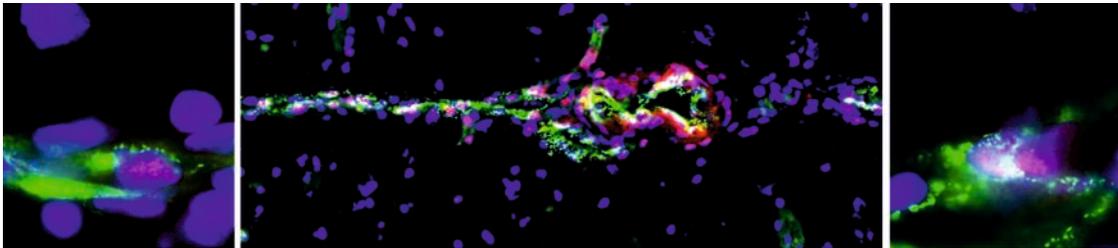


**SANDY KOENIG**

---

Altersabhängige Effekte auf inflammatorische  
Mediatoren und zentralnervös kontrollierte  
Krankheitssymptome bei systemischen  
Entzündungsreaktionen der Ratte



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.**

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

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

1. Auflage 2015

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

1<sup>st</sup> Edition 2015

© 2015 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen  
Printed in Germany



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

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

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

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

Betreuer: PD Dr. Christoph Rummel

**Altersabhängige Effekte auf inflammatorische  
Mediatoren und zentralnervös kontrollierte  
Krankheitssymptome bei systemischen  
Entzündungsreaktionen der Ratte**

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

eingereicht von

**Sandy Koenig**

Tierärztin aus Luxemburg

Gießen 2015

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

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

Gutachter: PD Dr. Christoph Rummel

PD Dr. Martin Schmidt

Tag der Disputation: 14.04.2015

## Abkürzungsverzeichnis

ACTH	Adrenocorticotropes Hormon
AER	Autofluorescence Eliminator Reagent
AgRP	Agouti-related peptide
AL	Anterior lobe
$\alpha$ -MSH	alpha Melanozyten-stimulierendes Hormon
AP	Area postrema
APR	Akute-Phase Reaktion
ARC	Nucleus arcuatus
ATP	Adenosintriphosphat
BHS	Blut-Hirn-Schranke
CART	Cocain and amphetamin regulated transcript
CD	Cluster of differentiation
C/EBP	CCAT/enhancer-binding protein family
COX2	Zyklooxygenase 2
Cre	Cremophor
CREB	cAMP responsive element
CRH	Corticotropin-releasing hormone
CVO	Circumventrikuläres Organ
DAPI	4´6-Diamidin-2´Phenylindol Dilaktat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	Dulbecco´s Modified Eagle Medium
DMH	Dorsomedialer hypothalamischer Nucleus
DNA	Desoxyribonucleic acid
DTT	Dithiothreitol
EBSS	Earle´s Balanced Salt Solution
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
EMA	European medicines agency
FDA	Food and Drug Administration
FKS	Fetales Kälberserum
FRET	Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer
FS-Zellen	Follikulostellate Zellen
GFAP	Glial fibrillary acidic protein
gp	Glykoprotein
HBSS	Hanks´ Balanced Salt Solution
HHL	Hypophysenhinterlappen
HPA	Hypothalamic-pituitary-adrenal
HRP	Horseradish peroxidase
HVL	Hypophysenvorderlappen
HZL	Hypophysenzwischenlappen

## Abkürzungsverzeichnis

---

IFN	Interferon
I $\kappa$ B	Inhibitor of kappa B
IL	Interleukin
IL-1ra	Interleukin-1 Rezeptor Antagonist
iNOS	Induzierbare Stickstoffmonoxid Synthase
i.p.	intraperitoneal
IRAK1	Interleukin-1 receptor-associated kinase 1
JAK	Janus Kinase
LAS	Leptin Antiserum
LH	Lateraler hypothalamischer Nucleus
LPS	Lipopolysaccharid
LTP	Long-term potentiation
MAPK/ERG	Mitogen-activated protein kinase/extracellular signal regulated kinase
MCR	Melanocortin-Rezeptor
ME	Eminentia mediana
MHC	Major histocompatibility complex
MPTP	1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine
mPGES	Mikrosomale Prostaglandin E Synthase
Mir-146a	microRNA 146a
MiRISC	MicroRNA induced silencing complex
mtDNA	Mitochondriale DNA
NF-IL6	Nuclear factor interleukin 6
NF $\kappa$ B	Nuclear factor kappa B
NPY	Neuropeptid Y
NRF1	Nuclear respiratory factor 1
NSS	Normal sheep serum
Ob-R	Leptin Rezeptor
OD	Optische Dichte
OVL	Organum vasculosum laminae terminalis
PAMPS	Pathogen associated molecular patterns
PBS	Phosphate buffered saline
PCB	PBS Coating Buffer
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd
PG	Prostaglandine
PGC-1 $\alpha$	Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)- $\gamma$ coactivator-1 $\alpha$
PL	Posterior lobe
POAH	Präoptische Region des anterioren Hypothalamus
POMC	Proopiomelanocortin
PPAR	Peroxisome proliferator-activated receptor

## Abkürzungsverzeichnis

---

PPRE	Peroxisome proliferator response element
Pre-miRNA	Precursor microRNA
Pri-miRNA	Primary microRNA transcript
PVN	Paraventriculärer Nucleus
RNA	Ribonucleic acid
ROS	Reaktive oxygen species
rpm	rounds per minute
RXR $\alpha$	Retinoid X receptor- $\alpha$
RZG	Rosiglitazon
SB	Substrate Buffer
s.c.	subkutan
SCO	Organum subcommissurale
SFO	Organum subfornicale
SOCS3	Suppressor of cytokine signaling
SON	Nucleus supraopticus
STAT3	Signal transducer and activator of transcription 3
T	Temperature
TFAM	Mitochondrial transcription factor A
TLR	Toll-like receptor
TNF $\alpha$	Tumornekrosefaktor alpha
TNF-R	Tumornekrosefaktor Rezeptor
TRAF6	Tumor necrosis factor-receptor associated family 6
TZD	Thiazolidinedion
VMH	Ventromedialer hypothalamischer Nucleus
vW	von Willebrandt Faktor
WDB	Wash Dilution Buffer
ZNS	Zentrales Nervensystem

## Inhaltsverzeichnis

I. Einleitung .....	11
1. Altern und das Immunsystem .....	11
2. Die systemische Entzündungsreaktion .....	13
2.1 „Sickness behaviour“ .....	13
2.2 Signalwege der systemischen Entzündungsreaktion .....	14
2.2.1 Nervale Signalübertragung .....	14
2.2.2 Humorale Signalübertragung .....	14
2.3 Inflammatorische Mediatoren .....	16
2.3.1 Zytokine .....	16
2.3.2 Transkriptionsfaktoren .....	18
2.3.3 Prostaglandine .....	19
2.3.4 MicroRNAs .....	19
3. Veränderungen der systemischen Entzündungsreaktion im Alter .....	22
4. Leptin .....	25
4.1 Die Rolle von Leptin im Immunsystem .....	29
4.2 Die Rolle von Leptin in der Entzündungsreaktion .....	29
5. Die Rolle von Adipositas in der Entzündungsreaktion .....	31
6. Oxidativer Stress und Altern .....	33
6.1 PGC-1 $\alpha$ .....	33
6.2 Der PPAR- $\gamma$ Agonist Rosiglitazon .....	35
7. Die Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse .....	39
7.1 Die Aktivierung der HPA-Achse durch Zytokine .....	39
7.2 Einfluss des Alterns auf die HPA-Achse .....	40
8. Ziele und Fragestellungen der Arbeit .....	42
II. Material und Methoden .....	45
1. In vitro Modelle .....	48
1.1 Versuchstiere .....	49
1.2 Primäre Zellkultur des Hypophysenvorderlappens .....	49
1.2.1 Versuchsaufbau .....	49
1.2.2 Durchführung .....	50
1.3 Fat Explants .....	53
1.3.1 Versuchsaufbau .....	53

1.3.2 Durchführung .....	53
2. In vivo Modelle .....	56
2.1 Versuchsaufbau .....	57
2.1.1 Studie „Altern“ .....	57
2.1.2 Studie „Leptin Antiserum“ .....	58
2.1.3 Studie „Rosiglitazon“ .....	59
2.2 Intraabdominale Implantation des Radiotransmitters .....	60
2.3 Intraperitoneale Injektionen .....	60
2.3.1 Lipopolysaccharid (LPS).....	60
2.3.2 Leptin Antiserum (LAS) .....	61
2.3.3 Rosiglitazon (RZG).....	61
3. Erfassung physiologischer Daten .....	62
3.1 Telemetrie.....	62
3.1.1 Der Sender.....	62
3.1.2 Der telemetrische Versuchsaufbau und durchgeführte Messungen .....	63
3.2 Perfusion und Organentnahme .....	64
3.3 Gewinnung und Aufbereitung der Blutproben.....	66
3.4 Organverarbeitung am Kryostat für Immunhistochemie und RT-PCR .....	66
4. Erfassung biochemischer Parameter .....	67
4.1 Plasmaprobenanalyse .....	67
4.1.1. Grundlagen des Bioassays.....	68
4.1.2 IL-6 Bioassay .....	68
4.1.3 TNF $\alpha$ Bioassay.....	71
4.1.4 Grundlagen des ELISA .....	72
4.1.5 IL-1ra und IL-10 ELISA .....	74
4.1.6. Leptin ELISA .....	77
4.2 Immunhistochemie und Immunzytochemie .....	78
4.2.1 Grundlagen der Methode.....	79
4.2.2 Antikörper .....	80
4.2.3 Versuchsprotokoll Immunhistochemie .....	81
4.2.4 Versuchsprotokoll Immunzytochemie .....	83
4.2.5 Fluoreszenzmikroskopie und Auswertung .....	83
4.3 Quantitative real-time PCR .....	84

4.3.1 Grundlagen der Methode.....	85
4.3.2 RNA-Extraktion .....	88
4.3.3 cDNA-Synthese.....	89
4.3.4 Durchführung der quantitativen real-time PCR .....	90
4.4 Quantitative real-time PCR für MicroRNAs.....	91
4.4.1 Grundlagen der Methode.....	91
4.4.2 cDNA-Synthese.....	92
4.4.3 Durchführung der quantitativen real-time PCR .....	93
5. Auswertung und Statistik .....	94
5.1 Physiologische Daten .....	94
5.2 Biochemische Parameter .....	94
5.2.1 Bioassay und ELISA .....	94
5.2.2 Immunhistochemie und Immunzytochemie .....	95
5.2.3 Quantitative real-time PCR .....	95
III. Ergebnisse .....	97
1. Altersabhängige Unterschiede in der LPS-bedingten Entzündungsreaktion .....	97
1.1 Einfluss des Alterns auf physiologische Parameter des „sickness behaviours“ ....	98
1.2 Einfluss des Alterns auf zirkulierende Zytokine .....	104
1.3 Altersbedingte Veränderungen der mRNA-Expression inflammatorischer Marker	106
1.4 Altersbedingte Veränderungen der Immunreaktivität inflammatorischer Transkriptionsfaktoren .....	111
1.5 Altersabhängige Unterschiede von zirkulierenden Zytokinen und inflammatorischen Markern zum Zeitpunkt 4 h nach LPS-Injektion.....	116
1.5.1 Konzentration pro- und antiinflammatorischer Zytokine im Blutplasma .....	116
1.5.2 Expressionsmuster inflammatorischer Marker auf mRNA-Ebene.....	117
1.5.3 Expressionsmuster inflammatorischer Marker auf Proteinebene mittels Immunhistochemie .....	118
2. Der Einfluss erhöhter Leptin-Werte und altersassoziierter Adipositas auf die LPS- bedingte Entzündungsreaktion .....	121
2.1 Die Auswirkung von Leptin Antiserum auf physiologische Parameter des „sickness behaviours“.....	122
2.2 Einfluss von Leptin Antiserum auf zirkulierende Zytokine.....	130
2.3 Effekte von Leptin Antiserum auf die mRNA-Expression inflammatorischer Marker .....	132

2.4 Auswirkung von Leptin Antiserum auf die Immunreaktivität inflammatorischer Transkriptionsfaktoren .....	135
2.5 Altersbedingte Veränderungen der Zytokinfreisetzung durch das Fettgewebe .....	137
3. Altersabhängige Einflüsse des PPAR $\gamma$ -Agonisten Rosiglitazon auf die LPS-bedingte Entzündungsreaktion .....	140
3.1 Auswirkung von Rosiglitazon auf physiologische Parameter des „sickness behaviours“ .....	141
3.2 Einfluss von Rosiglitazon auf zirkulierende Zytokine .....	148
3.3 Effekte von Rosiglitazon auf die mRNA-Expression inflammatorischer Marker ...	150
3.4 Auswirkung von Rosiglitazon auf die Proteinexpression von Markern für oxidativen Stress (In Kooperation mit Dr. Wenz) .....	156
4. Charakterisierung altersbedingter Veränderungen in der Aktivierung der HPA-Achse durch LPS und „novel environment“ Stress .....	157
4.1 Altersabhängige Unterschiede in der Zytokinfreisetzung in der LPS-stimulierten primären HVL-Zellkultur .....	157
4.1.1 Konzentration proinflammatorischer Zytokine im Überstand der HVL-Zellkultur .....	157
4.1.2 Expressionsmuster von NF-IL6, TNF $\alpha$ und ACTH auf Proteinebene mittels Immunhistochemie in der HVL-Zellkultur .....	159
4.2 Altersbedingte Unterschiede in der mRNA-Expression und Immunreaktivität inflammatorischer Transkriptionsfaktoren nach LPS-Stimulus in der Hypophyse .....	162
4.2.1 Altersbedingte Unterschiede in der mRNA-Expression .....	162
4.2.3 Altersbedingte Unterschiede in der Immunreaktivität .....	163
4.3 Altersbedingte Veränderungen physiologischer Reaktionen auf eine neue Umgebung .....	167
IV. Diskussion .....	170
1. Altersabhängige Veränderungen in der Entzündungsreaktion nach LPS-Stimulus auf verschiedenen Ebenen .....	170
1.1 Veränderungen der „sickness response“ im Altern .....	170
1.2 Altersbedingte Veränderungen peripherer und zentraler inflammatorischer Parameter basal und nach Immunstimulus .....	171
1.3 Veränderungen oxidativer Stressmarker im Altern und nach LPS-Stimulus .....	176
1.4 Potentielle Bedeutung von mir-146a in der altersabhängigen Veränderungen der LPS-induzierten Inflammation .....	178
2. Der Einfluss von Leptin auf die altersbedingten Veränderungen in der systemischen Entzündungsreaktion .....	180

2.1 Altersabhängige Auswirkungen der LAS-Behandlung auf die „sickness response“ und periphere sowie zentrale inflammatorische Parameter.....	180
2.2 Beurteilung der Ergebnisse der LAS-Behandlung im Hinblick auf den experimentellen Versuchsaufbau und die altersassoziierte Leptin-Resistenz.....	182
3. Veränderungen in der Zytokinfreisetzung durch das Fettgewebe im Alter .....	184
4. Altersabhängige Auswirkungen des PPAR $\gamma$ -Agonisten Rosiglitazon auf die LPS-induzierte Entzündungsreaktion.....	186
4.1 Einfluss einer Rosiglitazon-Behandlung im Kontext von inflammatorischen und neurodegenerativen Krankheitsbildern.....	186
4.2 Beurteilung der Effekte von Rosiglitazon auf die LPS-induzierte Entzündungsreaktion bei jungen und alten Ratten.....	187
4.3 Ausblick für die Rosiglitazon-Forschung .....	189
4.4 Cremophor® EL als Lösungsvermittler.....	190
5. Altersbedingte Veränderungen in der Aktivierung der HPA-Achse.....	192
5.1 Unterschiede in der Zytokinfreisetzung des Hypophysenvorderlappens (HVL) junger und alter Ratten .....	192
5.2 Unterschiede in der Expression inflammatorischer Transkriptionsfaktoren in der Hypophyse junger und alter Ratten.....	194
5.3 Altersbedingte Veränderungen in der Temperaturerhöhung auf einen psychologischen Stressor .....	196
6. Gesamtbetrachtung der hier untersuchten Unterschiede von jungen und alten Ratten nach inflammatorischem und psychischem Stress.....	197
V. Zusammenfassung .....	201
VI. Summary .....	204
VII. Literatur .....	207
VIII. Anhang .....	235
1. Publikationen.....	235
1.1 Originalarbeiten in Fachzeitschriften.....	235
1.1 Zitierbare Kurzmitteilungen.....	235
2. Danksagung.....	236
3. Erklärung.....	237

## **I. Einleitung**

### **1. Altern und das Immunsystem**

Der Alterungsprozess geht mit einer Reihe von Veränderungen auf Organ- und zellulärer Ebene einher, welche oftmals zu einer Abnahme von physiologischen Funktionen führen.

Altersbedingte Veränderungen des Immunsystems werden unter dem Begriff „Immunoseneszenz“ zusammengefasst und betreffen sowohl das angeborene als auch das adaptive Immunsystem (Pfister & Savino 2008). So sind verschiedene Komponenten des angeborenen Immunsystems (dendritische Zellen, neutrophile Granulozyten, natürliche Killerzellen) im Alter durch eine verringerte Proliferation, Antigenpräsentation, Phagozytose und Chemotaxis charakterisiert. Des Weiteren führt das Altern physiologischerweise zu einer Involution des Thymus als wichtiges Organ des adaptiven Immunsystems, was zu einer drastisch verringerten Freisetzung naiver T- und B-Zellen führt, die sich noch auf neue Antigene prägen können (Ponnappan & Ponnappan 2011; Corona et al. 2012). Als Folge hiervon sind ältere Bevölkerungsgruppen einem höheren Infektionsrisiko ausgesetzt, welches mit einer ebenfalls erhöhten Mortalitätsrate einhergeht (Pinner et al. 1996; Ginaldi et al. 2001; Laupland et al. 2003; Krabbe et al. 2004). Des Weiteren leiden ältere Personen im Rahmen einer Infektionskrankheit häufig an Begleiterscheinungen wie Delirium, Depression oder kognitiven Beeinträchtigungen (Jackson et al. 2004). Komplexe Veränderungen der Komponenten des Immunsystems tragen zu diesen Beeinträchtigungen im Altern bei. Als eines der Hauptmerkmale des Alterns wird mittlerweile das Vorliegen einer chronischen, subklinischen Inflammation angesehen. Ältere Individuen sind somit auch ohne Kontakt mit einem entzündungsauslösenden Immunstimulus durch eine erhöhte Expression inflammatorischer Marker sowohl in der Peripherie, welche periphere Organe und den Blutkreislauf umfasst, als auch zentral im Gehirn charakterisiert (Krabbe et al. 2004). Diese Veränderungen wirken sich auch auf die systemische Entzündungsreaktion aus, bei welcher durch einen Immunstimulus die angeborene Immunantwort ausgelöst wird, und welche in der vorliegenden Arbeit genauer untersucht werden soll. Da die erhöhte Inflammation im Altern eine wichtige Komponente darstellt, deren Auswirkungen und mögliche Implikation in diverse altersbegleitende Krankheitsbilder, unter anderem Alzheimer (Blasko et al. 2004), Parkinson, Atherosklerose und Sarkopenie, immer deutlicher wird (Wick et al. 2000; Krabbe et al. 2004), gewinnt die Erforschung ihrer Ursachen zunehmend an Bedeutung. Die zugrundeliegenden Ursachen werden nicht mehr nur auf Ebene des Immunsystems erforscht, sondern es geraten zunehmend auch andere Bereiche in den Fokus, die zu diesen Veränderungen beitragen könnten. Eine wichtige Komponente, die oftmals mit dem Älterwerden korreliert, ist eine Zunahme an Fettmasse und Abnahme an Muskelmasse, welches zur sogenannten altersassoziierten Adipositas führt. Das Fettgewebe gilt mittlerweile nicht mehr nur als Speicherort für Lipide sondern ihm wird eine bedeutende Rolle als endokrines Organ und Produktionsort für inflammatorische Faktoren wie Zytokine zuerkannt. Inzwischen ist bekannt, dass eine chronische periphere Inflammation ebenfalls ein Hauptmerkmal der Adipositas ist und das expandierende Fettgewebe einen zentralen Faktor für die Entstehung derselben darstellt (Maury & Brichard 2010). Neben den Zytokinen ist das Fettgewebe Bildungsort weiterer Adipokine, zu denen beispielweise unter anderem das

Fettgewebshormon Leptin gehört. Neben seiner primär bekannten Rolle im Energiehaushalt gilt Leptin zunehmend als wichtiger inflammatorischer Mediator in der Entzündungsreaktion und wird als sogenanntes zytokin-ähnliches Hormon beschrieben (Carlton et al. 2012). Sowohl bei adipösen als auch bei älteren Individuen liegen häufig erhöhte Plasmawerte dieses Hormons vor und beide Gruppen zeichnen sich durch eine veränderte Entzündungsreaktion als Antwort auf einen Immunstimulus aus (Li et al. 1997; Pohl et al. 2009). Somit ergeben sich deutliche Anhaltspunkte, den Einfluss des Fettgewebes und der erhöhten Leptinwerte auf die erhöhten Zytokinwerte und die veränderte Entzündungsreaktion im Alter genauer zu untersuchen.

Als weiterer wichtiger Begleitfaktor des Alterns gilt eine Zunahme an freien Sauerstoffradikalen und dadurch verursachten oxidativen Schäden auf zellulärer Ebene, insbesondere in den Mitochondrien. Hieraus hat sich die sogenannte „mitochondriale Theorie des Alterns“ entwickelt, welche eine Zunahme an mitochondrialen Schäden und Mutationen und damit einhergehender erhöhter Freisetzung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) als Ursache für viele altersbedingte Krankheitsbilder postuliert (Greaves & Turnbull 2009). Da ROS unter anderem auch proinflammatorische Faktoren aktivieren können, könnte die altersbedingte mitochondriale Dysfunktion auch an dem Entstehen der chronischen altersassoziierten Inflammation beteiligt sein (Chung et al. 2011).

## **2. Die systemische Entzündungsreaktion**

Die Entzündung oder Inflammation beschreibt generell eine Reaktion des Körpers auf einen schädigenden Stimulus, welche sich zu Beginn meist lokal im vaskularisierten Gewebe abspielt. Neben chemischen oder physikalischen Reizen zählen auch infektiöse Erreger zu den auslösenden Stimuli. Hierzu gehört unter anderem das Lipopolysaccharid (LPS), ein Zellwandbestandteil gramnegativer Bakterien (Freundenberg & Galanos 1990), welches in seiner purifizierten Form häufig in experimentellen Studien eingesetzt wird, um eine Entzündungsreaktion auszulösen. LPS wird den sogenannten „pathogen associated molecular patterns“ oder PAMPs zugeordnet, bei denen es sich um hochkonservierte Strukturen pathogener Erreger handelt, die von Zellen des angeborenen Immunsystems, wie Granulozyten oder Makrophagen, als körperfremd erkannt werden und eine Abwehrreaktion hervorrufen können (Schnare et al. 2006).

Überschreitet die lokale Entzündung eine gewisse Stärke, gelangen endogene Mediatoren oder infektiöse Bestandteile in die systemische Zirkulation und werden über die Blutbahn im Organismus verteilt. Die nun systemisch gewordene Entzündungsreaktion resultiert in der sogenannten Akute-Phase Reaktion (APR), welche die Gesamtheit multifaktorieller Reaktionen des Organismus auf eine Infektion, Verletzung oder Trauma umfasst (Baumann & Gauldie 1994; Roth et al. 2006).

Einige dieser Reaktionen werden vom zentralen Nervensystem gesteuert und unter dem Begriff „sickness behaviour“ zusammengefasst.

### **2.1 „Sickness behaviour“**

Das „sickness behaviour“ besteht aus einer Reihe zentralnervös kontrollierter Krankheitssymptome die im Rahmen einer systemischen Entzündungsreaktion ausgelöst werden und beinhaltet die Entwicklung einer Fieberreaktion, eine reduzierte Futter- und Wasseraufnahme (Anorexie und Adipsie) gekoppelt mit einer daraus resultierenden Gewichtsabnahme, eine erniedrigte lokomotorische Aktivität (Lethargie), verminderte Aufmerksamkeit und soziale Interaktion (Dantzer et al. 1998). Diese Mechanismen stellen ein adaptives Verhalten des Organismus dar welches zur Bekämpfung der Infektion beiträgt (Hart 1988). So bewirkt z.B. die Entwicklung einer erhöhten Körpertemperatur (Fieber) eine Proliferation von Immunzellen, eine Verschiebung des Temperaturoptimums vieler Bakterien, sowie eine Erniedrigung der für das mikrobielle Wachstum wichtigen Eisen- und Zinkgehalte im Blut (Dantzer 2001) und steht in positiver Korrelation mit einer erniedrigten Morbidität und Mortalität bei Infektionen (Bryant et al. 1971; Weinstein et al. 1978; Mackowiak et al. 1980).

Das wichtigste thermoregulatorische Kontrollzentrum befindet sich in der präoptischen Region des anterioren Hypothalamus (POAH) (Romanovsky 2007) und kann auf unterschiedlichen Wegen bei einer Infektion aktiviert werden.

## 2.2 Signalwege der systemischen Entzündungsreaktion

### 2.2.1 Nervale Signalübertragung

Es werden zwei mögliche Wege diskutiert, auf denen die am Entzündungsort gebildeten Mediatoren das inflammatorische Signal an das zentrale Nervensystem (ZNS) weiterleiten.

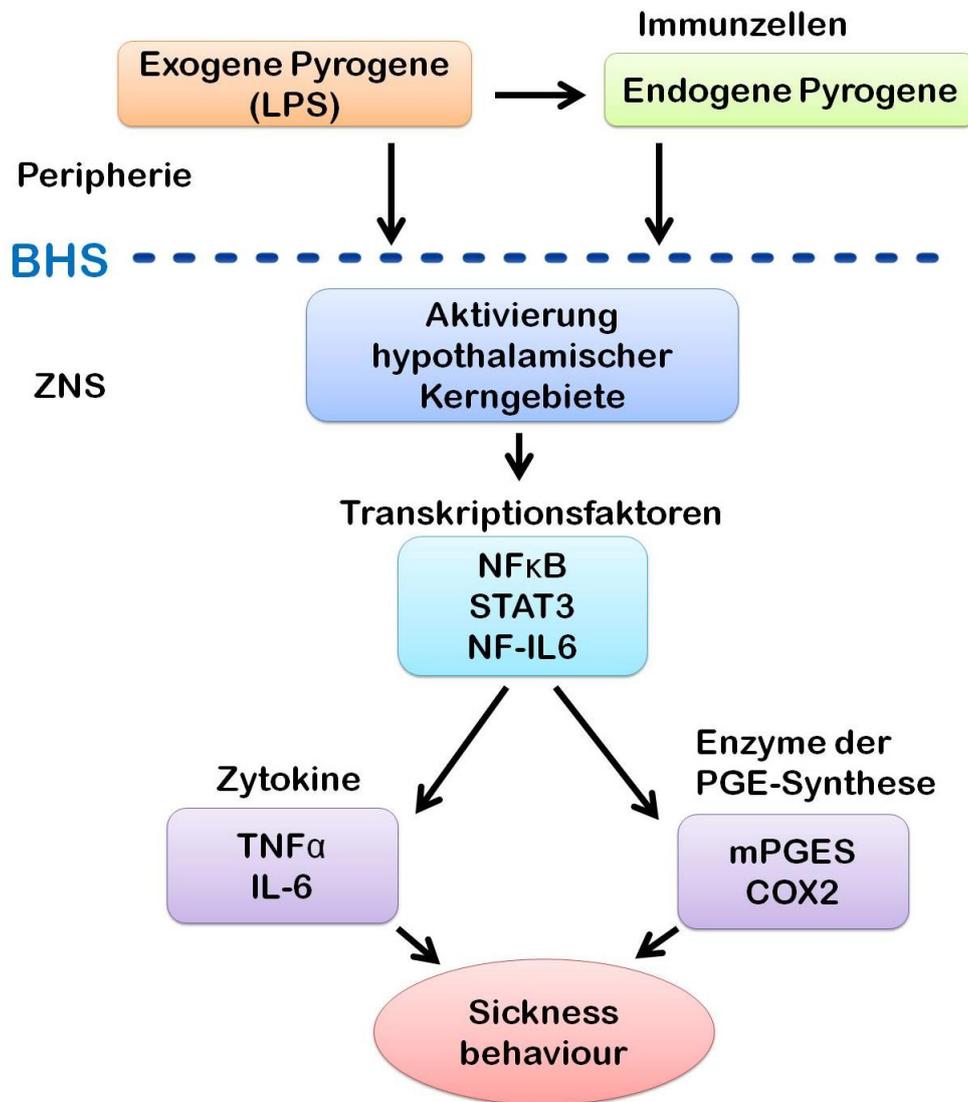
Der frühe Induktionsweg findet sehr rasch nach dem Auftreten einer Entzündung statt, meist noch bevor größere Mengen inflammatorischer Mediatoren im Blutkreislauf vorzufinden sind. Es handelt sich hierbei um den sogenannten nervalen Signalweg, bei dem am Entzündungsort produzierte Mediatoren Afferenzen des *Nervus vagus* und kutaner sensorischer Nerven stimulieren und das Signal in Form von Aktionspotentialen ans ZNS weiterleiten (Dantzer et al. 2000; Ross et al. 2000; Roth & De Souza 2001; Blatteis 2006). Bei dieser Art der Signalübertragung spielen Kupfferzellen der Leber eine große Rolle, welche in einem sehr frühen Stadium der Immunstimulation über Komponenten des Komplementsystems aktiviert werden. Die Kupfferzellen produzieren daraufhin ihrerseits endogene Mediatoren und aktivieren darüber hepatische Afferenzen des *Nervus vagus*, welche anschließend in die Medulla oblongata und von dort aus in die thermoregulatorische präoptische Region des anterioren Hypothalamus projizieren (Blatteis 1997; Li et al. 1999).

### 2.2.2 Humorale Signalübertragung

Neben diesem frühen Induktionsweg spielt vor allem der sogenannte humorale Signalweg eine große Rolle bei der Fieberentstehung. Exogene Pyrogene (z.B. LPS) können entweder selbst über die Blutbahn das Gehirn erreichen und ihre jeweiligen Rezeptoren (z.B. „toll-like receptor 4“) aktivieren, oder sie bewirken zuerst die Produktion endogener Pyrogene (z.B. Zytokine) durch Immunzellen, welche dann ihrerseits über die Blutbahn den Hypothalamus erreichen (Abbildung 1). Das ZNS ist gegenüber dem peripheren Blutkreislauf von einer dichten Blut-Hirn-Schranke (BHS) abgegrenzt, welche die hochmolekularen Zytokine nicht passieren können. Für die Signalweiterleitung über den humoralen Weg werden deshalb folgende Mechanismen beschrieben:

- 1) Zytokine können mit spezifischen Rezeptoren an Endothelzellen der Bluthirnschranke interagieren, welche dann die Produktion und Freisetzung sekundärer Mediatoren in das Gehirn bedingen (Matsumura & Kobayashi 2004).
- 2) Zytokine gelangen über aktive, gesättigte Transportmechanismen, die spezifisch für individuelle Zytokine sind, in das Gehirngewebe (Banks et al. 1995).
- 3) Zytokine agieren an Gebieten des Hypothalamus mit einer veränderten Bluthirnschranke, welche durchlässig für diese Moleküle ist (Roth et al. 2004). Hierbei handelt es sich um die circumventrikulären Organe (CVOs), welche direkt von den Zytokinen erreicht werden können. Zu den CVOs gehören das *Organum vasculosum laminae terminalis* (OVLT), das *Organum subfornicale* (SFO), die *Eminentia mediana* (ME), die Epiphyse, das *Organum subcommissurale* (SCO), die Neurohypophyse und die *Area postrema* (AP) (McKinley et al. 2003). Eine Subgruppe dieser CVOs, die sensorischen CVOs, zeichnet sich zusätzlich durch Neuronenzellkörper aus und spielt dementsprechend eine große Rolle bei der Weiterleitung von Signalen aus der Zirkulation in andere Gehirnareale. Sie umfasst das OVLT, das SFO und die AP.

Nach Passage der Bluthirnschranke binden die exo- (wie LPS) oder endogenen Pyrogene (wie Zytokine) daraufhin an spezifische Rezeptoren von Zellen der Hirngefäße oder des Gehirnparenchyms und aktivieren Transkriptionsfaktoren, welche dann ihrerseits die Expression sekundärer Mediatoren im ZNS induzieren.



**Abbildung 1: Schematische Darstellung des humoralen Signalwegs**

Exogene Pyrogene (z.B. Lipopolysaccharid) aktivieren Immunzellen in der Peripherie und induzieren die Produktion von endogenen Pyrogenen (z.B. Zytokine). Über die Blutzirkulation erreichen die endogenen Pyrogene die Bluthirnschranke und können über verschiedene Mechanismen (siehe Kapitel 2.2.2) hypothalamische Kerngebiete aktivieren. In den aktivierten Gehirnzellen werden über proinflammatorische Transkriptionsfaktoren lokal weitere Entzündungsmediatoren wie Zytokine oder Enzyme der Prostaglandinsynthese produziert, welche im ZNS zu der Entstehung entsprechender Krankheitssymptome, dem „sickness behaviour“, beitragen. NFκB, „nuclear factor kappa B“; STAT3, „signal transducer and activator of transcription“ 3; NF-IL6, „nuclear factor interleukin 6“; TNFα, Tumornekrosefaktor alpha; mPGES, mikrosomale Prostaglandin E Synthase; COX2, Zyklooxygenase 2.

## 2.3 Inflammatorische Mediatoren

### 2.3.1 Zytokine

Bei Zytokinen handelt es sich um hoch induzierbare, lösliche Proteine, Glykoproteine oder Polypeptide, die überwiegend von immunkompetenten Zellen produziert werden und deren Hauptaufgabe in der Regulation und Koordination der Immunantwort besteht. Neben der Peripherie konnte auch im ZNS die Expression von Zytokinen und ihrer Rezeptoren durch gliale oder neuronale Zelltypen nachgewiesen werden (Conti et al. 2004). Zytokine wirken entweder lokal auf die Zelle selbst (autokrin) bzw. auf benachbarte Zellen (parakrin) oder werden in den Blutkreislauf abgegeben (endokrin). Sie aktivieren Komponenten des angeborenen Immunsystems wie Makrophagen, oder induzieren im adaptiven Immunsystem die Differenzierung und Aktivierung von Lymphozyten.

In der Peripherie erkennen Zellen des angeborenen Immunsystems wie neutrophile Granulozyten, Makrophagen und Monozyten PAMPs, wie zum Beispiel LPS, über spezielle „pattern-recognition receptors“, in diesem Fall „toll-like receptor 4“ (Beutler 2002). Dies führt zur Produktion und Freisetzung von Zytokinen, welche über den humoralen Signalweg Rezeptoren an der Bluthirnschranke oder im Gehirngewebe aktivieren und somit die Produktion von weiteren Zytokinen im Gehirn bewirken.

#### **TNF $\alpha$**

Tumornekrosefaktor (TNF)  $\alpha$  ist einer der Hauptmediatoren der akuten Entzündungsreaktion und wird von mononukleären Phagozyten, natürlichen Killerzellen, Mastzellen und T-Zellen gebildet. TNF $\alpha$  steigt als eines der ersten Zytokine in der frühen Phase der LPS-stimulierten Entzündungsreaktion im Serum an und korreliert ebenfalls mit der initialen Phase der Hypothermie, welche dem Fieberanstieg oftmals vorangeht, so dass diesem Molekül sowohl pyrogene als auch antipyretische Effekte zugeschrieben werden (Jansky et al. 1995). TNF $\alpha$  kann an zwei ubiquitär exprimierte Rezeptoren binden, TNF-R Typ I (p55) und TNF-R Typ II (p75). Über Aktivierung des Transkriptionsfaktors „nuclear factor“ (NF) $\kappa$ B induziert es die Genexpression proinflammatorischer Proteine, unter anderem Interleukin (IL)-1, und ist somit wahrscheinlich an der Fieberentwicklung beteiligt (Dinarello et al. 1986; Wajant et al. 2003).

#### **IL-1 $\beta$**

Das Zytokin Interleukin 1 existiert in zwei verschiedenen Formen,  $\alpha$  und  $\beta$ , von denen für die vorliegende Arbeit vor allem auf letzteres näher eingegangen werden soll. Nach Stimulation mit LPS und anderen Immunstimuli findet man erhöhte Level von IL-1 $\beta$  im Blutplasma und in der Zerebrospinalflüssigkeit. Die Applikation von IL-1 $\beta$  löst eine Fieberreaktion in verschiedenen Tierespezies und im Menschen aus (Tewari et al. 1990; Anforth et al. 1998). IL-1 $\beta$  gilt als ein wichtiges Zytokin für die Fieberentstehung und kann ebenfalls die Synthese weiterer wichtiger pro- (TNF $\alpha$  und IL-6) und antiinflammatorischer (IL-1 Rezeptor Antagonist [IL-1ra] und IL-10) Mediatoren in Makrophagen, Endothelzellen und Mikrogliazellen induzieren (Marsh & Wewers 1994; Foey et al. 1998; Konsman et al. 2000).

Die Verminderung von IL-1 $\beta$ -induziertem Fieber durch Vorbehandlung mit seinem Antagonisten IL-1ra bestätigt die direkte Rolle dieses Zytokins in der Entstehung der

Fieberantwort (Opp & Krueger 1991). IL-1 $\beta$  wirkt über den IL-1 Rezeptor Typ I, welcher zur Familie der „toll-like“ Rezeptoren gehört und über NF $\kappa$ B zur Induktion der Expression seiner Zielgene führt.

### **IL-6**

Interleukin 6 wird nach Stimulation mit verschiedenen infektiösen und entzündlichen Stimuli in diversen Zelltypen, unter anderem Monozyten, Endothelzellen, Fibroblasten, Gliazellen und Neuronen transkribiert (Frei et al. 1989). IL-6 gilt als wichtiges endogenes Pyrogen, dessen Anstieg im Blutplasma mit dem Anstieg der Körperkerntemperatur korreliert. Während einer Fieberreaktion steigt die Konzentration von IL-6 ebenfalls in der Zerebrospinalflüssigkeit an (Ueno et al. 1989; Coceani et al. 1993). Obwohl die alleinige Administration von IL-6 nur zu einer moderaten Erhöhung der Körpertemperatur führt (Harré et al. 2002), zeigen Studien an IL-6-defizienten Mäusen, die nach LPS- oder IL-1 $\beta$ -Stimulation keine Fieberentwicklung zeigten, dass dieses Zytokin eine wichtige Rolle bei der Fieberantwort spielt (Chai et al. 1996; Kozak et al. 1998). IL-6 bindet an seinen Rezeptor, welcher über gp (Glykoprotein)130 die Phosphorylierung und Aktivierung von Janus Kinasen und schlussendlich über den Transkriptionsfaktor STAT3 die Expression von Zielgenen veranlasst (Kishimoto et al. 1992) zu denen auch wichtige Enzyme der Prostaglandinsynthese gehören (Rummel et al. 2006; Rummel et al. 2011).

### **IL-1ra**

Interleukin 1 Rezeptor Antagonist (IL-1ra) wirkt als endogener Antagonist von IL-1 $\alpha$  und IL-1 $\beta$ , indem es ebenfalls an den IL-1 Rezeptor Typ I bindet, ohne jedoch die durch IL-1 auslösbare Signalkaskade zu aktivieren (Hannum et al. 1990). Die IL-1ra Produktion wird dosisabhängig durch IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  und TNF $\alpha$  induziert und scheint demnach eine bedeutende Rolle als negativer endogener Regulator für die Aktivität dieser Zytokine zu spielen (Marsh & Wewers 1994). Am Entzündungsort soll die lokale Produktion von endogenem IL-1ra die Fieberantwort abschwächen. Lokale LPS-Applikation führt zu einer lokalen Erhöhung der Konzentrationen von IL-1 $\alpha$  und IL-1 $\beta$ , gefolgt von einem späteren Anstieg der IL-1ra Level (Cartmell et al. 2001). Des Weiteren konnten durch zentrale Applikation von IL-1ra die fieberinduzierenden Effekte einer zentralen IL-1 $\beta$ -Injektion blockiert werden (Opp & Krueger 1991).

### **IL-10**

Interleukin 10 ist ein antiinflammatorisch und antipyretisch wirkendes Zytokin welches unter anderem von T-Zellen, Monozyten und Makrophagen gebildet wird. IL-10 verhindert die Synthese proinflammatorischer Zytokine wie IL-1, IL-6 und TNF $\alpha$  indem es die nukleäre Translokation von NF $\kappa$ B oder dessen Bindung an die DNA blockiert (Schottelius et al. 1999). Experimentelle IL-10 Applikation verhindert die Entwicklung von LPS-induziertem Fieber und IL-10 defiziente Mäuse reagieren auf LPS-Stimulation mit stärkerem Fieber und erhöhter Mortalität (Leon et al. 1998; Leon et al. 1999).

### 2.3.2 Transkriptionsfaktoren

Allgemein vermitteln Transkriptionsfaktoren die genomische Zellaktivierung. Nach Bindung der entsprechenden Liganden (hier exo- oder endogene Pyrogene) an den Rezeptor wird eine intrazelluläre Signalkaskade ausgelöst, welche die Translokation des aktivierten Transkriptionsfaktors in den Zellkern zur Folge hat. Nach Bindung des Transkriptionsfaktors an regulatorische Elemente der DNA wird die Transkription von Zielgenen initiiert (Johnson & McKnight 1989; Schindler & Darnell 1995).

Im Zusammenhang mit der systemischen Entzündungsreaktion existieren drei wichtige inflammatorische Transkriptionsfaktoren, welche für die Bildung von Entzündungsmediatoren wie Zytokinen und Prostaglandinen in der Peripherie und im ZNS eine zentrale Rolle spielen und somit die Entstehung zentralnervös kontrollierter Krankheitssymptome regulieren.

#### **NFκB**

„Nuclear factor“ κB besteht aus den Untereinheiten p50 und p65 und wird in der ruhenden Zelle über eine Komplexbildung mit „inhibitor of“ κB (IκB)-Proteinen an der nukleären Translokation gehindert (Baeuerle & Baltimore 1996). Erst nachdem ein PAMP wie LPS oder das Zytokin IL-1β an den entsprechenden Rezeptor (LPS an TLR4 oder IL-1β an IL-1R1) gebunden hat wird eine intrazelluläre Signalkaskade initiiert, die eine Freisetzung von NFκB und anschließende Translokation in den Zellkern zur Folge hat, wo NFκB die Genexpression der jeweiligen Zielgene beeinflusst (Baeuerle & Henkel 1994). Als wichtiger Transkriptionsfaktor der Entzündungsreaktion beeinflusst NFκB unter anderem die Expression diverser Entzündungsmediatoren (TNFα, IL-6, IL-1β) (Lawrence et al. 2001; Kielian 2006).

#### **STAT3**

Der „signal transducer and activator of transcription 3“ ist eines der 7 Mitglieder der STAT-Familie und wird allgemein vor allem durch Zytokine der IL-6, IL-10 und Interferon (IFN)-Familie beeinflusst (Kisseleva et al. 2002). Die Signaltransduktion wird über rezeptorassoziierte Tyrosinkinase der JAK (Janus-Kinase)-Familie vermittelt. Nach erfolgter Aktivierung von STAT3-Monomeren durch Phosphorylierung schließen sich diese zu Homo- oder Heterodimeren mit anderen Transkriptionsfaktoren zusammen und wandern in den Zellkern ein (Heinrich et al. 1998).

#### **NF-IL6**

„Nuclear factor“ IL-6 gehört zu der „CCAAT/enhancer-binding protein family“ (C/EBP) und ist unter anderem an der Zellproliferation und -differenzierung, der Bildung des Langzeitgedächtnisses und der Inflammation beteiligt (Taubenfeld et al. 2001; Ramji & Foka 2002; Nerlov 2007). Als inflammatorischer Transkriptionsfaktor wird NF-IL6 durch LPS und Zytokine wie IL-6 aktiviert und ist an der Expression von Zielgenen wie z.B. COX2, mPGES, IL-6 und IL-1β beteiligt (Akira & Kishimoto 1992; Ramji & Foka 2002; Uematsu et al. 2002; Chun & Surh 2004).

Neben den bereits beschriebenen Zytokinen und Transkriptionsfaktoren sind für die vorliegende Arbeit vor allem Prostaglandine und die erst kürzlich entdeckten microRNAs in ihrer Rolle als Vermittler der inflammatorischen Signalkaskade relevant.

### 2.3.3 Prostaglandine

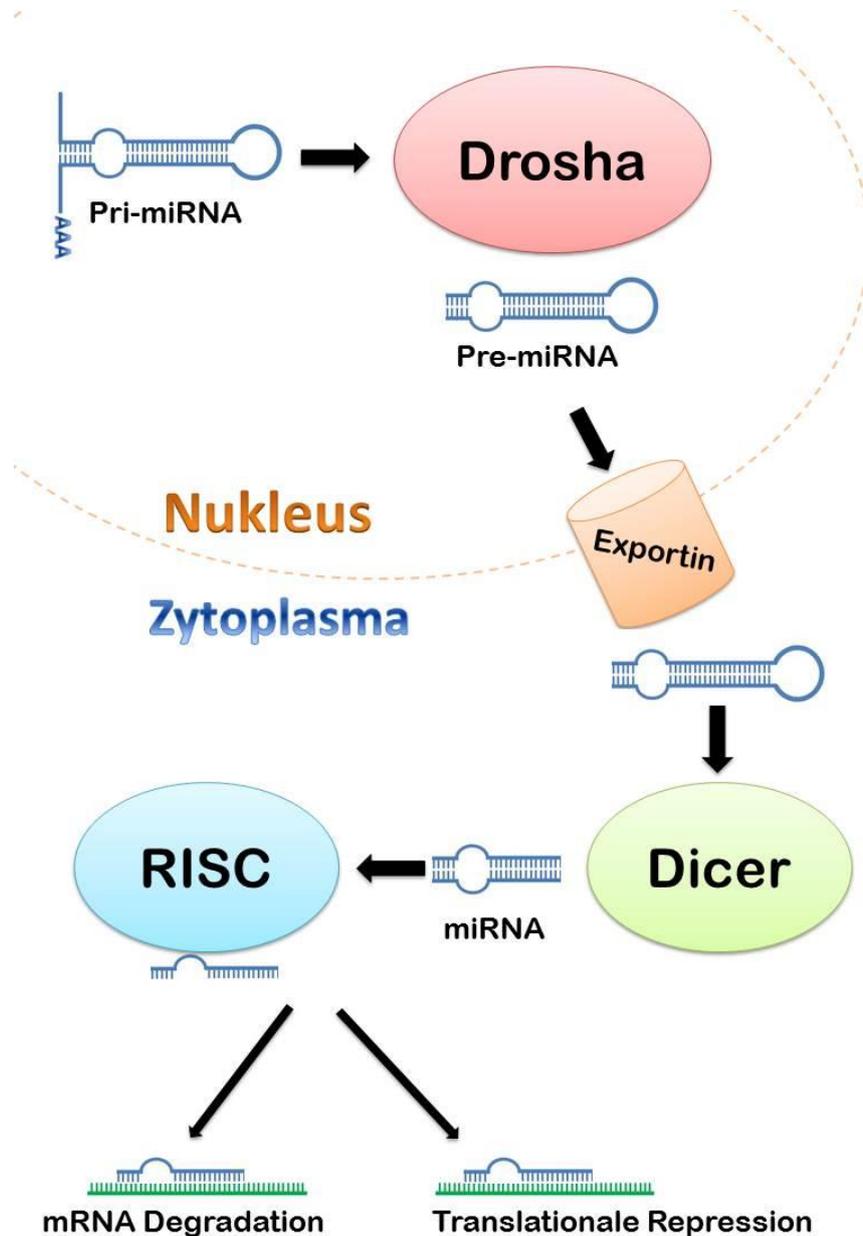
Prostaglandine (PG), unter anderem  $\text{PGE}_2$ , sind wichtige Entzündungsmediatoren und maßgeblich an der Entstehung der Fieberreaktion beteiligt. Prostaglandine werden in mehreren Schritten aus der Arachidonsäure der Zellmembran hergestellt. Als wichtige Schlüsselenzyme für die Regulation der Prostaglandinbildung und damit einhergehend für die Ausbildung des „sickness behaviours“ gelten vor allem die Zyklooxygenase 2 (COX2) und die mikrosomale Prostaglandin E Synthase (mPGES) (Zhang et al. 2003; Park et al. 2006).  $\text{PGE}_2$  gilt als entscheidender terminaler Mediator der Fieberantwort. Es wird bereits in der Peripherie in Kupfferzellen der Leber gebildet und leitet die frühe Phase der Fieberentstehung ein (Perlik et al. 2005; Li et al. 2006), indem es vagale Afferenzen stimuliert oder das Gehirn über den Blutweg erreicht, da es als kleines lipophiles Molekül die Bluthirnschranke passieren kann. Über den humoralen Signalweg wird außerdem seine Bildung zentral im Gehirn induziert, indem die Expression der Regulationsenzyme COX2 und mPGES durch Entzündungsmediatoren gesteigert wird (Cao et al. 1995; Elmquist et al. 1997; Yamagata et al. 2001; Gaetano et al. 2010).

### 2.3.4 MicroRNAs

1993 wurde ein neuer bis dato unbekannter Mechanismus zu Genregulation entdeckt, welcher bis heute Gegenstand intensiver Forschung ist. Bei den MicroRNAs (miRNAs) handelt es sich um nichtkodierende RNAs von einer Länge von circa 21 Nukleotiden, welche in die posttranskriptionale Genregulation eingebunden sind und unter anderem zur Hemmung der Proteintranslation führen (Lee et al. 1993). Obwohl die microRNAs ein junges Forschungsgebiet sind bestehen bereits eindeutige Hinweise, dass sie als Schlüsselregulatoren in vielfältige elementare Prozesse wie Zellproliferation und –differenzierung, Apoptosis, Signaltransduktion und Organentwicklung, sowie auch in verschiedene Krankheitsbilder wie muskuläre, kardiovaskuläre und neurodegenerative Krankheiten und Tumorentstehung impliziert sind (Sonkoly et al. 2008). Mittlerweile wurde auch ein Einwirken dieser Regulatoren in die Immunantwort, die Entzündungsreaktion und inflammatorische Krankheitsprozesse nachgewiesen (Sonkoly et al. 2008).

Nach Transkription der betreffenden Sequenz aus der DNA entsteht zunächst das „primary miRNA transcript“ (pri-miRNA), welches bis zu mehrere Kilobasen lang sein kann und charakteristischerweise in Haarnadelstrukturen faltet (Abbildung 2). Die pri-miRNA wird durch die Endonuklease Drosha in die lediglich 60 – 80 Basenpaare lange „precursor miRNA“ (pre-miRNA) prozessiert, welche über den Nuklear-Export-Faktor Exportin 5 aus dem Zellkern in das Zytoplasma transportiert wird. Durch Abspaltung der Haarnadel-Struktur über eine zweite Endonuklease Dicer entsteht ein circa 21 Nukleotid langes doppelsträngiges RNA Molekül, von dem ein Strang verworfen wird. Der andere Strang, welcher jetzt die mature miRNA darstellt, wird in einen Multi-Enzymkomplex eingebaut, den „miRNA induced silencing complex“ (miRISC). Die Interaktion der im Multi-Enzymkomplex enthaltenen muren miRNA mit ihrer Ziel-mRNA erfolgt über Basenpaarung und kann über

zwei verschiedene Wirkweisen die Proteinkodierung unterbinden. Bei perfekter Basen-Komplementarität zwischen miRNA und Ziel-mRNA wird die Ziel-mRNA endonukleolytisch gespalten, während es bei imperfekter Komplementarität zur Hemmung der Proteintranslation kommt (Filipowicz et al. 2008).

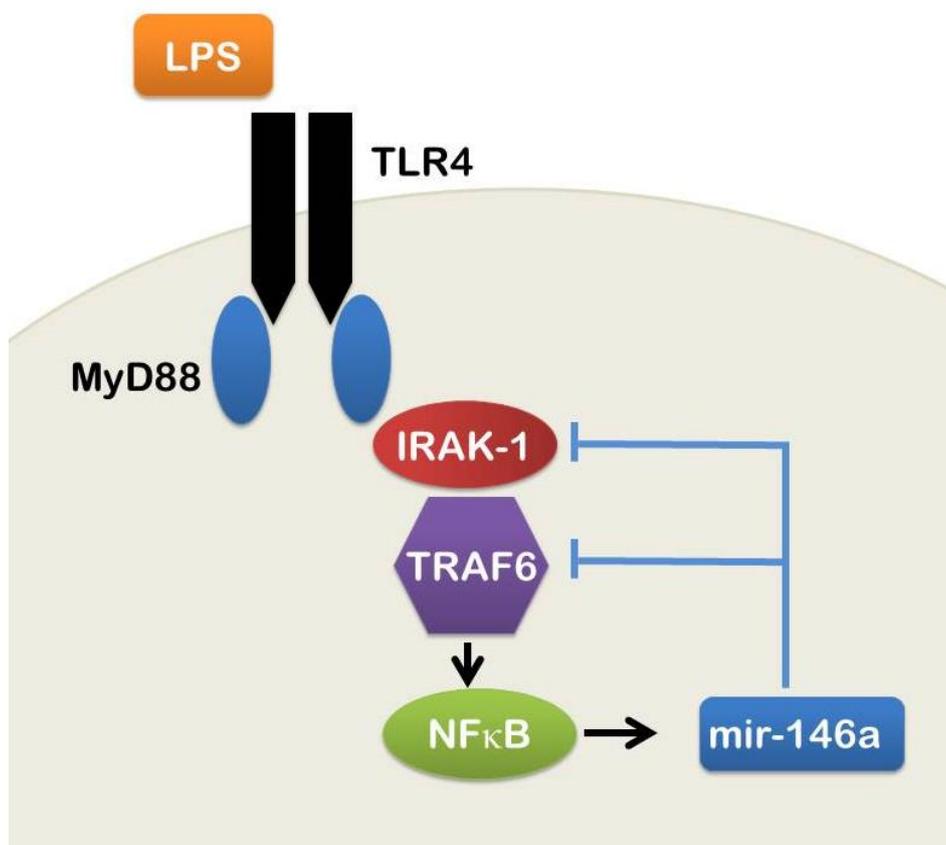


**Abbildung 2: Schematische Darstellung der microRNA-Synthese und Funktion**

Das aus der DNA transkribierte „primary miRNA transcript“ (pri-miRNA) wird durch die Endonuklease Drosha in die lediglich 60 – 80 Basenpaare lange „precursor miRNA“ (pre-miRNA) prozessiert und über den Nuklear-Export-Faktor Exportin 5 aus dem Zellkern in das Zytoplasma exportiert. Durch Abspaltung der Haarnadel-Struktur über die Endonuklease Dicer entsteht die circa 21 Nucleotide lange einsträngige mature miRNA welche in den miRNA induced silencing complex (miRISC) eingebaut wird. Die Hemmung der Proteinentstehung erfolgt über Degradation der mRNA oder Repression der Proteintranslation. Modifiziert nach (Filipowicz et al. 2008)

### Mir-146a

Mir-146a ist eine in die angeborene Immunantwort involvierte microRNA, deren Transkription durch Stimuli wie LPS, TNF $\alpha$  und IL-1 $\beta$  über NF $\kappa$ B induzierbar ist. Mir-146a wirkt daraufhin hemmend an 2 Elementen dieser Signalkaskade, welche sich „up-stream“ von NF $\kappa$ B befinden, dem „tumor necrosis factor-receptor associated family“ 6 (TRAF6) und der „interleukin-1 receptor-associated kinase 1“ (IRAK1) (Abbildung 3). Über diese Aktion verringert mir-146a die NF $\kappa$ B-Aktivierung und wirkt somit als negativer Regulator der Immunantwort (Taganov et al. 2006). Die Sekretion der Zytokine IL-6 und IL-8 konnte durch mir-146a in Fibroblastenzelllinien ebenfalls unterdrückt werden (Bhaumik et al. 2009).



**Abbildung 3: Schematische Darstellung der Funktionsweise von mir-146a in der TLR-4 Signalkaskade**

Bindung von LPS am „toll-like receptor“ 4 führt über eine Signalkaskade zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF $\kappa$ B, welcher neben Entzündungsmediatoren ebenfalls die Expression von mir-146a bewirkt. Als negativer Regulator der Entzündungsreaktion wirkt mir-146a regulierend auf die NF $\kappa$ B-Aktivität, indem es die vorgeschalteten Elemente „interleukin-1 receptor-associated kinase 1“ (IRAK-1) und „tumor necrosis factor-receptor associated family 6“ (TRAF6) hemmt. Modifiziert nach (Junker 2011)

### 3. Veränderungen der systemischen Entzündungsreaktion im Alter

Wie bereits zuvor erwähnt führt das Altern zu Veränderungen im angeborenen und adaptiven Immunsystem, welche sich auch auf den Verlauf systemischer Entzündungsreaktionen auswirken.

Die Auswirkungen des Alterns auf das „sickness behaviour“ wurden in mehreren tierexperimentellen Studien vor allem an Mäusen und Ratten untersucht, indem durch systemische Verabreichung eines Immunstimulus, meist *E.coli*, LPS oder IL-1 $\beta$ , eine Entzündungsreaktion ausgelöst wurde. Die alten Versuchstiere reagierten daraufhin überwiegend mit einer verstärkten Ausprägung der Anorexie, des Gewichtsverlustes, der Lethargie und der verringerten sozialen Interaktion (Godbout et al. 2005; Godbout et al. 2008; Abraham & Johnson 2009). Die Fieberantwort jedoch war in den meisten Studien bei den älteren Tieren niedriger als bei den jüngeren oder gar nicht vorhanden (Norman et al. 1988; Miller et al. 1991; Foster et al. 1992; Scarpace et al. 1992; Fraifeld et al. 1995; Wachulec et al. 1997). Klinische Studien und Aufzeichnungen belegen ebenfalls, dass ältere Personen im Anschluss an eine Infektion oft gar kein oder nur ein geringgradiges Fieber entwickeln (Gleckman & Hibert 1982; Finkelstein et al. 1983; Berman & Fox 1985), was darüber hinaus mit einer erhöhten Mortalität im Vergleich zu Individuen mit einer normalen Fieberantwort korreliert (Norman et al. 1985; Grahn et al. 1987; Saito et al. 2003).

Weitere Studien auf diesem Gebiet konnten feststellen, dass nach *E. coli*-Infektion die Fieberantwort der alten Ratten nur in den ersten Stunden beeinträchtigt war, sich aber in den darauffolgenden Tagen fortsetzte und im Vergleich zu jüngeren Tieren verlängert war (Barrientos et al. 2009). Die Ursache, welche zu dieser beeinträchtigten Fieberreaktion im Altern führt, konnte noch nicht vollständig geklärt werden.

Hypothesen hierzu (Florez-Duquet et al. 2001) erwähnen die Möglichkeit:

- a) einer fehlerhaften Weiterleitung des Pyrogensignals aus der Peripherie zum Hypothalamus
- b) einer unvollständigen Signaltransduktion im ZNS an die thermoregulatorische Kontrollzone oder die Thermoektoren
- c) eine beeinträchtigte Kapazität der Thermoektoren die Temperatur an den neuen Sollwert anzupassen.

Eine zentrale Applikation von IL-1 $\beta$  oder PGE<sub>2</sub> bewirkte eine ähnliche Fieberantwort in beiden Altersgruppen und deutet darauf hin, dass ein Grund für die erniedrigte Fieberantwort nicht in der zentralen Signaltransduktion sondern eher in einer fehlerhaften Weiterleitung des peripheren Signals zum ZNS liegen könnte (Plata-Salaman et al. 1998; Satinoff et al. 1999). Hinweise darauf liefert auch die Feststellung, dass die Passage des Zytokins IL-1 $\beta$  durch die Blut-Hirn-Schranke im Altern beeinträchtigt ist (McLay et al. 2000).

Weitere Studien lieferten Hinweise darauf, dass die Außentemperatur bei alten Ratten eine größere Rolle zur Regulation ihrer Fieberantwort spielt. Bei höheren Umgebungstemperaturen vermochten die alten Ratten ein ähnlich hohes Fieber wie die junge Vergleichsgruppe zu entwickeln. Gab man ihnen eine Wahlmöglichkeit, suchten sie nach LPS-Stimulation auch öfter als junge Ratten Plätze mit einer höheren Umgebungstemperatur auf (Florez-Duquet et al. 2001; Buchanan et al. 2003; Peloso et al. 2003). Über Messung des O<sub>2</sub>-Verbrauchs als Maßstab für Wärmeproduktion wurde herausgefunden, dass alte Ratten bei einer kühleren Außentemperatur entscheidend weniger Wärme produzieren können als junge Ratten und erst

bei einer höheren Außentemperatur gleich viel Wärme produzieren (Buchanan et al. 2003). Somit scheint eine beeinträchtigte Kapazität der Thermoeffektoren in der verminderten Fähigkeit zur Fieberentwicklung im Alter ebenfalls eine Rolle zu spielen.

Abgesehen von der Ausprägung der Krankheitssymptomatik wurden auch im Bereich der zirkulierenden Zytokine altersabhängige Veränderungen nachgewiesen. Je nach eingesetztem Stimulus, Dosis und ausgewähltem Messzeitpunkt nach Stimulation von Labornagern wurden erhöhte Werte und/oder eine längerfristige Hochregulation im Blutplasma von IL-6 (Tateda et al. 1996; Saito et al. 2003; Godbout et al. 2005; Godbout et al. 2008; Huang et al. 2008), IL-1 $\beta$  (Kalehua et al. 2000; Saito et al. 2003), TNF $\alpha$  (Tateda et al. 1996; Kalehua et al. 2000) und IL-10 (Tateda et al. 1996; Saito et al. 2003; Henry et al. 2009) gemessen. Auch bei älteren menschlichen Probanden haben mehrere Studien erhöhte Gehalte an proinflammatorischen Zytokinen wie IL-6 (Wei et al. 1992; Ershler 1993; Hager et al. 1994), TNF $\alpha$  (Paolisso et al. 1998; Bruunsgaard et al. 1999) und IL-1 $\beta$  (Alvarez-Rodriguez et al. 2012), aber auch antiinflammatorischen Zytokinen wie IL-1ra (Catania et al. 1997) und IL-10 (Alvarez-Rodriguez et al. 2012) in der Blutbahn festgestellt. Diese erhöhten Blutplasmaspiegel an Entzündungsmediatoren fanden sich bei älteren, ansonsten gesunden Individuen (ohne bekannte vorhergehende Entzündungsgeschehen). Obwohl auch einige Studien keine altersbedingten Abweichungen in den zirkulierenden Zytokinen vorgefunden haben (Peterson et al. 1994; Beharka et al. 2001), wird mittlerweile das Vorliegen einer chronischen, subklinischen Inflammation in der Peripherie, gekennzeichnet durch einen erhöhten Blutspiegel inflammatorischer Mediatoren, als ein Hauptmerkmal des Alterns angesehen. Sie gilt als einer der Gründe für die veränderte Entzündungsreaktion und wird ebenfalls als beitragender Faktor für das Entstehen von verschiedenen altersassoziierten chronischen Krankheiten wie Atherosklerose, Sarkopenie und Osteoporose diskutiert (Wick et al. 2000; Krabbe et al. 2004).

Neben der Peripherie ist auch das ZNS immunbedingten Veränderungen unterworfen und nach Immunstimulus wurde in tierexperimentellen Versuchen eine erhöhte Expression von IL-6 (Godbout et al. 2005; Huang et al. 2008), IL-1 $\beta$  (Godbout et al. 2005; Huang et al. 2008; Abraham & Johnson 2009; Barrientos et al. 2009; Henry et al. 2009; Tarr et al. 2011), TNF $\alpha$  (Kalehua et al. 2000; Huang et al. 2008) und IL-10 (Henry et al. 2009) im Gehirn vorgefunden, während die PGE<sub>2</sub>-Expression im Hypothalamus durch das Altern unbeeinflusst blieb (Fraifeld et al. 1995). Zum Teil konnte auch basal eine erhöhte Zytokinexpression detektiert werden (Ye & Johnson 1999; Maher et al. 2004; Abraham & Johnson 2009). Anhand dieser Befunde kam man zu dem Schluss, dass sich auch das alternde ZNS im Zustand einer chronischen Neuroinflammation befindet, welche durch eine konstante, basal erhöhte Produktion zentraler Zytokine einerseits und einer erhöhten Reaktivität auf einen Immunstimulus andererseits gekennzeichnet ist (Dilger & Johnson 2008). Es gibt mittlerweile mehrere Hinweise, dass die Ursache dieser Neuroinflammation unter anderem von einer veränderten Zellpopulation des alternden Gehirns herrührt.

Zum einen sind hiervon die Astrozyten betroffen, welche sich im Alter durch einen reaktiveren, hypertrophen Phänotyp auszeichnen und vermehrt „glial fibrillary acidic protein“ (GFAP) exprimieren (Cotrina & Nedergaard 2002; Finch 2003; Lynch et al. 2010). Diese „astrogliosis“ könnte die Immunantwort beeinflussen, da Astrozyten einerseits direkt mit Neuronen und Mikroglia kommunizieren und andererseits wesentlich am Erhalt einer intakten

Blut-Hirn-Schranke beteiligt sind (Abbott et al. 2006), deren Dichtigkeit im Alter herabgesetzt ist (Popescu et al. 2009; Blau et al. 2012).

Neben den Astrozyten werden vor allem modifizierte Mikrogliazellen als Hauptursache der Neuroinflammation diskutiert. Mikroglia werden als die Immunzellen des ZNS bezeichnet und zeigen im Rahmen einer Immunantwort makrophagenähnliche Aktivitäten einschließlich Phagozytosis, Antigenpräsentation, Komplementaktivierung und Zytokinproduktion (Godbout & Johnson 2009). Normalerweise befinden sich die Mikroglia im ZNS in einem Ruhestadium, in welchem sie eine verzweigte Morphologie einnehmen und ihre Umgebung auf etwaige Pathogene überprüfen (Nimmerjahn et al. 2005). Als Reaktion auf einen Immunstimulus wandeln sie sich in einen kompakten Phänotyp um, das sogenannte Aktivitätsstadium, und antworten mit einer proinflammatorischen Zytokinproduktion von unter anderem IL-1 $\beta$ , IL-6 und TNF $\alpha$  (Hanisch & Kettenmann 2007). Dieser aktivierte Zustand ist normalerweise vorübergehend und mit dem Ende der Immunantwort beendet. Im Alter nimmt ein Großteil der Mikroglia population einen dritten Zustand ein, das sogenannte „primed“ Stadium. Sie charakterisieren sich durch eine erhöhte Expression inflammatorischer Marker wie zum Beispiel „major histocompatibility complex II“ (MHC II) (Sheffield & Berman 1998; Morgan et al. 1999; Godbout et al. 2005; Frank et al. 2006), die Integrine CD11b und CD11c (Stichel & Luebbert 2007), den Scavenger-Rezeptor CD68 (Godbout et al. 2005; Wong et al. 2005) und „toll-like“ Rezeptoren (TLRs) (Letiembre et al. 2007). Dieses „priming“ führt dazu, dass die Mikroglia auf einen Immunstimulus schneller und mit einer erhöhten Zytokinproduktion antworten, was zu einer verstärkten Krankheitssymptomatik führt (Norden & Godbout 2013). Es wird heutzutage postuliert, dass diese altersassoziierten Veränderungen in der Peripherie und im ZNS zu der veränderten Ausprägung der Entzündungsreaktion im Alter beitragen.

Neben diesen bereits länger bekannten Immunmediatoren rücken heutzutage auch immer stärker die microRNAs als mögliche Ursachen altersbedingter Veränderungen in den Blickpunkt. In Hinsicht auf die Immunantwort erscheint nach rezenten Forschungsergebnissen eine deregulierte Expression der mir-146a im Alter eine mögliche Ursache zu sein. In seneszenten Fibroblasten (Bhaumik et al. 2009), sowie in peritonealen Makrophagen, der Milz und im Serum alter Mäuse wurde eine basal höhere Expression von mir-146a im Vergleich zu jungen Tieren festgestellt (Jiang et al. 2012). Bei LPS-stimulierten Mäusen fiel des Weiteren auf, dass die Expression dieser microRNA in den jungen Tieren durch den Immunstimulus hochreguliert wurde, diese Regulation bei den alten Tieren jedoch nicht mehr feststellbar war. Die basale Hochregulation der mir-146a könnte durch die im Alter vorherrschenden erhöhten Zytokinlevel bedingt sein, während die verringerte Regulation durch Immunstimuli Ansatzpunkte für eine Beteiligung von mir-146a an der altersassoziierten Immunderegulation liefert, die auch vor allem für das Gehirn noch weiter erforscht werden sollte.

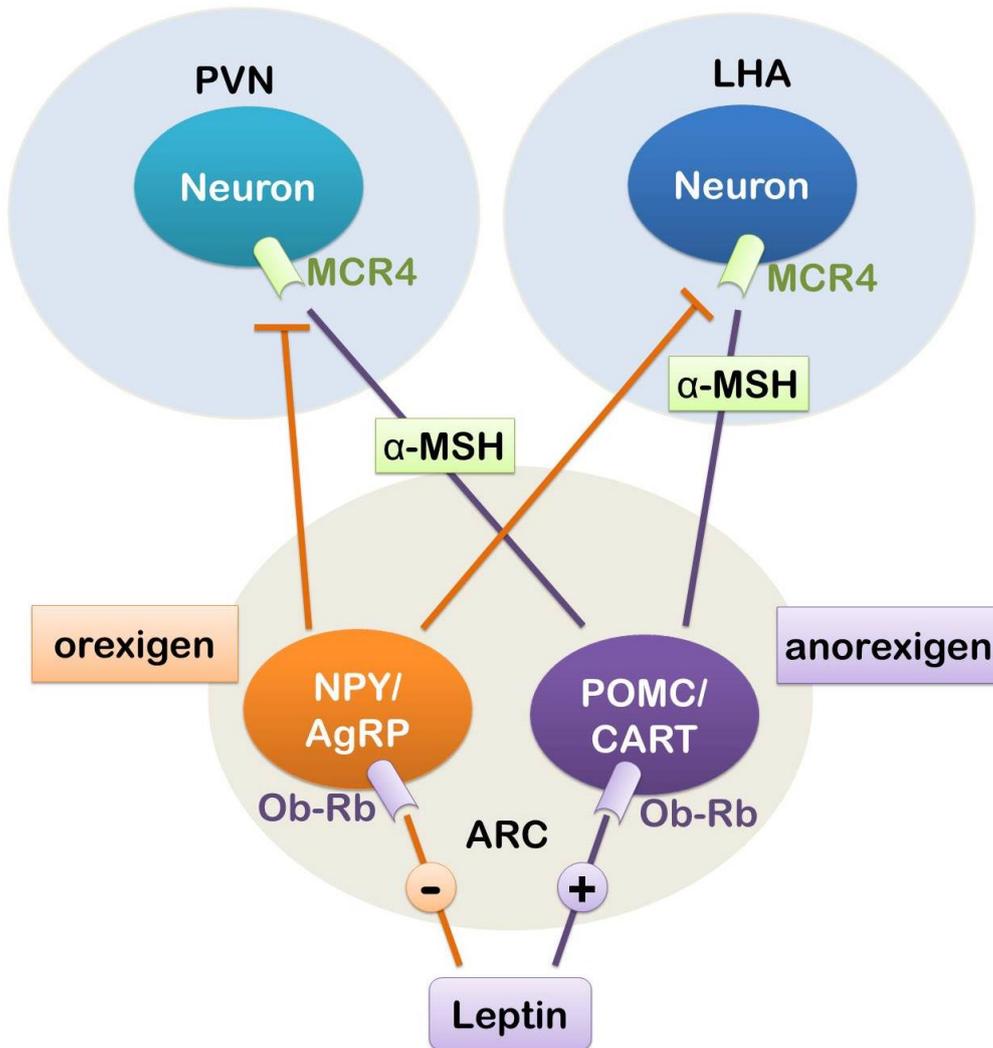
## 4. Leptin

Bei Leptin handelt es sich um ein die Nahrungsaufnahme und den Energieumsatz regulierendes Hormon, welches durch das *ob* („obese“) Gen codiert wird. (Halaas et al. 1995). Diesem Faktor wird eine zentrale Rolle im Energiehaushalt zuerkannt, da eine Mutation im *ob* Gen (*ob/ob*) für den Faktor selbst oder im *db* Gen (*db/db*) für den Leptin-Rezeptor bei Mäusen zur Ausprägung eines adipösen Phänotyps führt (Coleman 1978; Friedman & Halaas 1998). Verabreicht man *ob/ob* Mäusen Leptin, bewirkt dies wiederum eine Reduktion des Körpergewichtes, der Futtermittelaufnahme und eine Steigerung des Energieverbrauchs (Campfield et al. 1995; Halaas et al. 1995; Pelleymounter et al. 1995). Produziert wird Leptin vor allem durch das Fettgewebe (Zhang et al. 1994), wobei die zirkulierenden Level direkt mit der Masse an Fettgewebe korrelieren (Maffei et al. 1995) und nach dem Fasten stark abfallen (Ahima et al. 1996). Rezeptoren für Leptin finden sich in großer Menge im Hypothalamus (Fei et al. 1997) aber auch in der Peripherie in geringerer Anzahl in Leber, Niere, Lunge, weißem Fettgewebe, Magen, B-Zellen des Pankreas, Skelettmuskulatur und Immunzellen (Margetic et al. 2002; Bjorbaek & Kahn 2004). Es existieren sechs verschiedene Isoformen des Leptin-Rezeptors (Ob-Ra bis Ob-Re). Die appetitregulierenden Effekte werden durch die lange Form des Rezeptors, OB-Rb, im Hypothalamus vermittelt (Vaisse et al. 1996). Die kürzeste Form (Ob-Re) zirkuliert als löslicher Rezeptor im Blut und fungiert als Transportprotein für Leptin (Houseknecht et al. 1996; Lammert et al. 2001). Bei den übrigen Formen (Ob-Ra, Ob-Rc, Ob-Rd, Ob-Rf) handelt es sich um membrangebundene Rezeptoren, welche unter anderem zuständig sind für die Aufnahme von Leptin aus dem Blut ins Gewebe (Uotani et al. 1999).

Im Hypothalamus wirkt Leptin vor allem am *Nucleus arcuatus* (ARC), der neben dem ventromedialen (VMH), dorsomedialen (DMH) und lateralen (LH) hypothalamischen Nukleus eine wichtige Region für die Regulation von Futteraufnahme und Energieumsatz darstellt (Bray & York 1979). Da Leptin als 16-kDa großes Protein die Blut-Hirn-Schranke normalerweise nicht passieren kann gibt es andere Möglichkeiten, wie Leptin den Hypothalamus erreicht. Zum einen kann Leptin die BHS über ein gesättigtes Transportsystem passieren (Banks et al. 1996; Banks 2001). Dieses Transportsystem ist wahrscheinlich durch die Rezeptorform Ob-Ra vermittelt, welche beispielsweise auch im Plexus Choroideus stark exprimiert wird (Golden et al. 1997). Es besteht dabei für Leptin auch die Möglichkeit im Transport über die Zerebrospinalflüssigkeit mit anschließender Diffusion in die Ventrikelumgebenden Hirnareale zu gelangen (Schwartz et al. 1996). Im Bereich der CVOs kann Leptin direkt ins Gehirngewebe diffundieren. Hiervon sind vor allem die Kerngebiete des ventrobasalen Hypothalamus, wie z. B. der *Nucleus arcuatus* betroffen (Rivest 2002).

Nach der Nahrungsaufnahme steigt die zirkulierende Leptinkonzentration an (Frederich et al. 1995; Kolaczynski et al. 1996) und führt nach Bindung an hypothalamische Rezeptoren zu einer Signalkaskade im ARC, die zur Inhibition orexigener, also hungerfördernder Nervenbahnen führt (Abbildung 4). In den entsprechenden Neuronen kommt es zu einer herabgesetzten mRNA-Expression von Neuropeptid Y (NPY) und „agouti-related“ Peptid (AgRP) (Wang et al. 1997; Ebihara et al. 1999; Mizuno & Mobbs 1999; Ziotopoulou et al. 2000), welche appetitanregende Signalwege ankurbeln. Gleichzeitig aktiviert Leptin POMC/CART-exprimierende Neurone, was zu erhöhten mRNA-Level von alpha

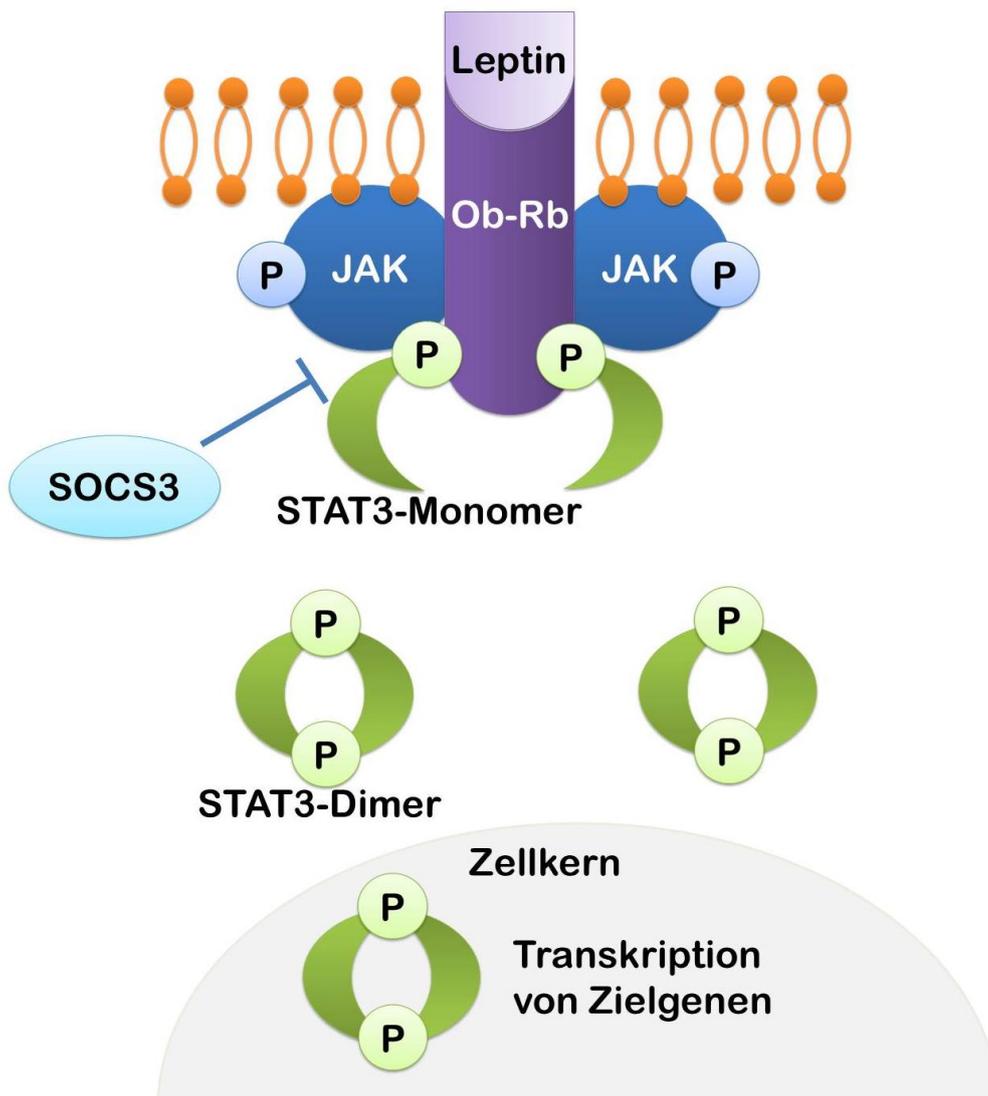
Melanozyten-stimulierendem Hormon ( $\alpha$ -MSH) und „cocain and amphetamin regulated transcript“ (CART) über die Synthese von Proopiomelanocortin (POMC) (Schwartz et al. 1997; Korner et al. 1999) führt.  $\alpha$ -MSH bindet an Melanocortin-Rezeptoren (MCRs) und führt zu Anorexie und erhöhtem Energieumsatz. Nach Hungerzuständen fallen die Leptinspiegel wieder ab (Kolaczynski et al. 1996).



**Abbildung 4: Schematische Darstellung der Wirkung von Leptin im Hypothalamus**

Leptin wirkt im *Nucleus arcuatus* (ARC) hemmend auf NPY/AgRP-Neurone, welche normalerweise orexigene Bahnen in weiteren hypothalamischen Kernen wie den paraventriculären Nucleus (PVN) und lateralen hypothalamischen Nucleus (LHA) stimulieren. Umgekehrt wirkt Leptin stimulierend auf POMC/CART-Neurone, was zu einer vermehrten Freisetzung von  $\alpha$ -MSH führt, welches in nachgeschalteten Kerngebieten am MCR4-Rezeptor anorexigene Bahnen stimuliert. NPY: Neuropeptid Y; AgRP: „agouti-related“ Peptid; POMC: Proopiomelanocortin; CART: „cocain and amphetamin regulated transcript“;  $\alpha$ -MSH: alpha Melanozyten-stimulierendes Hormon; MCR4: Melanocortin-Rezeptor 4. Modifiziert nach (Rediger et al. 2012).

Der Leptin-Rezeptor Ob-Rb ist Mitglied der Klasse-I-Zytokin-Rezeptor Familie (Tartaglia et al. 1995), zu der unter anderem auch der IL-6 Rezeptor gehört. Neben dem Phosphoinositol-3-(PI-3)-Kinase-Signalweg (Niswender et al. 2001) und dem MAPK/ERG-Signalweg („mitogen-activated protein kinase“/ „extracellular signal regulated kinase“) (Bjorbaek et al. 2001) funktioniert der Hauptsignalweg am Hypothalamus über die JAK-STAT-Kaskade (Abbildung 5). Hierbei assoziieren nach Bindung von Leptin zwei Janus-Kinasen an die intrazelluläre Domäne des Rezeptors (Banks et al. 2000), was zur gegenseitigen Transphosphorylierung der JAKs und zur Phosphorylierung von Tyrosinresten am Rezeptor führt. Die Tyrosinreste, welche Bindungsstellen für STATs darstellen, aktivieren nun STAT-Moleküle, hierunter vor allem STAT3. Die STAT-Monomere dissoziieren von der intrazellulären Rezeptordomäne und bilden Dimere, welche in den Zellkern wandern und die Transkription von Zielgenen aktivieren (Heim 1996; Hegyi et al. 2004). Gehemmt werden kann dieser Signalweg beispielweise durch den „suppressor of cytokine signaling 3“ (SOCS3) (Endo et al. 1997), in dem er Bindungsstellen an den Signalmolekülen (JAKs) oder am Rezeptor selbst besetzt (Hansen et al. 1999) und somit die Aktivierung der STAT-Moleküle verhindert.



**Abbildung 5: Schematische Darstellung der Signaltransduktion von Leptin über die JAK-STAT-Signalkaskade**

Der Ligand Leptin bindet am Ob-Rb Rezeptor, woraufhin Janus-Kinasen aktiviert werden, welche wiederum STAT3-Moleküle phosphorylieren. Die aktivierten STAT3-Monomere dissoziieren und schließen sich zu Dimeren zusammen, welche in den Zellkern wandern und dort die Transkription von Zielgenen initiieren. SOCS3 hemmt diese Kaskade, indem es die Bindungsstellen für STAT3 besetzt. STAT3: „signal transducer and activator of transcription 3“; SOCS3: suppressor of cytokine signaling 3“. Modifiziert nach (Mütze 2005).

## 4.1 Die Rolle von Leptin im Immunsystem

Neben seiner zentralen Funktion spielt Leptin in der Peripherie unter anderem eine Rolle in der Insulin-Sekretion, der Reproduktion, der Glykogen-Synthese und dem Glukose-Transport im Skelettmuskel sowie auch im Immunsystem (Margetic et al. 2002). In unterschiedlichen Studien konnte gezeigt werden, dass Leptin in die Immunantwort impliziert ist. Zum einen bewirken Zustände, die zur Freisetzung von Komponenten des Akute-Phase-Systems führen, beispielsweise Entzündungsgeschehen, ebenfalls die Sekretion von Leptin (Grunfeld et al. 1996; Sarraf et al. 1997; Landman et al. 2003). Zum anderen korrelieren Reduktionen des Körperfetts mit einer beeinträchtigten Immunfunktion (Norgan 1997; Klasing 1998), während eine Zunahme an Körperfett oder eine experimentelle Leptin-Gabe die vollständige Immunfunktion wieder herstellt (Lord et al. 1998; Howard et al. 1999). Leptin-Rezeptoren konnten auf einer großen Anzahl unterschiedlicher Immunzellen nachgewiesen werden, unter anderem auf Monozyten/Makrophagen, neutrophilen Granulozyten (Neutrophilen), natürlichen Killerzellen, dendritischen Zellen, T- und B-Lymphozyten (Martin-Romero et al. 2000; Sanchez-Margalet et al. 2003; Zhao et al. 2003; Bjorbaek & Kahn 2004; Bruno et al. 2005), so dass unter anderem eine direkte Wirkung von Leptin auf diese Zellen postuliert wird. Die Neutrophilen werden durch Leptin zur Chemotaxis und Freisetzung von Sauerstoffradikalen angeregt (Caldefie-Chez et al. 2003), während natürliche Killerzellen in ihrer Entwicklung und Aktivierung beeinflusst werden (Zhao et al. 2003). Des Weiteren wird die Aktivierung und Phagozytose von Monozyten und Makrophagen durch Leptin gefördert, ebenso wie die Bildung von COX2 und die Sekretion von proinflammatorischen Zytokinen (Zarkesh-Esfahani et al. 2001). In murinen peritonealen Makrophagen sowie humanen Monozyten wurde die LPS-induzierte *in vitro* Produktion von TNF $\alpha$ , IL-6 und IL-12 durch Leptin Gabe erhöht (Loffreda et al. 1998; Santos-Alvarez et al. 1999). In einer murinen Makrophagen Zelllinie konnte eine Leptin-induzierte Produktion von IL-1 $\alpha$  beobachtet werden (Faggioni et al. 1999).

Leptin hat ebenfalls Auswirkungen auf das adaptive Immunsystem. So ist die Leptin-Defizienz in ob/ob und db/db Mäusen mit einer Immunsuppression und Thymusatrophie vergesellschaftet (Howard et al. 1999). Eine fehlerhafte T-Zellvermittelte Immunität wurde in diesen genetisch veränderten Mäusen unter anderem über eine Beeinträchtigung der verzögerten, also T-Zellvermittelten Hypersensitivitätsreaktion und eine Unterdrückung der Abstoßung eines Haut-Allografts nachgewiesen (Mandel & Mahmoud 1978; Chandra & Au 1980). In Menschen mit geringem Körpergewicht und folglich niedrigen Leptin-Blutspiegeln ist ebenfalls die zellvermittelte Immunität beeinträchtigt (Cason et al. 1986). Leptin fördert vor allem bei naiven T-Zellen die Proliferation und IL-2 Sekretion sowie die Expression von Adhäsionsmolekülen (Lord et al. 1998) und wirkt somit stimulierend auf die zellvermittelte Immunantwort.

## 4.2 Die Rolle von Leptin in der Entzündungsreaktion

Mehrere tierexperimentelle Studien haben gezeigt, dass die Stimulation mit Faktoren, welche eine systemische Entzündungsreaktion auslösen wie LPS oder proinflammatorische Zytokine (IL-1 $\beta$  und TNF $\alpha$ ) ebenfalls zu einer Erhöhung zirkulierender Leptingehalte im Serum oder

einer gesteigerten mRNA-Expression von Leptin im Fettgewebe führt (Grunfeld et al. 1996; Sarraf et al. 1997; Finck et al. 1998). Ein weiterer Hinweis auf die proinflammatorische Wirkung von Leptin besteht darin, dass eine zentrale oder periphere Verabreichung von Leptin zu einer Erhöhung der Körperkerntemperatur führt (Luheshi et al. 1999). Die Neutralisierung endogener zirkulierender Leptin Level mittels eines Leptin Antiserums bewirkte, dass nach anschließender LPS-Stimulation das Fieber deutlich abgemildert wurde oder sogar ganz ausblieb (Sachot et al. 2004; Harden et al. 2006).

Zurzeit liegen mehrere Indizien vor, dass die proinflammatorische Wirkweise von Leptin über Interaktion mit dem Zytokin IL-1 $\beta$  vermittelt wird. Zum einen führt die Verabreichung von Leptin direkt zu einer Erhöhung der mRNA-Expression von IL-1 $\beta$  im Gehirn. Zum anderen wurde eine verstärkte Expression von IL-1ra, einem Gegenspieler von IL1 $\beta$  und indirektem Marker für eine gesteigerte IL-1 $\beta$ -Aktivität, nachgewiesen (Luheshi et al. 1999; Hosoi et al. 2002; Hosoi et al. 2002; Inoue et al. 2006). Die Neutralisierung von Leptin bewirkte außerdem eine Abschwächung der LPS-induzierten Hochregulation von IL-1 $\beta$  und IL-1ra (Sachot et al. 2004; Inoue et al. 2006). Darüber hinaus konnte die Leptin-vermittelte Reduktion der Futteraufnahme und/oder Temperaturerhöhung über zentrale Injektion des Gegenspielers IL-1ra und in Mäusen ohne IL-1 Rezeptor ausgeschaltet werden (Luheshi et al. 1999).

Neben IL-1 $\beta$  scheint auch COX2 in der Leptin-vermittelten Entzündungsreaktion eine Rolle zu spielen. Bei der durch Leptin induzierten Temperaturerhöhung handelt es sich um ein prostaglandinabhängiges Fieber, da es durch Gabe von COX-Hemmern ausgeschaltet werden konnte (Luheshi et al. 1999). Zentrale Leptin-Gabe induzierte sowohl mRNA- als auch Protein-Expression von COX2 im Hypothalamus, welche wiederum durch Injektion von IL-1ra runterreguliert wurde (Inoue et al. 2006).

Seine Rolle im Energiehaushalt und der Futteraufnahme legen die Vermutung nahe, dass Leptin an der Vermittlung des durch systemische Entzündung ausgelösten Krankheitssymptoms Anorexie beteiligt ist. Mehrere Studien untermauern diesen Grundgedanken. Grunfeld und Kollegen (1996) konnten zeigen, dass die Stärke der LPS-induzierten Anorexie proportional zu der Leptin mRNA-Expression im Fettgewebe war (Grunfeld et al. 1996). Neutralisierung von Leptin konnte die LPS-induzierte Anorexie und Gewichtsabnahme stark abmildern oder sogar gänzlich aufheben (Sachot et al. 2004; Harden et al. 2006). Jedoch unterstützen nicht alle Studien diese These. In db/db Mäusen konnte nur eine partielle Resistenz gegenüber der LPS-induzierten Anorexie festgestellt werden, während ob/ob Mäuse demgegenüber sogar sensibler reagierten (Faggioni et al. 1997).

In mehreren Tiermodellen, sowie auch beim Menschen, wurde mit dem Altern ein Ansteigen der Leptinkonzentration im Serum festgestellt (Baumgartner et al. 1999; Scarpace & Tumer 2001; Gabriely et al. 2002), wiewohl auch gegenteilige Beobachtungen beim Menschen gemacht wurden (Isidori et al. 2000). Inwieweit die erhöhten Leptinblutspiegel die Entzündungsreaktion im Altern beeinflussen, wurde bis dato allerdings noch nicht ausreichend untersucht.

## 5. Die Rolle von Adipositas in der Entzündungsreaktion

Das Vorkommen von Adipositas und damit assoziierte Krankheiten wie Diabetes Mellitus und kardiovaskuläre Erkrankungen nehmen weltweit immer stärker zu (Flegal et al. 2010; WHO 2013). Auch in der älteren Population kommt es weitverbreitet zu einer Gewichtszunahme, der sogenannten altersassoziierten Adipositas, welche durch eine Zunahme und Redistribution der Körperfettmasse gekennzeichnet ist (Rossner 2001; Cartwright et al. 2007).

In den letzten Jahren wurde festgestellt, dass das Vorliegen einer chronischen Entzündung eines der Hauptmerkmale der Adipositas darstellt. Epidemiologische Studien haben bei adipösen Individuen erhöhte Plasmawerte an inflammatorischen Markern wie Fibrinogen, C-reaktives Protein, TNF $\alpha$  und IL-6, aber auch dem antiinflammatorischen Zytokin IL-1ra festgestellt, deren Werte positiv mit steigendem Körperfettanteil und „body mass index“ korrelieren (Festa et al. 2001; Meier et al. 2002; Bullo et al. 2003; Park et al. 2005). Nachdem man eine erhöhte Expression und Sekretion von TNF $\alpha$  durch das Fettgewebe adipöser Nager festgestellt hat, wurde die Verbindung zwischen den erhöhten Entzündungsparametern bei Adipositas und dem Fettgewebe, welches als endokrines Organ und Syntheseort für Zytokine einen bedeutenden Anteil an der gesteigerten Zytokinkonzentration hat, hergestellt (Hotamisligil et al. 1993).

Generell besteht das weiße Fettgewebe aus den Adipozyten und aus der sogenannten stromalen, vaskulären Fraktion, welche unter anderem aus Fettgewebsvorläuferzellen, Endothelzellen und Immunzellen besteht. Adipositas führt zu einer verstärkten Fetteinlagerung in ausdifferenzierten Adipozyten, welche anschließend hypertroph werden (Spalding et al. 2008). Die Hypertrophie führt zu einer deregulierten Produktion und Ausschüttung von Adipokinen, zu welchen Fettgewebshormone (z.B. Leptin) aber auch vom Fettgewebe produzierte Mediatoren wie Zytokine gehören. Adipositas führt zu einer erhöhten Produktion der proinflammatorischen Faktoren Leptin, TNF $\alpha$  und IL-6 und einer erniedrigten Sekretion des antiinflammatorisch wirksamen Fettgewebshormons Adiponektin durch hypertrophe Adipozyten (Hotamisligil et al. 1993; Maffei et al. 1995; Fried et al. 1998; Arita et al. 1999).

Die stark expandierende Fettmasse und Adipozytenhypertrophie führt zu einer lokalen Hypoperfusion mit anschließender Hypoxie des Fettgewebes (Hosogai et al. 2007), welche ursächlich mit einer erhöhten Expression inflammatorischer Marker assoziiert ist (Wang et al. 2007; Ye et al. 2007). Die Hypertrophie hat ebenfalls eine vermehrte Nekrose der Adipozyten zur Folge. Dies führt dazu, dass verstärkt Makrophagen aus dem Gewebe angelockt werden, welche sich in sogenannten „crown-like structures“ um die nekrotischen Adipozyten ansiedeln und deren Überreste phagozytieren (Cinti et al. 2005). Die erhöhte Infiltration des Fettgewebes mit Makrophagen bei Adipositas trägt nun ihrerseits zu einer erhöhten Produktion proinflammatorischer Zytokine bei (Weisberg et al. 2003; Xu et al. 2003).

Neben der erhöhten Anzahl an Makrophagen führt ein adipöser Zustand zusätzlich zu einer Umschaltung von den ansässigen, überwiegend antiinflammatorisch oder M2-aktivierten Makrophagen, welche vor allem antiinflammatorische Zytokine wie IL-10 und IL-1ra

produzieren, zu den größtenteils eingewanderten und proinflammatorisch oder M1-aktivierten Makrophagen, welche vermehrt IL-6 und TNF $\alpha$  produzieren (Lumeng et al. 2007).

Freie Fettsäuren, welche bei Adipositas erhöht sind, können „toll-like“ Rezeptoren in Adipozyten oder Makrophagen aktivieren und so die inflammatorische Kaskade aktivieren (Shi et al. 2006; Nguyen et al. 2007).

Die Gabe einer fettreichen Diät führte zu einer Erhöhung der Plasmaspiegel von LPS über eine Zunahme der LPS-produzierenden Mikrobiota des Verdauungstraktes, so dass die hierdurch entstehende metabolische Endotoxämie als weiterer Faktor diskutiert wird, welcher zur chronischen Inflammation bei Adipositas beiträgt (Cani et al. 2007; Cani et al. 2008).

Klinische Studien haben gezeigt, dass adipöse Patienten anfälliger für postoperative Infektionen sind (Falagas & Kompoti 2006) und eine beeinträchtigte Wundheilungskapazität haben (Scheinfeld 2004; Wilson & Clark 2004). In Tiermodellen wurde eine erhöhte Anfälligkeit für experimentell induzierte Infektionen bei genetisch veränderten adipösen Ratten sowie diätinduziert adipösen Mäusen festgestellt (Plotkin et al. 1996; Smith et al. 2007). Experimentelle LPS-Stimulation von diätinduziert adipösen Ratten zeigte eine verstärkte Fieberantwort und höhere Zytokinwerte im Serum sowie im Hypothalamus verglichen mit normalgewichtigen Ratten. Mit LPS stimuliertes Fettgewebe adipöser Ratten zeigte in der gleichen Studie eine verstärkte IL-6 Ausschüttung (Pohl et al. 2009).

Studien zu altersassoziiert Adipositas konnten eine höhere mRNA-Expression der inflammatorischen Marker COX2, IL-1, IL-6 und TNF $\alpha$  im Fettgewebe alter Mäuse, sowie eine gesteigerte Sekretion von IL-6, TNF $\alpha$  und PGE2 durch Adipozyten alter Mäuse nachweisen (Wu et al. 2007). Trotz dieser vielversprechenden Ansätze wurde der Einfluss einer erhöhten Fettgewebsmasse auf die deregulierte Entzündungsreaktion im Altern bis jetzt nicht hinreichend untersucht.

## 6. Oxidativer Stress und Altern

Eine der Hauptveränderungen auf zellulärer Ebene im Alter ist eine stärkere Akkumulation freier Sauerstoffradikale und dadurch bedingte oxidative Schäden an Lipiden, Proteinen und Nukleinsäuren (Balaban et al. 2005). Daraus einhergehend hat sich die sogenannte „mitochondriale Theorie des Alterns“ entwickelt. Da Mitochondrien im Rahmen der Atmungskette und ATP-Produktion den Hauptentstehungsort von reaktiven Sauerstoffspezies („reactive oxygen species“ ROS) in der Zelle darstellen, sind sie demzufolge auch das Hauptangriffsziel für oxidative Schäden, welche zu geschädigten Lipiden, Proteinen und Nukleinsäuren und daraus resultierender mitochondrialer Dysfunktion führen. Des Weiteren führen die Sauerstoffradikale zu Mutationen der mitochondrialen DNA (mtDNA), so dass eine erhöhte Mutationsrate in mehreren Geweben, unter anderem Skelettmuskulatur, Herzmuskulatur, Gehirn, Leber und Retina, im Alter vorgefunden wurde (Greaves & Turnbull 2009).

