

Aus dem Institut für Anatomie und Zellbiologie der Philipps-Universität Marburg

Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. E. Weihe

Abteilung für Molekulare Neurowissenschaften

Direktor: Prof. Dr. E. Weihe

**Expression von TNF α und seinen Rezeptoren
p55TNFR und p75TNFR im Gehirn der Maus
nach SEB- und LPS-Stimulation**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades

der gesamten Medizin

dem Fachbereich Humanmedizin
der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Oliver Kaut aus Speyer

Marburg 2005

Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin der Philipps-Universität
Marburg am 09.06.2005.

Gedruckt mit der Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan: Prof. Dr. Bernhard Maisch

Referent: Prof. Dr. E. Weihe

Correferent: Prof. Dr. H. Renz

Inhaltsverzeichnis

0. INHALTSVERZEICHNIS	1
1. ZUSAMMENFASSUNG.....	4
2. FRAGESTELLUNG UND ZIELSETZUNG.....	6
3. EINLEITUNG.....	8
3.1. WEGE DER NEUROIMMUNEN KOMMUNIKATION.....	8
3.1.1. <i>Der humorale Weg.....</i>	9
3.1.1.1. Zytokine via Zirkumventrikuläre Organe (CVOs).....	10
3.1.1.2. Zytokine via aktiven Transport.....	11
3.1.1.3. Zytokinwirkung am zerebralen Gefäßendothel.....	11
3.1.2. <i>Der neurale Weg.....</i>	12
3.1.2.1. Die Rolle des Nervus vagus.....	12
3.1.2.2. Die Rolle des Nervus glossopharyngeus.....	13
3.1.2.3. Die Rolle des Nervus trigeminus.....	13
3.1.2.4. Die Rolle peripherer Nerven.....	14
3.1.3. <i>Neuraler und Humoraler Weg: parallel oder konvergent?.....</i>	14
3.2. DER LIGAND: TNF α	14
3.2.1. <i>Genlocus.....</i>	15
3.2.2. <i>Eigenschaften des Proteins.....</i>	15
3.2.3. <i>Funktionen von TNFα.....</i>	16
3.2.4. <i>Stimuli der TNFα Synthese.....</i>	16
3.2.5. <i>Inhibitoren der TNFα Synthese.....</i>	17
3.2.6. <i>Produktionsort.....</i>	17
3.2.7. <i>TNFα assoziierte Erkrankungen und pharmakologische Strategien.....</i>	17
3.3. DIE REZEPTOREN.....	18
3.3.1. <i>Der Rezeptor p55TNFR (CD120a).....</i>	18
3.3.1.1. <i>Genlocus.....</i>	18
3.3.1.2. <i>Eigenschaften des Proteins.....</i>	18
3.3.1.3. <i>Verteilung der Expression.....</i>	19
3.3.1.4. <i>Funktionen.....</i>	19
3.3.2. <i>Der Rezeptor p75TNFR (CD120b).....</i>	19
3.3.2.1. <i>Genlocus.....</i>	19
3.3.2.2. <i>Eigenschaften des Proteins.....</i>	20
3.3.2.3. <i>Verteilung der Expression.....</i>	20
3.3.2.4. <i>Induktoren der Expression.....</i>	20
3.3.2.5. <i>Funktionen.....</i>	20
3.3.3. <i>Signaltransduktion der TNFα Rezeptoren p55 und p75.....</i>	21
3.4. TNF α EXPRESSIONSMUSTER IM GEHIRN.....	23
3.4.1. <i>TNFα Expressionsmuster im Gehirn unter Kontrollbedingungen.....</i>	23
3.4.2. <i>TNFα Expressionsmuster im Gehirn nach SEB.....</i>	24
3.4.3. <i>TNFα Expressionsmuster im Gehirn nach LPS.....</i>	24
3.5. p55TNF α EXPRESSIONSMUSTER IM GEHIRN.....	24
3.5.1. <i>p55TNFR Expressionsmuster im Gehirn unter Kontrollbedingungen.....</i>	24

3.5.2. <i>p55TNFR Expressionsmuster in Gehirn nach SEB-Gabe</i>	25
3.5.3. <i>p55TNFR Expressionsmuster in Gehirn nach LPS-Gabe</i>	25
3.6. <i>p75TNFα EXPRESSIONSMUSTER IM GEHIRN</i>	26
3.6.1. <i>p75TNFR Expressionsmuster in Gehirn unter Kontrollbedingungen</i>	26
3.6.2. <i>p75TNFR Expressionsmuster in Gehirn nach SEB-Gabe</i>	26
3.6.3. <i>p75TNFR Expressionsmuster in Gehirn nach LPS-Gabe</i>	26
4. MATERIAL UND METHODEN	27
4.1. TIERVERSUCHE.....	27
4.1.1. <i>Immunstimulation</i>	27
4.2. GEWEBEENTNAHME.....	28
4.2.1. <i>Gewebeentnahme für die ISH</i>	28
4.2.2. <i>Gewebeentnahme für die RT-PCR</i>	28
4.3. HERSTELLUNG DER PLASMID-SONDEN.....	28
4.3.1. <i>RNA-Extraktion</i>	28
4.3.2. <i>Photometrische Bestimmung der RNA-Konzentration</i>	30
4.3.3. <i>Reverse Transkription</i>	30
4.3.4. <i>Polymerasekettenreaktion (PCR)</i>	31
4.3.5. <i>Agarosegelelektrophorese</i>	33
4.3.6. <i>Aufreinigung von Nukleinsäuren mittels Gel Extraktionskit</i>	34
4.3.7. <i>Transfektion von cDNA in E.coli Zellen</i>	36
4.3.8. <i>Elektroporation</i>	37
4.3.9. <i>Selektion kompetenter Zellen</i>	38
4.3.10. <i>Inserttest mittels PCR</i>	39
4.3.11. <i>Inserttest mittels Sequenzierung bei Sequelab</i>	39
4.3.12. <i>Herstellung einer „Vorkultur“</i>	39
4.3.13. <i>Anfertigen eines Glycerol-Stocks</i>	40
4.3.14. <i>Plasmidpräparation mit Midiprep</i>	40
4.4. <i>IN-SITU HYBRIDISIERUNG (ISH)</i>	42
4.4.1. <i>Beschichten von Objektträgern mit TESAP</i>	42
4.4.2. <i>Anfertigen von Gewebeschnitten mit dem Gefriermikrotom</i>	42
4.4.3. <i>Herstellung von Ribonukleotidsonden durch in vitro-Transkription</i>	43
4.4.4. <i>Prähybridisierung</i>	46
4.4.5. <i>Hybridisierung (Tag 1)</i>	48
4.4.6. <i>Posthybridisierung (Tag 2)</i>	49
4.4.7. <i>Detektion radioaktiver Signale mit Autoradiogrammen</i>	50
4.4.8. <i>Detektion radioaktiver Signale mit Photoemulsion</i>	51
4.4.9. <i>Histologische Färbemethoden</i>	51
4.4.9.1. <i>Kresylviolett Färbung</i>	51
4.4.9.2. <i>Hämatoxylin/Eosin Färbung</i>	52
4.4.10. <i>Mikroskopische Analyse</i>	52
4.4.11. <i>Quantifizierung der Autoradiogramme mit MCID</i>	52
4.4.12. <i>Statistische Analyse</i>	53
4.5. <i>CONFOKALE LASERSCANNING MIKROSKOPIE</i>	53
4.5.1. <i>Fixierung der Gewebe</i>	53
4.5.2. <i>Einbettung und Schneiden der Gewebe</i>	54
4.5.3. <i>Immunzytochemie</i>	54
4.6. <i>LASER CAPTURE MICRODISSECTION (LCM)</i>	56
4.6.1. <i>Microdissection</i>	57

4.6.2. RNA-Extraktion.....	58
4.6.3. Reverse Transkription (RT).....	59
4.6.4. Polymerase Kettenreaktion (PCR).....	59
5. ERGEBNISSE.....	61
5.1. EXPRESSION VON C-FOS mRNA IM HYPOTHALAMISCHEN NCL. PARAVENTRICULARIS (PVN).....	61
5.2. EXPRESSION VON TNF α , p55TNFR UND p75TNFR mRNA IN KONTROLLTIEREN	
5.2.1. Quantifizierung der ISH-Autoradiografien für p55TNFR.....	66
5.2.2. Nachweis mittels RT-PCR.....	68
5.3. EXPRESSION VON TNF α , p55TNFR UND p75TNFR mRNA NACH APPLIKATION VON STAPHYLOKOKKEN ENTEROTOXIN B (SEB).....	72
5.4. EXPRESSION VON TNF α , p55TNFR UND p75TNFR mRNA NACH APPLIKATION VON LIPOPOLYSACCHARIDE (LPS).....	72
5.5. NACHWEIS VON TNF α , p55TNFR UND p75TNFR mRNA MITTELS LASERCAPTUREMICRODISSECTION (LCM).....	74
5.6. IMMUNZYTOCHEMISCHE DOPPELMARKIERUNG MIT p55TNFR - UND NEU N -ANTIKÖRPERN IM NCL. N. FACIALIS.....	75
6. DISKUSSION.....	79
6.1. EXPRESSION DES TNF α -SYSTEMS IM GEHIRN UNTER KONTROLLBEDINGUNGEN... 79	
6.1.1. Expression von TNF α im Gehirn unter Kontrollbedingungen.....	79
6.1.2. Expression von p55TNFR im Gehirn unter Kontrollbedingungen.....	80
6.1.3. Expression von p75TNFR im Gehirn unter Kontrollbedingungen.....	82
6.2. EXPRESSION DES TNF α -SYSTEMS IM GEHIRN NACH STIMULATION MIT SEB.....	82
6.3. EXPRESSION DES TNF α -SYSTEMS IM GEHIRN NACH STIMULATION MIT LPS.....	82
6.3.1. Expression von TNF α nach LPS.....	83
6.3.2. Expression von p55TNFR nach LPS.....	84
6.3.3. Expression von p75TNFR nach LPS.....	86
6.4. BEDEUTUNG FÜR DAS MODELL DER NEUROIMMUNEN KOMMUNIKATION: ZYTOKIN-ODER MITOGEN-VERMITTELTEN AFFERENTEN SCHENKEL?.....	87
7. LITERATURVERZEICHNIS.....	92
8. ANHANG.....	114
8.1. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	114
8.2. TABELLARISCHER LEBENS LAUF.....	116
8.3. VERZEICHNIS DER AKADEMISCHEN LEHRER.....	118
8.4. PUBLIKATIONEN.....	119
8.5. DANKSAGUNG.....	120

Zusammenfassung

Zwischen Gehirn und peripherem Immunsystem besteht eine bidirektionale Kommunikation, die u.a. durch lösliche Faktoren wie Zytokine mediert wird. Eines der dabei beteiligten Proteine ist der Tumor-Nekrose-Faktor-alpha ($\text{TNF}\alpha$), ein proinflammatorisch und apoptotisch wirkendes Zytokin, das im ZNS von residenten Mikrogliazellen und Astrozyten synthetisiert werden kann. Die Voraussetzung einer Rezeptor-medierten lokalen Wirkung des $\text{TNF}\alpha$ im Gehirn ist durch die nachgewiesene Expression der $\text{TNF}\alpha$ Rezeptoren p55TNFR und p75TNFR erfüllt. Allerdings sind die Zellentypen ebenso wie die Mechanismen, die zur Synthese der $\text{TNF}\alpha$ Rezeptoren führen bislang unklar.

Die vorliegende Arbeit charakterisiert die zelluläre Verteilung von $\text{TNF}\alpha$, p55TNFR und p75TNFR im Gehirn der Maus unter physiologischen Bedingungen und zu verschiedenen Zeitpunkten (1, 4, 8, 12 und 24h) nach intraperitonealer Injektion von Lipopolysaccharid (LPS) oder Staphylokokken Enterotoxin B (SEB). Beide Mitogene erhöhen die Serumspiegel von $\text{TNF}\alpha$. Die unterschiedlichen Aktivierungsmechanismen der beiden Mitogene erlauben aber zu unterscheiden, ob Serum- $\text{TNF}\alpha$ alleine oder nur in Kombination mit der lokalen Wirkung eines der Mitogene direkt im ZNS zu einer Induktion der $\text{TNF}\alpha$ -Rezeptoren im Gehirn führt.

Im unstimulierten Gehirn fand sich eine panneuronale Expression der p55TNFR mRNA, die in einzelnen Hirnnervenkernen besonders stark ausgeprägt war. Kleine, non-neuronale Zellen im gesamten Gehirn exprimierten die p75TNFR mRNA. LPS als auch SEB führten zu einer neuronalen Aktivierung im ZNS, die sich in der Induktion von c-fos mRNA im Nucleus Paraventricularis (PVN) nachweisen ließ. Keines der beiden Mitogene beeinflusste die konstitutive Expression der p55TNFR mRNA. Dagegen führte nur die Gabe von LPS, nicht aber von SEB zu einer Erhöhung der $\text{TNF}\alpha$ mRNA und zu einer Induktion der p75TNFR mRNA im Bereich der Zirkumventrikulären Organe (circumventricular organs, CVOs).

Aus dem Vergleich der zerebralen Reaktionen auf die periphere Gabe von SEB oder LPS lässt sich folgern, dass der afferente Schenkel der neuroimmunen Kommunikation des $\text{TNF}\alpha$ -Systems Mitogen-abhängig ist. Im

1. Zusammenfassung

Serum erhöhte Zytokinspiegel alleine können innerhalb der „immune-to-brain communication“ zwar Einfluss auf die neuronale Aktivität wie im PVN ausüben, sie haben aber keine modulierende Wirkung auf das $\text{TNF}\alpha$ -System im Gehirn.

