

DIE BEDEUTUNG DER *AREA POSTREMA* ALS ZENTRALNERVÖSER SENSOR FÜR INFLAMMATORISCHE SIGNALE

FLORIAN WUCHERT

INAUGURAL-DISSERTATION

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



édition scientifique
VVB LAUFFERSWEILER 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 2008

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 2008

© 2008 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



VVB LAUFERSWEILER VERLAG
édition scientifique

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

Aus dem Institut für Veterinärphysiologie der

Justus-Liebig-Universität Gießen

Betreuer: Prof. Dr. Joachim Roth

**„Die Bedeutung der *Area postrema* als zentralnervöser
Sensor für inflammatorische Signale“**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines

Dr. med. vet.

beim Fachbereich Veterinärmedizin

der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

Florian Wuchert

Tierarzt aus Meiningen

Gießen 2008

**Mit Genehmigung des Fachbereichs für Veterinärmedizin
Der Justus-Liebig-Universität Gießen**

Dekan: Prof. Dr. Dr. habil. G. Baljer

Gutachter: Prof. Dr. J. Roth
Prof. Dr. S. Wensch

Tag der Disputation: 05.12.2008

1. EINLEITUNG	11
1.1. Signalwege zur inflammatorischen Aktivierung des Gehirns	13
1.1.1. Der humorale Weg zur Aktivierung des Gehirns (Humorale Fieberhypothese)	14
1.1.2. Der nervale Weg zur Aktivierung des Gehirns (Nervale Fieberhypothese)	15
1.2. Die Zirkumventrikulären Organe (CVOs) und die Blut-Hirn-Schranke	16
1.2.1. Die besondere Rolle der <i>Area postrema</i> im Organismus	19
1.2.2. Die Blut-Hirn-Schranke und die besonderen Gegebenheiten in den sensorischen zirkumventrikulären Organen	22
1.3. Aktivierung des angeborenen Immunsystems durch Pathogen-assoziierte Moleküle (PAMPs)	24
1.3.1. Die Pathogen-associated-molecular patterns (PAMPs)	25
1.3.1.1. Lipopolysaccharid (LPS)	26
1.3.1.2. Das Phänomen der Endotoxintoleranz	28
1.3.1.3. Muramyl-dipeptid (MDP)	31
1.3.1.4. Fibroblasten-stimulierendes Lipopeptid-1 (FSL-1)	34
1.3.1.5. Polyriboinosin-Polyribocytosinsäure (PI:PC)	35
1.3.2. Die Toll-like Rezeptoren (TLRs)	36
1.3.2.1. Die Signalübertragung durch Pathogen-assoziierte Moleküle (PAMPs) an den Toll-like Rezeptoren (TLRs)	38
1.3.2.2. Die Aktivierung des TLR-2 durch MDP/ PGN	40
1.3.2.3. Die Aktivierung des TLR-2/6-Heterodimers durch FSL-1/ MALP	41
1.3.2.4. Die Aktivierung des TLR-3 durch doppelsträngige RNA	42
1.3.2.5. Die Aktivierung des TLR-4 durch LPS	42

1.4. Die Bedeutung proinflammatorischer Zytokine bei der Induktion zentralnervöser Krankheitssymptome	44
1.4.1. Der Tumor Nekrose Faktor-alpha (TNF- α)	47
1.4.1.1. Der TNF-Rezeptor (TNF-R) und sein Signalweg	48
1.4.2. Das Interleukin 1 β (IL-1 β) und sein Rezeptor	50
1.4.3. Das Interleukin 6 (IL-6) und sein Rezeptor	51
1.5. Die Bildung von Zytokinen im Gehirn im Verlauf von Infektionen und Entzündungsreaktionen	53
1.5.1. Die Rolle von Stickstoff-Monoxid (NO) bei der Manifestierung zentralnervös kontrollierter Krankheitssymptome	55
1.6. Die Rolle von Kalzium (Ca²⁺) als intrazellulärer Botenstoff und als Indikator für Zellaktivierung im Rahmen eines inflammatorischen Geschehens	57
1.7. Zentrale Ziele und Fragestellung der Arbeit	60
2. MATERIAL UND METHODEN	62
2.1. Material	62
2.1.1. Geräte	62
2.1.2. Ge- und Verbrauchsmaterial	63
2.1.2.1. Zellkultur und Kalzium-Imaging	63
2.1.2.2. Immunzytochemie	64
2.1.2.3. Bioassays	64
2.1.3. Chemikalien	65
2.1.4. Computerprogramme	67
2.2. Versuchstiere	68
2.3. Verwendete Elektrolytlösungen und Puffer	68
2.3.1. Lösungen zur Zellkulturpräparation	68
2.3.1.1. Neurobasal-Medium A	68
2.3.1.2. Gey`s Balanced Salt Solution (GBSS)	69
2.3.1.3. Hanks Balanced Salt Solution (HBSS)	69
2.3.1.4. Ansetzen der Dispaselösung	69

Inhaltsverzeichnis

2.3.1.5.	Inaktivierungslösung der Dispase	69
2.3.2.	Lösungen für Kalzium-Imaging Messungen	70
2.3.2.1.	Kalziummesspuffer	70
2.3.3.4.	High-Kalium-Puffer	70
2.3.3.	Lösungen für die Immunzytochemie	70
2.3.3.1.	Phosphatpuffer (PB)	70
2.3.3.2.	Inkubationspuffer für immunzytochemische Untersuchungen	71
2.3.3.3.	Inkubationspuffer für immunzytochemische Untersuchungen	71
2.3.3.4.	Avidin-Biotin Blocking Kit	71
2.3.3.5.	Paraformaldehydlösung (PFA 4 %)	71
2.3.4.	Lösungen für die Zytokin-Bioassays	72
2.3.4.1.	Verwendete Lösungen für den TNF- α Bioassay und das Passagieren der WEHI-Zelllinie	72
2.3.4.2.	Verwendete Lösungen für den IL-6 Bioassay und das Passagieren der B9-Zelllinie	74
2.3.5.	Verwendete PAMPs und Zytokine	76
2.3.5.1.	Verwendete PAMPs	76
2.3.5.2.	Verwendete Zytokine	79
2.3.5.3.	Der NO-Donor DEA (2-(N,N-Diethylamino)-diazenolat-2-oxid)	80
2.4.	Methoden	81
2.4.1.	Primäre Zellkultur der Area postrema	81
2.4.1.1.	Vorbereitung und Beschichtung der Zellkulturkammern	81
2.4.1.2.	Präparation der Area postrema	82
2.4.1.3.	Weiterverarbeitung des Gewebes	83
2.4.2.	Messung der intrazellulären Kalziumkonzentration mittels Ratio-Imaging-Technik	84
2.4.2.1.	Grundlagen der Ratio-Imaging-Technik	84
2.4.2.2.	Der Fluoreszenz-Farbstoff Fura-2-Acetoxymethyl(AM)ester	87
2.4.2.3.	Der Imaging-Messstand	90
2.4.2.4.	Versuchsdurchführung	91
2.4.2.5.	Die "Pathogen-associated molecular pattern" (PAMPs) im Kalzium-Imaging	92

Inhaltsverzeichnis

2.4.2.6.	Proinflammatorische Zytokine	92
2.4.2.7.	Der NO-Donor DEA	93
2.4.2.8.	Kalium	93
2.4.2.9.	Auswertung	94
2.4.3.	Immunzytochemie	97
2.4.3.1.	Grundlagen der Immunzytochemie	97
2.4.3.2.	Indirekte Immunfluoreszenz	97
2.4.3.3.	Der anti-TNF- α Antikörper	100
2.4.3.4.	Der anti-iNOS Antikörper	100
2.4.3.5.	Der anti-nNOS Antikörper	100
2.4.3.6.	Immunzytochemisches Protokoll	101
2.4.3.7.	Nachweis der Spezifität der Primärantikörper	103
2.4.3.8.	Auswertung und Dokumentation der Immunzytochemie	103
2.4.4.	Messung der Zytokine	104
2.4.4.1.	Stimulation der Zellkultur und Abnahme der Kulturüberstände	104
2.4.4.2.	Bioassays	105
2.4.4.3.	Passagieren der WEHI-Zelllinie	105
2.4.4.4.	Passagieren der B9-Zelllinie	106
2.4.4.5.	Der TNF- α Bioassay	106
2.4.4.6.	Die Auswertung des TNF- α Bioassays	109
2.4.4.7.	Der IL-6 Bioassay	110
2.4.4.8.	Die Auswertung des IL-6 Bioassays	112
2.4.4.9.	Statistische Auswertung der Zytokin-Daten	113
3.	ERGEBNISSE	114
3.1.	Zellkultur	114
3.2.	Der Einfluss der PAMPs auf die $[Ca^{2+}]_i$ von Zellen der Area postrema	116
3.2.1.	LPS	116
3.2.2.	MDP	119
3.2.3.	FSL-1	121
3.2.4.	PI:PC	123

3.3. Der Einfluss der PAMPs auf die Freisetzung von bioaktiven Zytokinen (TNF-α, IL-6) aus Zellen der primären Zellkultur der Area postrema	126
3.3.1. Stimulation der AP Zellen mit LPS	127
3.3.1.1. Messung von TNF- α im Bioassay nach Inkubation mit LPS	127
3.3.1.2. Messung von IL-6 im Bioassay nach Inkubation mit LPS	128
3.3.1.3. Immunzytochemische Detektion von TNF- α in Mikrogliazellen	129
3.3.2. Stimulation der AP Zellen mit FSL-1	132
3.3.2.1. Messung von TNF- α im Bioassay nach Inkubation mit FSL-1	132
3.3.2.2. Messung von IL-6 im Bioassay nach Inkubation mit FSL-1	133
3.3.3. Stimulation der Zellen der AP mit PI:PC	134
3.3.3.1. Messung von TNF- α im Bioassay nach Inkubation mit PI:PC	135
3.3.3.2. Messung von IL-6 im Bioassay nach Inkubation mit PI:PC	136
3.4. Toleranzerscheinungen der AP- Zellkultur gegenüber LPS	137
3.4.1. Auswirkungen der wiederholten Stimulation mit LPS auf die $[Ca^{2+}]_i$ der AP-Zellkultur	137
3.4.2. Auswirkungen einer Vorinkubation der AP-Zellkultur mit LPS für 18 Stunden auf die $[Ca^{2+}]_i$	139
3.4.3. Auswirkungen einer Vorinkubation mit MDP oder FSL-1 auf die LPS-induzierte Änderung der $[Ca^{2+}]_i$ der AP-Zellkultur	141
3.4.4. Auswirkungen einer Vorinkubation mit LPS für 18 Stunden auf die Freisetzung Zytokinen aus Zellen der primären Zellkultur der AP	144
3.4.4.1. Die Messung von TNF- α im Bioassay nach Vorinkubation mit LPS	144
3.4.4.2. Die Messung von IL-6 im Bioassay nach Vorstimulation mit LPS	146
3.5. Der Einfluss von Zytokinen auf die $[Ca^{2+}]_i$ von Zellen der AP	147
3.5.1. TNF- α	147
3.5.2. IL-1 β	150

3.6. Der Einfluss von NO (Stickstoff-Monoxid) auf die $[Ca^{2+}]_i$ von Zellen der AP	153
3.6.1. Immunzytochemischer Nachweis von iNOS und nNOS in Zellen der AP-Zellkultur	153
3.6.2. Effekt des NO-Donors DEA auf die $[Ca^{2+}]_i$ von Zellen der AP	156
4. DISKUSSION	159
4.1. Zellen der AP als potentielle Sensoren für zirkulierende PAMP's	161
4.1.1. LPS induziert eine Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ in Zellen der AP	161
4.1.2. MDP und FSL-1 führen zu keiner nennenswerten Veränderung der $[Ca^{2+}]_i$ in Zellen der AP	163
4.1.3. PI:PC induziert eine Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ in Zellen der AP	165
4.2. Zirkulierende PAMPs induzieren eine Freisetzung von Zytokinen (TNF-α, IL-6) aus einer primären Zellkultur der AP	166
4.2.1. Die Messung von TNF- α und IL-6 im Überstand der AP Zellkultur nach Stimulation mit LPS, FSL-1 oder PI:PC	166
4.2.2. LPS-induzierte Freisetzung von TNF- α aus Mikrogliazellen der AP	168
4.3. Die Entwicklung einer Toleranz gegenüber Pyrogenen in einer primären AP Zellkultur	170
4.3.1. Die Entwicklung einer „Endotoxin-Toleranz“	170
4.3.2. Toleranzentwicklung gegenüber LPS	170
4.3.3. Kreuztoleranz zwischen LPS, MDP und FSL-1	172
4.4. Zellen der AP als potentielle Sensoren für zirkulierende Zytokine	174
4.4.1. TNF- α induziert eine Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ in Zellen der AP	175
4.4.2. IL-1 β induziert eine Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ in Zellen der AP	176
4.5. Zellen der AP als potentielle Sensoren für NO, einem sekundären Botenstoff bei Inflammation	179
4.5.1. NO induziert eine Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ in Zellen der AP	179
4.5.2. Die Expression von nNOS und iNOS in Zellen der AP Zellkultur	180

4.6. Ausblick	182
5. ZUSAMMENFASSUNG	184
6. SUMMARY	186
7. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	188
8. LITERATURVERZEICHNIS	191
9. ANHANG	222
9.1. Publikationen	222
9.2. Danksagung	223
9.3. Erklärung	224

1. Einleitung

Man kennt heute ein Vielzahl gut untersuchter Regelkreise und kontrollierter Lebensprozesse im Säugetierorganismus. Unabhängig davon, wie komplex diese Prozesse in den einzelnen Kompartimenten des Körpers auch ablaufen, dienen sie meist nur einem Ziel: der Aufrechterhaltung des physiologischen Gleichgewichts, der sogenannten „Homöostase“.

An geradezu allen dieser vitalen homöostatischen Vorgänge sind bestimmte Botenstoffe beteiligt, die im Blut zirkulieren. Diese kann man ganz allgemein in Hormone und Botenstoffe des Immunsystems unterteilen. Zur großen Gruppe der Hormone zählt beispielsweise das Angiotensin II. Es kontrolliert neben seinem Einfluss auf das Trinkverhalten von Säugetieren über das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System den Wasserhaushalt, und ist des weiteren an der Blutdruckregulation beteiligt. Insulin und Glucagon wirken als Hauptakteure im Glukosestoffwechsel. Dem Peptidhormon Leptin wird wegen seiner lipostatischen Eigenschaft eine große Bedeutung im Energiehaushalt zugesprochen. Neben einer ganzen Reihe weiterer zirkulierender Hormone, die an Stoffwechsel-, Energie-, Thermo- und Wasserhaushalt beteiligt sind, existieren auch zirkulierende Botenstoffe des aktivierten Immunsystems. Diese treten vermehrt im Zusammenhang mit Inflammation und Krankheitsprozessen im Körper auf, werden jedoch auch teilweise unter physiologischen Bedingungen exprimiert.

Im Blutkreislauf zirkulierende Stoffe, die in der Lage sind, medizinisch relevante zentralnervös kontrollierte Krankheitssymptome (z.B. Fieber) auszulösen, werden als Pyrogene bezeichnet. Diese kann man prinzipiell in exogene und endogene Pyrogene unterscheiden. Exogene Pyrogene sind bestimmte Komponenten von Bakterien, Viren, Pilzen, chemischen Stoffen oder Fremdproteinen. Eines der bekanntesten bakteriellen Pyrogene ist wohl das Lipopolysaccharid (LPS) gramnegativer Bakterien. Bei den endogenen Pyrogenen handelt es sich um Polypeptide oder Proteine, die von körpereigenen Zellen produziert werden. Auslösende Faktoren hierfür können beispielsweise exogene Pyrogene oder auch Antigen-Antikörper-Komplexe sein. Zu den endogenen Pyrogenen gehören vor allem die Zytokine (Tumor

Nekrose Faktor- α , Interleukin-1, Interleukin-6), aber auch Chemokine wie der Lymphozyten-aktivierende Faktor (LAF) oder das Makrophagen-Inflammatorische Protein-1 (MIP-1).

Sowohl exogene als auch endogene Pyrogene lösen im infizierten Säugerorganismus eine Reihe charakteristischer Reaktionen aus, die unter dem Begriff „Akute Phase Antwort“ (APR) zusammengefasst werden. Innerhalb dieses Vorgangs kommt es neben hämatologischen und metabolischen Veränderungen im Körper auch zu einer Anpassung vitaler homöostatischer Funktionen, die zentralnervös kontrolliert werden. Im weiteren Verlauf folgt die Bildung so genannter „Akute-Phase-Proteine“ in der Leber, die als Mediatoren einen regulatorischen Einfluss auf die Immunantwort besitzen. Symptome der APR sind Adipsie und Anorexie, Gewichtsverlust und Fieber. Des Weiteren kommt es zu einer Aktivierung der Hypothalamo-Hypophysen-Nebennieren-Achse (HPAA) und Verhaltensänderungen wie Apathie, Somnolenz und Verlust der Libido, die zusammenfassend als „sickness-behavior“ bezeichnet werden (Dantzer, 2001; Marvel *et al.*, 2004).

Wie aber kommt es zu diesen zentralnervös vermittelten Krankheitssymptomen aufgrund von im Blut zirkulierenden Substanzen? Im Verlauf der letzten Jahre manifestierte sich die Theorie, dass im Rahmen lokaler und systemischer Inflammationen von immunkompetenten Zellen freigesetzte proinflammatorische Zytokine wie Interleukin-1 β (IL-1 β), Interleukin-6 (IL-6) und Tumor Nekrose Faktor- α (TNF- α) als afferente Botenstoffe des aktivierten Immunsystems an das ZNS agieren (Roth & De Souza, 2001). Dieser Signalweg wird auch als „humorale Fieberhypothese“ bezeichnet (Roth *et al.*, 2004).

In letzter Zeit verdichten sich aber die Hinweise dafür, dass bakterielle, virale oder andere Pathogene selbst über Moleküle verfügen, die eine direkte Beeinflussung des Gehirns bereits vor einer massiven Bildung zirkulierender Zytokine erreichen können. Bei diesen in englischer Sprache als „pathogen-associated-molecular pattern“ (PAMPs) bezeichneten Molekülstrukturen handelt es sich beispielsweise um Lipopolysaccharide (LPS) gramnegativer Bakterien, Peptidoglykane bzw. Muramyl-Dipeptid (MDP) grampositiver Bakterien, Lipopeptide von Mycoplasmen, aber auch bakterielle DNA oder virale doppelsträngige RNA. Für derartige Molekülstrukturen verfügt das angeborene

Immunsystem über eine Reihe von Erkennungsmolekülen, die als „Toll-like-Rezeptoren“ (TLRs) bezeichnet werden (Aderem & Ulevitch, 2000; Knapp *et al.*, 2002). Es existieren bereits einige Studien darüber, die belegen, dass solche TLRs auch im Gehirn exprimiert werden (Aderem & Ulevitch, 2000; Laflamme *et al.*, 2001; Rivest, 2003), was darauf hindeutet, dass zirkulierende PAMPs tatsächlich einen direkten Einfluss aufs Gehirn haben könnten. Dabei stellt sich jedoch die Frage, ob und wie es diesen Molekülstrukturen überhaupt möglich ist, die sehr dichte Blut-Hirn-Schranke zu überwinden, um jene TLRs zu aktivieren. Die folgenden Kapitel dieser Arbeit sollen sich ausführlich mit dieser Fragestellung beschäftigen.

1.1. Signalwege zur inflammatorischen Aktivierung des Gehirns

Die Frage nach den Signalwegen zur inflammatorischen Aktivierung des Gehirns soll im folgenden mit Hilfe von experimentellen Fiebermodellen näher erläutert werden. Dabei kommt es im Rahmen des „sickness behavior“ zu Fieber, das als Merkmal einer Aktivierung des ZNS infolge eines inflammatorischen Reizes aus der Körperperipherie gesehen werden kann. Wie gelangen diese Fieber induzierenden Signale nun von der Peripherie ins Gehirn?

Allgemein können hierzu zwei Kommunikationswege unterschieden werden (Roth & De Souza, 2001). Auf der einen Seite wird der humorale Weg beschrieben, der mittels verschiedener Mediatoren wie Zytokinen oder Prostaglandinen aus dem Blutkreislauf zu einer zentralnervösen Aktivierung führt. Auf der anderen Seite gibt es den nervalen Weg, der inflammatorische Signale über nervale Afferenzen transportiert.

1.1.1. Der humorale Weg zur Aktivierung des Gehirns (Humorale Fieberhypothese)

Die Voraussetzung für diese Theorie ist, dass Zytokine wie TNF- α , IL-1 β und IL-6 als humorale Mediatoren des Fiebers angesehen werden können (Kluger, 1991; Zeisberger & Roth, 1998), die vermehrt als Antwort auf einen inflammatorischen Reiz im Körper gebildet werden. Die Zytokin-vermittelte Wirkung führt unter anderem zu einer Verschiebung des thermoregulatorischen Sollwerts („set-points“) in der präoptischen hypothalamischen Region, die als Kontrollzentrum der Thermoregulation angesehen wird (Scammell *et al.*, 1996). Wie gelangen nun diese 15-25 kDa großen hydrophilen Stoffe durch die relativ dichte Blut-Hirn-Schranke ins ZNS? Zur Beantwortung dieser Frage bestehen vier verschiedene Hypothesen:

Die erste Möglichkeit ist, dass im Blut zirkulierende Zytokine über sogenannte „Sensorische zirkumventrikuläre Organe“ (sCVOs), die durch eine unvollständige Blut-Hirn-Schranke gekennzeichnet sind, ins Gehirn gelangen (McKinley *et al.*, 2003; Roth *et al.*, 2004) und dort an spezifische Zytokinrezeptoren binden. Als „Eintrittspforte“ in diese CVOs spielt dabei die Fenestrierung des Gefäßendothels eine große Rolle, auf die später noch näher eingegangen werden soll.

Eine weitere Möglichkeit ist, dass die Zytokine nicht durch die BHS gelangen, sondern mit spezifischen endothelialen (Matsumura & Kobayashi, 2004) oder perivaskulären (Schiltz & Sawchenko, 2003) Rezeptoren interagieren und ihre Wirkung über bestimmte „second messenger“ (NO oder Prostaglandine) vermittelt wird.

Als dritter Weg der Passage von Zytokinen ins Gehirn werden aktive Transportsysteme beschrieben. Diese Zytokintransporter existieren für TNF- α , IL-1 β ebenso wie für IL-6 (Banks *et al.*, 1995), haben aber aufgrund ihrer schnellen Sättigung und geringen Transportleistung nur eine untergeordnete Bedeutung. Als letztes können Zytokine auch über aktivierte T-Zellen die BHS passieren, allerdings spielt dieser Transportweg quantitativ auch nur eine vergleichsweise geringe Rolle (Neumann & Wekerle, 1998).

1.1.2. Der nervale Weg zur Aktivierung des Gehirns (Nervale Fieberhypothese)

Bei vorausgehenden Experimenten zur Fieberentstehung wurde häufig LPS als potenter Auslöser der Zytokinkaskade systemisch appliziert. Dabei fiel sehr deutlich auf, dass das daraufhin entstandene Fieber biphasisch ist (Romanovsky *et al.*, 1998). Bereits vor dem Erscheinen von signifikant erhöhten Zytokinspiegeln (TNF- α , IL-6) im Blut kommt es nach LPS Stimulation zu einem ersten Fieberanstieg (Roth & De Souza, 2001). Ein vergleichbarer erster Fieber-Peak wurde auch nach systemischer Applikation des Fibroblastenstimulierenden Lipopeptids-1 (FSL-1) beschrieben (Greis *et al.*, 2007). Aus diesem Grund begann man, die humorale Fieberhypothese als alleinigen Übertragungsweg von inflammatorischen Signalen zum Gehirn in Frage zu stellen und suchte nach Alternativen.

Im Verlauf der letzten Jahre hat sich noch eine weitere Theorie zur inflammatorischen Aktivierung des ZNS durchgesetzt. Diese geht davon aus, dass nervale Afferenzen über den *Nervus vagus* aber auch aus afferenten sensorischen Hautnerven (Ross *et al.*, 2000) zum Gehirn geleitet werden und dort die Kaskade des zentralnervös gesteuerten „sickness behavior“ einleiten. In vielen Studien an vagotomierten Tieren konnte gezeigt werden, dass Symptome des „sickness behaviors“ induziert durch LPS- oder Zytokingabe vollständig fehlten oder zumindest teilweise unterdrückt werden konnten (Blatteis & Sehic, 1997; Dantzer, 2001; Roth & De Souza, 2001). Man geht davon aus, dass die afferenten vagalen Nervenfasern im *Nucleus tractus solitarius* (NTS) enden (Dantzer, 2001), von wo aus das inflammatorische Signal über den Botenstoff Noradrenalin zur präoptischen Region weitergeleitet wird. Infolge dessen kommt es dort zur Ausschüttung von Prostaglandin E₂ (PGE₂) und der Entstehung von Fieber (Sehic *et al.*, 1996b).

Ein weiteres Indiz für die nervale These ist die Expression von Rezeptoren für IL-1 β und PGE₂ auf vagalen sensorischen Neuronen (Ek *et al.*, 1998). In einer vorausgegangen Studie wird IL-1 als potentestes Zytokin zur Aktivierung der HPA-Achse (HPAA) beschrieben und ihm außerdem eine große Bedeutung im Rahmen einer schnellen Immunantwort zugesprochen (Kapcala *et al.*, 1995). Diese IL-1 β -bedingte Aktivierung der HPAA kann durch Neutralisierung des

Zytokins über einen IL-1-Antikörper vollständig unterbunden werden (Fleshner *et al.*, 1995). Dabei geht man davon aus, dass IL-1 β unter lokalen inflammatorischen Bedingungen freigesetzt wird und an Rezeptoren an vagalen Nervenfasern bindet. Diese Bindung löst Aktionspotentiale aus, die mit den vagalen Fasern im NTS enden und dort zur Freisetzung von Glutamat führen (Mascarucci *et al.*, 1998). Das freigesetzte Glutamat aktiviert katecholaminerge Neurone im NTS, was zu einer Signalübertragung zum *Nucleus paraventricularis* (PVN) und in die präoptische Region (Sawchenko & Swanson, 1982; Ericsson *et al.*, 1994) und letztendlich zu einer Aktivierung der HPAAs und anderen zentralnervös kontrollierten Krankheitssymptomen führt. In diesem Zusammenhang konnte auch gezeigt werden, dass die Freisetzung von IL-1 β im Gehirn als Antwort auf einen peripheren inflammatorischen Stimulus mit LPS oder IL-1 β in vagotomierten Tieren stark unterdrückt wird (Laye *et al.*, 1994; Hansen *et al.*, 1998).

Eine weitere Theorie wurde von Blatteis (Blatteis, 2006) vorgestellt. Diese beschreibt die Aufnahme von LPS in die Kupfferzellen der Leber durch Phagozytose und eine anschließende Aktivierung des Komplementsystems. Dabei kommt es zur Freisetzung des Komplementfaktors C5a, der wiederum die Kupfferzellen zur Ausschüttung von PGE₂ anregt, welches über eine Stimulation vagaler Afferenzen zum NTS eine weitere Signalübertragung zur präoptischen Region und somit die Entstehung von Fieber zur Folge hat.

1.2. Die Zirkumventrikulären Organe (CVOs) und die Blut-Hirn-Schranke

Die Zirkumventrikulären Organe (CVOs) stellen wichtige Strukturen im Gehirn aller Wirbeltiere dar (Abbildung 1). Ihren Namen verdanken sie ihrem direkten Kontakt zum Ventrikelsystem des Gehirns. Sie besitzen eine ausgeprägte Vaskularisation und sind besonders durch eine fehlende Blut-Hirn-Schranke gekennzeichnet (Hofer, 1958). Prinzipiell kann man eine Unterscheidung in sensorische und sekretorische CVOs treffen (Price *et al.*, 2008). Zu den sensorischen CVOs (sCVOs) gehören das Subfornikalorgan (SFO), das *Organum vasculosum lamiae terminalis* (OVLT) und die *Area postrema* (AP).

Die sekretorischen CVOs umfassen die *Eminentia mediana* (ME), die Neurohypophyse (NL), das Subcommisuralorgan (SCO), den Mittellappen der Adenohypophyse und die Epiphyse (PIN). Einige Autoren zählen auch die *Plexus choroidei* der vier Ventrikel zu den zirkumventrikulären Organen (Cottrell & Ferguson, 2004). In den folgenden Kapiteln soll näher auf die sensorischen CVOs eingegangen werden.

Eine Besonderheit der sensorischen CVOs ist, dass sie im Gegensatz zu den restlichen CVOs selbst neuronale Zellkörper besitzen. Diese werden direkt den chemischen Verhältnissen des zirkulierenden Blutes ausgesetzt und können über efferente Signale mit anderen Bereichen des ZNS kommunizieren (McKinley *et al.*, 2003; Fry & Ferguson, 2007). Nicht nur das Fehlen der Blut-Hirn-Schranke, sondern auch das Vorhandensein von spezifischen Rezeptoren zur Bindung von Hormonen, Neurotransmittern und Neuropeptiden kennzeichnen die sensorischen Eigenschaften von OVLT, SFO und AP (McKinley *et al.*, 2003). Neben spezifischen Zytokinrezeptoren für TNF- α , IL-1 β und IL-6 (Ericsson *et al.*, 1995; Vallieres & Rivest, 1997; Nadeau & Rivest, 1999a) besitzt jedes der drei sensorischen CVOs sogenannte *Toll-like-Rezeptoren* (TLRs), die über zirkulierende PAMPs aktiviert werden können (Aderem & Ulevitch, 2000; Laflamme & Rivest, 2001; Laflamme *et al.*, 2001). Aufgrund dieser speziellen Eigenschaften agieren die sCVOs als geeignete Eintrittspforten für zirkulierende Zytokine oder für Pathogen-assoziierte Moleküle, gewissermaßen als „Fenster zum Gehirn“.

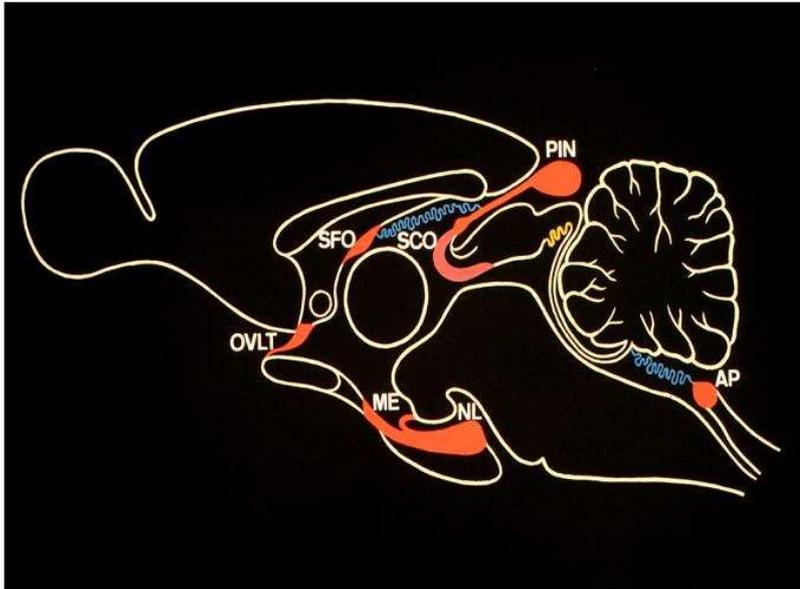


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Lage der Zirkumventrikulären Organe in einem Sagittalschnitt durch das Rattengehirn. Die Strukturen mit offener Blut-Hirnschranke sind rot dargestellt. (AP= Area postrema; ME= Eminentia mediana; NL= Neurohypophyse; OVLT= Organum vasculosum lamina terminalis; PIN= Pinealorgan; SCO= Subcommisuralorgan; SFO= Subfornikalorgan)

Das SFO sowie das OVLT sind als Bestandteile der *Lamina terminalis* in der vorderen Wand des dritten Ventrikels lokalisiert. Beide Strukturen sind in die Regulation des kardiovaskulären Systems und des Flüssigkeitshaushalts im Organismus involviert. Diese homöostatischen Funktionen werden überwiegend über das Renin-Angiotensin-System vermittelt (Haywood *et al.*, 1983; Mangiapane & Brody, 1987; Song *et al.*, 1992). Des Weiteren sind SFO und OVLT auch am Reproduktionszyklus beteiligt, wobei insbesondere die Sekretion von Gonadotropin-Releasing-Hormon (GnRH) geregelt wird (Limonta *et al.*, 1981; Piva *et al.*, 1982). Wie bereits erwähnt, kommt beiden sCVOs eine wichtige Rolle bei der Vermittlung inflammatorischer Signale aus der Peripherie zum Gehirn zu. Sie gelten als Zielregionen für exogene und endogene Pyrogene. Läsionen des ventralen Anteils der Lamina terminalis, welche das OVLT enthält (Blatteis *et al.*, 1983), ebenso wie des SFO (Takahashi *et al.*, 1997) führen zu einer Abschwächung des Fiebers nach systemischer Injektion von LPS.

1.2.1. Die besondere Rolle der *Area postrema* im Organismus

Die *Area postrema* (AP) als das am meisten caudal gelegene sensorische CVO ist Bestandteil der Wand des vierten Ventrikels und als membranartige Struktur auf der dorsalen Oberfläche der Medulla oblongata lokalisiert. Sie befindet sich in unmittelbarer Nähe zum *Nucleus tractus solitarius* (NTS).

Ihre Existenz wurde bereits 1906 als „Nucleus postremus“ (Wilson, 1906) beschrieben. Später untersuchte man zunächst einmal ihre Eigenschaft als „Chemo-Trigger-Zone“, als Auslöser des Erbrechens (Borison & Brizzee, 1951; Carpenter *et al.*, 1983; Miller & Leslie, 1994).

Im Laufe der letzten Jahre entdeckte man jedoch noch eine Vielzahl weiterer Funktionen der AP. So ist sie als Bestandteil des dorsalen vagalen motorischen Komplexes an der Regulation des Kreislaufs und des Wasserhaushalts beteiligt, wobei u.a. Angiotensin II und Vasopressin eine große Rolle spielen (Cox *et al.*, 1990; Bishop & Sanderford, 2000; Xue *et al.*, 2003).

Ein jüngeres Feld der Forschung beschäftigt sich außerdem mit dem Einfluss der AP auf die Nahrungsaufnahme und metabolische Prozesse im Organismus. In diesem Zusammenhang reagiert die AP sensorisch auf zirkulierendes Amylin, welches gemeinsam mit Insulin postprandial aus dem exokrinen Pankreas ausgeschüttet wird. Im Zuge dieses Geschehens kann das Amylin seine starken anorektischen Eigenschaften entfalten (Riediger *et al.*, 2001; Riediger *et al.*, 2004). Zudem wird der AP eine Beteiligung an der Steuerung der Sekretion von Ghrelin aus Zellen der Magenwand zugesprochen, das wiederum selbst die Sekretion von exokrinen Pankreasenzymen stimuliert (Li *et al.*, 2006a).

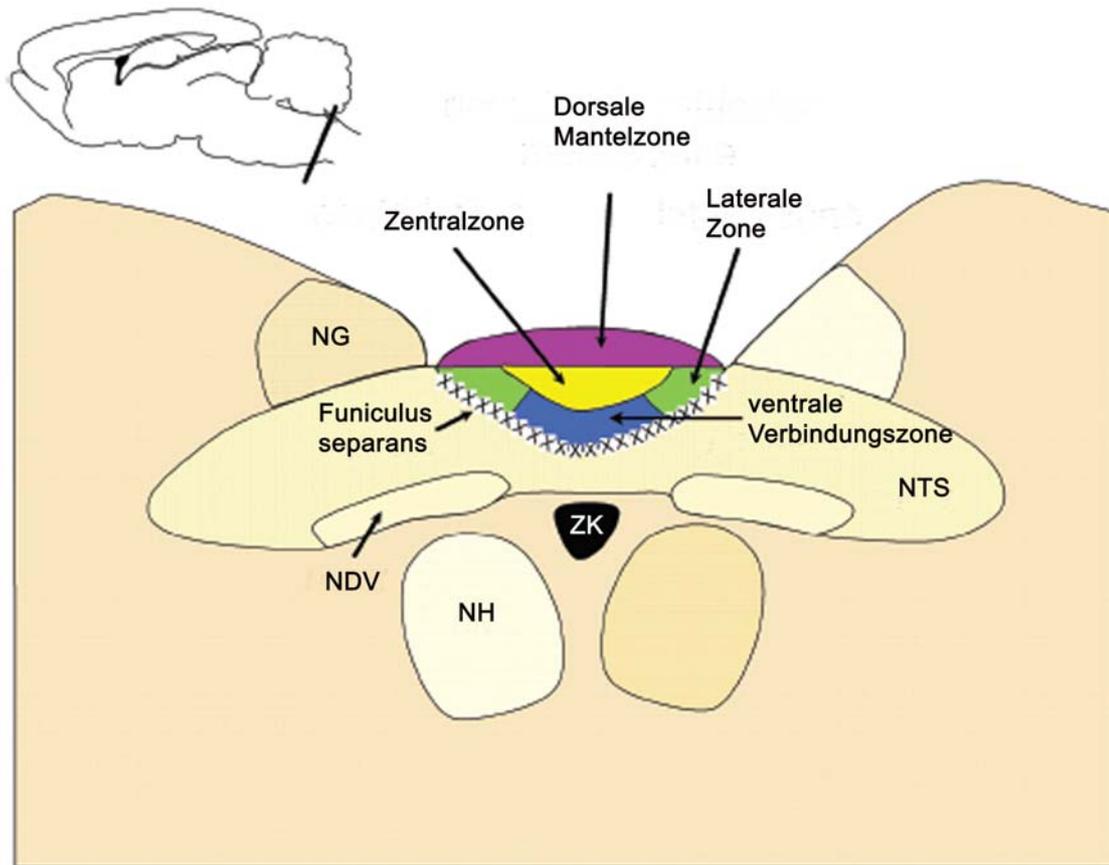


Abbildung 2: Topographische Lage der AP und ihre Unterteilung in verschiedene Zonen. Die dorsale Zone und Zentralzone bestehen überwiegend aus Neuronen, während die ventrale Zone vor allem Gliazellen enthält. (NTS= Nucleus tractus solitarius; NG= Nucleus gracillis; NDV= Nucleus dorsalis des Nervus vagus; NH= Nucleus hypoglossus; ZK= Zentralkanal) (Abbildung modifiziert nach Price *et al.* 2008)

Die AP der Ratte ist nur einfach angelegt, während sie bei höheren Säugetieren wie Kaninchen und Primaten eine bilaterale Struktur aufweist. Anatomisch kann man sie in drei Zonen unterteilen: die dorsale Mantelzone, die Zentralzone und ventrale Zone (McKinley *et al.*, 2003). Letztere besteht wiederum aus der ventralen Verbindungszone und der Lateralzone (Abbildung 2). Während dorsale Mantelzone und Zentralzone reich an Neuronen und deren Axonen, umgeben von Ependymzellen sind, besteht die Ventralzone überwiegend aus Gliazellen (McKinley *et al.*, 2003; Price *et al.*, 2008). Neuronale Tracing-Studien der letzten Jahre haben gezeigt, dass die AP den Großteil ihrer Efferenzen zum NTS und parvozellulären Neuronen des *Nucleus paraventricularis* (PVN) weiterleitet (Vigier & Portalier, 1979; Leslie & Osborne, 1984), einen kleineren Anteil jedoch auch zum *Nucleus ambiguus*, zu dorsalen Kerngebieten des *Nervus vagus* und zu dorsalen tegmental Kerngebieten (Shapiro & Miselis, 1985). Afferente Signale erhält die AP vor allem vom NTS und dem PVN (van der Kooy & Koda, 1983; Shapiro & Miselis, 1985). Zusammen mit dem NTS übernimmt die AP eine bedeutende integrative Rolle in der Verarbeitung sensorischer Afferenzen des *Nervus vagus* und *Nervus glossopharyngeus*.

In Anknüpfung an die vorher geschilderten afferenten und efferenten Verschaltungen der AP wird auch ihre komplexe Bedeutung in der Vermittlung inflammatorischer Signale deutlich. Bei näherer Betrachtung laufen in der AP beide Wege zur Aktivierung zentralnervös kontrollierter Krankheitssymptome zusammen. Auf der einen Seite kann es auf humoralem Wege durch zirkulierende Zytokine wie TNF- α , Interleukin-1 oder Interleukin-6 zur Übertragung des inflammatorischen Reizes kommen. Diese könnten durch die fehlende BHS in die AP gelangen und dort an ihre spezifischen Rezeptoren auf AP-Neuronen binden (Ericsson *et al.*, 1995; Nadeau & Rivest, 1999a). Auf der anderen Seite wäre eine Signalübertragung aus der Peripherie über Hautnerven, vor allem aber über afferente Bahnen des *Nervus vagus* denkbar, was ebenfalls eine Aktivierung der HPAA (Ericsson *et al.*, 1994) und dem damit verbundenen „sickness behavior“ zur Folge hätte .

1.2.2. Die Blut-Hirn-Schranke und die besonderen Gegebenheiten in den sensorischen zirkumventrikulären Organen

Alle CVOs und damit auch die AP sind durch das Fehlen der Blut-Hirn-Schranke (BHS) gekennzeichnet. Die BHS dient als physiologische Barriere zwischen dem zentralen Nervensystem und dem Blutkreislauf des Organismus. Das Endothel der Kapillaren besitzt keine Fenestrierung, seine einzelnen Komplexe sind stattdessen durch sehr dichte „tight junctions“ verbunden (Abbott *et al.*, 2006). Zusätzlich sind die Endothelzellen im Gehirn meist von Astrozyten umgeben, deren Ausläuferenden sich aneinander anlagern und so ein weiteres „Filternetz“ bilden (Betz, 1986; Abbott *et al.*, 2006), das fast impermeabel ist (Abbildung 3 rechts). Somit kann die BHS sehr gut ihrer Aufgabe gerecht werden, das Milieu im Gehirn aufrecht zu erhalten und es vor im Blut zirkulierenden Krankheitserregern, Toxinen oder Botenstoffen zu schützen.

Einige Substanzen können dennoch die BHS überwinden, dies kann auf vier verschiedenen Wegen passieren: erstens durch Diffusion, was aber lediglich Gasen und einigen wenigen hydrophoben Substanzen möglich ist. Als zweite Möglichkeit gibt es selektive Transportmechanismen z.B. für Leptin (Banks & Kastin, 1996) oder Insulin (Baura *et al.*, 1996). Die dritte Variante ist über eine endotheliale Informations-Translation möglich, die z.B. für den Signalweg des Adiponektins beschrieben ist (Spranger *et al.*, 2006; Paton *et al.*, 2007). Hierbei bindet das Adiponektin, welches die BHS nicht durchdringen kann, an spezifische Rezeptoren am Endothel, was auf der Seite des ZNS zur Aktivierung von Zytokinen führt. Als letzten Übertragungsweg ist der Eintritt zirkulierender Moleküle durch die sCVOs ins ZNS zu nennen, der für die vorliegenden Arbeit von größter Bedeutung ist.

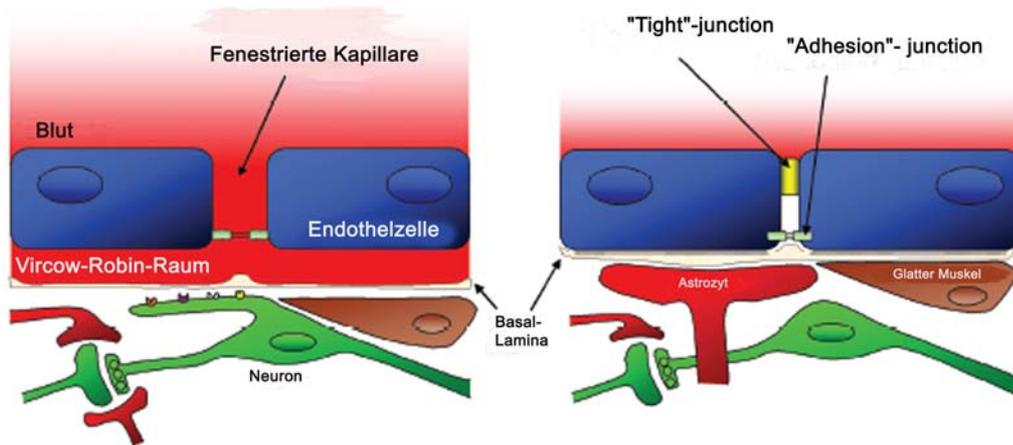


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Blut-Hirn-Schranke. Auf der linken Seite ist die offene BHS in den sCVOs dargestellt. Charakteristisch ist das fenestrierte Endothel und die Ausbildung der Virchow-Robin-Räume, in denen die Neurone direkten Kontakt zu zirkulierenden Botenstoffen haben. Rechts eine intakte BHS mit „tight“-junctions und „Adhesion“-junctions, die das Endothel geradezu impermeabel machen. Neurone haben hier keinen direkten Kontakt zu im Blut zirkulierenden Substanzen (Abbildung modifiziert nach Price *et al.* 2008).

Alle drei sCVOs besitzen eine ausgeprägte Vaskularisation. Die Endothelzellen ihrer Kapillaren sind fenestriert, da ihnen die vorher beschriebenen „tight junctions“ fehlen (Petrov *et al.*, 1994). Des Weiteren besitzen die Blutgefäße in den sCVOs eine spezielle Architektur. Diese kommt zum einen dadurch zustande, dass durch das Fehlen der „tight junctions“ größere Zwischenräume zwischen den Endothelzellen entstehen, zum anderen, dass der Abstand des Endothels hin zur Basallamina der ependymalen Seite vergrößert ist (Abbildung 3 links). Diese Zwischenräume werden auch als „Virchow-Robin-Räume“ bezeichnet (Gross, 1991). Eine weitere wichtige Eigenschaft der sCVOs ist die große Dichte an spezifischen Rezeptoren für eine ganze Reihe zirkulierender Botenstoffe. Diese erlauben eine Interaktion mit Hormonen, Zytokinen, aber auch mit körperfremden Stoffen, sogenannten exogenen Pyrogenen.

Man kann also zusammenfassend feststellen, dass die besonderen strukturellen Verhältnisse im Kapillarnetz der sCVOs eine Kommunikation zwischen Körperperipherie und Gehirn begünstigen.

1.3. Aktivierung des angeborenen Immunsystems durch Pathogen-assoziierte Moleküle (PAMPs)

Man kann das Immunsystem von Säugetieren generell in zwei Bereiche unterteilen, nämlich in das angeborene oder auch unspezifische Immunsystem und in das adaptive, spezifische Immunsystem. Beide Systeme werden sowohl bei infektiösen, als auch autoimmunbedingten Krankheitsprozessen im Organismus aktiviert und können untereinander interagieren. Während bei einer spezifisch-humoralen Immunantwort überwiegend B-Lymphozyten zur Bildung Antigen-spezifischer Antikörper und zur Differenzierung von Gedächtniszellen stimuliert werden, stellen die Zellen des angeborenen Systems eine weniger spezifische, aber doch sehr wichtige erste Reaktion des Körpers auf eindringende Pathogene dar. Zu diesen Zellen des angeborenen Immunsystems zählen mononukleäre Zellen wie Monozyten und Makrophagen, ebenso wie neutrophile Granulozyten. Diese erkennen Mikroorganismen anhand von speziellen strukturellen Bestandteilen, die von einer breiten Masse von Bakterien, Viren, Pilzen und Parasiten exprimiert werden. Die Strukturen werden als Pathogen-assoziierte Moleküle oder auch als „Pathogen-associated molecular patterns“ (PAMPs) bezeichnet. Die Rezeptoren des angeborenen Immunsystems, die zur Erkennung der PAMPs notwendig sind, nennt man „pattern recognition receptors“ (PRRs) (Prinz *et al.*, 2003; Kielian *et al.*, 2005b; Schnare *et al.*, 2006). Mikrogliazellen stellen die residenten mononukleären Phagozyten des ZNS dar. Damit nehmen sie einen wichtigen Platz innerhalb der unspezifischen Immunabwehr des ZNS ein und können durch die Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen und Chemokinen eine nachgeschaltete Zytokin-Kaskade aktivieren. Innerhalb dieser Kaskade kommt es neben der Übertragung inflammatorischer Signale in andere Bereiche des Gehirns auch zu einer vermehrten Expression des „major histocompatibility complexes“ (MHCs) zur Antigen-Präsentation. Zudem bilden Mikrogliazellen im Rahmen infektiöser Prozesse im Organismus mit Hilfe der induzierbaren Stickstoff-Monoxid-Synthase (iNOS) beachtliche Konzentrationen an Stickstoff-

Monoxid (NO), das wiederum eine mikrobizide Wirkung aufweist (Carpentier *et al.*, 2008).

1.3.1. Die Pathogen-associated-molucular patterns (PAMPs)

Die sogenannten „Pathogen-associated molecular pattern“ (PAMPs) sind ganz deutlich vom Begriff des „Antigens“ abzugrenzen. So beschreiben zwar beide Begriffe Substanzen, die vom lebenden Organismus als körperfremd angesehen werden, es besteht jedoch ein markanter Unterschied in ihrer Wirkung auf das Immunsystem. Ein Antigen verfügt in der Regel über mehrere antigene Determinanten, die als Epitope bezeichnet werden (de Gruyter, 2002). Diese Epitope sind meist sehr spezifisch. Aus diesem Grund kann das humorale Immunsystem auch spezifische Antikörper gegen nur dieses Antigen und damit gegen eine bestimmte Spezies von Mikroorganismen bilden. PAMPs hingegen werden als invariable Strukturen bezeichnet, die essentiell für physiologische Vorgänge von Mikroorganismen und deren Überleben sind. Im Gegensatz zu Epitopen sind diese Strukturen jedoch nicht spezifisch, sondern sind bei einer breite Masse von Bakterien, Viren, Pilzen oder Parasiten als morphologisches Merkmal gleich ausgebildet (Schnare *et al.*, 2006). Zu diesen Pathogen-assoziierten Molekülen zählen Proteine, Carbohydrate, Nucleinsäuren, Lipide oder auch Kombinationen dieser Stoffe, die sowohl im Zellinneren, als auch auf der Oberfläche lokalisiert sein können. Zellen, die zur Erkennung von PAMPs befähigt sind, gehören zum angeborenen Immunsystem. Die Erkennung erfolgt über Toll-like-Rezeptoren (TLRs) (Aderem & Ulevitch, 2000; Knapp *et al.*, 2002), die zur Gruppe der PRRs gehören und auf die später noch genauer eingegangen werden soll (siehe: Kapitel 1.3.2.). Eine direkte Aktivierung von Zellen im Bereich der sensorischen zirkumventrikulären Organe durch PAMPs scheint aufgrund der Existenz von TLRs in den spezialisierten Gehirnstrukturen möglich und könnte einen weiteren, schnellen Weg zur Übermittlung inflammatorischer Signale in das ZNS beinhalten (Laflamme & Rivest, 2001).

1.3.1.1. Lipopolysaccharid (LPS)

Als eines der bekanntesten PAMPs stellt das Lipopolysaccharid (LPS) einen wichtigen Bestandteil in der äußeren Zellmembran gram-negativer Bakterien dar. Das auch als Endotoxin bezeichnete Molekül ist für einen Organismus nicht toxisch, so lange es fest in der Bakterienmembran gebunden ist. Seine toxische Wirkung entfaltet es erst, wenn es durch ein massives Absterben oder Lyse von gram-negativen Bakterien freigesetzt wird (Van Lenten *et al.*, 1986; Hellman *et al.*, 2000). Das relativ thermostabile LPS besteht aus vier verschiedenen Teilen: dem Lipid A, dem Polysaccharidanteil mit der inneren und äußeren Kernregion und der O-spezifischen Seitenkette. Dabei stellt das Lipid A die Komponente des LPS dar, die das angeborene Immunsystem aktiviert (Abbildung 4). Es besteht aus sechs oder mehr Fettsäureresten, die mit zwei phosphorilierten Glukosaminzuckern verbunden sind.

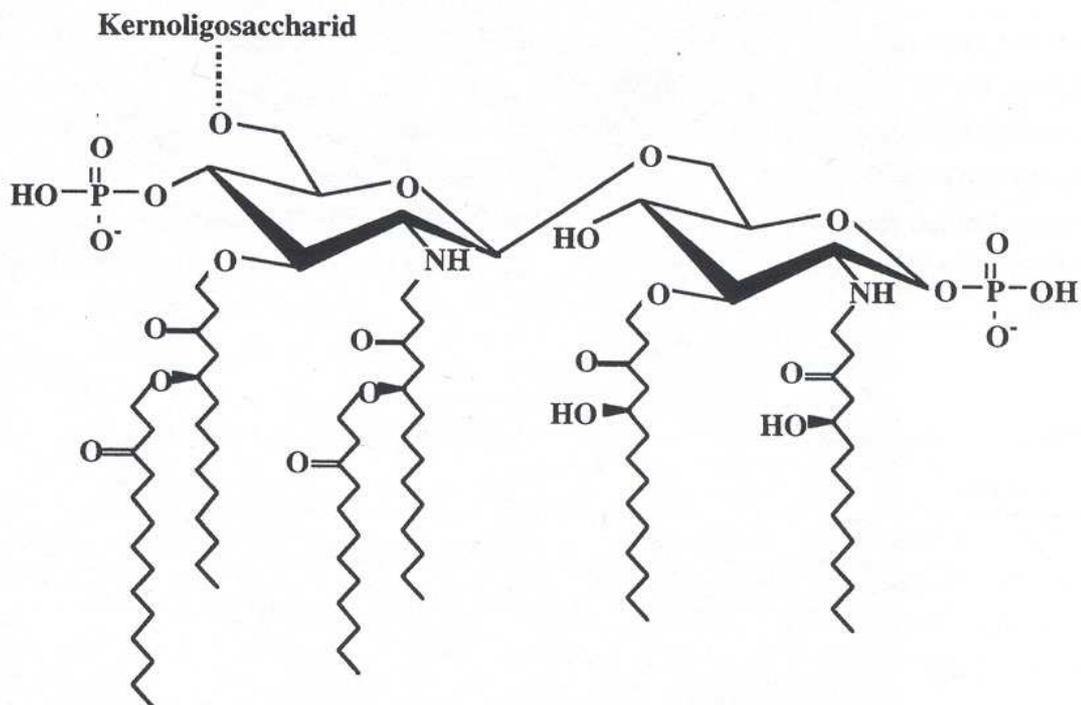


Abbildung 4: Das Lipid A stellt die Komponente des LPS dar, die das angeborene Immunsystem aktiviert.

Gelangt LPS in den Körper lebender Organismen, so kann es dort die Bildung von proinflammatorischen Zytokinen wie TNF- α und IL-1 β (Kluger, 1991) und IL-6 (Zeisberger & Roth, 1993) auslösen. Weitere Studien der letzten Jahre beschreiben zudem, dass IL-1 β und IL-6 die Freisetzung des Lipopolysaccharid-Bindungs-Proteins (LBP) induzieren können (Grube *et al.*, 1994; Wan *et al.*, 1995). Dabei handelt es sich um ein Akut-Phase-Protein, das vor allem aus der Leber, zum Teil aber auch aus Lunge, Nieren und Herz freigesetzt wird und mit einer hohen Affinität an das Lipid A des LPS bindet. Der so entstandene LPS-LBP-Komplex kann in großen Mengen vorliegen und seine stimulatorische Wirkung auf die Induktion von Zytokinen wie TNF- α und IL-1 β , wird als 1000fach potenter als für LPS allein beschrieben (Raetz *et al.*, 1991).

Als weitere molekulare Struktur zur Bindung von LPS ist der CD14-Rezeptor (CD=Cluster of differentiation) zu nennen. Er kann sowohl membrangebunden auf allen myeloischen Zellen wie B-Zellen, Hepatozyten, Fibroblasten und Mikrogliazellen (Peterson *et al.*, 1995; Liu *et al.*, 1998; Nanbo *et al.*, 1999), als auch in löslicher Form auftreten, wodurch auch Epithel- und Endothelzellen unter Einfluss von LPS aktiviert werden können (Golenbock *et al.*, 1995).

Da dem CD14 aber eine transmembrane Signaldomäne fehlt, vermutete man noch einen anderen Rezeptor zur zellulären Aktivierung durch LPS (Wright *et al.*, 1990). Die Antwort auf diese Frage brachte später die Entdeckung der Toll-like-Rezeptoren (TLRs). Zur Detektion von LPS gram-negativer Bakterien ist vor allem der TLR-4 verantwortlich (Heine *et al.*, 1999; Hirschfeld *et al.*, 2000). Wenn CD14 und LPS gemeinsam an den TLR-4 binden, entsteht so ein membrangebundener Rezeptorkomplex, der eine transmembranäre Signaldomäne besitzt. Diese Bindung aktiviert über das Adaptorprotein MyD88 die gleiche zelluläre Signalkasade, wie auch IL-1 β (Laflamme & Rivest, 2001; Rivest, 2003). Auf den genaueren Ablauf dieser Signalübertragung soll jedoch in einem späteren Kapitel eingegangen werden (siehe: Kapitel: 1.3.2).

Im Körper kann LPS auch an das High-Density-Lipoprotein (HDL) gebunden werden (Tobias *et al.*, 1985), was zum einen seine Erkennung am Rezeptor behindert (Munford & Dietschy, 1985), zum anderen seine stimulierende Wirkung zur Bildung proinflammatorischer Zytokine aufhebt (Ulevitch *et al.*, 1981).

1.3.1.2. Das Phänomen der Endotoxintoleranz

Endotoxintoleranz ist definiert als reduzierte Immunantwort eines lebenden Wirtes (*in vivo*) oder von kultivierten Makrophagen- oder Monozytenkulturen (*in vitro*), auf die wiederholte Exposition mit einem Endotoxin wie z.B. LPS (Fan & Cook, 2004). Dabei werden eine unvollständige oder vollständige Unterdrückung von Fieber, ein Ausbleiben weiterer Symptome des „sickness behaviors“ und eine verminderte Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen als Merkmale einer Endotoxintoleranz gewertet.

Prinzipiell unterscheidet man zwei Phasen der Endotoxintoleranz (Greisman *et al.*, 1966). Bei der ersten Phase handelt es sich um eine Toleranz gegenüber LPS, die sich unmittelbar nach LPS-Injektion einstellt. Sie ist transient, also vorübergehend und abhängig vom Lipid-A des LPS. Bei der zweiten Phase handelt es sich um einen immunologischen Prozess des Organismus, bei der das zelluläre Immunsystem spezifische Antikörper gegen die O-spezifische Seitenkette des LPS bildet. Da sich die vorliegende Arbeit jedoch schwerpunktmäßig mit Mechanismen des angeborenen Immunsystems beschäftigt, soll an dieser Stelle nur auf die erste Phase der Endotoxintoleranz eingegangen werden.

Die wiederholte Applikation von LPS führte in vielen Versuchen zu einer Unterdrückung des Fiebers (Roth *et al.*, 1994) und zu einer verminderten Freisetzung proinflammatorischer Zytokine wie TNF- α , IL-1 β und IL-6 (Nakamori *et al.*, 1995; Roth *et al.*, 1997; Shemi & Kaplanski, 2005). Basierend auf diesen Ergebnissen versuchte man anschließend, diese Endotoxintoleranz therapeutisch zu nutzen, um beispielsweise den Krankheitsverlauf eines septischen Schocks abzuschwächen oder eine Reinfektion mit demselben Krankheitserreger zu verhindern (Broad *et al.*, 2006). Dazu war es wichtig, die Mechanismen zur Entstehung einer Endotoxintoleranz zu erforschen, was sich letztendlich jedoch als multifaktorielles und sehr komplexes Geschehen darstellte.

Zunächst vermutete man eine „Down-Regulation“ verschiedener Rezeptoren, die in die LPS-abhängige Signalübertragung involviert sind. Diese Vermutung konnte jedoch nicht bestätigt werden. So wurde gezeigt, dass die CD14-Expression bei einer Monozyten-Zelllinie nach Vorinkubation mit LPS nicht

beeinflusst (Mathison *et al.*, 1993) oder sogar hochreguliert (Ziegler-Heitbrock *et al.*, 1994a) wurde. Ähnliches publizierte eine andere Arbeitsgruppe für den TLR-4, der unter LPS-Einfluss ebenfalls vermehrt exprimiert wird (Medvedev *et al.*, 2002). Das genaue Gegenteil fanden Nomura *et al.* heraus, die zeigen konnten, dass der TLR-4 unter Einfluss von LPS auf Makrophagen herunter reguliert wird und machen diesen Vorgang verantwortlich für die Endotoxintoleranz in Verbindung mit LPS (Nomura *et al.*, 2000). Eine verantwortliche Rolle des LPS-Bindungsproteins (LBP) konnte im Zusammenhang mit Endotoxintoleranz ausgeschlossen werden (Heagy *et al.*, 2003).

Versuche mit dem Pertussis-Toxin (PTx), welches ein potenter Gi-Protein-Hemmer ist, zeigten eine Hemmung der LPS-induzierten „extracellular signal-regulated kinase“ (ERK1/ERK2) und weiterer MAP-Kinasen, die in die Gi-Protein-gekoppelte Signaltransduktion verwickelt sind (Makhlouf *et al.*, 1998; Tempel *et al.*, 2001). Dies deutet auf eine Beteiligung der Gi-Proteine in die Entstehung einer Endotoxintoleranz hin.

Eine wichtige Rolle in der Ausbildung einer Toleranz gegenüber LPS wird für IRAK-M („IL-1-Receptor associated kinase-M“) beschrieben. Hierzu konnte Kobayashi in einer Studie belegen, dass IRAK-M die Dissoziation von IRAK und IRAK-4 vom Adaptermolekül MyD88 verhindert und so eine für die Signalkaskade unerlässliche Bildung eines IRAK-TRAF-6-Komplexes blockiert (Kobayashi *et al.*, 2002). IRAK-M wird unter LPS-Einfluss vermehrt exprimiert und hemmt sozusagen als „negatives Feedback“ die weitere LPS-TLR-4-MyD88-Signalkaskade.

Auch die sogenannten „SOCS“ (Suppressor of Cytokine Signalling) werden unter LPS-Exposition schnell freigesetzt und haben einen hemmenden Effekt auf die LPS-Signalübertragung. Ihre Wirkung vermitteln die SOCS über eine direkte Bindung an IRAK und verhindern so eine Expression von NFκB (Kinjyo *et al.*, 2002; Nakagawa *et al.*, 2002).

Der Transkriptionsfaktor NFκB („nuclear factor κB“) wird durch LPS aktiviert und führt im Zellkern zur Expression von Genen, die eine Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen bewirken (Fan & Cook, 2004). Physiologischerweise liegt NFκB als Heterodimer aus einer 50 kDa und einer 65 kDa Untereinheit vor. In LPS-toleranten Tieren zeigt sich jedoch ein

vermehrtes Vorkommen von NF κ B als Homodimer von zwei 50 kDa Untereinheiten (Ziegler-Heitbrock *et al.*, 1994b), das als inaktive Form keine Freisetzung von Zytokinen induzieren kann.

Im Verlauf von Endotoxintoleranz kommt es jedoch nicht nur zu einer verringerten Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen. Anti-inflammatorische Zytokine wie IL-10 werden unter Anwesenheit von LPS vermehrt gebildet (Frankenberger *et al.*, 1995) und scheinen nicht unbeteiligt an einer Toleranzentwicklung zu sein. Auch ST2, einem hemmenden Protein aus der TLR-Kaskade, wird eine Beteiligung an der Entstehung einer Endotoxintoleranz zugesprochen (Brint *et al.*, 2004).

Verschiedene Studien der letzten Jahre beschäftigen sich mit der Rolle von Ca²⁺ im Rahmen von Endotoxintoleranz (siehe auch: Kapitel 1.6). Hierzu beschreiben Beck *et al.* (Beck *et al.*, 2008), dass LPS an dem nichtselektiven Ca²⁺-Rezeptor „TRPM4“ den Ca²⁺-Einstrom hemmt und es so zu in einer verminderten Responsivität von Mikrogliazellen gegenüber weiteren exogenen Stimuli kommt. Eine weitere Arbeitsgruppe postulierte eine Ca²⁺-abhängige Zytokinfreisetzung aus Mikrogliazellen und bestätigt ebenfalls eine Ca²⁺-abhängige Refraktärphase dieser Zellen als Schutzmechanismus vor einer überschießenden Immunreaktion (Hoffmann *et al.*, 2003).

Man muss zusammenfassend feststellen, dass das Phänomen der Endotoxintoleranz durch keinen der vorher genannten Mechanismen allein zustande kommt, sondern wahrscheinlich ein komplexes Zusammenspiel vieler einzelner Vorgänge ist. Zudem empfiehlt es sich zu unterscheiden, ob die jeweiligen Untersuchungen zur Toleranzentwicklung *in vivo*, also innerhalb eines vollständigen Organismus, oder *in vitro* an einzelnen Zellen durchgeführt wurden.

Nachfolgend stellt sich die Frage, ob eine Toleranzentwicklung auch zwischen unterschiedlichen exogenen Pyrogenen möglich ist. Dieser auch als Kreuztoleranz bezeichneten Erscheinung versuchte man ebenfalls in einigen wenigen Studien auf den Grund zu gehen.

Eine Kreuztoleranz zwischen LPS und MDP (Muramylidipeptid) bezüglich der Fieberentstehung und einer Freisetzung von TNF- α und IL-6 konnte weder im

Kaninchen (Soszynski *et al.*, 1991), noch im Meerschweinchen (Roth *et al.*, 1997) gezeigt werden.

Bei Untersuchungen zur Kreuztoleranz zwischen LPS und MALP-2 (Makrophagen-stimulierendes Lipopeptid-2) führte eine zweimalige Behandlung von Makrophagen mit MALP-2 zu einer Hyporesponsivität gegenüber LPS. Hierbei zeigten die untersuchten Zellen eine verminderte TNF- α -Freisetzung (Sato *et al.*, 2000). Zudem kam es bei den MALP-2-vorbehandelten Zellen nach Stimulation mit LPS, zu einer reduzierten Aktivierung von NF κ B und der c-Jun-Kinase (Sakurai *et al.*, 2002), was für eine bestehende Kreuztoleranz zwischen den beiden PAMPs spricht.

Eine Kreuztoleranz zwischen LPS oder MDP und dem TLR-3 Agonisten PI:PC (Polyriboinosin-Polyribocytosinsäure) wurde bisher noch nicht beschrieben. Eine Studie zeigt aber, dass die Anwesenheit von PI:PC nicht nur den eigenen TLR-3 an Mikrogliazellen hochreguliert, sondern auch die Expression von TLR-2 und TLR-4 (Carpentier *et al.*, 2005). Dies könnte ein Indiz für eine Interaktion der vorher beschriebenen PAMPs an den Rezeptoren der jeweils anderen Pyrogene sein. Auch die Tatsache, dass sich LPS und PI:PC den alternativen TRIF-abhängigen Signalweg zur inflammatorischen Aktivierung von Zielzellen teilen, stellt eine Option zur weiteren Erforschung einer möglichen Kreuztoleranz zwischen diesen beiden PAMPs dar.

1.3.1.3. Muramyl-dipeptid (MDP)

Das Muramyl-dipeptid (MDP) ist eine Untereinheit des Peptidoglycans (PGN), das wiederum ein Zellwandbestandteil von Bakterien ist (Abbildung 5). Während gram-negative Bakterien nur von einer dünnen Schicht PGN umgeben sind, stellt das PGN eine vielschichtige Umhüllung der Zytoplasmamembran von gram-positiven Bakterien dar (Morath *et al.*, 2002a; Morath *et al.*, 2002b). Das PGN besteht aus Polysaccharidketten, in denen alternierend die Bausteine N-Acetylglucosamin und N-Acetylmuraminsäure vorkommen, die (1-4)- β -glykosidisch verbunden sind (Dinarello *et al.*, 1978).

