleukin-1 inhibitor. *Nature* **343**, 336-340.
- HANSEN, M. K. & KRUEGER, J. M. (1997). Subdiaphragmatic vagotomy blocks the sleep- and fever-promoting effects of interleukin-1beta. *Am J Physiol* **273**, R1246-1253.
- HARRÉ, E. M., ROTH, J., GERSTBERGER, R. & HÜBSCHLE, T. (2003). Interleukin-6 mediates lipopolysaccharide-induced nuclear STAT3 translocation in astrocytes of rat sensory circumventricular organs. *Brain Res* **980**, 151-155.
- HARRÉ, E. M., ROTH, J., PEHL, U., KUETH, M., GERSTBERGER, R. & HÜBSCHLE, T. (2002). Selected contribution: role of IL-6 in LPS-induced nuclear STAT3 translocation in sensory circumventricular organs during fever in rats. *J Appl Physiol* **92**, 2657-2666.
- HART, B. L. (1988). Biological basis of the behavior of sick animals. *Neurosci Biobehav Rev* **12**, 123-137.
- HASAN, M. K. & WHITE, A. C. (1979). Psychogenic fever: entity or nonentity? *Postgrad Med* **66**, 152-154.
- HASDAY, J. D. (1996). The influence of temperature on host defenses. In *Fever: Basic Mechanisms and Management*. ed. MACKOWIAK, P. A., pp. 87-116. Raven Press, New York.
- HASHIMOTO, M., UENO, T. & IRIKI, M. (1994). What roles does the organum vasculosum laminae terminalis play in fever in rabbits? *Pflügers Arch - Eur J Physiol* **429**, 50-57.
- HASPEL, R. L. & DARNELL, J. E., JR. (1999). A nuclear protein tyrosine phosphatase is required for the inactivation of Stat1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 10188-10193.
- HEGYI, K., FULOP, K., KOVACS, K., TOTH, S. & FALUS, A. (2004). Leptin-induced signal transduction pathways. *Cell Biol Int* **28**, 159-169.
- HEINRICH, P. C., BEHRMANN, I., HAAN, S., HERMANN, H. M., MULLER-NEWEN, G. & SCHAPER, F. (2003). Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. *Biochem J* **374**, 1-20.
- HEINRICH, P. C., BEHRMANN, I., MULLER-NEWEN, G., SCHAPER, F. & GRAEVE, L. (1998). Interleukin-6-type cytokine signalling through the gp130/Jak/STAT pathway. *Biochem J* **334 (Pt 2)**, 297-314.
- HELLE, M., BRAKENHOFF, J. P., DE GROOT, E. R. & AARDEN, L. A. (1988). Interleukin 6 is involved in interleukin 1-induced activities. *Eur J Immunol* **18**, 957-959.

- HENSEL, H. (1981). Thermoreception and temperature regulation. *Monogr Physiol Soc* **38**, 1-321.
- HERKENHAM, M., LEE, H. Y. & BAKER, R. A. (1998). Temporal and spatial patterns of c-fos mRNA induced by intravenous interleukin-1: a cascade of non-neuronal cellular activation at the blood-brain barrier. *J Comp Neurol* **400**, 175-196.
- HERRERA, D. G. & ROBERTSON, H. A. (1989). Unilateral induction of c-fos protein in cortex following cortical devascularization. *Brain Res* **503**, 205-213.
- HICKEY, W. F., HSU, B. L. & KIMURA, H. (1991). T-lymphocyte entry into the central nervous system. *J Neurosci Res* **28**, 254-260.
- HIRSCHFELD, M., MA, Y., WEIS, J. H., VOGEL, S. N. & WEIS, J. J. (2000). Cutting edge: repurification of lipopolysaccharide eliminates signaling through both human and murine toll-like receptor 2. *J Immunol* **165**, 618-622.
- HOFER, H. (1958). Zur Morphologie der circumventriculären Organe des Zwischenhirns der Säugetiere. *Zool Anz (Suppl)* **22**, 203-251.
- HOLMES, J. E. & MILLER, N. E. (1963). Effects of Bacterial Endotoxin on Water Intake, Food Intake, and Body Temperature in the Albino Rat. *J Exp Med* **118**, 649-658.
- HOLST, O., ULMER, A. J., BRADE, H., FLAD, H. D. & RIETSCHEL, E. T. (1996). Biochemistry and cell biology of bacterial endotoxins. *FEMS Immunol Med Microbiol* **16**, 83-104.
- HORI, T., SHIBATA, M., NAKASHIMA, T., YAMASAKI, M., ASAMI, A., ASAMI, T. & KOGA, H. (1988). Effects of interleukin-1 and arachidonate on the preoptic and anterior hypothalamic neurons. *Brain Res Bull* **20**, 75-82.
- HORNEF, M. W., FRISAN, T., VANDEWALLE, A., NORMARK, S. & RICHTER-DAHLFORS, A. (2002). Toll-like receptor 4 resides in the Golgi apparatus and colocalizes with internalized lipopolysaccharide in intestinal epithelial cells. *J Exp Med* **195**, 559-570.
- HOSOI, T., KAWAGISHI, T., OKUMA, Y., TANAKA, J. & NOMURA, Y. (2002). Brain stem is a direct target for leptin's action in the central nervous system. *Endocrinology* **143**, 3498-3504.
- HU, H. J., BHAVE, G. & GEREAU, R. W. T. (2002). Prostaglandin and protein kinase A-dependent modulation of vanilloid receptor function by metabotropic glutamate receptor 5: potential mechanism for thermal hyperalgesia. *J Neurosci* **22**, 7444-7452.
- HÜBSCHLE, T., MATHAI, M. L., MCKINLEY, M. J. & OLDFIELD, B. J. (2001a). Multisynaptic neuronal pathways from the submandibular and sublingual glands to the lamina terminalis in the rat: a model for the role of the lamina terminalis in the control of osmo- and thermoregulatory behavior. *Clin Exp Pharmacol Physiol* **28**, 558-569.
- HÜBSCHLE, T., THOM, E., WATSON, A., ROTH, J., KLAUS, S. & MEYERHOF, W. (2001b). Leptin-induced nuclear translocation of STAT3 immunoreactivity in hypothalamic nuclei involved in body weight regulation. *J. Neurosci.* **21**, 2413-2424.

- HUNT, S. P., PINI, A. & EVAN, G. (1987). Induction of c-fos-like protein in spinal cord neurons following sensory stimulation. *Nature* **328**, 632-634.
- HWANG, S. W., CHO, H., KWAK, J., LEE, S. Y., KANG, C. J., JUNG, J., CHO, S., MIN, K. H., SUH, Y. G., KIM, D. & OH, U. (2000). Direct activation of capsaicin receptors by products of lipoxygenases: endogenous capsaicin-like substances. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 6155-6160.
- IBELGAUFTS, H. (1995). *Dictionary of cytokines*. VCH Verlag, Weinheim.
- IBUKI, T., MATSUMURA, K., YAMAZAKI, Y., NOZAKI, T., TANAKA, Y. & KOBAYASHI, S. (2003). Cyclooxygenase-2 is induced in the endothelial cells throughout the central nervous system during carrageenan-induced hind paw inflammation; its possible role in hyperalgesia. *J Neurochem* **86**, 318-328.
- IMAI-MATSUMURA, K., MATSUMURA, K., TERAO, A. & WATANABE, Y. (2002). Attenuated fever in pregnant rats is associated with blunted syntheses of brain cyclooxygenase-2 and PGE₂. *Am J Physiol* **283**, R1346-1353.
- INOHARA, N., OGURA, Y., CHEN, F. F., MUTO, A. & NUNEZ, G. (2001). Human Nod1 confers responsiveness to bacterial lipopolysaccharides. *J Biol Chem* **276**, 2551-2554.
- INOUE, W., MATSUMURA, K., YAMAGATA, K., TAKEMIYA, T., SHIRAKI, T. & KOBAYASHI, S. (2002). Brain-specific endothelial induction of prostaglandin E(2) synthesis enzymes and its temporal relation to fever. *Neurosci Res* **44**, 51-61.
- ISHIKAWA, H., CLAUDIO, E., DAMBACH, D., RAVENTOS-SUAREZ, C., RYAN, C. & BRAVO, R. (1998). Chronic inflammation and susceptibility to bacterial infections in mice lacking the polypeptide (p)105 precursor (NF-kappaB1) but expressing p50. *J Exp Med* **187**, 985-996.
- IUPS. (2001). IUPS Thermal Commission: Glossary of terms for thermal physiology. *The Jpn J Physiol* **51**, 245-280.
- IVANOV, A. I., PERO, R. S., SCHECK, A. C. & ROMANOVSKY, A. A. (2002). Prostaglandin E(2)-synthesizing enzymes in fever: differential transcriptional regulation. *Am J Physiol* **283**, R1104-1117.
- IVANOV, A. I. & ROMANOVSKY, A. A. (2004). Prostaglandin E2 as a mediator of fever: synthesis and catabolism. *Front Biosci* **9**, 1977-1993.
- IVANOV, A. I., SCHECK, A. C. & ROMANOVSKY, A. A. (2003). Expression of genes controlling transport and catabolism of prostaglandin E2 in lipopolysaccharide fever. *Am J Physiol* **284**, R698-706.
- JAKOBSSON, P. J., THOREN, S., MORGENSTERN, R. & SAMUELSSON, B. (1999). Identification of human prostaglandin E synthase: a microsomal, glutathione-dependent, inducible enzyme, constituting a potential novel drug target. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 7220-7225.

- JANSKY, L., VYBIRAL, S., POSPISILOVA, D., ROTH, J., DORNAND, J., ZEISBERGER, E. & KAMINKOVA, J. (1995). Production of systemic and hypothalamic cytokines during the early phase of endotoxin fever. *Neuroendocrinology* **62**, 55-61.
- JIANG, Q., CROSS, A. S., SINGH, I. S., CHEN, T. T., VISCARDI, R. M. & HASDAY, J. D. (2000). Febrile core temperature is essential for optimal host defense in bacterial peritonitis. *Infect Immun* **68**, 1265-1270.
- JIANG, Q., DETOLLA, L., SINGH, I. S., GATDULA, L., FITZGERALD, B., VAN ROOIJEN, N., CROSS, A. S. & HASDAY, J. D. (1999a). Exposure to febrile temperature upregulates expression of pyrogenic cytokines in endotoxin-challenged mice. *Am J Physiol* **276**, R1653-1660.
- JIANG, Q., DETOLLA, L., VAN ROOIJEN, N., SINGH, I. S., FITZGERALD, B., LIPSKY, M. M., KANE, A. S., CROSS, A. S. & HASDAY, J. D. (1999b). Febrile-range temperature modifies early systemic tumor necrosis factor alpha expression in mice challenged with bacterial endotoxin. *Infect Immun* **67**, 1539-1546.
- JOHNSON, J. D., O'CONNOR, K. A., DEAK, T., STARK, M., WATKINS, L. R. & MAIER, S. F. (2002). Prior stressor exposure sensitizes LPS-induced cytokine production. *Brain Behav Immun* **16**, 461-476.
- JOHNSON, J. D., O'CONNOR, K. A., HANSEN, M. K., WATKINS, L. R. & MAIER, S. F. (2003a). Effects of prior stress on LPS-induced cytokine and sickness responses. *Am J Physiol* **284**, R422-432.
- JOHNSON, M. D., KAMSO-PRATT, J. M., WHETSELL, W. O., JR. & PEPINSKY, R. B. (1989). Lipocortin-1 immunoreactivity in the normal human central nervous system and lesions with astrocytosis. *Am J Clin Pathol* **92**, 424-429.
- JOHNSON, R. W. (2002). The concept of sickness behavior: a brief chronological account of four key discoveries. *Vet Immunol Immunopathol* **87**, 443-450.
- JONES, S. A., HORIUCHI, S., TOPLEY, N., YAMAMOTO, N. & FULLER, G. M. (2001). The soluble interleukin 6 receptor: mechanisms of production and implications in disease. *FASEB J* **15**, 43-58.
- JURZAK, M., SCHMID, H.A., GERSTBERGER, R. (1994). NADPH-diaphorase staining and NO-synthase immunoreactivity in circumventricular organs of the rat brain. In *Integrative and cellular aspects of anatomic functions: temperature and osmoregulation*. ed. PLESCHKA, K., GERSTBERGER, R., pp. 451-459. John Libbey Eurotext, Paris.
- JUSTICIA, C., GABRIEL, C. & PLANAS, A. M. (2000). Activation of the JAK/STAT pathway following transient focal cerebral ischemia: signaling through Jak1 and Stat3 in astrocytes. *Glia* **30**, 253-270.
- KANAI, N., LU, R., SATRIANO, J. A., BAO, Y., WOLKOFF, A. W. & SCHUSTER, V. L. (1995). Identification and characterization of a prostaglandin transporter. *Science* **268**, 866-869.