Kapitel 2

Fragestellung und Zielsetzung

Die Funktion von $\text{TNF}\alpha$ und seinen Rezeptoren p55TNFR und p75TNFR (Ligand und Rezeptoren im Folgenden auch als $\text{TNF}\alpha$ -System bezeichnet) im Gehirn von Säugetieren ist noch weitgehend unklar. Wirkungen wie Neuroprotektion, Neurodegeneration und Neuroimmune Kommunikation werden diskutiert. Hier soll die Funktion des $\text{TNF}\alpha$ -Systems innerhalb der Kommunikation zwischen peripherem Immunsystem und Gehirn ("cytokine-to-brain communication") weiter geklärt werden. Konkret werden dabei folgende Fragestellungen verfolgt:

I. Lokalisation der konstitutiven Expression von $\text{TNF}\alpha$, p55- und p75TNFR mRNA im Hirn der Maus

Werden $\text{TNF}\alpha$, p55- oder p75TNFR mRNA im Hirn konstitutiv expremiert? Falls ja, folgt diese Expression spezifischen Verteilungsmustern hinsichtlich bestimmter Hirnregionen oder Kerngebiete?

II. Lokalisation der regulierten Expression von $\text{TNF}\alpha$, p55- und p75TNFR mRNA nach SEB- und LPS-Stimulation

Verändert sich die Expression des $\text{TNF}\alpha$ -Systems im Hirn nach Stimulation des Immunsystems durch SEB oder LPS? Falls ja, welche Kerngebiete sind dabei beteiligt und in welchem zeitlichen Verlauf zeigen sich Veränderungen?

III. Vergleich der SEB- und LPS-induzierten Expressionsmuster

Die Mitogene SEB und LPS aktivieren unterschiedliche Zelltypen des Immunsystems. SEB gilt als T-Zell abhängiger Stimulus, während LPS ein Makrophagenabhängiges Mitogen darstellt (Fleischer et al., 1989; Alber et al., 1990; Marrack et al., 1990; Rosenstreich et al., 1978).

2. Fragestellung und Zielsetzung

Als Parameter des Vergleiches beider Mitogene werden zeitliche Kinetik und räumliche Verteilung (Kerngebiete, Regionen) der durch sie induzierten Expression von $\text{TNF}\alpha$, p55TNFR und p75TNFR analysiert.

IV. Identifikation der beteiligten Zelltypen

Um welche Zelltypen handelt es sich bei den $\text{TNF}\alpha$, p55TNFR oder p75TNFR exprimierenden Zellen: Neurone, Gliazellen, Endothelzellen oder Immunzellen? Dies soll soweit möglich mittels Doppelmarkierungen und Einzelzell-spezifischer mRNA-Isolation mittels LaserCaptureMicrodissection geklärt werden.

Anhand der Ergebnisse soll diskutiert werden, ob i) durch Mitogene erhöhte Serumzytokinspiegel in der Lage sind, Veränderungen der Expressionsmuster des $\text{TNF}\alpha$ -Systems im Gehirn hervorzurufen, ii) Serumzytokinspiegel nur in Kombination mit einem Mitogen auf das $\text{TNF}\alpha$ -System im Gehirn einwirken können oder ob iii) die Modulation des $\text{TNF}\alpha$ -Systems im Gehirn nur vom Mitogen abhängig moduliert wird, nicht aber durch erhöhte Serumzytokinspiegel.

Kapitel 3

Einleitung

3.1. Wege der neuroimmunen Kommunikation

Das ZNS und das Immunsystem stellen keine isoliert voneinander arbeitenden Kompartemente dar. Vielmehr bestehen zwischen beiden Systemen vielfältige kommunikative und regulierende Interaktionen.

Diese neuroimmunen Interaktionen verlaufen bidirektional: von Immunsystem zum ZNS, wie auch vom ZNS zum Immunsystem. Zytokine und andere Produkte von Immunzellen können die Aktivität, Differenzierung und das Überleben von Nervenzellen modulieren. Immunzellen selbst sind fähig, Hormone und Neuropeptide zu produzieren und so auf Neurone einzuwirken, während andererseits die chemischen Botenstoffe von Nervenzellen, Neurotransmitter wie Katecholamine und Neuropeptide wie Serotonin, sowie Neurotrophine auf Immunzellen wirken können. (Szelenyi, 2001; Serafein et al., 2001).

Die morphologische Basis für die Interaktion von ZNS zum Immunsystem stellt die Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren (HPA)-Achse dar (Besedovsky et al., 1975; 1977; 1981; 1987), sowie die ausgeprägte autonome Innervation lymphatischer Organe (Weihe et al., 1991; 1998; Felten et al., 1984; Fink et al., 1988; Safieh-Garabedian et al., 2002 a, b). Die Informationsübertragung vom Immunsystem zum ZNS wird durch lösliche Faktoren gewährleistet, die auf Neurone im ZNS bzw. periphere Nerven einwirken.

Die Wirkungen des Immunsystem auf das ZNS werden besonders während einer Vielzahl von Entzündungsreaktionen in der Peripherie deutlich. Infektionen mit Viren oder Bakterien führen zu physiologischen Veränderungen des Organismus, die der Abwehr der Pathogene dienen (Hart et al., 1988; Janeway, 2001; 2002). Innerhalb dieser „acute phase response“ kommt es zur Ausschüttung Akuter-Phase Proteine, Aktivierung der HPA-Achse und erhöhter Körpertemperatur sowie zu Verhaltensänderungen, die auch als „Krankheits-

3. Einleitung

verhalten“ (sickness behavior) zusammengefasst werden. Dazu gehören veränderte Schlafarchitektur (vermehrter slow wave sleep), vermehrte Schlafaktivität, Anorexie (Uehara et al., 1989; Dinarello et al., 1990), verminderte Flüssigkeits- und Nahrungsaufnahme (Yirmiya, 1997), verminderter sozialer Aktivität und Hyperalgesie (Hart, 1988; Kent et al., 1992a; Watkins et al., 1995; Turnbull et al., 1999). Proinflammatorischen Zytokinen wird dabei die Funktion zugeschrieben, diese Reaktionen zu mediieren. Dies wurde nachgewiesen, indem man die „acute phase response“ durch die Gabe von neutralisierenden Antikörper gegen spezifische Zytokine, von Rezeptor-antagonisten gegen Zytokin-Rezeptoren oder von Kortikoiden, die die Zytokinausschüttung vermindern, supprimierte oder komplett blockierte (zur Übersicht siehe Watkins et al., 1995). Die experimentelle Applikation von Zytokinen führte zum Auftreten eines typischen Krankheitsverhalten (Rothwell, 1991; Kent et al., 1992b).

Unklar aber ist bis heute wie die Information einer in der Peripherie ablaufenden Infektion in das ZNS gelangt? Zwei Wege sind denkbar:

- I. Humoral, mittels löslicher Mediatoren, wie z.B. Zytokine „cytokine-to-brain communication“ (Watkins et al., 1995), Chemokine (Goehler et al., 2000) oder Fragmente von Complementfaktoren wie C3a und C5a (Blatteis et al., 1997).
- II. Neuronal, mittels Aktionspotentialen peripher verlaufender Nerven oder im ZNS gelegener Neurone.

3.1.1. Der humorale Weg

Bei Infektionen werden während der initialen Immunantwort eine Vielzahl von Zytokinen produziert und ins Blut abgegeben. Über den Blutkreislauf gelangen die so systemisch wirkenden Zytokine als humorale Stoffe auch zum Gehirn. Diese Zytokine sind jedoch relativ große, hydrophile Moleküle (Banks et al., 1989), so dass eine passive Diffusion durch die Blut-Hirn-Schranke (blood brain barrier, BBB) aus physikalisch-chemischen Gründen unmöglich ist. (Levin, 1980; Davson et al., 1987; Banks et al., 1987). Wie können Zytokine trotzdem als Mediatoren die BBB überwinden und lokal im ZNS wirken? Hier bietet sich ein aktiver Transport durch das Endothel im Gehirn an oder Regionen im ZNS,

3. Einleitung

in denen keine BBB vorhanden ist. Alternativ wäre auch eine Wirkung der Zytokine an dem Endothel der BBB denkbar, die zur Freisetzung von spezifischen Faktoren auf der dem Hirnparenchym zugewandten Seite führt. Zudem kann die Permeabilität der BBB unter Entzündungsbedingungen eingeschränkt sein (zur Übersicht Lossinsky et al., 2004).

3.1.1.1. Zytokine via Zirkumventrikuläre Organe (CVOs)

Die Zirkumventrikulären Organe (CVOs) sind Regionen im ZNS, die sich durch das Fehlen der Bluthirnschranke, starke Vaskularisierung und ein fenestriertes Endothel auszeichnen, so dass in diesen Regionen lösliche Zytokine passiv in das Gehirn gelangen können (Stitt, 1990; Katsuura et al., 1990; Buller, 2001). Eine weitere Diffusion von dort in das Hirnparenchym ist jedoch durch Tight junctions limitiert, die die CVOs von umgebenden Hirngewebe trennen (Weindel, 1973). Deshalb müssen sie in den CVOs direkt auf Neurone mit Projektionsgebieten in andere Hirnareale wirken (Blatteis, 1992) oder es muß zur Synthese von lipophilen Mediatoren, wie z.B. Prostaglandinen (PG) kommen, die dann in das Hirnparenchym eindringen können (Dantzer et al., 2000).

Für das Organum vasculosum laminae terminalis (OVLT) konnte nachgewiesen werden, dass Zytokine an astrozytäre Zytokinrezeptoren im OVLT binden, wodurch dann die Produktion und Freisetzung von Prostaglandin E₂ (PGE₂) getriggert wird. (Katsuura et al., 1989). PGs, die als kleine und lipophile Substanzen die Tight junctions gut penetrieren können, dringen in umliegende Hirnareale vor (Dascombe, 1979). Dort können sie noradrenerge Neurone der nahe gelegenen Medianen präoptischen Area (MPOA) aktivieren, die zum Paraventriculären Nucleus (PVN) des Hypothalamus oder in andere Regionen projizieren (Katsuura et al., 1990; Komaki et al., 1992).

Alternativ könnten auch Neurone im OVLT durch Zytokine erregt werden, die in andere Hirnregionen projizieren, wie z.B. das MPOA (Stitt, 1985; Shibata, 1991). Die Rolle der Zytokin-induzierten PG-Synthese wurde durch Experimente mit Mikroinjektion von Indomethacin in das OVLT/MPOA bestätigt, bei denen die Erhöhung des Adrenokortikotropen Hormons (ACTH) nach Gabe von rekombinantem IL-1 ausblieb (Katsuura et al., 1990). Dabei ist jedoch

3. Einleitung

kritisch anzumerken, dass viele andere Hormone und Transmitter, die innerhalb dieser Experimentalbedingungen hochreguliert waren, die PG-Synthese ebenfalls triggern können (Malmberg et al., 1992; Malmberg et al., 1994), so dass die ACTH-Erhöhung nicht zwingend notwendig direkt der Zytokinwirkung zugeschrieben werden muss, wohl aber IL-1-abhängig induziert wurde.

3.1.1.2. Zytokine via aktiven Transport

Ein aktiver, sättigbarer Carrier-mediierter Transport durch die Blut-Hirn-Schranke konnte für IL-1 α , IL-1 β , IL-6 und TNF α nachgewiesen werden (Banks et al., 1989; Banks et al., 1991a; 1991b; 1992; 1994; Gutierrez et al., 1993). Die so ins ZNS gelangten Zytokine können dann an intrazerebral lokalisierte Zytokinrezeptoren binden (Maier et al., 2003). Die Menge der über diesen Mechanismus transportierten Zytokine ist jedoch sehr gering. Nur 0,05% des i.v.-applizierten TNF α erlangen Zugang in das ZNS (Gutierrez et al., 1993), so dass sich die Frage stellt, ob Zytokinkonzentrationen dieser Größenordnung überhaupt physiologisch relevant sein können.

Interessant ist der Vergleich der Wirksamkeit von i.v.- und i.c.v.-injiziertem IL-1 β . So können beide Applikationsarten experimentell Fieber induzieren, bei der i.c.v. Dosis reicht allerdings schon ein 3000-stel der i.v. benötigten Dosis aus, um den gleichen Effekt zu erreichen (Hashimoto et al., 1991). Anscheinend sind schon kleinste Mengen von Zytokinen wirksam, sobald sie innerhalb des ZNS vorliegen.

3.1.1.3. Zytokinwirkung am zerebralen Gefäßendothel

Endothelial-expremierte IL-1 Rezeptoren können IL-1 binden, intrazellulär aufnehmen (Banks et al., 1991a; Hashimoto et al., 1991; Banks et al., 1993; Van Dam et al., 1996) und die PG-Synthese in Endothelzellen oder in perivaskulären Zellen (Ericsson et al., 1997) induzieren. So konnte z.B. Prostaglandin E₂ nach Endotoxingabe an zerebralen Gefäßen nachgewiesen werden (Van Dam et al., 1993). Die neu synthetisierten Prostaglandine werden auf der dem Hirn zugewandten Seite der BBB abgegeben und können dann durch das Hirnparenchym diffundieren (Kluger, 1991).

Schwachpunkt dieser Hypothese ist, dass das zerebrale Endothel Zytokinrezeptoren abundant expremiert, während hingegen nur eine begrenzte

3. Einleitung

Anzahl spezifischer Hirnareale durch intraperitoneal oder intravenös appliziertes IL-1 aktiviert wird (Watkins et al., 1995).

3.1.2. Der neurale Weg

Die Hypothese der neuralen Vermittlung zum ZNS geht davon aus, dass Entladungen von Hirn- oder peripheren Nerven für die Induktion der Zytokinexpression im Gehirn und/oder der Aktivierung der HPA-Achse verantwortlich sind.