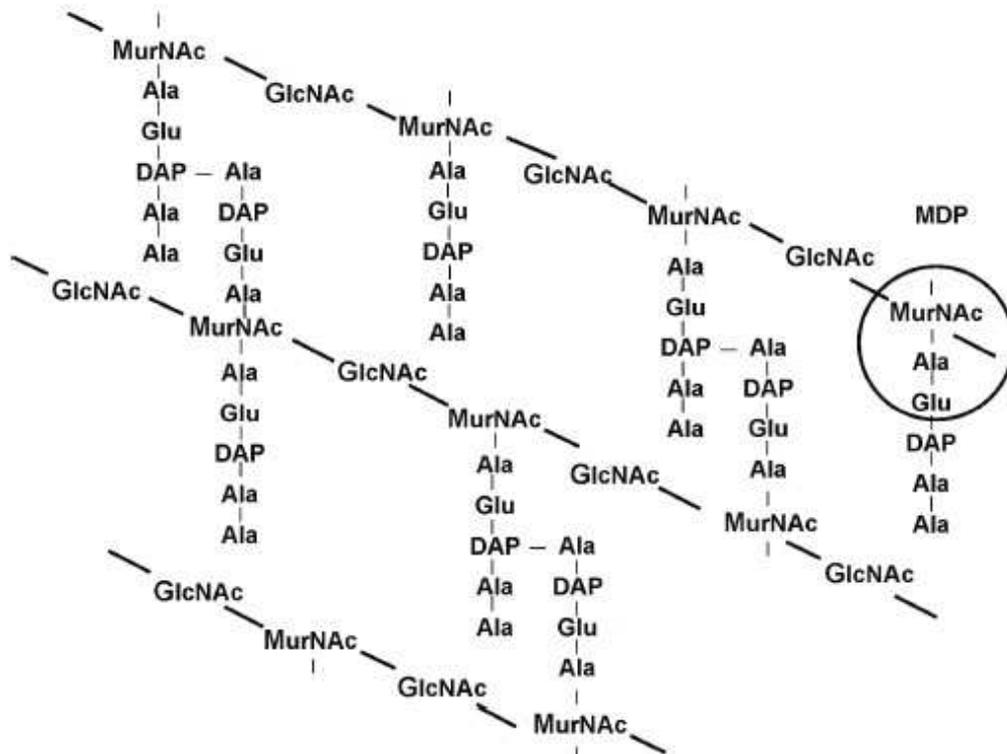


Abbildung 5: Die alternierend angeordneten Bausteine N-Acetylglucosamin und N-Acetylmuraminsäure bilden die Struktur des Peptidoglycans (PGN). (Traub *et al.*, 2006)

Muramylpeptide haben einen großen immunmodulatorischen Einfluss auf den Organismus. Sie werden im Rahmen von Wachstumsvorgängen und während der Zellteilung von Bakterien, sowie Antibiotikabehandlung und durch lytische Enzyme der körpereigenen Abwehr aus der Bakterienhülle freigesetzt.

Neben seiner stimulierenden Wirkung auf das angeborene Immunsystem (Phillips *et al.*, 1987) verstärkt MDP als Adjuvans auch die Bildung spezifischer Antikörper im Organismus. Des Weiteren soll MDP somnogen, also schlaffördernd wirken (Sarkar & Das, 1997). Diese Wirkung scheint im Zusammenhang damit zu stehen, dass MDP die Bildung von endogenen Pyrogenen wie TNF- α und IL-1 (Krueger & Majde, 1994; Chen *et al.*, 2004) und IL-6 (Roth *et al.*, 1997), induzieren kann. Auch andere Autoren beschreiben, dass MDP in der Lage ist, Symptome des „sickness behavior“ wie Fieber (Roth *et al.*, 1997), Gewichtsverlust und Appetitlosigkeit (Plata-Salaman, 1999), auszulösen.

Im Laufe der letzten Jahre wurde vor allem dem TLR-2 bei der MDP-vermittelten Aktivierung von glialen Zellen eine große Bedeutung

zugesprochen. In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass sowohl Astrozyten (Esen *et al.*, 2004), als auch Mikrogliazellen (Esen & Kielian, 2005) den TLR-2 exprimieren, und dass dieser im Rahmen einer Infektion mit *Staphylococcus aureus* die Ausschüttung von inflammatorischen Mediatoren wie TNF- α und NO vermittelt (Kielian *et al.*, 2005b). Unterstützt würde diese These vor allem dadurch, dass MDP in der Lage ist, die Transkription der MyD88 mRNA auszulösen, was ein wichtiges Adaptormolekül für TLRs ist (Yang *et al.*, 2001). Ebenso wie für LPS am TLR-4, wird CD14 für PGN am TLR-2 eine Funktion als Co-Rezeptor zugesprochen (Remer *et al.*, 2006). Dabei kommt dem TLR-2-CD14-Rezeptorkomplex bei inflammatorischen Prozessen innerhalb des ZNS eine wichtige Bedeutung zu. So wurde unter anderem die TLR-2-abhängige Aktivierung von Astrozyten (Bsibsi *et al.*, 2007) unter Anwesenheit von löslichem CD14 beschrieben.

Neuere Studien beschreiben noch eine weitere Gruppe von intrazellulären Rezeptoren, die in der Lage sind, MDP zu binden und damit antibakterielle Prozesse zu aktivieren: die sog. „nukleotide-binding oligomerization domains“ (NODs). Hierbei spielt für die Erkennung von MDP die NOD-2 eine entscheidende Rolle, die mit Hilfe des „receptor interacting-protein-2“ (RIP-2) eine Kaskade aktiviert, die letztendlich zu einer Freisetzung von TNF- α und IL-1 β führt (Windheim *et al.*, 2007).

Über die Wertigkeit der vorher beschriebenen Rezeptoren zur Vermittlung inflammatorischer Signale aufgrund zirkulierender Zellwandkomponenten von gram-positiven Bakterien, wie z.B. das MDP, ist man sich nicht einig. Einige Autoren beschreiben jedoch ein komplexes Zusammenspiel aller dieser Rezeptoren als Immunantwort auf zirkulierendes MDP und PGN (Traub *et al.*, 2006), was in Anbetracht der publizierten Befunde auch sehr plausibel erscheint.

1.3.1.4. Fibroblasten-stimulierendes Lipopeptid-1 (FSL-1)

Das Fibroblasten-stimulierende Lipopeptid-1 (FSL-1) ist ein Mycoplasma-spezifisches diacyliertes Lipopetid, welches synthetisch auf der Basis der N-terminalen Sequenz von *Mycoplasma salivarium* hergestellt wird (Okusawa *et al.*, 2004). Es ist verwandt mit dem Makrophagen-stimulierenden Lipopeptid-2 (MALP-2). Die beiden PAMPs unterscheiden sich lediglich in der Aminosäuresequenz und in der Länge des Peptidanteils. FSL-1 besitzt zwei durch Esterbindung verbundene Fettsäuren, die an den Pam₂Cys-Anteil gebunden sind, und einen freien N-Terminus (Abbildung 6).

Die Erkennung von FSL-1 im Organismus erfolgt über ein Heterodimer der TLRs 2 und 6 (Takeda *et al.*, 2002).

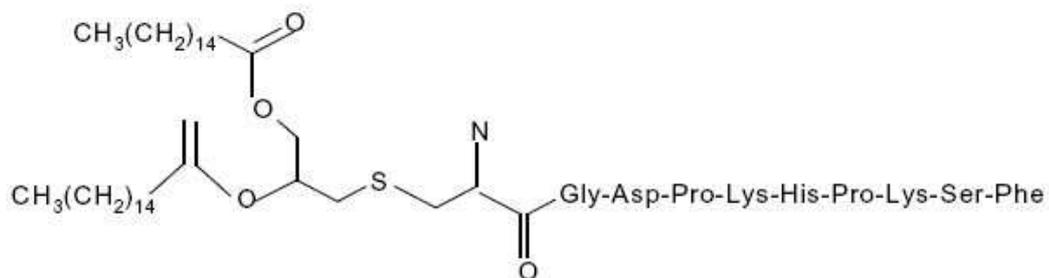


Abbildung 6: Die Strukturformel des FSL-1. Das mycoplasmale Lipopeptid besitzt zwei durch Esterbindung verbundene Fettsäuren, die an den Glyceryl-Cys-Anteil gebunden sind, und einen freien N-Terminus am Ende des Peptidanteils.

Es wurde gezeigt, dass FSL-1 humane gingivale Fibroblasten (HGF) zur Induktion proinflammatorischer Zytokine und zur Expression des interzellulären Adhäsionsmoleküls-1 (ICAM-1) stimulieren kann (Nakamura *et al.*, 2002).

Nach systemischer Applikation kann FSL-1 in Ratten und Meerschweinchen Fieber, sowie die Ausschüttung von TNF- α und IL-6 (Hubschle *et al.*, 2006; Greis *et al.*, 2007) und Symptome des „sickness behavior“ auslösen (Hubschle *et al.*, 2006).

1.3.1.5. Polyriboinosin-Polyribocytosinsäure (PI:PC)

Polyriboinosin-Polyribocytosinsäure (PI:PC) ist eine synthetisch hergestellte doppelsträngige virale RNA. Diese fällt als „Nebenprodukt“ bei der Replikation vieler bekannter Viren an (Jacobs & Langland, 1996). Schon sehr früh fand man heraus, dass PI:PC ein potenter Interferon- (IFN) Stimulator ist (Field *et al.*, 1967). In den folgenden Jahren beschäftigte man sich intensiv mit der pyrogenen Wirkung von PI:PC. Die auch als „exogenes Pyrogen“ bezeichnete Substanz ist in der Lage, Fieber in Kaninchen (Absher & Stinebring, 1969; Kimura *et al.*, 1994), Ratten (Chuang *et al.*, 1990; Fortier *et al.*, 2004) und Meerschweinchen (Cooper *et al.*, 1988; Voss *et al.*, 2006) auszulösen.

Für die PI:PC-abhängige Aktivierung des Organismus wird der TLR-3 als Mediator beschrieben (Alexopoulou *et al.*, 2001). Die dadurch aktivierte Signalkaskade ist MyD88-unabhängig (Carpentier *et al.*, 2008) und wird später noch ausführlich beschrieben (siehe: Kapitel 1.3.2.4).

Neben der Freisetzung von IFN moduliert PI:PC im Körper auch die Ausschüttung von Zytokinen wie TNF- α , IL-6, IL-1 β ins Blutplasma (Voss *et al.*, 2006; Cunningham *et al.*, 2007). Eine Bildung von Zytokinen innerhalb des ZNS auf systemische PI:PC-Gabe wird dominiert von IL-6 (Cunningham *et al.*, 2007). Doch auch TNF- α , IL-1 β und die Cyclooxygenase-2 (COX-2) konnten dort detektiert werden (Cunningham *et al.*, 2007; Voss *et al.*, 2007). Im Zusammenhang mit neuronaler Inflammation scheinen Astrozyten eine Schlüsselrolle einzunehmen. Hierzu zeigte (Farina *et al.*, 2005) eine Freisetzung von TNF- α und verschiedenen Chemokinen aus einer primären humanen Astrozytenkultur nach Stimulation mit PI:PC. Auch eine andere Arbeitsgruppe konnte die Bildung von TNF- α , IFN- β und IP-10 in Astrozyten durch Applikation von PI:PC induzieren (Park *et al.*, 2006). Hierzu wurde das PI:PC zum einen direkt ins Gehirn von Mäusen injiziert, zum anderen wurde eine Astrozyten-Zelllinie damit konfrontiert. In weiteren Studien wurde deutlich, dass PI:PC nicht nur in der Lage ist, eine vermehrte Expression des TLR-3 auszulösen, sondern auch anderer TLRs wie dem TLR-2 und -4 (Carpentier *et*

al., 2005). Eine Aktivierung des TLR-2 und –4 durch PI:PC wurde jedoch bisher nicht beschrieben.

Die vorausgegangenen Studien machen den TLR-3-Agonisten PI:PC interessant in Bezug auf neuroinflammatorische Prozesse, weshalb die Wirkung dieses PAMPs ebenfalls im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersucht werden sollte.

1.3.2. Die Toll-like Rezeptoren (TLRs)

Toll-like Rezeptoren (TLRs) gehören zur Familie der „Pattern recognition receptors“ (PRRs). Als Rezeptoren des angeborenen Immunsystems dienen sie der frühen Erkennung von im Körper zirkulierenden, pathogenen Bestandteilen (PAMPs) von Mikroorganismen wie Bakterien, Viren, Pilzen oder Parasiten. Aktuell sind 13 bekannte TLRs bei Säugetieren beschrieben, davon 11 beim Menschen (Uematsu & Akira, 2006). Jeder TLR ist dabei in der Lage, ein oder mehrere bestimmte PAMPs zu erkennen und eine nachgeschaltete Signalkaskade zu aktivieren (Tabelle 1). Der TLR-1 erkennt triacylierte Lipopeptide als Zellwandbestandteile von verschiedenen Bakterien (Omueti *et al.*, 2005). Der TLR-2 ist der Rezeptor, der die meisten PAMPs erkennt. Nach Bildung eines Heterodimers mit dem TLR-1 erkennt er triacylierte Lipoproteine, während er als Heterodimer mit dem TLR-6 auf diacylierte Lipopeptide wie z.B. Bestandteile von Mycoplasmen (Okusawa *et al.*, 2004) und Zymosan von Pilzen reagiert. Zur Erkennung von PGN, einem Zellwandbestandteil grampositiver Bakterien, spielt der TLR-2 eine wichtige Rolle. Der TLR-3 erkennt doppelsträngige RNA (dsRNA) von replizierenden Viren (Alexopoulou *et al.*, 2001; Carpentier *et al.*, 2008). Der wohl am besten erforschte TLR ist ohne Zweifel der TLR-4, der für die Erkennung des Lipopolysaccharid (LPS), ein Endotoxin gramnegativer Bakterien, verantwortlich ist (Takeuchi *et al.*, 1999). An der LPS-abhängigen Aktivierung des TLR-4 sind außerdem der Co-Rezeptor CD14 (Peterson *et al.*, 1995; Nanbo *et al.*, 1999) und das lösliche Molekül MD-2 (Shimazu *et al.*, 1999) beteiligt. Flagellin, ein monomeres Protein, das durch „self-assembly“ den Faden von Bakteriengeißeln bei gramnegativen und grampositiven Bakterien formt, wird vom TLR-5 erkannt (Hawn *et al.*, 2005). Wie bereits erwähnt, bildet der TLR-6 ein funktionelles Heterodimer mit

1 Einleitung

dem TLR-2 und erkennt so diacylierte Lipopopetide (Okusawa *et al.*, 2004). Zur Bindung dieser Lipopeptidstrukturen wie beispielsweise das MALP-2 oder FSL-1 könnte der spezifische Co-Rezeptor CD36 nötig sein (Hoebe *et al.*, 2005).

TLR-7 und TLR-8 sind verantwortlich für die immunmodulatorische Antwort auf einzelsträngige virale RNA (Diebold *et al.*, 2004), wobei der TLR-7 ebenfalls einzelsträngige RNA nichtviralen Ursprungs erkennt. Der Ligand des TLR-9 ist bakterielle und virale DNA, die eine CpG-reiche Domäne besitzt (Takeda *et al.*, 2003). Für den TLR-10 ist bis zum heutigen Tage kein Ligand bekannt (Takeda *et al.*, 2003; Kielian, 2006). Sowohl pathogene Bakterien des Urogenitaltrakts wie *E.coli*, als auch Bestandteile des Parasiten *Toxoplasma gondii* werden vom TLR-11 erkannt (Zhang *et al.*, 2004; Lauw *et al.*, 2005). Abschließend sind noch TLR-12 und -13 zu nennen, die CpG-reiche Oligodesoxynukleotide des Zytomegalievirus detektieren können (Heine & Lien, 2003).

Toll-like Rezeptoren	Liganden (PAMPs)
TLR-1	Triacylierte Lipopeptide
TLR-2	Lipoproteine/-peptide (gram+); Zymosan, MDP
TLR-3	Doppelsträngige RNA (viral: z.B. PI:PC, nicht viral)
TLR-4	Lipopolysaccharid (gram-); Taxol (pflanzlich)
TLR-5	Flagellin
TLR-6	Diacylierte Lipopeptide (zusammen mit TLR-2: MALP, FSL-1)
TLR-7	Einzelsträngige RNA (viral, nicht viral)
TLR-8	Einzelsträngige virale RNA
TLR-9	Doppelsträngige CpG-reiche DNA (viral, nicht viral)
TLR-10	???
TLR-11	Liganden aus Mikroorganismen des Urogenitaltrakts
TLR-12	CpG-reiche Oligodesoxynukleotide (viral)
TLR-13	CpG-reiche Oligodesoxynukleotide (viral)

Tabelle 1: Übersicht über die 13 bekannten TLRs und ihre Liganden

1.3.2.1. Die Signalübertragung durch Pathogen-assoziierte Moleküle (PAMPs) an den Toll-like Rezeptoren (TLRs)

Toll-like Rezeptoren besitzen eine extrazelluläre Domäne, die charakteristischerweise aus 18-31 Leucin-reichen „repeats“ besteht. Schon bald nach Entdeckung der TLRs fiel auf, dass ihre zytoplasmatische Signaldomäne der des Interleukin-1 Rezeptors (IL-1R) stark ähnelt (Anderson, 2000; Takeda *et al.*, 2003). Alle bekannten TLRs mit Ausnahme des TLR-3, bedienen sich genau wie der IL-1R, der Aktivierung des Adapterproteins MyD88 (myeloid differentiation factor 88), was letztendlich zu einer Aktivierung des Transkriptionsfaktors „nuclear factor κ B“ (NF κ B) führt (Abbildung 7). Das MyD88 besteht aus der C-terminalen TIR-domäne und einer N-terminalen „Todesdomäne“ (Medzhitov *et al.*, 1998).

Nach der Aktivierung des TLRs durch ein PAMP kommt es durch MyD88 zu einer Rekrutierung der IRAK4 (IL-1-R associated kinase), die wiederum eine Phosphorylierung von IRAK1 auslöst. Im Anschluss daran verbindet sich IRAK1 mit TRAF6 (TNF-receptor associated factor-6) und bildet so einen Komplex mit Ubiquitin-konjugierten Enzymen. Darauf folgt die Aktivierung der I κ B-Kinase (IKK), was eine Ablösung des NF κ B von seinem zytoplasmatischen Inhibitor I κ B bewirkt. Alternativ kann der IRAK-1-TRAF6-Komplex auch die „mitogen-activated protein kinase“ (MAPK) aktivieren, was über den Jun Kinase (JNK) – Signalweg zu einer Rekrutierung des AP-1 (Aktivatorprotein-1) führt. Danach können AP-1 und NF κ B in den Zellkern wandern und dort die Transkription von Genen induzieren, die letztendlich dann eine Bildung bzw. Freisetzung von Zytokinen wie TNF- α , IL-1 β oder IL-6, Chemokinen wie MCP-1 („monocyte chemoattractant protein-1“), sowie Komplementfaktoren und inflammatorischen Enzymen wie COX-2 oder iNOS (Medzhitov *et al.*, 1998; Glezer *et al.*, 2007) bewirken.

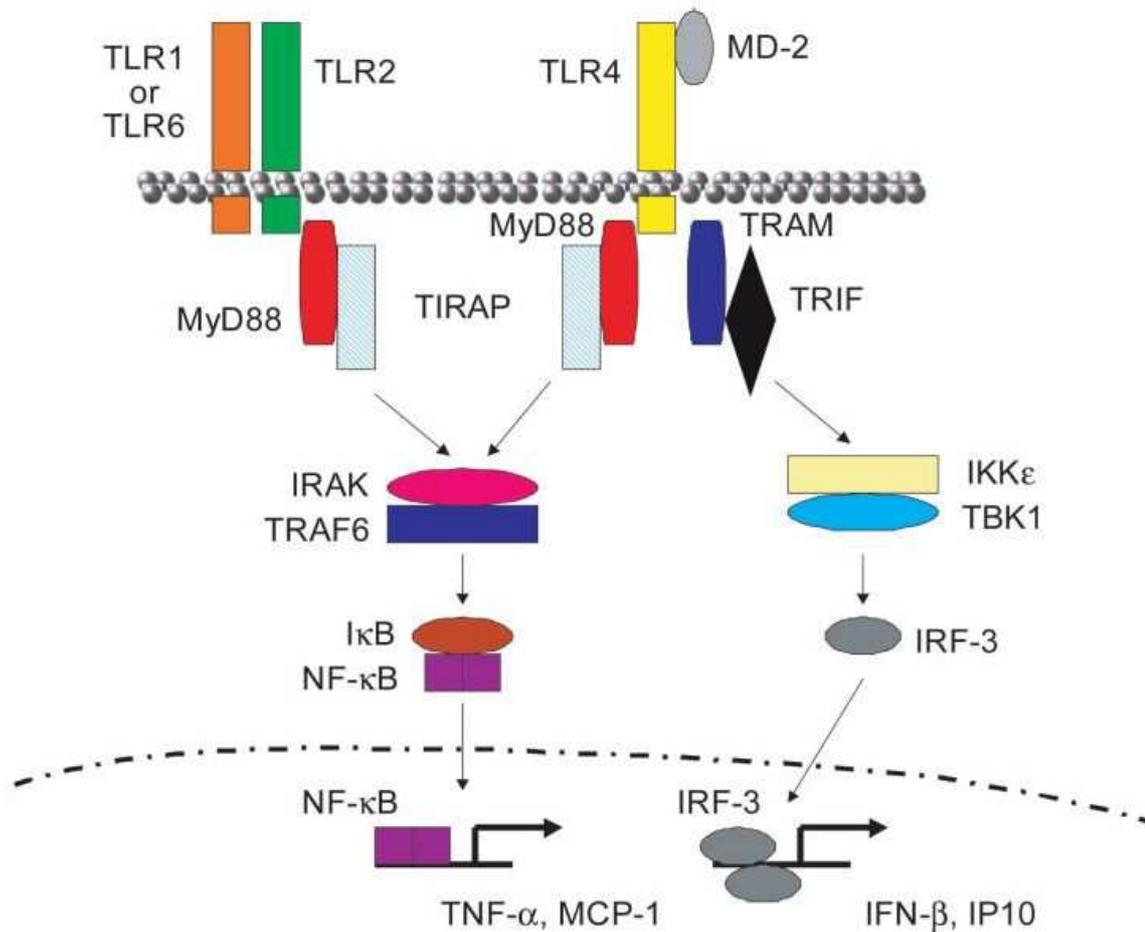


Abbildung 7: Schematische Darstellung der Signalkaskade der Toll-like Rezeptoren TLR-4 und TLR-2/6. Während der TLR-4 nach Bindung des LPS ein Homodimer bildet, kommt es nach Bindung mit MALP-2 oder FSL-1 am TLR-2 zur Ausbildung eines Heterodimers mit dem TLR-6. Bei beiden kommt es über eine Aktivierung des Adapterproteins MyD88 zur Bildung des IRAK-TRAF6-Komplexes, wodurch am Ende der Kaskade der Transkriptionsfaktor NFκB im Zellkern die Transkription von Genen auslöst, die eine Zytokinfreisetzung induzieren können. Für den TLR-3 und TLR-4 existiert noch ein alternativer Signalweg, der an TRIF gebunden ist. Hierbei löst der IRF-3 („interferon response-factor“) die Freisetzung von IFN-β und IP-10 aus. (Kielian, 2006)

Neben dem vorher beschriebenen MyD88-abhängigen Weg, existiert noch ein MyD88-unabhängiger Signalweg (Abbildung 7). Dieser kommt obligatorisch am TLR-3 vor und stellt für den TLR-4 eine alternative, aber langsamere Möglichkeit der Signalübertragung dar (Takeda & Akira, 2004; Yamamoto *et al.*, 2004).

1.3.2.2. Die Aktivierung des TLR-2 durch MDP/ PGN

Der TLR-2 übernimmt wichtige Funktionen in der Erkennung von Bestandteilen gram-positiver Bakterien. Zu seinen Liganden zählen unter anderem das Peptidoglykan (PGN), welches das MDP beinhaltet, die Lipoteichoid-Säure (LTA) und das Tripalmitoyl-S-Glycerol-Cystein (Pam3Cys) (Kielian 2002, Olson and Miller 2004, Chien 2005).

Eine Aktivierung des TLR-2 durch seine Liganden erfolgt mit Unterstützung des Co-Rezeptors CD14 (Remer *et al.*, 2006; Bsibsi *et al.*, 2007). Dieser Rezeptorkomplex aktiviert das Adapterprotein MyD88 und es folgt die in Kapitel 1.3.2.1. beschriebene Signalkaskade, bei der es letztendlich zur Aktivierung von NF κ B kommt, was eine Ausschüttung von proinflammatorischen Zytokinen zur Folge hat (Kielian, 2006; Carpentier *et al.*, 2008).

In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass sowohl Astrozyten (Esen *et al.*, 2004), als auch Mikrogliazellen (Esen & Kielian, 2005) den TLR-2 exprimieren, und dass dieser im Rahmen einer Infektion mit *Staphylococcus aureus* die Ausschüttung von inflammatorischen Mediatoren wie TNF- α und NO vermittelt (Kielian *et al.*, 2005b). Auch andere Arbeitsgruppen beschreiben den TLR-2 als verantwortlich für die immunogene Antwort von Mikrogliazellen, in Form von NO-Ausschüttung auf eine Infektion mit Streptokokken der Gruppe B (Lehnardt *et al.*, 2006). Uneinigkeit herrscht darüber, ob der TLR-2 nur den größeren Komplex PGN oder etwa auch seine Untereinheit MDP erkennen kann. Während Yang (Yang *et al.*, 2001) die MDP-abhängige Aktivierung von MyD88 am TLR-2 beschreibt, sind andere Autoren der Meinung, dass der TLR-2 zwar PGN (Van Amersfoort *et al.*, 2003; Esen *et al.*, 2004; Kielian *et al.*, 2005a) aber nicht MDP (Takada *et al.*, 2002) erkennt.

Als alternative Rezeptoren zu den TLRs im Zusammenhang mit MDP wurden in den letzten Jahren die NOD-Rezeptoren (siehe: Kapitel 1.3.1.3) propagiert (Traub *et al.*, 2006; Windheim *et al.*, 2007).

1.3.2.3. Die Aktivierung des TLR-2/6-Heterodimers durch FSL-1/ MALP

Zur Erkennung diacylierter Polypeptide mycoplastischen Ursprungs ist die Bildung eines Heterodimers von TLR-2 und-6 notwendig (Takeuchi *et al.*, 2001). So konnte gezeigt werden, dass TLR-6 KO Mäuse nicht auf das mycoplastische PAMP MALP-2 reagierten, im Gegensatz zu ihrer Kontrollgruppe. An der Aktivierung des TLR-2/6-Rezeptorkomplexes ist ebenfalls ein Co-Rezeptor beteiligt. Es handelt sich dabei um CD36, ein Oberflächenglykoprotein (Hoebe *et al.*, 2005), welches konstitutiv in die Zellmembran in sog. „lipid rafts“ eingebaut ist. Wenn nun FSL-1 am Rezeptor vorhanden ist, wird dieses an CD36 gebunden, worauf es zu einer Rekrutierung des bereits vorgebildeten TLR-2/6-Heterodimers in die „lipid rafts“ kommt. Auch diese Signaltransduktion löst wieder die Aktivierung von MyD88 und der dazugehörigen Signalkaskade aus (siehe: Kapitel 1.3.2.1). Parallel zum MyD88-abhängigen Signalweg kann es auch zu einer Internalisierung des FSL-1-TLR2/6-Komplexes und dessen Transport zum Golgi-Apparat kommen. Die genauere Bedeutung dieses Vorgangs ist aber noch unklar.

Im Zusammenhang mit inflammatorischen Bedingungen konnte gezeigt werden, dass FSL-1 die Freisetzung von MIP-1, IL-6 und IL-8 vermittelt. Die gleiche Studie beschreibt auch die Freisetzung von TNF- α aus Makrophagen nach Aktivierung mit FSL-1. In beiden Versuchsanordnungen konnte weiterhin dokumentiert werden, dass die Aktivierung durch FSL-1 abhängig vom TLR-2/6-Rezeptorkomplex ist (Nakamura *et al.*, 2002; Okusawa *et al.*, 2004). Zudem löst eine systemische Applikation des TLR-2/6-Agonisten FSL-1 in Meerschweinchen Fieber und eine Erhöhung der Plasmaspiegel von TNF- α und IL-6 aus (Greis *et al.*, 2007).

Der TLR-2 ebenso wie der TLR-6 werden beide von glialen Zellen des ZNS exprimiert (Bsibsi *et al.*, 2002; Olson & Miller, 2004), weshalb im Rahmen dieser Arbeit ebenfalls FSL-1 als Ligand dieser Rezeptoren untersucht werden sollte.

1.3.2.4. Die Aktivierung des TLR-3 durch doppelsträngige RNA

Ein Beispiel für doppelsträngige virale RNA ist das in vielen Experimenten verwendete Poly I: Poly C (PI:PC), welches synthetisch hergestellt wird und nach systemischer Applikation Fieber und die vermehrte Expression von TNF- α und IL-6 im Plasma bewirken kann (Voss *et al.*, 2006)

Wenn nun PI:PC an den TLR-3 bindet, wird eine Signalkaskade eingeleitet, die nicht der der anderen TLRs entspricht (Carpentier *et al.*, 2008). Hierbei ersetzt das Adapterprotein TRAM (TRIF-related adaptor molecule) das MyD88-Protein in der Signalkaskade. Nach dessen Aktivierung kommt es wieder zur Phosphorylierung des IKK, der mit dem TBK-1 interagiert und so den IRF-3 (interferon response factor-3) aktiviert, der im Zellkern die Bildung von IFN- β (Interferon- β) und IP10 (interferon inducible protein 10) auslöst (Takeda & Akira, 2004; Yamamoto *et al.*, 2004). Jüngere Studien beschreiben, dass dieser alternative Signalweg nicht nur IRF-3, sondern auch NF κ B aktivieren kann (Carpentier *et al.*, 2008), was dann wiederum zur Transkription von Zytokinen wie TNF- α und IL-1 β führen würde.

Eine Expression des TLR-3 im ZNS wurde bisher sowohl auf Astrozyten (Bsibsi *et al.*, 2002) und Mikrogliazellen (Olson & Miller, 2004), als auch Neuronen (Prehaud *et al.*, 2005) beschrieben. Funktionell scheinen hierbei jedoch Astrozyten eine zentrale Bedeutung zu besitzen. So konnte nach Stimulation mit PI:PC eine vermehrte Expression des TLR-3 auf Astrozyten, und eine Freisetzung von verschiedenen proinflammatorischen Zytokinen aus den gleichen Zellen nachgewiesen werden (Bsibsi *et al.*, 2002; Carpentier *et al.*, 2005; Farina *et al.*, 2005), während eine Aktivierung von Mikrogliazellen durch PI:PC-Gabe gänzlich ausblieb (Olson & Miller, 2004; Kielian *et al.*, 2005a).

1.3.2.5. Die Aktivierung des TLR-4 durch LPS

Wenngleich schon vielfach erforscht, so ist die Aktivierung des TLR-4 durch LPS für die vorliegende Arbeit von zentraler Bedeutung.

Bereits 1999 fand man heraus, dass der TLR-4 für Reaktionen des Immunsystems auf Bestandteile gram-negativer Bakterien verantwortlich ist (Takeuchi *et al.*, 1999). Belegt wurde diese These anhand von Versuchen an Mäuse-Makrophagen, die durch LPS aktiviert werden konnten, während Mauslinien, die eine Mutation des TLR-4 aufwiesen nicht auf LPS reagierten (Poltorak *et al.*, 1998; Hoshino *et al.*, 1999; Qureshi *et al.*, 1999).

Für die Aktivierung einer Zielzelle durch LPS ist der TLR-4 jedoch nicht allein verantwortlich. Essentiell wichtig für die Bindung von LPS ist ein lösliches Adaptermolekül, das MD-2, welches an die aktive Komponente des LPS, das Lipid A bindet (Shimazu *et al.*, 1999; Viriyakosol *et al.*, 2000). Ein weiterer Co-Rezeptor, der für die LPS-abhängige Aktivierung des TLR-4 nötig ist, ist das CD14. Es wird ebenso wie der TLR-4 in den sCVOs konstitutiv exprimiert (Laflamme & Rivest, 2001) und verstärkt die Antwort auf LPS (Dobrovolskaia & Vogel, 2002).

Eine Aktivierung des TLR-4 durch LPS kann intrazellulär zwei Signalwege auslösen. Zum einen kommt es zur Induktion des klassischen Signalwegs über MyD88, was letztendlich zu einer Ausschüttung von proinflammatorischen Zytokinen führt (Kielian, 2006). Zum anderen kann auch die alternative Signalkaskade über das Adapterprotein TRAM eingeleitet werden, welchem sich auch der TLR-3 bedient (Takeda & Akira, 2004; Yamamoto *et al.*, 2004). Letzteres aktiviert die Transkription von IFN-Genen und verläuft wesentlich langsamer als der MyD88-abhängige Signalweg.

Dass LPS im Säugetierorganismus Fieber auslösen (Blatteis *et al.*, 1983; Roth *et al.*, 1997) und auch die Bildung von proinflammatorischen Zytokinen (Wan *et al.*, 1995; Nadeau & Rivest, 1999b; Choi *et al.*, 2002) induzieren kann, wurde schon vor einigen Jahren wiederholt gezeigt. Im Rahmen einer inflammatorischen Aktivierung des ZNS war aber die Entdeckung des TLR-4 (Laflamme & Rivest, 2001) in den sCVOs von großer Wertigkeit. Sowohl der TLR-4, als auch CD14 werden konstitutiv in der AP exprimiert (Laflamme & Rivest, 2001). Zieht man nun in Betracht, dass im Blut zirkulierende PAMPs wie LPS durch die fehlende BHS in die AP gelangen können, so eröffnet sich die Möglichkeit, dass LPS dort eine Aktivierung des TLR-4 und somit eine Kaskade der Neuroinflammation auslösen könnte. Diese Aktivierung wäre sogar noch vor dem Auftreten erster proinflammatorischer Zytokine im Blut möglich.

1.4. Die Bedeutung proinflammatorischer Zytokine bei der Induktion zentralnervöser Krankheitssymptome

Zytokine, die auch als endogene Pyrogene bezeichnet werden, sind lösliche, hitzelabile Polypeptide oder Glycoproteine, deren Molekulargewicht <30 kDa beträgt. Sie werden im Organismus v.a. von Monozyten, Makrophagen, Mikrogliazellen, Lymphozyten, Granulozyten und Endothelzellen gebildet und besitzen sehr unterschiedliche Funktionen. So spielen einige Zytokine eine große Rolle bei Reaktionen des angeborenen Immunsystems. Zu diesen gehören beispielsweise TNF- α , IL-1 β , IL-6, IFN und verschiedene Chemokine. Andere Zytokine agieren zur Unterstützung des erworbenen Immunsystems, wie z.B. IL-2, IL-4, IL-5 und IL-13. Wieder andere Zytokine wie IL-3, IL-7 und CSF sind überwiegend an der Hämatopoese beteiligt.

Im Säugetierorganismus weisen Zytokine einige Besonderheiten auf. Im Gegensatz zu den Hormonen können sich die Effekte unterschiedlicher Zytokine überlappen, was als Redundanz bezeichnet wird. Beispielsweise sind TNF- α und IL-1 β in hohen Konzentrationen gemeinsam für den septischen Schock verantwortlich. Außerdem können Zytokine auf verschiedene Zielzellen wirken, was als Pleiotropie bezeichnet wird (Ozaki & Leonard, 2002), und an diesen zusätzlich noch verschiedene Effekte vermitteln (Ambiguität) (Ozaki & Leonard, 2002). Ihre Wirkung ist ebenfalls stark von ihrer Konzentration und ihrem umgebenden Milieu abhängig.

Unabhängig davon, ob Zytokine nun über den humoralen (siehe: Kapitel 1.1.1) oder den nervalen Weg (siehe: Kapitel 1.1.2) zu einer inflammatorischen Aktivierung des Gehirns führen, so konnte ihre Beteiligung an zentralnervös kontrollierten Krankheitssymptomen bereits vielfach belegt werden. Geht man davon aus, dass Fieber ein Hauptsymptom zentralnervöser Inflammation ist, so liefern folgende Befunde entscheidende Hinweise dafür, dass Zytokine als Mediatoren eines inflammatorischen Prozesses angesehen werden können:

TNF- α ist das erste Zytokine, das nach Injektion von LPS im Blutplasma auftritt (Long *et al.*, 1990; Roth *et al.*, 1993), direkt gefolgt von Spuren von IL-1 β

(Jansky *et al.*, 1995) und großen Mengen IL-6 (LeMay *et al.*, 1990; Roth *et al.*, 1993). Von diesen drei Zytokinen korreliert jedoch nur der Plasmaspiegel von IL-6 direkt mit dem Fieberverlauf (LeMay *et al.*, 1990; Roth *et al.*, 1994).

Auch eine Injektion von Zytokinen selbst kann Fieber auslösen, wie für IL-1 (Anforth *et al.*, 1998; Roth *et al.*, 1998b), TNF- α (Dinarello *et al.*, 1986; Goldbach *et al.*, 1996) und IL-6 (Blatteis *et al.*, 1990; Harre *et al.*, 2002) gezeigt werden konnte. Diese pyrogene Wirkung der Zytokine wurde in weiteren Versuchen bestätigt, bei denen nach Injektion von LPS durch Neutralisierung oder Antagonisierung der einzelnen proinflammatorischen Zytokine, das Fieber stark unterdrückt werden konnte. Für IL-1 wurde dazu ein IL-1-Rezeptor-Antagonist verwendet (Roth & De Souza, 2001), für TNF- α eine synthetisch hergestellte neutralisierende Form des p55 TNF- α -Rezeptors (Roth *et al.*, 1998a; Roth & De Souza, 2001) und für IL-6 neutralisierende IL-6-Antikörper (Cartmell *et al.*, 2000).

Zudem brachten Studien mit Zytokin-defizienten knockout Mäusen eine genauere Aufklärung der Wertigkeit bestimmter Zytokine in Zusammenhang mit Fieber. Bei IL-1-KO Mäusen ist das LPS-abhängige Fieber zwar reduziert, jedoch nicht gänzlich unterdrückt (Kozak *et al.*, 1995), während bei IL-6-KO Mäusen das Fieber nach LPS-Applikation komplett ausblieb (Chai *et al.*, 1996; Kozak *et al.*, 1998). Dies deutet darauf hin, dass eine Freisetzung von IL-6 zur Ausbildung des LPS-Fiebers essentiell ist, was auf IL-1 β nur zum Teil zutrifft.

Die Bedeutung von Zytokinen als inflammatorische Mediatoren wird auch für weitere Symptome des „sickness behavior“ beschrieben. Sie sollen ebenfalls für eine verringerte Futter- und Wasseraufnahme, verminderte soziale Kontakte, Veränderungen des Schlafrythmus und eine Hyperalgesie verantwortlich sein (Fleshner *et al.*, 1995). Diese These wurde ebenfalls durch Versuche belegt, in denen man die spezifischen Zytokinrezeptoren im Gehirn blockierte und somit zentralgesteuerte Krankheitssymptome im Rahmen eines Infektionsgeschehens abschwächen konnte (Rothwell & Luheshi, 1994; Watkins *et al.*, 1994).

Das vermehrte Auftreten von proinflammatorischen Zytokinen dient zunächst dem unspezifischen Immunsystem zur Bekämpfung körperfremder Substanzen oder Bestandteilen von Mikroorganismen. Im Rahmen dieser Abwehrreaktion vermitteln Zytokine jedoch nicht nur inflammatorische Effekte. So stimulieren TNF- α , IL-1 und IL-6 gleichzeitig die Hypophysen-Hypothalamus-Nebennieren-

Achse (HPAA) (Gaillard, 1994; Chrousos, 1995), was zu einer Freisetzung des Corticotropen Hormons (CRH) und letztendlich zu einer Sekretion des Adrenocorticotropen Hormons (ACTH) gefolgt von Kortikosteroiden führt. Dieser Vorgang kann als „negatives Feedback“ auf das aktivierte Immunsystems gesehen werden (Besedovsky *et al.*, 1986; Turnbull & Rivier, 1996) und dient als Selbstschutz des Organismus vor einer exzessiven Hyperthermie und zytotoxischen Effekten der Zytokine selbst. Als potentestes Zytokin zur Stimulation der HPAA wird das IL-1 beschrieben (Bateman *et al.*, 1989; Rivier & Rivest, 1993; Tilders *et al.*, 1994).

Die Hypothese, dass zentralnervös kontrollierte Krankheitssymptome durch Interaktionen zirkulierender Zytokine mit Zellen innerhalb des ZNS, insbesondere der sCVOs induziert werden, erfordert zwei Voraussetzungen: zum einen die Existenz entsprechender Zytokin-Rezeptoren im Bereich der sCVOs, zum anderen reproduzierbare zelluläre Reaktionen nach Stimulation der sCVOs mit den entsprechenden Zytokinen wie TNF- α , IL-1 β und IL-6. Durch Nachweis der mRNA konnte die Existenz des IL-1-Rezeptors in SFO und OVLT, sowie der AP (Cunningham *et al.*, 1992; Ericsson *et al.*, 1995) bewiesen werden. Ebenso wie die p55-Form des TNF-Rezeptors (Nadeau & Rivest, 1999a) wird der IL-6-Rezeptor und seine gp130 Untereinheit (Schobitz *et al.*, 1993) in den sCVOs unter basalen Bedingungen exprimiert. Nach intravenöser Applikation von TNF- α wird sein dazugehöriger Rezeptor im Bereich des SFO, des OVLT und der AP sogar hochreguliert (Nadeau & Rivest, 1999a).

Interaktionen zirkulierender Zytokine mit ihren jeweiligen Rezeptoren im Bereich der sCVOs können unterschiedliche zelluläre Reaktionen auslösen. So wurde zum einen ein direkter Einfluss von Zytokinen auf die elektrische Aktivität (Shibata & Blatteis, 1991; Ota *et al.*, 1997), zum anderen auf die elektrophysiologischen Eigenschaften (Desson & Ferguson, 2003) von Neuronen innerhalb der sCVOs dokumentiert. Die durch Zytokine induzierbaren Veränderungen neuronaler Aktivitätsmuster im OVLT scheinen zu denjenigen hypothalamischen Kerngebieten weitergeleitet zu werden, die in die Fieberentstehung involviert sind (Ota *et al.*, 1997).

Als ein weiteres Signal für neurologische Aktivierung aufgrund von Stimulation durch Zytokine kann die vermehrte Expression des Transkriptionsfaktors Fos

angesehen werden. Dieser Nachweis kann sowohl immunzytochemisch, als auch molekularbiologisch auf Ebene der mRNA erfolgen. Im Rahmen dieses Versuchs kam es nach intravenöser Applikation von TNF- α (Nadeau & Rivest, 1999a) oder IL-6 (Vallieres & Rivest, 1997) zu einer vermehrten c-Fos Expression in den sCVOs.

Eine direkte genomische Aktivierung von Zellen im Bereich der sCVOs durch zirkulierende Zytokine kann über eine immunzytochemische Detektion Zytokin-spezifischer Transkriptionsfaktoren nachgewiesen werden. Mittels dieser Methodik konnte *in vivo* eine IL-6-induzierte Aktivierung des Transkriptionsfaktors STAT3 (Harre *et al.*, 2002) bzw. eine IL-1 β -induzierte Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF κ B (Nadjar *et al.*, 2003) gezeigt werden.

Damit sind einige grundlegende Voraussetzungen erfüllt, die nötig sind, um proinflammatorische Zytokine und deren Interaktionen an sCVO-intrinsischen Zellen als Vermittler zentralnervös kontrollierter Krankheitssymptome zu bewerten. Die AP scheint dabei eine besondere Rolle zu spielen. Sie besitzt genau wie die beiden anderen sCVOs Rezeptoren für zirkulierende Zytokine, ist aber im Gegensatz dazu Teil des dorsovagalen Komplexes, der für die Entstehung des „sickness behaviors“ von großer Bedeutung ist.

1.4.1. Der Tumor Nekrose Faktor-alpha (TNF- α)

Tumor Nekrose Faktor- α (TNF- α) wird aufgrund seiner Eigenschaften zu den endogenen Pyrogenen gezählt. Er ist einer der wichtigsten Mediatoren akuter Infektionen und ist in sehr hohen Mengen hauptverantwortlich für den septischen Schock (Fiedler *et al.*, 1992). Seine Funktion als proinflammatorisches Zytokin ist sehr komplex. TNF gehört zur Gruppe der ständig wachsenden TNF-Superfamilie, deren Mitglieder mit Ausnahme von TNF- β , alle Typ II membrangebundene Glycoproteine darstellen. TNF existiert entweder in gebundener oder in löslicher Form. Bei der gebundenen Form handelt es sich um ein 17 kDa schweres Protein mit einem relativ kurzen zytoplasmatischen Segment und einer relativ langen extrazellulären Region, die einen C-Terminus besitzt (Gruss & Dower, 1995).

Die lösliche Form entsteht durch proteolytische Spaltung eines 26 kDA schweren membrangebundenen Vorläufermoleküls (pro-TNF) mit Hilfe eines TNF-Converting Enzyms (TACE), welches ein Mitglied der Familie der Zink-Metalloproteasen darstellt (Moss *et al.*, 1997; Rosendahl *et al.*, 1997). Beide Formen des TNF sind biologisch aktiv, allerdings scheint die gelöste Form potenter zu sein (Decoster *et al.*, 1995).

Während inflammatorischer Prozesse im Säugetierorganismus hat TNF- α eine Reihe modulatorischer Aufgaben. So ist es das erste Zytokin, das nach systemischer Applikation von LPS im Blutplasma auftritt (Long *et al.*, 1990; Roth *et al.*, 1993). Zudem stimuliert es Endothelzellen zur Sekretion von Chemokinen, Selektinen und Integrinen, die eine wichtige Rolle in der Leukodiapedese spielen. Des Weiteren induziert es die Bildung von Akut-Phase-Proteinen aus der Leber. TNF- α selbst kann aber auch die Freisetzung anderer Zytokine, wie z.B. IL-1 β induzieren (Dinarello *et al.*, 1986; Watkins *et al.*, 1995), was seine Rolle als „Leitzytokin“ innerhalb der Zytokinkaskade bestätigt. Nicht zuletzt ist noch seine Toxizität auf verschiedene Tumorzellen zu erwähnen, was ihm auch seinen Namen gab.

Zur Bildung von TNF- α sind neben Makrophagen, Monozyten, T-Zellen, Osteoblasten und Dendritischen Zellen auch Zellen innerhalb des ZNS wie Neurone, Astrozyten und Mikrogliazellen fähig, worauf in einem späteren Kapitel noch näher eingegangen werden soll (siehe: Kapitel 1.5).

1.4.1.1. Der TNF-Rezeptor (TNF-R) und sein Signalweg

Zur Bindung von TNF- α existieren zwei verschiedene Rezeptoren, der TNF-R1 und der TNF-R2, die beide zur TNF-Rezeptor Superfamilie gehören. Diese sind charakterisiert durch bis zu sechs Cystein-reiche Domänen und einen extrazellulären Bestandteil. Da der TNF-R2 lediglich auf T-Lymphozyten exprimiert wird, soll an dieser Stelle nur auf den TNF-R1 eingegangen werden. Dieser wurde, wie bereits beschreiben, unter anderem in den sCVOs nachgewiesen (Nadeau & Rivest, 1999b).

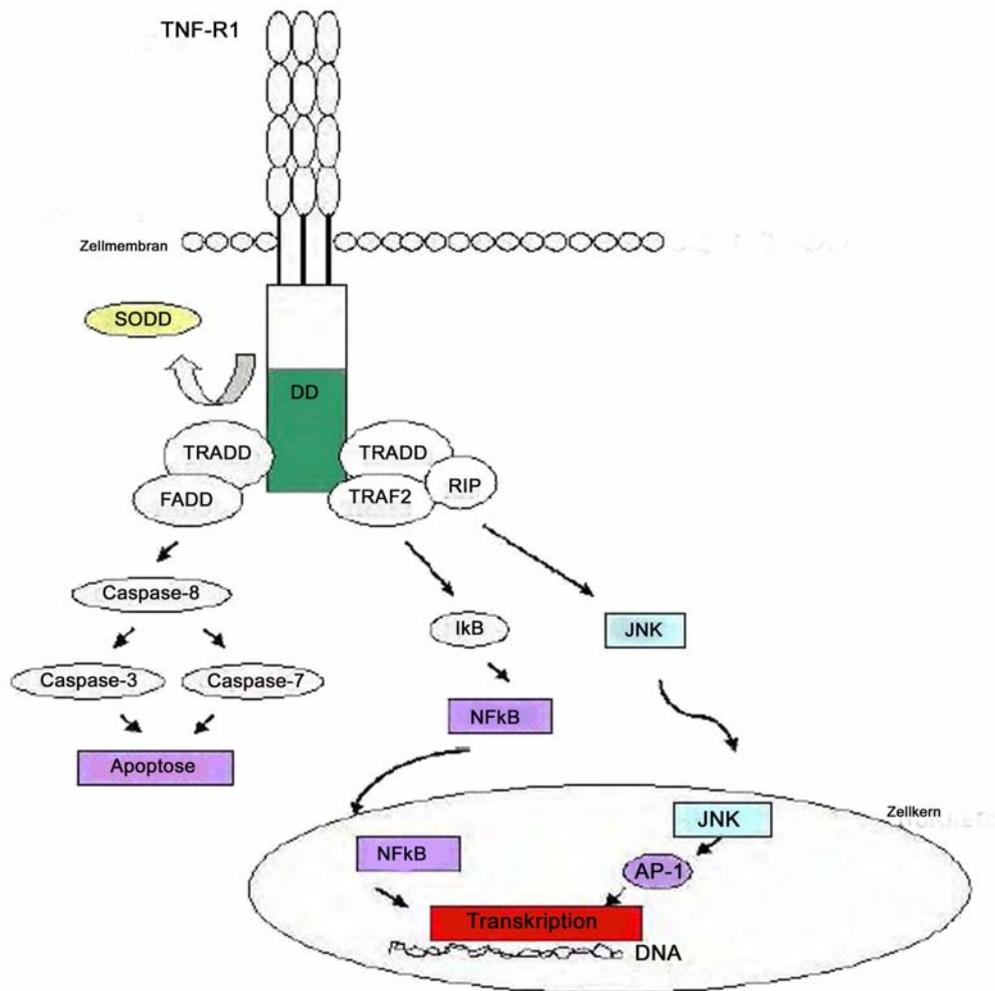


Abbildung 8: Die Signaltransduktion am TNF-R1. Bindet TNF an seinen Rezeptor, kommt es dabei zu einer Abspaltung von SODD („Silencer of death domain“). Die DD des TNF-R bildet dann einen Komplex mit TRADD, TRAF2 und RIP, was zu einer Aktivierung von NFκB oder MAPK JNK führt. Alternativ kann aber auch zu einer Trimer-Bildung des TNF-R mit TRADD und FADD kommen, was über einen Komplex mit der Caspase-8 letztendlich zur Apoptose der Zelle führt.

Zu Beginn der Signalkaskade (Abbildung 8) dockt die TRADD („TNF-Rezeptor associated death domain“) über ihre C-terminale DD („death domain“) an diejenige des TNF-R, und über ihr N-terminales Ende an TRAF2 („TNF-R associated factor 2“) und RIP1 („Receptor interacting protein 1“). Der nun entstandene Rezeptorkomplex kann über einen schnellen Signalweg direkt NFκB aktivieren (Hsu *et al.*, 1996b). Etwas später lösen sich TRADD, TRAF2 und RIP1 von membranständigen TNF-R. Der endosomale TNF-R1 rekrutiert die FADD („Fas associated death domain“), die sich anschließend selbst an

eine Caspase-8 bindet (Abbildung 8). So entsteht ein zytoplasmatischer Komplex, der das Signal zur Apoptose vermittelt (Hsu *et al.*, 1996a). Innerhalb der Kaskade scheint die Morphologie des TRAF2 mit seiner „RING-Finger-Domäne“ eine entscheidende Rolle zur Aktivierung von NF κ B zu spielen (Hsu *et al.*, 1996a; Darnay & Aggarwal, 1999). Die Rekrutierung des RIP1 kann neben einer Aktivierung von NF κ B (Kelliher *et al.*, 1998) auch zu einer Aktivierung der MAP-Kinase JNK (Liu *et al.*, 1996) führen, was wiederum AP-1 aktivieren kann. Weitere Studien beschreiben, dass TRAF2 außerdem für eine Rekrutierung der IKK (I- κ B-Kinase) zum TNF-R1 zuständig ist (Hsu *et al.*, 1996b). RIP1 bewirkt dann durch Aktivierung der IKK eine Dissoziation von NF κ B von seinem zytoplasmatischen Inhibitor I κ B. Diese Aktivierung des NF κ B geschieht analog zur Signalkaskade an den TLRs und dem IL-1-Rezeptor (Verstrepen *et al.*, 2008). Letztendlich kann NF κ B im Kern die Transkription von Genen bewirken, die für die unspezifische Abwehr wichtig sind.

1.4.2. Das Interleukin 1 β (IL-1 β) und sein Rezeptor

Interleukin-1 β (IL-1 β) ist ein weiteres Zytokin aus der Gruppe der endogenen Pyrogene. Seine Bildung kann sowohl durch exogene Pyrogene wie die vorher genannten PAMPs, als auch durch endogene Pyrogene wie das TNF- α induziert werden (Kluger, 1991). IL-1 β ist eng verwandt mit IL-1 α , welches ähnliche biologische Eigenschaften aufweist. Beide Moleküle werden in vivo von zahlreichen Zelltypen wie Monozyten, Makrophagen, T-Zellen, B-Zellen, aber auch Astrozyten, Gliazellen, Endothelzellen, Epithelzellen und Fibroblasten produziert (Dinarello *et al.*, 1986; Kluger, 1991).

IL-1 β ist ein wichtiger Bestandteil der Zytokinkaskade, die Entzündungsreaktionen im Organismus moduliert. Innerhalb solcher Prozesse ist IL-1 β beispielsweise nach systemischer Applikation von LPS, unmittelbar nach dem Auftreten von TNF- α im Blutplasma messbar (Jansky *et al.*, 1995). Eine systemische Injektion von IL-1 β selbst kann Fieber (Anforth *et al.*, 1998; Roth *et al.*, 1998b), neuroendokrine Aktivierung und Symptome des „sickness behavior“ auslösen (Dantzer, 2001).

IL-1 β wird als potentestes Zytokin zur Aktivierung der HPAA beschrieben (Kapcala *et al.*, 1995) Diese IL-1 β -bedingte Aktivierung der HPAA kann durch Neutralisierung des Zytokins über einen IL-1-Antikörper vollständig unterbunden werden (Fleshner *et al.*, 1995). Zudem wird IL-1 β eine große Bedeutung im Rahmen der nervalen Übertragung inflammatorischer Signale zum Gehirn zugesprochen (siehe: Kapitel 1.1.2.).

Die zentralen Aufgaben von IL-1 β werden durch den IL-1-Rezeptor (IL-1-R) vermittelt. Dieser aktiviert den gleichen Signalweg wie die Toll-like-Rezeptoren (siehe: Kapitel 1.3.2.1), wobei es zu einer Aktivierung des Adapterproteins MyD88 kommt (Anderson, 2000; Takeda & Akira, 2004). Der IL-1-R bildet ein Heterodimer mit dem IL-1RacP („IL-1rezeptor accessory protein“), worauf eine Rekrutierung vom MyD88 folgt (Conti *et al.*, 2004). Dieses moduliert über diverse Zwischenschritte die Bildung eines IRAK-1-TRAF6-Komplexes, der die IKK aktiviert, die eine Dissoziation von NF κ B von seinem zyttoplasmatischen Inhibitor I κ B bewirkt (Verstrepen *et al.*, 2008). Der aktivierte NF κ B kann anschließend im Zellkern die Transkription von Genen veranlassen, die zu einer Freisetzung weiterer Zytokine oder Chemokine führen.

Nicht zuletzt ist noch zu erwähnen, dass die Wirkung von zirkulierendem IL-1 β durch einen endogenen IL-1-Rezeptor-Antagonisten (IL-1-RA) abgeschwächt wird, was als eine Art „negatives Feedback“ angesehen werden kann (Dinarello, 1992).

1.4.3. Das Interleukin 6 (IL-6) und sein Rezeptor

Das Interleukin-6 gehört ebenfalls zur Gruppe der proinflammatorischen Zytokine und ist einer der wichtigsten Mediatoren bei der Entstehung von Fieber und der Akut-Phase-Reaktion im Rahmen inflammatorischer Prozesse (Blatteis *et al.*, 1990). Dieses aus 184 AS bestehende Glycoprotein wird aus einer 212 kDa schweren Vorstufe gebildet. In seiner nicht-glykolisierten Form besitzt es ein Molekulargewicht von 23 kDa, während seine glykolisierte Form 26 kDa schwer ist.

Seine besondere Bedeutung innerhalb eines zentralen Entzündungsgeschehens im Organismus kommt vor allem dadurch zustande, dass sein Plasmaspiegel nach LPS-Injektion direkt mit dem damit einhergehenden Fieber korreliert (Roth *et al.*, 1993; Roth *et al.*, 1994). In diesem Zusammenhang konnte auch gezeigt werden, dass IL-6 essentiell für die Entwicklung von TNF- α -abhängigem Fieber ist, da IL-6-KO Mäuse nach Injektion von TNF- α keinerlei Fieber entwickelten (Sundgren-Andersson *et al.*, 1998). Außerdem induziert es die Freisetzung von Akut-Phase-Proteinen aus der Leber. Eine weitere wichtige Aufgabe von IL-6 ist die als Wachstums- und Differenzierungsfaktor von Zellen des hämatopoetischen Systems und des Immunsystems. IL-6 kann von einer Vielzahl von Zellen gebildet werden. Hierzu gehören Monozyten, Makrophagen, Synoviozyten, Fibroblasten, Endothelzellen, aber auch Zellen des ZNS wie Neurone und Gliazellen (Frei *et al.*, 1989; Maimone *et al.*, 1993).

IL-6 gehört zur gp130- Rezeptor Familie, was bedeutet, dass alle Mitglieder dieser Familie an Rezeptoren mit der gp130-Untereinheit binden (Kishimoto *et al.*, 1995; Taga, 1997). Am IL-6-Rezeptor (IL-6-R) findet die Signaltransduktion prinzipiell über zwei Wege statt. Zum einen kommt es zu einer Dimerisierung zweier gp130-Einheiten, was am Rezeptor stationierte Janus Kinasen (JAKs) aktiviert. Danach kommt es zu einer Phosphorylierung und Dimerisierung von STAT3 („signal transducer and activator of transcription“)-Proteinen durch die JAKs. Die aktivierten STAT3-Dimere wandern nun in den Zellkern und regulieren dort die Expression bestimmter Gene (Takeda & Akira, 2000; May *et al.*, 2003). Alternativ kann eine Signaltransduktion am IL-6-R auch zu einer Aktivierung der MAPK-Kaskade führen, was einen Transkriptionsfaktor NF-IL-6 aktiviert, der ebenfalls im Zellkern die Transkription von Genen veranlasst (Kishimoto, 1994).

1.5. Die Bildung von Zytokinen im Gehirn im Verlauf von Infektionen und Entzündungsreaktionen

Wie bereits im vorherigen Kapitel beschrieben, spielen Zytokine eine bedeutende Rolle in der Kommunikation zwischen Körper und Gehirn im Rahmen inflammatorischer Prozesse. Zytokine können jedoch nicht nur in der Körperperipherie gebildet werden, sondern auch im Gehirn selbst. Proinflammatorische Zytokine wie TNF- α , IL-1 β und IL-6 werden im ZNS konstitutiv exprimiert (Nakamori *et al.*, 1995; Konsman *et al.*, 1999; Vitkovic *et al.*, 2000). Im Zusammenhang mit Infektionen und pathologischen Prozessen kann die Expression dieser Zytokine, insbesondere in den sCVOs um ein vielfaches gesteigert werden. Auslöser dafür können zirkulierende Zytokine aus der Körperperipherie (Dantzer, 2001; Churchill *et al.*, 2006), Stress (Minami *et al.*, 1991), Ischämie (Minami *et al.*, 1992), invasive Verletzungen oder Operationen des Gehirns (Yan *et al.*, 1992) und eine Reihe pharmakologischer Stimuli (Dantzer, 2001), sein.

Zur Freisetzung von Zytokinen innerhalb des ZNS sind verschiedene Zelltypen in der Lage. Einige Autoren beschreiben, dass sowohl Neurone, als auch Gliazellen Zytokine bilden können (Kapcala *et al.*, 1995; Conti *et al.*, 2004). Im speziellen wurde für Neurone eine Expression von IL-1 β (Dinarello, 1992) und IL-6 (Tsakiri *et al.*, 2008) beschrieben. Die Bildung von IL-1 β konnte jedoch nicht für Neurone der AP bestätigt werden (Goehler *et al.*, 2006), ebenso wenig wie eine Bildung von TNF- α (Wuchert *et al.*, 2008) von AP Neuronen gefunden wurde. Auch Astrozyten können unter inflammatorischen Bedingungen Zytokine freisetzen (Esen *et al.*, 2004). Als die wohl wichtigsten Zellen des ZNS im Zusammenhang mit Zytokinfreisetzung sind zweifellos die Mikrogliazellen zu nennen. Diese spezialisierten Immunzellen des Gehirns können nach diversen Stimuli TNF- α (Nadeau & Rivest, 2000; Vitkovic *et al.*, 2000; Glezer *et al.*, 2007; Hwang *et al.*, 2008), IL-1 β (Van Dam *et al.*, 1995; Dantzer, 2001) und IL-6 (Hwang *et al.*, 2008) bilden. Für Mikrogliazellen der AP konnte auch in Gehirnschnitten der AP eine Bildung von IL-1 β nachgewiesen werden (Goehler

et al., 2006). Die Fähigkeit kultivierter Mikrogliazellen aus der AP zur Bildung von TNF- α wurde im Rahmen dieser Arbeit untersucht.

Die Funktionen der Zytokine im Gehirn sind ebenso wie peripher sehr vielfältig. Ihre Wirkung vermitteln Zytokine über spezielle Zytokinrezeptoren, die von nahezu allen Zellen innerhalb des ZNS exprimiert werden (siehe auch Kapitel: 1.4). Im Zuge dessen wurden in der AP ebenfalls Rezeptoren für TNF- α (Nadeau & Rivest, 1999a), IL-1 (Ericsson *et al.*, 1995) und IL-6 (Vallieres & Rivest, 1997) nachgewiesen.

Neben pyretischen werden Zytokinen im Gehirn auch trophische Eigenschaften nachgesagt, die besonders für eine volle Funktionalität der Neurone wichtig sein sollen (Kahn *et al.*, 1995; Conti *et al.*, 2004). Die Hauptaufgabe der proinflammatorischen Zytokine im Gehirn ist jedoch die Manifestation zentralnervös gesteuerter Krankheitssymptome. Unabhängig davon, ob die zentrale Freisetzung der Zytokine nun durch zirkulierende PAMPs oder Zytokine aus der Peripherie (siehe: „humorale Fieberhypothese“ Kapitel 1.1.1) oder durch nervale Afferenzen (siehe: „nervale Fieberhypothese“ Kapitel 1.1.2) induziert wird, konnte gezeigt werden, dass diese gefolgt ist von einer Entwicklung von Fieber und Symptomen des „sickness behavior“. Als Belege für diese Theorie existieren zahlreiche Studien, bei denen in der AP und den anderen sCVOs eine Expression von TNF- α , IL-1 β und IL-6 nach systemischer LPS-Injektion nachgewiesen werden konnte (Vallieres & Rivest, 1997; Quan *et al.*, 1999). Noch einen Schritt weiter gehen Breder *et al.*, die zeigen konnten, dass es in den sCVOs zu einer Freisetzung von Zytokinen bereits im Verlauf des ersten Fieber-Peaks nach LPS-Applikation kommt (Breder *et al.*, 1994). Während der Vermittlung von Fieber können TNF- α , IL-1 β , und IL-6 eine direkte Wirkung auf thermosensitive Neurone ausüben (Conti *et al.*, 2004). In diesem Zusammenhang zeigten einige Versuche, dass IL-1 β (Vasilenko *et al.*, 2000) ebenso wie TNF- α und IL-6 (Nakashima *et al.*, 1991; Xin & Blatteis, 1992) die Aktivität der meisten warm-sensitiven Neurone herabsetzen, während sie gleichzeitig die Aktivität der kalt-sensitiven Neurone erhöhen. Es bestehen jedoch einige Hinweise darauf, dass die pyrogene Wirkung der Zytokine über eine nachgeschaltete Bildung sekundärer Botenstoffe wie PGE₂ oder NO vermittelt wird (Lin & Lin, 1996; Matsumura & Kobayashi, 2004). Während TNF- α , IL-1 β und IL-6 als potentielle Mediatoren des „sickness behavior“

beschrieben werden (Dantzer, 2001), kommt IL-1 β in der AP eine besondere Bedeutung zu. So konnte in zwei unabhängigen Studien dokumentiert werden, dass IL-1 β aus Mikrogliazellen der AP freigesetzt wird und dort direkt Neurone aktiviert (Dantzer, 2001; Goehler *et al.*, 2006). Diese Aktivierung der Neurone hat wiederum eine Aktivierung der HPAAs zur Folge, was zu Depression, vermehrtem Schlafbedürfnis, Inappetenz und weiteren Symptomen des „sickness behaviors“ führt.

1.5.1. Die Rolle von Stickstoff-Monoxid (NO) bei der Manifestierung zentralnervös kontrollierter Krankheitssymptome

Stickstoff-Monoxid (NO) ist eine gasförmige unkonventionelle Substanz, die im Organismus ein großes Spektrum an Aufgaben erfüllt. Im ZNS fungiert NO als Neurotransmitter, in der Körperperipherie ist es u.a. an der Funktion der glatten Muskulatur, des kardiovaskulären Systems, des Immunsystems und des Reproduktionstrakts beteiligt (Licinio *et al.*, 1999). NO entsteht durch Konversion von L-Arginin zu L-Citrullin. Dieser Vorgang wird durch die NO-Synthase (NOS) katalysiert. Es existieren drei Isoformen der NOS; die neuronale NOS (nNOS oder NOS1), die induzierbare NOS (iNOS oder NOS2) und die endotheliale NOS (eNOS oder NOS3) (Nathan & Xie, 1994; Forstermann *et al.*, 1995). Alle drei Formen sind im Gehirn zu finden, wobei die nNOS, wie auch ihr Name schon sagt, dort von Neuronen, die iNOS überwiegend von glialen Zellen und die eNOS ausschließlich von Endothelzellen exprimiert wird.

Eine Besonderheit der iNOS ist, dass sie nicht von Geburt an im ZNS zu finden ist. Erst pathologische Prozesse wie Infektionen, Ischämie oder auch der physiologische Alterungsprozess induzieren eine Expression der iNOS (Licinio *et al.*, 1999). Für eine solche Induktion der iNOS können auch periphere inflammatorische Stimuli verantwortlich sein. So wurde z.B. gezeigt, dass bakterielle Pyrogene wie LPS, virale Bestandteile, Interferone und Zytokine wie IL-1 β , TNF- α und IL-6, zur Bildung der iNOS in Makrophagen (Numata *et al.*, 1998) führen können (Abbildung 9). Auch auf zentralnervöser Ebene konnte

nach Stimulation mit LPS und proinflammatorischen Zytokinen ein Auftreten der iNOS in Mikrogliazellen und Astrozyten dokumentiert werden (Kopnisky *et al.*, 1997; Carpentier *et al.*, 2008).