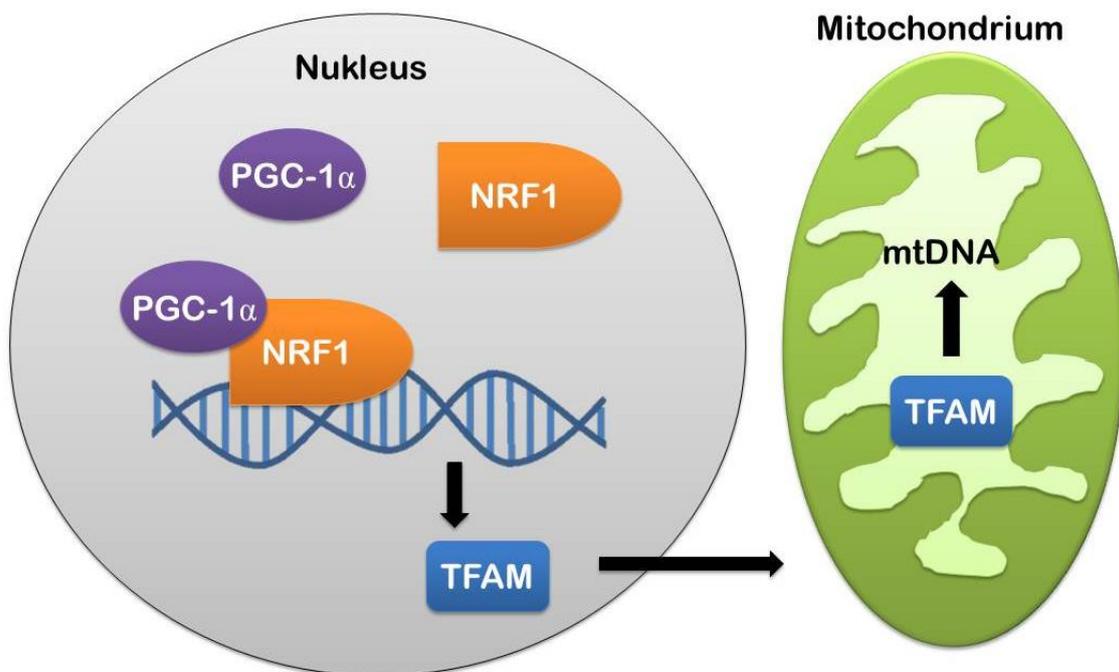
Wegen seines hohen Gehaltes an ungesättigten Fettsäuren, hohem Energie- und Sauerstoffverbrauch und relativ geringem Gehalt an Antioxidationsenzymen gilt das Gehirn als besonders anfällig für oxidative Schäden (Nunomura et al. 2006). Klinische Studien haben eine zentrale Bedeutung von oxidativem Stress und gestörtem zellulären Energiemetabolismus in der Pathogenese von neurodegenerativen Erkrankungen wie Alzheimer, Parkinson und Huntington nachgewiesen (Gardian & Vecsei 2004; Mattson 2004; Przedborski & Ischiropoulos 2005). Mitochondriale Schäden und Mutationen führen zu einer erhöhten Produktion reaktiver Sauerstoffspezies und leiten somit einen *Circulus vitiosus* ein (Lopez-Armada et al. 2013). Die ROS können redox-sensitive Transkriptionsfaktoren, zu denen der bedeutende proinflammatorische Transkriptionsfaktor NF $\kappa$ B gehört, aktivieren und die Genexpression inflammatorischer Mediatoren wie IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF $\alpha$  und COX2 erhöhen (Chung et al. 2011). Somit könnte auch die altersbedingte Abnahme der mitochondrialen Funktion und damit einhergehenden Zunahme von ROS und oxidativen Schäden eine weitere Ursache für die Entstehung der altersbedingten chronischen Inflammation darstellen.

### 6.1 PGC-1 $\alpha$

Der „peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)- $\gamma$  coactivator-1  $\alpha$ “ (PGC-1 $\alpha$ ) ist ein Transkriptions-Coaktivator der mit mehreren Transkriptionsfaktoren interagieren kann, welche in eine Vielzahl von biologischen Vorgängen impliziert sind, z.B. adaptive Thermogenese, Glukosestoffwechsel, Fettsäurestoffwechsel und mitochondriale Biogenese (Puigserver 2003). Als Coaktivator bindet PGC-1 $\alpha$  nicht selbst an die DNA, sondern erhöht durch seine Interaktion mit dem Transkriptionsfaktor die Wahrscheinlichkeit, dass ein bestimmtes Gen transkribiert wird. PGC-1 $\alpha$  gilt als Schlüsselregulator der mitochondrialen Biogenese, indem es mit dem Transkriptionsfaktor „nuclear respiratory factor 1“ (NRF1) interagiert und dessen transkriptionale Aktivität erhöht. NRF1 bindet daraufhin an die Promoterregion von einer großen Anzahl mitochondrialer Gene, die zum großen Teil in die mitochondriale Atmungskette involviert sind. Des Weiteren induziert NRF1 auch die Expression des „mitochondrial transcription factor A“ (TFAM), welcher daraufhin vom Zellkern in die Mitochondrien einwandert und die Replikation und Transkription mitochondrialer DNA aktiviert (Abbildung 6). Wird PGC-1 $\alpha$  in Muskelzellen über retrovirale

Vektoren eingeschleust, führt dies zu einer Steigerung der Genexpression von NRF1 und TFAM (Wu et al. 1999). Gerade in Skelett- oder Herzmuskulatur wurde in mehreren Studien nachgewiesen, dass PGC-1 $\alpha$  nachweislich die mitochondriale Biogenese und Atmung steigert (Wu et al. 1999; Lehman et al. 2000; Handschin & Spiegelman 2006; Wenz et al. 2008). In tierexperimentellen Studien konnte eine vermehrte PGC-1 $\alpha$ -Aktivierung die Auswirkungen von mitochondrialen Myopathien über Steigerung der mitochondrialen Biogenese und ATP-Level abmildern (Wenz et al. 2008; Wenz et al. 2009) und auch dem altersbedingten Verlust an Muskelmasse, der Sarkopenie, entgegenwirken. Der mit Sarkopenie einhergehende Anstieg inflammatorischer Zytokine im Skelettmuskel wurde ebenfalls abgesenkt (Wenz et al. 2009).

Studien mit knock-out Tieren deuten darauf hin, dass PGC-1 $\alpha$  die lokale oder systemische Inflammation beeinflusst und an der Expressionsregulation inflammatorischer Marker wie TNF $\alpha$  oder IL-6 beteiligt ist (Arnold et al. 2011; Wenz 2011). Ältere transgene PGC-1 $\alpha$  Tiere zeigten eine Reduktion der beim Altern üblicherweise erhöhten Level an zirkulierenden inflammatorischen Markern (Wenz et al. 2009). Der genaue Mechanismus über den PGC-1 $\alpha$  auf die Entzündungsreaktion wirkt ist noch nicht entschlüsselt. Es wurde jedoch gezeigt, dass PGC-1 $\alpha$  durch Zytokine (IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  und TNF $\alpha$ ) und LPS über direkte Phosphorylierung durch p38 MAPK aktiviert werden kann (Puigserver et al. 2001). Die Expression von PGC-1 $\alpha$  wird hauptsächlich durch PPARs und andere gewebespezifische Faktoren, im Skelettmuskel z.B. „cAMP responsive element“ (CREB), reguliert. Die Aktivierung der PPARs wiederum erfolgt über externe Stimuli oder pharmakologische Agonisten und kann somit auch die mitochondriale Biogenese induzieren (Wenz et al. 2008).



### **Abbildung 6: Schematische Darstellung der PGC-1 $\alpha$ Funktion in der mitochondrialen Biogenese**

Im Zellkern induziert der Coaktivator PGC-1 $\alpha$  die vermehrte Bindung des Transkriptionsfaktors NRF1 an die DNA und darauffolgende Expression mitochondrialer Zielgene, darunter der mitochondriale Transkriptionsfaktor A (TFAM). TFAM verlässt den Zellkern und wandert in das Mitochondrium ein, wo es die Replikation und Transkription mitochondrialer DNA aktiviert. PGC-1 $\alpha$ , „peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)- $\gamma$  coactivator-1  $\alpha$ “; NRF1, „nuclear respiratory factor 1“. Modifiziert nach (Vina et al. 2009)

## **6.2 Der PPAR- $\gamma$ Agonist Rosiglitazon**

Rosiglitazon gehört zur Klasse der Thiazolidinedione (TZDs), bei welchen es sich um orale Antidiabetika handelt, welche bei Patienten mit Typ II Diabetes mellitus eingesetzt werden. Sie steigern die Insulinsensitivität, erhöhen hierdurch die Glukoseverfügbarkeit und senken Blutglukose und zirkulierendes Insulin (Smith et al. 2000). TZDs fördern die Aufnahme freier Fettsäuren in Adipozyten und die Lipogenese. Sie reduzieren die durch TNF $\alpha$  vermittelte Lipolyse, welche ebenfalls zur Insulinresistenz beiträgt und erhöhen die Glukoseaufnahme aus dem Blut über eine erhöhte Produktion des Glukosetransporters GLUT4 (Wolffenbuttel et al. 2001). Die Effekte von Rosiglitazon werden größtenteils über agonistische Bindung und somit Aktivierung des „peroxisome proliferator activated receptor (PPAR)- $\gamma$ “ vermittelt.

„Peroxisome proliferator-activated receptors“ (PPARs) spielen eine große Rolle in der transkriptionellen Regulierung von Genen die in den Glukose- und Lipidmetabolismus involviert sind. Mittlerweile sind drei verschiedene PPAR Subtypen identifiziert worden, PPAR- $\alpha$ , PPAR- $\delta$  und der für diese Arbeit bedeutende PPAR- $\gamma$ . PPAR- $\gamma$  ist in der Regulation des Energieumsatzes, des Glukose- und Lipidmetabolismus beteiligt. Er formt mit dem „retinoid X receptor- $\alpha$ “ (RXR $\alpha$ ) einen Heterodimer-Komplex, welcher an die „peroxisome proliferator response elements“ (PPREs) innerhalb des Promotors der PPAR- $\gamma$  Zielgene bindet und deren Expression induziert. Bindung des Coaktivators PGC-1 $\alpha$  an den Heterodimer-Komplex reguliert die Aktivität dieses Transkriptionsfaktors (Zieleniak et al. 2008). PPAR- $\gamma$  wird überwiegend aber nicht ausschließlich im Fettgewebe exprimiert und fördert die Adipozytendifferenzierung und die Apoptose reifer Adipozyten (Schoonjans et al. 1996). Dies erhöht den Anteil kleiner Adipozyten im weißen Fettgewebe, welche insulinsensitiver sind als größere Adipozyten (Okuno et al. 1998).

Neben seiner zentralen Rolle im Fettstoffwechsel rücken zunehmend auch die antiinflammatorischen Eigenschaften von PPAR- $\gamma$  in den Fokus der Forschung (Cunard et al. 2002). Außer dem Fettgewebe exprimieren auch Zellen des Immunsystems wie Monozyten, Makrophagen, B- und T-Zellen PPAR- $\gamma$  (Braissant et al. 1996). Im Gehirn ist die Expression dieses Transkriptionsfaktors vor allem in Mikrogliazellen und Astrozyten lokalisiert (Bernardo et al. 2003). PPAR- $\gamma$  Agonisten wirken entzündungshemmend und neuroprotektiv, in dem sie die Aktivierung und damit einhergehende Produktion inflammatorischer Zytokine wie TNF $\alpha$ , IL12, IL-6, IL-1 $\beta$  und IL-8 von peripheren Immunzellen (Monozyten/Makrophagen) herabsenken (Jiang et al. 1998; Ricote et al. 1998). Im Gehirn selbst wirken sie modulierend auf die Aktivierung von Mikroglia und Astrozyten und vermindern dort die zerebrale Produktion von inflammatorischen Markern, darunter IL-1 $\beta$ ,

IL-6, IL-12, TNF $\alpha$ , iNOS (induzierbare Stickstoffmonoxid Synthase) und COX2 (Kielian & Drew 2003; Luna-Medina et al. 2005; Xu & Drew 2007; Bernardo & Minghetti 2008). Somit verhindern sie die bei Überproduktion neurotoxische Wirkung der Zytokine und fördern das Überleben neuronaler Zellen (Kim et al. 2002). Des Weiteren vermindern sie die Einwanderung peripherer Immunzellen aus dem zerebralen Gefäßsystem in das ZNS-Gewebe indem sie die Expression von Adhäsionsmolekülen herabsenken (Jackson et al. 1999).

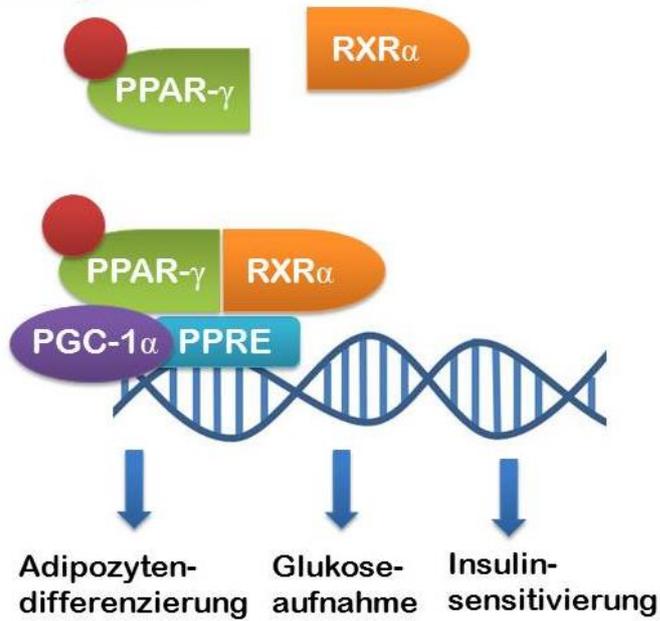
Diese entzündungshemmenden Effekte von PPAR- $\gamma$  werden vermittelt, indem die Aktivität inflammatorischer Transkriptionsfaktoren, unter anderem STAT und NF $\kappa$ B, gehemmt wird (Daynes & Jones 2002). Es wird postuliert, dass PPAR- $\gamma$  über einen noch nicht ganz geklärten Mechanismus der „receptor-dependent transrepression“ die Transkriptionsfaktoren an der Expression ihrer Zielgene hindert (Kielian & Drew 2003). Die Transrepression findet statt, indem PPAR- $\gamma$  mit anderen Transkriptionsfaktoren um die Bindung von nur begrenzt zur Verfügung stehenden Co-aktivatoren konkurriert oder über direkte Interaktion, wie es z.B. für NF $\kappa$ B nachgewiesen wurde (Chung et al. 2008). Hierbei bindet PPAR- $\gamma$  an die p65 Untereinheit dieses Transkriptionsfaktors und verhindert die Bindung dieses Komplexes an die DNA und somit die Transkription der Zielgene (Chung et al. 2000)(Abbildung 7).

Aufgrund dieser antiinflammatorischen Eigenschaften, wurde auch der Agonist Rosiglitazon in zahlreichen experimentellen Studien eingesetzt, um die positiven Wirkungen dieses Medikamentes in Krankheitsbildern zu testen, bei denen die Entzündung eine Rolle spielt. Viele dieser Studien haben die neuroprotektiven Eigenschaften Rosiglitazons in Tiermodellen der zerebralen Ischämie untersucht. Durch die Reduktion der Sekretion von neurotoxisch wirkenden inflammatorischen Zytokinen durch Ischämie-bedingte Microglia-Aktivierung, konnte in mehreren Studien eine neuroprotektive Wirkung von Rosiglitazon nachgewiesen werden und das Krankheitsbild verbessert werden (Allahtavakoli et al. 2006; Allahtavakoli et al. 2009; White & Murphy 2010). Auch bei neurodegenerativen Krankheiten wie Alzheimer, Multiple Sklerose und Parkinson, denen auch eine neuroinflammatorische Komponente zu Grunde liegt, geriet Rosiglitazon als zukünftige Behandlungsmöglichkeit in den Fokus (Chung et al. 2008; Carta et al. 2011). Des Weiteren haben erste Studien die Wirkung von Rosiglitazon auf die erhöhten zerebralen Entzündungsparameter bei alten Ratten untersucht und einen antiinflammatorischen Effekt auf die altersbedingte chronische Neuroinflammation sowie eine Reduktion der altersassoziierten „astrogliosis“ festgestellt (Loane et al. 2009; Cowley et al. 2012).

Der Wirkstoff Rosiglitazon erweist sich für Untersuchungen zu altersbedingten Erkrankungen als besonders interessant, da es neben seinen entzündungshemmenden Eigenschaften auch nachgewiesenermaßen die PGC-1 $\alpha$ -Expression erhöht und somit die mitochondriale Biogenese beeinflusst (Muhlhausler et al. 2009). Somit könnte eine positive Auswirkung von Rosiglitazon auf die altersbedingte chronische Entzündung unter anderem mit einer Zunahme der mitochondrialen Biogenese und Verminderung oxidativer Schäden und Inflammation in Zusammenhang stehen.

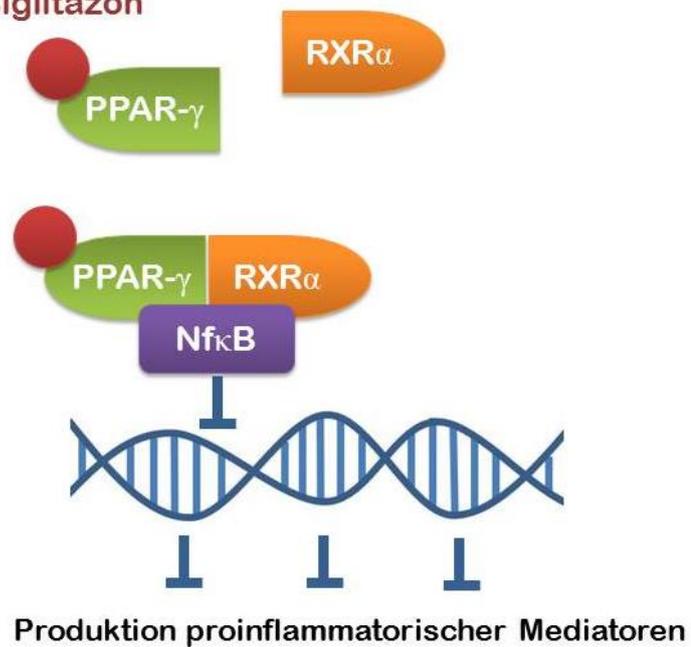
## A) Transaktivierung

Rosiglitazon



## B) Transrepression

Rosiglitazon



**Abbildung 7: Mechanismen der Rosiglitazon-vermittelten Wirkweise von PPAR- $\gamma$**

„Peroxisome proliferator-activated receptors“ (PPARs) sind liganden-aktivierte Transkriptionsfaktoren welche die Genexpression über zwei Mechanismen regulieren können: Transaktivierung und Transrepression.

**A) Transaktivierung:** Nach Bindung des Liganden (Rosiglitazon) bildet PPAR- $\gamma$  mit „retinoid X receptor- $\alpha$ “ (RXR $\alpha$ ) einen Heterodimer-Komplex. Dieser bindet an DNA-spezifische Sequenzen, die „PPAR responsive elements“ (PPREs) und induziert die Expression von Zielgenen des Lipid- und Glukosestoffwechsels. Der Co-Aktivatoren PGC-1 $\alpha$  erhöht die transkriptionale Aktivität von PPAR- $\gamma$ .

**B) Transrepression:** Nach Bindung des Liganden (Rosiglitazon) kann PPAR- $\gamma$  die Aktivität von Transkriptionsfaktoren hemmen, z.B. bei „nuclear factor“ (NF)- $\kappa$ B über direkte Bindung an die p65 Untereinheit. Somit wird die Bindung von NF $\kappa$ B an die DNA und die Expression inflammatorischer Zielgene verhindert. Modifiziert nach (Coll et al. 2009)

## 7. Die Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse

Die Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse (HPA-Achse) stellt ein dreigliedriges neuroendokrines System dar, welches aus dem Hypothalamus, der Hypophyse und der Nebennierenrinde besteht und eine zentrale Rolle in dem Ablauf einer Stressreaktion einnimmt.

Durch primär sensorische Organe erfasste Stressoren lösen im Organismus neben psychischen Reaktionen auch vegetative Symptome aus wie z.B. Erhöhung der Herzfrequenz und des Blutdrucks, welche vom limbischen System und dem präfrontalen Cortex erfasst und an den Hypothalamus weitergeleitet werden (Selye 1950). Im Hinblick auf die HPA-Achse nimmt hierbei der *Nucleus paraventricularis* (PVN) eine zentrale Stellung ein, da er Afferenzen unter anderem aus dem limbischen System und anderen hypothalamischen Kerngebieten erhält und Efferenzen an den Hypophysenvorderlappen (HVL, Adenohypophyse) und den Hypophysenhinterlappen (HHL, Neurohypophyse) weitergibt (Nickel et al. 1992). Der PVN besteht aus zwei verschiedenen Zelltypen. Die größeren magnozellulären Neurone bilden die Hormone Oxytocin (reguliert die Kontraktion des Uterus und der Milchdrüse) und Vasopressin (reguliert den Wasserhaushalt), welche über ihre Axone an den HHL weitergeleitet und dort in Vesikeln gespeichert und bei Bedarf an den Blutkreislauf abgegeben werden (Brownstein et al. 1980). Die kleineren parvozellulären Neurone bilden das „corticotropin-releasing hormone“ (CRH), welches über neuronale Projektionen in die *Median eminence* (ME) gelangt und über Abgabe an das Portalblutgefäßsystem den HVL erreicht (Whitnall et al. 1985).

Die nächste Station der Stress-Achse bildet die Hypophyse, welche sich in einen Vorderlappen (HVL), Zwischenlappen (HZL) und Hinterlappen (HHL) gliedert. Der HHL enthält Pituizyten, Blutgefäße und Nervenfasern und bleibt mit dem Hypothalamus über den Hypophysenstiel (*Infundibulum*) verbunden (Whitnall et al. 1985). Der HVL stellt den sogenannten Drüsenteil der Hypophyse dar und ist der Bildungsort von essentiellen Hormonen wie Somatotropin, follikelstimulierendes Hormon, luteinisierendes Hormon, Thyreotropin und Prolaktin. In Bezug auf die HPA-Achse stellt die Produktion von Adrenocorticotropem Hormon (ACTH) durch den HVL die wichtigste Funktion dar. Das über das Portalblut ankommende CRH bindet an Rezeptoren auf den corticotropen Zellen des Vorderlappens und stimuliert die Sekretion von ACTH (Nickel et al. 1992).

Die letzte Schaltstelle der HPA-Achse stellt die Nebenniere dar, welche sich in Rinde und Mark aufteilt. Nachdem ACTH in den peripheren Blutkreislauf abgegeben wurde, kann es in der Nebennierenrinde die Freisetzung von Glucocorticoiden, vor allem Corticosteron bzw. Cortisol, veranlassen (Selye 1950). Über einen negativen Feedback-Mechanismus vor allem auf Ebene des Hypothalamus hemmen die Glucocorticoide ihrerseits die HPA-Achse (Dallman et al. 1994).

### 7.1 Die Aktivierung der HPA-Achse durch Zytokine

Neben psychischen Stressoren ist mittlerweile allgemein bekannt, dass auch das Immunsystem einen Einfluss auf die HPA-Achse hat und die während eines Entzündungsgeschehens freigesetzten Zytokine ebenfalls die Sekretion von antiinflammatorischen Glucocorticoiden veranlassen können. Die Zytokine können die HPA-

Achse auf verschiedenen Ebenen aktivieren. Am Entzündungsort freigesetzte Zytokine können Zellen des PVN direkt stimulieren, indem sie die Bluthirnschranke über die in Kapitel 2.2.2. bereits beschriebenen Mechanismen überwinden oder dort lokal gebildet werden, und anschließend die Sekretion von CRH induzieren (Turnbull & Rivier 1999).

Eine Reihe von Zytokinen, unter anderem IL-1, IL-1ra, TNF $\alpha$ , IL-6 und IL-2, können aber auch direkt auf Ebene der Hypophyse wirken und das Hypophysenwachstum sowie die Hormonfreisetzung beeinflussen, indem sie z.B. in den corticotropen Zellen die ACTH-Produktion stimulieren (Arzt et al. 1999; Arzt 2001; Haedo et al. 2009).

Daneben existiert auch eine lokale Synthese von Zytokinen in der Hypophyse, welche unter anderem durch LPS-Rezeptoren auf den follikulostellaten (FS-) Zellen geregelt ist (Gloddek et al. 2001) und durch Immunstimuli verstärkt werden kann (Spangelo et al. 1994). Unter diesen lokal synthetisierten Zytokinen nimmt IL-6 eine maßgebliche Rolle ein, dessen Rezeptoren auf verschiedenen hypophysären Zelltypen, unter anderem auch auf corticotropen Zellen gefunden wurden (Ohmichi et al. 1992). Die intrahypophysäre Produktion und Freisetzung von IL-6 kann durch TNF $\alpha$ , IL-1 und LPS induziert werden (Nash et al. 1992; Spangelo et al. 1994), wobei hauptsächlich die FS-Zellen für die IL-6 Produktion verantwortlich sind. Bei den FS-Zellen, welche circa 5 – 10 % der Zellen des HVL ausmachen, handelt es sich um agranuläre, sternförmige, nicht-endokrine Zellen. IL-6 fördert auf corticotropen Zellen die Freisetzung von ACTH und moduliert somit die Antwort der Hypophyse im Rahmen eines Entzündungsgeschehens (Renner et al. 1998). Neben Rezeptoren für IL-6 wurden auch Bindungsstellen für TNF $\alpha$  im Hypophysenvorderlappen von Maus und Ratte entdeckt. Systemisch verabreichtes TNF $\alpha$  führt zu einem Anstieg von ACTH im Plasma, während es in Zellkulturen die Freisetzung von ACTH eher hemmt (Bernardini et al. 1990; Gaillard et al. 1990; Wolvers et al. 1993). Eine hypophysäre Synthese von TNF $\alpha$  konnte bis jetzt jedoch noch nicht eindeutig nachgewiesen werden. Auch IL-1 Rezeptoren kommen in der Hypophyse vor (Parnet et al. 1993). IL-1 beeinflusst das Wachstum hypophysärer Zellen und stimuliert die Freisetzung mehrerer Hormone des HVL, unter anderem auch ACTH (Bernton et al. 1987).

Zytokine können auch auf Ebene der Nebennierenrinde wirken und den Anstieg zirkulierender Glucocorticoide durch eine Entzündung oder einen Infekt verstärken. TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  und IL-6 werden ebenfalls lokal durch residierende Makrophagen gebildet. Es wurde gezeigt, dass IL-1 $\beta$  und IL-6 sowohl *in vivo* als auch *in vitro* die Corticosteron/Cortisol Ausschüttung steigern und LPS die adrenale Expression dieser beiden Zytokine erhöht (Ehrhart-Bornstein et al. 1998).

## 7.2 Einfluss des Alterns auf die HPA-Achse

Es gibt mehrere Hinweise auf eine veränderte Regulation der HPA-Achse im Altern. Generell geht man von einer verstärkten Aktivierung der HPA-Achse einhergehend mit einem gestörten negativen Feedbackmechanismus im Altern aus (Magri et al. 1997). Im Ruhezustand zeigt die HPA-Achse einen zirkadianen und ultradianen Rhythmus mit pulsatilem Glucocorticoidausschüttung, welche für die normale Funktion des Organismus von zentraler Bedeutung ist (Krieger et al. 1971). Beim Altern kann es zu einem Verlust dieser zirkadianen Rhythmik kommen, sowie zu erhöhten basalen Blutspiegeln von Glucocorticoiden, welche mit neurologischen Beeinträchtigungen assoziiert sein können (Ferrari et al. 2000; Ferrari et

al. 2001). Diese Erkenntnisse sind jedoch noch nicht gefestigt, da auch abweichende Ergebnisse mit eher niedrigeren Glukokortikoid-Werten im Altern gefunden wurden (Lupien et al. 1996; Lightman et al. 2000; Lupien et al. 2005; Ferrari & Magri 2008). Neben Abweichungen in den basalen Blutspiegeln kommt es nach einem Stressor zu einer Hypersekretion von Glucocorticoiden (Sapolsky et al. 1987), welche auf Grund der Beeinträchtigung des negativen Feedbackmechanismus schwieriger zu beenden ist (Sapolsky et al. 1986). Des Weiteren fanden sich beim Altern erhöhte Plasma-ACTH Level (Zietz et al. 2001; Cano et al. 2008).

Mehrere Studien konnten eine erniedrigte Dichte an CRH-Rezeptoren in der Hypophyse feststellen (Hauger et al. 1994; Ceccatelli et al. 1996). Über die CRH-Sekretion an sich gibt es unterschiedliche Beobachtungen, die entweder eine niedrigere (Kasckow et al. 1999) oder höhere CRH Produktion im Alter postulieren (Hauger et al. 1994).

Mit Rücksicht auf die chronische Entzündung welche sich im Alter einstellt, stellt sich die Frage, inwieweit diese erhöhte Zytokinkonzentration an der wohl häufig auftretenden übermäßigen Aktivierung der HPA-Achse im Altern beteiligt ist. So wurde bereits eine Korrelation zwischen erhöhten Werten des Zytokins IL-6 und ACTH im Serum von älteren Frauen festgestellt (Zietz et al. 2001). Obwohl dieser Ansatz auch von anderen Forschern als möglicher Zusammenhang erkannt wurde, wurde er jedoch noch nicht hinreichend untersucht (Giunta 2008).

Psychologischer Stress löst neben anderen körperlichen Reaktionen auch einen Anstieg der Körpertemperatur aus (Hasan & White 1979). Überführt man Ratten in eine unbekannte Umgebung (ein sog. „novel environment“) führt dies zu einem stress-induzierten Anstieg der Körpertemperatur (Blasig et al. 1978). In einigen Studien konnte zudem nachgewiesen werden, dass der stress-induzierte Temperaturanstieg mit einem Anstieg der IL-6 Plasmakonzentration gekoppelt ist (LeMay et al. 1990) und sich durch den Einsatz von Zyklooxygenase-Hemmern verhindern lässt (Singer et al. 1986; Kluger et al. 1987; Morimoto et al. 1991). Sowohl die altersbedingten Veränderungen in der Fieberantwort als auch in der HPA-Achse lassen die Frage aufkommen, inwieweit der psychologische Temperaturanstieg in Folge eines Stressors im Alter verändert ist.

## **8. Ziele und Fragestellungen der Arbeit**

Aufgrund der demographischen Entwicklung der Bevölkerung rücken das Älterwerden und die damit verbundenen Krankheitsbilder immer stärker in den Vordergrund und sind heutzutage Gegenstand intensiver Forschung. Trotz vieler Fortschritte und neuem Erkenntnisgewinn sind viele Fragestellungen noch nicht hinreichend geklärt und bedürfen kontinuierlicher Forschung. Die zunehmende Haltung von Haustieren als „Familienmitglieder“ führt dazu, dass auch in der Veterinärmedizin der geriatrische Patient in der Tierarztpraxis eine zunehmend bedeutendere Rolle einnimmt und die medizinische Versorgung altersbedingter Erkrankungen auch in der Tiermedizin an Relevanz gewinnt.

Im Rahmen dieser Arbeit sollten die im Alter auftretenden Veränderungen in der Entzündungsreaktion vor allem auf molekularbiologischer Ebene genauer aufgeschlüsselt werden, sowie weitere mögliche Faktoren, die diesen Veränderungen zu Grunde liegen können, analysiert werden.

### **1) Charakterisierung altersassoziierter Veränderungen während systemischer Entzündungsreaktionen**

In der ersten Studie sollten altersbedingte Veränderungen der systemischen Entzündungsreaktion nach einem experimentellen Immunstimulus mit LPS von jungen und alten Ratten auf mehreren Ebenen genauer und weiterführend untersucht werden. Dazu sollten möglichst umfassend physiologische und biochemische Parameter ermittelt werden, um neue Erkenntnisse zu gewinnen.

Mittels moderner stressfreier telemetrischer Messmethoden wurde die Ausprägung des „sickness behaviours“ in den Bereichen Fieberentwicklung, Lethargie, Anorexie, Adipsie und Gewichtsverlust bei 28°C untersucht um das Vorhandensein, bzw. das Ausmaß altersbedingter Veränderungen auf diverse Symptome der systemischen Entzündungsreaktion bei einer höheren Umgebungstemperatur zu untersuchen.

Die Konzentration der wichtigsten pro- und antiinflammatorischen zirkulierenden Zytokine wurde mittels ELISA oder Bioassay aus dem Blutplasma bestimmt um etwaige altersbedingte Veränderungen aufzuzeigen, sowohl in der basalen Konzentration als auch nach LPS-Stimulus. Des Weiteren wurde ein besonderes Augenmerk auf die Konzentration bzw. Konzentrationsänderung des zytokin-ähnlichen Hormons Leptin gelegt, um zu untersuchen, ob dieses Hormon im Alter nicht nur basal sondern auch explizit bei systemischen Entzündungsreaktionen im Alter höhere Konzentrationen annimmt und somit eventuell einen stärkeren Einfluss auf bisher beobachtete altersbedingte Veränderungen hat.

Auf Ebene der Genexpression erfolgte eine umfangreiche Untersuchung der in die inflammatorische Signalkaskade implizierten Mediatoren, welche sowohl das Gehirn als auch die Leber als peripheres Immunorgan einschloss. Diese Analyse umfasste die wichtigsten pro- und antiinflammatorischen Zytokine, proinflammatorische Transkriptionsfaktoren und Enzyme der Prostaglandinsynthese, um ein möglichst genaues Bild darüber zu gewinnen, welche Mediatoren im Alter eine Expressionsänderung erfahren. Zusätzlich wurden als mögliche Regulatoren microRNAs (mir146a) und oxidative Stressmarker analysiert, um einerseits zu

überprüfen, ob diese Faktoren im Alter bereits basal verändert sind und andererseits eine eventuelle Implikation in die altersbedingten Veränderungen bei systemischer Entzündung aufzuzeigen.

Auf Proteinebene wurden die wichtigsten Gehirnregionen immunhistochemisch auf Veränderungen der Aktivität und Expression proinflammatorischer Transkriptionsfaktoren im Altern untersucht.

### **2) Möglicher Einfluss von Leptin auf die altersbedingten Veränderungen der Entzündungsreaktion**

In dieser Studie sollte untersucht werden, ob die im Alter oftmals erhöhte Konzentration zirkulierenden Leptins in seiner Eigenschaft als proinflammatorisches Zytokin in kausalem Zusammenhang mit der veränderten Fieberreaktion im Altern steht. Hierzu wurden vor LPS-Stimulation durch Behandlung mit einem Leptin-Antiserum die endogenen Leptin-Level neutralisiert und eine eventuell unterschiedliche Ausprägung dieser Neutralisierung bei jungen und alten Ratten auf die Krankheitssymptomatik sowie die peripheren und zentralen inflammatorischen Marker analysiert. Somit sollte untersucht werden, ob erhöhte Leptin-Level bei alten Ratten beteiligt sind an der differenzierten Ausprägung der Fieberreaktion und auch anderer Parameter des „sickness behaviours“, inwieweit durch Leptin die zirkulierenden Blut-Level anderer Zytokine im Alter beeinflusst werden und ob Leptin auch an der veränderten altersbedingten mRNA-Expression inflammatorischer Marker in Hypothalamus und Leber beteiligt ist.

### **3) Möglicher Einfluss des Fettgewebes auf die chronische periphere Entzündung im Alter**

Ausgehend von der bedeutenden Rolle, welche das Fettgewebe als endokrines Organ im Rahmen der Adipositas in der Entstehung der chronischen peripheren Inflammation spielt, sollte untersucht werden, ob das Fettgewebe im Altern ebenfalls eine mögliche Quelle der erhöhten zirkulierenden Zytokinkonzentrationen darstellt. Hierzu wurde die Zytokinfreisetzung durch das Fettgewebe junger und alter Ratten im Zellkulturmedium sowohl basal als auch nach LPS-Stimulation gemessen. Hierdurch sollte weitergehend geklärt werden, ob im Alter das Fettgewebe entweder basal und/oder nach Immunstimulus vermehrt IL-6, TNF $\alpha$  und IL-1ra produziert.

### **4) Untersuchung der Effekte des PPAR- $\gamma$ Agonisten Rosiglitazon auf die altersassoziierten Veränderungen der Entzündungsreaktion**

Als PPAR- $\gamma$  Agonist besitzt das Antidiabetikum Rosiglitazon entzündungshemmende und neuroprotektive Eigenschaften, welche vor allem in Studien der zerebralen Ischämie oder neurodegenerativen Erkrankungen wie Parkinson erforscht wurden. Des Weiteren erhöht dieser Wirkstoff nachgewiesenermaßen die Expression des Co-Aktivators PGC-1 $\alpha$ , welcher die mitochondriale Biogenese anregt. In dieser Studie sollte durch Behandlung junger und alter Ratten mit Rosiglitazon vor Stimulation mit LPS zum einen analysiert werden, ob dieses Thiazolidinedion auch in Modellen der systemischen Entzündungsreaktion und der Fieberentwicklung eine akute

antiinflammatorische Wirkung zeigt. Daneben sollte durch Vergleich der Effekte zwischen jungen und alten Ratten untersucht werden, ob Rosiglitazon speziell auf die chronische Neuroinflammation im Altern Einfluss nimmt, indem die neuroprotektiven Effekte über Anregung der mitochondrialen Biogenese und Verminderung des oxidativen Stresses vermittelt werden. Hierzu wurde neben Messung der Ausprägung des „sickness behaviours“, sowie der zentralen und peripheren Mediatoren ein besonderes Augenmerk auch auf die Expression der in die mitochondriale Biogenese implizierten oxidativen Stressmarker gelegt.

### **5) Analyse der Implikation von Zytokinveränderungen in die altersbedingten Veränderungen in der Aktivierung der HPA-Achse**

Es ist bekannt, dass im Altern die HPA-Achse verändert ist. Da die HPA-Achse ebenfalls durch Zytokine beeinflusst wird und mittlerweile fest steht, dass im Altern sowohl peripher als auch zentral ein erhöhter inflammatorischer Zustand vorherrscht, der unter anderem durch das Vorliegen erhöhter Zytokin-Level charakterisiert ist, liegt die Fragestellung nahe, inwieweit ein Zusammenhang zwischen diesen beiden Konditionen besteht. Inwieweit ist die verstärkte inflammatorische Aktivierung im Altern beteiligt an der Deregulation der HPA-Achse? Um diesen Zusammenhang weiter aufzuklären, wurde aufbauend aus Erkenntnissen aus vorangegangenen Forschungsarbeiten an jungen Ratten (Fuchs 2013) ein altersbedingter Einfluss auf drei verschiedenen Ebenen untersucht:

Mittels Immunhistochemie wurden Hypophysen junger und alter Ratten sowohl basal als auch nach LPS-Stimulation auf eine differenzierte Aktivierung und Expression des proinflammatorischen Transkriptionsfaktors NF-IL6 untersucht.

Es wurden Zellkulturen des HVL alter Ratten angefertigt, welche, zum Teil nach vorheriger Inkubation mit verschiedenen Zytokin-Antiseren, mit LPS stimuliert wurden, um anschließend die Zytokinproduktion der Zellen im Mediumüberstand zu analysieren. Hierdurch sollte überprüft werden, ob der HVL alter Ratten auf LPS-Stimulation mit einer gegenüber jungen Ratten veränderten Ausschüttung von IL-6 und TNF $\alpha$  reagiert und die Blockung eines bestimmten Zytokins mittels Antiserum eine von den jungen Ratten unterschiedliche Auswirkung auf die IL-6 und TNF $\alpha$ -Freisetzung hat.

Schlussendlich wurde ein psychologischer Stressor, der sogenannte „novel environment“ Stressor eingesetzt, um zu untersuchen, ob die altersbedingte Veränderung der Fieberreaktion, die bekanntermaßen bei Entzündungsreaktionen stattfindet, sich auch in der stressinduzierten Erhöhung der Körpertemperatur widerspiegelt.

## II. Material und Methoden

### Technische Geräte

<b>Bezeichnung</b>	<b>Modell</b>	<b>Hersteller</b>
Aqua bidest Anlage	Milli-Q Biocel	Millipore, Eschborn
Autoklav	Systec 2540 EL	Systec Wettenberg
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 mit:	Olympus BX50	Olympus Optical, D- Hamburg
Digitale schwarz-weiß Kamera	Spot Insight, Model 3.1.0	Diagnostic Instruments – Visitron Systems, D- Puchheim
Spot Insight Software		Diagnostic Instruments, Michigan, USA
Metamorph-Software	Version 7.7.5	Diagnostic Instruments – Visitron Systems, D- Puchheim
Guillotine		Werkstatt Kerckhoff Institut, Bad Nauheim
Heißluftsterilisator	ED 115/E2	Binder GmbH, D-Tuttlingen
Homogenisator	SONOPULS	Bandelin Electronic GmbH & Co KG, D-Berlin
Kryostat	Typ HM 500 O	Microm GmbH, D-Walldorf
Lamina	Herasafe	Kendro Laboratory Product GmbH, Hanau
Mikroflow TM Sicherheitswerkbank Klasse 2	Modell 20229	Nunc, Wiesbaden
Minishaker/Vortex	MS1	IKA Works Inc., Wilmington, NC, USA
Perfusionsanlage		W.G.Kerckhoff Institut, D- Bad-Nauheim
pH-Meter	inoLab® 7110	Wissenschaftlich-Technische Werkstätten GmbH, D- Weilheim
Pipettiergerät	Pipetboy	Integra Biosciences GmbH, D-Fernwald
Pipettierhelfer	Easypet	Eppendorf AG, D-Hamburg
Power Supply	Power Pac 200	BioRad, München
Schermaschine	Typ GH 004	Aesculap, Tuttlingen

Schlauchpumpe	Minipuls-3	Abimed Analysen Technik, D-Langefeld
Schüttler Rotomix	Type 50800	Barnstead International, Dubuque, IA, USA
Schwannenhalslampe	Intralux 500	Volpi AG, Zürich, Schweiz
Sicherheits-Bunsenbrenner	Fireboy	Technomara, D-Fernwald
Spectrophotometer	DU ® 50	Beckman Coulter, Brea, CA, USA
StepOnePlus™ Real-Time PCR System		Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
Sterilbank	Microflow Biological Safety Cabinet	Thermo Electrocorporation, D-Langensfeld
Thermoblock	QBT	VWR, D-Darmstadt
Tischrühr- und Heizgerät	Combimag	Roth GmbH, D-Karlsruhe
Tischrühr- und Heizgerät	PCT Basic	IKA Labortechnik, D-Staufen
Ultraschall-Wasserbad	Sonorex RK 100	Bandelin, D-Berlin
Waage zum Wiegen der Tiere	Satorius universal	Sartorius AG, D-Göttingen
Waagen zum Abwiegen von Trockensubstanzen	P1210N; AE 50 und PM 2500	Mettler Toledo, D-Gießen
Wärmematte		MarMed GmbH, Cölbe
Wärmematte	TR-100 FST + EA4013	Messmer Elektronik, Dettenhausen
Wärmeschrank	Typ 5050 EK	Haereus, D-Hanau
Zentrifuge	Megafuge 1.0 R	Heraeus Sepatech GmbH, D-Osterode
Zentrifuge	PerfectSpinP	PEQLAB Biotechnologie GmbH, D-Erlangen
Zentrifuge für 96well Platten	Spectrafuge mini	neo Lab, D-Heidelberg

### Software

Bezeichnung	Hersteller
Accudiet 1.20	AccuScan Instruments, Columbus, OH, USA
Adobe Photoshop, Version 6.0	Adobe Systems GmbH, Unterschleißheim
DIETDAT, Version 1.70	AccuScan Instruments, Columbus, OH, USA
Dietmax	AccuScan Instruments, Columbus, OH, USA
EndNote Programm, Version X5	Thomson ISI ResearchSoft, Carlsbad, CA, USA
Graph Pad Prism®, Version 5.0	GraphPad Software, Inc., San Diego, CA-USA
Metamorph, Version 5.05 / 7.7.5	Diagnostic Instruments – Visitron Systems, D-Puchheim
Microsoft® Office Excel, Version 6.0	Microsoft Corporation, D-München
Microsoft® Office Word, Version 6.0	Microsoft Corporation, D-München
StepOne Software, Version 2.1	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
SigmaStat, Version 2.0	Jandel Scientific, CA-Corte Madera
Stat View®	Abacus Concepts, Berkeley, CA, USA

Vital View Version 3.1	Respironics Inc-MiniMitter, Bend, OR, USA
------------------------	---

### Gebrauchsmaterial allgemein

Bezeichnung	Modell	Hersteller
Glasflaschen	verschiedene Volumina	Schott AG, Mainz
Magnetrührstäbchen	PTFE ummantelt	Roth GmbH, Karlsruhe
Messkolben	Klasse A, 1-, 2- und 5 l	Roth GmbH, Karlsruhe
Messzylinder	Klasse A, 100- und 250 ml	Roth GmbH, Karlsruhe
Pipetten	verschiedene Größen	Eppendorf AG, Hamburg
Reaktionsgefäßständer		Roth GmbH, Karlsruhe
Schraubdeckeldosen	unsteril, 40 ml	Roth GmbH, Karlsruhe

### Verbrauchsmaterial allgemein

Bezeichnung	Modell	Hersteller
Einmalhandschuhe	aus Latex	UNIGLOVES® GmbH, Troisdorf
Einmalhandschuhe N-Dex®	aus Nitril	Best Manufacturing Company, Menlo GA, USA
Labortücher	Kimtech Science	Kimberley-Clarke Europe Limited, Reigate, England
Parafilm®		Roth Laborbedarf, Karlsruhe
Pasteur-Pipetten	einweg	MAGV, Rabenau
Pipettenspitzen	verschiedene Größen 10-, 100-, 1000 µl	Greiner Bio-One GmbH, Kremsmünster, Österreich
Pipettenspitzen mit Filter	verschiedene Größe 10-, 100-, 1000 µl	Fa Eppendorf-Natheler-Hinz-GmbH, Hamburg
PS-Röhrchen	steril: 12-, 15-, 50 ml	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Safe-Lock Tubes	Reaktionsgefäße 3810, 0,5-, 1,5-, 2 ml	Fa Eppendorf-Natheler-Hinz-GmbH, Hamburg
Serologische Pipetten	steril: 5-, 10-, 25-, 50 ml	Sarstedt AG&Co, Nürmbrecht
Skalpellklingen	BB522	Aesculap-Werke AG, Tuttlingen

## 1. In vitro Modelle

### Material

#### Ge- und Verbrauch

Bezeichnung	Modell	Hersteller
Deckgläschen	15 x 15 mm Stärke 1	Menzel GmbH, Braunschweig
Einwegspritzen	1 ml	B. Braun, Melsungen
Filterpapier	Ø 10 cm	Macherey-Nagel, Düren
Flexiperm®	Mikro-12 Kammersysteme	Haereus, Hanau
Kim-Wipes	Fusselfreie Tücher	Kimberley-Clark, Mainz
Multi-Wellplatten	12-fach	Greiner Bio One, Frickenhausen
Neubauer-Zählkammer		Brand, Wertheim
Pasteurpipetten	230 mm aus Glas	MAGV, Rabenau
Petrischale (Glas)	Ø 11 cm	MAGV, Rabenau
Petrischalen (Plastik)	94/16 mm	Sarstedt, Nümbrecht
Präparationsbesteck		Aesculap-B.Braun, Tuttlingen
Röhrchen, steril	15 und 50 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Sterilfilter	FP 30/0, 2 CA-S	Schleicher und Schuell GmbH, Dassel
Sterile Einmalpipetten	1; 5; 10; 50 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Sterile Glaspasteurpipetten		Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt
Sterilfilter		Whatman, Dassel
Teflonschläuche	Innendurchmesser 0,75- und 1,98 mm	Kronlab, Sinsheim

### Chemikalien

Bezeichnung	Hersteller
Carbogengas	Messer Griesheim GmbH, Neuried
Dispase 1	Roche Deutschland, Grenzach-Wyhlen
DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium)	Invitrogen, Darmstadt
DMEM F12	Invitrogen, Darmstadt
(EBSS) Earle's balanced salt solution	Invitrogen, Darmstadt
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Sigma-Aldrich, München
Fetales Kälberserum (FKS)	PAA, Cölbe
(HBSS) Hank's buffered salt solution	Biochrom, Berlin
HEPES Natriumsalz (N-(2-Hydroxyethyl)-piperazin- N'-(2-ethansulfonsäure)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
HEPES 1 molar	Invitrogen, Darmstadt
L-Glutamin	Biochrom, Berlin
Lipopolysaccharid (E.coli, Serotyp 0111:B4)	Sigma-Aldrich, München
Lipopolysaccharid-Stocklösung (1 mg/ml)	Lösen von LPS in PBS und Lagerung bei -20 °C

Lipopolysaccharid-Gebrauchslösung (100 µg/ml)	Verdünnung der Stocklösung in PBS und Lagerung bei -20 °C
Narcoren®	Merial, Halbermoos
PBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline)	PAA, Cölbe
PBS (instant), pH 7,2 - 7,4	Ansatz aus PBS tablets in Aqua dd.. (1 Tablette/ 200 ml)
Penicillin/Streptomycin	Biochrom, Berlin
Paraformaldehyd-Lösung (PFA) 4 %	Ansatz von PFA (Pulverform) in PBS, unter Rühren bei 60 °C, Filtration mit Faltenfilter
Poly-L-Lysin	Biochrom, Berlin
Steriles <i>Aqua bidest.</i> für die Zellkultur	PAA, Pasching, Österreich
Trypsin	Biochrom, Berlin

## 1.1 Versuchstiere

Für die Versuche wurden männliche Wistar-Ratten aus der institutseigenen Zucht verwendet, deren Elterntiere von Charles River WIGA (Sulzfeld) stammten.

Die Tiere wurden bei einer konstanten Raumtemperatur von  $23 \pm 1$  °C, einer relativen Luftfeuchte von 50 % und einem 12/12 Stunden hell/dunkel Rhythmus (Lichtphase von 7:00 bis 19:00) gehalten und aufgezogen. Bis zu einem Erreichen von  $110 \pm 10$  g Körpergewicht wurden die Jungtiere zusammen mit dem Muttertier in transparenten Polycarbonat-Käfigen des Typ IV gehalten. Anschließend wurden die Tiere abgesetzt und nach Geschlechtern getrennt in Gruppen von maximal 5 Tieren in Polycarbonat-Käfige des Typ III umgesetzt. Die Tiere wurden auf Einstreu der Firma Sniff gehalten und hatten Futter und Wasser *ad libitum* zur Verfügung.

Die in dieser Arbeit als „jung“ bezeichnete Tiergruppe hatte bei Versuchsbeginn ein Gewicht von 200 – 250 g erreicht, dies entsprach einem Alter von 8 Wochen.

Die als „alt“ angegebene Tiergruppe wurde erst mit  $24 \pm 1$  Monat in den Versuch genommen, das durchschnittliche Gewicht betrug zu diesem Zeitpunkt 603 g.

Vor Beginn der Studie wurden die durchzuführenden Tierversuche beim Regierungspräsidium Hessen per Antrag genehmigt (Projektnummer GI 18/2 Nr.1/2011) bzw. angezeigt (V54-19, c20/15c GI18/2).

## 1.2 Primäre Zellkultur des Hypophysenvorderlappens

### 1.2.1 Versuchsaufbau

Um altersbedingte Veränderungen in der Zytokinfreisetzung durch den Hypophysenvorderlappen zu untersuchen, wurde eine Primärkultur aus dem Hypophysenvorderlappen alter Ratten angelegt. Diese wurde mit Antikörpern gegen verschiedene Zytokine oder dem Zytokin selbst inkubiert und anschließend mit LPS (100 µg/ml) stimuliert, um den Einfluss spezifischer Zytokine im LPS-induzierten Zytokin-Milieu genauer untersuchen zu können.

Die Überstände wurden mittels Bioassay auf die Zytokine TNF $\alpha$  und IL-6 untersucht, die Zellen mit 4 % PFA fixiert und immunzytochemisch analysiert.

## 1.2.2 Durchführung

### Verwendete Lösungen

Bezeichnung	Zusammensetzung
<b>Dulbecco´s Modified Eagle Medium (DMEM)</b>	43,5 ml DMEM 5 ml fetales Kälberserum (FKS) 1 ml Glutamin 500 µl Penicillin/Streptomycin
<b>Earle´s Balanced Salt Solution (EBSS)</b>	40 ml CO <sub>2</sub> -begaste EBSS
<b>Hanks´ Balanced Salt Solution (HBSS)</b>	40 ml CO <sub>2</sub> -begaste HBSS 1,6 ml HEPES (20 mM)
<b>Dispase I-Enzymlösung</b>	1 ml CO <sub>2</sub> -begaste HBSS (20 mM HEPES) 2 mg Dispase I
<b>Inaktivierungslösung</b>	10 ml CO <sub>2</sub> -begaste HBSS (20 mM HEPES) 1 mM EDTA

**Tabelle 1: Übersicht über die für die HVL-Zellkultur verwendeten Lösungen**

### Vorbereitung

Als Zellkulturkammerwände wurden in einzelne Mikrokammern geschnittene Flexiperm®-Mikro-12-Blöcke verwendet, welche zuvor für 30 min in 70 %igem Ethanol sterilisiert wurden. Mittels Pinzette wurden sterile Deckgläschen auf die glatte Seite der abgetrockneten Zellkulturkammerwände gelegt, welche sich nach leichtem Andrücken ansaugten und den Boden der Zellkulturkammern bildeten. Um eine bessere Anhaftung und anschließendes Wachstum der Zellen zu gewährleisten, wurden die Deckglasböden mit 200 µl Poly-L-Lysin beschichtet und über Nacht lichtgeschützt bei 4 °C inkubiert. Das überschüssige Poly-L-Lysin wurde am darauffolgenden Tag abgesaugt und die Kammern mit sterilem *Aqua bidest.* ausgewaschen. Die bei den nachfolgenden Schritten verwendeten Lösungen sind in Tabelle 1 beschrieben.

### Präparation des Hypophysenvorderlappens

Da eine möglichst sterile Arbeitsweise notwendig war, wurden hitzesterilisierte Instrumente zur Präparation, sowie autoklavierte Reaktionsgefäße und Pipettenspitzen verwendet. Soweit möglich wurden die Arbeiten und Vorbereitungen unter einer Sterilbank durchgeführt.

Die Ratten wurden nach durch Genickbruch getötet und mit einer Guillotine dekapitiert, woraufhin der Kopf zügig in ein Becherglas gefüllt mit eiskaltem PBS getaucht wurde.

Als erstes wurde mit dem Skalpell ein sagittaler Schnitt an der Kopfhaut durchgeführt. Die Haut wurde von der Schädeldecke abpräpariert und weggeklappt, woraufhin die Muskulatur der Schädelknochen abpräpariert und die Schädeldecke vorsichtig von kranial nach kaudal abgetragen wurde. Nach Durchtrennung der Sehnerven wurde das Gehirn vom Siebbein gelöst und entnommen.

Die Hypophyse lag daraufhin frei in der Fossa hypophysialis und wurde nach Durchtrennen der Hirnhäute mit einem kleinen Spatel aus der Schädelkalotte entnommen und in eine Petrischale mit eiskaltem EBSS überführt.

Unter einem Binokular wurde der Vorderlappen von den übrigen Anteilen der Hypophyse gelöst. Hierzu wurde der Vorderlappen mit einer kleinen Pinzette auf der Petrischale fixiert. Mit einer zweiten Pinzette wurde der Hinter- und Zwischenlappen der Hypophyse ergriffen und konnte vom Vorderlappen losgelöst und bis zum enzymatischen Verdau in eine mit HBSS gefüllte Petrischale überführt werden.

### **Dipase-I-Verdau**

Das Gewebe wurde für 90 Minuten in der Dispase I-Enzymlösung unter CO<sub>2</sub>-Begasung bei 37 °C inkubiert. Während der Inkubation wurde das Gewebe alle 30 Minuten kurz aufgeschüttelt. Dieser Schritt diente der enzymatischen Dissoziation der Zellen aus dem Gewebeverband, indem die Metalloprotease Dispase interzelluläre Matrixbestandteile wie Fibronectin und Kollagen spaltete (Schmitz 2011).

### **Enzyminaktivierung**

Um den enzymatischen Verdau zu stoppen wurde die Dispase I-Enzymlösung vorsichtig abgenommen und 5 ml der Inaktivierungslösung auf das Gewebe gegeben. Anschließend erfolgt eine Zentrifugation bei 1000 rpm. Die Inaktivierungslösung wurde gegen frische ausgetauscht und nach erneuter Zentrifugation gegen DMEM ausgewechselt. Durch leichtes Klopfen an das Röhrchen wurde das Gewebe gelockert und das Röhrchen nochmal zentrifugiert. Nach Abnahme des Mediums wurde das Röhrchen mit 2 ml DMEM aufgefüllt.

### **Dissoziation der Zellen**

Mittels einer sterilen 1 ml Pipettenspitze wurde das Gewebe durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren mechanisch zerkleinert und die Zellen dissoziiert. In einer Neubauer Zählkammer wurden 10 Kleinstquadrate ausgezählt und die Zellsuspension anschließend mit vorgewärmtem DMEM auf circa 300.000 Zellen/ml verdünnt.

Die verdünnte Zellsuspension wurde anschließend in die im Brutschrank vorgewärmten Zellkulturkammern überführt (350 µl pro Zellkulturkammer) und im Brutschrank bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und 95 % Luftfeuchtigkeit inkubiert.

### **Versuchsablauf**

24 Stunden nach Anlegen der Zellkultur wurde das alte Medium mit einer Pasteurpipette abgesaugt, frisches, auf 37 °C erwärmtes, DMEM auf die Zellen gegeben und diese zur weiteren Kultivierung im Brutschrank gelagert.

3 Tage später wurde das serumhaltige Medium gegen serumfreies Medium ausgetauscht, um etwaige durch das Kälberserum vermittelte inflammatorische Eigenwirkungen auszuschließen. Nach 24stündiger Inkubation mit dem serumfreien Medium wurde der eigentliche Versuch durchgeführt.

Hierzu wurde der serumfreie Mediumüberstand abgenommen und für spätere Messungen bei -20 °C gelagert. Anschließend wurde frisches serumfreies Medium mit dem jeweiligen Zytokin-Antikörper auf die Zellkulturkammern gegeben (Tabelle 2). Nach 30-minütiger

Inkubation im Brutschrank wurden die Zellen danach mit 100 µg/ml LPS oder der gleichen Menge an serumfreien Medium stimuliert (Kontrolle) und für weitere 6 Stunden im Brutschrank inkubiert.

Nach diesem Zeitraum erfolgte die Abnahme des Mediums, welches für spätere Untersuchungen bei -20 °C gelagert wurde.

Nach Abnahme der Zellkulturkammerwände wurden die Deckgläschen mit dem Zellrasen einzeln in die „wells“ einer 12-well Platte gelegt und mit eiskaltem 4 %igem PFA fixiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS konnten die Zellen in dieser Form 14 Tage lang bei 4 °C gelagert werden.

### Verwendete Antikörper

Substanz	Konzentration	Hersteller
TNF $\alpha$ Antikörper	1 µl/350 µl	National Institute for Biological Standards and Control (NIBSC) Gabe von Giamal N. Luheshi, Douglas Institut, McGill Universität Montreal, Kanada
IL-6 Antikörper	10 µl/350 µl	
IL-10 Antikörper	10 µl/350 µl	
IL-1ra	10 µl/350 µl	

**Tabelle 2: Übersicht über die verwendeten Zytokin-Antikörper**

## 1.3 Fat Explants

### 1.3.1 Versuchsaufbau

Zur Klärung der Fragestellung, ob Fettgewebe als Zytokin-freisetzendes Organ eine mögliche Rolle bei der Entstehung chronischer, peripherer Entzündung im Alter spielt, wurden Fettgewebeskulturen, die sogenannten „Fat Explants“ (Pohl et al. 2009), angelegt. Dabei wurde Fettgewebe aus drei verschiedenen Regionen (epididymal, retroperitoneal und subkutan) von alten und jungen Ratten entnommen und mit LPS (100 ng/ml) oder PBS für 24h stimuliert. Die freigesetzten Zytokine wurden anschließend in Überständen mittels Bioassay oder ELISA untersucht (TNF $\alpha$ , IL-6 und IL-1ra).

### 1.3.2 Durchführung

#### Verwendete Lösungen

Bezeichnung	Zusammensetzung
<b>Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS)</b>	100 ml HBSS 1000 $\mu$ l Penicillin/Streptomycin 1,5 ml HEPES (1 molar)
<b>Dulbecco's Modified Eagle Medium F 12 (DMEM/F12)</b>	45 ml DMEM/F12 500 $\mu$ l Penicillin/Streptomycin 0,75 ml HEPES (1 molar) 5 ml fetales Kälberserum

**Tabelle 3: Übersicht über die für die „Fat Explants“ verwendeten Lösungen**

#### Präparation des Fettgewebes

Um eine möglichst sterile Vorgehensweise zu erreichen, wurden hitzesterilisierte Instrumente zur Präparation verwendet und alle Arbeitsschritte ab der Entnahme des Fettgewebes unter einer Sterilbank durchgeführt. Die für die folgenden Schritte verwendeten Lösungen sind in Tabelle 3 beschrieben, der Versuchsablauf ist schematisch in Abbildung 8 dargestellt.

Junge Ratten zeigten deutlich weniger Fettgewebe. Folglich wurden pro Präparation zwei junge Ratten oder eine alte Ratte benötigt. Die Ratten wurden durch Genickbruch getötet und per Guillotine dekapitiert. Nach Verbringen in Rückenlage, wurde das Fell am Bauchbereich großzügig mit 70 %igem Ethanol übergossen. Die Haut am Bauch wurde mittels chirurgischer Pinzette hochgehalten und mit einer Schere von der Bauchdecke entfernt. Anschließend wurde die Bauchmuskulatur vorsichtig mit einem Skalpell eröffnet und der Schnitt entlang der *Linea alba* bis in die Leistengegend verlängert. Zusätzlich wurden beidseits querverlaufende Entlastungsschnitte angelegt, um das benötigte Fettgewebe zu erreichen und dabei eine Kontamination durch die Haut / äußere Muskulatur weiterhin zu vermeiden. Das epididymale Fettgewebe wurde beidseits dorsal des Hodens um den Samenleiter entnommen, das retroperitoneale Fettgewebe beidseits am kaudalen Nierenpol und das subkutane Fettgewebe kaudal an der Leistengegend beidseits zwischen Muskulatur und *Subkutis*. Das Gewebe wurde in entsprechend markierte sterile 50 ml PS-Röhrchen gegeben, welche 10 – 15 ml kalte HBSS Lösung enthielten.

Unter der Sterilbank wurde eine 12-well Platte mit 2 ml HBSS pro „well“ vorbereitet. Der Inhalt jedes PS-Röhrchens wurde zuerst in eine sterile Petrischale gekippt. Anschließend wurden circa 60 mg große Stücke des Gewebes herausgeschnitten und in die 12-well Platte gelegt.

Um Unterschieden in der Zytokinfreisetzung des Fettgewebes durch kleine Lokalisationsunterschiede vorzubeugen, wurde hierbei nach folgendem Schema verfahren:

In jedes „well“ kamen 3 Fettgewebsstücke die aus der kranialen, mittleren und kaudalen Region des zuvor entnommen größeren Fettgewebsstückes stammten. Hierbei wurden sowohl linke und rechte Seite als Entnahmestelle als auch, bei den jungen Ratten, beide Tieren randomisiert gemischt. Es wurde jedoch strikt nach epididymalem, retroperitonealem und subkutanem Fettgewebe getrennt. Auf diese Weise entstanden pro Fettgewebsart 8 „wells“, die jeweils drei 60 mg Stücke aus kranialer, mittlerer und kaudaler Region einer Fettgewebsart enthielten.

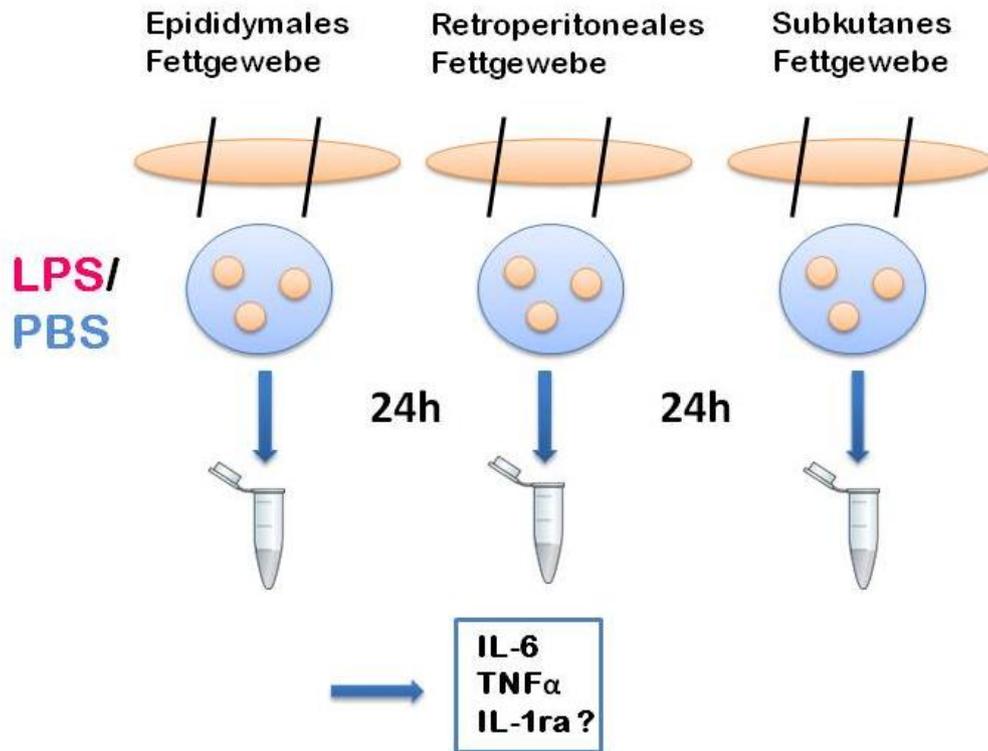
Nachdem die Fettgewebsstücke dreimal mit kalter HBSS-Lösung gewaschen wurden, wurde zu jedem „well“ 2 ml auf 37 °C erwärmtes DMEM/F12 zugegeben.

Die 12-well Platten wurden daraufhin für 24 Stunden im Brutschrank bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und 95 % Luftfeuchte inkubiert.

### **Versuchsablauf**

Am darauffolgenden Tag wurde das Medium ausgetauscht und der eigentliche Versuch gestartet. Hierzu wurde serumfreies Medium verwendet, welchem LPS (100 ng/ml) oder PBS in der gleichen Menge zugesetzt wurde. Nach Abnahme des alten Mediums und Zugabe von 2 ml erwärmten Medium pro „well“, wurden die 12-well Platten wiederum in den Brutschrank gestellt. Nach 24stündiger Inkubation mit LPS oder PBS wurde der Überstand abgenommen und bis zur weiterführenden Analyse bei -20 °C gelagert.

Die verbliebenen Fettgewebsstücke jedes „wells“ wurden separat gewogen, so dass später die Zytokinkonzentration pro Gramm eingesetzten Fettgewebes errechnet werden konnte.



**Abbildung 8: Schematische Darstellung des Versuchsablaufs der „Fat Explants“**

Es wurden möglichst steril Fettgewebstücke aus einer epididymalen, retroperitonealen und subkutanen Region einer Ratte entnommen. Je 3 Stücke (je circa 60 mg) wurden anschließend pro Region entnommen und in 2 ml Zellkulturmedium kultiviert. 24 Stunden nach Stimulation mit LPS (100 ng/ml) oder PBS wurde der Überstand abgenommen und mittels Bioassay oder ELISA die Konzentration der Zytokine IL-6, TNF $\alpha$  und IL-1ra gemessen.

## 2. In vivo Modelle

### Material

#### Ge- und Verbrauch

Bezeichnung	Modell	Hersteller
Einstreu für Tierkäfige	SS14-H1505-219	Sniff, Soest
Standard Rattenfutter	R-Z V1324-000	Sniff, Soest
Polycarbonatkäfige	Typ III	Ehret Labor- und Pharmatechnik, Emmerdingen
Polycarbonatkäfige	Typ IV	Ehret Labor- und Pharmatechnik, Emmerdingen
Sterile Einwegkanülen	Sterican®	Braun Melsungen AG, Melsungen
Sterile Einwegspritzen 1 ml	BD Plastipak®	Becton Dickinson S.A., Madrid
Wasserflasche mit Tränkenippel		Ehret Labor- und Pharmatechnik, Emmerdingen
Zellstoff	ungebleicht 40 x 60 cm	ZVG Zellstoff Vertriebs GmbH, Troisdorf

#### Medikamente und OP-Bedarf

Handelsname	Wirkstoff	Hersteller
Antisedan®	Atipamezolhydrochlorid	Pfizer GmbH, Berlin
Vidisic®-Augengel	Carbomer 40000-60000	Dr. Mann Pharma, Bausch & Lomb, Berlin
Braunol®	Povidon-Iod Lösung	B. Braun, Melsungen
Cepetor® KH	Medetomidin	cp-pharma GmbH Burgdorf,
Cutasept®	2-Propanol-Benzalkoniumchlroid	Bode, Hamburg
Isotone NaCl- Lösung 0,9 %	Natriumchlorid	B. Braun, Melsungen
Ketamin® 10 %	Ketaminhydrochlorid	Belapharm, Vechta
Metacam® Injektionslösung, 5 mg/kg	Meloxicam	Boehringer Ingelheim Vetmedica GmbH, Ingelheim
Narcoren®	Pentobarbital-Natrium	Merial, Halbermoos
Operationsbesteck		Aesculap, Tuttlingen
Polyester	Nahtmaterial, nicht resorbierbar: USP 2/0, EP 3	SMI, St. Vith, Belgien
Sterile Schlinggazetupfer	6 x 9 cm	Weisweiler GmbH & Co.KG, Münster
Surgicryl	Nahtmaterial, resorbierbar: USP 3/0, EP 2	SMI, St. Vith, Belgien
Vetranquil® 1%	Acepromazin	Albrecht GmbH, Aulendorf

## Chemikalien

Bezeichnung	Hersteller
Cremophor® EL (Polyoxyethylenglyceroltriricinoleat 35, DAC)	Sigma-Aldrich, München
Chremophor-Gebrauchslösung (30 %)	Cremophor® EL in PBS auf 30 % verdünnt
Leptin Antiserum (sheep anti-mouse/rat)	NIBSC Gabe von Giamal N. Luheshi, Douglas Institut, McGill Universität Montreal, Kanada
Lipopolysaccharid (E.coli, Serotyp 0111:B4)	Sigma-Aldrich, München
Lipopolysaccharid-Stocklösung (1 mg/ml)	Lösen von LPS in PBS und Lagerung bei -20 °C
Lipopolysaccharid-Gebrauchslösung (100 µg/ml)	Verdünnung der Stocklösung in PBS und Lagerung bei -20 °C
Normal Sheep Serum	Sigma-Aldrich, München
PBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline)	PAA, Cölbe
Rosiglitazon	Enzo Life Sciences GmbH, Lörrach

## 2.1 Versuchsaufbau

### 2.1.1 Studie „Altern“

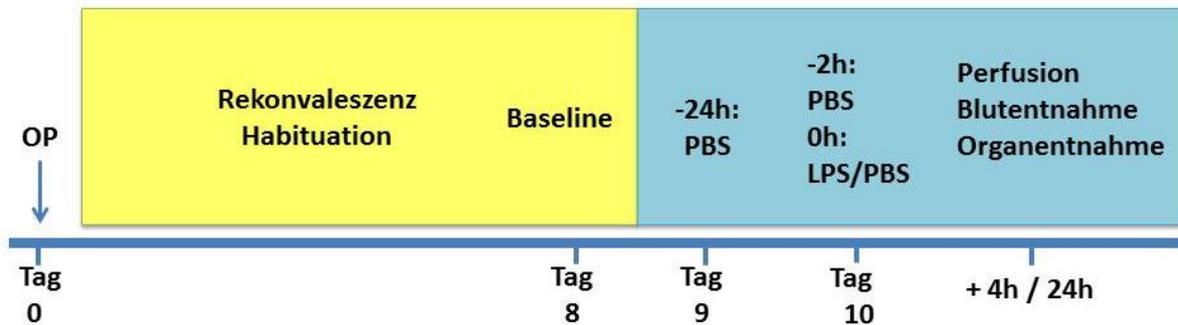
Für alle *in vivo* Studien wurden Ratten aus zwei verschiedenen Altersgruppen verwendet. Die „junge“ Gruppe bestand aus Ratten mit einem Ausgangsgewicht von 200 – 250 g und einem Alter von 2 Monaten. Dem gegenüber setzte sich die „alte“ Gruppe aus Ratten zusammen, die  $24 \pm 1$  Monat alt waren und deren Gewicht im Durchschnitt 603 g betrug.

Zu Beginn des Versuches wurde den Tieren intraperitoneal ein telemetrischer Sender implantiert. In der nachfolgenden Rekonvaleszenzphase von 8 Tagen wurden die Tiere täglich zwischen 9:00 und 10:00 Uhr zur Kontrolle der Genesung gewogen und an die Fixation durch die menschliche Hand gewöhnt, um den Stress bei den nachfolgenden intraperitonealen Injektionen zu minimieren.

Nach 6 Tagen wurden die Tiere in spezielle Messkäfige in die Klimakammer umgestellt und zwei Tage an die neue Umgebung und den veränderten Zugang zu Futter und Wasser gewöhnt. Gleichzeitig wurde mit den Aufzeichnungen der abdominalen Körpertemperatur, der motorischen Aktivität und der Futter- und Wasseraufnahme über das telemetrische System begonnen. Am 8. Tag wurde mit der Aufzeichnung der „Baseline“ begonnen. An diesem Tag wurden die Tiere zur gewohnten Zeit gewogen und gehandelt, ansonsten aber nicht manipuliert, um eine ungestörte Aufzeichnung zu gewährleisten.

Um eine möglichst gute Vergleichbarkeit bezüglich der Injektionshäufigkeit und des injizierten Volumens mit Studie „Leptin Antiserum“ und Studie „Rosiglitazon“ zu gewährleisten, wurden die Tiere 24 und 2 Stunden vor der eigentlichen Injektion mit Lipopolysaccharid (LPS) bereits mit steriler, Phosphat-gepufferter Saline (PBS) (1 ml/kg) injiziert. An Tag 10 (Zeitpunkt 0) wurden die Tiere zwischen 11:00 und 13:00 mit LPS (100 µg/kg) oder als Kontrollgruppe mit PBS (1 ml/kg) injiziert. Alle Injektionen erfolgten

intraperitoneal. 4 oder 24 Stunden nach der letzten Injektion wurden die Tiere perfundiert und Blut und Gewebe zur weiteren Untersuchung gewonnen (Abbildung 9).



**Abbildung 9: Zeitverlauf Studie „Altern“**

Schematische Darstellung des zeitlichen Versuchsablaufs nach Implantation des telemetrischen Senders (OP = Operation an Tag 0).

### 2.1.2 Studie „Leptin Antiserum“

Analog dem Zeitverlauf von Studie „Altern“ wurden die Tiere nach der Senderimplantation an Tag 0 bis Tag 6 täglich gewogen und gehandelt. An Tag 6 erfolgte das Umsetzen in die Klimakammer, allerdings verblieben die Tiere hierfür erst in ihren gewohnten Käfigen und lediglich die Temperatur und motorische Aktivität wurde aufgezeichnet.

#### „Novel environment“ Versuch

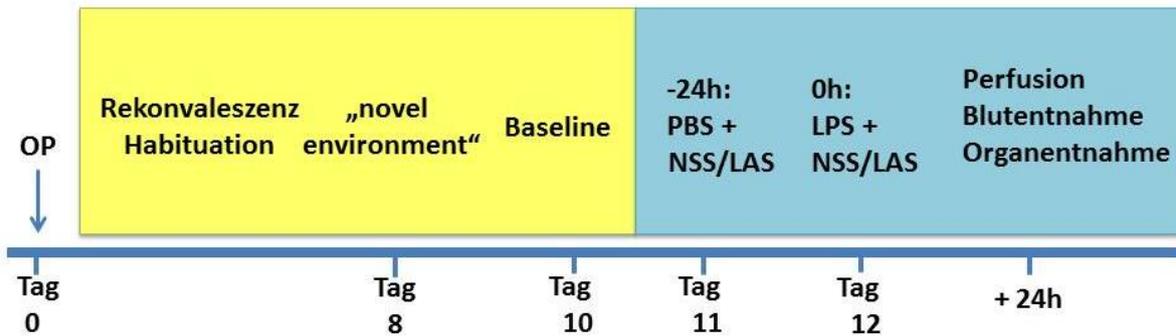
Innerhalb dieser Studie wurden die Tiere einem „novel environment“ Versuch (Käfigwechsel) unterzogen. Am Tag zuvor (Tag 7) wurden die Tiere ohne jegliche Manipulation in der Klimakammer belassen, um eine ungestörte Baseline als Vergleich aufzuzeichnen. Am folgenden Tag (Tag 8) wurde ebenfalls auf Wiegen und Handling verzichtet. Um 10:00 Uhr wurden die Tiere in neue Käfige des gleichen Modells umgesetzt, welche jedoch weder Einstreu, noch Futter oder Wasser enthielten. Anschließend wurde die Reaktion der Tiere auf diesen Stressor mittels des verwendeten telemetrischen Systems über 4 Stunden aufgezeichnet.

#### Leptin Antiserum Versuch

Sofort nach Beendigung des „novel environment“ Versuchs wurden die Tiere in die Messkäfige umgesetzt und die Aufzeichnung der Futter- und Wasseraufnahme begonnen.

Nach Aufzeichnung der Baseline an Tag 10 wurden die Tiere an Tag 11 zwischen 11:00 und 13:00 mit Leptin Antiserum (LAS) (1 ml/kg) oder mit „Normal Sheep Serum“ (NSS) im gleichen Volumen injiziert. Zeitgleich bekamen alle Tiere eine PBS-Injektion (1 ml/kg), damit telemetrische Kontrolldaten für diesen Versuch aufgezeichnet werden konnten. Einen Tag später (Zeitpunkt 0) wurden die Tiere zwischen 11:00 und 13:00 Uhr nochmals mit Leptin Antiserum/Normal Sheep Serum und gleichzeitig mit LPS (100 µg/kg) injiziert. Alle Injektionen erfolgten intraperitoneal.

24 Stunden nach der letzten Injektion wurden die Tiere transkardial perfundiert und Blut und Gewebe für weiterführende Untersuchungen entnommen (Abbildung 10).



**Abbildung 10: Zeitverlauf Studie „Leptin Antiserum“**

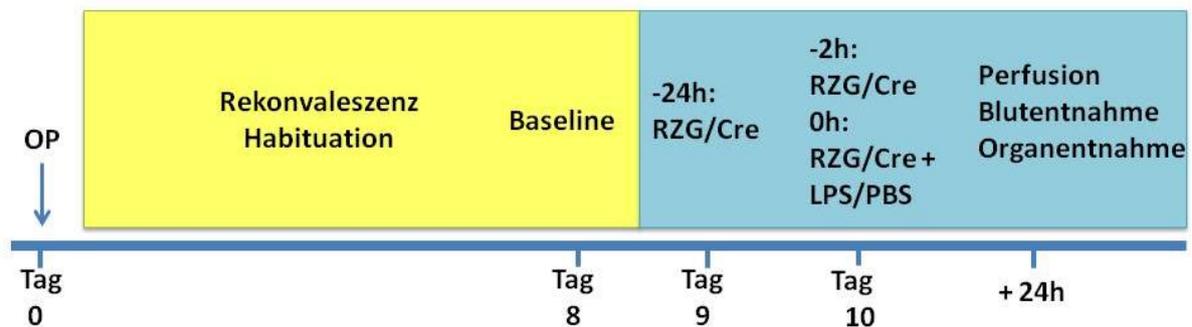
Schematische Darstellung des zeitlichen Versuchsablaufs nach Implantation des telemetrischen Senders (OP = Operation an Tag 0)

### 2.1.3 Studie „Rosiglitazon“

Von der Senderimplantation an Tag 0 bis zur Aufzeichnung der Baseline an Tag 8 erfolgten alle Schritte analog dem für Studie „Altern“ geschilderten Versuchsablaufs.

In Studie „Rosiglitazon“ wurden die Tiere 3 mal innerhalb von 24 Stunden mit dem Wirkstoff Rosiglitazon (RZG) (3 mg/kg) oder dem Lösungsmittel Cremophor 30 % (Cre) (gleiche Volumina) injiziert, um eine ausreichende Anflutung des Wirkspiegels zu gewährleisten, bevor die Tiere mit LPS (100 µg/kg) oder als Kontrolle mit PBS (1 ml/kg) injiziert wurden. Die Verabreichung von Rosiglitazon/Cremophor erfolgte 24 Stunden und 2 Stunden vor und nochmal gleichzeitig mit LPS/PBS-Gabe an Zeitpunkt 0. Alle Injektionen erfolgten intraperitoneal.

24 Stunden nach der letzten Injektion wurden die Tiere transkardial perfundiert und Blut und Gewebe zur weitergehenden Verarbeitung gesammelt (Abbildung 11).



**Abbildung 11: Zeitverlauf Studie „Rosiglitazon“**

Schematische Darstellung des zeitlichen Versuchsablaufs nach Implantation des telemetrischen Senders (OP = Operation an Tag 0).

## 2.2 Intraabdominale Implantation des Radiotransmitters

### Narkose

Den Tieren wurde circa 18 Stunden vor dem operativen Eingriff zur präventiven Analgesie eine Injektion des Schmerzmittels Meloxicam (2 mg/kg) subkutan (s.c.) verabreicht sowie nochmals 20 Minuten vor der Operation. Die Narkose setzte sich aus den Bestandteilen Ketamin (50 mg/kg), Medetomidin (5 mg/kg) und Acepromazin (0,5 mg/kg) zusammen und wurde als Mischspritze i.p. verabreicht. Die Narkosetiefe und Schmerzfreiheit des Tieres wurden anhand des Lidreflexes am Auge und des Flexorreflexes an der Zwischenzehenhaut überprüft. Waren beide Reflexe nicht mehr auslösbar, war eine ausreichende Narkosetiefe erreicht. Die Narkose wurde frühestens nach 45 Minuten mit Atipamezol (1 mg/kg i.p.) teilantagonisiert.

### Operation

Circa 20 Minuten nach Narkoseinjektion befand sich das Tier in ausreichender Narkosetiefe und wurde auf eine Wärmematte in Rückenlage verbracht. In die Lidspalten wurde Vidisic®-Augengel eingegeben, um einem Austrocknen der Kornea vorzubeugen. Das Operationsfeld wurde in einem Bereich von 4 cm um den Nabel geschoren und anschließend dreimal mit Cutasept® desinfiziert. Es erfolgte ein 3 cm großer Hautschnitt mit dem Skalpell in der Medianen, daraufhin wurde das Unterhautgewebe stumpf von der Bauchmuskulatur gelöst. Anschließend wurde die Bauchhöhle entlang der *Linea alba* mittels Stichinzision eröffnet und dieser Stich mit einer Schere nach Metzenbaum längs erweitert. Nach Einbringen des desinfizierten Senders in die Bauchhöhle wurde die Wunde verschlossen, indem die Muskelschicht mit resorbierbarem Nahtmaterial fortlaufend und die Haut mit nicht resorbierbarem Nahtmaterial mit Einzelheften genäht wurde.

### Nachsorge

24 Stunden nach der Senderimplantation wurde den Ratten nochmals Meloxicam (2 mg/kg KM) subkutan verabreicht. Die Operationsnaht wurde täglich kontrolliert und das Allgemeinbefinden des Tieres anhand der Futter- und Wasseraufnahme sowie des Körpergewichtes beurteilt.

## 2.3 Intraperitoneale Injektionen

### 2.3.1 Lipopolysaccharid (LPS)

Das verwendete LPS wurde aus der LPS-Stocklösung (1 mg/ml) mittels sterilem PBS auf 100 µg/ml verdünnt und in Aliquots von je 1 ml bei -20 °C gelagert.

Kurz vor Versuchsbeginn wurde das LPS bei Raumtemperatur aufgetaut und für die Injektion die benötigte Dosis von 100 µg/kg in eine sterile Einwegspritze aufgezogen. Die intraperitoneale Injektion erfolgte in der Medianen der *Regio umbilicalis*. Als Kontrolle wurde die gleiche Menge an sterilem PBS injiziert.

### **2.3.2 Leptin Antiserum (LAS)**

Das Leptin Antiserum wurde in Aliquots von 1 ml bei -20 °C gelagert.

Kurz vor Versuchsbeginn wurde das Leptin Antiserum bei Raumtemperatur aufgetaut. Die benötigte Menge für die gewünschte Dosis von 1 ml/kg wurde in eine sterile Einwegspritze aufgezogen und den Ratten intraperitoneal in der Medianen der *Regio umbilicalis* injiziert. Als Kontrollsubstanz diente das „Normal Sheep Serum“ (NSS), welches den Tieren in der gleichen Menge intraperitoneal verabreicht wurde.

### **2.3.3 Rosiglitazon (RZG)**

Rosiglitazon wurde in Pulverform vom Hersteller bezogen und am Tag der Injektion in 30 %igem Cremophor gelöst. Für das 30 %ige Cremophor wurde die Originallösung Cremophor® EL mit sterilem PBS auf 30 % verdünnt, durch Erwärmen im Blockthermostat auf 45 °C und durch Schwenken vollständig gemischt und in Aliquots von 1 ml bei -20 °C gelagert.

Am Tag der Injektion wurde für jede Ratte eine Dosis Rosiglitazon von 3 mg/kg abgewogen und in je 1 ml Cremophor 30 % aufgelöst. Hierzu wurden die gefrorenen Cremophor-Aliquots im Blockthermostat auf 35 °C erwärmt, die abgewogene Menge Rosiglitazon dazugegeben und diese dann für 10 Minuten im Ultraschallbad behandelt, so dass das Rosiglitazon sich vollständig im Cremophor auflöste.

Anschließend wurde diese Dosis in eine sterile Einwegspritze aufgezogen und den Ratten intraperitoneal injiziert. Als Kontrolle wurde 30 %iges Cremophor in der gleichen Menge verabreicht.

### 3. Erfassung physiologischer Daten

#### Material

Bezeichnung	Modell	Hersteller
Alufolie		Roth GmbH, Karlsruhe
Einwegkanülen Sterican®	0,45 x 12 mm und 0,4 x 20 mm	Braun Melsungen AG, Melsungen
Einwegspritzen	1-, 5 ml	BD Plastipak, Becton-Dickinson, Heidelberg
Futterbehälter		institutseigene Herstellung
Heparin-Natrium-250000-ratiopharm®	Heparin-Natrium 250000 I.E./10 ml	Ratiopharm, Ulm
Klebeband	Silkafix® 2,5 cm x 9,2 m	Lohmann Rauscher International GmbH & Co.KG, Rengsdorf
Messkäfig mit Deckel	30 x 24 x 22,5 cm (L x H x B)	W.G. Kerckhoff-Institut, Bad Nauheim
Narcoren®	Pentobarbital-Natrium	Merial, Hallbergmos
Natriumchlorid (NaCl)		Merck, Darmstadt
Objektträger	76 x 22 mm	Menzel GmbH, Braunschweig
Operationsbesteck		Aesculap, Tuttlingen
Physiologische Kochsalzlösung		0,9% NaCl in <i>Aqua bidest.</i>
Rasierklingen	752/1/SS	Campden Instruments Limited, Loughborough, UK
Telemetrie - Dataport (Körpertemperatur)	DP-24 Dataport	Minimitter Company Inc., Sunriver, OR, USA
Telemetrie-Empfängerplatte (30 x 22,5 x 3 cm)	RA -1000	Minimitter Company Inc., Sunriver, OR, USA
Telemetrie - Sender (16 x 11mm)	VM-FH TR-3000	Minimitter Company Inc., Sunriver, OR, USA
Tissue Freezing Medium®		Leica Instruments GmbH, Nussloch
Waagschale für Tiere		institutseigene Herstellung
Handelsübliche Wasserflaschen für Kleintiere mit speziellem Tränkenippel		Accusan Instruments, Columbus, OH, USA

#### 3.1 Telemetrie

##### 3.1.1 Der Sender

Die Telemetrie ermöglicht die stressfreie Aufzeichnung der abdominalen Körpertemperatur und motorischen Aktivität über einen längeren Zeitraum, während die Versuchstiere in einer gewohnten Umgebung verbleiben.

In dieser Studie wurden dazu telemetrische Sender des Typs VM-FH TR-3000 verwendet, deren Messprinzip auf einem wärmeempfindlichen Transistor mit negativem Temperaturkoeffizienten beruht (Abbildung 12). Eine Veränderung der Umgebungstemperatur führte zu einer Frequenzänderung des Senders und anhand zuvor ermittelter Referenzfrequenzen für die Temperaturen  $37,0 \pm 0,1 \text{ }^\circ\text{C}$  und  $41,0 \pm 0,1 \text{ }^\circ\text{C}$  konnten Temperaturwerte für alle anderen Frequenzen mit dem dazugehörigen Computerprogramm (VitalView, Version 3.1) ermittelt und im 5 Minuten Takt registriert werden.

Über ein im Sender enthaltenes Trägheitselement konnte gleichzeitig die motorische Aktivität der Versuchstiere telemetrisch aufgezeichnet werden. Abhängig von der Entfernung und Ausrichtung des Trägheitselementes zum Empfänger variierte das von ihm emittierte Signal in seiner Stärke. Die somit erfassten Bewegungsänderungen des Tieres wurden als sogenannte „activity counts“ ebenfalls in 5 minütigen Abständen erfasst und von der Computersoftware registriert (Harkin et al. 2002).

Die Messelektronik des Senders wurde von 2 Polyethylenzylindern umschlossen, welche in eine auf  $70 \text{ }^\circ\text{C}$  erhitzte Paraffin/Elvax®-Mischung (Mini Mitter Company Inc.) getaucht wurden, um die Elektronik vor Feuchtigkeit zu schützen. Gleichzeitig wurde somit eine glatte Oberfläche geschaffen, um Fremdkörperreaktionen in der Peritonealhöhle zu minimieren. Die verwendeten Sender wurden über eine Knopfzelle mit Energie versorgt, welche im Abstand von 2 – 3 Monaten ausgetauscht werden musste.



**Abbildung 12: Telemetrischer Sender**

### **3.1.2 Der telemetrische Versuchsaufbau und durchgeführte Messungen**

Die telemetrischen Messungen fanden in einer Klimakammer statt, welche auf eine konstante Hell-Dunkel-Beleuchtung (7:00: Licht an, 19:00: Licht aus), eine relative Luftfeuchte von 50 % und eine Umgebungstemperatur von  $28 \text{ }^\circ\text{C}$  eingestellt worden war. Bei dieser Raumtemperatur war in früheren Studien gezeigt worden, dass alte Ratten Fieberreaktionen entwickeln können (Buchanan et al. 2003).

In der Klimakammer befanden sich die Empfängerplatten für das telemetrische System, welche die empfangenen Senderfrequenzen über einen Dataport an den angeschlossenen Computer weiterleiteten (Abbildung 13).

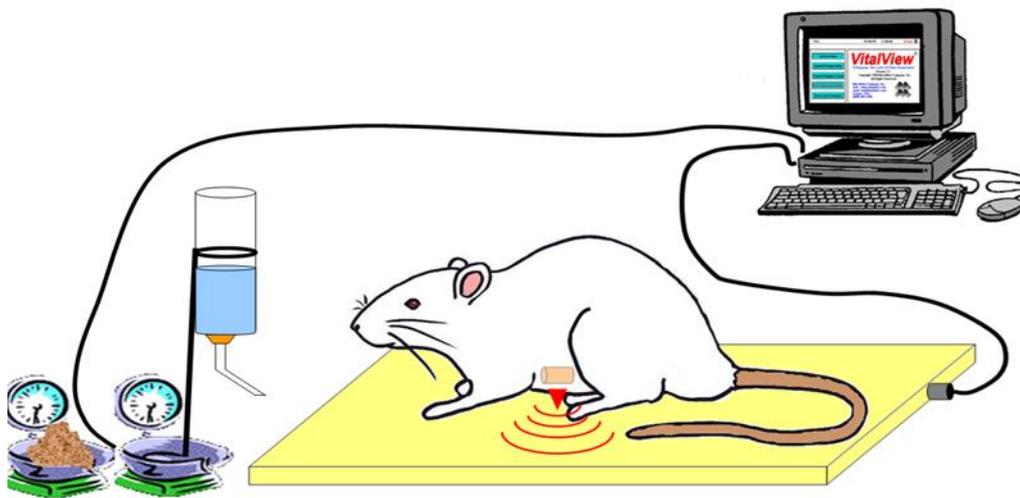
Auf den Empfängerplatten standen spezielle Messkäfige aus transparentem Plexiglas (30 x 22,5 x 24 cm; L x H x B) in welche die Tiere für den Versuch einzeln umgesetzt wurden.

Die Käfige enthielten Einstreu und wurden durch transparente Plexiglasdeckel verschlossen, welche mit Luftlöchern versehen waren.

Seitlich erhielten die Tiere über einen Plastiktunnel Zugang zu Futter *ad libitum*, welches für die Dauer des Versuches aus gemahlene Rattenzuchtfutterpellets bestand. Die Tiere erhielten über eine Nippeltränke Wasser *ad libitum*. Die Nippeltränke war über einem Schlauch mit einer Wasserflasche verbunden. Sowohl das Futterschälchen als auch die Wasserflasche befanden sich auf Waagen. Damit war eine genaue Bestimmung der erfolgten Futter- und Wasseraufnahme möglich. Beide Waagen waren über einen Dataport ebenfalls an einen Computer angeschlossen. Mittels der Software „AccuDiet“ wurde alle 5 Minuten der von den Waagen gemessene Wert erfasst und sowohl als Einzelwert als auch als kumulativer Wert aufgezeichnet.

Das verwendete System erlaubte somit eine stressfreie, kontinuierliche und exakte Aufzeichnung der Körpertemperatur, motorischen Aktivität sowie Futter- und Wasseraufnahme der Versuchstiere.

Des Weiteren wurden die Tiere täglich zwischen 9:00 und 10:00 Uhr gewogen und gehandelt, um zum einen die Gewichtsentwicklung zu dokumentieren und zum anderen die Tiere an den menschlichen Umgang und die Fixation zu gewöhnen. Dies gewährleistete später eine möglichst stressfreie Injektion bei der Versuchsdurchführung.



### Abbildung 13: Telemetrischer Versuchsaufbau

Über den intraabdominal implantierten Sender werden die Temperatur- und Aktivitätsmessungen auf die Empfängerplatte übertragen und mittels VitalView Software aufgezeichnet. Ein spezielles Waagesystem misst die Futter- und Wasseraufnahme und überträgt diese Daten an den Computer. (Damm 2012)

## 3.2 Perfusion und Organentnahme

4 oder 24 Stunden nach der letzten intraperitonealen Injektion wurden die Tiere zur Entnahme der für die Studie relevanten Organe mit eiskalter Kochsalzlösung transkardial perfundiert.

Den Tieren wurde intraperitoneal eine subletale Dosis Pentobarbital (160 mg/kg) verabreicht. Nach Aussetzen des Flexorreflexes wurden die Tiere in Rückenlage mit Silkafix® am Gitter einer Perfusionswanne fixiert. Als erstes wurde die Bauchhöhle praeumbilical eröffnet und nach Verlängerung des Schnittes bis zu den Rippenbögen durch ein Abtrennen des Diaphragmas von der Thoraxwand ebenfalls die Brusthöhle eröffnet. Um das Herz besser darstellen zu können, wurden die Rippen auf beiden Seiten durchtrennt und das Sternum nach kranial geklappt. Der Herzbeutel wurde entfernt und zwecks Blutgewinnung für die Zytokindiagnostik wurden mit einer heparinisierten Spritze aus dem rechten Ventrikel 4 bis 5 ml Blut entnommen. Als nächster Schritt wurde der linke Ventrikel an der Spitze mit einer Schere eröffnet und die Perfusionskanüle durch diese Öffnung vorsichtig in die Aorta vorgeschoben. Die Perfusionskanüle war über ein Schlauchsystem direkt mit der Perfusionsanlage verbunden, so dass über Regulierung durch einen Dreiwegehahn eiskalte, physiologische Kochsalzlösung in den Blutkreislauf der Ratte eingebracht und durch rasches Anschneiden des rechten Atriums auch wieder ausgespült werden konnte. Mittels angeschlossener Fußpumpe wurde während des Perfusionsvorgangs ein konstanter Druck von 120 mm Hg aufrechterhalten und auf diese Weise 300 – 400 ml Kochsalzlösung durch den Blutkreislauf gespült. Eine ausreichende Blässe der Leber, sowie eine farblose aus dem Herzen austretende Flüssigkeit, deuteten auf eine ausreichende Perfusion hin.

Nach der Perfusion wurden zügig die benötigten Organe entnommen und mittels Trockeneis schockgefroren.

### **Gehirn**

Der Kopf wurde am zweiten Halswirbel abgesetzt und anschließend ab dem *Os nasale* von Haut und Muskulatur befreit. Nach Entfernung der Halswirbel wurde der Schädelknochen vorsichtig von kaudal nach kranial abpräpariert und die Meninx entfernt. Nach Durchtrennen der austretenden Hirnnerven konnte das freigelegte Gehirn vorsichtig aus der Schädelhöhle entfernt werden. Es wurde mit einer Skalpellklinge an der *Fissura transversa cerebelli* in die Anteile Groß- und Kleinhirn getrennt und unverzüglich auf Trockeneis schockgefroren. Vor dem Einfrieren wurde der Bereich des Hypothalamus zum Schutz zusätzlich mit Tissue Freezing Medium® überschichtet. Abschließend wurde das Gehirn mit Parafilm und Alufolie umwickelt und in luftdicht verschlossenen Kunststoffbeuteln bei -55 °C gelagert.

### **Hypophyse**

Nach Entfernen des Gehirns verblieb die Hypophyse erst in der Schädelkalotte. Nachdem zuerst die Hirnhaut durchschnitten wurde, konnte die Hypophyse entnommen werden. Sie wurde komplett mit Tissue Freezing Medium® auf einer Plastischale bedeckt, auf Trockeneis schockgefroren und analog dem Gehirn verpackt und gelagert.