3.1.2.1. Die Rolle des Nervus vagus

Der N. vagus ist durch seine Innervation innerer Organe wie z.B. dem Gastrointestinaltrakt und der Lunge als immunsensorische Struktur ideal positioniert, um in den Organismus eindringende Pathogene wahrnehmen zu können (Goehler et al., 2000). Um seine Rolle innerhalb der „immune-to-brain communication“ zu klären, wurden Versuchstiere subdiaphragmatisch vagotomiert und daraufhin untersucht, ob LPS- oder IL-1-induzierte Reaktionen im Organismus dadurch verändert wurden. So war bei vagotomierten Tieren die Fieberentwicklung nach LPS-Applikation attenuiert bzw. blockiert (Romanovsky et al., 1997; Sehic et al., 1996; Goldbach et al., 1997; Kapas et al., 1998; Opp et al., 1998), die LPS- und IL-1 β -induzierte Aktivierung der HPA-Achse gemessen anhand der Erhöhung des ACTH-Serumspiegels war abgeschwächt (Gaykema et al., 1995; Kapcala et al., 1996). Die durch peripher appliziertes LPS induzierte Hyperalgesie war inhibiert (Watkins et al., 1994), die IL-1 β Synthese nach LPS- oder IL-1 β Gabe blockiert (Laye et al., 1995; Hansen et al., 1998) und die durch LPS vermittelte Induktion von c-fos im Gehirn reduziert (Wan et al., 1993). Dies spricht insgesamt für die Funktion des N. vagus als Vermittler von Informationen aus der Peripherie in das ZNS.

Neuere Studien zeigten jedoch genau das Gegenteil: Vagotomie blockierte nicht die LPS-induzierte IL-1 β Immunreaktivität (Van Dam et al., 2000), LPS-induziertes Fieber (Caldwell et al., 1999, Hansen et al., 2000a), LPS-induzierte Corticosteroiderhöhung (Hansen et al., 2000b), LPS- und IL-1 β -induzierte c-fos Expression im Hirn (Ericsson et al., 1997; Hermann et al., 2001). Diese

3. Einleitung

Ergebnisse sprechen gegen die vermutete Funktion des N. vagus als Vermittler von Peripherie und ZNS.

Aufgrund dieser widersprüchlichen Daten zur Rolle des N. vagus war es von entscheidender Bedeutung die Existenz von Zytokinrezeptoren bei Vagusneuronen, insbesondere der IL-1 Rezeptoren zu zeigen. Für IL-1 Rezeptoren konnte dies mittels mRNA-Nachweis nachgewiesen werden (Ek et al., 1998). Zudem exprimieren abdominale Paraganglien, die mit subdiaphragmatischen Vagusfasern bis in den Leberhilus verbunden sind, IL-1 Rezeptoren (Goehler et al., 1997). Mit dieser anatomischen Topografie können Zytokine im Abdomen, im Blut und im hepatischen perivaskulären Raum detektiert werden. Auch elektrophysiologische Untersuchungen erhärten diese Hypothese, denn nach Injektion von IL-1 β in die V. portae hepatis verstärkt sich die elektrische Aktivität des N. vagus (Niiijima, 1996).

3.1.2.2. Die Rolle des Nervus glossopharyngeus

Die afferenten Fasern des N. glossopharyngeus dienen der Vermittlung von Informationen zum ZNS über Infektionsgeschehen, die sich im Bereich des hinteren Mundraumes / Palatum molle manifestieren. Gezeigt wurde dies in Experimenten, bei denen nach Durchtrennung beider Nn. glossopharyngei die Fieberreaktion nach LPS-Gabe ausblieb (Romeo et al., 2001; Romeo et al., 2003).

3.1.2.3. Die Rolle des Nervus trigeminus

Sensible Neurone im Ggl. trigeminale reagieren auf LPS i.p. oder IL-1 β i.p. mit einer Induktion der Signaltransduktoren und Aktivatoren der Transkription STAT1 und STAT3 (Kobierski et al., 2000). Inwieweit diese Induktion für eine neuroimmune Informationsvermittlung zum Gehirn relevant ist, ist noch nicht geklärt. Eine Beteiligung des Ggl. trigeminale innerhalb der „immune-to-brain communication“ kann nur als gesichert anerkannt werden, wenn eine Folgereaktion im Gehirn ursächlich auf Vorgänge im Trigeminusganglion zurückzuführen ist.

3. Einleitung

3.1.2.4. Die Rolle peripherer Nerven

Auch periphere Nerven scheinen an der "immune-to-brain communication" beteiligt zu sein. So führte subkutan appliziertes IL-1 β , IL-6 oder TNF α zu Hyperalgesie (Fukuoka et al., 1994; Cunha et al., 1992; Ferreira et al., 1988). Die normalerweise nach subkutan appliziertem LPS auftretende Fieberreaktion wurde durch lokale Anästhesie der Hautnerven im Bereich der Einstichstelle deutlich abgeschwächt (Ross et al., 2000). Unklar ist jedoch, inwieweit dafür wirklich periphere Nerven verantwortlich sind.

3.1.3. Neuraler und Humoraler Weg: parallel oder konvergent?

Wie gezeigt, gibt es Hinweise für die Existenz sowohl des humoralen als auch des neuralen Weges. Existieren beide nun parallel oder arbeiten sie konvergent? Dantzer propagiert die Konvergenztherorie, nach der periphere Zytokine über den humoralen Weg in das Gehirn gelangen, wo sie sich durch Diffusion im extrazellulären Raum ausbreiten. Während zeitgleich über den neuralen Weg Neurone in bestimmten zerebralen Zielarealen für diffundierenden Zytokine sensitiviert werden, und so nur spezifische Hirnareale für Zytokine ansprechbar sind (Dantzer et al., 2000).

3.2. Der Ligand: TNF α

Als Synonyme sind für TNF α Cachectin, CF (cytotoxic factor), CTX (cytotoxin), DIF (differentiation inducing factor), EP (endogenous pyrogen), hemorrhagic factor, macrophage derived cytotoxic factor, J774-derived cytotoxic factor, MCF (macrophage cytotoxic factor), MCT (macrophage cytotoxin) und PCF (peritoneal cytotoxic factor) bekannt.

Tumor-Nekrose-Faktor-alpha (TNF α) ist ein para-, auto- und endokrin wirkendes proinflammatorisches Zytokin, das zur „Tumor-necrosis-factor ligand superfamily“ gezählt wird (Kwon et al., 1999). Neben einer Vielzahl von Effekten wirkt es als Entzündungsmediator und dient der Regulation von Immunfunktionen und der Induktion von Apoptose.

3. Einleitung

Schon Ende des 19. Jahrhunderts gab es Hinweise, dass bei Patienten mit Malignomen eine Verkleinerung des Tumors auftrat, wenn zeitgleich eine bakterielle Entzündung vorlag (Coley, 1893).

1975 entdeckte Carswell im Serum von Bacillus Calmette-Guerin (BCG) und Endotoxin-behandelten Mäusen eine Substanz, die bei Tumoren zur Nekrose führte und so dem Protein zu seinem Namen verhalf (Carswell et al., 1975). Kurze Zeit später wurde aus Blut ein Protein isoliert, das im Tierversuch zur Kachexie führte und deshalb Cachectin genannt wurde (Beutler et al., 1985a). Erst nach molekulargenetischer Charakterisierung von Cachectin und $\text{TNF}\alpha$ erkannte man, dass es sich bei beiden um dasselbe Protein handelte (Beutler et al., 1986b).

TNF-Superfamilie		TNFR-Superfamilie
$\text{TNF}\alpha$	tumor-necrosis-factor-alpha	p55TNFR und p75TNFR
$\text{TNF}\beta$	tumor-necrosis-factor-beta	p55TNFR und p75TNFR
NGF	nerve growth factor	NGF receptor
Fas ligand		Fas receptor

Tabelle 1. Auswahl einiger Vertreter der TNF- und TNFR-Superfamilie. Ligand und Rezeptor/en sind jeweils gegenüber gestellt. (Locksley et al., 2001, Idriss et al., 2000)

3.2.1. Genlocus

$\text{TNF}\alpha$ ist bei der Maus auf Chromosom 17 (Nedospasov et al., 1986; Semon et al., 1987) zwischen dem Genlocus von Komplement und MHC I (Abbas et al., 1994; Müller et al., 1987) lokalisiert. Die Gensequenz ist ca. 3 kb lang, mit 4 Exons, die von 3 Introns unterbrochen sind (Shakow et al., 1990). Die mRNA ist ca. 1,7 kb lang (Spriggs et al., 1992). Es werden fast keine posttranslationalen Modifikationen beobachtet (Idriss et al., 2000).

3.2.2. Eigenschaften des Proteins

Zuerst liegt murines $\text{TNF}\alpha$ als 26 kDa transmembranöse Form vor (Liu et al., 1989; Kriegler et al., 1988), die dann proteolytisch zur 17 kDa-Form prozessiert wird (Jue et al., 1990; Niehorster et al., 1990). Drei dieser 17 kDa Peptide aus je 156 Aminosäuren bestehend (Pennica et al., 1985) bilden ein

3. Einleitung

Homotrimer, das die aktive Form des $\text{TNF}\alpha$ bildet (Smith et al., 1987; Wingfield et al., 1987) bei einem relativen Molekulargewicht (M_R) von 45-55 kDa (Aggarwal et al., 1985). Es kann in einer sekretorischen und einer membranständigen Form vorliegen (Perez et al., 1990).

Die Aminosäuresequenzen von Maus, Ratte, Kaninchen, Katze, Schaf, Schwein und Mensch sind zu 70-90% identisch (Farrah et al., 1992). Im Serum liegt die Halbwertszeit bei 6-20 min (Beutler et al., 1985c; Tracey et al., 1994).

3.2.3. Funktionen von $\text{TNF}\alpha$

Zusammengefasst kann $\text{TNF}\alpha$ zytotoxisch, inflammatorisch und hämatopoetisch wirken, sowie antiviral durch Inhibition viraler Replikation (Wong et al., 1986).

Es führt zur Induktion von Adhäsionsmolekülen an Endothelzellen, Differenzierung von Myeloiden Zellen, Induktion weiterer Zytokine wie IL-1, IL-6, CSF und $\text{TNF}\alpha$ selbst (Aggarwal et al., 1992), sowie zur Infiltration von Leukozyten in das Gehirn (Ching et al., 2005) und zur Proliferation von Oligodendrozyten-Progenitorzellen und Remyelinisierung (Arnett et al., 2001). Desweiteren führt $\text{TNF}\alpha$ zur Synthese von Prostaglandinen (Dayer et al., 1985), zur Aktivierung neutrophiler (Shalaby et al., 1985) und eosinophiler Granulozyten (Silberstein et al., 1986), einer Endotoxämie mit Fieber, metabolischer Azidose, Diarrhoe, DIC (dissiminierte intravasale Koagulation), Hypotension (Beutler et al., 1986a; 1988; Cerami et al., 1988) sowie zur Regulation des Schlafs (Krueger et al. 1998). $\text{TNF}\alpha$ kann sowohl Nekrose also auch Apoptose auslösen (Beyaert et al., 1994). Gerade in Kombination mit der aktivierten Form der induzierbaren NO-Synthetase (iNOS) kommt es zur vermehrten Apoptose von Neuronen (Blais et al., 2004).

3.2.4. Stimuli der $\text{TNF}\alpha$ Synthese

LPS gilt als hochpotenter Stimulus der $\text{TNF}\alpha$ Synthese (Beutler et al., 1985c, Singh et al., 2003). Aber auch andere bakterielle Toxine wie Enterotoxine (Keeney et al., 2003), Viren wie HIV und Influenza-Virus, Pilze und Parasiten sind wirksame Stimulatoren (Tracey et al., 1994). Als weitere Aktivatoren sind IFN, IL-2, GM-CSF, SP, Bradykinin, Antigen-Antikörper-

3. Einleitung

Komplexe, Cyclooxygenase-Inhibitoren, PAF (Ibelgaufts 2003) und Amyloid-beta (A β 1-42) (Franciosi et al., 2005) bekannt. Axotomie des N. facialis führt im Kerngebiet des Nerven zur Hochregulation von TNF α (Bohatschek et al., 2004). Schließlich induziert TNF α auch seine eigene Produktion auf auto- und parakrinem Weg (Camussi et al., 1991).

3.2.5. Inhibitoren der TNF α Synthese

Im Organismus gibt es verschiedene endogene Inhibitoren der TNF α Synthese wie Glukokorticoide (Beutler et al., 1986a), IL-6, TGF- β , Prostaglandin E₂, Cyclosporin A (Ibelgaufts, 2003) und Fractalkine (Mizuno et al., 2003).

3.2.6. Produktionsort

Eine Vielzahl unterschiedlicher Zelltypen ist zur TNF α Synthese befähigt: Makrophagen, aktivierte Monozyten, NK-Zellen, neutrophile Granulozyten (Miller et al., 1993), T- und B-Lymphozyten (Goldfeld et al., 1991), Mastzellen, glatte Muskelzellen (Brennan et al., 1992), Ependymzellen (Liu et al., 1996), Langerhans Zellen, Kupffer-Sternzellen (Tracey et al., 1994), Fibroblasten (Fitzgerald et al., 2001), Mikroglia (Nadeau et al.; 1999a; 2000) und Astrozyten (Chung et al., 1990). Ob Neurone TNF α synthetisieren ist noch umstritten. Während ältere Veröffentlichungen eine neuronale TNF α Synthese zeigten (Breder et al., 1994; Turnbull et al., 1997), ergab sich dafür in einer kürzlich publizierten Arbeit kein Hinweis (Li et al., 2004).

3.2.7. TNF α assoziierte Erkrankungen und pharmakologische Strategien

Bei verschiedenen Erkrankungen spielt TNF α eine entscheidende Rolle. Beim „septic shock syndrome“ kommt es zur akuten Überproduktion von TNF α (Tracey et al., 1990; 1993). Bei Malignomen und AIDS induziert es Kachexie, bei Rheumatoider Arthritis ist TNF α bei Gewebsentzündung und Gelenkdestruktion beteiligt (Beutler et al., 1999, Feldmann et al., 2003). Bei ARDS (adult respiratory distress syndrome) wirkt es zytotoxisch auf Pneumozyten (Tracey et al., 1994). Auch bei Erkrankungen des ZNS, wie Multipler Sklerose, Morbus Alzheimer, Chronisch inflammatorischer demyelinisierender Polyneuropathie (CIDP), Enzephalitis bei Malaria und bei Meningitis

3. Einleitung

ist $\text{TNF}\alpha$ pathogenetisch beteiligt (Tracey et al., 1994; Kuwabara et al., 2002; Levy et al., 2003; Lindenlaub et al., 2003; Greig et al., 2004; Cacquevel et al., 2004; Radhakrishnan et al., 2004; Mei et al., 2005).