- KANDIMALLA, E. R., ZHU, F. G., BHAGAT, L., YU, D. & AGRAWAL, S. (2003). Toll-like receptor 9: modulation of recognition and cytokine induction by novel synthetic CpG DNAs. *Biochem Soc Trans* **31**, 654-658.
- KANO, A., WOLFGANG, M. J., GAO, Q., JACOBY, J., CHAI, G. X., HANSEN, W., IWAMOTO, Y., POBER, J. S., FLAVELL, R. A. & FU, X. Y. (2003). Endothelial cells require STAT3 for protection against endotoxin-induced inflammation. *J Exp Med* **198**, 1517-1525.
- KARIN, M. & LIN, A. (2002). NF-kappaB at the crossroads of life and death. *Nat Immunol* **3**, 221-227.
- KARIN, M., YAMAMOTO, Y. & WANG, Q. M. (2004). The IKK NF-kappa B system: a treasure trove for drug development. *Nat Rev Drug Discov* **3**, 17-26.
- KARJALAINEN, J. & VIITASALO, M. (1986). Fever and cardiac rhythm. *Arch Intern Med* **146**, 1169-1171.
- KELLEY, K. W., BLUTHE, R. M., DANTZER, R., ZHOU, J. H., SHEN, W. H., JOHNSON, R. W. & BROUSSARD, S. R. (2003). Cytokine-induced sickness behavior. *Brain Behav Immun* **17 Suppl 1**, S112-118.
- KENT, S., BLUTHE, R. M., KELLEY, K. W. & DANTZER, R. (1992). Sickness behavior as a new target for drug development. *Trends Pharmacol Sci* **13**, 24-28.
- KIRSCHNING, C. J., UNBEHAUN, A., FIEDLER, G., HALLATSCHEK, W., LAMPING, N., PFEIL, D. & SCHUMANN, R. R. (1997). The transcriptional activation pattern of lipopolysaccharide binding protein (LBP) involving transcription factors AP-1 and C/EBP beta. *Immunobiology* **198**, 124-135.
- KISHIMOTO, T., AKIRA, S., NARAZAKI, M. & TAGA, T. (1995). Interleukin-6 family of cytokines and gp130. *Blood* **86**, 1243-1254.
- KISHIMOTO, T., TAGA, T. & AKIRA, S. (1994). Cytokine signal transduction. *Cell* **76**, 253-262.
- KISSELEVA, T., BHATTACHARYA, S., BRAUNSTEIN, J. & SCHINDLER, C. W. (2002). Signaling through the JAK/STAT pathway, recent advances and future challenges. *Gene* **285**, 1-24.
- KIYOHARA, T., MIYATA, S., NAKAMURA, T., SHIDO, O., NAKASHIMA, T. & SHIBATA, M. (1995). Differences in Fos expression in the rat brains between cold and warm ambient exposures. *Brain Res Bull* **38**, 193-201.
- KLEIN, N. C. & CUNHA, B. A. (1996). Treatment of fever. *Infect Dis Clin North Am* **10**, 211-216.
- KLUGER, M. J. (1991). Fever: role of pyrogens and cryogens. *Physiol. Rev.* **71**, 93-127.
- KLUGER, M. J., KOZAK, W., CONN, C. A., LEON, L. R. & SOSZYNSKI, D. (1998). Role of fever in disease. *Ann N Y Acad Sci* **856**, 224-233.

- KLUGER, M. J., RINGLER, D. H. & ANVER, M. R. (1975). Fever and survival. *Science* **188**, 166-168.
- KLUGER, M. J. & ROTHENBURG, B. A. (1979). Fever and reduced iron: their interaction as a host defense response to bacterial infection. *Science* **203**, 374-376.
- KLUGER, M. J. & VAUGHN, L. K. (1978). Fever and survival in rabbits infected with *Pasteurella multocida*. *J Physiol* **282**, 243-251.
- KOMAKI, G., ARIMURA, A. & KOVES, K. (1992). Effect of intravenous injection of IL-1 beta on PGE₂ levels in several brain areas as determined by microdialysis. *Am J Physiol* **262**, E246-251.
- KOMAROFF, A. L., FAGIOLI, L. R., DOOLITTLE, T. H., GANDEK, B., GLEIT, M. A., GUERRIERO, R. T., KORNISH, R. J., 2ND, WARE, N. C., WARE, J. E., JR. & BATES, D. W. (1996). Health status in patients with chronic fatigue syndrome and in general population and disease comparison groups. *Am J Med* **101**, 281-290.
- KONSMAN, J. P., KELLEY, K. & DANTZER, R. (1999). Temporal and spatial relationships between lipopolysaccharide-induced expression of Fos, interleukin-1beta and inducible nitric oxide synthase in rat brain. *Neuroscience* **89**, 535-548.
- KONSMAN, J. P., LUHESHI, G. N., BLUTHE, R. M. & DANTZER, R. (2000). The vagus nerve mediates behavioural depression, but not fever, in response to peripheral immune signals; a functional anatomical analysis. *Eur J Neurosci* **12**, 4434-4446.
- KONSMAN, J. P., PARNET, P. & DANTZER, R. (2002). Cytokine-induced sickness behaviour: mechanisms and implications. *Trends Neurosci* **25**, 154-159.
- KONSMAN, J. P., VIGUES, S., MACKERLOVA, L., BRISTOW, A. & BLOMQUIST, A. (2004). Rat brain vascular distribution of interleukin-1 type-1 receptor immunoreactivity: relationship to patterns of inducible cyclooxygenase expression by peripheral inflammatory stimuli. *J Comp Neurol* **472**, 113-129.
- KOPP, E. B. & MEDZHITOV, R. (1999). The Toll-receptor family and control of innate immunity. *Curr Opin Immunol* **11**, 13-18.
- KOSSMANN, T., HANS, V., IMHOF, H. G., TRENTZ, O. & MORGANTI-KOSSMANN, M. C. (1996). Interleukin-6 released in human cerebrospinal fluid following traumatic brain injury may trigger nerve growth factor production in astrocytes. *Brain Res* **713**, 143-152.
- KOSSMANN, T., HANS, V. H., IMHOF, H. G., STOCKER, R., GROB, P., TRENTZ, O. & MORGANTI-KOSSMANN, C. (1995). Intrathecal and serum interleukin-6 and the acute-phase response in patients with severe traumatic brain injuries. *Shock* **4**, 311-317.
- KOZAK, W., KLUGER, M. J., SOSZYNSKI, D., CONN, C. A., RUDOLPH, K., LEON, L. R. & ZHENG, H. (1998). IL-6 and IL-1 beta in fever. Studies using cytokine-deficient (knockout) mice. *Ann N Y Acad Sci* **856**, 33-47.

- KOZAK, W. & KOZAK, A. (2003). Genetic Models in Applied Physiology. Differential role of nitric oxide synthase isoforms in fever of different etiologies: studies using Nos gene-deficient mice. *J Appl Physiol* **94**, 2534-2544.
- KRISCH, B., LEONHARDT, H. & BUCHHEIM, W. (1978). The functional and structural border between the CSF- and blood-milieu in the circumventricular organs (organum vasculosum laminae terminalis, subfornical organ, area postrema) of the rat. *Cell Tissue Res* **195**, 485-497.
- KRISCH, B., LEONHARDT, H. & OKSCHE, A. (1987). Compartments in the organum vasculosum laminae terminalis of the rat and their delineation against the outer cerebrospinal fluid-containing space. *Cell Tissue Res* **250**, 331-347.
- KRUKOFF, T. L. (1999). Central actions of nitric oxide in regulation of autonomic functions. *Brain Res Brain Res Rev* **30**, 52-65.
- KUDO, I. & MURAKAMI, M. (2002). Phospholipase A2 enzymes. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* **68-69**, 3-58.
- KUO, P. C. & ABE, K. Y. (1995). Cytokine-mediated production of nitric oxide in isolated rat hepatocytes is dependent on cytochrome P-450III activity. *FEBS Lett* **360**, 10-14.
- KUROSAWA, S., KOBUNE, F., OKUYAMA, K. & SUGIURA, A. (1987). Effects of antipyretics in rinderpest virus infection in rabbits. *J Infect Dis* **155**, 991-997.
- KUSHNER, I. (1988). The acute phase response: an overview. *Methods Enzymol* **163**, 373-383.
- LACROIX, S., FEINSTEIN, D. & RIVEST, S. (1998). The bacterial endotoxin lipopolysaccharide has the ability to target the brain in upregulating its membrane CD14 receptor within specific cellular populations. *Brain Pathol* **8**, 625-640.
- LAFLAMME, N., ECHCHANNAOUI, H., LANDMANN, R. & RIVEST, S. (2003). Cooperation between toll-like receptor 2 and 4 in the brain of mice challenged with cell wall components derived from gram-negative and gram-positive bacteria. *Eur J Immunol* **33**, 1127-1138.
- LAFLAMME, N. & RIVEST, S. (1999). Effects of systemic immunogenic insults and circulating proinflammatory cytokines on the transcription of the inhibitory factor kappaB alpha within specific cellular populations of the rat brain. *J Neurochem* **73**, 309-321.
- LAFLAMME, N. & RIVEST, S. (2001). Toll-like receptor 4: the missing link of the cerebral innate immune response triggered by circulating gram-negative bacterial cell wall components. *FASEB J* **15**, 155-163.
- LAMBERT, P. D., ANDERSON, K. D., SLEEMAN, M. W., WONG, V., TAN, J., HIJARUNGURU, A., CORCORAN, T. L., MURRAY, J. D., THABET, K. E., YANCOPOULOS, G. D. & WIEGAND, S. J. (2001). Ciliary neurotrophic factor activates leptin-like pathways and reduces body fat, without cachexia or rebound weight gain, even in leptin-resistant obesity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 4652-4657.

- LANDAS, S., PHILLIPS, M.I. (1987). Comparative anatomy of the organum vasculosum of the lamina terminalis. In *Circumventricular Organs and Body Fluids.*, vol. I. ed. GROSS, P., pp. 131-156. CRC Press, Boca Raton, FL.
- LANG, R., PAULEAU, A. L., PARGANAS, E., TAKAHASHI, Y., MAGES, J., IHLE, J. N., RUTSCHMAN, R. & MURRAY, P. J. (2003). SOCS3 regulates the plasticity of gp130 signaling. *Nat Immunol* **4**, 546-550.
- LANSDORP, P. M., AARDEN, L. A., CALAFAT, J. & ZEILJEMAKER, W. P. (1986). A growth-factor dependent B-cell hybridoma. *Curr Top Microbiol Immunol* **132**, 105-113.
- LAWRENCE, T., GILROY, D. W., COLVILLE-NASH, P. R. & WILLOUGHBY, D. A. (2001). Possible new role for NF-kappaB in the resolution of inflammation. *Nat Med* **7**, 1291-1297.
- LAWRENCE, T., WILLOUGHBY, D. A. & GILROY, D. W. (2002). Anti-inflammatory lipid mediators and insights into the resolution of inflammation. *Nat Rev Immunol* **2**, 787-795.
- LAYÉ, S., BLUTHE, R. M., KENT, S., COMBE, C., MEDINA, C., PARNET, P., KELLEY, K. & DANTZER, R. (1995). Subdiaphragmatic vagotomy blocks induction of IL-1 beta mRNA in mice brain in response to peripheral LPS. *Am J Physiol* **268**, R1327-1331.
- LEBEL, É., VALLÈRES, 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**, 3749-3763.
- LEE, H. Y., WHITESIDE, M. B. & HERKENHAM, M. (1998). Area postrema removal abolishes stimulatory effects of intravenous interleukin-1beta on hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity and c-fos mRNA in the hypothalamic paraventricular nucleus. *Brain Res Bull* **46**, 495-503.
- LEE, J. J., HUANG, W. T., SHAO, D. Z., LIAO, J. F. & LIN, M. T. (2003). Blocking NF-kappaB activation may be an effective strategy in the fever therapy. *Jpn J Physiol* **53**, 367-375.
- LEMAY, L. G., VANDER, A. J. & KLUGER, M. J. (1990). Role of interleukin 6 in fever in rats. *Am J Physiol* **258**, R798-803.
- LENCZOWSKI, M. J., BLUTHE, R. M., ROTH, J., REES, G. S., RUSHFORTH, D. A., VAN DAM, A. M., TILDERS, F. J., DANTZER, R., ROTHWELL, N. J. & LUHESHI, G. N. (1999). Central administration of rat IL-6 induces HPA activation and fever but not sickness behavior in rats. *Am J Physiol* **276**, R652-658.
- LENCZOWSKI, M. J., SCHMIDT, E. D., VAN DAM, A. M., GAYKEMA, R. P. & TILDERS, F. J. (1998). Individual variation in hypothalamus-pituitary-adrenal responsiveness of rats to endotoxin and interleukin-1 beta. *Ann N Y Acad Sci* **856**, 139-147.
- LEON, L. R., WHITE, A. A. & KLUGER, M. J. (1998). Role of IL-6 and TNF in thermoregulation and survival during sepsis in mice. *Am J Physiol* **275**, R269-277.