### **Leber**

In der bereits eröffneten Bauchhöhle wurde der linke kraniale Leberlappen entfernt, in Trockeneis schockgefroren und anschließend wie das Gehirn verpackt und gelagert.

### 3.3 Gewinnung und Aufbereitung der Blutproben

Vor der Blutentnahme wurden 5 ml Spritzen mit einer 21 G Kanüle versehen und der Konus mit Heparin gefüllt, um das Einsetzen der Gerinnung zu vermeiden.

Vor Einsetzen der Perfusion wurde mit der Kanüle in den rechten Herzventrikel eingestochen und 4 – 5 ml Blut entnommen. Die gewonnenen Blutproben wurden anschließend 10 min bei 6000 rpm zentrifugiert, das Plasma abgenommen und bei -20 °C gelagert.

### 3.4 Organverarbeitung am Kryostat für Immunhistochemie und RT-PCR

Die nach Perfusion mit physiologischer Kochsalzlösung gewonnenen Gehirne konnten sowohl für PCR als auch für Immunhistochemie verwendet werden. Zur Herstellung von Gefrierschnitten wurde der Kryostat auf eine Innentemperatur von -18 bis -22 °C heruntergekühlt und das *Cerebrum* mittels Tissue Freezing Medium® auf den Objektblock aufgefroren und dieser auf eine Objekttemperatur von -9 bis -11 °C eingestellt. Von *rostral* beginnend wurde das Großhirn in transversale Scheiben geschnitten und mehrere relevante Regionen im Bereich des Hypothalamus für die Immunhistochemie gesammelt. Diese umfassten von rostral nach kaudal das *Organum vasculosum laminae terminalis* (OVLT), den *Nucleus praeropticus medianus* (MnPo), das *Organum subfornicale* (SFO), den *Nucleus supraopticus* (SON), den *Nucleus paraventricularis* (PVN), den *Nucleus arcuatus* (ARC) und die *Eminentia mediana* (ME). Von diesen Regionen wurden je nach Ausdehnungsgrad 12 bis 18 Schnitte von 20 µm Durchmesser angefertigt und auf vorgekühlte Poly-L-Lysin beschichtete Objektträger aufgezogen und durch einmaliges, kurzes Antauen festgefroren. Die Poly-L-Lysin-Beschichtung zeigte über ihre positive Ladung eine Wechselwirkung mit der negativen Ladung des Gewebes und verbesserte somit die Adhäsion der Schnitte am Objektträger.

Zwischen den einzelnen erwähnten hypothalamischen Regionen wurden 80 µm Schnitte für die PCR gesammelt. Diese wurden auf einem Objektträger übereinandergestapelt, anschließend wurde die hypothalamische Region ausgeschnitten, nochmals in der Medianen in zwei gleich große Hälften zerteilt und in zwei separaten, vorgekühlten, sterilen Eppendorftubes (2 ml) gesammelt. Die Anteile des Großhirnrinde lateral und dorsal des Hypothalamus wurden ebenfalls in ein separates Eppendorftube verbracht und als „*Cortex*“ für spätere Untersuchungen aufbewahrt.

Das *Cerebellum* wurde ebenfalls aufgeblickt und von kaudal beginnend die *Area postrema* (AP) in 20 µm Scheiben geschnitten und wie bereits beschrieben auf Objektträger gezogen.

Die Gefrierschnitte sowie das für die PCR gesammelte Gewebe wurden bis zur weiterführenden Untersuchung bei -55 gelagert.

## 4. Erfassung biochemischer Parameter

### 4.1 Plasmaprobenanalyse

#### Material

#### Ge- und Verbrauch

Bezeichnung	Modell	Hersteller
Zellkulturflaschen	steril mit Filter: 50; 75; 250 und 550 ml	Greiner Bio- One GmbH, Frickenhausen
Gewebekulturplatten	steril, mit Abdeckplatte, 96 K	Greiner Bio- One GmbH, Frickenhausen
Heparin-Natrium 250000 Ratiopharm®	Heparin-Natrium	Ratiopharm GmbH, Ulm

#### Chemikalien und Substanzen

Bezeichnung	Hersteller
Actinomycin	Sigma-Aldrich, München
Albumin	Sigma-Aldrich
Avidin-HRP	BD Pharmingen
Fetales Kälberserum (FKS)	PAA, Pasching, Österreich
Gentamicin	Biochrom, Berlin
Glutamin	Biochrom, Berlin
Interleukin-6 Qualitätskontrollen und Standards	NIBSC, Potters Bar, UK
Isopropanol	Sigma-Aldrich, München
Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, München
MTT (3-[4,5-Dimethylthiazol-2yl]) 2,5-Diphenyl-Tetrazolium-bromid)	Sigma-Aldrich, München
Normal Sheep Serum	Sigma-Aldrich
OPD-Tabletten	Sigma-Aldrich
Penicillin/Streptomycin	Biochrom, Berlin
PBS (Dulbecco´s Phosphate Buffered Saline)	PAA, Cölbe
RMPI Medium	Rothwell Park Memorial Institute; Medium 1640, Fa. Life Technologies, Paisley, Scotland
Tumornekrosefaktor $\alpha$ Qualitätskontrollen und Standards	NIBSC, Potters Bar, UK
Tris HCL	Sigma-Aldrich, München
Trypsin	Biochrom, Berlin

## Leptin-ELISA

Bezeichnung	Hersteller
Adhesive plate sealer	Millipore, Massachusetts
Assaybuffer	
Enzyme Solution	
HRP Wash buffer Concentrate	
Quality Controls	
Rat/Mouse Leptin Antiserum	
Rat/Mouse Leptin Detection Antibody	
Rat/Mouse Leptin ELISA plate	
Rat/Mouse Leptin Matrix solution	
Rat Leptin Standards	
Stop Solution	
Substrate	

### 4.1.1. Grundlagen des Bioassays

Das Prinzip des Bioassays beruht auf der Tatsache, dass Zytokine in bestimmten Zelllinien spezifische biologische Reaktionen auslösen können. Im Unterschied zum ELISA detektiert der Bioassay nur die biologisch aktiven Formen verschiedener Zytokine und zeichnet sich durch eine sehr hohe Sensitivität aus, so dass bereits geringste Mengen eines Zytokins exakt bestimmt werden können. Ein weiterer Vorteil ist, dass er bis zu einem gewissen Maße auch speziesübergreifend genutzt werden kann. Die in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien zur Detektion von IL-6 und TNF $\alpha$  reagieren mit einer dosisabhängigen Zellproliferation bzw. Zellsterben auf das Vorliegen des jeweiligen Zytokins. Diese Effekte korrelieren direkt mit der Konzentration an aktivem Zytokin, welche über eine Farbreaktion photometrisch bestimmt werden kann (Mosmann 1983).

Hierbei wird die Umsetzung eines gelben MTT-Tetrazoliumsals (3-[4,5-Dimethylthiazol-2yl] 2,5-Diphenyl-Tetrazoliumbromid) zu dunkelblauen MTT-Formazankristallen gemessen. Diese Reaktion findet nur in den Mitochondrien lebender Zellen statt und wird durch die Succinyl-Dehydrogenase umgesetzt. Die Menge an gebildetem Formazan verhält sich direkt proportional zur Anzahl lebender Zellen (Mosmann 1983; Ibelgaufts 1995) und wird nach Lyse der Zellen und der Formazan-Kristalle mittels eines ELISA-Readers photometrisch bestimmt. Die für diese Arbeit beschriebenen Bioassays wurden im Institut für Veterinär-Physiologie und -Biochemie in Zusammenarbeit mit Jolanta Murgott durchgeführt.

### 4.1.2 IL-6 Bioassay

Für den IL-6 Bioassay wurde die Hybridoma B9 Zelllinie eingesetzt (Lansdorp et al. 1986), welche durch bioaktive Formen dieses Zytokins zur Proliferation angeregt wird, so dass anhand der Anzahl gewachsener Zellen die Menge an IL-6 in der vorliegenden Probe bestimmt werden kann. Das Detektionslimit lag hierbei bei 3 I.U./ml.

Bezeichnung	Zusammensetzung
<b>Assay Medium</b>	45 ml RPMI Medium 4 ml FKS 0,5 ml Glutamin (200 nm) 125 µl Mercaptoethanol 65 µl Gentamicin (10 ng/ml)
<b>Wachstumsmedium</b>	Assay Medium + 500 I.U. IL-6 Standard/ml
<b>MTT-Lösung</b>	0,1 g MTT in 20 ml PBS
<b>Isopropanol/HCL-Lösung</b>	4 ml 2N HCL in 196 ml Isopropanol

**Tabelle 4: Übersicht über die für den IL-6 Bioassay verwendeten Lösungen**

Alle Arbeitsschritte wurden unter möglichst sterilen Bedingungen unter einer Sterilbank durchgeführt. Die B9-Zellen wurden in einem spezifischen Medium unter Zugabe von 500 I.U. IL-6 Standard („Wachstumsmedium“) im Brutschrank kultiviert (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>, 95 % Luftfeuchte) und mussten alle 3 Tage passagiert werden. Hierbei wurde 1 ml der Zellsuspension mit 9 ml Medium in eine neue Kulturflasche umgesetzt. Die für die folgenden Schritte verwendeten Lösungen sind in Tabelle 4 beschrieben.

Der eigentliche Bioassay wurde auf einer 96-well-Mikrotiterplatte durchgeführt (Abbildung 14).

In die erste Reihe wurde ein Standard mit rekombinantem IL-6 einer bestimmten Konzentration (100 I.U./ml) vorgelegt. Dieser wurde von seiner ursprünglichen Konzentration kontinuierlich 1:2 mit Assay Medium (ohne IL-6) runterverdünnt, in dem je 100 µl aus den 200 µl des vorherigen „wells“ mit 100 µl Assay Medium gemischt wurden, wobei das erste „well“ dieser Reihe frei blieb (blank) und das letzte „well“ mit reinem Assay Medium gefüllt wurde.

Die nachfolgenden 2 Reihen enthielten die Qualitätskontrollen, welche eine bekannte Konzentration an rekombinantem IL-6 (QK1: 10 I.U./ml und QK2: 30 I.U./ml) aufwiesen und im Doppelansatz 1:2 mit Assay Medium runterverdünnt wurden.

In Reihe 4 bis 8 wurden die jeweiligen Proben im Doppelansatz aufgetragen und nach dem gleichen Prinzip 1:2 mit Assay Medium runterverdünnt.

Bei allen Reihen wurden aus dem Ansatz der letzten Verdünnungsstufe 100 µl verworfen, so dass in jedem „well“ ein Volumen von 100 µl vorlag.

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L
<b>1</b>	Blank	S1	S2 1:2	S3 1:4	S4 1:8	S5 1:16	S6 1:32	S7 1:64	S8 1:128	S9 1:256	S10 1:518	M
<b>2</b>	QK1	QK1	1:2	1:2	1:4	1:4	1:8	1:8	1:16	1:16	1:32	1:32
<b>3</b>	QK2	QK2	1:2	1:2	1:4	1:4	1:8	1:8	1:16	1:16	1:32	1:32
<b>4</b>	Probe	Probe	1:2	1:2	1:4	1:4	1:8	1:8	1:16	1:16	1:32	1:32
<b>5</b>	Probe	Probe	1:2	1:2	1:4	1:4	1:8	1:8	1:16	1:16	1:32	1:32
<b>6</b>	Probe	Probe	1:2	1:2	1:4	1:4	1:8	1:8	1:16	1:16	1:32	1:32
<b>7</b>	Probe	Probe	1:2	1:2	1:4	1:4	1:8	1:8	1:16	1:16	1:32	1:32
<b>8</b>	Probe	Probe	1:2	1:2	1:4	1:4	1:8	1:8	1:16	1:16	1:32	1:32

**Abbildung 14: Pipettierschema einer Mikrotiterplatte für den IL-6 Bioassay**

Reihe 1: A1 = Blank, B1 – K1 = Verdünnungsreihe der Standards, L1 = Kontrolle mit Medium (M)

Reihe 2-3: Verdünnungsreihen der Qualitätskontrollen (QK1 und QK2)

Reihe 4-8: Verdünnungsreihen der Proben

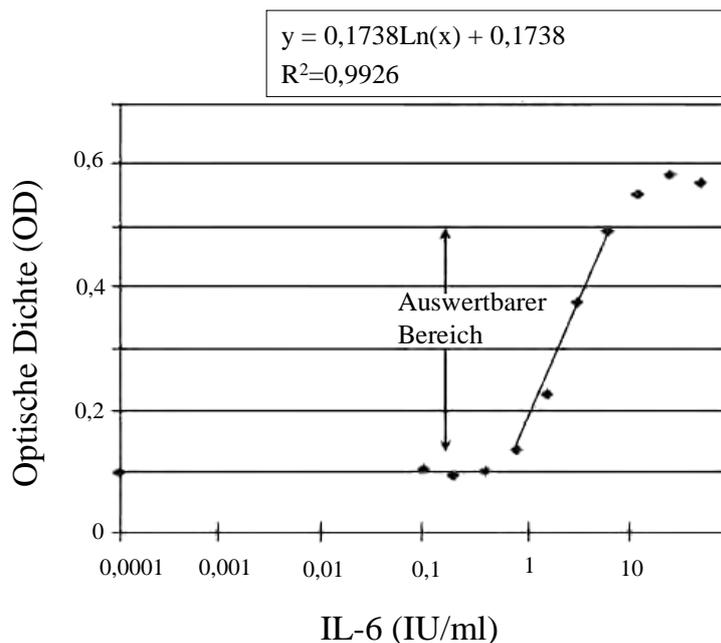
Die B9-Zellsuspension wurde 3 x 10 Minuten bei 2300 rpm zentrifugiert und nach Verwerfen des Überstandes das zellhaltige Pellet mit Assay Medium resuspendiert. Von dieser Suspension wurden 50 µl in einer Zählkammer nach Thoma eingesetzt und nach Auszählung von 80 Kleinstquadraten konnte der benötigte Verdünnungsfaktor ausgerechnet werden, um die Zellzahl auf 5000 Zellen pro 100 µl einzustellen:

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

Je 100 µl der verdünnten B9-Zellsuspension wurden pro „well“ in die Mikrotiterplatte pipettiert.

Anschließend erfolgte eine 72-stündige Inkubation im Brutschrank nach deren Ablauf je 25 µl MTT pro „well“ hinzugefügt wurden. Während einer weiteren 4-stündigen Inkubationsperiode erfolgte die Umsetzung des MTT in den lebenden Zellen zu Formazankristallen. Danach wurden pro „well“ 125 µl des Überstandes abgenommen und 100 µl Isopropanol-HCL in die „wells“ gegeben, was zur Lyse der Zellwände und zur Freisetzung und Auflösung der Formazankristalle führte. Nach 12 Stunden Inkubation bei Raumtemperatur war dieser Prozess beendet und die optische Dichte konnte mittels eines ELISA-Readers bei einer Wellenlänge von 550 nm bestimmt werden.

Aus den so ermittelten Werten wurde eine Eichkurve erstellt, in dem die OD des IL-6 Standards auf der y-Achse (linear) gegen die OD der eingesetzten Proben auf der x-Achse (logarithmisch) aufgetragen wurde (Abbildung 15). In dem linearen Bereich dieser Eichkurve ergab sich eine direkte Proportionalität zwischen bioaktivem IL-6 und gemessenem Formazan. Zur Auswertung wurden nur die Proben zugelassen, deren OD sich in diesem linearen Bereich befand. Lagen die Werte außerhalb dieses Bereichs wurden die Proben nach entsprechend angepasster Verdünnung erneut bestimmt. Anhand der Regressionsgleichung der Eichkurve und des Verdünnungsfaktors konnte die in den Proben vorliegende IL-6 Konzentration errechnet werden.



**Abbildung 15: Exemplarische Eichkurve zur Quantifizierung von IL-6**

Im linearen Teil der Kurve ist die Menge an gebildetem Formazan, gemessen über die optische Dichte (OD) direkt proportional zur Menge vorhandenem IL-6 in der Probe.

#### 4.1.3 TNF $\alpha$ Bioassay

Für den TNF $\alpha$  Bioassay wurde eine murine Fibrosarkomzelllinie des Walter and Eliza Hall Instituts (WEHI 164, „subclone 13“) eingesetzt. Im Gegensatz zum IL-6 Bioassay wird in diesem Fall der zytotoxische Effekt von TNF $\alpha$  auf diese Zelllinie genutzt, um anhand des dosisabhängigen Absterbens der WEHI-Zellen auf den Gehalt an TNF $\alpha$  der eingesetzten Probe rückzuschließen. Die Nachweisgrenze für biologisch aktives TNF $\alpha$  lag bei 6 pg/ml (Ross et al. 2003). Die für die folgenden Schritte verwendeten Lösungen sind in Tabelle 5 beschrieben.

Bezeichnung	Zusammensetzung
Assay Medium	500 ml RMPI Medium 55 ml FKS 5 ml Glutamin (200 nm) 5 ml Penicillin-Streptomycin (5000 I.U./ml)
MTT-Lösung	0,1 g MTT in 20 ml PBS
Isopropanol/HCL-Lösung	4 ml 2N HCL in 196 ml Isopropanol
Trypsin (25%)	Fertiglösung: 0,25% in PBS ohne Ca <sup>2+</sup> oder Mg <sup>2+</sup>

**Tabelle 5: Übersicht über die für den TNF $\alpha$  Bioassay verwendeten Lösungen**

Aufgrund des adhärenen Wachstums dieser Zelllinie wurden die Zellen zum Passagieren erst mit PBS gewaschen und anschließend nach Zugabe von 3 ml 25 %igem Trypsin durch Schwenken vom Boden der Kulturflasche gelöst. Nach Zugabe von 25 ml Medium wurde die Aktivität von Trypsin durch die im Medium enthaltenen FK-Serumproteine inaktiviert. Von der nunmehr verdünnten Zellsuspension wurden 1,5 ml in eine Kulturflasche mit Nährmedium überführt und im Brutschrank bei leicht geöffneter Kulturflasche inkubiert (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>, 95 % Luftfeuchte). 3 Tage nach der Passage hatten sich circa 90 % der Zellen am Boden der Kulturflasche angeheftet.

Die Durchführung des TNF $\alpha$  Bioassays erfolgte in den wesentlichen Schritten analog zum IL-6 Bioassay, jedoch betrug die eingesetzte Zellzahl 50.000 Zellen pro 100  $\mu$ l und der Zellsuspension wurde 4  $\mu$ g Actinomycin D pro ml hinzugefügt. Dies diente dem Hemmen des Zellwachstums und der Sensibilisierung der WEHI-Zellen gegenüber TNF $\alpha$ . Die Inkubationszeit betrug hier 24 Stunden.

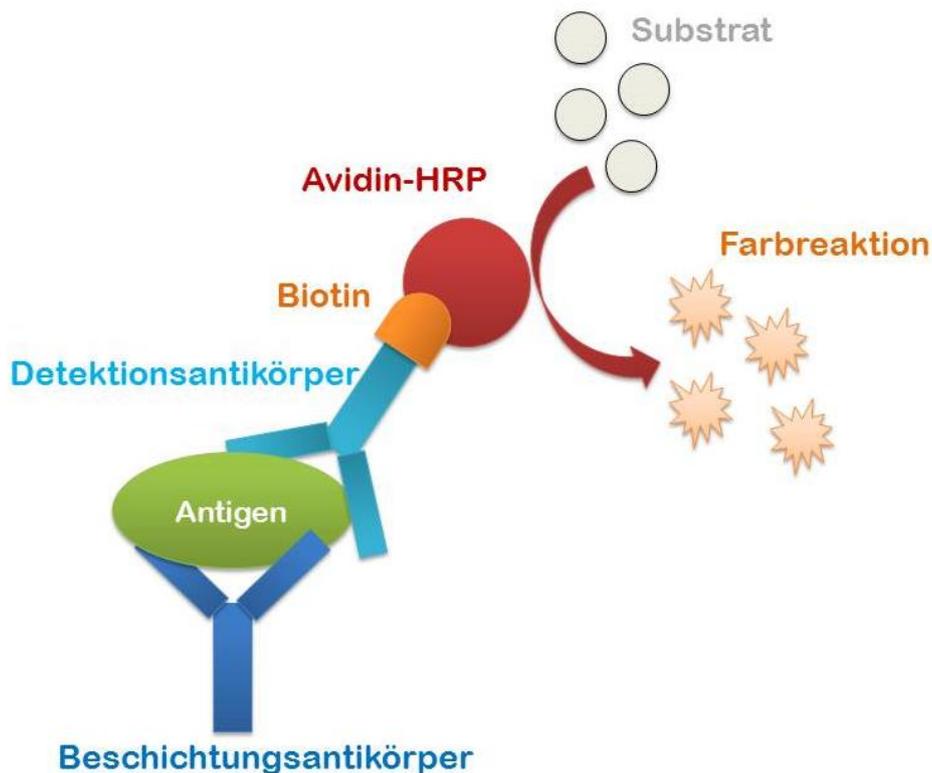
Anhand der gemessenen ODs wurde eine Eichkurve erstellt und die Werte, welche innerhalb des linearen Bereichs lagen, zur Auswertung herangezogen. Aufgrund der zytotoxischen Wirkung von TNF $\alpha$  war die Menge an gemessenem Formazan umgekehrt proportional zur Konzentration an bioaktivem TNF $\alpha$  in der eingesetzten Probe.

#### 4.1.4 Grundlagen des ELISA

Neben den Bioassays werden auch verbreitet die „Enzyme Linked Immunosorbent Assays“ (ELISA) zur Bestimmung von Zytokinkonzentrationen eingesetzt. Hierbei handelt es sich um ein antikörperbasiertes Nachweisverfahren mit dem Antigene detektiert werden können. Es gibt unterschiedliche ELISA-Techniken, in der vorliegenden Arbeit wurde der sogenannte Sandwich-ELISA eingesetzt. Diese Technik benötigt für ein bestimmtes Antigen zwei verschiedene Antikörper, die an unterschiedlichen Epitopen (Bindungsstellen für Antikörper) des Antigens ansetzen (Abbildung 16).

Bei dieser Variante wird der Boden z.B. einer Mikrotiterplatte mit dem „coating antibody“ oder Beschichtungsantikörper beschichtet. Daraufhin wird das zu detektierende Antigen hinzugefügt, welches von dem verankerten ersten Antikörper gebunden wird. Nicht gebundene Bestandteile werden durch einen Waschschriff entfernt und ein zweiter, markierter (z.B. durch Biotin) Antikörper, der sogenannte „detection antibody“ oder

Detektionsantikörper, bindet an eine zweite Stelle des Antigens. Über einen gegen das Biotin gerichteten Antikörper wird ein Enzym, oftmals Meerrettichperoxidase („horseradish peroxidase“ = HRP), an den Antikörper-Antigen-Antikörper-Komplex angelagert. Durch Zugabe eines farblosen Substrates, welches von dem Enzym in ein gefärbtes Produkt überführt wird, kann die Konzentration an vorhandenem Antigen durch die Stärke der Farbreaktion gemessen werden, welche die Menge an gebundenem Detektionsantikörper und somit auch die Konzentration an vorhandenem Antigen, widerspiegelt (Voller et al. 1978; Porstmann & Kiessig 1992).



#### Abbildung 16: Funktionsweise eines Sandwich-ELISAs

Das gesuchte Antigen bindet an den am Boden verankerten Beschichtungsantikörper. Ein mit Biotin markierter Detektionsantikörper bindet an einer zweiten Bindungsstelle an das Antigen. Über den gegen Biotin gerichteten Antikörper Avidin-HRP (Avidin-Horseradish-Peroxidase-Konjugat) wird nach Zugabe eines bestimmten Substrats eine Farbreaktion ausgelöst, deren Intensität die Konzentration des gesuchten Antigens widerspiegelt. Abbildung modifiziert nach (Male 2005).

#### 4.1.5 IL-1ra und IL-10 ELISA

Die hier beschriebenen ELISAs wurden im Neuroimmunology Laboratory des Douglas Mental Health University Institute der McGill University in Montreal, Kanada in der Arbeitsgruppe von Professor Giamal N. Luheshi eigenständig aber in begrenztem Umfang auch durch Ke Cui durchgeführt. Eine Aufstellung der verwendeten Lösungen und Antikörper finden sich in Tabelle 6 und Tabelle 7.

##### Verwendete Puffer

Bezeichnung	Zusammensetzung
<b>PBS Coating Buffer (PCB)</b>	NaCl 0,14 M = 8,18 g/l KCL 2,7 mM = 0,2 g/l KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 1,5 mM = 0,2 g/l Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 8,1 mM = 1,15 g/l ➤ In 1 Liter <i>Aqua bidest.</i> lösen
<b>Wash Dilution Buffer (WDB)</b>	NaCl 0,5 M = 29,22 g/l NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 2,5 mM = 0,3 g/l Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 7,5 mM = 1,07 g/l 1 ml Tween 20 ➤ In 1 Liter <i>Aqua bidest.</i> lösen pH-Wert auf 7,2 einstellen
<b>Substrate Buffer (SB)</b>	Citric Acid 34,7 mM = 7,3 g/l Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 66,7 mM = 9,47 g/l ➤ In 1 Liter <i>Aqua bidest.</i> lösen pH-Wert auf 5 einstellen

**Tabelle 6: Zusammensetzung der verwendeten Puffer**

##### Verwendete Antikörper

Bezeichnung	Verdünnung	Hersteller
<b>IL-1ra coating antibody</b>	1:1000	National Institute for Biological Standards and Control (NIBSC)
<b>IL-1ra biotinylated antibody</b>	1:1000	
<b>IL-10 coating antibody</b>	1:500	
<b>IL-10 biotinylated antibody</b>	1:1000	

**Tabelle 7: Verwendete Antikörper und deren Verdünnung**

Die Arbeitsschritte verteilen sich über drei aufeinanderfolgende Tage.

##### Tag 1

Der jeweilige Beschichtungsantikörper wurde in der vorgeschriebenen Verdünnung mit PBS „Coating Buffer“ verdünnt.

In einer 96-well-Mikrotiterplatte wurden 100 µl des verdünnten Beschichtungsantikörpers pro „well“ vorgelegt. Zwei „wells“ (Blanks) wurden hierbei und in den darauffolgenden Schritten

bis zur Substratzugabe ausgespart. Die Mikrotiterplatte wurde anschließend mit Adhäsionsfolie abgedichtet und für 16 – 24h bei 4 °C gelagert.

### Tag 2

Die Mikrotiterplatte wurde einem Waschschrift unterzogen, bei welchem in jedes „well“ 100 µl „Wash Dilution Buffer“ gegeben wurden und anschließend die Platte auf Zellstoff ausgeklopft wurde. Dies wurde, auch in allen nachfolgenden Waschschriften, 4 Mal wiederholt, wobei sich nach dem vierten Mal eine Zentrifugation der Platte bei 2000 rpm für 1 Minute anschloss, um restliche Flüssigkeit möglichst vollständig zu entfernen.

Es wurden 0,1 g Ovalbumin in 10 ml WDB gelöst und diese 1 %ige Ovalbuminlösung in die „wells“ gegeben (100 µl/„well“), um die restlichen freiliegenden Antikörperbindungsstellen zu blocken. Nach Abdichtung mit Adhäsionsfolie wurde die Platte eine Stunde inkubiert und anschließend gewaschen. Das im Folgenden beschriebene Pipettierschema der Mikrotiterplatte ist in Abbildung 17 dargestellt.

In die ersten beiden Reihen wurden Standardproteine für IL-1ra respektive IL-10 im Doppelansatz in unterschiedlichen Verdünnungen pipettiert, welche in der späteren Auswertung eine Standardkurve ergaben. Der Stock des Standardproteins besaß eine Konzentration von 100 ng/ml, welcher für Standard 1 auf 1000 pg/ml mit WDB verdünnt wurde (15 µl Standardprotein auf 1485 µl WDB). Nun wurden jeweils 500 µl der derzeitigen Verdünnung mit 500 µl WDB auf 1:2 verdünnt, bis Standard 11 mit einer Konzentration von 0,975 pg/ml erreicht wurde. Davon wurden jeweils 100 µl in jedes „well“ gegeben. Standard 12 besaß eine Konzentration von 0 pg/ml und bestand nur aus WDB.

Die Qualitätskontrolle wies eine Konzentration von 100 pg/ml auf, von denen je 100 µl in zwei verschiedene „wells“ gegeben wurden.

In die restlichen „wells“ wurden die zu untersuchenden Proben 1:5 vorverdünnt (20 µl auf 80 µl WDB) im Doppelansatz gegeben.

Anschließend erfolgte die Inkubation bei 4 °C über 16 – 24h.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	S1	S2 1:2	S3 1:4	S4 1:8	S5 1:16	S6 1:32	S7 1:64	S8 1:128	S9 1:256	S10 1:518	S11 1:1036	S12 WDB
B	S1	S2 1:2	S3 1:4	S4 1:8	S5 1:16	S6 1:32	S7 1:64	S8 1:128	S9 1:256	S10 1:518	S11 1:1036	S12 WDB
C	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
D	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
E	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
F	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
G	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	QK	BL
H	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	QK	BL

**Abbildung 17: Pipettierschema einer Mikrotiterplatte eines ELISAs**

Reihe 1 und 2: Verdünnungsreihen der Standards im Doppelansatz

Reihen 3 – 8: Proben im Doppelansatz sowie Qualitätskontrollen (QK) und Blanks (BL)

### Tag 3

Der biotinylierte Detektionsantikörper wurde auf die benötigte Konzentration in 10 ml WDB, welcher zusätzlich 100 µl „Normal Sheep Serum“ enthielt, verdünnt. Nach einem Waschschrift wurden 100 µl dieser Mischung allen „wells“ zugegeben und die Platte 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert.

Nach Waschen der Platte wurde ein Avidin-Horseradish-Peroxidase-Konjugat (Avidin/HRP) auf 1:1000 mit WDB verdünnt und 100 µl pro „well“ pipettiert. Das Glykoprotein Avidin bindet an das Biotin des Detektionsantikörpers, während die HRP, also Meerrettichperoxidase, in dem nächsten Schritt die enzymatische Reaktion katalysiert. Es erfolgte eine 30minütige Inkubation, gefolgt von einem weiteren Waschschrift.

Bei der Substratzugabe wurde 1 Tablette OPD in 10 ml auf 37 °C erwärmten „Substrate Buffer“ aufgelöst, und 4 µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zugegeben. Davon wurden pro „well“ 100 µl zugefügt, auch in die Blanks. Die Platte wurde, mit Alufolie ummantelt, lichtgeschützt für circa 15 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen. Während dieser Zeit wurde das farblose Substrat o-phenylenediamine dihydrochloride (OPD) durch HRP mittels H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oxidiert, was zu einem Farbumschlag nach orange führte. Nach Ablauf der Zeit wurden in jedes „well“ 150 µl 1 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> zugegeben, um die Farbreaktion zu stoppen.

Bei 490 nm wurde die Reaktion im ELISA-Reader gemessen, wobei der Grad der umgesetzten Farbreaktion proportional zur Menge des vorliegenden Proteins war.

Bei der Auswertung wurde beachtet, dass sich die Qualitätskontrolle bei der Messung im richtigen Konzentrationsbereich befand.

Anhand der gemessenen Standardwerte konnte errechnet werden, ob alle Standardverdünnungen sich im richtigen Konzentrationsbereich befanden. War dies ab einem bestimmten Standard nicht mehr gegeben, so wurde die Konzentration dieses Standards (z.B. Standard 10 = 1,95 pg/ml) als Detektionslimit eingesetzt und alle Proben, deren gemessene Konzentration niedriger war, mit diesem Detektionslimit bewertet.

### 4.1.6. Leptin ELISA

Der Leptin ELISA unterschied sich von den vorher beschriebenen ELISAs dadurch, dass es sich um ein fertiges Kit handelte, welches innerhalb eines Tages durchzuführen war. Alle benötigten Reagenzien und Lösungen wurden vom Hersteller im Kit mitgeliefert.

Im ersten Schritt wurden die „wells“ des Mikrotiterstrips, die bereits mit Beschichtungsantikörper beschichtet waren, 3 Mal mit je 300 µl des zuvor 1:10 in *aqua bidest.* verdünnten „Wash Buffer“ gewaschen und auf Zellstoff ausgeklopft.

Anschließend wurden in die „wells“ für die Blanks, Standards und Qualitätskontrollen je 30 µl „Assay Buffer“ und in die „wells“ für die zu untersuchenden Proben je 40 µl „Assay Buffer“ hinzugefügt. Da es sich bei den Proben um Blutplasma handelte, wurde den Blanks, Standards und Qualitätskontrollen je 10 µl Matrix Solution zugegeben.

Hiernach wurden in die dafür vorgesehenen „wells“ im Doppelansatz je 10 µl „Rat Leptin Standards“ in unterschiedlicher Konzentration, 10 µl Qualitätskontrolle 1 und 2 und 10 µl „Assay Buffer“ für die Blanks gegeben. Von den Plasmaproben wurden ebenfalls im Doppelansatz je 10 µl pro „well“ gegeben. In jedes „well“ wurden 50 µl eines murinen Leptin Antiserums pipettiert und nach Verschluss mit Adhäsionsfolie erfolgte eine zweistündige Inkubation.

Nach 3maligem Waschen mit „Wash Buffer“ und Ausklopfen des Mikrotiterstrips wurde der Detektionsantikörper hinzugefügt (100 µl/„well“) und die Platte für eine Stunde inkubiert.

Nach 3 Waschschritten erfolgte die Zugabe von je 100 µl der Enzyme Solution.

30 Minuten später wurde der Mikrotiterstrip 6 Mal mit „Wash Buffer“ ausgewaschen und pro „well“ je 100 µl der „Substrate Solution“ (3,3',5,5'-tetramethylbenzidine) hinzugegeben. Nach 10-15 Minuten erfolgte ein Farbumschlag nach blau und nach Zugabe der „Stop Solution“ (100 µl/„well“) wurde die Intensität der Farbreaktion bei 450 und 590 nm im ELISA Reader gemessen.

## 4.2 Immunhistochemie und Immunzytochemie

### Material

#### Ge- und Verbrauch

Bezeichnung	Modell	Hersteller
Aluminiumfolie		Roth GmbH, Karlsruhe
Deckgläschen	24 x 50 mm und 24 x 60 mm, Stärke 1	Menzel GmbH, Braunschweig
Faltenfilter 604	1/2 (Ø 240 mm)	Schleicher und Schuell GmbH, Dassel
Fettstift	Papp-Pen®	G. Kisker, Steinfurt
Inkubationskästen mit Deckel	20 x 30 x 5 cm	Biochem Instrumente GmbH, Weilburg
Multi-Wellplatten	12-fach	MAGV, Rabenau
Objektträger	76 x 26 mm	Menzel GmbH & Co.KG, Braunschweig
Objektträgermappen	für 20 OT	LAT-Labor- und Analysen- Technik GmbH, Garbsen
Parafilm®		Roth GmbH, Karlsruhe
pH-Indikatorpapier		Merck, Darmstadt
Pinsel	Rotmarderhaar	Renensis, Flensburg
Reaktionsgefäße	0,5; 1,5 und 2 ml	Eppendorf AG, Hamburg
serologische Pipetten	1; 5; 10 und 25 ml	Sarstedt, Nümbrecht

#### Chemikalien

Bezeichnung	Hersteller
4'-6-Diamidin-2-Phenylindol Dilaktat (DAPI)	MoBiTec, Göttingen
Autofluorescence Eliminator Reagent®	Merck Millipore, Schwalbach
Citifluor® (Glycerol in PBS-Lösung)	Citifluor LTD, London
Di-Natriumhydrogenphosphat Monohydrat (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	Merck, Darmstadt
Ethanol, unvergällt	Merck, Darmstadt
Immersionsöl (Refraktionsindex 1,51)	Olympus Optical, Hamburg
Natriumdihydrogenphosphat Dihydrat (NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	Merck, Darmstadt
Normal Donkey Serum (NDS)	PAA, Pasching, Österreich
Paraformaldehyd (PFA)	Merck, Darmstadt
Phosphate-Buffered Saline Tablets (PBS)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Poly-L-Lysin	Biochrom, Berlin
Triton-X-100	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA

## Lösungen und Puffer

Bezeichnung	Zusammensetzung/Hersteller
0,2 M Na <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> -Lösung (Stocklösung A)	27,6 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (137,99 g/mol) in 1 l <i>Aqua bidest.</i>
0,2 M NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> -Lösung (Stocklösung B)	35,6 g NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (177,9 g/mol) in 1 l <i>Aqua bidest.</i>
DAPI-Inkubationslösung	DAPI 1 : 10.000 in PBS
Blockinglösung für Immunzytochemie	10% FKS in PBS-T
Blockinglösung für Immunhistochemie	10% NDS in PBS, Zugabe von 0,3 % Triton-X-100
Paraformaldehyd-Lösung (PFA) 20 % (Stocklösung, Lagerung im Kühlschrank)	Ansatz von PFA (Pulverform) in <i>Aqua bidest.</i> , unter Rühren bei 65 °C, Zugabe von wenigen Tropfen 1 N NaOH, Filtration mit Faltenfilter
Paraformaldehyd-Lösung (PFA) 2 %	Ansatz aus PFA-Stocklösung in PBS (1:10)
Paraformaldehyd-Lösung (PFA) 4 %	Ansatz von PFA (Pulverform) in PBS, unter Rühren bei 60 °C, Filtration mit Faltenfilter
PBS 0,1 M, pH 7,2 – 7,4	28 % Stocklösung A + 72 % Stocklösung B in <i>Aqua bidest</i>
PBS instant, pH 7,2 – 7,4	Ansatz aus PBS Tabletten in <i>Aqua bidest.</i> (1 Tablette/200 ml)
PBS-T	PBS unter Zugabe von 0,05 % Triton-X-100

### 4.2.1 Grundlagen der Methode

Für die immunhistologische Aufarbeitung der gewonnenen Gehirne, der Hypophysen sowie der Zellen aus der Hypophysenzellkultur wurde in dieser Arbeit die indirekte Immunfluoreszenz als Methode angewendet. Dabei werden spezifische Primärantikörper eingesetzt, deren Paratope mit den Epitopen des zu detektierenden Antigens interagieren bzw. an diese binden. Um das gesuchte Antigen sichtbar darzustellen wird ein Sekundärantikörper eingesetzt, der gegen das Fc-Fragment der Wirtsspezies des Primärantikörpers gerichtet ist. Der Sekundärantikörper ist mit einem fluoreszierenden Farbstoff markiert, welcher durch Licht einer bestimmten Wellenlänge angeregt werden kann. Durch diese Anregung des Fluorochroms kommt es zur Emission von längerwelligem Licht, welches mittels eines Fluoreszenzmikroskops erfasst werden kann (Coons & Kaplan 1950). Die Methode bietet den Vorteil, dass Doppelmarkierungen durch primäre Antikörper verschiedener Wirtsspezies und deren Detektion mittels entsprechender Sekundärantikörper gekoppelt an Fluorochrome unterschiedlicher Wellenlängen möglich sind.

Die Zellkerne wurden zusätzlich mittels DAPI-Färbung sichtbar gemacht. Der eingesetzte Farbstoff DAPI bindet selektiv an die DNA. Diese gebundenen Komplexe konnten dann durch eine spezifische Anregungswellenlänge ebenfalls im Fluoreszenzmikroskop dargestellt werden.

### 4.2.2 Antikörper

Zur Detektion nukleärer (NF-IL6, p-STAT3) oder perinukleärer (COX2) oder zytoplasmatischer (TNF $\alpha$ ) Signale und gleichzeitiger Zellphänotypisierung wurden Antikörper aus verschiedenen Tierarten verwendet die bereits in früheren Studien in den entsprechenden Zielgeweben (Gehirn, Hypophyse) bei Ratten und Mäusen getestet worden waren (Rummel et al. 2008; Wuchert et al. 2008; Damm et al. 2011; Damm et al. 2012). Endothelzellen wurden über ein gegen das Markerprotein von Willebrandt Faktor (vW) gerichteten Antikörper dargestellt (Konsman et al. 2004; Rummel et al. 2005), Astrozyten über ein gegen das zytoplasmatische Intermediärfilament „glial fibrillary acidic protein“ (GFAP) gerichteten Antikörper (Debus et al. 1983).

Ein gegen ACTH gerichteter Antikörper wurde eingesetzt, um corticotrope Zellen der Hypophyse zu detektieren (Blahser 1988).

Aktivierte Mikrogliazellen/Makrophagen und perivaskuläre Makrophagen wurden über gegen die Oberflächenproteine CD68 (Pulford et al. 1990; Bauer et al. 1994) und CD163 (Graeber et al. 1989) gerichtete Antikörper markiert. Nachfolgend sind die verwendeten Primär- und Sekundärantikörper aufgelistet.

#### Primärantikörper

Antigen	Spezies, Typ	Verdünnung/Anteil Triton X	Katalog-Nr./Hersteller
NF-IL6	rabbit, polyclonal IgG	1: 5000; 0,3 %	sc-150 Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA
vW	sheep, polyclonal IgG	1: 3000; 0,3 %	SARTW-IG, Affinity Biologicals, Ancaster, Ontario, Canada
GFAP	mouse, polyclonal IgG	1: 2000; 0,3 %	MAB3402; Millipore, Billerica, MA, USA
CD68 (ED1)	mouse, monoclonal IgG	1: 500; 0,3 %	MCA341R; AbD Serotec; Oxford, UK
ACTH (1-24)	rabbit, polyclonal IgG	1: 2000; 0,3 %	Gabe von Dr. Blähser, JLU Giessen
TNF $\alpha$	goat, polyclonal IgG	1:200; 0,03 %	Cat. AF-510-NA R&D Systems, MN, USA
p-STAT3 (Tyr 705)	mouse, polyclonal IgG	1:200, 0,1 %	sc-8059; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA
COX2	goat, polyclonal IgG	1:2000, 0,3 %	sc-1747; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA

**Sekundärantikörper**

Fluorochrom/Exzitationsmaximum	Aus Spezies	Gegen Spezies	Verdünnung	Katalog-Nr/Hersteller
Alexa Flour® 488 (495nm)	donkey IgG	mouse	1:500	AZA21202, MoBiTec GmbH, Göttingen
		goat	1:500	AZA11055, MoBiTec GmbH, Göttingen
		sheep	1:500	AZA11015, MoBiTec GmbH, Göttingen
		rabbit	1:500	AZA21206, MoBiTec GmbH, Göttingen
Cy <sup>TM</sup> 3 (550nm)	donkey IgG	mouse	1:600	cat. 715-165-150, , Jackson Immuno Research, West Grove, PA, USA
		rabbit	1:500	cat. 711-165-152, Jackson Immuno Research, West Grove, PA, USA

**4.2.3 Versuchsprotokoll Immunhistochemie**

Die bei -55 °C gelagerten, zuvor angefertigten Gefrierschnitte wurden kurzfristig in den Kryostat gestellt, um sie behutsam auf -20 °C zu erwärmen. Anschließend wurden sie bei Raumtemperatur kurz getrocknet und mit Fettstift umrandet. Eine 10-minütige Fixierung mit 2 %igem PFA sorgte dafür, dass die Antigene während den nachfolgenden Schritten „geschützt“ waren.

Um einem unspezifischen Binden der Antikörper vorzubeugen, wurden die Schnitte nach dreimaligem Waschen in PBS mit Blockinglösung inkubiert, deren Serumanteil die unspezifischen Bindungsstellen des Gewebes absättigte. Die Blockinglösung enthielt das Detergens Triton X, welches die Membrandurchlässigkeit erhöhen kann. Sowohl die Blockinglösung als auch alle weiteren Antikörperlösungen wurden mittels Pipette tropfenweise direkt auf den Gewebeschnitt gegeben, wobei circa 300 µl der Lösung ausreichten. Durch die Oberflächenspannung und die Begrenzung mittels Fettstiftumrandung verblieben die Lösungen auf dem Objektträger.

Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem Primärantikörper, welcher zuvor in der benötigten Konzentration in der Blockinglösung verdünnt wurde. Hierzu wurde eine sogenannte feuchte Kammer erstellt, indem ein Schnittkasten mit feuchten Tüchern ausgelegt wurde. Bei 4 °C wurde der Primärantikörper 20 – 24 Stunden in der feuchten Kammer inkubiert.

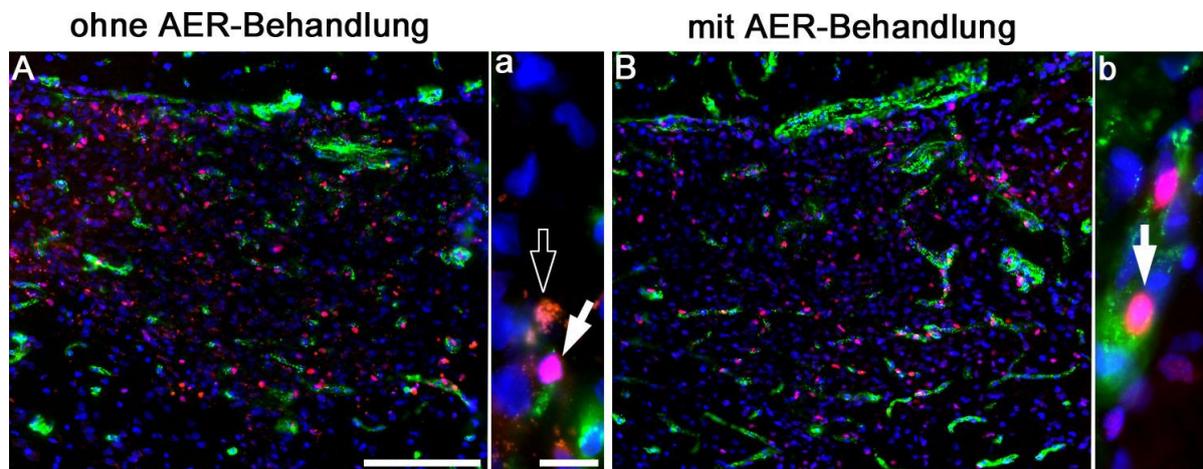
Am nächsten Tag wurde die überschüssige Primärantikörperlösung dreimal mit PBS abgewaschen (jeweils 5 Minuten) und der Sekundärantikörper, ebenfalls in Blockinglösung entsprechend verdünnt, aufgetragen. Alle folgenden Schritte wurden unter möglichst lichtarmen Bedingungen durchgeführt.

Nach 2-stündiger Inkubation des Sekundärantikörpers bei Raumtemperatur erfolgte ein dreimaliges Waschen mit PBS. Anschließend erfolgte die Kernfärbung mittels DAPI (1:10.000 in PBS verdünnt) für 10 Minuten und danach dreimaliges Waschen mit PBS.

Da in der Immunfluoreszenz von den Gehirnschnitten alter Versuchstiere eine starke aber nicht ungewöhnliche Ansammlung eines autofluoreszierenden Stoffes, bei dem es sich um Lipofuszin auch „Alterspigment“ genannt handelte, festgestellt wurde, wurden alle Schnitte zusätzlich 5 Minuten mit dem „Autofluorescence Eliminator Reagent®“ behandelt, welcher die durch Lipofuszin hervorgerufene Autofluoreszenz herabsenkt (Abbildung 18). Die durch den Sekundärantikörper hervorgerufene erwünschte Fluoreszenz wurde hiervon nur minimal beeinträchtigt. Das Reagenz wurde durch 2-minütiges Eintauchen der Schnitte in 70 %iges ETOH herausgespült und die Schnitte noch 2-mal in PBS gewaschen.

Als letzter Schritt wurden die Schnitte mit dem Mounting Medium Citifluor überschichtet und mit Deckgläschen abgedeckt.

Anschließend wurden die Schnitte in lichtundurchlässigen Mappen in einem abgedunkelten Raum bei 4 °C gelagert.



**Abbildung 18: Behandlung mit AER® zur Reduktion der Lipofuszin-Autofluoreszenz**

Nukleäre NF-IL6 Signale sind durch Überlagerung mit dem Zellmarker (DAPI, blau) pink dargestellt, Artefakte durch Lipofuszin-Autofluoreszenz sind extranukleär und leuchten rot. Nach Behandlung mit „Autofluorescence Eliminator Reagent®“ (B) wurde die störende Autofluoreszenz (A) deutlich herabgesenkt. Gefüllte Pfeile weisen auf NF-IL6 Signale, offene Pfeile auf Lipofuszin-Artefakte. Größenmarker in A entspricht 100 µm und gilt in A und B; Größenmarker in a entspricht 10 µm und gilt in a und b.

#### 4.2.4 Versuchsprotokoll Immunzytochemie

Nach Abnahme der Zellkulturkammerwände wurden die Deckgläschen mit dem Zellrasen einzeln in die wells einer 12-well Platte überführt und 15 Minuten mit 4 %igem eiskalten PFA fixiert. Danach wurden die Zellen dreimal für jeweils 5 Minuten mit eiskaltem PBS gewaschen und bei 4 °C gelagert. Das weitere immunzytochemische Verfahren konnte direkt im Anschluss oder innerhalb der folgenden 14 Tage durchgeführt werden. Hier enthielten sowohl das PBS (hier: PBS-T) als auch die Blockinglösung stets 0,05% Triton-X.

Als erster Schritt wurden die Zellen für 2 Stunden in der Blockinglösung inkubiert.

Daraufhin folgte die Inkubation mit dem Primärantikörper, welcher zuvor in der benötigten Konzentration in der Blockinglösung verdünnt wurde. Eine Menge von circa 500 µl pro well reichte aus, um die Deckgläschen vollständig zu benetzen. Der Inkubationszeitraum betrug 48 Stunden, währenddessen die 12-well Platte in einer mit feuchten Tüchern ausgelegten Metalldose bei 4 °C gelagert wurde.

Nach dreimaligem Waschen für jeweils 5 Minuten mit PBS-T erfolgte die Inkubation mit dem in Blockinglösung verdünnten Sekundärantikörper. Diese betrug 2 Stunden und erfolgte bei Raumtemperatur lichtgeschützt in der Metalldose.

Nach dreimaligem Waschen mit PBS-T für jeweils 5 Minuten wurden die Zellen für die Kernfärbung 10 Minuten mit DAPI-Lösung inkubiert.

Nach weiteren Waschschritten wurden die Deckgläschen kurz mit einer Pinzette in *Aqua bidest.* getaucht und anschließend mit der bewachsenen Seite nach unten auf einen Objektträger gelegt, auf welchen zuvor ein Tropfen Citifluor gegeben wurde.

Die Objektträger wurden in lichtundurchlässigen Mappen in einem abgedunkelten Raum bei 4 °C gelagert.

#### 4.2.5 Fluoreszenzmikroskopie und Auswertung

Im Anschluss an die Immunhistochemie / Immunzytochemie erfolgte die Auswertung der behandelten Gehirnschnitte bzw. Zellen unter einem Fluoreszenzmikroskop (BX50). Über bestimmte eingesetzte Filter wurde der jeweils verwendete Sekundärantikörper mittels einer bestimmten Anregungswellenlänge zur Lichtemission einer bestimmten Wellenlänge veranlasst. Die Cy3<sup>TM</sup>-gekoppelten Antikörper wurden durch eine Wellenlänge von 520 – 550 nm angeregt und emittierten optisch rotes Licht im Bereich von 630 – 660 nm. Die Anregungswellenlänge für Alexa 488®-konjugierte Antikörper betrug 460 – 490 nm und hatte eine Emissionswellenlänge von 510 – 540 nm zur Folge, welches optisch grün erschien. DAPI wurde durch eine Wellenlänge von 330 – 385 zur Emission bläulichen Lichtes von 461 nm angeregt.

Von den wesentlichen Regionen der Gehirnschnitte und von den Zellkulturen wurden mittels einer digitalen schwarz-weiß Kamera Fotos in drei verschiedenen Farbkanälen (rot, grün, blau) in verschiedenen Vergrößerungen aufgenommen. Diese wurden mit Hilfe des Programmes Metamorph zu einem dreifarbigem Bild vereint. Auf diese Weise war es möglich, sowohl die Lokalisation des Transkriptionsfaktors in Bezug auf den Zellkern (intra- oder perinukleär) zu beurteilen, sowie Aussagen über die Phänotypen bestimmter Zellen (Endothelzelle, Astrozyten) bei einer möglichen Kolo-kalisation zu treffen.

### 4.3 Quantitative real-time PCR

#### Material

Bezeichnung	Hersteller
MicroAMP™ TM 96- Well Support Base	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
MicroAmp(R) Fast 8-Tube Strip 0.1 ml	
MicroAmp(R) Fast 96-Well Reaction Plate 0.1 ml	
MicroAMP™ 96- Well Tray for VeriFlex™ Blocks	
MicroAMP™ optical 96- Well Reaction Plate	
Mikro Küvette (45 mm x 12,5 mm x 12,5 mm; Schichtdicke 10 mm) aus Quarzglas Suprasil®	Hellma Analytics, Mühlheim
Optical Adhesive Cover	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
Optical Flat Cap 8 / strip	
5 x First Strand Buffer: 250 mM Tris-HCl (pH 8,3 bei RT) 375 mM KCl 15 mM MgCl <sub>2</sub>	Invitrogen, San Diego, CA, USA
Chloroform	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Deoxynucleotide (dNTP) Mix; 10 mM	
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	
DEPC-Wasser	0,1% DEPC in <i>Aqua bidest.</i> , nach 24stündigem Rühren autoklaviert
DTT (Dithiothreitol) 0,1 M	Invitrogen, San Diego, CA, USA
Ethanol absolut	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Isopropanol	
M-MLV Reverse Transcriptase; 200 U/μl	Invitrogen, San Diego, CA, USA
Random Hexamers (Random primers); 50 μM in 10 mM Tris-HCl; pH 8,3	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
RNase ZAP®	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
TaqMan® Gene Expression Master Mix	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
TRIzol	Invitrogen, San Diego, CA, USA

**Primer**

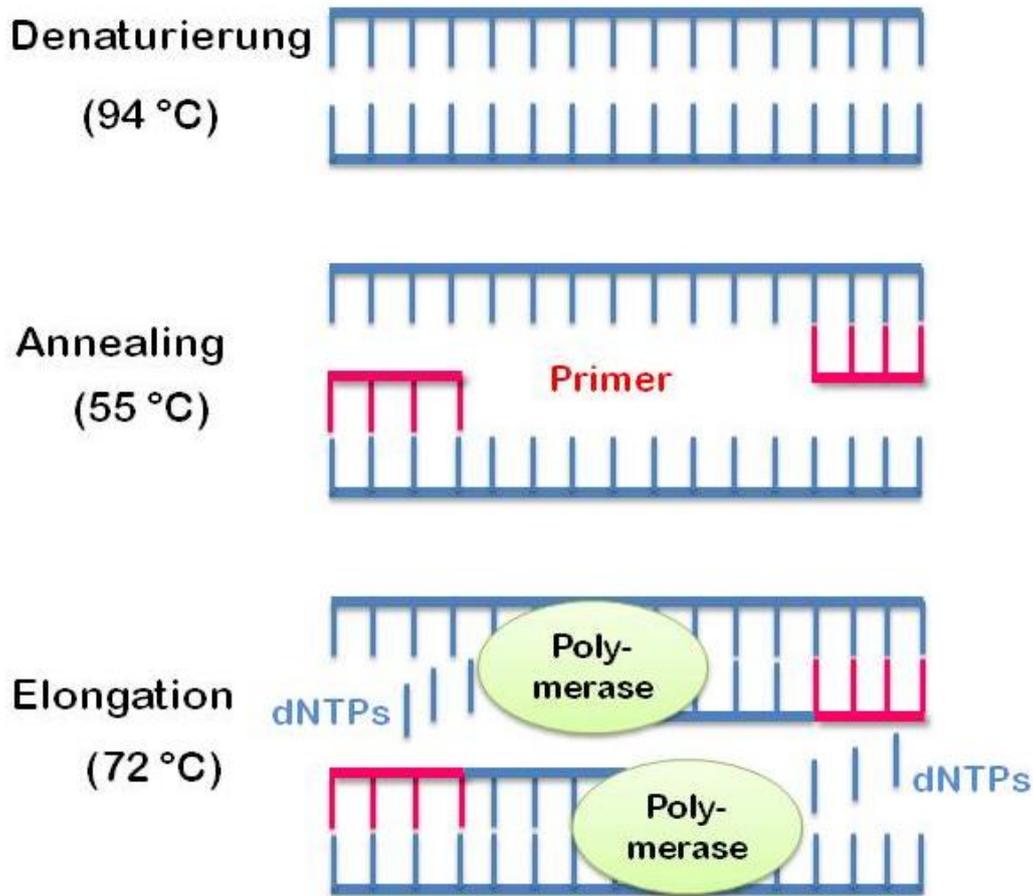
TaqMan® Gene Expression Assays (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)

Assay-ID	Gen ( <i>Rattus Norvegicus</i> )
4352340E Rat ACTB Endogenous Control (VIC/MGB Probe, Primer Limited)	β-Aktin (Referenzgen)
Rn01775763_g1	Gapdh (Referenzgen)
Rn00568225_m1	COX2
Rn01473658_g1	IκBα
Rn00580432_m1	IL-1β
Rn00573488_m1	IL-1ra
Rn01410330_m1	IL-6
Rn99999012_m1	IL-10
Rn00561646_m1	iNOS
Rn00572047_m1	mPGES
Rn00824635_s1	NF-IL6
Rn01455958_m1	NRF1
Rn00580241_m1	PGC-1α
Rn00595020_m1	POMC
Rn00585674_s1	SOCS3
Rn00580051_m1	TFAM

**4.3.1 Grundlagen der Methode**

Bei der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) handelt es sich um ein enzymabhängiges Verfahren, welches die Amplifikation bestimmter Sequenzen eines ein- oder doppelsträngigen DNA-Moleküls ermöglicht (Mullis & Faloona 1987).

Die PCR setzt sich aus den 3 Schritten Denaturierung, Annealing und Elongation zusammen. Bei der Denaturierung führt ein Erhitzen auf 94 °C zu einer Trennung der beiden Stränge der Template-DNA. Ein anschließendes Absenken der Temperatur auf 55 °C ermöglicht den im Überschuss vorhandenen Primern an die nunmehr einzelsträngige Template-DNA zu binden. Daraufhin wird die Temperatur auf 72 °C eingestellt, was dem Arbeitsoptimum der Taq-Polymerase (*Thermus Aquaticus*), einer hitzestabilen DNA-abhängigen DNA-Polymerase, entspricht. Die Taq-Polymerase synthetisiert mittels der im Reaktionsansatz vorliegenden Desoxyribonucleosidtriphosphat-Moleküle (dNTPs) ausgehend von dem Primer einen komplementären Strang, so dass am Ende des Zyklus eine exakte Replikation der Template-DNA vorliegt (Abbildung 19). Der Zyklus wird üblicherweise 30- bis 40-fach wiederholt, wobei jedes Mal die vorliegende DNA verdoppelt wird (Mühlhardt 2009).



**Abbildung 19: Schematischer Ablauf der Polymerase-Kettenreaktion**

Die Denaturierung bei 94 °C führt zu einer Trennung der beiden DNA-Stränge. Ein Absenken der Temperatur auf 55 °C erlaubt in der Annealing Phase den Primern an den DNA-Einzelstrang zu binden. Während der Elongation bei 72 °C komplementiert die Polymerase den DNA-Strang ausgehend von vorhandenen dNTPs. Modifiziert nach (Mühlhardt 2009).

Rein theoretisch würde also jeder Zyklus zu einer Verdopplung der vorherigen Menge an Template-DNA führen. In Wirklichkeit sind dieser Reaktion jedoch nach einer bestimmten Menge an Zyklen ihre Grenzen gesetzt. Man kann demzufolge die Reaktionskinetik der PCR in 3 Phasen unterteilen.

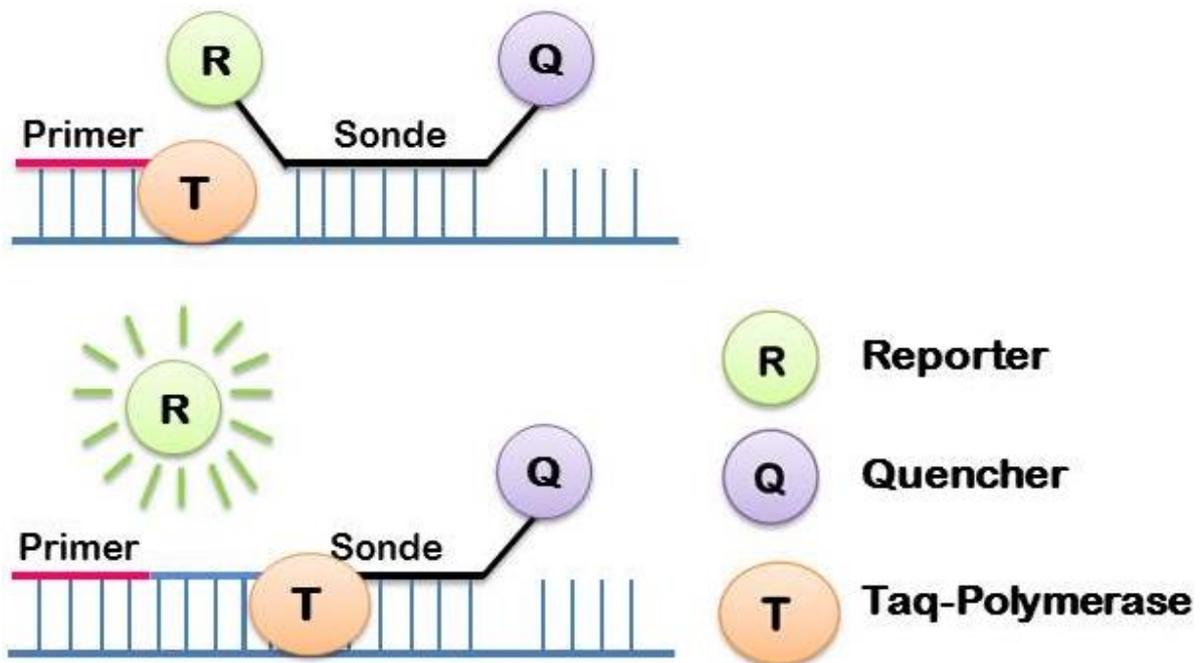
- 1. Exponentielle Phase:** Die Template-DNA wird in jedem Zyklus verdoppelt, da alle benötigten Ausgangsstoffe in ausreichender Menge vorliegen.
- 2. Lineare Phase:** Die Reaktion verlangsamt sich, da bestimmte Reagenzien aufgebraucht werden.
- 3. Plateauphase:** Die Reaktion kommt zum Erliegen, es entstehen keine neuen Produkte.

Üblicherweise erfolgt nach der Amplifikation der DNA die elektrophoretische Auftrennung der Fragmente in einem Agarose-Gel. Durch Färbung mit einem interkalierenden, fluoreszierenden Farbstoff wie z. B. Ethidiumbromid können die DNA-Fragmente anschließend im UV-Licht bei 254 nm sichtbar gemacht werden. Ein parallel aufgetragener Größenmarker ermöglicht die Bestimmung der Größe der amplifizierten DNA-Fragmente.

Die Menge amplifizierter DNA wird anhand der Bandenstärke im Agarosegel bestimmt. Die rückwirkende Quantifizierung der Ausgangsmenge eingesetzter RNA oder DNA ist mit diesem Verfahren allerdings ungenau und fehlerhaft, da die Kinetik der Reaktion hierbei nicht berücksichtigt wird.

Mit Entwicklung der quantitativen real-time PCR wurde es möglich, DNA zu amplifizieren und dabei die Reaktionskinetik in Echtzeit zu verfolgen. Dies erlaubte eine genauere Bestimmung der Ausgangsmenge an DNA.

Heute wird dabei verbreitet der „Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer“ (FRET) als Detektionsmethode eingesetzt. Dabei werden in der PCR-Reaktion mit Fluoreszenzfarbstoffen (Fluorochrome) markierte Oligonukleotide (Sonden) eingesetzt. Bei der gängigen TaqMan®-Sonde sitzen an einem Ende ein Reporter- und am anderen Ende ein Quencher-Fluorochrom (Abbildung 20). Der Reporter wird durch Licht einer bestimmten Wellenlänge angeregt und die aufgenommene Energie wird wiederum als Licht einer anderen, für ihn spezifischen Wellenlänge emittiert. Diese Emission wird jedoch durch die räumliche Nähe zu dem Quencher unterdrückt. Die TaqMan®-Sonde lagert sich an die Template-DNA an und wird während der PCR-Reaktion von der Taq-Polymerase abgebaut. Hierbei wird der Reporter vom Quencher getrennt und reagiert daraufhin mit Lichtemission. Diese Emission steigt nun proportional zur Amplifikation des Templates und wird vom Gerät detektiert.



**Abbildung 20: Schematische Darstellung der Funktionsweise der TaqMan®-Sonde**

Primer und Sonde lagern sich an den DNA Einzelstrang an, wobei die Sonde an einem Bereich hinter dem Primer mit der DNA hybridisiert. Durch die Nähe zum Quencher wird der Reporter (Fluorochrom) bei intakter Sonde an der Lichtemission gehindert. Während der Elongationsphase trifft die Taq-Polymerase auf die Sonde und spaltet den Reporter ab, so dass dieser Fluoreszenz emittieren kann. Abbildung modifiziert nach (Holzapfel & Wickert 2007).

### 4.3.2 RNA-Extraktion

Vor Beginn der Extraktion wurden sämtliche Oberflächen und verwendeten Geräte mit RNase ZAP® und 100 %igem Ethanol gereinigt, um einer Zerstörung der RNA durch RNasen vorzubeugen.

Für die RNA-Extraktion wurde die sogenannte „Single-Step Methode“ nach Chomczynski und Sacchi (1987) angewendet (Chomczynski & Sacchi 1987). Falls nicht anders beschrieben wurden alle Arbeitsschritte auf Eis durchgeführt. Als erstes wurden 500 µl TRIzol-Reagenz zu jeder Probe hinzugefügt, welche anschließend für 10 – 15 Sekunden am Sonicator (Stabultraschallgerät) homogenisiert wurde. TRIzol, eine Lösung aus Phenol und Guanidin-Isothiocyanat, denaturiert und inaktiviert Proteine ebenso wie RNasen, wodurch nach diesem ersten Schritt die Gefahr der RNA-Zerstörung relativ gering war (Mühlhardt 2009). Anschließend wurden die Proben 10 Minuten bei 12.000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Nach der Zentrifugation hatte sich ein Pellet gebildet, welches nicht-relevante Bestandteile wie zelluläre Membranfragmente, Polysaccharide und DNA enthielt. Der Überstand wurde abpipettiert, in ein neues 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt und für 5 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen, um eine möglichst vollständige Dissoziation der Nucleo-Protein-Komplexe zu gewährleisten. Anschließend wurden 100 µl Chloroform dazugegeben und durch kräftiges Schütteln mit dem Überstand vermischt, was zu einem Herauslösen von Proteinen und DNA führte. Nach erneuter Zentrifugation (20 min, 12.000 rpm, 4 °C) hatten sich 3 Phasen gebildet: eine organische Phase, welche Proteine enthielt, eine Interphase mit DNA und eine wässrige, RNA-haltige Phase, welche abpipettiert wurde. Nach Zugabe von 250 µl Isopropanol wurde die Probe über Nacht bei -20 °C aufbewahrt, was zu einem Ausfällen der RNA aus der Lösung führte. Erneute Zentrifugation (15 min, 15.000 rpm, 4 °C) brachte die RNA in Pelletform. Nach 2 Waschschritten mit 70 %igem und 100 %igem Ethanol wurde das Eppendorfgefäß 20 Minuten mit offenem Deckel trocknen gelassen. Schlussendlich wurde das RNA-Pellet mit DEPC-Wasser (je nach Pelletgröße 50 – 100 µl) aufgelöst.

Diethylpyrocarbonat (DEPC) führt über Bindung an primären und sekundären Aminen zu kovalenten Bindungen, wodurch die Aktivität der RNasen gehemmt wird (Mühlhardt 2009). Um dieses RNase-freie Wasser zu erzeugen, wurde 1 ml DEPC in 1 Liter *Aqua bidest.* gelöst und nach 24stündigem Rühren autoklaviert.

### Qualitative und quantitative Bestimmung der RNA

Die Konzentrationsbestimmung der RNA erfolgte photometrisch. Dabei wurden 6 µl der RNA mit 114 µl autoklaviertem *Aqua bidest.* auf 1:20 verdünnt und anschließend in einer Quarzküvette bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen. Der als optische Dichte („optical density“ = OD) bezeichnete Messwert gab Aufschluss über die enthaltene Menge an RNA, wobei ein OD von 1 einer Konzentration von 40 µg/ml entsprach. Anhand dieser Konzentrationsbestimmung und des bekannten Verdünnungsfaktors konnte die RNA durch Hinzufügen von DEPC-Wasser auf die gewünschte Konzentration von 250 ng/µl für die nachfolgende Reverse Transkription PCR verdünnt werden.

Neben der Messung bei 260 nm wurden die eingesetzten Proben ebenfalls bei 280 nm Wellenlänge gemessen, um die Qualität der gewonnenen RNA zu überprüfen. Da Proteine

maximal Licht einer Wellenlänge von 280 nm absorbieren, RNA hingegen einer Wellenlänge von 260 nm, kann aus den beiden erhaltenen Messwerten über die Bildung der Ratio  $OD_{260}/OD_{280}$  die Reinheit der RNA bestimmt werden. Werte zwischen 1,9 und 2,1 sprachen für eine reine RNA, Werte unter 1,6 wiesen auf Verunreinigungen mit Proteinen oder Phenol hin.

### 4.3.3 cDNA-Synthese

Als nächster Schritt wurde die extrahierte mRNA mittels reverser Transkription in cDNA umgeschrieben, damit sie in der quantitativen real-time PCR eingesetzt werden konnte. Dazu wurde als erstes der in Tabelle 8 beschriebene RT-Mix I erstellt. Anschließend wurden in jedes Reaktionsgefäß 7 µl dieses Ansatzes vorgelegt und mit 4 µl Proben-RNA gemischt.

Bezeichnung	Zusammensetzung
RT-Mix I	5 µl DEPC Wasser
	1 µl Random Hexamer
	1 µl dNTPs

**Tabelle 8: Zusammensetzung des RT-Mix I pro Reaktionsgefäß**

Im real-time Cycler wurden die Proben für 10 min bei 65 °C erhitzt, um die Sekundärstrukturen der RNA aufzuspalten. Ein anschließendes Abkühlen auf 4°C ermöglichte den verwendeten Primern (hier: Random Hexamer) an die RNA zu binden.

Danach wurde der in Tabelle 9 aufgeführte RT-Mix II hergestellt und jeweils 9 µl zu den bereits vorhandenen 11 µl des ersten Ansatzes hinzugefügt.

Bezeichnung	Zusammensetzung
RT-Mix II	4 µl RT Puffer
	2 µl autoklaviertes <i>Aqua bidest.</i>
	2 µl 0,1 M DTT
	1 µl M-MLV RT

**Tabelle 9: Zusammensetzung des RT-Mix II pro Reaktionsgefäß**

Im real-time Cycler wurden die Proben während 60 min bei 37 °C inkubiert, so dass die Reverse Transkriptase (hier: „Moloney murine leukemia virus“ M-MLV) aus den im Ansatz vorliegenden dNTP einen zur mRNA komplementären DNA-Strang synthetisieren konnte. DTT (Dithiothreitol) diente als Reduktionsmittel ebenfalls der Aufspaltung von Sekundärstrukturen.

Durch ein fünfminütiges Erhitzen auf 90 °C wurde die Reaktion inaktiviert und anschließend auf 4 °C herunter gekühlt. Die gewonnene cDNA wurde anschließend mit autoklaviertem Wasser im Verhältnis 1:10 verdünnt und bis zum Einsatz bei -20 °C gelagert.

Als Negativkontrollen wurden für den ersten Reaktionsschritt ein Reaktionsgefäß mit RT-Mix I und autoklaviertem *Aqua bidest.* anstatt RNA gefüllt (Blank 1) und für den zweiten

Reaktionsschritt 11 µl DEPC Wasser anstelle des erhitzten ersten Ansatzes dem RT-Mix II hinzugefügt (Blank 2).

#### 4.3.4 Durchführung der quantitativen real-time PCR

Für die quantitative real-time PCR wurden jeweils 9 µl des in Tabelle 10 aufgeführten PCR-Mix pro „well“ in eine 96-well Platte vorgelegt und anschließend 1 µl der Proben-cDNA hinzugefügt. Dabei erfolgte für jede Probe eine Doppelbestimmung. Als Negativkontrolle wurde anstelle der cDNA 1 µl autoklaviertes *Aqua bidest.* in das „well“ gegeben (Blank 3).

Bezeichnung	Zusammensetzung
PCR-Mix	3,5 µl autoklaviertes <i>Aqua bidest.</i>
	5 µl Mastermix
	0,5 µl Primer

**Tabelle 10: Zusammensetzung des PCR-Mix pro Reaktionsgefäß**

Anschließend wurde die PCR im real-time Cycler mit nachfolgenden Zyklen durchgeführt.

Step	Aktivierung der Polymerase	35 – 44 Zyklen	
		Denaturierung	Annealing/Elongation
Temperatur °C	50 °C	95 °C	60 °C
Zeit	2 min	15 s	30 s

## 4.4 Quantitative real-time PCR für MicroRNAs

### Material

Bezeichnung	Hersteller
Nukleasefreies Wasser	Invitrogen, San Diego, CA, USA
TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription Kit	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
TaqMan® Universal PCR Master Mix II, No UNG	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA

### Primer

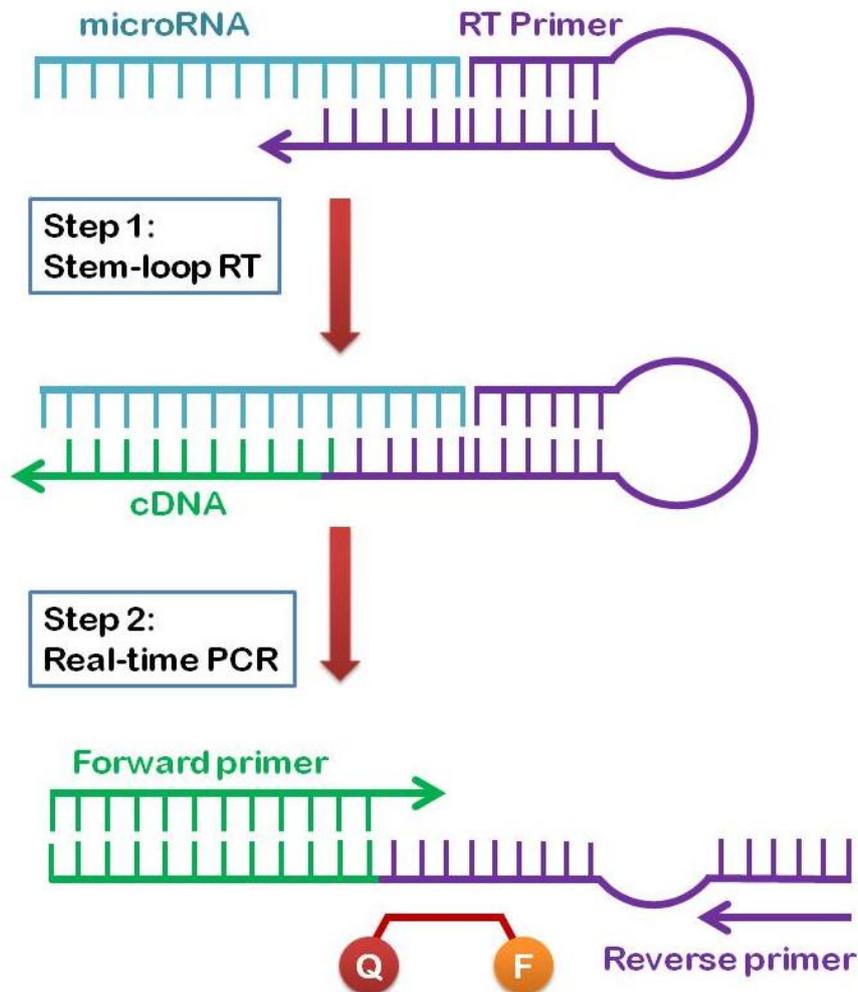
TaqMan® MicroRNA Assays (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)

Assay-ID	Gen ( <i>Rattus Norvegicus</i> )
001973	U6snRNA (Referenzgen)
462788_mat	Mir146a

### 4.4.1 Grundlagen der Methode

Aufgrund der geringen Größe von microRNAs (circa 20 – 22 Nukleotide) und ihrem oftmals geringfügigen Anteil an der Gesamt-RNA-Menge einer Probe, sind die üblicherweise in der real-time PCR verwendeten Standardmethoden häufig nicht sensitiv genug für eine Amplifikation von microRNAs. Dieses Problem wurde gelöst durch den Einsatz von sogenannten „stem-loop RT-Primern“ bereits in der Phase der Reversen Transkription (Chen et al. 2005)(Abbildung 21).

Die RT-Primer zeichnen sich durch eine stabile Schlaufenstruktur aus, die sich spezifisch an das 3'-Ende einer bestimmten muren microRNA anlagert. Von diesem RT-Primer ausgehend wird die microRNA in cDNA umgeschrieben. Die Schlaufenstruktur der RT-Primer verhindert ein Anlagern des Primers an die Vorläuferstrukturen (pri- und pre-microRNAs) der muren microRNA, die ebenfalls eine Haarnadelschleifenstruktur besitzen. Nach der Reversen Transkription entfaltet der RT-Primer seine Schlaufenstruktur und verlängert somit die microRNA von ~ 22 auf > 60 Nukleotide, was das Ansetzen der Forward und Reverse Primer in der PCR erleichtert (Chen et al. 2005; Schmittgen et al. 2008; Kramer 2011).



**Abbildung 21: Reverse Transkription mittels Stem-loop Primern**

Der „Stem-loop Primer“ lagert sich an das 3'-Ende der gesuchten murenen microRNA an. Von dem „Stem-loop Primer“ ausgehend wird die RNA in cDNA umgeschrieben. In der sich anschließenden real-time PCR entfaltet der „Stem-loop Primer“ seine Schlaufenstruktur und schafft eine Basis, an die der „Reverse Primer“ sich anlagern kann. Abbildung modifiziert nach (Chen et al. 2005).

#### 4.4.2 cDNA-Synthese

Die RNA-Extraktion erfolgte wie vorher beschrieben nach der „Single-Step“ Methode mit TRIzol. Anschließend wurde die RNA für die Reverse Transkription mit nukleasefreiem Wasser auf 2 ng/μl verdünnt.

Als nächster Schritt wurde der in Tabelle 11 aufgeführte RT-Mix für microRNAs zusammengestellt und in jedes Reaktionsgefäß 10 μl dieses Ansatzes vorgelegt und mit 5 μl Proben-RNA vermischt. Als Blank wurden 5 μl nukleasefreies Wasser eingesetzt.

Bezeichnung	Zusammensetzung
<b>RT-Mix für microRNAs</b>	0,15 µl dNTP Mix
	1 µl Multiscribe RT enzyme
	1,5 µl RT Puffer
	0,19 µl Rnase Inhibitor
	4,16 µl nukleasefreies Wasser
	3 µl RT Primer

**Tabelle 11: Zusammensetzung des RT-Mix für microRNAs pro Reaktionsgefäß**

Nach 5minütiger Inkubation auf Eis durchliefen die Proben im real-time Cycler folgendes Programm: Inkubation bei 16 °C für 30 min, Inkubation bei 42 °C für 30 min, 5minütiges Erhitzen auf 85 °C und anschließendes Abkühlen auf 4 °C.

Die gewonnene cDNA wurde bis zum Einsatz in der PCR bei -20 °C gelagert.

#### 4.4.3 Durchführung der quantitativen real-time PCR

Jeweils 9 µl des in Tabelle 12 beschriebenen PCR-Mix für microRNAs wurden pro „well“ in eine 96-well Platte vorgelegt und anschließend jeweils 1 µl der Proben-cDNA hinzugefügt. Für jede Probe erfolgte eine Doppelbestimmung und als Negativkontrolle wurde 1 µl nukleasefreies Wasser in das „well“ gegeben.

Bezeichnung	Zusammensetzung
<b>PCR-Mix für microRNAs</b>	3,5 µl nukleasefreies Wasser
	5 µl Universal PCR Mastermix II, No UNG
	0,5 µl Primer

**Tabelle 12: Zusammensetzung des PCR-Mix für microRNAs pro Reaktionsgefäß**

Anschließend wurde die PCR im real-time Cycler mit nachfolgenden Zyklen durchgeführt.

Step	Aktivierung der Polymerase	40 Zyklen	
		Denaturierung	Annealing/Elongation
Temperatur °C	95 °C	95 °C	60 °C
Zeit	10 min	15 s	60 s

Erfolgte die Amplifikation der microRNA sehr spät, konnte dies durch eine der eigentlichen PCR vorgeschaltete Präamplifikation für 10 Zyklen unter gleichen Bedingungen verbessert werden, indem das präamplifizierte Produkt anschließend in der regulären PCR mit 40 Zyklen als cDNA eingesetzt wurde.

## 5. Auswertung und Statistik

### 5.1 Physiologische Daten

Die telemetrisch ermittelten Temperatur- und Aktivitätsdaten wurden mit dem Computerprogramm VitalView in 5 Minuten Intervallen aufgezeichnet und zur weiteren Auswertung in Excel® übertragen.

Für die Temperaturdaten wurden zuerst für jedes Tier die Delta-T Werte ( $\Delta T$ ) errechnet, das heißt die Temperaturunterschiede im Vergleich zu einem zuvor gemittelten Basiswert, welcher als Mittelwert der erfassten Temperaturdaten von Zeitpunkt -180 min bis -60 min vor der Injektion kalkuliert wurde. Bei Studie „Rosiglitazon“ wurden die Originaldaten verwendet, da manche Tiere in dem zur Ermittlung des Basiswertes für Delta-T benötigten Zeitraum einen zu unruhigen Temperaturverlauf aufwiesen. Anschließend wurden die Mittelwerte mit Standardfehler von 15 Minuten Intervallen für jede Gruppe errechnet und in Prism® graphisch dargestellt.

Für die statistische Auswertung erfolgte eine zweifaktorielle Varianzanalyse (ANOVA) für wiederholte Messungen mit anschließendem post-hoc Test nach Scheffe mit Hilfe des Programms StatView®.

Bei manchen Gruppen wurde zur Darstellung der Fieberstärke zusätzlich der Fieberindex (F.I.) ermittelt. Dieser errechnet sich aus der Integration der Fläche unterhalb der Fieberkurve anhand eines zuvor ermittelten Basiswertes (Mittelwert von Zeitpunkt -180 min bis -60 min).

Die Aktivitätsdaten wurden in Excel® kumulativ für jedes Tier zusammengezählt, entweder über den gesamten Versuchszeitraum von 24 h oder getrennt in Tag- und Nachtaktivität. Zusätzlich wurden die Mittelwerte mit Standardfehler von 15 Minuten Intervallen für jede Gruppe errechnet und diese als Aktivitätsverlauf über die Zeit aufgetragen und in Prism® dargestellt.

Die Futter- und Wasseraufnahme wurde mit dem Programm AccuDiet in 5 Minuten Intervallen aufgezeichnet und später in Excel® übertragen. Für jedes Tier wurden die Messwerte über den gesamten Versuchszeitraum von 24 h kumulativ zusammengezählt.

Für den Fieberindex, die Aktivität, die Futter-, Wasseraufnahme und die Gewichtsänderung wurde für jede Tiergruppe der Mittelwert mit Standardfehler in Prism® errechnet und graphisch als Balkendiagramm dargestellt. Die statistische Auswertung erfolgte in Prism® mittels einer zweifaktoriellen ANOVA. Bei signifikanter Interaktion der untersuchten Hauptparameter wurde zusätzlich ein Bonferroni *post-hoc* Test durchgeführt. Bei lediglich 2 Gruppen wurde ein parametrischer T-Test durchgeführt. Es wurde eine Irrtumswahrscheinlichkeit von  $p < 0,05$  als signifikant unterschiedlich vorausgesetzt.

### 5.2 Biochemische Parameter

#### 5.2.1 Bioassay und ELISA

Zur Auswertung der ermittelten Zytokindaten der Hypophysenvorderlappenzellkultur und der Fat Explants wurde zuerst für jede behandelte Gruppe aus einem Versuchsansatz der Mittelwert errechnet. Anschließend wurde aus den so kalkulierten Mittelwerten aus allen Versuchsansätzen erneut der Mittelwert mit Standardfehler für die Behandlungsgruppe

errechnet. Zur Auswertung der Zytokindaten aus dem Blutplasma wurde lediglich der Mittelwert mit Standardfehler für jede Tiergruppe errechnet.

In Prism® schloss sich danach je nach Gruppengröße entweder ein parametrischer t-Test (2 Gruppen) oder eine zweifaktorielle ANOVA mit Bonferroni *post-hoc* Test bei signifikanter Interaktion an, wobei die Irrtumswahrscheinlichkeit bei  $p < 0,05$  festgesetzt wurde.

### 5.2.2 Immunhistochemie und Immunzytochemie

Zusätzlich zur Fluoreszenzmikroskopie und Darstellung der Bildaufnahmen in Photoshop wurden die Dichte und Intensität der Signale semiquantitativ anhand eines 5-Punkte Bewertungssystems beurteilt. Die ermittelten Werte wurden anschließend für jedes Tier (jeweils aus 2-3 Schnitten pro Gehirnregion) und jede Tiergruppe (hierbei jeweils  $n = 3-6$ ) arithmetisch gemittelt („mean of the mean“).

- (1)	keine nukleären Signale
± (2)	einzelne nukleäre Signale
+ (3)	niedrige Dichte nukleärer Signale
++ (4)	mittlere Dichte nukleärer Signale
+++ (5)	hohe Dichte nukleärer Signale

### 5.2.3 Quantitative real-time PCR

Zur Auswertung der Ergebnisse wurde die Relative Quantifizierung durchgeführt, das heißt es wurde nicht die absolute Menge des Templates die sich im Reaktionsansatz befand ausgerechnet, sondern die relative Expressionsänderung des Zielgens im Vergleich zu einer Kontrollgruppe bestimmt. Dazu mussten folgende Parameter bestimmt werden.

Der „Threshold“ oder Schwellenwert ist der Punkt, an dem die emittierte Fluoreszenz erstmalig die Hintergrundfluoreszenz übersteigt. Der Threshold befindet sich in der exponentiellen Phase der PCR-Reaktion und der Zyklus in dem der Threshold überschritten wird, wird als „Cycle Threshold“ oder als  $C_T$ -Wert bezeichnet.

Um nun die relative Genexpression zu errechnen, wurde der  $C_T$ -Wert des Zielgens mit dem  $C_T$ -Wert eines Referenzgens normiert. Bei dem Referenzgen handelt es sich üblicherweise um ein sogenanntes „housekeeping“ Gen, welches in dem untersuchten Gewebe konstitutiv exprimiert wird und von den Versuchsbedingungen unbeeinflusst bleibt. In der vorliegenden Arbeit wurde als Referenzgen für Hypothalamus und Hypophyse  $\beta$ -Aktin und für die Leber Gapdh eingesetzt. Der ermittelte Delta- $C_T$ -Wert ( $\Delta-C_T = C_T\text{-Zielgen} - C_T\text{-Referenzgen}$ ) vermindert somit Variationen die auf Unterschieden in der RNA-Extraktion oder eingesetzter cDNA beruhen, da diese Ziel- und Referenzgen gleichermaßen betreffen.

Anschließend wurden die errechneten Delta- $C_T$ -Werte mit einer Referenzprobe verglichen, dem sogenannten Kalibrator, bei dem es sich um ein Tier der Kontrollgruppe handelte und somit der  $\Delta\Delta-C_T$ -Wert ( $\Delta\Delta-C_T = \Delta-C_T\text{-Zielgen} - \Delta-C_T\text{-Zielgen der Referenzprobe}$ ) erstellt. Die RQ (relative quantity oder relative Menge) des untersuchten Zielgens im Vergleich zur Referenzprobe ergibt sich aus  $2^{-\Delta\Delta C_T}$ .

$\Delta-C_T = C_T\text{-Zielgen} - C_T\text{-Referenzgen}$
$\Delta\Delta-C_T = \Delta-C_T\text{-Zielgen} - \Delta-CT\text{-Zielgen der Referenzprobe}$
$RQ = 2^{-\Delta\Delta CT}$

Für jede Tiergruppe wurden Mittelwert und Standardfehler der RQ-Werte in Prism® errechnet und graphisch als Balkendiagramme dargestellt. Mittels parametrischem t-Test (2 Gruppen) oder zweifaktorieller ANOVA und anschließendem Bonferroni *post-hoc* Test bei signifikanter Interaktion wurden statistisch signifikante Unterschiede bei  $p < 0,05$  festgelegt.

### III. Ergebnisse

#### 1. Altersabhängige Unterschiede in der LPS-bedingten Entzündungsreaktion

Zur Untersuchung altersbedingter Veränderungen bei systemischen Entzündungsreaktionen wurden junge (2 Monate) und alte (circa 24 Monate) Ratten mit LPS (100 µg/kg) oder PBS (gleiches Volumen) intraperitoneal injiziert (Tabelle 13).

Unter anderem sollten Krankheitssymptome, die zum sogenannten „sickness behaviour“ gehören und durch LPS ausgelöst werden, analysiert werden. Mittels eines telemetrischen Systems wurden dafür die physiologischen Parameter Körperkerntemperatur (Fieber), motorische Aktivität (Lethargie), Futter- und Wasseraufnahme (Anorexie und Adipsie) und Gewichtsänderung (Gewichtsverlust) aufgezeichnet und dieser Symptomkomplex auf altersassoziierte Veränderungen analysiert. Des Weiteren wurde die Konzentration zirkulierender Zytokine im Blutplasma sowie die Expression relevanter inflammatorischer Marker zentral im Hypothalamus und peripher in der Leber auf altersabhängige Unterschiede untersucht.

Zur statistischen Auswertung wurde eine two-way ANOVA über die Haupteffekte „Alter“ (alt vs jung) und „LPS-Behandlung“ (LPS vs PBS) angewendet. Bei signifikanter Interaktion dieser Parameter wurde zusätzlich ein Bonferroni *post-hoc* Test durchgeführt.

	Alter	applizierte Substanz	Zeitpunkt Perfusion	Tierzahl
<b>Kontrolle</b>	2 Monate	PBS (1 ml/kg)	+ 24h	5
	24 Monate			6
<b>Inflammation</b>	2 Monate	LPS (100 µg/kg)	+ 24h	5
	24 Monate			6
	2 Monate	LPS (100 µg/kg)	+ 4h	3
	24 Monate			3

**Tabelle 13: Versuchsgruppen Studie „Altern“**

Übersicht über die für Studie „Altern“ gebildeten Versuchsgruppen, die applizierten Substanzen, den Perfusionszeitpunkt und die jeweils verwendete Anzahl an Tieren.

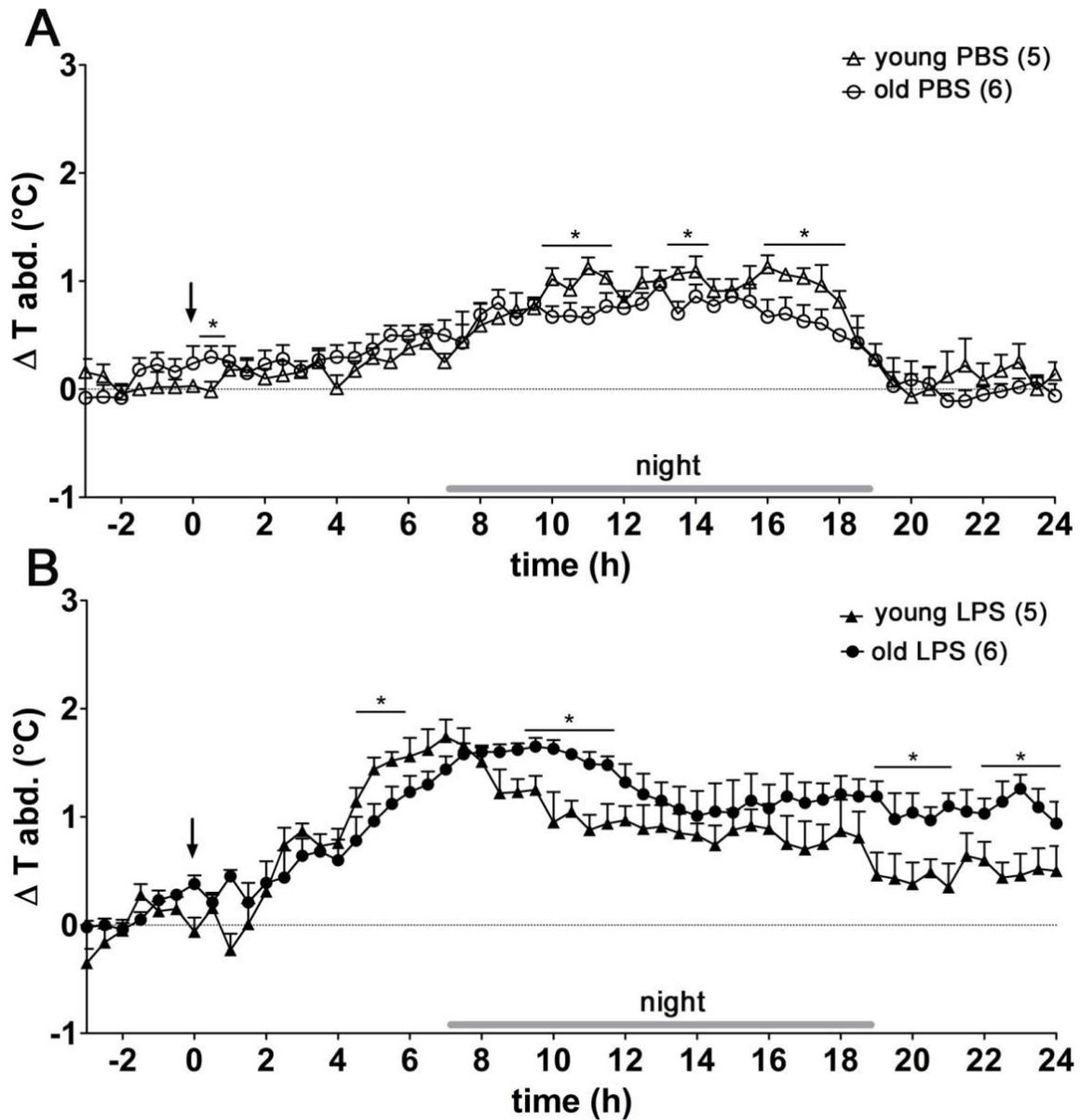
## **1.1 Einfluss des Alters auf physiologische Parameter des „sickness behaviours“**

Die Ratten wurden zum Zeitpunkt  $t = 0$  mit LPS (100  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) oder PBS intraperitoneal injiziert und die Körperkerntemperatur über 24 h aufgezeichnet. Zur Auswertung wurde der Mittelwert von dem Zeitraum -3 h bis -1 h vor der Injektion errechnet und die Temperaturänderungen zu diesem Basiswert als Delta-T ( $\Delta T$ ) dargestellt.

LPS-Stimulation löste bei den jungen Ratten eine 7stündige signifikante Temperaturerhöhung aus (von Zeitpunkt 2,5 h bis 9,5 h nach Injektion) mit einem Temperaturmaximum von  $1,74 \pm 0,16$  °C zum Zeitpunkt 7 h (Abbildung 23, A). Danach ging die Temperatur wieder in den normalen circadianen Rhythmus über und unterschied sich nicht weiter von der PBS-injizierten Kontrollgruppe. Bei den alten Ratten führte die gleiche Dosis LPS zu einer ersten Fieberentwicklung, die von 3 h bis 12 h nach Injektion andauerte und ein Temperaturmaximum von  $1,66 \pm 0,08$  °C nach 10 h erreichte (Abbildung 23, B). Nach der darauffolgenden Nachtphase wiesen die alten Ratten eine zweite, späte Fieberphase auf, welche von Zeitpunkt 17,5 h bis zum Ende der Aufzeichnung bei 24 h andauerte.

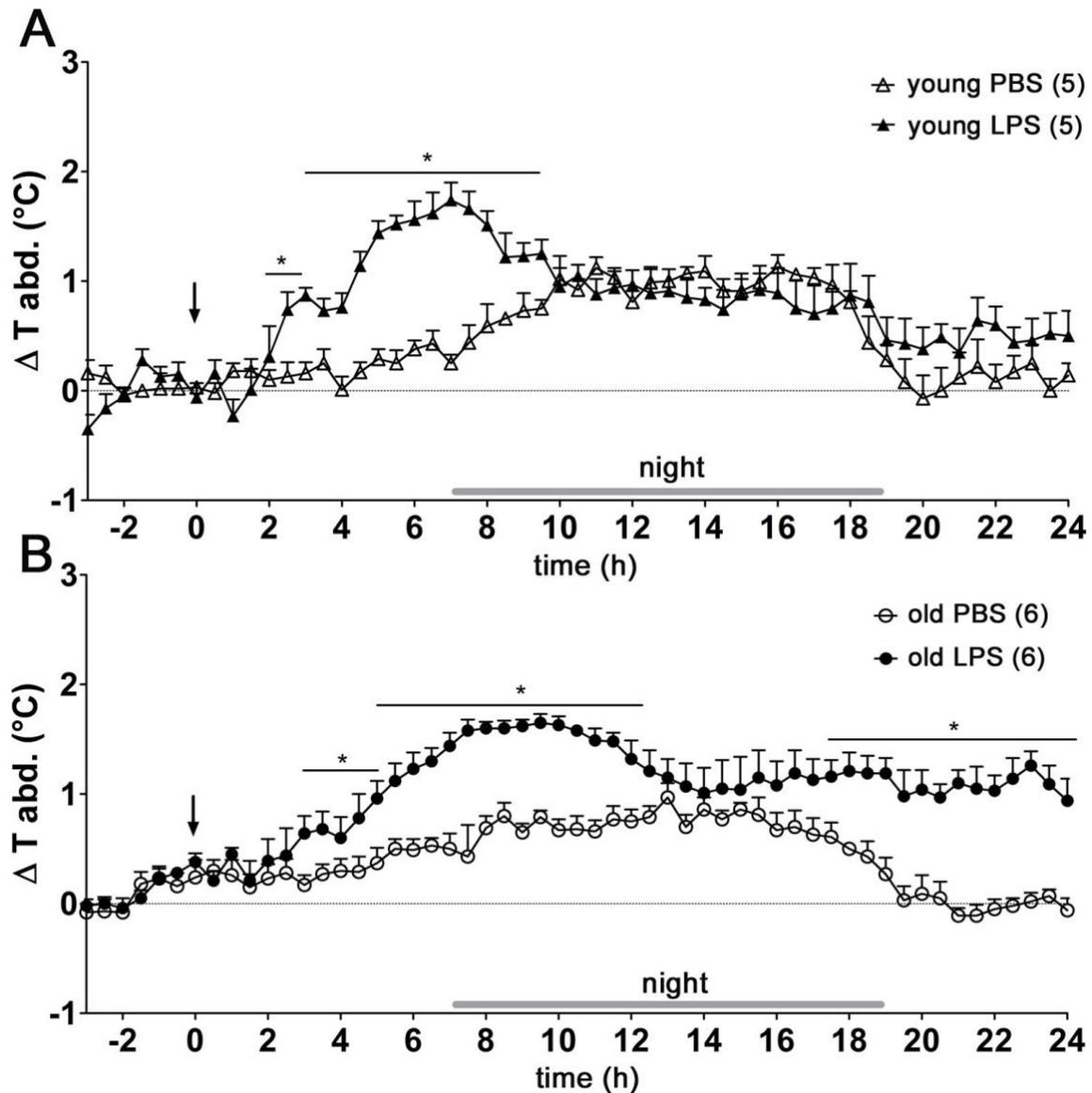
Im direkten Vergleich der jungen und alten LPS-stimulierten Gruppen zeigten die alten Ratten einen schwächeren bzw. verzögerten Temperaturanstieg in der frühen Fieberphase (von Zeitpunkt 4,75 h bis 5,75 h), jedoch ein höheres und länger andauerndes Fieber über den verbleibenden Zeitraum des Experimentes (Abbildung 22, B).