Infliximab (Remicade[®]) ist ein monoklonaler Antikörper gegen humanes $\text{TNF}\alpha$, das sowohl die freie wie auch die membranöse Form bindet. Die Wirksamkeit bei Rheumatoider Arthritis wurde in 2 randomisierten doppel-blind Studien gezeigt (Markham et al., 2000). Zudem wurde die Indikation um Morbus Crohn erweitert (Richtlinien des Bundesausschuss der Ärzte und Krankenkassen April 2001).

Etanercept (Enbrel[®]) ist ein lösliches Fusionsprotein und wirkt als kompetitiver Inhibitor, der die Bindung von $\text{TNF}\alpha$ an seine Rezeptoren verhindert. Es wird erfolgreich bei rheumatoider Arthritis eingesetzt (Schattner, 2004).

3.3. Die Rezeptoren

$\text{TNF}\alpha$ bindet an die Rezeptoren p55TNFR und p75TNFR, die beide zur „Tumor necrosis factor receptor (TNFR)-related gene superfamily“, kurz auch TNFR-Superfamilie gehören (Gravestain et al., 1998; Kwon et al., 1999, Locksley et al., 2001). Nur in der humanen Leber wurde ein dritter Rezeptor-Subtyp beschrieben (Schwalb, 1993). Die Mehrheit der Zelltypen kann beide Rezeptortypen exprimieren (Tartaglia et al., 1992).

3.3.1. Der Rezeptor p55TNFR (CD120a)

3.3.1.1. Genlocus

Das murine Gen ist in der distalen Region des Chromosoms 4 lokalisiert (Goodwin et al., 1991).

3.3.1.2. Eigenschaften des Proteins

Bei der Maus hat der Rezeptor 425 Aminosäuren (Lewis et al., 1991) bei einem Molekulargewicht (M_R) von 55 kDa (Brockhaus et al., 1990) Die

3. Einleitung

extrazelluläre Domäne besteht aus vier Cysteinresten (Smith et al., 1990) und hat bis zu 20% Homologie zur extrazellulären Domäne des p75TNFR, während hingegen die intrazellulären Domänen von p55TNFR und p75TNFR keinerlei homologe Sequenzen aufweisen (Dembic et al., 1990). Der extrazelluläre Anteil des p55TNFR kann abgetrennt werden und liegt dann im Serum als lösliche Form vor (Nophar et al., 1990). Die Homologie zwischen Maus und Mensch liegt bei 64% (Tartaglia et al., 1992).

3.3.1.3. Verteilung der Expression

Der p55TNFR ist im Organismus konstitutiv (Vandenabeele et al., 1995a) und mit Einschränkungen ubiquitär exprimiert (Ryffel et al., 1993; Armitage, 1994). Er findet sich auf fast allen Zellen des Körpers mit Ausnahme von Erythrozyten und ruhenden T-Zellen (Fitzgerald, 2001).

3.3.1.4. Funktionen

Die meisten der durch $\text{TNF}\alpha$ induzierten Funktionen werden über den p55 Rezeptor vermittelt (MacEwan, 2002). Dazu gehören: Zytotoxizität (Tartaglia et al., 1993a) und Induktion von Apoptose (MacEwan, 2002; Alikhani et al., 2004), proinflammatorische Effekte (Bazzoni et al., 1996), Hochregulation von endothelialen Adhäsions-molekülen wie dem intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1), E-selectin, vascular cell adhesion molecule type 1 (VCAM-1) und CD44 Adhäsionsmolekül (Mackay et al., 1993), Induktion von IL-1 und IL-6 (Anderson et al., 1992), Superoxid Dismutase (Tartaglia et al., 1992), NO (Riches et al., 1998), nuclear factor kappa B (NF- κ B) (Pfeffer et al., 1993) und die Synthese von Prostaglandin E_2 (Dayer et al., 1985).

3.3.2. Der Rezeptor p75TNFR (CD 120b)

3.3.2.1. Genlocus

Das murine Gen ist in der distalen Region des Chromosoms 6 lokalisiert (Goodwin et al., 1991).

3. Einleitung

3.3.2.2. Eigenschaften des Proteins

Bei der Maus hat die reife Form des Rezeptors 452 Aminosäuren (Lewis et al., 1991), bei einem Molekulargewicht (M_R) von 75 kDa (Brockhaus et al., 1990). Der p75TNFR kann wie auch der p55TNFR in löslicher Form vorliegen (Nophar et al., 1990).

3.3.2.3. Verteilung der Expression

Die Expression des p75TNFR ist durch eine Vielzahl von Stimuli auf transkriptionaler und posttranskriptionaler Ebene induzierbar (Vandenabeele et al., 1995a). Seine Expression ist im wesentlichen auf Zellen hämatopoetischer Herkunft beschränkt (Ryffel et al., 1993; Armitage, 1994; Fitzgerald et al., 2001).

3.3.2.4. Induktoren der Expression

Die Expression des p75TNFR kann durch eine Vielzahl von Immunstimuli induziert werden (Tab. 2). In diesem Zusammenhang wurde LPS als effektives mikrobielles Mitogen beschrieben (Tannenbaum et al., 1993), aber auch endogen produzierte Zytokine wie IL-2 (Naume et al., 1991) oder $TNF\alpha$ selbst (Kalthoff et al., 1993; Grell et al., 1995) können zur Synthese des p75TNFR führen.

3.3.2.5. Funktionen

Der p75TNFR Subtyp stellt sich in einigen Funktionen als Antagonist des p55 Subtyps dar, indem er die z.B. die TNF-induzierte Entzündungsreaktion supprimiert (Pfeffer et al., 1993). Andere p75TNFR-vermittelte Funktionen umfassen die Proliferation von Thymozyten und T-Zellen (Lewis et al., 1991; Tartaglia et al., 1993c; Grell et al., 1998), die Hochregulation von α_2 -Integrin (Mackay et al., 1993), aber auch Verstärkung der p55TNFR-abhängigen Wirkung, indem p75TNFR den Liganden zuerst bindet und ihn dann an p55TNFR weiterleitet. Dies wird als „ligand-passing model“ bezeichnet (Tartaglia et al., 1993b).

3. Einleitung

Zelltyp	Stimulus	p55TNFR	p75TNFR	Referenz
B-Zellen	Mitogen	↔	↑	Erikstein et al., 1991
T-Zellen	Mitogen	↔	↑	Gehr et al., 1992
Makrophagen	LPS	↔	↑	Tannenbaum et al., 1993
CD56 ⁺ NK-Zellen	IL-2	↔	↑	Naume et al., 1991

Tabelle 2: Differentielle Regulation von p55TNFR und p75TNFR.

Deutlich zeigt sich die Induzierbarkeit des p75TNFR durch diverse Stimuli, in Abgrenzung zum nicht-induzierbaren p55TNFR.

↔, basale Expression vorhanden, aber unverändert; ↑, Expression hochreguliert

3.3.3. Signaltransduktion der TNF α Rezeptoren p55 und p75

Beide Rezeptor-Subtypen verfügen über verschiedene Signaltransduktionkaskaden (Lewis et al., 1991), wobei einige Signalproteine bei beiden beteiligt sind (Abb. 3.1.). Die Signaltransduktion des p55TNFR verläuft wie folgt:

1. Ein TNF α Trimer bindet an die extrazelluläre Domäne des Rezeptors.
2. Rezeptor und Ligand bilden mit der TNFR-associated death domain (TRADD) einen Komplex. Eine „death domain“ ist eine intrazelluläre Domäne, die mit Proteinen interagiert, die an der TNF-vermittelten Apoptose beteiligt sind. „Death domains“ aktivieren Caspasen (Idriss et al., 2000) und finden sich bei verschiedenen Mitgliedern der TNF-Superfamilie.
3. TRADD kann andere Adapterproteine rekrutieren wie das receptor-interactin protein (RIP), die fas-associated death domain (FADD) und TNFR-associated factor 2 (TRAF2, Chen et al., 2002a). RIP und FADD werden nur von p55 benutzt, TRAF von p55 und p75 gemeinsam (Natoli et al., 1998). Welches dieser Adapterproteine gewählt wird, entscheidet über die weitere „Richtung“ innerhalb der Signalkaskade und damit darüber in welcher Reaktion die Bindung von TNF α an den Rezeptor resultieren wird.
4. So kann FADD via Aktivierung der Caspase 8 und 3 zur Apoptose führen (Rath et al., 1999). FADD scheint aber zur Auslösung von Apoptose nicht der einzige Weg zu sein, da auch FADD-defiziente Zellen zur TNF-induzierten Apoptose fähig sind (Baud et al., 2001).

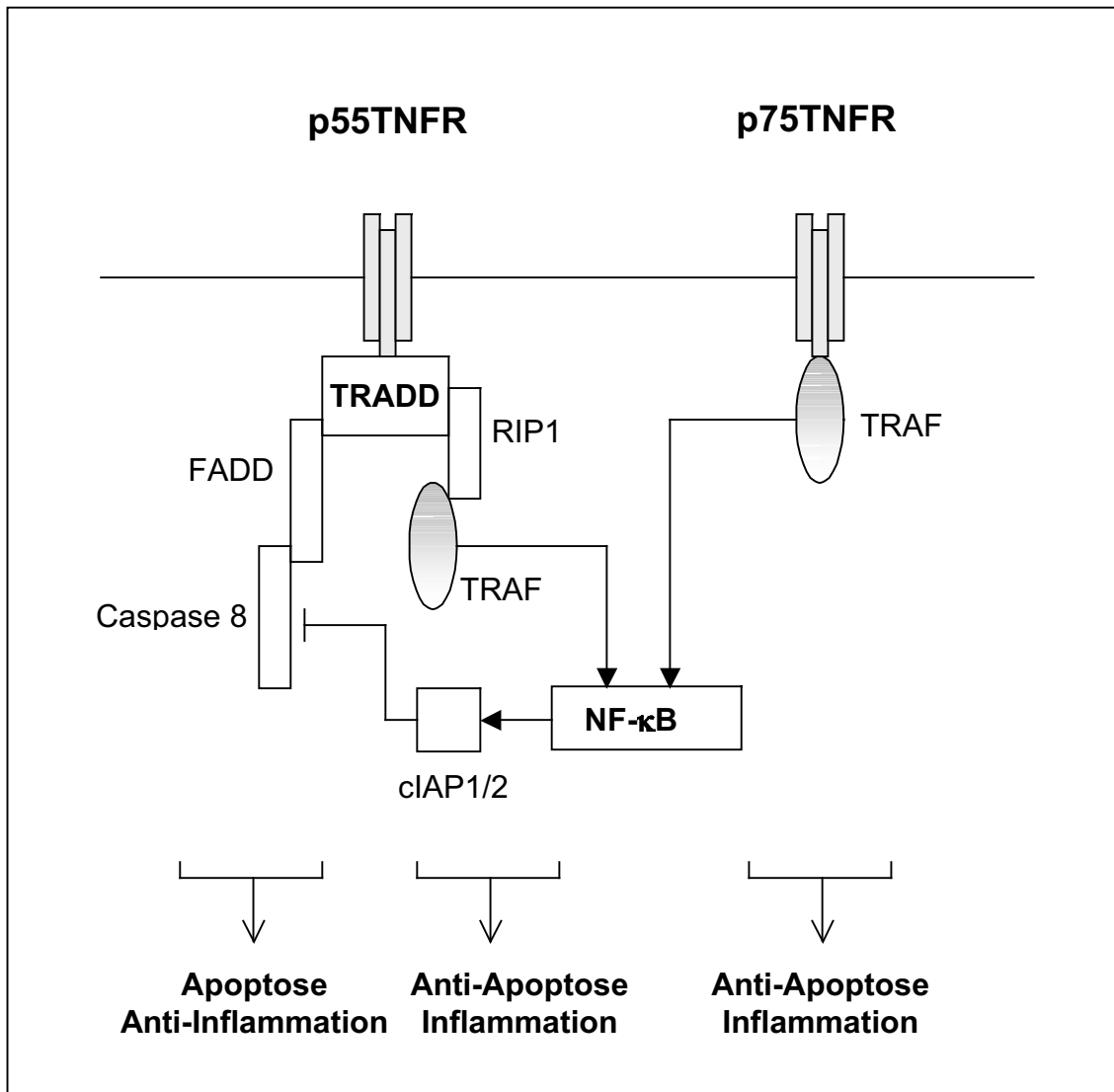


Abb. 3.1.: Schematische Darstellung der p55- und p75TNFR Signaltransduktion.

Die Rezeptor-spezifischen Effekte sind in der unteren Zeile dargestellt. Nur über p55TNFR kann Apoptose induziert werden, während Inflammation über beide Rezeptoren vermittelt wird.

Abk.: TRADD, TNFR-associated death domain; FADD, Fas-associated death domain; RIP, receptor-interactin protein; TRAF, TNFR-associated factor; NF-κB, Nuclear factor kappa B; cIAP, cellular inhibitor of apoptosis. (modifiziert nach Baud et al., 2001; Chen et al., 2002a)

5. TRAF2 kann über mehrere Zwischenschritte den Transkriptionsfaktor c-jun aktivieren oder zur Rekrutierung der cellular inhibitor of apoptosis proteins (cIAP-1 und -2) führen. Diese inhibieren Caspasen wie die Caspase 3 und 8 und damit die Apoptose.
6. RIP führt über viele Zwischenschritte zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF-κB, der die Expression von Genen induziert, die bei chronischer und akuter Entzündung beteiligt sind (Branes et al., 1997).