- LEVY, B. D., CLISH, C. B., SCHMIDT, B., GRONERT, K. & SERHAN, C. N. (2001). Lipid mediator class switching during acute inflammation: signals in resolution. *Nat Immunol* **2**, 612-619.
- LI, S., BALLOU, L. R., MORHAM, S. G. & BLATTEIS, C. M. (2001). Cyclooxygenase-2 mediates the febrile response of mice to interleukin-1beta. *Brain Res* **910**, 163-173.
- LI, S., WANG, Y., MATSUMURA, K., BALLOU, L. R., MORHAM, S. G. & BLATTEIS, C. M. (1999). The febrile response to lipopolysaccharide is blocked in cyclooxygenase-2(-/-), but not in cyclooxygenase-1(-/-) mice. *Brain Res* **825**, 86-94.
- LICHTMAN, S. N., WANG, J., ZHANG, C. & LEMASTERS, J. J. (1996). Endocytosis and Ca²⁺ are required for endotoxin-stimulated TNF-alpha release by rat Kupffer cells. *Am J Physiol* **271**, G920-928.
- LICINIO, J., PROLO, P., MCCANN, S. M. & WONG, M. L. (1999). Brain iNOS: current understanding and clinical implications. *Mol Med Today* **5**, 225-232.
- LUST, J. A., DONOVAN, K. A., KLINE, M. P., GREIPP, P. R., KYLE, R. A. & MAIHLE, N. J. (1992). Isolation of an mRNA encoding a soluble form of the human interleukin-6 receptor. *Cytokine* **4**, 96-100.
- MACHIDA, H., LIMVIPHUVADH, OKAZAWA, M., SHIRAKI, K., MATSUMURA, K., KOBAYASHI, S. (2001). PGE₂ selectively activates peripheral cold-sensitive neurons. *Proc Austral Physiol Pharmacol Soc* **32**, 92.
- MACKOWIAK, P. A. (1998). Concepts of fever. *Arch Intern Med* **158**, 1870-1881.
- MACKOWIAK, P. A., BROWNE, R. H., SOUTHERN, P. M., JR. & SMITH, J. W. (1980). Polymicrobial sepsis: an analysis of 184 cases using log linear models. *Am J Med Sci* **280**, 73-80.
- MACKOWIAK, P. A., RUDERMAN, A. E., MARTIN, R. M., MANY, W. J., SMITH, J. W. & LUBY, J. P. (1981). Effects of physiologic variations in temperature on the rate of antibiotic-induced bacterial killing. *Am J Clin Pathol* **76**, 57-62.
- MAIER, J. A., HLA, T. & MACIAG, T. (1990). Cyclooxygenase is an immediate-early gene induced by interleukin-1 in human endothelial cells. *J Biol Chem* **265**, 10805-10808.
- MAIMONE, D., CIONI, C., ROSA, S., MACCHIA, G., ALOISI, F. & ANNUNZIATA, P. (1993). Norepinephrine and vasoactive intestinal peptide induce IL-6 secretion by astrocytes: synergism with IL-1 beta and TNF alpha. *J Neuroimmunol* **47**, 73-81.
- MAO, Y., LING, P. R., FITZGIBBONS, T. P., MCCOWEN, K. C., FRICK, G. P., BISTRAN, B. R. & SMITH, R. J. (1999). Endotoxin-induced inhibition of growth hormone receptor signaling in rat liver in vivo. *Endocrinology* **140**, 5505-5515.
- MARINE, J. C., MCKAY, C., WANG, D., TOPHAM, D. J., PARGANAS, E., NAKAJIMA, H., PENDEVILLE, H., YASUKAWA, H., SASAKI, A., YOSHIMURA, A. & IHLE, J. N. (1999). SOCS3 is essential in the regulation of fetal liver erythropoiesis. *Cell* **98**, 617-627.

- MARK, K. S., TRICKLER, W. J. & MILLER, D. W. (2001). Tumor necrosis factor-alpha induces cyclooxygenase-2 expression and prostaglandin release in brain microvessel endothelial cells. *J Pharmacol Exp Ther* **297**, 1051-1058.
- MARVEL, F. A., CHEN, C. C., BADR, N., GAYKEMA, R. P. & GOEHLER, L. E. (2004). Reversible inactivation of the dorsal vagal complex blocks lipopolysaccharide-induced social withdrawal and c-Fos expression in central autonomic nuclei. *Brain Behav Immun* **18**, 123-134.
- MATHISON, J. C., TOBIAS, P. S., WOLFSON, E. & ULEVITCH, R. J. (1992). Plasma lipopolysaccharide (LPS)-binding protein. A key component in macrophage recognition of gram-negative LPS. *J Immunol* **149**, 200-206.
- MATSUDA, T., HORI, T. & NAKASHIMA, T. (1992). Thermal and PGE₂ sensitivity of the organum vasculosum lamina terminalis region and preoptic area in rat brain slices. *J Physiol* **454**, 197-212.
- MATSUMURA, K., CAO, C., OZAKI, M., MORII, H., NAKADATE, K. & WATANABE, Y. (1998a). Brain endothelial cells express cyclooxygenase-2 during lipopolysaccharide-induced fever: light and electron microscopic immunocytochemical studies. *J Neurosci* **18**, 6279-6289.
- MATSUMURA, K., CAO, C. & WATANABE, Y. (1998b). Prostaglandin system in the brain: sites of biosynthesis and sites of action under normal and hyperthermic states. *Prog Brain Res* **115**, 275-295.
- MATSUMURA, K. & KOBAYASHI, S. (2004). Signaling the brain in inflammation: the role of endothelial cells. *Front Biosci* **9**, 2819-2826.
- MATSUMURA, K., OKAMURA, W., INOUE, K., YAMAGATA, K., KOBAYASHI, S. (2003). Induction of prostaglandin transporter (pig) in the brain endothelial cells and arachnoidal membrane of rat after systemic injection of pyrogen lipopolysaccharide (Abstract). vol. Abstract Viewer/Itinerary Planner., pp. Program 28.04.2003. Society for Neuroscience (2003), Washington, DC.
- MAY, L. T., GHAYEB, J., SANTHANAM, U., TATTER, S. B., STHOEGER, Z., HELFGOTT, D. C., CHIORAZZI, N., GRIENINGER, G. & SEHGAL, P. B. (1988). Synthesis and secretion of multiple forms of beta 2-interferon/B-cell differentiation factor 2/hepatocyte-stimulating factor by human fibroblasts and monocytes. *J Biol Chem* **263**, 7760-7766.
- MCBRIDE, K. M., BANNINGER, G., McDONALD, C. & REICH, N. C. (2002). Regulated nuclear import of the STAT1 transcription factor by direct binding of importin-alpha. *EMBO J* **21**, 1754-1763.
- MCCANN, S. M., KARANTH, S., KAMAT, A., LES DEES, W., LYSON, K., GIMENO, M. & RETTORI, V. (1994). Induction by cytokines of the pattern of pituitary hormone secretion in infection. *Neuroimmunomodulation* **1**, 2-13.

- MCCOWEN, K. C., CHOW, J. C. & SMITH, R. J. (1998). Leptin signaling in the hypothalamus of normal rats in vivo. *Endocrinology* **139**, 4442-4447.
- MCCURDY, J. D., LIN, T. J. & MARSHALL, J. S. (2001). Toll-like receptor 4-mediated activation of murine mast cells. *J Leukoc Biol* **70**, 977-984.
- MCKEMY, D. D., NEUHAUSSER, W. M. & JULIUS, D. (2002). Identification of a cold receptor reveals a general role for TRP channels in thermosensation. *Nature* **416**, 52-58.
- MEDZHITOV, R., PRESTON-HURLBURT, P. & JANEWAY, C. A., JR. (1997). A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* **388**, 394-397.
- MEYER, T., GAVENIS, K. & VINKEMEIER, U. (2002). Cell type-specific and tyrosine phosphorylation-independent nuclear presence of STAT1 and STAT3. *Exp Cell Res* **272**, 45-55.
- MILLER, A. J., HOPKINS, S. J. & LUHESHI, G. N. (1997a). Sites of action of IL-1 in the development of fever and cytokine responses to tissue inflammation in the rat. *Br J Pharmacol* **120**, 1274-1279.
- MILLER, A. J., LUHESHI, G. N., ROTHWELL, N. J. & HOPKINS, S. J. (1997b). Local cytokine induction by LPS in the rat air pouch and its relationship to the febrile response. *Am J Physiol* **272**, R857-861.
- MILTON, A. S. (1998). Prostaglandins and fever. *Prog Brain Res* **115**, 129-139.
- MILTON, A. S. & WENDLANDT, S. (1971). Effects on body temperature of prostaglandins of the A, E and F series on injection into the third ventricle of unanaesthetized cats and rabbits. *J Physiol* **218**, 325-336.
- MINANO, F. J., ARMENGOL, J. A., SANCIBRIAN, M., POMARES, F., BENAMAR, K. & MYERS, R. D. (1997). Macrophage inflammatory protein-1 beta and inducible nitric oxide synthase immunoreactivity in rat brain during prostaglandin E2- or lipopolysaccharide-induced fever. *Ann N Y Acad Sci* **813**, 272-280.
- MIRE-SLUIJS, A. R., GAINES-DAS, R. & THORPE, R. (1995). Immunoassays for detecting cytokines: what are they really measuring? *J Immunol Methods* **186**, 157-160.
- MITCHELL, D., LABURN, H. P., COOPER, K. E., HELLON, R. F., CRANSTON, W. I. & TOWNSEND, Y. (1986). Is prostaglandin E the neural mediator of the febrile response? The case against a proven obligatory role. *Yale J Biol Med* **59**, 159-168.
- MIYAMOTO, S. & VERMA, I. M. (1995). Rel/NF-kappa B/I kappa B story. *Adv Cancer Res* **66**, 255-292.
- MIYATA, S., NAKASHIMA, T. & KIYOHARA, T. (1994). Expression of c-fos immunoreactivity in the hypothalamic magnocellular neurons during chronic osmotic stimulations. *Neurosci Lett* **175**, 63-66.

- MOGI, M., HARADA, M., KONDO, T., RIEDERER, P., INAGAKI, H., MINAMI, M. & NAGATSU, T. (1994). Interleukin-1 beta, interleukin-6, epidermal growth factor and transforming growth factor-alpha are elevated in the brain from parkinsonian patients. *Neurosci Lett* **180**, 147-150.
- MONCADA, S. & HIGGS, A. (1993). The L-arginine-nitric oxide pathway. *N Engl J Med* **329**, 2002-2012.
- MONCADA, S., PALMER, R. M. & HIGGS, E. A. (1991). Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev* **43**, 109-142.
- MORIMOTO, A., MURAKAMI, N. & WATANABE, T. (1988). Effect of prostaglandin E2 on thermoresponsive neurones in the preoptic and ventromedial hypothalamic regions of rats. *J Physiol* **405**, 713-725.
- MOSMANN, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* **65**, 55-63.
- MOUIHATE, A. & PITTMAN, Q. J. (2003). Neuroimmune response to endogenous and exogenous pyrogens is differently modulated by sex steroids. *Endocrinology* **144**, 2454-2460.
- MPHAHLELE, N. R., FULLER, A., ROTH, J. & KAMERMAN, P. R. (2004). Body temperature, behavior, and plasma cortisol changes induced by chronic infusion of *Staphylococcus aureus* in goats. *Am J Physiol* **287**, R863-869.
- MÜHLRADT, P. F. & FRISCH, M. (1994). Purification and partial biochemical characterization of a *Mycoplasma fermentans*-derived substance that activates macrophages to release nitric oxide, tumor necrosis factor, and interleukin-6. *Infect Immun* **62**, 3801-3807.
- MÜLLBERG, J., SCHOOLTINK, H., STOYAN, T., GUNTHER, M., GRAEVE, L., BUSE, G., MACKIEWICZ, A., HEINRICH, P. C. & ROSE-JOHN, S. (1993). The soluble interleukin-6 receptor is generated by shedding. *Eur J Immunol* **23**, 473-480.
- MÜLLER-NEWEN, G., KOHNE, C., KEUL, R., HEMMANN, U., MULLER-ESTERL, W., WIJDENES, J., BRAKENHOFF, J. P., HART, M. H. & HEINRICH, P. C. (1996). Purification and characterization of the soluble interleukin-6 receptor from human plasma and identification of an isoform generated through alternative splicing. *Eur J Biochem* **236**, 837-842.
- MÜLLER-NEWEN, G., KUSTER, A., HEMMANN, U., KEUL, R., HORSTEN, U., MARTENS, A., GRAEVE, L., WIJDENES, J. & HEINRICH, P. C. (1998). Soluble IL-6 receptor potentiates the antagonistic activity of soluble gp130 on IL-6 responses. *J Immunol* **161**, 6347-6355.
- MURAKAMI, M., KAMBE-OHKURA, T. & KUDO, I. (2002a). Functional coupling between phospholipase A2S and cyclooxygenases in immediate and delayed prostanoid biosynthetic pathways. *Adv Exp Med Biol* **507**, 15-19.