Der Temperaturverlauf der beiden Kontrollgruppen zeigte den für nachtaktive Säugetiere typischen circadianen Rhythmus mit dem Temperaturmaximum in der Dunkelphase. In dieser Dunkelphase wiesen die jungen Ratten außerdem eine geringgradig höhere Körperkerntemperatur als die alten Ratten auf (Abbildung 22, A).



**Abbildung 22: Altersbedingte Veränderungen in der Körperkerntemperatur nach Injektion mit LPS oder PBS**

Verlauf der intraabdominal gemessenen Körpertemperatur nach Injektion mit LPS (100  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) (B) oder PBS (A) über 24 h bei jungen und alten Ratten im Vergleich. Der Zeitpunkt der i.p. Injektion wurde mit einem Pfeil markiert, die Nachtphase wurde mit einem grauen Balken gekennzeichnet. \*  $P < 0.05$ .



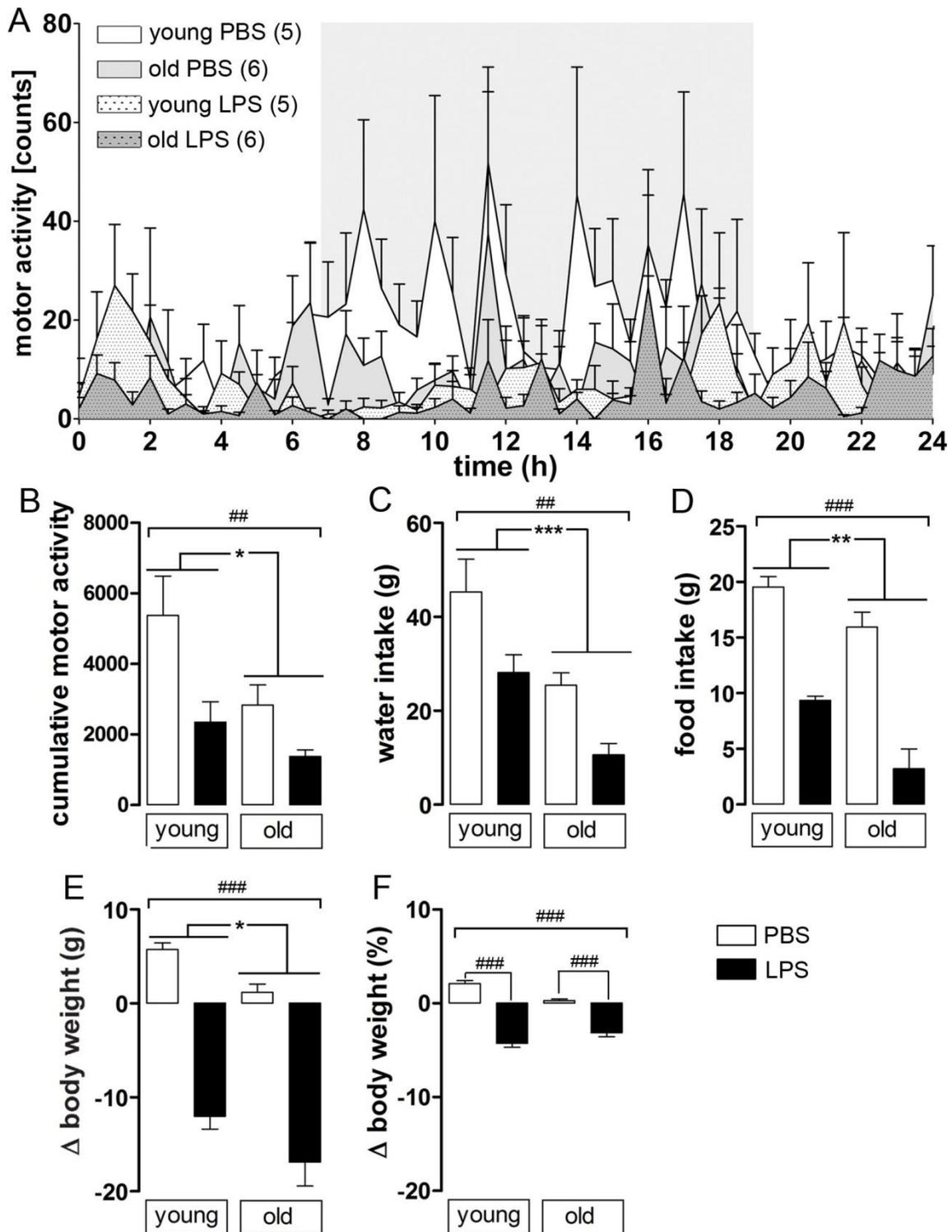
**Abbildung 23: Altersbedingte Veränderungen in der Körperkerntemperatur nach Injektion mit LPS oder PBS**

Verlauf der intraabdominal gemessenen Körpertemperatur nach intraperitonealer Injektion mit LPS (100  $\mu\text{g/kg}$ ) oder PBS über 24 h bei jungen (A) und alten (B) Ratten. Der Zeitpunkt der i.p. Injektion wurde mit einem Pfeil markiert, die Nachtphase wurde mit einem grauen Balken gekennzeichnet. Beide Graphen zeigen den Vergleich zwischen LPS-stimulierten Tieren und ihren Kontrollen. \*  $P < 0.05$

Die motorische Aktivität der Ratten wurde über 24 h kumulativ zusammengezählt (Abbildung 24, A-B). LPS-Stimulation über 24 h verringerte die motorische Aktivität in beiden Altersgruppen im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die alten Ratten zeigten generell eine reduzierte motorische Aktivität im Vergleich zur jungen Gruppe (Tabelle 14). Die Darstellung des Aktivitätsverlaufs über 24 h erlaubt eine detailliertere Betrachtung der vorhin erwähnten Unterschiede zu den einzelnen Zeitpunkten. Bei den Jungtieren zeigte sich ein deutliches Aktivitätsmaximum in der grau hinterlegten Nachtphase. In diesem Zeitraum war der Aktivitätsverlust durch LPS-Stimulation am größten. Bei den alten Ratten war diese starke circadiane Rhythmik der motorischen Aktivität schwächer ausgeprägt.

Die kumulative Wasser- und Futteraufnahme über 24 h wurde in beiden Altersgruppen durch LPS im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant erniedrigt (Abbildung 24, C-D). Die alten Ratten unterschieden sich jedoch von den Jungtieren durch einen deutlich reduzierten Futter- und Wasserkonsum, was sowohl die basale Aufnahme als auch die LPS-induzierte Anorexie und Adipsie betraf.

Aufgrund des unterschiedlichen mittleren Körpergewichtes zwischen jungen und alten Ratten wurde die Gewichtsänderung zum Vortag sowohl in Absolutwerten als auch als prozentuale Gewichtsänderung zum Körpergesamtwert analysiert (Abbildung 24, E-F). In beiden Darstellungen führte die LPS-Injektion zu einem hochsignifikanten Gewichtsverlust, welche in der Analyse der Absolutwerte ebenfalls eine reduzierte basale Gewichtszunahme und verstärkte LPS-induzierte Abnahme bei den alten Ratten erkennen ließ. Nach Umrechnung auf die prozentuale Gewichtsänderung relativierte sich jedoch diese altersbedingte Verstärkung der Gewichtsabnahme und die beiden Altersgruppen unterschieden sich nicht mehr so deutlich (Tabelle 14).



**Abbildung 24: Einfluss des Alterns auf Parameter des „sickness behaviours“**

Zeitlicher Verlauf der Aktivität (A) oder kumulativen Aktivität (B), Wasseraufnahme (C), Futteraufnahme (D), Gewichtsänderung in Gramm (E), bzw. Prozent (F) nach Stimulation mit LPS (100  $\mu$ g/kg) oder PBS von jungen und alten Ratten (über 24 h). B-F: \* Haupteffekt des Alterns, # Haupteffekt der LPS-Behandlung / Vergleich LPS mit korrespondierender PBS-Gruppe (*post-hoc*), \*  $P < 0.05$ ; \*\*,###  $P < 0.01$ ; \*\*\*,###  $P < 0.001$ .

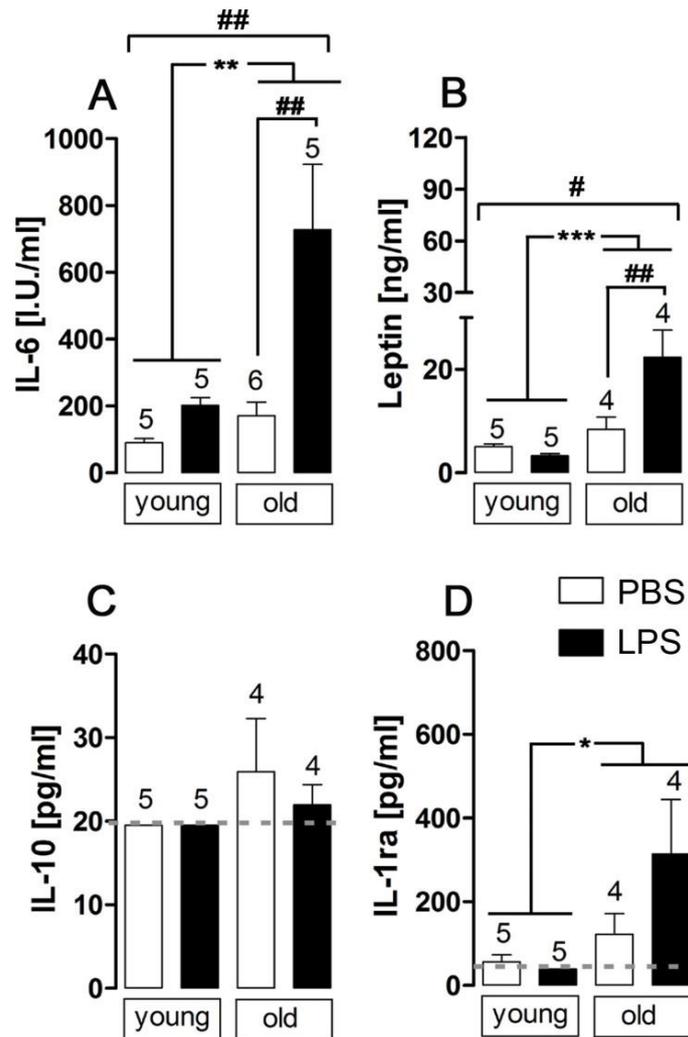
	<b>PBS young</b>	<b>LPS young</b>	<b>PBS old</b>	<b>LPS old</b>
Motorische Aktivität („counts“)	5377 ± 1114	2347 ± 581	2839 ± 567,1	1378 ± 183,8
Wasseraufnahme (g)	45,32 ± 6,96	28,14 ± 3,8	25,43 ± 2,64	10,63 ± 2,4
Futteraufnahme (g)	19,55 ± 0,95	9,37 ± 0,36	15,95 ± 1,33	3,21 ± 1,77
Gewichtsdifferenz (g)	5,74 ± 0,69	-12,02 ± 1,38	1,18 ± 0,87	-16,88 ± 2,57
Gewichtsdifferenz (%)	2,12 ± 0,31	-4,26 ± 0,43	0,28 ± 0,18	-3,14 ± 0,44

**Tabelle 14: Einfluss des Alters auf Parameter des „sickness behaviours“ (über 24 h)**

## 1.2 Einfluss des Alters auf zirkulierende Zytokine

Ausgehend von den gewonnenen physiologischen Daten sollte nun untersucht werden, ob sich die verstärkte bzw. länger andauernde Fieberantwort der alten Ratten in einer erhöhten Konzentration zirkulierender (humoraler) Entzündungsmediatoren widerspiegelt. Zu diesem Zweck wurden die wichtigsten pro- (IL-6, TNF $\alpha$ ) und antiinflammatorischen (IL-10, IL-1ra) Zytokine und zytokin-ähnlichen Hormone (Leptin) der LPS-induzierten Entzündungsreaktion im Blutplasma analysiert.

Es wurde ein altersbedingter Anstieg der Zytokinkonzentration von IL-6, Leptin und IL-1ra im Blutplasma der alten Ratten im Vergleich zu den jungen Ratten festgestellt (Abbildung 25, A-B, D) (Tabelle 15). Während für IL-10 und IL-1ra nach 24 h keine Wirkung durch die LPS-Injektion (100  $\mu$ g/kg) nachzuweisen war, ergab sich für IL-6 und Leptin ein statistisch signifikanter Haupteffekt der LPS-Behandlung. Weitere *post-hoc* Tests nach positiver Interaktion der analysierten Parameter Altern und LPS-Behandlung verdeutlichten jedoch, dass ein LPS-vermittelter Anstieg der Zytokinkonzentration von IL-6 und Leptin nur bei den alten Ratten auftrat, während sich die jungen Ratten nach 24 h nicht mehr von ihrer Kontrollgruppe unterschieden (Abbildung 25, A-D). TNF $\alpha$  (Daten nicht gezeigt) konnte zu diesem Zeitpunkt in keiner der untersuchten Proben nachgewiesen werden.



**Abbildung 25: Einfluss des Alterns auf zirkulierende Zytokine**

Konzentration von IL-6 (A), Leptin (B), IL-10 (C) und IL-1ra (D) im Blutplasma von alten und jungen Ratten 24 h nach Injektion von LPS (100 µg/kg) oder PBS. Zahlen über den Balken geben die jeweilige Tierzahl an. Die graue gestrichelte Linie entspricht dem Detektionslimit. \* Haupteffekt des Alterns, # Haupteffekt der LPS-Behandlung / Vergleich LPS mit korrespondierender PBS-Gruppe (*post-hoc*) \*,#  $P < 0.05$ ; ##, \*\*  $P < 0.01$ ; \*\*\*  $P < 0.001$ .

	<b>PBS young</b>	<b>LPS young</b>	<b>PBS old</b>	<b>LPS old</b>
IL-6 (I.U./ml)	90,4 ± 12,3	201,8 ± 23,51	171,3 ± 40,57	728 ± 195,1
Leptin (ng/ml)	5,04 ± 0,47	3,26 ± 0,43	8,42 ± 2,34	22,36 ± 5,25
IL-10 (pg/ml)	19,53 (D.L.)	19,53 (D.L.)	25,92 ± 6,38	21,96 ± 2,43
IL-1ra (pg/ml)	56,65 ± 16,48	39,07 (D.L.)	122 ± 49,86	314,5 ± 129,6

**Tabelle 15: Konzentration pro- und antiinflammatorischer Zytokine**

D.L. = Detektionslimit.

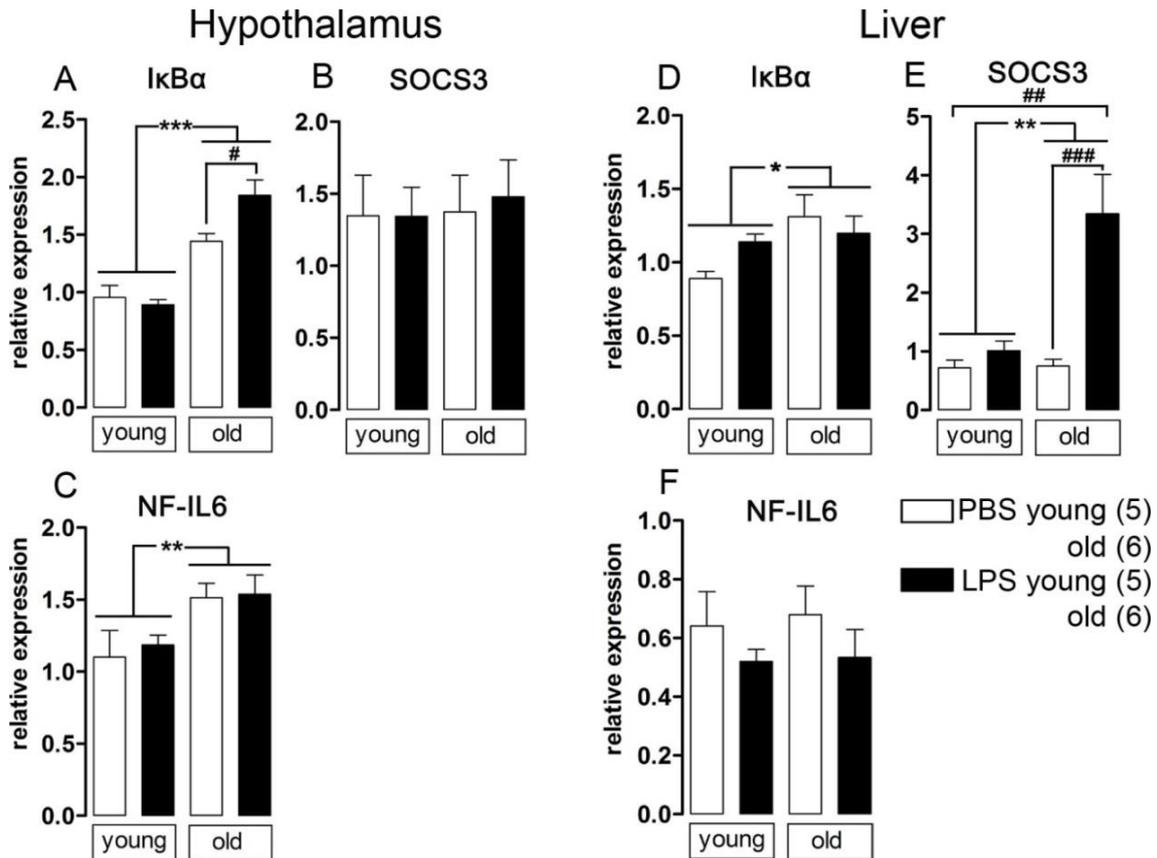
### **1.3 Altersbedingte Veränderungen der mRNA-Expression inflammatorischer Marker**

Um altersbedingte Veränderungen in den Signalwegen, welche an der Manifestation des „sickness behaviour“ (wie der Fieberantwort) und der Entzündungsreaktion im Gehirn relevant sind, näher zu charakterisieren, wurde eine große Bandbreite relevanter entzündlicher Mediatoren auf zentraler und peripherer Ebene untersucht. Anhand von Hypothalamus- oder Lebergewebe der mit LPS oder PBS behandelten jungen und alten Ratten wurde zunächst die Induktion verschiedener inflammatorischer Marker auf mRNA-Ebene mittels quantitativer real-time PCR analysiert.

#### **Transkriptionsfaktoren**

Zu den essentiellen Transkriptionsfaktoren, welche im Rahmen der LPS-vermittelten Entzündung aktiviert werden, gehören „nuclear factor“ (NF)- $\kappa$ B, „signal transducer and activator of transcription“ (STAT) 3 und NF-IL6 (Nadjar et al. 2005; Rummel et al. 2006; Damm et al. 2011). Für die Untersuchung von NF $\kappa$ B und STAT3 wurden in der vorliegenden Arbeit deren negative Regulatoren „inhibitor of“ kappa B  $\alpha$  (I $\kappa$ B $\alpha$ ) und „suppressor of cytokine signaling“ 3 (SOCS3) als Aktivitätsmarker herangezogen (Laflamme & Rivest 1999; Lebel et al. 2000), während NF-IL6 direkt nachgewiesen wurde (Damm et al. 2011)(Abbildung 26).

Eine altersassoziierte Steigerung der mRNA-Expression trat im Hypothalamus für I $\kappa$ B $\alpha$  und NF-IL6 auf, während die zentrale SOCS3-Expression vom Altern unbeeinflusst blieb. Peripher in der Leber hingegen wurde vor allem die SOCS3- und I $\kappa$ B $\alpha$ -Expression im Alter erhöht und NF-IL6 blieb unverändert. Behandlung mit LPS erhöhte die I $\kappa$ B $\alpha$ -Expression im Hypothalamus lediglich bei den alten Ratten. In der Leber wurde für SOCS3 statistisch ein Haupteffekt der LPS-Behandlung nachgewiesen. Weitere *post-hoc* Tests nach positiver Interaktion konnten jedoch belegen, dass die SOCS3-Expression nur bei den alten Ratten durch die LPS-Behandlung erhöht wurde, während sie bei den jungen Ratten nicht von der PBS-Kontrollgruppe abwich. Bei den anderen Parametern trat zu diesem Zeitpunkt kein Effekt der LPS-Stimulation mehr auf.



**Abbildung 26: Altersbedingte Veränderung der Expression inflammatorischer Transkriptionsfaktoren in Hypothalamus und Leber**

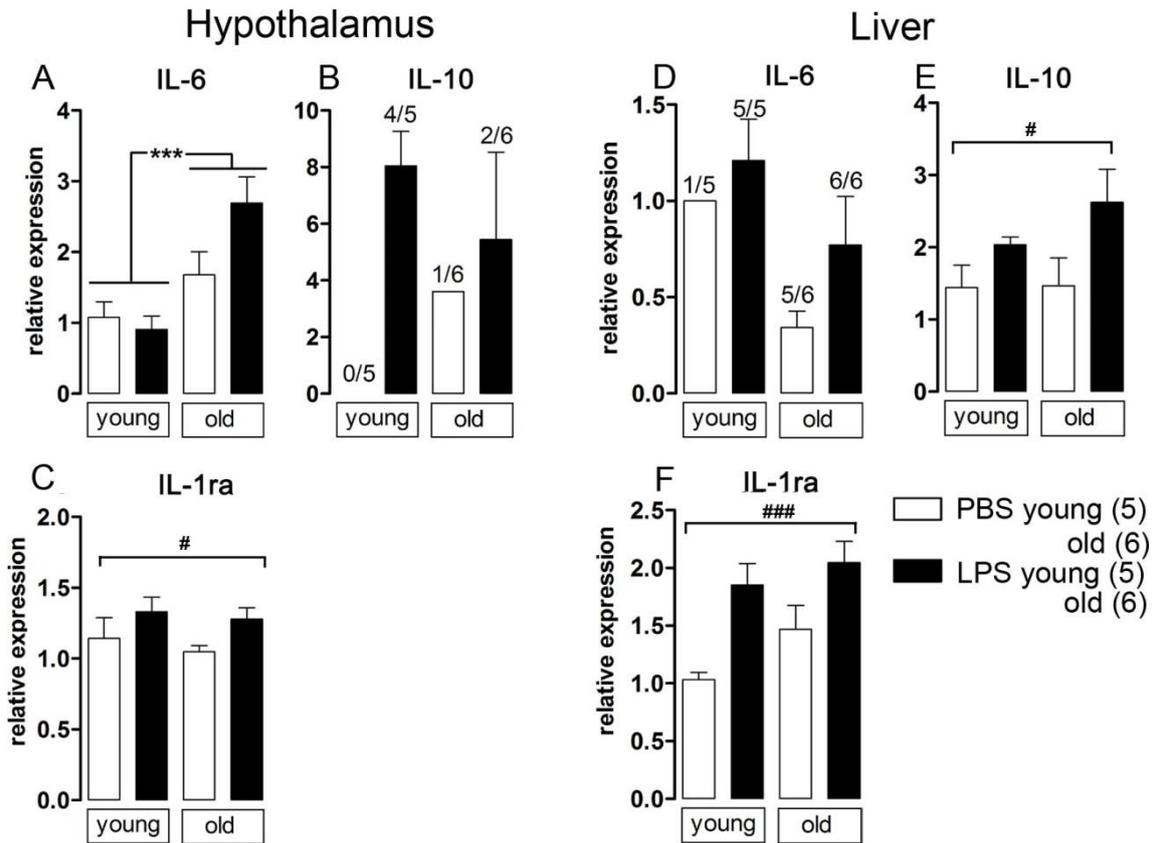
Induktion der mRNA-Expression inflammatorischer Transkriptionsfaktoren im Hypothalamus und in der Leber 24 h nach Injektion mit LPS (100  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) oder PBS von alten und jungen Ratten. \* Haupteffekt des Alterns, # Haupteffekt der LPS-Behandlung / Vergleich LPS mit korrespondierender PBS-Kontrollgruppe (*post-hoc*). #, \*  $P < 0.05$ ; ##, \*\*  $P < 0.01$ ; ###, \*\*\*  $P < 0.001$ .  $I\kappa B\alpha$ , „inhibitor of kappa B  $\alpha$ “; SOCS3, „suppressor of cytokine signaling“ 3; NF-IL6, „nuclear factor“ interleukin 6.

### Zytokine

Als nachgeschaltete Zielgene der Transkriptionsfaktoren wurde die Induktion pro- (IL-6) und antiinflammatorischer (IL-10, IL-1ra) Zytokine untersucht (Abbildung 27).

Eine altersassoziierte Expressionssteigerung konnte nur für das proinflammatorische Zytokin IL-6 im Hypothalamus nachgewiesen werden, alle anderen Zytokine zeigten sich unbeeinflusst durch das Altern.

Ein Haupteffekt der LPS-Behandlung manifestierte sich für IL-1ra sowohl im Hypothalamus als auch in der Leber, und für IL-10 nur in der Leber und führte unabhängig von der Altersgruppe zu einer Steigerung der mRNA-Expression.



**Abbildung 27: Altersbedingte Veränderung der Zytokin-Expression in Hypothalamus und Leber**

Induktion der mRNA-Expression von Zytokinen im Hypothalamus und in der Leber 24 h nach Injektion mit LPS (100 µg/kg) oder PBS von alten und jungen Ratten. \* Haupteffekt des Alterns, # Haupteffekt der LPS-Behandlung. #  $P < 0.05$ ; ###,\*\*\*  $P < 0.001$ . Zahlen über den Säulen geben bei Abweichungen die Anzahl amplifizierter Proben innerhalb der Gesamtprobenzahl an. IL, Interleukin.

### Enzyme der Prostaglandinsynthese und iNOS

Als regulierende Schlüsselenzyme des für die Fieberentstehung kritischen Prostaglandins (PG) E<sub>2</sub> wurden die Zyklooxygenase 2 (COX2) und mikrosomale Prostaglandin E Synthase (mPGES) herangezogen (Roth et al. 2009; Rummel et al. 2011). Die induzierbare Form der Stickstoffmonoxid (NO) Synthase (iNOS) wurde als weiteres durch inflammatorische Transkriptionsfaktoren aktiviertes Zielgen (Kozak & Kozak 2003) ebenfalls auf altersbedingte Veränderungen in der mRNA-Expression untersucht (Abbildung 28).

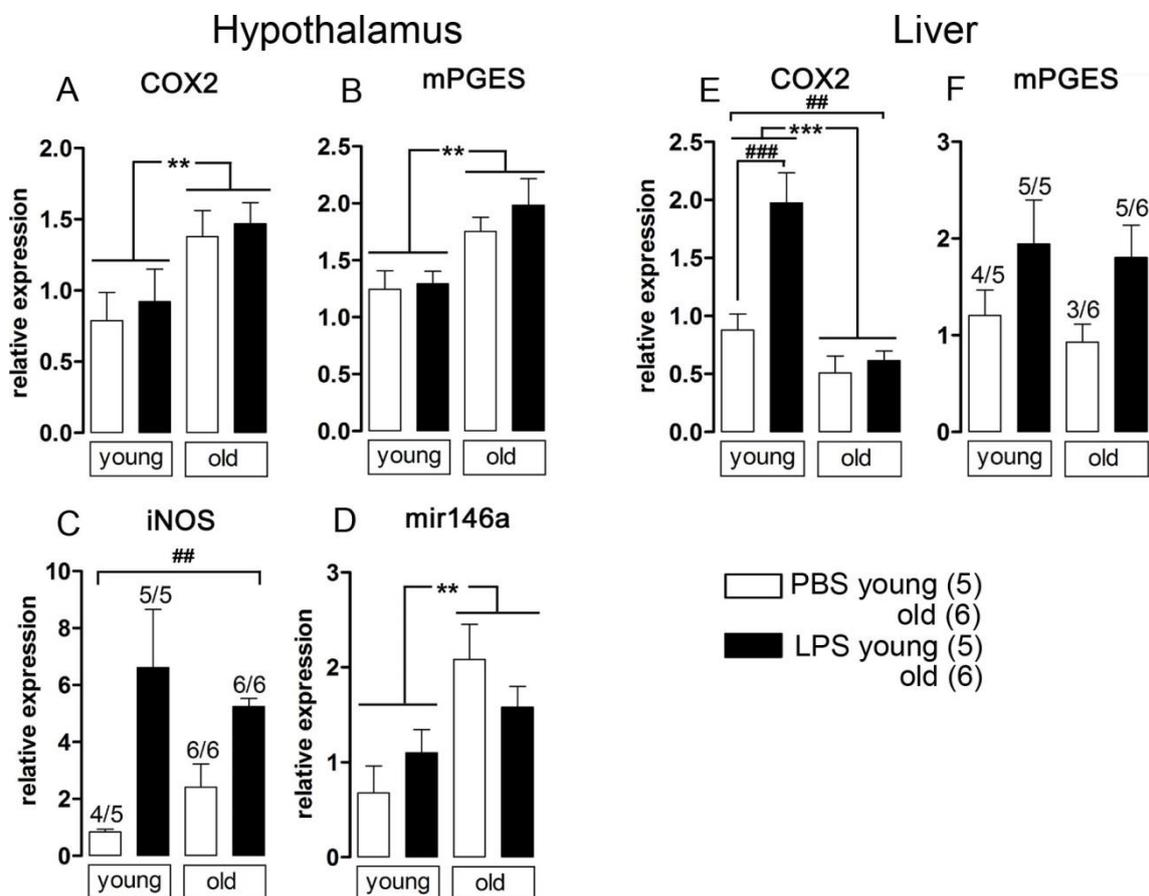
Im Hypothalamus zeigte sich sowohl für COX2 als auch für mPGES eine altersbedingte Steigerung der mRNA-Expression. In der Leber hingegen bewirkte das Altern bei den alten Ratten eine Erniedrigung der COX2-Expression, während mPGES hiervon unbeeinflusst blieb. Nur in der Leber manifestierte sich bei COX2 ein Haupteffekt der LPS-Behandlung. Eine weitere Analyse mittels *post-hoc* Test nach positiver Interaktion verdeutlichte allerdings, dass die LPS-Stimulation nur bei den jungen Ratten zu einer signifikanten Erhöhung der COX2-Expression führte, während die alten Ratten keine Regulation aufwiesen.

INOS, welches nur im Hypothalamus untersucht wurde, wies keine altersbedingten Veränderungen auf, zeigte jedoch einen Haupteffekt der LPS-Behandlung. Dieser bewirkte unabhängig von der Altersgruppe eine Steigerung der iNOS-Expression 24 h nach Stimulation.

### MicroRNAs

MicroRNA 146a wird als negativer Regulator der Immunantwort angesehen und wurde als neues potentiell Zielgen für altersbedingte inflammatorische Veränderungen untersucht (Abbildung 28, D).

Tatsächlich ergab die Analyse der mir146a-Expression (nur im Hypothalamus) eine altersabhängige Beeinflussung. Bei den alten Ratten zeigte sich besonders für die basale Expression der PBS-Kontrollgruppe eine gesteigerte Expression von mir146a im Vergleich zu den jungen Tieren.



**Abbildung 28: Altersbedingte Veränderung der Expression von inflammatorischen Markern in Hypothalamus und Leber**

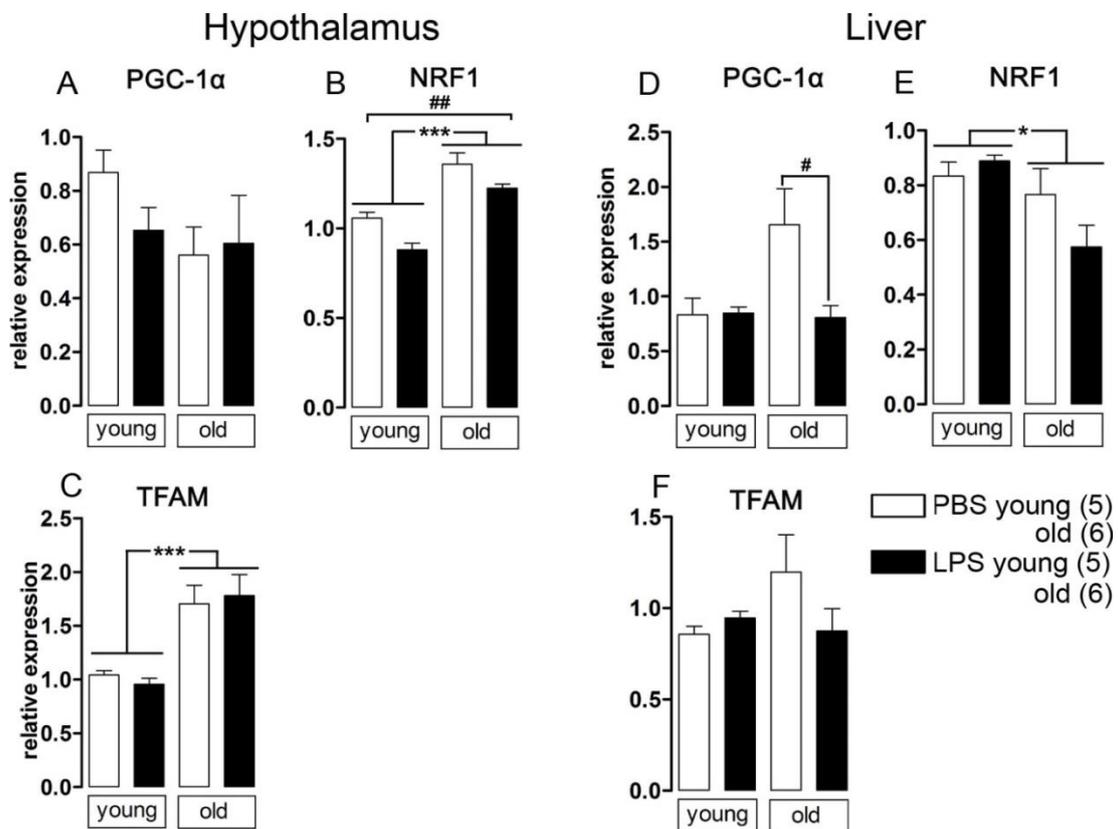
Induktion der mRNA-Expression von Enzymen der PG-Synthese im Hypothalamus (A-B) und in der Leber (E-F), iNOS (induzierbare NO Synthase, C) und mir146a (D) im Hypothalamus 24 h nach Injektion mit LPS (100 µg/kg) oder PBS von alten und jungen Ratten. \* Haupteffekt des Alterns, # Haupteffekt der LPS-Behandlung / Vergleich LPS mit korrespondierender PBS-Kontrollgruppe (*post-hoc*). ##, \*\*  $P < 0.01$ ; ###, \*\*\*  $P < 0.001$ . Zahlen über den Säulen geben bei Abweichungen die Anzahl amplifizierter Proben innerhalb

der Gesamtprobenzahl an. mPGES, mikrosomale Prostaglandin E Synthase; COX, Zyklooxygenase; mir, microRNA.

### Marker für oxidativen Stress

In früheren Studien konnte ein Zusammenhang zwischen erhöhtem oxidativen Stress und einer gesteigerten Entzündung im Altern festgestellt werden (Jenny 2012; Salminen et al. 2012). Deswegen wurden in der vorliegenden Studie ebenfalls verschiedene Marker für oxidativen Stress in dieser Fragestellung näher analysiert. Als wichtige Regulatoren der mitochondrialen Biogenese wurden „peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  coactivator“ 1  $\alpha$  (PGC-1 $\alpha$ ) und die nachgeschalteten Zielgene „nuclear respiratory factor“ 1 (NRF1) und „mitochondrial transcription factor“ A (TFAM) auf LPS-induzierte und altersbedingte Veränderungen untersucht (Abbildung 29).

Bei den untersuchten Geweben zeigte sich ein altersbedingter Anstieg der hypothalamischen mRNA-Expression von NRF1 und TFAM, während in der Leber das Altern zu einer Erniedrigung der NRF1 Expression führte. Ein Haupteffekt der LPS-Behandlung konnte lediglich für NRF1 im Hypothalamus nachgewiesen werden, wobei hier alle Gruppen unabhängig vom Alter eine Erniedrigung der NRF1 Expression durch LPS aufwiesen. In der Leber stellte sich in *post-hoc* Tests heraus, dass LPS-Stimulation nur bei den alten Ratten zu einer Erniedrigung der PGC-1 $\alpha$  Level führte.



**Abbildung 29: Altersbedingte Veränderung der Expression von oxidativen Stressmarkern in Hypothalamus und Leber**

Induktion der mRNA-Expression von oxidativen Stressmarkern im Hypothalamus (A-C) und in der Leber (D-F) 24 h nach Injektion mit LPS (100  $\mu$ g/kg) oder PBS von alten und jungen

Ratten. \* Haupteffekt des Alterns, # Haupteffekt der LPS-Behandlung / Vergleich LPS mit korrespondierender PBS-Kontrollgruppen (*post-hoc*). #,\*  $P < 0.05$ ; ##  $P < 0.01$ ; \*\*\*  $P < 0.001$ . PGC-1 $\alpha$ , „peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  coactivator 1  $\alpha$ “; NRF1, „nuclear respiratory factor 1“; TFAM, „mitochondrial transcription factor A“.

#### 1.4 Altersbedingte Veränderungen der Immunreaktivität inflammatorischer Transkriptionsfaktoren

Die Analyse der physiologischen Parameter offenbarte eine altersbedingte Verstärkung des „sickness behaviours“ mit einem noch anhaltenden Fieber der alten Ratten 24 h nach LPS-Injektion. Mittels indirekter Immunfluoreszenz wurde untersucht, ob sich diese altersassoziierte Verstärkung der Entzündungsreaktion in einer gesteigerten Aktivierung inflammatorischer Transkriptionsfaktoren im Hypothalamus widerspiegelt. Bei jungen Ratten haben bisherige Studien gezeigt, dass die hier angewendete LPS-Dosis zu einem Aktivierungsmaximum von NF-IL6 bei 8 Stunden (Damm et al. 2011), STAT3 bei 2 – 4 Stunden (Harré et al. 2002) und NF $\kappa$ B bei 1 – 3 Stunden (Nadjar et al. 2003) führt. Aufgrund dieser Vorarbeiten wurde sich in dieser Studie zur Untersuchung von Gehirnen 24 h nach Stimulation vor allem auf den zu einem späteren Zeitpunkt noch aktivierten Transkriptionsfaktor NF-IL6 konzentriert.

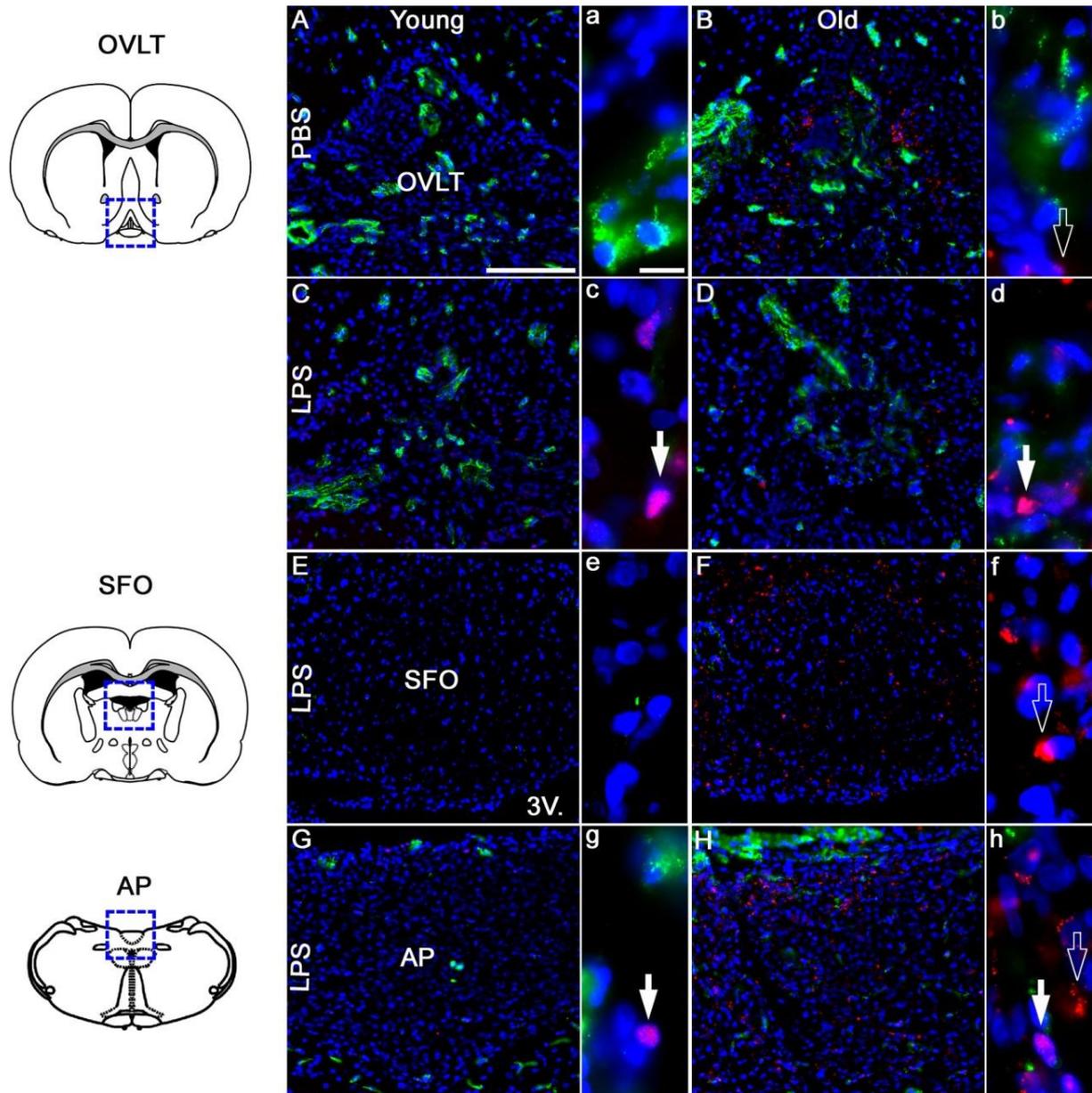
##### NF-IL6

Die Aktivierung von NF-IL6 wurde in Kombination mit einer Endothelzellenfärbung (von Willebrand Faktor) in verschiedenen circumventrikulären Organen des Hypothalamus (OVL, SFO, PVN, ME) und des Kleinhirns (AP) immunhistochemisch untersucht und durch semiquantitative Beurteilung der Signaldichte (- bis +++) zusätzlich analysiert (Tabelle 16). Zu dem 24 h Zeitpunkt konnten im OVL, PVN, SFO und der AP keine oder nur noch vereinzelte nukleäre NF-IL6 Signale in den LPS-stimulierten Tieren festgestellt werden, wobei kein Unterschied zwischen den beiden Altersgruppen festzustellen war (Abbildung 30; Abbildung 31, C-D). Bei der Analyse der *Median eminence* (ME) konnte jedoch eine gesteigerte NF-IL6-Aktivierung bei den alten Ratten (++) im Vergleich zu den jungen Tieren (+) nach LPS-Stimulus aufgezeigt werden (Abbildung 31, G-H). Die PBS-injizierten Kontrollen beider Altersgruppen wiesen kaum NF-IL6-Signale auf.

	nuclear NF-IL6 immunoreactivity			
	PBS young	LPS young	PBS old	LPS old
<b>OVL</b>	- (1,4)	± (1,8)	- (1)	± (1,67)
<b>SFO</b>	- (1)	- (1)	- (1)	- (1)
<b>PVN</b>	- (1,25)	± (2,4)	- (1,17)	± (2,2)
<b>ME</b>	- (1,4)	+ (2,8)	- (1,4)	++ (4)
<b>AP</b>	- (1)	± (2)	- (1)	± (1,67)

**Tabelle 16: Semiquantitative Analyse der nukleären NF-IL6 I.R. in verschiedenen Hirnarealen nach LPS/PBS Injektion junger und alter Ratten**

- (1) = keine Signale, ± (2) = vereinzelte Signale, + (3) = niedrige Dichte, ++ (4) = mittlere Dichte, +++ (5) = hohe Dichte. Auswertung 3-6 Tiere pro Gruppe, 2 Schnitte pro Tier

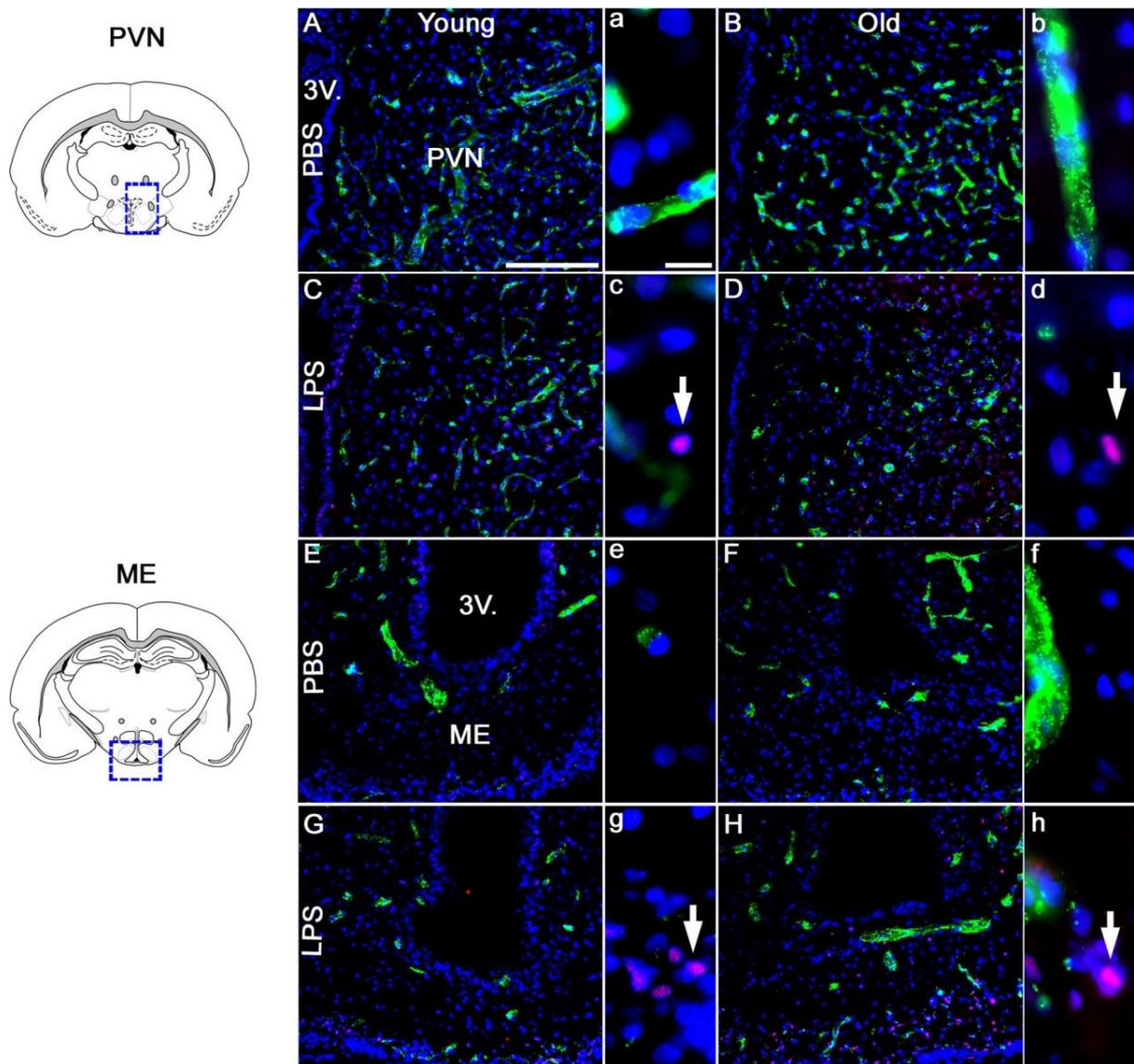


**Abbildung 30: NF-IL6 Immunreaktivität in den circumventrikulären Organen 24 h nach i.p. Injektion von LPS (100 µg/kg) oder PBS von jungen und alten Ratten.**

Die schematischen Darstellungen am linken Seitenrand dienen der Verdeutlichung der anatomischen Lage der jeweiligen Strukturen, blaue Kästchen weisen auf den in Übersichtsaufnahmen gezeigten Abschnitt hin. Großbuchstaben markieren Übersichtsaufnahmen, Kleinbuchstaben markieren Detailaufnahmen.

NF-IL6 Signale sind durch Überlagerung mit dem Zellkernsignal (DAPI, blau) pink dargestellt. Der Zellmarker für Endothelzellen (von Willebrand Faktor) ist grün dargestellt. Altersbedingte Lipofuszin-Ansammlungen sind als rote, nicht nukleäre Artefakte zu erkennen (hier nicht mit Autofluorescence Eliminator Reagent® behandelt). Gefüllte Pfeile verweisen auf nukleäre NF-IL6 Signale, offene Pfeile auf Lipofuszin-Artefakte.

Größenmarker in A entspricht 100 µm und gilt in allen Übersichtsaufnahmen, Größenmarker in a entspricht 10 µm und gilt in allen Detailaufnahmen. OVLT: *Organum vasculosum laminae terminalis*, SFO: *Organum subfornicale*, AP: *Area postrema*.



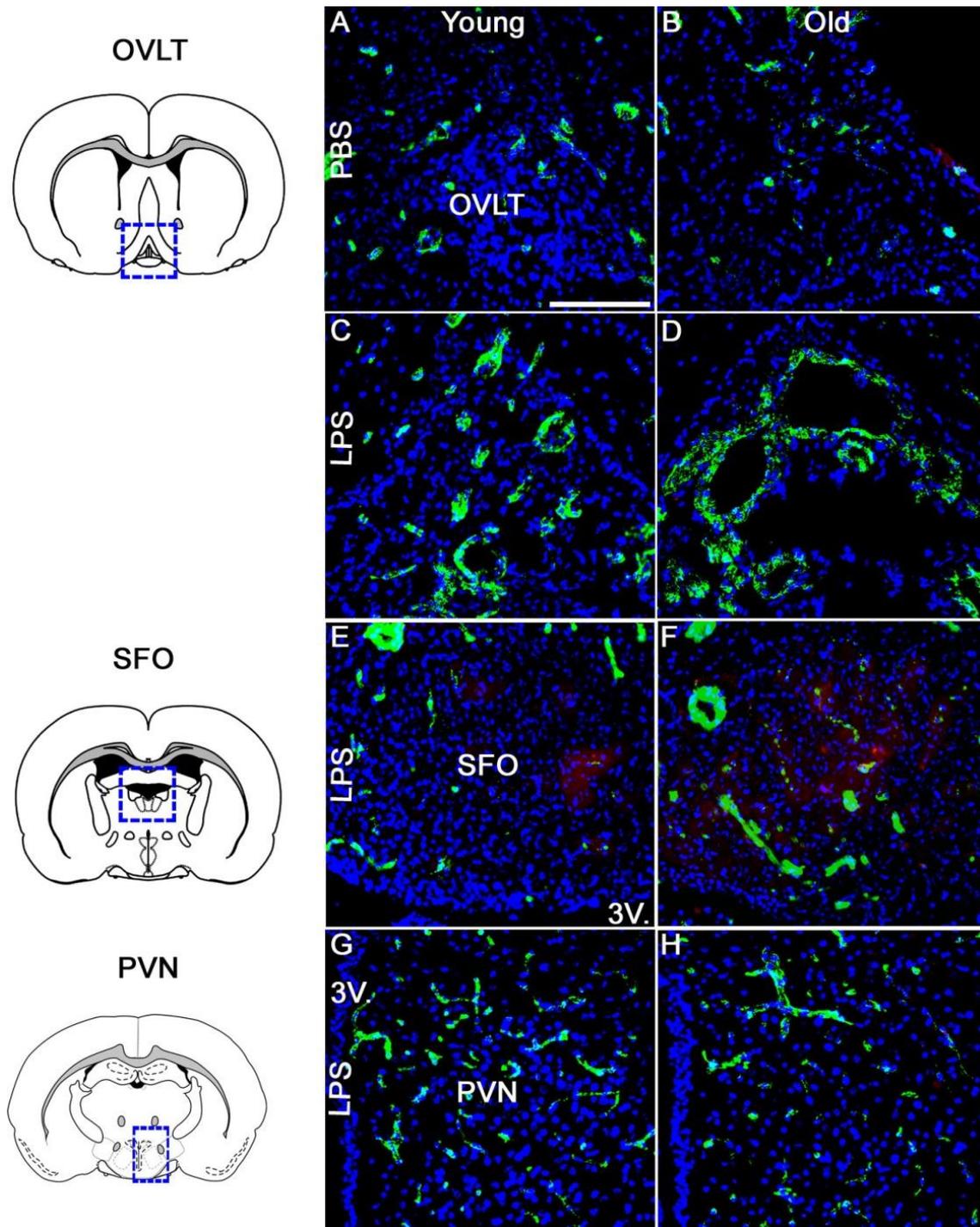
**Abbildung 31: : NF-IL6 Immunreaktivität in den circumventrikulären Organen 24 h nach i.p. Injektion von LPS (100 µg/kg) oder PBS von jungen und alten Ratten.**

Die schematischen Darstellungen am linken Seitenrand dienen der Verdeutlichung der anatomischen Lage der jeweiligen Strukturen, blaue Kästchen weisen auf den in Übersichtsaufnahmen gezeigten Abschnitt hin. Großbuchstaben markieren Übersichtsaufnahmen, Kleinbuchstaben markieren Detailaufnahmen.

NF-IL6 Signale sind durch Überlagerung mit dem Zellkernsignal (DAPI, blau) pink dargestellt. Der Zellmarker für Endothelzellen (von Willebrand Faktor) ist grün dargestellt. Gefüllte Pfeile verweisen auf nukleäre NF-IL6 Signale. Größenmarker in A entspricht 100 µm und gilt in allen Übersichtsaufnahmen, Größenmarker in a entspricht 10 µm und gilt in allen Detailaufnahmen. PVN: *Nucleus paraventricularis*, ME: *Median eminence*.

### Phospho-STAT3

Eine Aktivierung der phosphorylierten Form des Transkriptionsfaktors STAT3 (pSTAT3) wurde exemplarisch in wenigen Tieren aus jeder Gruppe immunhistochemisch für die Gebiete OVLT, SFO und PVN analysiert, da auf Grund des späten Perfusionszeitpunktes eine hohe Signaldichte unwahrscheinlich erschien. In keiner der Behandlungsgruppen wurden pSTAT3-Signale gefunden, weswegen auf eine weitere immunhistochemische Aufarbeitung und semiquantitative Analyse dieses Transkriptionsfaktors verzichtet werden konnte (Abbildung 32).



**Abbildung 32: phospho-STAT3 Immunreaktivität in den circumventrikulären Organen 24 h nach i.p. Injektion von LPS (100 µg/kg) oder PBS von jungen und alten Ratten.**

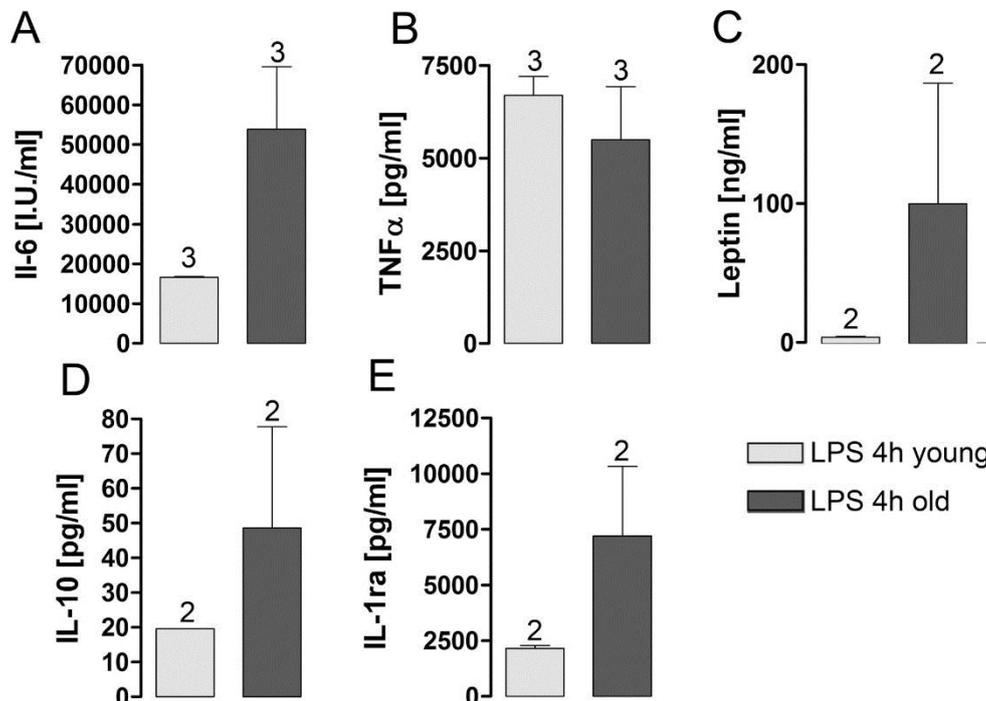
Die schematischen Darstellungen am linken Seitenrand dienen der Verdeutlichung der anatomischen Lage der jeweiligen Strukturen, blaue Kästchen weisen auf den in Übersichtsaufnahmen gezeigten Abschnitt hin. Großbuchstaben markieren Übersichtsaufnahmen. P-STAT3 Signale sind durch Überlagerung mit dem Zellkernsignal (DAPI, blau) pink dargestellt. Der Zellmarker für Endothelzellen (von Willebrand Faktor) ist grün dargestellt. Altersbedingte Lipofuszin-Ansammlungen sind als rote, nicht nukleäre Artefakte zu erkennen (hier nicht mit Autofluorescence Eliminator Reagent® behandelt). Größenmarker in A entspricht 100 µm und gilt in allen Übersichtsaufnahmen. OVLT: *Organum vasculosum laminae terminalis*, SFO: *Organum subfornicale*, PVN: *Nucleus paraventricularis*.

## 1.5 Altersabhängige Unterschiede von zirkulierenden Zytokinen und inflammatorischen Markern zum Zeitpunkt 4 h nach LPS-Injektion

Während sich der Zeitpunkt 24 h nach LPS-Stimulation für die Untersuchung der physiologischen Veränderungen, um die gesamten Auswirkungen der Fieberantwort zu verfolgen, gut eignete, erwies er sich für verschiedene molekularbiologische Untersuchungen sowie für die Analyse der Plasmazytokine als weniger günstig, da verschiedene inflammatorische Marker zu einem früheren Zeitpunkt induziert werden und eine Aktivierung bzw. Konzentrationserhöhung nach 24 h teilweise nicht mehr nachzuvollziehen ist. Aus diesem Grund wurde eine kleine Gruppe junger und alter Ratten ( $n = 3$ ) zu einem früheren Zeitpunkt von 4 h nach LPS-Injektion perfundiert. Die Ergebnisse wurden mittels parametrischen T-Tests analysiert.

### 1.5.1 Konzentration pro- und antiinflammatorischer Zytokine im Blutplasma

Es wurden die wichtigsten pro- (IL-6,  $\text{TNF}\alpha$ ) und antiinflammatorischen (IL-10, IL-1ra) Zytokine sowie zytokinähnlichen Hormone (Leptin) im Blutplasma junger und alter Ratten 4 h nach LPS-Stimulation ( $100 \mu\text{g}/\text{kg}$ ) untersucht. Sowohl für IL-6, Leptin, IL-10 und IL-1ra zeigte sich eine deutliche Tendenz, dass die alten Ratten eine erhöhte Konzentration dieser Zytokine aufweisen, welche jedoch aufgrund der kleinen Gruppengrößen nicht statistisch belegt werden konnte (Abbildung 33).



**Abbildung 33: Einfluss des Alters auf zirkulierende Zytokine 4h nach LPS-Stimulus**  
Konzentration von IL-6 (A),  $\text{TNF}\alpha$  (B), Leptin (C), IL-10 (D) und IL-1ra (E) im Blutplasma von alten und jungen Ratten 4 h nach Injektion von LPS ( $100 \mu\text{g}/\text{kg}$ ). Zahlen über den Balken geben die jeweilige Tierzahl an.

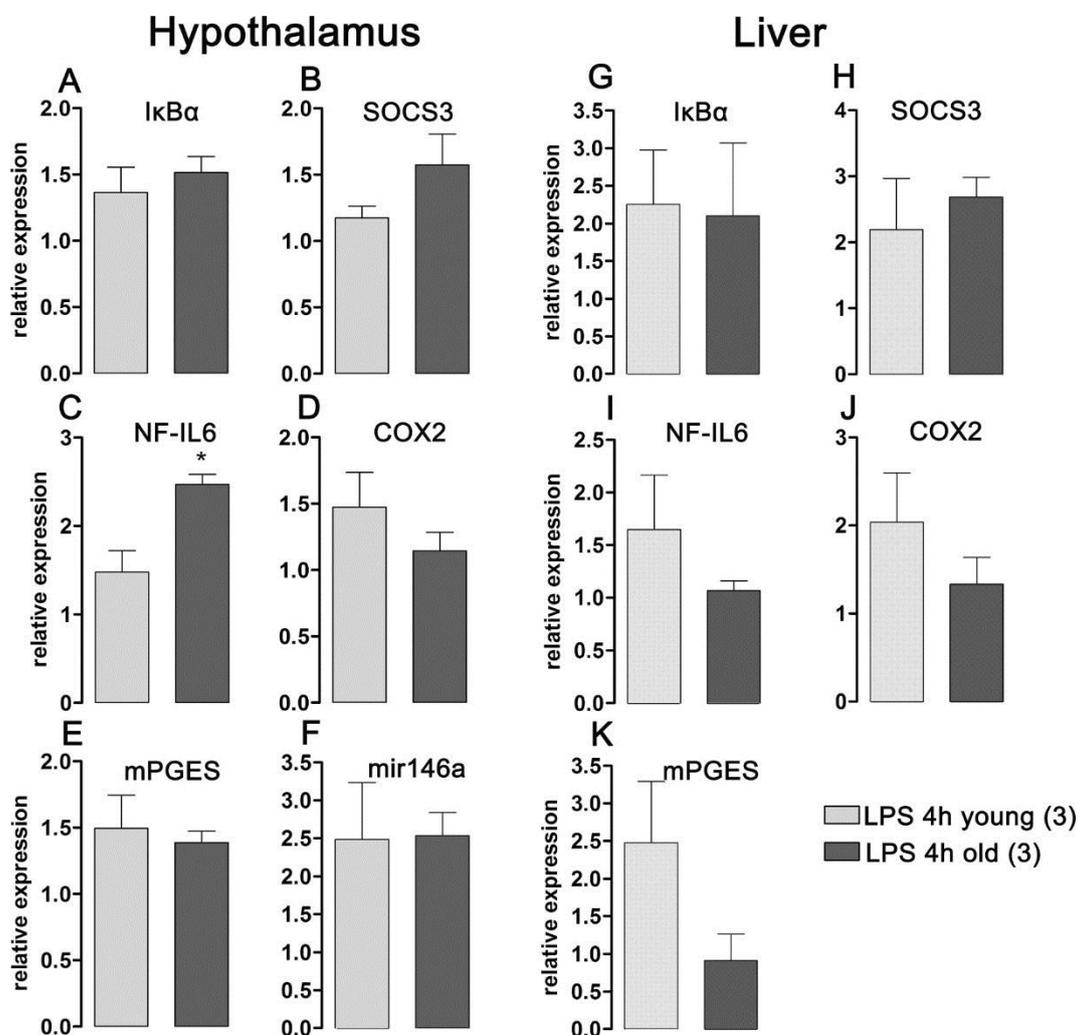
### 1.5.2 Expressionsmuster inflammatorischer Marker auf mRNA-Ebene

Auf mRNA-Ebene wurden die vorher beschriebenen Transkriptionsfaktoren sowie die Enzyme der Prostaglandinsynthese und mir146a in Hypothalamus und Leber 4 h nach LPS-Stimulation untersucht (Abbildung 34).

SOCS3 und NF-IL6 zeigten im Hypothalamus die Tendenz einer altersbedingten Erhöhung der Expression nach LPS-Stimulation, welche jedoch nur für NF-IL6 signifikant war. In der Leber wies SOCS3 eine Tendenz zur erhöhten mRNA-Induktion im Alter auf, während NF-IL6 eher leicht erniedrigt war.

Die COX2- und mPGES-Expression war bei den alten Ratten in der Leber tendenziell erniedrigt, während im Hypothalamus nur COX2 eine leichte Abnahme der Induktion im Alter aufwies. Statistisch ergaben sich hier jedoch keine signifikanten altersbedingten Veränderungen.

Mir146a wies 4h nach LPS-Gabe keine altersbedingten Veränderungen auf.



**Abbildung 34: Altersbedingte Veränderungen der mRNA-Expression inflammatorischer Marker 4 h nach LPS-Stimulus**

Induktion der Expression inflammatorischer Marker in Hypothalamus (A-E) und Leber (F-G) 4 h nach Stimulation mit LPS (100 µg/kg) von jungen und alten Ratten.

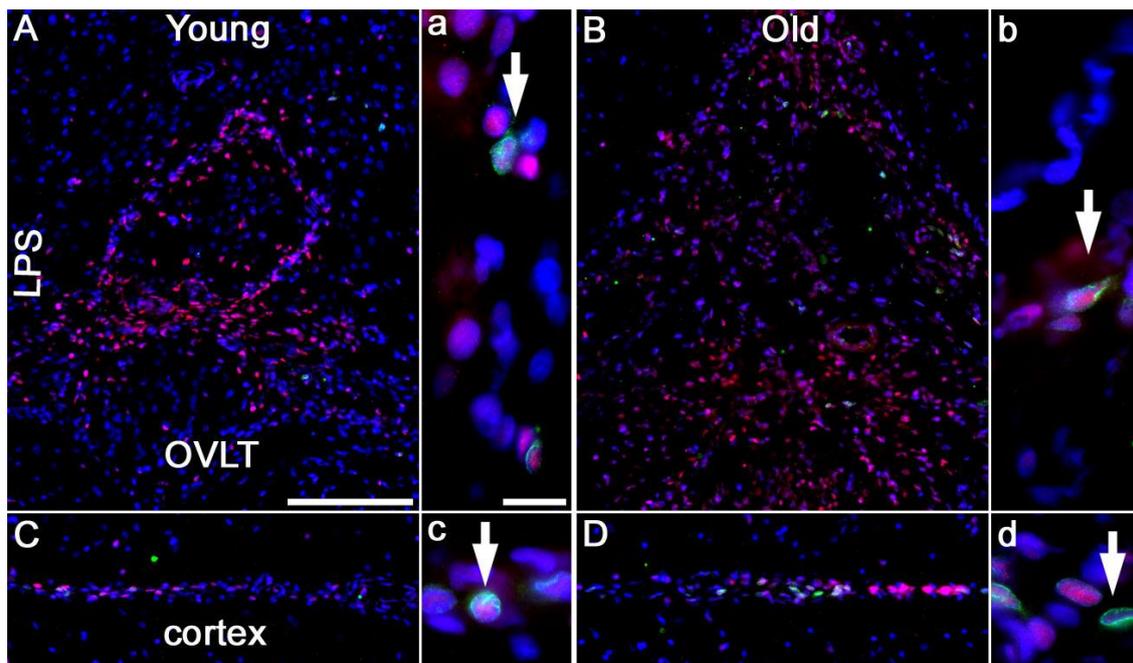
\* Vergleich alt mit jung. \*  $P < 0,05$ . I $\kappa$ B $\alpha$ , „inhibitor of kappa B  $\alpha$ “; SOCS3, „suppressor of cytokine signaling 3“; NF-IL6, „nuclear factor interleukin 6“; mPGES, mikrosomale Prostaglandin E Synthase; COX2, Zyklooxygenase 2; mir146a, microRNA 146a.

### 1.5.3 Expressionsmuster inflammatorischer Marker auf Proteinebene mittels Immunhistochemie

#### NF-IL6 und COX2

Die Aktivierung von NF-IL6 wurde in Kombination mit einer COX2-Färbung im OVLT immunhistochemisch untersucht und semiquantitativ ausgewertet (Abbildung 35).

Sowohl die jungen als auch die alten Ratten zeigten 4 h nach LPS-Stimulation eine hohe Dichte an NF-IL6 Signalen und eine moderate Dichte an COX2-markierten Zellen im OVLT und in gefäßartigen Strukturen im cerebralen Cortex. Die perinukleären COX2-Signale waren in den meisten Fällen mit nukleären NF-IL6 Signalen kolokalisiert. Ein deutlicher Unterschied zwischen alten und jungen Ratten in der NF-IL6 oder COX2 Immunreaktivität konnte nicht festgestellt werden (Tabelle 17).



**Abbildung 35: NF-IL6 und COX2 Immunreaktivität im OVLT und Cortex 4 h nach i.p. Injektion von LPS (100  $\mu$ g/kg) von jungen und alten Ratten.**

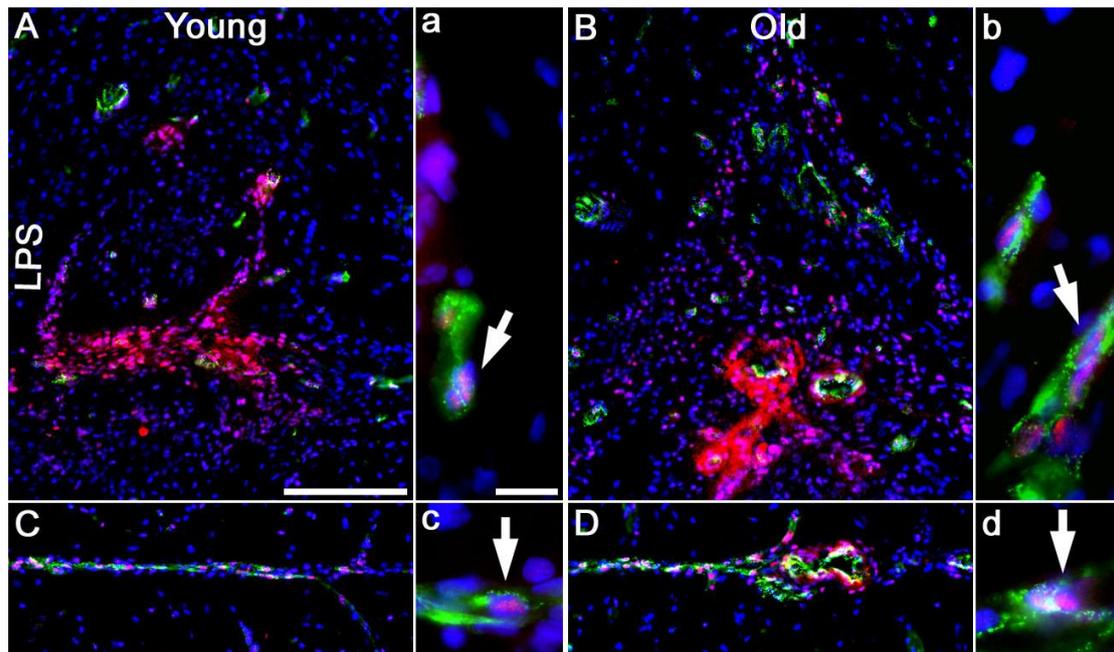
Großbuchstaben markieren Übersichtsaufnahmen, Kleinbuchstaben markieren Detailaufnahmen. NF-IL6 Signale sind durch Überlagerung mit dem Zellkernmarker (DAPI, blau) pink dargestellt, perinukleäre COX2 Signale sind grün markiert. Gefüllte Pfeile verweisen auf nukleäre NF-IL6 Signale in mit COX2 markierten Zellen.

Größenmarker in A entspricht 100  $\mu$ m und gilt in allen Übersichtsaufnahmen, Größenmarker in a entspricht 10  $\mu$ m und gilt in allen Detailaufnahmen. OVLT: *Organum vasculosum laminae terminalis*.

### Phospho-STAT3

Die Aktivität der phosphorylierten Form des STAT3-Transkriptionsfaktors wurde in Kombination mit einer Endothelzellenfärbung (von Willebrand Faktor) ebenfalls im OVLT der jungen und alten LPS-injizierten Ratten beurteilt (Abbildung 36).

Beide Altersgruppen wiesen eine moderate bis hohe Dichte an nukleären STAT3-Signalen im OVLT und in gefäßartigen Strukturen im cerebralen Cortex auf, welche zum Teil mit Endothelzellen kolokalisiert waren. Ein deutlicher Unterschied in der pSTAT3-Immunreaktivität zwischen jungen und alten Ratten wurde nicht verzeichnet (Tabelle 17).



**Abbildung 36: Phospho-STAT3 Immunreaktivität im OVLT und Cortex 4 h nach i.p. Injektion von LPS (100 µg/kg) von jungen und alten Ratten.**

Großbuchstaben markieren Übersichtsaufnahmen, Kleinbuchstaben markieren Detailaufnahmen. pSTAT3 Signale sind durch Überlagerung mit dem Zellkernmarker (DAPI, blau) pink dargestellt, der Zellmarker für Endothelzellen (von Willebrand Faktor) ist grün dargestellt. Gefüllte Pfeile verweisen auf nukleäre pSTAT3 Signale in Endothelzellen hin.

Größenmarker in A entspricht 100 µm und gilt in allen Übersichtsaufnahmen, Größenmarker in a entspricht 10 µm und gilt in allen Detailaufnahmen. OVLT: *Organum vasculosum laminae terminalis*.

	<b>LPS 4 h young</b>	<b>LPS 4 h old</b>
<b>nuclear NF-IL6 immunoreactivity</b>		
<b>OVLT</b>	+++ (5)	+++ (4,5)
<b>COX2 immunoreactivity</b>		
<b>OVLT</b>	++ (4)	++ (4)
<b>nuclear phospho-STAT3 immunoreactivity</b>		
<b>OVLT</b>	++ (4,33)	++ (4)

**Tabelle 17: Semiquantitative Analyse der nukleären NF-IL6 I.R., COX2 I.R. und nukleären phospho-STAT3 I.R. im OVLT nach i.p. Injektion junger und alter Ratten**  
 - (1) = keine Signale, ± (2) = vereinzelte Signale, + (3) = niedrige Dichte, ++ (4) = mittlere Dichte, +++ (5) = hohe Dichte. Auswertung 2-3 Tiere pro Gruppe, 2 Schnitte pro Tier

## 2. Der Einfluss erhöhter Leptin-Werte und altersassoziierter Adipositas auf die LPS-bedingte Entzündungsreaktion

In der vorhergehenden Studie konnte zum ersten Mal nachgewiesen werden, dass LPS-Stimulation bei alten Ratten zur Freisetzung erhöhter Leptin-Konzentrationen im Blutplasma im Vergleich zu jungen Ratten führt. Aufbauend auf diesen Erkenntnissen war das Ziel der anschließenden Studie, den Einfluss dieser erhöhten Leptin-Gehalte nach LPS-Injektion im Hinblick auf die altersbedingten Veränderungen der Fieberantwort, insbesondere das verstärkte „sickness behaviour“, näher zu untersuchen. Um die Auswirkung von Leptin genauer zu charakterisieren, wurden alte und junge Ratten mit Leptin Antiserum (LAS, 1 ml/kg) oder, als Kontrolle, mit „Normal Sheep Serum“ (NSS, gleiches Volumen) injiziert und gleichzeitig mit LPS (100 µg/kg) stimuliert. Um Kontrollwerte für die physiologischen Parameter zu erhalten, wurden die gleichen Tiere am Tag vorher mit LAS/NSS und PBS behandelt (Tabelle 18).

Die erhobenen Vitalparameter wurden für jede Altersgruppe separat mittels two-way ANOVA auf die Haupteffekte „LAS-Vorbehandlung“ (LAS vs NSS) und „LPS-Behandlung“ (LPS vs PBS) analysiert. Bei signifikanter Interaktion zwischen den beiden Parametern wurde zusätzlich ein Bonferroni *post-hoc* Test (innerhalb der jeweiligen Altersgruppe) durchgeführt. Die Zytokinplasmawerte und PCR-Untersuchungen wurden auf Grund der fehlenden PBS-Gruppen mittels two-way ANOVA auf die Haupteffekte „Alter“ (jung vs alt) und „LAS-Behandlung“ (LAS vs NSS) untersucht. Bei signifikanter Interaktion zwischen den beiden Parametern wurde zusätzlich ein Bonferroni *post-hoc* Test durchgeführt.

	Alter	applizierte Substanzen	Zeitpunkt Perfusion	Tierzahl
<b>Inflammation Lösungsmittel</b>	2 Monate	NSS (1 ml/kg)	+ 24h	5
	24 Monate	LPS (100 µg/kg)		5
<b>Inflammation Antiserum</b>	2 Monate	LAS (1 ml/kg)	+ 24h	5
	24 Monate	LPS (100 µg/kg)		6

**Tabelle 18: Versuchsgruppen Studie „Leptin Antiserum“**

Übersicht über die für die Studie „Leptin Antiserum“ gebildeten Versuchsgruppen, die applizierten Substanzen, den Perfusionszeitpunkt und die jeweils verwendete Anzahl an Tieren.

## 2.1 Die Auswirkung von Leptin Antiserum auf physiologische Parameter des „sickness behaviours“

Die Ratten wurden an Zeitpunkt  $t = 0$  mit LAS oder NSS und gleichzeitig mit LPS oder PBS (Vortag) intraperitoneal injiziert und die Temperaturdaten über 24 h aufgezeichnet.

Die jungen mit NSS behandelten Ratten zeigten nach LPS-Injektion eine deutliche Fieberentwicklung von Zeitpunkt 2,5 h bis 9 h mit einem Maximum von 1,81 °C bei 6,5 h, sowie eine leichte Temperaturerhöhung von 20,5 h bis 22,5 h (Abbildung 39). Bei den mit LAS behandelten jungen Ratten führte die LPS-Stimulation zu einem Fieberanstieg zwischen Zeitpunkt 2,5 h und 7,25 h mit einem Maximum von 1,36 °C bei 5,25 h und einer ebenfalls leichten Temperaturerhöhung nach der Nachtphase zwischen 20,25 h und 23 h.

Im direkten Vergleich der beiden LPS-Kurven (NSS-LPS vs LAS-LPS) der jungen Ratten konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden, obwohl die NSS-LPS behandelten Ratten einen höheren Temperaturanstieg aufwiesen, vor allem zwischen Zeitpunkt 4 h und 8 h nach Injektion (Abbildung 38, A).

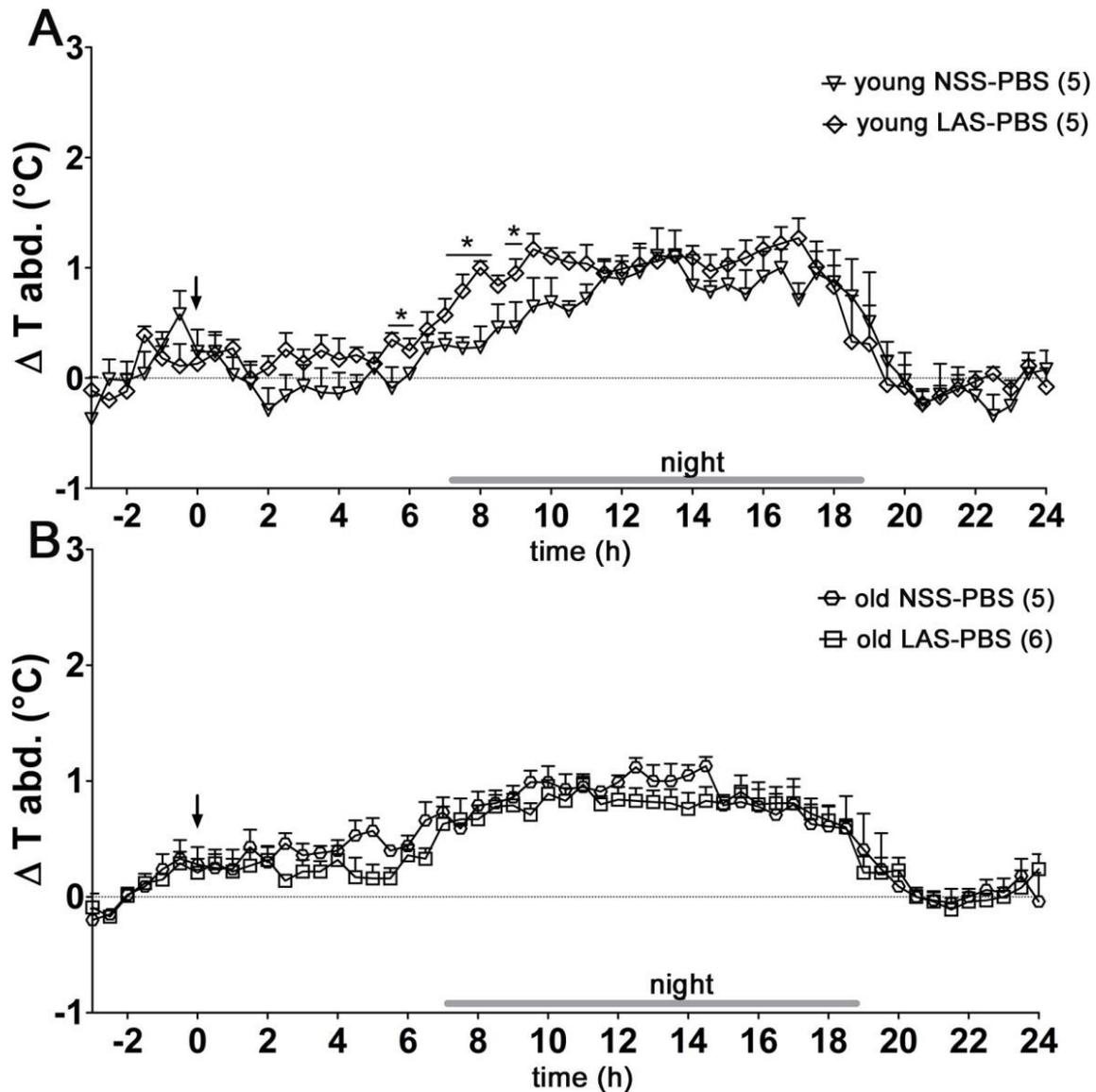
Dieser Unterschied konnte durch die Berechnung des Fieberindex (Fläche unterhalb der Temperaturkurve) für den Zeitraum des Vorhandenseins der Fieberreaktion (0 – 8 h) noch deutlicher gezeigt werden (Abbildung 41, A). Es wurde ein Haupteffekt der LPS-Behandlung, jedoch nicht der LAS-Behandlung für diesen Zeitraum statistisch nachgewiesen. Die Durchführung zusätzlicher *post-hoc* Tests nach positiver Interaktion konnte jedoch belegen, dass LPS bei den NSS-vorbehandelten Ratten zu einem signifikant deutlicheren Anstieg des Fieberindex führt als bei den mit LAS-vorbehandelten Ratten.

Bei den alten mit NSS behandelten Ratten führte die LPS-Injektion zu einer Fieberreaktion zwischen 5 h und 11 h und nach Ende der Nachtphase von 20 h bis zum Ende der Aufzeichnungen (Abbildung 40). Das Temperaturmaximum lag bei 1,62 °C bei 8,5 h. Eine Behandlung mit LAS und LPS vermittelte einen Anstieg der Körperkerntemperatur zwischen 4,5 h und 10 h nach Injektion (Temperaturmaximum 1,59 °C bei 8 h) und von Zeitpunkt 21,75 h bis zum Ende des Experimentes.

Beim direkten Vergleich der beiden LPS-Temperaturverläufe wurde ein hemmender Effekt des Antiserums in der späten Fieberphase festgestellt (Zeitpunkt 13,75 h bis 18 h) (Abbildung 38, B).

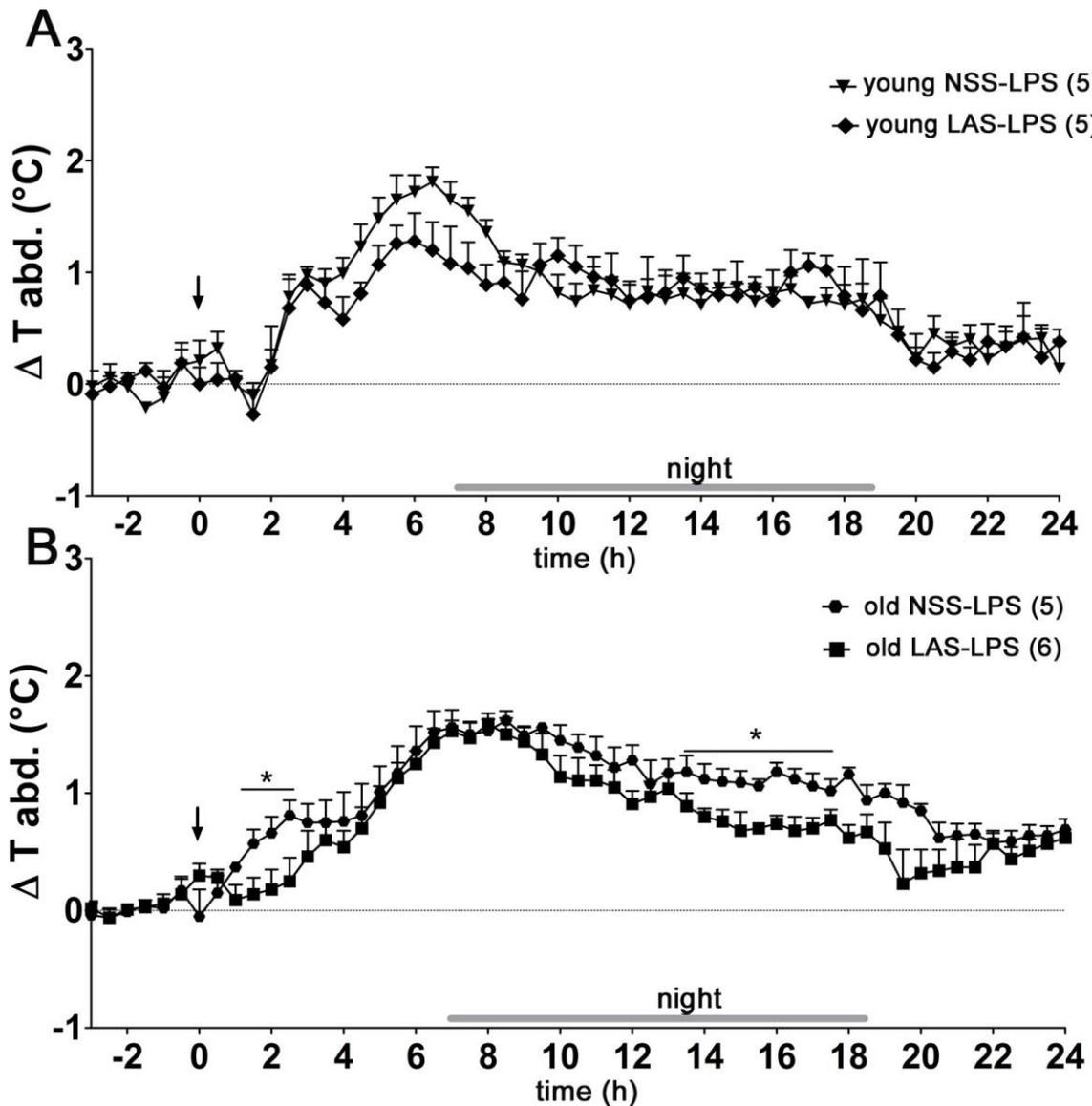
Die Berechnung des Fieberindex über den Gesamtzeitraum der Fieberreaktion (0 - 24 h) bestätigte diese Beobachtung (Abbildung 41, B). Hier zeigte sich ein signifikanter Haupteffekt der LAS-Behandlung, welcher zu einer Erniedrigung des Fieberindex über 24 h führte.

Die mit PBS behandelten Kontrollgruppen zeigten im Anschluss an die Injektionen keine relevanten Abweichungen vom normalen circadianen Temperaturverlauf (Abbildung 37).



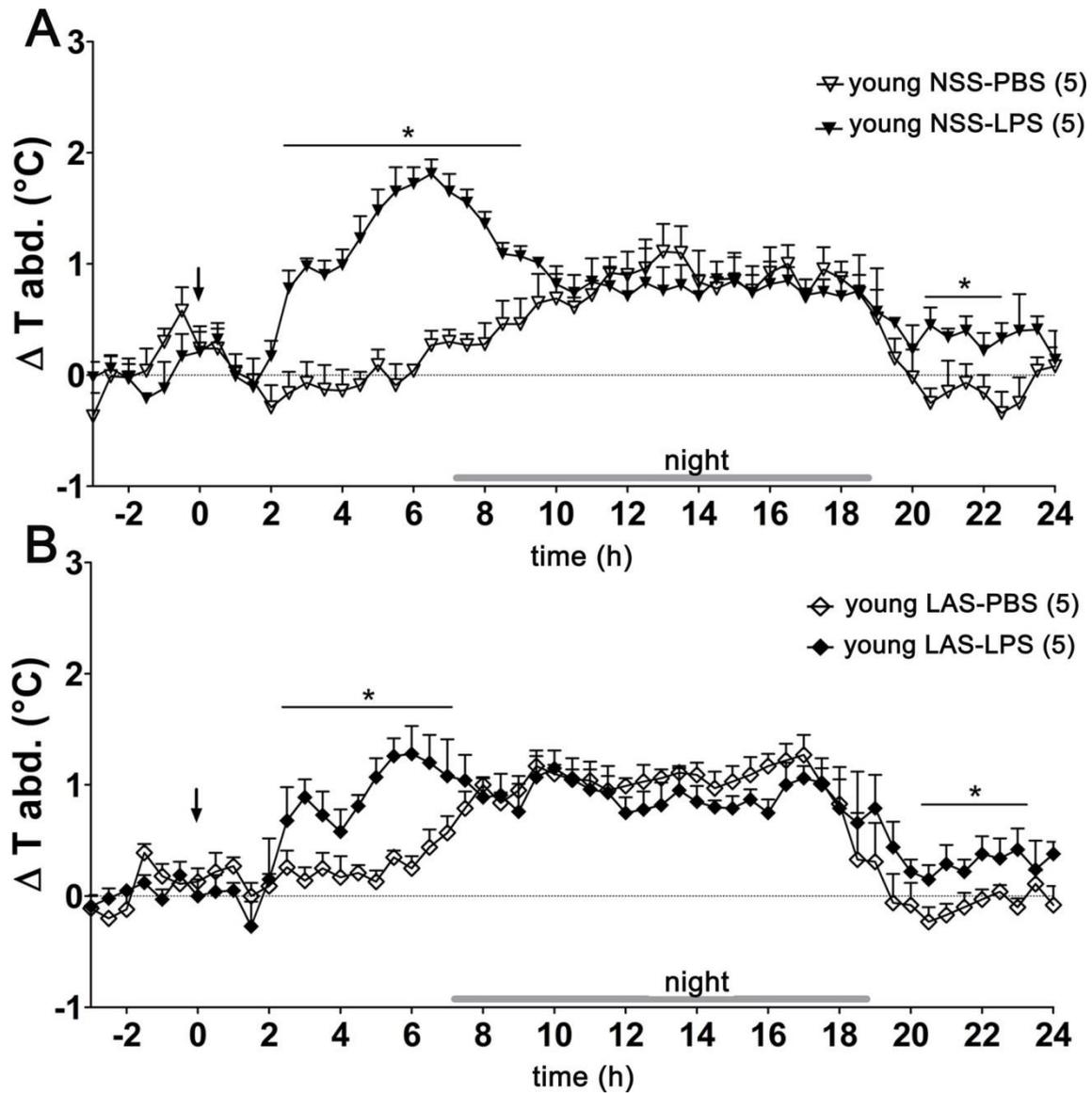
**Abbildung 37: Einfluss von Leptin Antiserum auf die Körperkerntemperatur nach PBS-Injektion**

Verlauf der intraabdominal gemessenen Körpertemperatur nach Injektion mit PBS gleichzeitig mit LAS (1 ml/kg) oder NSS über 24 h bei jungen (A) oder alten (B) Ratten im Vergleich. Der Zeitpunkt der i.p. Injektion wurde mit einem Pfeil markiert, die Nachtphase wurde mit einem grauen Balken gekennzeichnet. \*  $P < 0.05$ .



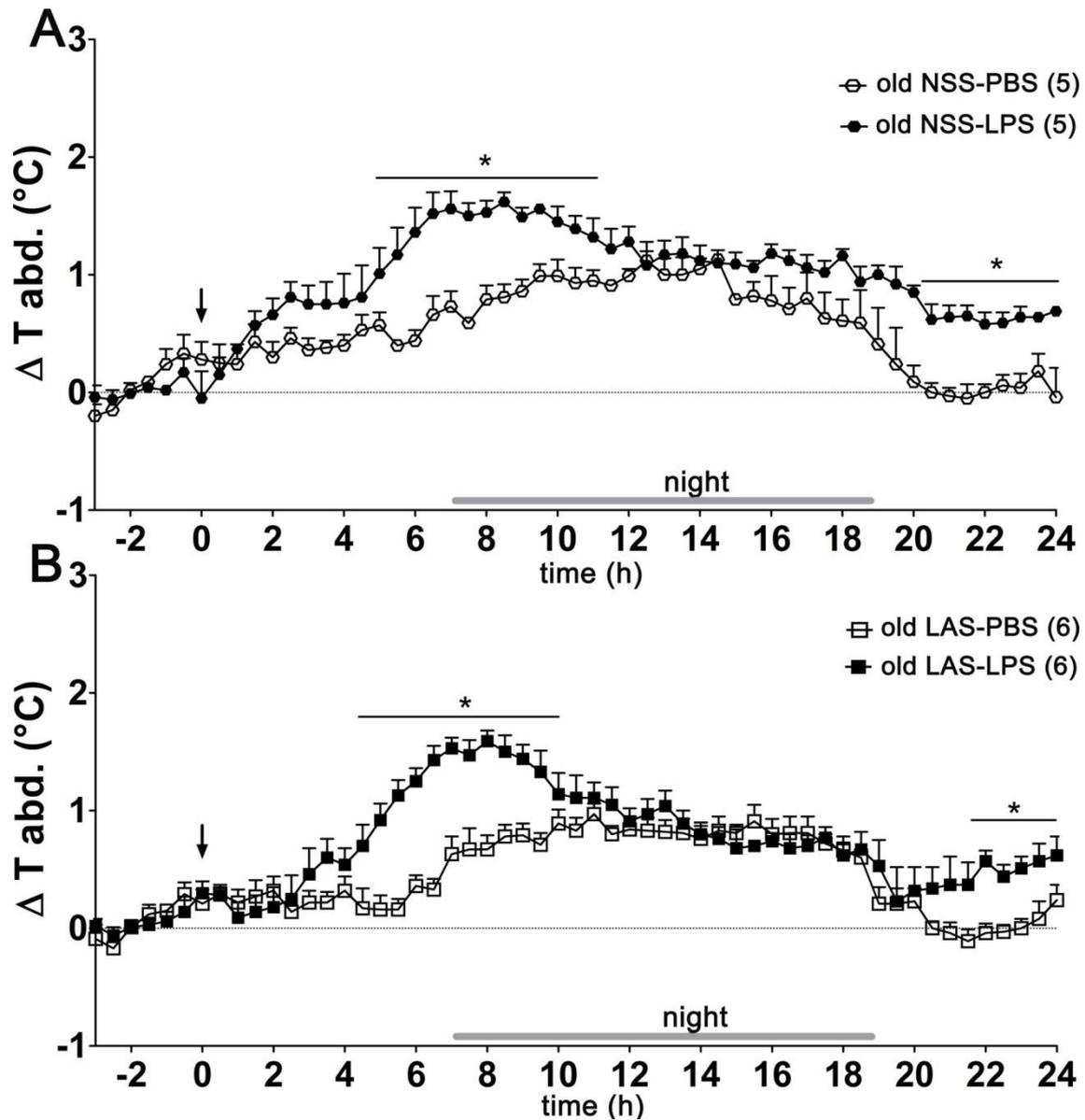
**Abbildung 38 : Einfluss von Leptin Antiserum auf die Körperkerntemperatur nach LPS-Injektion**

Verlauf der intraabdominal gemessenen Körpertemperatur nach Injektion mit LPS (100  $\mu\text{g/kg}$ ) gleichzeitig mit LAS (1 ml/kg) oder NSS über 24 h bei jungen (A) oder alten (B) Ratten im Vergleich. Der Zeitpunkt der i.p. Injektion wurde mit einem Pfeil markiert, die Nachtphase wurde mit einem grauen Balken gekennzeichnet. \*  $P < 0.05$ .



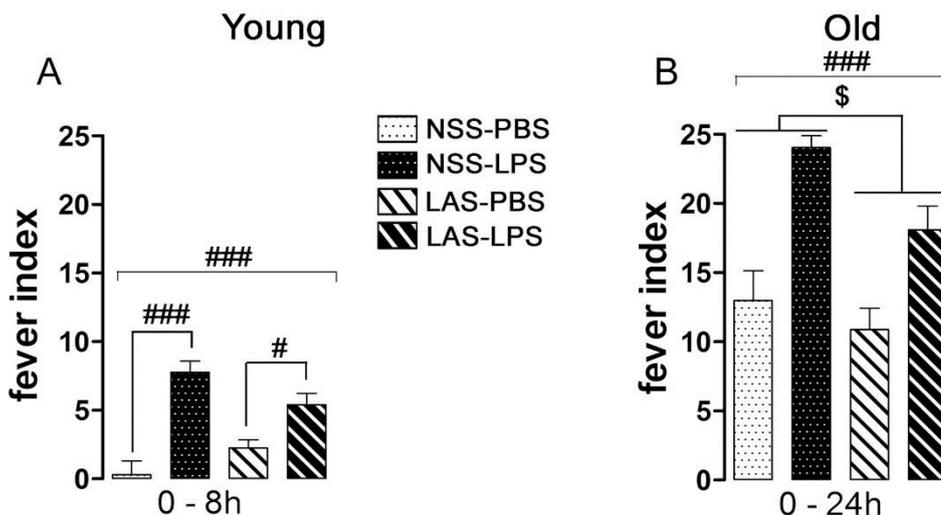
**Abbildung 39: Einfluss von Leptin Antiserum auf die Körperkerntemperatur bei jungen Ratten**

Verlauf der intraabdominal gemessenen Körpertemperatur nach Injektion mit LPS (100  $\mu\text{g/kg}$ ) oder PBS gleichzeitig mit LAS (1 ml/kg) (B) oder NSS (A) über 24 h bei jungen Ratten im Vergleich. Der Zeitpunkt der i.p. Injektion wurde mit einem Pfeil markiert, die Nachtphase wurde mit einem grauen Balken gekennzeichnet. \*  $P < 0.05$ .