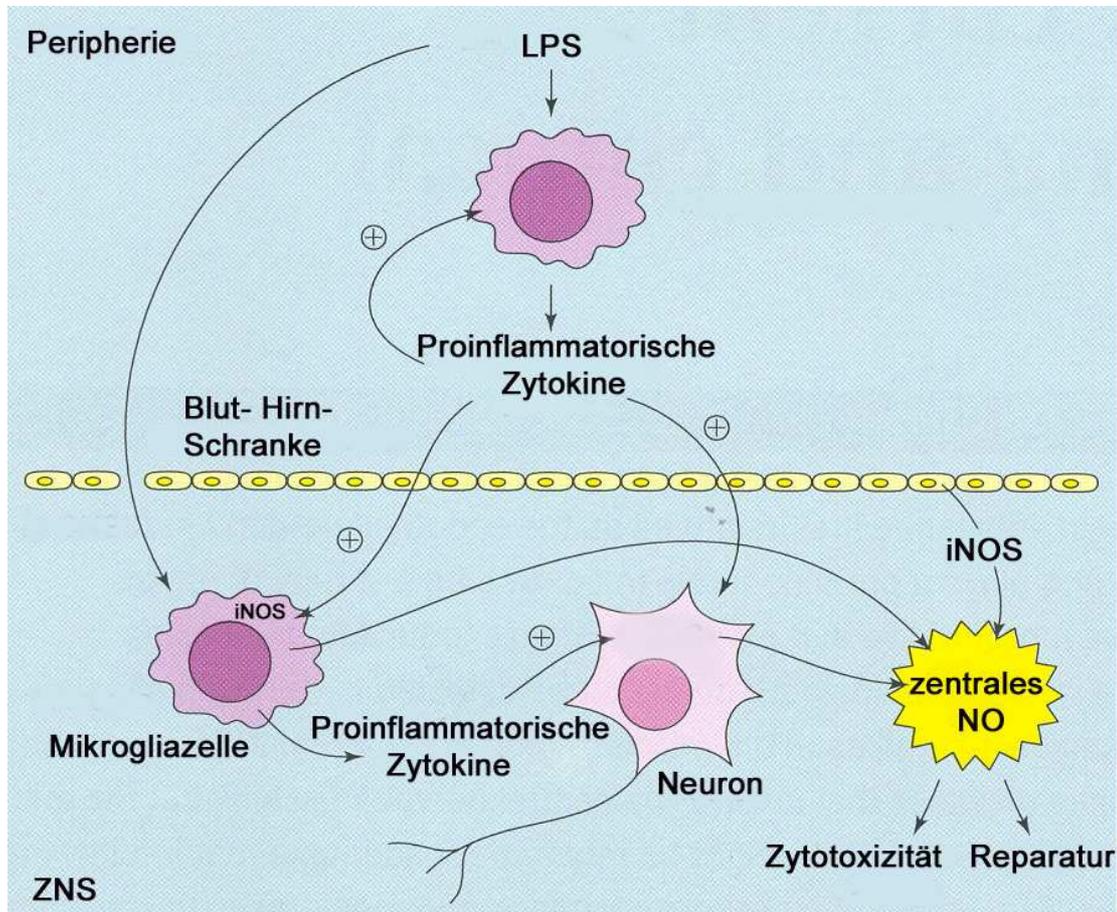


Abbildung 9: Schematische Darstellung der Herkunft von NO gebildet durch die iNOS im Organismus. Während systemischer Inflammation kommt es durch zirkulierendes LPS zu einer direkten Aktivierung von mononukleären Zellen in der Peripherie des Körpers oder von Mikrogliazellen im ZNS. Sekundär kann iNOS aber auch durch die LPS-abhängige Freisetzung proinflammatorischer Zytokine induziert werden. Potentielle Zellen zur iNOS-abhängigen NO-Freisetzung im Gehirn sind Neurone, Gliazellen und perivaskuläre Zellen (Abbildung modifiziert nach Licinio *et al.* 1999).

Die Funktionen von NO, insbesondere im Gehirn, werden noch kontrovers diskutiert. Zum einen wird dem Neurotransmitter eine starke Zytotoxizität nachgesagt, was auch ein gewünschter Effekt in der Bekämpfung von Pathogenen durch Makrophagen ist. Allerdings wird die Zytotoxizität auch mit degenerativen Erkrankungen wie Alzheimer und Multipler Sklerose in

Verbindung gebracht (Koprowski *et al.*, 1993; Vodovotz *et al.*, 1996). Zum anderen übernimmt NO eine wichtige Aufgabe wie Reparation des Nervensystems (Abbildung 9), da gezeigt werden konnte, dass es ebenfalls an Re-Myelinisierungs-Prozessen des Rückenmarks beteiligt ist (Merrill & Murphy, 1997). Im Verlauf von zentralnervös kontrollierten inflammatorischen Prozessen, agiert NO als neuroendokriner Mediator. Dabei aktiviert NO die HPAA (Sandi & Guaza, 1995), was letztendlich zu einer Ausschüttung von Corticosteroiden führt und wiederum antiinflammatorisch wirkt. Im Gehirn vermittelt NO also eine Art „negatives Feedback“ im Rahmen einer Infektion. Im Gegensatz dazu ist jedoch auch zu erwähnen, dass NO in der Körperperipherie als Vermittler pyrogener Signale zum Gehirn auftritt. Diese Funktion wurden in Studien bewiesen, in denen die Applikation von NOS-Inhibitoren das LPS-abhängiges Fieber unterdrücken konnte (Scammell *et al.*, 1996; Roth *et al.*, 1999).

1.6. Die Rolle von Kalzium (Ca^{2+}) als intrazellulärer Botenstoff und als Indikator für Zellaktivierung im Rahmen eines inflammatorischen Geschehens

Kalzium (Ca^{2+}) hat für die unterschiedlichsten Körperfunktionen eine herausragende Bedeutung. Eine sehr wichtige Aufgabe von Ca^{2+} ist die als ubiquitärer intrazellulärer Botenstoff. Damit Ca^{2+} als intrazelluläres Signal genutzt werden kann, muss ein deutlicher Konzentrationsgradient zwischen Extra- und Intrazellularraum, sowie dem Zytosol und intrazellulären Kompartimenten herrschen (Alberts, 2001).

Extrazelluläres Ca^{2+} kann über verschiedene Wege in die Zelle gelangen. In Nervenzellen führt eine durch ein Aktionspotential hervorgerufene Depolarisation zur Öffnung spannungsabhängiger Ca^{2+} -Kanäle sogenannter „VOCs“ (voltage-operated Ca^{2+} -channels) in der Zellmembran. Dadurch kommt es zu einem Ca^{2+} -Influx in die Nervenendigung, wodurch die Sekretion von Neurotransmittern induziert wird. Rezeptorenabhängige Kanäle, die auch als „ROCs“ (receptor-operated Ca^{2+} -channels) bezeichnet werden, können entweder direkt oder durch einen Liganden aktiviert werden

(ligandengesteuerter Ca^{2+} -Kanal), oder sekundär nach Bindung eines Liganden an einen G-Protein-gekoppelten Rezeptor (GPCR) und die nachfolgende „Second-messenger“-Kaskade aktivieren (Nordheim, 2003). Als weiterer Ca^{2+} -Signalweg wird die Freisetzung von Ca^{2+} aus intrazellulären Speichern, den sogenannten „SOCs“ (store-operated-channels) durch bestimmte Second messenger beschrieben. Ein Beispiel dafür ist die Freisetzung von Ca^{2+} aus dem endoplasmatischen Retikulum (ER) einer Zelle über den Second messenger Inositol-1,4,5-triphosphat (IP_3). Hierbei bindet ein entsprechendes extrazelluläres Signalmolekül an einen GPCR, welcher dann Phospholipase C aktiviert. Dieses Enzym spaltet Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP_2) zu IP_3 und Diacylglycerol (DAG). Im folgenden bindet IP_3 an die Membran des ER und setzt so nach Rezeptoraktivierung Ca^{2+} aus dem ER frei. Der initiale zytosolische Ca^{2+} -Anstieg und DAG aktivieren eine Ca^{2+} -abhängige Proteinkinase C (PKC), welche bestimmte Ionenkanäle innerhalb der Zielzelle phosphorylieren kann (Alberts, 2001). IP_3 -vermittelte Ca^{2+} -Rekrutierung aus dem ER kann auch nach Aktivierung einer Tyrosin-Kinase erfolgen (Nordheim, 2003). Der IP_3 -abhängige Signalweg wird sowohl für Neurone (Ouyang *et al.*, 2005) als auch für Gliazellen (Moller, 2002; Farber & Kettenmann, 2006) beschrieben.

Wie aber wirken sich PAMPs wie LPS und Zytokine wie $\text{TNF-}\alpha$ auf die intrazelluläre Kalziumkonzentration [Ca^{2+}] aus?

Bereits 1994 beschrieb Bader (Bader *et al.*, 1994), dass LPS neben einer Freisetzung von Zytokinen aus Mikrogliazellen dort auch eine Erhöhung der [Ca^{2+}] induzieren kann. Er vermutete die Existenz eines koffein-sensitiven Ca^{2+} -Rezeptors. Weitere Studien zur Herkunft des Ca^{2+} zeigten, dass eine LPS-induzierte Erhöhung der [Ca^{2+}] in einem Ca^{2+} -freien Puffer vollständig ausbleibt, was auf die Abhängigkeit eines Ca^{2+} -Influges aus dem Extrazellularraum hindeutete (Yi *et al.*, 2005). Der gleiche Autor zeigte auch eine Abhängigkeit von Ca^{2+} innerhalb einer LPS-abhängigen Aktivierung von Mikrogliazellen und der daraus resultierenden $\text{TNF-}\alpha$ und NO-Freisetzung, konnte aber die komplexen Zusammenhänge nicht eindeutig klären.

Weitere Studien der letzten Jahre beschreiben ebenfalls, dass die Ca^{2+} -Signale der Zelle nach Exposition mit LPS, durch einen Ca^{2+} -Influx zustande kommen (Herms *et al.*, 1997; Choi *et al.*, 2002; Yi *et al.*, 2005). Im Gegensatz dazu

postulieren andere Arbeitsgruppen eine LPS-abhängige Aktivierung von Mikrogliazellen, die über den IP₃-Weg vermittelt wird (abd-el-Basset & Fedoroff, 1995; Nakamura *et al.*, 1999). Innerhalb dieser kontroversen Ergebnisse wurde in letzter Zeit noch ein alternativer Ca²⁺-Signalweg bei Mikrogliazellen beschrieben. Dabei kommt es nach Stimulation mit LPS zu einer im Vergleich zu den anderen Ca²⁺-Signalwegen verzögerten Erhöhung der [Ca²⁺]. Dafür wird der TRPM4, ein nicht selektiver Kationenkanal verantwortlich gemacht, der durch eine Änderung des Membranpotentials aktiviert wird und sekundär auch intrazelluläre Ca²⁺-Speicher mobilisiert (Launay *et al.*, 2004; Beck *et al.*, 2008). Auch proinflammatorische Zytokine können das Kalzium-System von Zellen des ZNS beeinflussen. So konnte bereits gezeigt werden, dass Mikrogliazellen (Goghari *et al.*, 2000), Astrozyten (Meini *et al.*, 2000) und Neurone (Viviani *et al.*, 2003) auf IL-1 β mit einem Anstieg ihrer [Ca²⁺] reagierten. Hierbei wird ebenfalls eine IP₃-abhängige Ca²⁺-Mobilisierung vermutet. Vergleichbare intrazelluläre Ca²⁺-Signale konnten auch in sensorischen Neuronen aus dem „dorsal root ganglion“ der Ratte unter Einfluss von TNF- α (Pollock *et al.*, 2002) gemessen werden.

Zusammenfassend kann man feststellen, dass Ca²⁺ eine bedeutende Rolle als intrazellulärer Botenstoff im Zusammenhang mit inflammatorischen Signalen einnimmt. Es bleibt zweifellos noch ein großer Klärungsbedarf, was involvierte Rezeptoren und deren nachgeschaltete Signalwege betrifft, jedoch gilt eine Beteiligung von [Ca²⁺] an den komplexen Vorgängen innerhalb der Zellen des ZNS, insbesondere der Mikrogliazellen nach Aktivierung durch zirkulierende PAMPs oder Zytokine als etabliert.

1.7. Zentrale Ziele und Fragestellung der Arbeit

In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, in wie weit sich zirkulierende inflammatorische Moleküle wie PAMPs, proinflammatorische Zytokine oder sekundäre Entzündungsmediatoren innerhalb der AP, einem sensorischen zirkumventrikulären Organ mit unvollständiger Blut-Hirn-Schranke, auswirken.

Hierzu wurde eine primäre Zellkultur der AP verwendet, um herauszufinden, ob eine direkte Stimulation mit dem TLR-4-Agonisten LPS, dem TLR-2-Agonisten MDP, dem TLR-2-und-6-Agonisten FSL-1 oder dem TLR-3-Agonisten PI:PC, eine messbare Veränderung der $[Ca^{2+}]_i$ bewirkt. Außerdem sollte geklärt werden, ob in Verbindung mit Inflammation zirkulierende oder lokal im ZNS gebildete proinflammatorische Zytokine wie $TNF-\alpha$ und $IL-1\beta$ und sekundäre Endzündungsmediatoren wie NO, ebenfalls Zellen der primären AP Zellkultur aktivieren können. Als Kriterium für eine Zellaktivierung sollte auch dazu eine Änderung der $[Ca^{2+}]_i$ mittels Ca^{2+} -Imaging dokumentiert werden.

Eine phänotypische Bestimmung des jeweiligen Zelltyps der untersuchten Zellen wurde mit Hilfe der Immunzytochemie durchgeführt. Dabei wurden spezielle Antisera gegen zellspezifische Marker-Proteine von Neuronen, Astrozyten, Mikrogliazellen oder Oligodendrozyten verwendet.

Weiter sollte deshalb im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden, ob Zellen der AP als spezialisierte Gehirnstruktur ebenfalls die Fähigkeit besitzen, Zytokine nach LPS-, FSL-1- oder PI:PC-Stimulation zu bilden und freizusetzen. Hierzu wurden die bioaktiven Konzentrationen von $TNF-\alpha$ und $IL-6$ im Überstand der stimulierten AP Kulturen mit Hilfe spezifischer Bioassays bestimmt. Im Anschluss daran wurde unter Verwendung der Immunzytochemie derjenige Zelltyp der AP bestimmt, der in der Lage ist, nach Stimulation mit LPS, das Zytokin $TNF-\alpha$ zu produzieren. Da $TNF-\alpha$ das erste Zytokin innerhalb der Kaskade ist, das im Plasma nach LPS-Injektion auftritt, sollte es in den vorliegenden Versuchen sozusagen als „Leitzytokin“ dienen.

Da bereits bekannt ist, dass Neurone der AP die neuronale Stickstoff-Monoxid-Synthase (nNOS) exprimieren (Rodrigo *et al.*, 1997), sollte in Anknüpfung daran

untersucht werden, ob die induzierbare NOS (iNOS) unter inflammatorischen Bedingungen ebenfalls von Zellen einer AP Zellkultur gebildet wird. Unter Verwendung spezifischer iNOS-Antikörper und zellspezifischer Marker wurde immunzytologisch analysiert, welcher spezielle Zelltyp der AP in der Lage ist, die iNOS zu exprimieren.

Basierend auf der Tatsache, dass für LPS bereits einige *in vivo*- und *in vitro*-Studien existieren, die eine Toleranzentwicklung gegenüber diesem Endotoxin beschreiben, sollte im Rahmen dieser Arbeit geklärt werden, ob sich innerhalb einer AP Zellkultur ebenfalls eine LPS-induzierte Endotoxin-Toleranz manifestiert. Untersuchungen dazu wurden sowohl im Ca^{2+} -Imaging als auch in Versuchen zur Zytokin-Freisetzung an primär kultivierten AP Zellen durchgeführt. Außerdem sollte die Frage geklärt werden, ob es zur Ausbildung einer möglichen Kreuztoleranz zwischen LPS, MDP und FSL-1 kommen kann, und ob sich diese auf die $[\text{Ca}^{2+}]_i$ der AP Zellkultur auswirkt.

Zusammenfassend sollten die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit dazu dienen, das Wissen und das Verständnis über die Rolle der AP im Organismus als Sensor für zirkulierende inflammatorische Botenstoffe wie PAMPs, Zytokine oder sekundäre Entzündungsmediatoren, und ihre Beteiligung in der Manifestation von Fieber und Symptomen des „sickness behavior“ zu erweitern.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Geräte

- Autoklav Systec 2540 EL (Systec, Wetzlar, Deutschland)
- Binokular Nikon-SMZ-V (Nikon, Tokio, Japan)
- Eismaschine Icematic F120 (CastelMAC S.p.A. Castelfranco Veneto, Italien)
- ELISA- Reader Digiscan (Asys Hitech, Eugendorf, Österreich)
- Fluoreszenzmikroskop Olympus BX50 (Olympus Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland)
 - mit digitaler Kamera Visitron Mode 3.1.0. (Visitron Systems, Puchheim, Deutschland)
- Gefrier-Microtom Modell 1205, (Jung, Heidelberg, Deutschland)
- Heißluftsterilisator ED 115/E2 (Binder GmbH, Tuttlingen, Deutschland)
- Kalzium-Imaging System (Diagnostic Instruments Visitron Systems GmbH, Puchheim, Deutschland)

bestehend aus:

- Mikroskop Olympus IMT-2 (Olympus Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland)
- Kamera VisiCam 12 Bit digital CCD-System (Diagnostic Instruments Visitron Systems GmbH, Puchheim, Deutschland)
- MAC-5000 Steuereinheit (Diagnostic Instruments Visitron Systems GmbH, Puchheim, Deutschland)
- Fluoreszenzlampe Olympus BH2-RFL-T3 (Olympus Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland)
- Kondensor IMT-NAC 2 (Olympus Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland)
- Ludl-Filterrad (Ludl Electronic Products Ltd., New York, USA)
- Zellkultur-Messkammer (W. G. Kerckhoff-Institut, Bad Nauheim, Deutschland)
- Laminar Herasafe (Kendro Laboratory Product GmbH, Hanau, Deutschland)
- MikroflowTM Sicherheitswerkbank Klasse 2 Modell 20229 (Nunc, Wiesbaden, Deutschland)

- pH-Meter 765 Calimatic (Kleinfeld Labortechnik, Hannover, Deutschland)
- Pipettiergerät Pipetboy (Integra Biosciences GmbH, Fernwald, Deutschland)
- Pipettierhelfer Easypet (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland)
- Reinstwassersystem Milli-Q Biocel (Millipore, Eschborn, Deutschland)
- Schlauchpumpen Minipuls-3 (Abimed Analysen Technik, Langenfeld, Deutschland)
- Schüttler Typ 3011 (Roth, Karlsruhe, Deutschland)
- Sicherheits-Bunsenbrenner (Fireboy) (Technomara, Fernwald, Deutschland)
- Thermoblock QBT (VWR, Darmstadt, Deutschland)
- Tischrühr- und Heizgerät Combimag (Roth, Karlsruhe, Deutschland)
- Ultraschallbad Sonorex RK 100 (Bandelin, Berlin, Deutschland)
- Waagen: P1210N und AE 50 PM 2500 (Mettler Toledo, Gießen, Deutschland)
- Wärmeschrank NuairTM US-Autoflow (Nuair, Plymouth, MN, USA)
- Wärmeschrank, Typ 5050 EK (Haereus, Hanau, Deutschland)
- Wasserbad BF 15 (Renner GmbH, Dannstadt, Deutschland)

2.1.2. Ge- und Verbrauchsmaterial

2.1.2.1. Zellkultur und Kalzium-Imaging

- CELLocate[®] glass coverslips (Eppendorf, Hamburg, Deutschland)
- Deckgläschen 15 x 15 mm Stärke 1 (für Zellkultur) (Menzel GmbH, Braunschweig, Deutschland)
- Einmalkanülen Sterican[®] 0,9 x 40 mm, 20 G (Braun, Melsungen, Deutschland)
- Einwegspritzen BD Plastipak (Becton-Dickinson, Heidelberg, Deutschland)
- Faltenfilter 604 1/2 (Ø 240 mm), (Schleicher und Schuell GmbH, Dassel, Deutschland)
- Flexiperm[®]-Mikro-12 Kammersysteme (Haereus, Hanau, Deutschland)
- Hahnbank, 5-fach (pub Medizintechnik GmbH & Co.KG, Kirchseen, Deutschland)
- Petrischalen (Plastik), 94/16 mm (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland)
- Petrischale (Glas), Ø 11 cm (MAGV, Rabenau, Deutschland)

- Pipetten (verschiedene Größen) (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland)
- Operationsbesteck (Aesculap-Werke AG, Tuttlingen, Deutschland)
- Reaktionsgefäße 0,5; 1,5; 2 und 5 ml (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland)
- Röhrchen, steril, 15 und 50 ml (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland)
- Serologische Pipetten 1, 5, 10 und 25 ml (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland)
- Tygon[®]-Schläuche (für Perfusionspumpe), Größe 0.110 und 0.081 (Abimed Analysen Technik, Langenfeld, Deutschland)

2.1.2.2. Immunzytochemie

- Deckgläschen 24 x 60 mm Stärke 1 (Menzel GmbH, Braunschweig)
- Einmalhandschuhe N-Dex[®] (Best Manufacturing Company, Menlo GA, USA)
- Einmal- Pasteur- Pipetten (MAGV, Rabenau, Deutschland)
- Inkubationskästen mit Deckel 20 x 30 x 5 cm (Biochem Instrumente GmbH, Weilburg, Deutschland)
- Multi-Wellplatten, 12-fach (MAGV, Rabenau, Deutschland)
- Objektträgermappen (MAGV, Rabenau, Deutschland)
- Objektträger 76 x 26 mm (Menzel GmbH, Braunschweig, Deutschland)
- Pipettenspitzen (verschiedene Größen) (Greiner Bio- One GmbH, Frickenhausen, Deutschland)
- PS- Röhrchen, steril, 15 und 50 ml (Greiner Bio- One GmbH, Frickenhausen, Deutschland)

2.1.2.3. Bioassays

- Gewebekulturflaschen, steril mit Filter: 50, 75, 250 und 550 ml (Greiner Bio- One GmbH, Frickenhausen, Deutschland)
- Gewebekulturplatte, steril, mit Abdeckplatte, 96K (Greiner Bio- One GmbH, Frickenhausen, Deutschland)
- PS- Röhrchen, steril, 3,5; 12; 15 und 50 ml (Greiner Bio- One GmbH, Frickenhausen, Deutschland)
- Serologische Pipetten, steril, 2, 5 und 10 ml (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland)

2.1.3. Chemikalien

- Äthanol, vergällt (Schmidt, D-Dillenburg)
- Äthanol, unvergällt (Merck, D-Darmstadt)
- Antikörper:
 - Primäre Antikörper:
 - Goat-anti-Rat-TNF- α /TNFSF1A (R&D Systems, Inc., Wiesbaden, Deutschland)
 - Mouse-anti-CNPase (clone 11-5b) (Sigma Aldrich, München, Deutschland)
 - Mouse-anti-glia-fibrillary acidic protein (GFAP) (Chemicon International, Inc., Temecula, CA, USA)
 - Mouse-anti-MAP (2a+2b) (Sigma Aldrich, München, Deutschland)
 - Mouse-anti-Rat CD68 (ED-1) (AbD Serotec, Oxford, UK)
 - Rabbit- anti-glia fibrillary acidic protein (GFAP) (DAKO, Hamburg, Deutschland)
 - Rabbit-anti-NOS1 (R-20) (Santa Cruz, Heidelberg, Deutschland)
 - Rabbit-anti-NOS2 (M-19) (Santa Cruz, Heidelberg, Deutschland)
 - Sekundäre Antikörper:
 - Amca-donkey-anti-mouse IgG (Millipore Deutschland GmbH, Schwalbach, Deutschland)
 - Alexa[®]488-donkey-anti-goat IgG (H+L) (MoBiTec GmbH, Göttingen, Deutschland)
 - Alexa[®]488-donkey-anti-rabbit IgG (H+L) (MoBiTec GmbH, Göttingen, Deutschland)
 - Alexa[®]488-donkey-anti-mouse IgG (H+L) (MoBiTec GmbH, Göttingen, Deutschland)
 - Cy3[™]- donkey-anti-rabbit IgG (H+L) (Dianova, Hamburg, Deutschland)
 - Cy3[™]- donkey-anti-mouse IgG (H+L) (Dianova, Hamburg, Deutschland)
 - Cy3[™]-Conjugated Streptavidin (Dianova, Hamburg, Deutschland)
- Biotin-horse-anti-goat IgG (H+L) (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA)
- Avidin-Biotin- Blocking Kit (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA)
- B 27 (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland)

- Calciumchlorid (CaCl_2) (Merck, Darmstadt, Deutschland)
- Citifluor[®] (Cityfluor LTD, London, UK)
- DEA (2-(N,N-Diethylamino)-diazenolat-2-oxid) (Alexis, Grünberg, Deutschland)
- 4',6-Diamidin-2-phenylindoldihydrochlorid (DAPI) (MöbiTec, Göttingen, Deutschland)
- Dimethylsulfoxid (DMSO) (Sigma Aldrich, München, Deutschland)
- Dispase I (Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland)
- Fetales Kälberserum (FKS) (PAA, Pasching, Österreich)
- Fluorescein Avidin D (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA)
- Fura-2 Acetoxymethylester (Fura-2-AM) (MöbiTec GmbH, Göttingen, Deutschland)
- Gey's balanced salt solution (GBSS) (Sigma Aldrich, München, Deutschland)
- D-Glukose (Sigma Aldrich, München, Deutschland)
- L-Glutamat (Monosodium-Salz) (Sigma Aldrich, München, Deutschland)
- L-Glutamin (Biochrom, Berlin, Deutschland)
- Hank's buffered salt solution (HBSS) (Biochrom, Berlin, Deutschland)
- HEPES Natriumsalz (N-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-N'-(2-ethansulfonsäure) (Sigma Aldrich, München, Deutschland)
- Kaliumchlorid (KCl) (Merck, Darmstadt, Deutschland)
- Magnesiumchlorid (MgCl_2) (Merck, Darmstadt, Deutschland)
- Natriumchlorid (NaCl) (Merck, Darmstadt, Deutschland)
- Natriumdihydrogenphosphat (NaH_2PO_4) (Merck, Darmstadt, Deutschland)
- Neurobasal-A (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland)
- Paraformaldehyd (PFA) (Merck, Darmstadt, Deutschland)
- Penicillin/Streptomycin (Biochrom, Berlin, Deutschland)
- Phosphate buffered saline tablets (PBS) (Sigma Aldrich, München, Deutschland)
- Poly-L-Lysin (Biochrom, Berlin, Deutschland)
- Steriles Wasser für die Zellkultur (PAA, Pasching, Österreich)
- Triton X-100 (Sigma Aldrich, D-München) München, Deutschland)

2.1.4. Computerprogramme

- Adobe Photoshop[®], Version 5.5 (Adobe Systems GmbH, Unterschleißheim, Deutschland)
- Graph Pad Prism[®], Version 3.02 (Graph Pad Software, Inc., San Diego, CA, USA)
- Metafluor- Imaging- Software für Mikroskope, Version 4.5 (Diagnostic Instruments Visitron Systems GmbH, Puchheim, Deutschland)
- Metamorph[®], Version 5.05 (Diagnostic Instruments Visitron Systems, Puchheim, Deutschland)
- Windows Microsoft Word[®], Version 6.0 (Microsoft Corporation, München, Deutschland)
- Windows Microsoft Excel[®], Version 6.0 (Microsoft Corporation, München, Deutschland)
- StatView[®] (Abacus Concepts Inc., Berkeley, CA, USA)

2.2. Versuchstiere

Alle Versuchstiere stammten aus der institutseigenen Zucht. Für die Präparation der primären Zellkultur wurden 4-6 Tage alte Wistar-Ratten beider Geschlechter verwendet.

Die Aufzucht der Jungtiere in den ersten Tagen bei der Mutter erfolgte in transparenten Polycarbonat-Käfigen (Typ IV 38 x 59 x 18 cm / Breite x Tiefe x Höhe) bei $23\pm 1^\circ\text{C}$ Raumtemperatur, einer relativen Luftfeuchtigkeit von 50% und einem Beleuchtungsregime von 12:12 Stunden (7:00/19:00 Uhr) Licht : Dunkel. Als Einstreu wurde Altromin Animal-Bedding verwendet. Wasser und Futter (Rattenzuchtfutter Altromin) standen den Zuchttieren *ad libitum* zur Verfügung.

Alle im Rahmen dieser Dissertation vorgesehenen Tierversuche an Ratten (Entnahme von Organen hierzu getöteter Tiere) waren lediglich anmeldepflichtig. Die Anmeldung erfolgte vor dem Beginn der Studie beim zuständigen Regierungspräsidium Hessen.

2.3. Verwendete Elektrolytlösungen und Puffer

2.3.1. Lösungen zur Zellkulturpräparation

2.3.1.1. Neurobasal-Medium A

Zur Kultivierung der primären neuroglialen Zellkultur wurde Neurobasal-A Medium supplementiert mit B 27 (Endkonzentration 2%), 100 µg/ml Penicillin/Streptomycin und 2 mM/l Glutamin verwendet.

2.3.1.2. Gey`s Balanced Salt Solution (GBSS)

Die GBSS wurde mit 5% Glukose versetzt. Dieser Ansatz wurde bis zur Präparation auf Eis gelagert und mittels einer Kanüle, die über ein Schlauchsystem mit einer Carbogen-Flasche verbunden war, oxigeniert. In der GBSS- Lösung wurde das Rautenhirn der Ratte bis zur weiteren Feinpräparation auf Eis gelagert.

2.3.1.3. Hanks Balanced Salt Solution (HBSS)

Der HBSS-Puffer wurde vor Präparationsbeginn mit 20mM HEPES versehen. Dieser Ansatz wurde bis zur Präparation auf Eis gelagert und mittels einer Kanüle, die über ein Schlauchsystem mit einer Carbogen-Flasche verbunden ist, begast.

Nach der Oxygenierung wurde die HBSS zum Ansetzen der Dispase-Lösung und deren EDTA-haltige Inaktivierungslösung genutzt. Außerdem diente HBSS zur Aufbewahrung des frisch präparierten *Area postrema*-Gewebes bis zu seiner Überführung in die Dispase-Lösung.

2.3.1.4. Ansetzen der Dispaselösung

Ein bei -20 °C gelagertes Aliquot der Dispase (Vol. 1 ml) wurde im Heizblock (37 °C) aufgetaut und 2ml HBSS zugefügt. Die Gebrauchslösung hatte nun eine Enzymaktivität von 2 U/ml.

2.3.1.5. Inaktivierungslösung der Dispase

Zur Inaktivierung der kalziumabhängigen Dispase wurde eine 1mM EDTA HBSS verwendet, die ebenfalls im Heizblock vorher auf 37°C angewärmt wurde.

2.3.2. Lösungen für Kalzium-Imaging Messungen

2.3.2.1. Kalziummesspuffer

Die Zellen der AP wurden während der Imaging-Versuche kontinuierlich mit Messpuffer superfundiert. Dieser Kalziummesspuffer setzte sich aus folgenden Bestandteilen zusammen: 5 mM/l HEPES Natriumsalz, 130 mM/l NaCl, 10 mM/l D-Glukose, 5 mM/l KCl, 1 mM/l MgCl₂ und 1,25 mM/l CaCl₂.

2.3.3.4. High-Kalium-Puffer

Die Zellen wurden am Ende eines jeden Imaging-Versuchs mit High-Kalium-Puffer superfundiert. Dieser diente als Kriterium für die Beurteilung der Vitalität einer neuronalen Zellkultur. Der High-Kalium-Puffer setzte sich aus folgenden Bestandteilen zusammen: 1,5 mM/l HEPES Natriumsalz, 43 mM/l NaCl, 10 mM/l D-Glukose, 50 mM/l KCl, 1,5 mM/l MgCl₂ und 1 mM/l CaCl₂.

2.3.3. Lösungen für die Immunzytochemie

2.3.3.1. Phosphatpuffer (PB)

Die Basislösung aller Inkubations- und Waschschriffe des immunzytochemischen Protokolls stellte ein jeweils frisch angesetzter 0,1 M/l Phosphatpuffer (PB) dar. Dieser Puffer wurde aus 0,2 M/l Stammlösungen von Dinatriumhydrogen-Phosphat (Na₂HPO₄) und Natriumdihydrogen-Phosphat (NaH₂PO₄) in Reinstwasser hergestellt. Durch Mischen von 720 ml NaH₂PO₄ und 280 ml Na₂HPO₄ erhielt man einen 0,2 M/l PB, welcher durch Zugabe des gleichen Volumens an Reinstwasser (1l) auf 0,1 M/l verdünnt wurde. Der pH-Wert des PB wurde unmittelbar nach seiner Herstellung durch Messung kontrolliert und ggf. auf einen pH von 7,4 korrigiert.

2.3.3.2. Inkubationspuffer für immunzytochemische Untersuchungen

Um bei immunzytochemischen Untersuchungen mit Antigen-spezifischen Antikörpern/-seren eine erhöhte Hintergrundfärbung zu vermeiden, mussten potenziell unspezifische Antikörperbindungsstellen (elektrische Ladungen, Bindegewebsstrukturen etc.) der neuroglialen Zellkultur abgesättigt werden. Hierzu wurden dem PBS 10 % fetales Kälberserum (FKS) zugesetzt. Zur partiellen Permeabilisierung der kultivierten Zellen wurde als Detergens 0,05% Triton-X-100 hinzugefügt. Die Zellkultur wurde nun für eine Stunde mit dem Präinkubationspuffer inkubiert.

2.3.3.3. Inkubationspuffer für immunzytochemische Untersuchungen

Für den Einsatz der primären und sekundären Antikörper in der Immunzytochemie der Zellkultur wurde diese zunächst vorsichtig in einem Inkubationspuffer gelöst. Die Grundlage dafür stellte ebenfalls PBS dar, dem 0,05% Triton-X-100 und 10% FKS zugeführt wurden.

2.3.3.4. Avidin-Biotin Blocking Kit

Zur Absättigung potenzieller Avidin – bzw. Biotin - spezifischer Bindungsstellen in der neuroglialen Kultur wurde jeweils Substanz A (Avidin) und Substanz B (Biotin) in einer Endkonzentration von 1:20 in einer Endkonzentration in PBS-T gelöst.

2.3.3.5. Paraformaldehydlösung (PFA 4 %)

Zur Fixierung der primären Zellkultur wurde eine jeweils frisch angesetzte 4% PFA-Lösung benutzt, deren fixierende Wirkung v.a. auf der Kreuzvernetzung reaktiver Gruppen in Polypeptidketten von Proteinen beruht. Eine entsprechende Menge des pulverförmigen Paraformaldehyds wurde dabei unter

dem Abzug abgewogen und unter Rühren bei 60 °C in P B gelöst. Anschließend wurde die Lösung mit Hilfe eines Faltenfilters (Ø 240 mm) filtriert und auf 4 °C gekühlt. Das PFA wurde vor jedem Versuch frisch angesetzt.

2.3.4. Lösungen für die Zytokin-Bioassays

2.3.4.1. Verwendete Lösungen für den TNF- α Bioassay und das Passagieren der WEHI-Zelllinie

Zur Messung der TNF- α Werte im Zellkulturüberstand wurde ein im Institut etablierter Bioassay verwendet. Für diesen Assay wurden WEHI-Zellen verwendet. Der Name der Zelllinie steht für: **W**alter and **E**lizabeth **H**all Institute. Es handelt sich um eine murine Fibrosarkom-Zelllinie 164 Subklon 13. Diese Zelllinie wird von der „American Tissue Culture Collection“ (ATCC) unter der Bezeichnung CRL 1751 geführt. Die Zellen stammen aus einem künstlich induzierten Fibrosarkom der Balb/c-Mäuse. Dazu wurde dieser Mauslinie die Substanz Methylcholandren subkutan injiziert. Aus den entstandenen Fibrosarkomzellen wurde der o.g. Subklon isoliert, der äußerst empfindlich gegenüber TNF reagiert (Espevik & Nissen-Meyer, 1986).

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

Tabelle 2: Verwendete Reagenzien für den TNF- α Bioassay

2.3.4.2. Verwendete Lösungen für den IL-6 Bioassay und das Passagieren der B9-Zelllinie

Zur Messung der IL-6 Werte im Zellkulturüberstand wurde ebenfalls ein im Institut etablierter Bioassay verwendet. Für diesen Assay wurden B9-Zellen verwendet. Diese Zelllinie wurde 1986 von Lansdorp et al. (Lansdorp *et al.*, 1986) entwickelt. Dazu wurde in die Bauchhöhle von Balb/c-Mäusen Pristane (2,6,10,14-Tetrapentylpentacane) injiziert. Die entnommenen Milzzellen der so behandelten Tiere wurden mit Hybridplastozytomzellen (Sp2/0Ag14) fusioniert. Daraus entstand dann die Hybridoma- Zelllinie B 13.29. Die in unserem Bioassay verwendete B9-Zelllinie ist ein Subklon dieser Zelllinie. Ihre Sensivität gegenüber IL-6 ist so hoch, dass sogar der Nachweis von bioaktivem IL-6 eines einzelnen menschlichen Monozyten möglich wäre.

Reagenzien	Zusammensetzung	Hersteller
Zellkulturmedium	45 ml RMPI-Medium 4 ml FKS (fetales Kälberserum) 65 µl Gentamycin 0,5 ml Glutamin 125 µl Mercaptoethanol 500 I.U./ml Recombinant-human-IL-6	Rothwell Park Memorial Institute Medium 1640, Fa. Life Technologies Paisley, Scotland
Assay-Medium	45 ml RMPI-Medium 4 ml FKS (fetales Kälberserum) 65 µl Gentamycin 0,5 ml Glutamin 125 µl Mercaptoethanol	Rothwell Park Memorial Institute Medium 1640, Fa. Life Technologies Paisley, Scotland
IL-6-Standard	500 µl IL-6 (50 IU/ml)	Referenz- Code 89/548,

Qualitätskontrollen	<p>QK 1:500 μl IL-6 (10 IU/ml)</p> <p>QK 2:500 μl IL-6 (25 IU/ml)</p>	National Institute for Biological Standards and Control (NIBSC) Potters Bar, Großbritannien
MTT (3-[4,5-Dimethyl- Thiazol-2yl] 2,5- Diphenyl-Tetrazolium- Bromid)-Lösung	0,1g MTT in 20 ml PBS	Sigma-Aldrich Chemicals St. Louis, MO, USA
Isopropanol/ HCl-Lösung	<p>4 ml 2NHCl</p> <p>196 ml Isopropanol</p>	Merck, D-Darmstadt

Tabelle 3: Verwendete Reagenzien für den IL-6 Bioassay

2.3.5. Verwendete PAMPs und Zytokine

2.3.5.1. Verwendete PAMPs

Substanz	Verwendete Dosis	Hersteller
LPS (Lipopolysaccharid), <i>Escherichia coli</i> , Serotyp O111:4B	100 µg/ml Medium	Sigma-Aldrich, (München, Deutschland)
MDP (N-acetyl-muramyl- L-alanin-D-isoglutamin) Gram-positive Bakterien	100 µg/ml Medium	ICN Biomedicals Inc., (Aurora, OH, USA)
FSL-1 (Fibroblasten- stimulierendes Lipopeptid-1), synthetisch hergestellt	100 µg/ml Medium	Emc microcollections GmbH, (Tuttlingen, Deutschland)
PI:PC (Polyriboinosin- Polyribocytosinsäure) synthetisch hergestellt	100 µg/ml Medium	Sigma-Aldrich, (München, Deutschland)

Tabelle 4: Verwendete PAMPs zur Stimulation der primären Zellkultur der AP

- **Lipopolysaccharid (LPS)**

Das in den Versuchen verwendeten LPS stammte von *Escherichia coli* Serotyp O111:4B (Sigma-Aldrich, München, Deutschland) und besteht aus einem zweifach phosphorylierten Glucoseaminyl-b-1,6-glucosamin-disaccharid, sechs ungesättigten Fettsäuren und drei Alkyloxyalkylgruppen bestimmter Länge und Position.

Das pulverförmige LPS wurde in sterilem PBS in einer Konzentration von 1 mg/ml gelöst und bis zum Versuchsbeginn bei – 40°C gelagert. Für das

Kalzium-Imaging wurde dann diese Stammlösung direkt in die Messkammer gegeben, so dass nach der Vermischung mit dem Messpuffer eine Konzentration von 100 µg/ml entstand. Zur Stimulation der primären neuroglialen Zellkultur für die Immunzytochemie und die Zytokinmessungen wurde die aufgetaute Stammlösung soweit mit Zellkulturmedium verdünnt, dass man eine Konzentration von 100 µg LPS /ml Zellkulturmedium erhielt. Für alle Versuche, bei denen die Zellkultur über Nacht mit LPS vorinkubiert wurde, wurde jedoch eine Konzentration von nur 10 µg/ml LPS eingesetzt, um zytotoxische Effekte zu vermeiden.

- **Muramyl-dipeptid (MDP)**

Das pulverförmige MDP (Abbildung 10) wurde in PBS in einer Konzentration von 1 mg/ml gelöst und bis zum Versuchsbeginn bei – 40°C gelagert. Für das Kalzium-Imaging wurde dann diese Stocklösung direkt in die Messkammer gegeben, um eine Endkonzentration von 100 µg/ml MDP zu erhalten.

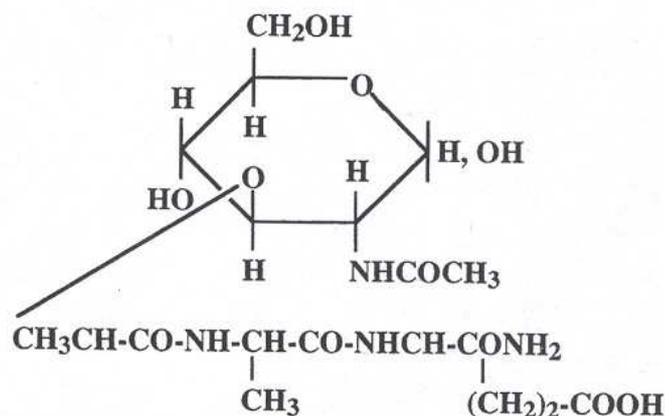


Abbildung 10: Strukturformel des MDP (N-Acetylmuramyl-L-alanin-D-Isoglutamin)

- **Fibroblasten-stimulierendes Lipopeptid-1 (FSL-1)**

FSL-1 (Abbildung 6) besitzt zwei durch Esterbindungen verbundene Fettsäuren und einen freien N-terminus. Sein hydrophober Charakter entsteht, da die letzte Aminosäure seines Peptidrests Phenylalanin ist (Okusawa *et al.*, 2004). Bei dem in unseren Versuchen verwendeten FSL-1 von der Firma emc microcollections GmbH (Tuttlingen, Deutschland) handelt es sich um ein Gemisch aus RR und RS Stereoisomeren.

Das pulverförmige FSL-1 wurde in PBS in einer Konzentration von 1 mg/ml gelöst und bis zum Versuchsbeginn bei – 40°C gelagert. Für das Kalzium-Imaging wurde dann diese Stocklösung direkt in die Messkammer gegeben, so dass sich nach der Vermischung mit dem Messpuffer eine Konzentration von 100 µg/ml entstellte. Zur Stimulation der primären neuroglialen Zellkultur für die Immunzytochemie und die Zytokinmessungen wurde die aufgetaute Stocklösung mit Zellkulturmedium so verdünnt, dass man eine Konzentration von 100 µg FSL-1 /ml Zellkulturmedium erreichte.

- **Polyriboinosin-Polyribocytosinsäure (PI:PC)**

Das in den Versuchen eingesetzte PI:PC stammte von Sigma-Aldrich (München, Deutschland) und wurde genau wie die vorher beschriebenen Pyrogene in einer Konzentration von 1 mg/ml in PBS gelöst und bei – 40°C eingefroren. Eingesetzt für sämtliche Versuche wurde es dann in einer Konzentration von 100 µg/ml.

2.3.5.2. Verwendete Zytokine

- **Tumor Nekrose Faktor- α (TNF- α)**

Bei dem für unsere Versuche verwendeten TNF- α handelte es sich um ein 17 kDa schweres Ratten-spezifisches rekombinantes Zytokin, das aus *E.coli* gewonnen wurde (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland).

Das lyophilisierte TNF- α wurde sofort nach der Lieferung auf Trockeneis in einer Konzentration von 40 $\mu\text{g/ml}$ in PBS gelöst und bei -55°C eingefroren. Für die Ratio-Imaging-Versuche wurde die Substanz dann wieder aufgetaut und als Boluszugabe auf die Zellkultur gegeben, so dass nach der Vermischung mit dem Messpuffer eine Konzentration von 4 $\mu\text{g/ml}$ TNF- α in der Messkammer vorlag. Diese Konzentration wurde anhand von zahlreichen Vorversuchen ausgewählt, in denen die Reaktivität primärer AP-Zellkulturen auf verschiedene Dosierungen an TNF- α getestet wurde.

- **Interleukin-1 β (IL-1 β)**

Bei dem hier verwendeten Ratten-spezifischen IL-1 β handelte es sich um ein 17,3 kDa schweres Molekül, welches aus *E.coli* gewonnen wurde (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland). Vor dem Einsatz als Agonist fürs Kalzium-Imaging, wurde es nach dem gleichen Protokoll wie TNF- α in PBS gelöst und bis zum Versuch bei -55°C eingefroren. Seine Endkonzentration für die Versuchsdurchführung von 4 $\mu\text{g/ml}$ wurde ebenfalls durch Vorversuche zur Dosisfindung ermittelt.

2.3.5.3. Der NO-Donor DEA (2-(N,N-Diethylamino)-diazemat-2-oxid)

NO agiert im Organismus als atypischer Neurotransmitter- oder Modulator. Bei DEA handelt es sich um einen hochpotenten NO-Donor (Feil *et al.*, 2002).

Das pulverförmige DEA stammte von der Firma Alexis (Grünberg, Deutschland) und wurde im DMSO (Dimethyl-Sulfoxid) als Stocklösung in einer Konzentration von 10 mM gelöst. Da NO eine sehr volatile und lichtempfindliche Substanz ist, musste es nach dem Auflösen schnell in einem lichtgeschützten Gefäß bei –23°C eingefroren werden. Für die Messungen der intrazellulären Kalzium-Konzentration wurde es dann erst unmittelbar vor jedem Versuch aufgetaut und als Bolus-Applikation in die Messkammer gegeben, so dass dort eine Konzentration von 1 mM DEA Messpuffer vorlag. Diese Dosierung wurde in Vorversuchen ermittelt und in vergleichbaren Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe bereits erfolgreich eingesetzt.

2.4. Methoden

2.4.1. Primäre Zellkultur der Area postrema

2.4.1.1. Vorbereitung und Beschichtung der Zellkulturkammern

Um ein optimales Wachstum der neuroglialen Zellkultur zu erreichen, mussten die Zellkulturkammern entsprechend vorbereitet werden. Als Grundfläche dieser Kammern dienten Objektträger aus Glas bzw. spezielle CELLocate® glass coverslips, auf denen ein Koordinatensystem zur genauen Lokalisierung einzelner Zellen aufgebracht war. Glas eignete sich aufgrund seiner Oberflächenbeschaffenheit und seiner elektrischen Ladung optimal zur Anheftung und für das Wachstum einzelner Zellen. Darüber hinaus eignete sich Glas wegen seiner optischen Eigenschaften hervorragend für die Methode des Kalzium-Imagings (Freshney, 1990). Um die Ratio-Imaging-Studien zur Messung der $[Ca^{2+}]_i$ durchführen zu können, muss die Adhäsionsmatrix der Zellen eine Durchlässigkeit für monochromatisches Licht entsprechender Wellenlänge bei vernachlässigbarer optischer und chromatischer Abberation verfügen. Die Deckgläschen bzw. „glass coverslips“ wurden auf die Unterseite von wieder verwertbaren Flexiperm®-Mikrokammern gelegt, wo sie sich fest anhefteten. Über Nacht wurde der Boden dieser Kammern dann mit Poly-L-Lysin (0,1 mg/ml) bei 4°C beschichtet, was ein Anwachsen der Zellen begünstigte. Vor dem „Aussähen“ der Zellsuspension war es jedoch wichtig, das Poly-L-Lysin mit sterilem Wasser wieder herunter zu waschen, da der direkte Kontakt der Zellen mit Poly-L-Lysin zu einer Schädigung der Zellmembran geführt hätte. Die Kulturkammern wurden nun unter der Sterilbank getrocknet und bis zur Befüllung im Brutschrank auf 37°C vorgewärmt.

2.4.1.2. Präparation der Area postrema

Die Präparation der *Area postrema* erfolgte unter annähernd sterilen Bedingungen; es wurden hitze- oder ethanolsterilisierte Instrumente dazu verwendet. Die 4-6 Tage alten neonatalen Wistar-Ratten wurden mit einer Schere dekapitiert. Danach wurde die Kopfhaut mit einem Skalpell ellipsenförmig inzidiert und mit einer chirurgischen Pinzette abpräpariert. Nachdem die Schädeldecke vorsichtig mit einer kleinen Schere durchtrennt wurde, konnte diese abgehoben werden. Anschließend wurde das komplette Gehirn unter Schonung des Hirnstammes aus dem Schädel extrahiert. Der Hirnstamm und das anhaftende Kleinhirn wurden nun mit einem sauberen Skalpell vom Großhirn abgetrennt und bis zur Feinpräparation in 3 cm großen Perischalen, gefüllt mit oxygeniertem GBSS-Puffer, auf Eis gelagert.

Unter einem Binokular wurde anschließend die *Area postrema*, die in Nachbarschaft zum *Nucleus tractus solitarius* als feine membranähnliche Struktur der Medulla oblongata aufsitzt, lokalisiert. Mit einer feinen Augenschere wurde nun die AP sorgfältig vom umliegenden Gewebe abgetrennt und in eine Petrischale gefüllt mit HBSS-Puffer überführt und bis zur enzymatischen Behandlung auf Eis gelagert.

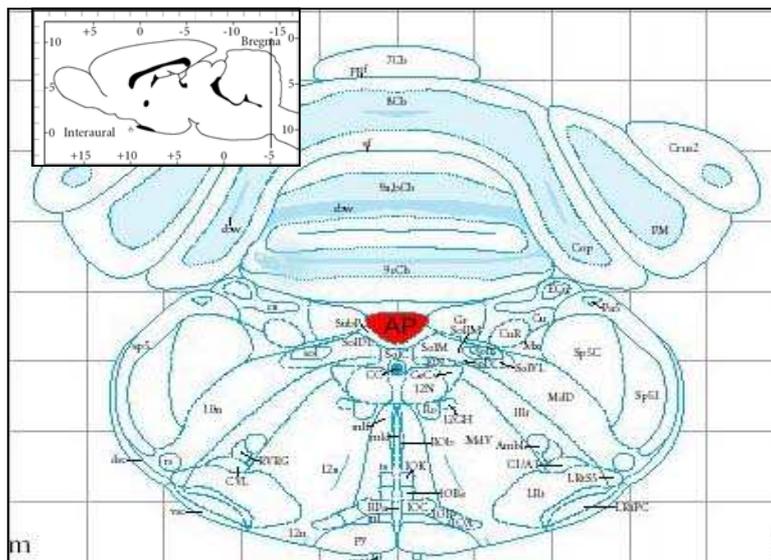


Abbildung 11: Die Abbildung zeigt die topographische Lage der AP der Ratte im Querschnitt des Hirnstammes (modifiziert nach „The Rat Brain“, G. Paxinos & C. Watson, 5th Edition, 2005).

2.4.1.3. Weiterverarbeitung des Gewebes

Nachdem die Gewebestücke der *Area postrema* aller Tiere sauber präpariert waren, wurden diese aus der HBSS-gefüllten Petrischale mit einer 10 ml serologischen Pipette in ein 15 ml Röhrchen überführt. Anschließend folgte eine Zugabe von ca. 2 ml Dispase (2 U/ml) gelöst in oxygeniertem HBSS-Puffer. Die enzymatische Inkubation erfolgte nun für 45 Minuten im Wärmeblock bei 37°C unter Zufuhr von Carbogen. Durch diese enzymatische Behandlung wurde das Gewebe teilweise aufgelöst, ohne dass es dabei zu nennenswerten Schädigungen der Zellmembran kam (Frangakis *et al.*, 1982; Frangakis & Kimelberg, 1984; Gebke *et al.*, 2000).

Um die Dispase zu inaktivieren, wurde nun das Gewebe zweimal mit EDTA (1mM), gelöst in HBSS-Puffer, gewaschen. Im Anschluss daran folgten drei weitere Waschschrte mit Neurobasal-A-Medium. Eine mechanische Dissoziation wurde dann ebenfalls in 2 ml Neurobasal-A-Medium durchgeführt. Hierzu wurden die Gewebefragmente solange durch die Öffnung einer 1 ml Eppendorf-Pipette gesogen, bis das Gewebe nahezu vollständig dissoziiert war. Als Anhaltspunkt für den Grad der Dissoziation wurden das Fehlen sichtbarer Gewebefragmente sowie eine milchige Trübung der Lösung gewählt. Während der mechanischen Behandlung musste darauf geachtet werden, dass keine gewebsschädigenden Luftblasen entstanden.

Abschließend wurde die Zellsuspension auf die vorbereiteten Zellkulturkammern verteilt (300 µl/Kammer). Die Kammern wurden im Brutschrank bei 37°C, einer CO₂-Konzentration von 5% und 95% relativer Luftfeuchtigkeit gelagert. Erst am darauffolgenden Tag erfolgte ein Wechsel des Kulturmediums unter der Sterilbank. Bis dahin hefteten sich die vitalen Zellen erfahrungsgemäß am Boden des Kulturgefäßes an. Nichtvitale Zellen und Zelltrümmer, die im Kulturüberstand vorhanden waren, wurden bei diesem

Wechsel des Mediums gleichzeitig abgesogen. Der Austausch des Neurobal-A-Mediums erfolgte dann im zweitägigen Wechsel.

Nach einer Wachstums- und Differenzierungszeit von 4-5 Tagen im Brutschrank standen die Zellen für funktionelle Untersuchungen zur Verfügung.

2.4.2. Messung der intrazellulären Kalziumkonzentration mittels Ratio-Imaging-Technik

2.4.2.1. Grundlagen der Ratio-Imaging-Technik

Die Ratio-Imaging Technik bietet die Möglichkeit, die intrazelluläre Konzentration freier Kalziumionen ($[Ca^{2+}]_i$) kontinuierlich zu messen (Baylor & Hollingworth, 2000). Damit stellt die Methode eine effiziente Möglichkeit zur Untersuchung der transmitterinduzierten, intrazellulären Signaltransduktion in lebenden Zellen wie Neuronen, Astrozyten, Mikrogliazellen oder Oligodendrozyten dar (Jurzak *et al.*, 1995a; Gebke *et al.*, 2000).

Um Änderungen der $[Ca^{2+}]_i$ messen zu können, macht man sich selektive, Ca^{2+} -chelierende Fluoreszenzfarbstoffe zunutze (Moreton, 1994). Die Entwicklung der ersten Farbstoffe dieser Gruppe gelang Roger Tsien (Tsien, 1980). Das Äquorin der Leuchtqualle war der erste, wissenschaftlich in der Muskelforschung eingesetzte Kalziumindikator zur Messung der intrazellulären Kalziumkonzentration. Heute steht eine große Anzahl selektiver Fluoreszenzindikatoren zur Kalzium-Messung zur Verfügung, wie beispielsweise Derivate des Kalziumchelators EGTA (z.B. Quin-2, Indo-1, Fura-2), des Fluoresceins (z.B. Fluo-3) oder des Rhodamins (z.B. Rhod-2) (Grynkiewicz *et al.*, 1985).

Die Farbstoffe werden in zwei große Gruppen unterteilt: Die Wellenlängen-stabilen (*wavelength stable*) und die Wellenlängen-ändernden (*wavelength shifting*) Fluoreszenzfarbstoffe. Bei den Wellenlängen-stabilen Fluoreszenzindikatoren, wie z.B. Quin-2, ändert sich durch Kalziumbindung nur die Emissionsintensität, das Exzitations- und Emissionsspektrum aber bleiben konstant. Mitglieder der Gruppe der Wellenlängen-ändernden Farbstoffe ändern

nach Kalziumbindung entweder ihre Exzitations- oder ihre Emissionsspektren (Ross, 1989; Tsien, 1989; Moreton, 1994) und erwiesen sich deshalb als besonders geeignet für die intrazelluläre Kalzium-Konzentrationsmessung. Zu den Wellenlängen-ändernden Fluoreszenzindikatoren gehört auch das in dieser Arbeit eingesetzte Fura-2 (Abbildung 13), dessen Exzitationsspektrum sich nach Kalziumbindung ändert (Tsien, 1986; Roe *et al.*, 1990). Das Anregungsoptimum des freien, polyanionischen Indikators Fura-2 liegt bei 363 nm, der mit Kalzium gesättigte Farbstoff dagegen wird maximal durch Licht einer Wellenlänge von 340 nm angeregt. Das Emissionsmaximum bleibt mit etwa 510 nm konstant (kalziumfreies Fura-2 512 nm, kalziumbindendes Fura-2 505 nm) (Abbildung 12) (Tsien, 1986). In der Praxis wird zur Messung der Fluoreszenzintensität des kalziumfreien Farbstoffes allerdings nicht die optimalen Anregungswellenlänge von 363 nm benutzt, sondern Licht einer Wellenlänge von 380 nm. Der Grund hierfür ist, dass eine Wellenlänge von 363 nm sehr nahe am sogenannten isoemissiven Punkt des Fura-2-spezifischen Spektralverhaltens liegt, bei dem die Fluoreszenzintensität des Fura-2 unabhängig von der Kalziumkonzentration immer gleich ist (Abbildung 12). Bei einer Anregungswellenlänge (ARW) von 380 nm ist dagegen die Differenz der Fluoreszenzintensität für kalziumfreies und –gesättigtes Fura-2 am größten.

Bei der Ratio-Imaging Technik wird der Quotient (Ratio) aus den gemessenen Emissionsintensitäten bei den beiden ARWs 340 und 380 nm gemessen. Dieser Quotient spiegelt das Verhältnis von gebundenem zu freiem Indikator wieder (Tsien, 1986).

Gemäß des Massenwirkungsgesetzes verhält sich die Ratio proportional zur Konzentration des vorhandenen freien bzw. gebundenen Kalziums. Aus der im Versuch gemessenen Ratio [Emission (340 nm) / Emission (380 nm)] kann mit Hilfe folgender Gleichung die absolute, intrazelluläre Kalziumkonzentration berechnet werden (Grynkiewicz *et al.*, 1985):

$$[\text{Ca}^{2+}] = \text{KD} \times \frac{(R - R_{\min})}{(R_{\max} - R)} \times \frac{S_{f2}}{S_{b2}}$$

Formellegende:

KD = Dissoziationskonstante des Fura-2 für Calcium

R = gemessene Ratio (Emission bei 340 nm ARW / Emission bei 380 nm ARW)

R_{min} = Ratio bei kalziumfreiem Fura-2

R_{max} = Ratio bei kalziumgesättigtem Fura-2

S_{f2} = Emissionswerte des kalziumfreien Fura-2 bei einer ARW von 380 nm

S_{b2} = Emissionswerte des kalziumgesättigten Fura-2 bei einer ARW von 380 nm

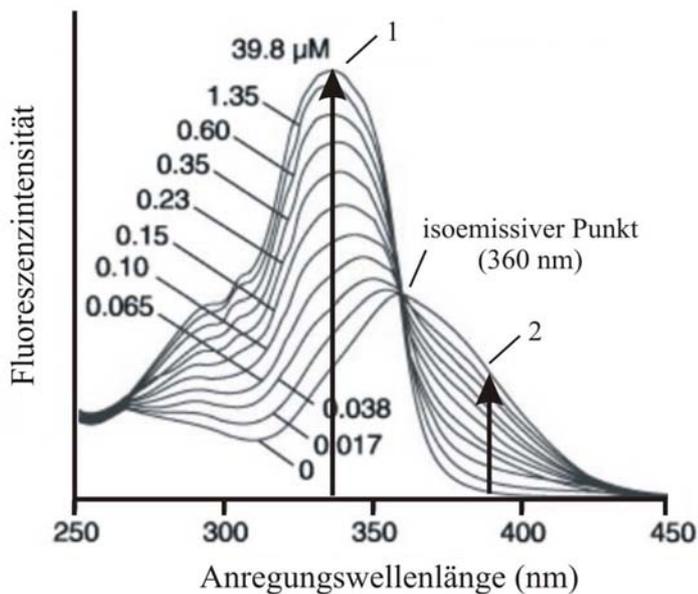


Abbildung 12: Exzitationsspektren von Fura-2

Das Diagramm zeigt die Fluoreszenzintensität (Emissionswellenlänge 510 nm) von Fura-2 in Abhängigkeit von der Anregungswellenlänge (nm) in Anwesenheit verschiedener Konzentrationen an freien Calciumionen ([Ca²⁺]_{frei} (µM)).

Kurve 1: das gesamte Fura-2 ist mit Calcium gesättigt; Emissionsmaximum bei 340 nm

Kurve 2: das gesamte Fura-2 liegt Calcium-frei vor; Emissionsmaximum bei 363 nm

Die Pfeile zeigen die Fluoreszenzintensitäten bei den beiden in der Praxis des Ratio-Imagings benutzten Anregungswellenlängen von 340 und 380 nm. Hier ist jeweils die Differenz der Fluoreszenzintensität für Ca²⁺-freies und –gesättigtes Fura-2 am größten.

In dieser Arbeit wurde aus den gemessenen Ratios allerdings nicht die absolute Ca^{2+} -Konzentration errechnet, da es ausreicht, die Höhe der Ratioänderung als Maß für eine zelluläre Aktivierung heranzuziehen.

2.4.2.2. Der Fluoreszenz-Farbstoff Fura-2-Acetoxyethyl(AM)ester

Zur Messung der Änderung intrazellulärer Ca^{2+} -Konzentrationen in Zellen einer AP-Zellkultur, wurde als Indikatorfarbstoff Fura-2 gewählt. Dieser Farbstoff ermöglichte es, etwaige Veränderungen der intrazellulären Kalziumkonzentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) nach externer Stimulation mit PAMPs oder proinflammatorischen Zytokinen zu messen.

Fura-2 ist ein stark negativ geladenes Molekül, welches nicht in der Lage ist, die Zellmembran zu permeieren. Um eine Farbstoffbeladung der zu untersuchenden Zellen ohne Schädigung der Zellmembran zu ermöglichen, wurden Acetoxyethylsterderivate der Fluoreszenzindikatoren entwickelt (Abbildung 13). Diese hingegen permeieren leicht die Zellmembran, da sie lipophil sind, können aber keine Ca^{2+} -Ionen binden. Innerhalb der Zelle wird der Fura-2 Acetoxyethylster durch zytoplasmatische Esterasen hydrolysiert. Da das Fura-2 Molekül nun membranimpermeabel ist, ist der Farbstoff sozusagen in der Zelle „gefangen“ (Poenie & Tsien, 1986). Zudem kann nur die aktive (hydrolysierte) Form des Fura-2 zweiwertige Kationen wie freies Ca^{2+} in der Zelle binden.

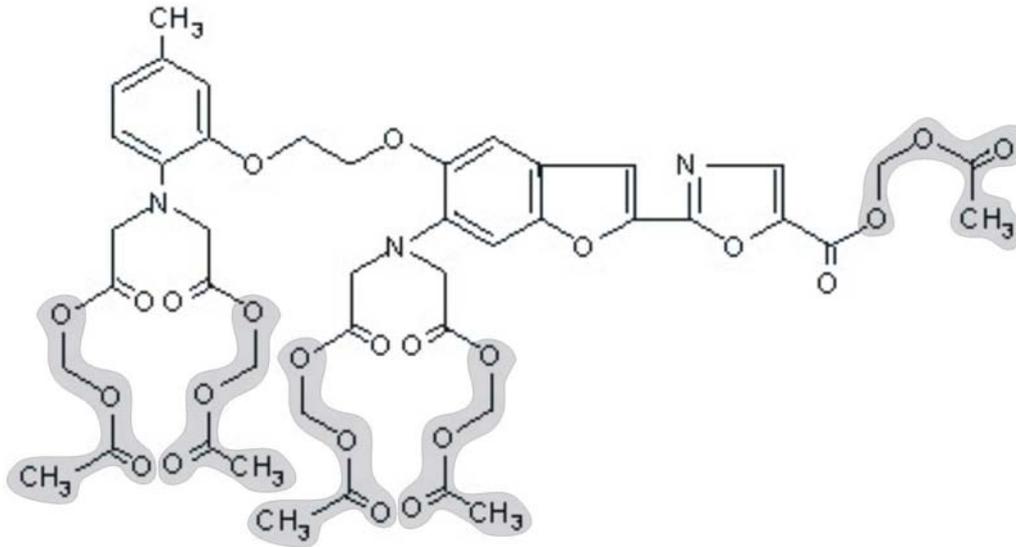


Abbildung 13: Strukturformel des Fura-2 Acetoxymethylester (Fura-2 AM). Die grau hinterlegten Bereiche des Moleküls werden in der Zelle durch zytoplasmatische Esterasen abgespalten. Fura-2 wird so membranimpermeabel, und kann außerdem als aktive Form Ionen binden.

Um die zu untersuchenden Zellen der primären Zellkultur der *Area postrema* mit Fura-2 zu beladen, wurde die Zellkulturkammer mit präpariertem Neurobasal-A-Medium gefüllt, welches 2 μ M Fura-2 AM enthielt. Das pulverförmige Fura-2 wurde dazu vorher in Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst und als 1 mM Stammlösung bei -24°C gelagert. Während der 45-minütigen Inkubation der Zellen im gewohnten Milieu im Brutschrank bei 37°C , erfolgte die zelluläre Aufnahme des Indikators. Im Anschluss an die Inkubation wurde nun das überschüssige Fura-2 durch dreimaliges Waschen mit Messpuffer entfernt. Um das CELLocate® glass coverslip mit den adhären Zellen in die Messkammer einzuspannen, musste zunächst die Flexiperm®-Kammerwandung vorsichtig mit einer Pinzette entfernt werden. Das runde CELLocate®-Gläschen wurde dazu auf die mittige Öffnung einer Stahlscheibe gelegt, welche die Basis der Messkammer bildete. Zur Befestigung des CELLocate®-Gläschens wurde ein Teflonring, der gleichzeitig die Außenwand der Messkammer bildete, mit vier Schrauben auf der Scheibe fixiert. Die Messkammer konnte nun in die dafür vorgesehene Öffnung des Objektisches des Mikroskops eingesetzt werden (Abbildung 14). Nach der Montage der

Messkammer wurde diese sofort mit 900 μl Messpuffer befüllt [RT]. An die Messkammer wurden Zu- und Abfluss einer Schlauchpumpe in Form von gebogenen Kanülen angeschlossen, welche eine permanente Perfusion der zu untersuchenden Zellen gewährleisten sollten. Dabei war die Kanüle, über die der Messpuffer in die Kammer geleitet wird, so angebracht, dass sie bis zum Boden der Kammer reichte, die Kanüle für den Abfluss aber lediglich die Flüssigkeitsoberfläche berührte. Mit Hilfe einer Schlauchpumpe wurde Messpuffer mit einer Flussrate von 2 ml/min durch die Messkammer geleitet, so dass eine konstante Füllung der Messkammer und ein kontinuierlicher Pufferwechsel bei minimaler Turbulenz gewährleistet waren.

Die Zellen wurden nun für 10 Minuten mit Messpuffer superfundiert, um den überschüssigen Fluoreszenzfarbstoff herunter zu waschen.

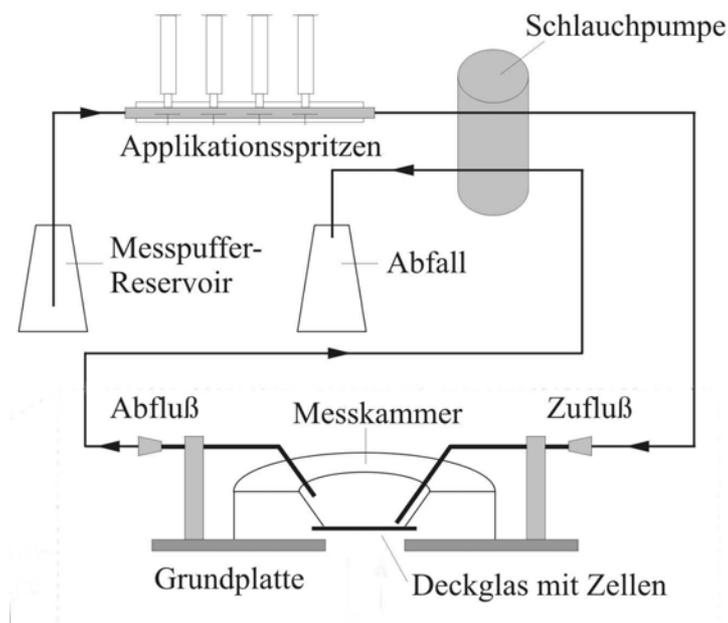


Abbildung 14: Schematische Darstellung der Messkammer und Apparatur zur Perfusion

Die Kulturen für die LPS-Toleranzversuche wurden vor dem Versuchstag für 18 Stunden mit dem jeweiligen PAMP vorstimuliert. Hierzu wurden die Kulturen mit LPS, MDP oder FSL-1 (jeweils 10 µg/ml), gelöst in Kulturmedium, im Brutschrank bei 37°C (5% CO₂, 95% Luftfeuchtigkeit) inkubiert. Anschließend erfolgte die Beladung mit Fura-2 wie oben beschrieben.