- MURAKAMI, M. & KUDO, I. (2004). Recent advances in molecular biology and physiology of the prostaglandin E2-biosynthetic pathway. *Prog Lipid Res* **43**, 3-35.
- MURAKAMI, M., NAKATANI, Y., ATSUMI, G., INOUE, K. & KUDO, I. (1997). Regulatory functions of phospholipase A2. *Crit Rev Immunol* **17**, 225-283.
- MURAKAMI, M., NAKATANI, Y., TANIOKA, T. & KUDO, I. (2002b). Prostaglandin E synthase. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* **68-69**, 383-399.
- MURAKAMI, M., NARABA, H., TANIOKA, T., SEMMYO, N., NAKATANI, Y., KOJIMA, F., IKEDA, T., FUEKI, M., UENO, A., OH, S. & KUDO, I. (2000). Regulation of prostaglandin E2 biosynthesis by inducible membrane-associated prostaglandin E2 synthase that acts in concert with cyclooxygenase-2. *J Biol Chem* **275**, 32783-32792.
- MURRAY, M. J. & MURRAY, A. B. (1979). Anorexia of infection as a mechanism of host defense. *Am J Clin Nutr* **32**, 593-596.
- MUZIO, M., BOSISIO, D., POLENTARUTTI, N., D'AMICO, G., STOPPACCIARO, A., MANCINELLI, R., VAN'T VEER, C., PENTON-ROL, G., RUCO, L. P., ALLAVENA, P. & MANTOVANI, A. (2000). Differential expression and regulation of toll-like receptors (TLR) in human leukocytes: selective expression of TLR3 in dendritic cells. *J Immunol* **164**, 5998-6004.
- NADJAR, A., COMBE, C., LAYE, S., TRIDON, V., DANTZER, R., AMEED, T. & PARNET, P. (2003). Nuclear factor κ B nuclear translocation as a crucial marker of brain response to interleukin-1. A study in rat and interleukin-1 type I deficient mouse. *J Neurochem* **87**, 1024-1036.
- NAGASHIMA, K., NAKAI, S., TANAKA, M. & KANOSUE, K. (2000). Neuronal circuitries involved in thermoregulation. *Auton Neurosci* **85**, 18-25.
- 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**, 924-929.
- NAKAGAWA, R., NAKA, T., TSUTSUI, H., FUJIMOTO, M., KIMURA, A., ABE, T., SEKI, E., SATO, S., TAKEUCHI, O., TAKEDA, K., AKIRA, S., YAMANISHI, K., KAWASE, I., NAKANISHI, K. & KISHIMOTO, T. (2002). SOCS-1 participates in negative regulation of LPS responses. *Immunity* **17**, 677-687.
- NAKAMURA, K. (2004). Fever-inducing sympathetic neural pathways. *J Therm Biol* **29**, 339-344.
- NAKAMURA, K., KANEKO, T., YAMASHITA, Y., HASEGAWA, H., KATOH, H., ICHIKAWA, A. & NEGISHI, M. (1999). Immunocytochemical localization of prostaglandin EP3 receptor in the rat hypothalamus. *Neurosci Lett* **260**, 117-120.

- NAKAMURA, K., MATSUMURA, K., KANEKO, T., KOBAYASHI, S., KATOH, H. & NEGISHI, M. (2002). The rostral raphe pallidus nucleus mediates pyrogenic transmission from the preoptic area. *J Neurosci* **22**, 4600-4610.
- NAKANO, J., PRANCAN, A. V. & MOORE, S. E. (1972). Metabolism of prostaglandin E 1 in the cerebral cortex and cerebellum of the dog and rat. *Brain Res* **39**, 545-548.
- NAKASHIMA, T., HORI, T., MORI, T., KURIYAMA, K. & MIZUNO, K. (1989). Recombinant human interleukin-1 beta alters the activity of preoptic thermosensitive neurons in vitro. *Brain Res Bull* **23**, 209-213.
- NAKASHIMA, T., KIYOHARA, T. & HORI, T. (1991). Tumor necrosis factor-beta specifically inhibits the activity of preoptic warm-sensitive neurons in tissue slices. *Neurosci Lett* **128**, 97-100.
- NARABA, H., MURAKAMI, M., MATSUMOTO, H., SHIMBARA, S., UENO, A., KUDO, I. & OHISHI, S. (1998). Segregated coupling of phospholipases A2, cyclooxygenases, and terminal prostanoid synthases in different phases of prostanoid biosynthesis in rat peritoneal macrophages. *J Immunol* **160**, 2974-2982.
- NEDERGAARD, J., GOLOZOUBOVA, V., MATTHIAS, A., ASADI, A., JACOBSSON, A. & CANNON, B. (2001). UCP1: the only protein able to mediate adaptive non-shivering thermogenesis and metabolic inefficiency. *Biochim Biophys Acta* **1504**, 82-106.
- NESBITT, J. E. & FULLER, G. M. (1992). Dynamics of interleukin-6 internalization and degradation in rat hepatocytes. *J Biol Chem* **267**, 5739-5742.
- NETEA, M. G., KULLBERG, B. J. & VAN DER MEER, J. W. (1999). Do only circulating pyrogenic cytokines act as mediators in the febrile response? A hypothesis. *Eur J Clin Invest* **29**, 351-356.
- NETEA, M. G., KULLBERG, B. J. & VAN DER MEER, J. W. (2000). Circulating cytokines as mediators of fever. *Clin Infect Dis* **31 Suppl 5**, S178-184.
- NEUMANN, H. & WEKERLE, H. (1998). Neuronal control of the immune response in the central nervous system: linking brain immunity to neurodegeneration. *J Neuropathol Exp Neurol* **57**, 1-9.
- NICHOLSON, S. E., DE SOUZA, D., FABRI, L. J., CORBIN, J., WILLSON, T. A., ZHANG, J. G., SILVA, A., ASIMAKIS, M., 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 U S A* **97**, 6493-6498.
- NIEMAND, C., NIMMESGERN, A., HAAN, S., FISCHER, P., SCHAPER, F., ROSSAINT, R., HEINRICH, P. C. & MULLER-NEWEN, G. (2003). Activation of STAT3 by IL-6 and IL-10 in primary human macrophages is differentially modulated by suppressor of cytokine signaling 3. *J Immunol* **170**, 3263-3272.

- NIJIMA, A. (1996). The afferent discharges from sensors for interleukin 1 beta in the hepatoportal system in the anesthetized rat. *J Auton Nerv Syst* **61**, 287-291.
- 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. *Neuroendocrinology* **66**, 47-53.
- NIJSTEN, M. W., DE GROOT, E. R., TEN DUIS, H. J., KLASSEN, H. J., HACK, C. E. & AARDEN, L. A. (1987). Serum levels of interleukin-6 and acute phase responses. *Lancet* **2**, 921.
- NISHIO, T., ADACHI, H., NAKAGOMI, R., TOKUI, T., SATO, E., TANEMOTO, M., FUJIWARA, K., OKABE, M., ONOGAWA, T., SUZUKI, T., NAKAI, D., SHIIBA, K., SUZUKI, M., OHTANI, H., KONDO, Y., UNNO, M., ITO, S., IINUMA, K., NUNOKI, K., MATSUNO, S. & ABE, T. (2000). Molecular identification of a rat novel organic anion transporter moat1, which transports prostaglandin D(2), leukotriene C(4), and taurocholate. *Biochem Biophys Res Commun* **275**, 831-838.
- O'BANION, M. K. (1999). Cyclooxygenase-2: molecular biology, pharmacology, and neurobiology. *Crit Rev Neurobiol* **13**, 45-82.
- O'BRIEN, C. A. & MANOLAGAS, S. C. (1997). Isolation and characterization of the human gp130 promoter. Regulation by STATS. *J Biol Chem* **272**, 15003-15010.
- OKA, T. (2001). Functional roles of hypothalamic PGE₂ and its receptors in brain-immune system interactions. *Adv Neurol Sci* **45**, 901-908.
- OKA, T. (2004). Prostaglandin E2 as a mediator of fever: the role of prostaglandin e (ep) receptors. *Front Biosci* **9**, 3046-3057.
- OKA, T., OKA, K., KOBAYASHI, T., SUGIMOTO, Y., ICHIKAWA, A., USHIKUBI, F., NARUMIYA, S. & SAPER, C. B. (2003). Characteristics of thermoregulatory and febrile responses in mice deficient in prostaglandin EP1 and EP3 receptors. *J Physiol* **551**, 945-954.
- OKA, T., OKA, K., SCAMMELL, T. E., LEE, C., KELLY, J. F., NANTEL, F., ELMQUIST, J. K. & SAPER, C. B. (2000). Relationship of EP(1-4) prostaglandin receptors with rat hypothalamic cell groups involved in lipopolysaccharide fever responses. *J Comp Neurol* **428**, 20-32.
- OKABE, S., TAUCHI, T., MORITA, H., OHASHI, H., YOSHIMURA, A. & OHYASHIKI, K. (1999). Thrombopoietin induces an SH2-containing protein, CIS1, which binds to Mpl: involvement of the ubiquitin proteasome pathway. *Exp Hematol* **27**, 1542-1547.
- OKAZAWA, M., TAKAO, K., HORI, A., SHIRAKI, T., MATSUMURA, K. & KOBAYASHI, S. (2002). Ionic basis of cold receptors acting as thermostats. *J Neurosci* **22**, 3994-4001.
- OLDFIELD, B. J., BADOER, E., HARDS, D. K. & MCKINLEY, M. J. (1994). Fos production in retrogradely labelled neurons of the lamina terminalis following intravenous infusion of either hypertonic saline or angiotensin II. *Neuroscience* **60**, 255-262.

- OLDFIELD, B. J., MCKINLEY, M.J. (1995). Circumventricular Organs. In *The Rat Nervous System, second edition*. ed. PAXINOS, G., pp. 391-403. Academic Press.
- OPAL, S. M. & DEPALO, V. A. (2000). Anti-inflammatory cytokines. *Chest* **117**, 1162-1172.
- OPREE, A. & KRESS, M. (2000). Involvement of the proinflammatory cytokines tumor necrosis factor-alpha, IL-1 beta, and IL-6 but not IL-8 in the development of heat hyperalgesia: effects on heat-evoked calcitonin gene-related peptide release from rat skin. *J Neurosci* **20**, 6289-6293.
- PAN, W., BANKS, W. A. & KASTIN, A. J. (1997). Permeability of the blood-brain and blood-spinal cord barriers to interferons. *J Neuroimmunol* **76**, 105-111.
- PAN, W. & KASTIN, A. J. (2001). Changing the chemokine gradient: CINC1 crosses the blood-brain barrier. *J Neuroimmunol* **115**, 64-70.
- PAN, W. & KASTIN, A. J. (2002). TNFalpha transport across the blood-brain barrier is abolished in receptor knockout mice. *Exp Neurol* **174**, 193-200.
- PAN, W., KASTIN, A. J. & BRENNAN, J. M. (2000). Saturable entry of leukemia inhibitory factor from blood to the central nervous system. *J Neuroimmunol* **106**, 172-180.
- PARFENOVA, H., PARFENOV, V. N., SHLOPOV, B. V., LEVINE, V., FALKOS, S., POURCYROUS, M. & LEFFLER, C. W. (2001). Dynamics of nuclear localization sites for COX-2 in vascular endothelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol* **281**, C166-178.
- PARROTT, R. F., VELLUCCI, S. V. & LLOYD, D. M. (1998). Effects of intravenous nitric oxide inhibitors on endotoxin-induced fever in prepubertal pigs. *Gen Pharmacol* **31**, 371-376.
- PATAPOUTIAN, A., PEIER, A. M., STORY, G. M. & VISWANATH, V. (2003). ThermoTRP channels and beyond: mechanisms of temperature sensation. *Nat Rev Neurosci* **4**, 529-539.
- PATRONAS, P., HOROWITZ, M., SIMON, E. & GERSTBERGER, R. (1998). Differential stimulation of c-fos expression in hypothalamic nuclei of the rat brain during short-term heat acclimation and mild dehydration. *Brain Res* **798**, 127-139.
- PAUL, W. E. (1989). Pleiotropy and redundancy: T cell-derived lymphokines in the immune response. *Cell* **57**, 521-524.
- PAXINOS, G., WATSON, C. (1998). *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates, 4th edn*. Academic Press, San Diego.
- PEIER, A. M., MOQRICH, A., HERGARDEN, A. C., REEVE, A. J., ANDERSSON, D. A., STORY, G. M., EARLEY, T. J., DRAGONI, I., MCINTYRE, P., BEVAN, S. & PATAPOUTIAN, A. (2002). A TRP channel that senses cold stimuli and menthol. *Cell* **108**, 705-715.
- PERERA, P. Y., MAYADAS, T. N., TAKEUCHI, O., AKIRA, S., ZAKS-ZILBERMAN, M., GOYERT, S. M. & VOGEL, S. N. (2001). CD11b/CD18 acts in concert with CD14 and Toll-like

- receptor (TLR) 4 to elicit full lipopolysaccharide and taxol-inducible gene expression. *J Immunol* **166**, 574-581.
- PIPER, P. J., VANE, J. R. & WYLLIE, J. H. (1970). Inactivation of prostaglandins by the lungs. *Nature* **225**, 600-604.
- POLLMÄCHER, T., HAACK, M., SCHULD, A., REICHENBERG, A. & YIRMIYA, R. (2002). Low levels of circulating inflammatory cytokines--do they affect human brain functions? *Brain Behav Immun* **16**, 525-532.
- POLTORAK, A., HE, X., SMIRNOVA, I., LIU, M. Y., VAN HUFFEL, C., DU, X., BIRDWELL, D., ALEJOS, E., SILVA, M., GALANOS, C., FREUDENBERG, M., RICCIARDI-CASTAGNOLI, P., LAYTON, B. & BEUTLER, B. (1998). Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science* **282**, 2085-2088.
- PRAT, A., BIERNACKI, K., WOSIK, K. & ANTEL, J. P. (2001). Glial cell influence on the human blood-brain barrier. *Glia* **36**, 145-155.
- QUAN, N., HE, L., LAI, W., SHEN, T. & HERKENHAM, M. (2000). Induction of IkappaBalpha mRNA expression in the brain by glucocorticoids: a negative feedback mechanism for immune-to-brain signaling. *J Neurosci* **20**, 6473-6477.
- QUAN, N., WHITESIDE, M., KIM, L. & HERKENHAM, M. (1997). Induction of inhibitory factor $\kappa B\alpha$ mRNA in the central nervous system after peripheral lipopolysaccharide administration: an in situ hybridization histochemistry study in the rat. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 10985-10990.
- RANELS, H. J. & GRIFFIN, J. D. (2003). The effects of prostaglandin E2 on the firing rate activity of thermosensitive and temperature insensitive neurons in the ventromedial preoptic area of the rat hypothalamus. *Brain Res* **964**, 42-50.
- RAY, D. W., REN, S. G. & MELMED, S. (1996). Leukemia inhibitory factor (LIF) stimulates proopiomelanocortin (POMC) expression in a corticotroph cell line. Role of STAT pathway. *J Clin Invest* **97**, 1852-1859.
- REID, G. & FLONTA, M. (2001a). Cold transduction by inhibition of a background potassium conductance in rat primary sensory neurones. *Neurosci Lett* **297**, 171-174.
- REID, G. & FLONTA, M. L. (2001b). Physiology. Cold current in thermoreceptive neurons. *Nature* **413**, 480.
- REIMERS, J. I., BJERRE, U., MANDRUP-POULSEN, T. & NERUP, J. (1994). Interleukin 1 beta induces diabetes and fever in normal rats by nitric oxide via induction of different nitric oxide synthases. *Cytokine* **6**, 512-520.
- RETTORI, V., GIMENO, M., LYSON, K. & MCCANN, S. M. (1992). Nitric oxide mediates norepinephrine-induced prostaglandin E2 release from the hypothalamus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 11543-11546.