**Abbildung 40: Einfluss von Leptin Antiserum auf die Körperkerntemperatur von alten Ratten**

Verlauf der intraabdominal gemessenen Körpertemperatur nach Injektion mit LPS (100  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) oder PBS gleichzeitig mit LAS (1 ml/kg) (B) oder NSS (A) über 24 h bei alten Ratten im Vergleich. Der Zeitpunkt der i.p. Injektion wurde mit einem Pfeil markiert, die Nachtphase wurde mit einem grauen Balken gekennzeichnet. \*  $P < 0.05$ .



**Abbildung 41: Fieberindex über den jeweiligen Fieberabschnitt bei jungen und alten Ratten**

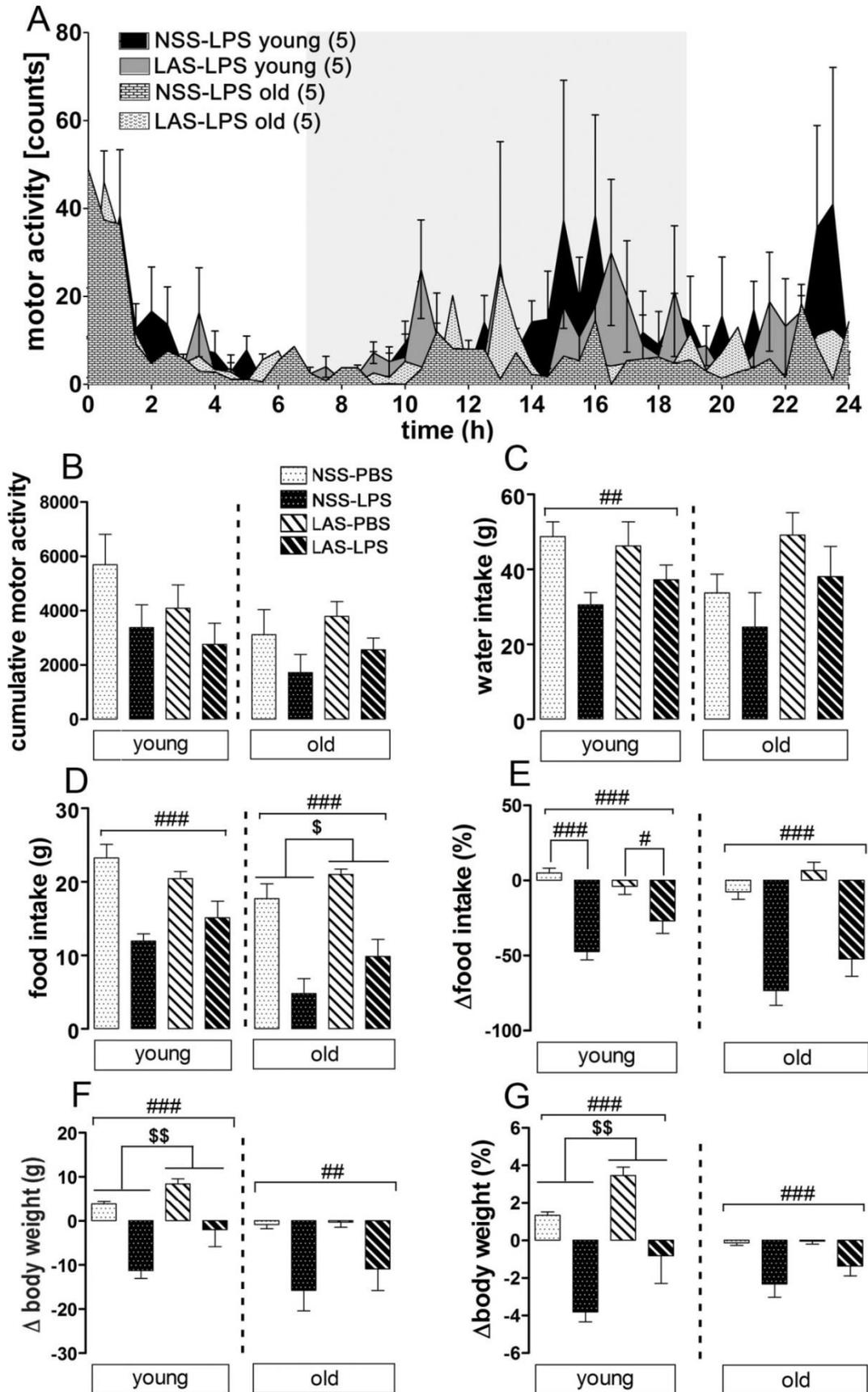
Fieberindex gemessen über den Zeitraum 0 – 8 h nach Injektion bei jungen Ratten und 0 – 24 h bei alten Ratten. \$ Haupteffekt der LAS-Behandlung; # Haupteffekt der LPS-Behandlung / Vergleich LPS mit korrespondierender PBS-Gruppe (*post-hoc*). #,\$  $P < 0.05$ ; ###  $P < 0.01$ .

Die motorische Aktivität wurde kumulativ für 24 h nach Injektion analysiert. Es konnte jedoch weder ein Effekt der LPS-Behandlung noch der LAS-Behandlung statistisch nachgewiesen werden (Abbildung 42, A-B).

Obwohl die LPS-induzierte Anorexie (Abbildung 42, D-E) der jungen Ratten nach LAS-Behandlung weniger ausgeprägt war (LAS-PBS vs. LAS-LPS:  $20,44 \pm 0,98$  g vs.  $15,10 \pm 2,25$  g) verglichen mit der NSS-LPS behandelten Gruppe (NSS-PBS vs. NSS-LPS:  $23,26 \pm 1,81$  g vs.  $11,94 \pm 0,96$  g), konnte statistisch ein signifikanter Effekt der LAS-Behandlung nur für die alten Ratten gezeigt werden (LAS-PBS vs. LAS-LPS:  $21,01 \pm 0,71$  g vs.  $9,86 \pm 2,28$  g and NSS-PBS vs. NSS-LPS:  $17,71 \pm 2,03$  g vs.  $4,81 \pm 2,01$  g). Durch Berechnung der prozentualen Futteraufnahmedifferenz im Vergleich zum Vortag konnte allerdings nach Durchführung von *post-hoc* Tests auf Grund einer signifikanten Interaktion gezeigt werden, dass die LAS-Vorbehandlung die LPS-induzierte Anorexie bei den jungen Ratten (Abnahme der Futteraufnahme um  $26,91 \pm 8,39$  %) gegenüber der NSS-vorbehandelten Kontrollgruppe abgeschwächt hatte, welche eine um  $47,27 \pm 5,53$  % reduzierte Futteraufnahme aufwiesen. Bei den alten Ratten erreichte die Abschwächung der Anorexie durch LAS (Rückgang der Futteraufnahme um  $52,16 \pm 11,67$  % in LAS-vorbehandelten alten Ratten vs  $73,26 \pm 9,97$  % in NSS-vorbehandelten Ratten) keine Signifikanz (Tabelle 19).

Wenngleich die LPS-Injektion in allen Gruppen zu einem Gewichtsverlust führte (Abbildung 42, F-G), wurde dieser in den jungen Ratten durch die LAS-Vorbehandlung signifikant abgemindert. So zeigten die jungen LAS-behandelten Ratten lediglich eine geringfügige Abnahme von  $-1,98 \pm 3,88$  g verglichen mit den NSS-behandelten Ratten ( $-11,26 \pm 1,76$  g). In den alten Ratten konnte kein statistisch signifikanter Effekt des Leptin Antiserums auf den LPS-bedingten Gewichtsverlust festgestellt werden (LAS-LPS vs NSS-LPS:  $-10,9 \pm 4,89$  g vs.  $-15,74 \pm 4,66$  g) (Tabelle 19).

Ein Einfluss des Leptin Antiserums auf die Wasseraufnahme wurde nicht festgestellt (Abbildung 42, C) (Tabelle 19).



**Abbildung 42: Einfluss von Leptin Antiserum auf Parameter des „sickness behaviours“**  
 Zeitlicher Verlauf der Aktivität (A), kumulative motorische Aktivität (B), Wasseraufnahme (C), Futtermittelaufnahme in Gramm (D) oder prozentuale Differenz der Futtermittelaufnahme zum Vortag (E), Gewichtsänderung in Gramm (F) bzw. Prozent (G) 24 h nach LPS- (100 µg/kg) oder PBS-Stimulation gleichzeitig mit LAS- (1 ml/kg) oder NSS-Injektion von jungen und alten Ratten. \$ Haupteffekt der LAS-Vorbehandlung; # Haupteffekt der LPS-Behandlung / Vergleich LPS mit korrespondierender PBS-Gruppe (*post-hoc*). #,\$  $P < 0.05$ ; ##,\$\$  $P < 0.01$ ; ###  $P < 0.001$ .

<b>Junge Ratten</b>				
	<b>NSS-PBS</b>	<b>NSS-LPS</b>	<b>LAS-PBS</b>	<b>LAS-LPS</b>
Motorische Aktivität („counts“)	5694 ± 1118	3374 ± 845,1	4088 ± 860,6	2764 ± 775,1
Wasseraufnahme (g)	48,8 ± 3,86	30,52 ± 3,32	46,28 ± 6,39	37,2 ± 3,95
Futtermittelaufnahme (g)	23,26 ± 1,81	11,94 ± 0,96	20,44 ± 0,98	15,1 ± 2,26
Futtermittelaufnahmedifferenz (%)	5,11 ± 3,14	-47,27 ± 5,53	-3,99 ± 5,31	-26,91 ± 8,39
Gewichtsänderung (g)	3,88 ± 0,56	-11,26 ± 1,76	8,58 ± 1,15	-1,98 ± 3,88
Gewichtsänderung (%)	1,34 ± 0,18	-3,8 ± 0,53	3,46 ± 0,45	-0,81 ± 1,47
<b>Alte Ratten</b>				
	<b>NSS-PBS</b>	<b>NSS-LPS</b>	<b>LAS-PBS</b>	<b>LAS-LPS</b>
Motorische Aktivität („counts“)	3115 ± 924,1	1721 ± 669,2	3791 ± 543,6	2564 ± 426,9
Wasseraufnahme (g)	33,74 ± 4,98	24,58 ± 9,2	49,13 ± 5,6	38,1 ± 8
Futtermittelaufnahme (g)	17,71 ± 2,03	4,81 ± 2,01	21,02 ± 0,71	9,86 ± 2,29
Futtermittelaufnahmedifferenz (%)	-7,59 ± 5,03	-73,26 ± 9,97	6,66 ± 5,48	-52,16 ± 11,67
Gewichtsänderung (g)	-0,8 ± 0,99	-15,74 ± 4,66	-0,28 ± 1,16	-10,9 ± 4,89
Gewichtsänderung (%)	-0,12 ± 0,14	-2,31 ± 0,72	-0,04 ± 0,15	-1,37 ± 0,52

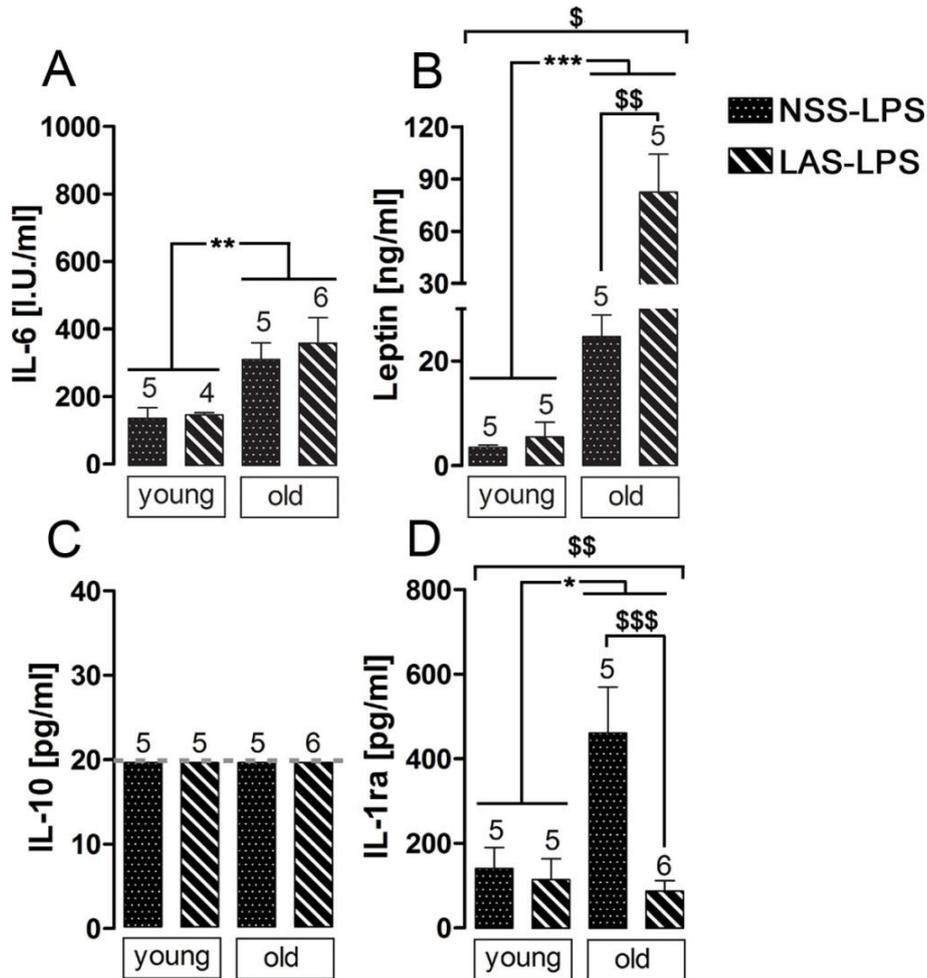
**Tabelle 19: Einfluss von Leptin Antiserum auf Parameter des „sickness behaviours“**

## 2.2 Einfluss von Leptin Antiserum auf zirkulierende Zytokine

Ausgehend von den telemetrisch gewonnenen physiologischen Daten sollte in dem nächsten Schritt untersucht werden, in welchem Ausmaß die Unterdrückung endogener Leptin-Level durch das Leptin Antiserum eine Auswirkung auf zirkulierende Entzündungsmediatoren hatte. Hierzu wurden pro- (IL-6, TNF $\alpha$ ) und antiinflammatorische (IL-10, IL-1ra) Zytokine und zytokin-ähnliche Hormone (Leptin) im Blutplasma gemessen (Abbildung 43) (Tabelle 20).

Behandlung mit Leptin Antiserum beeinflusste die Plasmakonzentrationen von Leptin und IL-1ra, hatte jedoch keinen Effekt auf die Level von IL-6 und IL-10. Eine signifikante Interaktion der zu untersuchenden Haupteffekte Altern und LAS-Behandlung für Leptin und IL-1ra demonstrierte in nachfolgenden *post-hoc* Tests, dass die Wirkung des Leptin Antiserums auf die Zytokinwerte der alten Ratten beschränkt war. LAS-Behandlung führte bei den alten Tieren zu einer Erhöhung der Leptinkonzentrationen im Plasma, während die altersassoziierte Hochregulation der IL-1ra-Level durch LAS abgesenkt wurde. Des Weiteren konnte die altersbedingte Erhöhung der Blutplasmalevel von IL-6, IL-1ra und Leptin hier noch einmal bestätigt werden.

Sowohl IL-10 als auch TNF $\alpha$  (Daten nicht gezeigt) konnten zu diesem Zeitpunkt in keiner der Plasmaproben nachgewiesen werden.



**Abbildung 43: Einfluss von Leptin Antiserum auf zirkulierende Zytokine**

Konzentration von IL-6 (A), Leptin (B), IL-10 (C) und IL-1ra (D) im Blutplasma von jungen und alten Ratten 24 h nach Stimulation mit LPS (100 µg/kg) gleichzeitig mit LAS- (1 ml/kg) oder NSS-Injektion. Zahlen über den Balken geben die jeweilige Tierzahl an. Gestrichelte graue Linie = Detektionslimit. \* Haupteffekt des Alterns, \$ Haupteffekt der LAS-Behandlung / Vergleich LAS-LPS mit NSS-LPS-Gruppe (post-hoc). \*  $P < 0.05$ ; \*\*, \$\$  $P < 0.01$ ; \*\*\*, \$\$\$  $P < 0.001$ .

	NSS-LPS jung	LAS-LPS jung	NSS-LPS alt	LAS-LPS alt
IL-6 (I.U. /ml)	140,6 ± 31,78	150,3 ± 6,58	314,8 ± 49,98	364 ± 74,45
Leptin (ng/ml)	3,52 ± 0,48	5,51 ± 2,83	24,78 ± 4,11	82,99 ± 21,67
IL-10 (pg/ml)	19,53 (D.L.)	19,53 (D.L.)	19,53 (D.L.)	19,53 (D.L.)
IL-1ra (pg/ml)	142,4 ± 49,74	116,6 ± 49,17	463,7 ± 108,4	88,75 ± 24,75

**Tabelle 20: Einfluss von Leptin Antiserum auf zirkulierende Zytokine**

D.L. = Detektionslimit.

### 2.3 Effekte von Leptin Antiserum auf die mRNA-Expression inflammatorischer Marker

Um den Einfluss des Leptin Antiserums auf Signalwege der LPS-bedingten Entzündungsreaktion genauer zu analysieren, wurde eine Auswahl der bereits für die Studie „Altern“ (Studie 1, Kapitel Nr. 1.3) beschriebenen inflammatorischen Marker analysiert. Auch hier wurde die zentrale (Hypothalamus) und die periphere (Leber) Ebene berücksichtigt.

Die Transkriptionsfaktoren, bzw. deren negative Regulatoren SOCS3, I $\kappa$ B $\alpha$  und NF-IL6 wurden auf Veränderungen ihrer mRNA-Induktion durch Leptin Antiserum untersucht (Abbildung 44, A-C und Abbildung 45, A-C).

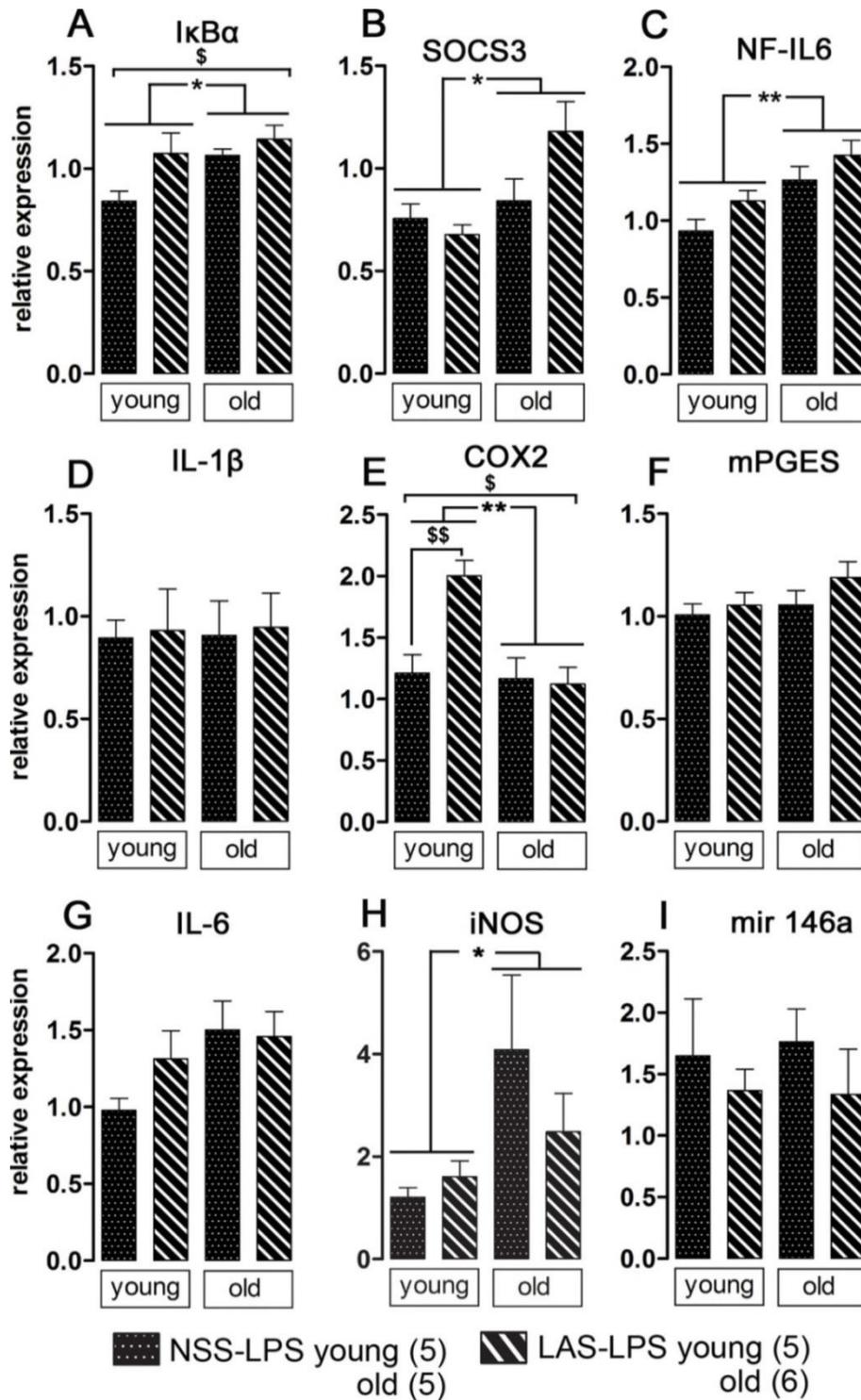
Im Hypothalamus zeigte sich eine altersbedingte Erhöhung der mRNA-Expression von I $\kappa$ B $\alpha$ , SOCS3 und NF-IL6. In der Leber wurde NF-IL6 durch das Altern runterreguliert, während die anderen Transkriptionsfaktoren unverändert blieben. Die LAS-Behandlung zeigte zu diesem Zeitpunkt einen signifikanten Effekt lediglich für die I $\kappa$ B $\alpha$  Expression im Hypothalamus, welche hierdurch leicht erhöht wurde. Des Weiteren gab es eine Tendenz für eine Steigerung der hypothalamischen SOCS3 mRNA-Expression in den alten, LAS-LPS-behandelten Tieren, welche jedoch keine statistische Signifikanz erreichte.

Die proinflammatorischen Zytokine IL-6 (nur Hypothalamus) und IL-1 $\beta$  (Hypothalamus und Leber, Abbildung 44, D und G und Abbildung 45, D) wiesen zu diesem Zeitpunkt keine signifikante Expressionsänderung durch LAS-Behandlung auf. Lediglich in der Leber der alten Ratten wurde eine Tendenz für eine Erniedrigung der IL-1 $\beta$ -Expression durch LAS-Behandlung festgestellt, welche jedoch keine Signifikanz erreichte.

Bei der Untersuchung der Schlüsselenzyme der Prostaglandinsynthese (Abbildung 44, E-F und Abbildung 45, E-F) wurde eine altersbedingte Erniedrigung der COX2-Expression sowohl im Hypothalamus als auch in der Leber festgestellt. Weitere statistische Analysen zeigten einen Effekt der LAS-Behandlung auf die hypothalamische COX2-Expression. In *post-hoc* Tests stellte sich heraus, dass die LAS-Behandlung zu diesem Zeitpunkt nur in den jungen Ratten zu einer deutlichen Steigerung der COX2 Expression geführt hat, was auch die statistisch signifikante altersbedingte Erniedrigung zu erklären scheint.

Die iNOS-Expression, welche nur im Hypothalamus untersucht wurde (Abbildung 44, H), zeigte eine altersbedingte Hochregulation der mRNA-Expression, blieb jedoch durch die LAS-Behandlung unbeeinflusst.

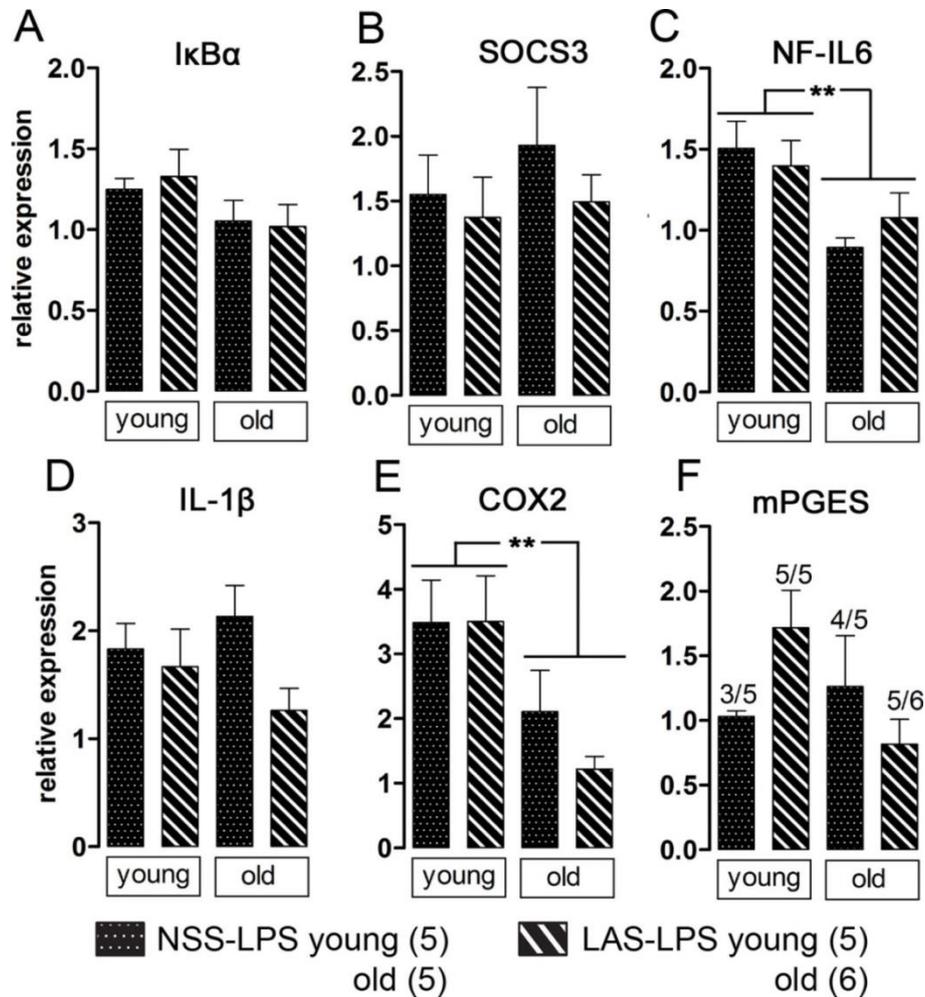
Es wurden außerdem keine Effekte auf die mir146a-Expression im Hypothalamus durch Behandlung mit Leptin Antiserum nachgewiesen (Abbildung 44, I).



**Abbildung 44: Auswirkung von Leptin Antiserum auf die mRNA-Expression inflammatorischer Marker im Hypothalamus**

Induktion der mRNA-Expression inflammatorischer Marker im Hypothalamus 24 h nach Injektion von LPS (100 µg/kg) gleichzeitig mit LAS (1 ml/kg) oder NSS von jungen und alten Ratten. \* Haupteffekt des Alters, \$ Haupteffekt der LAS-Behandlung / Vergleich LAS-LPS mit korrespondierender NSS-LPS-Gruppe (*post-hoc*). \*,\$  $P < 0.05$ ; \*\*, \$\$  $P < 0.01$ . IkBα, „inhibitor of kappa B α“; SOCS3, „suppressor of cytokine signaling“ 3; NF-IL6, „nuclear

factor interleukin 6“; mPGES, mikrosomale Prostaglandin E Synthase; COX2, Zyklooxygenase 2; iNOS, induzierbare NO Synthase; mir146a, microRNA 146a.



**Abbildung 45: Auswirkung von Leptin Antiserum auf die mRNA-Expression inflammatorischer Marker in der Leber**

Induktion der mRNA-Expression inflammatorischer Marker in der Leber 24 h nach Injektion von LPS (100 µg/kg) gleichzeitig mit LAS (1 ml/kg) oder NSS von jungen und alten Ratten. \* Haupteffekt des Alterns; \*\*  $P < 0.01$ . IκBα, „inhibitor of kappa B α“; SOCS3, „suppressor of cytokine signaling 3“; NF-IL6, „nuclear factor interleukin 6“; mPGES, mikrosomale Prostaglandin E Synthase; COX2, Zyklooxygenase 2.

## 2.4 Auswirkung von Leptin Antiserum auf die Immunreaktivität inflammatorischer Transkriptionsfaktoren

### NF-IL6

Aufbauend auf den immunhistochemischen Ergebnissen aus der vorhergehenden Studie wurden als vielversprechendste Regionen der *Nucleus paraventricularis* (PVN) und die *Median eminence* (ME) auf Unterschiede in der NF-IL6-Aktivierung, in Kombination mit einer Endothelzellenfärbung (von Willebrand Faktor) untersucht und zusätzlich semiquantitativ ausgewertet. Im PVN wurden nur vereinzelte NF-IL6 Signale beobachtet und es konnte kein Unterschied zwischen den verschiedenen Behandlungs- und Altersgruppen festgestellt werden (Abbildung 46, A-D). Bei der Analyse der ME wiesen die alten Ratten beider Behandlungsgruppen eine erhöhte Anzahl an NF-IL6 Signalen (++) im Vergleich zu den jungen Ratten (+) auf (Abbildung 46, E-H) (Tabelle 21). Somit konnte eine altersbedingte Verstärkung der nukleären NF-IL6 Translokation, welche bereits in der Studie „Altern“ aufgefallen war, bestätigt werden. Eine unterschiedliche Ausprägung der Signalstärke als Effekt auf die LAS-Behandlung wurde jedoch nicht beobachtet.

	nuclear NF-IL6 immunoreactivity							
	NSS-LPS young		LAS-LPS young		NSS-LPS old		LAS-LPS old	
PVN	±	(1,6)	±	(1,6)	±	(1,8)	±	(1,83)
ME	+	(3)	+	(3,25)	++	(4)	++	(3,6)

**Tabelle 21: Semiquantitative Analyse der nukleären NF-IL6 I.R. in verschiedenen Hirnarealen nach i.p. Injektion junger und alter Ratten**

- (1) = keine Signale, ± (2) = vereinzelte Signale, + (3) = niedrige Dichte, ++ (4) = mittlere Dichte, +++ (5) = hohe Dichte. Auswertung 4-6 Tiere pro Gruppe, 2 Schnitte pro Tier

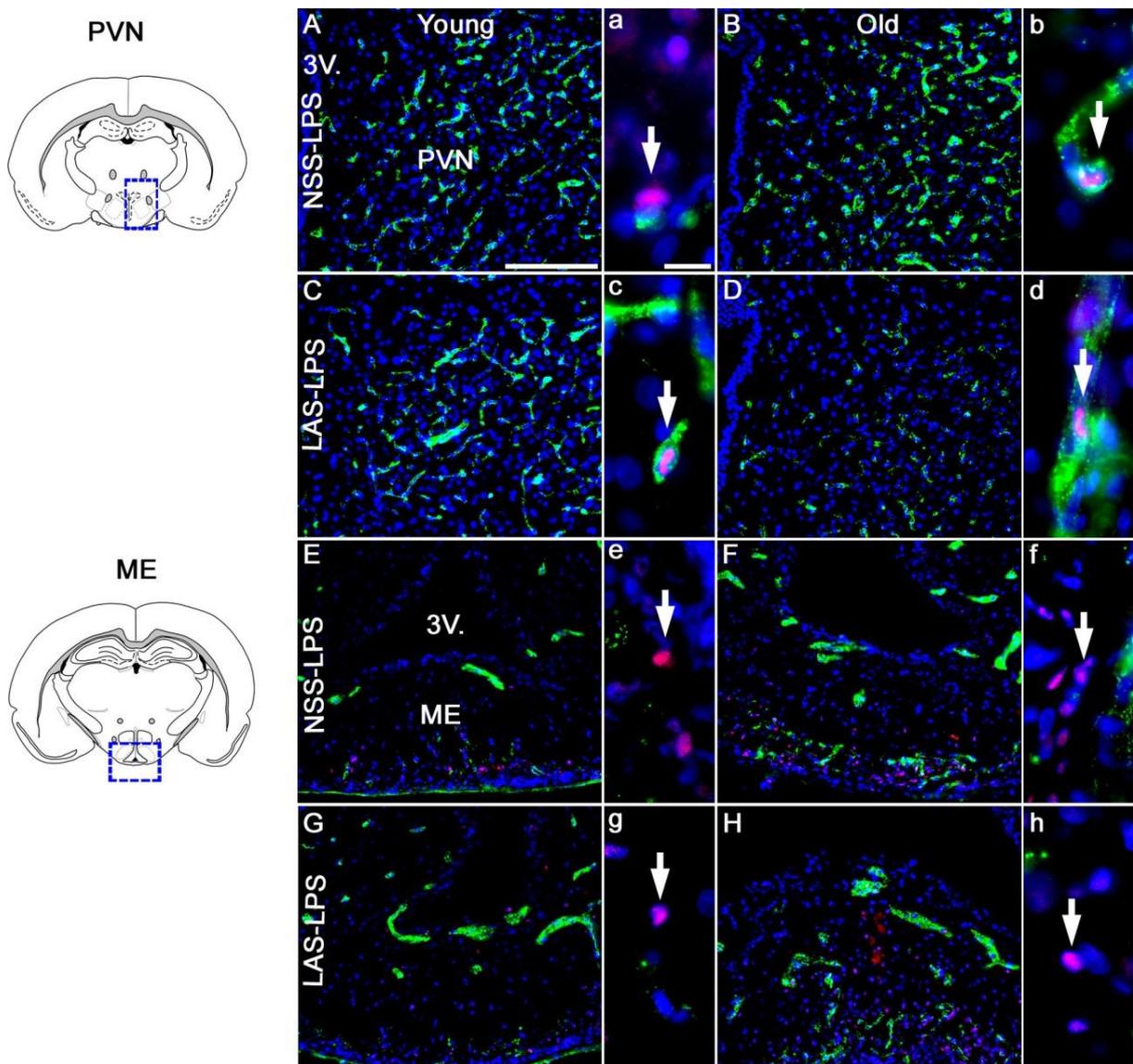
### Phospho-STAT3

Obwohl eine Aktivierung des Transkriptionsfaktors STAT3 zu diesem Zeitpunkt durch die LPS-Behandlung als unwahrscheinlich erschien, wurde die Aktivität von pSTAT3 im *Nucleus Arcuatus* (ARC) aufgrund der entscheidenden Bedeutung dieser Region für die Leptinwirkung immunhistochemisch untersucht und semiquantitativ ausgewertet (Tabelle 22; Beispielbilder sind hier nicht gezeigt). Es sollte hier vor allem eine potentielle STAT3-Aktivierung durch erhöhte Leptin-Konzentrationen in alten Ratten überprüft werden. Wie aus der vorhergehenden Studie in jungen Ratten zu erwarten war, konnten zu diesem Zeitpunkt keine oder nur sehr vereinzelte nukleäre pSTAT3-Signale beobachtet werden. Trotz erhöhter Plasma Leptin Spiegel in alten Ratten, wurden pSTAT3-Signale nicht vermehrt nachgewiesen. Es konnte insgesamt kein Unterschied zwischen den untersuchten Gruppen festgestellt werden, weswegen auf eine weitergehende Analyse von pSTAT3 in anderen Regionen des Hypothalamus verzichtet wurde.

nuclear phospho-STAT3 immunoreactivity								
	NSS-LPS young		LAS-LPS young		NSS-LPS old		LAS-LPS old	
ARC	±	(2)	±	(2)	±	(2)	±	(2)

**Tabelle 22: Semiquantitative Analyse der nukleären phospho-STAT3 I.R. im ARC nach i.p. Injektion junger und alter Ratten**

- (1) = keine Signale, ± (2) = vereinzelte Signale, + (3) = niedrige Dichte, ++ (4) = mittlere Dichte, +++ (5) = hohe Dichte. Auswertung 5-6 Tiere pro Gruppe, 2 Schnitte pro Tier



**Abbildung 46: NF-IL6 Immunreaktivität in den circumventrikulären Organen 24 h nach i.p. Injektion von LPS (100 µg/kg) in Kombination mit LAS (1 ml/kg) oder NSS von jungen und alten Ratten.**

Die schematischen Darstellungen am linken Seitenrand dienen der Verdeutlichung der anatomischen Lage der jeweiligen Strukturen, blaue Kästchen weisen auf den in Übersichtsaufnahmen gezeigten Abschnitt hin. Großbuchstaben markieren Übersichtsaufnahmen, Kleinbuchstaben markieren Detailaufnahmen.

NF-IL6 Signale sind durch Überlagerung mit dem Zellkernsignal (DAPI, blau) pink dargestellt. Der Zellmarker für Endothelzellen (von Willebrand Faktor) ist grün dargestellt. Gefüllte Pfeile verweisen auf nukleäre NF-IL6 Signale. Größenmarker in A entspricht 100  $\mu\text{m}$  und gilt in allen Übersichtsaufnahmen, Größenmarker in a entspricht 10  $\mu\text{m}$  und gilt in allen Detailaufnahmen. PVN: *Nucleus paraventricularis*, ME: *Median eminence*.

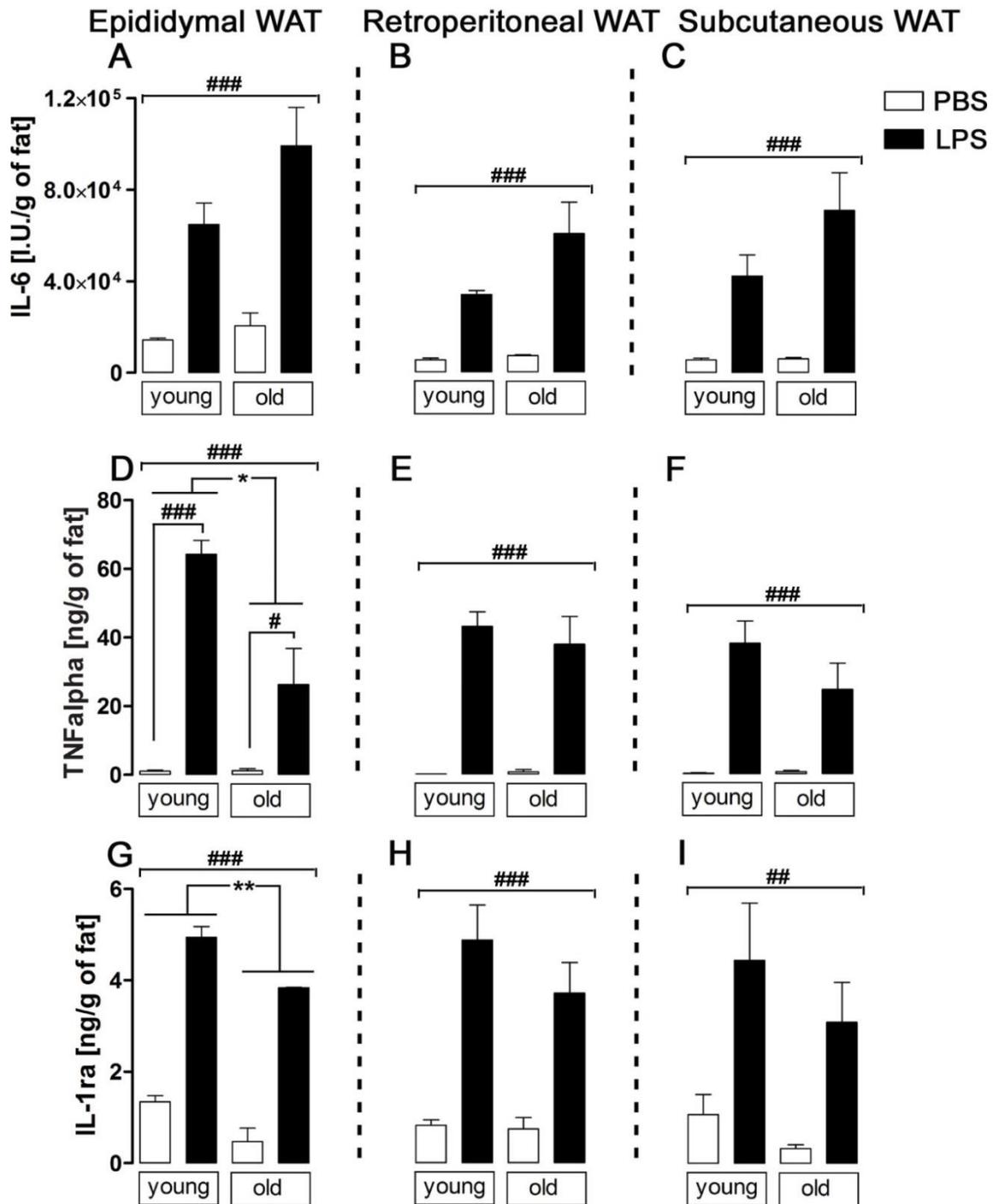
## **2.5 Altersbedingte Veränderungen der Zytokinfreisetzung durch das Fettgewebe**

Ähnlich wie beim Altern ist auch der Zustand der Adipositas durch ein verstärktes „sickness behaviour“ und eine chronische, periphere Entzündung gekennzeichnet, charakterisiert durch erhöhte Konzentrationen inflammatorischer Entzündungsmediatoren im Blut (Fantuzzi 2005). Bei adipösen Individuen wurde ein Einfluss des Fettgewebes als zytokinfreisetzendes Organ auf die erhöhten Gehalte zirkulierender humoraler Mediatoren belegt (Pohl et al. 2009). Da auch das Altern mit einer altersassoziierten Adipositas einhergeht, sollte im folgenden Versuchsansatz ein möglicher Beitrag der Zytokinfreisetzung durch das Fettgewebe auf die im Alter oftmals vorherrschende chronische, periphere Entzündung näher untersucht werden. Zu diesem Zweck wurde die Freisetzung von IL-6, TNF $\alpha$  und IL-1ra durch Fettgewebe von jungen und alten Ratten nach 24stündiger Inkubation mit LPS (100 ng/ml) oder PBS im Überstand gemessen. Des Weiteren wurden drei verschiedene Lokalisationen des Fettgewebes (epididymal, retroperitoneal und subkutan) untereinander verglichen (Abbildung 47, Tabelle 23).

Zur statistischen Analyse wurde eine two-way ANOVA über die Haupteffekte „Alter“ (jung vs alt) und „LPS-Behandlung“ (LPS vs PBS) durchgeführt. Bei signifikanter Interaktion der beiden Hauptparameter wurde ein Bonferroni *post-hoc* Test durchgeführt.

Bei allen untersuchten Fettgewebsarten wurde ein LPS-induzierter Anstieg der Zytokinfreisetzung gemessen, unabhängig von der Altersgruppe.

Die sezernierten IL-6 Konzentrationen blieben durch das Altern unbeeinflusst. Die durch das epididymale Fettgewebe alter Ratten sezernierten Level von TNF $\alpha$  und IL-1ra waren jedoch im Vergleich zu der jungen Gruppe signifikant niedriger (Abbildung 47, D und G). Eine signifikante Interaktion der untersuchten Parameter Alter und LPS-Behandlung für epididymales TNF $\alpha$  zeigte in nachfolgenden *post-hoc* Tests, dass die LPS-Behandlung im Vergleich zur PBS-Kontrollgruppe einen deutlicheren Anstieg der epididymalen TNF $\alpha$  Sekretion durch das Fettgewebe junger Ratten zur Folge hatte, im Vergleich zur alten Gruppe. Die anderen Fettgewebsarten zeigten keine altersbedingten Unterschiede in ihrer Zytokinsekretion.



**Abbildung 47: Altersbedingte Veränderungen der Zytokinfreisetzung durch das Fettgewebe**

Konzentrationen von IL-6, TNF $\alpha$  und IL-1ra im Überstand von Fettgewebeskulturen junger und alter Ratten nach Stimulation mit LPS (100  $\mu$ g/kg) oder PBS für 24 h. \* Haupteffekt des Alterns, # Haupteffekt der LPS-Behandlung / Vergleich LPS mit korrespondierender PBS-Gruppe (*post-hoc*). #, \*  $P < 0.05$ ; ##, \*\*  $P < 0.01$ ; ###, \*\*\*  $P < 0.001$ .

<b>IL-6 (I.U./g of fat)</b>				
	<b>PBS young</b>	<b>LPS young</b>	<b>PBS old</b>	<b>LPS old</b>
„Epididymal WAT“	14400 ±730	64701±9492	20594±5522	99154±16827
„Retroperitoneal WAT“	5352 ±761,5	33990±1804	7247 ±434,6	60669±13665
„Subcutaneous WAT“	5560±798,1	42249±9208	6041±633,3	70992±16449
<b>TNFα (ng/g of fat)</b>				
“Epididymal WAT”	1,05 ± 0,25	64,22 ± 4,11	1,15 ± 0,61	26,28 ± 10,48
“Retroperitoneal WAT”	0,08 ± 0,05	43,06 ± 4,14	0,71 ± 0,67	37,85 ± 8,02
“Subcutaneous WAT”	0,2 ± 0,09	38,13 ± 6,46	0,64 ± 0,31	24,63 ± 7,68
<b>IL-1ra (ng/g of fat)</b>				
“Epididymal WAT”	1,34 ± 0,14	4,94 ± 0,24	0,47 ± 0,3	3,84 ± 0,01
“Retroperitoneal WAT”	0,82 ± 0,12	4,86 ± 0,76	0,74 ± 0,25	3,71 ± 0,67
“Subcutaneous WAT”	1,07 ± 0,44	4,44 ± 1,25	0,33 ± 0,09	3,1 ± 0,87

**Tabelle 23: Altersbedingte Veränderungen der Zytokinfreisetzung durch das Fettgewebe**

### 3. Altersabhängige Einflüsse des PPAR $\gamma$ -Agonisten Rosiglitazon auf die LPS-bedingte Entzündungsreaktion

Das Ziel dieser Studie bestand darin, die Auswirkungen von Rosiglitazon als möglicher entzündungshemmender Wirkstoff auf die LPS-induzierte Entzündung zu untersuchen und gleichzeitig eventuelle altersbedingte Veränderungen in der Wirkung zu berücksichtigen. Zu diesem Zweck wurden junge und alte Ratten mit Rosiglitazon (3 mg/kg) oder dem Lösungsmittel Cremophor vorbehandelt und mit LPS (100  $\mu$ g/kg) stimuliert. Um eine Eigenwirkung des Wirkstoffs auszuschließen, wurden zusätzlich Kontrollgruppen nach gleicher Vorbehandlung mit PBS injiziert (Tabelle 24).

Zur statistischen Auswertung wurden die beiden Altersgruppen jeweils separat mittels two-way ANOVA auf die Haupteffekte „Rosiglitazon-Vorbehandlung“ (Rosiglitazon vs Cremophor) und „LPS-Behandlung“ (LPS vs PBS) untersucht. Bei signifikanter Interaktion dieser beiden Parameter wurde ein Bonferroni *post-hoc* Test (jeweils separat für die jeweilige Altersgruppe) durchgeführt.

	Alter	applizierte Substanzen	Zeitpunkt Perfusion	Tierzahl
<b>Kontrolle Lösungsmittel</b>	2 Monate	Cremophor	+ 24h	4
	24 Monate	PBS		4
<b>Kontrolle Rosiglitazon</b>	2 Monate	Rosiglitazon	+ 24h	4
	24 Monate	PBS		4
<b>Inflammation Lösungsmittel</b>	2 Monate	Cremophor	+ 24h	5
	24 Monate	LPS		5
<b>Inflammation Rosiglitazon</b>	2 Monate	Rosiglitazon	+ 24h	6
	24 Monate	LPS		5

**Tabelle 24: Versuchsgruppen Studie „Rosiglitazon“**

Übersicht über die für Studie „Rosiglitazon“ gebildeten Versuchsgruppen, die applizierten Substanzen, den Perfusionszeitpunkt und die jeweils verwendete Anzahl an Tieren.

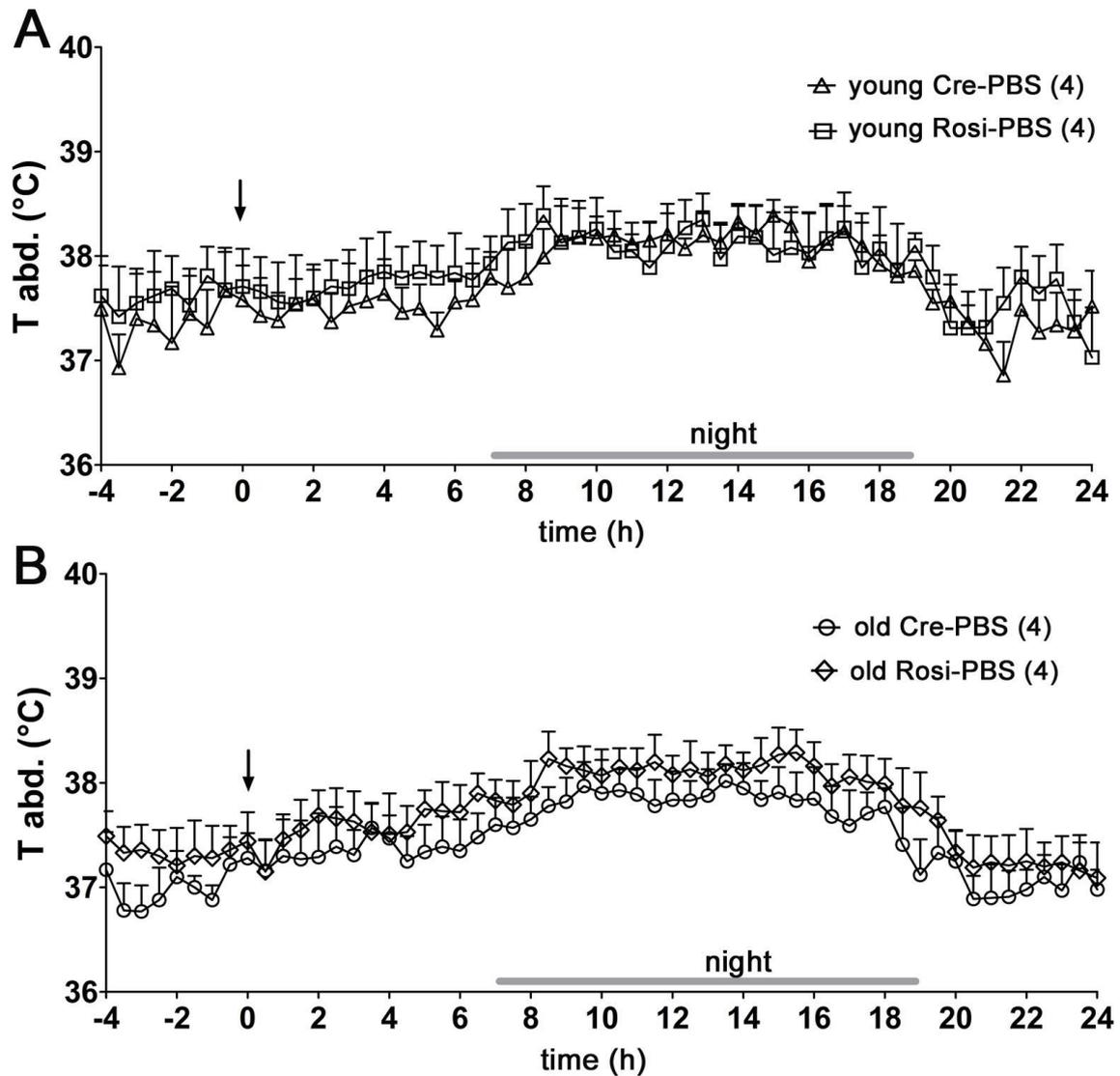
### **3.1 Auswirkung von Rosiglitazon auf physiologische Parameter des „sickness behaviours“**

Die Ratten wurden 3-mal während 24 h mit Rosiglitazon (3 mg/kg) oder dem Lösungsmittel Cremophor 30 % vorbehandelt (Zeitpunkt -24 h, -2 h und 0 h vor LPS/PBS-Injektion). An Zeitpunkt  $t = 0$  erfolgte die Injektion mit LPS oder PBS. Die Daten wurden während 24 h aufgezeichnet. Zur Auswertung wurden die absoluten Temperaturdaten verwendet.

Die Injektion mit LPS in Kombination mit Cremophor führte bei den jungen Ratten zu einem signifikanten Temperaturanstieg im Vergleich zur PBS-Kontrollgruppe zwischen Zeitpunkt 2,25 h und 7 h nach Injektion, mit einem Temperaturmaximum von 39,09 °C zum Zeitpunkt 5,25 h (Abbildung 50, A). Die jungen mit Rosiglitazon vorbehandelten Ratten entwickelten nach der LPS-Injektion einen Fieberanstieg von Zeitpunkt 3 h bis Zeitpunkt 8 h im Vergleich zur PBS-Kontrollgruppe. Das Temperaturmaximum bei dieser Gruppe lag bei 39,13 °C zum Zeitpunkt 6 h (Abbildung 50, B). Im direkten Vergleich unterschieden sich die beiden LPS-injizierten Gruppen der jungen Ratten nicht (Abbildung 49, A).

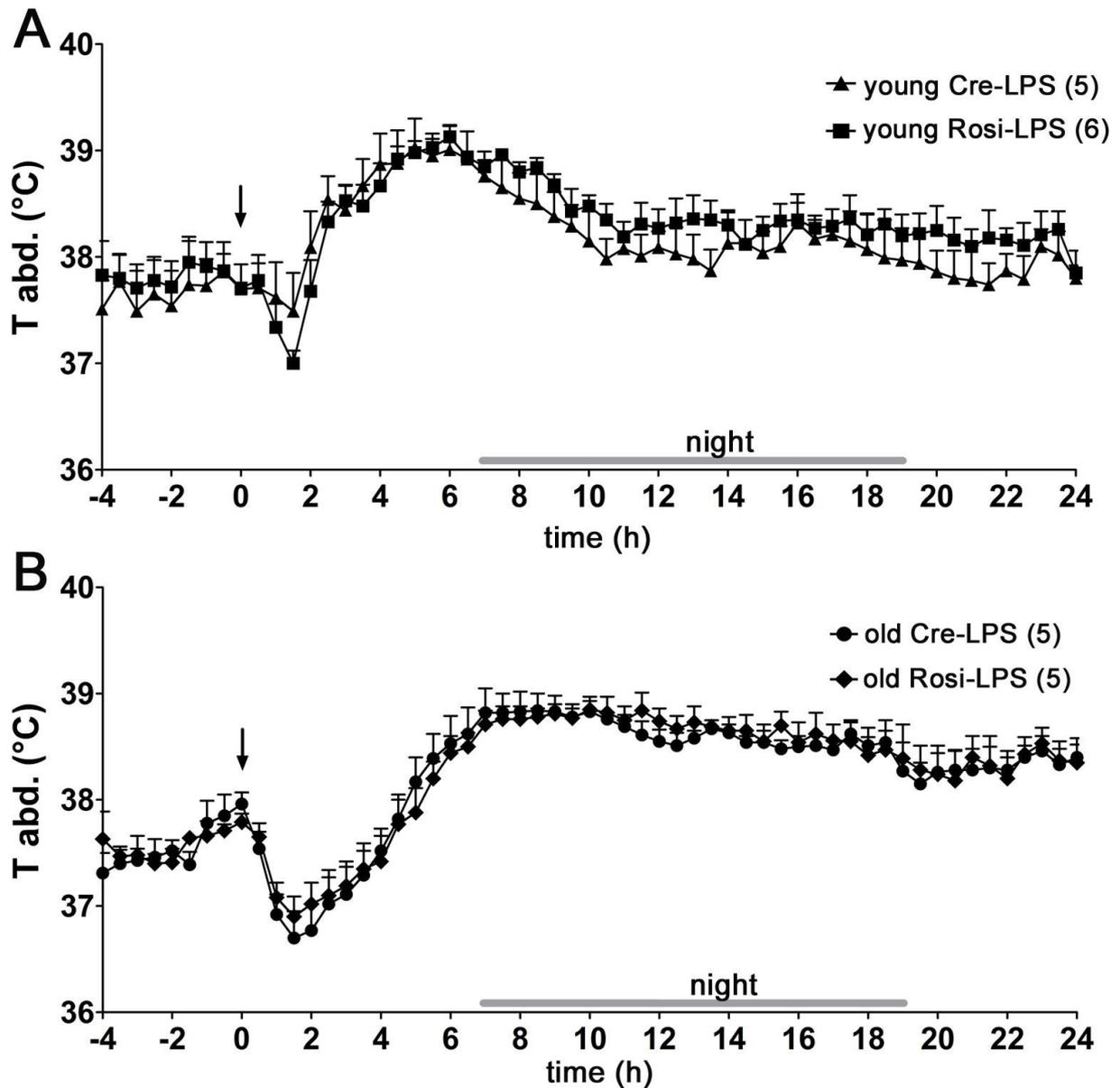
Bei den alten Cremophor behandelten Ratten führte die LPS-Injektion nach 4,5 h zu einem signifikanten Fieber, welches sich bis zum Ende der Temperaturlaufzeichnung an Zeitpunkt 24 h aufrechterhielt (Abbildung 51, A). Allerdings muss hierbei beachtet werden, dass die Cre-LPS-Gruppe bereits vor der LPS-Injektion eine signifikant höhere Körperkerntemperatur hatte als die PBS-Kontrollgruppe. Das Temperaturmaximum lag bei 38,84 °C zum Zeitpunkt 8,5 h. Die mit Rosiglitazon vorbehandelten alten Ratten entwickelten nach LPS-Injektion einen signifikanten Temperaturanstieg im Vergleich zur PBS-Gruppe zwischen Zeitpunkt 6,25 h und 14 h, 16,25 h und 17 h, und im Anschluss an die Nachtphase von 20,25 h bis zum Ende des Experimentes (Abbildung 51, B). Das Temperaturmaximum betrug bei dieser Gruppe 38,86 °C an Zeitpunkt 10,25 h. Im direkten Vergleich unterschieden sich auch diese LPS-injizierten Gruppen nicht in ihrem Temperaturverlauf (Abbildung 49, B).

Weder bei den alten noch bei den jungen PBS-injizierten Kontrollgruppen gab es eine relevante Beeinflussung des Temperaturverlaufs durch die Vorbehandlung mit Cremophor oder Rosiglitazon (Abbildung 48).



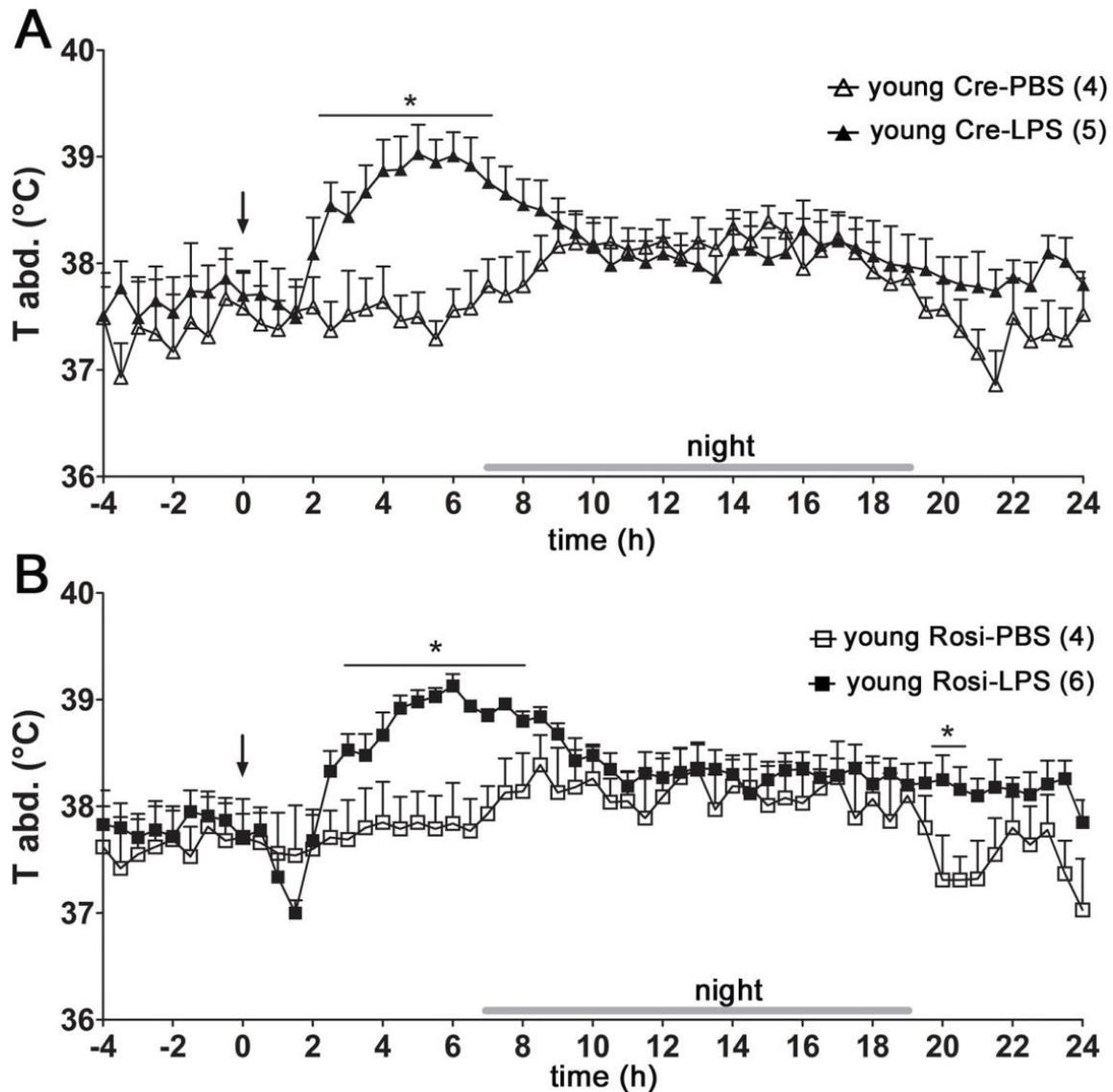
**Abbildung 48: Einfluss von Rosiglitazon auf die Körperkerntemperatur nach PBS-Injektion**

Verlauf der intraabdominal gemessenen Körpertemperatur nach Injektion mit PBS nach Vorbehandlung mit Rosiglitazon (3 mg/kg) oder dem Lösungsmittel Cremophor über 24 h bei jungen (A) und alten (B) Ratten im Vergleich. Der Zeitpunkt der i.p. Injektion wurde mit einem Pfeil markiert, die Nachtphase wurde mit einem grauen Balken gekennzeichnet.



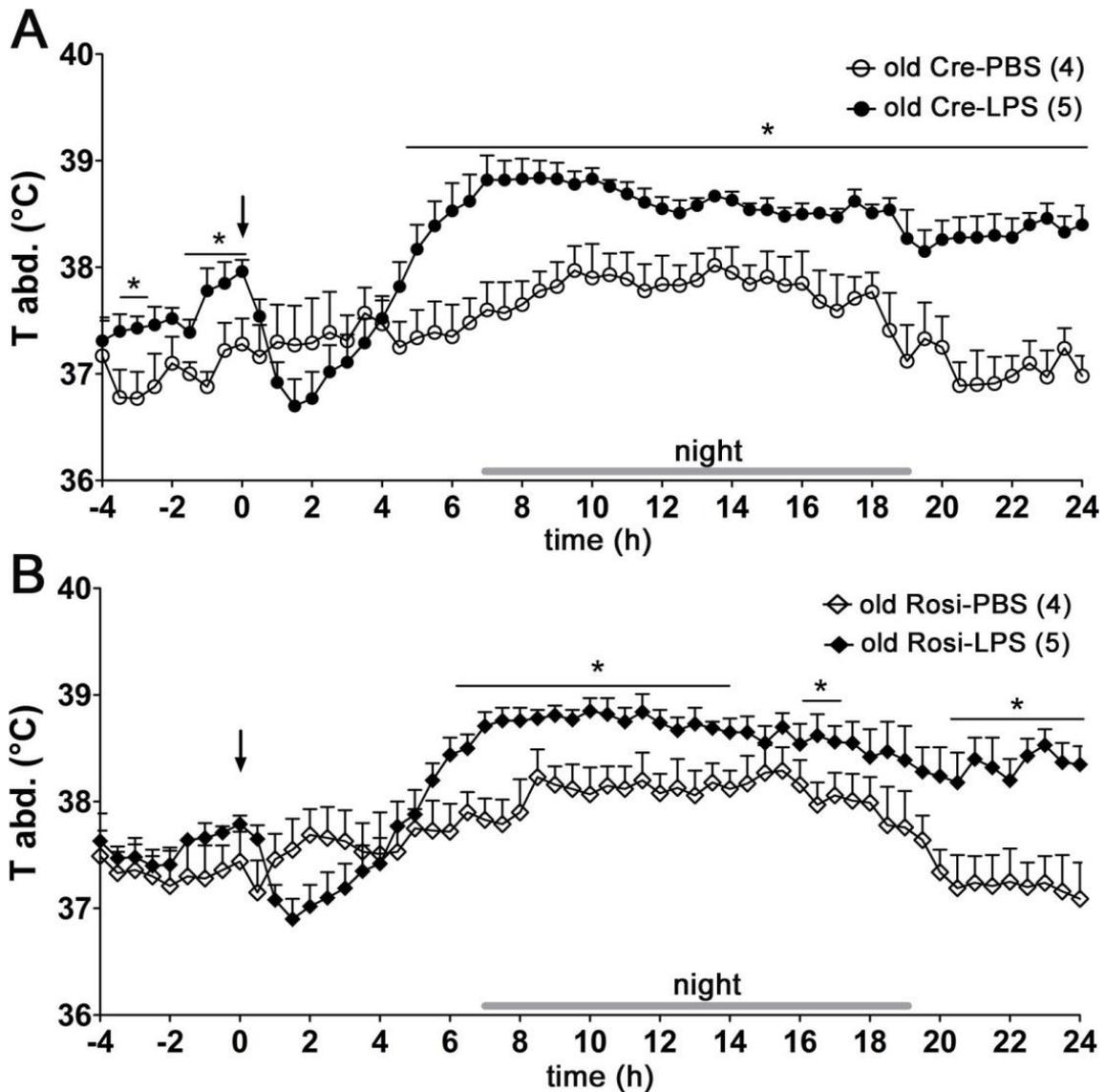
**Abbildung 49: Einfluss von Rosiglitazon auf die Körperkerntemperatur nach LPS-Injektion**

Verlauf der intraabdominal gemessenen Körpertemperatur nach Injektion mit LPS (100  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) nach Vorbehandlung mit Rosiglitazon (3  $\text{mg}/\text{kg}$ ) oder dem Lösungsmittel Cremophor über 24 h bei jungen (A) und alten (B) Ratten im Vergleich. Der Zeitpunkt der i.p. Injektion wurde mit einem Pfeil markiert, die Nachtphase wurde mit einem grauen Balken gekennzeichnet.



**Abbildung 50: Einfluss von Rosiglitazon auf die Körperkerntemperatur bei jungen Ratten**

Verlauf der intraabdominal gemessenen Körpertemperatur nach Injektion mit LPS (100  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) oder PBS nach Vorbehandlung mit Rosiglitazon (3  $\text{mg}/\text{kg}$ ) (B) oder dem Lösungsmittel Cremophor (A) über 24 h bei jungen Ratten im Vergleich. Der Zeitpunkt der i.p. Injektion wurde mit einem Pfeil markiert, die Nachtphase wurde mit einem grauen Balken gekennzeichnet. \*  $P < 0.05$ .



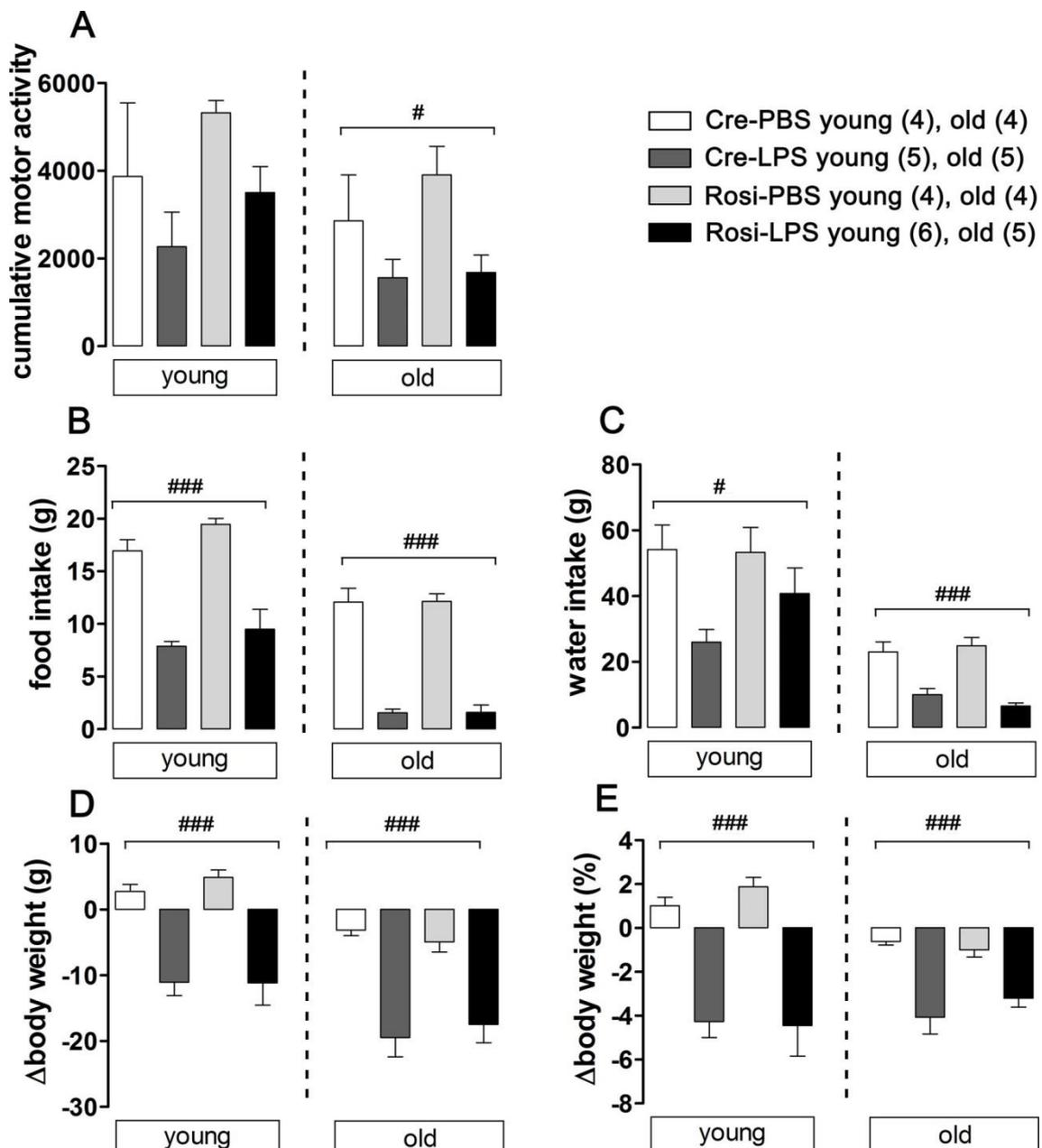
**Abbildung 51: Einfluss von Rosiglitazon auf die Körperkerntemperatur von alten Ratten**

Verlauf der intraabdominal gemessenen Körpertemperatur nach Injektion mit LPS (100 µg/kg) oder PBS nach Vorbehandlung mit Rosiglitazon (3 mg/kg) (B) oder dem Lösungsmittel Cremophor (A) über 24 h bei alten Ratten im Vergleich. Der Zeitpunkt der i.p. Injektion wurde mit einem Pfeil markiert, die Nachtphase wurde mit einem grauen Balken gekennzeichnet. \*  $P < 0.05$ .

Die motorische Aktivität wurde kumulativ für 24 h nach Injektion untersucht (Abbildung 52, A). Nach LPS-Injektion zeigten alle Gruppen eine tendenziell erniedrigte motorische Aktivität, welche jedoch nur bei den alten Ratten signifikant wurde. Ein Effekt von Rosiglitazon konnte nicht aufgezeigt werden (Tabelle 25).

Die LPS-Behandlung zeigte eine deutliche Reduzierung der Futtermittelaufnahme bei beiden Altersgruppen. Die LPS-induzierte Adipsie hingegen äußerte sich bei den alten Ratten wesentlich deutlicher als bei den jungen Ratten (Abbildung 52, B-C) (Tabelle 25). Eine Vorbehandlung mit Rosiglitazon zeigte keinen sichtbaren Einfluss.

Eine Stimulation mit LPS führt in allen Gruppen unabhängig von Alter und Behandlung zu einer deutlichen Gewichtsabnahme, sowohl in der Darstellung der Absolutwerte als auch in der prozentualen Umrechnung (Abbildung 52, D-E) (Tabelle 25). Rosiglitazon führte in den untersuchten Parametern zu keinem sichtbaren Effekt.



**Abbildung 52: Einfluss von Rosiglitazon auf Parameter des „sickness behaviours“**

Motorische Aktivität (A), Futtermittelaufnahme (B), Wasseraufnahme (C) und Gewichtsänderung in Gramm (D) bzw. Prozent (E) nach Stimulation mit LPS (100 µg/kg) oder PBS nach Vorbehandlung mit Rosiglitazon (3 mg/kg) oder dem Lösungsmittel Cremophor von jungen und alten Ratten (über 24 h). # Haupteffekt der LPS-Behandlung. #  $P < 0.05$ ; ###  $P < 0.001$ .

<b>Junge Ratten</b>				
	<b>Cre-PBS</b>	<b>Cre-LPS</b>	<b>Rosi-PBS</b>	<b>Rosi-LPS</b>
Motorische Aktivität („counts“)	3781 ± 1674	2267 ± 789,9	5322 ± 282,6	3501 ± 596,4
Futtermittelaufnahme (g)	16,96 ± 1,05	7,88 ± 0,46	19,47 ± 0,56	9,49 ± 1,9
Wasseraufnahme (g)	54,2 ± 7,45	26 ± 3,86	53,33 ± 7,55	40,75 ± 7,8
Gewichtsänderung (g)	2,75 ± 1,05	-11,06 ± 2,03	4,88 ± 1,15	-11,17 ± 3,4
Gewichtsänderung (%)	1,01 ± 0,4	-4,27 ± 0,73	1,87 ± 0,43	-4,45 ± 1,4
<b>Alte Ratten</b>				
	<b>Cre-PBS</b>	<b>Cre-LPS</b>	<b>Rosi-PBS</b>	<b>Rosi-LPS</b>
Motorische Aktivität („counts“)	2859 ± 1046	1563 ± 417,6	3907 ± 649,4	1681 ± 395,2
Futtermittelaufnahme (g)	12,08 ± 1,3	1,55 ± 0,36	12,13 ± 0,73	1,59 ± 0,71
Wasseraufnahme (g)	23,03 ± 3,09	10,04 ± 1,88	24,88 ± 2,58	6,54 ± 0,94
Gewichtsänderung (g)	-3,1 ± 0,83	-19,46 ± 2,93	-4,92 ± 1,51	-17,44 ± 2,82
Gewichtsänderung (%)	-0,61 ± 0,16	-4,07 ± 0,77	-0,99 ± 0,33	-3,2 ± 0,41

**Tabelle 25: Einfluss von Rosiglitazon auf Parameter des „sickness behaviours“**

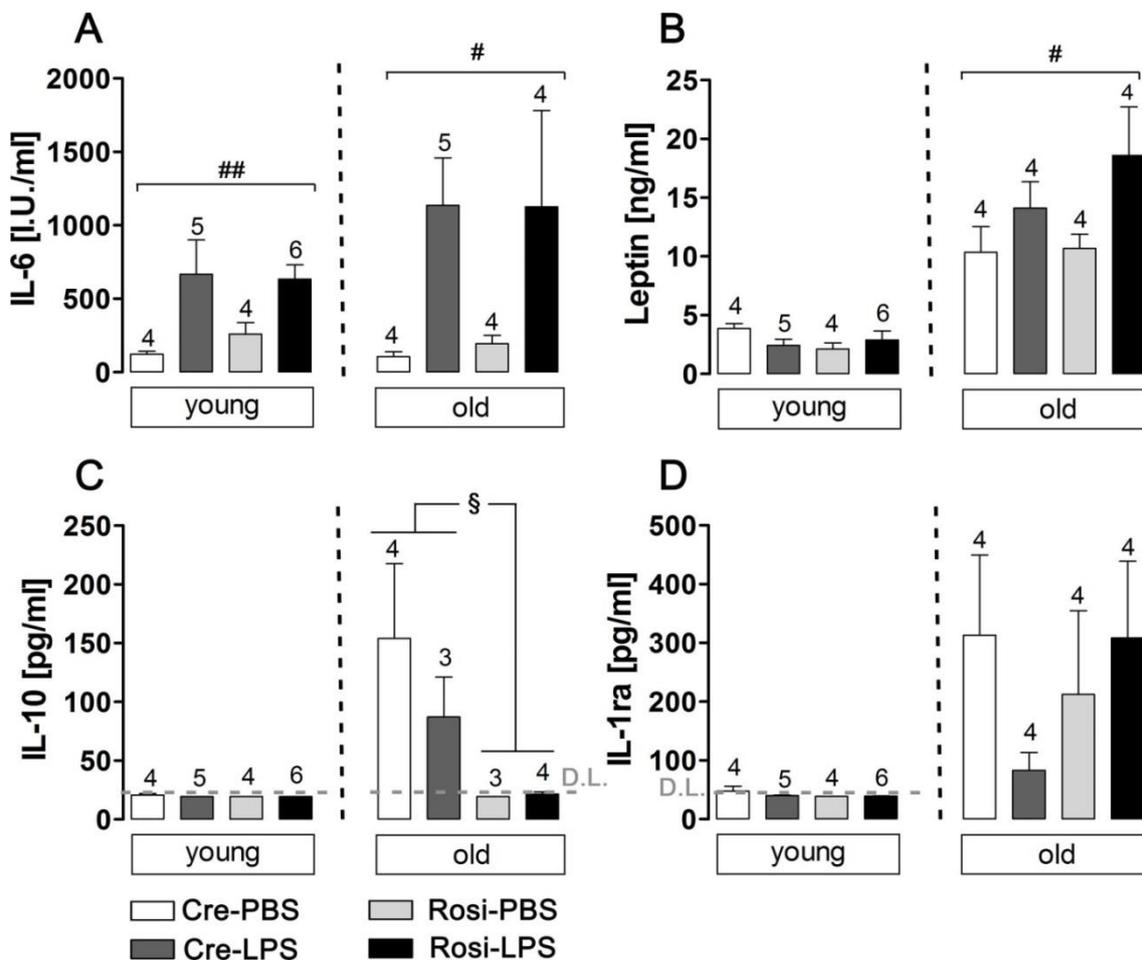
### 3.2 Einfluss von Rosiglitazon auf zirkulierende Zytokine

Nachdem die gewonnenen physiologischen Parameter keine signifikanten Unterschiede in den mit Rosiglitazon oder Cremophor vorbehandelten Gruppen aufwiesen, wurden die Plasmaproben der Versuchstiere im nächsten Schritt auf eine mögliche periphere Auswirkung dieser Wirkstoffe auf die Gehalte an zirkulierenden humoralen Mediatoren untersucht (Abbildung 53) (Tabelle 26).

Ein Einfluss der LPS-Behandlung zeigte sich für IL-6 in beiden Altersgruppen, wobei dieser Effekt bei der jungen Gruppe deutlicher war. Für Leptin hingegen konnte nur bei den alten Ratten ein Anstieg der Plasmakonzentration festgestellt werden. IL-10 und IL-1ra zeigten zu diesem Zeitpunkt keinen regulatorischen Effekt durch LPS.

Die Vorbehandlung mit Rosiglitazon führte zu einer Erniedrigung der IL-10 Plasmalevel, jedoch nur bei den alten Ratten (Abbildung 53, C). Auf die anderen untersuchten Zytokine hatte Rosiglitazon keinen Einfluss.

TNF $\alpha$  (Daten nicht gezeigt) konnte in keiner der untersuchten Proben detektiert werden.



**Abbildung 53: Auswirkung von Rosiglitazon auf zirkulierende Zytokine**

Konzentration von IL-6 (A), Leptin (B), IL-10 (C) und IL-1ra (D) im Blutplasma von alten und jungen Ratten 24 h nach Stimulation mit LPS (100 µg/kg) oder PBS nach Vorbehandlung mit Rosiglitazon (3 mg/kg) oder dem Lösungsmittel Cremophor. Zahlen über den Balken

geben die jeweilige Tierzahl an. D.L. = Detektionslimit. # Haupteffekt der LPS-Behandlung, § Haupteffekt der Rosiglitazon-Behandlung. #, §  $P < 0.05$ ; ##  $P < 0.01$ .

<b>Junge Ratten</b>				
	<b>Cre-PBS</b>	<b>Cre-LPS</b>	<b>Rosi-PBS</b>	<b>Rosi-LPS</b>
IL-6 (I.U./ml)	121,8 ± 20,04	666,8 ± 233,6	259 ± 78,28	634,7 ± 96,41
Leptin (ng/ml)	3,87 ± 0,42	2,42 ± 0,53	2,11 ± 0,51	2,88 ± 0,77
IL-10 (pg/ml)	20,79 ± 1,26	19,53 (D.L.)	19,53 (D.L.)	19,53 (D.L.)
IL-1ra (pg/ml)	47,51 ± 8,45	40,12 ± 1,05	39,07 (D.L.)	39,48 ± 0,41
<b>Alte Ratten</b>				
	<b>Cre-PBS</b>	<b>Cre-LPS</b>	<b>Rosi-PBS</b>	<b>Rosi-LPS</b>
IL-6 (I.U./ml)	105,5 ± 33,53	1135 ± 324,1	194,5 ± 56,55	1125 ± 656,1
Leptin (ng/ml)	10,35 ± 2,19	14,12 ± 2,24	10,68 ± 1,21	18,59 ± 4,12
IL-10 (pg/ml)	154 ± 63,66	87,22 ± 33,98	19,53 (D.L.)	21,53 ± 2
IL-1ra (pg/ml)	312,9 ± 136,6	83,26 ± 30,21	212,3 ± 142,6	308,5 ± 130,4

**Tabelle 26: Auswirkung von Rosiglitazon auf zirkulierende Zytokine**

D.L. = Detektionslimit.

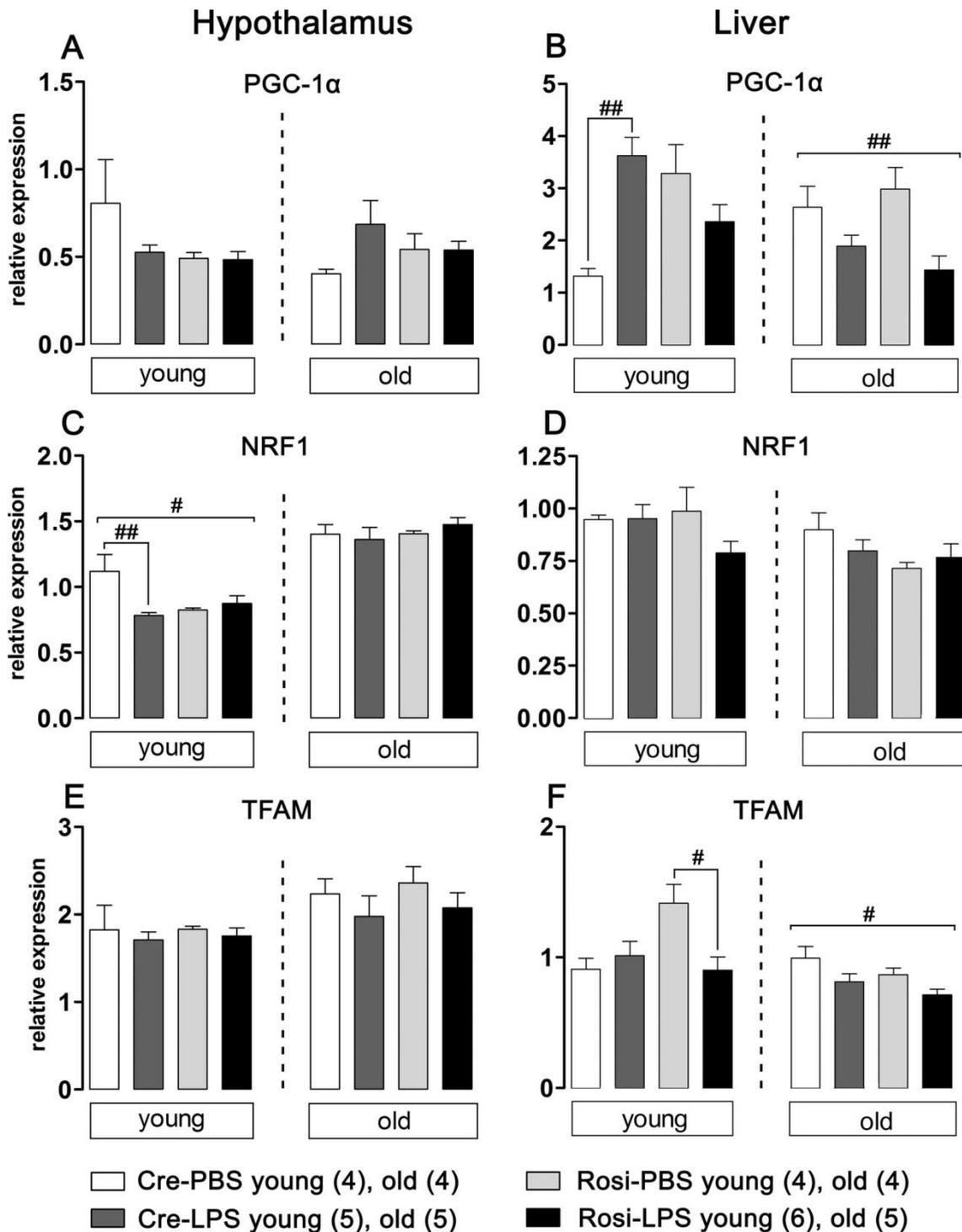
### 3.3 Effekte von Rosiglitazon auf die mRNA-Expression inflammatorischer Marker

In den bisher untersuchten Parametern wurde bisher lediglich für zirkulierendes IL-10 eine signifikante Auswirkung von Rosiglitazon nachgewiesen. Zur weiteren Analyse wurden mittels real-time PCR in den entnommenen Gewebeproben (Hypothalamus und Leber) Marker analysiert, die als Indikatoren für eine Anflutung und Wirksamkeit des verabreichten Wirkstoffs in den jeweiligen Organen dienen. Hierzu wurden die bereits in der Studie „Altern“ untersuchten Marker für oxidativen Stress, „peroxisome proliferator activated receptor (PPAR)  $\gamma$  coactivator“ 1  $\alpha$  (PGC-1 $\alpha$ ), „nuclear respiratory factor“ 1 (NRF1) und „mitochondrial transcription factor“ a (TFAM) herangezogen. Die Expression besagter Marker wird direkt durch den PPAR $\gamma$ -Agonisten Rosiglitazon induziert, da PGC-1 $\alpha$  als Co-Aktivator des besagten PPAR $\gamma$  fungiert, und es sich bei NRF1 und TFAM um die nachgeschalteten Zielgene in der Aktivierungskette handelt.

Im Hypothalamus wurde ein Effekt der LPS-Behandlung nur auf die mRNA-Expression von NRF1 bei den jungen Ratten beobachtet. Die Rosiglitazon-Gabe führte in diesem Gewebe zu keiner Expressionsänderung bei PGC-1 $\alpha$  und TFAM. Bei der Untersuchung der NRF1-Expression zeigte sich jedoch in *post-hoc* Tests, dass bei den jungen Ratten die Expression in der Cremophor-Gruppe durch LPS signifikant erniedrigt wurde, in der Rosiglitazon-Gruppe jedoch nicht (Abbildung 54, A, C, E).

Bei der Untersuchung der Leber zeigte sich ein Haupteffekt der LPS-Behandlung bei den alten Tieren für PGC-1 $\alpha$  und TFAM und führte in beiden Fällen zu einer Erniedrigung der mRNA-Expression (Abbildung 54, B, D, F).

Ein direkter Haupteffekt von Rosiglitazon wurde statistisch nicht festgestellt. Die Durchführung von *post-hoc* Tests bei der PGC-1 $\alpha$ -Expression der jungen Ratten ergab, dass LPS bei den Cremophor-behandelten Tieren zu einer Steigerung der PGC-1 $\alpha$  Expression führte. Bei den Rosiglitazon-behandelten Tieren ist dies nicht der Fall. Hier fällt ebenfalls auf, dass die PGC-1 $\alpha$  Expression der Rosiglitazon-PBS Gruppe bereits deutlich höher war als bei den Cremophor-PBS Tieren. Die Durchführung von *post-hoc* Tests bei der TFAM-Expression der jungen Tiere zeigte, dass LPS nur bei den Rosiglitazon-vorbehandelten Tieren zu einer Erniedrigung der Expression führte. Auch hier fällt auf, dass die TFAM Expression der Rosiglitazon-PBS Gruppe deutlich höher war als bei der Cremophor-Gruppe. Durch die gleichzeitige Regulation dieser Marker durch LPS, konnte dieser Unterschied statistisch jedoch nicht erfasst werden.

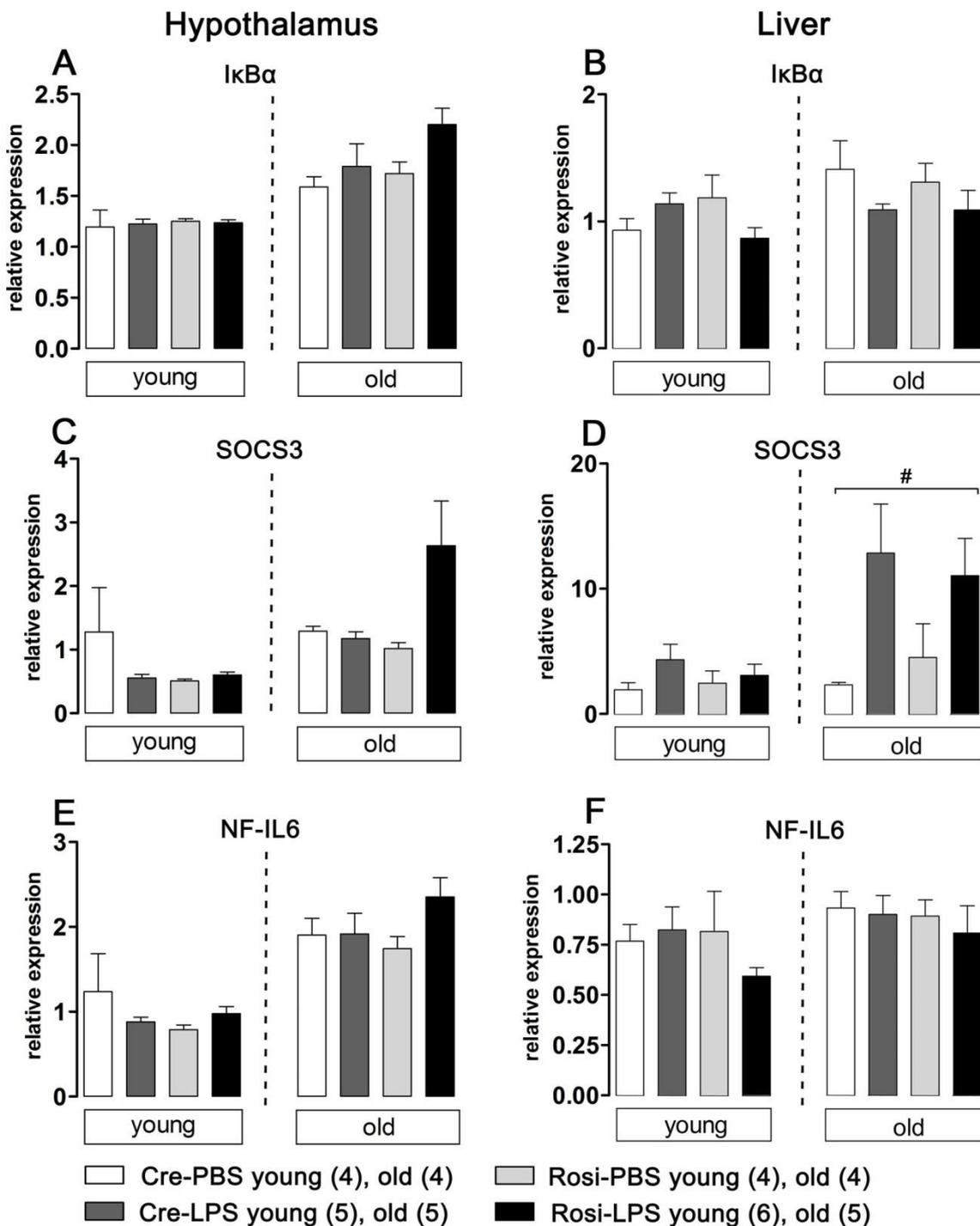


**Abbildung 54: Auswirkung von Rosiglitazon auf die mRNA-Expression von Markern für oxidativen Stress in Hypothalamus und Leber**

Induktion der Expression von Markern für oxidativen Stress in Hypothalamus und Leber 24 h nach Injektion von LPS (100 µg/kg) oder PBS nach Vorbehandlung mit Rosiglitazon (3 mg/kg) oder dem Lösungsmittel Cremophor von jungen und alten Ratten. # Haupteffekt der LPS-Behandlung / Vergleich LPS mit korrespondierender PBS-Kontrollgruppe (*post-hoc*) #  $P < 0.05$ ; ##  $P < 0.01$ . PGC-1 $\alpha$ , „peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  coactivator” 1  $\alpha$ ; NRF1, „nuclear respiratory factor” 1; TFAM, „mitochondrial transcription factor” A.

Analog zu den anderen Studien wurde eine breite Palette inflammatorischer Marker in der Leber und auch im Hypothalamus 24 h nach LPS- oder PBS-Injektion auf eine mögliche Auswirkung der Rosiglitazon-Vorbehandlung untersucht.

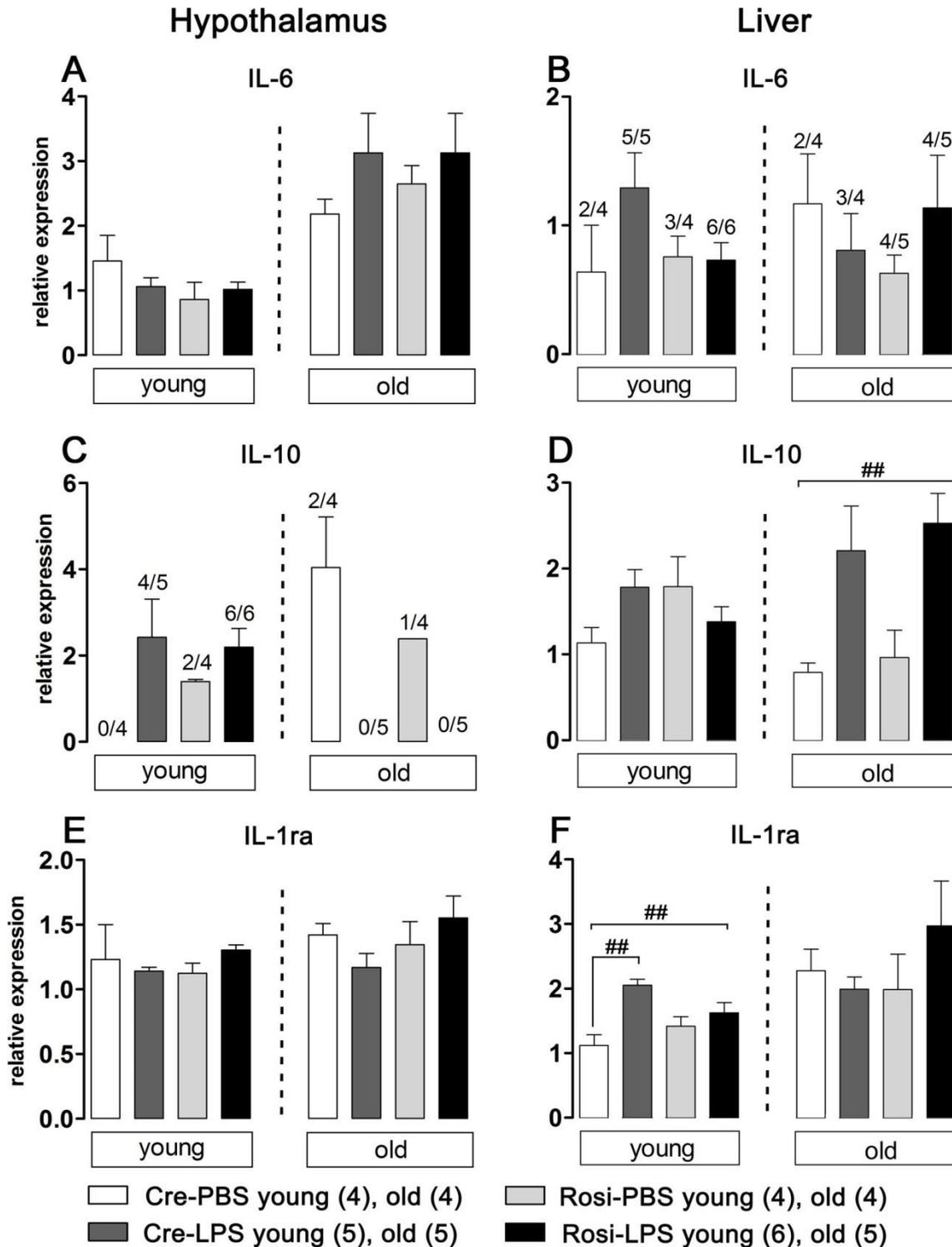
Bei der Untersuchung der inflammatorischen Transkriptionsfaktoren, bzw. deren Aktivitätsmarker  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ , SOCS3 und NF-IL6 konnte ein statistisch signifikanter Effekt von LPS nur bei der SOCS3-Expression der alten Ratten in der Leber nachgewiesen werden (Abbildung 55, D). LPS führte hier zu einem Anstieg der SOCS3-Expression unabhängig von der Vorbehandlung. Ein signifikanter Einfluss der Rosiglitazon-Vorbehandlung auf die Expression der Transkriptionsfaktoren wurde nicht deutlich.



**Abbildung 55: Auswirkung von Rosiglitazon auf die mRNA-Expression inflammatorischer Transkriptionsfaktoren in Hypothalamus und Leber**

Induktion der Expression inflammatorischer Transkriptionsfaktoren in Hypothalamus und Leber 24 h nach Injektion von LPS (100 µg/kg) oder PBS nach Vorbehandlung mit Rosiglitazon (3 mg/kg) oder dem Lösungsmittel Cremophor von jungen und alten Ratten. # Haupteffekt der LPS-Behandlung. (*post-hoc*) #  $P < 0.05$ . IκBα, „inhibitor of“ kappa B α; SOCS3, „suppressor of cytokine signaling“ 3; NF-IL6, „nuclear factor“ interleukin 6.

Die Untersuchung der Zytokine ergab im Hypothalamus weder einen statistisch nachweisbaren Effekt der LPS-Behandlung noch der Rosiglitazon-Vorbehandlung (Abbildung 56, A, C, E). In der Leber wurde für IL-10 bei den alten Ratten und IL-1ra bei den jungen Ratten eine Hochregulation der mRNA-Expression durch LPS festgestellt. Für IL-1ra wurde in nachgeschalteten *post-hoc* Tests deutlich, dass die Hochregulation der mRNA-Expression nur die Cre-LPS Gruppe im Vergleich zur Cre-PBS Gruppe betraf (Abbildung 56, D, F).

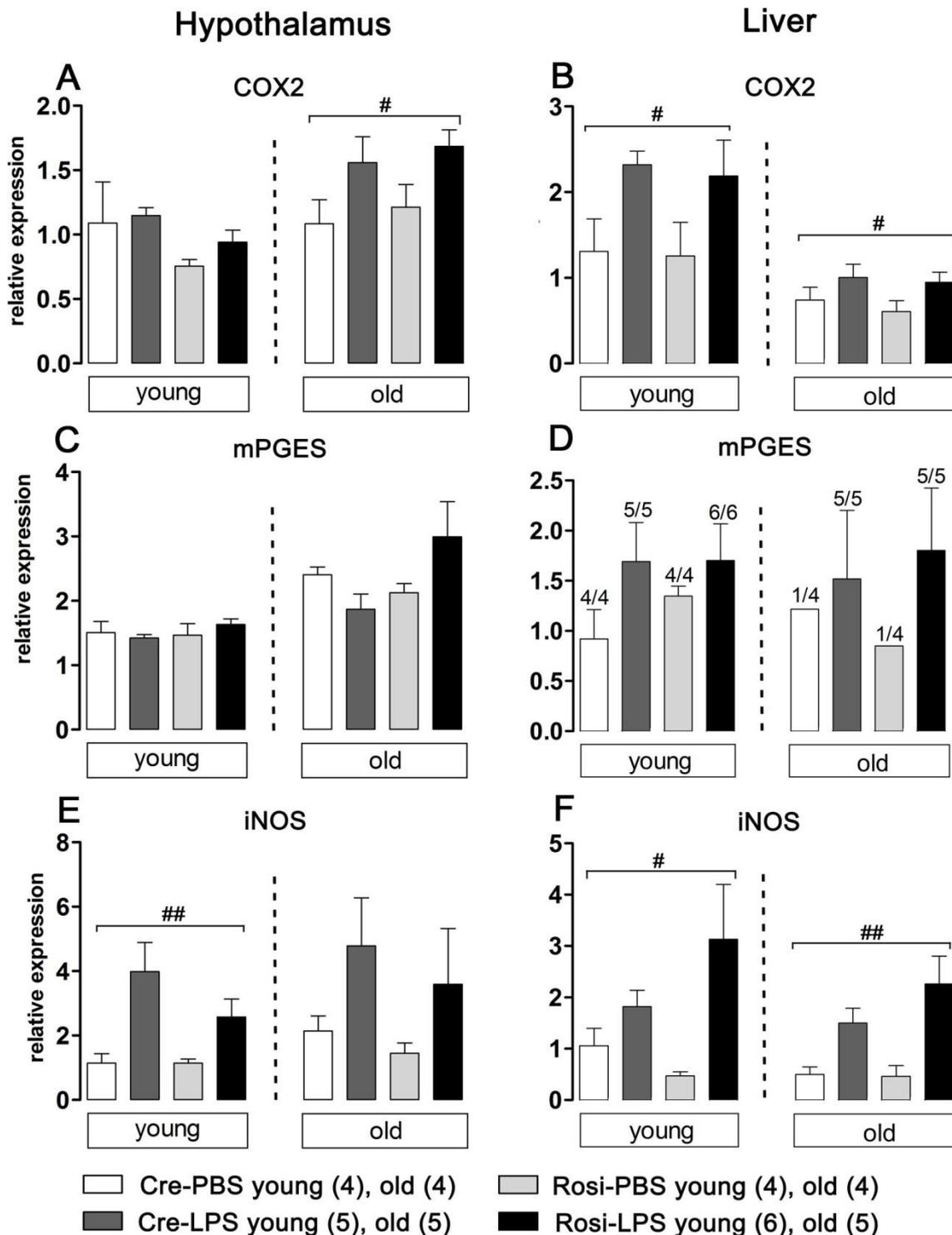


**Abbildung 56: Auswirkung von Rosiglitazon auf die mRNA-Expression von Zytokinen in Hypothalamus und Leber**

Induktion der Expression von Zytokinen in Hypothalamus und Leber 24 h nach Injektion von LPS (100 µg/kg) oder PBS nach Vorbehandlung mit Rosiglitazon (3 mg/kg) oder dem Lösungsmittel Cremophor von jungen und alten Ratten. # Haupteffekt der LPS-Behandlung / Vergleich LPS mit korrespondierender PBS-Gruppe (*post-hoc*). ##  $P < 0.01$ . Zahlen über den Säulen geben bei Abweichungen die Anzahl amplifizierter Proben innerhalb der Gesamtprobenzahl an.

Was die Enzyme der Prostaglandinsynthese betrifft, erhöhte die Stimulation mit LPS die Expression von COX2 bei den jungen Ratten in der Leber und bei den alten Ratten sowohl im Hypothalamus als auch in der Leber. mPGES blieb in diesem Fall durch die LPS-Behandlung unbeeinflusst (Abbildung 57, A-D).

Die ebenfalls untersuchte iNOS wurde durch LPS-Injektion ebenfalls hochreguliert, bei den alten Ratten nur in der Leber, bei den jungen Ratten jedoch in beiden Organen (Abbildung 57, E-F). Rosiglitazon bewirkte keine Veränderung der Genexpression



### Abbildung 57: Auswirkung von Rosiglitazon auf die mRNA-Expression von Enzymen der Prostaglandinsynthese und iNOS in Hypothalamus und Leber

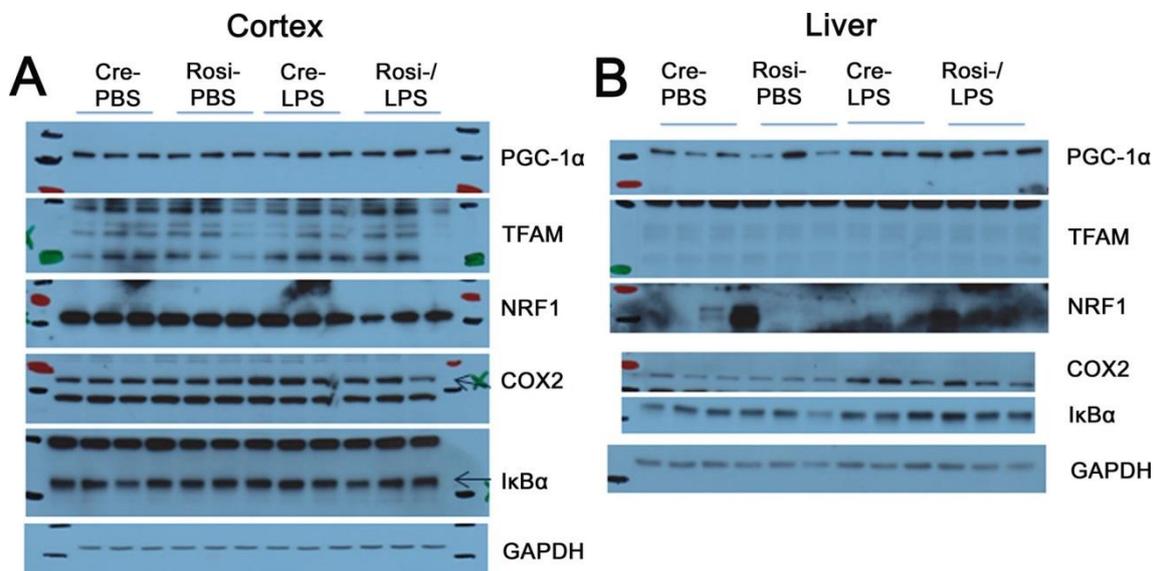
Induktion der Expression von Enzymen der Prostaglandinsynthese und iNOS in Hypothalamus und Leber 24 h nach Injektion von LPS (100 µg/kg) oder PBS nach Vorbehandlung mit Rosiglitazon (3 mg/kg) oder dem Lösungsmittel Cremophor von jungen und alten Ratten. # Haupteffekt der LPS-Behandlung. (*post-hoc*) #,  $P < 0.05$ ; ##  $P < 0.01$ . Zahlen über den Säulen geben bei Abweichungen die Anzahl amplifizierter Proben innerhalb der Gesamtprobenzahl an. mPGES, mikrosomale Prostaglandin E Synthase; COX2, Zyklooxygenase 2; iNOS, induzierbare NO Synthase.

### 3.4 Auswirkung von Rosiglitazon auf die Proteinexpression von Markern für oxidativen Stress (In Kooperation mit Dr. Wenz)

In Kooperation mit Dr. Tina Wenz wurden im Institut für Genetik der Universität Köln von den dortigen Mitarbeitern der Cortex und die Leber der jungen und alten Ratten mittels Westernblot exemplarisch auf eine Veränderung der Proteinexpression der untersuchten oxidativen Stressmarker PGC-1 $\alpha$ , NRF1 und TFAM, sowie von COX2 und I $\kappa$ B $\alpha$  durch Rosiglitazon-Vorbehandlung untersucht (Abbildung 58).

Im Cortex wurde weder ein Effekt der LPS-Stimulation noch der Rosiglitazon-Vorbehandlung auf die untersuchten Proteine sichtbar.

In der Leber konnte auf Proteinebene ebenfalls kein signifikanter Effekt von Rosiglitazon dargestellt werden. Allerdings zeigte sich hier eine gesteigerte Proteinexpression der inflammatorischen Marker COX2 und I $\kappa$ B $\alpha$  nach LPS-Stimulation.



### Abbildung 58: Auswirkung von Rosiglitazon auf Proteinebene

Induktion der Proteinexpression von oxidativen Stressmarkern sowie inflammatorischen Markern in Cortex und Leber 24 h nach Injektion von LPS (100 µg/kg) oder PBS nach Vorbehandlung mit Rosiglitazon (3 mg/kg) oder dem Lösungsmittel Cremophor von jungen und alten Ratten.

## 4. Charakterisierung altersbedingter Veränderungen in der Aktivierung der HPA-Achse durch LPS und „novel environment“ Stress

### 4.1 Altersabhängige Unterschiede in der Zytokinfreisetzung in der LPS-stimulierten primären HVL-Zellkultur

Zur Untersuchung altersassoziierter Veränderungen in der Zytokinfreisetzung durch den Hypophysenvorderlappen wurden primäre Zellkulturen dieses Gewebes für 6 h mit LPS (100 µg/kg) oder PBS stimuliert. 30 Minuten vorher erfolgte zum Teil zusätzlich zur Untersuchung der Interaktion von Zytokinen eine Inkubation mit verschiedenen Zytokinantikörpern (AB = „antibody“). Um Effekte des dem Zellkulturmedium zugefügten Serums auf die Zytokinproduktion auszuschließen, wurden die Zellen 24 h vor Versuchsbeginn mit serumfreiem Medium inkubiert. Mittels Bioassay wurden im Überstand der HVL-Zellkulturen die Gehalte der proinflammatorischen Zytokine TNF $\alpha$  und IL-6 gemessen und die Ergebnisse mittels one-way ANOVA statistisch ausgewertet. Anschließend wurden die verbliebenen Zellen immunzytochemisch auf NF-IL6-, TNF $\alpha$ - und ACTH-Aktivierung untersucht.

PBS	LPS
+ IL-6 AB	+ IL-6 AB
+ IL-10 AB	+ IL-10 AB
+ TNF $\alpha$ AB	+ TNF $\alpha$ AB
+ IL-1ra	+ IL-1ra

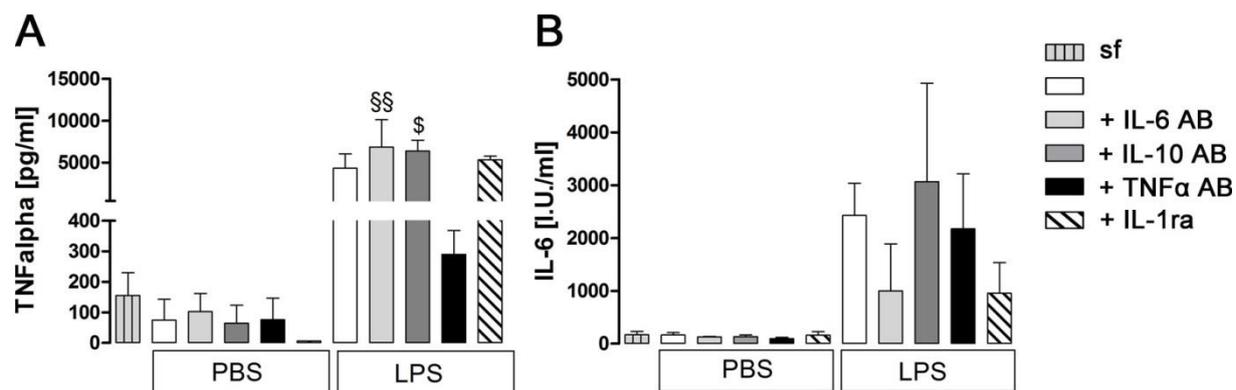
#### 4.1.1 Konzentration proinflammatorischer Zytokine im Überstand der HVL-Zellkultur

##### TNF $\alpha$

Eine Stimulation der Zellkultur mit LPS führte bei allen Behandlungen zu einem Anstieg der TNF $\alpha$ -Freisetzung (Abbildung 59, A) (Tabelle 27). Eine Inkubation mit den Antikörpern gegen IL-6 ( $6859 \pm 3268$ ) und IL-10 ( $6391 \pm 1287$ ) steigerte die TNF $\alpha$ -Sekretion zusätzlich und führte zu einer signifikanten Zunahme der Konzentration im Vergleich zu der korrespondierenden PBS-Kontrollgruppe. Eine Vorinkubation mit dem TNF $\alpha$  Antikörper führte zu einer wesentlich niedrigeren TNF $\alpha$ -Konzentration im Überstand ( $290,3 \pm 77,79$ ) nach LPS-Stimulation im Vergleich zur alleinigen LPS-Behandlung ( $4341 \pm 1701$ ). Die Behandlung der PBS-stimulierten Zellkultur mit IL-1ra bewirkte eine Erniedrigung der TNF $\alpha$ -Ausschüttung bis unter die Detektionsgrenze (6 pg/ml). Ein weiterer Einfluss der verwendeten Zytokinantikörper in den PBS-stimulierten Behandlungsgruppen auf die TNF $\alpha$ -Freisetzung wurde nicht beobachtet.

## IL-6

Eine Stimulation der Zellkultur mit LPS bewirkte einen deutlichen Anstieg der Gehalte an IL-6 im Überstand unabhängig von der Vorbehandlung (Abbildung 59, B) (Tabelle 27). Eine Vorinkubation mit dem Antikörper gegen IL-6 und Stimulation mit LPS ( $997,5 \pm 890,8$ ) bewirkte eine geringere IL-6-Konzentration im Überstand im Vergleich zur alleinigen Stimulation mit LPS ( $2425 \pm 609,8$ ), welche jedoch nicht signifikant unterschiedlich war. Ansonsten fanden sich keine weiteren signifikanten Auswirkungen der verwendeten Zytokinantikörper auf die IL-6-Freisetzung.



**Abbildung 59: Konzentration proinflammatorischer Zytokine im Überstand der HVL-Zellkultur**

Konzentration von  $\text{TNF}\alpha$  (A) und IL-6 (B) im Überstand der HVL-Zellkultur 6 h nach Stimulation mit LPS ( $100 \mu\text{g/ml}$ ) oder PBS alleine oder nach vorheriger Inkubation mit Zytokinantikörpern (AB = „antibody“). § = Vergleich IL-6 AB + PBS mit IL-6 AB + LPS; \$ Vergleich IL-10 AB + PBS mit IL-10 AB + LPS. §  $P < 0,05$ ; §§  $P < 0,01$ .

	<b>TNF<math>\alpha</math> (pg/ml)</b>	<b>IL-6 (I.U./ml)</b>
<b>Serunfreies Medium</b>	$155,5 \pm 74,82$	$167,1 \pm 64,4$
<b>PBS</b>	$74,5 \pm 68,5$	$162,8 \pm 48,13$
<b>PBS + IL-6 AB</b>	$102,5 \pm 59,65$	$125,5 \pm 9,39$
<b>PBS + IL-10 AB</b>	$64,83 \pm 58,83$	$133,3 \pm 29,96$
<b>PBS + TNF<math>\alpha</math> AB</b>	$76,17 \pm 70,17$	$95,17 \pm 21,55$
<b>PBS + IL-1ra</b>	$6 \pm 0$ (D.L.)	$162 \pm 64,26$
<b>LPS</b>	$4341 \pm 1701$	$2425 \pm 609,8$
<b>LPS + IL-6 AB</b>	$6859 \pm 3268$	$997,5 \pm 890,8$
<b>LPS + IL-10 AB</b>	$6391 \pm 1287$	$3063 \pm 1866$
<b>LPS + TNF<math>\alpha</math> AB</b>	$290,3 \pm 77,79$	$2172 \pm 1042$
<b>LPS + IL-1ra</b>	$5345 \pm 434,1$	$958 \pm 576,7$

**Tabelle 27: Konzentration proinflammatorischer Zytokine im Überstand der HVL-Zellkultur**

#### 4.1.2 Expressionsmuster von NF-IL6, TNF $\alpha$ und ACTH auf Proteinebene mittels Immunhistochemie in der HVL-Zellkultur

Nach Abnahme des Überstands wurden die Zellen immunzytochemisch angefärbt und auf die Intensität der NF-IL6-, TNF $\alpha$ - und ACTH-Aktivität untersucht, sowie zusätzlich semiquantitativ beurteilt (Abbildung 60, Tabelle 28).

In allen Zellkulturen führte die Stimulation mit LPS zu einer deutlichen Zunahme der NF-IL6 Immunreaktivität im Vergleich zu den PBS-behandelten Kontrollen. Diese Zunahme war unabhängig von der Vorbehandlung mit einem Zytokinantikörper zu beobachten. Lediglich bei der Vorinkubation mit dem antiinflammatorischen Zytokin IL-1ra wurde nach LPS-Stimulation eine weniger deutliche Zunahme der NF-IL6 Signale festgestellt (++) im Vergleich zu den anderen Behandlungen (+++) (Abbildung 60, J). Auch die PBS-stimulierten Zellen wiesen eine geringe Dichte an NF-IL6-Signalen auf, welche ebenfalls nach IL-1ra-Vorinkubation geringgradig weniger ausgeprägt war (Abbildung 60, I).

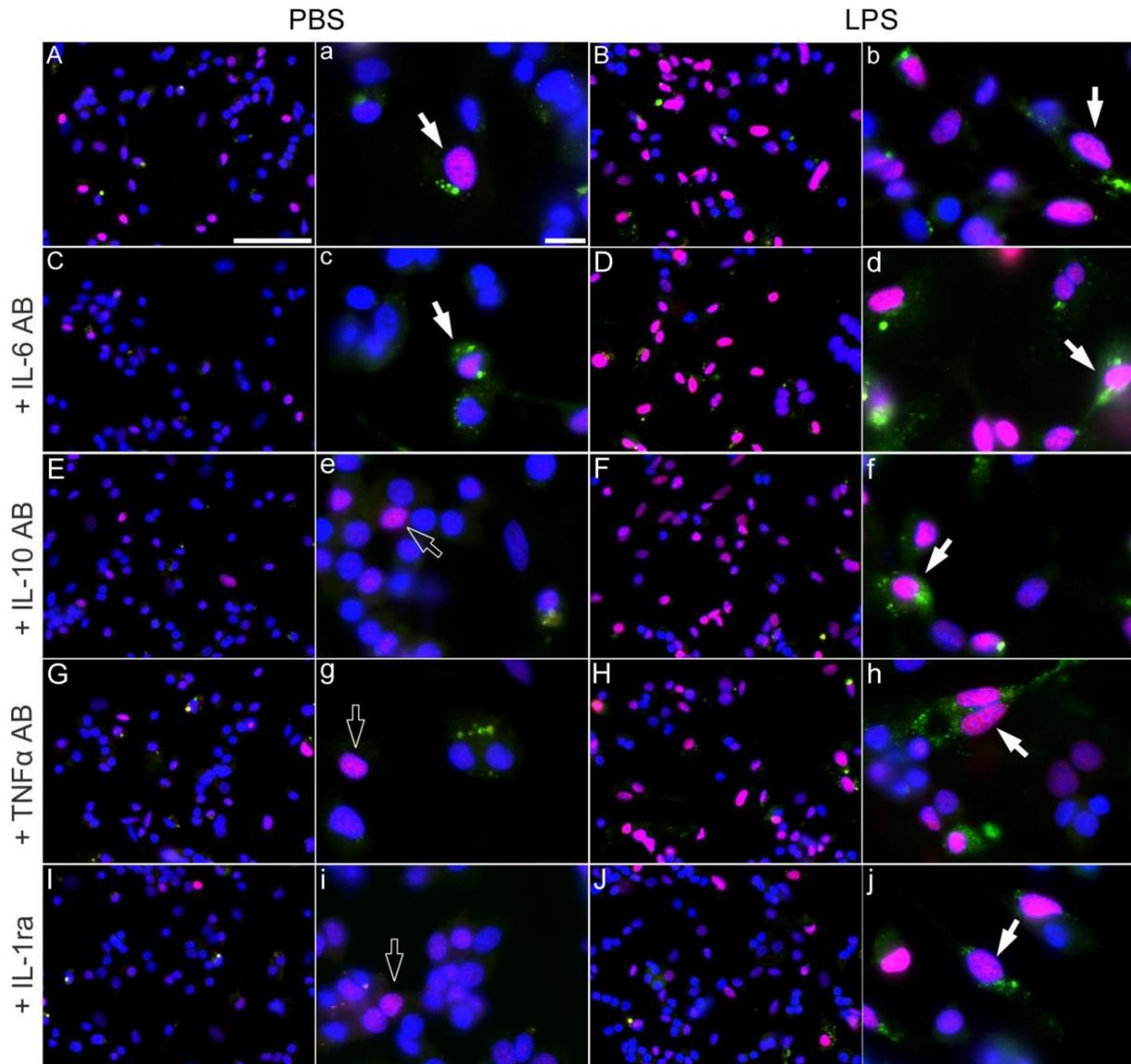
Bei der Beurteilung der TNF $\alpha$ -Immunreaktivität konnte kein deutlicher Unterschied zwischen den Behandlungen gesehen werden, da diese auch in den PBS-stimulierten Kontrollen vorhanden war. Nach LPS-Stimulation fiel auf, dass vermehrt eine Kolokalisation zwischen NF-IL6-positiven und TNF $\alpha$ -markierten Zellen auftrat, während bei den PBS-stimulierten Zellkulturen die TNF $\alpha$ -Immunreaktivität häufiger auch in NF-IL6-negativen Zellen zu finden war. Die Vorinkubation mit verschiedenen Zytokinantikörpern hatte keinen deutlich sichtbaren Effekt auf die Intensität der TNF $\alpha$ -Immunreaktivität.

Eine deutliche ACTH-Immunreaktivität, welche vor allem in Bereichen mit größeren Zellansammlungen oder Zellhaufen auftrat, konnte in allen Zellkulturen beobachtet werden (Abbildung 61). Es wurden keine sichtbaren Unterschiede durch Stimulation mit LPS im Vergleich zur PBS-Kontrolle, oder durch Vorinkubation mit den verwendeten Antikörpern festgestellt.

	NF-IL6 I.R.	ACTH I.R.
<b>PBS</b>	+ (3)	++ (4)
<b>PBS + IL-6 AB</b>	± (2,3)	++ (4)
<b>PBS + IL-10 AB</b>	+ (3)	++ (4)
<b>PBS + TNF<math>\alpha</math> AB</b>	± (2,3)	++ (4)
<b>PBS + IL-1ra</b>	± (2)	++ (4)
<b>LPS</b>	+++ (4,67)	++ (4)
<b>LPS + IL-6 AB</b>	+++ (4,67)	++ (4)
<b>LPS + IL-10 AB</b>	+++ (4,67)	++ (4)
<b>LPS + TNF<math>\alpha</math> AB</b>	+++ (4,67)	++ (4)
<b>LPS + IL-1ra</b>	++ (4)	++ (4)

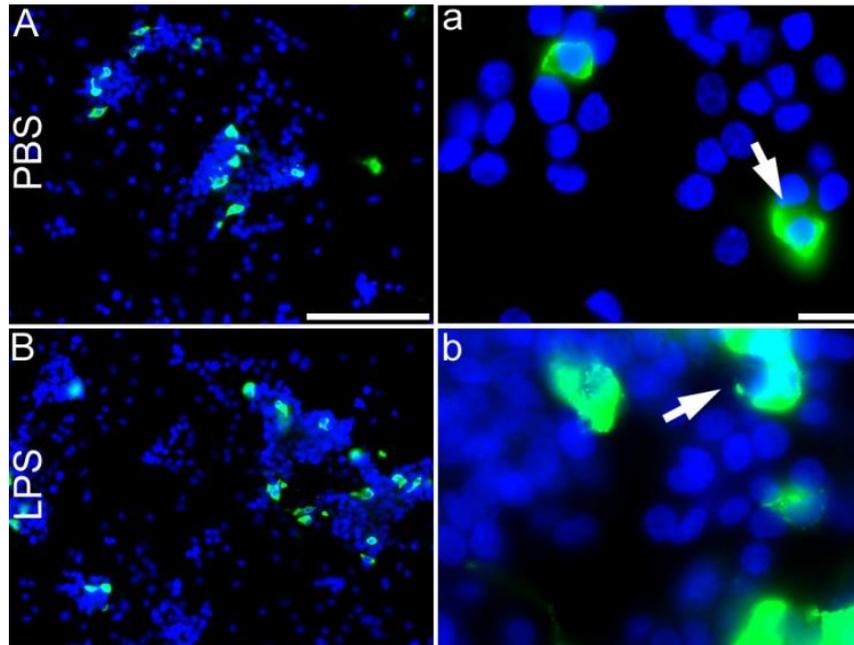
**Tabelle 28: Semiquantitative Analyse der nukleären NF-IL6 I.R. und ACTH I.R. in der primären Zellkultur des Hypophysenvorderlappens**

- (1) = keine Signale, ± (2) = vereinzelte Signale, + (3) = niedrige Dichte, ++ (4) = mittlere Dichte, +++ (5) = hohe Dichte. Auswertung: 3 Zellkulturen pro Behandlung, 1 Schnitt pro Zellkultur



**Abbildung 60: NF-IL6 Immunreaktivität in der primären Zellkultur des Hypophysenvorderlappens 6 h nach Stimulation mit LPS (100 µg/ml) oder PBS alleine oder mit zusätzlicher Vorinkubation mit Zytokinantikörpern.**

Großbuchstaben kennzeichnen Übersichtsaufnahmen, Kleinbuchstaben markieren Detailaufnahmen aus der jeweiligen Zellkultur. NF-IL6 Signale im roten Kanal sind durch Überlagerung mit dem Zellkernmarker DAPI (blau) pink dargestellt. TNF $\alpha$  Signale im Zytoplasma der Zelle sind grün dargestellt. Offene Pfeile verweisen auf nukleäre NF-IL6 Signale, gefüllte Pfeile auf nukleäre NF-IL6 Signale in mit TNF $\alpha$ -markierten Zellen. Größenmarker in A entspricht 50 µm in allen Übersichtsaufnahmen, Größenmarker in a entspricht 10 µm in allen Detailaufnahmen.



**Abbildung 61: ACTH-Immunreaktivität in der primären Zellkultur des Hypophysenvorderlappen 6 h nach Stimulation mit LPS (100 µg/ml) oder PBS.**

A-B kennzeichnen Übersichtsaufnahmen und a-b Detailaufnahmen aus der jeweiligen Zellkultur. Die Zellkerne sind im blauen Kanal dargestellt (DAPI), ACTH-positive Zellen sind grün markiert. Gefüllte Pfeile verweisen auf ACTH-markierte Zellen in den Detailaufnahmen.

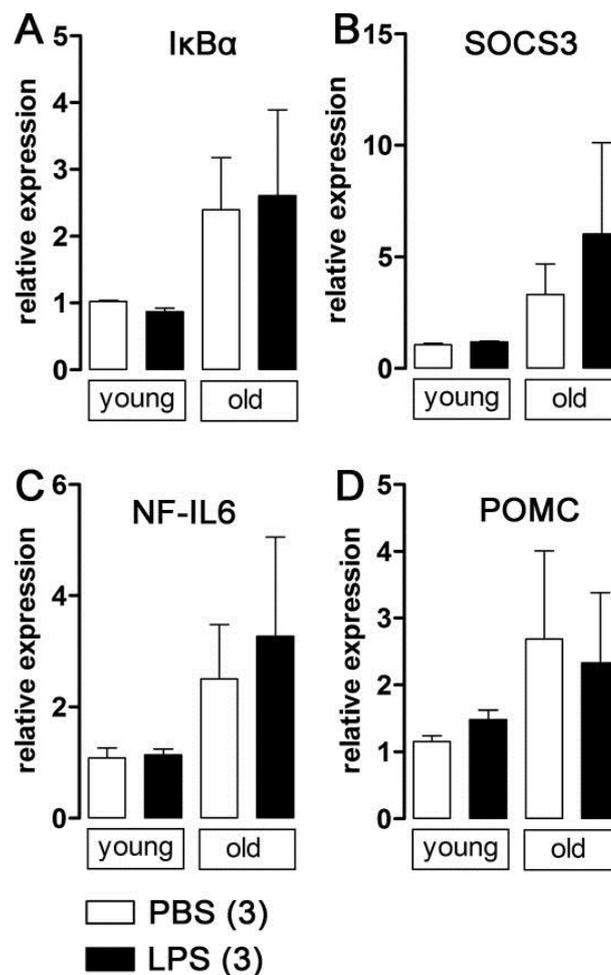
Größenmarker in A entspricht 100 µm in allen Übersichtsaufnahmen, Größenmarker in a entspricht 10 µm in allen Detailaufnahmen.

## 4.2 Altersbedingte Unterschiede in der mRNA-Expression und Immunreaktivität inflammatorischer Transkriptionsfaktoren nach LPS-Stimulus in der Hypophyse

Zur weiteren Charakterisierung altersbedingter Unterschiede in der Aktivierung inflammatorischer Marker in der Hypophyse nach LPS-Stimulus wurden junge und alte Ratten 24 h nach Stimulation mit LPS (100 µg/kg) oder PBS auf eine Veränderung der Expression von inflammatorischen Transkriptionsfaktoren auf mRNA- oder Proteinebene untersucht.

### 4.2.1 Altersbedingte Unterschiede in der mRNA-Expression

In der Hypophyse wurden die wichtigsten Transkriptionsfaktoren bzw. deren negative Regulatoren I $\kappa$ B $\alpha$ , SOCS3 und NF-IL6, sowie das für die ACTH-Bildung wichtige Prohormon Proopiomelanocortin (POMC) mittels real-time PCR untersucht (Abbildung 62). Für alle Transkriptionsfaktoren und POMC zeigte sich bei den alten Ratten eine tendenzielle Erhöhung der mRNA-Expression, sowohl basal (PBS) als auch nach LPS-Stimulation. Aufgrund der hohen Standardfehler in diesen Gruppen, welche vermutlich auf die geringe Tierzahl zurückzuführen sind, konnte kein signifikanter Unterschied festgehalten werden.



### Abbildung 62: Altersbedingte Unterschiede der mRNA-Expression inflammatorischer Marker in der Hypophyse

Induktion der mRNA-Expression inflammatorischer Marker in der Hypophyse nach Injektion mit LPS (100 µg/kg) oder PBS von jungen und alten Ratten. IκBα, „inhibitor of“ kappa B α; SOCS3, „suppressor of cytokine signaling“ 3; NF-IL6, „nuclear factor“ interleukin 6; POMC, Proopiomelanocortin.

#### 4.2.3 Altersbedingte Unterschiede in der Immunreaktivität

Mittels indirekter Immunfluoreszenz wurde der Transkriptionsfaktor NF-IL6 in der Hypophyse auf altersbedingte Unterschiede in der Immunreaktivität untersucht und die Signaldichte zusätzlich semiquantitativ ausgewertet (Tabelle 29). Mittels Doppelmarkierung mit Zellmarkerproteinen wurde des Weiteren eine eventuelle Kolokalisation der nukleären NF-IL6 Signale mit GFAP- oder CD68-positiven Zellen untersucht (Abbildung 63, Abbildung 64).

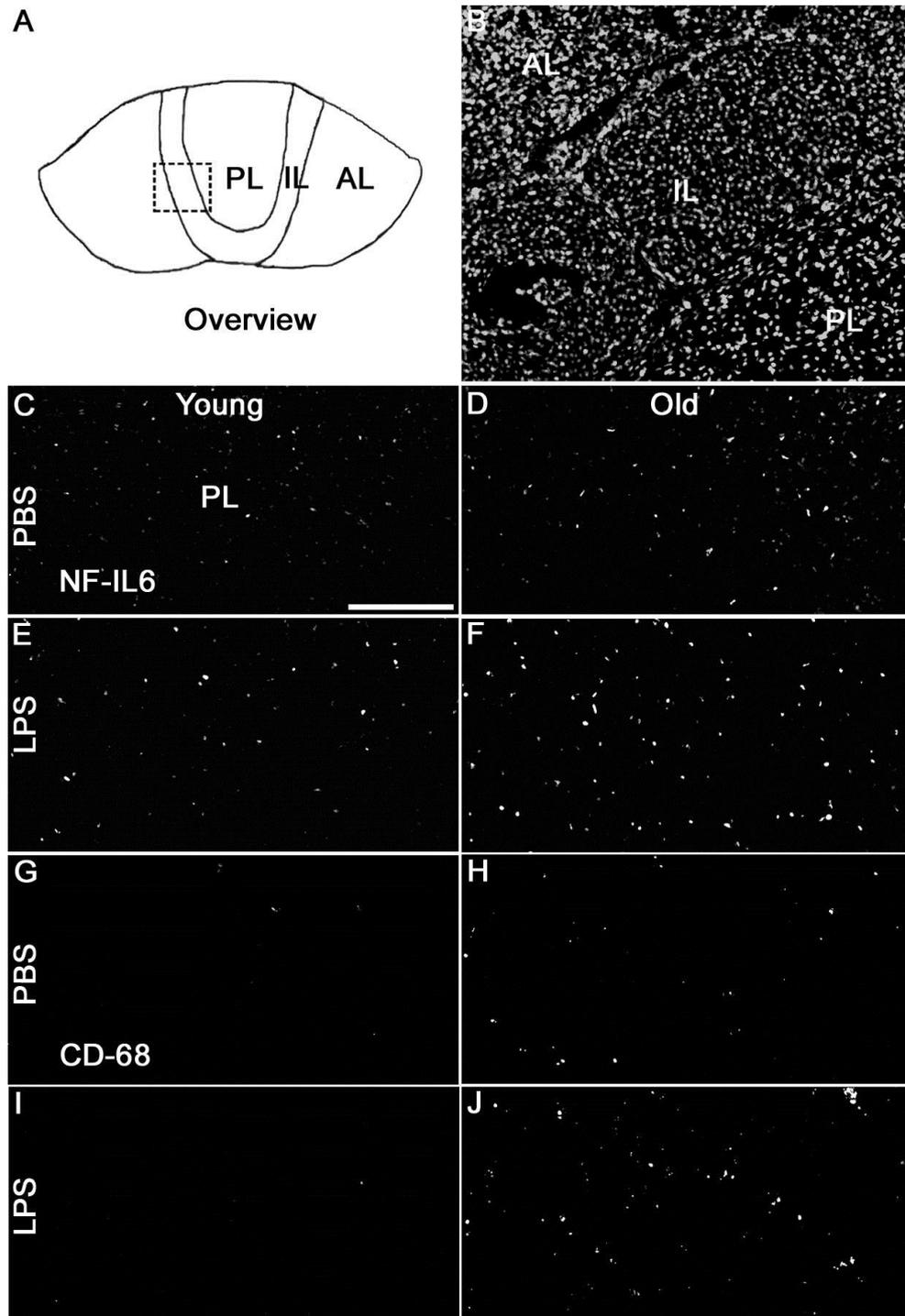
Während der Hypophysenzwischenlappen („intermediate lobe“) unabhängig von den Behandlungsgruppen nur vereinzelte Signale aufwies, konnte im Hypophysenvorderlappen („anterior lobe“) ein deutlicher Unterschied in der Anzahl an NF-IL6 Signalen zwischen den PBS-Kontrolltieren (+) und den LPS-injizierten Tieren (++) dargestellt werden, wobei sich hier die beiden Altersgruppen nicht unterschieden.

Auch im Hypophysenhinterlappen („posterior lobe“) wurde dieser LPS-bedingte Anstieg der nukleären NF-IL6-Translokation beobachtet. Hier wurde jedoch zusätzlich ein altersassoziierter Unterschied festgestellt. Die alten Ratten hatten sowohl basal nach PBS-Injektion (++) als auch nach LPS-Injektion (+++) eine höhere Signaldichte als die jungen PBS- (±) oder LPS-injizierten (++) Ratten (Abbildung 63, C-F und Abbildung 64, A-H). Bei der Untersuchung einer möglichen Kolokalisation fiel auf, dass im Hypophysenhinterlappen der alten PBS- (++) oder LPS-stimulierten (+++) Ratten ebenfalls deutlich mehr CD68-positive Zellen detektiert wurden als bei den korrespondierenden jungen Ratten (± für PBS und + für LPS) (Abbildung 63, G-J und Abbildung 64, E-H). Die NF-IL6 Signale waren zum Teil mit CD68-positiven Zellen kolokalisiert. Im Gegensatz dazu wurden kaum Kolokalisationen von NF-IL6 Signalen mit GFAP-positiven Zellen beobachtet (Abbildung 64, A-D).

	PBS young	LPS young	PBS old	LPS old
<b>nuclear NF-IL6 immunoreactivity</b>				
<b>Anterior lobe</b>	+ (2,7)	++ (3,9)	+ (2,73)	++ (3,87)
<b>Intermediate lobe</b>	± (1,5)	± (1,65)	± (1,67)	± (2,2)
<b>Posterior lobe</b>	± (2,3)	++ (3,73)	++ (3,5)	+++ (4,87)
<b>CD68 immunoreactivity</b>				
<b>Anterior lobe</b>	++ (3,5)	++ (4)	++ (3,83)	++ (4,3)
<b>Intermediate lobe</b>	- (1)	- (1)	± (1,83)	± (1,67)
<b>Posterior lobe</b>	± (2,25)	+ (3)	++ (4)	+++ (4,83)

**Tabelle 29: Semiquantitative Analyse der nukleären NF-IL6 I.R. und CD68 I.R. in der Hypophyse nach i.p. Injektion junger und alter Ratten**

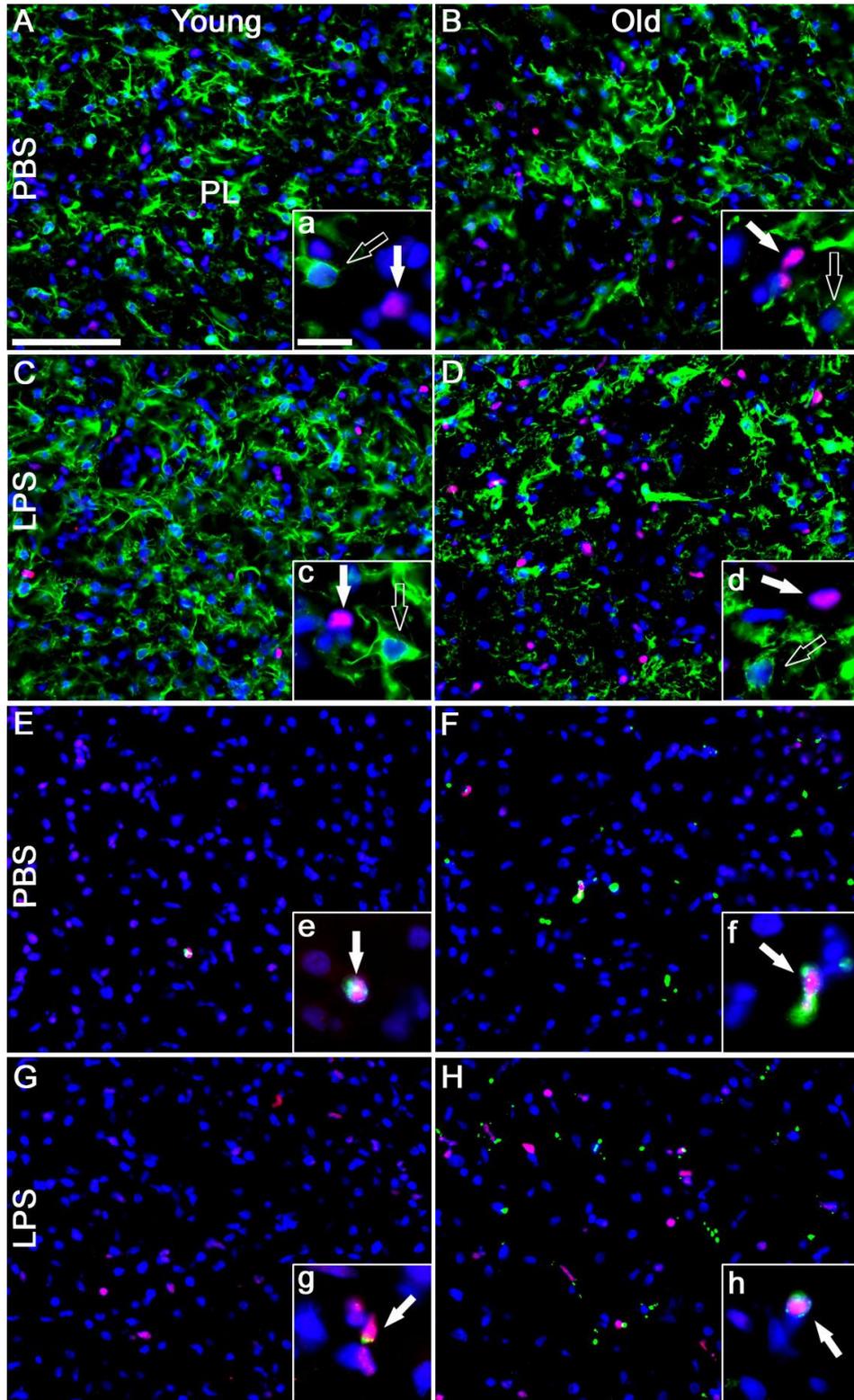
- (1) = keine Signale, ± (2) = vereinzelte Signale, + (3) = niedrige Dichte, ++ (4) = mittlere Dichte, +++ (5) = hohe Dichte. Auswertung NF-IL6 I.R.: 2-3 Tiere pro Gruppe, 4 – 10 Schnitte pro Tier. Auswertung CD68 I.R.: 2-3 Tiere pro Gruppe, 2 Schnitte pro Tier



**Abbildung 63: NF-IL6 und CD-68 Immunreaktivität im Hypophysenhinterlappen 24 h nach i.p. Injektion von LPS (100 µg/kg) oder PBS von jungen und alten Ratten.**

Die schematische Darstellung der Hypophyse (A), sowie die Darstellung einer Kernfärbung (DAPI, B) dienen der Veranschaulichung der Aufteilung der Hypophyse in Vorderlappen (anterior lobe = AL), Zwischenlappen („intermediate lobe“ = IL) und Hinterlappen („posterior lobe“ = PL). Alle weiteren Abbildungen stellen Übersichtsaufnahmen des Hinterlappens (PL) dar. Abbildungen C-F zeigen die NF-IL6 Signaldichte (weiße Signale), Abbildungen G-J die CD-68 Signaldichte (weiße Signale).

Der Größenmarker in C entspricht 100  $\mu\text{m}$  und gilt in allen Übersichtsaufnahmen.



**Abbildung 64: NF-IL6 und CD-68 Immunreaktivität im Hypophysenhinterlappen 24 h nach i.p. Injektion von LPS (100 µg/kg) oder PBS von jungen und alten Ratten.** Großbuchstaben markieren Übersichtsaufnahmen, Kleinbuchstaben markieren Detailaufnahmen des Hypophysenhinterlappens. Abbildungen A-D zeigen eine NF-IL6-Färbung (rot) in Kombination mit dem Zellmarker GFAP (grün).

Abbildungen E-F zeigen eine NF-IL6 Färbung (rot) in Kombination mit dem Zellmarker CD68 (grün). Der Zellkernmarker DAPI ist in allen Abbildungen blau dargestellt. Durch Überlagerung mit NF-IL6 weist eine pinke Färbung auf nukleäre Signale in allen Abbildungen hin.

Gefüllte Pfeile weisen auf nukleäre NF-IL6 Signale (a-d) in Kombination mit C68-immunreaktiven Zellen (e-h), offene Pfeile auf GFAP-immunreaktive Zellen (a-d, keine Kolokalisation).

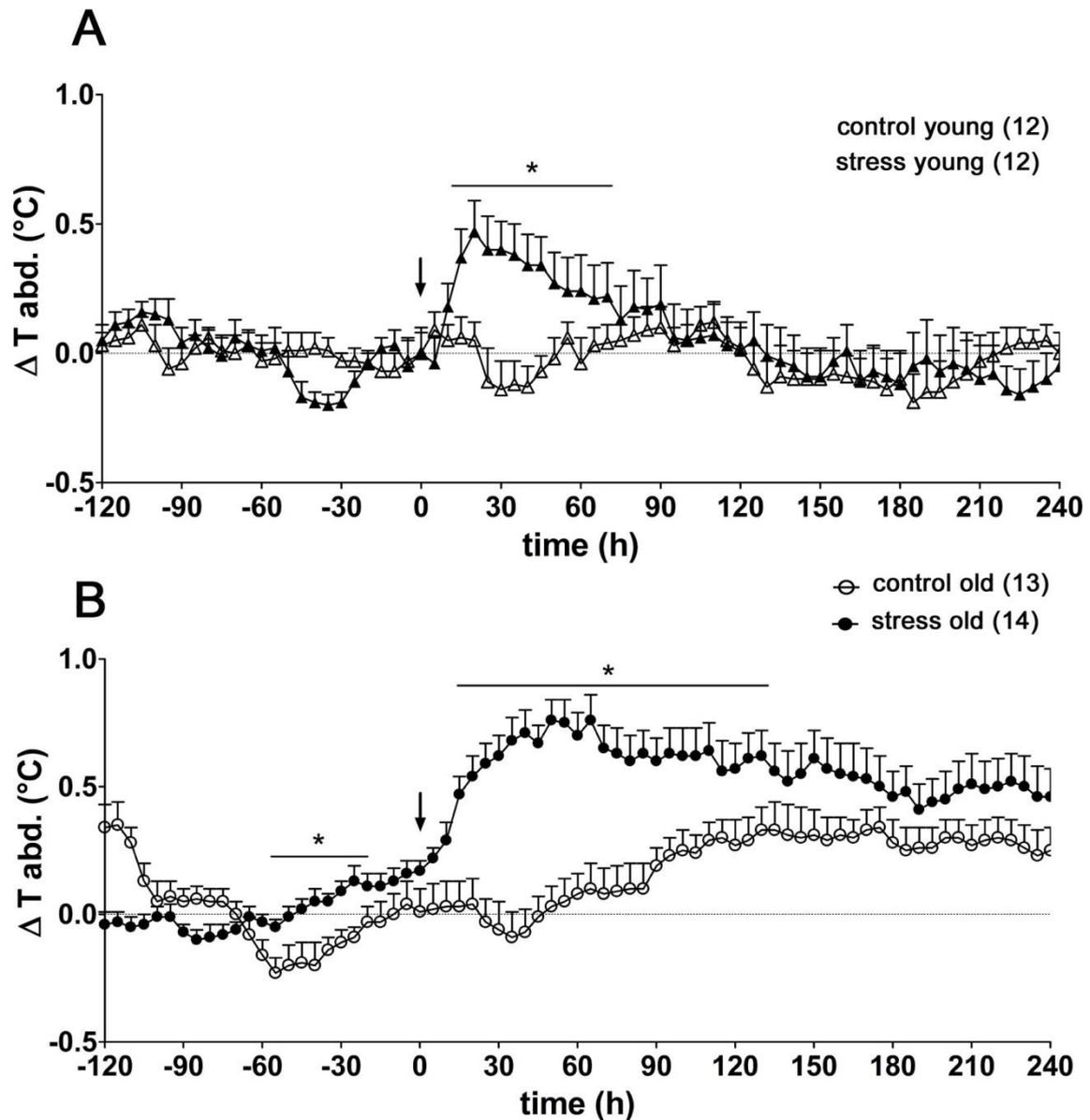
Der Größenmarker in A entspricht 50  $\mu\text{m}$  und gilt in allen Übersichtsaufnahmen, der Größenmarker in a entspricht 10  $\mu\text{m}$  und gilt in allen Detailaufnahmen.

### **4.3 Altersbedingte Veränderungen physiologischer Reaktionen auf eine neue Umgebung**

Zu dem Zeitpunkt  $t = 0$  wurden die Ratten aus ihrem gewohnten Käfig (im Zuge des normalen Käfigwechsels) in einen neuen Käfig gleichen Modells umgesetzt, was ein Modell eines psychologischen Stressors darstellt und als „novel environment“ bezeichnet wird. Die Körperkerntemperatur sowie die motorische Aktivität wurden über 4 h aufgezeichnet. Die Kontrolldaten resultierten aus den Aufzeichnungen des vorhergehenden Tages, an dem die Tiere während des gleichen Zeitraums ungestört in ihrer gewohnten Umgebung verblieben. Für die Auswertung der Körperkerntemperatur wurde der Delta-T Wert ausgerechnet, wobei als Baseline der Mittelwert der Temperatur von -120 min bis 0 min gebildet wurde, welches dem gleichmäßigsten Basiswert der Tiere entsprach.

Die jungen Ratten reagierten auf den „novel environment“ Stress mit einem leichten Temperaturanstieg (Temperaturmaximum = 0,47 °C bei  $t = 20$  min), welcher sich von Zeitpunkt 5 min bis 75 min nach Umsetzung signifikant von der Körperkerntemperatur der Kontrollgruppe unterschied (Abbildung 65, A).

Im Gegensatz dazu reagierten die alten Ratten nach der Käfigumsetzung mit einem signifikanten Temperaturanstieg im Vergleich zur Kontrollgruppe, welcher von 15 min bis 140 min anhielt. Das Temperaturmaximum war mit 0,76 °C an Zeitpunkt  $t = 50$  min ebenfalls bedeutend höher als bei den jungen Tieren. Allerdings muss hierbei berücksichtigt werden, dass die Temperatur der alten gestressten Gruppe bereits kurz vor Beginn des Käfigwechsels signifikant höher war als die Temperatur der Kontrollgruppe (Abbildung 65, B).

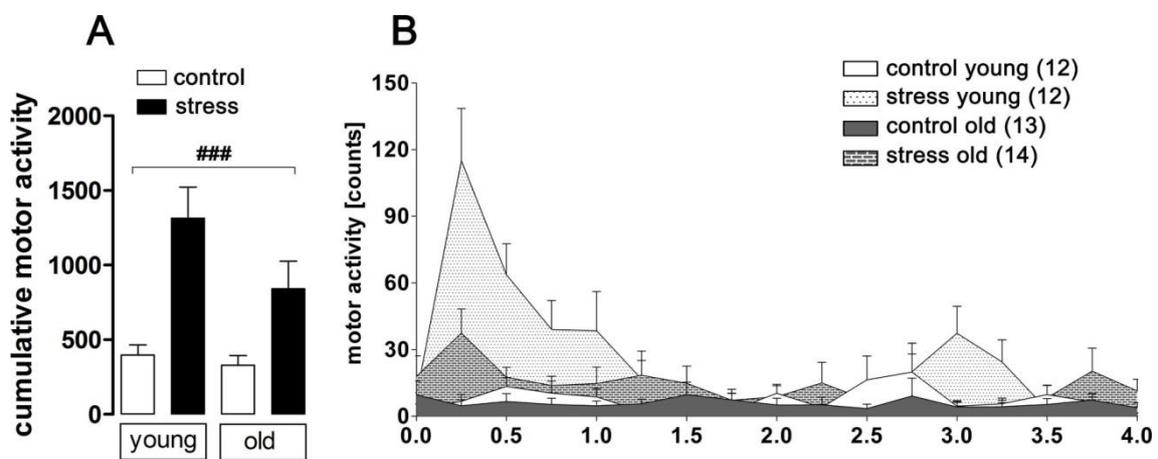


**Abbildung 65: Körperkerntemperatur nach einem „novel environment“ Stress**

Verlauf der intraabdominal gemessenen Körpertemperatur bei einem „novel environment“ Stress im Vergleich zur Kontrollgruppe über 4 h bei jungen (A) und alten (B) Ratten. Der Zeitpunkt des Käfigwechsels wurde mit einem Pfeil markiert. \*  $P < 0.05$ .

Bei der kumulativen Auswertung der motorischen Aktivität über den 4 h Zeitraum zeigte sich eine deutliche Steigerung der Aktivität nach Käfigwechsel bei beiden Altersgruppen. Obwohl diese Steigerung bei den alten Ratten nicht so deutlich war, wurde statistisch kein Unterschied zwischen den Altersgruppen festgestellt (Abbildung 66, A).

Bei der Darstellung des zeitlichen Verlaufs der Aktivität fiel auf, dass die jungen Ratten nach Beginn des „novel environment“ Stress vor allem innerhalb der ersten 60 min mit einer stark erhöhten Aktivität reagierten und sich dann der normalen Aktivität der Kontrollgruppe anpassten (Abbildung 66, B). Die alten Ratten hingegen zeigten auf den Stressor nicht diesen deutlichen Anstieg, sondern vielmehr eine kontinuierliche, geringgradige Erhöhung der Aktivität im Vergleich zur Kontrolle.



**Abbildung 66: Motorische Aktivität nach „novel environment“ Stress**

Motorische Aktivität im zeitlichen Verlauf (B) oder kumulativ (A) nach Stimulation junger und alter Ratten mit einem „novel environment“ Stress über 4 h im Vergleich zur Kontrolle. # Haupteffekt „novel environment“ Stimulus. ###  $P < 0,001$ .

	control young	stress young	control old	stress old
Aktivität 4h („counts“)	397,1±68,88	1315±207,2	328,7±65,19	841,6±184,6

**Tabelle 30: Motorische Aktivität nach „novel environment“ Stress**

## IV. Diskussion

### 1. Altersabhängige Veränderungen in der Entzündungsreaktion nach LPS-Stimulus auf verschiedenen Ebenen

#### 1.1 Veränderungen der „sickness response“ im Altern

In der vorliegenden Arbeit wurde auf Ebene physiologischer Parameter ein Einfluss des Alterns auf mehrere Parameter des LPS-induzierten „sickness behaviours“ nachgewiesen (Abbildung 24). Nach LPS-Injektion zeigten die alten Ratten eine Verstärkung der Symptome Lethargie, Adipsie und Anorexie, welche bei einer systemischen Entzündungsreaktion auftreten. Diese Befunde untermauern Ergebnisse aus anderen Studien, in denen ebenfalls eine deutlichere Reduktion der lokomotorischen Aktivität und der Futteraufnahme bei alten Ratten/Mäusen nach Immunstimulus im Vergleich zu jüngeren Tieren auftraten (Godbout et al. 2005; Godbout et al. 2008; Huang et al. 2008; Abraham & Johnson 2009). In der hier vorliegenden Studie wurde in diesem Zusammenhang auch die Wasseraufnahme zwischen jungen und alten Ratten verglichen und eine ebenfalls stärkere Reduktion des Wasserkonsums nach peripherem Entzündungsstimulus bei den alten Ratten festgestellt. Im Vergleich mit den anderen untersuchten Vitalwerten manifestierte sich der Einfluss des Alterns sogar am deutlichsten in der Verstärkung der Adipsie. Bei den Befunden zum verstärkten Gewichtsverlust bei den alten Ratten ist zu berücksichtigen, dass diese Werte sich nur in der Darstellung der Absolutwerte signifikant von den Werten der Jungtiere unterscheiden. Berechnet man die prozentuale Gewichtsänderung, was auf Grund der unterschiedlichen durchschnittlichen Körpergewichte zwischen alten und jungen Ratten eine alternative Betrachtung darstellt, findet sich kein Unterschied. Einige der vorhin erwähnten Studien haben analog zu der verstärkten Anorexie auch einen erhöhten Gewichtsverlust nach systemischer Entzündung im Alter festgestellt, wobei nur die Absolutwerte ausgewertet wurden (Godbout et al. 2005; Godbout et al. 2008). Da das Alter einen negativen Einfluss auf alle anderen gemessenen Parameter des „sickness behaviours“ hatte, erscheint dies durchaus plausibel, konnte allerdings auch hier nur unter Bestrahlung der Absolutwerte bestätigt werden.

Im Hinblick auf die Körperkerntemperatur berichten zahlreiche Studien, dass ältere Ratten/Mäuse nach verschiedenartigen Immunstimuli ein deutlich niedrigeres Fieber entwickeln oder sogar überhaupt keine Fieberreaktion aufweisen (Norman et al. 1988; Scarpace et al. 1992; Fraifeld et al. 1995; Wachulec et al. 1997). Dieses Phänomen wurde auch bei älteren Menschen beobachtet und sowohl bei menschlichen Patienten als auch in Labortierstudien wurde die fehlende Fieberreaktion mit einer erhöhten infektionsbedingten Mortalität in Zusammenhang gebracht (Gleckman & Hibert 1982; Finkelstein et al. 1983; Norman et al. 1985). Da seit mehreren Jahrzehnten die Ausprägung des „sickness behaviours“ und vor allem der Fieberreaktion als adaptives Verhalten angesehen wird, welches zur Bekämpfung der Infektion beiträgt (Bryant et al. 1971; Weinstein et al. 1978; Hart 1988), scheint die Abwesenheit von Fieber im Alter den Verlauf einer Infektionskrankheit ungünstig zu beeinflussen. Somit besteht bei älteren Patienten die ungünstige Ausgangssituation, dass

zum einen eine Infektion auf Grund der ausbleibenden Temperaturerhöhung schlechter vom Körper bekämpft wird und zum anderen nicht sofort als solche diagnostiziert wird, da die klinischen Symptome sich bei älteren Patienten anders präsentieren (Norman & Toledo 1992). Obschon die Ursachen welche das Ausbleiben der Fieberreaktion bewirken noch nicht vollständig geklärt sind, finden sich vermehrte Anzeichen in der Literatur, dass eine eingeschränkte Kapazität der Thermoregulation im Alter eine bedeutende Rolle spielt. Dies belegen Studien an Labornagern, in welchen alte Ratten bei einer höheren, thermoneutralen Raumtemperatur in der Lage waren eine gleich hohe Fieberreaktion nach LPS-Stimulus zu entwickeln wie die junge Vergleichsgruppe, während dies bei einer kälteren Umgebungstemperatur nicht der Fall war (Florez-Duquet et al. 2001; Buchanan et al. 2003; Peloso et al. 2003). Mit Berücksichtigung dieser Erkenntnisse wurde in der vorliegenden Arbeit die Umgebungstemperatur auf 28 °C eingestellt. Diese Erhöhung der Außentemperatur ermöglichte es den alten Ratten in diesem Versuchsansatz eine Fieberreaktion zu entwickeln, was die Hypothese eines altersassoziierten Kapazitätsverlustes der Thermoeffektoren bekräftigt. Die Fieberreaktion der alten Ratten unterschied sich jedoch im zeitlichen Verlauf und in ihrer Ausprägung von der jungen Vergleichsgruppe (Abbildung 23). Die jungen Ratten zeigten auf die verabreichte LPS-Dosis einen raschen Anstieg der Körperkerntemperatur und Hauptausprägung des Fiebers in den ersten 8 Stunden. Dies stellt eine typische Reaktion auf die verabreichte moderate LPS-Dosis von 100 µg/kg dar, welche auch bereits in anderen Arbeiten dokumentiert wurde (Harré et al. 2002; Damm 2012). Die alte Gruppe reagierte zunächst mit einem relativ verzögerten Temperaturanstieg und erreichte ein ähnlich hohes Fieber wie die junge Gruppe erst nach 8 Stunden. Daraufhin blieb das Fieber bei den alten Ratten jedoch bestehen und auch nach 24 Stunden wiesen sie noch eine signifikant höhere Körpertemperatur auf als die PBS-injizierte Kontrollgruppe. Somit war die Fieberreaktion bei 28 °C nicht schwächer, sondern zeigte einen tendenziell verzögerten Anstieg in der Anfangsphase gekoppelt mit einer deutlich verlängerten Fieberphase. Da das Fieber nach 24 Stunden zum Perfusionszeitpunkt der Tiere noch Bestand hatte, hätte man den eigentlichen Endzeitpunkt der Fieberreaktion nur bei einem längeren Beobachtungszeitraum feststellen können. Das Entstehen einer verlängerten Fieberphase im Alter wurde bisher lediglich in einer Studie nach Stimulation mit *E. coli* gezeigt (Barrientos et al. 2009). Die in der hier vorliegenden Arbeit gewonnenen Erkenntnisse bezeugen demnach zum ersten Mal, dass im Anschluss an eine LPS-Stimulation auch ein verlängertes Fieber im Alter auftreten kann.

## **1.2 Altersbedingte Veränderungen peripherer und zentraler inflammatorischer Parameter basal und nach Immunstimulus**

Inwieweit die vorgefundene altersbedingte stärkere Ausprägung des „sickness behaviours“ und vor allem eines zum Perfusionszeitpunkt noch bestehenden Fiebers sich auch in der Ausprägung der zirkulierenden Zytokine und inflammatorischen Marker peripher in der Leber und zentral im Hypothalamus widerspiegelt war ebenso Untersuchungsgegenstand der vorliegenden Arbeit. Damit sollten die zugrundeliegenden Mechanismen und Mediatoren der in alten Ratten verstärkt auftretenden Krankheitssymptome aufgeklärt werden.

### **Zirkulierende Zytokine im Blutplasma**

Wie bereits beschrieben wurden bei älteren Menschen basal erhöhte Werte an proinflammatorischen Zytokinen wie IL-6, TNF $\alpha$  und IL-1 $\beta$  und antiinflammatorischen Zytokinen wie IL-1ra und IL-10 in der Blutbahn festgestellt (Ershler 1993; Catania et al. 1997; Bruunsgaard et al. 1999; Alvarez-Rodriguez et al. 2012). Bei tierexperimentellen Studien konnte zum Teil bereits basal, meist aber in Zusammenhang mit einem Immunstimulus, ebenfalls eine altersbedingte Hochregulation verschiedener zirkulierender Zytokine gezeigt werden, unter anderem IL-6, TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  und IL-10 (Tateda et al. 1996; Saito et al. 2003; Godbout et al. 2005; Godbout et al. 2008; Huang et al. 2008; Henry et al. 2009).

In unserer Studie konnte weder bei den jungen noch bei den alten Ratten zirkulierendes TNF $\alpha$  in den entnommenen Proben zum Zeitpunkt 24 h nach Stimulation detektiert werden. 4 h nach LPS-Injektion konnten zwar erhöhte TNF $\alpha$  Plasmawerte gemessen werden; allerdings keine altersabhängigen Effekte. TNF $\alpha$  ist eines der ersten Zytokine, das nach LPS-Stimulation im Blutplasma auftritt. Es ist in Blutproben unstimulierter Tiere meist nicht detektierbar, erreicht seinen Konzentrationspeak innerhalb der ersten 60 Minuten und fällt innerhalb der nächsten Stunden wieder rapide ab (Roth et al. 1993). Es kann also nicht ausgeschlossen werden, dass zu einem früheren Zeitpunkt in den alten Ratten vermehrt TNF $\alpha$  gebildet wurde. IL-6 zeigte in der vorliegenden Studie basal keine Unterschiede zwischen alten und jungen Ratten, war jedoch 24 h nach LPS-Stimulation im Blutplasma der alten Ratten noch deutlich hochreguliert, während sich bei den jungen Ratten zu diesem Zeitpunkt keine Unterschiede zu dem Basalwert ergaben (Abbildung 25 A). Die zirkulierenden IL-6-Werte spiegeln somit gut die verstärkte Fieberreaktion der alten Ratten wider. IL-6 gilt generell als das Zytokin, dessen Plasmakonzentration am besten mit dem Verlauf der Fieberantwort korreliert und, im Gegensatz zu TNF $\alpha$  und IL-1 $\beta$ , während der gesamten Fieberreaktion erhöht bleibt (Ueno et al. 1989; Cartmell et al. 2000).

Auf Seiten der in dieser Arbeit untersuchten antiinflammatorischen Zytokine zeigte IL-10 keine altersabhängige Regulation. Hingegen fand sich eine altersbedingte Hochregulation in den gemessenen Konzentrationen von IL-1ra, welche auch vor allem in der LPS-stimulierten Gruppe alter Ratten seine Ausprägung fand (Abbildung 25 D). Da IL-1ra in früheren tierexperimentellen Studien in diesem Zusammenhang meistens nicht gemessen wurde, stellt dies ebenfalls eine neue Erkenntnis dar. Hinweise aus klinischen Studien an menschlichen Probanden konnten bereits eine Implikation veränderter IL-1ra Konzentrationen an den im Alter auftretenden inflammatorischen Veränderungen auf Grund erhöhter basaler Plasmawerte im Altern aufzeigen (Catania et al. 1997). IL-1ra ist in der Humanmedizin in Altersstudien ebenfalls ein prognostisch interessantes Zytokin, da ein Zusammenhang zwischen erhöhten IL-1ra Werten und einer erhöhten Mortalität bei älteren Probanden hergestellt wurde (Jylha et al. 2007). In der vorliegenden Arbeit könnten die erhöhten IL-1ra Werte eventuell an dem verzögerten Auftreten des Fiebers beteiligt sein, da zirkulierendes IL-1ra LPS-induziertes Fieber zu hemmen vermag (Luheshi et al. 1996).

Das zytokin-ähnliche Hormon Leptin wurde ebenfalls im Blutplasma untersucht, da mehrere Studien Leptin als wichtiges proinflammatorisches zytokinartiges Hormon, welches an der Ausprägung der LPS-bedingten systemischen Entzündungsreaktion beteiligt ist,

charakterisiert haben (Grunfeld et al. 1996; Sarraf et al. 1997; Luheshi et al. 1999; Sachot et al. 2004; Harden et al. 2006; Rummel et al. 2010). Des Weiteren wurden in mehreren Tiermodellen sowie auch beim Menschen im Alter erhöhte Leptinwerte im Blut vorgefunden (Baumgartner et al. 1999; Scarpace & Tumer 2001; Gabriely et al. 2002), wobei beim Menschen auch gegenteilige Beobachtungen vorliegen (Isidori et al. 2000). In der vorliegenden Studie wurde bei den alten Ratten basal keine signifikant erhöhte Leptinkonzentration im Blut festgestellt. Somit konnte die in anderen Versuchen festgestellte positive Korrelation zwischen Alter und erhöhten Leptinwerten nicht bestätigt werden. Dies könnte unter anderem daran liegen, dass die vorher genannten Studien an anderen Rattenstämmen durchgeführt wurden (Fischer 344 x Braune Norweger und Sprague-Dawley Ratten).

Obschon aus anderen Studien bekannt ist, dass die zirkulierende Leptinkonzentration nach Immunstimulus im Blut zu bestimmten Zeitpunkten ansteigen kann (Sarraf et al. 1997; Berkowitz et al. 1998; Faggioni et al. 1998; Gomez-Ambrosi et al. 2004), konnten andere keine Erhöhung von Leptin Spiegel im Plasma nachweisen (Gautron et al. 2005). Dies scheint auch im Zusammenhang mit dem gewählten Versuchsdesign zu stehen bei dem erst ein Futterentzug vor/bei der Stimulation bis zur Blutentnahme zu erhöht gemessenen Leptinkonzentrationen beizutragen scheint (Sarraf et al. 1997; Berkowitz et al. 1998; Faggioni et al. 1998; Gomez-Ambrosi et al. 2004). Kurzfristiges Hungern führt nämlich zu einem starken Abfall von Leptin im Plasma (Boden et al. 1996; Hardie et al. 1996). In jüngeren Studien konnten vielmehr bei Tieren ohne vorherigen Futterentzug lediglich zum Zeitpunkt 8 Stunden nach Stimulation mit der gleichen Dosierung an LPS ein geringgradiger Leptin-Anstieg festgestellt werden, der zum Zeitpunkt 24 Stunden wieder auf die Basalwerte abgesunken war (Luheshi & Rummel 2007; Inoue et al. 2008). Entsprechend wurde in den vorliegenden Versuchsergebnissen zu dem Zeitpunkt 24 Stunden nach Stimulation bei der jungen Gruppe keine Regulation durch LPS mehr vorgefunden. Nach LPS-Stimulation hingegen konnte in der vorliegenden Arbeit zum ersten Mal beobachtet werden, dass die Leptinkonzentrationen der alten Ratten 24 Stunden nach LPS-Stimulus stark erhöht waren (Abbildung 25 B). Genau wie IL-6 scheint also auch Leptin eine größere Rolle in der altersbedingten Veränderung der „sickness response“ zu spielen. Bei der ebenfalls untersuchten Gruppe junger und alter Ratten, welche 4 Stunden nach LPS-Injektion perfundiert wurde, konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Plasmazytokinen gefunden werden, wenngleich eine Tendenz für eine Erhöhung der IL-6-, Leptin-, IL-10- und IL-1ra-Werte im Alter ersichtlich war (Abbildung 33). Dies könnte auf die niedrige Tierzahl (2-3 pro Gruppe) zurückzuführen sein und es wäre sinnvoll, in weiterführenden Untersuchungen an einer größeren Anzahl Versuchstiere diesen Zeitpunkt noch einmal zu analysieren.

Zusammenfassend konnte hier zwar für den untersuchten Messzeitpunkt keine altersbedingte Veränderung für die zirkulierenden Zytokine IL-10 und TNF $\alpha$  aber für IL-6 und IL-1ra gezeigt werden. Des Weiteren konnte zum ersten Mal nachgewiesen werden, dass Plasma Leptin durch LPS im Alter ebenfalls eine verstärkte und verlängerte Hochregulation erfährt. Insgesamt sind die vorgefundenen Zytokinwerte konsistent mit der verzögerten und verlängerten Ausprägung der Fieberantwort und insbesondere IL-6, IL-1ra und Leptin könnten entscheidend an der altersassoziierten Verstärkung der Fieberantwort beteiligt sein.

### **Zentrale und periphere inflammatorische Parameter in Hypothalamus und Leber**

Wie bereits erwähnt wurden neben Veränderungen in den zirkulierenden Zytokinen in tierexperimentellen Studien oftmals auch (basal und/oder nach Immunstimulus) eine erhöhte Expression inflammatorischer Marker, unter anderem IL-6, IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$  und IL-10, im Gehirn vorgefunden (Godbout et al. 2005; Godbout et al. 2008; Huang et al. 2008; Abraham & Johnson 2009; Barrientos et al. 2009; Henry et al. 2009). In der vorliegenden Arbeit wurde zusätzlich zu den Zytokinen eine umfassende Untersuchung LPS-induzierbarer Signalwege auf altersbedingte Veränderungen durchgeführt. Hierbei wurden sowohl der Hypothalamus als zentrale Schaltstelle der Fieberentstehung als auch die Leber als wichtiges peripheres „Immunorgan“ berücksichtigt. Die vorgefundene altersassoziierte Expressionssteigerung des Aktivitätsmarkers I $\kappa$ B $\alpha$  in Hypothalamus und Leber deutet auf eine gesteigerte Aktivität des inflammatorischen Transkriptionsfaktors NF $\kappa$ B im Alter in diesen beiden Organen hin (Abbildung 26 A, D). Diese Beobachtungen sind konform mit der von Chung et al. aufgestellten „molecular inflammation hypothesis of aging“, welche eine chronisch gesteigerte Aktivität von verschiedenen inflammatorischen Faktoren, unter anderem NF $\kappa$ B, als Folge des erhöhten oxidativen Stresses im Alter postuliert (Chung et al. 2011). Eine basal erhöhte Aktivität und/oder Expression von NF $\kappa$ B im Alter wurde auch bereits von anderen Forschungsgruppen für Herz, Leber, Niere und Gehirn festgestellt (Geokas et al. 1985; Helenius et al. 1996; Korhonen et al. 1997; Helenius et al. 2001). Während Saito et al. im Herzmuskel keinen Unterschied der NF $\kappa$ B-Bindungsaktivität zwischen jungen und alten Mäusen nach LPS-Injektion feststellte (Saito et al. 2003), konnte hier eine gesteigerte Expression von I $\kappa$ B $\alpha$  24 Stunden nach LPS-Stimulation im Hypothalamus der alten Ratten nachgewiesen werden, welche bei der jungen Gruppe nicht mehr vorhanden war. In der Leber hingegen wurde bei beiden Gruppen kein regulatorischer Effekt von LPS mehr nachgewiesen. Analog zu einer früheren Studie (Sandhir & Berman 2010) wurde außerdem eine erhöhte Expression von NF-IL6 im Hypothalamus der alten Ratten festgestellt (Abbildung 26 C), welche sich sowohl zu dem 24 Stunden als auch zu dem 4 Stunden Zeitpunkt manifestierte. Der Aktivitätsmarker SOCS3 blieb im Hypothalamus durch das Altern unbeeinflusst, eine altersassoziierte Erhöhung im Gehirn, wie sie von Peralta et al. (2002) berichtet wurde, konnte hier nicht bestätigt werden (Peralta et al. 2002). In der Leber zeigte sich jedoch eine altersbedingte Expressionssteigerung (Abbildung 26 E). Bei genauerer Betrachtung scheint dieser Effekt durch die starke LPS-induzierte Hochregulation von SOCS3 bei den alten Ratten entstanden zu sein. Dieser Effekt war bei den jungen Ratten nicht beobachtet worden. Die basalen Level der beiden Altersgruppen unterschieden sich allerdings nicht. Dies deutet demnach auf eine erhöhte Aktivität des inflammatorischen Transkriptionsfaktors STAT3 hin und könnte somit die vorgefundenen erhöhten zirkulierenden IL-6- und Leptin-Werte der alten Ratten widerspiegeln. Die systemische IL-6- und Leptin-Aktivität der alten Ratten scheint interessanterweise zentral keinen Einfluss auf die SOCS3-Aktivität im Hypothalamus zu haben, jedoch auf die Leber als peripheres Organ zu wirken. Dies könnte wiederum ein Hinweis dafür sein, dass eine potentielle Resistenz gegenüber Leptin lediglich für das Gehirn nicht aber für die Leber also periphere Organe existiert. Zumindest ist eine erhöhte SOCS3-Expression als eine der möglichen Hypothesen einer Leptin-Resistenz beschrieben worden (Peralta et al. 2002).

In Einklang mit anderen Studien wurde auch in der vorliegenden Arbeit im Hypothalamus eine erhöhte IL-6-Expression in den alten Ratten im Vergleich zu den jungen Ratten vorgefunden (Godbout et al. 2005; Huang et al. 2008). Ein signifikanter zusätzlicher Effekt durch LPS konnte hier statistisch jedoch nicht nachgewiesen werden. Die alten Ratten zeigten allerdings eine starke Tendenz auf eine noch vorhandene Hochregulation der IL-6 Expression in der LPS-Gruppe (Abbildung 27 A).

Die antiinflammatorischen Zytokine IL-10 und IL-1ra wiesen in beiden untersuchten Organen keine altersbedingten Veränderungen in ihrer Expression auf. Unabhängig von der Altersgruppe war IL-1ra in beiden Geweben und IL-10 in der Leber jedoch nach LPS-Stimulation vermehrt exprimiert. Dies könnte ein Regulationsmechanismus gegen das erhöhte proinflammatorische Milieu darstellen (Abbildung 27).

Da bereits gezeigt werden konnte, dass zirkulierendes IL-6 zu einer STAT3-gekoppelten Expression von COX2 und mPGES im Gehirn beiträgt (Rummel et al. 2006; Rummel et al. 2011), lag die Vermutung nahe, dass die in dieser Studie vorgefundenen erhöhten IL-6-Plasmaspiegel bei alten Ratten über eine Erhöhung der hypothalamischen COX-2 und mPGES-Expression zu der verstärkten Fieberantwort beitragen. Doch obwohl hier generell eine altersbedingte erhöhte Expression dieser beiden Enzyme im Hypothalamus vorlag, führte die LPS-Stimulation nicht, wie bei den zirkulierenden IL-6-Leveln, ebenfalls zu einer erhöhten COX-2 und mPGES-Expression (Abbildung 28 A-B). Diese Beobachtung könnte bedeuten, dass IL-6 nicht alleine hauptverantwortlich für das verstärkte „sickness behaviour“ der alten Ratten ist, sondern auch andere Elemente wie ein gleichzeitig aktivierter NFκB-Signalweg zusätzlich nötig sind.

Immunhistochemisch wurde an verschiedenen relevanten Regionen des Hypothalamus auf Proteinebene zum ersten Mal überprüft, inwieweit das verstärkte „sickness behaviour“ sich ebenfalls in einer regionspezifischen, verstärkten Aktivierung inflammatorischer Transkriptionsfaktoren widerspiegelt. Obwohl Fieber in den alten Ratten zum Zeitpunkt 24-Stunden noch vorhanden war, konnte keine verstärkte Aktivierung für NFκB und phosphoryliertem, also aktiviertem STAT3 nachgewiesen werden. Tatsächlich war bei alten wie auch jungen Ratten keine nennenswerte Aktivierung 24 Stunden nach Stimulation zu verzeichnen. Dies entspricht Ergebnissen aus früheren Studien mit jungen Tieren (Rivest 1999; Gautron et al. 2002; Nadjar et al. 2003; Rummel et al. 2005), war allerdings für alte Ratten noch nicht entsprechend untersucht worden.

Wie in der Einleitung beschrieben (Einleitung Kapitel 4 Leptin), spielt eine STAT3-Phosphorylierung im *Nucleus arcuatus* für die Leptin-induzierte Hemmung der Futterraufnahme eine entscheidende Rolle (Hegyí et al. 2004). Da in alten Ratten keine erhöhte STAT3-Aktivierung im *Nucleus arcuatus* nachgewiesen werden konnte, obwohl diese Tiere erhöhte Leptin-Konzentrationen zum Zeitpunkt 24 h aufwiesen, könnte dies ebenfalls als ein Hinweis auf eine zentrale Leptin-Resistenz gedeutet werden. Solch eine Leptin-Resistenz könnte durch die altersbedingte Fettsucht oder das Altern selbst verursacht werden (Diskussion Kapitel 2.2 Beurteilung der Ergebnisse der LAS-Behandlung im Hinblick auf den experimentellen Versuchsaufbau und die altersassoziierte Leptin-Resistenz). Für NF-IL6 Aktivität wurde in den untersuchten Regionen basal ebenfalls kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Altersgruppen nachgewiesen. Die chronische Neuroinflammation, die im Altern auch im basalen Zustand vorherrscht, scheint somit nicht mit einer

immunhistochemisch messbaren verstärkten Aktivierung von NF-IL6 in Zusammenhang zu stehen. Nach LPS-Stimulation konnte für die Mehrzahl der untersuchten Hirnregionen ebenfalls kein Unterschied der NF-IL6-Immunreaktivität zwischen alten und jungen Ratten gezeigt werden. Zum ersten Mal stellte sich jedoch ein deutlicher und quantifizierbarer Unterschied für die *Median eminence* (ME) heraus (Abbildung 31 G-H). Die LPS-Stimulation führte hier zu einer verstärkten NF-IL6-Aktivität bei den alten Ratten. Die ME gehört zu den circumventrikulären Organen und ist eine wichtige Struktur der HPA-Achse. Parvozelluläre Neurone aus dem PVN geben das von ihnen gebildete „corticotropin-releasing hormone“ (CRH) über neuronale Projektionen an die ME weiter. In der ME erfolgt daraufhin die Abgabe des CRH an das Portalblutgefäßsystem, worüber es den Hypophysenvorderlappen erreicht (Whitnall et al. 1985). Eine verstärkte altersassoziierte NF-IL6-Aktivierung dieser Hirnstruktur nach LPS-Stimulus könnte somit implizieren, dass die nachgeschalteten Strukturen der HPA-Achse ebenfalls stärker aktiviert werden und sich die systemische Entzündungsreaktion im Alter anders auf die Stressachse auswirkt.

Zusätzlich sollte zu einem früheren Zeitpunkt, bei dem es in jungen Tieren nach LPS-Stimulation mit der gleichen Dosierung sowohl zu NF-IL6 als auch zu STAT3 Aktivierung kommt, untersucht werden, ob die verstärkte Entzündungsreaktion bei alten Ratten sich auch in verstärkter Aktivierung von Transkriptionsfaktoren widerspiegelt. Damit sollten ebenfalls mögliche Gehirnregionen identifiziert werden, die altersbedingte Unterschiede in der Aktivierung aufweisen. Hierfür wurde entsprechend früheren Untersuchungen (Rummel et al. 2005; Damm et al. 2011) eine kleine Gruppe alter und junger Ratten 4-Stunden nach LPS-Stimulation analysiert. Exemplarisch konnte für das OVLT gezeigt werden, dass auch hier keine eindeutigen Unterschiede zwischen jungen und alten Ratten vorzuliegen scheinen (Abbildung 35, Abbildung 36). Es wird dennoch sinnvoll sein, diese Untersuchungen an einer größeren Gruppe und anderen Hirnregionen in weiterzuführenden Versuchen fortzusetzen, bevor das Vorhandensein altersbedingter Unterschiede auf dieser Ebene vollständig ausgeschlossen werden kann.

Auf Ebene der mRNA-Expression inflammatorischer Marker in Hypothalamus und Leber konnte 4 Stunden nach LPS-Stimulation die bereits vorher festgestellte erhöhte Expression des Transkriptionsfaktors NF-IL6 im Hypothalamus im Alter bestätigt werden (Abbildung 34 C). Die anderen untersuchten Parameter zeigten keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Altersgruppen. Auch hier muss auf die niedrige Gruppengröße ( $n = 3$ ) und die preliminäre Natur dieser Ergebnisse hingewiesen werden, die durch eine Erhöhung der Tierzahl und weiterführende Untersuchungen erst noch bestätigt werden sollten.

### **1.3 Veränderungen oxidativer Stressmarker im Altern und nach LPS-Stimulus**

Wie bereits beschrieben spielen die hier untersuchten oxidativen Stressmarker PGC-1 $\alpha$ , NRF1 und TFAM eine grundlegende Rolle in der mitochondrialen Biogenese. Die „mitochondriale Theorie des Alterns“ postuliert, dass eine Zunahme oxidativer Schäden im Altern und ein damit verbundener mitochondrialer Funktionsverlust an der Entstehung altersassoziiierter Veränderungen und Krankheitsbilder beteiligt ist (Balaban et al. 2005; Greaves & Turnbull 2009). Eine Untersuchung der altersbedingten Expressionsänderung dieser oxidativen Stressmarker wurde bereits mehrmals in Zusammenhang mit dem altersassoziierten

Krankheitsbild der Sarkopenie, einem Verlust an Muskelmasse, durchgeführt, da eine Abnahme der mitochondrialen Funktion diesem Krankheitsbild zugrunde liegen soll (Wenz et al. 2009). Mehrere Studien haben an Biopsieproben von Skelettmuskulatur älterer menschlicher Probanden oder in Tiermodellen die Expression dieser Faktoren untersucht und eine erhöhte Expression von NRF1 (Lezza et al. 2001; Bori et al. 2012), eine erhöhte (Lezza et al. 2001) oder reduzierte (Kang et al. 2013) Expression von TFAM und eine Reduktion von PGC-1 $\alpha$  (Joseph et al. 2012; Kang et al. 2013) nachgewiesen. In der Herzmuskulatur wurde eine Reduktion der Expression von PGC-1 $\alpha$  und NRF1 festgestellt (Vina et al. 2009). Zu altersbedingten Expressionsänderungen dieser oxidativer Stressmarker im Gehirn gibt es bis jetzt nur wenige Studien. Picca et al. fanden eine erhöhte Expression von TFAM im Frontalkortex alter Mäuse, welche jedoch mit einer Abnahme der DNA-Bindungsaktivität dieses Faktors und des Gehaltes an mitochondrialer DNA gekoppelt war (Picca et al. 2013).

In der vorliegenden Arbeit zeigten die untersuchten Marker für oxidativen Stress NRF1 und TFAM im Hypothalamus eine altersbedingte Hochregulation (Abbildung 29). In der Leber hingegen war die NRF1-Expression im Alter signifikant erniedrigt. Die basale Expression von PGC1 $\alpha$  war in der Leber der alten Ratten tendenziell erhöht und wurde durch LPS signifikant erniedrigt, während bei den jungen Ratten keine Regulation durch LPS vorlag (Abbildung 29 D). Vorhergehende Studien haben nach Stimulation mit LPS eine Erhöhung dieser oxidativen Stressmarker in Herz und/oder Leber nachgewiesen (Suliman et al. 2003; Suliman et al. 2004). Diese abweichenden Ergebnisse könnten durch unterschiedliche LPS-Dosierungen (1 mg/kg vs 100 $\mu$ g/kg), Untersuchungszeiträume (6h, 24h und 48h vs 24h) und Alter (jung vs alt) der Tiere bedingt sein.

Zurzeit liegen also leicht widersprüchliche Ergebnisse über eine Zu- oder Abnahme der Expression dieser Faktoren in verschiedenen Geweben im Alter vor. Auch die Interpretation dieser Ergebnisse lässt verschiedene Schlussfolgerungen zu, da sowohl eine Expressionszunahme als kompensatorische Antwort auf das Vorliegen erhöhter oxidativer Schäden gedeutet wird (Lezza et al. 2001) als auch eine Expressionsabnahme als Beweis für das Vorliegen erhöhten oxidativen Stresses und mitochondrialer Dysfunktion im Alter herangezogen werden kann (Vina et al. 2009). In der vorliegenden Arbeit konnten weitere Ergebnisse zu altersassoziierten Veränderungen von NRF1 und TFAM für den Hypothalamus gezeigt werden, welche die bereits vorliegenden Erkenntnissen aus der Arbeit von Picca et al. für den Frontalcortex ergänzen (Picca et al. 2013). Picca und Kollegen fanden erhöhte TFAM-Protein-Level im Gehirn alter Ratten, die jedoch interessanterweise mit einer deutlich reduzierten Bindungsaktivität an mitochondriale DNA einhergingen, was das gleichzeitige Vorfinden erniedrigter Gehalte an mitochondrialer DNA bei alten Ratten in dieser Studie erklären könnte. Insgesamt konnten in der vorliegenden Arbeit neue alters- und LPS-bedingte Veränderungen in der Ratte zum Zeitpunkt 24 h nach Stimulation mit einer moderaten LPS-Dosierung nachgewiesen werden. Weitere Untersuchungen dieser wichtigen Faktoren werden allerdings notwendig sein, um deren funktionelle Rolle beim Altern und inflammatorischen Stress in Gehirn und Leber besser zu verstehen. Dafür könnten beispielsweise antioxidative Stoffe in Kombination mit LPS und / oder Altern eingesetzt werden. Resveratrol, ein natürliches Phytoalexin, stellt z.B. ein bekanntes Antioxidans dar, welches bereits in vielen Forschungsprojekten auf seine antioxidativen Eigenschaften untersucht wurde (Frombaum et al. 2012; Marchal et al. 2013). Unter anderem wurden auch neuroprotektive Eigenschaften in

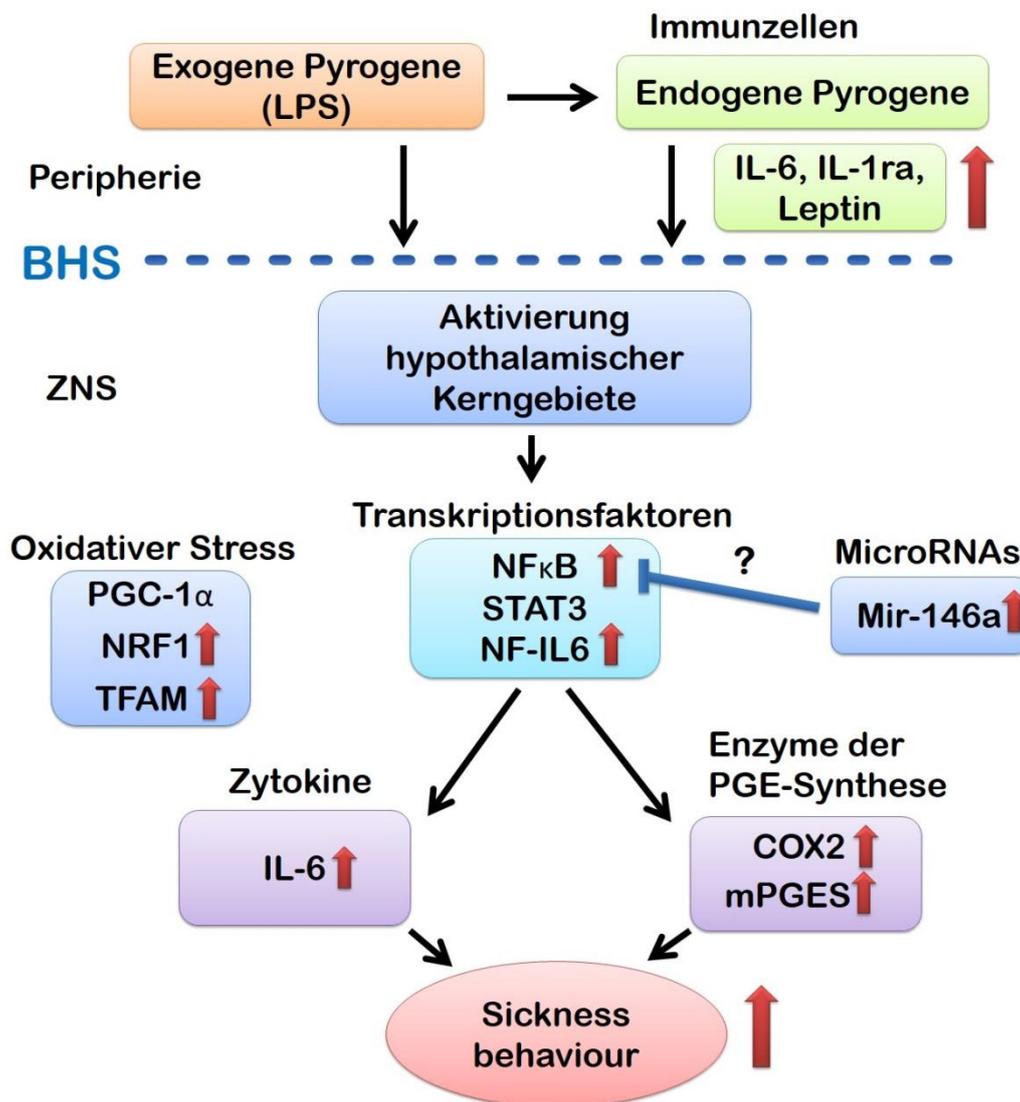
einem Modell der zerebralen Ischämie, eine Reduktion oxidativer Stressmarker und inflammatorischer Mediatoren bei Ratten nachgewiesen (Orsu et al. 2013). Dieser natürliche Wirkstoff wurde auch bereits erfolgreich in LPS-stimulierten Rattenmodellen eingesetzt und bewirkte eine Reduktion der LPS-induzierten Erhöhung oxidativer Stressmarker in Gehirn und Leber (Sebai et al. 2009; Sebai et al. 2010). Somit ergeben sich hier interessante Ansatzpunkte, diesen Wirkstoff in einem Kombinationsmodell Alter/Inflammation und die Regulation mitochondrialer Stressmarker weiter zu untersuchen.

#### **1.4 Potentielle Bedeutung von mir-146a in der altersabhängigen Veränderungen der LPS-induzierten Inflammation**

Als neuer potentieller Faktor, der in die im Alter vorliegenden immunologischen Veränderungen impliziert sein könnte, wurde in der vorliegenden Arbeit die microRNA mir-146a näher betrachtet. Ansatzpunkte für diese Untersuchung lieferten frühere Studien, welche eine basal verstärkte Expression von mir-146a in peritonealen Makrophagen, Milz und Serum alter Mäuse und eine LPS-induzierte Hochregulation der Expression in jungen aber nicht in alten Tieren zeigten (Jiang et al. 2012). Des Weiteren wird mir-146a verstärkt in seneszenten Fibroblasten exprimiert und die ektopische Expression von mir-146a in primären humanen Fibroblasten unterdrückt z.B. die IL-6 Expression und kann hierüber als negatives Feedback Signal im Rahmen einer Inflammation wirken (Bhaumik et al. 2009). Generell wird mir-146a über einen NF $\kappa$ B-abhängigen Signalweg induziert und trägt zu einer negativen Regulation der TLR-Aktivierung bei (Taganov et al. 2006). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen zum ersten Mal eine altersassoziierte Hochregulation von mir-146a ebenfalls im Hypothalamus. Ähnlich zu Ergebnissen der Studie von Jiang et al. wurde auch hier vor allem in der basalen Expression eine altersbedingte Expressionserhöhung nachgewiesen. Die Regulation durch LPS (Zeitpunkt 24 h) schien bei den alten Tieren im Vergleich zu der jungen Gruppe beeinträchtigt zu sein (Abbildung 28 D). So gleicht sich die Expressionsstärke nach LPS-Behandlung bei beiden Altersgruppen an, weshalb wahrscheinlich zu dem vierstündigen Untersuchungszeitpunkt auch kein Unterschied zwischen den beiden Altersgruppen detektiert werden konnte. Die in dieser Arbeit vorgefundene basal erhöhte mir-146a-Expression könnte die beobachtete erhöhte NF $\kappa$ B-Aktivierung widerspiegeln, allerdings ohne die LPS-induzierte erhöhte Entzündungsantwort im Gehirn zu erniedrigen. Eigentlich sollte mir-146a, wie in der Einleitung beschrieben (Einleitung Kapitel 2.3.4 MicroRNAs), die NF $\kappa$ B-vermittelte Expression inflammatorischer Zielgene wie mPGES und COX2 als negativen Feedbackmechanismus hemmen. Dies konnte allerdings in der vorliegenden Studie nicht nachgewiesen werden. Diese endogene antiinflammatorische Gegenregulation durch mir-146a scheint also im Alter verringert zu sein und könnte dazu beitragen, die erhöhte inflammatorische Aktivierung im Alter zu erklären. Da die microRNAs als wichtige Modulatoren und Regulatoren verschiedenster Prozesse erst seit relativ kurzer Zeit entdeckt wurden, sind viele Mechanismen noch ungeklärt. Laufend werden neue microRNAs entdeckt oder neue Funktionen bereits bekannter microRNAs aufgedeckt. Dementsprechend gibt es natürlich noch weitere Kandidaten, deren Untersuchung in diesem Zusammenhang interessant wäre. Hierzu würden z.B. die microRNAs mir-29a und mir-29b zählen. Es handelt sich um zwei immunomodulatorische microRNAs, deren Expression im Gehirn im Alter ebenfalls erhöht ist und mit einer Reduktion von Regulatoren der mikroglialen Aktivierung einhergeht

(Fenn et al. 2013). Die Untersuchung dieser und weiterer in die Immunregulation implizierter microRNAs, wie z.B. mir-155 und mir-125b (Tili et al. 2007), im Hinblick auf altersassoziierte Veränderungen in der Entzündungsreaktion stellen mit Sicherheit vielversprechende und interessante Ansätze für zukünftige Forschungsarbeiten auf diesem Gebiet dar.

Eine zusammenfassende Betrachtung der in dieser Arbeit vorgefundenen Veränderungen in den untersuchten inflammatorischen Signalwegen im Alter ist in der nachfolgenden Abbildung dargestellt (Abbildung 67).



**Abbildung 67: Zusammenfassende Darstellung der vorgefundenen Veränderungen in den untersuchten inflammatorischen Signalwegen im Alter**

Die durchgeführten Untersuchungen brachten neue Erkenntnisse bezüglich altersbedingter inflammatorischer Veränderungen auf peripherer und zentraler Ebene. Peripher im Blutkreislauf wurden erhöhte Werte zirkulierender Zytokine (IL-6, IL-1ra und Leptin) vorgefunden. Auf hypothalamischer Ebene konnte eine altersbedingte Steigerung der

Expression mehrerer relevanter inflammatorischer Marker nachgewiesen werden. Dies betraf verschiedene Transkriptionsfaktoren (NF $\kappa$ B, NF-IL6), Zytokine (IL-6), Enzyme der Prostaglandinsynthese (COX2, mPGES), oxidative Stressmarker (NRF1, TFAM) und die antiinflammatorische microRNA mir146a, welche regulatorisch die Aktivität von NF $\kappa$ B hemmt. Zusammenfassend untermauern diese Veränderungen von inflammatorischen Faktoren die ebenfalls dokumentierte verstärkte Ausprägung des „sickness behaviour“ im Alter. NF $\kappa$ B, „nuclear factor“ kappa B; STAT3, „signal transducer and activator of transcription“ 3; NF-IL6, „nuclear factor“ interleukin 6; TNF $\alpha$ , Tumornekrosefaktor alpha; mPGES, mikrosomale Prostaglandin E Synthase; COX2, Zyklooxygenase 2; PGC-1 $\alpha$ , „peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)- $\gamma$  coactivator“ 1  $\alpha$ ; NRF1, „nuclear respiratory factor“ 1; TFAM, „mitochondrial transcription factor“ A.