3. Einleitung

Der p75TNFR zeigt einige Unterschiede zum p55TNFR. Er verfügt über keine death domain, weshalb eine TNF α Bindung an diesem Rezeptor nie zur Apoptose führt. Vielmehr kann der Apoptose-Inhibitor cIAP-2 durch ihn aktiviert werden (Chen et al., 2002b). Zur Induktion von Apoptose werden trotzdem beide Rezeptoren benötigt (Vandenabeele et al., 1995b). TRAF2 wird im Gegensatz zur p55TNFR Signaltransduktion direkt nach Bindung des Liganden ohne Beteiligung von TRADD aktiviert, woraufhin TRADD dann TRAF1 rekrutiert (Rothe et al., 1994; 1995).

3.4. TNF α Expressionsmuster im Gehirn

3.4.1. TNF α Expressionsmuster im Gehirn unter Kontrollbedingungen

Im normalen Gehirn bei Maus und Ratte ist TNF α als mRNA und Protein nur schwach oder überhaupt nicht nachweisbar.

RT-PCR Analysen konnten die basale Expression von TNF α im Hirn zeigen (Gatti et al., 1993; Buttini et al., 1996; Pitossi et al., 1997; Taupin et al., 1997) mit einer Ausnahme, bei der die TNF α mRNA als „barely undetectable“ beschrieben wurde (Renno et al., 1995). *In-situ* Hybridisierungsnachweise zeigten im Hirn entweder keine TNF α positiven Zellen (Nadeau et al., 1999a; Medana et al., 1997) oder nur wenige im Ncl. präopticus und Ncl. supra-chiasmaticus (Breder et al., 1994). Mittels Rnase Protection Assay konnte keine mRNA in Kortex, Hippocampus oder Cerebellum nachgewiesen werden (Turrin et al., 2001).

Durch immunzytochemische Analysen wurden nur wenige oder keine TNF-immunreaktiven Zellen detektiert (Knoblauch et al., 1999; LeVine et al., 1997, Dziejulska et al., 2003).

Hinsichtlich der Synthese von TNF α mRNA durch Mikrogliazellen in Kultur sind die Daten widersprüchlich, so dass bei unstimulierten Zellen TNF α mRNA nachgewiesen (Lee et al., 2002), bzw. nicht nachgewiesen wurde (Zajicek et al., 1992). Astrozyten in Kultur produzierten auf mRNA-Niveau (Chung et al., 1990; Wesselingh et al., 1990; Lung et al., 2001) und Protein-Niveau (Chung et al., 1990) kein oder nur sehr wenig TNF α (Lafortune et al., 1996; Yu, 2000).

3. Einleitung

3.4.2. TNF α Expressionsmuster im Gehirn nach SEB

Über die Effekte von SEB auf die zerebrale Expression von TNF α gibt es bisher nur eine Untersuchung. Dabei wurde nur der Hypothalamus fokussiert untersucht (Del Rey et al., 2000). Nach intraperitonealer Gabe von SEB zeigte sich in dieser Studie, dass SEB bei Mäusen keine Wirkung auf die TNF α mRNA Level im Hypothalamus hervorrief.

3.4.3. TNF α Expressionsmuster im Gehirn nach LPS

Über die Effekte von LPS auf die zerebrale Expression von TNF α liegen eine Vielzahl von Untersuchungen vor, die übereinstimmend eine LPS-induzierte Hochregulation von TNF α mRNA im Gehirn von Maus und Ratte zeigen. Diese Effekte konnten sowohl durch RT-PCR und RNase Protection Assay Analysen (Gatti et al., 1993; Pitossi et al., 1997; Ilyin et al., 1998; Gayle et al., 1998; Stern et al., 2000; Turrin et al., 2001) als auch durch *in-situ* Hybridisierungsstudien (Breder et al., 1994; Nadeau et al., 1999a; Nadeau et al., 2002) gezeigt werden. In anatomischen Untersuchungen wurde eine schnell auftretende Induktion der TNF α mRNA nach intraperitonealer Gabe von LPS im Bereich der CVOs beobachtet, die sich im zeitlichen Verlauf in tiefer gelegene Regionen des Parenchyms ausbreitete. Ein Phänomen, das als „migratory-like pattern“ bezeichnet wurde (Nadeau et al., 1999a).

LPS stimulierte *in vitro* hohe TNF α mRNA Level in Astrozyten (Sharif et al., 1993; Chung et al., 1990; Wesseling et al., 1990; Lee et al., 2000; Lung et al., 2001) und Mikrogliazellen (Hetier et al., 1991; Zajicek et al., 1992; Liu et al., 2001; Nakamura et al., 1999; Lee et al., 2002) von Maus, Ratte und Mensch. Im direkten Vergleich synthetisierten Mikrogliazellen deutlich mehr TNF α als Astrozyten (Sawada et al., 1989; Lafortune et al., 1996), was eine präferentielle Synthese von TNF α in Mikroglia *in vivo* vermuten lässt.

3.5. p55TNF α Expressionsmuster im Gehirn

3.5.1. p55TNFR Expressionsmuster im Gehirn unter Kontrollbedingungen

Die Expression von p55TNFR wurde sowohl in neuronalen als auch non-neuronalen Zellen nachgewiesen. Die neuronale p55TNFR Expression unter

3. Einleitung

Kontrollbedingungen wurde in nur wenigen Studien untersucht, die zudem *in vitro* mit Zellkulturen (Grassi et al., 1994; Neumann et al., 1997) oder der Neuroblastoma Zelllinie M1E-115 (Sipe et al., 1996) durchgeführt wurden. Dabei zeigten hippokampale Neurone in Kultur eine konstitutive p55TNFR Expression (Grassi et al., 1994; Neumann et al., 1997). *In vivo* konnte der Rezeptor in Neuronen des Ggl. trigeminale und von Spinalganglien (Cunningham et al., 1997; Li et al. 2004), sowie in kortikalen Neuronen im Gehirn der Maus (Yin et al., 2004) und Neuronen des Hirnstamms in der Ratte nachgewiesen werden (Hermann et al., 2004).

Als non-neuronale Zellen, in denen der p55TNFR expremiert werden kann, wurden Ependymzellen, meningealen Zellen, Plexus choroideus Zellen, Endothelzellen, und Zellen in der ME und AP aufgrund von in *in-situ* Hybridisierungsanalysen beschrieben (Nadeau et al., 1999b). In Kultur expremierten Astrozyten (Tada et al., 1994; Aranguéz et al., 1995; Dopp et al., 1997; Lung et al. 2001), Mikroglia (Dopp et al., 1997) und Oligodendrozyten (Agresti et al., 1998) mRNA und das Protein (Dopp et al., 1997).

3.5.2. p55TNFR Expressionsmuster in Gehirn nach SEB-Gabe

Nach Stimulation mit SEB wurde die Expression im Gehirn bisher noch nicht untersucht.

3.5.3. p55TNFR Expressionsmuster in Gehirn nach LPS-Gabe

Untersuchungen zur Wirkung von LPS auf die Expression des p55TNFR im Gehirn liegen bisher nur vereinzelt vor. Nur in einer Studie wurde eine LPS-induzierte Hochregulation von p55TNFR im Bereich der CVOs und der Meningen beschrieben (Nadeau et al., 1999b).

In vitro zeigte LPS keine Auswirkung auf die Genexpression des p55TNFR in primären Rattenastrozyten (Lung et al., 2001) oder murinen Rattenastrozyten (Aranguéz et al., 1995).

3.6. p75TNFR Expressionsmuster im Gehirn

3.6.1. p75TNFR Expressionsmuster in Gehirn unter Kontrollbedingungen

Dieser Rezeptor ist konstitutiv im Gehirn kaum nachweisbar. So zeigte die ISH im Hirn der Ratte nur im Hippocampus p75TNFR mRNA (Nadeau et al., 1999a). In kultivierten Astrozyten (Tada et al., 1994; Dopp et al., 1997; Lung et al., 2001) Oligodendrozyten und Mikrogliazellen (Dopp et al., 1997) wurde der Rezeptor nur schwach expremiert.

3.6.2. p75TNFR Expressionsmuster in Gehirn nach SEB-Gabe

Untersuchungen zur Expression des p75TNFR im Gehirn nach SEB-Gabe liegen bisher noch nicht vor.

3.6.3. p75TNFR Expressionsmuster in Gehirn nach LPS-Gabe

Im Rattenhirn zeigte LPS eine Induktion der p75TNFR in den Meningen, in Blutgefäßen, dem Plexus choroideus sowie den CVOs (Nadeau et al., 1999b). Im Gegensatz zur LPS-induzierten TNF α Expression fand sich aber im Verlauf der Stimulation keine Verlagerung der p75TNFR mRNA in das Parenchym (sog. „migratory-like pattern“). *In vitro* führte die Gabe von LPS in primären Rattenastrozyten zu einer Erhöhung der p75TNFR Level (Lung et al., 2001).

Kapitel 4

Material und Methoden

4.1. Tierversuche

Als Versuchstiere wurden männliche Balb/c Mäuse, 6-8 Wochen alt mit 25-30 g Körpergewicht verwendet (Charles River, Sulzfeld). Die Tiere wurden im Haus-eigenen Tierstall in einem 12h/12h Tag-Nacht-Rhythmus gehalten und erhielten Futter und Wasser *ad libitum*. Zwischen Anlieferung der Mäuse und Versuchsbeginn lag mindestens eine Woche, in der die Tiere auf ihren Gesundheitszustand hin überwacht wurden.

4.1.1. Immunstimulation

Folgende Immunstimulantien wurden verwendet: Staphylokokken-Enterotoxin B von *Staphylokokkus aureus* (S4881, SIGMA, München, Best.Nr.: S-9399, Lot-Nr.: 126H4079 und 78H4009) und bakterielles Lipopolysaccharid von *Escherichia coli* 0127:B (Sigma München, L3129).

Zur Immunstimulation wurden pro Tier intraperitoneal 50 µg SEB in 200 µl Volumen PBS appliziert, was einer Konzentration von 200 µg SEB/100 g Körpergewicht entspricht, oder 5 µg LPS in 200 µl Volumen PBS, was einer Konzentration von 20 µg LPS/100 g Körpergewicht entspricht. Kontrolltiere erhielten eine sham-Injektion mit gleichem Volumen PBS. Kontrolltiere, SEB- und LPS-stimulierte Tiere wurden 1h, 4h, 8h, 12h und 24h post injectionem (p.i.) in CO₂-Atmosphäre getötet. Für alle Zeitpunkte standen jeweils 5 Tiere pro Gruppe zur Verfügung.

Für RT-PCR Analysen wurden weitere 4 sham-injizierte Tiere 1h p.i. und für die Verwendung mit LaserCaptureMicrodissection (LCM) ein weiteres sham-injiziertes, sowie ein mit LPS stimuliertes Tier 1h p.i. präpariert.

4.2. Gewebeentnahme

4.2.1. Gewebeentnahme für die ISH

Material:

Tiere, CO₂, Präparierbesteck, Trockeneis, Tissue-Tek (Miles), Blechdose mit Isopentan, Kryoformen (Miles), Parafilm

Vorgehen

1. Isopentan in einer Blechdose auf Trockeneis auf -40-50°C vorkühlen.
2. Tier in CO₂ töten.
3. Entnahme des Gehirns. Dazu wurde das Tier zuerst mit einer Schere dekapitiert, der Schädel vom Foramen magnum beginnend eröffnet und die Kalotte mittels medio-sagittalem Schnitt gespalten und zur Seite geschoben. Nach Entfernen der Dura mater, konnte das nun frei liegende Hirn mit einem Spatel von der Schädelbasis abgehoben werden.
4. Gehirn in eiskalten Isopentan einfrieren.
5. Gefrorene Gewebe mit Nummern versehen, in Parafilm einwickeln und bei -70°C bis zur weiteren Aufarbeitung lagern.

4.2.2. Gewebeentnahme für die RT-PCR

Für die RNA-Isolation wurden vom entnommenen Hirn Kortex, Cerebellum und Hirnstamm isoliert und in jeweils ein Kryoröhrchen überführt, in flüssigem Stickstoff gefroren und ebenfalls bei -70°C aufbewahrt.

4.3. Herstellung der Plasmid-Sonden

4.3.1. RNA-Extraktion

Beim Umgang mit RNA müssen Kontaminationen mit ubiquitär auftretenden Ribonukleasen (RNasen) vermieden werden. Dazu wurden die von Blumberg (1987) beschriebenen Vorsichtsmaßnahmen beachtet und nur Pipetten mit Filterspitzen verwendet. Alle Versuche wurden an einem nur für die PCR reserviertem Arbeitsplatz durchgeführt, der vor jedem Arbeitsbeginn mit 3%-igem H₂O₂ gereinigt wurde. Zur RNA-Isolation wurde das Protokoll von TRIzol

4. Material und Methoden

verwendet, das eine Verbesserung der 1987 von Chomzynsky und Sacchi (Chomzynsky et al., 1987) vorgestellten single-step Methode darstellt.

Materialien

Trizol Reagenz (GibcoBRL)
RNase freies H₂O
Chloroform (Merck)
0,5ml Eppendorf-Cups
100% Isopropanol
70% Isopropanol

Geräte

Ultra-Turrax T125 (Jankel
und Kunkel)
Kühlzentrifuge
Vortex

Vorgehen

1. Wiegen der Gewebe und anschließende Homogenisierung im Ultra-Turrax bis keine Gewebeteile mehr sichtbar waren.
2. Versetzen der Homogenisate mit TRIzol-Reagenz (1ml pro 50–100 g Gewebe). Inkubation für 5 min bei Raumtemperatur.
3. Zugabe von 0,2 ml Chloroform pro 1 ml Trizol-Reagenz und vortexen für ca. 15 sec.
4. Zentrifugation bei 12.000 x g für 10 min in der Kühlzentrifuge bei 4-8°C.
5. Wässrige Phase (die obere der 3 sichtbaren Phasen) entnehmen und in ein neues Cup überführen (die wässrige Phase enthält die RNA).
6. Zugabe von 0,5 ml 100%-igem Isopropanol pro 1 ml Trizol-Reagenz, vortexen und bei Raumtemperatur für 10 min inkubieren.
7. Zentrifugation bei 12.000 x g bei 4-8°C für 10 min.
8. Das verbleibende Pellet mit 500 µl 70%-igem Isopropanol versetzen, kurz schütteln, zentrifugieren bei 12.000 x g bei 4-8°C für 10 min.
9. Zweimaliges Wiederholen von Schritt 8.
10. Nach Verwerfen des Überstandes das Pellet bei RT für 5-10 min an der Luft trocknen,
11. Pellet in 20 µl ddH₂O lösen.