2.4.2.3. Der Imaging-Messstand

Da der eingesetzte Fluoreszenzindikator Fura-2 durch Kalziumbindung sein Exzitationsspektrum ändert, wurde zur Messung monochromatisches Licht der Wellenlänge 340 nm und 380 nm benötigt. Das Licht in der benötigten Wellenlänge wurde erzeugt, indem das Licht einer 100 Watt Quecksilberlampe abwechselnd durch zwei unterschiedliche Filter eines rotierenden Filterrads strahlte. Mit Hilfe des von einer Steuereinheit regulierten Shutter wurden die Zellen vor Hitze und dem sog. Photo bleaching geschützt. Über die Kamera konnten die Belichtungszeit sowie die zeitlichen Abstände zwischen den Belichtungen reguliert werden. Das aus dem Filterrad austretende Licht der entsprechenden Anregungswellenlängen wurde in ein inverses Fluoreszenzmikroskop geleitet. Im Mikroskop wurde das Licht durch einen dichromatischen Spiegel abgelenkt und durch ein Fluoreszenzobjektiv (Vergrößerungsfaktor 30x) in die Messkammer geleitet, wo es das Fura-2 zur Fluoreszenz anregte. Das vom Fura-2 emittierte Licht gelangte von der Messkammer aus wieder durch das Objektiv, durch einen Sperrfilter (515 nm) und über den dichromatischen Spiegel in eine CCD-Restlichtkamera. Die bei den beiden unterschiedlichen Anregungswellenlängen (340/380 nm) dokumentierten Bilder wurden mit Hilfe der systemeigenen Software quantifiziert. Bei den daraus resultierenden Werten wurde der Quotient (Emission bei 340 nm ARW / Emission bei 380 nm ARW) gebildet, welcher im Folgenden als Δ Ratio angegeben wird.

2.4.2.4. Versuchsdurchführung

Jede Versuchsreihe wurde mit Zellen aus mehreren Präparationen durchgeführt. Damit sollte erreicht werden, dass jeweils Zellen von unterschiedlich alten Tieren (4-6 Tage) aus verschiedenen Würfen untersucht wurden, um individuelle Unterschiede auszugleichen.

Mit Hilfe des Durchlichtbildes wurde ein Bereich auf dem Raster der CELLLocates® ausgesucht, in dem die Zellen nicht zu dicht lagen und morphologisch einwandfrei erschienen. Eine erfolgreiche Beladung der Zellen mit Fura-2 wurde dagegen mit dem Fluoreszenz-Filter (ARW 340 und 380 nm) kontrolliert. Mit dem selben wurde anschließend auch durch manuelles Öffnen des Shutters jede einzelne zu untersuchende Zelle als „region of interest“ markiert und automatisch nummeriert. Die gemessene Δ Ratio in einem markierten Bereich konnte so exakt einer einzelnen Zelle zugeordnet werden und diente dementsprechend als Kriterium für eine Reaktion dieser Zelle auf den vorausgegangenen Stimulus.

Die zur Stimulation verwendeten Substanzen wurden vorher bei -45°C aufwahrt und unmittelbar vor den Versuchen auf Eis gelagert. Je nach Konzentration der einzelnen Stocklösungen wurden diese zum Teil mit Messpuffer bis zur gewünschten Endkonzentration verdünnt.

Die Applikation der Substanzen erfolgte auf zwei unterschiedliche Weisen: In den meisten Fällen wurde die zu testende Substanz als 100 μl - Bolus mit einer Pipette direkt in die Messkammer appliziert. Durch dreimaliges Aufziehen und Zurückpipettieren wurde eine Durchmischung der Lösungen mit dem Messpuffer erzielt. Vor der Applikation wurde die Perfusion der Messkammer gestoppt, um ein Abfließen der Lösung zu verhindern. Vor der eigentlichen Stimulation erfolgte eine Boluskontrolle, also eine Applikation von 100 μl Messpuffer als Bolus in die Kammer, um sicher zu stellen, dass eine Reaktion der Zellen nicht durch Turbulenzen oder andere mechanische Einflüsse aufgrund der Applikation stattfinden konnte. Die zweite Möglichkeit einen Stimulus in die Messkammer zu geben bestand darin, den substanzhaltigen Puffer in eine 10 ml Spritze zu pipettieren, die mit einem Schlauchsystem mit der Messkammer in Verbindung stand. Nach dem Durchmischen der Substanz

in der Spritze konnte mit einem vorgeschaltetem 3-Wege-Hahn so umgeschaltet werden, dass nicht mehr Messpuffer, sondern die Substanz aus der Spritze in die Messkammer geleitet wurde.

2.4.2.5. Die “Pathogen-associated molecular pattern” (PAMPs) im Kalzium-Imaging

<i>Substanz</i>	<i>Konzentration ($\mu\text{g/ml}$)</i>	<i>Applikations- Art und -menge</i>	<i>Stimulationszeit</i>
LPS	100	100 μl -Bolus	60 Sekunden
MDP	100	100 μl -Bolus	60 Sekunden
FSL-1	100	100 μl -Bolus	60 Sekunden
PI:PC	100	100 μl -Bolus	60 Sekunden

Tabelle 5: Verwendete PAMPs zur Stimulation der primären Zellkultur der AP im Kalzium- Imaging

2.4.2.6. Proinflammatorische Zytokine

<i>Substanz</i>	<i>Konzentration ($\mu\text{g/ml}$)</i>	<i>Applikations- Art und -menge</i>	<i>Stimulationszeit</i>
Tumor Nekrose Faktor- α (TNF α)	4	100 μl -Bolus	60 Sekunden
Interleukin 1 β (IL-1 β)	4	100 μl -Bolus	60 Sekunden

Tabelle 6: Verwendete Zytokine zur Stimulation der primären Zellkultur der AP im Kalzium- Imaging

2.4.2.7. Der NO-Donor DEA

Stickstoff-Monoxid (NO) ist im ZNS sowohl als Neurotransmitter in Neuronen (Metea & Newman, 2007) als auch in Mikrogliazellen während inflammatorischer Vorgänge (Noda *et al.*, 2006) zu finden. In der vorliegenden Arbeit sollte nun untersucht werden, ob die kultivierten Zellen der *Area postrema* durch NO-Zugabe mit einer Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ reagieren. DEA (2-(N,N-Diethylamino)-diazemat-2-oxid) stellt einen hochpotenten NO-Donor dar (Ferrero *et al.*, 1999; Feil *et al.*, 2002). Diese Substanz wurde daher für die entsprechenden Versuche im Rahmen dieser Arbeit eingesetzt

Da die NO-Freisetzung von DEA sehr schnell erfolgt, wurde die Stocklösung (10 mM) erst 1 Minute vor dem Versuch lichtgeschützt aufgetaut und unmittelbar als 100 μ l-Bolus-Applikation in die Messkammer gegeben, so dass sich nach der Vermischung mit Messpuffer eine Endkonzentration von 1 mM einstellte.

2.4.2.8. Kalium

Die Kaliumkonzentration von Neuronen im Zytosol ist deutlich höher als die im Extrazellulärraum. Da die Zellmembran selektiv permeabel für Kaliumionen ist, strömen aufgrund des osmotischen Gradienten Kaliumionen aus der Zelle hinaus. Größere Anionen, für welche die Zellmembran impermeabel ist, bleiben im Inneren der Zelle zurück. Es entsteht ein Membranpotential, welches auf Zytosolseite negativ polarisiert ist. Dieses elektrochemische Potential verhindert einen Ausgleich der Kaliumionen-Konzentration.

Eine Erhöhung der extrazellulären Kalium-Konzentration führt zu einer Depolarisierung präsynaptischer Nervenendigungen, in deren Folge es zur Öffnung spannungsabhängiger Kationen-Kanäle kommt. Durch diese Kanäle erfolgt dann ein Einstrom von Natrium- und Kalziumionen in die Zelle.

Zum Abschluss jedes Imaging-Versuches wurde als letzter Stimulus Kalium in einer Konzentration von 50 mM für 180 Sekunden über das Schlauchsystem appliziert. Die Reaktion der Zellen auf Kalium sollte im Rahmen dieser Arbeit

jedoch nicht ausgewertet werden. Sie gab lediglich Aufschluss über die Vitalität der Zellkultur und ermöglichte eine erste Typisierung der untersuchten Zellen, insbesondere der Neurone.

2.4.2.9. Auswertung

Der Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ in den Zellen der *Area postrema* wurde mit Hilfe eines bildgebenden, computergestützten Verfahrens bestimmt. Die Aufzeichnung der Kalzium-Ströme erfolgte in Nicht-Echtzeit auf Einzelzellniveau. Die durch die CCD-Kamera gemessenen Intensitätswerte der Lichtemission bei 515 nm nach Anregung einzelner Fura-2 beladener Zellen mit den für Fura-2 spezifischen Wellenlängen von 340 und 380 nm wurden wechselweise in den Computer eingelesen. Während der Stimulation wurden die Fluoreszenz-Intensitäten alle 5 Sekunden gemessen. Eine frequentere Messung war aufgrund der manuellen Zugabe der Stimuli als Bolus praktisch nicht umsetzbar. Um ein übermäßiges Ausbleichen des Fluoreszenzfarbstoffs zu verhindern, wurde während der Auswaschphasen nur alle 10 Sekunden gemessen. Der vom Computer ermittelte Quotient (340 nm/380 nm) wurde in Abhängigkeit von der Zeit mit Hilfe von Windows Microsoft Excel, Version 6.0 in einem Koordinatensystem aufgetragen. Die gemessenen Werte wurden gespeichert und zur Darstellung in das Grafikprogramm Graph Pad Prism[®] exportiert.

Für jede applizierte Substanz wurde prozentual ermittelt, wie viele der untersuchten Zellen stimuliert werden konnten. Als positive Stimulation wurden nur solche Zellen berücksichtigt, deren ermittelte Ratioänderung $\geq 0,1$ war, um mögliche physiologische Schwankungen der Baseline auszugleichen. Für die reagierenden Zellen der einzelnen Zelltypen wurde der arithmetische Mittelwert (MW) und der Standardfehler des Mittelwertes (S.E.M.) der Ratioänderung berechnet. Die Daten wurden ebenfalls mit Graph Pad Prism[®] in Form von Balkendiagrammen dargestellt.

Die Zelltypisierung der im Kalzium-Imaging gemessenen Zellen erfolgte mit Hilfe von monoklonalen primären Antikörpern und Antisera. Hierbei handelte es sich um Antikörper gegen MAP2a+b für Neurone, GFAP (**G**lial **f**ibrillary **a**cidic **p**rotein) für Astrozyten, ED1 (CD68) für Mikrogliazellen und CNPase als immunzytologischer Marker für Oligodendrozyten. (Grundlagen der Immunzytochemie siehe Kap. 2.4.3.)

Zelltyp	Primärer Antikörper	Konzentration	Herkunft
Neurone	Mouse-anti-MAP2a+b	1:600	Sigma-Aldrich (München, Deutschland)
Astrozyten	Rabbit-anti-Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP)	1:800	DAKO (Hamburg, Deutschland)
Mikroglia	Mouse-anti-ED1(CD68)	1:2000	AbD Serotec (Oxford, UK)
Oligodendrozyten	Mouse-anti-CNPase	1:300	Sigma-Aldrich (München, Deutschland)

Tabelle 7: Übersicht über die eingesetzten primären Antikörper zur phänotypischen Charakterisierung einzelner Zelltypen

Alle Inkubations- und Waschschrte erfolgten in einer Multiwell-Platte.

Nach Absättigung der unspezifischen Bindungsstellen im Zellkultur-Inkubationspuffer für eine Stunde bei RT wurden die Antikörper in ihren individuellen Verdünnungen (Tabelle 7) in Zellkultur-Inkubationspuffer gelöst und eingesetzt. Nach einer 48-stündigen Inkubation des primären Antikörpers bei 4 °C wurden die Ansätze dann 3 mal jeweils 5 Minuten mit PBS-T gewaschen. Anschließend erfolgte die Zugabe des Sekundärantikörpers für weitere 2 Stunden bei RT.

Sekundärantikörper	Verdünnung	Herkunft
Alexa [®] 488-donkey-anti-rabbit IgG	1:500	MoBiTec GmbH (Göttingen, Deutschland)
Alexa [®] 488-donkey-anti-mouse IgG	1:500	MoBiTec GmbH (Göttingen, Deutschland)
Amca-donkey-anti-mouse IgG	1:200	Chemicon International, Inc. (Temecula, CA, USA)
Cy3 [™] -donkey-anti-rabbit IgG	1:600	Dianova (Hamburg, Deutschland)
Cy3 [™] -goat-anti-mouse IgG	1:600	Dianova (Hamburg, Deutschland)

Tabelle 8: Übersicht über die eingesetzten Fluorochrom-gekoppelten Sekundärantikörper

Nach der Inkubation mit dem Fluorochrom-gekoppelten Sekundärantikörper wurden die zellbeladenen CELLocate[®] Gläschen durch dreimaliges Waschen für 5 Minuten mit PBS-T von überschüssiger Antikörperlösung befreit. Anschließend wurden diese mit Hilfe einer Pinzette vorsichtig in Aqua bidest. getaucht, um eine Kristallisation von Puffersalzen auf der Glasoberfläche zu vermeiden. Zum Schluss wurden auf einen Objektträger 10 µl Citifluor[®] pipettiert und die Gläschen mit ihrer Oberfläche nach unten aufgelegt, so dass die Seite mit den daran festgewachsenen Zellen in Citifluor[®] eingebettet war. Mit Hilfe des auf den CELLocate[®] Gläschen aufgebrachten Rasters konnten nun die im Kalzium-Imaging markierten „Regions of interest“ einzelnen Zellen zugeordnet und deren Zelltyp bestimmt werden.

2.4.3. Immunzytochemie

2.4.3.1. Grundlagen der Immunzytochemie

Die Grundlage der Immunzytochemie ist der zytologische Nachweis der Bildung eines (sub-) zellulär lokalisierbaren Antigen-Antikörperkomplexes. Unter Verwendung spezifischer mono- bzw. polyklonaler Antikörper/-seren (meist IgG-Varianten) können antigene Strukturen in Zellen und Geweben lokalisiert werden (Lane, 1988). Die Determinante des Antigens (AG), an welche der Antikörper (Ak) bindet, wird als Epitop, die antigenbindende Domäne des AK als Paratop bezeichnet (Liddel, 1996).

Der histologische Nachweis von Antigen-Antikörperkomplexen im Gewebe bzw. in der Zellkultur kann durch unterschiedliche Verfahren erfolgen. Man unterscheidet direkte und indirekte Markierungsverfahren. Ist der 1. AK z.B. selbst mit einem visuell detektierbaren Marker verbunden, handelt es sich um eine direkte Markierung. Wird zur Detektion des primären Antikörpers ein sekundärer, seinerseits markierter Antikörper eingesetzt, wird dies als indirekte Markierung bezeichnet. Als „Markierungs“-Substanzen außer Fluorochromen, wie in der vorliegenden Arbeit, können Fluorophore, Enzyme, Radioisotope oder Metallionen als Marker verwendet werden (Liddel, 1996).

2.4.3.2. Indirekte Immunfluoreszenz

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendete Fluoreszenzmethode ist die indirekte Immunfluoreszenz. Hierbei wird ein spezifisches Antigen bzw. Epitop von einem unmarkierten spezifischen Primärantikörper erkannt und gebunden. In einem zweiten Schritt wird seine F_c Region von einem Sekundärantikörper erkannt, der an einen fluoreszierenden Farbstoff wie z.B. Fluoreszein oder Rhodamin gekoppelt ist. Die Lokalisation dieses Komplexes erfolgt dann mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskopes mit geeigneten Filtern. Dazu wird das an den Sekundärantikörper gekoppelte Fluorophor mit Licht einer geeigneten

Wellenlänge angeregt, worauf durch den Filter längerwellige Strahlung emittiert wird. Ein Nachteil der Fluoreszenzmarkierung ist, dass Fluorophore bei Anregung im UV-Bereich relativ schnell ausbleichen; spezielle Einbettmedien (hier: Citifluor[®]) verzögern diesen Vorgang (Janeway C.A., 1997).

In der hier vorliegenden Arbeit wurde in den meisten Versuchen eine Dreifachmarkierung, d.h. eine Markierung mit 3 verschiedenen Primärantikörpern, vorgenommen. Voraussetzung dafür ist, dass alle Primärantikörper aus verschiedenen Wirtstieren stammen und die verwendeten Sekundärantikörper an unterschiedliche Fluorochrome gekoppelt sind (Harre *et al.*, 2003; Rummel *et al.*, 2005). Für den immunzytologischen Nachweis von TNF- α in aktivierten Mikrogliazellen der AP konnte so z.B. das Signal für TNF- α gekoppelt an Cy3[™] rot, ED1, den Zellmarker für Mikrogliazellen gekoppelt an Alexa[®] Fluor 488 grün und letztlich die Zellkerne mit dem Kernfarbstoff DAPI blau, dargestellt werden.

Um eine vergleichbare Intensität der Emission der TNF- α -Markierung zu erreichen, erfolgte eine Signalamplifikation mittels der Avidin-Biotin-Methode. Grundlage dieser Methode ist der Einsatz eines biotinylierten Sekundärantikörpers, der durch Bindung an den Primärantikörper des Ag-Ak-Komplexes mittels des Biotins zusätzliche potentielle Bindungsstellen für das visualisierende Fluorescin-Avidin D bietet und somit das Signal um eine vielfaches potenziert (Abbildung 15).

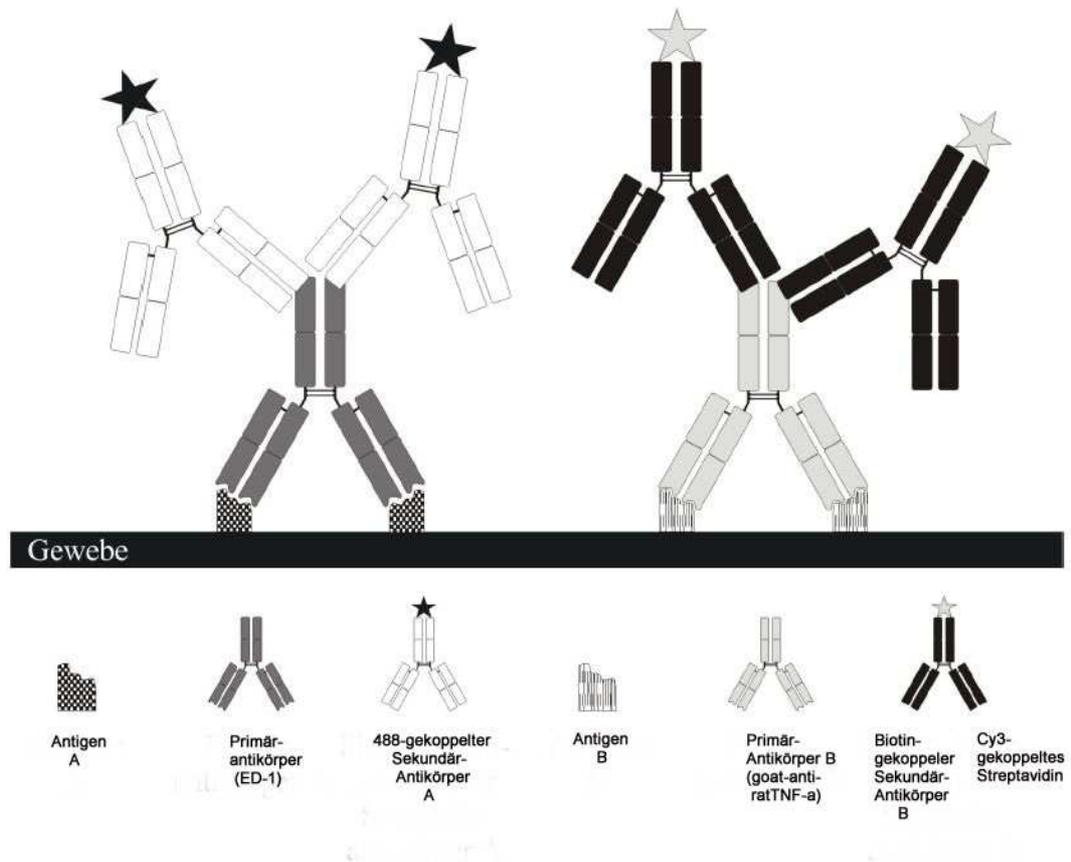


Abbildung 15: Prinzip der Doppelmarkierung mittels indirekter Immunfluoreszenz. Die primären Antikörper A (monoclonal mouse-anti-ED1) + B (monoclonal goat-anti-TNF- α) binden mit ihren F_{ab}-Fragmenten an die Epitope der Antigene A (ED1/CD68) + B (TNF- α). Mit Hilfe eines Fluorochrom (Cy3)-gekoppelten Sekundärantikörpers, welcher gegen das F_c-Fragment des Primärantikörpers gerichtet ist, kann dieser Ag-Ak-Komplex sichtbar gemacht werden. Zur intensiveren Visualisierung des TNF- α wird ein biotinylierter Sekundärantikörper verwendet, der durch Streptavidin detektiert werden kann.

2.4.3.3. Der anti-TNF- α Antikörper

Der anti-rat TNF- α (TNFSF1A)-Antikörper wurde in Ziegen hergestellt, die mit rekombinantem TNF- α der Ratte aus E.coli-Stämmen immunisiert wurden. Er bindet an die biologisch aktive Form des TNF- α von Ratten und Mäusen und zeigt laut Hersteller keine Kreuzreaktionen mit TNF- β (Technical Datasheet, R&D Systems).

2.4.3.4. Der anti-iNOS Antikörper

Das als „atypischer Neurotransmitter“ bezeichnete Molekül NO wird von der Stickstoffmonoxid-Synthase (NOS) synthetisiert (Bredt *et al.*, 1990; Bult *et al.*, 1990). Man unterscheidet 3 Formen der NO-Synthase: die neuronale NOS1 (nNOS), die induzierbare NOS2 (iNOS) und die endotheliale NOS3 (eNOS) (Evans, 1995; Alderton *et al.*, 2001). Die iNOS ist ein hochdiffusibles, kurzlebigen bioaktives Molekül, welches im Organismus von einer Reihe von Zellen, vor allem aber von Immunzellen, wie z.B. Mikrogliazellen gebildet werden kann (Dasgupta *et al.*, 2002). Der hier verwendete iNOS Antikörper wurde im Kaninchen hergestellt und erkennt spezifisch die C-terminale Domäne der induzierbaren Stickstoff-Monoxid-Synthase.

2.4.3.5. Der anti-nNOS Antikörper

Der hier verwendete anti-nNOS Antikörper ist gegen gereinigte neuronale Stickstoff Synthase (nNOS/ NOS 1) gerichtet. Er erkennt spezifisch den C-Terminus von nNOS und kreuzreagiert nicht mit iNOS oder eNOS (Technical Datasheet, Santa Cruz).

2.4.3.6. Immunzytochemisches Protokoll

In einer 4-5 tägigen Wachstumsphase im Brutschrank konnten sich die Zellen der primären Zellkultur der *Area postrema* ausdifferenzieren (Präparation siehe Kap. 2.4.1.). Anschließend wurden diese für immunzytologische Untersuchungen rekrutiert. Abhängig davon, welches Signal mit der Immunfluoreszenzmethode dargestellt werden sollte, wurden die Zellen vorher mit dem Lipopolysaccharid (LPS) gramnegativer Bakterien, stimuliert. Durch zahlreiche Vorversuche im Rahmen dieser Arbeit und anderer Arbeiten in unserem Hause bewährte sich für den immunzytologischen Nachweis von TNF- α in der Zellkultur eine Inkubationszeit von 180 Minuten und für den Nachweis von iNOS eine Inkubationsdauer von 360 Minuten mit LPS. Das LPS wurde dazu in Zellkulturmedium in einer Konzentration von 100 $\mu\text{g/ml}$ gelöst und die Kulturen wurden im gleichen Milieu, indem auch ihr Wachstum stattfand, inkubiert (37°C, 5% CO₂, 95% Luftfeuchtigkeit). Eine Vorstimulation mit PAMPs zum Nachweis der neuronalen NOS war nicht nötig, da diese von nitrergen Neuronen konstitutiv exprimiert wird (Bredt *et al.*, 1990).

Parallel zu allen mit LPS stimulierten Primärkulturen wurden jeweils auch unstimulierte Kontrollen der gleichen Präparation angefertigt. Diese wurden für die gleiche Zeit wie die Proben nach 3-maligen Waschen mit Neurobasal-A-Medium lediglich mit demselben inkubiert.

Waren die Zellen nun für die jeweils definierten Zeiten vorstimuliert, wurden die Zellkulturglaschen vorsichtig mit einer Pinzette von der Kammerwand gelöst und in eine 12-Well-Platte überführt, wo sie für 15 Minuten mit eiskaltem Paraformaldehyd (4%-ig) fixiert wurden. Alle weiteren Inkubations- und Waschschritte erfolgten in der gleichen Multi-Well-Platte. Im Anschluss an die Fixierung schloss sich ein 3-maliges Waschen mit PBS für 5 Minuten und ein weiterer Waschschritt für 5 Minuten mit PBS-T an. Nach Absättigung der unspezifischen Bindungsstellen im Zellkultur-Inkubationspuffer für eine Stunde bei RT, wurden die Antikörper in ihren individuellen Verdünnungen (Tabelle 7) in Antikörper-Puffer gelöst und eingesetzt.

Nach einer 48-stündiger Exposition mit dem primären Antikörper bei 4 °C, wurden die Ansätze dann 3 mal jeweils 5 Minuten mit PBS-T gewaschen.

Anschließend erfolgte die Zugabe des Sekundärantikörpers für weitere 2 Stunden bei RT. Für die Amplifizierung des TNF- α -Primärantikörpers wurde nach der 2-stündigen Inkubation mit dem biotinylierten Sekundärantikörper noch für weitere 60 Minuten mit dem Cy3TM-konjugierten Streptavidin inkubiert. Nach dem Inkubieren mit dem Fluorochrom-gekoppelten Sekundärantikörper wurden die zellbeladenen CELLocate[®] Gläschen durch dreimaliges Waschen für 5 Minuten mit PBS-T von überschüssiger Antikörperlösung befreit. Für die Kernfärbung wurden die Zellen für weitere 5 Minuten mit DAPI gefärbt und danach wieder 3 mal für 5 Minuten mit PBS-T gewaschen. Anschließend wurden diese mit Hilfe einer Pinzette vorsichtig in Aqua bidest. getaucht, um eine Kristallisation von Puffersalzen auf der Glasoberfläche zu vermeiden. Zum Schluss wurden auf einen Objektträger 10 μ l Citifluor[®] pipettiert und die Gläschen mit ihrer Oberfläche nach unten aufgelegt, so dass die Seite mit den daran festgewachsenen Zellen in Citifluor[®] eingebettet war.

Primärantikörper (Konzentration)	Sekundärantikörper (Konzentration)
Goat-anti-ratTNF- α (1:200)	a) Biotinylated-horse-anti-goat IgG (1:200) b) Cy3 TM -Conjugated Streptavidin (1:1000)
Mouse-anti-ED1(CD68) (1:2000)	Alexa [®] 488-anti-mouse (1:500) DAPI (Gebrauchslösung 300 nM/l)
Rabbit-anti-NOS2 (1 :1000) Mouse-anti-ED1(CD68) (1:2000)	Cy3 TM -donkey-anti-rabbit (1:600) Alexa [®] 488-anti-mouse (1:500) DAPI (Gebrauchslösung 300 nM/l)
Rabbit-anti-NOS1 (1 :1000) Mouse-anti-MAP2a+b (1:500)	Cy3 TM -donkey-anti-rabbit (1:600) Alexa [®] 488-anti-mouse (1:500) DAPI (Gebrauchslösung 300 nM/l)

Tabelle 9: Übersicht über die Kombinationen der eingesetzten Primär- und Sekundärantikörper zur Mehrfachmarkierung der verschiedenen Antigene

2.4.3.7. Nachweis der Spezifität der Primärantikörper

Um die Spezifität der sekundären Antikörper nachzuweisen, wurde in jedem immunzytochemischen Protokoll mindestens eine Zellkultur als methodische Kontrolle behandelt. Hierzu wurden dem Inkubationspuffer keine primären Antikörper zugesetzt. Die Präinkubation und die Inkubation mit den sekundären Antikörpern erfolgten wie oben beschrieben.

2.4.3.8. Auswertung und Dokumentation der Immunzytochemie

Nach Beendigung des immunzytochemischen Protokolls wurden die einzelnen Zellkultur-Wells der AP mit einem Fluoreszenzmikroskop fotografiert und bewertet. Mit Hilfe eines FITC-Filters (ARW 450-490 nm) wurden die Alexa® 488-markierten Antigen-Antikörper Komplexe detektiert und mit Hilfe eines Rhodamin-Filters (ARW 510-540 nm) die Cy3™-gekoppelten Komplexe.

Alexa® 488 emittiert grünes Licht im Wellenlängenbereich von 510-540 nm, Cy3™ rotes Licht im Bereich 630-660 nm. Der Fluoreszenzfarbstoff DAPI wird mit einer Wellenlänge von 358 nm angeregt und emittiert daraufhin blaues Licht in einer Wellenlänge von 461 nm.

Die Bilder der einzelnen fluoreszierenden Komplexe wurden in den verschiedenen Wellenlängenbereichen mit einer Schwarz-weiß-Kamera angefertigt und dann mit Hilfe des Computerprogramms Metamorph mit verschiedenen Farben versehen. Die so entstandenen Bilder in verschiedenen Farben konnten mit dem gleichen Programm dann übereinander gelegt werden, so dass in einem Bild gleichzeitig das TNF- α -, iNOS- oder nNOS-Signal, die Kolokalisation mit einem bestimmten Zelltyp (Mikroglia, Neurone) und die Zellkerne darstellbar waren. Die einzelnen Fluoreszenzpräparate wurden mit verschiedenen Objektiven (10, 20, 40 und 100-fache Vergrößerung) angesehen und anschließend fotografiert. Die Helligkeit sowie der Kontrast der Bilder wurden mit dem Programm Adobe Photoshop angepasst. Mit derselben Software wurden die Einzelbilder zu Bildtafeln zusammengestellt.

Jede Versuchserie wurde mit primären Zellkulturen von mindestens 3 verschiedenen Präparationen durchgeführt, bei denen jeweils mindestens 5 Wells hergestellt wurden, so dass für jede Serie mindestens 15 Wells mit primärer neuroglialer Zellkultur der *Area postrema* zur Verfügung standen.

2.4.4. Messung der Zytokine

2.4.4.1. Stimulation der Zellkultur und Abnahme der Kulturüberstände

Die Messung von TNF- α und IL-6 in den Überständen der kultivierten Zellkulturen der AP wurde zum gleichen Zeitpunkt wie das Kalzium-Imaging und die Immunzytochemie, nämlich 4-5 Tage nach Präparation des Gewebes, durchgeführt. Dazu wurden die einzelnen CELLocate[®] Gläschen mit den darauf befindlichen Zellen zunächst mit Neurobasal-A-Zellkulturmedium drei mal gewaschen, um bereits im Überstand enthaltene Zytokine zu eliminieren. Anschließend wurden die Zellen mit LPS, welches in einer Konzentration von 100 $\mu\text{g/ml}$ in Zellkulturmedium gelöst war, im Brutschrank bei 37°C inkubiert.

Nach einer exakt definierten Zeit (30, 60, 90, 180 oder 360 Minuten) wurden 300 μl des Zellkulturüberstandes vorsichtig mit einer Pipette abgenommen, in ein 1 ml Eppendorfgefäß überführt und dann bis zur Messung im Bioassay bei – 20°C eingefroren.

Die CELLocate[®] Gläschen mit den darauf vorhandenen Zellen wurden sofort mit 4%igem Paraformaldehyd für 15 Minuten fixiert. Nach dem immunzytochemischen Protokoll (Kap.: 2.4.2.8) wurden Astrozyten und Mikrogliazellen durch zellspezifische Antikörper (GFAP und ED-1) detektiert und mit Hilfe von fluorochrom-gekoppelten Sekundärantikörpern (Alexa[®] 488, Cy3[™]) in den Farben Grün und Rot unter einem Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht.

Zu jeder Versuchreihe wurden immer mindestens 2 Kontrollproben angefertigt, die nach 3-maliger Waschung mit Zellkulturmedium auch mit demselben für die definierten Zeiten inkubiert wurden.

Die Kulturen für die Toleranzversuche wurden für 18 Stunden mit LPS oder anderen PAMPs vorstimuliert. Hierzu wurden die Kulturen mit LPS, MDP oder FSL-1 (jeweils 10 µg/ml), gelöst in Kulturmedium, im Brutschrank bei 37°C (5% CO₂, 95% Luftfeuchtigkeit) inkubiert.

2.4.4.2. Bioassays

Prinzipiell kann man zwei Methoden zur Quantifizierung von Zytokinen in biologischen Flüssigkeiten unterscheiden. Zum einen gibt es den immunologischen Nachweis von Zytokin-Proteinen mittels ELISA-Techniken (Enzyme-linked-Immuno-Sorbent-Assay), zum anderen existieren zytokinspezifische Zellkultur-abhängige Bioassays.

Die verfügbaren ELISA-Tests für Zytokine sind praktisch sehr schnell und einfach umzusetzen. Bei ihnen werden Spezies-spezifische Antikörper gegen zu messende Zytokine eingesetzt. Der Nachteil dabei ist, dass bei dieser Methode nicht nur biologisch aktive Formen der Zytokine detektiert werden, sondern auch ihre inaktiven Bestandteile.

Eine andere Möglichkeit Zytokine quantitativ zu bestimmen, beruht auf der Tatsache, dass Zytokine in bestimmten Zellen biologische Reaktionen auslösen. Mittels Zytokin-spezifischer Zellkultur-abhängiger Bioassays kann dieses biologisch aktive Material nachgewiesen werden. Diese ermöglichen die Messung eines bestimmten Zytokins bei unterschiedlichen Spezies mit einer hohen Sensitivität.

Da sich die Methode der Bioassays für TNF- α und IL-6 seit Jahren in unserem Hause bewährt hat, wurden in der vorliegenden Arbeit die Zellkultur-abhängigen Bioassays zur Analyse der Zellkulturüberstände eingesetzt.

2.4.4.3. Passagieren der WEHI-Zelllinie

Das Passagieren der Zellen fand unter einer Sterilbank statt. Die Flüssigkeit aus den Kulturflaschen der letzten Passage wurde dekantiert, in die Flaschen

jeweils 12 ml PBS gegeben und waagrecht für etwa 3 Minuten ruhen lassen. Dieser Waschschrift ist nötig, um die vorhandenen Kalziumionen auszuwaschen, die sonst zu einer Inaktivierung von Trypsin führen würden. Danach wurde PBS wieder abgegossen und pro Flasche jeweils 3 ml Trypsin zugegeben. Diese wurden wieder in eine waagerechte Position gebracht und hin und wieder leicht geschwenkt, bis sich alle Zellen vom Flaschenboden gelöst hatten. Dieser Vorgang war durch eine makroskopisch sichtbare Trübung des Mediums erkennbar. Die neuen Kulturflaschen wurden mit 20 ml Kulturmedium befüllt, und 1,5 ml der Zellsuspension wurden hinzugegeben. Die Flaschen wurden verschlossen und später im Brutschrank wieder geöffnet. Die spindelförmigen Fibroblasten hefteten sich innerhalb von 3 Tagen zu mindestens 80% an den Boden der Kulturflasche an.

2.4.4.4. Passagieren der B9-Zelllinie

Unter einer Sterilbank wurden neue Kulturflaschen beschriftet und mit je 9 ml Kulturmedium befüllt. Danach wurden aus dem Brutschrank (37°C, 5% CO₂, 95% Luftfeuchtigkeit) entnommene Kulturflaschen der letzten Passage geöffnet und aus ihnen jeweils 1 ml in eine neue Kulturflasche überführt. Die Flaschen wurden unter Einhaltung höchster Sauberkeit verschlossen, in den Brutschrank gestellt und dort die Verschlusskappen wieder aufgedreht. Die Zellen der B9-Zelllinie wurden alle 3-4 Tage passagiert.

2.4.4.5. Der TNF- α Bioassay

Das dem TNF- α -Bioassay zugrunde liegende Prinzip beruht auf dem zytotoxischen Effekt von TNF- α auf bestimmte Zellen. Die Nachweisgrenze für diesen Assay liegt bei 6 pgTNF/ml (Ross *et al.*, 2003). Das im Zellkulturüberstand enthaltene TNF tötet konzentrationsabhängig eine bestimmte Menge an Zellen, die sich quantitativ nach der Zugabe von MTT messen lässt. Der Farbstoff Methylthiazolyltetrazolium (MTT) wird in den

Mitochondrien der überlebenden Zellen in Formazankristalle umgewandelt, die sich dunkelblau darstellen (Abbildung 16). Aufgrund der optischen Dichte kann diese Färbung dann mit Hilfe eines ELISA-Readers quantitativ bestimmt werden.

Nach der Passage der WEHI-Zellen wurde die Zellsuspension für 10 Minuten bei 2300 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und mit Assay-Medium resuspendiert. Dieser Vorgang wurde zweimal wiederholt. Die lebenden Zellen wurden auszugsweise unter dem Mikroskop in einer Zählkammer (nach Thoma) ausgezählt. Die Zellsuspension sollte auf etwa 50000 Zellen/100 μ l eingestellt werden. Dazu musste sie anhand der ermittelten Zellzahl verdünnt werden. Der Verdünnungsfaktor wurde anhand folgender Formel ermittelt:

$$\text{Verdünnungsfaktor} = \text{Zellzahl} / \text{Kammerfaktor} \times \text{ausgezählte Zellen}$$

Nach der Verdünnung wurden noch 4 μ l/ml Actinomycin D hinzugegeben, was einerseits ein weiteres Zellwachstum verhindern, und andererseits die Sensibilität der Zellen erhöhen sollte.

Zur Durchführung des Assays wurden Mikrotiterplatten mit 96 Vertiefungen verwendet. Die Platte wurde nach einem vorgegebenen Schema beschickt. Bei jedem Assay wurden mindestens zwei Standards und zwei Qualitätskontrollen erstellt. Dazu wurden in Vertiefung B1 200 μ l TNF- α -Standard (1000 μ g/ml), in A2 und A3 und B2 und B3 jeweils 200 μ l der Qualitätskontrollen I und II pipettiert. Die restlichen Vertiefungen der Spalten wurden mit 200 μ l der jeweiligen Probe bestückt. Eine Standard-Verdünnungsreihe wurde erstellt, indem in der ersten Spalte 100 μ l aus B1 abpipettiert und mit Medium aus C1 vermischt wurden. Aus C1 wurde dann wiederum 100 μ l Medium in D1 vermischt. Dieses Schema wurde dann durch die gesamte Reihe fortgeführt. Die letzten 100 μ l aus K1 wurden verworfen, so dass sich in L1 nur noch Medium befand. Eine ebensolche Verdünnung fand für die Qualitätskontrollen und Proben statt, bei denen jedoch eine Doppelbestimmung durchgeführt wurde (Schema einer Plattenbeschickung siehe Abbildung 18).

Nachdem die entsprechende Verdünnung der Zellsuspension angefertigt war, wurden in alle Vertiefungen der Platte mit Ausnahme von A1 100 µl davon suspendiert und der komplette Ansatz für 24 Stunden im Brutschrank inkubiert. Nach Ablauf dieser Zeit wurde in jedes der 96 Tubes der Platte, außer in A1, 25 µl MTT pipettiert. Dieses zunächst gelbe Reagenz wurde dann in den Mitochondrien lebender Zellen von einem Enzym, der Succinyl-Dehydrogenase, zu dunkelblauen Formazankristallen verstoffwechselt (Abbildung 16).

Es folgte eine weitere Inkubation im Brutschrank für 4 Stunden. Aus allen Wells wurden dann 125 µl Flüssigkeit abgenommen, dabei musste darauf geachtet werden, dass keine Zellen vom Boden der Mikrotiterplatte abgesaugt wurden. In alle Wells wurde anschließend 100 µl des Isopropanol-HCl-Gemisches gegeben, das die Zellwände der WEHI-Zellen zerstört und so die Formazankristalle freisetzt und auflöst. Nach einer weiteren lichtgeschützten Inkubation für mindestens 12 Stunden bei RT, konnte die Quantifizierung stattfinden. Dazu wurden die Mikrotiterplatten in einen ELISA-Reader eingelegt, mit dessen Hilfe die optische Dichte in den einzelnen Wells bei einer Wellenlänge von 550 nm gemessen wurde.

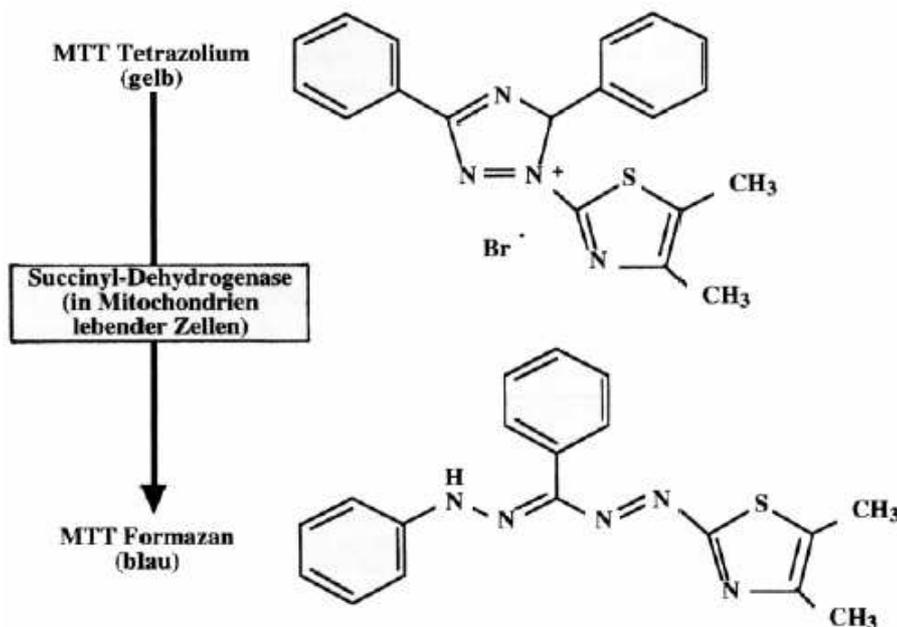


Abbildung 16: Schematische Darstellung der Umwandlung des MTT-Tetrazoliumbromids in MTT-Formazan

2.4.4.6. Die Auswertung des TNF- α Bioassays

Um die erhobenen Daten des Bioassays auszuwerten, musste zunächst eine Eichkurve erstellt werden. Hierzu wurden mit Hilfe des Programms Microsoft Excel 6.0 die Standardwerte der optischen Dichte auf der y-Achse gegen die TNF- α -Konzentration auf der x-Achse aufgetragen (Abbildung 17). Der lineare Teil der Kurve stellt das Absterben der Zellen dar, das konzentrationsabhängig erfolgt. Gleichzeitig ist dieser Zelluntergang auch direkt proportional zur Abnahme der Menge an verstoffwechselten Formazankristallen. Die optische Dichte nimmt also ab. Es wurden nur die Verdünnungen ausgewählt, die im Bereich der Regressionsgeraden lagen. Anhand der Regressionsformel und des Verdünnungsfaktors konnte schließlich die TNF- α -Konzentration in einer Probe ermittelt werden.

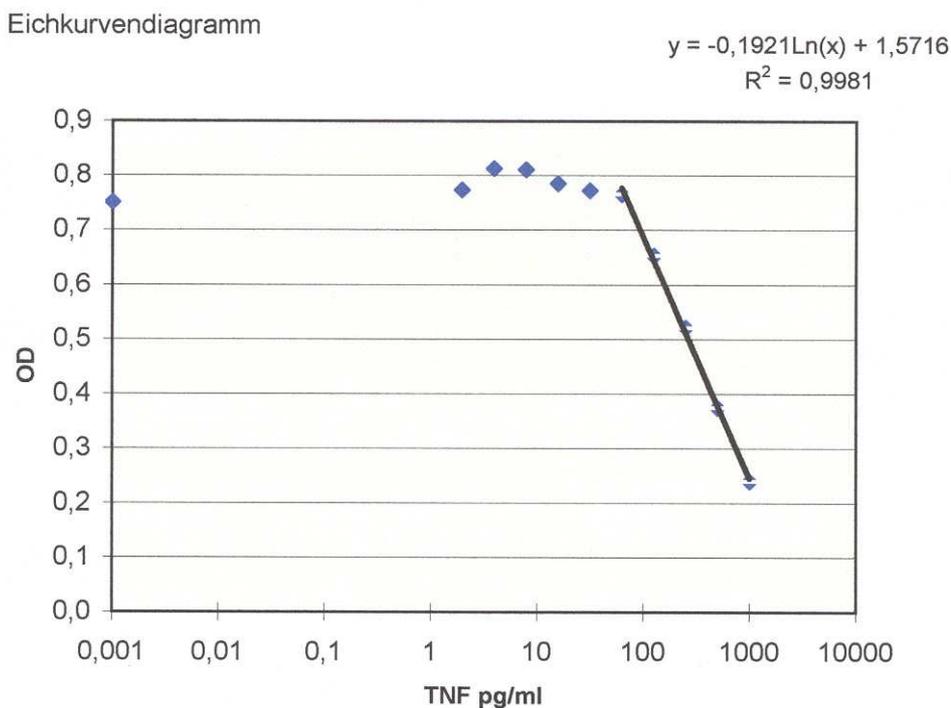


Abbildung 17: Exemplarische Eichkurve aus einem TNF-Bioassay. Die Regression im linearen Teil der Kurve liegt annähernd bei 1. Die Kurve fällt in diesem Bereich ab, da die Zellen mit steigender Konzentration an TNF absterben und somit auch die Menge an Formazankristallen abnimmt, was eine Abnahme der optischen Dichte bewirkt.

2.4.4.7. Der IL-6 Bioassay

Das Zytokin IL-6 besitzt einen proliferativen Einfluss auf die B9 Hybridoma-Zelllinie (Aarden *et al.*, 1987). Dieser Einfluss ist dosisabhängig, d.h. je mehr IL-6 in einer Probe enthalten ist, desto höher ist auch die resultierende Zellzahl. Die Nachweisgrenze dieses Bioassays liegt bei 3 I.U.IL-6/ml (Ross *et al.*, 2003). Die Versuchsdurchführung erfolgte wiederum in den schon beschriebenen 96-Well-Mikrotiterplatten. Diese Platten wurden nach einem vorgegebenen Schema (Abbildung 18) beschickt. Bei jedem Assay wurden mindestens zwei Standards und zwei Qualitätskontrollen erstellt. Durch den Einsatz von Verdünnungsreihen ergab sich auch hier eine Dosis-Wirkungs-Beziehung, die durch Verwendung internationaler Standardreihen quantifiziert werden konnte und einen internationalen Vergleich zwischen verschiedenen Laboren erlaubte (Meager & Das, 1994).

Die B9-Zellen wurden auch zuerst noch einmal passagiert und die übrige Zellsuspension für 10 Minuten bei 2300 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde nun dekantiert und die Zellen mit Assay-Medium resuspendiert. Dieser Vorgang wurde noch zwei weitere Male wiederholt, um das im Zellkulturmedium enthaltene rhIL-6 vollständig auszuwaschen. Genau wie beim TNF-Assay wurden die Zellen danach mit einer Zählkammer nach Thoma gezählt und über die oben genannte Formel wurde der Verdünnungsfaktor errechnet. Die Zellsuspension für den IL-6-Assay sollte nun auf ca. 5000 Zellen/100 µl eingestellt werden. Im Gegensatz zum TNF-Assay wurde diesem Ansatz kein Actinomycin D zugesetzt. Die Befüllung der Mikrotiterplatte erfolgte dann wie beim TNF-Assay, die erste Inkubationszeit betrug hierbei allerdings 72 Stunden. Das weitere Protokoll war identisch mit dem des TNF-Assays.

Nach der letzten Inkubation wurden die Mikrotiterplatten ebenfalls in den ELISA-Reader gelegt, mit dessen Hilfe die optische Dichte der einzelnen Wells bei einer Wellenlänge von 550 nm bestimmt wurde.

2 Material und Methoden

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L
1	B	50 IU	1:1	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512
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 18: Schematische Darstellung der Beschickung einer Mikrotiterplatte für einen IL-6-Bioassay. Für den TNF- α -Assay erfolgte die Beschickung analog, in der ersten Reihe (B-K) befanden sich jedoch ansteigende Konzentrationen an TNF- α beginnend mit 1000 pg/ml.

2.4.4.8. Die Auswertung des IL-6 Bioassays

Die Auswertung des IL-6-Bioassays erfolgte ebenfalls mit Hilfe einer Eichkurve und der daraus ermittelten Regressionsgeraden. Hier stellt der lineare Teil der Kurve jedoch das Wachstum der Zellen dar, die Kurve steigt also an (Abbildung 19). Dieses Wachstum erfolgte konzentrationsabhängig und direkt proportional zur Menge an umgesetzten Formazankristallen, die eine Zunahme der optischen Dichte bedingen. Zur Auswertung wurden nur diejenigen Verdünnungen zugelassen, die sich im Bereich der Regressionskurve befanden. Die IL-6 Konzentration wurde anhand der Regressionsgleichung der Eichkurve und des Verdünnungsfaktors errechnet.

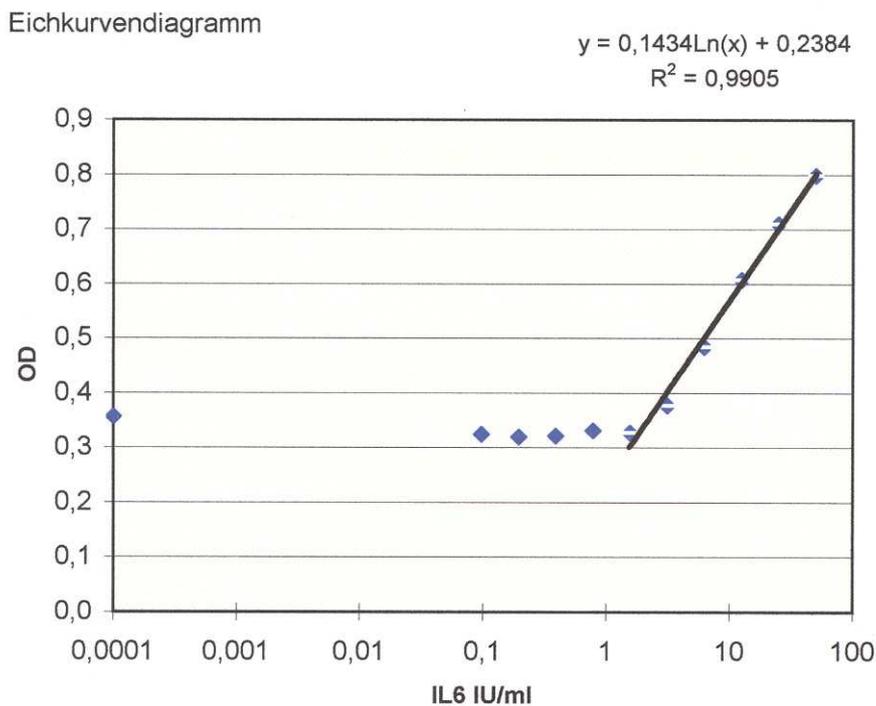


Abbildung 19: Exemplarische Darstellung einer Eichkurve aus dem IL-6-Assay. Die Regression im linearen Teil der Kurve liegt annähernd bei 1.

2.4.4.9. Statistische Auswertung der Zytokin-Daten

Um die Konzentrationen von TNF- α und IL-6 im Überstand unter verschiedenen experimentellen Bedingungen zu vergleichen, wurde eine einfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA) genutzt. Im Anschluss an jede Varianzanalyse wurde als post-hoc-Test der Scheffé-Test auf 5% Niveau durchgeführt.

Die Irrtumswahrscheinlichkeit für einen statistisch signifikanten Unterschied lag bei $P < 0.05$. Da die Zytokinwerte häufig nicht normalverteilt sind, wurden sie vor ihrer statistischen Auswertung logarithmiert. Die gemessenen Werte wurden in Microsoft Excel® dokumentiert und mit Hilfe desselben Programms wurde für die TNF- α - und IL-6-Werte zu den unterschiedlichen Zeiten der arithmetische Mittelwert (MW) und der daraus resultierende Standardfehler (S.E.M.) errechnet. Die Daten wurden in Form von Balkendiagrammen mit Hilfe der Software Graph Pad Prism® dargestellt.

Zur Beurteilung der Qualität der einzelnen Zellkulturen, wurden diese wie im Kapitel 2.4.4.1. beschrieben, einem immunzytologischen Protokoll unterzogen, wobei über spezifische Zellmarker Astrozyten (GFAP) und Mikrogliazellen (ED1) detektiert wurden. Diese wurden dann mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops angesehen und beurteilt. Anhand morphologischer Gesichtspunkte der einzelnen Zellen und der empirisch erhobenen Zelldichte, wurden nur die Zytokinwerte derjenigen Zellkulturüberstände gewertet, die auch einwandfreien Zellkulturen zuzuordnen waren.

3. Ergebnisse

3.1. Zellkultur

Die Zellen der *Area postrema* wurden nach dem im Kapitel 2.4.1. beschriebenen Protokoll präpariert und standen nach einer Wachstums- und Differenzierungszeit von 4-5 Tagen zum Versuch bereit. Auf einem Zellkulturgläschen konnten gleichzeitig zwischen 1 und 50 Zellen im Kalzium-Imaging untersucht werden, wobei darauf geachtet wurde, dass sich die Zellkörper und deren Ausläufer nicht berührten und somit keine Übertragung von Signalen über Zellverbindungen stattfinden konnte. Jede untersuchte Zellkultur enthielt jeweils alle vier Zelltypen, wobei sich deren zahlenmäßiger prozentualer Anteil an der Gesamtkultur sehr homogen darstellte (Neurone ~25%, Astrozyten ~48%, Mikrogliazellen ~10% und Oligodendrozyten ~17%).

Um jede untersuchte Zelle eindeutig einem Zelltyp zuordnen zu können, wurde jede einzelne Zellkultur im Anschluss an das Kalzium-Imaging nach einem immunzytochemischen Protokoll (Kap. 2.4.2.9.) behandelt. Mit spezifischen primären Antikörpern, die an Zell-spezifische Proteine der unterschiedlichen Zelltypen binden, wurden diese typisiert. In einem weiteren Schritt wurden diese Antigen-Antikörperkomplexe dann mit Hilfe von fluorchrom-gekoppelten Sekundärantikörpern im Fluoreszenzlicht sichtbar gemacht (Abbildung 20).

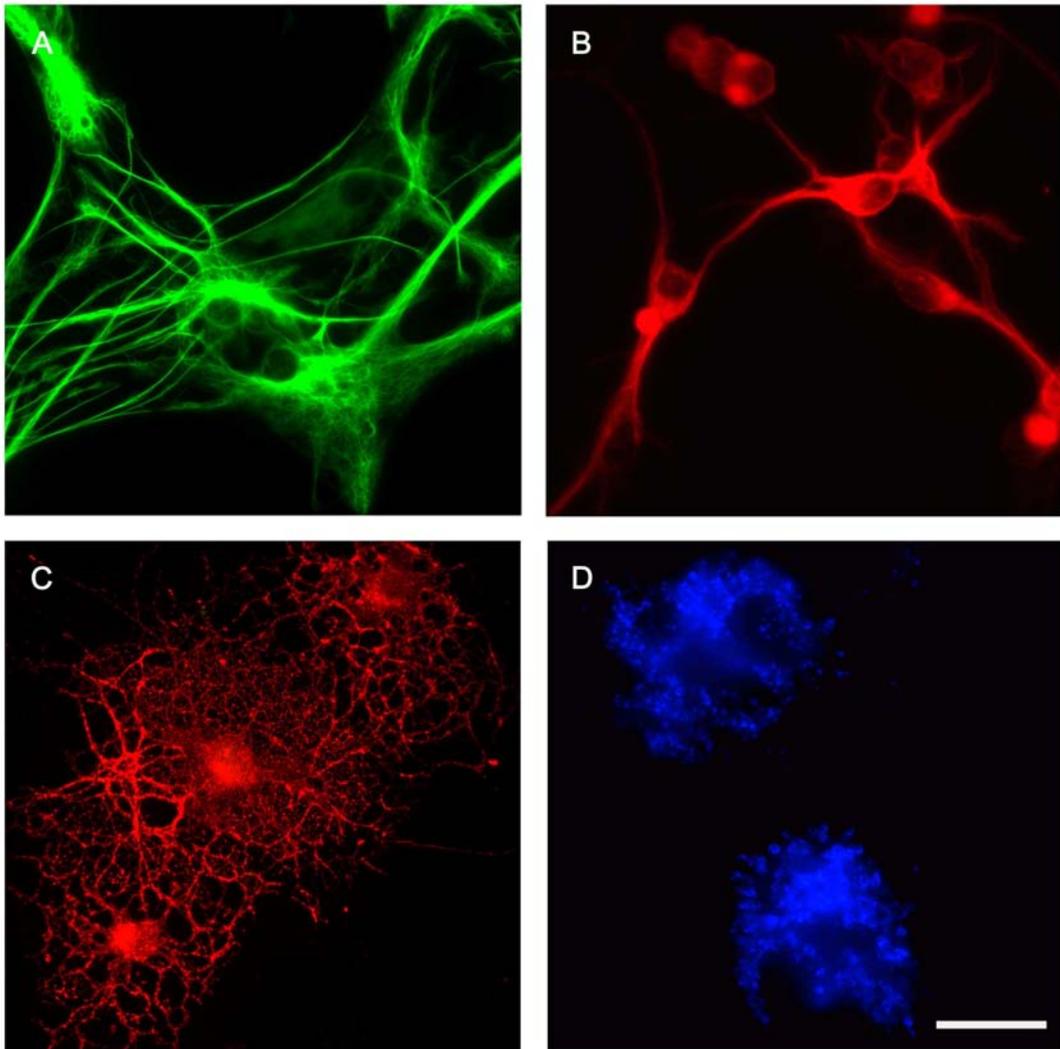


Abbildung 20: Immunfluoreszenzbild der verschiedenen Zelltypen in der Zellkultur der Area postrema: A=Astrozyten (GFAP+Alexa®488), B=Neurone (MAP2a+b+ Cy3™), C=Oligodendrozyten (CNPase+ Cy3™), D=Mikrogliazellen (ED1+Amca), Eichbalken = 25µm.

3.2. Der Einfluss der PAMPs auf die $[Ca^{2+}]_i$ von Zellen der Area postrema

Eine funktionelle Charakterisierung von Neuronen und Gliazellen und deren Reaktion auf bestimmte PAMPs ist mit Hilfe mikrospektrofluorometrischer Analysen wie z.B. dem Kalzium-Imaging möglich (siehe auch: 2.4.2). Um zu untersuchen, ob verschiedene Zelltypen einer AP Primärkultur auf eine Stimulation mit diversen pathogenen Bestandteilen von Bakterien oder Viren mit einer Erhöhung ihrer $[Ca^{2+}]_i$ reagieren, wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit verschiedene PAMPs eingesetzt. Die Ergebnisse dazu sollen im folgenden dokumentiert werden.

3.2.1. LPS

Die Zugabe von LPS erfolgte ausschließlich als Bolus in die Messkammer des Imaging-Systems. Hierbei wurden 100 μ l der LPS-Stocklösung in die Messkammer gegeben, so dass sich in der Kammer eine Konzentration von 100 μ g LPS/ml Messpuffer einstellte.

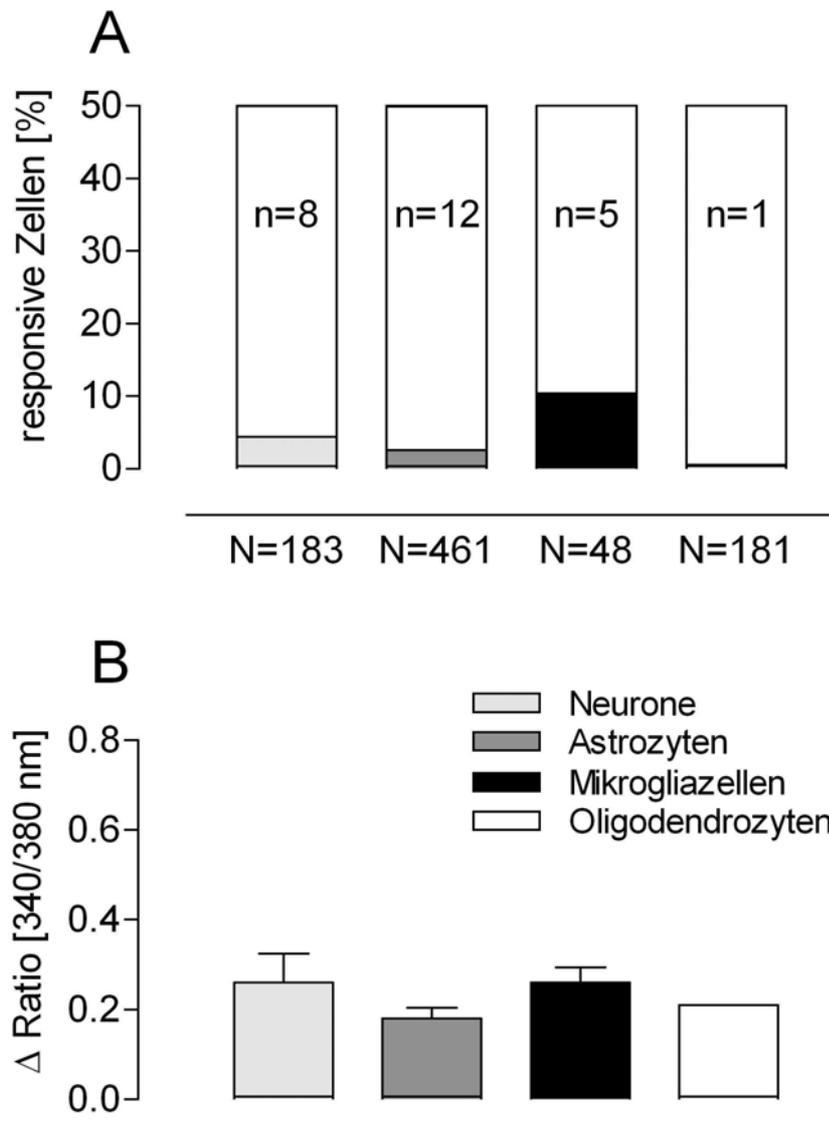


Abbildung 21: Stimulation der primären Zellkultur der AP mit LPS (100 µg/ml) für 60 Sekunden.

- A) prozentualer Anteil der verschiedenen Zelltypen, die mit einer Ratio-Erhöhung auf LPS-Applikation reagierten, N=Anzahl der untersuchten Zellen, n=Anzahl der responsiven Zellen
- B) durchschnittliche Erhöhung der 340/380 nm Fluoreszenz Ratio der reagierenden Zellen als arithmetischer Mittelwert und S.E.M.

Bei der untersuchten Wirkung von LPS auf die $[Ca^{2+}]_i$ einer primäre Zellkultur der AP wurden insgesamt 183 Neurone, 461 Astrozyten, 48 Mikrogliazellen und 181 Oligodendrozyten getestet. Davon reagierten jeweils 8 Neurone, 12 Astrozyten, 5 Mikrogliazellen und lediglich 1 Oligodendrozyt mit einer Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$. Prozentual bedeutet das, dass ca. 4% der Neurone, 2,5% der Astrozyten, 10% der Mikrogliazellen und weniger als 1% der Oligodendrozyten mit einer Erhöhung der 340/380 nm Ratio auf LPS antworteten (Abbildung 21A). Das arithmetische Mittel (\pm S.E.M.) der Δ Ratio (340/380 nm) lag bei $0,26 \pm 0,07$ für Neurone, $0,27 \pm 0,06$ für Astrozyten, $0,26 \pm 0,03$ für Mikrogliazellen und $0,17 \pm 0,04$ für die Oligodendrozyten (Abbildung 21 B).

Abbildung 22 zeigt ein Beispiel für eine typische Reaktion einer mit Fura-2 beladenen Mikrogliazelle auf die Applikation von LPS. Die Zelle reagierte innerhalb von wenigen Sekunden mit einem schnellen, steilen Anstieg der Fluoreszenz Ratio, welche nach dem erreichten Maximum wieder steil abfiel (Abbildung 22). Eine Applikation einer gleichen Menge Messpuffer zeigte hingegen keinen Effekt auf die Zelle.

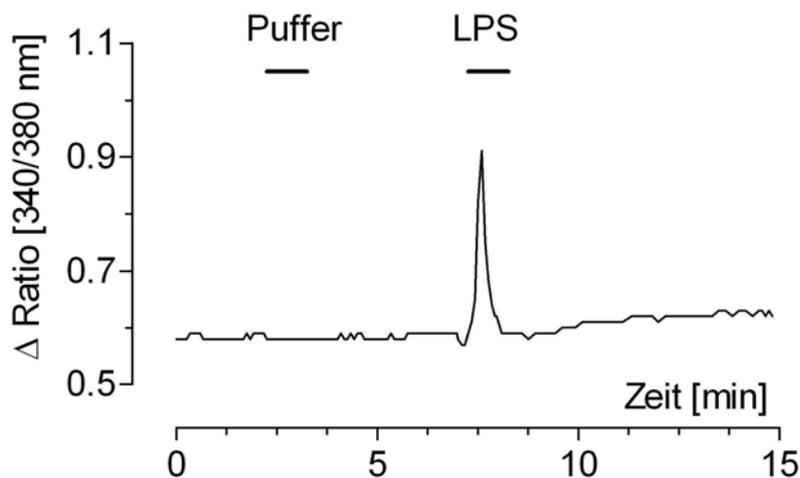


Abbildung 22: Schematisches Beispiel einer AP-Mikrogliazelle, die nach LPS-Zugabe mit einer Erhöhung der Fluoreszenz-Ratio (340/380 nm) reagierte. Die Δ Ratio ist proportional zur Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$. Eine Zugabe von Messpuffer hingegen zeigte keinen Effekt.

3.2.2. MDP

In einem weiteren Versuch sollte die Wirkung des TLR-2-Rezeptor-Agonisten MDP auf Zellen der primären Zellkultur der AP getestet werden. Die Applikation erfolgte auch hier wieder als 100 µl-Bolus der MDP-Stocklösung in die Messkammer, so dass dort eine Konzentration von 100 µg MDP/ml Messpuffer entstand.

Die Reaktivität gegenüber MDP wurde an 157 Neuronen, 292 Astrozyten, 51 Mikrogliazellen und 117 Oligodendrozyten getestet. Es reagierten davon lediglich 3 Neurone (<2% von N) und 3 Astrozyten (1% von N) mit einer Erhöhung ihrer $[Ca^{2+}]_i$. Bei Mikrogliazellen und Oligodendrozyten konnte nach Stimulation mit MDP keine Erhöhung der Δ Ratio gemessen werden (Abbildung 23 A). Das arithmetische Mittel (\pm S.E.M.) der erhobenen 340/380nm Ratio lag bei Neuronen bei $0,12 \pm 0,03$ und bei den Astrozyten bei $0,15 \pm 0,01$ und ist in Abbildung 23B dargestellt. Auch in diesem Versuch zeigte keine der AP Zellen eine Reaktion auf die Bolusapplikation von Messpuffer.