## **2. Der Einfluss von Leptin auf die altersbedingten Veränderungen in der systemischen Entzündungsreaktion**

### **2.1 Altersabhängige Auswirkungen der LAS-Behandlung auf die „sickness response“ und periphere sowie zentrale inflammatorische Parameter**

In vorhergehenden Studien an jungen Ratten konnten über Gabe eines Leptin Antiserums (LAS) sowohl die LPS-induzierte Fieberreaktion, als auch die damit einhergehende Anorexie und der Gewichtsverlust stark vermindert werden (Sachot et al. 2004; Harden et al. 2006). In der vorliegenden Arbeit gibt es zwar Unterschiede zu den vorhergehenden Studien, es liegen jedoch auch ähnliche Ergebnisse oder gleiche Tendenzen vor. In der Fieberkurve der jungen Ratten zeigte sich etwas weniger deutlich als bei Sachot und Kollegen (2004), dass die LAS-Gabe das Fieber in den ersten 8 Stunden minderte, was der Hauptfieberphase der jungen Ratten entsprach (Abbildung 38 A). Die Berechnung des Fieberindex für diesen Zeitraum bestätigte diese Beobachtung. Während LAS keinen Effekt auf die Aktivität und die Wasseraufnahme der jungen Ratten zeigte, wurden sowohl der Gewichtsverlust als auch die Anorexie durch LAS abgeschwächt, jedoch nicht völlig eliminiert (Abbildung 42).

Bei den alten Ratten konnte hier zum ersten Mal gezeigt werden, dass sich die Neutralisation endogenen Leptins vor allem auf die spätere Fieberphase auswirkte und in diesem Abschnitt das Fieber verminderte (Abbildung 38 B). Genau dieser Zeitabschnitt stellt die für die alten Ratten in dem experimentellen Versuchsaufbau dieser Arbeit kennzeichnende verlängerte Fieberphase dar, welche bei der jungen Gruppe nicht beobachtet werden konnte. Auch die Berechnung des Fieberindex über den für alte Ratten relevanten Zeitraum (24 h) bestätigte diese Beobachtung. Wie bei den jungen Ratten hatte LAS auch bei der alten Gruppe keine Auswirkung auf die Aktivität oder die Wasseraufnahme. Während LAS bei den alten Ratten auf die Anorexie noch einen leichten Effekt zu haben schien, blieb der LPS-induzierte Gewichtsverlust hiervon unbeeinflusst (Abbildung 42). Die Erniedrigung der späteren Fieberphase bei den alten Ratten, und nicht wie bei den jungen Ratten während den ersten 8 Stunden, deutet auf einen unterschiedlichen Einfluss von Leptin zwischen der alten und der jungen Gruppe hin. Somit scheinen die nach LPS-Stimulus stark erhöhten zirkulierenden Leptin-Level bei den alten Ratten einen Einfluss auf die physiologischen Parameter der verlängerten „sickness response“, vor allem die Temperaturerhöhung, zu haben. Allerdings

zeigten sich im Alter schwächere Effekte des Leptin-Antiserums auf die Anorexie und den Gewichtsverlust.

Im Rahmen der Analyse der zirkulierenden Zytokine (Abbildung 43) blieb IL-6 durch LAS sowohl bei jungen als auch bei alten Ratten unbeeinflusst, wie bereits auch in der Studie von Sachot und Kollegen (2004) an jungen Ratten gezeigt worden war. Im Gegensatz dazu, wurden die altersbedingt erhöhten IL-1ra-Plasmaspiegel bei den alten Ratten durch LAS-Behandlung stark abgesenkt. Dieser Einfluss von LAS auf die IL-1ra Expression wurde ebenfalls von Sachot und Kollegen (2004) nachgewiesen. Sie konnten zeigen, dass LAS die Hochregulation der hypothalamischen mRNA-Expression nach LPS verhindert (Sachot et al. 2004). Diese Übereinstimmung zwischen den beiden Studien bestätigt eine ähnliche Wirkung bzw. die Wirksamkeit des LAS auch in der vorliegenden Studie. Während die zirkulierenden Leptin-Werte bei den jungen Ratten unverändert waren, kam es bei den alten Ratten durch LAS-Gabe zu einer stark signifikanten Erhöhung der Leptin-Level. Hierbei handelt es sich wahrscheinlich um einen „rebound“-Effekt der durch die vorhergehende Leptin-Neutralisierung über einen Zeitraum von zwei Tage ausgelöst wurde. Interessanterweise scheint dies bei den jungen Ratten entweder gar nicht oder zu einem früheren Zeitpunkt aufgetreten zu sein. Obwohl deutliche Effekte des LAS auf die „sickness response“ und auf die IL-1ra-Level gemessen werden konnten, kann allerdings auch nicht ausgeschlossen werden, dass für die alten Ratten eine höhere Dosierung von LAS pro kg Körpergewicht benötigt wird, um die deutlich höheren Leptin-Konzentrationen im Plasma der Tiere vollständig zu neutralisieren. Dies könnte in weiterführenden Studien untersucht werden.

Die Analyse der mRNA-Expression inflammatorischer Marker nach LPS-Stimulus bestätigt eine altersassoziierte Erhöhung der Expression der Transkriptionsfaktoren NF $\kappa$ B (über I $\kappa$ B $\alpha$ ) und NF-IL6 im Hypothalamus und eine altersbedingte Erniedrigung der COX2-Expression in der Leber, welche bereits in der vorangehenden Studie (Studie 1: Altersabhängige Unterschiede in der LPS-bedingten Entzündungsreaktion) beobachtet wurden (Abbildung 44, Abbildung 45). Die LPS-induzierte mir-146a-Expression zeigte hier keine altersbedingte Veränderung. Dies bestätigt die vorher erwähnte Beobachtung und Hypothese, dass die Hochregulation der mir146a-Expression im Alter vor allem basal vorhanden ist. Jiang et al. (2012) konnten so bereits für andere Gewebe nachweisen, dass die Regulation durch LPS, welche bei jungen Tieren auftritt, im Alter deutlich reduziert ist (Jiang et al. 2012). Demzufolge gleichen sich nach LPS-Stimulus die Expressionslevel von der jungen und alten Gruppe wieder an (wie bei mir146a).

Andere Ergebnisse als in der vorigen „Studie 1“ ergaben sich für NF-IL6 (Leber) und SOCS3, die allerdings teilweise auch einfach damit zusammen hängen könnten, dass hierfür nur LPS-stimulierte Tiere und nicht zusätzlich PBS-Kontrolltiere untersucht und statistisch ausgewertet worden sind. Hier wurde in der Leber eine altersbedingte Erniedrigung der NF-IL6-Expression gefunden, welche in der ersten Studie „Altern“ nicht signifikant nachgewiesen werden konnte (Abbildung 45 C). Des Weiteren zeigte im Gegensatz zur Studie „Altern“ die SOCS3-Expression in der Leber bei diesen Gruppen keine altersbedingten Unterschiede. Diesmal ist hingegen im Hypothalamus eine leichte Erhöhung der SOCS3-Expression zu sehen (Abbildung 44 B). Es ist nicht auszuschließen, dass die zusätzlich zu LPS verabreichten Sera eine geringfügige Eigenwirkung auf die Inflammation hatten und einige Unterschiede zwischen den beiden durchgeführten Studien hierdurch hervorgerufen wurden. Zwischen der

ersten und zweiten Studie konnten allerdings für die physiologischen Parameter keine signifikanten Unterschiede nachgewiesen werden. Außerdem hatten in früheren Studien die Sera keinen signifikanten inflammatorischen Eigeneffekt (Rummel et al. 2008; Rummel et al. 2010; Harden et al. 2013) und sollten deswegen eine zu vernachlässigende Rolle spielen.

Obwohl das Leptin-Antiserum auf zirkulierendes IL-1ra bei den alten Ratten eine deutlich hemmende Wirkung aufzeigte, blieb die IL-1 $\beta$ -Expression sowohl in Hypothalamus als auch in der Leber unbeeinflusst (Abbildung 44 D, Abbildung 45 D). Vorhergehende Studien haben gezeigt, dass LAS die LPS-induzierte Erhöhung der mRNA-Expression sowohl von IL-1ra als auch von IL-1 $\beta$  im Gehirn hemmt (Sachot et al. 2004; Inoue et al. 2006). Allerdings wurden diese Analysen zu einem früheren Zeitpunkt zwischen 1 und 8 Stunden nach LPS-Injektion durchgeführt. Der hier untersuchte 24 Stunden Zeitpunkt könnte für eine Erfassung dieser Hemmung zu spät gewesen sein. Eine eindeutige Auswirkung von LAS in der quantitativen real-time PCR Untersuchung zeigte sich lediglich für die hypothalamische COX2-Expression der jungen Ratten, welche durch Behandlung mit LAS gesteigert wurde (Abbildung 44 E). Die alten Ratten blieben jedoch unbeeinflusst. Dieser Befund ist schwierig zu interpretieren, da bisherige Studien nachgewiesen haben, dass Leptin Antiserum die LPS-induzierte COX2 Expression im Gehirn erniedrigt (Inoue et al. 2006). Auch dies wurde zu einem früheren Zeitpunkt (3 Stunden nach LPS-Injektion) analysiert. Da die jungen Ratten zum Zeitpunkt der Messung bereits kein Fieber mehr aufwiesen scheint die erhöhte COX2-Expression zu diesem späten Zeitpunkt nicht repräsentativ für ihre physiologische Bedeutung bei der Fieberreaktion zu sein. Ebenso wie die erhöhten zirkulierenden Leptinwerte der alten Ratten könnte es sich bei dieser erhöhten COX2-Expression um die Folge einer durch die zweitägige Neutralisierung der Leptin-Level initiierten Gegenregulation zu dem späten Zeitpunkt 24 h nach Stimulation handeln.

Aufbauend auf den Ergebnissen der ersten Studie wurden immunhistochemisch die *Median eminence* (ME) und der in der Stressachse vorgeschaltete *Nucleus paraventricularis* (PVN) auf Veränderungen in der Aktivität des Transkriptionsfaktors NF-IL6 untersucht. Konform mit den vorigen Ergebnissen zeigte sich auch hier eine verstärkte Aktivität von NF-IL6 in der ME der alten Ratten (Abbildung 46 E-H). Unterschiede durch die Behandlung mit LAS oder NSS wurden allerdings nicht festgestellt. Wegen der Bedeutung von STAT3 in der durch Leptin induzierten Signalkaskade wurde zusätzlich die phosphorylierte Form dieses Transkriptionsfaktors im für die Appetit-Regulation wichtigen *Nucleus arcuatus* untersucht. Zu dem späten Untersuchungszeitpunkt (LPS-induziertes Aktivierungsmaximum von STAT3 liegt bei 2 – 4 Stunden nach Stimulation) konnten nur vereinzelte Signale beobachtet werden und es konnte kein Unterschied zwischen den Alters- und Behandlungsgruppen festgestellt werden. Dies spricht außerdem wieder für eine gewisse zentrale Leptin-Resistenz, da alleine eine erhöhte Konzentration dieses Appetit hemmenden Hormons zu verstärkten STAT3-Phosphorylierung im *Nucleus arcuatus* hätte führen müssen (Hübschle et al. 2001; Münzberg et al. 2003), siehe auch Studie 1).

## **2.2 Beurteilung der Ergebnisse der LAS-Behandlung im Hinblick auf den experimentellen Versuchsaufbau und die altersassoziierte Leptin-Resistenz**

Wie schon erwähnt, muss bei der Interpretation der vorliegenden Ergebnisse berücksichtigt werden, dass für die alten Ratten auf Grund der erhöhten Leptin-Plasmaspiegel vielleicht eine

höhere Dosis Leptin-Antiserum benötigt worden wäre, um die Leptin-Plasmaspiegel vollständig zu neutralisieren. Damit hätten vielleicht weitere Veränderungen nachgewiesen werden können. Allerdings haben Studien von Harden et al. (2006) an jungen Ratten gezeigt, dass die Verabreichung einer höheren Dosis LAS auch die basale Futtermittelaufnahme beeinflusst (Harden et al. 2006). Solch eine grundsätzliche Veränderung der Physiologie der Tiere war nicht Ziel der hier vorliegenden Arbeit sondern die Neutralisation von pathophysiologisch erhöhten Leptin-Konzentrationen. Deswegen wurde auf die bereits an anderer Stelle erprobte Dosierung zurückgegriffen (Sachot et al. 2004), da in diesen Versuchen endogenes zirkulierendes Leptin neutralisiert werden konnte, ohne die Basalwerte zu beeinflussen. Für alte Ratten lagen bis dato noch keine anderen Studien oder Vergleichsdaten für die Verwendung von LAS vor.

Ein anderer wichtiger Faktor, den man bei der Interpretation der vorliegenden Daten berücksichtigen muss, ist das mögliche Vorliegen einer Leptin-Resistenz im Alter. Ähnlich wie bei adipösen Individuen, welche sich durch erhöhte zirkulierende Leptin-Level und gleichzeitig persistierende Adipositas auszeichnen, scheint es auch im Alter zu einer gewissen Resistenz gegenüber den Effekten von Leptin zu kommen (Carter et al. 2013). Es wurde beobachtet, dass alte Ratten mit basal erhöhten Leptin-Blutspiegeln auf eine experimentelle Leptin-Gabe mit weniger stark ausgeprägter Anorexie und Gewichtsverlust reagieren als junge Ratten (Scarpace et al. 2000; Gabriely et al. 2002) und die mRNA-Expression von Neuropeptid Y im Alter durch Leptin weniger stark gehemmt wird (Shek & Scarpace 2000). Sowohl die Leptin-Aufnahme in den Hypothalamus als auch die Expression der langen Form des Leptin Rezeptors OB-Rb im Hypothalamus ist bei alten Ratten erniedrigt (Fernandez-Galaz et al. 2001). Leptin reguliert normalerweise über negativen Feedback seine eigene Expression und auch diese Eigenschaft ist im Alter reduziert (Gabriely et al. 2002). Die regulatorischen Mechanismen, welche der Leptin-Resistenz zugrunde liegen, sind bis dato noch nicht völlig entschlüsselt. Prinzipiell geht man mittlerweile von drei möglichen Hypothesen aus:

- a) Eine erniedrigte Kapazität des zirkulierenden Leptins seine Zielregionen im Gehirn zu erreichen
- b) Eine erniedrigte Expressionsrate der langen Form des Leptin-Rezeptors Ob-Rb
- c) Eine Hemmung in den Signalwegen verschiedener Neurone in spezifischen Gehirnarealen.

Anhaltspunkte für Hypothese a) ergeben sich aus Studien, die einen verminderten Leptin-Transport über die Blut-Hirn-Schranke in adipösen und alten Nagern festgestellt haben (Banks et al. 1999; Levin et al. 2004), eine partielle Aufhebung der Leptin-Resistenz bei intrazerebroventrikulärer Verabreichung von Leptin (Muzumdar et al. 2006), sowie erniedrigte Leptin-Konzentrationen in der Zerebrospinalflüssigkeit bei gleichzeitig erhöhten Plasmaspiegeln (Schwartz et al. 1996). Hier muss jedoch angemerkt werden, dass es auch Studien gab, in welchen eine zentrale Leptin-Gabe bei alten Ratten mit einer Leptin-Resistenz gekoppelt war (Shek & Scarpace 2000). Mehrere Studien haben das Vorliegen einer erniedrigten Expression der langen Form des Leptin-Rezeptors Ob-Rb postuliert und unterstützen somit Hypothese b) (Fernandez-Galaz et al. 2001; Scarpace et al. 2001; Fernandez-Galaz et al. 2002; Wilsey et al. 2003; Wilsey & Scarpace 2004). Im Hinblick auf

Hypothese c) ergab sich unter anderem eine Implikation für den Transkriptionsfaktor STAT3, welcher im Rahmen der JAK-STAT-Kaskade, welche den Hauptsignalweg von Leptin am Hypothalamus darstellt, aktiviert wird. Alte Ratten zeigten eine reduzierte Sensitivität für die Phosphorylierung, also Aktivierung, von STAT3 sowie eine erniedrigte DNA-Bindungsaktivität von p-STAT3 nach Induktion durch Leptin (Scarpace et al. 2000; Scarpace et al. 2001). Auch SOCS3, welcher als negativer Regulator von STAT3 die Leptin-Wirkung hemmt, könnte in der Entwicklung der Leptin-Resistenz eine Rolle spielen. So konnten Peralta et al. (2002) nachweisen, dass die SOCS3-Expression in alten, Leptin-resistenten Ratten erhöht war (Peralta et al. 2002).

Manche dieser Anhaltspunkte zu der Entstehung der Leptin-Resistenz rühren auch von Studien an adipösen Individuen/Tiermodellen her und es muss kritisch beachtet werden, dass im Alter zum Teil auch andere Mechanismen in das Bild der Leptin-Resistenz impliziert sein könnten, oder sogar eine Kombination verschiedener Ursachen und Mechanismen (Alter / Fettsucht) wie in der vorliegenden Studie eine Rolle spielen.

Abschließend muss darauf hingewiesen werden, dass der Zeitpunkt 24 Stunden nach LPS-Injektion gewählt wurde, um die physiologischen Veränderungen des „sickness behaviours“, insbesondere der Fieberreaktion, möglichst umfassend analysieren zu können. Außerdem wurde bereits in der ersten Studie gezeigt, dass bei den alten Ratten das Fieber zu diesem Zeitpunkt noch andauert. Insoweit war dieser Zeitpunkt wichtig, um Auswirkungen des Leptin-Antiserums auf die späte Phase der Fieberantwort zu erfassen und um eine möglichst gute Vergleichbarkeit der Ergebnisse dieser Studie mit der vorherigen Studie zu ermöglichen. Um auf molekularbiologischer Ebene die Auswirkungen des Leptin-Antiserums, wie sie bereits in anderen Studien nachgewiesen wurden, vollständig darzustellen, wären weiterführende Studien zu einem früheren Zeitpunkt an alten und jungen Ratten mit Sicherheit sinnvoll.

Insgesamt konnte in der vorliegenden Studie zum ersten Mal gezeigt werden, dass es bei alten Ratten altersbedingt und aufgrund der altersassoziierten Fettsucht (Leptin) zu erhöhter Inflammation und verstärktem „sickness behaviour“ kommt. Es ergaben sich außerdem Hinweise, die die Hypothesen einer zentralen nicht aber einer peripheren Leptin-Resistenz unterstützen. Zirkulierende Zytokine wurden beispielsweise beeinflusst, während Effekte auf die Futterraufnahme und die Leptin vermittelte STAT3-Aktivierung nicht durch LAS beeinflussbar waren. Im Weiteren sollte nun zusätzlich untersucht werden, welche Rolle das Fettgewebe in alten Ratten als Quelle für die erhöhten Plasma-Zytokinspiegel spielt.

### **3. Veränderungen in der Zytokinfreisetzung durch das Fettgewebe im Alter**

Es ist generell bekannt, dass Fettgewebe eine wichtige Quelle erhöhter Zytokinproduktion während einer systemischen Entzündungsreaktion darstellt. Adipositas weist mehrere Ähnlichkeiten mit den altersassoziierten Veränderungen in der Immunantwort, welche in der vorliegenden Arbeit beschrieben wurden, auf. So sind adipöse Individuen ebenfalls durch eine chronische, periphere Entzündung, erhöhte Leptinkonzentrationen im Serum und eine Leptin-Resistenz gekennzeichnet (Maury & Brichard 2010). In adipösen Individuen entsteht diese

chronische Inflammation durch Hypertrophie der Adipozyten, welche eine verstärkte Immuzellinfiltration des Fettgewebes mit sich bringt und zu einer erhöhten Produktion proinflammatorischer Zytokine durch Immun- und Fettzellen führt (Weisberg et al. 2003; Cinti et al. 2005; Spalding et al. 2008) (Einleitung Kapitel 5: Die Rolle von Adipositas in der Entzündungsreaktion). In vorangehenden Studien bei alten Mäusen von Wu et al. (2007), die sich ebenfalls mit der Frage nach dem Einfluss des Fettgewebes im Altern beschäftigt haben, scheinen vor allem die Adipozyten und weniger die stromale Zellfraktion für die chronische Entzündung verantwortlich zu sein. Sie wiesen eine erhöhte IL-6 und TNF $\alpha$ -Sekretion durch Adipozyten alter Mäuse im Vergleich zu jungen Mäusen nach, gekoppelt mit einer ebenfalls erhöhten mRNA-Expression von IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF $\alpha$  und COX2 im „alten Fettgewebe“ (Wu et al. 2007). In einer anderen Studie wurde die mRNA-Expression von IL-6 im epididymalen, retroperitonealen und subkutanen Fettgewebe von jungen und alten Mäusen nach intraperitonealer LPS-Injektion untersucht und in allen drei Lokalisationen eine erhöhte IL-6-Expression bei den alten Mäusen vorgefunden, welche mit ebenfalls erhöhten IL-6-Plasmaspiegeln der alten Mäuse korrelierte (Starr et al. 2009). Eine weitere Studie aus der gleichen Arbeitsgruppe konnte in einem ähnlichen Versuchsansatz eine erhöhte LPS-induzierte mRNA-Expression von IL-6, TNF $\alpha$  und IL-1 $\beta$  epididymaler Fettdepots alter Mäuse zeigen (Starr et al. 2013). In der vorliegenden Arbeit konnten diese Ergebnisse nicht in dieser Form für die Sekretion von Zytokinen bestätigt werden. Obwohl in allen drei untersuchten Fettgewebsarten eine Tendenz für erhöhte IL-6 Sekretion im alten LPS-stimulierten Fettgewebe vorlag, erreichte sie keine Signifikanz (Abbildung 47). Im Gegensatz dazu wurden in diesem Versuch sogar erniedrigte Konzentrationen an LPS-induziertem TNF $\alpha$  und IL-1ra gemessen, welche durch das LPS-stimulierte epididymale Fettgewebe alter Ratten freigesetzt wurden. Die Ursache für diese Diskrepanz könnte beispielsweise in speziesspezifischen Unterschieden (Maus versus Ratte), dem verwendeten Serotyp von LPS (*Pseudomonas aeruginosa* vs *E. coli*), dem Versuchsaufbau (*in vivo* vs *in vitro*; Adipozyten Zellkultur vs Fat Explants) und den verwendeten Methoden liegen (ELISA vs Bioassay). Eine verringerte Produktion von Zytokinen pro g Fettgewebe alter Ratten könnte beispielsweise mit altersbedingten Veränderungen im Immunsystem bzw. der einwandernden Makrophagen oder der Adipozyten selbst zusammenhängen (Pfister & Savino 2008; Garg et al. 2014). In der Studie von Pohl et al. (2009) wurde bei einem ähnlichen Versuch zwischen in diesem Fall normalgewichtigen und Diät induziert adipösen jungen Ratten eine erhöhte LPS-induzierte IL-6 Sekretion durch das Fettgewebe adipöser Tiere nachgewiesen (Pohl et al. 2009). Diese Erkenntnisse implizieren somit eine unterschiedliche Auswirkung zwischen diät-induzierter und altersassoziiertes Adipositas. Außerdem konnte in der vorliegenden Arbeit das Fettgewebe als anteiliger Ursprungsort der erhöhten Zytokinwerte aufgrund größerer Fettdepots alter Ratten bestätigt werden. Im Vergleich zu der Situation bei fettsüchtigen jungen Ratten scheinen bei fettsüchtigen alten Ratten aber weitere Gewebe (z.B. Leber oder Muskulatur) anteilig eine größere Rolle als Zytokinquellen darzustellen. Schließlich bleibt zu bemerken, dass im Gegensatz zu anderen Studien hier die Aktivität der Zytokine mittels Bioassay gemessen wurde und nicht deren Konzentration mittels Elisa bestimmt wurde. So ist es möglich, dass Konzentrationen von Zytokinen ansteigen aber deren biologische Aktivität gesunken ist. Dies ist eine interessante und neue Hypothese des alternden Immunsystems, was in weiteren Studien noch genauer untersucht werden sollte.

Ausgehend von den zuvor genannten Studien aus der aktuellen Forschungsliteratur erscheint es natürlich lohnenswert, in Zukunft auch die mRNA-Expression dieser Zytokine im Fettgewebe der *in vivo* LPS-stimulierte jungen und alten Ratten zu untersuchen. Bis jetzt liegen nur sehr wenige Untersuchungen vor, welche den Zusammenhang zwischen einer erhöhten Inflammation des Fettgewebes sowie einer erhöhten Produktion inflammatorischer Faktoren durch das Fettgewebe und der bestehenden chronischen, peripheren Inflammation im Altern näher analysieren, so dass weitere Arbeiten für die Klärung dieser Fragestellung sinnvoll erscheinen.

#### **4. Altersabhängige Auswirkungen des PPAR $\gamma$ -Agonisten Rosiglitazon auf die LPS-induzierte Entzündungsreaktion**

##### **4.1 Einfluss einer Rosiglitazon-Behandlung im Kontext von inflammatorischen und neurodegenerativen Krankheitsbildern**

Es gibt bisher nach eigener Kenntnis nur eine Studie, welche die therapeutischen Effekte von Rosiglitazon auf die Fieberreaktion analysiert hat. Koufany et al. (2008) untersuchten in diesem Kontext die Wirkung einer Rosiglitazon-Behandlung auf die Pathogenese der Adjuvant-induzierten Arthritis im Rattenmodell (Koufany et al. 2008). Die Gabe einer hohen Dosis Rosiglitazon (10 mg/kg/Tag oral über 21 Tage) konnte sowohl die akute (Tag 0 – 3) als auch chronische (Tag 4 – 17) Fieberphase vermindern und den Schweregrad der induzierten Arthritis klinisch verbessern. Hierbei wurden die zentralnervösen Mechanismen der Fieberentstehung allerdings nicht genauer analysiert. Die meisten Forschungsarbeiten in Bezug auf die antiinflammatorischen Eigenschaften von Rosiglitazon haben seine potentielle therapeutische Wirkung in Tiermodellen der zerebralen Ischämie untersucht und ebenfalls potentiell neuroprotektive Eigenschaften dieses Thiazolidinedions erforscht. Die zerebrale Minderperfusion wurde meistens über Verschluss (chirurgisch oder embolisch) der *Arteria cerebri media* herbeigeführt und Rosiglitazon oder Lösungsmittelkontrolle je nach Studie entweder bereits vor Verschluss (Allahtavakoli et al. 2006; Chu et al. 2006; Luo et al. 2006; Wang et al. 2009; Fatehi-Hassanabad & Tasker 2011) oder auch erst kurz nach dem Verschluss (Pereira et al. 2006; Allahtavakoli et al. 2009; Sobrado et al. 2009) verabreicht. Die Dauer und Art der Verabreichung (oral, intraperitoneal oder intrazerebroventrikulär) sowie die Dosierung waren unterschiedlich. Die Rosiglitazon-Behandlung führte in diesen Studien zu einer Verkleinerung der zerebralen Läsion und einer verbesserten neurologischen Symptomatik.

Auch in Bezug auf das Altern und die damit assoziierte Neuroinflammation gab es Arbeitsgruppen die sich mit einer therapeutischen Wirkung von Rosiglitazon in diesem Kontext beschäftigt haben. In der Studie von Gemma et al. (2004) konnte eine Langzeitverabreichung von Rosiglitazon übers Futter während 2 Monaten den altersassoziierten Rückgang kognitiver Fähigkeiten abmildern. Alte Ratten zeigten nach Rosiglitazon-Behandlung in einem Modell der kontextuellen Angstkonditionierung einen ähnlichen Lerneffekt wie junge Kontrollratten und beide Gruppen unterschieden sich signifikant von den alten Kontrollratten, welche einen schwächeren Lerneffekt zeigten (Gemma et al. 2004). In einer anderen Studie konnte gezeigt werden, dass die erhöhte

Produktion von IL-1 $\beta$  im Hippocampus alter Ratten durch Rosiglitazon-Behandlung abgesenkt werden konnte (Loane et al. 2009). Diese Absenkung der IL-1 $\beta$ -Produktion war darüber hinaus mit einer Wiederherstellung der Langzeit-Potenzierung (engl. „long-term potentiation“ LTP) verbunden. LTP stellt einen Maßstab für die synaptische Plastizität der Nervenzellen im Rahmen von Gedächtnisvorgängen dar und nimmt im Alter ebenfalls ab (Almaguer et al. 2002; Blau et al. 2012). Auch eine weitere Studie konnte durch Rosiglitazon-Behandlung über 21 Tage die über LTP gemessene synaptische Plastizität bei alten Ratten verbessern (Cowley et al. 2012). Des Weiteren wurde hierdurch die altersassoziierte „astrogliosis“, also erhöhte Reaktivität der Astrozyten, reduziert. Neben einer erhöhten Aktivierung der Mikrogliazellen wird die „astrogliosis“ ebenfalls als zur altersbedingten Neuroinflammation beitragenden Faktor angesehen. In der gleichen Studie führte die Rosiglitazon-Behandlung ebenfalls zu einer Erniedrigung erhöhter TNF $\alpha$ -Level im Gehirn alter Ratten.

Neben den altersassoziierten zerebralen Veränderungen wurde die Auswirkung einer Rosiglitazon-Behandlung auch im Kontext neurodegenerativer Erkrankungen wie Parkinson oder Alzheimer untersucht. An einem experimentellen Parkinson Tiermodell, verursacht durch MPTP (1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine) induzierte Degeneration dopaminergener Neuronen, wurde eine 2-wöchige Rosiglitazon-Behandlung durchgeführt (Carta et al. 2011). Die MPTP-Behandlung steigerte unter anderem die mikrogliale Reaktivität durch Erhöhung der CD11b-Expression und auch die TNF $\alpha$ -Expression durch mikrogliale Zellen. Diese Effekte konnten durch die Rosiglitazon-Behandlung rückgängig gemacht werden. Ebenso konnte Rosiglitazon die Degeneration dopaminergener Neurone aufhalten. Im Kontext der Alzheimer Erkrankung gab es nach Rosiglitazon-Therapie Hinweise auf eine Verbesserung der kognitiven Fähigkeiten bei Humanpatienten (Watson et al. 2005; Risner et al. 2006) und in Tiermodellen (Pedersen et al. 2006; Escribano et al. 2010). Eine vierwöchige Rosiglitazon-Behandlung in einem transgenen Alzheimer Mausmodell führte zu einer Reduktion der mikroglialen Reaktivität und einer Verminderung der mRNA-Expression von TNF $\alpha$  und COX2, zusammen mit einer Verbesserung der kognitiven Fähigkeiten (Escribano et al. 2010). Eine größere klinische Studie über eine Monotherapie mit Rosiglitazon an Alzheimer Patienten konnte jedoch keine signifikanten positiven Effekte von Rosiglitazon feststellen (Gold et al. 2010).

Neuroinflammatorische Prozesse, wie sie auch beim Altern auftreten, scheinen eine bedeutende Rolle bei der Entstehung bzw. dem Fortschreiten neurodegenerativer Erkrankungen wie Parkinson (Hirsch & Hunot 2009; Tufekci et al. 2012) oder Alzheimer (Rogers et al. 2007; Fuster-Matanzo et al. 2013) zu spielen. Ein Teil der Forschungsarbeiten auf diesen Gebieten beschäftigen sich somit mit der Entwicklung oder dem Einsatz von Substanzen, welche eine Verbesserung dieser Krankheitsbilder über eine Reduktion der neuroinflammatorischen Vorgänge herbeiführen könnten.

## **4.2 Beurteilung der Effekte von Rosiglitazon auf die LPS-induzierte Entzündungsreaktion bei jungen und alten Ratten**

Die genannten Studien liefern vielversprechende Ansätze um die Wirkung von Rosiglitazon in dem Modell der LPS-induzierten systemischen Entzündungsreaktion zu untersuchen. Mit dem in dieser Arbeit genutzten Versuchsmodell könnte man sowohl den potentiellen Nutzen

der antiinflammatorischen Wirkung auf die Fieberreaktion und der zugrundeliegenden Mechanismen analysieren als auch weitere Hinweise auf eine modulierende Beeinflussung der altersbedingten chronischen Neuroinflammation und potentielle therapeutische Ansätze für hiermit assoziierte Krankheitsbilder gewinnen. Trotz der in den anderen Forschungsarbeiten erwiesenen antiinflammatorischen sowie neuroprotektiven Effekte dieses Wirkstoffs, konnte in der vorliegenden Studie keine Auswirkung der Rosiglitazon-Behandlung auf die Parameter der LPS-induzierten „sickness response“ nachgewiesen werden (Abbildung 49; Abbildung 52). Auch die peripheren Zytokin-Level blieben, bis auf eine Erniedrigung der IL-10-Plasmaspiegel bei den alten Ratten, welches auf Grund der sehr hohen Variabilität dieses Ergebnisses sehr kritisch betrachtet werden muss, von der Vorbehandlung durch Rosiglitazon unbeeinflusst (Abbildung 53). Bei den untersuchten inflammatorischen Markern in Hypothalamus und Leber trat ebenfalls kein Unterschied zwischen der Behandlung mit Rosiglitazon oder dem Lösungsmittel Cremophor auf (Abbildung 55; Abbildung 56; Abbildung 57). Eine Analyse der mRNA-Expression von Faktoren, welche durch Rosiglitazon nachweislich induzierbar sind, nämlich PGC-1 $\alpha$  und seine „down-stream“ Gene NRF1 und TFAM (Mensink et al. 2007; Muhlhausler et al. 2009), sollte Klarheit über eine ausreichende Anflutung und Wirkung dieses Wirkstoffes in den untersuchten Organen liefern. Im Hypothalamus gab es keine Anhaltspunkte für eine Rosiglitazon-induzierte Expressionsänderung dieser Faktoren (Abbildung 54 A, C, E). In der Leber hingegen konnte die Rosiglitazon-Behandlung in der jungen PBS-Kontrollgruppe die mRNA-Expression von PGC-1 $\alpha$  und TFAM erhöhen (Abbildung 54 B, F), dieser Effekt war allerdings nach LPS-Stimulation nicht mehr nachweisbar. Prinzipiell konnte also der zu erwartende Effekt einer PGC-1 $\alpha$ - und TFAM-Erhöhung durch Rosiglitazon auf mRNA-Ebene nachgewiesen werden. Auf Proteinebene allerdings war wiederum in der Leber keine deutliche Veränderung dieser oxidativen Stressmarker festzustellen (Abbildung 58). Eine Erklärung hierfür wäre, dass die zweitägige Gabe von Rosiglitazon nicht ausreicht, um das System physiologisch zu beeinflussen. Tatsächlich verwendeten bereits erwähnte Rosiglitazon-Studien am Nagermodell oftmals die Rosiglitazon-Behandlung als Langzeittherapie über mehrere Tage oder Wochen. In der vorliegenden Arbeit wurde sich unter anderem für eine akute zweitägige Verabreichung entschieden, da bei einer Fiebererkrankung eine akute direkte medikamentelle Beeinflussung durch Rosiglitazon und zugrundeliegende Mechanismen untersucht werden sollte. Diese Verabreichungsdauer scheint jedoch nicht lang genug gewesen zu sein. Obwohl Rosiglitazon die mRNA-Expression in der Leber gesteigert hat, wurden die Proteine nicht signifikant beeinflusst. In den Studien an Modellen der zerebralen Ischämie wurde Rosiglitazon in einigen Fällen aber auch akut vor Arterienverschluss oder sogar danach gegeben. Im Unterschied zu der vorliegenden Arbeit werden bei der Okklusion der *Arteria cerebri media* weitaus schwerwiegendere Läsionen und Entzündungsreaktionen im Gehirngewebe gesetzt. Durch diese Läsion des Gehirngewebes konnte der Wirkstoff möglicherweise die Blut-Hirn-Schranke umgehen und somit leichter ins Gehirngewebe gelangen. Die Schwierigkeit die Blut-Hirn-Schranke zu überwinden würde auch erklären, dass in der Leber als peripheres Organ eine leichte Regulation der Gene durch Rosiglitazon gesehen wurde, der Hypothalamus jedoch gänzlich unbeeinflusst blieb. Ungeachtet der potentiellen Hirngängigkeit konnte die systemische Inflammation in der vorliegenden Studie ebenfalls durch Rosiglitazon nicht maßgeblich beeinflusst werden. Man kann aus der

vorliegenden Studie also schließen, dass die antiinflammatorischen Eigenschaften von Rosiglitazon hauptsächlich langfristigen indirekten Effekten zuzuschreiben sind. Trotzdem erscheint auf Grund der bisherigen Ergebnisse aus der Literatur eine Anwendung von Rosiglitazon, insbesondere im Hinblick auf eine Beeinflussung der chronischen Neuroinflammation im Altern, immer noch sinnvoll. Aufgrund der neuen Daten der vorliegenden Studie, sollte dafür aber Rosiglitazon deutlich länger als zwei Tage appliziert werden. Gerade für solch eine längere Anwendungsdauer sollte die orale Verabreichungsart anstelle systemischer Gabe vorgezogen werden, wie sie in einigen anderen Studien erfolgreich eingesetzt werden konnte.

### **4.3 Ausblick für die Rosiglitazon-Forschung**

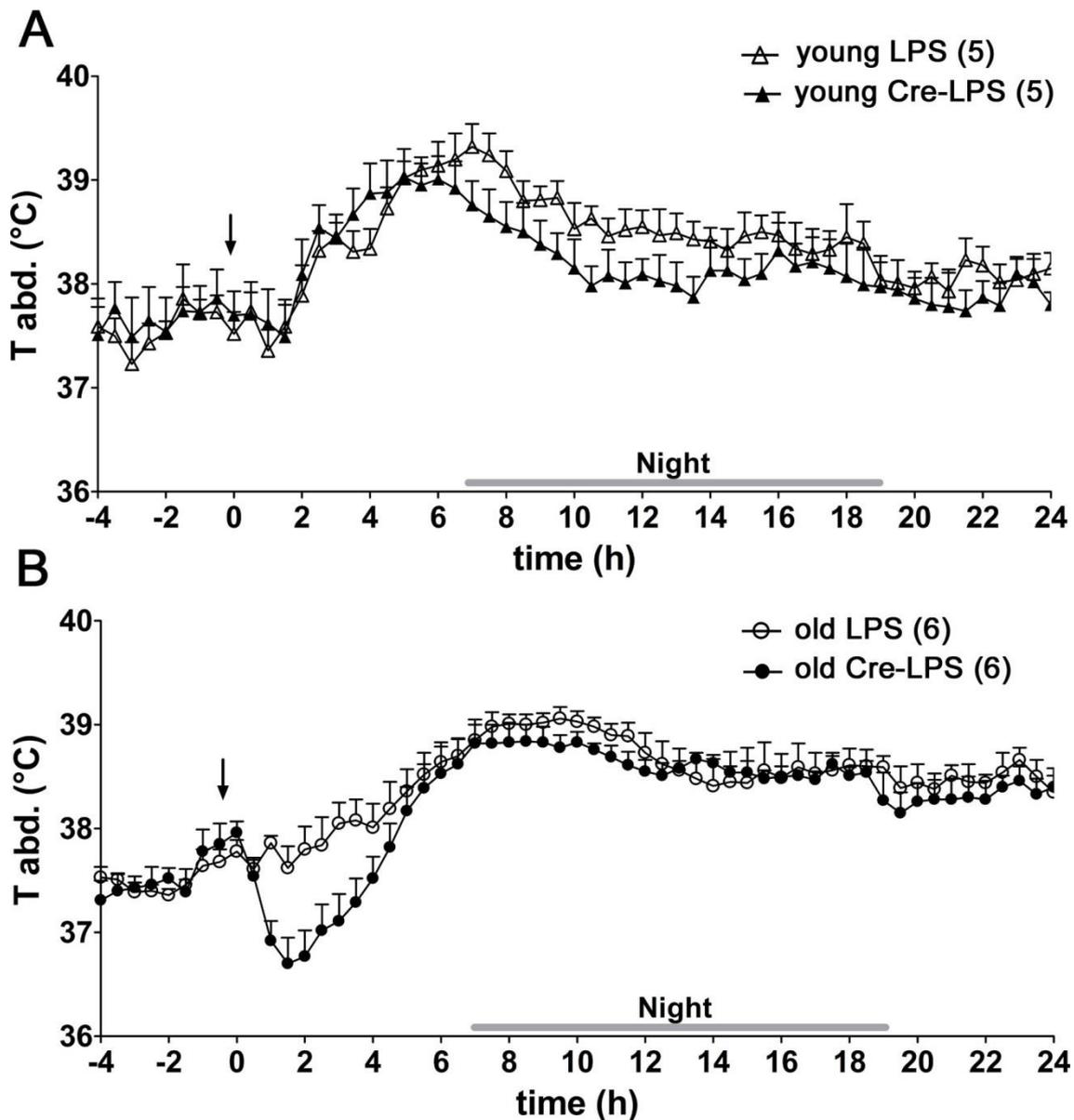
Circa erst 10 Jahre nachdem Rosiglitazon 1999 unter dem Produktnamen Avandia® als insulin sensibilisierendes orales Antidiabetika-Präparat auf dem Markt eingeführt wurde häuften sich Studien über eine Erhöhung der Rate an myokardialen Infarkten bei Rosiglitazon-Einnahme (Nissen & Wolski 2007; Nissen & Wolski 2010). Obwohl die Signifikanz dieser Korrelation auch angezweifelt wurde (Home et al. 2007; Home et al. 2009), wurde auf Grund des geänderten ungünstigen Nutzen-Risiko-Verhältnisses für den Patienten Avandia® 2010 von der Europäischen Arzneimittelagentur (EMA) vom europäischen Markt genommen (Blind et al. 2011; Pouwels & van Grootheest 2012). In den USA hingegen ist Avandia® immer noch erhältlich (Khalaf & Taegtmeyer 2012). Zwischen November 2011 und November 2013 hatte die „Food and Drug Administration“ (FDA) die Verschreibung dieses Medikamentes in den USA strengeren Einschränkungen unterworfen, welche aber aktuell auf Grund einer neuerlichen umfassenden Re-Evaluierung der kardiovaskulären Sicherheit von Rosiglitazon wieder gelockert worden sind. Diese Re-Evaluierung hatte kein höheres Risiko für myokardiale Infarkte nach Avandia®-Einnahme im Vergleich zu üblicherweise genutzten Antidiabetika ergeben (FDA 2013).

Trotz dieser kontroversen Schlagzeilen in der Diabetes-Therapie sind Rosiglitazon sowie andere PPAR- $\gamma$  Agonisten noch immer Gegenstand der Forschung in anderen Krankheitsbildern. Neben den bereits erwähnten Forschungsarbeiten an Alzheimer und Parkinson rückt hier auch eine weitere neurodegenerative Krankheit in den Vordergrund, nämlich Huntington. Bei Huntington handelt es sich um eine genetische, autosomal-dominante neurodegenerative Erkrankung, welcher einer Mutation im Huntington-Gen zu Grunde liegt. Sie ist gekennzeichnet durch fortschreitende motorische Dysfunktion, einem Rückgang der kognitiven Funktion und psychiatrischer Symptomatik (Walker 2007). Neben anderen Vorgängen gibt es auch Hinweise auf eine Störung der mitochondrialen Funktion und der PGC-1 $\alpha$ -Expression (Cui et al. 2006; McGill & Beal 2006). Experimentelle Studien haben nun erste Anzeichen gefunden, dass Rosiglitazon über Beeinflussung von PPAR- $\gamma$  und PGC-1 $\alpha$  eine Verbesserung der mitochondrialen Funktion und einen positiven Einfluss auf die Pathogenese dieser Krankheit hat (Quintanilla et al. 2008; Chiang et al. 2010; Chiang et al. 2012; Jin et al. 2013). In der Fachliteratur gibt es somit mehrere Hinweise für eine Rolle dieser Faktoren in neurodegenerativen, bisher nicht zufriedenstellend therapierbaren Erkrankungen, so dass ein Vorantreiben weiterer Forschung auf diesem Gebiet in jedem Fall sinnvoll erscheint. Nach den hier vorliegenden Ergebnissen sollte dabei von akuten Behandlungsstrategien abgesehen werden.

#### 4.4 Cremophor® EL als Lösungsvermittler

Bei den Fieberkurven der mit Rosiglitazon oder Cremophor vorbehandelten alten Ratten fällt auf, dass kurz nach der LPS-Injektion eine deutliche Hypothermie auftritt (Abbildung 49 B), bevor die Temperatur wieder ansteigt, während bei den nur mit LPS behandelten alten Ratten aus der ersten Studie „Altern“ keine Hypothermie in der Fieberphase zu sehen war (Abbildung 23 B, Abbildung 68 B). Im Allgemeinen hängt das Auftreten einer Hypothermie nach LPS-Injektion zum einen mit der Umgebungstemperatur und zum anderen mit der LPS-Dosis zusammen. So führt eine kühlere oder subthermoneutrale Außentemperatur von z.B. 22 °C zu einer initialen hypothermischen Phase, während die gleiche Dosis LPS bei einer höheren Umgebungstemperatur von z.B. 30 °C keine Hypothermie mehr verursacht (Steiner et al. 2009). Des Weiteren löst eine höhere Dosis LPS bereits bei der hohen Außentemperatur eine Hypothermie aus bzw. verstärkt und/oder verlängert die Phase der Hypothermie bei gleichbleibender Umgebungstemperatur (Steiner et al. 2009; Damm 2012). Somit kann die Hypothermie auch als ein Indikator für die Stärke der LPS-Effekte angesehen werden (Blaque et al. 1996). Weitet sich die systemische Entzündungsreaktion zur Sepsis aus, ist Hypothermie oftmals der vorherrschende Zustand und korreliert in septischen Patienten mit einem ungünstigeren Krankheitsverlauf im Vergleich zu Patienten mit erhöhter Temperatur (Remick & Xia 2006). In dieser Arbeit wurden die Ratten in beiden Studien bei gleicher Umgebungstemperatur (28 °C) gehalten und bekamen die gleiche Dosis LPS injiziert. Infolgedessen liegt es nahe, dass der auslösende Faktor der Hypothermie das in der Rosiglitazon-Studie verwendete Lösungsmittel Cremophor ist. Bei Cremophor® EL handelt es sich um einen nicht-ionischen Lösungsvermittler und Emulgator, welcher zu einem hohen Bestandteil aus Rizinusöl besteht und weitgehend als Lösungsmittel für wasserunlösliche Substanzen wie Anästhetika, Immunsuppressiva, Analgetika und Zytostatika genutzt wird (Tabarelli et al. 2003) und auch in vorherigen Forschungsarbeiten des Instituts für Veterinär-Physiologie bereits verwendet wurde (Knorr et al. 2010; Damm et al. 2013). Da Cremophor bzw. die Cremophor-Rosiglitazon-Mischung zeitgleich mit in PBS-gelöstem LPS injiziert wurde, scheint das ölige Lösungsmittel die intraperitoneale Aufnahme von LPS verbessert und somit die LPS-vermittelten Effekte verstärkt zu haben, was sich vor allem in der Fieberkurve widerspiegelt. Interessanterweise ist dieser Effekt bei den alten Ratten sehr deutlich, während die jungen Ratten kaum davon beeinflusst waren (Abbildung 68). Die somit „höhere“ Dosis LPS scheint bei den alten Tieren eine stärkere Wirkung aufzuzeigen als bei den jungen Tieren. Obwohl Cremophor® EL weitreichend als Lösungsvermittler eingesetzt wird und vom Hersteller von Rosiglitazon als Lösungsvermittler angegeben war, berichten auch Studien über Eigeneffekte dieses Lösungsmittels. Diese Effekte sollten bei der Beurteilung von Forschungsergebnissen, sowie bei der Verabreichung von Medikamenten beachtet werden. Die Langzeitverabreichung von Cremophor® EL führte so in Tierversuchen zu einem Anstieg von Leberenzymen (Gutierrez et al. 2006) und bei Humanpatienten häufig zu Hypersensitivitätsreaktionen, sowie zu einer Aktivierung des Komplementsystems (Szebeni et al. 1998). In der vorliegenden Arbeit wiesen die mit Cremophor und PBS behandelten Kontrolltiere keine Auffälligkeiten auf, so dass ein starker Eigeneffekt des Lösungsmittels auf die vorliegenden Ergebnisse unwahrscheinlich erscheint. Die auffällige Verstärkung der durch LPS ausgelösten Fieberreaktion, gekennzeichnet durch das Entstehen

einer Hypothermie, insbesondere bei den alten und für die Effekte des Endotoxins ohnehin anfälligeren Ratten, stellt jedoch einen wichtigen Befund im Hinblick auf die Anwendung von Cremophor® EL dar. Nicht nur für weitere Studien zur Untersuchung inflammatorischer Prozesse, insbesondere der Fieberreaktion, sondern auch für die klinische Anwendung von Cremophor® EL z.B. in der Krebstherapie (Taxotere®) stellen solche Beobachtungen ebenfalls wichtige Befunde dar. Krebstherapien können nämlich auch vermehrt Endotoxine freisetzen bzw. inflammatorisch wirken oder die Durchlässigkeit der Darmbarriere für Endotoxine erhöhen (Byrd-Leifer et al. 2001; Pusztai et al. 2004; Razonable et al. 2006). Nach den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit könnte Cremophor® EL hierbei zu verstärkten Nebenwirkungen beitragen.



**Abbildung 68: Vergleich der Fieberkurven nach Injektion mit dem Lösungsmittel Cremophor und LPS oder LPS alleine**

Verlauf der intraabdominal gemessenen Körpertemperatur in Absolutwerten nach intraperitonealer Injektion mit Cre-LPS oder LPS (100 µg/kg) über 24 h bei jungen (A) und

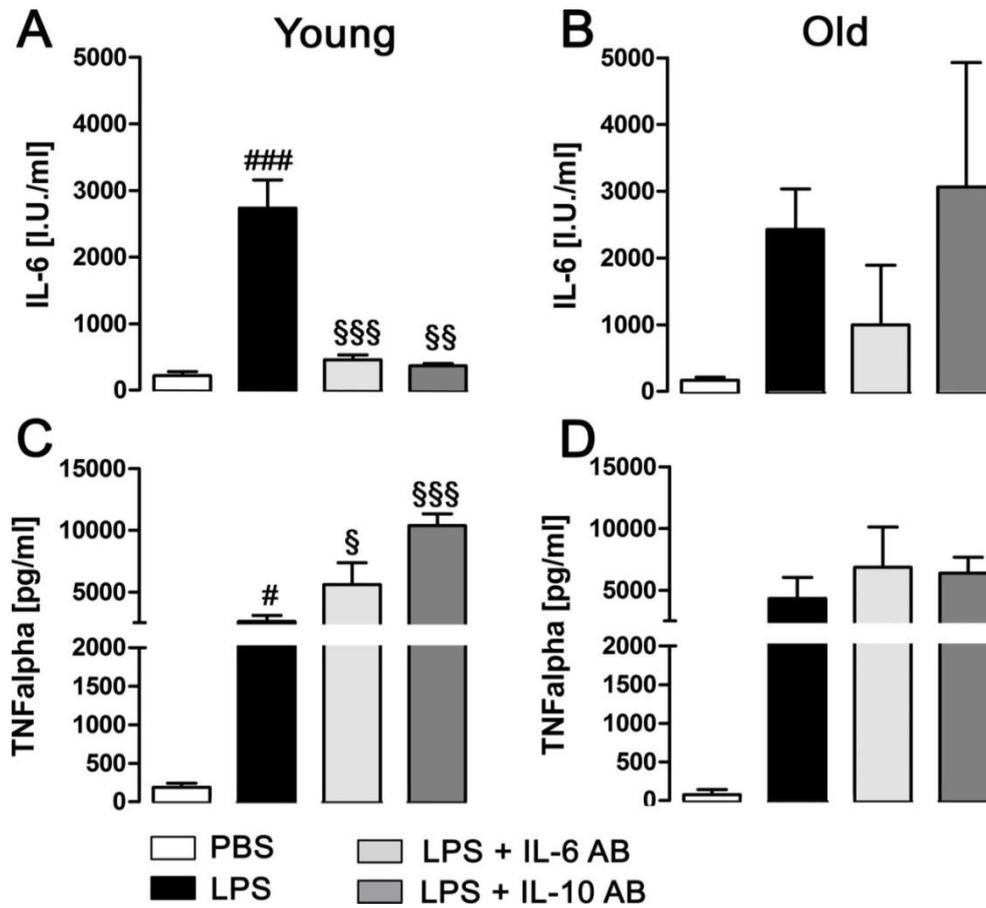
alten (B) Ratten. Der Zeitpunkt der i.p. Injektion wurde mit einem Pfeil markiert, die Nachtphase wurde mit einem grauen Balken gekennzeichnet. Beide Graphen zeigen den Vergleich zwischen Cre-LPS-stimulierten und LPS-stimulierten Tieren.

## **5. Altersbedingte Veränderungen in der Aktivierung der HPA-Achse**

### **5.1 Unterschiede in der Zytokinfreisetzung des Hypophysenvorderlappens (HVL) junger und alter Ratten**

Wie in früheren Studien bereits gezeigt (Sandhir & Berman 2010) konnte in der vorliegenden Arbeit eine erhöhte Expression von NF-IL6 im Gehirn bzw. Hypothalamus alter Ratten gezeigt werden. In der immunhistochemischen Untersuchung relevanter Hirnregionen junger und alter LPS-stimulierter Ratten konnte hier allerdings zum ersten Mal nachgewiesen werden, dass die LPS-Stimulation in der *Median eminence* und der Hypophyse eine verstärkte NF-IL6-Aktivität bei den alten Ratten auslöst. Wie bereits beschrieben, stellt die ME eine relevante Struktur für die HPA-Achse dar, indem sie das im PVN gebildete „corticotropin-releasing hormone“ (CRH) an das Portalblutgefäßsystem und somit an den HVL weitergibt (Whitnall et al. 1985). Eine verstärkte Aktivierung dieses inflammatorischen Transkriptionsfaktors in diesen beiden Regionen könnte somit bedeuten, dass der im Alter vorherrschende erhöhte inflammatorische Status Einfluss auf die Stressachse haben könnte. Veränderungen in der Stressachse bei alten Tieren und Menschen sind bereits länger bekannt (Sapolsky et al. 1987; Ferrari et al. 2001; Cano et al. 2008) (Einleitung Kapitel 7.2: Einfluss des Alterns auf die HPA-Achse), die Ursachen sind allerdings teilweise noch unklar. In einer Studie konnte außerdem kürzlich gezeigt werden, dass NF-IL6 möglicherweise bei der Aktivierung der HPA-Achse in jungen Tieren eine Rolle zu spielen scheint (Damm et al. 2011; Fuchs et al. 2013). Unter diesen Gesichtspunkten wurde die Hypophyse als nachgeschaltete Struktur sowohl immunhistochemisch und auf mRNA-Ebene anhand von Hypophysen LPS-behandelter Versuchstiere als auch *in vitro* anhand von primären Zellkulturen der Hypophyse untersucht. Da der Hypophysenvorderlappen (HVL) als der ME nachgeschaltete Struktur über das erhaltene CRH mit ACTH-Produktion antwortet und somit eine wichtige Schnittstelle für die Stressantwort darstellt, wurde sich in der Zellkultur auf die Untersuchung des HVL konzentriert.

Im Rahmen der primären Zellkultur des HVL alter Ratten führte eine Stimulation mit LPS zu einer erhöhten Produktion von IL-6 und TNF $\alpha$  im Vergleich zu PBS-stimulierten Kontrollen. Die LPS-induzierte Produktion und Freisetzung von IL-6 im HVL konnte bereits in früheren Studien gezeigt werden (Spangelo et al. 1990; Spangelo et al. 1990), während der Nachweis einer erhöhten TNF $\alpha$ -Produktion nach LPS-Stimulus kürzlich bei jungen Ratten erbracht wurde (Fuchs 2013). Die aus der Forschungsarbeit von Franziska Fuchs gewonnenen Ergebnisse stammen aus Versuchen an primären HVL-Zellkulturen, die am gleichen Institut durchgeführt wurden und dem gleichen Versuchsaufbau und der gleichen Methodik unterlagen wie die in dieser Arbeit diskutierten Ergebnisse und können deshalb zur vergleichenden Betrachtung zwischen jungen (Fuchs) und alten (Koenig) HVL-Zellkulturen der Ratten herangezogen werden.



**Abbildung 69: Konzentration von IL-6 und TNF $\alpha$  im Überstand der HVL-Zellkultur**

Konzentration von IL-6 (A und B) und TNF $\alpha$  (C und D) im Überstand der HVL-Zellkultur von jungen und alten Ratten 6 h nach Stimulation mit LPS (100  $\mu$ g/ml) oder PBS alleine oder nach vorheriger Inkubation mit Zytokinantikörpern (antibody = AB). # = Vergleich LPS vs PBS; § = Vergleich IL-6 AB/IL-10 AB + LPS mit LPS; #,§ P < 0.05; §§ P < 0.01; ###,§§§ P < 0.001. Aus (Fuchs 2013) (A,C) im direkten Vergleich mit den HVL-Zellkulturen alter Ratten (B,D).

Im direkten Vergleich der Zytokinproduktion der Hypophysenvorderlappen junger und alter Ratten (Abbildung 69) fällt auf, dass die HVL junger Ratten sich durch eine stärkere Regulation durch die verabreichten Zytokinantikörper auszeichnen. In der Arbeit von Fuchs, 2013 führte sowohl die Präinkubation mit IL-6-Antiserum als auch mit IL-10-Antiserum vor LPS-Stimulation zu einer drastischen Reduktion der gemessenen IL-6-Konzentration im Überstand im Vergleich zur alleinigen LPS-Stimulation (Fuchs 2013). Bei den Zellkulturen alter Ratten führte die Präinkubation mit dem IL-6-Antiserum zu einer sichtbaren, allerdings weniger starken und statistisch nicht mehr signifikanten Reduktion der IL-6 Produktion und Freisetzung. Die Inkubation mit dem IL-10-Antiserum scheint jedoch bei den alten Ratten interessanterweise keinen regulatorischen Effekt auf die IL-6-Produktion auszuüben. Ein ähnliches Muster ergibt sich bei der Betrachtung der TNF $\alpha$ -Messung. Bei den jungen Ratten führte die Gabe von IL-6 und IL-10-Antisera vor LPS-Gabe zu einer Erhöhung der TNF $\alpha$ -Konzentration im Vergleich zur alleinigen LPS-Stimulation. Dies erlaubte bei den jungen Ratten Rückschlüsse darauf, dass es sich hier wahrscheinlich um einen durch die erniedrigten

IL-6-Spiegel ausgelösten Vorgang handelt. Aus anderen Arbeiten ist bereits bekannt, dass durch Immunzellen produziertes IL-6 die Produktion von TNF $\alpha$  und IL-1 $\beta$  hemmt und somit auch antiinflammatorisch wirken kann (Tilg et al. 1994). Dieser negative Feedback-Mechanismus scheint bei den jungen Ratten durch die Konzentrationsabnahme von IL-6 nach Inkubation mit IL-6 und IL-10-Antiseren wegzufallen und daraufhin eine erhöhte Produktion von TNF $\alpha$  zur Folge zu haben. Bei den alten Ratten führt weder die Gabe von IL-10-Antikörpern, welcher auch die IL-6-Produktion nicht hemmen konnte, noch die Gabe von IL-6-Antikörpern zu einer Beeinflussung der TNF $\alpha$ -Konzentration.

LPS kann über spezifische LPS-Rezeptoren an den follikulostellaten (FS-) Zellen des HVL die Freisetzung von IL-6 veranlassen, welches über IL-6-Rezeptoren an corticotropen Zellen die ACTH-Freisetzung fördern kann (Renner et al. 1998). Obwohl Bindungsstellen für TNF $\alpha$  im HVL bereits nachgewiesen werden konnten (Wolvers et al. 1993), ist die Wirkung von TNF $\alpha$  auf die ACTH-Produktion und somit die Stressachse bisher noch nicht geklärt, da sowohl stimulierende (Bernardini et al. 1990) als auch inhibitorische (Gaillard et al. 1990) Wirkungen von TNF $\alpha$  festgestellt wurden. Nach Fuchs 2013 konnte in der vorliegenden Arbeit nun auch eine TNF $\alpha$ -Produktion des HVL alter Ratten belegt werden, die sich jedoch durch eine weniger starke Regulation durch die vorhandenen IL-6-Konzentrationen auszeichnet. Auch die hypophysäre IL-6-Produktion an sich wird bei den alten Ratten nicht so stark durch IL-6- und IL-10-Antikörper reguliert wie bei den jungen Ratten. Diese Ergebnisse aus der Zellkultur spiegeln sich auch in den anschließenden immunhistochemischen Untersuchungen der NF-IL6- und TNF $\alpha$ -Immunreaktivität der Zellen wider (Abbildung 60). Bei den jungen Ratten wurde eine deutliche Zunahme sowohl der NF-IL6- als auch der TNF $\alpha$ -Immunreaktivität nach Inkubation mit IL-6- und IL-10-Antiserum vor LPS-Gabe im Vergleich zur alleinigen LPS-Stimulation festgestellt (Fuchs 2013). In der hier vorliegenden Arbeit konnte jedoch bei den Zellkulturen alter Ratten keine sichtbare Veränderung der Immunreaktivität von NF-IL6 oder TNF $\alpha$  gezeigt werden, was im Einklang mit den gemessenen Zytokinkonzentrationen im Zellkulturüberstand steht. Lediglich zwischen PBS- und LPS-stimulierten Zellkulturen trat eine deutliche Zunahme der NF-IL6-Aktivität auf, welche ebenfalls mit der beobachteten Zunahme der LPS-induzierten Konzentration von sowohl IL-6 als auch TNF $\alpha$  im Zellkulturüberstand korreliert. Somit konnte auf diesen beiden Ebenen festgestellt werden, dass der HVL alter Ratten auf LPS-Stimulation ähnlich wie bei jungen Ratten reagiert, aber das Zusammenspiel der verschiedenen Zytokine und deren gegenseitige Beeinflussung weniger stark oder anders reguliert zu sein scheint als bei jungen Ratten. Man könnte hier vielleicht sogar analog zu Leptin von einer gewissen altersbedingten Resistenz der Zytokine gegenüber deren gegenseitigen Beeinflussung (Feedbacks) sprechen. Eine Veränderung dieser Regulationsmechanismen in der Hypophyse beim Altern könnte zu einer veränderten Aktivierung der HPA-Achse und verminderten Stressresistenz beitragen.

## **5.2 Unterschiede in der Expression inflammatorischer Transkriptionsfaktoren in der Hypophyse junger und alter Ratten**

Aufbauend auf der Vorarbeit von (Fuchs 2013) zur Charakterisierung der NF-IL6-Aktivität in der Hypophyse in jungen Ratten, wurden hier ebenfalls immunhistochemische Analysen dieses Transkriptionsfaktors durchgeführt. Während im Vorderlappen der Hypophyse eine LPS-induzierte Aktivität von NF-IL6 bei beiden Gruppen vorhanden war, aber keine

altersbedingten Unterschiede nachgewiesen werden konnten, ergaben sich interessantere Befunde bei der Untersuchung des Hinterlappens der Hypophyse (HHL). Hier konnte erstmalig eine deutliche Zunahme der NF-IL6-Aktivität im Alter festgestellt werden, welche sowohl bei den PBS-stimulierten alten Ratten auftrat und sich noch deutlicher nach LPS-Injektion herausstellte (Abbildung 63 C-F). Eine Kolokalisation dieser NF-IL6-Aktivierung nach LPS-Stimulus konnte in der vorhergehenden Studie (Fuchs et al. 2013) immunhistochemisch für corticotrope Zellen, Pituizyten, endotheliale Zellen, nNOS-exprimierende Neurone, perivaskuläre Makrophagen und aktivierte Makrophagen nachgewiesen werden. Da im Vorderlappen keine verstärkte NF-IL6-Aktivierung im Altern gesehen wurde, erschien die Untersuchung einer Kolokalisation mit corticotropen Zellen nicht sinnvoll und es wurde im Folgenden auf die Untersuchung des Hinterlappens fokussiert und eine mögliche Kolokalisation von NF-IL6 mit Pituizyten (GFAP-Färbung) und aktivierten Makrophagen (CD68-Färbung) untersucht. Es konnte keine Kolokalisation mit GFAP festgestellt werden (Abbildung 64 A-D), jedoch lieferte die CD68-Färbung interessante Ergebnisse. NF-IL6 zeigte im Hinterlappen eine häufige Kolokalisation mit CD68-positiven Zellen (Abbildung 64 E-H) und darüber hinaus konnte bei den alten Ratten deutlich vermehrte CD68-positive Zellen im Hinterlappen nachgewiesen werden, sowohl bei den PBS-behandelten Tieren und vor allem nach LPS-Stimulation (Abbildung 63 G-J). Zum ersten Mal wurde bei den alten Ratten basal eine vermehrte residierende Population immunkompetenter Zellen, die mit CD68 angefärbt werden, beobachtet. Nach Immunstimulus war ein verstärktes Einwandern bzw. eine verstärkte Aktivierung dieser Zellen dokumentierbar. Diese Zellen könnten für die vorgefundene verstärkte Aktivierung des inflammatorischen Transkriptionsfaktors NF-IL6 verantwortlich sein. Dieses Ergebnis stellt einen interessanten Befund dar und es wäre sinnvoll, dies in weiterführenden Studien näher zu untersuchen. Da die erhöhte NF-IL6-Immunreaktivität vor allem im Hypophysenhinterlappen auftrat ist unklar, wie und ob hierdurch die ACTH-Produktion und die Stressachse beeinflusst werden, da der HHL über Axone aus dem Hypothalamus die Hormone Vasopressin (VP) (Wasserrückresorption in den Nieren, Blutdruckregulation) und Oxytocin (Kontraktion der Uterusmuskulatur und der Milchdrüse) erhält, speichert und bei Bedarf an die Blutbahn abgibt (Nickel et al. 1992). Vasopressin wird vor allem in den magnozellularen Neuronen des PVN gebildet und erreicht auf dem eben beschriebenen Weg den HHL (Brownstein et al. 1980). Aber auch die parvozellulären Neurone, welche vor allem für die CRH-Bildung bekannt sind, enthalten zu 50% Vasopressin (Whitnall et al. 1985), welches in Stresssituation über die ME und das Portalblutgefäßsystem ebenfalls in den HVL gelangt und über Vasopressin Vb1 Rezeptoren (Aguilera & Rabadan-Diehl 2000) die ACTH-Sekretion stimulieren kann (Hauger & Aguilera 1993; Aguilera 1994). Ob die hier beobachteten Veränderungen einen Einfluss auf die Stressachse im Alter haben ist noch unklar. Die Etablierung primärer Zellkulturen des HHL alter Ratten und eine Messung der Zytokinproduktion wären aufgrund der vorliegenden immunhistochemischen Ergebnisse in zukünftigen Untersuchungen mit Sicherheit sinnvoll, um die Tragweite dieser vermehrten Anzahl aktivierter Makrophagen und vermehrter NF-IL6-Aktivität weiter zu analysieren.

In der molekularbiologischen Untersuchung wurde die mRNA-Expression inflammatorischer Transkriptionsfaktoren (NF-IL6) oder deren Aktivitätsmarker (SOCS3 und  $I\kappa B\alpha$ ) sowie das für die ACTH-Produktion relevante Prohormon Proopiomelanocortin (POMC) bei jungen und

alten PBS- oder LPS-stimulierten Ratten untersucht. Hierbei wurde die Hypophyse nicht in ihre einzelnen Lappen unterteilt sondern als ganzes Organ für die RNA-Extraktion verwendet. Die Ergebnisse zeigen bei allen 4 untersuchten Faktoren eine deutliche Tendenz für eine gesteigerte mRNA-Expression im Alter, die für NF-IL6 und SOCS3 noch zusätzlich durch LPS erhöht zu werden scheint (Abbildung 62). Allerdings müssen bei diesen Ergebnissen die hohen Standarderrors berücksichtigt werden, durch die keine statistische Signifikanz erreicht werden konnte. Dies lag vermutlich an der geringen Tierzahl pro Gruppe ( $n = 3$ ), welche bei diesem Versuch zur Verfügung stand. Somit handelt es sich hierbei um preliminäre Ergebnisse, die ebenfalls eine interessante Tendenz für ein erhöhte inflammatorische Aktivierung der Hypophyse im Alter aufweisen, und durch eine größere Tierzahl in weiteren Studien gefestigt und bestätigt werden sollten. Insgesamt könnte solch eine verstärkte Inflammation potentiell an der erhöhten Stressanfälligkeit alter Tiere und Menschen beteiligt sein.

### **5.3 Altersbedingte Veränderungen in der Temperaturerhöhung auf einen psychologischen Stressor**

Es ist allgemein bekannt, dass auch psychologischer Stress zu einer Erhöhung der Körpertemperatur führen kann, sowohl beim Menschen (Hiramoto et al. 2009; Oka et al. 2013) als auch bei Tiermodellen wie z.B. Ratten (Briese & De Quijada 1970; Blasig et al. 1978). Bisher ist noch nicht ganz geklärt, ob es sich bei dieser stressbedingten Temperaturerhöhung um ein echtes Fieber handelt oder lediglich um eine Hyperthermie. Mehrere Studien konnten die Körpertemperatur durch Gabe von Zykllooxygenase-Hemmern senken, was darauf schließen lässt, dass es sich um eine Prostaglandin-abhängige Temperaturerhöhung handelt (Singer et al. 1986). Des Weiteren korrelierte die Temperaturerhöhung in manchen Studien mit einem Anstieg der IL-6 Plasmakonzentration, was ebenfalls daraufhin deutet, dass es sich um ein echtes Fieber handelt (LeMay et al. 1990). Jedoch berichten andere Studien von einem Prostaglandin-unabhängigen Temperaturanstieg (Zethof et al. 1995) oder fanden keinen Anstieg der peripheren IL-6 Level (Fuchs et al. 2013), so dass diese Fragestellung bis heute kontrovers diskutiert wird. In Tiermodellen werden als psychologische Stressoren verschiedene mehr oder weniger starke Modelle umgesetzt, unter anderem „Handling“ der Tiere, „open field“, also das Umsetzen des Tieres auf eine große, offene Fläche, „restraint“, also Fixieren des Tieres, und das sogenannte „novel environment“, welches in dieser Arbeit genutzt wurde (Oka et al. 2001). Bei diesem Modell werden die Tiere in eine neue, unbekannte Umgebung überführt, was auch als „cage-switch“ bezeichnet werden kann, wenn es sich hierbei um einen unbekanntes Käfig handelt. In der vorliegenden Arbeit wurden sowohl der Temperaturanstieg als auch die motorische Aktivität, welche durch das „novel environment“ ausgelöst wurden zwischen jungen und alten Ratten verglichen. Obwohl alte Ratten bei einem infektiös bedingten Temperaturanstieg, also einem echten Fieber, in Abhängigkeit von der Umgebungstemperatur meistens mit einem verzögerten und abgeschwächten Temperaturanstieg reagieren, führte der psychologische Stressor überraschenderweise bei den alten Ratten in dieser Studie zu einem stärkeren und längeren Temperaturanstieg als bei den jungen Ratten (Abbildung 65). Für diese erstmalig festgestellte Beobachtung scheint die motorische Aktivität nicht zu dem verstärkten und verlängerten Temperaturanstieg beizutragen, da die alten Ratten einen geringeren Anstieg an motorischer

Aktivität aufwiesen als die jungen (Abbildung 66). In dieser Studie kam es beim Altern zu einer stärkeren Auswirkung eines psychologischen Stressors auf den Temperaturanstieg. Der Effekt des Alterns auf die stress-induzierte Hyperthermie wurde bis jetzt nur in wenigen Studien untersucht. Die Arbeitsgruppe von Foster et al. (1992) untersuchte die Auswirkungen des Alterns auf die Temperaturerhöhung sowohl durch Exposition auf ein „open field“ als auch durch „cage switch“ (Foster et al. 1992). Bei dem „cage switch“ wurden zwar ähnliche aber nicht signifikante Ergebnisse wie in der vorliegenden Arbeit bei den alten Ratten gefunden. Bei dem von Foster und Kollegen eingesetzten „open field“ Modell hingegen wurde, analog zu mehreren LPS-induzierten Fiebermodellen mit alten Ratten, eine geringere Temperaturerhöhung bei den alten Tieren festgestellt. In der Studie von Wachulec et al. (1997) wurde nach einem „novel environment“ Stressor bei den alten Ratten eine geringere Temperaturerhöhung im Vergleich mit jungen Ratten festgestellt (Wachulec et al. 1997), was unseren Beobachtungen ebenfalls widerspricht. In beiden Studien betrug die Umgebungstemperatur der Ratten  $23 \pm 1$  °C, während in der vorliegenden Arbeit die Ratten für den „novel environment“ Versuch bei 26 °C gehalten wurden. Da die Umgebungstemperatur bei LPS-induziertem Fieber nachweislich bei alten Ratten eine größere Rolle spielt als bei jungen und eine höhere Außentemperatur zu einer höheren Fieberreaktion bei den alten Ratten führt (Florez-Duquet et al. 2001; Buchanan et al. 2003; Peloso et al. 2003), könnte dieser Temperaturunterschied zwischen den Studien auch den Unterschied in dem psychologischen „Fieber“ erklären. Auch bei der Stress-induzierten Temperaturerhöhung scheint eine beeinträchtigte Kapazität der Thermoeffektoren (Florez-Duquet et al. 2001) im Alter zu der verminderten „Fieberentwicklung“ beizutragen. Weitere Untersuchungen sind nötig, um die Ursache für die verstärkte und verlängerte Erhöhung der Körpertemperatur bei alten Ratten im „novel environment“ Versuch erklären zu können. Es könnten beispielsweise Tiere zum Zeitpunkt 4 Stunden nach „cage change“ molekularbiologisch und histologisch untersucht werden. Zu diesem Zeitpunkt ist nämlich die Körpertemperatur in alten Ratten noch signifikant erhöht aber in jungen Ratten bereits auf das Kontrollniveau abgesunken.

## **6. Gesamtbetrachtung der hier untersuchten Unterschiede von jungen und alten Ratten nach inflammatorischem und psychischem Stress**

Zusammenfassend konnten in dieser Arbeit Unterschiede in der LPS-bedingten „sickness response“ und den zugrundeliegenden Signalwegen herausgearbeitet werden. Außerdem wurde ebenfalls die Rolle weiterer möglicher Einflussfaktoren wie Leptin, altersassoziierter Adipositas und der HPA-Achse näher untersucht. Es konnten insgesamt folgende Haupthypothesen/Ergebnisse formuliert werden.

### **Altersabhängige Unterschiede in der LPS-bedingten Entzündungsreaktion**

- Eine höhere Umgebungstemperatur ermöglicht es den alten Ratten auf einen LPS-Stimulus nach einem verzögerten Anstieg eine ähnlich hohe Fieberreaktion wie die

jungen Ratten zu entwickeln, welche allerdings deutlich länger andauert. Weitere Parameter der „sickness response“, Lethargie, Anorexie, Adipsie und Gewichtsverlust, sind im Alter deutlich verstärkt.

- Die Plasmalevel des inflammatorischen Zytokins IL-6 aber auch des zytokinähnlichen Hormons Leptin zeigen im Alter nach Immunstimulus eine deutlich länger andauernde Hochregulation und scheinen somit an der ebenfalls verstärkten / länger andauernden „sickness response“ im Alter beteiligt zu sein.
- Im Hypothalamus führt das Altern zu einer erhöhten Expression von inflammatorischen Transkriptionsfaktoren ( $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ , NF-IL6), Zytokinen (IL-6), Enzymen der Prostaglandinsynthese (COX2, mPGES) und oxidativen Stressmarkern (NRF1, TFAM). In der Leber als peripherem Immunorgan findet sich im Altern eine erhöhte ( $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ , SOCS3, PGC-1 $\alpha$ ) oder eine erniedrigte (COX2, NRF1) Expression bedeutender inflammatorischer Marker. Diese inflammatorischen Signalwege sind an einigen physiologischen Veränderungen im Alter beteiligt wie die Expression von COX2 und mPGES für die länger anhaltende Fieberreaktion.
- Die microRNA mir146a, welche als negativer Regulator der Immunantwort die NF $\kappa$ B-Aktivität verringert, zeigt im Alter eine basal erhöhte Expression, ohne jedoch die LPS-induzierte erhöhte Entzündungsantwort im Gehirn zu erniedrigen. Die antiinflammatorische Gegenregulation durch mir146a im Alter erscheint demnach als Kompensationsmechanismus nicht ausreichend bzw. defekt zu sein.

### **Der Einfluss erhöhter Leptin-Werte und altersassoziierter Adipositas auf die LPS-bedingte Entzündungsreaktion**

- Die Neutralisation endogener Leptin-Level zeigte, dass Leptin in der Entwicklung der altersspezifischen verlängerten Fieberphase impliziert ist. Allerdings zeigte sich im Alter ein schwächerer Einfluss von Leptin auf den LPS-induzierten Gewichtsverlust und die Anorexie.
- Die mehrtägige Neutralisierung endogener Leptin-Level führte bei den alten Ratten zu einer starken Erhöhung der zirkulierenden Leptin-Level („rebound“-Effekt), sowie zu einer Absenkung der altersbedingt erhöhten IL-1ra-Level. Zu dem gleichen Zeitpunkt wurden bei den jungen Ratten keine Effekte der Leptin-Neutralisierung nachgewiesen. Dies deutet darauf hin, dass Leptin im Alter einen bedeutenderen Einfluss auf die peripheren Entzündungsparameter hat.
- Die sich im Alter entwickelnde Leptinresistenz scheint sich vor allem zentral im Gehirn zu manifestieren. In der Peripherie zeigte LAS Effekte auf Zytokine (IL1ra) und SOCS3-Expression (Leber), nicht aber im Hypothalamus.

- Im Alter ist Fettgewebe in anderer Weise als bei Diät induzierter Adipositas bei der Entstehung chronischer peripherer Inflammation und erhöhter Zytokinlevel involviert. Wenngleich der LPS-Stimulus zu einer tendenziell erhöhten IL-6 Freisetzung durch das Fettgewebe im Alter führte, so war die TNF $\alpha$ - und IL-1ra-Sekretion pro g Fettgewebe im Vergleich zu jungen, normalgewichtigen Ratten erniedrigt.

### **Altersabhängige Auswirkungen des PPAR $\gamma$ -Agonisten Rosiglitazon auf die LPS-induzierte Entzündungsreaktion**

- Eine akute Rosiglitazon-Gabe ist nicht ausreichend, um im LPS-Modell die gewünschte Wirkung im Gehirn und die Erhöhung der Zielproteine zu erreichen. Deshalb sollte in zukünftigen Studien eine chronische Verabreichungsform gewählt werden
- Aufgrund der Lipidlöslichkeit des gewählten Immunstimulus führte der Lösungsvermittler Cremophor zu einer Steigerung der LPS-Effekte. Dies äußerte sich vor allem bei den alten Ratten in dem Entstehen einer Hypothermie zu Beginn der Fieberreaktion. Bei ähnlichen Studien zu Entzündungsreaktionen sollte diese Eigenschaft von Cremophor bei Verwendung dieser Substanz berücksichtigt werden.

### **Altersbedingte Veränderungen in der Aktivierung der HPA-Achse**

- Die *Median Eminence*, welche als Gehirnregion „corticotropin-releasing hormone“ an den *Nucleus Paraventricularis* weiterleitet und somit eine Schnittstelle der HPA-Achse darstellt, zeichnete sich im Alter durch eine erhöhte Aktivierung des inflammatorischen Transkriptionsfaktors NF-IL6 aus. Der im Alter vorherrschende inflammatorische Status und damit auch die NF-IL6-Aktivierung in diesen Gehirnstrukturen könnten an der ebenfalls verstärkten Aktivierung der HPA-Achse bzw. Stressachse im Alter beteiligt sein.
- Im Hypophysenhinterlappen wurde ebenfalls eine erhöhte NF-IL6 Aktivität bei alten Ratten vorgefunden. Diese war gekoppelt mit einer verstärkten Kolo-kalisation der ebenfalls zahlreicher vorliegenden CD68-positiven Immunzellen. Dies spricht für ein altersbedingt verstärktes Einwandern immunkompetenter Zellen in den Hypophysenhinterlappen und einen dadurch erhöhten inflammatorischen Status dieser Region. Mögliche Auswirkungen auf die Funktion des Hypophysenhinterlappens im Rahmen der Vasopressin und Oxytocin-Freisetzung im Alter sind denkbar.
- Im Hypophysenvorderlappen konnte in der Zellkultur beobachtet werden, dass nach LPS-Stimulation in alten Ratten ähnliche Mengen an Zytokinen wie bei jungen Ratten

produziert werden. Die zum Teil hemmenden Interaktion und Feedbackvernetzungen zwischen Zytokinen scheinen im Alter allerdings verloren zu gehen. Altersbedingte Veränderungen dieser Regulationsmechanismen könnten zu einer verminderten Stressresistenz durch eine veränderte Aktivierung der HPA-Achse beitragen.

- Ein psychologischer Stressor führte bei den alten Ratten zu einer wesentlich stärkeren Hyperthermie im Vergleich zu den jungen Ratten. Diese war nicht durch eine verstärkte lokomotorische Aktivität bedingt. Die vorgefundene erhöhte Inflammation von Strukturen im Hypothalamus und in der HPA-Achse sowie die Dysregulation des Zytokinmilieus könnten aber die verstärkte Reaktion auf den psychologischen Stressor bei alten Ratten und deren verminderte Stressresistenz verursachen.

## V. Zusammenfassung

Im Altern kommt es zu komplexen Veränderungen des Immunsystems, welche sich dahingehend äußern, dass ältere Personen mit einer erhöhten Infektionsrate, einer verstärkten Krankheitssymptomatik und einer erhöhten Mortalitätsrate auf eine Infektionskrankheit reagieren. Das sogenannte „sickness behaviour“ umfasst zentralnervös kontrollierte Krankheitssymptome, welche im Rahmen eines systemischen Entzündungsgeschehens auftreten. Mit Ausnahme der Fieberreaktion, welche in den meisten Fällen erniedrigt oder nicht vorhanden ist, sind die meisten dieser Symptome im Alter verstärkt ausgeprägt. Das Vorliegen einer subklinischen, chronischen Entzündungsreaktion (ohne vorherigen Kontakt mit einem entzündungsauslösenden Immunstimulus) sowohl peripher (Blut, periphere Organe) als auch zentral im Gehirn wird mittlerweile als eines der Hauptmerkmale des Alterns angesehen. Bisher waren die meisten Studien darauf beschränkt, Abweichungen in den Zytokinleveln zu untersuchen, ohne Veränderungen in den unterliegenden immunoregulatorischen Signalwegen näher zu beleuchten. In der vorliegenden Arbeit wurde eine tiefere Untersuchung der Veränderungen in den inflammatorischen Signalwegen unter Berücksichtigung von inflammatorischen Transkriptionsfaktoren, Enzymen der Prostaglandinsynthese sowie von anderen potentiell implizierten Faktoren wie oxidativen Stressmarkern und neuen endogenen regulatorischen Molekülen, den microRNAs, unternommen. Neben den erwähnten inflammatorischen Markern rücken jedoch mittlerweile auch verstärkt andere Faktoren in den Fokus, die ebenfalls einen Einfluss auf die immunbedingten Veränderungen haben könnten. In der vorliegenden Arbeit wurde der potentielle Einfluss anderer altersassoziierter Zustände untersucht. Dazu gehörten erhöhte Plasmalevel des zytokin-ähnlichen Hormons Leptin, welches auch als neuroimmuner Mediator bekannt ist, und altersassoziierter Adipositas auf die im Alter beobachteten Veränderungen der „sickness response“. Als therapeutischer Ansatz wurde der Effekt des antiinflammatorischen Wirkstoffes Rosiglitazon auf die Entzündungsreaktion untersucht. Abschließend wurde ebenfalls der mögliche Einfluss dieser inflammatorischen Veränderungen auf die altersbedingte Dysregulation der HPA-Achse und die Auswirkung auf Stress-induzierte Reaktionen analysiert.

Alte und junge Ratten wurden mit LPS (100 µg/kg) oder PBS intraperitoneal injiziert und das „sickness behaviour“ mittels telemetrischer Methoden aufgezeichnet. Nach einem Zeitintervall von 4 oder 24 h wurden Blut, Gehirn und Leber für molekularbiologische und immunhistochemische Analysen entnommen. Zur weiteren Charakterisierung der Einflussgröße von Leptin auf die altersbedingte Entzündungsreaktion wurden die endogenen Leptinlevel durch Applikation eines Leptin Antiserums (LAS) vor LPS-Injektion neutralisiert. In einer dritten Studie wurde Rosiglitazon vor LPS- oder PBS-Stimulation verabreicht, um die therapeutische Anwendbarkeit dieses Wirkstoffes und zugrundeliegende Mechanismen zu untersuchen (altersbedingter mitochondrialer Stress). Die Beteiligung der altersassozierten Adipositas an der Produktion von zirkulierenden Zytokinen wurde über Messung der LPS-induzierten Zytokinsekretion *ex vivo* entnommener Fettdepots von jungen und alten Ratten („fat explants“) überprüft.

Altersbedingte Veränderungen in der HPA-Achse wurden über drei verschiedene Methoden untersucht: (1) Immunhistochemische und molekularbiologische Analyse von Hypophysen LPS- oder PBS-stimulierter Ratten, (2) Messung des Zytokinüberstandes nach Stimulation des Hypophysenvorderlappens in der Zellkultur mit LPS / PBS in Kombination mit verschiedenen Zytokin-Antisera und (3) Einsatz eines psychologischen Stressors in einem *in vivo* Versuch.

In der vorliegenden Arbeit konnte zum ersten Mal nachgewiesen werden, dass alte Ratten nach LPS-Stimulation nicht nur eine verzögerte, sondern sogar eine länger andauernde Fieberreaktion aufweisen. Dass alte Ratten überhaupt Fieber entwickeln, lag vermutlich an der hier eingesetzten höheren Umgebungstemperatur (28 °C). Diese Feststellung unterstützt Ergebnisse aus einer früheren Studie, dass die teilweise beschriebene erniedrigte oder ausbleibende Fieberreaktion im Alter mit einer beeinträchtigten Kapazität der Thermoeffektoren zusammenhängt. Außerdem wurde eine verstärkte Ausprägung der weiteren Parameter des „sickness behaviours“ (Lethargie, Anorexie, Adipsie, Gewichtsverlust) in den alten Ratten dokumentiert.

Bei den alten Ratten wurden erhöhte Plasmawerte der Zytokine IL-6 und IL-1ra nachgewiesen, welche somit wahrscheinlich eine Rolle bei der verstärkten Ausprägung der Krankheitssymptomatik spielen. Zum ersten Mal konnte hier auch eine länger andauernde Erhöhung der Leptin Plasmalevel bei alten Ratten gezeigt werden, welches Hinweise auf eine bedeutendere Beteiligung von Leptin an der Fieberantwort im Altern liefert. Im Gehirn wurde eine erhöhte Expression verschiedener inflammatorischer Transkriptionsfaktoren (I $\kappa$ B $\alpha$ , NF-IL6), Zytokine (IL-6), Enzyme der Prostaglandinsynthese (COX2, mPGES) und oxidativer Stressmarker (NRF1, TFAM) nachgewiesen und somit eine genauere Aufschlüsselung der unterliegenden Signalwege erreicht. Erstmals konnte auch eine altersbedingte Erhöhung der antiinflammatorischen microRNA mir146a im Gehirn gezeigt werden, welche einen neuen Kandidaten zur Erklärung altersbedingter Veränderungen in der Immunantwort darstellt.

Des Weiteren konnten wir mittels LAS demonstrieren, dass die erhöhten LPS-induzierten Leptin-Plasmalevel im Alter einen Einfluss auf die verlängerte und somit altersspezifische Fieberphase haben, während der Einfluss auf die Anorexie und Gewichtsabnahme bei den jungen Ratten größer war. Neutralisation endogener Leptin-Level hatte bei den alten Ratten einen starken Effekt auf die zirkulierenden IL-1ra-Level, welcher bei den jungen Ratten nicht vorhanden war. Somit scheint Leptin im Alter durchaus eine größere aber auch andere Rolle als bei jungen Tieren bei der Aufrechterhaltung der Fieberreaktion zu spielen.

Die Untersuchung zu altersassoziiertter Adipositas deutet darauf hin, dass das Fettgewebe auch bei alten Ratten nicht als einziger Entstehungsort der peripheren Inflammation in Frage zu kommen scheint, da die gewonnenen Ergebnisse lediglich eine tendenzielle Erhöhung der IL-6-Sekretion jedoch eine Erniedrigung der TNF $\alpha$ - und IL-1ra-Sekretion pro g Fettgewebe im Alter dokumentieren. Somit wurden Unterschiede zu bisher bekannten Befunden aus Studien zu diät-induzierter Adipositas und der hier untersuchten altersassoziierten Adipositas nachgewiesen.

Die angewandte Methodik der akuten Rosiglitazon-Gabe stellte sich als ungeeignet für eine ausreichende antiinflammatorische Wirkung und Aktivierung entsprechender Targetproteine heraus. Lediglich in der Leber konnte eine Erhöhung der basalen PGC-1 $\alpha$  und TFAM

Expression (junge Ratten) sowie eine Erniedrigung der IL-10 Plasma Konzentration (alte Ratten) nachgewiesen werden. Im Gehirn war keiner der untersuchten Parameter durch die zweitägige Rosiglitazon-Behandlung beeinflusst. Nach den vorliegenden Erkenntnissen sollte in zukünftigen Studien demnach eine chronische Verabreichung dieses Wirkstoffes bevorzugt werden.

In zentralen Schaltstellen (*Median Eminence* und Hypophysenhinterlappen) der HPA-Achse wurde eine verstärkte Aktivierung des inflammatorischen Transkriptionsfaktors NF-IL6 und von CD68-positiven immunkompetenten Zellen (nur Hypophysenhinterlappen) bei alten Ratten nachgewiesen. Während die verstärkte NF-IL6 Aktivität in der *Median Eminence* nur nach LPS-Stimulation auftrat, konnte diese verstärkte Immunreaktivität beider Faktoren im Hypophysenhinterlappen sowohl basal als auch nach Immunstimulus gezeigt werden. Des Weiteren wurde im Hypophysenhinterlappen eine verstärkte Kolokalisation der NF-IL6 Signale mit CD68-positiven Zellen beobachtet. Zusätzlich führte eine LPS-Stimulation von Zellkulturen des Hypophysenvorderlappens zu mit jungen Ratten vergleichbarer Sekretion von IL-6 und TNF $\alpha$ . Allerdings konnten bei gleichzeitiger Gabe von Antiseren gegen IL-10 und IL-6 keine Mechanismen einer Gegenregulation wie bei jungen Ratten nachgewiesen werden. Außerdem zeigten alte Ratten eine deutlich längere Erhöhung der Körpertemperatur nach dem psychologischen Stressor „Käfigwechsel“ als junge Ratten. Insgesamt fanden wir neue Hinweise darauf, wie die inflammatorischen Veränderungen im Alter sich ebenfalls auf die Aktivierung der HPA-Achse auswirken und damit zu einer verminderten Stressresistenz beitragen könnten. Zu diesen Hinweisen zählen: (A) die Veränderungen in den Regulationsmechanismen des Zytokinmilieus auf Ebene des Hypophysenvorderlappens, (B) die verstärkte Hyperthermie der alten Ratten nach psychologischem Stress (C) sowie die verstärkte NF-IL6-Aktivierung in der Hypophyse und im Hypothalamus.

Über eine umfangreiche Analyse der zu Grunde liegenden inflammatorischen Signalwege auf zentraler und peripherer Ebene trägt diese Arbeit zu einer weiteren Aufschlüsselung der immunologischen Veränderungen und der implizierten inflammatorischen Faktoren beim Altern bei. Neben wesentlichen bekannten Faktoren, welche in früheren Studien untersucht wurden, analysierte das gegenwärtige Forschungsprojekt neue Kandidaten-Moleküle (z.B. mir146a) und deren potentielle Bedeutung. Außerdem konnte zum ersten Mal eine altersspezifische Rolle des Fettgewebes und des Hormons Leptin für die beobachteten Veränderungen im Gehirn und peripheren Organen bei systemischen Entzündungsreaktionen nachgewiesen werden. Zudem wurden Hinweise auf eine Resistenz der Zytokininteraktion und weitere immunologische Veränderungen im Alter gesammelt, die die Aktivierung der HPA-Achse und die Stressresistenz im Alter beeinflussen könnten. Diese Zusammenhänge wurden bisher in der Literatur kaum untersucht und die gezeigten Ergebnisse regen zu einer weiterführenden Untersuchung der hieraus neu entwickelten Hypothese an.

## VI. Summary

Aging induces complex changes in the immune system, which result in an increased frequency of infection, aggravated disease symptoms and an increased mortality rate in elderly people. Systemic inflammation leads to brain-controlled symptoms; the so-called sickness behavior. With the exception of the fever response, which was blunted or absent in several previous reports, most of these symptoms are significantly enhanced / prolonged with aging. Furthermore, the existence of a chronic low-grade inflammation (without previous contact to immune stimuli) in the periphery (blood, peripheral organs) or centrally in the brain constitutes a hallmark of the aging process. To date, most studies in this area have been limited to analyzing alterations in cytokine levels without considering the modifications in the underlying immunoregulatory pathways. In the present work, a more detailed analysis of alterations in the inflammatory signaling pathways including inflammatory transcription factors, rate-limiting enzymes of the prostaglandin synthesis pathway and other potentially implicated factors like oxidative stress markers and new endogenous regulatory molecules, namely microRNAs, was performed. Besides the mentioned inflammatory markers, other factors that could also have an impact in the age-linked immunological alterations become the focus of recent research. As such, the present work investigated the potential implication of age-associated changes in plasma levels of the cytokine-like hormone leptin, which is also known as a neuro-immune mediator. Moreover, aging associated modifications of the sickness response observed with late-onset obesity were analysed. As a therapeutic approach, the efficacy of the anti-inflammatory agent rosiglitazone on systemic inflammation was investigated. Finally, the potential influence of these inflammatory alterations on the age-related dysregulation of the HPA axis and its implications for reactions to psychological stress was analysed.

Old and young rats were injected intraperitoneally with LPS (100 µg/kg) or PBS and the sickness behaviour was recorded via telemetric measurements. After a time interval of 4 or 24 h blood, brain and liver were collected for further molecular and immunohistochemical analysis. In a second study, for further characterization of the influence of leptin on the age-dependent systemic inflammation, neutralization of endogenous leptin levels was performed by application of leptin antiserum (LAS) prior to the LPS-stimulus. In a third study, in order to investigate the therapeutic potential of rosiglitazone and underlying mechanisms (age-associated mitochondrial stress), this agent was administered prior to LPS or PBS. The involvement of age-associated obesity in the production of circulating cytokines was verified by measuring the LPS-induced cytokine secretion of *ex vivo* fat explants of young and old rats.

Age-dependent changes in the HPA axis were analysed by three different methods: (1) Immunohistochemical and molecular biological analysis of pituitaries of LPS- or PBS-stimulated rats, (2) measurement of cytokine levels in supernatants of pituitary anterior lobe cell culture after stimulation with LPS / PBS in combination with different cytokine antisera and (3) use of a psychological stress *in vivo*.

In the present work, it was shown for the first time that old rats not only develop a delayed but even a prolonged fever response after LPS-stimulation. The fact that old rats were capable to develop this febrile response was most likely due to the high ambient temperature used in these experiments. This discovery supports results from an earlier study suggesting that impaired thermoregulatory abilities in aged rodents contribute to the development of the often described blunted or absent fever response with aging. Moreover, aggravation of other parameters of sickness behaviour (lethargy, anorexia, adipsia, weight loss) was observed in old rats.

In the aged rodents, increased plasma levels of IL-6 and IL-1ra were detected, which are probably involved in the accompanying exacerbation of the sickness response. In addition, for the first time, as well prolonged elevated plasma leptin levels were detected in the old rats, providing evidence for a more substantial involvement of leptin in the fever response during aging. In the brain, an increased expression of different inflammatory transcription factors (I $\kappa$ B $\alpha$ , NF-IL6), cytokines (IL-6), enzymes of the prostaglandin synthesis pathway (COX2, mPGES) and oxidative stress markers (NRF1, TFAM) was demonstrated and was part of a more detailed analysis of the underlying signaling pathways. For the first time, an age-dependent increase in the expression of the anti-inflammatory microRNA mir146a was demonstrated in the brain, depicting mir146a as a new potential candidate to explain age-related alterations in the immune response.

Furthermore, it was shown by the use of LAS that the increased LPS-induced leptin plasma levels present with aging have an impact on the prolonged and hence age-specific fever phase. The impact on anorexia and weight loss, however, was more pronounced in the young rats. Neutralisation of endogenous leptin levels strongly affected circulating IL-1ra levels in the old, but not in the young rats. Thus, other than observed in young animals, it seems that leptin plays a more prominent but also different role in the maintenance of the fever response with aging.

Investigation of the role of age-associated obesity indicated that adipose tissue does not seem to represent the exclusive source of peripheral inflammation in young and old rats. Only a slight increase in IL-6 secretion and even a decrease of TNF $\alpha$  and IL-1ra secretion per g of adipose tissue was observed with aging. Overall, differences between findings from studies on diet-induced obesity and the age-associated obesity were shown in the present research project.

The applied methodology of acute administration of rosiglitazone proved to be inadequate for a sufficient anti-inflammatory effect and activation of respective target proteins. Only in the liver, an increase in the basal expression of PGC-1 $\alpha$  and TFAM (young rats) and a decrease of the plasma concentration of IL-10 (old rats) was detected. In the brain, none of the tested factors was influenced by the two-day treatment with rosiglitazone. According to the findings of this experiment, a chronic administration of this agent should be preferred in future studies. In higher regulatory centres of the HPA axis (*median eminence* and/or posterior pituitary lobe), an increased activation of the inflammatory transcription factor NF-IL6 and of CD-68 positive immunocompetent cells (only posterior pituitary lobe) was demonstrated. While enhanced NF-IL6 activation in the *median eminence* only occurred after LPS-stimulation, the increased immunoreactivity of both factors could be shown in the posterior pituitary lobe basally and after immune stimulus. Furthermore, an enhanced colocalisation of NF-IL6

signals with CD68-positive cells was observed in the posterior pituitary lobe. In addition, LPS stimulation of primary cell cultures of the anterior pituitary lobe lead to a secretion of IL-6 and TNF $\alpha$  comparable with young rats. However, in case of simultaneous administration of antisera against IL-10 and IL-6, no mechanisms of counterregulation comparable to young rats could be detected. Moreover, old rats showed a considerably longer increase in body temperature after the psychological stress “cage change” compared with young rats. These observed alterations in the regulatory mechanisms present new indications how the age-linked inflammatory alterations influence the activation of the HPA axis and contribute to a diminished stress resistance: i.e. (A) the cytokine milieu of the anterior pituitary lobe, (B) the increased hyperthermic response of old rats after a psychological stress and (C) the enhanced NF-IL6 activation in the pituitary and hypothalamus.