4. Material und Methoden

4.3.2. Photometrische Bestimmung der RNA-Konzentration

Bei der spektralphotometrischen Bestimmung der Konzentration von Nucleinsäuren nutzt man das Absorptionmaximum von RNA bei einer Wellenlänge von 260 nm aus.

Quantifizierung von RNA: $C = 40 \cdot E_{260} \cdot f$. (C in ng/μl, f: Verdünnungsfaktor).

Mittels des Quotient $v = E_{260}/E_{280}$ lässt sich die Reinheit der Probe bewerten,

Die vermessene Probe wird als rein betrachtet, wenn $1,7 < v < 2,1$ ist.

Materialien, Geräte

Quarzküvetten, Ultrospec 3000 Spektralphotometer

Vorgehen

1. Proben mit ddH₂O auf 1:50 verdünnen.
 2. Eine Quarzküvette mit ddH₂O für den Nullabgleich verwenden.
 3. Probe in eine Quarzküvette überführen und im Photometer messen.
- Alle Messungen wurden als Duplex-Messungen durchgeführt, die Konzentration wurde vom Photometer direkt berechnet.

4.3.3. Reverse Transkription

Materialien

Eis

isolierte RNA

Oligo (dT)₁₂₋₁₈ Primer, 500 μg/ml

5x First-Strand-Puffer (Invitrogen): 250 mM Tris-HCl (pH 8,3), 375 mM KCl,
15mM MgCl₂

0,1M DTT (Invitrogen)

dNTP-Mix: dATP+dCTP+dGTP+dTTP (Boehringer) je 10 mM, zu gleichen Volumina

ddH₂O

RNaseOUT Recombinant Ribonuklease Inhibitor, 40 U/μl (Fermentas)

Superscript II RNase H⁻ Reverse Transcriptase (Invitrogen)

4. Material und Methoden

Geräte

Thermozykler PTC-200 (MJ Research)

Vorgehen

1. In ein 0,5 ml Cup werden pipettiert:
 - 1 μ l Oligo (dT)₁₂₋₁₈ Primer
 - 1 μ l 10 mM dNTP-Mix
 - 10 μ l RNA
2. Diese Lösung im Thermozykler für 5 min auf 65°C erhitzen.
3. Cup auf Eis stellen und Zugabe von:
 - 4 μ l 5x First Strand Buffer
 - 2 μ l 0,1 M DTT
 - 1 μ l RNaseOUT
4. Resuspendieren der Lösung und im Thermozykler bei 42°C für 2 min inkubieren.
5. Zugabe von 1 μ l (200 units) Superscript. Resuspendieren und bei 42°C inkubieren.
6. Inaktivieren des Enzyms bei 70°C für 15 min.
7. Die so gewonnene cDNA auf ein Volumen von je 50 μ l mit ddH₂O auffüllen und bei -20°C lagern.

4.3.4. Polymerasekettenreaktion (PCR)

Materialien

Filterspitzen für Pipetten
PCR-Reaktionsgefäße (BIOzym)
MgCl₂ (25mM)
10X Reaktionspuffer
dNTP-Mix 10mM (je 10mM dATP, dCTP, d GTP, dTTP)
Taq-DNA Polymerase 5 U/ μ l (Promega)
Primermix aus upper und lower Primer (2 μ M)
cDNA aus Reverser Transkription

Geräte

Thermozykler PTC-200 (MJ Research)

4. Material und Methoden

Primer

Alle Primer wurden von Eurogentec bezogen, mit Ausnahme von β -Actin, das von Roth geliefert wurde.

mTNF α upper primer, 25mer, 5' position 423: 5'-AGC CCA CGT CGT AGC AAA CCA CCA A-3' lower primer, 25mer, 3' position 853:5'-ACA CCC ATT CCC TTC ACA GAG CAA T-3'

m p55TNFR upper primer, 19mer, 5' position 5'-GTG CCT ACC TCC TCC GCT T-3' lower primer, 22mer, 3' position 5'-CAG CAT ACA GAA TCG CAA GGT C-3'

m p75TNFR upper primer, 19mer, 5' position 5'-GCA ACA AGA CCT CGG ACA C-3' lower primer, 20mer, 3' position 5'-TGA ACC CAA CGA TGT AAG GA-3'

m β -actin upper primer, 25mer, 5' position 5'-TGG ATT CCT GTG GCA TCC ATG AAA C-3' lower primer, 25mer, 3' position 5'-TAA AAC GCA GCT CAG TAA CAG TCC G-3'

PCR-Programm

Step	Temperatur	Dauer (min)	
1	94,0°C	3:00	
2	94,0°C	0:45	
3	58,0°C	0:45	
4	72,0°C	1:00	
5	3x Wiederholung von Step 2-4		
6	94,0°C	0:45	Denaturierung
7	58,0°C	0:45	Annealing
8	72,0°C	1:00	Polymerasereaktion
9	35x Wiederholung von Step 6-8		
10	94,0°C	5:00	
11	8,0°C	∞	

Primer	Annealing Temp. T_m	Templatlänge	Zyklenzahl
TNFα	61,0°C	446bp	42
m p55TNFR	58,3°C	503bp	42
m p75TNFR	58,3°C	681bp	42
β-Actin	62,0°C	349bp	25

4. Material und Methoden

Vorgehen

1. Alle Reagenzien auf Eis auftauen.
2. Für einen 25 µl-Ansatz als Mastermix pipettieren:

Reaktionspuffer 10X	2,5 µl
MgCl ₂ (25mM)	2,5 µl
dNTP-Mix	0,5 µl
Taq-Polymerase	0,125 µl
H ₂ O	16,0µl
3. Zugabe von 2,5 µl der cDNA.
4. Zugabe von 0,8 µl Primermix.
5. PCR-Cups in den Thermocycler überführen und das entsprechende Programm starten.
6. Die Analyse erfolgte mit einem Agarosegel.

4.3.5. Agarosegelelektrophorese

Puffer und Reagenzien

50x TAE; (Stammlösung):	Tris-Base	242 g
	Eisessig (98%)	57,1 ml
	0,5M EDTA (pH 8,0)	100 ml
	Auffüllen mit ddH ₂ O auf 1000 ml	

Agarose (Sigma)

Ethidiumbromid 10 mg/ml; (Lagerung bei 4°C)

Elektrophoresepuffer: 1x TAE + 0,5 µg/ml Ethidiumbromid

Ladepuffer: Bromphenol-Blau, 0,25%, Xylen-Cyanol FF, 0,25%, Glycerol in
Wasser 30%

Größenstandard: 0,1 µg/µl 1kb-DNA-Leiter, bzw 100 bp-DNA-Leiter (GibcoBRL,
Eggenstein), 1/10 Ladepuffer

Material und Geräte

Erlenmeyerkolben

Mikrowelle

Elektrophoresekammer mit Zubehör (Integra Bioscience)

Spannungsquelle

4. Material und Methoden

Geldokumentationssystem (BIORAD)

Videoprinter (Mitsubishi)

Vorgehen

1. Gießen eines 1,5%-igen Agarosegels.
2. Gelschlitten in eine Gießkammer einspannen und Kämme einsetzen.
3. 1,5 g Agarose in einem Erlenmeyerkolben eingewiegen, 100 ml 1x TAE dazugeben und in der Mikrowelle aufkochen bis eine klare Lösung entsteht. Unter dem Abzug 50 µl Ethidiumbromidlösung (1:20.000 Volumenteil) zur Agaroselösung pipettieren, kurz mischen und das Gelgemisch in die Kammer giessen.

Nach Erkalten (ca. 30 min) kann das Gel verwendet werden.

Probenvorbereitung

Zu 9 µl einer cDNA Probe wurde 1µl (1/10) Ladepuffer gegeben.

Elektrophorese

1. Gel in die Elektrophoresekammer einsetzen und mit 1x Elektrophoresepuffer überschichten.
2. Kämme vorsichtig entfernen und die Proben sowie 10 µl Größenstandard auf das Gel laden.
3. Proben unter einer Spannung von 80 Volt auftrennen bis der Bromphenolblau-Marker im Ladepuffer 50-70% des Gels durchwandert hat. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe eines videogestützten Dokumentationssystems von BIORAD, bei dem die Gelphotographien für die weitere Dokumentation im PC gespeichert und per Videoprinter ausgedruckt wurden.

4.3.6. Aufreinigung von Nukleinsäuren mittels Gel Extraktionskit

Nachdem durch die PCR die gewünschten Template ausreichend amplifiziert waren, und diese als PCR-Bande im Agarosegel vorlagen, mussten sie noch für die Ligation im Vektor isoliert werden. Diese Isolation wurde mit dem Gel Extraktionskit von Qiagen durchgeführt.

4. Material und Methoden

Material

QIAquick PCR Purification Kit (Quiagen)

Geräte

Heizblock

Puffer und Lösungen

Puffer QG wurde gemäß Quiagen Protokoll mit 96% Ethanol verdünnt.

Vorgehen

1. Ausschneiden der DNA-Bande aus dem Gel auf dem UV-Leuchttisch.
2. Gelstück wiegen, in ein 1,5 ml Eppendorf Cup überführen und das dreifache Volumen an QG-Puffer dazugeben.
3. Inkubation des Gelstücks bei 50°C für 10 min, wobei alle 2-3 min gevortext wurde, um das vollständige Lösen sicherzustellen.
4. Nach dem Lösen den pH-Wert mit pH-Papier bestimmen. Dieser muß <7,5 sein, weil nur in diesem Bereich die QIAquick-Membran effizient funktioniert. Bei Abweichen des pH-Werts wurde 3M Natriumacetat, pH 5,2 dazupipettiert.
5. Zugabe von 1 Gelvolumen Isopropanol und vortexen.
6. Überführen des Gemischs in eine Säule (QIAquick column), die in einem 2 ml Auffangbehälter steht.
7. Zentrifugation für 1 min bei 13.000 rpm, danach Verwerfen des Durchlaufs.
8. Waschen der Säule durch Zugabe von 750 µl PE-Puffer.
9. Verwerfen des Durchflusses und erneutes Zentrifugieren für 1 min bei 13.000 rpm.
10. DNA durch Zugabe von 50 µl EB-Puffer eluieren (Achtung: in ein neues Cup aufnehmen).
11. Zentrifugation für 1min bei 13.000 rpm.

Ligation von PCR-Produkten in Plasmid-Vektoren

TNF α :	Acc. M20155	407 bp fragment in pGEM3(-) vector
p55TNFR:	Acc. X59238	503 bp fragment in pGEM-T easy vect.
p75TNFR:	Acc. M60469	681 bp fragment in pGEM-T easy vect.
c-fos:	Acc. X06769	352 bp fragment in pGEM-Teasy vect.

4. Material und Methoden

Material

Eis

Reagenzien und Puffer

PCR-Produkt

T4-DNA-Ligase (Weiss)

pGEM-T Easey-Vektor (50 ng/μl) (Promega)

2X Rapid Ligation Puffer

Vorgehen

1. Zusammenpipettieren von : 15 μl aufgereinigtem PCR-Produkt
1 μl T4-DNA-Ligase
1 μl pGEM-T Easey-Vektor
5 μl 2X Rapid Ligation Puffer
2. Ligation über Nacht bei +4°C.

4.3.7. Transfektion von cDNA Templaten in E. coli Zellen

Reagenzien und Puffer

LB-und LBA-Medium: 10 g Bacto-Trypton, 5g Bacto-Yeast Extract,
10 g Natriumchlorid (Lösung autoklavieren)

Natriumhydroxid (5N)

Ampicillin (50 mg/ml)

LBA-Medium: LB-Medium + 50 μg/ml Ampicillin

SOB-Medium: 20g 2%-igem Bactotryptone, 5g 0,5%-iges Bacto-Yeast
Extrakt, 2ml 5M NaCl in 1 l ddH₂O (pH 7,0) (Lösung
autoklavieren)

SOC-Medium: SOB-Medium + 20ml 1M Glucose pro l

Isopropyl-β-D-thiogalactosid (IPTG)(10 μg/μl)

X-Gal (10 μg/μl in Dimethylformamid)

Agarplatten

Herstellung der Agarplatten

4. Material und Methoden

Vorgehen

1. 500 ml LB-Medium mit 7,5 g Bacto-Agar versetzen, autoklavieren und auf ca. 45°C abkühlen.
2. Addition von 500 µl Ampicillin.
3. Ausgießen der flüssigen Lösung in Petrischalen. Nach dem Erstarren Aufbewahrung bei +4°C.

LBA^{X-gal/IPTG}-Agarplatte

Herstellung der LBA^{X-gal/IPTG}-Agarplatte

1. 80µl IPTG und 40µl X-gal-Lösung auf LBA-Agarplatte ausstreichen.
2. Bei Raumtemperatur für 45 min inkubieren bis die Lösungen in das Agar eindiffundiert sind.

Material

Brutschrank, sterile Kunststoff-Petrischalen

Zellen

Dazu wurden elektrokompente E. coli XL1 Blue-Zellen verwendet, die mit der Methode nach Hanahan (1986) kompetent gemacht worden waren. Diese Zellen habe ich gebrauchsfertig von den Medizinisch-technischen Angestellten der AG-Weihe übernehmen können, weshalb die Vorgehensweise hier nicht beschrieben wird.