- RICOTE, M., LI, A. C., WILLSON, T. M., KELLY, C. J. & GLASS, C. K. (1998). The peroxisome proliferator-activated receptor-gamma is a negative regulator of macrophage activation. *Nature* **391**, 79-82.
- RIETSCHEL, E. T., KIRIKAE, T., SCHADE, F. U., MAMAT, U., SCHMIDT, G., LOPPNOW, H., ULMER, A. J., ZHRINGER, U., SEYDEL, U. & DI PADOVA, F. (1994). Bacterial endotoxin: molecular relationships of structure to activity and function. *FASEB J* **8**, 217-225.
- RINAMAN, L. & SCHWARTZ, G. (2004). Anterograde transneuronal viral tracing of central viscerosensory pathways in rats. *J Neurosci* **24**, 2782-2786.
- RITTER, S., RITTER, R.C., BARNES, C.D. (1992). Neuroanatomy & Physiology of Abdominal Vagal Afferents. *CRC. Ann Arbor*.
- RIVEST, S. (1999). What is the cellular source of prostaglandins in the brain in response to systemic inflammation? Facts and controversies. *Mol Psychiatry* **4**, 500-507.
- RIVEST, S. (2003). Molecular insights on the cerebral innate immune system. *Brain Behav Immun* **17**, 13-19.
- RIVEST, S., LACROIX, S., VALLIERES, L., NADEAU, S., ZHANG, J. & LAFLAMME, N. (2000). How the blood talks to the brain parenchyma and the paraventricular nucleus of the hypothalamus during systemic inflammatory and infectious stimuli. *Proc Soc Exp Biol Med* **223**, 22-38.
- ROBERTS, A. W., ROBB, L., RAKAR, S., HARTLEY, L., CLUSE, L., NICOLA, N. A., METCALF, D., HILTON, D. J. & ALEXANDER, W. S. (2001). Placental defects and embryonic lethality in mice lacking suppressor of cytokine signaling 3. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 9324-9329.
- ROCK, F. L., HARDIMAN, G., TIMANS, J. C., KASTELEIN, R. A. & BAZAN, J. F. (1998). A family of human receptors structurally related to Drosophila Toll. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 588-593.
- ROIVAINEN, R. & KOISTINAHO, J. (1990). Decentralization induces long-term c-fos protein-like immunoreactivity in non-neuronal cells in the rat superior cervical ganglion. *Neurosci Lett* **119**, 105-108.
- ROMANO, M., SIRONI, M., TONIATTI, C., POLENTARUTTI, N., FRUSCELLA, P., GHEZZI, P., FAGGIONI, R., LUINI, W., VAN HINSBERGH, V., SOZZANI, S., BUSSOLINO, F., POLI, V., CILIBERTO, G. & MANTOVANI, A. (1997). Role of IL-6 and its soluble receptor in induction of chemokines and leukocyte recruitment. *Immunity* **6**, 315-325.
- ROMANOVSKY, A. A. (2004a). Anorexia: the toll for lipopolysaccharide recognition. *Am J Physiol* **287**, R274-275.
- ROMANOVSKY, A. A. (2004b). Signaling the brain in the early sickness syndrome: are sensory nerves involved? *Front Biosci* **9**, 494-504.

- ROMANOVSKY, A. A., IVANOV, A. I. & KARMAN, E. K. (1999). Blood-borne, albumin-bound prostaglandin E2 may be involved in fever. *Am J Physiol* **276**, R1840-1844.
- ROMANOVSKY, A. A., IVANOV, A. I. & SHIMANSKY, Y. P. (2002). Selected contribution: ambient temperature for experiments in rats: a new method for determining the zone of thermal neutrality. *J Appl Physiol* **92**, 2667-2679.
- ROMANOVSKY, A. A., SIMONS, C. T., SZEKELY, M. & KULCHITSKY, V. A. (1997). The vagus nerve in the thermoregulatory response to systemic inflammation. *Am J Physiol* **273**, R407-413.
- ROMANOVSKY, A. A., SUGIMOTO, N., SIMONS, C. T. & HUNTER, W. S. (2003). The organum vasculosum laminae terminalis in immune-to-brain febrigenic signaling: a reappraisal of lesion experiments. *Am J Physiol* **285**, R420-428.
- ROSS, G., HÜBSCHLE, T., PEHL, U., BRAUN, H. A., VOIGT, K., GERSTBERGER, R. & ROTH, J. (2003). Fever induction by localized subcutaneous inflammation in guinea pigs: the role of cytokines and prostaglandins. *J Appl Physiol* **94**, 1395-1402.
- ROSS, G., HÜBSCHLE, T., BICKENBACH, A., ZEISBERGER, E., GERSTBERGER, R., ROTH, J. (2001). Febrile and cortisol responses induced in guinea pigs by localized peripheral inflammatory stimulation. *J Therm Biol* **26**, 319-324.
- ROSS, G., ROTH, J., STORR, B., VOIGT, K. & ZEISBERGER, E. (2000). Afferent nerves are involved in the febrile response to injection of LPS into artificial subcutaneous chambers in guinea pigs. *Physiol Behav* **71**, 305-313.
- ROTH, J. (1989). Hormonelle und neuroendokrine Beeinflussung der Temperaturregulation und des Wasserhaushalts im Verlauf der thermischen Adaptation des Meerschweinchens. In *Dissertation Fachbereich Biologie*, pp. 114. Justus-Liebig-Universität, Giessen.
- ROTH, J. (2002). Fieber bei Akuterkrankungen: vorteilhaft oder maladaptiv? *Wien Klin Wochenschr* **114**, 82-88.
- ROTH, J. (2003). Energie- und Wärmehaushalt, Temperaturregulation. In *Lehrbuch der Vorklinik Teil C*, pp. 419-435. Deutscher Ärzte-Verlag, Köln.
- ROTH, J., ASLAN, T., STORR, B. & ZEISBERGER, E. (1997a). Lack of cross tolerance between LPS and muramyl dipeptide in induction of circulating TNF-alpha and IL-6 in guinea pigs. *Am J Physiol* **273**, R1529-1533.
- ROTH, J., CONN, C. A., KLUGER, M. J. & ZEISBERGER, E. (1993). Kinetics of systemic and intrahypothalamic IL-6 and tumor necrosis factor during endotoxin fever in guinea pigs. *Am J Physiol* **265**, R653-658.
- ROTH, J. & DE SOUZA, G. E. (2001). Fever induction pathways: evidence from responses to systemic or local cytokine formation. *Braz J Med Biol Res* **34**, 301-314.

- ROTH, J., HARRÉ, E. M., RUMMEL, C., GERSTBERGER, R. & HÜBSCHLE, T. (2004). Signaling the brain in systemic inflammation: role of sensory circumventricular organs. *Front Biosci* **9**, 290-300.
- ROTH, J., HOPKINS, S. J., HOADLEY, M. E., TRIPP, A., ASLAN, T., STORR, B., LUHESHI, G. N. & ZEISBERGER, E. (1997b). Fever and production of cytokines in response to repeated injections of muramyl dipeptide in guinea-pigs. *Pflügers Arch - Eur J Physiol* **434**, 525-533.
- ROTH, J., HÜBSCHLE, T., PEHL, U., ROSS, G. & GERSTBERGER, R. (2002). Influence of systemic treatment with cyclooxygenase inhibitors on lipopolysaccharide-induced fever and circulating levels of cytokines and cortisol in guinea-pigs. *Pflügers Arch - Eur J Physiol* **443**, 411-417.
- ROTH, J., MARTIN, D., STORR, B. & ZEISBERGER, E. (1998a). Neutralization of pyrogen-induced tumour necrosis factor by its type 1 soluble receptor in guinea-pigs: effects on fever and interleukin-6 release. *J Physiol* **509 (Pt 1)**, 267-275.
- ROTH, J., MCCLELLAN, J., KLUGER, M. & ZEISBERGER, E. (1994). Attenuation of fever and release of cytokines after repeated injections of lipopolysaccharide in guinea-pigs. *J Physiol (Lond)* **477**, 177-185.
- ROTH, J., RUMMEL, C., HARRÉ, E. M., VOSS, T., MÜTZE, J., GERSTBERGER, R., HÜBSCHLE, T. (2004). Is interleukin-6 the necessary pyrogenic cytokine? *J Therm Biol* **29**, 383-389.
- ROTH, J., STORR, B., GOLDBACH, J., VOIGT, K. & ZEISBERGER, E. (1999). Dose-dependent attenuation of lipopolysaccharide-fever by inhibitors of inducible nitric oxide-synthase in guinea pigs. *Eur J Pharmacol* **383**, 177-187.
- ROTH, J., STORR, B., MARTIN, D., VOIGT, K. & ZEISBERGER, E. (2000). The role of local induction of tumor necrosis factor by LPS within a subcutaneous air pouch in the development of a febrile response in guinea pigs. *Neuroimmunomodulation* **7**, 169-176.
- ROTH, J., STORR, B., VOIGT, K. & ZEISBERGER, E. (1998b). Inhibition of nitric oxide synthase attenuates lipopolysaccharide-induced fever without reduction of circulating cytokines in guinea-pigs. *Pflügers Arch - Eur J Physiol* **436**, 858-862.
- ROTH, J., STORR, B., VOIGT, K. & ZEISBERGER, E. (1998c). Inhibition of nitric oxide synthase results in a suppression of interleukin-1beta-induced fever in rats. *Life Sci* **62**, PL 345-350.
- ROTH, J. & ZEISBERGER, E. (1995). Endotoxin tolerance alters thermal response of guinea pigs to systemic infusions of tumor necrosis factor-alpha. *Am J Physiol* **268**, R514-519.
- ROTHWELL, N. J., BUSBRIDGE, N. J., LEFEUVRE, 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**, 1465-1469.

- ROTONDO, D., ABUL, H. T., MILTON, A. S. & DAVIDSON, J. (1988). Pyrogenic immunomodulators increase the level of prostaglandin E2 in the blood simultaneously with the onset of fever. *Eur J Pharmacol* **154**, 145-152.
- RUMMEL, C., HÜBSCHLE, T., GERSTBERGER, R. & ROTH, J. (2004). Nuclear translocation of the transcription factor STAT3 in the guinea pig brain during systemic or localised inflammation. *J Physiol* **557**, 671-687.
- SAGAR, S. M., PRICE, K. J., KASTING, N. W. & SHARP, F. R. (1995). Anatomic patterns of Fos immunostaining in rat brain following systemic endotoxin administration. *Brain Res Bull* **36**, 381-392.
- SAGAR, S. M., SHARP, F. R. & CURRAN, T. (1988). Expression of c-fos protein in brain: metabolic mapping at the cellular level. *Science* **240**, 1328-1331.
- SAKATA, Y., MORIMOTO, A., LONG, N. C. & MURAKAMI, N. (1991). Fever and acute-phase response induced in rabbits by intravenous and intracerebroventricular injection of interleukin-6. *Cytokine* **3**, 199-203.
- SAMAD, T. A., MOORE, K. A., SAPIRSTEIN, A., BILLET, S., ALLCHORNE, A., POOLE, S., BONVENTRE, J. V. & WOOLF, C. J. (2001). Interleukin-1beta-mediated induction of Cox-2 in the CNS contributes to inflammatory pain hypersensitivity. *Nature* **410**, 471-475.
- SAMUELSSON, B. (1964). Prostaglandins and Related Factors. 27. Synthesis of Tritium-Labeled Prostaglandin E1 and Studies on Its Distribution and Excretion in the Rat. *J Biol Chem* **239**, 4091-4096.
- SAPER, C. B. (1998). Neurobiological basis of fever. *Ann N Y Acad Sci* **856**, 90-94.
- SASAKI, A., INAGAKI-OHARA, K., YOSHIDA, T., YAMANAKA, A., SASAKI, M., YASUKAWA, H., KOROMILAS, A. E. & YOSHIMURA, A. (2003). The N-terminal truncated isoform of SOCS3 translated from an alternative initiation AUG codon under stress conditions is stable due to the lack of a major ubiquitination site, Lys-6. *J Biol Chem* **278**, 2432-2436.
- SCAMMELL, T. E., ELMQUIST, J. K., GRIFFIN, J. D. & SAPER, C. B. (1996a). Ventromedial preoptic prostaglandin E2 activates fever-producing autonomic pathways. *J Neurosci* **16**, 6246-6254.
- SCAMMELL, T. E., ELMQUIST, J. K. & SAPER, C. B. (1996b). Inhibition of nitric oxide synthase produces hypothermia and depresses lipopolysaccharide fever. *Am J Physiol* **271**, R333-338.
- SCAMMELL, T. E., PRICE, K. J. & SAGAR, S. M. (1993). Hyperthermia induces c-fos expression in the preoptic area. *Brain Res* **618**, 303-307.
- SCHÄFER, K., BRAUN, H. A. & ISENBERG, C. (1986). Effect of menthol on cold receptor activity. Analysis of receptor processes. *J Gen Physiol* **88**, 757-776.

- SCHEINMAN, R. I., GUALBERTO, A., JEWELL, C. M., CIDLOWSKI, J. A. & BALDWIN, A. S., JR. (1995). Characterization of mechanisms involved in transrepression of NF-kappa B by activated glucocorticoid receptors. *Mol Cell Biol* **15**, 943-953.
- SCHILTZ, J. C. & SAWCHENKO, P. E. (2002). Distinct brain vascular cell types manifest inducible cyclooxygenase expression as a function of the strength and nature of immune insults. *J Neurosci* **22**, 5606-5618.
- SCHILTZ, J. C. & SAWCHENKO, P. E. (2003). Signaling the brain in systemic inflammation: the role of perivascular cells. *Front Biosci* **8**, s1321-1329.
- SCHINDLER, R., MANCILLA, J., ENDRES, S., GHORBANI, R., CLARK, S. C. & DINARELLO, C. A. (1990). Correlations and interactions in the production of interleukin-6 (IL-6), IL-1, and tumor necrosis factor (TNF) in human blood mononuclear cells: IL-6 suppresses IL-1 and TNF. *Blood* **75**, 40-47.
- SCHLETTER, J., HEINE, H., ULMER, A. J. & RIETSCHEL, E. T. (1995). Molecular mechanisms of endotoxin activity. *Arch Microbiol* **164**, 383-389.
- SCHMIDT, H. H., LOHMANN, S. M. & WALTER, U. (1993). The nitric oxide and cGMP signal transduction system: regulation and mechanism of action. *Biochim Biophys Acta* **1178**, 153-175.
- SCHÖBITZ, B., PEZESHKI, G., POHL, T., HEMMANN, U., HEINRICH, P. C., HOLSBOER, F. & REUL, J. M. (1995). Soluble interleukin-6 (IL-6) receptor augments central effects of IL-6 in vivo. *FASEB J* **9**, 659-664.
- SCHUMAN, E. M. & MADISON, D. V. (1994). Nitric oxide and synaptic function. *Annu Rev Neurosci* **17**, 153-183.
- SCHUMANN, R. R., LEONG, S. R., FLAGGS, G. W., GRAY, P. W., WRIGHT, S. D., MATHISON, J. C., TOBIAS, P. S. & ULEVITCH, R. J. (1990). Structure and function of lipopolysaccharide binding protein. *Science* **249**, 1429-1431.
- SCHUSTER, V. L. (1998). Molecular mechanisms of prostaglandin transport. *Annu Rev Physiol* **60**, 221-242.
- SCHUSTER, V. L. (2002). Prostaglandin transport. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* **68-69**, 633-647.
- SCOTT, K. F., BRYANT, K. J. & BIDGOOD, M. J. (1999). Functional coupling and differential regulation of the phospholipase A2-cyclooxygenase pathways in inflammation. *J Leukoc Biol* **66**, 535-541.
- SEHIC, E. & BLATTEIS, C. M. (1996). Blockade of lipopolysaccharide-induced fever by subdiaphragmatic vagotomy in guinea pigs. *Brain Res* **726**, 160-166.
- SEHIC, E., GERSTBERGER, R. & BLATTEIS, C. M. (1997). The effect of intravenous lipopolysaccharide on NADPH-diaphorase staining (= nitric oxide synthase activity)

- in the organum vasculosum laminae terminalis of guinea pigs. *Ann N Y Acad Sci* **813**, 383-391.
- SEHIC, E., SZEKELY, M., UNGAR, A. L., OLADÉHIN, A. & BLATTEIS, C. M. (1996a). Hypothalamic prostaglandin E2 during lipopolysaccharide-induced fever in guinea pigs. *Brain Res Bull* **39**, 391-399.
- SEHIC, E., UNGAR, A. L. & BLATTEIS, C. M. (1996b). Interaction between norepinephrine and prostaglandin E2 in the preoptic area of guinea pigs. *Am J Physiol* **271**, R528-536.
- SEIBERT, F. B. (1925). The cause of many febrile reactions following intravenous injections. *Am. J. Physiol* **71**, 621-651.
- SEIFERLE, E. (1992). Nervensystem Sinnesorgane Endokrine Drüsen. In *Lehrbuch der Anatomie*, vol. IV. ed. BÖHME, G., pp. 548. Verlag Paul Parey, Berlin, Hamburg.
- SERHAN, C. N. & LEVY, B. (2003). Success of prostaglandin E2 in structure-function is a challenge for structure-based therapeutics. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 8609-8611.
- SHAFTEL, S. S., OLSCHOWKA, J. A., HURLEY, S. D., MOORE, A. H. & O'BANION, M. K. (2003). COX-3: a splice variant of cyclooxygenase-1 in mouse neural tissue and cells. *Brain Res Mol Brain Res* **119**, 213-215.
- SHIBATA, M. & BLATTEIS, C. M. (1991). Human recombinant tumor necrosis factor and interferon affect the activity of neurons in the organum vasculosum laminae terminalis. *Brain Res* **562**, 323-326.
- SHIMAZU, R., AKASHI, S., OGATA, H., NAGAI, Y., FUKUDOME, K., MIYAKE, K. & KIMOTO, M. (1999). MD-2, a molecule that confers lipopolysaccharide responsiveness on Toll-like receptor 4. *J Exp Med* **189**, 1777-1782.
- SILBERNAGEL, S., LANG, F. (1998). *Taschenatlas der Pathophysiologie*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart New York.
- SIMONS, C. T., KULCHITSKY, V. A., SUGIMOTO, N., HOMER, L. D., SZEKELY, M. & ROMANOVSKY, A. A. (1998). Signaling the brain in systemic inflammation: which vagal branch is involved in fever genesis? *Am J Physiol* **275**, R63-68.
- SINGER, R., HARKER, C. T., VANDER, A. J. & KLUGER, M. J. (1986). Hyperthermia induced by open-field stress is blocked by salicylate. *Physiol Behav* **36**, 1179-1182.
- SMALL, P. M., TAUBER, M. G., HACKBARTH, C. J. & SANDE, M. A. (1986). Influence of body temperature on bacterial growth rates in experimental pneumococcal meningitis in rabbits. *Infect Immun* **52**, 484-487.
- SMITH, W. L., DEWITT, D. L. & GARAVITO, R. M. (2000). Cyclooxygenases: structural, cellular, and molecular biology. *Annu Rev Biochem* **69**, 145-182.
- SNELL, E. S., ATKINS, E. (1968). The mechanisms of fever. *Biological Basis of Medicine*, 397-419.

- SOMMER, C. & KRESS, M. (2004). Recent findings on how proinflammatory cytokines cause pain: peripheral mechanisms in inflammatory and neuropathic hyperalgesia. *Neurosci Lett* **361**, 184-187.
- SOSZYNSKI, D., KOZAK, W. & SZEWCZENKO, M. (1991). Course of fever response to repeated administration of sublethal doses of lipopolysaccharides, polyinosinic:polycytidylic acid and muramyl dipeptide to rabbits. *Experientia* **47**, 43-47.
- STAHL, S. M. (1998). Nitric oxide physiology and pharmacology. *J Clin Psychiatry* **59**, 101-102.
- STARR, R., WILLSON, T. A., VINEY, E. M., MURRAY, L. J., 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**, 917-921.
- STEENSBERG, A., FISCHER, C. P., KELLER, C., MOLLER, K. & PEDERSEN, B. K. (2003). IL-6 enhances plasma IL-1ra, IL-10, and cortisol in humans. *Am J Physiol* **285**, E433-437.
- STEINER, A. A., COLOMBARI, E. & BRANCO, L. G. (1999). Carbon monoxide as a novel mediator of the febrile response in the central nervous system. *Am J Physiol* **277**, R499-507.
- STEPHANOU, A., ISENBERG, D. A., AKIRA, S., KISHIMOTO, T. & LATCHMAN, D. S. (1998). The nuclear factor interleukin-6 (NF-IL6) and signal transducer and activator of transcription-3 (STAT-3) 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 (Pt 1)**, 189-195.
- STICHTENOTH, D. O., THOREN, S., BIAN, H., PETERS-GOLDEN, M., JAKOBSSON, P. J. & CROFFORD, L. J. (2001). Microsomal prostaglandin E synthase is regulated by proinflammatory cytokines and glucocorticoids in primary rheumatoid synovial cells. *J Immunol* **167**, 469-474.
- STOIBER, D., KOVARIK, P., COHNEY, S., JOHNSTON, J. A., STEINLEIN, P. & DECKER, T. (1999). Lipopolysaccharide induces in macrophages the synthesis of the suppressor of cytokine signaling 3 and suppresses signal transduction in response to the activating factor IFN-gamma. *J Immunol* **163**, 2640-2647.
- STOYAN, T., MICHAELIS, U., 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**, 239-245.
- STROMBERG, H., SVENSSON, S. P. & HERMANSON, O. (2000). Distribution of the transcription factor signal transducer and activator of transcription 3 in the rat central nervous system and dorsal root ganglia. *Brain Res* **853**, 105-114.

- 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.
- SZEKELY, M., BALASKO, M., KULCHITSKY, V. A., SIMONS, C. T., IVANOV, A. I. & ROMANOVSKY, A. A. (2000). Multiple neural mechanisms of fever. *Auton Neurosci* **85**, 78-82.
- SZEKELY, M., BALASKO, M. & ROMANOVSKY, A. A. (1997). Peripheral neural inputs. Their role in fever development. *Ann N Y Acad Sci* **813**, 427-434.
- TABETA, K., GEORGEL, P., JANSSEN, E., DU, X., HOEBE, K., CROZAT, K., MUDD, S., SHAMEL, L., SOVATH, S., GOODE, J., ALEXOPOULOU, L., FLAVELL, R. A. & BEUTLER, B. (2004). Toll-like receptors 9 and 3 as essential components of innate immune defense against mouse cytomegalovirus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 3516-3521.
- TAGA, T. & KISHIMOTO, T. (1997). Gp130 and the interleukin-6 family of cytokines. *Annu Rev Immunol* **15**, 797-819.
- TAKAHASHI, Y., SMITH, P., FERGUSON, A. & PITTMAN, Q. J. (1997). Circumventricular organs and fever. *Am J Physiol* **273**, R1690-1695.
- TAKAMIYA, A., TAKEDA, M., YOSHIDA, A. & KIYAMA, H. (2002). Inflammation induces serine protease inhibitor 3 expression in the rat pineal gland. *Neuroscience* **113**, 387-394.
- TAKEDA, K. & AKIRA, S. (2000). STAT family of transcription factors in cytokine-mediated biological responses. *Cytokine Growth Factor Rev* **11**, 199-207.
- TAKEDA, K., KAISHO, T. & AKIRA, S. (2003). Toll-like receptors. *Annu Rev Immunol* **21**, 335-376.
- TAKEDA, K., NOGUCHI, K., SHI, W., TANAKA, T., MATSUMOTO, M., YOSHIDA, N., KISHIMOTO, T. & AKIRA, S. (1997). Targeted disruption of the mouse Stat3 gene leads to early embryonic lethality. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 3801-3804.
- TAKIZAWA, T., YANAGISAWA, M., OCHIAI, W., YASUKAWA, K., ISHIGURO, T., NAKASHIMA, K. & TAGA, T. (2001). Directly linked soluble IL-6 receptor-IL-6 fusion protein induces astrocyte differentiation from neuroepithelial cells via activation of STAT3. *Cytokine* **13**, 272-279.
- TANIOKA, T., NAKATANI, Y., SEMMYO, N., MURAKAMI, M. & KUDO, I. (2000). Molecular identification of cytosolic prostaglandin E2 synthase that is functionally coupled with cyclooxygenase-1 in immediate prostaglandin E2 biosynthesis. *J Biol Chem* **275**, 32775-32782.
- THEWS, G., MUTSCHLER, E., VAUPEL, P. (1999). *Anatomie Physiologie Pathophysiologie des Menschen*. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart.