The present study advances knowledge about immunological changes and implicated inflammatory factors observed with aging by an extensive analysis of underlying inflammatory signaling pathways on a central and peripheral level. Besides well-known factors investigated in previous studies, the current research also investigated new candidate molecules (e.g. mir146a) and their potential importance. Moreover, for the first time, an age-specific contribution of adipose tissue and leptin to the observed changes in the brain and periphery were determined during systemic inflammation. Furthermore, evidence was detected for an influence of age-dependent immunological changes on the activation of the HPA axis and stress resistance. To date, there is still a need for research on the precise mechanisms in this context. The present results and newly developed hypothesis will instigate further research in this field.

## VII. Literatur

- Abbott, N. J., L. Ronnback, et al.** (2006). "Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier." *Nat Rev Neurosci* **7**(1): 41-53.
- Abraham, J. & R. W. Johnson** (2009). "Central inhibition of interleukin-1beta ameliorates sickness behavior in aged mice." *Brain Behav Immun* **23**(3): 396-401.
- Aguilera, G.** (1994). "Regulation of pituitary ACTH secretion during chronic stress." *Front Neuroendocrinol* **15**(4): 321-350.
- Aguilera, G. & C. Rabadan-Diehl** (2000). "Regulation of vasopressin V1b receptors in the anterior pituitary gland of the rat." *Exp Physiol* **85 Spec No**: 19S-26S.
- Ahima, R. S., D. Prabakaran, et al.** (1996). "Role of leptin in the neuroendocrine response to fasting." *Nature* **382**(6588): 250-252.
- Akira, S. & T. Kishimoto** (1992). "IL-6 and NF-IL6 in acute-phase response and viral infection." *Immunol Rev* **127**: 25-50.
- Allahtavakoli, M., R. Moloudi, et al.** (2009). "Delayed post ischemic treatment with Rosiglitazone attenuates infarct volume, neurological deficits and neutrophilia after embolic stroke in rat." *Brain Res* **1271**: 121-127.
- Allahtavakoli, M., A. P. Shabanzadeh, et al.** (2006). "Rosiglitazone, a peroxisome proliferator-activated receptor-gamma ligand, reduces infarction volume and neurological deficits in an embolic model of stroke." *Clin Exp Pharmacol Physiol* **33**(11): 1052-1058.
- Almaguer, W., B. Estupinan, et al.** (2002). "Aging impairs amygdala-hippocampus interactions involved in hippocampal LTP." *Neurobiol Aging* **23**(2): 319-324.
- Alvarez-Rodriguez, L., M. Lopez-Hoyos, et al.** (2012). "Aging is associated with circulating cytokine dysregulation." *Cell Immunol* **273**(2): 124-132.
- Anforth, H. R., R. M. Bluthe, et al.** (1998). "Biological activity and brain actions of recombinant rat interleukin-1alpha and interleukin-1beta." *Eur Cytokine Netw* **9**(3): 279-288.
- Arita, Y., S. Kihara, et al.** (1999). "Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity." *Biochem Biophys Res Commun* **257**(1): 79-83.
- Arnold, A. S., A. Egger, et al.** (2011). "PGC-1alpha and myokines in the aging muscle - a mini-review." *Gerontology* **57**(1): 37-43.
- Arzt, E.** (2001). "gp130 cytokine signaling in the pituitary gland: a paradigm for cytokine-neuro-endocrine pathways." *J Clin Invest* **108**(12): 1729-1733.
- Arzt, E., M. P. Pereda, et al.** (1999). "Pathophysiological role of the cytokine network in the anterior pituitary gland." *Front Neuroendocrinol* **20**(1): 71-95.
- Baeuerle, P. A. & D. Baltimore** (1996). "NF-kappa B: ten years after." *Cell* **87**(1): 13-20.
- Baeuerle, P. A. & T. Henkel** (1994). "Function and activation of NF-kappa B in the immune system." *Annu Rev Immunol* **12**: 141-179.
- Balaban, R. S., S. Nemoto, et al.** (2005). "Mitochondria, oxidants, and aging." *Cell* **120**(4): 483-495.

- Banks, A. S., S. M. Davis, et al.** (2000). "Activation of downstream signals by the long form of the leptin receptor." *J Biol Chem* **275**(19): 14563-14572.
- Banks, W. A.** (2001). "Leptin transport across the blood-brain barrier: implications for the cause and treatment of obesity." *Curr Pharm Des* **7**(2): 125-133.
- Banks, W. A., C. R. DiPalma, et al.** (1999). "Impaired transport of leptin across the blood-brain barrier in obesity." *Peptides* **20**(11): 1341-1345.
- Banks, W. A., A. J. Kastin, et al.** (1995). "Passage of cytokines across the blood-brain barrier." *Neuroimmunomodulation* **2**(4): 241-248.
- Banks, W. A., A. J. Kastin, et al.** (1996). "Leptin enters the brain by a saturable system independent of insulin." *Peptides* **17**(2): 305-311.
- Barrientos, R. M., M. G. Frank, et al.** (2009). "Time course of hippocampal IL-1 beta and memory consolidation impairments in aging rats following peripheral infection." *Brain Behav Immun* **23**(1): 46-54.
- Barrientos, R. M., L. R. Watkins, et al.** (2009). "Characterization of the sickness response in young and aging rats following E. coli infection." *Brain Behav Immun* **23**(4): 450-454.
- Bauer, J., T. Sminia, et al.** (1994). "Phagocytic activity of macrophages and microglial cells during the course of acute and chronic relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis." *J Neurosci Res* **38**(4): 365-375.
- Baumann, H. & J. Gauldie** (1994). "The acute phase response." *Immunol Today* **15**(2): 74-80.
- Baumgartner, R. N., D. L. Waters, et al.** (1999). "Age-related changes in sex hormones affect the sex difference in serum leptin independently of changes in body fat." *Metabolism* **48**(3): 378-384.
- Beharka, A. A., M. Meydani, et al.** (2001). "Interleukin-6 production does not increase with age." *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* **56**(2): B81-88.
- Berkowitz, D. E., D. Brown, et al.** (1998). "Endotoxin-induced alteration in the expression of leptin and beta3-adrenergic receptor in adipose tissue." *Am J Physiol* **274**(6 Pt 1): E992-997.
- Berman, P. & R. A. Fox** (1985). "Fever in the elderly." *Age Ageing* **14**(6): 327-332.
- Bernardini, R., T. C. Kamilaris, et al.** (1990). "Interactions between tumor necrosis factor-alpha, hypothalamic corticotropin-releasing hormone, and adrenocorticotropin secretion in the rat." *Endocrinology* **126**(6): 2876-2881.
- Bernardo, A., M. A. Ajmone-Cat, et al.** (2003). "15-deoxy-delta12,14-prostaglandin J2 regulates the functional state and the survival of microglial cells through multiple molecular mechanisms." *J Neurochem* **87**(3): 742-751.
- Bernardo, A. & L. Minghetti** (2008). "Regulation of Glial Cell Functions by PPAR-gamma Natural and Synthetic Agonists." *PPAR Res* **2008**: 864140.
- Bernton, E. W., J. E. Beach, et al.** (1987). "Release of multiple hormones by a direct action of interleukin-1 on pituitary cells." *Science* **238**(4826): 519-521.
- Beutler, B.** (2002). "TLR4 as the mammalian endotoxin sensor." *Curr Top Microbiol Immunol* **270**: 109-120.

- Bhaumik, D., G. K. Scott, et al.** (2009). "MicroRNAs miR-146a/b negatively modulate the senescence-associated inflammatory mediators IL-6 and IL-8." *Aging (Albany NY)* **1**(4): 402-411.
- Bjorbaek, C., R. M. Buchholz, et al.** (2001). "Divergent roles of SHP-2 in ERK activation by leptin receptors." *J Biol Chem* **276**(7): 4747-4755.
- Bjorbaek, C. & B. B. Kahn** (2004). "Leptin signaling in the central nervous system and the periphery." *Recent Prog Horm Res* **59**: 305-331.
- Blahser, S.** (1988). "The ACTH-immunoreactive system in the brain of the white-crowned sparrow, *Zonotrichia leucophrys gambelii* (Passeriformes, Emberizidae)." *Histochemistry* **88**(3-6): 309-312.
- Blanque, R., C. Meakin, et al.** (1996). "Hypothermia as an indicator of the acute effects of lipopolysaccharides: comparison with serum levels of IL1 beta, IL6 and TNF alpha." *Gen Pharmacol* **27**(6): 973-977.
- Blasig, J., V. Holtt, et al.** (1978). "Involvement of endorphins in emotional hyperthermia of rats." *Life Sci* **23**(25): 2525-2531.
- Blasko, I., M. Stampfer-Kountchev, et al.** (2004). "How chronic inflammation can affect the brain and support the development of Alzheimer's disease in old age: the role of microglia and astrocytes." *Aging Cell* **3**(4): 169-176.
- Blatteis, C. M.** (2006). "Endotoxic fever: new concepts of its regulation suggest new approaches to its management." *Pharmacol Ther* **111**(1): 194-223.
- Blatteis, C. M., Sehic, E.** (1997). "Fever: how may circulating cytokines signla the brain ?" *News in Physiological Sciences* **12**: 1-9.
- Blau, C. W., T. R. Cowley, et al.** (2012). "The age-related deficit in LTP is associated with changes in perfusion and blood-brain barrier permeability." *Neurobiol Aging* **33**(5): 1005 e1023-1035.
- Blind, E., K. Dunder, et al.** (2011). "Rosiglitazone: a European regulatory perspective." *Diabetologia* **54**(2): 213-218.
- Boden, G., X. Chen, et al.** (1996). "Effect of fasting on serum leptin in normal human subjects." *J Clin Endocrinol Metab* **81**(9): 3419-3423.
- Bori, Z., Z. Zhao, et al.** (2012). "The effects of aging, physical training, and a single bout of exercise on mitochondrial protein expression in human skeletal muscle." *Exp Gerontol* **47**(6): 417-424.
- Braissant, O., F. Fougelle, et al.** (1996). "Differential expression of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): tissue distribution of PPAR-alpha, -beta, and -gamma in the adult rat." *Endocrinology* **137**(1): 354-366.
- Bray, G. A. & D. A. York** (1979). "Hypothalamic and genetic obesity in experimental animals: an autonomic and endocrine hypothesis." *Physiol Rev* **59**(3): 719-809.
- Briese, E. & M. G. De Quijada** (1970). "Colonic temperature of rats during handling." *Acta Physiol Lat Am* **20**(2): 97-102.
- Brownstein, M. J., J. T. Russell, et al.** (1980). "Synthesis, transport, and release of posterior pituitary hormones." *Science* **207**(4429): 373-378.
- Bruno, A., S. Conus, et al.** (2005). "Apoptotic pathways are inhibited by leptin receptor activation in neutrophils." *J Immunol* **174**(12): 8090-8096.

- Bruunsgaard, H., K. Andersen-Ranberg, et al.** (1999). "A high plasma concentration of TNF-alpha is associated with dementia in centenarians." *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* **54**(7): M357-364.
- Bryant, R. E., A. F. Hood, et al.** (1971). "Factors affecting mortality of gram-negative rod bacteremia." *Arch Intern Med* **127**(1): 120-128.
- Buchanan, J. B., E. Peloso, et al.** (2003). "Thermoregulatory and metabolic changes during fever in young and old rats." *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **285**(5): R1165-1169.
- Bullo, M., P. Garcia-Lorda, et al.** (2003). "Systemic inflammation, adipose tissue tumor necrosis factor, and leptin expression." *Obes Res* **11**(4): 525-531.
- Byrd-Leifer, C. A., E. F. Block, et al.** (2001). "The role of MyD88 and TLR4 in the LPS-mimetic activity of Taxol." *Eur J Immunol* **31**(8): 2448-2457.
- Caldefie-Chezet, F., A. Poulin, et al.** (2003). "Leptin regulates functional capacities of polymorphonuclear neutrophils." *Free Radic Res* **37**(8): 809-814.
- Campfield, L. A., F. J. Smith, et al.** (1995). "Recombinant mouse OB protein: evidence for a peripheral signal linking adiposity and central neural networks." *Science* **269**(5223): 546-549.
- Cani, P. D., J. Amar, et al.** (2007). "Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance." *Diabetes* **56**(7): 1761-1772.
- Cani, P. D., R. Bibiloni, et al.** (2008). "Changes in gut microbiota control metabolic endotoxemia-induced inflammation in high-fat diet-induced obesity and diabetes in mice." *Diabetes* **57**(6): 1470-1481.
- Cano, P., D. P. Cardinali, et al.** (2008). "Effect of aging on 24-hour pattern of stress hormones and leptin in rats." *Life Sci* **83**(3-4): 142-148.
- Cao, C., K. Matsumura, et al.** (1995). "Induction by lipopolysaccharide of cyclooxygenase-2 mRNA in rat brain; its possible role in the febrile response." *Brain Res* **697**(1-2): 187-196.
- Carlton, E. D., G. E. Demas, et al.** (2012). "Leptin, a neuroendocrine mediator of immune responses, inflammation, and sickness behaviors." *Horm Behav*.
- Carta, A. R., L. Frau, et al.** (2011). "Rosiglitazone decreases peroxisome proliferator receptor-gamma levels in microglia and inhibits TNF-alpha production: new evidences on neuroprotection in a progressive Parkinson's disease model." *Neuroscience* **194**: 250-261.
- Carter, S., A. Caron, et al.** (2013). "Role of leptin resistance in the development of obesity in older patients." *Clin Interv Aging* **8**: 829-844.
- Cartmell, T., G. N. Luheshi, et al.** (2001). "Role of endogenous interleukin-1 receptor antagonist in regulating fever induced by localised inflammation in the rat." *J Physiol* **531**(Pt 1): 171-180.
- Cartmell, T., S. Poole, et al.** (2000). "Circulating interleukin-6 mediates the febrile response to localised inflammation in rats." *J Physiol* **526 Pt 3**: 653-661.
- Cartwright, M. J., T. Tchkonja, et al.** (2007). "Aging in adipocytes: potential impact of inherent, depot-specific mechanisms." *Exp Gerontol* **42**(6): 463-471.

- Cason, J., C. C. Ainley, et al.** (1986). "Cell-mediated immunity in anorexia nervosa." *Clin Exp Immunol* **64**(2): 370-375.
- Catania, A., L. Airaghi, et al.** (1997). "Cytokine antagonists in aged subjects and their relation with cellular immunity." *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* **52**(2): B93-97.
- Ceccatelli, S., L. Calza, et al.** (1996). "Age-related changes in the expression of corticotropin-releasing hormone receptor mRNA in the rat pituitary." *Brain Res Mol Brain Res* **37**(1-2): 175-180.
- Chai, Z., S. Gatti, et al.** (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**(1): 311-316.
- Chandra, R. K. & B. Au** (1980). "Spleen hemolytic plaque-forming cell response and generation of cytotoxic cells in genetically obese (C57Bl/6J ob/ob) mice." *Int Arch Allergy Appl Immunol* **62**(1): 94-98.
- Chen, C., D. A. Ridzon, et al.** (2005). "Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR." *Nucleic Acids Res* **33**(20): e179.
- Chiang, M. C., C. M. Chen, et al.** (2010). "Modulation of energy deficiency in Huntington's disease via activation of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma." *Hum Mol Genet* **19**(20): 4043-4058.
- Chiang, M. C., Y. Chern, et al.** (2012). "PPARgamma rescue of the mitochondrial dysfunction in Huntington's disease." *Neurobiol Dis* **45**(1): 322-328.
- Chomczynski, P. & N. Sacchi** (1987). "Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction." *Anal Biochem* **162**(1): 156-159.
- Chu, K., S. T. Lee, et al.** (2006). "Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma-agonist, rosiglitazone, promotes angiogenesis after focal cerebral ischemia." *Brain Res* **1093**(1): 208-218.
- Chun, K. S. & Y. J. Surh** (2004). "Signal transduction pathways regulating cyclooxygenase-2 expression: potential molecular targets for chemoprevention." *Biochem Pharmacol* **68**(6): 1089-1100.
- Chung, H. Y., E. K. Lee, et al.** (2011). "Molecular inflammation as an underlying mechanism of the aging process and age-related diseases." *J Dent Res* **90**(7): 830-840.
- Chung, J. H., A. Y. Seo, et al.** (2008). "Molecular mechanism of PPAR in the regulation of age-related inflammation." *Ageing Res Rev* **7**(2): 126-136.
- Chung, S. W., B. Y. Kang, et al.** (2000). "Oxidized low density lipoprotein inhibits interleukin-12 production in lipopolysaccharide-activated mouse macrophages via direct interactions between peroxisome proliferator-activated receptor-gamma and nuclear factor-kappa B." *J Biol Chem* **275**(42): 32681-32687.
- Cinti, S., G. Mitchell, et al.** (2005). "Adipocyte death defines macrophage localization and function in adipose tissue of obese mice and humans." *J Lipid Res* **46**(11): 2347-2355.
- Coceani, F., J. Lees, et al.** (1993). "Interleukin-6 and tumor necrosis factor in cerebrospinal fluid: changes during pyrogen fever." *Brain Res* **612**(1-2): 165-171.
- Coleman, D. L.** (1978). "Obese and diabetes: two mutant genes causing diabetes-obesity syndromes in mice." *Diabetologia* **14**(3): 141-148.

- Coll, T., R. Rodriguez-Calvo, et al.** (2009). "Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) beta/delta: a new potential therapeutic target for the treatment of metabolic syndrome." *Curr Mol Pharmacol* **2**(1): 46-55.
- Conti, B., I. Tabarean, et al.** (2004). "Cytokines and fever." *Front Biosci* **9**: 1433-1449.
- Coons, A. H. & M. H. Kaplan** (1950). "Localization of antigen in tissue cells; improvements in a method for the detection of antigen by means of fluorescent antibody." *J Exp Med* **91**(1): 1-13.
- Corona, A. W., A. M. Fenn, et al.** (2012). "Cognitive and behavioral consequences of impaired immunoregulation in aging." *J Neuroimmune Pharmacol* **7**(1): 7-23.
- Cotrina, M. L. & M. Nedergaard** (2002). "Astrocytes in the aging brain." *J Neurosci Res* **67**(1): 1-10.
- Cowley, T. R., J. O'Sullivan, et al.** (2012). "Rosiglitazone attenuates the age-related changes in astrocytosis and the deficit in LTP." *Neurobiol Aging* **33**(1): 162-175.
- Cui, L., H. Jeong, et al.** (2006). "Transcriptional repression of PGC-1alpha by mutant huntingtin leads to mitochondrial dysfunction and neurodegeneration." *Cell* **127**(1): 59-69.
- Cunard, R., M. Ricote, et al.** (2002). "Regulation of cytokine expression by ligands of peroxisome proliferator activated receptors." *J Immunol* **168**(6): 2795-2802.
- Dallman, M. F., S. F. Akana, et al.** (1994). "Corticosteroids and the control of function in the hypothalamo-pituitary-adrenal (HPA) axis." *Ann N Y Acad Sci* **746**: 22-31; discussion 31-22, 64-27.
- Damm, J.** (2012). *Charakterisierung der Beteiligung des Transkriptionsfaktors NF-IL6 an der Induktion zentralnervös kontrollierter Krankheitssymptome in der Ratte.*
- Damm, J., L. M. Harden, et al.** (2013). "The putative JAK-STAT inhibitor AG490 exacerbates LPS-fever, reduces sickness behavior, and alters the expression of pro- and anti-inflammatory genes in the rat brain." *Neuropharmacology* **71**: 98-111.
- Damm, J., G. N. Luheshi, et al.** (2011). "Spatiotemporal nuclear factor interleukin-6 expression in the rat brain during lipopolysaccharide-induced fever is linked to sustained hypothalamic inflammatory target gene induction." *J Comp Neurol* **519**(3): 480-505.
- Damm, J., F. Wiegand, et al.** (2012). "Fever, sickness behavior, and expression of inflammatory genes in the hypothalamus after systemic and localized subcutaneous stimulation of rats with the Toll-like receptor 7 agonist imiquimod." *Neuroscience* **201**: 166-183.
- Dantzer, R.** (2001). "Cytokine-induced sickness behavior: where do we stand?" *Brain Behav Immun* **15**(1): 7-24.
- Dantzer, R., R. M. Bluthé, et al.** (1998). "Molecular basis of sickness behavior." *Ann N Y Acad Sci* **856**: 132-138.
- Dantzer, R., J. P. Konsman, et al.** (2000). "Neural and humoral pathways of communication from the immune system to the brain: parallel or convergent?" *Auton Neurosci* **85**(1-3): 60-65.
- Daynes, R. A. & D. C. Jones** (2002). "Emerging roles of PPARs in inflammation and immunity." *Nat Rev Immunol* **2**(10): 748-759.

- Debus, E., K. Weber, et al.** (1983). "Monoclonal antibodies specific for glial fibrillary acidic (GFA) protein and for each of the neurofilament triplet polypeptides." *Differentiation* **25**(2): 193-203.
- Dilger, R. N. & R. W. Johnson** (2008). "Aging, microglial cell priming, and the discordant central inflammatory response to signals from the peripheral immune system." *J Leukoc Biol* **84**(4): 932-939.
- Dinarello, C. A., J. G. Cannon, et al.** (1986). "Tumor necrosis factor (cachectin) is an endogenous pyrogen and induces production of interleukin 1." *J Exp Med* **163**(6): 1433-1450.
- Ebihara, K., Y. Ogawa, et al.** (1999). "Involvement of agouti-related protein, an endogenous antagonist of hypothalamic melanocortin receptor, in leptin action." *Diabetes* **48**(10): 2028-2033.
- Ehrhart-Bornstein, M., J. P. Hinson, et al.** (1998). "Intraadrenal interactions in the regulation of adrenocortical steroidogenesis." *Endocr Rev* **19**(2): 101-143.
- Elmqvist, J. K., C. D. Breder, et al.** (1997). "Intravenous lipopolysaccharide induces cyclooxygenase 2-like immunoreactivity in rat brain perivascular microglia and meningeal macrophages." *J Comp Neurol* **381**(2): 119-129.
- Endo, T. A., M. Masuhara, et al.** (1997). "A new protein containing an SH2 domain that inhibits JAK kinases." *Nature* **387**(6636): 921-924.
- Ershler, W. B.** (1993). "Interleukin-6: a cytokine for gerontologists." *J Am Geriatr Soc* **41**(2): 176-181.
- Escribano, L., A. M. Simon, et al.** (2010). "Rosiglitazone rescues memory impairment in Alzheimer's transgenic mice: mechanisms involving a reduced amyloid and tau pathology." *Neuropsychopharmacology* **35**(7): 1593-1604.
- Faggioni, R., G. Fantuzzi, et al.** (1998). "IL-1 beta mediates leptin induction during inflammation." *Am J Physiol* **274**(1 Pt 2): R204-208.
- Faggioni, R., G. Fantuzzi, et al.** (1999). "Leptin deficiency enhances sensitivity to endotoxin-induced lethality." *Am J Physiol* **276**(1 Pt 2): R136-142.
- Faggioni, R., J. Fuller, et al.** (1997). "LPS-induced anorexia in leptin-deficient (ob/ob) and leptin receptor-deficient (db/db) mice." *Am J Physiol* **273**(1 Pt 2): R181-186.
- Falagas, M. E. & M. Kompoti** (2006). "Obesity and infection." *Lancet Infect Dis* **6**(7): 438-446.
- Fantuzzi, G.** (2005). "Adipose tissue, adipokines, and inflammation." *J Allergy Clin Immunol* **115**(5): 911-919; quiz 920.
- Fatehi-Hassanabad, Z. & R. A. Tasker** (2011). "Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma (PPAR-gamma) activation confers functional neuroprotection in global ischemia." *Neurotox Res* **19**(3): 462-471.
- FDA** (2013). Readjudication of the Rosiglitazone evaluated for cardiovascular outcomes and regulation of glycemia in diabetes trial (RECORD), Joint Meeting of the Endocrinologic and Metabolic Drugs Advisory Committee and the Drug Safety and Risk Management Advisory Committee.

- Fei, H., H. J. Okano, et al.** (1997). "Anatomic localization of alternatively spliced leptin receptors (Ob-R) in mouse brain and other tissues." *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(13): 7001-7005.
- Fenn, A. M., K. M. Smith, et al.** (2013). "Increased micro-RNA 29b in the aged brain correlates with the reduction of insulin-like growth factor-1 and fractalkine ligand." *Neurobiol Aging* **34**(12): 2748-2758.
- Fernandez-Galaz, C., T. Fernandez-Agullo, et al.** (2001). "Decreased leptin uptake in hypothalamic nuclei with ageing in Wistar rats." *J Endocrinol* **171**(1): 23-32.
- Fernandez-Galaz, C., T. Fernandez-Agullo, et al.** (2002). "Long-term food restriction prevents ageing-associated central leptin resistance in wistar rats." *Diabetologia* **45**(7): 997-1003.
- Ferrari, E., A. Arcaini, et al.** (2000). "Pineal and pituitary-adrenocortical function in physiological aging and in senile dementia." *Exp Gerontol* **35**(9-10): 1239-1250.
- Ferrari, E., D. Casarotti, et al.** (2001). "Age-related changes of the adrenal secretory pattern: possible role in pathological brain aging." *Brain Res Brain Res Rev* **37**(1-3): 294-300.
- Ferrari, E., L. Cravello, et al.** (2001). "Age-related changes of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis: pathophysiological correlates." *Eur J Endocrinol* **144**(4): 319-329.
- Ferrari, E. & F. Magri** (2008). "Role of neuroendocrine pathways in cognitive decline during aging." *Ageing Res Rev* **7**(3): 225-233.
- Festa, A., R. D'Agostino, Jr., et al.** (2001). "The relation of body fat mass and distribution to markers of chronic inflammation." *Int J Obes Relat Metab Disord* **25**(10): 1407-1415.
- Filipowicz, W., S. N. Bhattacharyya, et al.** (2008). "Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight?" *Nat Rev Genet* **9**(2): 102-114.
- Finch, C. E.** (2003). "Neurons, glia, and plasticity in normal brain aging." *Neurobiol Aging* **24 Suppl 1**: S123-127; discussion S131.
- Finck, B. N., K. W. Kelley, et al.** (1998). "In vivo and in vitro evidence for the involvement of tumor necrosis factor-alpha in the induction of leptin by lipopolysaccharide." *Endocrinology* **139**(5): 2278-2283.
- Finkelstein, M. S., W. M. Petkun, et al.** (1983). "Pneumococcal bacteremia in adults: age-dependent differences in presentation and in outcome." *J Am Geriatr Soc* **31**(1): 19-27.
- Flegal, K. M., M. D. Carroll, et al.** (2010). "Prevalence and trends in obesity among US adults, 1999-2008." *JAMA* **303**(3): 235-241.
- Florez-Duquet, M., E. Peloso, et al.** (2001). "Fever and behavioral thermoregulation in young and old rats." *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **280**(5): R1457-1461.
- Foey, A. D., S. L. Parry, et al.** (1998). "Regulation of monocyte IL-10 synthesis by endogenous IL-1 and TNF-alpha: role of the p38 and p42/44 mitogen-activated protein kinases." *J Immunol* **160**(2): 920-928.
- Foster, K. D., C. A. Conn, et al.** (1992). "Fever, tumor necrosis factor, and interleukin-6 in young, mature, and aged Fischer 344 rats." *Am J Physiol* **262**(2 Pt 2): R211-215.
- Fraifeld, V., L. Abramovich, et al.** (1995). "Delayed febrile response in old rats is not associated with an inability of hypothalamus to produce prostaglandin E2." *Mech Ageing Dev* **79**(2-3): 137-140.

- Frank, M. G., R. M. Barrientos, et al.** (2006). "mRNA up-regulation of MHC II and pivotal pro-inflammatory genes in normal brain aging." *Neurobiol Aging* **27**(5): 717-722.
- Frederich, R. C., A. Hamann, et al.** (1995). "Leptin levels reflect body lipid content in mice: evidence for diet-induced resistance to leptin action." *Nat Med* **1**(12): 1311-1314.
- Frei, K., U. V. Malipiero, et al.** (1989). "On the cellular source and function of interleukin 6 produced in the central nervous system in viral diseases." *Eur J Immunol* **19**(4): 689-694.
- Freudenberg, M. A. & C. Galanos** (1990). "Bacterial lipopolysaccharides: structure, metabolism and mechanisms of action." *Int Rev Immunol* **6**(4): 207-221.
- Fried, S. K., D. A. Bunkin, et al.** (1998). "Omental and subcutaneous adipose tissues of obese subjects release interleukin-6: depot difference and regulation by glucocorticoid." *J Clin Endocrinol Metab* **83**(3): 847-850.
- Friedman, J. M. & J. L. Halaas** (1998). "Leptin and the regulation of body weight in mammals." *Nature* **395**(6704): 763-770.
- Frombaum, M., S. Le Clanche, et al.** (2012). "Antioxidant effects of resveratrol and other stilbene derivatives on oxidative stress and \*NO bioavailability: Potential benefits to cardiovascular diseases." *Biochimie* **94**(2): 269-276.
- Fuchs, F.** (2013). Untersuchungen zur Rolle des Transkriptionsfaktors NF-IL6 in der Hypothalamus-Hypophysen Achse bei Ratten und Mäusen nach psychologischem und inflammatorischen Stress, VVB Laufersweiler.
- Fuchs, F., J. Damm, et al.** (2013). "Activation of the inflammatory transcription factor nuclear factor interleukin-6 during inflammatory and psychological stress in the brain." *J Neuroinflammation* **10**: 140.
- Fuster-Matanzo, A., M. Llorens-Martin, et al.** (2013). "Role of neuroinflammation in adult neurogenesis and Alzheimer disease: therapeutic approaches." *Mediators Inflamm* **260925**(10): 3.
- Gabriely, I., X. H. Ma, et al.** (2002). "Leptin resistance during aging is independent of fat mass." *Diabetes* **51**(4): 1016-1021.
- Gaetano, L., K. Watanabe, et al.** (2010). "Cyclooxygenase-2/microsomal prostaglandin E synthase-1 complex in the preoptic-anterior hypothalamus of the mouse: involvement through fever to intravenous lipopolysaccharide." *Acta Physiol (Oxf)* **200**(4): 315-324.
- Gaillard, R. C., D. Turnill, et al.** (1990). "Tumor necrosis factor alpha inhibits the hormonal response of the pituitary gland to hypothalamic releasing factors." *Endocrinology* **127**(1): 101-106.
- Gardian, G. & L. Vecsei** (2004). "Huntington's disease: pathomechanism and therapeutic perspectives." *J Neural Transm* **111**(10-11): 1485-1494.
- Garg, S. K., C. Delaney, et al.** (2014). "Changes in adipose tissue macrophages and T cells during aging." *Crit Rev Immunol* **34**(1): 1-14.
- Gautron, L., P. Lafon, et al.** (2002). "Spatiotemporal analysis of signal transducer and activator of transcription 3 activation in rat brain astrocytes and pituitary following peripheral immune challenge." *Neuroscience* **112**(3): 717-729.

- Gautron, L., R. Mingam, et al.** (2005). "Influence of feeding status on neuronal activity in the hypothalamus during lipopolysaccharide-induced anorexia in rats." *Neuroscience* **134**(3): 933-946.
- Gemma, C., H. Stellwagen, et al.** (2004). "Rosiglitazone improves contextual fear conditioning in aged rats." *Neuroreport* **15**(14): 2255-2259.
- Geokas, M. C., C. N. Contreas, et al.** (1985). "The aging gastrointestinal tract, liver, and pancreas." *Clin Geriatr Med* **1**(1): 177-205.
- Ginaldi, L., M. F. Loreto, et al.** (2001). "Immunosenescence and infectious diseases." *Microbes Infect* **3**(10): 851-857.
- Giunta, S.** (2008). "Exploring the complex relations between inflammation and aging (inflamm-aging): anti-inflamm-aging remodelling of inflamm-aging, from robustness to frailty." *Inflamm Res* **57**(12): 558-563.
- Gleckman, R. & D. Hibert** (1982). "Afebrile bacteremia. A phenomenon in geriatric patients." *JAMA* **248**(12): 1478-1481.
- Gloddek, J., P. Lohrer, et al.** (2001). "The intrapituitary stimulatory effect of lipopolysaccharide on ACTH secretion is mediated by paracrine-acting IL-6." *Exp Clin Endocrinol Diabetes* **109**(8): 410-415.
- Godbout, J. P., J. Chen, et al.** (2005). "Exaggerated neuroinflammation and sickness behavior in aged mice following activation of the peripheral innate immune system." *FASEB J* **19**(10): 1329-1331.
- Godbout, J. P. & R. W. Johnson** (2009). "Age and neuroinflammation: a lifetime of psychoneuroimmune consequences." *Immunol Allergy Clin North Am* **29**(2): 321-337.
- Godbout, J. P., M. Moreau, et al.** (2008). "Aging exacerbates depressive-like behavior in mice in response to activation of the peripheral innate immune system." *Neuropsychopharmacology* **33**(10): 2341-2351.
- Gold, M., C. Alderton, et al.** (2010). "Rosiglitazone monotherapy in mild-to-moderate Alzheimer's disease: results from a randomized, double-blind, placebo-controlled phase III study." *Dement Geriatr Cogn Disord* **30**(2): 131-146.
- Golden, P. L., T. J. Maccagnan, et al.** (1997). "Human blood-brain barrier leptin receptor. Binding and endocytosis in isolated human brain microvessels." *J Clin Invest* **99**(1): 14-18.
- Gomez-Ambrosi, J., S. Becerril, et al.** (2004). "Reduced adipose tissue mass and hypoleptinemia in iNOS deficient mice: effect of LPS on plasma leptin and adiponectin concentrations." *FEBS Lett* **577**(3): 351-356.
- Graeber, M. B., W. J. Streit, et al.** (1989). "Identity of ED2-positive perivascular cells in rat brain." *J Neurosci Res* **22**(1): 103-106.
- Grahn, D., D. C. Norman, et al.** (1987). "Fever and aging: central nervous system prostaglandin E2 in response to endotoxin." *Exp Gerontol* **22**(4): 249-255.
- Greaves, L. C. & D. M. Turnbull** (2009). "Mitochondrial DNA mutations and ageing." *Biochim Biophys Acta* **1790**(10): 1015-1020.
- Grunfeld, C., C. Zhao, et al.** (1996). "Endotoxin and cytokines induce expression of leptin, the ob gene product, in hamsters." *J Clin Invest* **97**(9): 2152-2157.

- Gutierrez, M. B., B. S. Miguel, et al.** (2006). "Oxidative stress induced by Cremophor EL is not accompanied by changes in NF-kappaB activation or iNOS expression." *Toxicology* **222**(1-2): 125-131.
- Haedo, M. R., J. Gerez, et al.** (2009). "Regulation of pituitary function by cytokines." *Horm Res* **72**(5): 266-274.
- Hager, K., U. Machein, et al.** (1994). "Interleukin-6 and selected plasma proteins in healthy persons of different ages." *Neurobiol Aging* **15**(6): 771-772.
- Halaas, J. L., K. S. Gajiwala, et al.** (1995). "Weight-reducing effects of the plasma protein encoded by the obese gene." *Science* **269**(5223): 543-546.
- Handschin, C. & B. M. Spiegelman** (2006). "Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1 coactivators, energy homeostasis, and metabolism." *Endocr Rev* **27**(7): 728-735.
- Hanisch, U. K. & H. Kettenmann** (2007). "Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain." *Nat Neurosci* **10**(11): 1387-1394.
- Hannum, C. H., C. J. Wilcox, et al.** (1990). "Interleukin-1 receptor antagonist activity of a human interleukin-1 inhibitor." *Nature* **343**(6256): 336-340.
- Hansen, J. A., K. Lindberg, et al.** (1999). "Mechanism of inhibition of growth hormone receptor signaling by suppressor of cytokine signaling proteins." *Mol Endocrinol* **13**(11): 1832-1843.
- Harden, L. M., I. du Plessis, et al.** (2006). "Interleukin-6 and leptin mediate lipopolysaccharide-induced fever and sickness behavior." *Physiol Behav* **89**(2): 146-155.
- Harden, L. M., C. Rummel, et al.** (2013). "Critical role for peripherally-derived interleukin-10 in mediating the thermoregulatory manifestations of fever and hypothermia in severe forms of lipopolysaccharide-induced inflammation." *Pflugers Arch* **10**: 10.
- Hardie, L. J., D. V. Rayner, et al.** (1996). "Circulating leptin levels are modulated by fasting, cold exposure and insulin administration in lean but not Zucker (fa/fa) rats as measured by ELISA." *Biochem Biophys Res Commun* **223**(3): 660-665.
- Harkin, A., J. M. O'Donnell, et al.** (2002). "A study of VitalView for behavioural and physiological monitoring in laboratory rats." *Physiol Behav* **77**(1): 65-77.
- Harré, E. M., J. Roth, et al.** (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**(6): 2657-2666.
- Hart, B. L.** (1988). "Biological basis of the behavior of sick animals." *Neurosci Biobehav Rev* **12**(2): 123-137.
- Hasan, M. K. & A. C. White** (1979). "Psychogenic fever: entity or nonentity?" *Postgrad Med* **66**(2): 152-154.
- Hauger, R. L. & G. Aguilera** (1993). "Regulation of pituitary corticotropin releasing hormone (CRH) receptors by CRH: interaction with vasopressin." *Endocrinology* **133**(4): 1708-1714.
- Hauger, R. L., K. V. Thrivikraman, et al.** (1994). "Age-related alterations of hypothalamic-pituitary-adrenal axis function in male Fischer 344 rats." *Endocrinology* **134**(3): 1528-1536.

- Hegy, K., K. Fulop, et al.** (2004). "Leptin-induced signal transduction pathways." *Cell Biol Int* **28**(3): 159-169.
- Heim, M. H.** (1996). "The Jak-STAT pathway: specific signal transduction from the cell membrane to the nucleus." *Eur J Clin Invest* **26**(1): 1-12.
- Heinrich, P. C., I. Behrmann, et al.** (1998). "Interleukin-6-type cytokine signalling through the gp130/Jak/STAT pathway." *Biochem J* **334** ( Pt 2): 297-314.
- Helenius, M., M. Hanninen, et al.** (1996). "Aging-induced up-regulation of nuclear binding activities of oxidative stress responsive NF-kB transcription factor in mouse cardiac muscle." *J Mol Cell Cardiol* **28**(3): 487-498.
- Helenius, M., S. Kyrylenko, et al.** (2001). "Characterization of aging-associated up-regulation of constitutive nuclear factor-kappa B binding activity." *Antioxid Redox Signal* **3**(1): 147-156.
- Henry, C. J., Y. Huang, et al.** (2009). "Peripheral lipopolysaccharide (LPS) challenge promotes microglial hyperactivity in aged mice that is associated with exaggerated induction of both pro-inflammatory IL-1beta and anti-inflammatory IL-10 cytokines." *Brain Behav Immun* **23**(3): 309-317.
- Hiramoto, T., T. Oka, et al.** (2009). "Pyrogenic cytokines did not mediate a stress interview-induced hyperthermic response in a patient with psychogenic fever: a case report." *Psychosom Med* **71**(9): 932-936.
- Hirsch, E. C. & S. Hunot** (2009). "Neuroinflammation in Parkinson's disease: a target for neuroprotection?" *Lancet Neurol* **8**(4): 382-397.
- Holzapfel, B. & L. Wickert** (2007). "Die quantitative Real-Time-PCR (qRT-PCR). Methoden und Anwendungsgebiete." *Biologie in unserer Zeit* **37**(2): 120-126.
- Home, P. D., S. J. Pocock, et al.** (2009). "Rosiglitazone evaluated for cardiovascular outcomes in oral agent combination therapy for type 2 diabetes (RECORD): a multicentre, randomised, open-label trial." *Lancet* **373**(9681): 2125-2135.
- Home, P. D., S. J. Pocock, et al.** (2007). "Rosiglitazone evaluated for cardiovascular outcomes--an interim analysis." *N Engl J Med* **357**(1): 28-38.
- Hosogai, N., A. Fukuhara, et al.** (2007). "Adipose tissue hypoxia in obesity and its impact on adipocytokine dysregulation." *Diabetes* **56**(4): 901-911.
- Hosoi, T., Y. Okuma, et al.** (2002). "Leptin induces IL-1 receptor antagonist expression in the brain." *Biochem Biophys Res Commun* **294**(2): 215-219.
- Hosoi, T., Y. Okuma, et al.** (2002). "Leptin regulates interleukin-1beta expression in the brain via the STAT3-independent mechanisms." *Brain Res* **949**(1-2): 139-146.
- Hotamisligil, G. S., N. S. Shargill, et al.** (1993). "Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance." *Science* **259**(5091): 87-91.
- Houseknecht, K. L., C. S. Mantzoros, et al.** (1996). "Evidence for leptin binding to proteins in serum of rodents and humans: modulation with obesity." *Diabetes* **45**(11): 1638-1643.
- Howard, J. K., G. M. Lord, et al.** (1999). "Leptin protects mice from starvation-induced lymphoid atrophy and increases thymic cellularity in ob/ob mice." *J Clin Invest* **104**(8): 1051-1059.

- Huang, Y., C. J. Henry, et al.** (2008). "Exaggerated sickness behavior and brain proinflammatory cytokine expression in aged mice in response to intracerebroventricular lipopolysaccharide." *Neurobiol Aging* **29**(11): 1744-1753.
- Hübschle, T., E. Thom, et al.** (2001). "Leptin-induced nuclear translocation of STAT3 immunoreactivity in hypothalamic nuclei involved in body weight regulation." *J Neurosci* **21**(7): 2413-2424.
- Ibelgaufts, H.** (1995). *Dictionary of cytokines*. Weinheim, VCH Verlag.
- Inoue, W., S. Poole, et al.** (2006). "Leptin induces cyclooxygenase-2 via an interaction with interleukin-1beta in the rat brain." *Eur J Neurosci* **24**(8): 2233-2245.
- Inoue, W., G. Somay, et al.** (2008). "Immune-to-brain signaling and central prostaglandin E2 synthesis in fasted rats with altered lipopolysaccharide-induced fever." *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*.
- Isidori, A. M., F. Strollo, et al.** (2000). "Leptin and aging: correlation with endocrine changes in male and female healthy adult populations of different body weights." *J Clin Endocrinol Metab* **85**(5): 1954-1962.
- Jackson, J. C., S. M. Gordon, et al.** (2004). "The association between delirium and cognitive decline: a review of the empirical literature." *Neuropsychol Rev* **14**(2): 87-98.
- Jackson, S. M., F. Parhami, et al.** (1999). "Peroxisome proliferator-activated receptor activators target human endothelial cells to inhibit leukocyte-endothelial cell interaction." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **19**(9): 2094-2104.
- Jansky, L., S. Vybiral, et al.** (1995). "Production of systemic and hypothalamic cytokines during the early phase of endotoxin fever." *Neuroendocrinology* **62**(1): 55-61.
- Jenny, N. S.** (2012). "Inflammation in aging: cause, effect, or both?" *Discov Med* **13**(73): 451-460.
- Jiang, C., A. T. Ting, et al.** (1998). "PPAR-gamma agonists inhibit production of monocyte inflammatory cytokines." *Nature* **391**(6662): 82-86.
- Jiang, M., Y. Xiang, et al.** (2012). "Dysregulated expression of miR-146a contributes to age-related dysfunction of macrophages." *Aging Cell* **11**(1): 29-40.
- Jin, J., J. Alvertz, et al.** (2013). "Neuroprotective effects of PPAR-gamma agonist rosiglitazone in N171-82Q mouse model of Huntington's disease." *J Neurochem* **125**(3): 410-419.
- Johnson, P. F. & S. L. McKnight** (1989). "Eukaryotic transcriptional regulatory proteins." *Annu Rev Biochem* **58**: 799-839.
- Joseph, A. M., P. J. Adhietty, et al.** (2012). "The impact of aging on mitochondrial function and biogenesis pathways in skeletal muscle of sedentary high- and low-functioning elderly individuals." *Aging Cell* **11**(5): 801-809.
- Junker, A.** (2011). "Pathophysiology of translational regulation by microRNAs in multiple sclerosis." *FEBS Lett* **585**(23): 3738-3746.
- Jylha, M., P. Paavilainen, et al.** (2007). "Interleukin-1 receptor antagonist, interleukin-6, and C-reactive protein as predictors of mortality in nonagenarians: the vitality 90+ study." *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* **62**(9): 1016-1021.

- Kalehua, A. N., D. D. Taub, et al.** (2000). "Aged mice exhibit greater mortality concomitant to increased brain and plasma TNF-alpha levels following intracerebroventricular injection of lipopolysaccharide." *Gerontology* **46**(3): 115-128.
- Kang, C., E. Chung, et al.** (2013). "Exercise training attenuates aging-associated mitochondrial dysfunction in rat skeletal muscle: role of PGC-1alpha." *Exp Gerontol* **48**(11): 1343-1350.
- Kasckow, J. W., A. Regmi, et al.** (1999). "Changes in brain corticotropin-releasing factor messenger RNA expression in aged Fischer 344 rats." *Brain Res* **822**(1-2): 228-230.
- Khalaf, K. I. & H. Taegtmeyer** (2012). "After avandia: the use of antidiabetic drugs in patients with heart failure." *Tex Heart Inst J* **39**(2): 174-178.
- Kielian, T.** (2006). "Toll-like receptors in central nervous system glial inflammation and homeostasis." *J Neurosci Res* **83**(5): 711-730.
- Kielian, T. & P. D. Drew** (2003). "Effects of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonists on central nervous system inflammation." *J Neurosci Res* **71**(3): 315-325.
- Kim, E. J., K. J. Kwon, et al.** (2002). "Effects of peroxisome proliferator-activated receptor agonists on LPS-induced neuronal death in mixed cortical neurons: associated with iNOS and COX-2." *Brain Res* **941**(1-2): 1-10.
- Kishimoto, T., M. Hibi, et al.** (1992). "The molecular biology of interleukin 6 and its receptor." *Ciba Found Symp* **167**: 5-16; discussion 16-23.
- Kisseleva, T., S. Bhattacharya, et al.** (2002). "Signaling through the JAK/STAT pathway, recent advances and future challenges." *Gene* **285**(1-2): 1-24.
- Klasing, K. C.** (1998). "Nutritional modulation of resistance to infectious diseases." *Poult Sci* **77**(8): 1119-1125.
- Kluger, M. J., B. O'Reilly, et al.** (1987). "Further evidence that stress hyperthermia is a fever." *Physiol Behav* **39**(6): 763-766.
- Knorr, C., D. Marks, et al.** (2010). "Peripheral and central cyclooxygenase (COX) products may contribute to the manifestation of brain-controlled sickness responses during localized inflammation induced by macrophage-activating lipopeptide-2 (MALP-2)." *Neurosci Lett* **479**(2): 107-111.
- Kolaczynski, J. W., R. V. Considine, et al.** (1996). "Responses of leptin to short-term fasting and refeeding in humans: a link with ketogenesis but not ketones themselves." *Diabetes* **45**(11): 1511-1515.
- Konsman, J. P., V. Tridon, et al.** (2000). "Diffusion and action of intracerebroventricularly injected interleukin-1 in the CNS." *Neuroscience* **101**(4): 957-967.
- Konsman, J. P., S. Vignes, et al.** (2004). "Rat brain vascular distribution of interleukin-1 type-1 receptor immunoreactivity: relationship to patterns of inducible cyclooxygenase expression by peripheral inflammatory stimuli." *J Comp Neurol* **472**(1): 113-129.
- Korhonen, P., M. Helenius, et al.** (1997). "Age-related changes in the regulation of transcription factor NF-kappa B in rat brain." *Neurosci Lett* **225**(1): 61-64.
- Korner, J., S. C. Chua, Jr., et al.** (1999). "Regulation of hypothalamic proopiomelanocortin by leptin in lean and obese rats." *Neuroendocrinology* **70**(6): 377-383.

- Koufany, M., D. Moulin, et al.** (2008). "Anti-inflammatory effect of antidiabetic thiazolidinediones prevents bone resorption rather than cartilage changes in experimental polyarthritis." *Arthritis Res Ther* **10**(1): R6.
- Kozak, W., M. J. Kluger, et al.** (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. & A. Kozak** (2003). "Genetic Models in Applied Physiology. Differential role of nitric oxide synthase isoforms in fever of different etiologies: studies using Nos gene-deficient mice." *J Appl Physiol* **94**(6): 2534-2544.
- Krabbe, K. S., M. Pedersen, et al.** (2004). "Inflammatory mediators in the elderly." *Exp Gerontol* **39**(5): 687-699.
- Kramer, M. F.** (2011). "Stem-loop RT-qPCR for miRNAs." *Curr Protoc Mol Biol* **Chapter 15**: Unit 15 10.
- Krieger, D. T., W. Allen, et al.** (1971). "Characterization of the normal temporal pattern of plasma corticosteroid levels." *J Clin Endocrinol Metab* **32**(2): 266-284.
- Laflamme, N. & S. Rivest** (1999). "Effects of systemic immunogenic insults and circulating proinflammatory cytokines on the transcription of the inhibitory factor kappaB alpha within specific cellular populations of the rat brain." *J Neurochem* **73**(1): 309-321.
- Lammert, A., W. Kiess, et al.** (2001). "Soluble leptin receptor represents the main leptin binding activity in human blood." *Biochem Biophys Res Commun* **283**(4): 982-988.
- Landman, R. E., J. J. Puder, et al.** (2003). "Endotoxin stimulates leptin in the human and nonhuman primate." *J Clin Endocrinol Metab* **88**(3): 1285-1291.
- Lansdorp, P. M., L. A. Aarden, et al.** (1986). "A growth-factor dependent B-cell hybridoma." *Curr Top Microbiol Immunol* **132**: 105-113.
- Laupland, K. B., D. L. Church, et al.** (2003). "Population-based study of the epidemiology of and the risk factors for invasive Staphylococcus aureus infections." *J Infect Dis* **187**(9): 1452-1459.
- Lawrence, T., D. W. Gilroy, et al.** (2001). "Possible new role for NF-kappaB in the resolution of inflammation." *Nat Med* **7**(12): 1291-1297.
- Lebel, E., L. Vallieres, et al.** (2000). "Selective involvement of interleukin-6 in the transcriptional activation of the suppressor of cytokine signaling-3 in the brain during systemic immune challenges." *Endocrinology* **141**(10): 3749-3763.
- Lee, R. C., R. L. Feinbaum, et al.** (1993). "The C. elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14." *Cell* **75**(5): 843-854.
- Lehman, J. J., P. M. Barger, et al.** (2000). "Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 promotes cardiac mitochondrial biogenesis." *J Clin Invest* **106**(7): 847-856.
- LeMay, L. G., A. J. Vander, et al.** (1990). "The effects of psychological stress on plasma interleukin-6 activity in rats." *Physiol Behav* **47**(5): 957-961.
- Leon, L. R., W. Kozak, et al.** (1998). "Role of IL-10 in inflammation. Studies using cytokine knockout mice." *Ann N Y Acad Sci* **856**: 69-75.
- Leon, L. R., W. Kozak, et al.** (1999). "An antipyretic role for interleukin-10 in LPS fever in mice." *Am J Physiol* **276**(1 Pt 2): R81-89.

- Letiembre, M., W. Hao, et al.** (2007). "Innate immune receptor expression in normal brain aging." *Neuroscience* **146**(1): 248-254.
- Levin, B. E., A. A. Dunn-Meynell, et al.** (2004). "Obesity-prone rats have normal blood-brain barrier transport but defective central leptin signaling before obesity onset." *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **286**(1): R143-150.
- Lezza, A. M., V. Pesce, et al.** (2001). "Increased expression of mitochondrial transcription factor A and nuclear respiratory factor-1 in skeletal muscle from aged human subjects." *FEBS Lett* **501**(1): 74-78.
- Li, H., M. Matheny, et al.** (1997). "Leptin gene expression increases with age independent of increasing adiposity in rats." *Diabetes* **46**(12): 2035-2039.
- Li, S., E. Sehic, et al.** (1999). "Relation between complement and the febrile response of guinea pigs to systemic endotoxin." *Am J Physiol* **277**(6 Pt 2): R1635-1645.
- Li, Z., V. Perlik, et al.** (2006). "Kupffer cell-generated PGE2 triggers the febrile response of guinea pigs to intravenously injected LPS." *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*.
- Lightman, S. L., R. J. Windle, et al.** (2000). "Significance of pulsatility in the HPA axis." *Novartis Found Symp* **227**: 244-257; discussion 257-260.
- Loane, D. J., B. F. Deighan, et al.** (2009). "Interleukin-4 mediates the neuroprotective effects of rosiglitazone in the aged brain." *Neurobiol Aging* **30**(6): 920-931.
- Loffreda, S., S. Q. Yang, et al.** (1998). "Leptin regulates proinflammatory immune responses." *Faseb J* **12**(1): 57-65.
- Lopez-Armada, M. J., R. R. Riveiro-Naveira, et al.** (2013). "Mitochondrial dysfunction and the inflammatory response." *Mitochondrion* **13**(2): 106-118.
- Lord, G. M., G. Matarese, et al.** (1998). "Leptin modulates the T-cell immune response and reverses starvation-induced immunosuppression." *Nature* **394**(6696): 897-901.
- Luheshi, G., A. J. Miller, et al.** (1996). "Interleukin-1 receptor antagonist inhibits endotoxin fever and systemic interleukin-6 induction in the rat." *Am J Physiol* **270**(1 Pt 1): E91-95.
- Luheshi, G. N., J. D. Gardner, et al.** (1999). "Leptin actions on food intake and body temperature are mediated by IL-1." *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(12): 7047-7052.
- Luheshi, G. N. & C. Rummel** (2007). "Is programming of weight regulation immune to neonatal inflammation?" *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **293**(2): R578-580.
- Lumeng, C. N., J. L. Bodzin, et al.** (2007). "Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization." *J Clin Invest* **117**(1): 175-184.
- Luna-Medina, R., M. Cortes-Canteli, et al.** (2005). "Regulation of inflammatory response in neural cells in vitro by thiadiazolidinones derivatives through peroxisome proliferator-activated receptor gamma activation." *J Biol Chem* **280**(22): 21453-21462.
- Luo, Y., W. Yin, et al.** (2006). "Neuroprotection against focal ischemic brain injury by the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonist rosiglitazone." *J Neurochem* **97**(2): 435-448.
- Lupien, S., A. R. Lecours, et al.** (1996). "Longitudinal study of basal cortisol levels in healthy elderly subjects: evidence for subgroups." *Neurobiol Aging* **17**(1): 95-105.

- Lupien, S. J., G. Schwartz, et al.** (2005). "The Douglas Hospital Longitudinal Study of Normal and Pathological Aging: summary of findings." *J Psychiatry Neurosci* **30**(5): 328-334.
- Lynch, A. M., K. J. Murphy, et al.** (2010). "The impact of glial activation in the aging brain." *Aging Dis* **1**(3): 262-278.
- Mackowiak, P. A., R. H. Browne, et al.** (1980). "Polymicrobial sepsis: an analysis of 184 cases using log linear models." *Am J Med Sci* **280**(2): 73-80.
- Maffei, M., J. Halaas, et al.** (1995). "Leptin levels in human and rodent: measurement of plasma leptin and ob RNA in obese and weight-reduced subjects." *Nat Med* **1**(11): 1155-1161.
- Magri, F., M. Locatelli, et al.** (1997). "Changes in endocrine circadian rhythms as markers of physiological and pathological brain aging." *Chronobiol Int* **14**(4): 385-396.
- Maher, F. O., D. S. Martin, et al.** (2004). "Increased IL-1beta in cortex of aged rats is accompanied by downregulation of ERK and PI-3 kinase." *Neurobiol Aging* **25**(6): 795-806.
- Male, D.** (2005). *Immunologie auf einen Blick*. München, Urban & Fischer Verlag.
- Mandel, M. A. & A. A. Mahmoud** (1978). "Impairment of cell-mediated immunity in mutation diabetic mice (db/db)." *J Immunol* **120**(4): 1375-1377.
- Marchal, J., F. Pifferi, et al.** (2013). "Resveratrol in mammals: effects on aging biomarkers, age-related diseases, and life span." *Ann N Y Acad Sci*: 12214.
- Margetic, S., C. Gazzola, et al.** (2002). "Leptin: a review of its peripheral actions and interactions." *Int J Obes Relat Metab Disord* **26**(11): 1407-1433.
- Marsh, C. B. & M. D. Wewers** (1994). "Cytokine-induced interleukin-1 receptor antagonist release in mononuclear phagocytes." *Am J Respir Cell Mol Biol* **10**(5): 521-525.
- Martin-Romero, C., J. Santos-Alvarez, et al.** (2000). "Human leptin enhances activation and proliferation of human circulating T lymphocytes." *Cell Immunol* **199**(1): 15-24.
- Matsumura, K. & S. Kobayashi** (2004). "Signaling the brain in inflammation: the role of endothelial cells." *Front Biosci* **9**: 2819-2826.
- Mattson, M. P.** (2004). "Pathways towards and away from Alzheimer's disease." *Nature* **430**(7000): 631-639.
- Maury, E. & S. M. Brichard** (2010). "Adipokine dysregulation, adipose tissue inflammation and metabolic syndrome." *Mol Cell Endocrinol* **314**(1): 1-16.
- McGill, J. K. & M. F. Beal** (2006). "PGC-1alpha, a new therapeutic target in Huntington's disease?" *Cell* **127**(3): 465-468.
- McKinley, M. J., R. M. McAllen, et al.** (2003). "The sensory circumventricular organs of the mammalian brain." *Adv Anat Embryol Cell Biol* **172**: III-XII, 1-122, back cover.
- McLay, R. N., A. J. Kastin, et al.** (2000). "Passage of interleukin-1-beta across the blood-brain barrier is reduced in aged mice: a possible mechanism for diminished fever in aging." *Neuroimmunomodulation* **8**(3): 148-153.
- Meier, C. A., E. Bobbioni, et al.** (2002). "IL-1 receptor antagonist serum levels are increased in human obesity: a possible link to the resistance to leptin?" *J Clin Endocrinol Metab* **87**(3): 1184-1188.

- Mensink, M., M. K. Hesselink, et al.** (2007). "Improved skeletal muscle oxidative enzyme activity and restoration of PGC-1 alpha and PPAR beta/delta gene expression upon rosiglitazone treatment in obese patients with type 2 diabetes mellitus." *Int J Obes* **31**(8): 1302-1310.
- Miller, D., T. Yoshikawa, et al.** (1991). "Effect of age on fever response to recombinant tumor necrosis factor alpha in a murine model." *J Gerontol* **46**(5): M176-179.
- Mizuno, T. M. & C. V. Mobbs** (1999). "Hypothalamic agouti-related protein messenger ribonucleic acid is inhibited by leptin and stimulated by fasting." *Endocrinology* **140**(2): 814-817.
- Morgan, T. E., Z. Xie, et al.** (1999). "The mosaic of brain glial hyperactivity during normal ageing and its attenuation by food restriction." *Neuroscience* **89**(3): 687-699.
- Morimoto, A., T. Watanabe, et al.** (1991). "Possible involvement of prostaglandins in psychological stress-induced responses in rats." *J Physiol* **443**: 421-429.
- Mosmann, T.** (1983). "Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays." *J Immunol Methods* **65**(1-2): 55-63.
- Mühlhardt, C.** (2009). *Der Experimentator Molekularbiologie/Genomics*. Heidelberg, Spektrum Akademischer Verlag.
- Muhlhausler, B. S., J. L. Morrison, et al.** (2009). "Rosiglitazone increases the expression of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma target genes in adipose tissue, liver, and skeletal muscle in the sheep fetus in late gestation." *Endocrinology* **150**(9): 4287-4294.
- Mullis, K. B. & F. A. Faloona** (1987). "Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction." *Methods Enzymol* **155**: 335-350.
- Münzberg, H., L. Huo, et al.** (2003). "Role of signal transducer and activator of transcription 3 in regulation of hypothalamic proopiomelanocortin gene expression by leptin." *Endocrinology* **144**(5): 2121-2131.
- Mütze, J.** (2005). "Immunohistochemische Analyse der Leptin-induzierten Transkriptionsfaktoren STAT3 und STAT5 im Gehirn der Ratte."
- Muzumdar, R. H., X. Ma, et al.** (2006). "Central resistance to the inhibitory effects of leptin on stimulated insulin secretion with aging." *Neurobiol Aging* **27**(9): 1308-1314.
- Nadjar, A., R. M. Bluthe, et al.** (2005). "Inactivation of the cerebral NFkappaB pathway inhibits interleukin-1beta-induced sickness behavior and c-Fos expression in various brain nuclei." *Neuropsychopharmacology* **30**(8): 1492-1499.
- Nadjar, A., C. Combe, et al.** (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**(4): 1024-1036.
- Nash, A. D., M. R. Brandon, et al.** (1992). "Effects of tumour necrosis factor-alpha on growth hormone and interleukin 6 mRNA in ovine pituitary cells." *Mol Cell Endocrinol* **84**(1-2): R31-37.
- Nerlov, C.** (2007). "The C/EBP family of transcription factors: a paradigm for interaction between gene expression and proliferation control." *Trends Cell Biol* **17**(7): 318-324.

- Nguyen, M. T., S. Favelyukis, et al.** (2007). "A subpopulation of macrophages infiltrates hypertrophic adipose tissue and is activated by free fatty acids via Toll-like receptors 2 and 4 and JNK-dependent pathways." *J Biol Chem* **282**(48): 35279-35292.
- Nickel, R., A. Schummer, et al.** (1992). *Lehrbuch der Anatomie der Haustiere*, Parey.
- Nimmerjahn, A., F. Kirchhoff, et al.** (2005). "Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo." *Science* **308**(5726): 1314-1318.
- Nissen, S. E. & K. Wolski** (2007). "Effect of rosiglitazone on the risk of myocardial infarction and death from cardiovascular causes." *N Engl J Med* **356**(24): 2457-2471.
- Nissen, S. E. & K. Wolski** (2010). "Rosiglitazone revisited: an updated meta-analysis of risk for myocardial infarction and cardiovascular mortality." *Arch Intern Med* **170**(14): 1191-1201.
- Niswender, K. D., G. J. Morton, et al.** (2001). "Intracellular signalling. Key enzyme in leptin-induced anorexia." *Nature* **413**(6858): 794-795.
- Norden, D. M. & J. P. Godbout** (2013). "Review: microglia of the aged brain: primed to be activated and resistant to regulation." *Neuropathol Appl Neurobiol* **39**(1): 19-34.
- Norgan, N. G.** (1997). "The beneficial effects of body fat and adipose tissue in humans." *Int J Obes Relat Metab Disord* **21**(9): 738-746.
- Norman, D. C., D. Grahn, et al.** (1985). "Fever and aging." *J Am Geriatr Soc* **33**(12): 859-863.
- Norman, D. C. & S. D. Toledo** (1992). "Infections in elderly persons. An altered clinical presentation." *Clin Geriatr Med* **8**(4): 713-719.
- Norman, D. C., R. H. Yamamura, et al.** (1988). "Fever response in old and young mice after injection of interleukin 1." *J Gerontol* **43**(4): M80-85.
- Nunomura, A., R. J. Castellani, et al.** (2006). "Involvement of oxidative stress in Alzheimer disease." *J Neuropathol Exp Neurol* **65**(7): 631-641.
- Ohmichi, M., K. Hirota, et al.** (1992). "Binding sites for interleukin-6 in the anterior pituitary gland." *Neuroendocrinology* **55**(2): 199-203.
- Oka, T., Y. Kanemitsu, et al.** (2013). "Psychological stress contributed to the development of low-grade fever in a patient with chronic fatigue syndrome: a case report." *Biopsychosoc Med* **7**(1): 7.
- Oka, T., K. Oka, et al.** (2001). "Mechanisms and mediators of psychological stress-induced rise in core temperature." *Psychosom Med* **63**(3): 476-486.
- Okuno, A., H. Tamemoto, et al.** (1998). "Troglitazone increases the number of small adipocytes without the change of white adipose tissue mass in obese Zucker rats." *J Clin Invest* **101**(6): 1354-1361.
- Opp, M. R. & J. M. Krueger** (1991). "Interleukin 1-receptor antagonist blocks interleukin 1-induced sleep and fever." *Am J Physiol* **260**(2 Pt 2): R453-457.
- Orsu, P., B. V. Murthy, et al.** (2013). "Cerebroprotective potential of resveratrol through anti-oxidant and anti-inflammatory mechanisms in rats." *J Neural Transm* **120**(8): 1217-1223.
- Paolisso, G., M. R. Rizzo, et al.** (1998). "Advancing age and insulin resistance: role of plasma tumor necrosis factor-alpha." *Am J Physiol* **275**(2 Pt 1): E294-299.

- Park, H. S., J. Y. Park, et al.** (2005). "Relationship of obesity and visceral adiposity with serum concentrations of CRP, TNF-alpha and IL-6." *Diabetes Res Clin Pract* **69**(1): 29-35.
- Park, J. Y., M. H. Pillinger, et al.** (2006). "Prostaglandin E2 synthesis and secretion: the role of PGE2 synthases." *Clin Immunol* **119**(3): 229-240.
- Parnet, P., D. L. Brunke, et al.** (1993). "Molecular identification of two types of interleukin-1 receptors in the murine pituitary gland." *J Neuroendocrinol* **5**(2): 213-219.
- Pedersen, W. A., P. J. McMillan, et al.** (2006). "Rosiglitazone attenuates learning and memory deficits in Tg2576 Alzheimer mice." *Exp Neurol* **199**(2): 265-273.
- Pelleymounter, M. A., M. J. Cullen, et al.** (1995). "Effects of the obese gene product on body weight regulation in ob/ob mice." *Science* **269**(5223): 540-543.
- Peloso, E. D., M. Florez-Duquet, et al.** (2003). "LPS fever in old rats depends on the ambient temperature." *Physiol Behav* **78**(4-5): 651-654.
- Peralta, S., J. M. Carrascosa, et al.** (2002). "Ageing increases SOCS-3 expression in rat hypothalamus: effects of food restriction." *Biochem Biophys Res Commun* **296**(2): 425-428.
- Pereira, M. P., O. Hurtado, et al.** (2006). "Rosiglitazone and 15-deoxy-Delta12,14-prostaglandin J2 cause potent neuroprotection after experimental stroke through noncompletely overlapping mechanisms." *J Cereb Blood Flow Metab* **26**(2): 218-229.
- Perlik, V., Z. Li, et al.** (2005). "LPS-activated complement, not LPS per se, triggers the early release of PGE2 by Kupffer cells." *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **289**(2): R332-R339.
- Peterson, P. K., C. C. Chao, et al.** (1994). "Levels of tumor necrosis factor alpha, interleukin 6, interleukin 10, and transforming growth factor beta are normal in the serum of the healthy elderly." *Clin Infect Dis* **19**(6): 1158-1159.
- Pfister, G. & W. Savino** (2008). "Can the immune system still be efficient in the elderly? An immunological and immunoendocrine therapeutic perspective." *Neuroimmunomodulation* **15**(4-6): 351-364.
- Picca, A., F. Fracasso, et al.** (2013). "Age- and calorie restriction-related changes in rat brain mitochondrial DNA and TFAM binding." *Age (Dordr)* **35**(5): 1607-1620.
- Pinner, R. W., S. M. Teutsch, et al.** (1996). "Trends in infectious diseases mortality in the United States." *JAMA* **275**(3): 189-193.
- Plata-Salaman, C. R., E. Peloso, et al.** (1998). "Interleukin-1beta-induced fever in young and old Long-Evans rats." *Am J Physiol* **275**(5 Pt 2): R1633-1638.
- Plotkin, B. J., D. Paulson, et al.** (1996). "Immune responsiveness in a rat model for type II diabetes (Zucker rat, fa/fa): susceptibility to *Candida albicans* infection and leucocyte function." *J Med Microbiol* **44**(4): 277-283.
- Pohl, J., B. Woodside, et al.** (2009). "Changes in hypothalamically mediated acute-phase inflammatory responses to lipopolysaccharide in diet-induced obese rats." *Endocrinology* **150**(11): 4901-4910.
- Ponnappan, S. & U. Ponnappan** (2011). "Aging and immune function: molecular mechanisms to interventions." *Antioxid Redox Signal* **14**(8): 1551-1585.

- Popescu, B. O., E. C. Toescu, et al.** (2009). "Blood-brain barrier alterations in ageing and dementia." *J Neurol Sci* **283**(1-2): 99-106.
- Porstmann, T. & S. T. Kiessig** (1992). "Enzyme immunoassay techniques. An overview." *J Immunol Methods* **150**(1-2): 5-21.
- Pouwels, K. B. & K. van Grootheest** (2012). "The rosiglitazone decision process at FDA and EMA. What should we learn?" *Int J Risk Saf Med* **24**(2): 73-80.
- Przedborski, S. & H. Ischiropoulos** (2005). "Reactive oxygen and nitrogen species: weapons of neuronal destruction in models of Parkinson's disease." *Antioxid Redox Signal* **7**(5-6): 685-693.
- Puigserver, P.** (2003). "Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-gamma Coactivator 1alpha (PGC-1alpha): Transcriptional Coactivator and Metabolic Regulator." *Endocrine Reviews* **24**(1): 78-90.
- Puigserver, P., J. Rhee, et al.** (2001). "Cytokine stimulation of energy expenditure through p38 MAP kinase activation of PPARgamma coactivator-1." *Mol Cell* **8**(5): 971-982.
- Pulford, K. A., A. Sipos, et al.** (1990). "Distribution of the CD68 macrophage/myeloid associated antigen." *Int Immunol* **2**(10): 973-980.
- Pusztai, L., T. R. Mendoza, et al.** (2004). "Changes in plasma levels of inflammatory cytokines in response to paclitaxel chemotherapy." *Cytokine* **25**(3): 94-102.
- Quintanilla, R. A., Y. N. Jin, et al.** (2008). "Rosiglitazone treatment prevents mitochondrial dysfunction in mutant huntingtin-expressing cells: possible role of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma (PPARgamma) in the pathogenesis of Huntington disease." *J Biol Chem* **283**(37): 25628-25637.
- Ramji, D. P. & P. Foka** (2002). "CCAAT/enhancer-binding proteins: structure, function and regulation." *Biochem J* **365**(Pt 3): 561-575.
- Razonable, R. R., M. Henault, et al.** (2006). "Stimulation of toll-like receptor 2 with bleomycin results in cellular activation and secretion of pro-inflammatory cytokines and chemokines." *Toxicol Appl Pharmacol* **210**(3): 181-189.
- Rediger, A., C. L. Piechowski, et al.** (2012). "MC4R dimerization in the paraventricular nucleus and GHSR/MC3R heterodimerization in the arcuate nucleus: is there relevance for body weight regulation?" *Neuroendocrinology* **95**(4): 277-288.
- Remick, D. G. & H. Xioa** (2006). "Hypothermia and sepsis." *Front Biosci* **11**: 1006-1013.
- Renner, U., J. Gloddek, et al.** (1998). "Regulation and role of intrapituitary IL-6 production by folliculostellate cells." *Domest Anim Endocrinol* **15**(5): 353-362.
- Ricote, M., A. C. Li, et al.** (1998). "The peroxisome proliferator-activated receptor-gamma is a negative regulator of macrophage activation." *Nature* **391**(6662): 79-82.
- Risner, M. E., A. M. Saunders, et al.** (2006). "Efficacy of rosiglitazone in a genetically defined population with mild-to-moderate Alzheimer's disease." *Pharmacogenomics J* **6**(4): 246-254.
- Rivest, S.** (1999). "What is the cellular source of prostaglandins in the brain in response to systemic inflammation? Facts and controversies." *Mol Psychiatry* **4**(6): 500-507.
- Rivest, S.** (2002). "Does circulating leptin have the ability to cross the blood-brain barrier and target neurons directly?" *Endocrinology* **143**(9): 3211-3213.

- Rogers, J., D. Mastroeni, et al.** (2007). "Neuroinflammation in Alzheimer's disease and Parkinson's disease: are microglia pathogenic in either disorder?" *Int Rev Neurobiol* **82**: 235-246.
- Romanovsky, A. A.** (2007). "Thermoregulation: some concepts have changed. Functional architecture of the thermoregulatory system." *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **292**(1): R37-46.
- Ross, G., T. Hubschle, et al.** (2003). "Fever induction by localized subcutaneous inflammation in guinea pigs: the role of cytokines and prostaglandins." *J Appl Physiol* **94**(4): 1395-1402.
- Ross, G., J. Roth, et al.** (2000). "Afferent nerves are involved in the febrile response to injection of LPS into artificial subcutaneous chambers in guinea pigs." *Physiol Behav* **71**(3-4): 305-313.
- Rossner, S.** (2001). "Obesity in the elderly--a future matter of concern?" *Obes Rev* **2**(3): 183-188.
- Roth, J., C. A. Conn, et al.** (1993). "Kinetics of systemic and intrahypothalamic IL-6 and tumor necrosis factor during endotoxin fever in guinea pigs." *Am J Physiol* **265**(3 Pt 2): R653-658.
- Roth, J. & G. E. De Souza** (2001). "Fever induction pathways: evidence from responses to systemic or local cytokine formation." *Braz J Med Biol Res* **34**(3): 301-314.
- Roth, J., E. M. Harré, et al.** (2004). "Signaling the brain in systemic inflammation: role of sensory circumventricular organs." *Front Biosci* **9**: 290-300.
- Roth, J., C. Rummel, et al.** (2006). "Molecular aspects of fever and hyperthermia." *Neurol Clin* **24**(3): 421-439, v.
- Roth, J., C. Rummel, et al.** (2009). "Molecular aspects of fever and hyperthermia." *Immunol Allergy Clin North Am* **29**(2): 229-245.
- Rummel, C., W. Inoue, et al.** (2010). "Leptin regulates leukocyte recruitment into the brain following systemic LPS-induced inflammation." *Mol Psychiatry* **15**(5): 523-534.
- Rummel, C., W. Inoue, et al.** (2008). "Selective contribution of interleukin-6 and leptin to brain inflammatory signals induced by systemic LPS injection in mice." *J Comp Neurol* **511**(3): 373-395.
- Rummel, C., K. Matsumura, et al.** (2011). "Circulating IL-6 contributes to peripheral LPS-induced mPGES-1 expression in the rat brain." *Brain Res Bull* **86**(5-6): 319-325.
- Rummel, C., C. Sachot, et al.** (2006). "Circulating interleukin-6 induces fever through a STAT3-linked activation of COX-2 in the brain." *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **291**(5): R1316-1326.
- Rummel, C., T. Voss, et al.** (2005). "Nuclear STAT3 translocation in guinea pig and rat brain endothelium during systemic challenge with lipopolysaccharide and interleukin-6." *J Comp Neurol* **491**(1): 1-14.
- Sachot, C., S. Poole, et al.** (2004). "Circulating leptin mediates lipopolysaccharide-induced anorexia and fever in rats." *J Physiol* **561**(Pt 1): 263-272.
- Saito, H., E. R. Sherwood, et al.** (2003). "Effects of aging on mortality, hypothermia, and cytokine induction in mice with endotoxemia or sepsis." *Mech Ageing Dev* **124**(10-12): 1047-1058.

- Salminen, A., J. Ojala, et al.** (2012). "Mitochondrial dysfunction and oxidative stress activate inflammasomes: impact on the aging process and age-related diseases." *Cell Mol Life Sci* **69**(18): 2999-3013.
- Sanchez-Margalet, V., C. Martin-Romero, et al.** (2003). "Role of leptin as an immunomodulator of blood mononuclear cells: mechanisms of action." *Clin Exp Immunol* **133**(1): 11-19.
- Sandhir, R. & N. E. Berman** (2010). "Age-dependent response of CCAAT/enhancer binding proteins following traumatic brain injury in mice." *Neurochem Int* **56**(1): 188-193.
- Santos-Alvarez, J., R. Goberna, et al.** (1999). "Human leptin stimulates proliferation and activation of human circulating monocytes." *Cell Immunol* **194**(1): 6-11.
- Sapolsky, R., M. Armanini, et al.** (1987). "Stress and glucocorticoids in aging." *Endocrinol Metab Clin North Am* **16**(4): 965-980.
- Sapolsky, R. M., L. C. Krey, et al.** (1986). "The neuroendocrinology of stress and aging: the glucocorticoid cascade hypothesis." *Endocr Rev* **7**(3): 284-301.
- Sarraf, P., R. C. Frederich, et al.** (1997). "Multiple cytokines and acute inflammation raise mouse leptin levels: potential role in inflammatory anorexia." *J Exp Med* **185**(1): 171-175.
- Satinoff, E., E. Peloso, et al.** (1999). "Prostaglandin E2-induced fever in young and old Long-Evans rats." *Physiol Behav* **67**(1): 149-152.
- Scarpace, P. J., S. E. Borst, et al.** (1992). "The association of E. coli peritonitis with an impaired and delayed fever response in senescent rats." *J Gerontol* **47**(4): B142-145.
- Scarpace, P. J., M. Matheny, et al.** (2000). "Impaired leptin responsiveness in aged rats." *Diabetes* **49**(3): 431-435.
- Scarpace, P. J., M. Matheny, et al.** (2000). "Impaired leptin signal transduction with age-related obesity." *Neuropharmacology* **39**(10): 1872-1879.
- Scarpace, P. J., M. Matheny, et al.** (2001). "Hypothalamic leptin resistance is associated with impaired leptin signal transduction in aged obese rats." *Neuroscience* **104**(4): 1111-1117.
- Scarpace, P. J. & N. Tumer** (2001). "Peripheral and hypothalamic leptin resistance with age-related obesity." *Physiol Behav* **74**(4-5): 721-727.
- Scheinfeld, N. S.** (2004). "Obesity and dermatology." *Clin Dermatol* **22**(4): 303-309.
- Schindler, C. & J. E. Darnell, Jr.** (1995). "Transcriptional responses to polypeptide ligands: the JAK-STAT pathway." *Annu Rev Biochem* **64**: 621-651.
- Schmittgen, T. D., E. J. Lee, et al.** (2008). "Real-time PCR quantification of precursor and mature microRNA." *Methods* **44**(1): 31-38.
- Schmitz, S.** (2011). *Der Experimentator Zellkultur*. Heidelberg, Spektrum Akademischer Verlag.
- Schnare, M., M. Rollinghoff, et al.** (2006). "Toll-like receptors: sentinels of host defence against bacterial infection." *Int Arch Allergy Immunol* **139**(1): 75-85.
- Schoonjans, K., B. Staels, et al.** (1996). "The peroxisome proliferator activated receptors (PPARS) and their effects on lipid metabolism and adipocyte differentiation." *Biochim Biophys Acta* **1302**(2): 93-109.

- Schottelius, A. J., M. W. Mayo, et al.** (1999). "Interleukin-10 signaling blocks inhibitor of kappaB kinase activity and nuclear factor kappaB DNA binding." *J Biol Chem* **274**(45): 31868-31874.
- Schwartz, M. W., E. Peskind, et al.** (1996). "Cerebrospinal fluid leptin levels: relationship to plasma levels and to adiposity in humans." *Nat Med* **2**(5): 589-593.
- Schwartz, M. W., R. J. Seeley, et al.** (1997). "Leptin increases hypothalamic pro-opiomelanocortin mRNA expression in the rostral arcuate nucleus." *Diabetes* **46**(12): 2119-2123.
- Sebai, H., W. Gadacha, et al.** (2009). "Protective effect of resveratrol against lipopolysaccharide-induced oxidative stress in rat brain." *Brain Inj* **23**(13-14): 1089-1094.
- Sebai, H., M. Sani, et al.** (2010). "Resveratrol, a red wine polyphenol, attenuates lipopolysaccharide-induced oxidative stress in rat liver." *Ecotoxicol Environ Saf* **73**(5): 1078-1083.
- Selye, H.** (1950). "Stress and the general adaptation syndrome." *Br Med J* **1**(4667): 1383-1392.
- Sheffield, L. G. & N. E. Berman** (1998). "Microglial expression of MHC class II increases in normal aging of nonhuman primates." *Neurobiol Aging* **19**(1): 47-55.
- Shek, E. W. & P. J. Scarpace** (2000). "Resistance to the anorexic and thermogenic effects of centrally administered leptin in obese aged rats." *Regul Pept* **92**(1-3): 65-71.
- Shi, H., M. V. Kokoeva, et al.** (2006). "TLR4 links innate immunity and fatty acid-induced insulin resistance." *J Clin Invest* **116**(11): 3015-3025.
- Singer, R., C. T. Harker, et al.** (1986). "Hyperthermia induced by open-field stress is blocked by salicylate." *Physiol Behav* **36**(6): 1179-1182.
- Smith, A. G., P. A. Sheridan, et al.** (2007). "Diet-induced obese mice have increased mortality and altered immune responses when infected with influenza virus." *J Nutr* **137**(5): 1236-1243.
- Smith, S. A., C. A. Lister, et al.** (2000). "Rosiglitazone prevents the onset of hyperglycaemia and proteinuria in the Zucker diabetic fatty rat." *Diabetes Obes Metab* **2**(6): 363-372.
- Sobrado, M., M. P. Pereira, et al.** (2009). "Synthesis of lipoxin A4 by 5-lipoxygenase mediates PPARgamma-dependent, neuroprotective effects of rosiglitazone in experimental stroke." *J Neurosci* **29**(12): 3875-3884.
- Sonkoly, E., M. Stahle, et al.** (2008). "MicroRNAs and immunity: novel players in the regulation of normal immune function and inflammation." *Semin Cancer Biol* **18**(2): 131-140.
- Spalding, K. L., E. Arner, et al.** (2008). "Dynamics of fat cell turnover in humans." *Nature* **453**(7196): 783-787.
- Spangelo, B. L., P. D. deHoll, et al.** (1994). "Neurointermediate pituitary lobe cells synthesize and release interleukin-6 in vitro: effects of lipopolysaccharide and interleukin-1 beta." *Endocrinology* **135**(2): 556-563.
- Spangelo, B. L., P. C. Isakson, et al.** (1990). "Production of interleukin-6 by anterior pituitary cells is stimulated by increased intracellular adenosine 3',5'-monophosphate and vasoactive intestinal peptide." *Endocrinology* **127**(1): 403-409.

- Spangelo, B. L., R. M. MacLeod, et al.** (1990). "Production of interleukin-6 by anterior pituitary cells in vitro." *Endocrinology* **126**(1): 582-586.
- Starr, M. E., B. M. Evers, et al.** (2009). "Age-associated increase in cytokine production during systemic inflammation: adipose tissue as a major source of IL-6." *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* **64**(7): 723-730.
- Starr, M. E., Y. Hu, et al.** (2013). "Gene expression profile of mouse white adipose tissue during inflammatory stress: age-dependent upregulation of major procoagulant factors." *Aging Cell* **12**(2): 194-206.
- Steiner, A. A., J. C. Hunter, et al.** (2009). "Cyclooxygenase-1 or -2--which one mediates lipopolysaccharide-induced hypothermia?" *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **297**(2): R485-494.
- Stichel, C. C. & H. Luebbert** (2007). "Inflammatory processes in the aging mouse brain: participation of dendritic cells and T-cells." *Neurobiol Aging* **28**(10): 1507-1521.
- Suliman, H. B., M. S. Carraway, et al.** (2003). "Lipopolysaccharide stimulates mitochondrial biogenesis via activation of nuclear respiratory factor-1." *J Biol Chem* **278**(42): 41510-41518.
- Suliman, H. B., K. E. Welty-Wolf, et al.** (2004). "Lipopolysaccharide induces oxidative cardiac mitochondrial damage and biogenesis." *Cardiovasc Res* **64**(2): 279-288.
- Szebeni, J., F. M. Muggia, et al.** (1998). "Complement activation by Cremophor EL as a possible contributor to hypersensitivity to paclitaxel: an in vitro study." *J Natl Cancer Inst* **90**(4): 300-306.
- Tabarelli, Z., D. B. Berlese, et al.** (2003). "Antinociceptive effects of Cremophor EL orally administered to mice." *Braz J Med Biol Res* **36**(1): 119-123.
- Taganov, K. D., M. P. Boldin, et al.** (2006). "NF-kappaB-dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses." *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(33): 12481-12486.
- Tarr, A. J., K. A. McLinden, et al.** (2011). "The effects of age on lipopolysaccharide-induced cognitive deficits and interleukin-1beta expression." *Behav Brain Res* **217**(2): 481-485.
- Tartaglia, L. A., M. Dembski, et al.** (1995). "Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R." *Cell* **83**(7): 1263-1271.
- Tateda, K., T. Matsumoto, et al.** (1996). "Lipopolysaccharide-induced lethality and cytokine production in aged mice." *Infect Immun* **64**(3): 769-774.
- Taubenfeld, S. M., M. H. Milekic, et al.** (2001). "The consolidation of new but not reactivated memory requires hippocampal C/EBPbeta." *Nat Neurosci* **4**(8): 813-818.
- Tewari, A., W. C. Buhles, Jr., et al.** (1990). "Preliminary report: effects of interleukin-1 on platelet counts." *Lancet* **336**(8717): 712-714.
- Tilg, H., E. Trehu, et al.** (1994). "Interleukin-6 (IL-6) as an anti-inflammatory cytokine: induction of circulating IL-1 receptor antagonist and soluble tumor necrosis factor receptor p55." *Blood* **83**(1): 113-118.
- Tili, E., J. J. Michaille, et al.** (2007). "Modulation of miR-155 and miR-125b levels following lipopolysaccharide/TNF-alpha stimulation and their possible roles in regulating the response to endotoxin shock." *J Immunol* **179**(8): 5082-5089.

- Tufekci, K. U., R. Meuwissen, et al.** (2012). "Inflammation in Parkinson's disease." *Adv Protein Chem Struct Biol* **88**: 69-132.
- Turnbull, A. V. & C. L. Rivier** (1999). "Regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis by cytokines: actions and mechanisms of action." *Physiol Rev* **79**(1): 1-71.
- Uematsu, S., M. Matsumoto, et al.** (2002). "Lipopolysaccharide-dependent prostaglandin E(2) production is regulated by the glutathione-dependent prostaglandin E(2) synthase gene induced by the Toll-like receptor 4/MyD88/NF-IL6 pathway." *J Immunol* **168**(11): 5811-5816.
- Ueno, Y., N. Takano, et al.** (1989). "The acute phase nature of interleukin 6: studies in Kawasaki disease and other febrile illnesses." *Clin Exp Immunol* **76**(3): 337-342.
- Uotani, S., C. Bjorbaek, et al.** (1999). "Functional properties of leptin receptor isoforms: internalization and degradation of leptin and ligand-induced receptor downregulation." *Diabetes* **48**(2): 279-286.
- Vaisse, C., J. L. Halaas, et al.** (1996). "Leptin activation of Stat3 in the hypothalamus of wild-type and ob/ob mice but not db/db mice." *Nat Genet* **14**(1): 95-97.
- Vina, J., M. C. Gomez-Cabrera, et al.** (2009). "Mitochondrial biogenesis in exercise and in ageing." *Adv Drug Deliv Rev* **61**(14): 1369-1374.
- Voller, A., A. Bartlett, et al.** (1978). "Enzyme immunoassays with special reference to ELISA techniques." *J Clin Pathol* **31**(6): 507-520.
- Wachulec, M., E. Peloso, et al.** (1997). "Individual differences in response to LPS and psychological stress in aged rats." *Am J Physiol* **272**(4 Pt 2): R1252-1257.
- Wajant, H., K. Pfizenmaier, et al.** (2003). "Tumor necrosis factor signaling." *Cell Death Differ* **10**(1): 45-65.
- Walker, F. O.** (2007). "Huntington's disease." *Lancet* **369**(9557): 218-228.
- Wang, B., I. S. Wood, et al.** (2007). "Dysregulation of the expression and secretion of inflammation-related adipokines by hypoxia in human adipocytes." *Pflugers Arch* **455**(3): 479-492.
- Wang, C. X., X. Ding, et al.** (2009). "Rosiglitazone alone or in combination with tissue plasminogen activator improves ischemic brain injury in an embolic model in rats." *J Cereb Blood Flow Metab* **29**(10): 1683-1694.
- Wang, Q., C. Bing, et al.** (1997). "Interactions between leptin and hypothalamic neuropeptide Y neurons in the control of food intake and energy homeostasis in the rat." *Diabetes* **46**(3): 335-341.
- Watson, G. S., B. A. Cholerton, et al.** (2005). "Preserved cognition in patients with early Alzheimer disease and amnesic mild cognitive impairment during treatment with rosiglitazone: a preliminary study." *Am J Geriatr Psychiatry* **13**(11): 950-958.
- Wei, J., H. Xu, et al.** (1992). "Increase of plasma IL-6 concentration with age in healthy subjects." *Life Sci* **51**(25): 1953-1956.
- Weinstein, M. P., P. B. Iannini, et al.** (1978). "Spontaneous bacterial peritonitis. A review of 28 cases with emphasis on improved survival and factors influencing prognosis." *Am J Med* **64**(4): 592-598.
- Weisberg, S. P., D. McCann, et al.** (2003). "Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue." *J Clin Invest* **112**(12): 1796-1808.

- Wenz, T.** (2011). "Mitochondria and PGC-1alpha in Aging and Age-Associated Diseases." *J Aging Res* **2011**: 810619.
- Wenz, T., F. Diaz, et al.** (2009). "Endurance exercise is protective for mice with mitochondrial myopathy." *J Appl Physiol* **106**(5): 1712-1719.
- Wenz, T., F. Diaz, et al.** (2008). "Activation of the PPAR/PGC-1alpha pathway prevents a bioenergetic deficit and effectively improves a mitochondrial myopathy phenotype." *Cell Metab* **8**(3): 249-256.
- Wenz, T., S. G. Rossi, et al.** (2009). "Increased muscle PGC-1alpha expression protects from sarcopenia and metabolic disease during aging." *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**(48): 20405-20410.
- White, A. T. & A. N. Murphy** (2010). "Administration of thiazolidinediones for neuroprotection in ischemic stroke: a pre-clinical systematic review." *J Neurochem* **115**(4): 845-853.
- Whitnall, M. H., E. Mezey, et al.** (1985). "Co-localization of corticotropin-releasing factor and vasopressin in median eminence neurosecretory vesicles." *Nature* **317**(6034): 248-250.
- WHO** (2013). "Obesity and overweight. Fact sheet number 311."
- Wick, G., P. Jansen-Durr, et al.** (2000). "Diseases of aging." *Vaccine* **18**(16): 1567-1583.
- Wilsey, J. & P. J. Scarpace** (2004). "Caloric restriction reverses the deficits in leptin receptor protein and leptin signaling capacity associated with diet-induced obesity: role of leptin in the regulation of hypothalamic long-form leptin receptor expression." *J Endocrinol* **181**(2): 297-306.
- Wilsey, J., S. Zolotukhin, et al.** (2003). "Central leptin gene therapy fails to overcome leptin resistance associated with diet-induced obesity." *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **285**(5): R1011-1020.
- Wilson, J. A. & J. J. Clark** (2004). "Obesity: impediment to postsurgical wound healing." *Adv Skin Wound Care* **17**(8): 426-435.
- Wolffenbuttel, B. H., J. P. Sels, et al.** (2001). "Rosiglitazone." *Expert Opin Pharmacother* **2**(3): 467-478.
- Wolvers, D. A., C. Marquette, et al.** (1993). "Tumor necrosis factor-alpha: specific binding sites in rodent brain and pituitary gland." *Eur Cytokine Netw* **4**(5): 377-381.
- Wong, A. M., N. V. Patel, et al.** (2005). "Macrosialin increases during normal brain aging are attenuated by caloric restriction." *Neurosci Lett* **390**(2): 76-80.
- Wu, D., Z. Ren, et al.** (2007). "Aging up-regulates expression of inflammatory mediators in mouse adipose tissue." *J Immunol* **179**(7): 4829-4839.
- Wu, Z., P. Puigserver, et al.** (1999). "Mechanisms controlling mitochondrial biogenesis and respiration through the thermogenic coactivator PGC-1." *Cell* **98**(1): 115-124.
- Wuchert, F., D. Ott, et al.** (2008). "Rat area postrema microglial cells act as sensors for the toll-like receptor-4 agonist lipopolysaccharide." *J Neuroimmunol* **204**(1-2): 66-74.
- Xu, H., G. T. Barnes, et al.** (2003). "Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance." *J Clin Invest* **112**(12): 1821-1830.

- Xu, J. & P. D. Drew** (2007). "Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonists suppress the production of IL-12 family cytokines by activated glia." *J Immunol* **178**(3): 1904-1913.
- Yamagata, K., K. Matsumura, et al.** (2001). "Coexpression of microsomal-type prostaglandin E synthase with cyclooxygenase-2 in brain endothelial cells of rats during endotoxin-induced fever." *J Neurosci* **21**(8): 2669-2677.
- Ye, J., Z. Gao, et al.** (2007). "Hypoxia is a potential risk factor for chronic inflammation and adiponectin reduction in adipose tissue of ob/ob and dietary obese mice." *Am J Physiol Endocrinol Metab* **293**(4): E1118-1128.
- Ye, S. M. & R. W. Johnson** (1999). "Increased interleukin-6 expression by microglia from brain of aged mice." *J Neuroimmunol* **93**(1-2): 139-148.
- Zarkesh-Esfahani, H., G. Pockley, et al.** (2001). "High-dose leptin activates human leukocytes via receptor expression on monocytes." *J Immunol* **167**(8): 4593-4599.
- Zethof, T. J., J. A. Van der Heyden, et al.** (1995). "Stress-induced hyperthermia as a putative anxiety model." *Eur J Pharmacol* **294**(1): 125-135.
- Zhang, Y., R. Proenca, et al.** (1994). "Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue." *Nature* **372**(6505): 425-432.
- Zhang, Y. H., J. Lu, et al.** (2003). "Specific roles of cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 in lipopolysaccharide-induced fever and Fos expression in rat brain." *J Comp Neurol* **463**(1): 3-12.
- Zhao, Y., R. Sun, et al.** (2003). "Expression of leptin receptors and response to leptin stimulation of human natural killer cell lines." *Biochem Biophys Res Commun* **300**(2): 247-252.
- Zieleniak, A., M. Wojcik, et al.** (2008). "Structure and physiological functions of the human peroxisome proliferator-activated receptor gamma." *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* **56**(5): 331-345.
- Zietz, B., S. Hrach, et al.** (2001). "Differential age-related changes of hypothalamus - pituitary - adrenal axis hormones in healthy women and men - role of interleukin 6." *Exp Clin Endocrinol Diabetes* **109**(2): 93-101.
- Ziotopoulou, M., C. S. Mantzoros, et al.** (2000). "Differential expression of hypothalamic neuropeptides in the early phase of diet-induced obesity in mice." *Am J Physiol Endocrinol Metab* **279**(4): E838-845.

## **VIII. Anhang**

### **1. Publikationen**

#### **1.1 Originalarbeiten in Fachzeitschriften**

Koenig S, Luheshi GN, Wenz T, Gerstberger R, Roth J, Rummel C. (2014) Leptin is involved in age-dependent changes in response to systemic inflammation in the rat. *Brain Behav Immun*, 36: 128-38

#### **1.1 Zitierbare Kurzmitteilungen**

Koenig S., Wenz T., Luheshi GN., Gerstberger R., Roth J. and Rummel C. (2012) Age dependant effects of the PPAR- $\gamma$  agonist rosiglitazone on the brain and periphery during systemic LPS-induced inflammation in rats. *Brain Behav Immun* 25, (Suppl. 1): s16.

Koenig S., Luheshi GN., Wenz T., Gerstberger R., Roth J. and Rummel C. (2013) The impact of obesity and leptin on age-dependent changes of systemic inflammation in the rat. *Brain Behav Immun* 32 (Suppl.): s15

## 2. Danksagung

In erster Linie möchte ich mich ganz herzlich bei Herrn PD Dr. Christoph Rummel für die außergewöhnlich engagierte und hervorragende Betreuung bedanken. Die stets konstruktive und motivierende Zusammenarbeit und jederzeit vorhandene Unterstützung hat nicht nur zum Gelingen dieser Doktorarbeit beigetragen, sondern mir vor allem auch die Freude und das Interesse am wissenschaftlichen Arbeiten nahe gebracht.

Herrn Prof. Dr. Rüdiger Gerstberger danke ich für die Möglichkeit, die Dissertation im Institut für Veterinär-Physiologie und –Biochemie anfertigen zu können, für seine Hilfsbereitschaft und Unterstützung.

Herrn Prof. Dr. Joachim Roth möchte ich ganz herzlich für die stets hilfsbereite und aufmunternde Atmosphäre und Beratung danken, die es mir auch in schwierigeren Phasen ermöglicht hat, stets den Spaß an der Arbeit wiederzufinden.

Ein sehr großer Dank geht an Daniela Ott, Doreen Marks und Jolanta Murgott, die mich sehr geduldig und kompetent in verschiedene Labormethoden eingearbeitet haben und mir durch ihre unkomplizierte und stetige Hilfsbereitschaft das Arbeiten sehr erleichtert haben. Daneben haben Sie auch sehr dazu beigetragen, dass ich mich im Institut für Physiologie so überaus wohl gefühlt habe.

Ich möchte mich bei allen anderen Doktoranden und Mitarbeitern des Instituts für das wunderbare und unvergleichliche Arbeitsklima bedanken, welches dieses Institut und die dort verbrachte Doktorandenzeit in meinen Augen zu etwas ganz Besonderen macht.

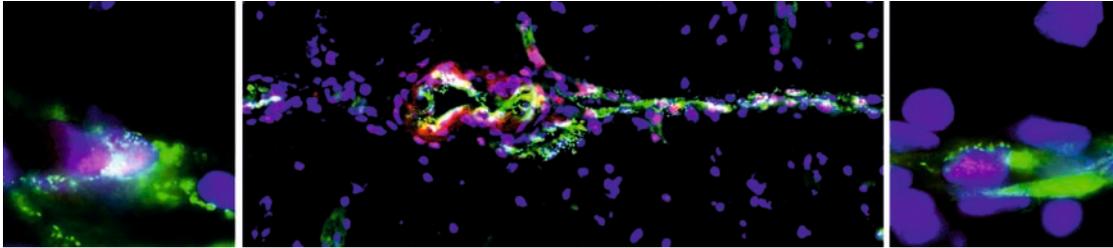
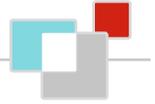
Ein sehr großes Dankeschön geht an meine Familie, die mich stets meinen Weg haben wählen lassen und mich dabei unterstützt haben.

Ein ganz besonderer Dank geht an meinen Freund Pavel, der mich immer noch in allen Lebenslagen unterstützt, vor allem in den schwierigeren Zeiten, wenn es wirklich darauf ankommt.

### **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 mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.“

Sandy Koenig



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

VVB LAUFERSWEILER VERLAG  
STAUFENBERGRING 15  
D-35396 GIESSEN

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

ISBN: 978-3-8359-6320-7



9 783835 1963207