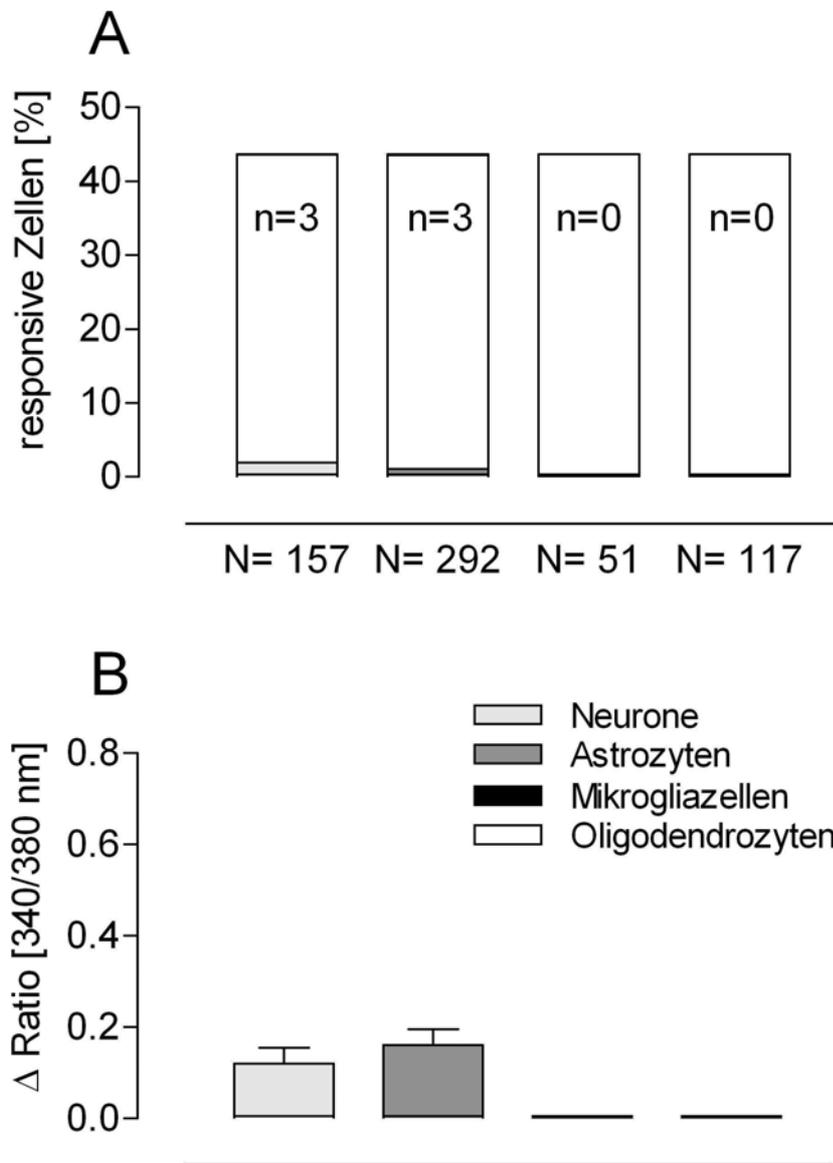


Abbildung 23: Stimulation der primären Zellkultur der AP mit MDP (100 µg/ml) für 60 Sekunden.

- A) prozentualer Anteil der verschiedenen Zelltypen, die mit einer Ratio-Erhöhung auf MDP-Applikation reagierten, N=Anzahl der untersuchten Zellen, n=Anzahl der responsiven Zellen
- B) durchschnittliche Erhöhung der 340/380 nm Fluoreszenz Ratio der reagierenden Zellen als arithmetischer Mittelwert und S.E.M.

3.2.3. FSL-1

Auch der Einfluss des TLR-2/6-Agonisten FSL-1 auf kultivierte Zellen der AP wurde im Rahmen dieser Arbeit untersucht. Die Applikation erfolgte wie bei den vorherigen PAMPs in Form einer Boluszugabe. Die Endkonzentration in der Messkammer betrug 100 µg FSL-1/ml Messpuffer.

Insgesamt wurden 87 Neurone, 208 Astrozyten, 46 Mikrogliazellen und 64 Oligodendrozyten im Rahmen des Ca^{2+} -Imagings mit FSL-1 stimuliert. Von allen untersuchten Zellen antwortete nur 1 Neuron (1% von N) und 1 Oligodendrozyt (1,5% von N) mit einer Erhöhung der ΔRatio auf den vorausgegangenen FSL-1-Stimulus (Abbildung 24 A).

Die ΔRatio betrug für die Ca^{2+} -Antwort des responsiven Neurons 0,13 und für die des Oligodendrozyten 0,22 (Abbildung 24 B).

Eine Bolus-Applikation von Messpuffer zu Beginn des Versuchs zeigte auch in diesem Fall keinen Einfluss auf die $[\text{Ca}^{2+}]_i$ der AP Zellkultur.

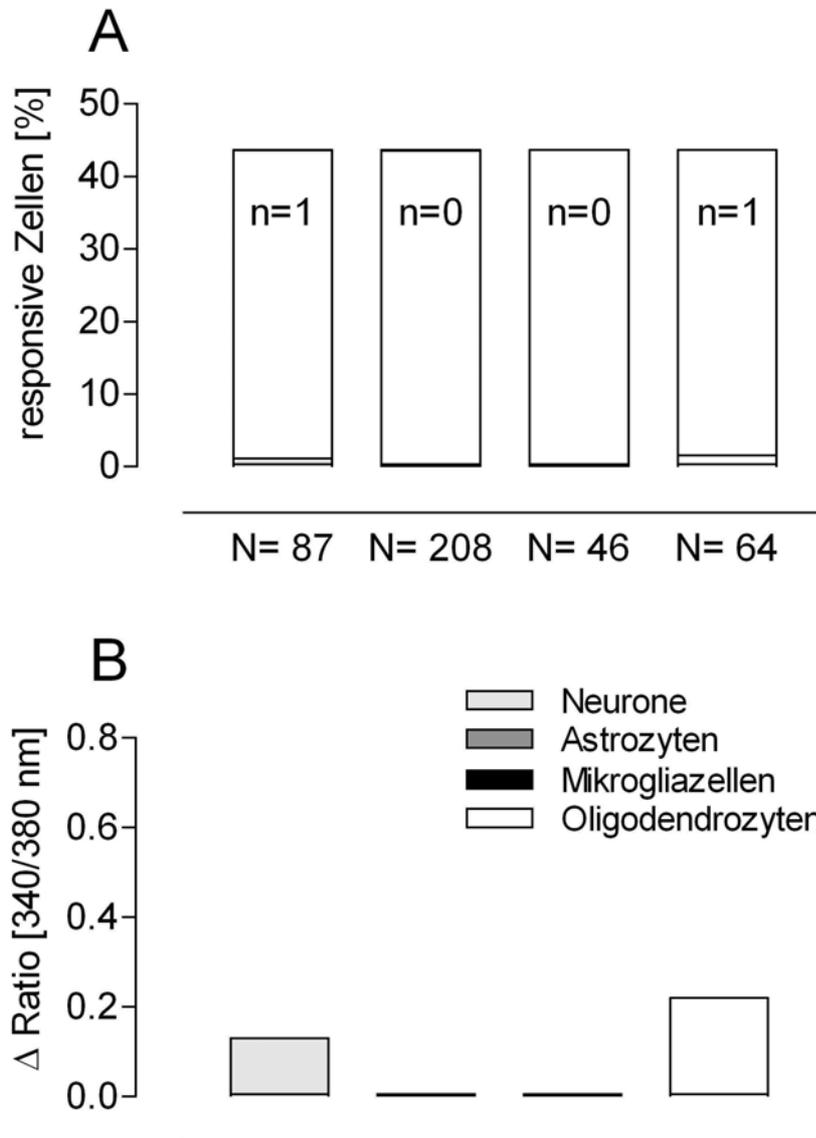


Abbildung 24: Stimulation der primären Zellkultur der AP mit FSL-1 (100 µg/ml) für 60 Sekunden

- A) Prozentualer Anteil der verschiedenen Zelltypen, die mit einer Ratio-Erhöhung auf eine FSL-1-Applikation reagierten, N=Anzahl der untersuchten Zellen, n=Anzahl der responsiven Zellen
- B) Erhöhung der 340/380 nm Fluoreszenz Ratio der reagierenden Zellen, ein S.E.M. konnte aufgrund der geringen Anzahl an responsiven Zellen nicht gebildet werden.

3.2.4. PI:PC

In der nächsten Versuchsreihe wurde der direkte Einfluss des TLR-3-Agonisten PI:PC auf Zellen der AP Primärkultur analysiert.

Abbildung 25 A zeigt, dass fast 8% (n=9) der 116 untersuchten Neurone, mehr als 2,2% (n=7) der 310 Astrozyten, jedoch keine der 108 Mikrogliazellen und der 67 untersuchten Oligodendrozyten mit einer Änderung der Δ Ratio 340/ 380 nm auf den vorausgehenden PI:PC-Stimulus reagierten.

Der Mittelwert der Ratioerhöhung lag bei den Neuronen bei 0,18 (S.E.M.= 0,08) und bei den Astrozyten mit 0,33 (S.E.M.= 0,25) noch deutlich höher (Abbildung 25 B).

Der Kurvenverlauf der Δ Ratio stieg bei Neuronen im Durchschnitt sofort steil an, fiel aber nur verzögert wieder auf den Basalwert zurück. Bei allen responsiven Astrozyten hingegen war ein steiler Anstieg der Kurve zu beobachten, die dann nach Erreichen des Maximums wieder direkt steil abfiel (Abbildung 26).

Die vor dem Stimulus mit PI:PC durchgeführte Boluszugabe von Messpuffer zeigte keinerlei Wirkung auf die $[Ca^{2+}]_i$ der primären AP Zellkultur. Auf die zum Abschluss des Versuchs durchgeführte KCl-Applikation reagierten vor allem die Neurone mit einer starken Erhöhung der 340/380 nm Ratio (Abbildung 26). Im allgemeinen konnte man an dieser deutlichen Reaktion auf KCl ablesen, dass die untersuchten Zellen und dabei insbesondere die Neurone, auch am Ende der Messung noch eine gute Vitalität aufwiesen.

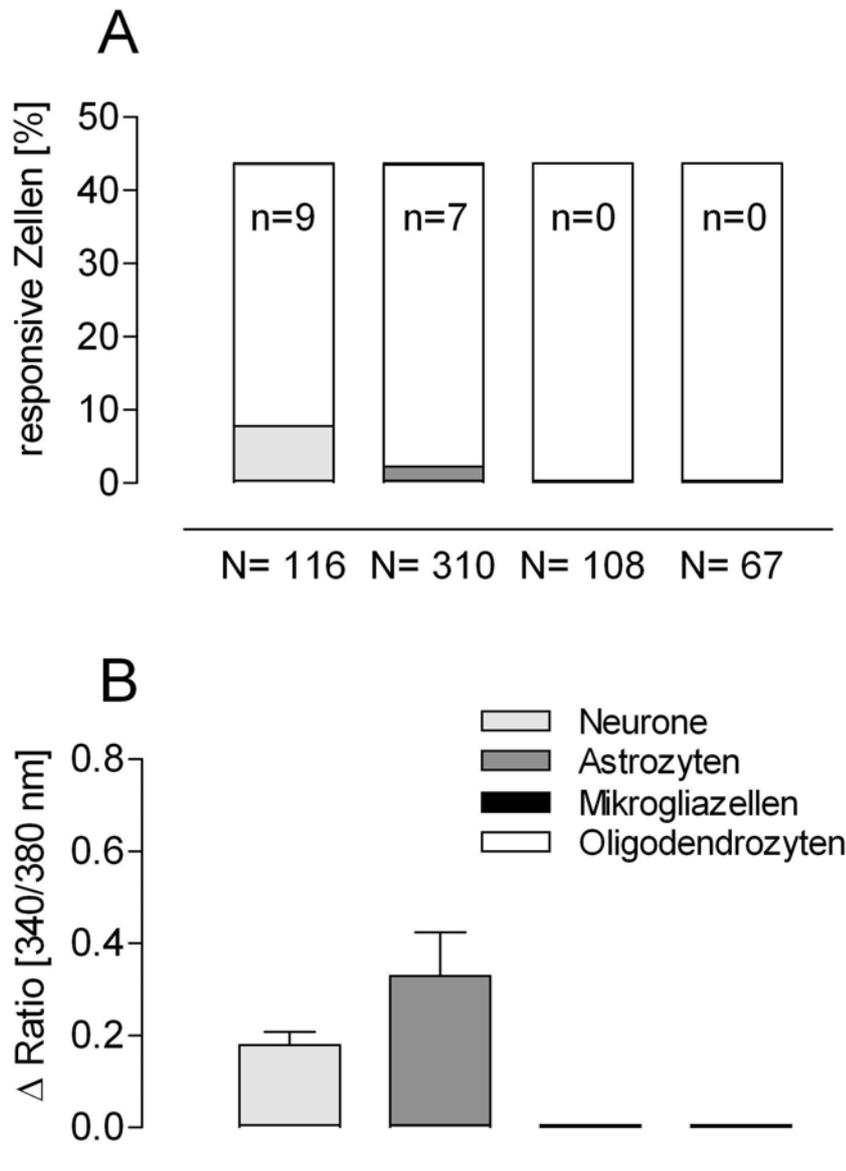


Abbildung 25: Stimulation der primären Zellkultur der AP mit PI:PC (100 µg/ml) für 60 Sekunden.

- A) prozentualer Anteil der verschiedenen Zelltypen, die mit einer Ratio-Erhöhung auf PI:PC-Applikation reagierten, N=Anzahl der gemessenen Zellen, n=Anzahl der responsiven Zellen
- B) durchschnittliche Erhöhung der 340/380 nm Fluoreszenz Ratio der reagierenden Neurone und Astrozyten als arithmetischer Mittelwert mit S.E.M.

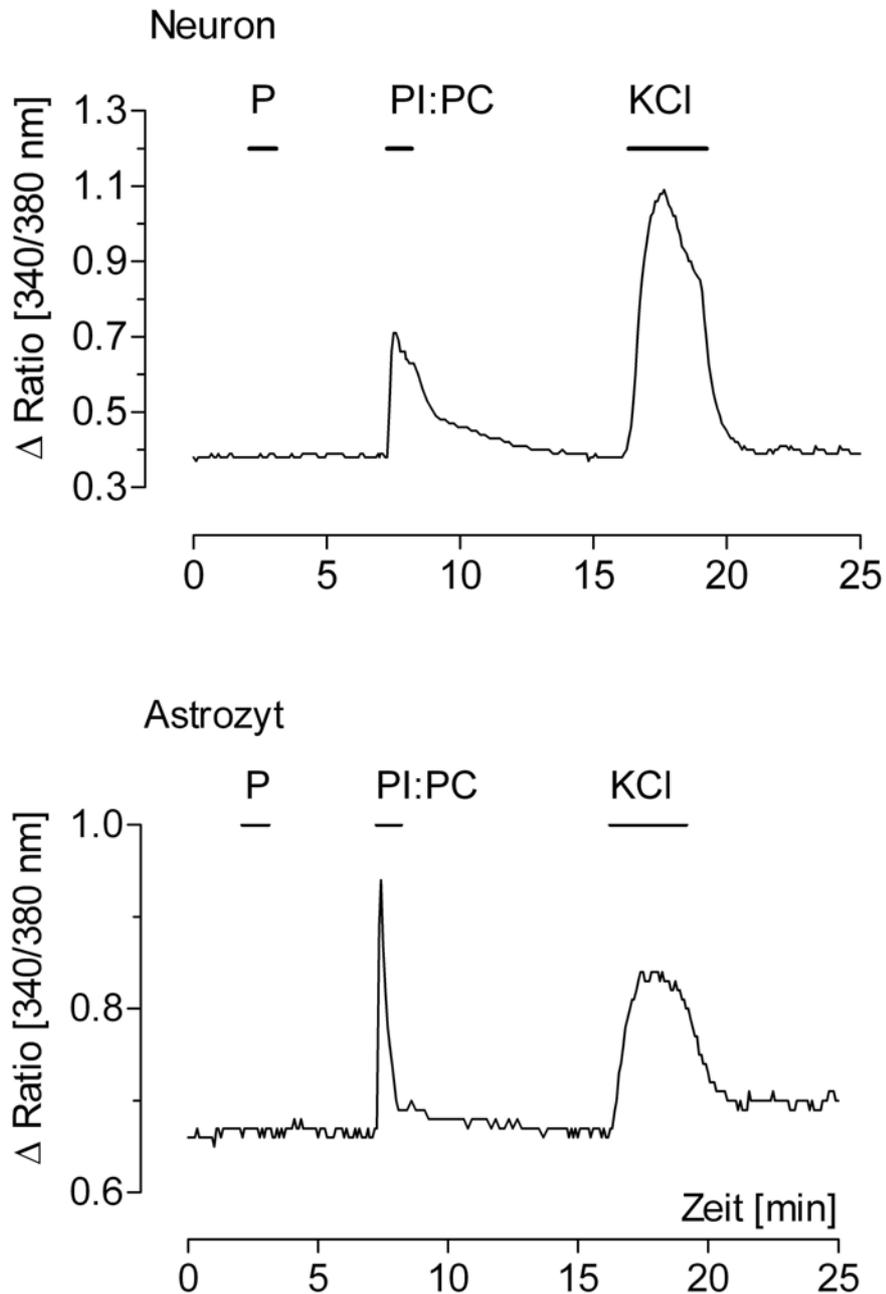


Abbildung 26: Darstellung der Δ Ratio eines einzelnen Neurons und Astrozyten der AP nach Stimulation mit PI:PC (100 μ g/ml). Der Kurvenverlauf steigt nach Zugabe des TLR-3-Agonisten bei beiden Zellen steil an und fällt nach Erreichen des Maximums bei dem Astrozyten ebenso steil wieder ab, während der Abfall der Δ Ratio beim Neuron verzögert verläuft. Die Boluskontrolle mit Puffer (P) zu Beginn führte nicht zu einer Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$, während der KCl-Stimulus am Ende des Versuchs ein deutliches Signal zeigte. Er diente als Vitalitätskriterium der untersuchten Zellen, insbesondere der Neurone.

3.3. Der Einfluss der PAMPs auf die Freisetzung von bioaktiven Zytokinen (TNF- α , IL-6) aus Zellen der primären Zellkultur der Area postrema

Im Rahmen dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob eine primäre Zellkultur der AP in der Lage ist, bioaktive Zytokine wie TNF- α und IL-6 in messbaren Konzentrationen in den Zellkulturüberstand nach Stimulation mit LPS oder anderen PAMPs freizusetzen.

Auch für diesen Versuch wurden die AP Primärkulturen nach einer Wachstums- und Differenzierungszeit von 4-5 Tagen verwendet. Hierbei wurden nur Kulturen ausgewählt, die unter dem Durchlichtmikroskop morphologisch einwandfrei erschienen. Dabei wurde darauf geachtet, dass die Kultur eine entsprechende Zelldichte aufwies und die Zellwände der einzelnen Zellen eine glatte durchgängige Oberfläche besaßen. Das Wachstum von Zellausläufern wie Axonen oder Dendriten wurde als Kriterium für die Vitalität der Zellkultur gewertet und ergab zusammen mit der Form der Zellen schon erste Hinweise auf den jeweiligen Zelltyp, welcher jedoch erst durch die Immunzytochemie eindeutig bestimmt werden konnte.

Für die Stimulation der Zellkultur mit dem jeweiligen PAMP wurde eine Zeitreihe festgelegt, die sich an *in vivo* Versuchen der eigenen Arbeitsgruppe orientierte. In der vorliegenden Arbeit wurden die Überstände der Zellkultur jeweils 30, 60, 90, 180 oder 360 Minuten nach der Stimulation mit dem zu testenden exogenen Pyrogen abgenommen und zur Messung im Bioassay vorbereitet.

3.3.1. Stimulation der AP Zellen mit LPS

Zur Messung der Zytokine nach LPS-Exposition im Überstand der primären AP Zellkultur wurden pro festgelegte Inkubationszeit durchschnittlich 10-12 Kulturen unterschiedlicher Präparationstage verwendet. Zu jeder der unterschiedlichen Zeiten wurden jeweils mindestens 6 Kontrollen unterschiedlicher Präparationen angefertigt. Die Kontrollen wurden lediglich mit Kulturmedium für die jeweilige Zeit inkubiert.

3.3.1.1. Messung von TNF- α im Bioassay nach Inkubation mit LPS

Bereits 30 Minuten nach dem Beginn der Stimulation mit LPS stieg die Konzentration an TNF- α im Überstand der AP Zellkultur im Vergleich zur Kontrolle signifikant an (1595 ± 924 versus 54 ± 32 pg/ml; $p = 0,0004$; $F = 23,4$). Längere Stimulationszeiten mit LPS führten zu einem kontinuierlichen Anstieg der TNF-Gehalte in den Kulturüberständen bis zu einem Wert von 39142 ± 8393 pg/ml nach 360 Minuten (siehe: Abbildung 27). Zu allen Stimulationszeiträumen lagen hochsignifikante Unterschiede bezüglich der TNF-Spiegel zwischen LPS-stimulierten Kulturen und den jeweiligen Kontrollen vor ($p < 0,0001$ nach 60, 90, 180 und 360 min; F-Werte zwischen 63 und 94).

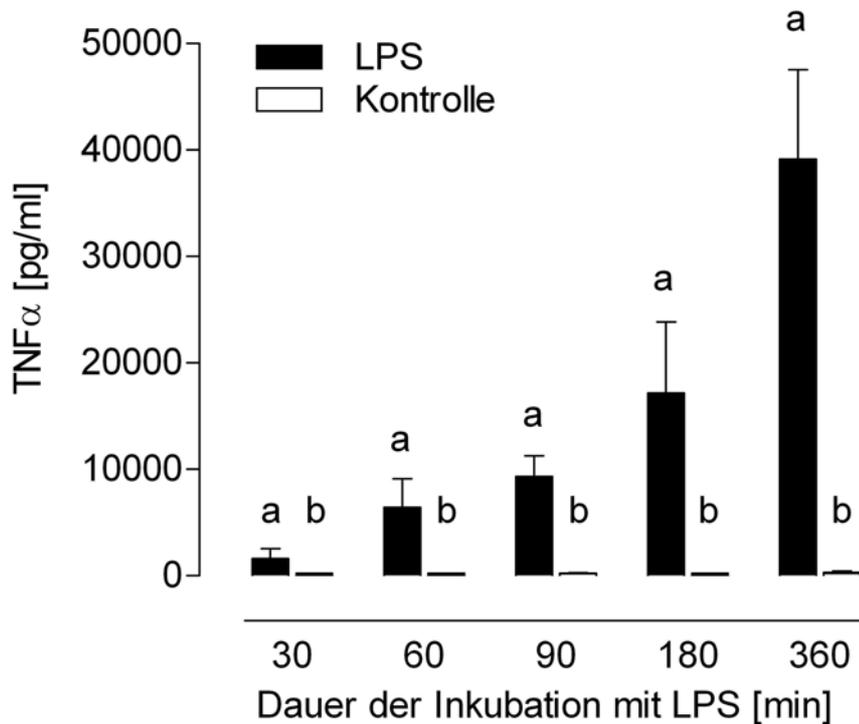


Abbildung 27: Im Kulturüberstand gemessene durchschnittliche Konzentrationen an TNF- α zu verschiedenen Inkubationszeitpunkten. Die Stimulation der Kultur mit LPS (100 μ g/ml) ist jeweils im Vergleich zu der dazugehörigen Kontrolle (Medium) dargestellt. Die unterschiedlichen Buchstaben über den Säulen der 30-, 60-, 90-, 180- und 360-min-Werte zeigen signifikante Unterschiede zwischen LPS-behandelten Kulturen und den jeweiligen Kontrollen an.

3.3.1.2. Messung von IL-6 im Bioassay nach Inkubation mit LPS

Die Kinetik der Freisetzung von biologisch aktivem IL-6 aus AP Zellen in den Kulturüberstand erfolgte ähnlich wie für TNF. Zu allen untersuchten Stimulationszeiträumen waren die IL-6-Konzentrationen in den Überständen LPS-stimulierter AP Kulturen im Vergleich zu den Kontrollen signifikant erhöht. LPS-Stimulation bewirkte eine kontinuierliche Erhöhung von IL-6 im Kulturmedium von 148 ± 52 I.U./ml nach 30 Minuten bis auf Werte von 2761 ± 1300 I.U./ml nach 360 Minuten. Die IL-6-Konzentrationen in den Kontrollüberständen waren zu allen untersuchten Zeitpunkten relativ konstant und lagen im Mittel zwischen 20 und 68 I.U./ml.

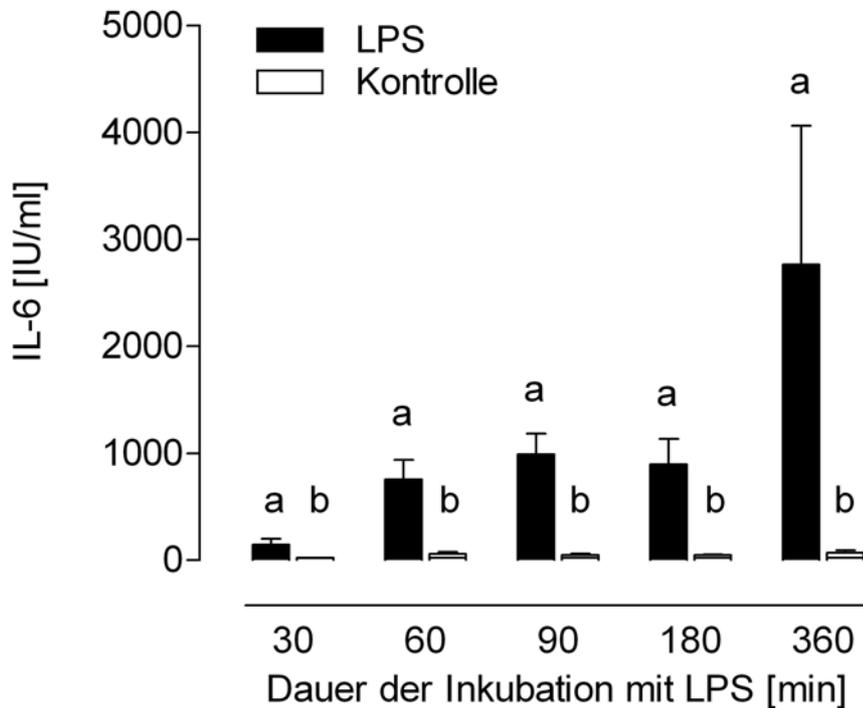


Abbildung 28: Im Kulturüberstand gemessene IL-6-Werte dargestellt als Mittelwerte \pm S.E.M. zu verschiedenen Inkubationszeitpunkten. Die Stimulation der Kultur mit LPS (100 μ g/ml) ist jeweils im Vergleich zur dazugehörigen Kontrolle (Medium) gezeigt. Die Werte nach 30, 60, 90, 180 und 360 min zeigen signifikante Unterschiede der IL-6-Werte zwischen der LPS-stimulierten Proben und den jeweiligen Kontrollen, was durch unterschiedliche Buchstaben über den Säulen zu den jeweiligen Zeitpunkten angezeigt wird.

3.3.1.3. Immunzytochemische Detektion von TNF- α in Mikrogliazellen

Basierend auf der Beobachtung, dass eine zeitabhängige Inkubation mit LPS, eine Freisetzung von TNF- α und IL-6 aus primären Zellen der AP stimulierte, sollte geklärt werden, welche Zelltypen der neuroglialen Kultur zur Synthese dieser Zytokine fähig sind. Mit Hilfe der Immunzytochemie wurde dazu die Kolokalisation von TNF- α als „Leitzytokin“ mit Signalen spezifischer Zellmarker dargestellt. Zur genauen Detektion wurde ein polyklonaler Antikörper gegen rekombinantes Ratten-TNF- α , jeweils mit primären Antikörpern gegen zelluläre Antigene eingesetzt. Die dafür verwendeten Primärantikörper waren: Mouse-

anti-MAP2a+b (Neurone), Rabbit-anti-GFAP (Astrozyten), Mouse-anti-CD68(ED1) (Mikrogliazellen) und Mouse-anti-CNPase (Oligodendrozyten). Die Lokalisation der einzelnen Zellkerne erfolgte mit dem Kernfarbstoff DAPI (Immunzytochemisches Protokoll siehe: Kapitel 2.4.3.6).

Für die Versuchsreihe wurden insgesamt 15 Wells mit primären Zellkulturen der AP von drei verschiedenen Präparationen verwendet. Die Proben wurden für 180 Minuten mit LPS (100 µg/ml Zellkulturmedium) im Brutschrank stimuliert. Mindestens 2 Wells pro Versuch wurden als unstimulierte Kontrollen lediglich mit Zellkulturmedium ebenfalls für 180 Minuten inkubiert.

Die mit LPS stimulierten AP Zellkulturen zeigten eine deutliche Expression von TNF- α -positiven Signalen in Mikrogliazellen, jedoch nicht in Astrozyten (Abbildung 29A), Neuronen oder Oligodendrozyten (hier nicht dargestellt). Bei der unstimulierten Kultur zeigte sich dieses TNF- α -Signal in Mikrogliazellen wesentlich schwächer (Abbildung 29B).

Bei der Betrachtung von einzelnen Mikrogliazellen stärkerer Vergrößerung fällt eine perinukleäre Lokalisation von TNF- α auf (Abbildung 29C+E). In der Literatur wird diese zelluläre Struktur als Trans-Golgi-Apparat beschrieben (Manderson *et al.*, 2007; Lieu *et al.*, 2008). In einigen Mikrogliazellen lagen die TNF- α -Signale in vesikulären Strukturen im Zytosol ebenso wie peripher im Bereich der Membran der Zelle vor (Abbildung 29 F+H).

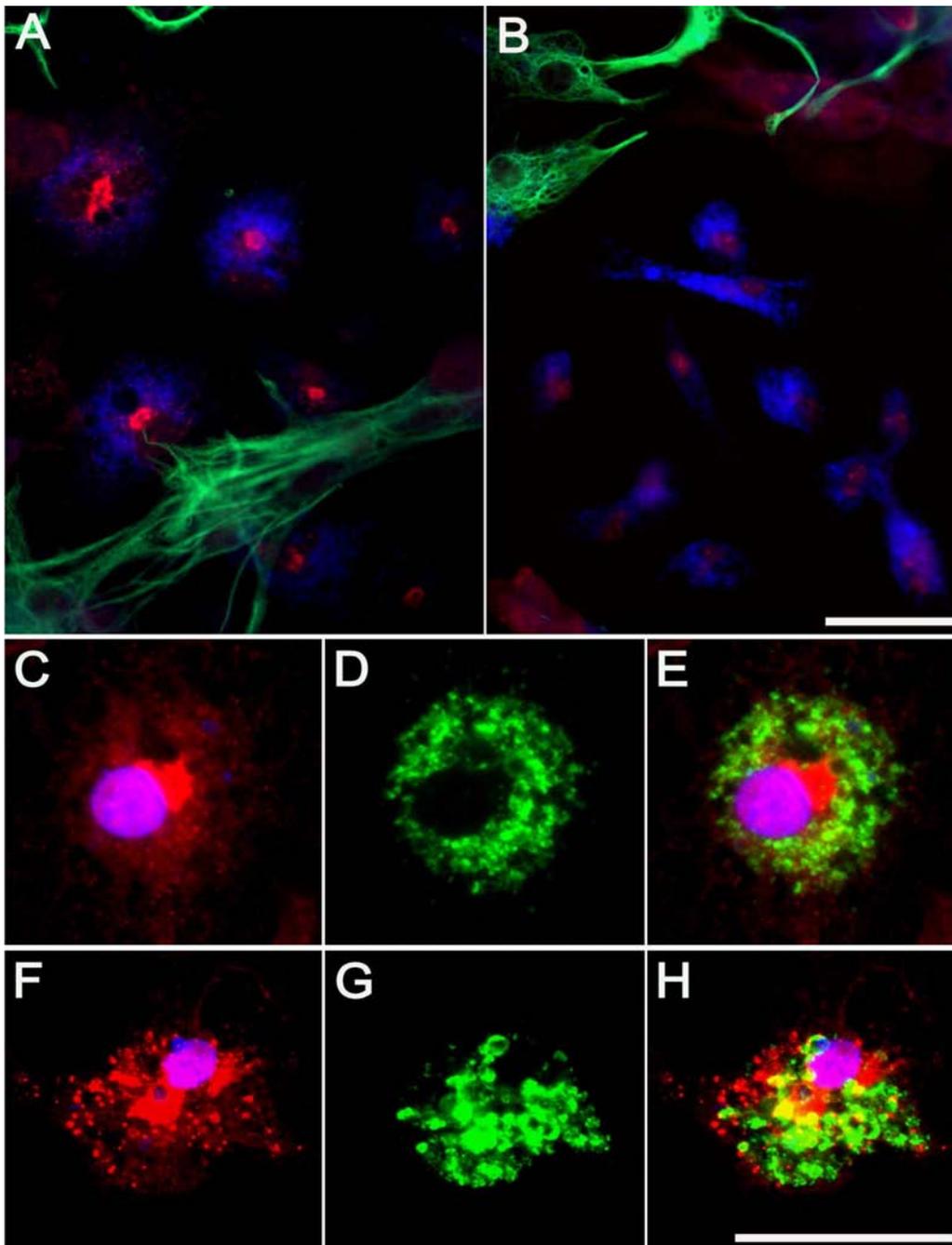


Abbildung 29: Immunzytochemischer Nachweis einer LPS-induzierten Expression von TNF- α in AP Mikrogliazellen. Nach einer Exposition mit LPS für 180 min (A) zeigte sich ein deutliches Signal für TNF- α (rot) in Mikrogliazellen (blau, ED-1-positiv), aber nicht in Astrozyten (grün, GFAP-positiv). Nur eine moderate Expression von TNF- α -Signalen ist in der unstimulierten Kontrolle (B) sichtbar.

Die Bilder C-H zeigen eine einzelne Mikrogliazelle in stärkerer Vergrößerung. Die TNF- α -positiven Signale sind hier rot (C+F), der Zellmarker für Mikrogliazellen (ED1) grün (D+G) und der Zellkern mit DAPI violett (C+E) dargestellt. Abbildung E zeigt als Dreifachmarkierung die Kolokalisation von TNF- α in einer Mikrogliazelle im perinukleären

Bereich. Während sich die TNF- α -Expression in F-G in vesikulären Strukturen im Zytosol und peripher im Bereich der Zellmembran darstellt. Die Eichbalken entsprechen einer Länge von 25 μm .

3.3.2. Stimulation der AP Zellen mit FSL-1

In dieser Versuchsreihe wurde die primäre Zellkultur der AP mit dem TLR-2/6-Agonisten FSL-1 stimuliert. Dazu wurde FSL-1 in einer Konzentration von 100 $\mu\text{g/ml}$ Kulturmedium eingesetzt und der Überstand der Zellkultur nach 60 Minuten ($n=6$ Proben) und nach 90 Minuten ($n=7$ Proben) abgenommen. Es wurden zu jeder Inkubationsdauer jeweils mindestens 6 Kontrollen angefertigt, die nur mit Medium inkubiert wurden. In den Kulturüberständen wurden mit Hilfe des Bioassays dann die darin enthaltene Konzentrationen an TNF- α und IL-6 gemessen.

3.3.2.1. Messung von TNF- α im Bioassay nach Inkubation mit FSL-1

Durchschnittlich wurden nach einer Stimulation mit FSL-1 nach 60 Minuten 955 ± 136 pg/ml TNF- α gemessenen. Die dazugehörige Kontrolle enthielt im Gegensatz dazu nur 75 ± 70 pg/ml TNF- α . Dieser Unterschied war statistisch signifikant ($p=0,0004$; $F=30,297$). Nach einer Inkubationszeit von 90 Minuten konnten bei der stimulierten Probe im Durchschnitt 785 ± 70 pg/ml TNF- α gemessen werden, was sich im Vergleich zur Kontrolle, bei der Werte von 179 ± 72 pg/ml TNF- α erhoben wurden (Abbildung 30) als ebenfalls signifikant unterschiedlich erwies ($p=0,001$; $F=15,749$).

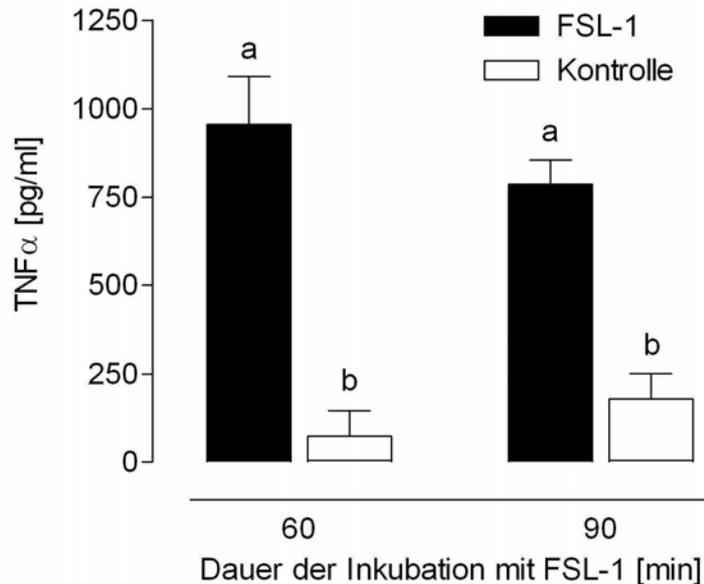


Abbildung 30: Das Diagramm zeigt die durchschnittlichen TNF- α Werte im Überstand der Zellkultur nach Stimulation mit FSL-1 für eine bestimmte Dauer. Unterschiedliche Buchstaben über den Säulen zeigen signifikante Unterschiede zwischen Probe und Kontrolle zu den jeweiligen Inkubationszeiten an. Über den Säulen ist der jeweilige Standard-Error als T-Balken dargestellt.

3.3.2.2. Messung von IL-6 im Bioassay nach Inkubation mit FSL-1

Es wurden nach Exposition der Zellkultur mit FSL-1 nach 60 Minuten durchschnittlich 171 ± 43 I.U./ml IL-6 gemessen. Für die Kontrolle lag der Wert bei 71 ± 14 I.U./ml IL-6 (Abbildung 31). Statistisch gesehen ergab dies keinen signifikanten Unterschied ($p=0,051$; $F= 5,269$). Die Durchschnittswerte nach 90 Minuten waren für die stimulierte Proben 147 ± 42 I.U./ml und für die dazugehörigen Kontrollen 49 ± 13 I.U./ml IL-6, was einen signifikanten Unterschied darstellte ($p= 0,017$; $F= 7,042$).

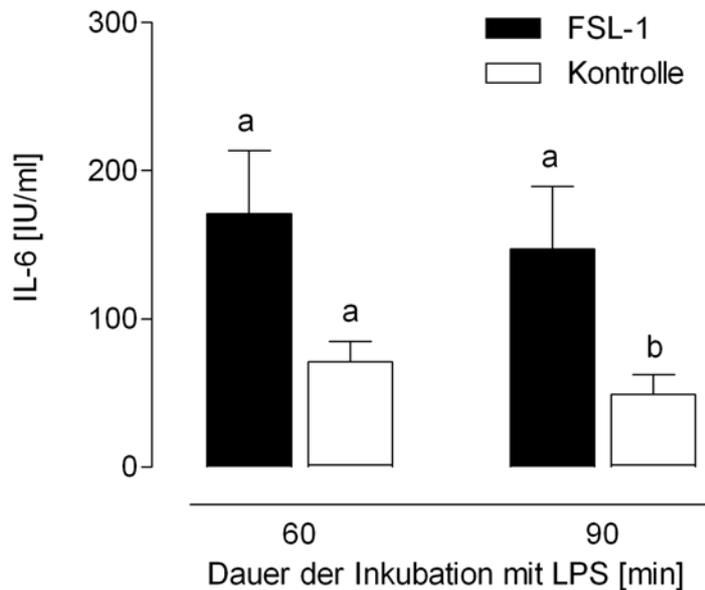


Abbildung 31: Hier dargestellt sind die durchschnittlichen Werte von IL-6 im Überstand der AP Zellkultur nach Stimulation mit FSL-1. Gleiche Buchstaben über den Säulen bei 60 Minuten zeigen, dass der Unterschied von stimulierten Proben zu Kontrollen nicht signifikant war. Im Gegensatz dazu zeigte sich bei einer Inkubationszeit von 90 Minuten ein signifikanter Unterschied, dargestellt durch unterschiedliche Buchstaben. Der Standard-Error ist als Balken über der jeweiligen Säule zu sehen.

3.3.3. Stimulation der Zellen der AP mit PI:PC

Im Rahmen dieser Versuchsanordnung wurde die primäre Zellkultur der AP mit dem TLR-3-Agonisten PI:PC stimuliert. Die Überstände der Kulturen wurden nach 30, 60, 90 und 120 Minuten entnommen und die biologisch aktiven TNF- α - und IL-6-Werte jeweils in einem Bioassay gemessen. Zu jedem der Inkubationszeitpunkte wurden ebenfalls mehrere Kontrollen angefertigt, die vorher lediglich mit Zellkulturmedium inkubiert wurden.

3.3.3.1. Messung von TNF- α im Bioassay nach Inkubation mit PI:PC

Bereits nach 30 Minuten Inkubationszeit mit PI:PC stieg die Konzentration an TNF- α in den Kulturüberständen auf 362 ± 117 pg/ml an, was sich von den entsprechenden Kontrollwerten (54 ± 32 pg/ml) statistisch signifikant unterschied ($p= 0,0039$; $F= 13,98$). Der mittlere Gehalt an TNF- α stieg mit zunehmender Inkubationszeit mit PI:PC kontinuierlich, aber moderat bis auf einen Wert von 692 ± 206 pg/ml an (Abbildung 32). Auch zu allen weiteren Inkubationszeiten (60, 90 und 120 Minuten) ergaben sich signifikante Unterschiede zwischen PI:PC-stimulierten AP Kulturen und den entsprechenden Kontrollen.

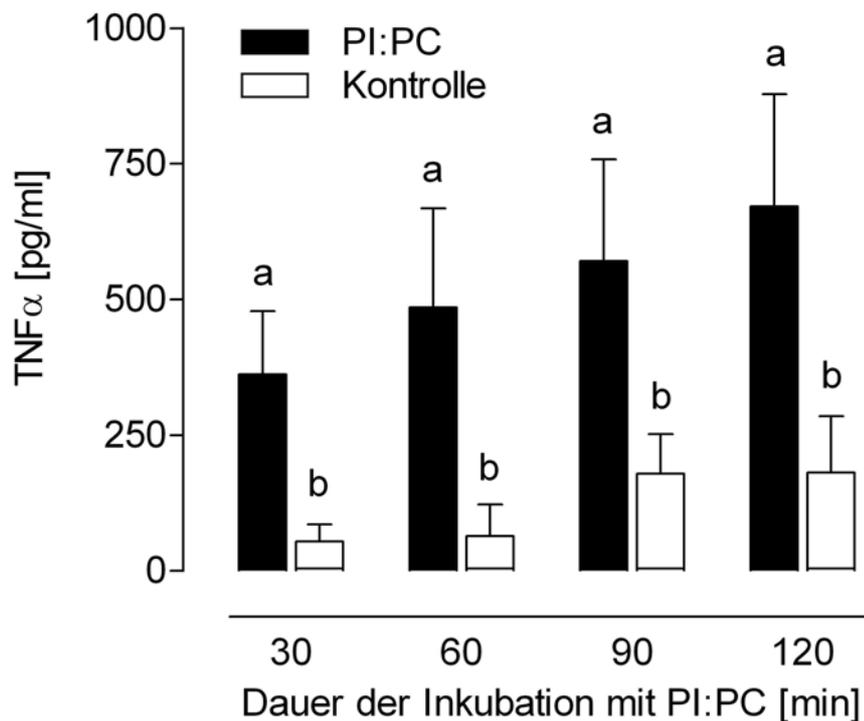


Abbildung 32: Das Diagramm zeigt die durchschnittlich gemessene TNF- α -Konzentration im Überstand der AP Zellkultur nach Inkubation mit PI:PC im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle. Unterschiedliche Buchstaben über den Säulen zeigen zu den jeweiligen Untersuchungszeitpunkten statistisch signifikante Unterschiede zwischen PI:PC-stimulierten Proben und den entsprechenden Kontrollen an.

3.3.3.2. Messung von IL-6 im Bioassay nach Inkubation mit PI:PC

Auch die Konzentration an biologisch aktivem IL-6 war in den AP Kulturüberständen bereits nach 30 Minuten Inkubation mit PI:PC gegenüber der Kontrolle signifikant erhöht (108 ± 13 versus 19 ± 4 I.U./ml; $p < 0,0001$; $F = 65,4$). Dieser Wert erhöhte sich innerhalb der nächsten 90 Minuten weiter bis auf 330 I.U./ml (Abbildung 33). Mit Ausnahme der nach 120 Minuten gemessenen Werte lagen jeweils signifikante Unterschiede zu den entsprechenden Kontrollen vor. Für die fehlende Signifikanz nach 120 Minuten ($p = 0,075$; $F = 4,2$) war die vergleichsweise höhere Streuung der einzelnen Messwerte verantwortlich.

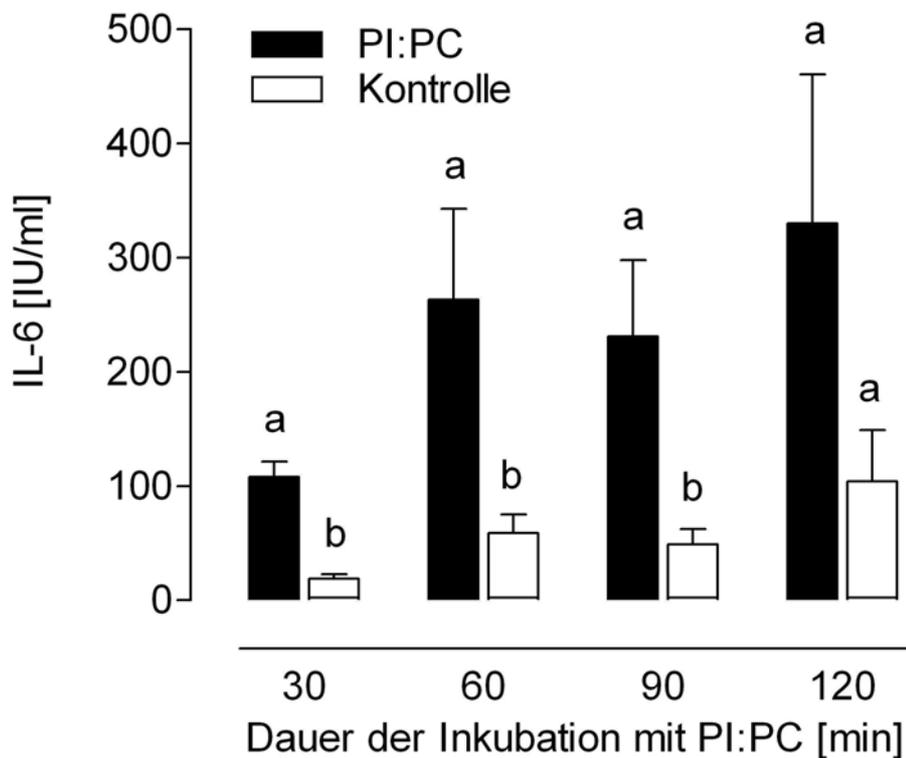


Abbildung 33: Im Bioassay gemessene durchschnittliche IL-6-Konzentrationen nach 30, 60, 90 und 120 Minuten PI:PC-Stimulation der AP Zellkultur. Unterschiedliche Buchstaben über den Säulen der 30-, 60- und 90-Minuten-Werte zeigen signifikante Unterschiede zwischen PI:PC-stimulierten Kulturen und den entsprechenden Kontrollen an. Gleiche Buchstaben über den Säulen bei 120 min bedeuten, dass hier kein signifikanter Unterschied vorlag. Der S.E.M. ist über den Säulen als T-Balken dargestellt.

3.4. Toleranzerscheinungen der AP- Zellkultur gegenüber LPS

Im Rahmen dieser Arbeit sollte analysiert werden, ob Toleranzerscheinungen auch nach direktem Kontakt verschiedener PAMPs mit einer primären Zellkultur der *Area postrema* auftreten. Dazu wurde zum einen untersucht, wie sich eine mehrmalige Applikation von LPS in kurzen Abständen auf die $[Ca^{2+}]_i$ der neuroglialen Zellkultur auswirkt, zum anderen, welche Wirkung eine länger andauernde Exposition von LPS auf die Reaktivität der Zellen hat. Im Anschluss daran stellte sich die Frage, ob sich auf Ebene der AP Zellkultur eine Kreuztoleranz zwischen dem TLR-4-Agonisten LPS, dem TLR-2-Agonisten MDP und dem TLR-2/6-Agonisten FSL-1 ausbildet.

3.4.1. Auswirkungen der wiederholten Stimulation mit LPS auf die $[Ca^{2+}]_i$ der AP-Zellkultur

In einzelnen Versuchen wurde der Einfluss einer wiederholten Stimulation mit LPS (100 $\mu\text{g/ml}$) in kurzen Abständen auf die $[Ca^{2+}]_i$ von primären Zellen der AP getestet. Beispielhaft wurden die Ca^{2+} -Signale von zwei Mikrogliazellen aus diesem Versuchsablauf dargestellt (Abbildung 34).

Nach einer Bolus-Applikation mit Messpuffer zeigten beide Zellen zunächst keinerlei Reaktion. Auf die erste LPS-Gabe reagierte die Zelle in Abbildung 34 A aber mit einer deutlich Erhöhung ihrer $[Ca^{2+}]_i$ ($\Delta\text{Ratio}= 0,32$). Eine zweite und dritte Stimulation mit LPS im Abstand von 7 Minuten zeigten keinerlei Erhöhung der ΔRatio . Auch die Beispielzelle in Abbildung 34 B reagierte sehr deutlich auf die erste Boluszugabe von LPS ($\Delta\text{Ratio}= 0,18$). Im Gegensatz zur ersten Zellen kam es hier jedoch auch nach zweiter ($\Delta\text{Ratio}= 0,12$) und dritter ($\Delta\text{Ratio}= 0,05$) LPS-Applikation zu einer Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$, die sich jedoch progressiv abschwächte. Beide Zellen zeigten folglich eine Desensibilisierung gegenüber wiederholter Konfrontation mit dem bakteriellen Endotoxin LPS.

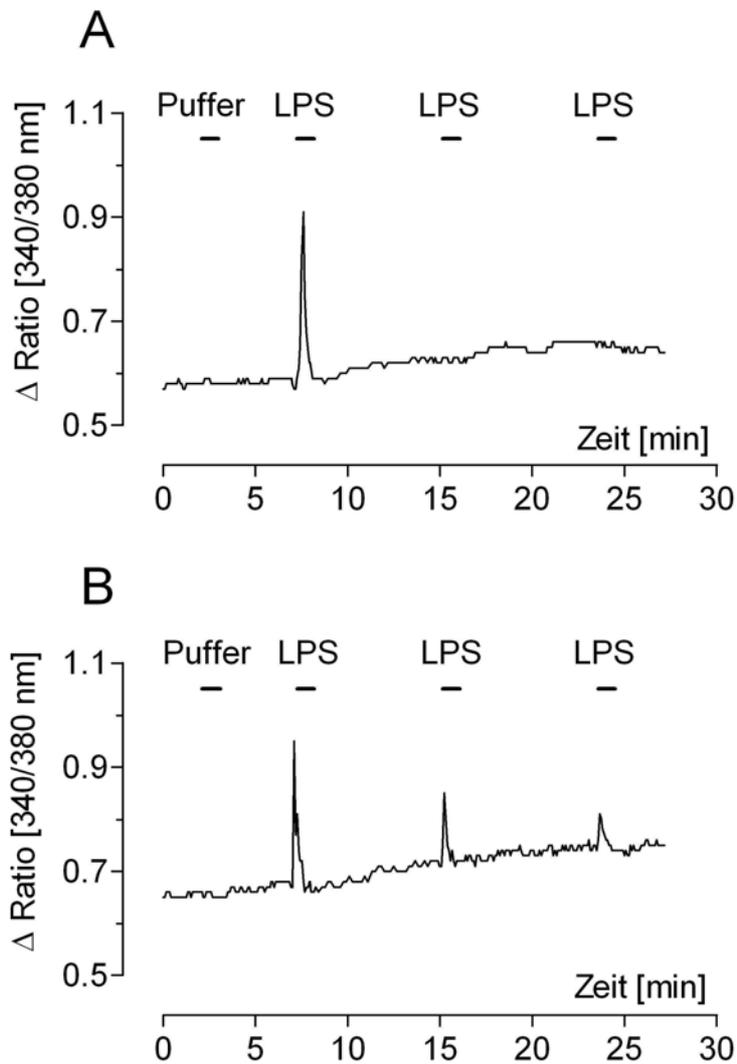


Abbildung 34: Schematische Darstellung der Reaktion zweier Mikrogliazellen im Kalzium-Imaging. Die Kurve zeigt die Δ Ratio (340/380 nm), die proportional zur $[Ca^{2+}]_i$ der Zellen gewertet werden kann. Abbildung A zeigt, dass nach einmaliger LPS-Stimulation keine weitere Responsivität gegenüber LPS bestand. In Abbildung B reagierte die Zelle auch auf den zweiten und dritten LPS-Stimulus, jedoch deutlich in ihrer Amplitude reduziert.

3.4.2. Auswirkungen einer Vorinkubation der AP-Zellkultur mit LPS für 18 Stunden auf die $[Ca^{2+}]_i$

Weitere Untersuchungen der Toleranzerscheinungen von AP-Zellen gegenüber LPS sollten zeigen, wie sich eine Vorinkubation der AP-Zellkultur mit LPS über einen längeren Zeitraum auf die $[Ca^{2+}]_i$ nach akuter LPS-Stimulation auswirkt. Dazu wurden die Kulturen für 18 Stunden mit LPS in einer Konzentration von 10 $\mu\text{g/ml}$ Zellkulturmedium im Wärmeschrank inkubiert. Anschließend wurde ihre Reaktion auf eine LPS-Applikation (100 $\mu\text{g/ml}$) im Kassium-Imaging getestet.

Im Rahmen dieser Versuchsreihe wurde die $[Ca^{2+}]_i$ von 150 Neuronen, 310 Astrozyten, 25 Mikrogliazellen und 84 Oligodendrozyten gemessen.

Die Vorstimulation mit LPS zeigte im Vergleich zur Versuchsreihe ohne Vorstimulation einen deutlichen Rückgang der Ca^{2+} -Signale als Reaktion auf einen akuten LPS-Stimulus. So antworteten nur 2 Neurone (durchschnittliche $\Delta\text{Ratio}= 0,1$) und ein Oligodendrozyt ($\Delta\text{Ratio}=0,21$), jedoch keine der Astrozyten und Mikrogliazellen mit einer Erhöhung ihrer ΔRatio (Abbildung 35).

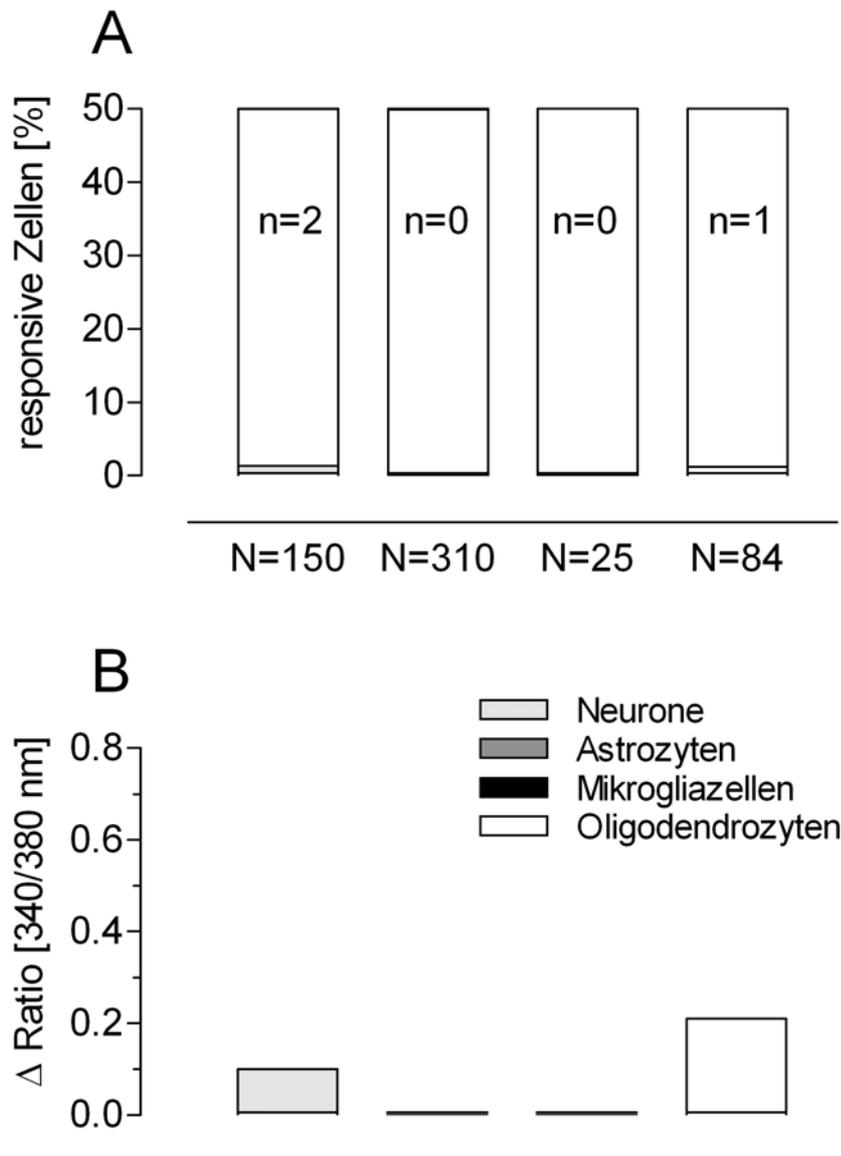


Abbildung 35: Die mit LPS vorinkubierten Zellen, insbesondere die Mikrogliazellen zeigten so gut wie keine Ca^{2+} -Signale als Reaktion auf akute LPS-Stimulation. Dieses Phänomen deutet auf eine bestehende Endotoxintoleranz hin.

A) prozentualer Anteil der verschiedenen Zelltypen, die mit einer Ratio-Erhöhung auf LPS-Applikation reagierten, N=Anzahl der untersuchten Zellen, n=Anzahl der responsiven Zellen

B) durchschnittliche Erhöhung der 340/380 nm Fluoreszenz Ratio der reagierenden Zellen als arithmetischer Mittelwert

3.4.3. Auswirkungen einer Vorinkubation mit MDP oder FSL-1 auf die LPS-induzierte Änderung der $[Ca^{2+}]_i$ der AP-Zellkultur

In den folgenden Versuchen sollte nun analysiert werden, ob eine Vorstimulation der AP Zellkultur mit anderen PAMPs ebenfalls zu einer Unterdrückung der Ca^{2+} -Antworten nach akuter Stimulation mit LPS führt. Dazu wurden das Muramyldipeptid (MDP) grampositiver Bakterien und das Fibroblasten-stimulierende Lipopeptid-1 (FSL-1) von Mycoplasmen verwendet. Die primären Zellkulturen wurden hierzu für 18 Stunden mit MDP oder FSL-1, die beide in Neurobasal-A-Medium so gelöst wurden, dass eine Endkonzentration von 10 $\mu\text{g/ml}$ entstand, inkubiert.

Im Kalzium-Imaging erfolgte die Stimulation der Zellen dann wieder durch eine Bolus-Applikation von LPS (100 $\mu\text{g/ml}$).

Bei der mit MDP vorstimulierten Kultur antworteten 3 von 175 der Neurone (1,7%), 3 von 180 Astrozyten (1,7%), 9 von 58 Mikrogliazellen (15,5%) und nur einer von 56 Oligodendrozyten (1,8%) auf den LPS-Stimulus. Der arithmetische Mittelwert (\pm S.E.M.) der Ratioänderung betrug dabei $0,15 \pm 0,03$ für Neurone; $0,46 \pm 0,21$ für Astrozyten; $0,2 \pm 0,03$ für Mikrogliazellen und $0,24$ für Oligodendrozyten (Abbildung 36 A und B).

Nach Präinkubation der AP Zellkultur mit FSL-1 für 18 Stunden antworteten 4 von 83 Neuronen (4,8%), 2 von 151 Astrozyten (1,3%), 8 von 89 Mikrogliazellen (9%) und einer von 69 Oligodendrozyten (1,5%) mit einer Erhöhung ihrer Δ Ratio auf Stimulation mit LPS (Abbildung 37A). Die durchschnittliche Ratioänderung betrug in diesem Versuch $0,44 \pm 0,28$ für Neurone; $0,53 \pm 0,28$ für Astrozyten; $0,36 \pm 0,07$ für Mikroglia und $0,1$ für Oligodendrozyten (Abbildung 37B).

Der Anteil der LPS-responsiven Zellen, insbesondere der Mikrogliazellen, ähnelte weitestgehend den Daten aus dem Versuch, bei dem keine Vorinkubation der Zellkultur stattgefunden hatte. Dies deutet darauf hin, dass MDP und FSL-1 nicht in der Lage sind, die primäre AP Kultur gegenüber LPS zu desensibilisieren. Es konnte also keine Kreuztoleranz zwischen LPS, MDP und FSL-1 im Kalzium-Imaging nachgewiesen werden.

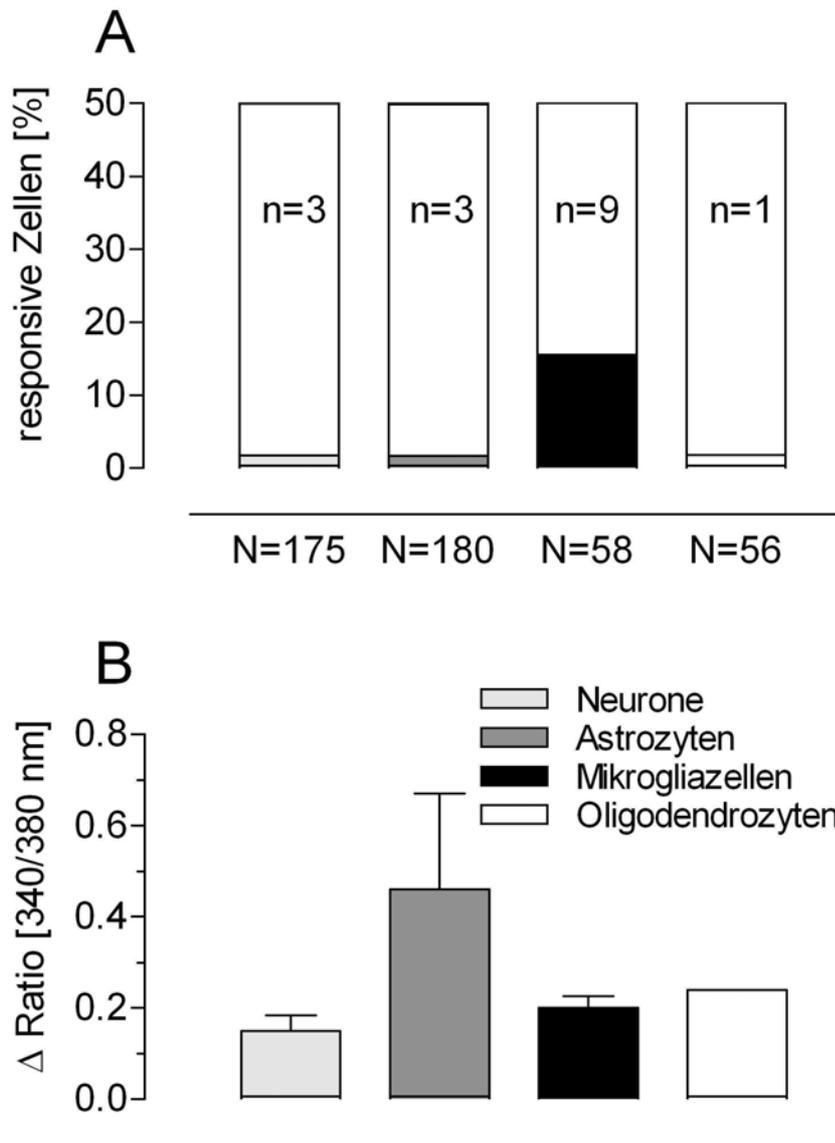


Abbildung 36: Nach 18-stündiger Inkubation der Zellkultur mit MDP (10 µg/ml). Reaktivität von Zellen der AP- Mikrokultur auf eine LPS-Bolusapplikation (100 µg/ml).

- A) prozentualer Anteil der verschiedenen Zelltypen, die mit einer Ratio-Erhöhung auf LPS-Applikation reagierten, N=Anzahl der untersuchten Zellen, n=Anzahl der responsiven Zellen
- B) durchschnittliche Erhöhung der 340/380 nm Fluoreszenz Ratio der reagierenden Zellen als arithmetischer Mittelwert und S.E.M. Auffällig sind hier die Astrozyten, die mit einer doppelt so hohen Ratio-Änderung auf LPS antworteten.

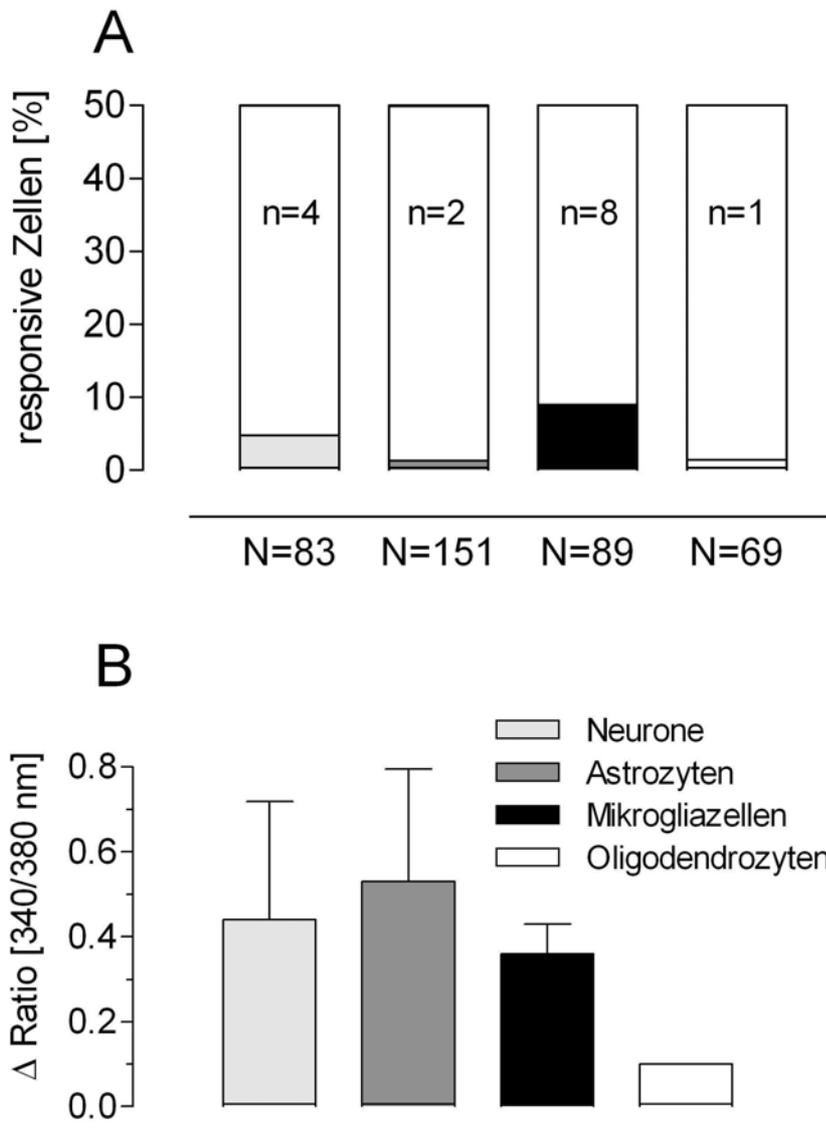


Abbildung 37: Nach 18-stündiger Vorstimulation der Zellkultur mit FSL-1 (10 µg/ml). Reaktivität von Zellen der AP- Mikrokultur auf eine LPS-Bolusapplikation (100 µg/ml).

- A) prozentualer Anteil der verschiedenen Zelltypen, die mit einer Ratio-Erhöhung auf LPS-Applikation reagierten, N=Anzahl der untersuchten Zellen, n=Anzahl der responsiven Zellen
- B) durchschnittliche Erhöhung der 340/380 nm Fluoreszenz Ratio der reagierenden Zellen als arithmetischer Mittelwert und S.E.M.

3.4.4. Auswirkungen einer Vorinkubation mit LPS für 18 Stunden auf die Freisetzung Zytokinen aus Zellen der primären Zellkultur der AP

Im Rahmen dieses Versuchs sollte untersucht werden, ob eine Präexposition der AP Zellkultur mit LPS ebenfalls Toleranzerscheinungen in Bezug auf die Freisetzung von Zytokinen aus den AP Zellen hervorruft. Dazu wurden wie bei den vorausgegangenen Versuchen primäre Zellkulturen der AP nach einer Wachstumszeit von 4-5 Tagen verwendet. Diese wurden dann für 18 Stunden mit LPS, welches dem Zellkulturmedium in einer Konzentration von 10 µg/ml zugegeben wurde, inkubiert. Gleichzeitig wurden dazu auch unstimulierte Kontrollen angefertigt, bei denen zum gleichen Zeitpunkt lediglich ein Wechsel des Kulturmediums durchgeführt wurde. Nach 18 Stunden wurden dann sowohl bei den vorstimulierten Proben, als auch bei den Kontrollkulturen, der Zellkulturüberstand abgenommen und die Kulturen dreimal mit Medium gewaschen. Daraufhin wurden Proben und Kulturen mit LPS in einer Konzentration von 100 µg/ml für eine bestimmte Zeit inkubiert. Nach 30, 60, 90, 180 oder 360 Minuten wurde anschließend der Zellkulturüberstand vorsichtig abgenommen, und anschließend die darin enthaltenen Konzentrationen von TNF- α und IL-6 mit Hilfe von Bioassays bestimmt.

3.4.4.1. Die Messung von TNF- α im Bioassay nach Vorinkubation mit LPS

Die Vorinkubation der AP Kulturen mit LPS für 18 Stunden führte zu einer deutlichen Abschwächung der anschließend untersuchten LPS-induzierten Freisetzung von TNF- α in die Kulturüberstände (Abbildung 38). Dieser Effekt manifestierte sich besonders nach 60, 180 und 360 Minuten Stimulationszeit. Speziell nach 360 Minuten wurde die LPS-induzierte Bildung von TNF- α durch AP Kulturen zu 90% durch die Vorinkubation mit LPS unterdrückt (39142 ± 8393 versus 3806 ± 1117 pg/ml; $p < 0,0001$; $F = 38,9$). Die Ergebnisse dieser Versuchsreihe zeigen, dass sich durch die 18-stündige Vorinkubation mit LPS

eine deutliche Toleranz gegenüber Endotoxin auf Ebene der Fähigkeit zur Induktion von TNF- α manifestiert.

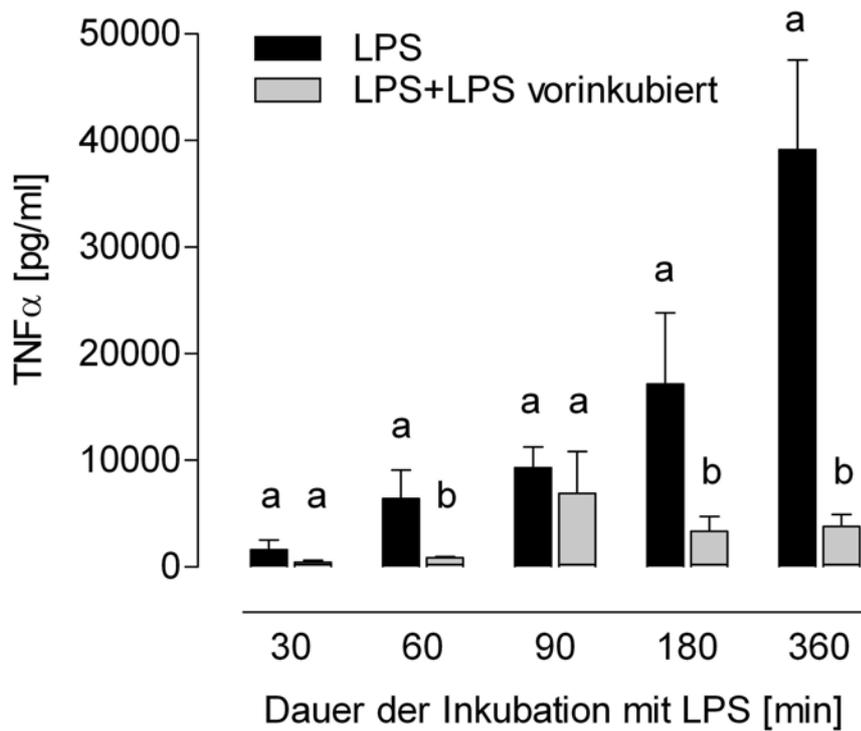


Abbildung 38: Hier dargestellt ist die im Durchschnitt gemessenen TNF- α -Konzentration im Überstand der AP Zellkultur nach akuter LPS-Stimulation für bestimmte Zeitintervalle. Dabei zeigt die jeweils rechte der beiden Säulen AP Zellkulturen, die für 18 Stunden mit LPS (10 $\mu\text{g/ml}$) vorinkubiert worden waren, während die linke Säule AP Zellkulturen darstellt, die vorher noch keinen Kontakt zu LPS hatten. Gleiche Buchstaben über den zusammen gehörigen Säulen beudeuten, dass kein signifikanter Unterschied der TNF- α -Werte zu diesem Zeitpunkt vorlag. Unterschiedliche Buchstaben stehen für statistisch signifikante Unterschiede zu den jeweiligen Zeitpunkten. Der Standard-Error ist als T-Balken über den Säulen sichtbar.

3.4.4.2. Die Messung von IL-6 im Bioassay nach Vorstimulation mit LPS

Die durch Vorinkubation der AP Zellen mit LPS verursachte Unterdrückung der LPS-induzierten Freisetzung von IL-6 manifestierte sich im gleichen Maße und nach den gleichen Stimulationszeiträumen wie bereits für TNF- α dargestellt wurde. Nach Stimulationszeiten von 60, 180 und 360 Minuten war die Fähigkeit zur LPS-induzierten Bildung von IL-6 in den LPS vorinkubierten Kulturen signifikant eingeschränkt (Abbildung 39), was ebenfalls als klares Zeichen einer Toleranzentwicklung gegenüber LPS gewertet werden kann.

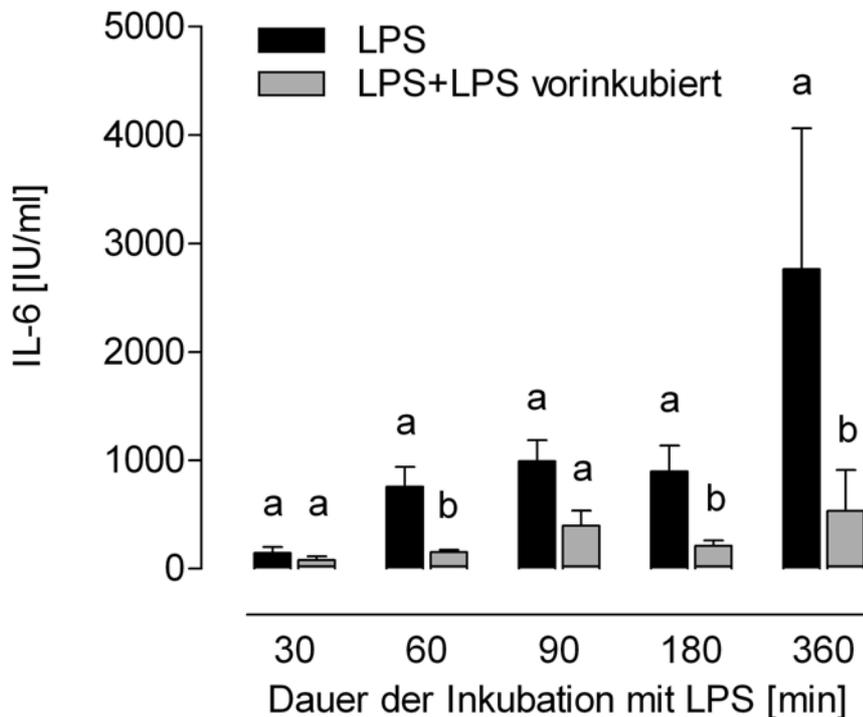


Abbildung 39: Im Durchschnitt gemessene IL-6-Konzentrationen im Überstand der AP Zellkultur nach akuter LPS-Stimulation für bestimmte Zeitintervalle. Dabei zeigt die jeweils rechte der beiden Säulen AP Zellkulturen, die für 18 Stunden mit LPS (10 μ g/ml) vorinkubiert wurden, während die linke Säule AP Zellkulturen darstellt, die vorher noch keinen Kontakt zu LPS hatten. Gleiche Buchstaben über den zusammen gehörigen Säulen bedeuten, dass kein signifikanter Unterschied der IL-6-Werte vorlag. Unterschiedliche Buchstaben stehen für statistisch signifikante Unterschiede zu den jeweiligen Zeitpunkten. Der Standard-Error ist als T-Balken über den Säulen sichtbar.

3.5. Der Einfluss von Zytokinen auf die $[Ca^{2+}]_i$ von Zellen der AP

In den nächsten Versuchsreihen wurde der direkte Einfluss von Zytokinen auf die $[Ca^{2+}]_i$ von Zellen der AP Kultur untersucht. Da es sich bei TNF- α und IL-1 β um die „Leitzytokine“ der LPS-induzierten Zytokinkaskade handelt, wurde die Reaktivität der AP Zellen gegenüber diesen beiden Zytokinen getestet.

3.5.1. TNF- α

Die TNF- α -Applikation in diesem Versuch erfolgte ausschließlich als Bolus-Zugabe. Hierbei wurden 100 μ l der TNF- α -Stocklösung in die Messkammer des Ca^{2+} -Imaging-Systems gegeben, so dass sich dort eine Konzentration von 4 μ g TNF- α /ml Messpuffer einstellte. Diese Konzentration wurde in zahlreichen Vorversuchen zur Dosisabhängigkeit von TNF- α im Kalzium-Imaging im Rahmen dieser Arbeit ermittelt.

Nach Stimulation mit TNF- α antworteten 7 von 88 Neuronen (8%), 19 von 253 Astrozyten (7,5%), 6 von 207 Mikrogliazellen, aber keiner der 43 Oligodendrozyten auf den TNF- α -Stimulus (Abbildung 40A).

Die Reaktionen hatten eine durchschnittliche Ratioänderung von $0,5 \pm 0,13$ für Neurone; $0,38 \pm 0,05$ für Astrozyten und $0,27 \pm 0,09$ für Mikrogliazellen, was in Abbildung 40B dargestellt ist.

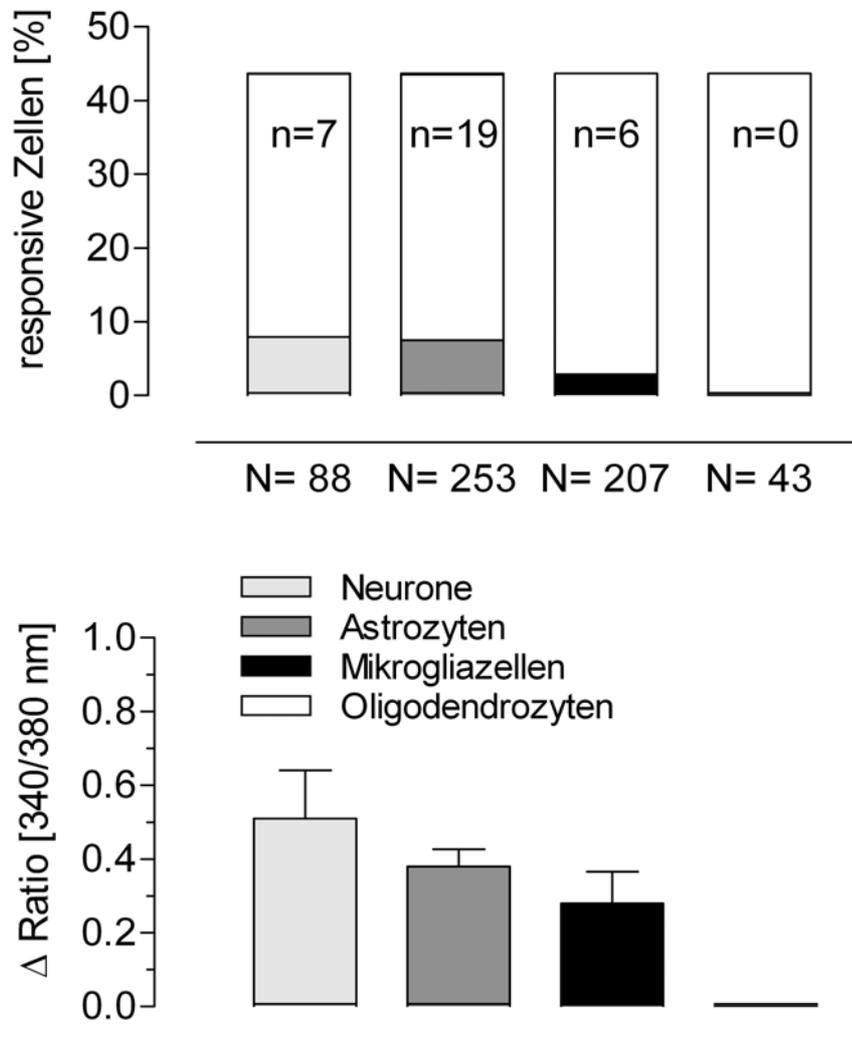


Abbildung 40: Reaktion der AP Zellkultur auf $\text{TNF-}\alpha$ (4 $\mu\text{g/ml}$).

- A) prozentualer Anteil der Neurone, Astrozyten, Mikrogliazellen und Oligodendrozyten, die mit einer Ratio-Erhöhung auf $\text{TNF-}\alpha$ -Applikation reagierten, N=Anzahl der untersuchten Zellen, n=Anzahl der responsiven Zellen
- B) durchschnittliche Erhöhung der 340/380 nm Fluoreszenz Ratio der reagierenden Zellen als arithmetischer Mittelwert und S.E.M.

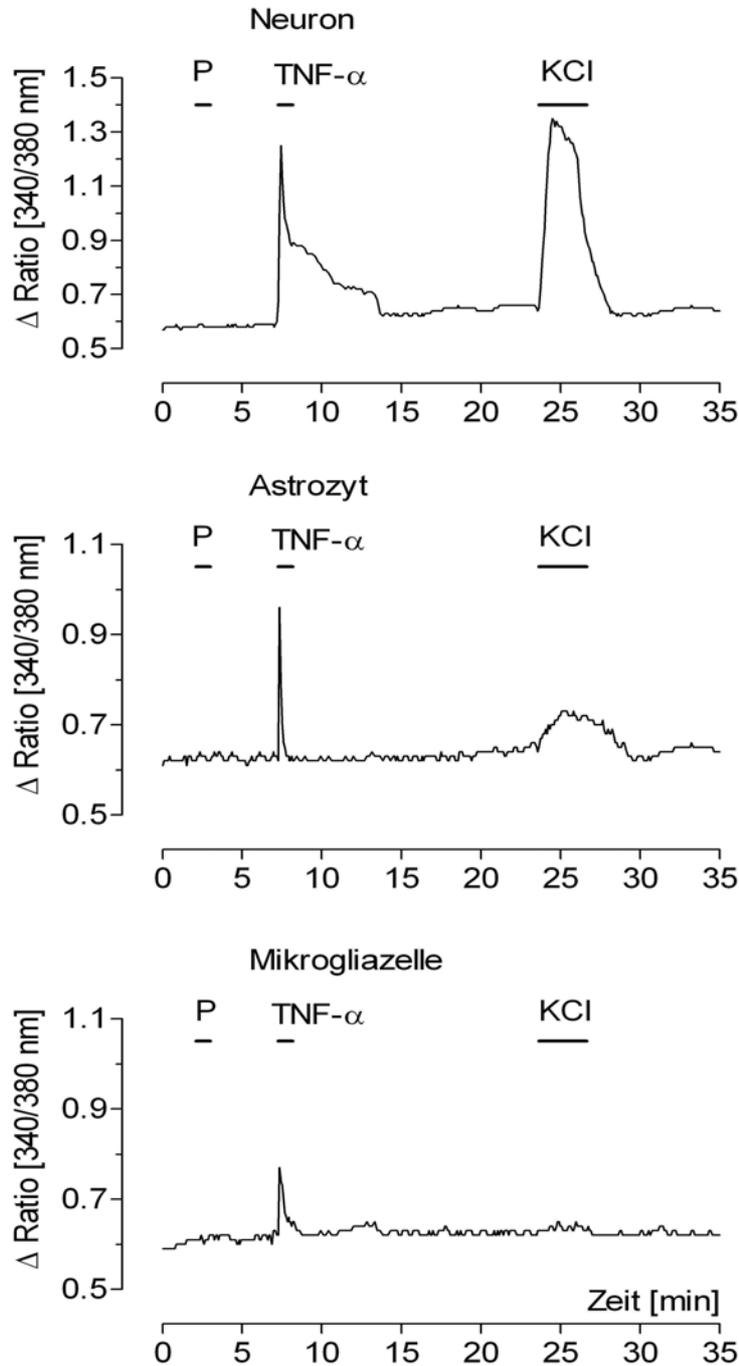


Abbildung 41: Die Abbildung zeigt Beispiele für die 340/380 nm Ratio Signale in den TNF- α -responsiven Zelltypen der AP. Auf die Boluskontrolle mit Puffer (P) folgte jeweils kein Signal. Auf den TNF- α -Stimulus reagierten Neurone mit einem unterschiedlichen Verlauf ihrer Δ Ratio-Kurve, verglichen mit dem der Astrozyten und Mikrogliazellen. Die Ratio-Erhöhung auf den KCl-Stimulus am Ende war bei Neuronen besonders hoch, bei Astrozyten im Durchschnitt moderat oder kaum vorhanden. Keine der untersuchten Mikrogliazellen reagierte auf KCl im Kalzium-Imaging.

Auf eine vorausgegangene Bolus-Applikation von 100 μl Messpuffer reagierte keine der untersuchten Zellen mit einer Veränderung ihrer $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Änderungen der ΔRatio äußerten sich bei den Neuronen als steiler Anstieg gefolgt von einem leichten Abfall auf ein Plateau, bevor die Kurve wieder zur Basis zurückkehrte. Bei Astrozyten und Mikrogliazellen war ein schneller steiler Anstieg und ebenso plötzlicher Abfall zur Baseline, was man als Ca^{2+} -Peak bezeichnen kann, zu beobachten (Abbildung 41). Neurone zeigten eine deutliche Responsivität gegenüber der KCl-Applikation als Kriterium für die Vitalität der Zellen, während Astrozyten nur moderat und Mikrogliazellen so gut wie nicht darauf reagierten.

3.5.2. IL-1 β

Auch IL-1 β wurde als 100 μl -Bolus in die Messkammer appliziert, so dass sich dort eine Endkonzentration von 4 μg IL-1 β / ml Messpuffer einstellte. Diese Konzentration wurde ebenfalls anhand eigener Vorversuche ermittelt.

Die Stimulation mit IL-1 β führte bei 14 von 101 Neuronen (14%), 16 von 243 Astrozyten (6,6%), 15 von 200 Mikrogliazellen (7,5%) und 4 von insgesamt 48 Oligodendrozyten (8,3%) zu einer Erhöhung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (Abbildung 42A).

Der arithmetische Mittelwert (\pm S.E.M.) der Ratioänderung betrug $0,45 \pm 0,06$ für Neurone; $0,5 \pm 0,07$ für Astrozyten; $0,21 \pm 0,03$ für Mikrogliazellen und $0,67 \pm 0,18$ für Oligodendrozyten (Abbildung 42B).

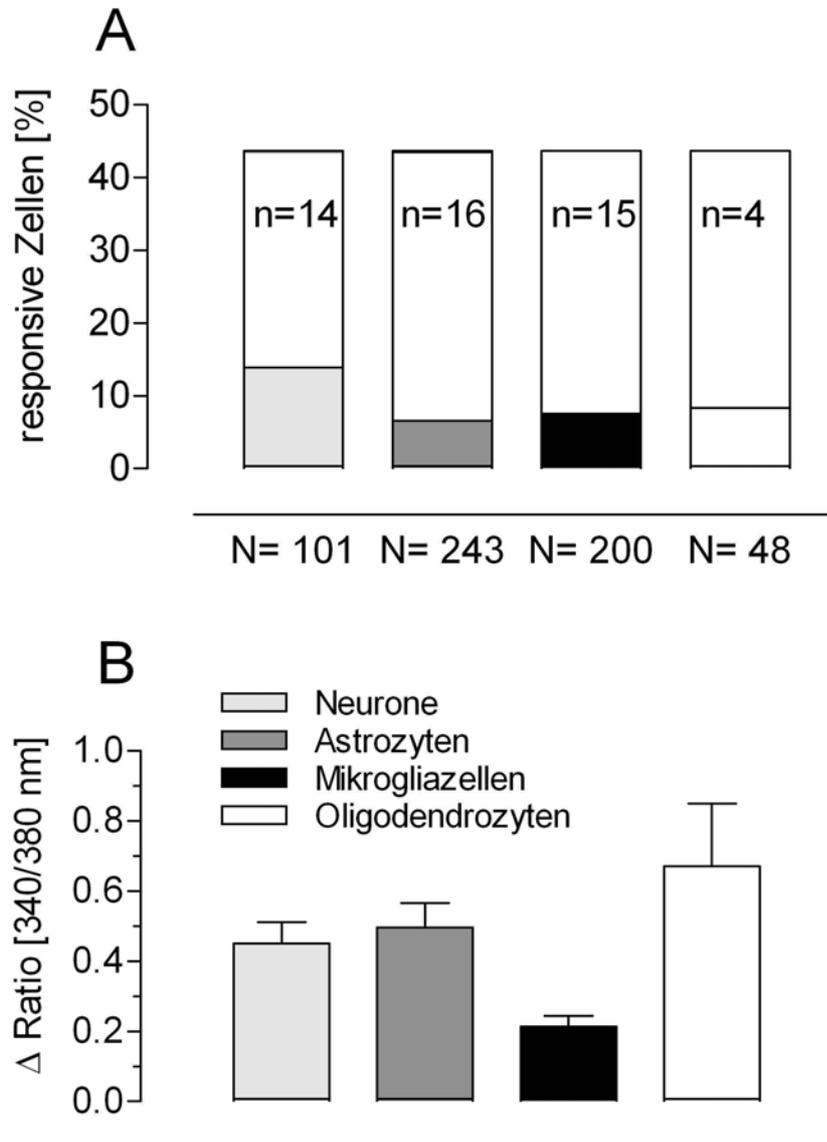


Abbildung 42: Das Diagramm zeigt, dass alle 4 Zelltypen auf eine IL-1 β -Applikation mit Erhöhung ihrer [Ca²⁺]_i reagierten.

- A) prozentualer Anteil der Zellen, die mit einer Änderung ihrer 340/380 nm Ratio auf den IL-1 β -Stimulus reagierten; N=Anzahl der untersuchten Zellen; n=Anzahl der reaktiven Zellen
- B) durchschnittliche Erhöhung der 340/380 nm Fluoreszenz Ratio der reagierenden Zellen als arithmetischer Mittelwert und S.E.M.

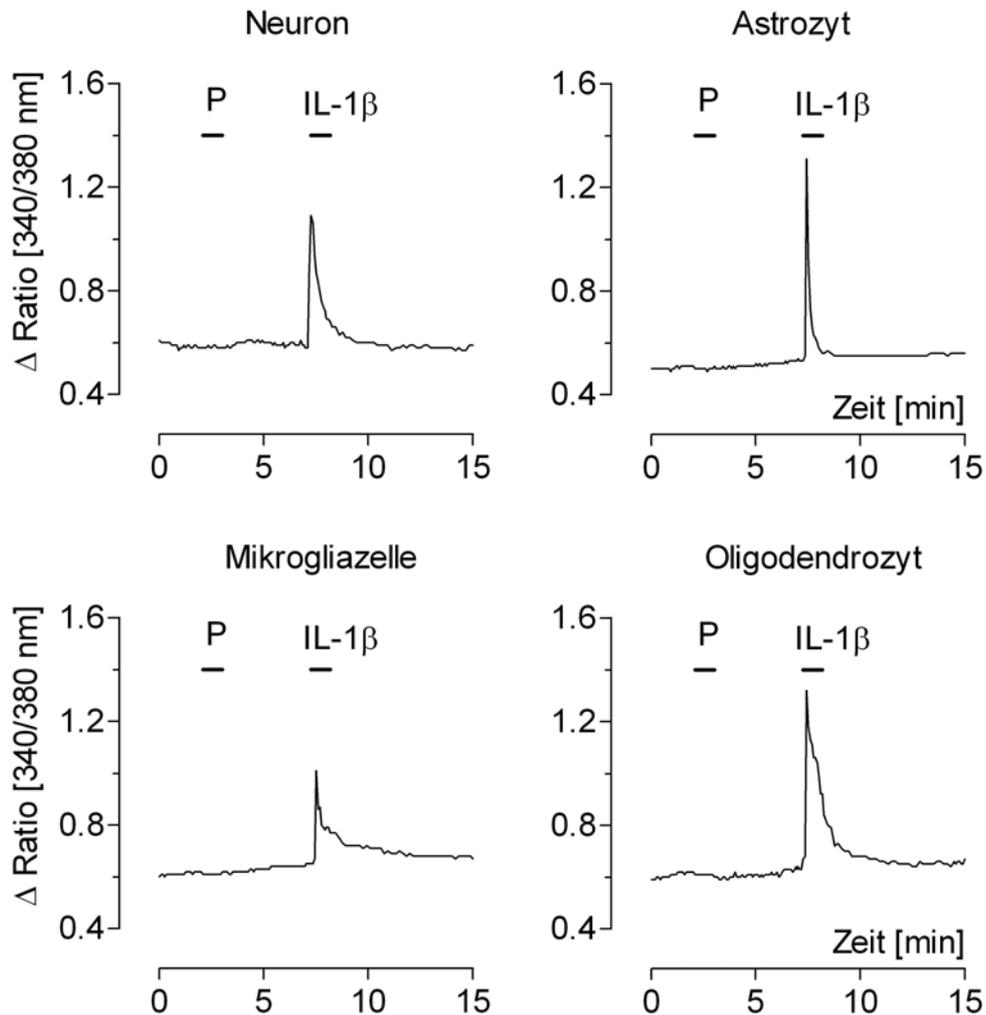


Abbildung 43: Hier dargestellt werden typische Reaktionsbeispiele der verschiedenen Zelltypen der AP nach Stimulation mit IL-1 β (4 μ g/ml) für 60 Sekunden im Kalzium-imaging.

Die Kalzium-Signale aller Zelltypen der AP nach Stimulation mit IL-1 β waren charakterisiert durch einen sofortigen steilen Anstieg der Δ Ratio-Kurve auf einen Maximalwert (Peak) und einen anschließenden raschen Abfall zurück auf die Basallinie (Abbildung 43).

Eine zu Beginn des Versuch durchgeführte Boluskontrolle mit Messpuffer (P) blieb bei allen untersuchten Zellen ohne Einfluss auf die 340/380 nm Ratio.

3.6. Der Einfluss von NO (Stickstoff-Monoxid) auf die $[Ca^{2+}]_i$ von Zellen der AP

Da es sich bei NO um einen potentiellen sekundären Mediator von PAMPs oder Zytokinen handelt, sollte in den folgenden Versuchen untersucht werden, ob diese Substanz einen Einfluss auf die $[Ca^{2+}]_i$ einer primären Zellkultur der *Area postrema* hat.

Des Weiteren sollte immunzytologisch untersucht werden, ob und welche Zelltypen innerhalb der AP, eine der zur NO-Bildung notwendigen NO-Synthasen (NOS) besitzen. In der vorliegenden Arbeit wurden dazu spezifische Primärantikörper gegen die neuronale NOS (nNOS) und die induzierbare NOS (iNOS) verwendet. Die endotheliale NOS blieb unberücksichtigt, da in der eingesetzten Primärkultur keine Endothelzellen vorlagen.

3.6.1. Immunzytochemischer Nachweis von iNOS und nNOS in Zellen der AP-Zellkultur

In der ersten Versuchsserie sollte ermittelt werden, ob Mikrogliazellen einer AP Zellkultur nach LPS-Stimulation für 360 Minuten die induzierbare NOS (iNOS) exprimieren, und somit in der Lage sind, NO zu bilden. Hierzu wurde ein iNOS-spezifischer Antikörper eingesetzt. Die Mikrogliazellen wurden mit dem Primärantikörper ED-1 und alle Zellkerne mit DAPI detektiert. Parallel dazu wurden zwei nichtstimulierte AP Kulturen nach dem gleichen immunzytochemischen Protokoll behandelt.

Wie in Abbildung 44 gut zu erkennen ist, zeigten Mikrogliazellen der AP nach Stimulation mit LPS eine ausgeprägte Expression von iNOS-Signalen. In der Dreifachmarkierung ist deutlich zu sehen, dass diese Signale (A+C) über die gesamte Zelle verteilt im Zytoplasma zu lokalisieren sind (C).

Die Mikrogliazellen einer nichtstimulierten AP Zellkultur zeigten hingegen nur eine sehr schwache Immunreaktivität gegenüber iNOS (D+F).

Zum Nachweis der neuronalen NOS (nNOS) wurde ebenfalls ein spezifischer nNOS-Antikörper verwendet. Als neuronaler Marker diente MAP2a+b und die Zellkerne wurden wieder mit DAPI sichtbar gemacht. Eine Stimulierung mit exogenen Pyrogenen zum Nachweis der nNOS war nicht notwendig, da sie in nitrergen Neuronen konstitutiv exprimiert wird (Gath *et al.*, 1999).

In der vorliegenden Versuchsreihe konnten in der AP Zellkultur eine Reihe von nNOS-positiven Neuronen detektiert werden (Abbildung 44G-I). Bezogen auf die Gesamtzahl der Neurone einer Kultur machten diese nitrergen Neurone jedoch nur einen moderaten Anteil (ca.10% der Neurone) aus. Die nNOS stellt sich im Immunfluoreszenzbild verteilt über den gesamten Zellkörper des Neurons dar (Abbildung 44 G). Eine nukleäre Kolo-kalisation ist nur sehr schwach ausgeprägt (Abbildung 44 I).

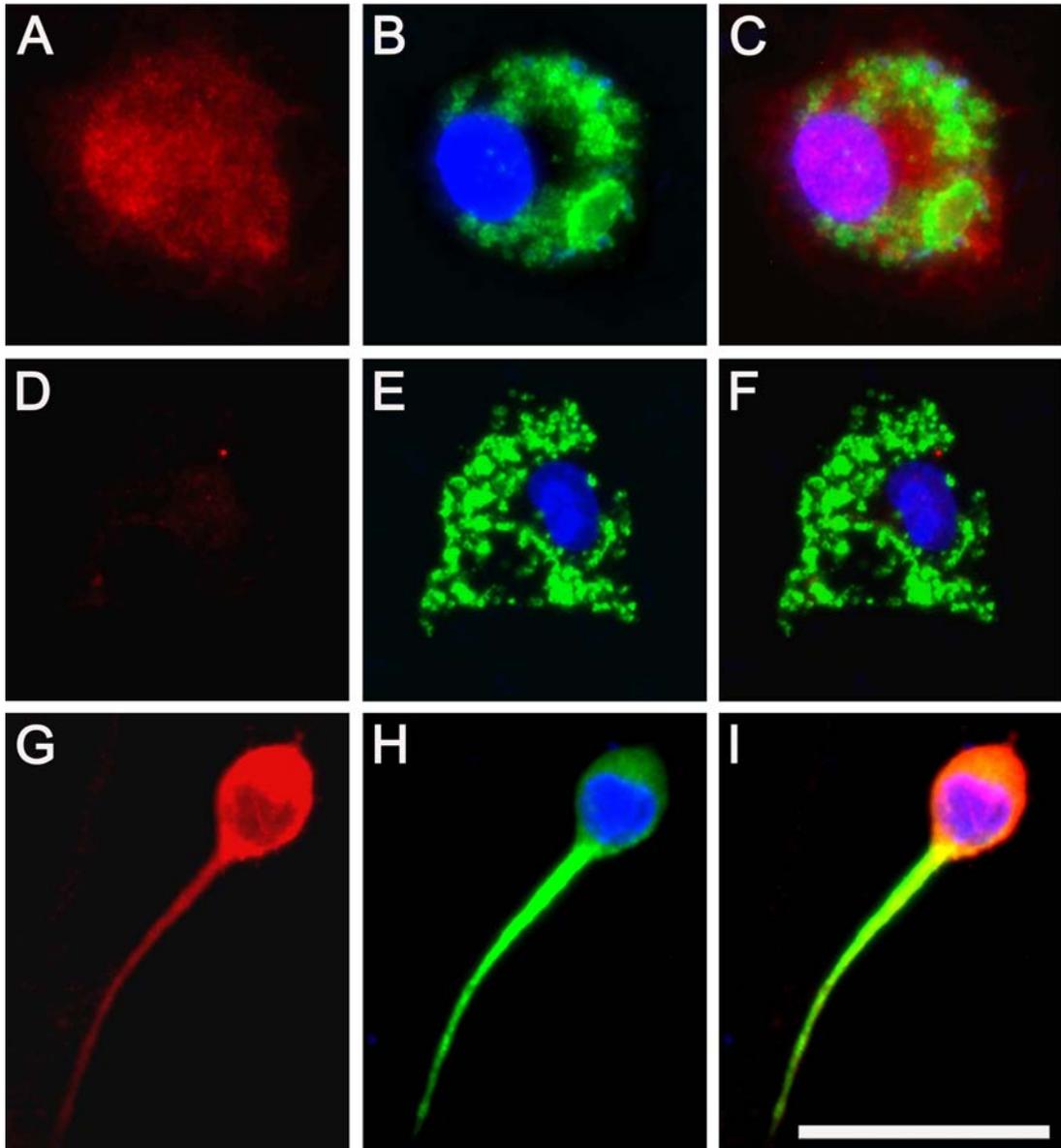


Abbildung 44: Immunzytochemischer Nachweis von iNOS in Mikrogliazellen und nNOS in Neuronen einer primären Zellkultur der AP.

In der linken Spalte ist jeweils das iNOS-Signal (A+D) und das nNOS-Signal (G) rot dargestellt. Die mittlere Spalte zeigt die zellspezifischen Marker ED-1 für Mikrogliazellen (B+E) und MAP2a+b (H) grün überlagert mit DAPI, das die Zellkerne blau markiert. A-C zeigt eine Mikrogliazelle, die für 360 Minuten mit LPS inkubiert wurde, während D-F eine unstimulierte Mikrogliazelle zeigen.

Die rechte Spalte zeigt eine Überlagerung von allen drei Signalen iNOS (C,F) und nNOS (I) (rote Signale), ED-1 und MAP2a+b (grüne Signale) und DAPI (blaue Signale). Eichbalken = 25 μm .

3.6.2. Effekt des NO-Donors DEA auf die $[Ca^{2+}]_i$ von Zellen der AP

Um zu untersuchen, welchen Effekt NO auf die Zellen der AP bezogen auf Veränderungen von $[Ca^{2+}]_i$ hat, wurde eine DEA-Stocklösung als Bolus-Applikation in Messkammer gegeben, so dass dort eine Endkonzentration von 1 mM entstand. Diese Konzentration wurde in Anlehnung an andere Arbeiten aus unserer Arbeitsgruppe (Nobel, 2004) und publizierte Studien anderer Gruppen (Feil *et al.*, 2002) festgelegt.

Nach Stimulation mit DEA reagierten 14 der insgesamt 84 Neurone (16,7%), 35 der 154 Astrozyten (22,7%), 21 der 201 Mikrogliazellen (10,3%) und 13 der 58 untersuchten Oligodendrozyten (22,4%) mit einer Erhöhung der Δ Ratio (Abbildung 45A).

Die 340/380 Fluoreszenz Ratio erhöhte sich dabei im arithmetischen Mittel (\pm S.E.M.) um $0,36 \pm 0,1$ bei den Neuronen; $0,36 \pm 0,06$ bei den Astrozyten; $0,23 \pm 0,02$ bei den Mikrogliazellen und $0,18 \pm 0,04$ bei den Oligodendrozyten (Abbildung 45B).

Neurone und Mikrogliazellen antworteten auf den DEA-Stimulus überwiegend mit einer steil ansteigenden und direkt wieder steil abfallenden Δ Ratio-Kurve (Abbildung 46). Im Gegensatz dazu stieg das Signal der Astrozyten zwar ebenfalls steil an, fiel dann aber auf ein Plateau ab, welches auch für eine gewisse Zeit andauerte, bevor die Imaging-Kurve wieder langsam zur Basallinie zurückkehrte. Oligodendrozyten reagierten mit einem langsam ansteigenden und ebenso langsam wieder absteigenden Signal auf eine Stimulation mit DEA (Abbildung 46).

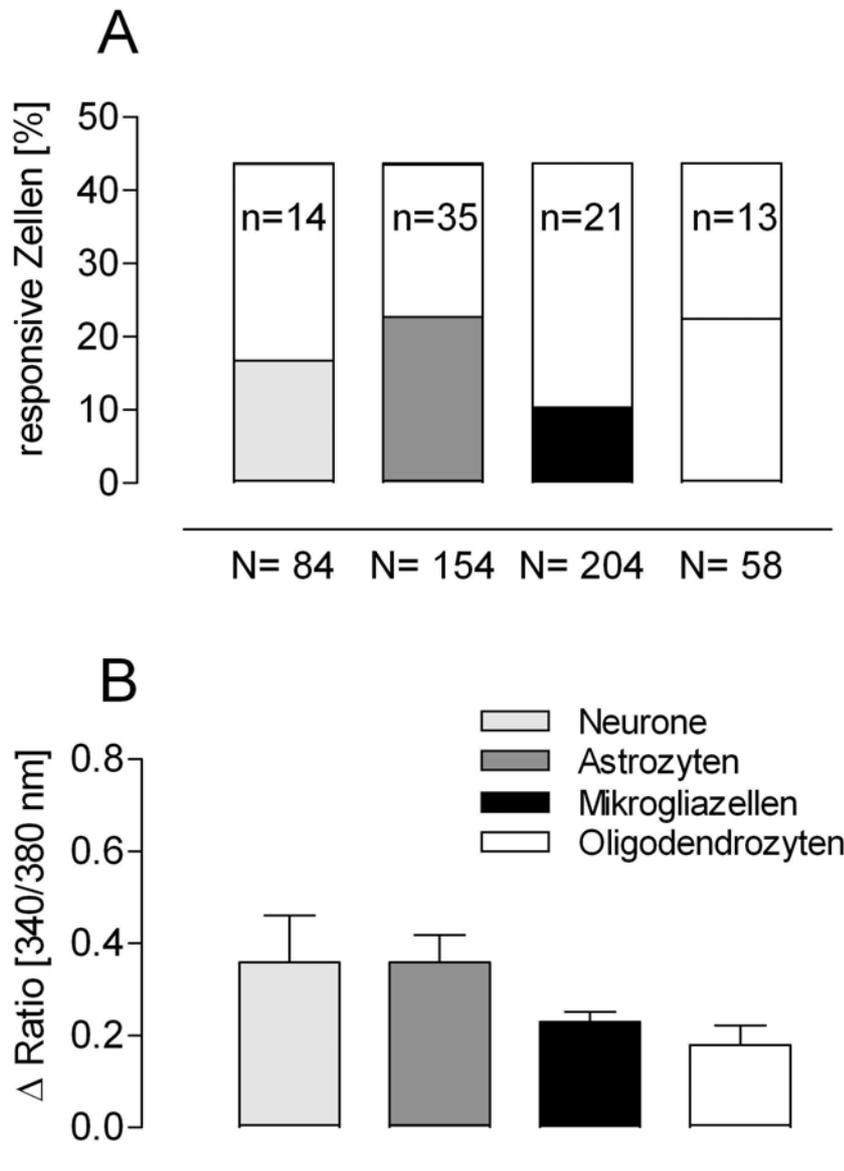


Abbildung 45: Stimulation einer AP Zellkultur mit DEA (1mM) im Kalzium-Imaging für 60 Sekunden.

- A) prozentualer Anteil der Zellen, die mit einer Änderung ihrer 340/380 nm Ratio auf den NO-Donor DEA reagierten; N=Anzahl der untersuchten Zellen; n=Anzahl der responsiven Zellen
- B) durchschnittliche Erhöhung der 340/380 nm Fluoreszenz Ratio der reagierenden Zellen als arithmetischer Mittelwert und S.E.M.

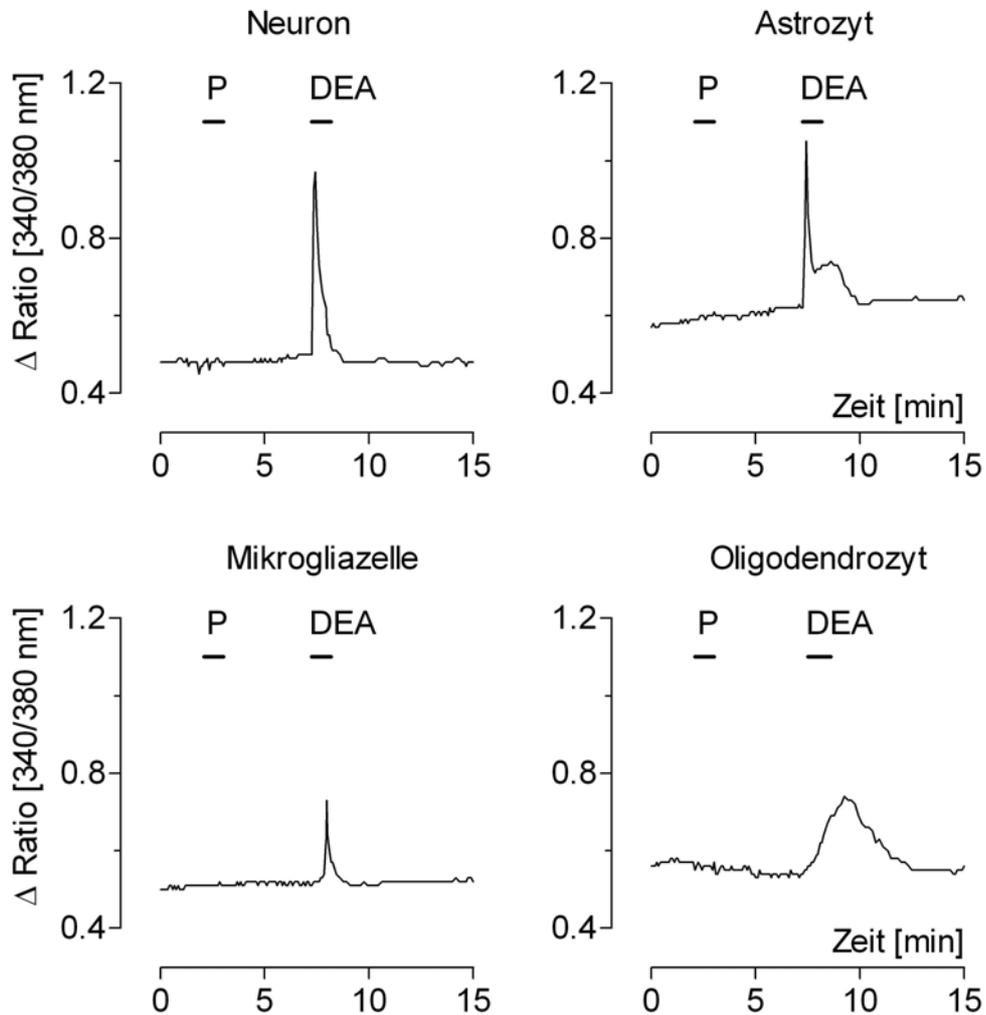


Abbildung 46: Reaktionsbeispiele für die Veränderungen der Δ Ratio einzelner AP Zelltypen nach Stimulation mit DEA. Während Neurone und Mikrogliazellen mit einem steilen Anstieg und ebenso raschem Abfall der Imaging-Kurve reagierten, kam es bei Astrozyten nach dem initialen Peak zu einer Plateaubildung, und bei Oligodendrozyten zu einem langsamen Anstieg des Kurvenverlaufs, der ebenso langsam wieder zur Ausgangslinie zurückkehrte.

4. Diskussion

Die Ergebnisse aus dem vorherigen Kapitel (siehe: Kapitel 3) lassen sich wie folgt zusammenfassen und sollen anschließend in dieser Abfolge diskutiert werden:

- LPS induziert eine Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ in 10-15% der Mikrogliazellen, 4% der Neurone und 2,5% der Astrozyten der AP (siehe: Kapitel 4.1.1).
- MDP und FSL-1 führen zu keiner nennenswerten Veränderung der $[Ca^{2+}]_i$ in Zellen der AP (siehe: Kapitel 4.1.2).
- PI:PC induziert eine Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ in 8% der Neurone und 2% der Astrozyten der AP (siehe: Kapitel 4.1.3).
- Die PAMPs LPS, FSL-1 und PI:PC induzieren eine Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen (TNF- α , IL-6) aus einer primären Zellkultur der AP (siehe: Kapitel 4.2.1).
- LPS induziert die Bildung von TNF- α und dessen Speicherung im „Trans-Golgi-Komplex“ in Mikrogliazellen der AP Zellkultur (siehe: Kapitel 4.2.2).
- Eine 18-stündige Vorinkubation der AP Zellkultur mit LPS führt zur Ausbildung einer Toleranz gegenüber akuter Stimulation mit LPS, während die Entwicklung einer Kreuztoleranz zwischen LPS, MDP und FSL-1 nicht beobachtet werden konnte (siehe: Kapitel 4.3).
- TNF- α induziert eine Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ in jeweils 8% der Neurone und Astrozyten und 3% der Mikrogliazellen der AP (siehe: Kapitel 4.4.1).

- IL-1 β induziert eine Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ in 14% der Neurone, in fast 7% der Astrozyten sowie in 8% der Mikrogliazellen und Oligodendrozyten (siehe: Kapitel 4.4.2).
- Der NO-Donor DEA induziert eine Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ in 17% der Neurone, 23% der Astrozyten und Oligodendrozyten, sowie 10% der Mikrogliazellen (siehe: Kapitel 4.5.1) der AP.
- LPS induziert in Astrozyten und Mikrogliazellen der AP die iNOS und ca. 10% der Neurone der AP exprimieren konstitutiv die nNOS (siehe: Kapitel 4.5.2).

4.1. Zellen der AP als potentielle Sensoren für zirkulierende PAMP's

Eine der wohl wichtigsten Entdeckungen der neuroimmunologischen Forschung der letzten Jahre war die Entdeckung der TLRs. Diese Rezeptorfamilie dient dem angeborenen Immunsystem zur Erkennung sog. „Pathogen-assoziiertes Moleküle“ (PAMPs), die Bestandteil einer ganzen Reihe von Mikroorganismen und Pilzen sind (Kopp & Medzhitov, 2003). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden zur spezifischen Stimulierung der TLRs bestimmte PAMPs verwendet. Im Speziellen handelte es sich dabei um den TLR-4-Agonisten LPS (Chow *et al.*, 1999), den TLR-2-Agonisten MDP (Takeuchi *et al.*, 1999), den Agonisten des TLR-2/6-Heterodimers FSL-1 (Okusawa *et al.*, 2004) und den TLR-3-Agonisten PI:PC (Alexopoulou *et al.*, 2001).

Von zentraler Bedeutung für diese Arbeit ist die Tatsache, dass TLR-2, TLR-3, TLR-4 und TLR-6 konstitutiv in den sCVOs und somit auch in der AP exprimiert und unter inflammatorischen Bedingungen sogar hochreguliert werden (Laflamme & Rivest, 2001; Laflamme *et al.*, 2001; Olson & Miller, 2004). Da die AP nur eine unvollständige Blut-Hirn-Schranke besitzt, kann man vermuten, dass im Blutkreislauf zirkulierende PAMPs direkt in diese spezialisierte Gehirnstruktur gelangen und dort eine Aktivierung des jeweiligen TLRs auslösen könnten.

4.1.1. LPS induziert eine Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ in Zellen der AP

Um zu untersuchen, ob LPS eine direkte Aktivierung von Zellen einer primären AP Zellkultur auslösen kann, wurde in dieser Arbeit die Methode des Kalzium-Imagings genutzt. Dazu wurde die $[Ca^{2+}]_i$ der mit dem Fluoreszenzfarbstoff Fura-2 beladenen Zellen kontinuierlich gemessen und mit Hilfe eines Computerprogramms dokumentiert (Jurzak *et al.*, 1995b; Gebke *et al.*, 1998). Hierbei wurden LPS-induzierte Ca^{2+} -Signale in Zellen der AP Zellkultur als Marker für eine direkte Zellaktivierung gewertet. Anschließend konnten die im Ca^{2+} -Imaging gemessenen Zellen unter Verwendung der Immunzytochemie mit

zellspezifischen Antikörpern detektiert und so letztendlich einem speziellen Zelltyp zugeordnet werden. Die genaue Lokalisation der einzelnen Zellen war über eine Art Koordinatensystem auf dem Boden des Zellkulturgefäßes gewährleistet. Tatsächlich konnte mit diesem Versuch gezeigt werden, dass speziell eine Population von 10-15% der Mikrogliazellen der AP mit einer Erhöhung ihrer $[Ca^{2+}]_i$ auf den vorausgegangenen LPS-Stimulus reagierten. Obwohl die physiologische Relevanz dieses Ergebnisses noch aufzuklären bleibt, zeigt der Befund jedoch deutlich, dass zirkulierendes LPS von einer spezifischen Population von AP Zellen innerhalb weniger Sekunden nach seinem Auftreten im Organismus erkannt werden kann. Es ist anzunehmen, dass dieser direkten immunologischen Antwort der AP, die durch eine unvollständige BHS gekennzeichnet ist, eine Bedeutung in der Manifestation von zentralnervös kontrollierten Krankheitssymptomen (siehe: Kapitel 1) als Reaktion auf zirkulierende PAMPs zukommt. Wenngleich verschiedene Autoren argumentieren, dass die LPS-induzierte zentralnervös kontrollierte Immunantwort, die sich in Fieber (Li *et al.*, 2006b) und einer Aktivierung der HPAA (Givalois *et al.*, 1994) äußert, von einer vorausgehenden Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen ins Blut induziert wird, so stellen die im Rahmen dieser Arbeit erhobenen Daten diese Theorie in Frage. Das klassische Konzept, dass LPS in der Peripherie eine Bildung und Freisetzung proinflammatorischer Zytokine induziert, die dann ihrerseits über die CVOs das Gehirn aktivieren und somit Fieber und andere Symptome des „sickness behavior“ auslösen, ist also zu überdenken und noch zu erweitern (Blatteis, 2006). Die Ergebnisse dieser Arbeit sind hingegen ein Beweis dafür, dass LPS direkt mit Bereichen des Gehirns interagieren kann, die wie die AP, eine offene BHS besitzen. Diese Tatsache könnte man somit als Erweiterung der humoralen Fieberhypothese (siehe: Kapitel 1.1.1) ansehen (Roth *et al.*, 2004). An dieser Stelle ist es nicht verwunderlich, dass gerade die Mikrogliazellen diejenige Zellpopulation der AP darstellen, die prozentual am häufigsten auf LPS reagiert. Als die residenten Makrophagen des ZNS stellen sie den wahrscheinlich wichtigsten Zelltyp im Rahmen einer Immunantwort gegenüber eindringenden Pathogenen dar (Hanisch & Kettenmann, 2007). Ein weiteres Indiz dafür ist, dass Mikrogliazellen eine ganze Reihe von TLRs (TLR1-9)

exprimieren (Bsibsi *et al.*, 2002; Olson & Miller, 2004). Außerdem können sie als Reaktion auf bestimmte PAMPs proinflammatorische Zytokine und sekundäre Botenstoffe wie NO freisetzen, worauf aber in einem späteren Kapitel noch eingegangen werden soll. Ein Zusammenhang zwischen LPS-abhängiger Aktivierung des TLR-4 und einer Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ in Mikrogliazellen wurde bereits 1994 von Bader *et al.* gezeigt. Diese Arbeitsgruppe postulierte, dass LPS in Mikrogliazellen eine Freisetzung von Ca^{2+} aus Koffein-abhängigen intrazellulären Speichern induziert (Bader *et al.*, 1994). Zudem konnte im Rahmen der gleichen Studie gezeigt werden, dass LPS ebenfalls den IP_3 -abhängigen Signalweg zur Aktivierung intrazellulärer Ca^{2+} -Speicher auslöst, der jedoch verglichen mit dem erstgenannten eine quantitativ eher untergeordnete Bedeutung hat. Erst kürzlich erschienene Studien beschreiben zudem einen Zusammenhang zwischen LPS-induzierter Aktivierung von Mikrogliazellen und einer einhergehenden Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$. Hierbei soll LPS in Mikrogliazellen eine Aktivierung des Enzyms CD38 bewirken, was wiederum die zyklische ADP-Ribose stimuliert, die als Ca^{2+} -aktivierender Botenstoff agiert. Diese aktiviert dabei Ca^{2+} aus intrazellulären Speichern, was letztendlich zu einer Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ führt (Franco *et al.*, 2006; Mayo *et al.*, 2008). Der eben beschriebene Signalweg soll außerdem an der Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen aus Mikrogliazellen beteiligt sein. Zusammenfassend sprechen diese Fakten dafür, dass insbesondere die Mikrogliazellen der AP als Sensor für den TLR-4-Agonisten LPS agieren, und dass dabei Ca^{2+} als intrazellulärer Botenstoff beteiligt ist.

4.1.2. MDP und FSL-1 führen zu keiner nennenswerten Veränderung der $[Ca^{2+}]_i$ in Zellen der AP

Im Anschluss an die vorher beschriebenen Versuche mit dem TLR-4-Agonisten LPS sollte untersucht werden, ob der TLR-2 Agonist MDP und der TLR-2/6-Agonist FSL-1 ebenfalls zu einer Aktivierung von kultivierten AP Zellen führt. Auch dazu wurde die $[Ca^{2+}]_i$ der AP Zellen im Ratio-Imaging-Versuch gemessen und die Zellen anschließend in der Immunzytochemie typisiert. Bei

der Stimulation der AP Zellkultur mit MDP reagierten lediglich einige der Neurone und Astrozyten, aber keine der untersuchten Mikrogliazellen und keiner der Oligodendrozyten. Ging man zunächst davon aus, dass der TLR-2 konstitutiv von Zellen der AP exprimiert wird (Laflamme *et al.*, 2001; Olson & Miller, 2004), so kam dieses Resultat doch relativ unerwartet. Eine mögliche Ursache für diesen Befund könnte darin begründet liegen, dass bisher nur sehr wenige Autoren eine MDP-abhängige Aktivierung des TLR-2 beschreiben (Yang *et al.*, 2001), während eine ganze Reihe von Arbeitsgruppen eine PGN-induzierte Aktivierung des TLR-2 belegen konnten (Takada *et al.*, 2002; Kielian *et al.*, 2005a; Windheim *et al.*, 2007) und eine TLR-2-Aktivierung durch MDP sogar ganz klar verneinen. Es wäre in diesem Zusammenhang durchaus denkbar, dass MDP als kleine Untereinheit des PGN, das Bestandteil der Zellmembran grampositiver Bakterien ist, nicht vom TLR-2 spezifisch erkannt werden kann. Als Rezeptoren, die in der Lage sind, MDP spezifisch zu erkennen wird in jüngeren Studien eine weitere intrazelluläre Rezeptorfamilie, die sog. „NODs“, beschrieben (Traub *et al.*, 2006; Windheim *et al.*, 2007).

Auch die Stimulation der AP Zellkultur mit FSL-1 führte zu keiner nennenswerten Aktivierung der primär kultivierten AP Zellen.

Betrachtet man nun abschließend diese Ergebnisse, so muss man feststellen, dass die Zellen der AP scheinbar nicht als Sensoren für MDP oder FSL-1 fungieren. Zumindest konnte im Rahmen dieser Arbeit keine direkte Aktivierung der AP Zellkultur in Verbindung mit einer Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ festgestellt werden. In der Literatur wurde bisher auch lediglich für LPS eine Ca^{2+} -abhängige Aktivierung seines TLR-4 beschrieben, nicht aber für MDP am TLR-2 oder für FSL-1 am TLR-2/6-Heterodimer. Es bleibt also zu vermuten dass, falls tatsächlich eine Aktivierung der AP-intrinsischen Zellen durch MDP oder FSL-1 über die dazugehörigen TLRs möglich ist, diese Ca^{2+} -unabhängig zu sein scheint.

4.1.3. PI:PC induziert eine Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ in Zellen der AP

In der vorliegenden Arbeit sollte ebenfalls untersucht werden, ob das virale PAMP PI:PC eine direkte Aktivierung der AP Zellkultur induzieren kann. Hierzu wurde, wie in den vorausgegangenen Versuchen, die $[Ca^{2+}]_i$ einzelner AP Zellen als Kriterium einer zellspezifischen Aktivierung gemessen. Auf eine Applikation von PI:PC antworteten hierbei 8% der Neurone und 2% der Astrozyten mit einem deutlichen Ca^{2+} -Signal, während Mikrogliazellen und Oligodendrozyten keine Veränderung in ihrer $[Ca^{2+}]_i$ zeigten. Anhand dieses Befundes wird deutlich, dass im Vergleich zu LPS nicht Mikrogliazellen, sondern in diesem Fall Neurone der AP in der Vermittlung inflammatorischer Signale als Antwort auf PI:PC eine Rolle spielen. Die Präsenz des TLR-3 wird sowohl auf Neuronen (Prehaud *et al.*, 2005), als auch glialen Zellen wie Astrozyten (Bsibsi *et al.*, 2002; Farina *et al.*, 2005), Mikrogliazellen (Olson & Miller, 2004) und Oligodendrozyten (Bsibsi *et al.*, 2002) beschrieben. Das bedeutet, dass die Grundvoraussetzung zur Erkennung des PI:PC für alle vier Zelltypen gegeben sein müsste, da der TLR-3 spezifisch PI:PC erkennt (Alexopoulou *et al.*, 2001). Dennoch wird den Astrozyten eine zentrale Bedeutung im Rahmen einer neuroimmunologischen Antwort auf PI:PC zugesprochen (Farina *et al.*, 2005; Kielian, 2006). Dieser Theorie liegt vor allem die Tatsache zu Grunde, dass Astrozyten nach Stimulation mit PI:PC in der Lage sind, proinflammatorische Zytokine wie TNF- α und IL-6 freizusetzen (Farina *et al.*, 2005). Eine weitere Arbeitsgruppe postulierte außerdem, dass nach systemischer Applikation von PI:PC bei Meerschweinchen eine vermehrte Expression des Transkriptionsfaktors STAT3 in Astrozyten, nicht aber Neuronen der AP nachzuweisen war (Voss *et al.*, 2007). STAT3 dient als Marker für inflammatorische Aktivierung und seine Bildung wird vor allem durch IL-6 induziert. Vorausgegangen Studien zufolge war also eine Aktivierung der Astrozyten der AP Zellkultur durch PI:PC zu erwarten. Völlig neu ist hingegen die Tatsache, dass im Rahmen der Versuche dieser Arbeit gezeigt werden konnte, dass Neurone diejenige Population der AP Zellen darstellt, die neben den Astrozyten als einzige und prozentual gesehen sogar am höchsten, auf den TLR-3-Agonisten PI:PC reagiert. Die physiologische Relevanz dieses Befundes bleibt jedoch zunächst offen.

4.2. Zirkulierende PAMPs induzieren eine Freisetzung von Zytokinen (TNF- α , IL-6) aus einer primären Zellkultur der AP

4.2.1. Die Messung von TNF- α und IL-6 im Überstand der AP Zellkultur nach Stimulation mit LPS, FSL-1 oder PI:PC

Eine wichtige Reaktion des Organismus im Rahmen systemischer Infektionsprozesse, insbesondere in Verbindung mit LPS ist die Ausschüttung von proinflammatorischen Zytokinen wie TNF- α , IL-1 β und IL-6. Diese sind nach Injektion von LPS nicht nur im Blutplasma messbar (Jansky *et al.*, 1995), sondern werden auch in den sCVOs und anderen Gehirnstrukturen bereits während der ersten Phase des LPS-induzierten Fiebers exprimiert (Breder *et al.*, 1994; Laye *et al.*, 1994). Bisher ging man theoretisch davon aus, dass LPS in der Körperperipherie über eine Aktivierung des TLR-4 auf Zellen des angeborenen Immunsystems eine nachgeschaltete Signalkaskade in Gang setzt und so eine Freisetzung von NF κ B bewirkt. Die Aktivierung dieses Transkriptionsfaktors führt wiederum zu einer Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen, die als inflammatorische Mediatoren eine Zytokin-freisetzung im Gehirn induzieren (Dantzer, 2001; Churchill *et al.*, 2006). Daher war es ein weiteres Ziel dieser Arbeit zu untersuchen, ob es möglich ist, messbare Konzentrationen von bioaktivem TNF- α und IL-6 im Überstand einer primären AP Zellkultur nach Exposition mit LPS nachzuweisen. Dazu wurden die Überstände der AP Zellkultur 30, 60, 90, 180 und 360 Minuten nach LPS-Zugabe entnommen und die darin enthaltenen Zytokinkonzentrationen mit Hilfe spezifischer Bioassays quantitativ bestimmt. Bereits nach 60 Minuten LPS-Stimulation zeigte sich sowohl für TNF- α , als auch für IL-6 ein signifikant erhöhter Zytokingehalt in den stimulierten Proben, welcher bis hin zu 360 Minuten bei beiden Zytokinen weiter stark anstieg. Von der zeitlichen Abfolge des Auftretens signifikanter Zytokin-Konzentrationen korrelieren die vorliegenden Befunde ebenfalls mit bereits veröffentlichten *in vivo*-Studien, bei denen nach systemischer LPS-Applikation zunächst TNF- α im Plasma stark

ansteigt und messbare IL-6-Konzentrationen erst nach 60 Minuten auftreten (Long *et al.*, 1990; Roth *et al.*, 1993; Roth *et al.*, 1994). So war zwar nach 30 Minuten Stimulation schon IL-6 im Überstand messbar, der gemessene Wert war jedoch nicht signifikant unterschiedlich zu dem der unstimulierten Kontrolle. Dass in den Überständen der unstimulierten Kontrollen auch geringe Konzentrationen von TNF- α und IL-6 vorlagen, kann damit begründet werden, dass proinflammatorische Zytokine im ZNS in geringen Mengen konstitutiv exprimiert werden (Nakamori *et al.*, 1995; Konsman *et al.*, 1999; Vitkovic *et al.*, 2000). Im Unterschied zu den mit LPS-stimulierten Kulturen blieb die Zytokin-Konzentration im Überstand der Kontrollen über 360 Minuten hinweg jedoch immer auf einem basalen Niveau. Außerdem geht man davon aus, dass Mikrogliazellen einer Zellkultur stets ein geringes Maß an Aktivierung und somit auch die Bildung von Zytokinen aufweisen, was durch eine vorausgegangene Gewebszerstörung zustande kommt, wodurch auch bei optimalen Kultivierungsbedingungen kein absolut authentisches physiologisches Milieu erreicht werden kann (Hanisch, 2002; Farber & Kettenmann, 2005).

In vorausgegangenen Studien der eigenen Arbeitsgruppe konnte bereits gezeigt werden, dass messbare Plasmaspiegel von TNF- α und IL-6 auch durch Injektion von FSL-1 (Greis *et al.*, 2007) oder PI:PC (Voss *et al.*, 2006) induziert werden können. Im Rahmen dieser Arbeit sollte im Anschluss daran getestet werden, ob FSL-1 und PI:PC eine AP Zellkultur zur Freisetzung von Zytokinen stimulieren können. Hierbei waren nach FSL-1-Stimulation nach 60 und 90 Minuten signifikant erhöhte Konzentrationen von TNF- α und erst nach 90 Minuten eine signifikant erhöhte Konzentration von IL-6 im Zellkulturüberstand detektierbar. Bei den Stimulationsversuchen mit PI:PC wurden Stimulationszeiten von 30, 60, 90 und 120 Minuten gewählt. Die gemessenen TNF- α - und IL-6-Konzentrationen waren zu fast allen Stimulationszeitpunkten im Gegensatz zu den jeweiligen Kontrollen signifikant erhöht. Hiermit konnte gezeigt werden, dass neben dem bakteriellen PAMP LPS auch das mycoplasmale FSL-1 und das virale PI:PC eine Aktivierung von primären AP Zellen induzieren können, was eine Freisetzung von Zytokinen zur Folge hat. Vergleicht man die erreichten Zytokinspiegel von TNF- α und IL-6 im Überstand zu den jeweiligen Zeitpunkten miteinander, so scheint jedoch das LPS eine wesentlich potentere

Wirkung auf die Zytokin-Freisetzung durch AP Zellen zu besitzen im Vergleich zu FSL-1 und PI:PC, die sich in ihrer Wirkung nicht nennenswert unterscheiden.

Die beschriebenen Ergebnisse beweisen eindeutig, dass eine direkte Aktivierung von Zellen spezialisierter Gehirnstrukturen durch zirkulierende PAMPs wie LPS, FSL-1 oder PI:PC möglich ist, was als ein wichtiger Signalweg der Kommunikation zwischen Immunsystem und Gehirn betrachtet werden kann (Quan & Banks, 2007). Die vorliegenden Daten könnten eine mögliche Erklärung dafür sein, dass es bereits vor dem Auftreten messbarer Zytokin-Level im Blutplasma zur Entwicklung einer ersten LPS-induzierten Fieberphase kommt. Dabei könnten im Blut zirkulierende PAMPs wie LPS, FSL-1 oder PI:PC direkt über die fehlende BHS in die sCVOs gelangen und dort die Bildung und Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen bewirken. Die so ins ZNS freigesetzten Zytokine könnten anschließend Fieber (Dinarello *et al.*, 1986; Roth *et al.*, 1998a; Harre *et al.*, 2002) und Symptome des „sickness behaviour“ auslösen (Dantzer, 2001; Dantzer *et al.*, 2008).

4.2.2. LPS-induzierte Freisetzung von TNF- α aus Mikrogliazellen der AP

Nachdem bereits gezeigt werden konnte, dass LPS mit Zellen einer Primärkultur der AP interagiert und diese zur Expression proinflammatorischer Zytokine stimuliert, sollte im Anschluss daran geklärt werden, welcher spezielle Zelltyp für LPS-induzierte Bildung und Freisetzung von Zytokinen verantwortlich ist. Hierzu wurde unter Verwendung der Immunzytochemie ein spezifischer Ratten-TNF- α -Antikörper und weitere Antikörper gegen Zelltyp-spezifische Markerproteine eingesetzt, um TNF- α als „Leitzytokin“ in bestimmten Zellen der AP Kultur zu detektieren.

Die mit LPS stimulierten AP Kulturen zeigten eine deutliche Expression von TNF- α -positiven Signalen in Mikrogliazellen, nicht jedoch in Neuronen, Astrozyten oder Oligodendrozyten (siehe: Abbildung 29). Die unstimulierte Kontrolle zeigte zwar auch eine geringe Expression von TNF- α in

Mikrogliazellen, diese fiel aber deutlich schwächer aus. Das Auftreten schwacher TNF- α -Signale in der Kontrolle kann damit begründet werden, dass Mikrogliazellen in Kultur per se ein geringes Maß an Aktivierung aufweisen (siehe: Kapitel 4.2.1). Bei der Betrachtung einzelner Mikrogliazellen in stärkerer Vergrößerung fällt eine perinukleäre Lokalisation von TNF- α auf (siehe: Abbildung 29 C+E). Die Existenz einer zellulären Struktur, in der TNF- α gebildet und gespeichert wird, wurde bereits auch von einigen Autoren für Makrophagen beschrieben und als „Trans-Golgi-Apparat“ bezeichnet (Manderson *et al.*, 2007; Lieu *et al.*, 2008). In der vorliegenden Arbeit ist es zum ersten Mal gelungen, TNF- α innerhalb des „Trans-Golgi-Apparats“ in Mikrogliazellen zu zeigen. In einigen Mikrogliazellen befinden sich TNF- α -Signale in vesikulären Strukturen im Zytosol und ebenso im Bereich direkt unter der Zellmembran. Man könnte vermuten, dass das Zytokin über diese Vesikel in die Peripherie der Zelle kommt, um an der Membran freigesetzt zu werden. Diese Vesikel werden in der Literatur auch als „phagocytic cups“ bezeichnet, die als Vehikel zur TNF- α -Freisetzung beschrieben werden (Murray *et al.*, 2005; Manderson *et al.*, 2007). Die Beobachtung, dass Mikrogliazellen der AP zu einer LPS-induzierten TNF- α -Produktion fähig sind, geht einher mit dem Ergebnis des Kalzium-Imagings, bei dem 10-15% der Mikrogliazellen als größte responsive Zellpopulation der AP auf LPS antworteten. Zudem könnte an der LPS-induzierten Zytokinfreisetzung aus Mikrogliazellen möglicherweise Ca^{2+} als intrazellulärer Botenstoff beteiligt sein. In diesem Zusammenhang konnte gezeigt werden, dass LPS die zyklische ADP-Ribose in Mikrogliazellen aktiviert, welche daraufhin Ca^{2+} aus intrazellulären Speichern mobilisiert, was zu einer Erhöhung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ führt. Gleichzeitig wird dabei die Ausschüttung von Zytokinen wie TNF- α und IL-6 und ebenfalls von NO induziert (Franco *et al.*, 2006; Mayo *et al.*, 2008).

Die Resultate dieser Dissertationsarbeit liefern also weitere Belege dafür, dass Mikrogliazellen eine besondere Bedeutung in Verbindung mit inflammatorischen Prozessen des Gehirns besitzen. Dafür erfüllen diese spezialisierten Immunzellen einige wichtige Grundvoraussetzungen. So wird zum einen für Mikrogliazellen und Astrozyten die stärkste Expression von TLRs im Gehirn beschrieben (Kielian, 2006), zum anderen werden Mikrogliazellen außerdem als

eine der größten Quellen von Zytokinen im Gehirn bezeichnet (Hanisch, 2002; Pinteaux *et al.*, 2002; Pinteaux *et al.*, 2007), was auch in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden konnte.

4.3. Die Entwicklung einer Toleranz gegenüber Pyrogenen in einer primären AP Zellkultur

4.3.1. Die Entwicklung einer „Endotoxin-Toleranz“

Als Toleranz wird ein vorübergehendes Stadium einer verminderten oder gar vollständig unterdrückten Antwort gegenüber Pyrogenen bezeichnet. Das Phänomen der „Endotoxin-Toleranz“ wurde im Verlauf der letzten Jahre in verschiedenen *in vivo*- und *in vitro*-Modellen intensiv erforscht (Zeisberger & Roth, 1998; Cross, 2002; Fan & Cook, 2004).

Auf molekularer Ebene werden dafür insbesondere Veränderungen in der Signaltransduktion am TLR-4 in Verbindung mit seinem Liganden LPS verantwortlich gemacht. In diesem Zusammenhang konnte gezeigt werden, dass während des Stadiums einer Endotoxin-Toleranz die zur Signalübertragung nötige Tyrosin-Phosphorylierung des Adaptorproteins TIR am TLR-4 unterdrückt wird (Medvedev *et al.*, 2007). Auch weitere Proteine der TLR-4-Rezeptor-Kaskade wie IRAK, MyD88, PKC und die MAP-kinase ebenso wie die Transkriptionsfaktoren AP-1 und NFκB werden während Toleranzerscheinungen in einem geringeren Umfang exprimiert oder in ihrer Aktivierung gehemmt (Fan & Cook, 2004).

4.3.2. Toleranzentwicklung gegenüber LPS

Die im Rahmen dieser Arbeit erhobenen Ergebnisse zeigen zum ersten Mal die Entwicklung einer LPS-Toleranz in einer speziellen Gehirnstruktur, wie hier in der AP. So führte eine Vorinkubation der AP Zellkultur mit LPS für 18 Stunden zu einer fast vollständigen Unterdrückung LPS-induzierter Ca²⁺-Signale (siehe:

Abbildung 35). Prinzipiell kommen als Ursache dafür sämtliche vorher beschriebenen Theorien zur Entstehung einer Endotoxin-Toleranz in Frage. Möglich wäre außerdem auch eine „Down-Regulation“ des TLR-4 wie sie von Nomura *et al.* bei Peritonealmakrophagen unter LPS-Einfluss beschrieben wird (Nomura *et al.*, 2000). Bereits 2003 fanden Hoffman *et al.* heraus, dass die initial gemessene LPS-induzierte Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ in Mikrogliazellen aus dem Cortex nach wiederholter Stimulation mit LPS unterdrückt wurde (Hoffmann *et al.*, 2003). Dieser Toleranzentwicklung schrieb man eine protektive Funktion zu, da gezeigt werden konnte, dass mit dieser Herunterregulierung der $[Ca^{2+}]_i$ gleichzeitig eine Unterdrückung der Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen und NO einhergeht, wenngleich auch die genauen Mechanismen, die dazu führen, nicht geklärt werden konnten. Diese Unterdrückung der Zytokinproduktion als Reaktion einer Vorinkubation der AP Zellkultur mit LPS konnte auch in den Versuchen zu dieser Arbeit bestätigt werden. Hierzu wurden die Zellkulturen der AP für 18 Stunden mit LPS in einer nicht zytotoxischen Dosierung vorinkubiert und anschließend mit LPS in einer höheren Dosierung für 30, 60, 90, 180 und 360 Minuten stimuliert. Gleichzeitig wurden nicht vorstimulierte AP Kulturen über den gleichen Zeitraum mit LPS stimuliert. Bereits nach 60 Minuten war die gemessene TNF- α -Konzentration im Überstand der vorinkubierten Kultur signifikant geringer als die der nichtvorstimulierten Kontrolle (siehe: Abbildung 38). Auch die LPS-abhängige Bildung von IL-6 konnte durch Vorstimulation der AP Kultur mit LPS unterdrückt werden. Hierbei zeigten sich ebenfalls nach einer Stimulationszeit von 60 Minuten eine signifikant niedrigere IL-6-Konzentration. Dass der Unterschied von gemessenem IL-6 zwischen vorinkubierter Probe und Kontrolle bei 90 Minuten nicht signifikant war, lag daran, dass die Werte eine zu große Streuung aufwiesen (siehe: Abbildung 39).

Die vorliegenden Befunde führen zu der Schlussfolgerung, dass die bereits vielfach untersuchte Unterdrückung von LPS-induzierten Fieber als Reaktion auf wiederholte Applikation von LPS nicht allein durch eine Unterdrückung der Zytokinfreisetzung in der Peripherie zustande kommt (Roth *et al.*, 1994; Roth *et al.*, 1997), sondern auch durch direkte LPS-vermittelte Effekte im Gehirn. Eine spezielle biologische Bedeutung dieses Phänomens in Gehirnstrukturen mit

unvollständiger BHS wie der AP wäre denkbar, da diese direkten Kontakt zu LPS unter pathologischen Bedingungen hat. Eine TLR-abhängige Toleranzentwicklung gegenüber LPS wird in peripheren Organsystemen, wie der Leber und dem Darm, die ständig Bakterien und deren TLR-Liganden ausgesetzt sind, längst als physiologischer Regulationsmechanismus angesehen (Broad *et al.*, 2006). Ob eine LPS-Toleranz im Gehirn ebenfalls eine physiologische und möglicherweise neuroprotektive Rolle spielt, bedarf jedoch noch einer weiteren Klärung.

4.3.3. Kreuztoleranz zwischen LPS, MDP und FSL-1

Im Zusammenhang mit Endotoxin-Toleranz gegenüber einem bestimmten Pathogen kam im Verlauf der Zeit auch immer wieder die Frage nach einer möglichen Kreuztoleranz zwischen verschiedenen pathogenen Molekülstrukturen auf. Eine Kreuztoleranz zwischen LPS und MDP bezüglich der Fieberentstehung und einer Freisetzung von TNF- α und IL-6 konnte hierzu weder im Kaninchen (Soszynski *et al.*, 1991) noch im Meerschweinchen (Roth *et al.*, 1997) gezeigt werden. Später gelang es Sato *et al.* an einer Makrophagenzelllinie, die LPS-induzierte TNF- α -Freisetzung durch Präexposition der Zellen mit MALP-2, einem TLR-2/6-Agonisten zu unterdrücken. Die gleiche Arbeitsgruppe beschrieb außerdem, dass die Kreuztoleranz nicht durch eine „Down-Regulation“ des TLR-4-MD-2-Komplexes ausgelöst wurde und vermutete eine Modulation innerhalb der nachgeschalteten Signalkaskade am TLR-4 (Sato *et al.*, 2000). Später konnte durch *in vivo*-Versuche gezeigt werden, dass LPS-Injektion in Meerschweinchen eine Hyporensponsivität gegenüber FSL-1 und umgekehrt hervorrufen kann (Greis, 2007). Die Entwicklung dieser Kreuztoleranz zwischen einem TLR-4- und einem TLR-2/6-Agonisten hing jedoch stark vom Applikationsweg der beiden Pyrogene ab.

Auf diesen Resultaten aufbauend sollte im Rahmen dieser Arbeit analysiert werden, ob es durch direkte Stimulation der AP Zellkultur mit verschiedenen PAMPs (LPS, MDP, FSL-1) zur Entwicklung einer Kreuztoleranz kommt. Wie

bereits im vorherigen Kapitel beschrieben (siehe: Kapitel 4.3.2), führte eine Vorinkubation der AP Zellkultur mit LPS für 18 Stunden zu einer fast vollständigen Unterdrückung LPS-induzierter Ca^{2+} -Signale. Im Gegensatz dazu konnte keine Desensibilisierung der AP Zellkultur gegenüber LPS durch Vorinkubation mit MDP oder FSL-1 beobachtet werden. Nach Präexposition mit MDP oder FSL-1 antwortete annähernd die gleiche Anzahl an Neuronen, Astrozyten und Oligodendrozyten mit einer Erhöhung ihrer $[\text{Ca}^{2+}]_i$ auf Stimulation mit LPS wie bei den Imaging-Versuchen mit der nicht vorstimulierten AP Kultur (siehe: Abbildung 36 und 37). Bei den in diesem Zusammenhang besonders relevanten Mikrogliazellen handelte es sich dabei sogar um exakt den gleichen Prozentsatz (9-15%). Diese Ergebnisse sprechen eindeutig gegen eine mögliche Kreuztoleranz zwischen LPS, MDP und FSL-1 innerhalb einer primären AP Zellkultur. Möglicherweise spielt die Herunterregulierung des jeweiligen TLRs in Anwesenheit seines spezifischen Liganden doch eine entscheidende Rolle bei der Entstehung einer Endotoxin-Toleranz (Nomura *et al.*, 2000). Eine weitere mögliche Erklärung wäre, dass zur Ausbildung von Toleranzerscheinungen nicht Modifikationen innerhalb des MyD88-abhängigen Signalwegs verantwortlich sind, sondern Veränderungen des TLR-3 und -4-spezifischen TRIF-Signalwegs. Diese Theorie würde erklären, warum es nicht zu einer Kreuztoleranz zwischen LPS, MDP und FSL-1 kam, die sich bekanntermaßen den MyD88-Signalweg teilen. Beweisend für die Beteiligung des TRIF-Signalwegs in Zusammenhang mit Endotoxin-Toleranz ist, dass bereits gezeigt werden konnte, dass PI:PC eine Toleranz gegenüber dem Lipid-A des LPS auslösen kann (Biswas *et al.*, 2007). Daher sollten in weiterführenden Untersuchungen noch ergänzend Versuche der Vorstimulation mit PI:PC und LPS durchgeführt werden, um das Phänomen der Kreuztoleranz weiter zu erforschen. Zudem sollten zusätzlich auch Zytokin-Messungen durchgeführt werden, um zu sehen, ob sich eine Kreuztoleranz zwar nicht auf die $[\text{Ca}^{2+}]_i$ der AP Zellen auswirkt, vielleicht aber auf ihre Kapazität zur Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen.

4.4. Zellen der AP als potentielle Sensoren für zirkulierende Zytokine

Zytokine spielen nicht nur im peripheren Organismus als Vermittler inflammatorischer Signale eine entscheidende Rolle, sondern auch im Gehirn selbst. So werden sie im Verlauf einer systemischen Infektion insbesondere in den sCVOs gebildet und freigesetzt, wie in den vorherigen Kapiteln bereits beschrieben wurde. Dabei vermitteln Zytokine eine Übertragung von Informationen, indem sie neuronale und gliale Zellen über spezifische Zytokinrezeptoren aktivieren (Ericsson *et al.*, 1995; Ek *et al.*, 1998; Goehler *et al.*, 2006). Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es daher, zu untersuchen, ob bestimmte Zelltypen der AP ebenfalls durch die Zugabe von proinflammatorischen Zytokinen aktiviert werden können. Als Maß für Zellaktivierung konnte, wie den vorherigen Versuchen mit PAMPs, eine Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ im Kalzium-Imaging angesehen werden. Zur Stimulation der Zellkultur wurden als Zytokine TNF- α und IL-1 β ausgewählt, da diese im Rahmen von Infektion und Inflammation als erste im Blutplasma auftreten (Long *et al.*, 1990; Roth *et al.*, 1994; Jansky *et al.*, 1995) und somit eine initiale Bedeutung in der Manifestation zentralnervös kontrollierter Krankheitssymptome besitzen. Eine TNF- α -abhängige Aktivierung der $[Ca^{2+}]_i$ konnte bereits in sensorischen Neuronen aus Spinalganglien oder auch aus dem Bereich des Hippocampus (Pollock *et al.*, 2002; De *et al.*, 2003), in Astrozyten (Hsiao *et al.*, 2007) und in Mikrogliazellen (McLarnon *et al.*, 2001) nachgewiesen werden. In weiteren Versuchen der vergangenen Jahre wurde zudem gezeigt, dass Mikrogliazellen (Goghari *et al.*, 2000), Astrozyten (Meini *et al.*, 2000) und Neurone (Viviani *et al.*, 2003) auf IL-1 β mit einem Anstieg ihrer $[Ca^{2+}]_i$ reagieren können.

4.4.1. TNF- α induziert eine Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ in Zellen der AP

Essentiell für diese Untersuchung ist die Existenz des TNF-Rezeptor-1 innerhalb der AP, die bereits 1999 nachgewiesen wurde (Nadeau & Rivest, 1999a). So konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass rund 8% aller Neurone und Astrozyten und fast 3% der Mikrogliazellen einer primären AP Zellkultur mit einer Erhöhung ihrer $[Ca^{2+}]_i$ auf den vorausgegangenen TNF- α -Stimulus antworteten (siehe: Abbildung 40). Dieses Ergebnis beweist, dass AP-intrinsische Zellen nicht nur mit zirkulierenden PAMPs, sondern auch mit zirkulierenden oder lokal im ZNS gebildeten Zytokinen interagieren können. Was aber bedeutet das genau für die Rolle der AP in der Vermittlung inflammatorischer Signale?

Die Tatsache, dass Mikrogliazellen der AP durch TNF- α stimuliert werden, zeigt, dass diese spezialisierten Immunzellen eine duale Rolle besitzen. Auf der einen Seite gelten sie als Hauptproduzenten von Zytokinen innerhalb des Gehirns, auf der anderen Seite aber auch als Empfänger von inflammatorischen Signalen (Hanisch, 2002). Ihre Reaktion auf den vorausgegangenen TNF- α -Stimulus könnte als wichtiger Bestandteil der Zytokinkaskade angesehen werden, da TNF- α die Bildung anderer Zytokine wie IL-1 β und IL-6 induzieren kann (Dinarello *et al.*, 1986; Zhang *et al.*, 1990). Verschiedene Funktionen der Mikrogliazellen werden jedoch auch kontrovers diskutiert, vor allem in Bezug auf die TNF- α -Freisetzung und die damit verbundene Neurotoxizität (Li *et al.*, 2007). Fakt ist, dass TNF- α in hohen Konzentrationen direkt toxische Wirkungen auf Neurone und Oligodendrozyten hat (Hanisch, 2002). Im Gegensatz dazu soll TNF- α in geringeren Konzentrationen hingegen eine neuroprotektive Wirkung aufweisen (Carlson *et al.*, 1999; Hanisch, 2002). In diesem Zusammenhang soll jedoch der TNF-R2 eine entscheidende Rolle spielen (Fontaine *et al.*, 2002), dessen Existenz in den sCVOs bisher noch nicht bewiesen wurde.

Unabhängig davon scheint es in Verbindung mit der Weiterleitung inflammatorischer Signale vielmehr so zu sein, dass das von Mikrogliazellen produzierte TNF- α besonders Neurone und Astrozyten aktiviert. Hierzu

beschreiben verschiedene Autoren eine TNF- α -induzierte Expression von COX-2, sowie eine Freisetzung der sekundären Entzündungsmediatoren PGE₂ und NO aus Astrozyten (Hsiao *et al.*, 2007; Ida *et al.*, 2008). Dieser Vorgang soll zudem mit einer Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ einhergehen, was die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit ebenfalls bestätigen konnten. Für die Mobilisierung des intrazellulären Ca²⁺ wird der IP₃-gekoppelte Signalweg beschrieben. Die vorher beschriebene Stimulierung von Astrozyten durch TNF- α hat zwei wichtige Auswirkungen auf die Entstehung zentralnervös kontrollierter Krankheitssymptome. Zum einen wirkt der aus Astrozyten freigesetzte sekundäre Botenstoff PGE₂ ebenso wie COX-2 selbst als Hauptmediator der Fieberentstehung (Sehic *et al.*, 1996a; Blatteis & Sehic, 1997; Milton, 1998), zum anderen kommt es gleichzeitig zu einer Ca²⁺-abhängigen Freisetzung von Glutamat, welches wiederum als neuronaler Transmitter agiert (Ida *et al.*, 2008). Das so in der AP freigesetzte Glutamat könnte dort katecholaminerge Neurone aktivieren, die weitere inflammatorische Signale zum NTS, dem PVN und in die präoptische Region (Sawchenko & Swanson, 1982; Ericsson *et al.*, 1994) projizieren und so letztendlich zu einer Aktivierung der HPAA, Fieber und anderen Symptomen des „sickness behaviors“ führen.

Basierend auf den Resultaten dieser Arbeit, konnte erstmals eine TNF- α -induzierte Aktivierung von Neuronen der AP dokumentiert werden. Daher wäre es denkbar, dass es durch solch eine Aktivierung von Neuronen der AP als Bestandteil des dorso-vagalen Komplexes zu einer direkten Aktivierung der HPAA und nachfolgend zu zentralnervös kontrollierter Krankheitssymptomen kommt.

4.4.2. IL-1 β induziert eine Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ in Zellen der AP

Die zahlreichen Aufgaben von IL-1 β im Organismus waren bereits Bestandteil intensiver Forschungsaktivitäten der letzten Jahre. In Versuchen zur Fieberentstehung konnte beispielweise gezeigt werden, dass IL-1 β nach systemischer Applikation von LPS unmittelbar nach dem Auftreten von TNF- α im Blutplasma messbar ist (Jansky *et al.*, 1995). Auch eine systemische Injektion von IL-1 β selbst kann Fieber (Anforth *et al.*, 1998; Roth *et al.*, 1998b),

neuroendokrine Aktivierung und Symptome des „sickness behavior“ auslösen (Dantzer, 2001).

Aus diesem Grund sollte nun der direkte Einfluss von IL-1 β auf eine primäre AP Zellkultur untersucht werden. Hierbei reagierten 14% der Neurone, fast 7% der Astrozyten sowie jeweils 8% der Mikrogliazellen und Oligodendrozyten mit einer Erhöhung ihrer [Ca²⁺]_i auf eine Stimulation mit dem Zytokin (siehe: Abbildung 42). Dieses Resultat zeigt, dass Zellen der AP nicht nur mit TNF- α , sondern sogar in stärkerem Umfang auch mit IL-1 β interagieren können. Des Weiteren ist ersichtlich, dass IL-1 β alle vier Zelltypen der AP mit ihren unterschiedlichen Funktionen aktiviert.

Die Reaktion der Mikrogliazellen auf den Zytokin-Stimulus könnte beispielsweise als ein positives „Auto-Feedback“ gesehen werden, da IL-1 β von Mikrogliazellen der AP gebildet wird (Goehler *et al.*, 2006) und IL-1 β seine eigene Produktion stimulieren kann (Dinarello *et al.*, 1987). Gleichzeitig wäre jedoch auch die Induktion der Bildung anderer Zytokine wie z.B. IL-6 möglich (Zhang *et al.*, 1990), was letztendlich zur Entstehung von Fieber (Blatteis *et al.*, 1990) und Symptomen des „sickness behavior“ (Bluthe *et al.*, 2000) führen könnte.

Eine Reaktion der Astrozyten der AP auf IL-1 β zeigt, dass auch dieser Zelltyp mit seinen multiplen Aufgaben eine Rolle im Rahmen pathologischer Ereignisse innerhalb der AP spielt. Astrozyten haben eine wichtige Ernährungsfunktion im ZNS und dienen anderen Zelltypen, wie Neuronen, Mikrogliazellen und Oligodendrozyten als Energielieferant, indem sie Glycogen speichern (Brown *et al.*, 2004). Außerdem sind sie verantwortlich für die Aufrechterhaltung des Ionen- und Wassergleichgewichts (Kimmelberg, 1995; Verkman *et al.*, 2006) und sind wichtig für Wachstums- und Regenerationsprozesse sämtlicher neuronaler und glialer Zellen, was verschiedenen Studien zufolge durch IL-1 β induziert wird (Friedman *et al.*, 1996; Mason *et al.*, 2001). Ihre Funktion im Rahmen von Inflammationsvorgängen vermitteln Astrozyten über eine Freisetzung von IL-6 (Lee *et al.*, 1993) und sekundären Entzündungsmediatoren wie NO nach Stimulation mit IL-1 β (Tichauer *et al.*, 2007; Ida *et al.*, 2008).

Der vermutlich wichtigste Befund aus dem vorliegenden Versuch ist, dass nahezu doppelt so viele Neurone, als alle anderen Zelltypen mit einem Anstieg ihrer $[Ca^{2+}]_i$ reagierten, was auf eine besondere Bedeutung der Neurone innerhalb der AP in Verbindung mit IL-1 β hindeutet.

Einige Studien der letzten Jahre befassten sich bereits mit der Wirkung von IL-1 β auf Neurone. In diesem Zusammenhang wurde beispielsweise eine Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ in Neuronen aus Synapsen des *Cortex* (Campbell & Lynch, 2000) und aus dem Bereich des Hippocampus (Viviani *et al.*, 2003) nach Stimulation mit IL-1 β beschrieben. Ein ähnliches Ergebnis publizierten Desson and Fergusson, die in einem weiteren sCVO, dem SFO, unter Einfluss von IL-1 β eine Veränderung des elektrischen Potentials von Neuronen induzieren konnten (Desson & Ferguson, 2003). Die Wirkung von IL-1 β an Neuronen und glialen Zellen innerhalb der AP wird vom Typ1 des IL-1-R vermittelt (Ek *et al.*, 1998). Somit sind sowohl physiologische, als auch anatomische Voraussetzungen gegeben, die eine direkte Wirkung von IL-1 β an Neuronen des ZNS als möglich erscheinen lassen. Eine solche direkte Wirkung wird auch in einer Studie an Gewebsschnitten der AP beschrieben. Hierbei konnte mit Hilfe verschiedener Nachweismethoden gezeigt werden, dass IL-1 β von Mikrogliazellen der AP freigesetzt wird, und dort direkt sensorische Fasern des *N. vagus* oder auch AP-intrinsische Neurone aktiviert (Goehler *et al.*, 2006). Auf die Art und Weise könnte IL-1 β seine inflammatorische Wirkung vermitteln, da es auch als potentestes Zytokin zur Aktivierung der HPAA beschrieben wird (Kapcala *et al.*, 1995). Abschließend kann man feststellen, dass der Einfluss von IL-1 β auf alle Zelltypen der AP, jedoch insbesondere auf die Neurone, deutlich zeigt, dass Zytokine eine wichtige Rolle in der Zell-zu-Zell-Kommunikation zur Weiterleitung inflammatorischer Signale spielen. Nicht zuletzt tragen diese Befunde aber auch dazu bei, die Bedeutung der AP als Sensor für exogene und endogene Pyrogene und ihre Aufgaben in der Induzierung, Vermittlung oder Aufrechterhaltung zentralnervös vermittelter Immunabwehrprozesse, besser zu verstehen.

4.5. Zellen der AP als potentielle Sensoren für NO, einem sekundären Botenstoff bei Inflammation

4.5.1. NO induziert eine Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ in Zellen der AP

NO ist an einer Reihe inflammatorischer Prozesse im Organismus beteiligt. So ist es in erster Linie verantwortlich für die bakterizide Wirkung von Makrophagen. Dabei kann die Freisetzung von NO durch bakterielle Pyrogene wie LPS, virale Bestandteile, Interferone ebenso durch Zytokine wie IL-1 β , TNF- α und IL-6 induziert werden (Numata *et al.*, 1998). Auch auf zentralnervöser Ebene konnte nach Stimulation mit LPS und proinflammatorischen Zytokinen ein Auftreten der iNOS, die zur Bildung von NO notwendig ist, in Mikrogliazellen und Astrozyten dokumentiert werden (Kopnisky *et al.*, 1997; Carpentier *et al.*, 2008). In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, wie sich der sekundäre Entzündungsmediator NO auf Zellen einer primären Zellkultur der AP auswirkt. Da bereits dokumentiert wurde, dass NO einen Einfluss auf die $[Ca^{2+}]_i$ von Neuronen des PVN (Uribe *et al.*, 1999) sowie von Astrozyten einer Mischkultur (Schipke *et al.*, 2008) hat, wurde in den hierbei durchgeführten Versuchen ebenfalls die $[Ca^{2+}]_i$ der AP Zellen als Kriterium einer Zellaktivierung gemessen. Auf die Stimulation der AP Zellkultur mit dem NO-Donor DEA antworteten 17% der Neurone, fast 23% der Astrozyten und Oligodendrozyten und rund 10% der Mikrogliazellen mit einer Erhöhung ihrer $[Ca^{2+}]_i$.

Diese direkte Aktivierung von AP Neuronen durch NO lässt mehrere Vermutungen der damit verbundenen Funktion zu. So gilt NO in der Körperperipherie zwar als inflammatorischer Vermittler, innerhalb des ZNS wird ihm hingegen eine antiinflammatorische Rolle zugeschrieben. Letzteres scheint in Bezug auf die anatomischen Verhältnisse der AP als Bestandteil des dorsovagalen Komplexes jedoch plausibler. Dabei aktiviert NO die HPAAs (Sandi & Guaza, 1995), was letztendlich zu einer Ausschüttung von Corticosteroiden führt und wiederum antiinflammatorisch auf systemische Infektionsprozesse wirkt.

Erstmals konnte in dieser Arbeit auch gezeigt werden, dass ein hoher Prozentsatz glialer Zellen wie Astrozyten und Oligodendrozyten der AP direkt

auf NO reagiert. Eine erst kürzlich veröffentlichte Studie beschreibt, dass NO eine wichtige Rolle in der Kommunikation zwischen Neuronen und Astrozyten besitzt. Hierbei wurde gezeigt, dass Astrozyten als Reaktion auf inflammatorische Stimuli, ausgelöst durch Zytokine, mit einer Glutamat-Ausschüttung antworten. Das freigesetzte Glutamat soll anschließend katecholaminerge Neurone aktivieren. An diesem komplexen Vorgang soll NO als Mediator beteiligt sein (Ida *et al.*, 2008).

Astrozyten und Mikrogliazellen werden aber auch als die Hauptproduzenten von NO als Reaktion auf endogene oder exogene Pathogene beschrieben (Choi *et al.*, 1999; Hsiao *et al.*, 2007; Carpentier *et al.*, 2008). Wie kommt es nun, dass sie selbst wieder auf NO reagieren? Möglicherweise könnte diese Reaktion Teil eines „negativen Feedbacks“ sein, um so die NO-Produktion zu hemmen, als Schutz vor einer neurotoxischen Dosis von NO (Rogers & Ignarro, 1992; Rengasamy & Johns, 1993).

Abschließend kann man sagen, dass die Zellen der AP nicht nur in der Lage sind, auf PAMPs oder Zytokine zu reagieren, sondern auch auf sekundäre Botenstoffe der Inflammationskaskade wie NO. Im Gegensatz zu den PAMPs und den Zytokinen, die in der AP eine überwiegend inflammatorische Wirkung vermitteln, scheint die Interaktion mit NO jedoch antiinflammatorische Effekte zu besitzen.

4.5.2. Die Expression von nNOS und iNOS in Zellen der AP Zellkultur

Das zur Bildung von NO nötige Enzym ist die NOS. Wie bereits beschrieben (siehe: Kapitel 1.5.1), existieren drei Isoformen der NOS; die neuronale NOS (nNOS), die induzierbare NOS (iNOS) und die endotheliale NOS (eNOS) (Nathan & Xie, 1994; Forstermann *et al.*, 1995). Alle drei Formen sind im Gehirn zu finden, wobei die eNOS im Rahmen dieser Arbeit keine Rolle spielt, da Endothelzellen in der Primärkultur der AP nicht vorhanden sind. Die Existenz der nNOS in Neuronen der AP wurde bereits beschrieben (Rodrigo *et al.*, 1997). Dieses Ergebnis konnte mit Hilfe der Immunzytochemie in dieser Arbeit

bestätigt werden. Dabei zeigten ca. 10% der AP Neurone positive nNOS-Signale (siehe: Abbildung 44 G-I). Eine vorherige Stimulierung der AP Zellkultur mit einem Pyrogen war zum Nachweis der nNOS nicht notwendig, da diese konstitutiv exprimiert wird (Krukoff, 1999), wobei eine Hochregulierung der nNOS unter Einfluss von LPS ebenfalls beschrieben wurde (Uribe *et al.*, 1999). In Verbindung mit inflammatorischen Prozessen konnte außerdem im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass fast alle Mikrogliazellen (siehe: Abbildung 44 A-C) und auch ein Teil der Astrozyten (nicht dargestellt) der AP Zellkultur nach 360-minütiger Stimulation mit LPS, eine deutliche iNOS-Expression zeigen, während die unstimulierte Kontrolle nur sehr schwache iNOS-Signale enthielt (siehe: Abbildung 44 D-F).

Es konnte also belegt werden, dass die in Verbindung mit Inflammation wichtige induzierbare NOS (iNOS) in einer AP Zellkultur von Mikrogliazellen und Astrozyten gebildet wird. Das bedeutet, dass zwar Neurone durch Expression der nNOS auch zur Bildung von NO fähig sind, den mengenmäßig größeren Anteil scheinen aber gliale Zellen, insbesondere unter pathologischen Bedingungen, innerhalb der AP zu besitzen.

4.6. Ausblick

Die Ergebnisse dieser Studie zeigen, dass die AP als Sensor im Gehirn für eine Reihe von Molekülen fungieren kann, die im Rahmen von Infektion und Entzündungsprozessen in der systemischen Zirkulation auftauchen bzw. direkt „vor Ort“ innerhalb der AP gebildet werden können. Weil bei derartigen Erkrankungen vitale homöostatische Funktionen signifikant beeinflusst und verändert werden, die unter Kontrolle bestimmter Kerngebiete des Hypothalamus stehen, wäre es von größtem Interesse die exakten Mechanismen des inflammatorischen Signaltransfers von der AP zum Hypothalamus aufzuklären. Da zumindest durch Zytokine und NO unter anderem auch Neurone direkt aktiviert wurden, könnte man untersuchen, welche efferenten Projektionsgebiete der AP (z.B. *Nucleus tractus solitarius*, *Nucleus parabrachialis* oder *Nucleus ambiguus*) von den durch TNF- α , IL-1 β oder NO aktivierten Neuronen angesteuert werden (siehe: Abbildung 47).

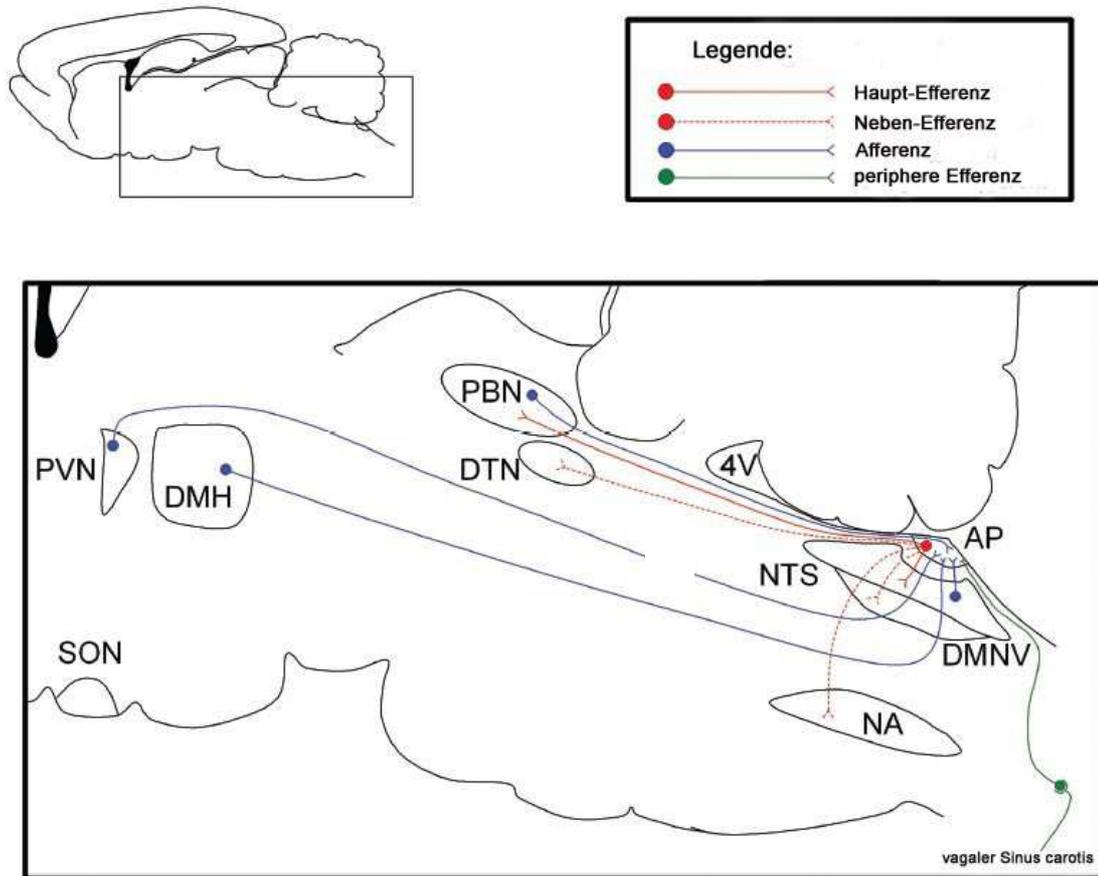


Abbildung 47: Schematische Darstellung der neuronalen Projektionen der AP. Die Haupt- und Nebenefferenzen von der AP zum ZNS sind rot, die Afferenzen zur AP hin blau und Efferenzen zu peripheren Organen sind grün dargestellt. PVN=Nucleus paraventricularis, DMH=dorsomedialer Hypothalamus, SON=Nucleus supraopticus, DTN=dorsaler Nucleus tegmentalis, PBN=Nucleus parabrachialis, 4V=vierter Ventrikel, NTS=Nucleus tractus solitarius, NA=Nucleus ambiguus, DMNV=dorsaler motorischer Nucleus des N.vagus und AP=Area postrema (modifiziert nach Price *et al.* 2008).

Umgekehrt wäre es von Interesse, festzustellen, ob afferente Projektionen zur AP aus hypothalamischen Kerngebieten direkten Einfluss auf diejenigen Neurone nehmen können, die direkt oder indirekt durch inflammatorische Mediatoren stimulierbar sind.

Basierend auf den vorgelegten Befunden bleibt jedoch bereits jetzt festzustellen, dass die neuroimmune Kontrolle zentralnervös kontrollierter Krankheitssymptome eine der integrativen Funktionen der AP darstellt, deren Arbeitsweise es näher zu charakterisieren gilt.

5. Zusammenfassung

Die *Area postrema* (AP) gehört zu den sensorischen zirkumventrikulären Organen, die durch eine unvollständige Blut-Hirn-Schranke gekennzeichnet sind und liegt in direkter Nähe zum vierten Ventrikel. Die Expression von Toll-like Rezeptoren (TLRs) zur Erkennung bestimmter Pathogen-assoziiierter Molekülstrukturen (PAMPs) und Rezeptoren zur Erkennung von proinflammatorischen Zytokinen wie z.B. Tumor Nekrose Faktor- α (TNF- α) und Interleukin-1 β (IL-1 β) innerhalb der AP machen dort eine direkte Interaktion von PAMPs oder Zytokinen mit zellulären Strukturen möglich. Um eine potentielle PAMP- oder Zytokin-induzierte zelluläre Aktivierung näher zu untersuchen, wurde eine primäre Zellkultur der AP der Ratte etabliert. Hierzu wurde das topographisch exakt präparierte Hirngewebe von 3-4 Tagen alten Ratten verwendet.

Zum ersten Mal wurde die Fura-2 Ratio-Imaging-Technik genutzt, um PAMP-induzierte Kalziumsignale in einer AP Zellkultur, stimuliert durch Lipopolysaccharid (LPS), Muramyldipeptid (MDP), Fibroblasten-stimulierendes Lipopeptid-1 (FSL-1) oder Polyriboinosin:Polyribocytosinsäure (PI:PC) näher zu charakterisieren. Das Resultat dieser Studie ergab eine niedrige Responsivität von Neuronen (3%), Astrozyten (2%) und Oligodendrozyten (1%), jedoch antworteten 10-12% der untersuchten Mikrogliazellen mit einem Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ als Reaktion auf eine Stimulation mit LPS, nicht aber mit MDP oder FSL-1. Die Stimulation mit PI:PC hingegen aktivierte 8% der untersuchten Neurone und 2% der Astrozyten, hatte aber keinerlei Einfluss auf die $[Ca^{2+}]_i$ der Mikrogliazellen. Mit Hilfe spezifischer Bioassays konnte in den Überständen von LPS-stimulierten AP Zellkulturen eine beachtliche Freisetzung der proinflammatorischen Zytokine TNF- α und IL-6 nachgewiesen werden, die eine Zeitabhängigkeit aufwies. Eine erhöhte Expression von immunreaktivem TNF- α konnte eigens nur im perinukleären Trans-Golgi-Aparat von AP Mikrogliazellen detektiert werden. Auch die Stimulation der AP Kulturen mit FSL-1 und PI:PC hatte eine erhöhte Freisetzung von bioaktivem TNF- α und IL-6 in den Kulturüberstand zur Folge, die aber wesentlich moderater ausfiel, verglichen mit

der Zytokinfreisetzung nach LPS-Stimulation. Die Vorinkubation der AP Zellkultur für 18 Stunden mit LPS führte zu einer vollständigen Unterdrückung von LPS-induzierten Ca^{2+} -Signalen und zu einer starken Abschwächung der LPS-induzierten Zytokinsekretion der AP Zellen.

Der Nachweis einer direkten zellulären Antwort auf eine LPS-Stimulation, insbesondere von AP-intrinsischen Mikrogliazellen, führt zu der berechtigten Annahme, dass die AP als Sensor für zirkulierende PAMPs, vor allem aber den TLR-4-Agonisten LPS, agiert. Die Unterdrückung der LPS-abhängigen Responsivität der Mikrogliazellen nach Vorinkubation der AP Zellkultur mit LPS, nicht aber mit MDP oder FSL-1, lässt die Entstehung einer spezifischen „Endotoxin-Toleranz“ innerhalb der AP vermuten.

Die Applikation von $\text{TNF-}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$ oder dem Stickstoff-Monoxid (NO)-Donor Diethylamino-diazenolat-2-oxid (DEA) führte zu einer raschen vorübergehenden Erhöhung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ bei bestimmten Zellpopulationen der AP Primärkultur. Auf Stimulation mit TNF reagierten 8% aller untersuchten Neurone und Astrozyten und nur vereinzelt Mikrogliazellen und Oligodendrozyten mit einem Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Hingegen antworten 15% der untersuchten Neurone auf IL-1 , während nur 5-7% der restlichen Zelltypen Veränderungen ihrer $[\text{Ca}^{2+}]_i$ zeigten. Der deutlichste Effekt war nach der Applikation von DEA zu beobachten, wobei mehr als 20% der untersuchten Astrozyten und Oligodendrozyten, 15% der Neurone und 10% der Mikrogliazellen reagierten.

Diese Studie beweist, dass die AP als Sensor für zirkulierendes $\text{TNF-}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$, oder für lokal produzierte Zytokine und NO während Infektion und Inflammation, eine bedeutende Rolle spielt.

Zusammenfassend kann man feststellen, dass die Ergebnisse dieser Arbeit ganz klar beweisen, dass die AP als sensorisches zirkumventrikuläres Organ die Fähigkeit besitzt, eine direkte und schnelle zelluläre Antwort sowohl auf exogene, als auch endogene Pyrogene zu entwickeln. Die postulierte Rolle der sensorischen CVOs innerhalb der komplexen Vorgänge der Kommunikation zwischen Immunsystem und Gehirn wird damit weiter untermauert.

6. Summary

The *area postrema* (AP) represents the sensory circumventricular organ lacking endothelial blood-brain barrier function in direct vicinity to the 4th cerebral ventricle. Expression of Toll-like receptors (TLRs) for several “pathogen-associated molecular patterns” (PAMPs) and of receptors for the pro-inflammatory cytokines tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interleukin-1 β (IL-1 β) within the AP enables direct interaction of a given PAMP or cytokine with its cellular elements. To study specific PAMP- or cytokine-mediated cellular activation, a primary microculture of the rat AP was established from topographically excised pup brain tissue.

The Fura-2 ratio imaging technique was first used to characterize PAMP-induced calcium signaling in AP microcultures stimulated with lipopolysaccharide (LPS), muramyl dipeptide (MDP), fibroblast-stimulating lipopeptide-1 (FSL-1) or polyinosinic:polycytidylic acid (PI:PC). With limited responsiveness of neurons (3 %), astrocytes (2 %) and oligodendrocytes (1 %), LPS but not MDP and FSL-1 caused fast transient rises in intracellular calcium concentration $[Ca^{2+}]_i$ in 10-12 % of the microglial cells investigated. Stimulation with PI:PC, on the other hand, activated 8% of all neurons and 2.5% of all astrocytes investigated, without any effects on $[Ca^{2+}]_i$ in microglial cells. In the supernatants of LPS-treated AP microcultures, a marked time-dependent release of the proinflammatory cytokines TNF- α and IL-6 was determined by use of specific bioassays. Enhanced expression of immunoreactive TNF- α could be detected in the perinuclear Golgi zone of AP microglial cells exclusively. Stimulation of AP-cultures with FSL-1 or PI:PC also caused an increased release of bioactive TNF- α and IL-6 into the supernatant, which was, however, less pronounced when compared to the effects of LPS. Pre-incubation of AP microcultures with LPS for 18 hours caused complete suppression of LPS-induced calcium signaling and strong attenuation of LPS-induced cytokine secretion by AP cells. The demonstration of direct cellular responses predominantly of AP-intrinsic microglial cells to LPS-stimulation raises the intriguing possibility that the AP can act as a sensor for circulating PAMPs,

mainly the TLR4-agonist LPS. The lack of microglial responsiveness to LPS by pre-exposure of AP microcultures with this PAMP, but not MDP or FSL-1, suggests AP-intrinsic development of a phenomenon termed “endotoxin tolerance”.

Administration of TNF- α , or IL-1 β or the nitric oxide (NO) donor diethylamino-diazenolate-2-oxide (DEA), caused fast transient rises in intracellular calcium concentrations ($[Ca^{2+}]_i$) in distinct populations of cells investigated in the rat AP primary microculture. TNF caused rapid elevations of $[Ca^{2+}]_i$ in 8% of all neurons and astrocytes investigated, with limited responses of microglial cells and no responses of oligodendrocytes. 15% of all neurons investigated responded to IL-1, while just 5-7% of the other cell types showed rises in $[Ca^{2+}]_i$. The most pronounced effects were caused by treatment with DEA with more than 20% responding astrocytes and oligodendrocytes, 15% neurons and 10% microglial cells. Evidently, the AP can act as a sensor for circulating TNF and IL-1, or for locally produced cytokines and NO during infection and inflammation.

Taken together, the results of this study clearly demonstrate that the AP as one of the sensory circumventricular organs has the capacity to develop direct and immediate cellular responses to putative exogenous as well as endogenous pyrogens. The postulated role for sensory CVOs within the complex array of immune-to-brain communication pathways is thus reinforced.

7. Abkürzungsverzeichnis

ACTH	Adrenocorticotropes Hormon
Ag	Antigen
Ak	Antikörper
AP	Area postrema
AP-1	Activator Protein-1
APP	Akut Phase Proteine
APR	Akut Phase Reaktion
ARW	Anregungswellenlänge
Asp	Asparagin-Säure
BHS	Blut-Hirn-Schranke
Ca ²⁺	Kalzium
[Ca ²⁺] _i	Intrazelluläre Kalziumkonzentration
CD	Cluster of differentiation
CO ₂	Kohlenstoff-Dioxid
COX	Zyklooxygenase
CRF	Corticotropin Releasing Factor
CVO	Zirkumventrikuläre Organe
DAG	Diacylglycerol
DAPI	4´6 Diamidino-2-Phenylindol
DD	Death domain (Todesdomäne)
DEA	(2-(N,N-Diethylamino)-diazenolat-2-oxid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
EDTA	Ethylen-Diamine-Tetraacetic Acid
ELISA	Enzyme linked Immunosorbent Assay
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERK	Extracellular Signal related Kinase
FADD	Fas associated Death Domain
FKS	Fetales Kälberserum
FOS	FOS-Protein (Transkriptionsfaktor)
FSL-1	Fibroblasten-stimulierendes Lipopeptid-1
FURA-2 AM	Fura-2-Acetoxy-methylester (Fluoreszenzfarbstoff)
GBSS	Gey´s Balanced Salt Solution
GFAP	Glial Fibrillary Acidic Protein
Glu	Glutaminsäure
Gly	Glycin
Gp130	Glykoprotein 130
GPCR	G-Protein gekoppelter Rezeptor
HBSS	Hank´s Balanced Salt Solution
HCl	Salzsäure
HDL	High density Lipoprotein
HGF	Human Gingival Fibroblasts
His	Histidin
HPAA	Hypophysen-Hypothalamus-Achse
ICAM	Intercellular Adhesion Molecule

IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IKK	I- κ B Kinase-Komplex
IL	Interleukin
Ile	Isoleucin
IL-1-R	IL-1-Rezeptor
IL-6-R	IL-6-Rezeptor
IL-RacP	IL-1-R accessory Protein
IP ₃	Inositol-1,4,5-Triphosphat
IP-10	Interferon inducible Protein-10
IRAK	IL-1-Receptor-associated Kinase
IRF	Interferon regulatory factor
JAK	Janus Kinase
JNK	cJun NH ₂ terminal Kinase
KCl	Kaliumchlorid
kDa	kilo Dalton
KGW	Körpergewicht
KO	Knock-out
LAF	Lymphozyten aktivierender Faktor
LBP	LPS-Bindungs-Protein
LPS	Lipopolysaccharid
LRR	Leucin-rich repeats
Lys	Lysin
MALP-2	Makrophagen aktivierendes Lipopeptid-2
MAPK	Mitogen activated Protein Kinase
MCP	Monozytes chemoattractant Protein
MD-2	Myeloid Differentiation Protein-2
MDP	Muramyldipeptid
ME	Eminentia mediana
MHC	Major Histocompatibility Complex
MIP-1	Makrophagen inflammatorisches Protein-1
mRNA	messenger RNA
MTT	Methyldiazoltetrazolium
MW	Mittelwert
MyD88	Myeloid Differentiation Factor 88
NaCl	Natriumchlorid (Kochsalz)
NDV	Nucleus dorsalis des Nervus vagus
NF-IL-6	Nuclear Factor IL-6
NF κ B	Nuclear Factor κ B
NG	Nucleus gracillis
NH	Nucleus hypoglossus
NIK	NF κ B inducing Kinase
NL	Neurohypophyse
NO	Stickstoff-Monoxid
NOD	Nucleotide Oligomerisation-Domain
NOS	Stickstoff-Monoxid-Synthase
NTS	Nucleus Tractus Solitarius
OVLT	Organum vasculosum lamiae terminalis
P	Puffer

PAMP	Pathogen associated molecular pattern
PBS	Phosphate buffered Saline
PDGF	Platelet activating Factor
PFA	Paraformaldehyd
PGE2	Prostaglandin E2
PGN	Peptidoglycan
Phe	Phenylalanin
PIN	Glandula pinealis (Epihyse)
PI:PC	Polyriboinosin-Polyribocytosinsäure
PKC	Protein-Kinase C
Pro	Prolin
PRR	Pattern recognition receptors
PVN	Paraventriculärer Nukleus
RES	Retikuloendotheliales System
RIP	Receptor interacting protein
RNA	Ribonucleinsäure
ROCs	Receptor-operated Ca ²⁺ -channels
RT	Raumtemperatur
s.c.	subcutan
SCO	Organum Subcommissurale
sCVO	sensorisches CVO
S.E.M.	Standard-Error
Ser	Serin
SFO	Subfornikalorgan
SOCS	Suppressor of Cytokine Signalling/ Store-operated Ca ²⁺ -channels
SODD	Silencer of Death Domain
ST2	Mitglied der TIR-Familie
STAT	Signal Transducer and Activator of Transkription
TACE	TNF- α -Converting Enzyme
TAK	Transforming Growth Factor- β activating Kinase
TGF- β	Transforming Growth Factor- β
TIR	Toll/IL-1-R Homologie Domäne
TIRAP/MAL	TIR Domain containing adaptor protein/ MyD88 adaptor-like
TLR	Toll-like Rezeptor
TNF- α	Tumor Nekrose Faktor- α
TNFbp	TNF-Bindungsprotein
TNF-R	TNF-Rezeptor
TRADD	TNF-Receptor associated Death Domain
TRAF	TNF-Receptor associated Factor
TRAIL	TNF-related Apoptosis inducing Ligand
TRAM	TRIF-related adaptor Molecule
TRIF	TIR-Domain containing adaptor inducing interferon- β
TRPM4	Nichtselektiver Kationenkanal
VOCS	Voltage-operated Ca ²⁺ -channels
ZK	Zentralkanal
ZNS	Zentrales Nervensystem

8. Literaturverzeichnis

- AARDEN, L. A., DE GROOT, E. R., SCHAAP, O. L. & LANSDORP, P. M. (1987). Production of hybridoma growth factor by human monocytes. *Eur J Immunol* **17**, 1411-1416.
- ABBOTT, N. J., RONNBACK, L. & HANSSON, E. (2006). Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nat Rev Neurosci* **7**, 41-53.
- ABD-EL-BASSET, E. & FEDOROFF, S. (1995). Effect of bacterial wall lipopolysaccharide (LPS) on morphology, motility, and cytoskeletal organization of microglia in cultures. *J Neurosci Res* **41**, 222-237.
- ABSHER, M. & STINEBRING, W. R. (1969). Toxic properties of a synthetic double-stranded RNA. Endotoxin-like properties of poly I. poly C, an interferon stimulator. *Nature* **223**, 715-717.
- ADEREM, A. & ULEVITCH, R. J. (2000). Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. *Nature* **406**, 782-787.
- ALBERTS, B. A. J., A. (2001). Molecular Biology of the Cell. *Taylor & Francis Inc.*
- ALDERTON, W. K., COOPER, C. E. & KNOWLES, R. G. (2001). Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem J* **357**, 593-615.
- ALEXOPOULOU, L., HOLT, A. C., MEDZHITOV, R. & FLAVELL, R. A. (2001). Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature* **413**, 732-738.
- 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., LUHESHI, G., LUNDKVIST, J., MICHAUD, B., MISTRY, Y., VAN DAM, A. M., ZHEN, C., DANTZER, R., POOLE, S., ROTHWELL, N. J., TILDERS, F. J. & WOLLMAN, E. E. (1998). Biological activity and brain actions of recombinant rat interleukin-1alpha and interleukin-1beta. *Eur Cytokine Netw* **9**, 279-288.
- BADER, M. F., TAUPENOT, L., ULRICH, G., AUNIS, D. & CIESIELSKI-TRESKA, J. (1994). Bacterial endotoxin induces [Ca²⁺]_i transients and changes the organization of actin in microglia. *Glia* **11**, 336-344.
- BANKS, W. A. & KASTIN, A. J. (1996). Passage of peptides across the blood-brain barrier: pathophysiological perspectives. *Life Sci* **59**, 1923-1943.
- BANKS, W. A., KASTIN, A. J. & BROADWELL, R. D. (1995). Passage of cytokines across the blood-brain barrier. *Neuroimmunomodulation* **2**, 241-248.

- BATEMAN, A., SINGH, A., KRAL, T. & SOLOMON, S. (1989). The immune-hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Endocr Rev* **10**, 92-112.
- BAURA, G. D., FOSTER, D. M., KAIYALA, K., PORTE, D., JR., KAHN, S. E. & SCHWARTZ, M. W. (1996). Insulin transport from plasma into the central nervous system is inhibited by dexamethasone in dogs. *Diabetes* **45**, 86-90.
- BAYLOR, S. M. & HOLLINGWORTH, S. (2000). Measurement and Interpretation of Cytoplasmic. *News Physiol Sci* **15**, 19-26.
- BECK, A., PENNER, R. & FLEIG, A. (2008). Lipopolysaccharide-induced down-regulation of Ca²⁺ release-activated Ca²⁺ currents (I CRAC) but not Ca²⁺-activated TRPM4-like currents (I CAN) in cultured mouse microglial cells. *J Physiol* **586**, 427-439.
- BESEDOVSKY, H., DEL REY, A., SORKIN, E. & DINARELLO, C. A. (1986). Immunoregulatory feedback between interleukin-1 and glucocorticoid hormones. *Science* **233**, 652-654.
- BETZ, A. L. (1986). Transport of ions across the blood-brain barrier. *Fed Proc* **45**, 2050-2054.
- BISHOP, V. S. & SANDERFORD, M. G. (2000). Angiotensin II modulation of the arterial baroreflex: role of the area postrema. *Clin Exp Pharmacol Physiol* **27**, 428-431.
- BISWAS, S. K., BIST, P., DHILLON, M. K., KAJIJI, T., DEL FRESNO, C., YAMAMOTO, M., LOPEZ-COLLAZO, E., AKIRA, S. & TERGAONKAR, V. (2007). Role for MyD88-independent, TRIF pathway in lipid A/TLR4-induced endotoxin tolerance. *J Immunol* **179**, 4083-4092.
- BLATTEIS, C. M. (2006). Endotoxic fever: new concepts of its regulation suggest new approaches to its management. *Pharmacol Ther* **111**, 194-223.
- BLATTEIS, C. M., 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., 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. (1997). Circulating pyrogen signaling of the brain. A new working hypothesis. *Ann N Y Acad Sci* **813**, 445-447.

- BLUTHE, R. M., MICHAUD, B., POLI, V. & DANTZER, R. (2000). Role of IL-6 in cytokine-induced sickness behavior: a study with IL-6 deficient mice. *Physiol Behav* **70**, 367-373.
- BORISON, H. L. & BRIZZEE, K. R. (1951). Morphology of emetic chemoreceptor trigger zone in cat medulla oblongata. *Proc Soc Exp Biol Med* **77**, 38-42.
- BREDER, C. D., HAZUKA, C., GHAYUR, T., KLUG, C., HUGININ, M., YASUDA, K., TENG, M. & SAPER, C. B. (1994). Regional induction of tumor necrosis factor alpha expression in the mouse brain after systemic lipopolysaccharide administration. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 11393-11397.
- BREDT, D. S., HWANG, P. M. & SNYDER, S. H. (1990). Localization of nitric oxide synthase indicating a neural role for nitric oxide. *Nature* **347**, 768-770.
- BRINT, E. K., XU, D., LIU, H., DUNNE, A., MCKENZIE, A. N., O'NEILL, L. A. & LIEW, F. Y. (2004). ST2 is an inhibitor of interleukin 1 receptor and Toll-like receptor 4 signaling and maintains endotoxin tolerance. *Nat Immunol* **5**, 373-379.
- BROAD, A., JONES, D. E. & KIRBY, J. A. (2006). Toll-like receptor (TLR) response tolerance: a key physiological "damage limitation" effect and an important potential opportunity for therapy. *Curr Med Chem* **13**, 2487-2502.
- BROWN, A. M., BALTAN TEKKOK, S. & RANSOM, B. R. (2004). Energy transfer from astrocytes to axons: the role of CNS glycogen. *Neurochem Int* **45**, 529-536.
- BSIBSI, M., BAJRAMOVIC, J. J., VAN DUIJVENVOORDEN, E., PERSON, C., RAVID, R., VAN NOORT, J. M. & VOGT, M. H. (2007). Identification of soluble CD14 as an endogenous agonist for Toll-like receptor 2 on human astrocytes by genome-scale functional screening of glial cell derived proteins. *Glia* **55**, 473-482.
- BSIBSI, M., RAVID, R., GVERIC, D. & VAN NOORT, J. M. (2002). Broad expression of Toll-like receptors in the human central nervous system. *J Neuropathol Exp Neurol* **61**, 1013-1021.
- BULT, H., BOECKXSTAENS, G. E., PELCKMANS, P. A., JORDAENS, F. H., VAN MAERCKE, Y. M. & HERMAN, A. G. (1990). Nitric oxide as an inhibitory non-adrenergic non-cholinergic neurotransmitter. *Nature* **345**, 346-347.
- CAMPBELL, V. & LYNCH, M. A. (2000). The role of ceramide in the modulation of intracellular Ca²⁺ levels by interleukin 1 beta in rat cortical synaptosomes. *Cytokine* **12**, 487-490.
- CARLSON, N. G., WIEGEL, W. A., CHEN, J., BACCHI, A., ROGERS, S. W. & GAHRING, L. C. (1999). Inflammatory cytokines IL-1 alpha, IL-1 beta, IL-6,

and TNF-alpha impart neuroprotection to an excitotoxin through distinct pathways. *J Immunol* **163**, 3963-3968.

- CARPENTER, D. O., BRIGGS, D. B. & STROMINGER, N. (1983). Responses of neurons of canine area postrema to neurotransmitters and peptides. *Cell Mol Neurobiol* **3**, 113-126.
- CARPENTIER, P. A., BEGOLKA, W. S., OLSON, J. K., ELHOFY, A., KARPUS, W. J. & MILLER, S. D. (2005). Differential activation of astrocytes by innate and adaptive immune stimuli. *Glia* **49**, 360-374.
- CARPENTIER, P. A., DUNCAN, D. S. & MILLER, S. D. (2008). Glial toll-like receptor signaling in central nervous system infection and autoimmunity. *Brain Behav Immun* **22**, 140-147.
- CARTMELL, T., POOLE, S., TURNBULL, A. V., ROTHWELL, N. J. & LUHESHI, G. N. (2000). Circulating interleukin-6 mediates the febrile response to localised inflammation in rats. *J Physiol* **526 Pt 3**, 653-661.
- CHAI, Z., GATTI, S., TONIATTI, C., POLI, V. & BARTFAI, T. (1996). Interleukin (IL)-6 gene expression in the central nervous system is necessary for fever response to lipopolysaccharide or IL-1 beta: a study on IL-6-deficient mice. *J Exp Med* **183**, 311-316.
- CHEN, L., TAISHI, P., MAJDE, J. A., PETERFI, Z., OBAL, F., JR. & KRUEGER, J. M. (2004). The role of nitric oxide synthases in the sleep responses to tumor necrosis factor-alpha. *Brain Behav Immun* **18**, 390-398.
- CHOI, H. B., KHOO, C., RYU, J. K., VAN BREEMEN, E., KIM, S. U. & MCLARNON, J. G. (2002). Inhibition of lipopolysaccharide-induced cyclooxygenase-2, tumor necrosis factor-alpha and [Ca²⁺]_i responses in human microglia by the peripheral benzodiazepine receptor ligand PK11195. *J Neurochem* **83**, 546-555.
- CHOI, S. H., SHIN, K. H., KANG, S. W., CHUN, Y. S. & CHUN, B. G. (1999). Guanosine 5',3'-cyclic monophosphate enhances lipopolysaccharide-induced nitric oxide synthase expression in mixed glial cell cultures of rat. *Neurosci Lett* **276**, 29-32.
- CHOW, J. C., YOUNG, D. W., GOLENBOCK, D. T., CHRIST, W. J. & GUSOVSKY, F. (1999). Toll-like receptor-4 mediates lipopolysaccharide-induced signal transduction. *J Biol Chem* **274**, 10689-10692.
- CHROUSOS, G. P. (1995). The hypothalamic-pituitary-adrenal axis and immune-mediated inflammation. *N Engl J Med* **332**, 1351-1362.
- CHUANG, J., LIN, M. T., CHAN, S. A. & WON, S. J. (1990). Febrile effects of polyriboinosinic acid: polyribocytidylic acid and interferon: relationship to somatostatin in rat hypothalamus. *Pflugers Arch* **415**, 606-610.

- CHURCHILL, L., TAISHI, P., WANG, M., BRANDT, J., CEARLEY, C., REHMAN, A. & KRUEGER, J. M. (2006). Brain distribution of cytokine mRNA induced by systemic administration of interleukin-1beta or tumor necrosis factor alpha. *Brain Res* **1120**, 64-73.
- 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. *Pflugers Arch* **412**, 292-296.
- COTTRELL, G. T. & FERGUSON, A. V. (2004). Sensory circumventricular organs: central roles in integrated autonomic regulation. *Regul Pept* **117**, 11-23.
- COX, B. F., HAY, M. & BISHOP, V. S. (1990). Neurons in area postrema mediate vasopressin-induced enhancement of the baroreflex. *Am J Physiol* **258**, H1943-1946.
- CROSS, A. S. (2002). Endotoxin tolerance-current concepts in historical perspective. *J Endotoxin Res* **8**, 83-98.
- CUNNINGHAM, C., CAMPION, S., TEELING, J., FELTON, L. & PERRY, V. H. (2007). The sickness behaviour and CNS inflammatory mediator profile induced by systemic challenge of mice with synthetic double-stranded RNA (poly I:C). *Brain Behav Immun* **21**, 490-502.
- CUNNINGHAM, E. T., JR., WADA, E., CARTER, D. B., TRACEY, D. E., BATTEY, J. F. & DE SOUZA, E. B. (1992). In situ histochemical localization of type I interleukin-1 receptor messenger RNA in the central nervous system, pituitary, and adrenal gland of the mouse. *J Neurosci* **12**, 1101-1114.
- DANTZER, R. (2001). Cytokine-induced sickness behavior: where do we stand? *Brain Behav Immun* **15**, 7-24.
- DANTZER, R., O'CONNOR, J. C., FREUND, G. G., JOHNSON, R. W. & KELLEY, K. W. (2008). From inflammation to sickness and depression: when the immune system subjugates the brain. *Nat Rev Neurosci* **9**, 46-56.
- DARNAY, B. G. & AGGARWAL, B. B. (1999). Signal transduction by tumour necrosis factor and tumour necrosis factor related ligands and their receptors. *Ann Rheum Dis* **58 Suppl 1**, I2-I13.
- DASGUPTA, S., JANA, M., LIU, X. & PAHAN, K. (2002). Myelin basic protein-primed T cells induce nitric oxide synthase in microglial cells. Implications for multiple sclerosis. *J Biol Chem* **277**, 39327-39333.

- DE, A., KRUEGER, J. M. & SIMASKO, S. M. (2003). Tumor necrosis factor alpha increases cytosolic calcium responses to AMPA and KCl in primary cultures of rat hippocampal neurons. *Brain Res* **981**, 133-142.
- DE GRUYTER, W. (2002). Pschyrembel Klinisches Wörterbuch. **259**, 88.
- DECOSTER, E., VANHAESEBROECK, B., VANDENABEELE, P., GROOTEN, J. & FIERIS, W. (1995). Generation and biological characterization of membrane-bound, uncleavable murine tumor necrosis factor. *J Biol Chem* **270**, 18473-18478.
- DESSON, S. E. & FERGUSON, A. V. (2003). Interleukin 1beta modulates rat subfornical organ neurons as a result of activation of a non-selective cationic conductance. *J Physiol* **550**, 113-122.
- 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.
- DINARELLO, C. A. (1992). The role of interleukin-1 in host responses to infectious diseases. *Infect Agents Dis* **1**, 227-236.
- DINARELLO, C. A., CANNON, J. G., WOLFF, S. M., BERNHEIM, H. A., BEUTLER, B., CERAMI, A., FIGARI, I. S., PALLADINO, M. A., JR. & O'CONNOR, J. V. (1986). Tumor necrosis factor (cachectin) is an endogenous pyrogen and induces production of interleukin 1. *J Exp Med* **163**, 1433-1450.
- DINARELLO, C. A., ELIN, R. J., CHEDID, L. & WOLFF, S. M. (1978). The pyrogenicity of the synthetic adjuvant muramyl dipeptide and two structural analogues. *J Infect Dis* **138**, 760-767.
- DINARELLO, C. A., IKEJIMA, T., WARNER, S. J., ORENCOLE, S. F., LONNEMANN, G., CANNON, J. G. & LIBBY, P. (1987). Interleukin 1 induces interleukin 1. I. Induction of circulating interleukin 1 in rabbits in vivo and in human mononuclear cells in vitro. *J Immunol* **139**, 1902-1910.
- DOBROVOLSKAIA, M. A. & VOGEL, S. N. (2002). Toll receptors, CD14, and macrophage activation and deactivation by LPS. *Microbes Infect* **4**, 903-914.
- EK, M., KUROSAWA, M., LUNDEBERG, T. & ERICSSON, A. (1998). Activation of vagal afferents after intravenous injection of interleukin-1beta: role of endogenous prostaglandins. *J Neurosci* **18**, 9471-9479.
- ERICSSON, A., KOVACS, K. J. & SAWCHENKO, P. E. (1994). A functional anatomical analysis of central pathways subserving the effects of interleukin-1 on stress-related neuroendocrine neurons. *J Neurosci* **14**, 897-913.

- ERICSSON, A., LIU, C., HART, R. P. & SAWCHENKO, P. E. (1995). Type 1 interleukin-1 receptor in the rat brain: distribution, regulation, and relationship to sites of IL-1-induced cellular activation. *J Comp Neurol* **361**, 681-698.
- ESEN, N. & KIELIAN, T. (2005). Recognition of Staphylococcus aureus-derived peptidoglycan (PGN) but not intact bacteria is mediated by CD14 in microglia. *J Neuroimmunol* **170**, 93-104.
- ESEN, N., TANGA, F. Y., DELEO, J. A. & KIELIAN, T. (2004). Toll-like receptor 2 (TLR2) mediates astrocyte activation in response to the Gram-positive bacterium Staphylococcus aureus. *J Neurochem* **88**, 746-758.
- ESPEVIK, T. & NISSEN-MEYER, J. (1986). A highly sensitive cell line, WEHI 164 clone 13, for measuring cytotoxic factor/tumor necrosis factor from human monocytes. *J Immunol Methods* **95**, 99-105.
- EVANS, C. H. (1995). Nitric oxide: what role does it play in inflammation and tissue destruction? *Agents Actions Suppl* **47**, 107-116.
- FAN, H. & COOK, J. A. (2004). Molecular mechanisms of endotoxin tolerance. *J Endotoxin Res* **10**, 71-84.
- FARBER, K. & KETTENMANN, H. (2005). Physiology of microglial cells. *Brain Res Brain Res Rev* **48**, 133-143.
- FARBER, K. & KETTENMANN, H. (2006). Functional role of calcium signals for microglial function. *Glia* **54**, 656-665.
- FARINA, C., KRUMBHOLZ, M., GIESE, T., HARTMANN, G., ALOISI, F. & MEINL, E. (2005). Preferential expression and function of Toll-like receptor 3 in human astrocytes. *J Neuroimmunol* **159**, 12-19.
- FEIL, R., GAPPA, N., RUTZ, M., SCHLOSSMANN, J., ROSE, C. R., KONNERTH, A., BRUMMER, S., KUH BANDNER, S. & HOFMANN, F. (2002). Functional reconstitution of vascular smooth muscle cells with cGMP-dependent protein kinase I isoforms. *Circ Res* **90**, 1080-1086.
- FERRERO, R., RODRIGUEZ-PASCUAL, F., MIRAS-PORTUGAL, M. T. & TORRES, M. (1999). Comparative effects of several nitric oxide donors on intracellular cyclic GMP levels in bovine chromaffin cells: correlation with nitric oxide production. *Br J Pharmacol* **127**, 779-787.
- FIEDLER, V. B., LOOF, I., SANDER, E., VOEHRINGER, V., GALANOS, C. & FOURNEL, M. A. (1992). Monoclonal antibody to tumor necrosis factor- α prevents lethal endotoxin sepsis in adult rhesus monkeys. *J Lab Clin Med* **120**, 574-588.

- FIELD, A. K., LAMPSON, G. P., TYTELL, A. A., NEMES, M. M. & HILLEMANN, M. R. (1967). Inducers of interferon and host resistance, IV. Double-stranded replicative form RNA (MS2-Ff-RNA) from *E. coli* infected with MS2 coliphage. *Proc Natl Acad Sci U S A* **58**, 2102-2108.
- 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.
- FONTAINE, V., MOHAND-SAID, S., HANOTEAU, N., FUCHS, C., PFIZENMAIER, K. & EISEL, U. (2002). Neurodegenerative and neuroprotective effects of tumor Necrosis factor (TNF) in retinal ischemia: opposite roles of TNF receptor 1 and TNF receptor 2. *J Neurosci* **22**, RC216.
- FORSTERMANN, U., GATH, I., SCHWARZ, P., CLOSS, E. I. & KLEINERT, H. (1995). Isoforms of nitric oxide synthase. Properties, cellular distribution and expressional control. *Biochem Pharmacol* **50**, 1321-1332.
- FORTIER, M. E., KENT, S., ASHDOWN, H., POOLE, S., BOKSA, P. & LUHESHI, G. N. (2004). The viral mimic, polyinosinic:polycytidylic acid, induces fever in rats via an interleukin-1-dependent mechanism. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **287**, R759-766.
- FRANCO, L., BODRATO, N., MORESCHI, I., USAI, C., BRUZZONE, S., SCARFI, S., ZOCCHI, E. & DE FLORA, A. (2006). Cyclic ADP-ribose is a second messenger in the lipopolysaccharide-stimulated activation of murine N9 microglial cell line. *J Neurochem* **99**, 165-176.
- FRANGAKIS, M. V. & KIMELBERG, H. K. (1984). Dissociation of neonatal rat brain by dispase for preparation of primary astrocyte cultures. *Neurochem Res* **9**, 1689-1698.
- FRANGAKIS, M. V., KOOPMAN, W. J., KIYONO, H., MICHALEK, S. M. & MCGHEE, J. R. (1982). An enzymatic method for preparation of dissociated murine Peyer's patch cells enriched for macrophages. *J Immunol Methods* **48**, 33-44.
- FRANKENBERGER, M., PECHUMER, H. & ZIEGLER-HEITBROCK, H. W. (1995). Interleukin-10 is upregulated in LPS tolerance. *J Inflamm* **45**, 56-63.
- 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.
- FRESHNEY, R. I. (1990). Tierische Zellkulturen- ein Methodenhandbuch. *de Gruyter, Berlin*.

- FRIEDMAN, W. J., THAKUR, S., SEIDMAN, L. & RABSON, A. B. (1996). Regulation of nerve growth factor mRNA by interleukin-1 in rat hippocampal astrocytes is mediated by NFkappaB. *J Biol Chem* **271**, 31115-31120.
- FRY, M. & FERGUSON, A. V. (2007). The sensory circumventricular organs: brain targets for circulating signals controlling ingestive behavior. *Physiol Behav* **91**, 413-423.
- GAILLARD, R. C. (1994). Neuroendocrine-immune system interactions The immune-hypothalamo-pituitary-adrenal axis. *Trends Endocrinol Metab* **5**, 303-309.
- GATH, I., STEPPUHN, A., MAELICKE, A., REINHARDT, S. & FORSTERMANN, U. (1999). Analysis of NO synthase expression in neuronal, astroglial and fibroblast-like derivatives differentiating from PCC7-Mz1 embryonic carcinoma cells. *Eur J Cell Biol* **78**, 134-142.
- GEBKE, E., MULLER, A. R., JURZAK, M. & GERSTBERGER, R. (1998). Angiotensin II-induced calcium signalling in neurons and astrocytes of rat circumventricular organs. *Neuroscience* **85**, 509-520.
- GEBKE, E., MULLER, A. R., PEHL, U. & GERSTBERGER, R. (2000). Astrocytes in sensory circumventricular organs of the rat brain express functional binding sites for endothelin. *Neuroscience* **97**, 371-381.
- GIVALOIS, L., DORNAND, J., MEKAOUICHE, 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.
- GLEZER, I., SIMARD, A. R. & RIVEST, S. (2007). Neuroprotective role of the innate immune system by microglia. *Neuroscience* **147**, 867-883.
- GOEHLER, L. E., ERISIR, A. & GAYKEMA, R. P. (2006). Neural-immune interface in the rat area postrema. *Neuroscience* **140**, 1415-1434.
- GOGHARI, V., FRANCIOSI, S., KIM, S. U., LEE, Y. B. & MCLARNON, J. G. (2000). Acute application of interleukin-1beta induces Ca(2+) responses in human microglia. *Neurosci Lett* **281**, 83-86.
- 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.
- GOLENBOCK, D. T., BACH, R. R., LICHENSTEIN, H., JUAN, T. S., TADAVARTHY, A. & MOLDOW, C. F. (1995). Soluble CD14 promotes LPS activation of CD14-deficient PNH monocytes and endothelial cells. *J Lab Clin Med* **125**, 662-671.

- GREIS, A. (2007). Charakterisierung der pyrogenen Eigenschaften des Fibroblasten-stimulierenden Lipopeptids-1 (FSL-1) beim Meerschweinchen. *WB Laufersweiler Verlag* **1**.
- GREIS, A., MURGOTT, J., RAFALZIK, S., GERSTBERGER, R., HUBSCHLE, T. & ROTH, J. (2007). Characterization of the febrile response induced by fibroblast-stimulating lipopeptide-1 in guinea pigs. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **293**, R152-161.
- GREISMAN, S. E., YOUNG, E. J. & WOODWARD, W. E. (1966). Mechanisms of endotoxin tolerance. IV. Specificity of the pyrogenic refractory state during continuous intravenous infusions of endotoxin. *J Exp Med* **124**, 983-1000.
- GROSS, P. M. (1991). Morphology and physiology of capillary systems in subregions of the subfornical organ and area postrema. *Can J Physiol Pharmacol* **69**, 1010-1025.
- GRUBE, B. J., COCHANE, C. G., YE, R. D., GREEN, C. E., MCPHAIL, M. E., ULEVITCH, R. J. & TOBIAS, P. S. (1994). Lipopolysaccharide binding protein expression in primary human hepatocytes and HepG2 hepatoma cells. *J Biol Chem* **269**, 8477-8482.
- GRUSS, H. J. & DOWER, S. K. (1995). The TNF ligand superfamily and its relevance for human diseases. *Cytokines Mol Ther* **1**, 75-105.
- GRYNKIEWICZ, G., POENIE, M. & TSIEN, R. Y. (1985). A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem* **260**, 3440-3450.
- HANISCH, U. K. (2002). Microglia as a source and target of cytokines. *Glia* **40**, 140-155.
- HANISCH, U. K. & KETTENMANN, H. (2007). Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain. *Nat Neurosci* **10**, 1387-1394.
- HANSEN, M. K., TAISHI, P., CHEN, Z. & KRUEGER, J. M. (1998). Vagotomy blocks the induction of interleukin-1beta (IL-1beta) mRNA in the brain of rats in response to systemic IL-1beta. *J Neurosci* **18**, 2247-2253.
- HARRE, E. M., ROTH, J., GERSTBERGER, R. & HUBSCHLE, T. (2003). Interleukin-6 mediates lipopolysaccharide-induced nuclear STAT3 translocation in astrocytes of rat sensory circumventricular organs. *Brain Res* **980**, 151-155.
- HARRE, E. M., ROTH, J., PEHL, U., KUETH, M., GERSTBERGER, R. & HUBSCHLE, T. (2002). Selected contribution: role of IL-6 in LPS-induced nuclear STAT3

- translocation in sensory circumventricular organs during fever in rats. *J Appl Physiol* **92**, 2657-2666.
- HAWN, T. R., WU, H., GROSSMAN, J. M., HAHN, B. H., TSAO, B. P. & ADEREM, A. (2005). A stop codon polymorphism of Toll-like receptor 5 is associated with resistance to systemic lupus erythematosus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 10593-10597.
- HAYWOOD, J. R., FINK, G. D., BUGGY, J., BOUTELLE, S., JOHNSON, A. K. & BRODY, M. J. (1983). Prevention of two-kidney, one-clip renal hypertension in rat by ablation of AV3V tissue. *Am J Physiol* **245**, H683-689.
- HEAGY, W., HANSEN, C., NIEMAN, K. & WEST, M. A. (2003). Evidence for a CD14- and serum-independent pathway in the induction of endotoxin-tolerance in human monocytes and THP-1 monocytic cells. *Shock* **19**, 321-327.
- HEINE, H., KIRSCHNING, C. J., LIEN, E., MONKS, B. G., ROTHE, M. & GOLENBOCK, D. T. (1999). Cutting edge: cells that carry a null allele for toll-like receptor 2 are capable of responding to endotoxin. *J Immunol* **162**, 6971-6975.
- HEINE, H. & LIEN, E. (2003). Toll-like receptors and their function in innate and adaptive immunity. *Int Arch Allergy Immunol* **130**, 180-192.
- HELLMAN, J., LOISELLE, P. M., TEHAN, M. M., ALLAIRE, J. E., BOYLE, L. A., KURNICK, J. T., ANDREWS, D. M., SIK KIM, K. & WARREN, H. S. (2000). Outer membrane protein A, peptidoglycan-associated lipoprotein, and murein lipoprotein are released by Escherichia coli bacteria into serum. *Infect Immun* **68**, 2566-2572.
- HERMS, J. W., MADLUNG, A., BROWN, D. R. & KRETZSCHMAR, H. A. (1997). Increase of intracellular free Ca²⁺ in microglia activated by prion protein fragment. *Glia* **21**, 253-257.
- 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.
- HOEBE, K., GEORGEL, P., RUTSCHMANN, S., DU, X., MUDD, S., CROZAT, K., SOVATH, S., SHAMEL, L., HARTUNG, T., ZHRINGER, U. & BEUTLER, B. (2005). CD36 is a sensor of diacylglycerides. *Nature* **433**, 523-527.
- HOFER, H. (1958). Zur Morphologie der circumventriculären Organe des Zwischenhirns der Säugetiere. *ZoolAnz (Suppl)* **22**, 203-251.
- HOFFMANN, A., KANN, O., OHLEMEYER, C., HANISCH, U. K. & KETTENMANN, H. (2003). Elevation of basal intracellular calcium as a central element in the activation of brain macrophages (microglia): suppression of receptor-

- evoked calcium signaling and control of release function. *J Neurosci* **23**, 4410-4419.
- HOSHINO, K., TAKEUCHI, O., KAWAI, T., SANJO, H., OGAWA, T., TAKEDA, Y., TAKEDA, K. & AKIRA, S. (1999). Cutting edge: Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the Lps gene product. *J Immunol* **162**, 3749-3752.
- HSIAO, H. Y., MAK, O. T., YANG, C. S., LIU, Y. P., FANG, K. M. & TZENG, S. F. (2007). TNF-alpha/IFN-gamma-induced iNOS expression increased by prostaglandin E2 in rat primary astrocytes via EP2-evoked cAMP/PKA and intracellular calcium signaling. *Glia* **55**, 214-223.
- HSU, H., HUANG, J., SHU, H. B., BAICHWAL, V. & GOEDEL, D. V. (1996a). TNF-dependent recruitment of the protein kinase RIP to the TNF receptor-1 signaling complex. *Immunity* **4**, 387-396.
- HSU, H., SHU, H. B., PAN, M. G. & GOEDEL, D. V. (1996b). TRADD-TRAF2 and TRADD-FADD interactions define two distinct TNF receptor 1 signal transduction pathways. *Cell* **84**, 299-308.
- HUBSCHLE, T., MUTZE, J., MUHLRADT, P. F., KORTE, S., GERSTBERGER, R. & ROTH, J. (2006). Pyrexia, anorexia, adipsia, and depressed motor activity in rats during systemic inflammation induced by the Toll-like receptors-2 and -6 agonists MALP-2 and FSL-1. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **290**, R180-187.
- HWANG, J., ZHENG, L. T., OCK, J., LEE, M. G., KIM, S. H., LEE, H. W., LEE, W. H., PARK, H. C. & SUK, K. (2008). Inhibition of glial inflammatory activation and neurotoxicity by tricyclic antidepressants. *Neuropharmacology*.
- IDA, T., HARA, M., NAKAMURA, Y., KOZAKI, S., TSUNODA, S. & IHARA, H. (2008). Cytokine-induced enhancement of calcium-dependent glutamate release from astrocytes mediated by nitric oxide. *Neurosci Lett* **432**, 232-236.
- JACOBS, B. L. & LANGLAND, J. O. (1996). When two strands are better than one: the mediators and modulators of the cellular responses to double-stranded RNA. *Virology* **219**, 339-349.
- JANEWAY C.A., P. T. (1997). Immunologie.
- 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.
- JURZAK, M., MULLER, A. R. & GERSTBERGER, R. (1995a). AVP-fragment peptides induce Ca²⁺ transients in cells cultured from rat circumventricular organs. *Brain Res* **673**, 349-355.

- JURZAK, M., MULLER, A. R. & GERSTBERGER, R. (1995b). Characterization of vasopressin receptors in cultured cells derived from the region of rat brain circumventricular organs. *Neuroscience* **65**, 1145-1159.
- KAHN, M. A., ELLISON, J. A., SPEIGHT, G. J. & DE VELLIS, J. (1995). CNTF regulation of astrogliosis and the activation of microglia in the developing rat central nervous system. *Brain Res* **685**, 55-67.
- KAPCALA, L. P., CHAUTARD, T. & ESKAY, R. L. (1995). The protective role of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis against lethality produced by immune, infectious, and inflammatory stress. *Ann N Y Acad Sci* **771**, 419-437.
- KELLIHER, M. A., GRIMM, S., ISHIDA, Y., KUO, F., STANGER, B. Z. & LEDER, P. (1998). The death domain kinase RIP mediates the TNF-induced NF-kappaB signal. *Immunity* **8**, 297-303.
- KIELIAN, T. (2006). Toll-like receptors in central nervous system glial inflammation and homeostasis. *J Neurosci Res* **83**, 711-730.
- KIELIAN, T., ESEN, N. & BEARDEN, E. D. (2005a). Toll-like receptor 2 (TLR2) is pivotal for recognition of *S. aureus* peptidoglycan but not intact bacteria by microglia. *Glia* **49**, 567-576.
- KIELIAN, T., HANEY, A., MAYES, P. M., GARG, S. & ESEN, N. (2005b). Toll-like receptor 2 modulates the proinflammatory milieu in *Staphylococcus aureus*-induced brain abscess. *Infect Immun* **73**, 7428-7435.
- KIMELBERG, H. K. (1995). Receptors on astrocytes--what possible functions? *Neurochem Int* **26**, 27-40.
- KIMURA, M., TOTH, L. A., AGOSTINI, H., CADY, A. B., MAJDE, J. A. & KRUEGER, J. M. (1994). Comparison of acute phase responses induced in rabbits by lipopolysaccharide and double-stranded RNA. *Am J Physiol* **267**, R1596-1605.
- KINJYO, I., HANADA, T., INAGAKI-OHARA, K., MORI, H., AKI, D., OHISHI, M., YOSHIDA, H., KUBO, M. & YOSHIMURA, A. (2002). SOCS1/JAB is a negative regulator of LPS-induced macrophage activation. *Immunity* **17**, 583-591.
- KISHIMOTO, T. (1994). Signal transduction through homo- or heterodimers of gp130. *Stem Cells* **12 Suppl 1**, 37-44; discussion 44-35.
- KISHIMOTO, T., AKIRA, S., NARAZAKI, M. & TAGA, T. (1995). Interleukin-6 family of cytokines and gp130. *Blood* **86**, 1243-1254.

- KLUGER, M. J. (1991). Fever: role of pyrogens and cryogens. *Physiol Rev* **71**, 93-127.
- KNAPP, S., BRANGER, J. & VAN DER POLL, T. (2002). Advances in research of the inflammatory response: the importance of toll-like receptors. *Wien Med Wochenschr* **152**, 552-554.
- KOBAYASHI, K., HERNANDEZ, L. D., GALAN, J. E., JANEWAY, C. A., JR., MEDZHITOV, R. & FLAVELL, R. A. (2002). IRAK-M is a negative regulator of Toll-like receptor signaling. *Cell* **110**, 191-202.
- 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.
- KOPNISKY, K. L., SUMNERS, C. & CHANDLER, L. J. (1997). Cytokine- and endotoxin-induced nitric oxide synthase in rat astroglial cultures: differential modulation by angiotensin II. *J Neurochem* **68**, 935-944.
- KOPP, E. & MEDZHITOV, R. (2003). Recognition of microbial infection by Toll-like receptors. *Curr Opin Immunol* **15**, 396-401.
- KOPROWSKI, H., ZHENG, Y. M., HEBER-KATZ, E., FRASER, N., RORKE, L., FU, Z. F., HANLON, C. & DIETZSCHOLD, B. (1993). In vivo expression of inducible nitric oxide synthase in experimentally induced neurologic diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 3024-3027.
- KOZAK, W., KLUGER, M. J., SOSZYNSKI, D., CONN, C. A., RUDOLPH, K., LEON, L. R. & ZHENG, H. (1998). IL-6 and IL-1 beta in fever. Studies using cytokine-deficient (knockout) mice. *Ann N Y Acad Sci* **856**, 33-47.
- KOZAK, W., ZHENG, H., CONN, C. A., SOSZYNSKI, D., VAN DER PLOEG, L. H. & KLUGER, M. J. (1995). Thermal and behavioral effects of lipopolysaccharide and influenza in interleukin-1 beta-deficient mice. *Am J Physiol* **269**, R969-977.
- KRUEGER, J. M. & MAJDE, J. A. (1994). Microbial products and cytokines in sleep and fever regulation. *Crit Rev Immunol* **14**, 355-379.
- KRUKOFF, T. L. (1999). Central actions of nitric oxide in regulation of autonomic functions. *Brain Res Brain Res Rev* **30**, 52-65.
- 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.
- LAFLAMME, N., SOUCY, G. & RIVEST, S. (2001). Circulating cell wall components derived from gram-negative, not gram-positive, bacteria cause a

- profound induction of the gene-encoding Toll-like receptor 2 in the CNS. *J Neurochem* **79**, 648-657.
- LANE, E. H. A. D. (1988). Antibodies- A laboratory manual. In *Cold Spring Harbour Laboratory*, pp. 1-4, Cold Spring.
- 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.
- LAUNAY, P., CHENG, H., SRIVATSAN, S., PENNER, R., FLEIG, A. & KINET, J. P. (2004). TRPM4 regulates calcium oscillations after T cell activation. *Science* **306**, 1374-1377.
- LAUW, F. N., CAFFREY, D. R. & GOLENBOCK, D. T. (2005). Of mice and man: TLR11 (finally) finds profilin. *Trends Immunol* **26**, 509-511.
- LAYE, S., PARNET, P., GOUJON, E. & DANTZER, R. (1994). Peripheral administration of lipopolysaccharide induces the expression of cytokine transcripts in the brain and pituitary of mice. *Brain Res Mol Brain Res* **27**, 157-162.
- LEE, S. C., LIU, W., DICKSON, D. W., BROSNAN, C. F. & BERMAN, J. W. (1993). Cytokine production by human fetal microglia and astrocytes. Differential induction by lipopolysaccharide and IL-1 beta. *J Immunol* **150**, 2659-2667.
- LEHNARDT, S., HENNEKE, P., LIEN, E., KASPER, D. L., VOLPE, J. J., BECHMANN, I., NITSCH, R., WEBER, J. R., GOLENBOCK, D. T. & VARTANIAN, T. (2006). A mechanism for neurodegeneration induced by group B streptococci through activation of the TLR2/MyD88 pathway in microglia. *J Immunol* **177**, 583-592.
- LEMAY, L. G., VANDER, A. J. & KLUGER, M. J. (1990). Role of interleukin 6 in fever in rats. *Am J Physiol* **258**, R798-803.
- LESLIE, R. A. & OSBORNE, N. N. (1984). Amines and other transmitter-like compounds in the bovine area postrema. *Brain Res Bull* **13**, 357-362.
- LI, L., LU, J., TAY, S. S., MOOCHHALA, S. M. & HE, B. P. (2007). The function of microglia, either neuroprotection or neurotoxicity, is determined by the equilibrium among factors released from activated microglia in vitro. *Brain Res* **1159**, 8-17.
- LI, Y., WU, X., ZHAO, Y., CHEN, S. & OWYANG, C. (2006a). Ghrelin acts on the dorsal vagal complex to stimulate pancreatic protein secretion. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **290**, G1350-1358.

- LI, Z., PERLIK, V., FELEDER, C., TANG, Y. & BLATTEIS, C. M. (2006b). Kupffer cell-generated PGE2 triggers the febrile response of guinea pigs to intravenously injected LPS. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **290**, R1262-1270.
- LICINIO, J., PROLO, P., MCCANN, S. M. & WONG, M. L. (1999). Brain iNOS: current understanding and clinical implications. *Mol Med Today* **5**, 225-232.
- LIDDEL, E. A. I. W. (1996). Immunlokalisation.
- LIEU, Z. Z., LOCK, J. G., HAMMOND, L. A., LA GRUTA, N. L., STOW, J. L. & GLEESON, P. A. (2008). A trans-Golgi network golgin is required for the regulated secretion of TNF in activated macrophages in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 3351-3356.
- LIMONTA, P., MAGGI, R., GIUDICI, D., MARTINI, L. & PIVA, F. (1981). Role of the subfornical organ (SFO) in the control of gonadotropin secretion. *Brain Res* **229**, 75-84.
- LIN, J. H. & LIN, M. T. (1996). Inhibition of nitric oxide synthase or cyclooxygenase pathways in organum vasculosum laminae terminalis attenuates interleukin-1 beta fever in rabbits. *Neurosci Lett* **208**, 155-158.
- LIU, S., KHEMLANI, L. S., SHAPIRO, R. A., JOHNSON, M. L., LIU, K., GELLER, D. A., WATKINS, S. C., GOYERT, S. M. & BILLIAR, T. R. (1998). Expression of CD14 by hepatocytes: upregulation by cytokines during endotoxemia. *Infect Immun* **66**, 5089-5098.
- LIU, Z. G., HSU, H., GOEDEL, D. V. & KARIN, M. (1996). Dissection of TNF receptor 1 effector functions: JNK activation is not linked to apoptosis while NF-kappaB activation prevents cell death. *Cell* **87**, 565-576.
- LONG, N. C., VANDER, A. J., KUNKEL, S. L. & KLUGER, M. J. (1990). Antiserum against tumor necrosis factor increases stress hyperthermia in rats. *Am J Physiol* **258**, R591-595.
- 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.
- MAKHLOUF, M., ZINGARELLI, B., HALUSHKA, P. V. & COOK, J. A. (1998). Endotoxin tolerance alters macrophage membrane regulatory G proteins. *Prog Clin Biol Res* **397**, 217-226.
- MANDERSON, A. P., KAY, J. G., HAMMOND, L. A., BROWN, D. L. & STOW, J. L. (2007). Subcompartments of the macrophage recycling endosome direct the differential secretion of IL-6 and TNFalpha. *J Cell Biol* **178**, 57-69.

- MANGIAPANE, M. L. & BRODY, M. J. (1987). Vasoconstrictor and vasodilator sites within anteroventral third ventricle region. *Am J Physiol* **253**, R827-831.
- 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.
- MASCARUCCI, P., PEREGO, C., TERRAZZINO, S. & DE SIMONI, M. G. (1998). Glutamate release in the nucleus tractus solitarius induced by peripheral lipopolysaccharide and interleukin-1 beta. *Neuroscience* **86**, 1285-1290.
- MASON, J. L., SUZUKI, K., CHAPLIN, D. D. & MATSUSHIMA, G. K. (2001). Interleukin-1beta promotes repair of the CNS. *J Neurosci* **21**, 7046-7052.
- MATHISON, J., WOLFSON, E., STEINEMANN, S., TOBIAS, P. & ULEVITCH, R. (1993). Lipopolysaccharide (LPS) recognition in macrophages. Participation of LPS-binding protein and CD14 in LPS-induced adaptation in rabbit peritoneal exudate macrophages. *J Clin Invest* **92**, 2053-2059.
- MATSUMURA, K. & KOBAYASHI, S. (2004). Signaling the brain in inflammation: the role of endothelial cells. *Front Biosci* **9**, 2819-2826.
- MAY, P., SCHNIERTSHAUER, U., GERHARTZ, C., HORN, F. & HEINRICH, P. C. (2003). Signal transducer and activator of transcription STAT3 plays a major role in gp130-mediated acute phase protein gene activation. *Acta Biochim Pol* **50**, 595-601.
- MAYO, L., JACOB-HIRSCH, J., AMARIGLIO, N., REHAVI, G., MOUTIN, M. J., LUND, F. E. & STEIN, R. (2008). Dual role of CD38 in microglial activation and activation-induced cell death. *J Immunol* **181**, 92-103.
- MCKINLEY, M. J., MCALLEN, R. M., DAVERN, P., GILES, M. E., PENSCHOW, J., SUNN, N., USCHAKOV, A. & OLDFIELD, B. J. (2003). The sensory circumventricular organs of the mammalian brain. *Adv Anat Embryol Cell Biol* **172**, III-XII, 1-122, back cover.
- MCLARNON, J. G., FRANCIOSI, S., WANG, X., BAE, J. H., CHOI, H. B. & KIM, S. U. (2001). Acute actions of tumor necrosis factor-alpha on intracellular Ca(2+) and K(+) currents in human microglia. *Neuroscience* **104**, 1175-1184.
- MEAGER, A. & DAS, R. E. (1994). International collaborative study of the candidate international standards for human tumour necrosis factors alpha (hTNF-alpha) and beta (hTNF-beta) and for murine tumour necrosis factor alpha (mTNF-alpha). *J Immunol Methods* **170**, 1-13.

- MEDVEDEV, A. E., LENTSCHAT, A., WAHL, L. M., GOLENBOCK, D. T. & VOGEL, S. N. (2002). Dysregulation of LPS-induced Toll-like receptor 4-MyD88 complex formation and IL-1 receptor-associated kinase 1 activation in endotoxin-tolerant cells. *J Immunol* **169**, 5209-5216.
- MEDVEDEV, A. E., PIAO, W., SHOENFELT, J., RHEE, S. H., CHEN, H., BASU, S., WAHL, L. M., FENTON, M. J. & VOGEL, S. N. (2007). Role of TLR4 tyrosine phosphorylation in signal transduction and endotoxin tolerance. *J Biol Chem* **282**, 16042-16053.
- MEDZHITOV, R., PRESTON-HURLBURT, P., KOPP, E., STADLEN, A., CHEN, C., GHOSH, S. & JANEWAY, C. A., JR. (1998). MyD88 is an adaptor protein in the hToll/IL-1 receptor family signaling pathways. *Mol Cell* **2**, 253-258.
- MEINI, A., BENOCCI, A., FROSINI, M., SGARAGLI, G., PESSINA, G., ALDINUCCI, C., YOUNBI, G. T. & PALMI, M. (2000). Nitric oxide modulation of interleukin-1[beta]-evoked intracellular Ca²⁺ release in human astrocytoma U-373 MG cells and brain striatal slices. *J Neurosci* **20**, 8980-8986.
- MERRILL, J. E. & MURPHY, S. P. (1997). Regulation of gene expression in the nervous system by reactive oxygen and nitrogen species. *Metab Brain Dis* **12**, 97-112.
- METEA, M. R. & NEWMAN, E. A. (2007). Signalling within the neurovascular unit in the mammalian retina. *Exp Physiol* **92**, 635-640.
- MILLER, A. D. & LESLIE, R. A. (1994). The area postrema and vomiting. *Front Neuroendocrinol* **15**, 301-320.
- MILTON, A. S. (1998). Prostaglandins and fever. *Prog Brain Res* **115**, 129-139.
- MINAMI, M., KURAISHI, Y., YABUUCHI, K., YAMAZAKI, A. & SATOH, M. (1992). Induction of interleukin-1 beta mRNA in rat brain after transient forebrain ischemia. *J Neurochem* **58**, 390-392.
- MINAMI, M., KURAISHI, Y., YAMAGUCHI, T., NAKAI, S., HIRAI, Y. & SATOH, M. (1991). Immobilization stress induces interleukin-1 beta mRNA in the rat hypothalamus. *Neurosci Lett* **123**, 254-256.
- MOLLER, T. (2002). Calcium signaling in microglial cells. *Glia* **40**, 184-194.
- MORATH, S., GEYER, A., SPREITZER, I., HERMANN, C. & HARTUNG, T. (2002a). Structural decomposition and heterogeneity of commercial lipoteichoic Acid preparations. *Infect Immun* **70**, 938-944.
- MORATH, S., STADELMAIER, A., GEYER, A., SCHMIDT, R. R. & HARTUNG, T. (2002b). Synthetic lipoteichoic acid from *Staphylococcus aureus* is a potent stimulus of cytokine release. *J Exp Med* **195**, 1635-1640.

- MORETON, R. B. (1994). Optical methods for imaging ionic activities. *Scanning Microsc Suppl* **8**, 371-390.
- MOSS, M. L., JIN, S. L., BECHERER, J. D., BICKETT, D. M., BURKHART, W., CHEN, W. J., HASSLER, D., LEESNITZER, M. T., MCGEEHAN, G., MILLA, M., MOYER, M., ROCQUE, W., SEATON, T., SCHOENEN, F., WARNER, J. & WILLARD, D. (1997). Structural features and biochemical properties of TNF-alpha converting enzyme (TACE). *J Neuroimmunol* **72**, 127-129.
- MUNFORD, R. S. & DIETSCHY, J. M. (1985). Effects of specific antibodies, hormones, and lipoproteins on bacterial lipopolysaccharides injected into the rat. *J Infect Dis* **152**, 177-184.
- MURRAY, R. Z., KAY, J. G., SANGERMANI, D. G. & STOW, J. L. (2005). A role for the phagosome in cytokine secretion. *Science* **310**, 1492-1495.
- NADEAU, S. & RIVEST, S. (1999a). Effects of circulating tumor necrosis factor on the neuronal activity and expression of the genes encoding the tumor necrosis factor receptors (p55 and p75) in the rat brain: a view from the blood-brain barrier. *Neuroscience* **93**, 1449-1464.
- NADEAU, S. & RIVEST, S. (1999b). Regulation of the gene encoding tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) in the rat brain and pituitary in response in different models of systemic immune challenge. *J Neuropathol Exp Neurol* **58**, 61-77.
- NADEAU, S. & RIVEST, S. (2000). Role of microglial-derived tumor necrosis factor in mediating CD14 transcription and nuclear factor kappa B activity in the brain during endotoxemia. *J Neurosci* **20**, 3456-3468.
- NADJAR, A., COMBE, C., LAYE, S., TRIDON, V., DANTZER, R., AMEDEE, T. & PARNET, P. (2003). Nuclear factor kappaB 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.
- 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.
- NAKAMORI, T., SAKATA, Y., WATANABE, T., MORIMOTO, A., NAKAMURA, S. & MURAKAMI, N. (1995). Suppression of interleukin-1 beta production in the circumventricular organs in endotoxin-tolerant rabbits. *Brain Res* **675**, 103-109.
- NAKAMURA, A., JOHNS, E. J., IMAIZUMI, A., YANAGAWA, Y. & KOHSAKA, T. (1999). Modulation of interleukin-6 by beta2-adrenoceptor in endotoxin-stimulated renal macrophage cells. *Kidney Int* **56**, 839-849.

- NAKAMURA, J., SHIBATA, K., HASEBE, A., INTO, T., WATANABE, T. & OHATA, N. (2002). Signaling pathways induced by lipoproteins derived from *Mycoplasma salivarium* and a synthetic lipopeptide (FSL-1) in normal human gingival fibroblasts. *Microbiol Immunol* **46**, 151-158.
- 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.
- NANBO, A., NISHIMURA, H., MUTA, T. & NAGASAWA, S. (1999). Lipopolysaccharide stimulates HepG2 human hepatoma cells in the presence of lipopolysaccharide-binding protein via CD14. *Eur J Biochem* **260**, 183-191.
- NATHAN, C. & XIE, Q. W. (1994). Nitric oxide synthases: roles, tolls, and controls. *Cell* **78**, 915-918.
- 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.
- NOBEL, S. (2004). Immunhistochemische und funktionelle Charakterisierung von Neuronen des parasymphatischen Ganglion shenopalatinum der transgenen Mauslinie MOL2.3-IGITL. *WB Laufersweiler Verlag* **1**.
- NODA, M., KETTENMANN, H. & WADA, K. (2006). Anti-inflammatory effects of kinins via microglia in the central nervous system. *Biol Chem* **387**, 167-171.
- NOMURA, F., AKASHI, S., SAKAO, Y., SATO, S., KAWAI, T., MATSUMOTO, M., NAKANISHI, K., KIMOTO, M., MIYAKE, K., TAKEDA, K. & AKIRA, S. (2000). Cutting edge: endotoxin tolerance in mouse peritoneal macrophages correlates with down-regulation of surface toll-like receptor 4 expression. *J Immunol* **164**, 3476-3479.
- NORDHEIM, A. A. L., R. (2003). Zelluläre Signalprozesse. *Lehrbuch Vorklinik, Deutscher Ärzteverlag Köln*, 421-450.
- NUMATA, M., SUZUKI, S., MIYAZAWA, N., MIYASHITA, A., NAGASHIMA, Y., INOUE, S., KANEKO, T. & OKUBO, T. (1998). Inhibition of inducible nitric oxide synthase prevents LPS-induced acute lung injury in dogs. *J Immunol* **160**, 3031-3037.
- OKUSAWA, T., FUJITA, M., NAKAMURA, J., INTO, T., YASUDA, M., YOSHIMURA, A., HARA, Y., HASEBE, A., GOLENBOCK, D. T., MORITA, M., KUROKI, Y., OGAWA, T. & SHIBATA, K. (2004). Relationship between structures and biological activities of mycoplasmal diacylated lipopeptides and their recognition by toll-like receptors 2 and 6. *Infect Immun* **72**, 1657-1665.

- OLSON, J. K. & MILLER, S. D. (2004). Microglia initiate central nervous system innate and adaptive immune responses through multiple TLRs. *J Immunol* **173**, 3916-3924.
- OMUETI, K. O., BEYER, J. M., JOHNSON, C. M., LYLE, E. A. & TAPPING, R. I. (2005). Domain exchange between human toll-like receptors 1 and 6 reveals a region required for lipopeptide discrimination. *J Biol Chem* **280**, 36616-36625.
- OTA, K., KATAFUCHI, T., TAKAKI, A. & HORI, T. (1997). AV3V neurons that send axons to hypothalamic nuclei respond to the systemic injection of IL-1beta. *Am J Physiol* **272**, R532-540.
- OUYANG, K., ZHENG, H., QIN, X., ZHANG, C., YANG, D., WANG, X., WU, C., ZHOU, Z. & CHENG, H. (2005). Ca²⁺ sparks and secretion in dorsal root ganglion neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 12259-12264.
- OZAKI, K. & LEONARD, W. J. (2002). Cytokine and cytokine receptor pleiotropy and redundancy. *J Biol Chem* **277**, 29355-29358.
- PARK, C., LEE, S., CHO, I. H., LEE, H. K., KIM, D., CHOI, S. Y., OH, S. B., PARK, K., KIM, J. S. & LEE, S. J. (2006). TLR3-mediated signal induces proinflammatory cytokine and chemokine gene expression in astrocytes: differential signaling mechanisms of TLR3-induced IP-10 and IL-8 gene expression. *Glia* **53**, 248-256.
- PATON, J. F., WAKI, H., ABDALA, A. P., DICKINSON, J. & KASPAROV, S. (2007). Vascular-brain signaling in hypertension: role of angiotensin II and nitric oxide. *Curr Hypertens Rep* **9**, 242-247.
- PETERSON, P. K., GEKKER, G., HU, S., SHENG, W. S., ANDERSON, W. R., ULEVITCH, R. J., TOBIAS, P. S., GUSTAFSON, K. V., MOLITOR, T. W. & CHAO, C. C. (1995). CD14 receptor-mediated uptake of nonopsonized Mycobacterium tuberculosis by human microglia. *Infect Immun* **63**, 1598-1602.
- PETROV, T., HOWARTH, A. G., KRUKOFF, T. L. & STEVENSON, B. R. (1994). Distribution of the tight junction-associated protein ZO-1 in circumventricular organs of the CNS. *Brain Res Mol Brain Res* **21**, 235-246.
- PHILLIPS, N. C., CHEDID, L., BERNARD, J. M., LEVEL, M. & LEFRANCIER, P. (1987). Induction of murine macrophage tumoricidal activity and treatment of experimental pulmonary metastases by liposomes containing lipophilic muramyl dipeptide analogs. *J Biol Response Mod* **6**, 678-691.
- PINTEAUX, E., INOUE, W., SCHMIDT, L., MOLINA-HOLGADO, F., ROTHWELL, N. J. & LUHESHI, G. N. (2007). Leptin induces interleukin-1beta release from rat

- microglial cells through a caspase 1 independent mechanism. *J Neurochem* **102**, 826-833.
- PINTEAUX, E., PARKER, L. C., ROTHWELL, N. J. & LUHESI, G. N. (2002). Expression of interleukin-1 receptors and their role in interleukin-1 actions in murine microglial cells. *J Neurochem* **83**, 754-763.
- PIVA, F., LIMONTA, P. & MARTINI, L. (1982). Role of the organum vasculosum laminae terminalis in the control of gonadotrophin secretion in rats. *J Endocrinol* **93**, 355-364.
- PLATA-SALAMAN, C. R. (1999). 1998 Curt P. Richter Award. Brain mechanisms in cytokine-induced anorexia. *Psychoneuroendocrinology* **24**, 25-41.
- POENIE, M. & TSIEN, R. (1986). Fura-2: a powerful new tool for measuring and imaging [Ca²⁺]_i in single cells. *Prog Clin Biol Res* **210**, 53-56.
- POLLOCK, J., MCFARLANE, S. M., CONNELL, M. C., ZEHAVI, U., VANDENABEELE, P., MACEWAN, D. J. & SCOTT, R. H. (2002). TNF-alpha receptors simultaneously activate Ca²⁺ mobilisation and stress kinases in cultured sensory neurones. *Neuropharmacology* **42**, 93-106.
- 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.
- PREHAUD, C., MEGRET, F., LAFAGE, M. & LAFON, M. (2005). Virus infection switches TLR-3-positive human neurons to become strong producers of beta interferon. *J Virol* **79**, 12893-12904.
- PRICE, C. J., HOYDA, T. D. & FERGUSON, A. V. (2008). The area postrema: a brain monitor and integrator of systemic autonomic state. *Neuroscientist* **14**, 182-194.
- PRINZ, M., HEIKENWALDER, M., SCHWARZ, P., TAKEDA, K., AKIRA, S. & AGUZZI, A. (2003). Prion pathogenesis in the absence of Toll-like receptor signalling. *EMBO Rep* **4**, 195-199.
- QUAN, N. & BANKS, W. A. (2007). Brain-immune communication pathways. *Brain Behav Immun* **21**, 727-735.
- QUAN, N., STERN, E. L., WHITESIDE, M. B. & HERKENHAM, M. (1999). Induction of pro-inflammatory cytokine mRNAs in the brain after peripheral injection of subseptic doses of lipopolysaccharide in the rat. *J Neuroimmunol* **93**, 72-80.

- QURESHI, S. T., GROS, P. & MALO, D. (1999). The Lps locus: genetic regulation of host responses to bacterial lipopolysaccharide. *Inflamm Res* **48**, 613-620.
- RAETZ, C. R., ULEVITCH, R. J., WRIGHT, S. D., SIBLEY, C. H., DING, A. & NATHAN, C. F. (1991). Gram-negative endotoxin: an extraordinary lipid with profound effects on eukaryotic signal transduction. *Faseb J* **5**, 2652-2660.
- REMER, K. A., BRCIC, M., SAUTER, K. S. & JUNGI, T. W. (2006). Human monocytoïd cells as a model to study Toll-like receptor-mediated activation. *J Immunol Methods* **313**, 1-10.
- RENGASAMY, A. & JOHNS, R. A. (1993). Regulation of nitric oxide synthase by nitric oxide. *Mol Pharmacol* **44**, 124-128.
- RIEDIGER, T., SCHMID, H. A., LUTZ, T. & SIMON, E. (2001). Amylin potently activates AP neurons possibly via formation of the excitatory second messenger cGMP. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **281**, R1833-1843.
- RIEDIGER, T., ZUEND, D., BECSKEI, C. & LUTZ, T. A. (2004). The anorectic hormone amylin contributes to feeding-related changes of neuronal activity in key structures of the gut-brain axis. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **286**, R114-122.
- RIVEST, S. (2003). Molecular insights on the cerebral innate immune system. *Brain Behav Immun* **17**, 13-19.
- RIVIER, C. & RIVEST, S. (1993). Mechanisms mediating the effects of cytokines on neuroendocrine functions in the rat. *Ciba Found Symp* **172**, 204-220; discussion 220-205.
- RODRIGO, J., RIVEROS-MORENO, V., BENTURA, M. L., UTTENTHAL, L. O., HIGGS, E. A., FERNANDEZ, A. P., POLAK, J. M., MONCADA, S. & MARTINEZ-MURILLO, R. (1997). Subcellular localization of nitric oxide synthase in the cerebral ventricular system, subfornical organ, area postrema, and blood vessels of the rat brain. *J Comp Neurol* **378**, 522-534.
- ROE, M. W., LEMASTERS, J. J. & HERMAN, B. (1990). Assessment of Fura-2 for measurements of cytosolic free calcium. *Cell Calcium* **11**, 63-73.
- ROGERS, N. E. & IGNARRO, L. J. (1992). Constitutive nitric oxide synthase from cerebellum is reversibly inhibited by nitric oxide formed from L-arginine. *Biochem Biophys Res Commun* **189**, 242-249.
- ROMANOVSKY, A. A., SIMONS, C. T. & KULCHITSKY, V. A. (1998). "Biphasic" fevers often consist of more than two phases. *Am J Physiol* **275**, R323-331.

- ROSENDAHL, M. S., KO, S. C., LONG, D. L., BREWER, M. T., ROSENZWEIG, B., HEDL, E., ANDERSON, L., PYLE, S. M., MORELAND, J., MEYERS, M. A., KOHNO, T., LYONS, D. & LICHENSTEIN, H. S. (1997). Identification and characterization of a pro-tumor necrosis factor-alpha-processing enzyme from the ADAM family of zinc metalloproteases. *J Biol Chem* **272**, 24588-24593.
- ROSS, G., HUBSCHLE, T., PEHL, U., BRAUN, H. A., VOIGT, K., GERSTBERGER, R. & ROTH, J. (2003). Fever induction by localized subcutaneous inflammation in guinea pigs: the role of cytokines and prostaglandins. *J Appl Physiol* **94**, 1395-1402.
- ROSS, G., ROTH, J., STORR, B., VOIGT, K. & ZEISBERGER, E. (2000). Afferent nerves are involved in the febrile response to injection of LPS into artificial subcutaneous chambers in guinea pigs. *Physiol Behav* **71**, 305-313.
- ROSS, W. N. (1989). Changes in intracellular calcium during neuron activity. *Annu Rev Physiol* **51**, 491-506.
- ROTH, J., ASLAN, T., STORR, B. & ZEISBERGER, E. (1997). 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., HARRE, E. M., RUMMEL, C., GERSTBERGER, R. & HUBSCHLE, T. (2004). Signaling the brain in systemic inflammation: role of sensory circumventricular organs. *Front Biosci* **9**, 290-300.
- 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. L., KLUGER, M. J. & ZEISBERGER, E. (1994). Attenuation of fever and release of cytokines after repeated injections of lipopolysaccharide in guinea-pigs. *J Physiol* **477** (Pt 1), 177-185.
- 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., VOIGT, K. & ZEISBERGER, E. (1998b). Inhibition of nitric oxide synthase results in a suppression of interleukin-1beta-induced fever in rats. *Life Sci* **62**, PL 345-350.
- ROTHWELL, N. J. & LUHESI, G. (1994). Pharmacology of interleukin-1 actions in the brain. *Adv Pharmacol* **25**, 1-20.
- RUMMEL, C., VOSS, T., MATSUMURA, K., KORTE, S., GERSTBERGER, R., ROTH, J. & HUBSCHLE, T. (2005). Nuclear STAT3 translocation in guinea pig and rat brain endothelium during systemic challenge with lipopolysaccharide and interleukin-6. *J Comp Neurol* **491**, 1-14.
- SAKURAI, H., NISHI, A., SATO, N., MIZUKAMI, J., MIYOSHI, H. & SUGITA, T. (2002). TAK1-TAB1 fusion protein: a novel constitutively active mitogen-activated protein kinase kinase kinase that stimulates AP-1 and NF-kappaB signaling pathways. *Biochem Biophys Res Commun* **297**, 1277-1281.
- SANDI, C. & GUAZA, C. (1995). Evidence for a role of nitric oxide in the corticotropin-releasing factor release induced by interleukin-1 beta. *Eur J Pharmacol* **274**, 17-23.
- SARKAR, K. & DAS, P. K. (1997). Protective effect of neoglycoprotein-conjugated muramyl dipeptide against *Leishmania donovani* infection: the role of cytokines. *J Immunol* **158**, 5357-5365.
- SATO, S., NOMURA, F., KAWAI, T., TAKEUCHI, O., MUHLRADT, P. F., TAKEDA, K. & AKIRA, S. (2000). Synergy and cross-tolerance between toll-like receptor (TLR) 2- and TLR4-mediated signaling pathways. *J Immunol* **165**, 7096-7101.
- SAWCHENKO, P. E. & SWANSON, L. W. (1982). The organization of noradrenergic pathways from the brainstem to the paraventricular and supraoptic nuclei in the rat. *Brain Res* **257**, 275-325.
- SCAMMELL, T. E., ELMQUIST, J. K., GRIFFIN, J. D. & SAPER, C. B. (1996). Ventromedial preoptic prostaglandin E2 activates fever-producing autonomic pathways. *J Neurosci* **16**, 6246-6254.
- SCHILTZ, J. C. & SAWCHENKO, P. E. (2003). Signaling the brain in systemic inflammation: the role of perivascular cells. *Front Biosci* **8**, s1321-1329.
- SCHIPKE, C. G., HEIDEMANN, A., SKUPIN, A., PETERS, O., FALCKE, M. & KETTENMANN, H. (2008). Temperature and nitric oxide control spontaneous calcium transients in astrocytes. *Cell Calcium* **43**, 285-295.

- SCHNARE, M., ROLLINGHOFF, M. & QURESHI, S. (2006). Toll-like receptors: sentinels of host defence against bacterial infection. *Int Arch Allergy Immunol* **139**, 75-85.
- SCHOBITZ, B., DE KLOET, E. R., SUTANTO, W. & HOLSBOER, F. (1993). Cellular localization of interleukin 6 mRNA and interleukin 6 receptor mRNA in rat brain. *Eur J Neurosci* **5**, 1426-1435.
- SEHIC, E., SZEKELY, M., UNGAR, A. L., OLADEHIN, 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.
- SHAPIRO, R. E. & MISELIS, R. R. (1985). The central neural connections of the area postrema of the rat. *J Comp Neurol* **234**, 344-364.
- SHEMI, D. & KAPLANSKI, J. (2005). Involvement of PGE2 and TNF-alpha in LPS-tolerance in rat glial primary cultures. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* **73**, 385-389.
- 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.
- SONG, K., ALLEN, A. M., PAXINOS, G. & MENDELSON, F. A. (1992). Mapping of angiotensin II receptor subtype heterogeneity in rat brain. *J Comp Neurol* **316**, 467-484.
- 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.
- SPRANGER, J., VERMA, S., GOHRING, I., BOBBERT, T., SEIFERT, J., SINDLER, A. L., PFEIFFER, A., HILEMAN, S. M., TSCHOP, M. & BANKS, W. A. (2006). Adiponectin does not cross the blood-brain barrier but modifies cytokine expression of brain endothelial cells. *Diabetes* **55**, 141-147.
- SUNDGREN-ANDERSSON, A. K., OSTLUND, P. & BARTFAI, T. (1998). IL-6 is essential in TNF-alpha-induced fever. *Am J Physiol* **275**, R2028-2034.

- TAGA, T. (1997). The signal transducer gp130 is shared by interleukin-6 family of haematopoietic and neurotrophic cytokines. *Ann Med* **29**, 63-72.
- TAKADA, H., YOKOYAMA, S. & YANG, S. (2002). Enhancement of endotoxin activity by muramyl dipeptide. *J Endotoxin Res* **8**, 337-342.
- TAKAHASHI, Y., SMITH, P., FERGUSON, A. & PITTMAN, Q. J. (1997). Circumventricular organs and fever. *Am J Physiol* **273**, R1690-1695.
- TAKEDA, K. & AKIRA, S. (2000). STAT family of transcription factors in cytokine-mediated biological responses. *Cytokine Growth Factor Rev* **11**, 199-207.
- TAKEDA, K. & AKIRA, S. (2004). Microbial recognition by Toll-like receptors. *J Dermatol Sci* **34**, 73-82.
- TAKEDA, K., KAISHO, T. & AKIRA, S. (2003). Toll-like receptors. *Annu Rev Immunol* **21**, 335-376.
- TAKEDA, K., TAKEUCHI, O. & AKIRA, S. (2002). Recognition of lipopeptides by Toll-like receptors. *J Endotoxin Res* **8**, 459-463.
- TAKEUCHI, O., HOSHINO, K., KAWAI, T., SANJO, H., TAKADA, H., OGAWA, T., TAKEDA, K. & AKIRA, S. (1999). Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of gram-negative and gram-positive bacterial cell wall components. *Immunity* **11**, 443-451.
- TAKEUCHI, O., KAWAI, T., MUHLRADT, P. F., MORR, M., RADOLF, J. D., ZYCHLINSKY, A., TAKEDA, K. & AKIRA, S. (2001). Discrimination of bacterial lipoproteins by Toll-like receptor 6. *Int Immunol* **13**, 933-940.
- TEMPEL, G. E., BROWN, A. N., MORINELLI, T. A., HALUSHKA, P. V. & COOK, J. A. (2001). Changes in vascular responsiveness to a thromboxane mimetic in endotoxin tolerance. *Shock* **16**, 389-392.
- TICHAUER, J., SAUD, K. & VON BERNHARDI, R. (2007). Modulation by astrocytes of microglial cell-mediated neuroinflammation: effect on the activation of microglial signaling pathways. *Neuroimmunomodulation* **14**, 168-174.
- TILDERS, F. J., DERIJK, R. H., VAN DAM, A. M., VINCENT, V. A., SCHOTANUS, K. & PERSOONS, J. H. (1994). Activation of the hypothalamus-pituitary-adrenal axis by bacterial endotoxins: routes and intermediate signals. *Psychoneuroendocrinology* **19**, 209-232.
- TOBIAS, P. S., MCADAM, K. P., SOLDAU, K. & ULEVITCH, R. J. (1985). Control of lipopolysaccharide-high-density lipoprotein interactions by an acute-phase reactant in human serum. *Infect Immun* **50**, 73-76.

- TRAUB, S., VON AULOCK, S., HARTUNG, T. & HERMANN, C. (2006). MDP and other mucopeptides--direct and synergistic effects on the immune system. *J Endotoxin Res* **12**, 69-85.
- TSAKIRI, N., KIMBER, I., ROTHWELL, N. J. & PINTEAUX, E. (2008). Differential effects of interleukin-1 alpha and beta on interleukin-6 and chemokine synthesis in neurones. *Mol Cell Neurosci* **38**, 259-265.
- TSIEN, R. Y. (1980). New calcium indicators and buffers with high selectivity against magnesium and protons: design, synthesis, and properties of prototype structures. *Biochemistry* **19**, 2396-2404.
- TSIEN, R. Y. (1986). New tetracarboxylate chelators for fluorescence measurement and photochemical manipulation of cytosolic free calcium concentrations. *Soc Gen Physiol Ser* **40**, 327-345.
- TSIEN, R. Y. (1989). Fluorescent probes of cell signaling. *Annu Rev Neurosci* **12**, 227-253.
- TURNBULL, A. V. & RIVIER, C. (1996). Corticotropin-releasing factor, vasopressin, and prostaglandins mediate, and nitric oxide restrains, the hypothalamic-pituitary-adrenal response to acute local inflammation in the rat. *Endocrinology* **137**, 455-463.
- UEMATSU, S. & AKIRA, S. (2006). Toll-like receptors and innate immunity. *J Mol Med* **84**, 712-725.
- ULEVITCH, R. J., JOHNSTON, A. R. & WEINSTEIN, D. B. (1981). New function for high density lipoproteins. Isolation and characterization of a bacterial lipopolysaccharide-high density lipoprotein complex formed in rabbit plasma. *J Clin Invest* **67**, 827-837.
- URIBE, R. M., LEE, S. & RIVIER, C. (1999). Endotoxin stimulates nitric oxide production in the paraventricular nucleus of the hypothalamus through nitric oxide synthase I: correlation with hypothalamic-pituitary-adrenal axis activation. *Endocrinology* **140**, 5971-5981.
- VALLIERES, L. & RIVEST, S. (1997). Regulation of the genes encoding interleukin-6, its receptor, and gp130 in the rat brain in response to the immune activator lipopolysaccharide and the proinflammatory cytokine interleukin-1beta. *J Neurochem* **69**, 1668-1683.
- VAN AMERSFOORT, E. S., VAN BERKEL, T. J. & KUIPER, J. (2003). Receptors, mediators, and mechanisms involved in bacterial sepsis and septic shock. *Clin Microbiol Rev* **16**, 379-414.
- VAN DAM, A. M., BAUER, J., TILDERS, F. J. & BERKENBOSCH, F. (1995). Endotoxin-induced appearance of immunoreactive interleukin-1 beta in

- ramified microglia in rat brain: a light and electron microscopic study. *Neuroscience* **65**, 815-826.
- VAN DER KOOY, D. & KODA, L. Y. (1983). Organization of the projections of a circumventricular organ: the area postrema in the rat. *J Comp Neurol* **219**, 328-338.
- VAN LENTEN, B. J., FOGELMAN, A. M., HABERLAND, M. E. & EDWARDS, P. A. (1986). The role of lipoproteins and receptor-mediated endocytosis in the transport of bacterial lipopolysaccharide. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**, 2704-2708.
- VASILENKO, V. Y., PETRUCHUK, T. A., GOURINE, V. N. & PIERAU, F. K. (2000). Interleukin-1beta reduces temperature sensitivity but elevates thermal thresholds in different populations of warm-sensitive hypothalamic neurons in rat brain slices. *Neurosci Lett* **292**, 207-210.
- VERKMAN, A. S., BINDER, D. K., BLOCH, O., AUGUSTE, K. & PAPADOPOULOS, M. C. (2006). Three distinct roles of aquaporin-4 in brain function revealed by knockout mice. *Biochim Biophys Acta* **1758**, 1085-1093.
- VERSTREPEN, L., BEKAERT, T., CHAU, T. L., TAVERNIER, J., CHARIOT, A. & BEYAERT, R. (2008). TLR-4, IL-1R and TNF-R signaling to NF-kappaB: variations on a common theme. *Cell Mol Life Sci*.
- VIGIER, D. & PORTALIER, P. (1979). Efferent projections of the area postrema demonstrated by autoradiography. *Arch Ital Biol* **117**, 308-324.
- VIRIYAKOSOL, S., KIRKLAND, T., SOLDAU, K. & TOBIAS, P. (2000). MD-2 binds to bacterial lipopolysaccharide. *J Endotoxin Res* **6**, 489-491.
- VITKOVIC, L., KONSMAN, J. P., BOCKAERT, J., DANTZER, R., HOMBURGER, V. & JACQUE, C. (2000). Cytokine signals propagate through the brain. *Mol Psychiatry* **5**, 604-615.
- VIVIANI, B., BARTESAGHI, S., GARDONI, F., VEZZANI, A., BEHRENS, M. M., BARTFAI, T., BINAGLIA, M., CORSINI, E., DI LUCA, M., GALLI, C. L. & MARINOVICH, M. (2003). Interleukin-1beta enhances NMDA receptor-mediated intracellular calcium increase through activation of the Src family of kinases. *J Neurosci* **23**, 8692-8700.
- VODOVOTZ, Y., LUCIA, M. S., FLANDERS, K. C., CHESLER, L., XIE, Q. W., SMITH, T. W., WEIDNER, J., MUMFORD, R., WEBBER, R., NATHAN, C., ROBERTS, A. B., LIPPA, C. F. & SPORN, M. B. (1996). Inducible nitric oxide synthase in tangle-bearing neurons of patients with Alzheimer's disease. *J Exp Med* **184**, 1425-1433.
- VOSS, T., BARTH, S. W., RUMMEL, C., GERSTBERGER, R., HUBSCHLE, T. & ROTH, J. (2007). STAT3 and COX-2 activation in the guinea-pig brain during

- fever induced by the Toll-like receptor-3 agonist polyinosinic:polycytidylic acid. *Cell Tissue Res* **328**, 549-561.
- VOSS, T., RUMMEL, C., GERSTBERGER, R., HUBSCHLE, T. & ROTH, J. (2006). Fever and circulating cytokines induced by double-stranded RNA in guinea pigs: dependence on the route of administration and effects of repeated injections. *Acta Physiol (Oxf)* **187**, 379-389.
- WAN, Y., FREESWICK, P. D., KHEMLANI, L. S., KISPERS, 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.
- WATKINS, L. R., MAIER, S. F. & GOEHLER, L. E. (1995). Cytokine-to-brain communication: a review & analysis of alternative mechanisms. *Life Sci* **57**, 1011-1026.
- WATKINS, L. R., WIERTELAK, E. P., GOEHLER, L. E., SMITH, K. P., MARTIN, D. & MAIER, S. F. (1994). Characterization of cytokine-induced hyperalgesia. *Brain Res* **654**, 15-26.
- WILSON, J. T. (1906). On the Anatomy of the Calamus Region in the Human Bulb; with an Account of a hitherto undescribed "Nucleus postremus": Part I. *J Anat Physiol* **40**, 210-241.
- WINDHEIM, M., LANG, C., PEGGIE, M., PLATER, L. A. & COHEN, P. (2007). Molecular mechanisms involved in the regulation of cytokine production by muramyl dipeptide. *Biochem J* **404**, 179-190.
- WRIGHT, S. D., RAMOS, R. A., TOBIAS, P. S., ULEVITCH, R. J. & MATHISON, J. C. (1990). CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. *Science* **249**, 1431-1433.
- WUCHERT, F., OTT, D., MURGOTT, J., RAFALZIK, S., HITZEL, N., ROTH, J. & GERSTBERGER, R. (2008). Rat area postrema microglial cells act as sensors for the toll-like receptor-4 agonist lipopolysaccharide. *J Neuroimmunol*.
- 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.
- XUE, B., GOLE, H., PAMIDIMUKKALA, J. & HAY, M. (2003). Role of the area postrema in angiotensin II modulation of baroreflex control of heart rate in conscious mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **284**, H1003-1007.
- YAMAMOTO, M., TAKEDA, K. & AKIRA, S. (2004). TIR domain-containing adaptors define the specificity of TLR signaling. *Mol Immunol* **40**, 861-868.

- YAN, H. Q., BANOS, M. A., HERREGODTS, P., HOOGHE, R. & HOOGHE-PETERS, E. L. (1992). Expression of interleukin (IL)-1 beta, IL-6 and their respective receptors in the normal rat brain and after injury. *Eur J Immunol* **22**, 2963-2971.
- YANG, S., TAMAI, R., AKASHI, S., TAKEUCHI, O., AKIRA, S., SUGAWARA, S. & TAKADA, H. (2001). Synergistic effect of muramyldipeptide with lipopolysaccharide or lipoteichoic acid to induce inflammatory cytokines in human monocytic cells in culture. *Infect Immun* **69**, 2045-2053.
- YI, H. A., YI, S. D., JANG, B. C., SONG, D. K., SHIN, D. H., MUN, K. C., KIM, S. P., SUH, S. I. & BAE, J. H. (2005). Inhibitory effects of glucosamine on lipopolysaccharide-induced activation in microglial cells. *Clin Exp Pharmacol Physiol* **32**, 1097-1103.
- ZEISBERGER, E. & ROTH, J. (1993). Neurobiological concepts of fever generation and suppression. *Neuropsychobiology* **28**, 106-109.
- ZEISBERGER, E. & ROTH, J. (1998). Tolerance to pyrogens. *Ann N Y Acad Sci* **856**, 116-131.
- ZHANG, D., ZHANG, G., HAYDEN, M. S., GREENBLATT, M. B., BUSSEY, C., FLAVELL, R. A. & GHOSH, S. (2004). A toll-like receptor that prevents infection by uropathogenic bacteria. *Science* **303**, 1522-1526.
- ZHANG, Y. H., LIN, J. X. & VILCEK, J. (1990). Interleukin-6 induction by tumor necrosis factor and interleukin-1 in human fibroblasts involves activation of a nuclear factor binding to a kappa B-like sequence. *Mol Cell Biol* **10**, 3818-3823.
- ZIEGLER-HEITBROCK, H. W., SCHRAUT, W., WENDELGASS, P., STROBEL, M., STERNSDORF, T., WEBER, C., AEPFELBACHER, M., EHLERS, M., SCHUTT, C. & HAAS, J. G. (1994a). Distinct patterns of differentiation induced in the monocytic cell line Mono Mac 6. *J Leukoc Biol* **55**, 73-80.
- ZIEGLER-HEITBROCK, H. W., WEDEL, A., SCHRAUT, W., STROBEL, M., WENDELGASS, P., STERNSDORF, T., BAUERLE, P. A., HAAS, J. G. & RIETHMULLER, G. (1994b). Tolerance to lipopolysaccharide involves mobilization of nuclear factor kappa B with predominance of p50 homodimers. *J Biol Chem* **269**, 17001-17004.

9. Anhang

9.1. Publikationen

(A) Originalarbeiten

Florian Wuchert, Daniela Ott, Jolanta Murgott, Sandra Rafalzik, Norma Hitzel, Joachim Roth, Rüdiger Gerstberger (2008)

„Rat *area postrema* microglial cells act as sensors for the Toll-like receptor-4 agonist lipopolysaccharide“. *Journal of Neuroimmunology* 204: 66-74

Florian Wuchert, Daniela Ott, Sandra Rafalzik, Joachim Roth, Rüdiger Gerstberger (2008)

“Tumor necrosis factor- α , interleukin-1 β and nitric oxide induce calcium transients in distinct populations of cells cultured from the rat *area postrema*“. *Journal of Neuroimmunology*: doi: 10.1016/j.neuroim.2008.10.010 (e-pub ahead of print)

(B) Kongressmitteilungen

Florian Wuchert, Daniela Ott, Jolanta Murgott, Sandra Rafalzik, Joachim Roth, Rüdiger Gerstberger (2008)

“LPS, MDP and FSL-1–induced cellular activation in rat *area postrema* cells“. *17. Symposium der Fachgruppe Physiologie und Biochemie der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft* (Leipzig 9.-11.März 2008), publiziert in: Leipziger Blaue Hefte 4 „Proceedings 18. Tagung der DVG-Fachgruppe Physiologie und Biochemie“

9.2. Danksagung

An aller erster Stelle möchte ich mich vielmals bei meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Joachim Roth für die fabelhafte Betreuung bedanken. Sein großes Engagement und seine Geduld, sowie seine Fähigkeit, komplizierte Dinge einfach zu erklären, haben sehr zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Herrn Prof. Dr. Rüdiger Gerstberger danke ich für die Überlassung des Themas und die großzügige finanzielle Unterstützung während der gesamten Zeit der Promotion.

Ein ganz besonderer Dank gilt Frau Daniela Ott, die mich in nahezu alle Labormethoden eingearbeitet hat und mir täglich mit ihrer fachlichen, als auch persönlichen Hilfe zur Seite stand. Ohne Dich hätte ich das nie geschafft!

Vielen herzlichen Dank auch an Janina Welsch, die mich nicht nur während meiner Doktorandenzeit begleitet hat, und mich von so manchem, meist computerbedingtem Frust wieder befreite.

Frau Jolanta Murgott danke ich für die große Unterstützung bei der Durchführung der Bioassays. Bei Sandra Rafalzik und Norma Hitzel möchte ich mich für die Einarbeitung in die Zellkultur, das Imaging und für die zahlreichen Tipps für die Auswertung der Versuche bedanken. Außerdem danke ich Frau Tanja Weber für den „Photoshop-Crash-Kurs“. Den Tierpflegern Alexia Alimoh und Michael Haas sei vielmals gedankt für die sorgfältige Pflege aller Tiere des Instituts. Ein großes Dankeschön auch an Frau Karger, Frau Krale und Frau Adam-Steller für die gründliche Reinigung unseres „haarigen“ Büros.

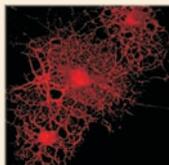
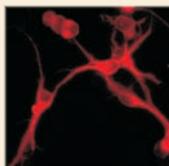
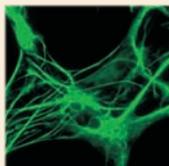
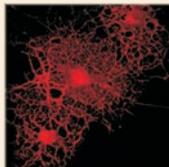
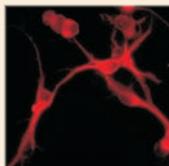
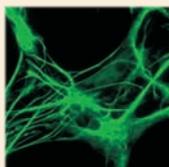
Vielen Dank an die gesamten Mitarbeiter der Veterinärphysiologie für viele unterhaltsame Arbeitspausen und so manches „Sektchen“ zwischendurch.

Von ganzem Herzen möchte ich mich bei meinem Freund Florian Kaal bedanken, der alle Höhen und Tiefen dieser Doktorarbeit mit mir durchgestanden und mich immer wieder motiviert hat. Ein großer Dank gilt meiner Familie, die während des Studiums und der Promotion immer an mich geglaubt und mich in jeglicher Hinsicht unterstützt hat. Nicht zuletzt sei meinen

Freunden dafür gedankt, dass immer ein „offenes Ohr“ für mich da war und dass mich so mancher Spass vom „harten“ Doktoranden-Dasein ablenken konnte.

9.3. 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 Auskunft 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
STAUFBENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

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

ISBN 3-8359-5344-3



9 17 8 3 8 3 5 1 9 5 3 4 4 4 1