- THOMAS, B., BERENBAUM, F., HUMBERT, L., BIAN, H., BEREZIAT, G., CROFFORD, L. & OLIVIER, J. L. (2000). Critical role of C/EBPdelta and C/EBPbeta factors in the stimulation of the cyclooxygenase-2 gene transcription by interleukin-1beta in articular chondrocytes. *Eur J Biochem* **267**, 6798-6809.
- THOMAS, W. E. (1999). Brain macrophages: on the role of pericytes and perivascular cells. *Brain Res Brain Res Rev* **31**, 42-57.
- THOMSON, A. W. (1991). *The Cytokine Handbook*. Academic Press, London.
- THOMSON, A. W. (1994). *The Cytokine Handbook, 2nd edn*. Academic Press, London.
- TILG, H., DINARELLO, C. A. & MIER, J. W. (1997). IL-6 and APPs: anti-inflammatory and immunosuppressive mediators. *Immunol Today* **18**, 428-432.
- TILG, H., TREHU, E., ATKINS, M. B., DINARELLO, C. A. & MIER, J. W. (1994). Interleukin-6 (IL-6) as an anti-inflammatory cytokine: induction of circulating IL-1 receptor antagonist and soluble tumor necrosis factor receptor p55. *Blood* **83**, 113-118.
- TOMINAGA, M., CATERINA, M. J., MALMBERG, A. B., ROSEN, T. A., GILBERT, H., SKINNER, K., RAUMANN, B. E., BASBAUM, A. I. & JULIUS, D. (1998). The cloned capsaicin receptor integrates multiple pain-producing stimuli. *Neuron* **21**, 531-543.
- TOMINAGA, M., WADA, M. & MASU, M. (2001). Potentiation of capsaicin receptor activity by metabotropic ATP receptors as a possible mechanism for ATP-evoked pain and hyperalgesia. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 6951-6956.
- TOTH, L. A., TOLLEY, E. A. & KRUEGER, J. M. (1993). Sleep as a prognostic indicator during infectious disease in rabbits. *Proc Soc Exp Biol Med* **203**, 179-192.
- TREBINO, C. E., STOCK, J. L., GIBBONS, C. P., NAIMAN, B. M., WACHTMANN, T. S., UMLAND, J. P., PANDHER, K., LAPOINTE, J. M., SAHA, S., ROACH, M. L., CARTER, D., THOMAS, N. A., DURTSCHI, B. A., MCNEISH, J. D., HAMBOR, J. E., JAKOBSSON, P. J., CARTY, T. J., PEREZ, J. R. & AUDOLY, L. P. (2003). Impaired inflammatory and pain responses in mice lacking an inducible prostaglandin E synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 9044-9049.
- TREVISANI, M., SMART, D., GUNTHORPE, M. J., TOGNETTO, M., BARBIERI, M., CAMPI, B., AMADESI, S., GRAY, J., JERMAN, J. C., BROUGH, S. J., OWEN, D., SMITH, G. D., RANDALL, A. D., HARRISON, S., BIANCHI, A., DAVIS, J. B. & GEPPETTI, P. (2002). Ethanol elicits and potentiates nociceptor responses via the vanilloid receptor-1. *Nat Neurosci* **5**, 546-551.
- TURNBULL, A. V., PREHAR, S., KENNEDY, A. R., LITTLE, R. A. & HOPKINS, S. J. (2003). Interleukin-6 is an afferent signal to the hypothalamo-pituitary-adrenal axis during local inflammation in mice. *Endocrinology* **144**, 1894-1906.
- 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.

- UEMATSU, S., MATSUMOTO, M., TAKEDA, K. & AKIRA, S. (2002). Lipopolysaccharide-dependent prostaglandin E(2) production is regulated by the glutathione-dependent prostaglandin E(2) synthase gene induced by the Toll-like receptor 4/MyD88/NF-IL6 pathway. *J Immunol* **168**, 5811-5816.
- ULEVITCH, R. J. & TOBIAS, P. S. (1994). Recognition of endotoxin by cells leading to transmembrane signaling. *Curr Opin Immunol* **6**, 125-130.
- ULEVITCH, R. J. & TOBIAS, P. S. (1999). Recognition of gram-negative bacteria and endotoxin by the innate immune system. *Curr Opin Immunol* **11**, 19-22.
- URADE, Y., WATANABE, K. & HAYAISHI, O. (1995). Prostaglandin D, E, and F synthases. *J Lipid Mediat Cell Signal* **12**, 257-273.
- USHIKUBI, F., SEGI, E., SUGIMOTO, Y., MURATA, T., MATSUOKA, T., KOBAYASHI, T., HIZAKI, H., TUBOI, K., KATSUYAMA, M., ICHIKAWA, A., TANAKA, T., YOSHIDA, N. & NARUMIYA, S. (1998). Impaired febrile response in mice lacking the prostaglandin E receptor subtype EP3. *Nature* **395**, 281-284.
- VALLIÈRES, L., LACROIX, S. & RIVEST, S. (1997). Influence of interleukin-6 on neural activity and transcription of the gene encoding corticotrophin-releasing factor in the rat brain: an effect depending upon the route of administration. *Eur J Neurosci* **9**, 1461-1472.
- VALLIÈRES, L. & RIVEST, S. (1997). Regulation of the genes encoding interleukin-6, its receptor, and gp130 in the rat brain in response to the immune activator lipopolysaccharide and the proinflammatory cytokine interleukin-1beta. *J Neurochem* **69**, 1668-1683.
- VALLIÈRES, L. & RIVEST, S. (1999). Interleukin-6 is a needed proinflammatory cytokine in the prolonged neural activity and transcriptional activation of corticotropin-releasing factor during endotoxemia. *Endocrinology* **140**, 3890-3903.
- VALLIÈRES, L. & SAWCHENKO, P. E. (2003). Bone marrow-derived cells that populate the adult mouse brain preserve their hematopoietic identity. *J Neurosci* **23**, 5197-5207.
- VAN DAM, A. M., BAUER, J., MAN, A. H. W. K., MARQUETTE, C., TILDERS, F. J. & BERKENBOSCH, F. (1995). Appearance of inducible nitric oxide synthase in the rat central nervous system after rabies virus infection and during experimental allergic encephalomyelitis but not after peripheral administration of endotoxin. *J Neurosci Res* **40**, 251-260.
- VAN DAMME, J., OPDENAKKER, G., SIMPSON, R. J., RUBIRA, M. R., CAYPHAS, S., VINK, A., BILLIAU, A. & VAN SNICK, J. (1987). Identification of the human 26-kD protein, interferon beta 2 (IFN-beta 2), as a B cell hybridoma/plasmacytoma growth factor induced by interleukin 1 and tumor necrosis factor. *J Exp Med* **165**, 914-919.
- VAN OERS, M. H., VAN DER HEYDEN, A. A. & AARDEN, L. A. (1988). Interleukin 6 (IL-6) in serum and urine of renal transplant recipients. *Clin Exp Immunol* **71**, 314-319.

- VANE, J. R. (1971). Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. *Nat New Biol* **231**, 232-235.
- VANE, J. R. (2000). The fight against rheumatism: from willow bark to COX-1 sparing drugs. *J Physiol Pharmacol* **51**, 573-586.
- VANE, J. R., BAKHLE, Y. S. & BOTTING, R. M. (1998). Cyclooxygenases 1 and 2. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **38**, 97-120.
- VANE, J. R. & BOTTING, R. M. (1998). Mechanism of action of antiinflammatory drugs. *Int J Tissue React* **20**, 3-15.
- VANE, J. R., MITCHELL, J. A., APPLETON, I., TOMLINSON, A., BISHOP-BAILEY, D., CROXTALL, J. & WILLOUGHBY, D. A. (1994). Inducible isoforms of cyclooxygenase and nitric-oxide synthase in inflammation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 2046-2050.
- VAUGHN, L. K., VEALE, W. L. & COOPER, K. E. (1980). Antipyresis: its effect on mortality rate of bacterially infected rabbits. *Brain Res Bull* **5**, 69-73.
- VILCÉK, J., LE, J. (1994). Immunology of cytokines: an introduction. In *The Cytokine Handbook*. ed. THOMSON, A. W., pp. 1-20. Academic press, London.
- VON MEYENBURG, C., HRUPKA, B. H., ARSENIJEVIC, D., SCHWARTZ, G. J., LANDMANN, R. & LANGHANS, W. (2004). Role for CD14, TLR2, and TLR4 in bacterial product-induced anorexia. *Am J Physiol* **287**, R298-305.
- WAGNER, J. E., MANNING, P.J. (1976). *The biology of the guinea pig*. Academic Press, New York San Francisco London.
- WAN, Y., FREESWICK, P. D., KHEMLANI, L. S., KISPERT, P. H., WANG, S. C., SU, G. L. & BILLIAR, T. R. (1995). Role of lipopolysaccharide (LPS), interleukin-1, interleukin-6, tumor necrosis factor, and dexamethasone in regulation of LPS-binding protein expression in normal hepatocytes and hepatocytes from LPS-treated rats. *Infect Immun* **63**, 2435-2442.
- WANG, X., MOSER, C., LOUBOUTIN, J. P., LYSENKO, E. S., WEINER, D. J., WEISER, J. N. & WILSON, J. M. (2002). Toll-like receptor 4 mediates innate immune responses to *Haemophilus influenzae* infection in mouse lung. *J Immunol* **168**, 810-815.
- WARNER, T. D. & MITCHELL, J. A. (2002). Cyclooxygenase-3 (COX-3): filling in the gaps toward a COX continuum? *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 13371-13373.
- WATANABE, T., MORIMOTO, A., TAN, N., MAKISUMI, T., SHIMADA, S. G., NAKAMORI, T. & MURAKAMI, N. (1994). ACTH response induced in capsaicin-desensitized rats by intravenous injection of interleukin-1 or prostaglandin E. *J Physiol* **475**, 139-145.
- WATKINS, L. R., GOEHLER, L. E., RELTON, J. K., TARTAGLIA, N., SILBERT, L., MARTIN, D. & MAIER, S. F. (1995a). Blockade of interleukin-1 induced hyperthermia by subdiaphragmatic vagotomy: evidence for vagal mediation of immune-brain communication. *Neurosci Lett* **183**, 27-31.

- WATKINS, L. R., MAIER, S. F. & GOEHLER, L. E. (1995b). Cytokine-to-brain communication: a review & analysis of alternative mechanisms. *Life Sci* **57**, 1011-1026.
- WATKINS, L. R., WIERTELAK, E. P., GOEHLER, L. E., MOONEY-HEIBERGER, K., MARTINEZ, J., FURNESS, L., SMITH, K. P. & MAIER, S. F. (1994). Neurocircuitry of illness-induced hyperalgesia. *Brain Res* **639**, 283-299.
- WEIHRAUCH, D. & RIEDEL, W. (1997). Nitric oxide (NO) and oxygen radicals, but not prostaglandins, modulate fever. *Ann N Y Acad Sci* **813**, 373-382.
- WEINSTEIN, M. P., IANNINI, P. B., STRATTON, C. W. & EICKHOFF, T. C. (1978). Spontaneous bacterial peritonitis. A review of 28 cases with emphasis on improved survival and factors influencing prognosis. *Am J Med* **64**, 592-598.
- WIKLUND, N. P., CELLEK, S., LEONE, A. M., IVERSEN, H. H., GUSTAFSSON, L. E., BRUNDIN, L., FURST, V. W., FLOCK, A. & MONCADA, S. (1997). Visualisation of nitric oxide released by nerve stimulation. *J Neurosci Res* **47**, 224-232.
- WING, E. J. & YOUNG, J. B. (1980). Acute starvation protects mice against *Listeria monocytogenes*. *Infect Immun* **28**, 771-776.
- WIRTH, T. (2003). Transkription und Transkriptionskontrolle. In *Lehrbuch Vorklinik Teil A*. ed. SCHMIDT, R. F., UNSICKER, K., pp. 347-383. Ärzte-Verlag, Köln.
- WOLFS, T. G., BUURMAN, W. A., VAN SCHADEWIJK, A., DE VRIES, B., DAEMEN, M. A., HIEMSTRA, P. S. & VAN 'T VEER, C. (2002). In vivo expression of Toll-like receptor 2 and 4 by renal epithelial cells: IFN-gamma and TNF-alpha mediated up-regulation during inflammation. *J Immunol* **168**, 1286-1293.
- WOOD, J. A., WOOD, P. L., RYAN, R., GRAFF-RADFORD, N. R., PILAPIL, C., ROBITAILLE, Y. & QUIRION, R. (1993). Cytokine indices in Alzheimer's temporal cortex: no changes in mature IL-1 beta or IL-1RA but increases in the associated acute phase proteins IL-6, alpha 2-macroglobulin and C-reactive protein. *Brain Res* **629**, 245-252.
- WRIGHT, S. D., RAMOS, R. A., TOBIAS, P. S., ULEVITCH, R. J. & MATHISON, J. C. (1990). CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. *Science* **249**, 1431-1433.
- XIA, D. & SAMOLS, D. (1997). Transgenic mice expressing rabbit C-reactive protein are resistant to endotoxemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 2575-2580.
- XIE, Q. W., CHO, H. J., CALAYCAY, J., MUMFORD, R. A., SWIDEREK, K. M., LEE, T. D., DING, A., TROSO, T. & NATHAN, C. (1992). Cloning and characterization of inducible nitric oxide synthase from mouse macrophages. *Science* **256**, 225-228.
- 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.

- XING, Z., GAULDIE, J., COX, G., BAUMANN, H., JORDANA, M., LEI, X. F. & ACHONG, M. K. (1998). IL-6 is an antiinflammatory cytokine required for controlling local or systemic acute inflammatory responses. *J Clin Invest* **101**, 311-320.
- YAMAGATA, K., ANDREASSON, K. I., KAUFMANN, W. E., BARNES, C. A. & WORLEY, P. F. (1993). Expression of a mitogen-inducible cyclooxygenase in brain neurons: regulation by synaptic activity and glucocorticoids. *Neuron* **11**, 371-386.
- YAMAGATA, K., MATSUMURA, K., INOUE, W., SHIRAKI, T., SUZUKI, K., YASUDA, S., SUGIURA, H., CAO, C., WATANABE, Y. & KOBAYASHI, S. (2001). Coexpression of microsomal-type prostaglandin E synthase with cyclooxygenase-2 in brain endothelial cells of rats during endotoxin-induced fever. *J Neurosci* **21**, 2669-2677.
- YAMAMOTO, Y. & GAYNOR, R. B. (2001). Therapeutic potential of inhibition of the NF-kappaB pathway in the treatment of inflammation and cancer. *J Clin Invest* **107**, 135-142.
- YASUKAWA, H., OHISHI, M., MORI, H., MURAKAMI, M., CHINEN, T., AKI, D., HANADA, T., TAKEDA, K., AKIRA, S., HOSHIJIMA, M., HIRANO, T., CHIEN, K. R. & YOSHIMURA, A. (2003). IL-6 induces an anti-inflammatory response in the absence of SOCS3 in macrophages. *Nat Immunol* **4**, 551-556.
- YOSHIDA, K., NAKAMURA, K., MATSUMURA, K., KANOSUE, K., KONIG, M., THIEL, H. J., BOLDOGKOI, Z., TOTI, I., ROTH, J., GERSTBERGER, R. & HUBSCHLE, T. (2003). Neurons of the rat preoptic area and the raphe pallidus nucleus innervating the brown adipose tissue express the prostaglandin E receptor subtype EP3. *Eur J Neurosci* **18**, 1848-1860.
- YOSHIDA, K., TAGA, T., SAITO, M., SUEMATSU, S., KUMANOGOH, A., TANAKA, T., FUJIWARA, H., HIRATA, M., YAMAGAMI, T., NAKAHATA, T., HIRABAYASHI, T., YONEDA, Y., TANAKA, K., WANG, W. Z., MORI, C., SHIOTA, K., YOSHIDA, N. & KISHIMOTO, T. (1996). Targeted disruption of gp130, a common signal transducer for the interleukin 6 family of cytokines, leads to myocardial and hematological disorders. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 407-411.
- ZEISBERGER, E. (1999). From humoral fever to neuroimmunological control of fever. *J Therm Biol* **24**, 287-326.
- ZEISBERGER, E., MERKER, G. & BLAHSER, S. (1981). Fever response in the guinea pig before and after parturition. *Brain Res* **212**, 379-392.
- ZEISBERGER, E., ROTH, J. (1994). Effects of immobilization on febrile, neuroendocrine and immunological responses in guinea pigs. In *Thermal Balance in Health and Disease. Advances in Pharmacological Sciences*. ed. ZEISBERGER, E., SCHÖNBAUM, E., LOMAX, P., pp. 403-408. Birkhäuser Verlag, Basel.
- ZEISBERGER, E., ROTH, J. (1996). Central regulation of adaptive responses to heat and cold. In *Handbook of Physiology, Section 4*, vol. I Environmental Physiology. ed. FREGLY, M. J., BLATTEIS, C.M., pp. 579-595. Oxford University Press, New York.

- ZETTERSTRÖM, M., SUNDGREN-ANDERSSON, A. K., OSTLUND, P. & BARTFAI, T. (1998). Delineation of the proinflammatory cytokine cascade in fever induction. *Ann N Y Acad Sci* **856**, 48-52.
- ZHANG, J. & RIVEST, S. (1999). Distribution, regulation and colocalization of the genes encoding the EP2- and EP4-PGE2 receptors in the rat brain and neuronal responses to systemic inflammation. *Eur J Neurosci* **11**, 2651-2668.
- 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. B., 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 U S A* **96**, 2071-2076.
- ZHANG, Y. H., LIN, J. X. & VILCEK, J. (1990). Interleukin-6 induction by tumor necrosis factor and interleukin-1 in human fibroblasts involves activation of a nuclear factor binding to a kappa B-like sequence. *Mol Cell Biol* **10**, 3818-3823.
- ZHANG, Y. H., LU, J., ELMQUIST, J. K. & SAPER, C. B. (2003). Specific roles of cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 in lipopolysaccharide-induced fever and Fos expression in rat brain. *J Comp Neurol* **463**, 3-12.

X. ANHANG

1. Publikationen

1.1. Originalarbeiten in Fachzeitschriften

- ROTH, J., HARRE, E. M., RUMMEL, C., GERSTBERGER, R. & HÜBSCHLE, T. (2004). Signaling the brain in systemic inflammation: role of sensory circumventricular organs. *Front Biosci* **9**, 290-300.
- RUMMEL, C., HÜBSCHLE, T., GERSTBERGER, R. & ROTH, J. (2004). Nuclear translocation of the transcription factor STAT3 in the guinea pig brain during systemic or localised inflammation. *J Physiol* **557**, 671-687.
- ROTH, J., RUMMEL, C., HARRÉ, E. M., VOSS, T., MÜTZE, J., GERSTBERGER, R., HÜBSCHLE, T. (2004). Is interleukin-6 the necessary pyrogenic cytokine? *Journal of Thermal Biology* **29**, 383-389.
- RUMMEL, C., VOSS, T., MATSUMURA, K., KORTE, S., GERSTBERGER, R., ROTH, J. & HÜBSCHLE, T. (2005). Nuclear STAT3 translocation in the guinea pig brain endothelium and astrocytes during pyrogenic challenge with lipopolysaccharide. *J Comp Neurol.* **in Revision**
- RUMMEL, C., BARTH, S., VOSS, T., GERSTBERGER, R. HÜBSCHLE, T. & ROTH, J. (2005). Systemic versus localised inflammation: A Role for prostaglandins at distinct points of the fever-induction pathways? *Am J Physiol.* **vorbereitet zur Publikation**

1.2. Veröffentlichte Abstrakts

- RUMMEL, C., HÜBSCHLE, T., GERSTBERGER, R. and ROTH J. (2003). Genomic activation of cellular elements within the brain during systemic or localized inflammation in guinea pigs. *Pflügers Arch - Eur J Physiol* **445**, 54.
- RUMMEL, C., GERSTBERGER, R., ROTH, J. and HÜBSCHLE T. (2003). Interleukin-6-induced genomic activation during systemic or localized inflammation in guinea pigs investigated with STAT3-immunohistochemistry. *Brain Behav Immun* **17**, 200.
- VOSS, T., RUMMEL, C., GERSTBERGER, R., HÜBSCHLE, T. and ROTH J. (2005). Fever and cytokine responses to single or repeated injections of double stranded RNA in guinea pigs. *Pflügers Arch - Eur J Physiol.* **im Druck**
- RUMMEL, C., BARTH, S., GERSTBERGER, R., HÜBSCHLE, T. and ROTH J. (2005). The role of prostaglandins in the induction of fever during localized as opposed to systemic inflammation. *Pflügers Arch - Eur J Physiol.* **im Druck**

1.3. Buchkapitel

- RUMMEL, C. (2004) Lyme-Borreliose - die häufigste durch Zecken übertragene Infektionskrankheit in der USA und Europa. In *Milzbrand, Pest, Pocken; Bedrohung durch alte und neue Krankheitserreger*. pp. 19-38. VVB Laufersweiler Verlag, Wettenberg.

2. Danksagung

Ich möchte mich hiermit herzlich bei allen Mitarbeitern der Veterinärphysiologie bedanken.

Herrn Prof. Dr. Rüdiger Gerstberger danke ich für seine große Unterstützung und dafür, dass er mein Interesse für diese Doktorarbeit geweckt hat. Mein größter Dank gilt PD Dr. Joachim Roth, der mich in vorbildlichster Weise betreut hat, wie man es sich nur wünschen kann. Weiterhin danke ich Dr. Thomas Hübschle für seine geduldige und fortwährende Unterweisung in die Grundlagen der Immunhistologie sowie der Bildbearbeitung.

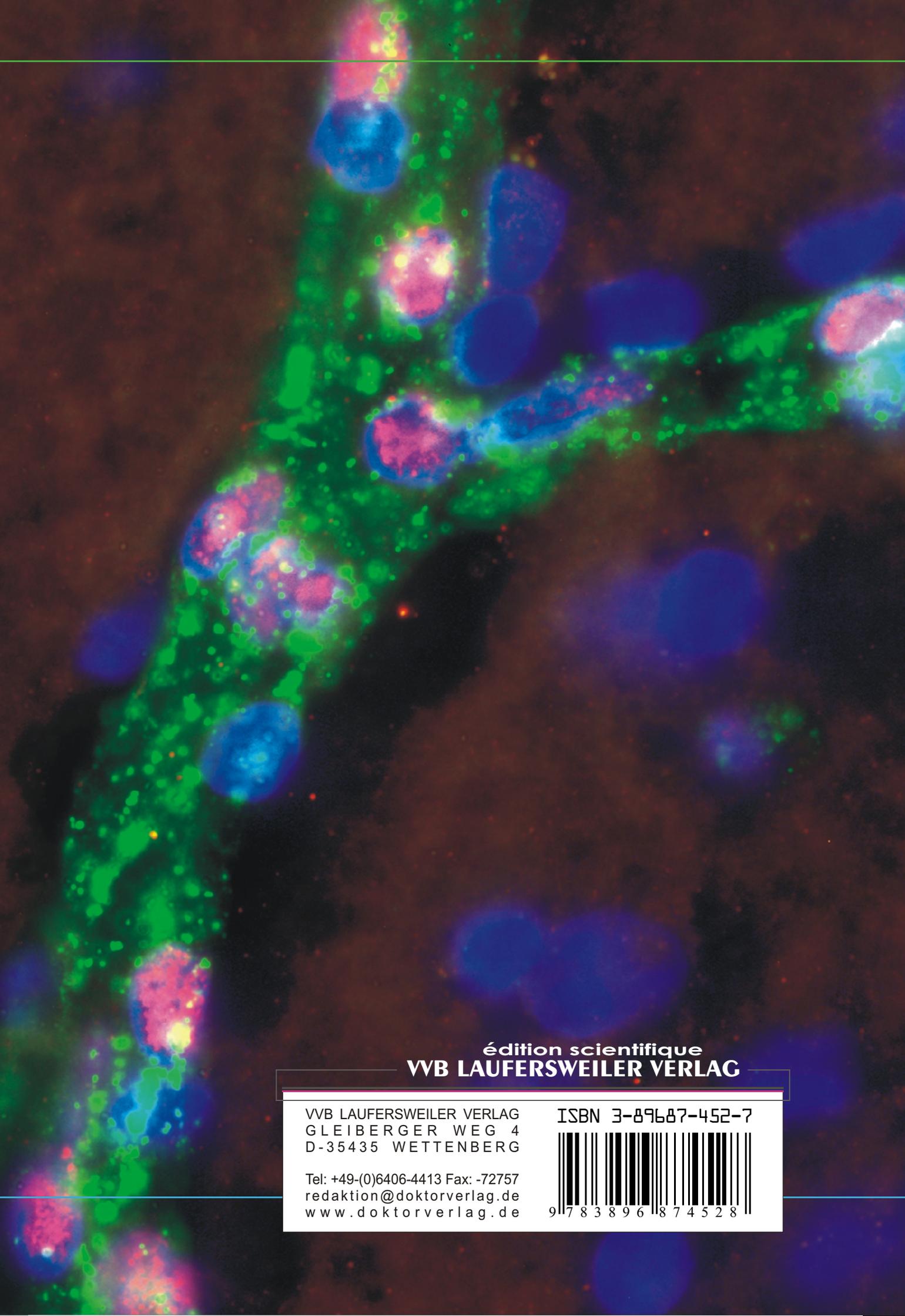
Vielen Dank auch an Günther Ross, Eva Harré, Sandra Nobel und Matthias Küth, die mir den Einstieg in die Arbeit erleichtert haben. Darüber hinaus danke ich allen Mitarbeitern des Instituts, die dazu beigetragen haben, dass die Physiologie ein derart angenehmer Arbeitsplatz für mich war. Im besonderen hat es mir viel Spaß gemacht mit Thilo Voss, Jörg Mütze, Daniela Hild, Jolanta Murgott, Doreen Marks und Bärbel Reuter zusammen zu arbeiten. Ich war begeistert, dass ich neben der Arbeit das freitägliche Frühstück und auch ansonsten so viele gesellige Veranstaltungen miterleben durfte.

Ansonsten möchte ich allen meinen Freunden und Bekannten für ihre seelische und ausgleichende Unterstützung danken.

Schließlich wäre das alles nicht möglich gewesen, wenn meine Eltern und meine Schwester nicht immer für mich da gewesen wären. Danke!

3. Erklärung

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



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
GLEIBERGER WEG 4
D-35435 WETTENBERG

Tel: +49-(0)6406-4413 Fax: -72757
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN 3-89687-452-7



9 783896 874528