4.3.8. Elektroporation

Reagenzien und Puffer

DNA, die in den Vektor ligiert wurde
SOC-Medium
Eis

Material und Geräte

Micropulser (BioRad)
Electroporationsküvette
Elektrokompente Zellen
17x100 mm Polypropylene Gefäß

Vorgehen

1. Auftauen der elektrokompenten Zellen auf Eis.
2. In einem auf Eis stehenden 1,5 ml Polypropylene Cup 40 µl Zellen mit 5 µl DNA mischen und auf Eis für 1 Minute inkubieren.

4. Material und Methoden

3. Überführen des Gemisches in eine Elektroporationsküvette und diese in den Micropulser.
4. Einmal pulsen mit „ECL-1“-Setting (Dauer: 6,20 ms, Spannung: 1,80 kV).
5. Zu dem Gemisch unverzüglich 1 ml SOC-Medium hinzugeben und vorsichtig resuspendieren. Die Periode zwischen Pulsen und Zugabe des SOC-Mediums muß möglichst kurz sein, denn schon bei einer Verzögerung von nur 1 min wird das Transformationsergebnis um ein Drittel vermindert.
6. Überführen der Zellsuspension in ein 17 x 100 mm Polypropylene Gefäß und Inkubation bei 37°C für 1 h unter Schütteln bei 225 rpm.

4.3.9. Selektion kompetenter Zellen

Reagenzien und Puffer

Agarplatte

Material und Geräte

LBA-Medium

Trigalsi-Spatel

Brutschrank (Heraeus Instruments)

14ml Falcon Rundbodenröhrchen 2059

2ml Eppendorf Cup

Schüttler

Vorgehen

1. Ausplattieren von je 100 µl der transformierten Zellen pro Agarplatte mit einem abgeflamnten und abgekühltem Trigalsi-Spatel.
2. Inkubation über Nacht bei 37°C.
3. Am nächsten Tag wurden mit einer sterilen Pipettenspitze einzelne, nur weiße Kolonien separiert und zusammen mit der Pipettenspitze in LBA-Medium fallen gelassen (18 ml in Falconröhrchen).
4. Inkubation für 3-5 h bei 37°C unter Schütteln inkubieren.
5. Umfüllen in ein 2 ml Eppendorf Cup und für 3 min bei 5.000 rpm zentrifugieren.
6. Überstand verwerfen, Pellet auf LBA-Agarplatte ausplattieren und über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubieren.
7. Am nächsten Tag einzelne, weiße Kolonien mit einer sterilen Pipettenspitze separieren und in einem markiertem Feld einer LBA-Agarplatte (Stocherplatte) ausstreichen.
8. Dieselbe Pipettenspitze wird danach für den Inserttest (4.3.10.) verwendet.

4. Material und Methoden

4.3.10. Inserttest mittels PCR

Material, Reagenzien und Puffer

wie unter 4.3.4.

Vorgehen

1. 25 µl-PCR-Reaktionscup mit 20 µl ddH₂O füllen und Pipettenspitze von 4.3.9. eintauchen, um die anhaftenden Bakterien so in ddH₂O zu überführen.
2. Reaktionscup für 5 min bei 95°C kochen.
3. 2 min bei 3.000 rpm abzentrifugieren.
4. 5 µl des Überstands in der PCR einsetzen.

4.3.11. Inserttest mittels Sequenzierung bei Sequlab

Die bei der PCR amplifizierte DNA wurde bei einem kommerziellen Labor (Sequlab) zur Sequenzierung eingeschickt.

4.3.12. Herstellung einer „Vorkultur“

Wenn die Sequenzierung das Vorliegen des gewünschten cDNA-Inserts bestätigt hat, kann eine Vorkultur angelegt werden und die Aufreinigung der cDNA erfolgen.

Reagenzien und Puffer

LBA-Medium

Material und Geräte

Bakterienschüttler Certomat H (Braun Biotech Int.)
Schikanen-Erlenmeyerkolben (1l)

Vorgehen

1. Einzelnen Klon mit einer steriler Pipettenspitze picken und in 4 ml LBA-Medium überführen.
2. Inkubation für 5 h bei 37°C unter Schütteln.
3. Diese „Vorkultur“ in 200 ml LBA-Medium geben und über Nacht im Schüttler inkubieren.

4. Material und Methoden

4.3.13. Anfertigen eines Glycerol-Stocks

Reagenzien und Puffer

Glycerol (99%, autoklaviert)

Bakterien aus „Vorkultur“

LBA-Medium

Material und Geräte

NUNC-Kryoröhrchen

Flüssigstickstoff

Vorgehen

1. 150 µl steriles Glycerol in ein NUNC-Kryoröhrchen vorgelegen.
2. 850 µl Bakterienlösung („Vorkultur“) addieren. Die Bakterien müssen sich noch in der logarithmischen Wachstumsphase befinden.
3. Vortexen, Lösung in flüssigem Stickstoff einfrieren und bei -70°C lagern.

4.3.14. Plasmidpräparation mit Midiprep

Die Präparation von Plasmid-DNA wurde nach einem modifizierten Verfahren nach Birnboim und Doly (1979, 1983) durchgeführt. Dabei wurde das „QIAgen Spin Plasmid Kit“ verwendet.

Material und Geräte

Kühlzentrifuge Centrifuge 5403 (Eppendorf)

Tischzentrifuge Biofuge15

500 ml Zentrifugenbehälter

30 ml Corexröhrchen

Reagenzien und Puffer

QIAgen Spin Plasmid Kit:

Resuspensionspuffer P1 (RNase-haltiger TRIS-Puffer mit EDTA)

Lysepuffer P2 (alkalischer SDS-Puffer)

Neutralisationspuffer N3 (natriumacetathaltiger Puffer)

Äquilibrierungspuffer QBT (ethanolhaltiger MOPS-Puffer)

Waschpuffer QC (ethanolhaltiger MOPS-Puffer)

Elutionspuffer QF (ethanolhaltiger Tris-Puffer)

QIAfilter Maxi

QIAGEN-500-Säule

Isopropanol (100%)

4. Material und Methoden

Ethanol (70%, -20°C)

Vorgehen

1. Die 200 ml der Vorkultur in einem 500 ml-Zentrifugenbehälter für 10 min bei 5000 rpm und 4°C zentrifugieren.
2. Überstand verwerfen und das Bakterienpellet in 10 ml Puffer P1 resuspendieren.
3. Lyse der Zellen durch Zugabe von 10 ml Puffer P2 und Inkubation bei Raumtemperatur für 5 min.
4. Zugabe von 10 ml gekühltem Puffer P3.
5. Überführen des Lysats in einen QIAfilter, während zwischenzeitlich die Säule durch Auftragen von 10 ml Puffer QBT äquilibriumiert wird.
6. Das Lysat auf die äquilibriumierte Säule auftragen und Flüssigkeit durchlaufen lassen.
7. Die an die Säulenmatrix gebundene DNA zweimal mit 30 ml Puffer QC waschen.
8. Elution mit 15 ml Puffer QF und Aufnahme des Eluats in einem silikonisierten 30 ml-Corex Röhrchen.
9. Präzipitation der DNA mit 10,5 ml Isopropanol.
10. Zentrifugation für 30 min bei 12.000 rpm und 4°C.
11. Zweimaliges Waschen der gefällten DNA mit 5 ml 70%igem kaltem Ethanol und jeweils anschließend Zentrifugieren bei 12.000 rpm für 15 min.
12. Lufttrocknen des Pellets bei RT und anschließend in 100 µl ddH₂O lösen.
13. Messung der DNA-Konzentration durch spektralphotometrische Analyse und Einstellung auf der cDNA auf 0,2 µg/µl.

Diese DNA wurde dann durch eine analytische Agarosegelelektrophorese überprüft und bei -20°C gelagert.

4. Material und Methoden

4.4. *In-situ* Hybridisierung (ISH)

4.4.1. Beschichten von Objektträgern mit TESAP

Um eine gute Adäsion der Gewebeschnitte auf der Glasoberfläche der Objektträger (OTs) zu gewährleisten, wurden diese mit positiven Ladungen des 3-Amino- propyltriethoxysilan (TESAP) beschichtet.

Reagenzien und Lösungen

Geschirrspülmittel

Isopropanol (70%)

Aceton

TESAP (Merck)

Material und Geräte

Objektträger Superfrost

Objektträgerhalter

Trockenschrank

Schüttler

Vorgehen

1. Die Objektträger in Objektträgerhalter einsortieren und 1 h in einer Spülmittellösung auf einem Schüttler waschen.
2. Spülen mit Leitungswasser, demineralisiertem und schließlich bidestilliertem Wasser.
3. Waschen der Objektträger in 70%igem Isopropanol für 45 min, danach Trocken im Trockenschrank bei 60°C für 3-4 h.
4. Zur Beschichtung Objektträger für 30 sec in eine Lösung aus 2% TESAP und Aceton tauchen, dann zweimal je 30 sec in reines Aceton stellen.
5. Schwenken in demineralisiertem und anschließend bidestillierten Wasser.
6. Trocknen im Trockenschrank bei 42°C.
7. Lagerung bei Raumtemperatur.

4.4.2. Anfertigen von Gewebeschnitten mit dem Gefriermikrotom

Material

Gefriermikrotom (Microm)

Gewebe

TESAP-beschichtete Objektträger (Starfrost)

Tissue-Tek OCT-Compound

4. Material und Methoden

Vorgehen

Die bei -70°C gelagerten Gewebe wurden vor dem Schneiden für 25 min in den Mikrotominnenraum gelegt, um sie der Innenraumtemperatur anzugleichen. Diese lag bei -19°C, die Objekthaltertemperatur bei -17°C. Es empfiehlt sich die Objekthaltertemperatur immer etwas wärmer einzustellen als die Innenraumtemperatur des Kryostaten, da sonst die Schnitte sich schlecht vom Messer abheben lassen. Die Schnittdicke der Hirnschnitte lag bei 20 µm. Die gefrorenen Gewebe wurden unter konstantem Vorschub geschnitten, jeder neue Schnitt auf einem Glasobjektträger (OT) aufgenommen. Die OTs wurden für 10 min bei RT angetrocknet, bevor sie bei -70°C gelagert wurden.

Jeder 19. Schnitt wurde mit Kresylviolett gefärbt, um damit das Bregma anhand des Hirnatlas (Franklin et al., 1997) zu bestimmen.

4.4.3. Herstellung von Ribonukleotidsonden durch in vitro-Transkription

Hier wurde ein von Cox et al. (1984) entwickeltes und von Schäfer und Day (1995) modifiziertes Verfahren eingesetzt.

Reagenzien und Lösungen

α- ³⁵S-UTP (10 mCi/ml, 10µM) (Amersham)

linearisierte Plasmid-DNA (0,2 µg/µl)

NTP-Mix (ATP, CTP, TTP) (je 3,3 mM in ddH₂O)

Dithiotreitol (DTT) (100 mM bzw. 1M)

RNase Inhibitor (10 U/µl, RNase-frei) (Boehringer) 0,5ml-Reaktionstgefäße

SP6- bzw. T7-Polymerase (Boehringer)

Natriumcarbonat (0,2 M, pH 10,2)

Essigsäure (10%)

Szintillationsflüssigkeit Aquasafe 300 Plus

1,1x Hybridisierungs-Puffer: 660 mM NaCl, 11 mM Tris, 1,1 mM EDTA, 0,56 mg/ml tRNA, 1x Denhardt's (50x Denhardt's: 5 g Ficoll, 5 g Polyvinylpyrrolidon, 5 g BSA in 500 ml

Material und Geräte

Wasserbad

Szintillationsgefäße

Zentrifuge Biofuge 15

Szintillationscounter

Vakuumentrifuge Speedvac (Heraeus)

4. Material und Methoden

H₂O), 11% (w/v) Dextransulfat, 110 µg/ml sonicated salmon sperm, 55% Formamid

Mastermix:: H ₂ O	6 µl
Transkriptionspuffer (10x)	6 µl
DTT (100 µm)	6 µl
ATP-Mix	9 µl
RNase-Inhibitor	3 µl

Vorgehen

1. Die Kühlfalle der Speedvac einschalten, das Wasserbad auf 37°C einstellen und die radioaktiven Nukleotide auftauen.
2. In ein steriles 0,5 ml Eppendorfgefäß 15 µl- ³⁵S-UTP pipettieren und für 40 min in der Speedvac eintrocknen.
3. Ansatz der Transkriptionsreaktion:

linearisierte DNA (0,2 µg/µl)	5 µl
Mastermix	4 µl
Polymerase	1 µl
4. Diesen Ansatz in das 0,5 ml Eppendorfgefäß mit dem eingetrockneten α-³⁵S-UTP pipettieren und resuspendieren.
5. Inkubation für 90 min bei 37°C im Wasserbad.
6. Zugabe von 1µl DNase und Inkubation für 15 min bei 37°C.
7. Auffüllen der Ansätze auf 30 µl mit ddH₂O.

Alkalische Hydrolyse der Ribosonden

Bei der alkalischen Hydrolyse wird die RNA der Ribosonden in einzelne Fragmente von ca. 250 Basen Länge zerlegt. Derart kurze RNA-Fragmente garantieren eine gute Penetration der Sonde in das Gewebe. Die Dauer der Hydrolyse T wird nach der Formel von Angerer (Angerer et al., 1987) berechnet:

$$T = (l_o - l_f) / (k \times l_o \times l_f)$$

(wobei T= Hydrolysedauer in min, l_o = Ausgangslänge in kb, l_f = gewünschte Länge in kb, k = Hydrolyskonstante = 0,11 min⁻¹kb⁻¹).

4. Material und Methoden

Dabei ergaben sich folgende Werte:

Sonde	Hydrolysendauer T[min]	Sondenlänge vor Hydrolyse [bp]
mTNFα	14	407
mp55TNFR	18	503
mp75TNFR	23	681
mc-fos	10	352

Reagenzien und Lösungen

NaCO₃ (0,2M, pH 10,2)

Na-Acetat (3M, pH 5,2)

10% Essigsäure

ddH₂O

Material und Geräte

Wasserbad

Szintillationsgefäße

Vorgehen

1. Zugabe von 30 μ l NaCO₃ zu dem Transkriptionsansatz.
2. Hydrolyse im Wasserbad bei 60°C für die jeweils berechnete Hydrolysendauer.
3. Stoppen der Reaktion durch Zugabe von 6 μ l Na-Acetat und 5 μ l 10% Essigsäure.

Vor der Aufreinigung wurden jeder Probe 1,4 μ l (entspricht 2% der Gesamtprobe) entnommen, in ein Szintillationsgefäß mit 15 ml Szintillationsflüssigkeit pipettiert und mit der Hand geschüttelt.

Aufreinigung der Ribosonden

Material und Geräte

Bio-Rad Micro-Spin P-30 Tris Chromatography Columns

Zentrifuge Biofuge 15

Vorgehen

1. Biorad-Säule mit der Hand kräftig schütteln, enthaltenen Puffer ausschütten und für 2 min bei 3600 rpm zentrifugieren.
2. Markierte Ribosonde auf die Biorad-Säule auftragen und für 4 min bei 3600 rpm zentrifugieren.

4. Material und Methoden

3. Probenvolumen (V_{Sonde}) messen und 2% entnehmen.
 4. Diese 2% in ein Szintillationsgefäß mit 15 ml Szintillationsflüssigkeit pipettieren und mit der Hand schütteln. Probe zusammen mit der noch vor der Aufreinigung entnommenen Proben im Szintillationscounter messen.
- Durch den Vergleich beider Werte konnte dann die Einbaurate in Prozent errechnet werden.

Berechnung der aktivität der markierten cDNA Sonde

Endvolumen e = gemessene Radioaktivität nach der Aufreinigung / 50.000 (cpm/ μ l).

Das Volumen des DTT y (in μ l) = $e/50$.

Das Volumen z des Hybridisierungsmix (in μ l) = $e/1,1$

Ist $V_{\text{Sonde}} + y + z < e$, wurde die Differenz mit ddH₂O aufgefüllt.

Verdünnung der Ribosonden

Vorgehen

1. Die aufgereinigte Ribosonde mit dem Hybridisierungsmix, 1M DTT und ggf. ddH₂O auf 50.000 cpm/ μ l verdünnen.
2. Abschließendes Messen von 2% der verdünnten Probe, um die Zielkonzentration von 50.000 cpm/ μ l zu überprüfen.
3. Die fertigen Proben bei -70°C bis zur Verwendung lagern.

Abfallentsorgung

Alle mit ³⁵S kontaminierten Objekte wurden gesammelt und zum radioaktiven Festabfall gegeben. Die Szintillationsgefäße mit Inhalt wurden im Szintillationsabfall entsorgt.

4.4.4. Prähybridisierung

Die Prähybridisierung dient dazu, die mRNA und das Gewebe durch Paraformaldehyd zu fixieren. Durch die TritonX-Behandlung soll die Permeabilität des Gewebes die Penetration von 250 bp langen Ribosonden erlauben, ohne die Integrität des Zellverbandes zu schädigen. Zudem werden unspezifische Bindungsstellen minimiert, indem die positiv geladenen Aminogruppen der

4. Material und Methoden

Proteine mittels Triethanolamine (TEA-Puffer) acetyliert und dadurch neutralisiert werden.

Reagenzien und Lösungen

10x PBS (100mM)

Acetic-Anhydrite (Essigsäureanhydrid)

Triton-Puffer: 0,4% Triton-X100 in PBS (Fluka)

Paraformaldehydpuffer 4% PFA (Merck) in PBS

TEA-Puffer (Sigma)

0,4% Triton-X100 in 1x PBS

Material und Geräte

RNase-freie Rührstäbe

Kunststoffgefäße

Taumlern (Heidolph)

Faltenfilter, Rückhaltebereich 4-7 µm (Schleicher & Schuell)

Herstellen des Paraformaldehydpuffers

1. 60 g Paraformaldehyd unter Abzug einwiegen und in 750 ml 55°C heißem ddH₂O lösen.
2. Rühren der trüben Lösung unter Zugabe von NaOH (gesättigt) bis sie klar wurde.
3. Zugabe von 750 ml PBS (1:5)
4. Abkühlen lassen bei Raumtemperatur und pH-Wert mit rauchender HCl auf 7,4 einstellen.
5. Filtrieren durch Faltenfilter und anschließende Lagerung bei 4°C.

Herstellen des 10x PBS: 100mM Phosphat, 1,55M NaCl (=9% w/v)

Na ₂ HPO ₄ * 12H ₂ O	551,3
NaH ₂ PO ₄ * 1H ₂ O	63,5
NaCl	1800g

Einwiegen und mit 17l ddH₂O auffüllen. pH auf 6,75 einstellen.

4. Material und Methoden

Herstellen von TEA-Puffer

20 ml TEA in 1480 ml ddH₂O geben und für 10 min rühren.

pH mit HCl konz. auf 8,0 einstellen.

Vorgehen

1. Die Gewebeschnitte auftauen und lufttrocknen.
2. Fixieren der Gewebe in PFA-Puffer für 60 min bei RT auf dem Taumler.
3. 3x Waschen in 1x PBS für je 10 min.
4. Inkubation in Triton-Puffer für 10 min.
5. Spülen mit ddH₂O für 1 min.
6. Acetylieren der Gewebeschnitte. Dazu die OTs in den TEA-Puffer stellen und unter heftigem Rühren für 1 min inkubieren, anschließend 1,25 ml Acetic-Anhydrite dazugeben. Unter starkem Rühren 10 min bei RT inkubieren.
7. Waschen in 1xPBS für 10 min und in ddH₂O für 1 min.
8. Entwässern in 70% und 50% Ethanol.
9. OTs für 15 min an der Luft trocknen, dann sofort hybridisieren oder bei -20°C lagern.

4.4.5. Hybridisierung

Reagenzien und Lösungen

radioaktiv markierte Ribonukleotidsonde

Hybridisierungskassetten

prähybridisierte Gewebeschnitte (OTs)

Material und Geräte

Hybridisierungssofen

Vorgehen

1. Trocknen der bei -20°C gelagerten OTs für ca. 20 min bei RT. Auftauen der radioaktiv markierten Sonden.
2. Aufbringen von je 30 µl Sonde pro OT und Auflegen eines Deckgläschens.
3. Hybridisierung für 14 h bei 58°C in mit 50% Formamid benetzten Kassetten.

4. Material und Methoden

4.4.6. Posthybridisierung

Dabei wurden die Schnitte mit steigender Stringenz (abnehmende Salzkonzentration, höhere Temperatur) gewaschen. Zudem eliminierte ein RNase-Verdau nichthybridisierte, also noch einsträngige RNA, während die doppelsträngigen, spezifischen Hybride erhalten blieben.

Reagenzien und Lösungen

20x SSC

RNase-Puffer

Kunststoffgefäße (1l)

Herstellen des RNase-Puffers

1M Tris-HCl, pH 8,0

5M NaCl

0,5M EDTA

10 mg/ml Rnase A

100000 U/ml Rnase T1

ddH₂O

Material und Geräte

Magnetrührer mit Heizplatte

Wasserbad

1500 ml	Final
15 ml	10mM
150 ml	0,5M
3,0 ml	1mM
6 ml	20µg/ml
15 µl	1 U/ml
1326 ml	

Herstellen von 20x SSC, pH 6,3

NaCl

876,5 g

Natriumcitrat

441 g

Die Salze wurden in knapp 5000 ml H₂O gerührt, der pH-Wert mit 10N NaOH auf 6,3 eingestellt.

Vorgehen

1. Erwärmen des RNase-Puffers im Wasserbad auf 37°C.
2. Die Hybridisierungskassetten unter dem Abzug öffnen (CAVE Formamid-dämpfe), die Deckgläser seitlich mit einer Pinzette abziehen, die OTs kurz in 2x SSC spülen und dann in 2x SSC überführen.
3. Es folgten mehrere Schritte mit absteigenden Salzkonzentrationen, die, soweit nicht anders angegeben unter Rühren auf dem Magnetrührer bei Raumtemperatur erfolgten.

2x SSC

20 min

1x SSC

20 min

4. Material und Methoden

RNase-Puffer, im Wasserbad bei 37°C	30 min
1x SSC	15 min
0,5x SSC	15 min
0,2x SSC	15 min
0,2x SSC	60 min, 60°C
0,2x SSC	15 min
ddH ₂ O	10 min
Entwässern in 50% Ethanol	je 1 min
Entwässern in 70% Ethanol	je 1 min

4. Lufttrocknen der Präparate.

4.4.7. Detektion radioaktiver Signale mit Autoradiogrammen

Die Detektion erfolgt mit Hilfe von Röntgenfilmen. Neben den Gewebeschnitten wurde zudem ein Radioaktivitätsstandard (Amersham) beigelegt um die Signalstärken bewerten zu können.

Material und Geräte

Amersham β -Max Film

Autoradiographiekassette (Amersham)

Photolabor

Radioaktivitätsstandart ARC146 (American Radiolabeled Chemical Inc.)

Reagenzien und Lösungen

Entwickler: Superfix (Tetenal)

Fixierer: Roenteroll (Tetenal)

Vorgehen

1. Film in der Dunkelkammer auflegen und für 3 Tage bei RT exponieren.
2. Entwickeln des Films für 4 min im Entwickler bei Raumtemperatur.
3. Spülen für 1 min im Wasserbad.
4. Fixation für 10 min im Fixierer.
5. Wässern für 10 min.
6. Trocknen im Wärmeschrank für 45 min.

4. Material und Methoden

4.4.8. Detektion radioaktiver Signale im Gewebeschnitt mittels Photoemulsion

Reagenzien und Lösungen

Entwickler für ISH (D19, Kodak)

Fixierer für ISH (Hypam Superfix, Ilford)

Aluminiumfolie

Photoemulsion NTB2 (Kodak): Die auf 42°C vorgewärmte Photoemulsion wurde mit ddH₂O, das einige Körnchen Detergens enthielt 1:1 verdünnt, zu 20 ml Portionen aliquotiert und lichtgeschützt bei 4°C gelagert.

Material und Geräte

Wasserbad in der Dunkelkammer

Dippinggefäß (Amersham)

Vorgehen

1. In der Dunkelkammer wurde bei schwachem Rotlicht die Photoemulsion im Wasserbad für 1h auf 37°C vorgewärmt, das Dippinggefäß dann mit Blasenfreier Emulsion gefüllt, ggf. musste gewartet werden bis vorhandene Luftblasen an die Oberfläche gestiegen und zerplatzt waren.
2. OTs senkrecht in die Emulsion tauchen, am unteren Ende abtupfen und zum Trocknen über Nacht in einen Halter stellen.
3. Transfer der getrockneten Präparate in mit einigen Kapseln Silikagel gefüllte Präparatekästen und einwickeln in eine doppelte Schicht aus Alufolie.
4. Präparate bei 4°C exponieren.
5. Nach Expositionszeit von 3 Wochen die OTs für 4 min in Entwickler tauchen und kurz in Wasser spülen.
6. Fixierung für 10 min im Fixierbad, 1h Wässern unter fließendem Wasser. Anschließend sollte die Rückseite der OTs von Photoemulsion befreit werden.

4.4.9. Histologische Färbemethode

4.4.9.1 Kresylviolett Färbung

Lösung

Kresylviolett-Färbelösung (0,5% w/v): Sie besteht aus 0,5% Kresylviolett (Fluka) in 60 mM Natriumacetat (Merck) und 340 mM Essigsäure gelöst in 0,1%-igem DEPEC-Wasser (Diethylpyrocarbonat, US Biological). Die Lösung

4. Material und Methoden

wird im Dunkeln 7 Tage bei RT gerührt und danach filtriert.

Vorgehen

1. Kresylviolett 15 min
2. Waschen mit fließendem Wasser 3 min
3. Differenzieren in 70% Ethanol 1-2 min
4. 80% Isopropanol 3 sec
5. 96% Ethanol 30 sec
6. 100% Ethanol 2x2 min
7. Xylol 3x5 min
8. Eindeckeln mit DEPEX

4.4.9.2 Hämatoxylin/Eosin Färbung

Vorgehen

1. Entparaffinierung der Schnitte in Xylol 3x10 min
2. Hydrierung in absteigender Isopropanolreihe (100%, 96%, 80%, 70%) und ddH₂O über jeweils 5 min
3. Färbung in Hämalaunlösung 5 min
4. Wässern unter fließendem Leitungswasser 10 min
5. Färbung in Eosinlösung 1 min
6. Dehydrierung in aufsteigender Alkoholreihe (70%, 80%, 90%, 96%, 100%) über jeweils 5 min
7. Xylol 3x10 min
8. Eindeckeln in Depex

4.4.10. Mikroskopische Analyse

Die Analyse der gefärbten Gewebeschnitte wurde mit einem Olympus AX70 Mikroskop sowohl im Dunkel- als auch im Hellfeld durchgeführt.

4.4.11. Quantifizierung der Autoradiogramme mit MCID

Die relative optische Dichte der einzelnen hybridisierten Gewebeschnitte wurde mit densitometrischer Bestimmung der Röntgenfilme mittels Leuchttisch und digitaler Kamera (Kamera MIT CCD72 mit Micro-Nikkon 55mm Objektiv)

4. Material und Methoden

gemessen. Die im Gewebeschnitt enthaltene Radioaktivität wurde anhand von Gewebeäquivalenten, die sich auf den Radioaktivitätsstandards (ARC 14C Standard) befanden errechnet.

4.4.12. Statistische Analyse

Die statistische Auswertung erfolgte mit einer Einfaktoriellen Varianzanalyse, Anova Test (=ANalysis Of VAriance), die als Erweiterung des Zweiprobentstich t-Tests gilt. