

# INHALT

<b>I. EINLEITUNG.....</b>	<b>16</b>
<b>1. Zentralnervös kontrollierte Krankheitssymptome.....</b>	<b>16</b>
1.1. Charakterisierung und Bedeutung der Symptome.....	16
1.2. Kommunikation zwischen Peripherie und ZNS.....	17
<b>2. Stationen und Signalkaskaden des humoralen Weges.....</b>	<b>19</b>
2.1. Potentielle Mediatoren in der Peripherie.....	19
2.2. Humorale Signalweiterleitung ins Gehirn.....	21
2.2.1. Circumventrikuläre Organe (CVO).....	21
2.2.2. Interaktionen mit Endothel-, perivaskulären und Mikrogliazellen.....	24
2.3. Ziele von Kommunikationswegen im Gehirn – wichtige Instanzen der zentralnervösen Kontrolle.....	24
2.4. Potentielle Mediatoren und Expression von Zielgenen im Gehirn.....	26
2.4.1. LPS als Mediator.....	26
2.4.2. IL-1 $\beta$ als Mediator.....	27
2.4.3. TNF $\alpha$ als Mediator.....	27
2.4.4. IL-6 als Mediator.....	27
2.4.5. PGE2 als Mediator.....	28
2.5. Genomische Zellaktivierung.....	30
2.5.1. Entscheidende Transkriptionsfaktoren.....	30
2.5.1.1. NF- $\kappa$ B.....	32
2.5.1.2. STAT3.....	32
2.5.2. Wege der Signalweiterleitung durch potentielle Mediatoren.....	33
2.5.2.1. Signaltransduktion durch IL-1 $\beta$ .....	33
2.5.2.2. Signaltransduktion durch LPS.....	33
2.5.2.3. Signaltransduktion durch TNF $\alpha$ .....	35
2.5.2.4. Signaltransduktion durch IL-6.....	36
<b>3. Der Transkriptionsfaktor NF-IL6.....</b>	<b>39</b>
3.1. Charakterisierung von NF-IL6.....	39
3.1.1. Struktur.....	39
3.1.2. Funktionsweise.....	40
3.2. Aktivierung, Signaltransduktion und Regulation.....	41
3.2.1. Aktivatoren von NF-IL6.....	41
3.2.1.1. Inflammatorische Stimuli.....	41
3.2.1.2. andere Stimuli.....	41
3.2.2. Signaltransduktion der NF-IL6-Aktivierung.....	41
3.2.2.1. Die JAK/MAP-Kinase-Kaskade.....	42
3.2.2.2. Der p90 RSK-Weg.....	42
3.2.2.3. Über PKA, PKC und PKG vermittelte Wege.....	42
3.2.3. Regulation durch Protein-Protein-Interaktionen.....	43
3.2.4. Negative Regulation.....	43
3.2.4.1. Negative Regulation mit Trib1.....	43
3.2.4.2. Negative Regulation mit LIP.....	43

3.3. Bedeutung, Funktionen und Zielgene von NF-IL6.....	44
3.3.1. Bedeutung für die Zelldifferenzierung und -proliferation.....	44
3.3.2. Bedeutungen im Gehirn.....	45
3.3.3. Bedeutung für Inflammationen.....	45
3.3.3.1. Regulation von Zytokinen.....	46
3.3.3.2. Regulation anderer inflammatorischer Mediatoren.....	46
<b>4. Zielsetzung der Arbeit .....</b>	<b>48</b>
4.1. Charakterisierung der NF-IL6 Aktivität im Verlauf zentralnervös kontrollierter Krankheitssymptome.....	48
4.2. Bedeutung JAK2-vermittelter Signalwege .....	49
4.3. Spezifische Bedeutung von NF-IL6 und NF-IL6-Synthese.....	50
<b>5. Studienaufbau.....</b>	<b>51</b>
5.1. LPS-induzierte Entzündungsreaktionen.....	51
5.2. Einflüsse des JAK-Inhibitors AG490 auf LPS-induzierte Entzündungsreaktionen.....	51
5.3. Einflüsse gegen NF-IL6 gerichteter siRNA auf LPS-induzierte Entzündungsreaktionen.....	53
<b>II. MATERIAL UND METHODEN.....</b>	<b>57</b>
<b>II.A. VERSUCHSMODELLE.....</b>	<b>60</b>
<b>1. In vitro Modell.....</b>	<b>60</b>
1.1. Materialien.....	60
1.2. Versuchsaufbau.....	62
1.3. Primäre Zellkultur der Area postrema.....	62
1.4. Transfektion und Stimulation der Zellen.....	63
<b>2. In vivo Modelle.....</b>	<b>64</b>
2.1. Materialien.....	64
2.2. Versuchsaufbau .....	67
2.3. Tiere.....	70
2.4. Operationen .....	70
2.4.1. Intraperitoneale Implantation der Radiotransmitter.....	70
2.4.2. Intracerebroventrikuläre Implantation der Leitkanüle.....	71
2.5. Injektionen.....	74
2.5.1. Intraperitoneale Injektion von Lipopolysaccharid .....	74
2.5.2. Intracerebroventrikuläre Injektionen.....	74
<b>II.B. ERFASSUNG PHYSIOLOGISCHER DATEN.....</b>	<b>76</b>
<b>1. Telemetrie.....</b>	<b>76</b>
1.1. Materialien.....	76
1.2. Versuchsbedingungen.....	76
1.3. Messung von Körpertemperatur und lokomotorischer Aktivität.....	76
1.4. Messung von Futter- und Wasseraufnahme.....	78
1.5. Auswertung und Statistik.....	78

<b>2. Entwicklung der Körpermasse.....</b>	<b>80</b>
2.1. Auswertung und Statistik.....	80
<b>II.C. ERFASSUNG BIOCHEMISCHER PARAMETER.....</b>	<b>81</b>
<b>1. Immunzytochemie / Immunhistochemie.....</b>	<b>81</b>
1.1. Materialien.....	81
1.2. Grundlagen der Methode.....	82
1.3. Antikörper.....	84
1.4. Immunzytochemie.....	86
1.4.1. Versuchsprotokoll.....	86
1.4.2. Auswertung.....	86
1.5. Immunhistochemie.....	87
1.5.1. Perfusion und Organentnahme.....	87
1.5.2. Herstellen von Gehirnschnitten am Kryostat.....	87
1.5.3. Versuchsprotokoll.....	89
1.5.4. Mikroskopie .....	91
1.5.5. Auswertung und Statistik.....	91
<b>2. Zytokin Bioassay.....</b>	<b>96</b>
2.1. Materialien.....	96
2.2. Grundlagen der Methode.....	97
2.3. Probengewinnung.....	97
2.4. IL-6.....	97
2.5. TNF.....	100
2.6. Auswertung und Statistik.....	100
<b>3. Quantitative real-time PCR.....</b>	<b>102</b>
3.1. Materialien.....	102
3.2. Grundlagen der Methode .....	102
3.3. RNA-Extraktion und -Aufbereitung.....	109
3.4. cDNA Synthese - Reverse Transkription.....	112
3.5. Durchführung der quantitativen real-time PCR.....	113
3.6. Auswertung und Statistik.....	113
<b>4. Western Blot.....</b>	<b>114</b>
4.1. Materialien.....	114
4.2. Grundlagen der Methode.....	116
4.3. Proteinextraktion und Aufbereitung.....	117
4.4. Durchführung des Western Blot.....	120
4.5. Detektion, Auswertung und Statistik.....	121
4.6. Gelgegenfärbung.....	121

<b>III. ERGEBNISSE.....</b>	<b>123</b>
<b>III.A. CHARAKTERISIERUNG DER NF-IL6 AKTIVITÄT IM VERLAUF LPS-INDUZIERTER ENTZÜNDUNGSREAKTIONEN.....</b>	<b>123</b>
1. Charakterisierung der Entzündungsreaktionen im zeitlichen Verlauf in Abhängigkeit von der LPS-Dosis.....	123
1.1. Physiologische Parameter.....	123
1.1.1. Körperkerntemperatur.....	123
1.1.2. Lokomotorische Aktivität.....	126
1.1.3. Futter- und Wasseraufnahme.....	127
1.1.4. Körpermasse.....	129
1.2. Konzentration bioaktiver pro-inflammatorischer Zytokine im Blutplasma.....	130
1.2.1. IL-6 .....	130
1.2.2. TNF.....	131
2. Zeitliche und räumliche Charakterisierung der NF-IL6-I.R im Gehirn .....	134
2.1. Verteilung der Signale im gesamten Gehirn.....	134
2.2. Zeitlicher Verlauf in den sCVO nach LPS Applikation.....	136
2.2.1. semiquantitative Bewertung.....	136
2.2.2. Zellzählungen.....	138
2.2.3. Dosisabhängigkeit.....	140
2.2.4. In vitro .....	140
2.3. Charakterisierung immunreaktiver Zelltypen.....	141
2.3.1. Vorkommende Zelltypen.....	144
2.3.2. Quantifizierung reaktiver Zellpopulationen in verschiedenen Hirngebieten.....	144
3. LPS-bedingte Induktion der Genexpression im Gehirn.....	146
3.1. Induktion auf mRNA-Ebene im Hypothalamus.....	146
3.1.1. NF-IL6 und sein negativer Regulator Trib1.....	146
3.1.2. Andere Transkriptionsfaktoren und ihre negativen Regulatoren.....	146
3.1.3. Inflammatorische Mediatoren.....	147
3.1.3.1. Zytokine.....	147
3.1.3.2. Enzyme der Prostaglandinsynthese.....	147
3.2. Induktion auf Proteinebene in Hypothalamus, cerebralem Cortex und Stammhirn.....	150
3.2.1. Expression verschiedener NF-IL6 Isoformen im Gehirn.....	150
3.2.2. Expression des inflammatorischen Markers COX2 .....	151
<b>III.B. EINFLÜSSE DES JAK-INHIBITORS AG490 AUF LPS-INDUZIERT ENTZÜNDUNGSREAKTIONEN.....</b>	<b>153</b>
1. Beeinflussung der Entzündungsreaktionen durch zentrale Injektion von AG490.....	153
1.1. Physiologische Parameter.....	153
1.1.1. Körperkerntemperatur.....	153
1.1.2. Fieberindex.....	157
1.1.3. Lokomotorische Aktivität.....	158
1.1.4. Futter- und Wasseraufnahme.....	160
1.1.5. Körpermasse.....	162

1.2. Konzentration bioaktiver pro-inflammatorischer Zytokine im Blutplasma.....	164
1.2.1. IL-6.....	164
1.2.2. TNF $\alpha$ .....	164
<b>2. Einfluss von AG490 auf die Immunreaktivität inflammatorischer Transkriptionsfaktoren im OVLT und SFO.....</b>	<b>167</b>
2.1. NF-IL6 und phospho-NF-IL6.....	167
2.2. STAT3 und phospho-STAT3.....	170
2.3. NF- $\kappa$ B.....	170
2.4. Einflüsse der i.c.v. Injektionen.....	172
<b>3. Beeinflussung der LPS-bedingten Induktion der Genexpression im Gehirn durch AG490.....</b>	<b>174</b>
3.1. Induktion auf mRNA-Ebene im Hypothalamus.....	174
3.1.1. Transkriptionsfaktoren und ihre negativen Regulatoren.....	174
3.1.2. Inflammatorische Mediatoren.....	174
3.1.2.1. Zytokine.....	174
3.1.2.2. Enzyme der Prostaglandinsynthese.....	176
3.2. Induktion von COX2 auf Proteinebene.....	177
<b>III.C. EINFLÜSSE VON ANTI-NF-IL6-SIRNA AUF LPS-INDUZIERT E ENTZÜNDUNGSREAKTIONEN.....</b>	<b>179</b>
<b>1. Charakterisierung verschiedener siRNA Sequenzen in primären neuroglialen Kulturen der AP.....</b>	<b>179</b>
1.1. Auswirkungen verschiedener siRNA Sequenzen auf die LPS-induzierte NF-IL6-I.R. in vitro.....	179
1.2. Auswirkungen auf die NF-IL6-I.R. in verschiedenen Zelltypen.....	180
1.3. Auswirkungen verschiedener Sequenzen auf die Konzentration bioaktiver Zytokine im Kulturmedium.....	182
<b>2. Beeinflussung der Entzündungsreaktionen durch zentrale Injektion von anti-NF-IL6-siRNA.....</b>	<b>185</b>
2.1. Distribution von siRNA im Gehirn nach der i.c.v. Injektion.....	185
2.2. Physiologische Parameter.....	188
2.2.1. Körperkerntemperatur.....	188
2.2.2. Fieberindex.....	192
2.2.3. Lokomotorische Aktivität.....	193
2.2.4. Futter- und Wasseraufnahme.....	194
2.2.5. Körpermasse.....	197
2.3. Konzentration bioaktiver pro-inflammatorischer Zytokine im Blutplasma.....	198
2.3.1. IL-6.....	198
2.3.2. TNF.....	199
<b>3. Einfluss der siRNA auf die Expression von NF-IL6 im Hypothalamus.....</b>	<b>201</b>
3.1. Expression von mRNA.....	201
3.2. NF-IL6 Immunreaktivität.....	203

<b>IV. DISKUSSION</b>	<b>207</b>
<b>1. NF-IL6 als später Zellaktivierungsmarker im Zeitverlauf LPS-induzierter systemischer Inflammationen</b>	<b>207</b>
1.1. NF-IL6-Expression im Gehirn und mögliche funktionale Auswirkungen	208
1.1.1. Anatomische Verteilungsmuster	208
1.1.2. Mögliche Relevanz der NF-IL6-I.R. in bestimmten Hirnregionen	208
1.1.3. Phänotypische Zusammensetzung reagierender Zellpopulationen und deren mögliche Rolle für die inflammatorische Reaktion im Gehirn	210
1.1.4. Potentielle Aktivatoren von NF-IL6 im Gehirn	211
1.1.5. Funktionsweise von NF-IL6 – mögliche Wichtung von Regulationsmechanismen seiner Aktivität	212
1.2. NF-IL6-Aktivität und charakteristische Krankheitssymptome bzw. Plasmakonzentrationen bioaktiver Zytokine im Zeitverlauf	213
1.3. Mögliche Bedeutung von NF-IL6 für die Expressionsmuster potentieller Zielgene im Gehirn	215
<b>2. Mögliche Bedeutung von NF-IL6 im Verlauf zentralnervös kontrollierter Krankheitssymptome</b>	<b>219</b>
2.1. NF-IL6 als Aktivierungsmarker im Gehirn nach traumatischen Läsionen	219
2.1.1. Einflüsse der NF-IL6-Aktivität auf die Entstehung von Hirnschädigungen	219
2.1.2. Auswirkungen mechanischer Traumata auf inflammatorische Reaktionen im Gehirn	220
2.1.3. Auswirkungen läsionsbedingter Effekte auf die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit	221
2.1.4. Mögliche Bedeutung JAK2-vermittelter Signalwege für die Entwicklung und Ausprägung charakteristischer Krankheitssymptome	222
2.1.5. Fördernde sowie hemmende Wirkungen von AG490 auf LPS-induzierte Krankheitssymptome	222
2.1.6. Dissoziierende Einflüsse inflammatorischer Mediatoren auf Komponenten des „sickness-behavior“	223
2.1.7. Mögliche Ursachen und Mechanismen veränderter Krankheitssymptome nach Inhibition mit AG490	224
2.1.7.1. Körperkerntemperatur	224
2.1.7.2. Lokomotorische Aktivität	226
2.1.7.3. Anorexie und Adipsie	227
2.2. Auswirkungen auf Expression und Zusammenspiel inflammatorischer Marker im Gehirn	229
2.2.1. Expression von Aktivierungsmarkern im Hypothalamus	231
2.2.1.1. STAT3	231
2.2.1.2. NF-IL6	232
2.2.1.3. NF- $\kappa$ B	236
2.2.2. Expression potentieller Mediatoren im Hypothalamus	238
2.3. Systemische Auswirkungen der Injektion	239
2.4. Zukünftige weiterführende Untersuchungen basierend auf den hier dargestellten Ergebnissen der eigenen Studie	240
2.5. Anwendung des Mechanismus der RNAi	241
2.5.1. Kritische Betrachtung der Ergebnisse nach Verwendung von anti-NF-IL6-siRNA	242
2.5.2. Mögliche Einflüsse von NF-IL6 und der Steigerung seiner Expression auf den Verlauf des Krankheitsgeschehens	244
<b>3. Fazit und Ausblick</b>	<b>246</b>

<b>V. ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>249</b>
<b>VI. SUMMARY.....</b>	<b>252</b>
<b>VII. LITERATUR.....</b>	<b>254</b>
<b>VIII. ANHANG.....</b>	<b>288</b>
<b>1. Publikationen.....</b>	<b>288</b>
1.1. Originalarbeiten in Fachzeitschriften.....	288
1.2. Veröffentlichte Abstracts.....	288
<b>2. Danksagung.....</b>	<b>289</b>
<b>3. Erklärung:.....</b>	<b>290</b>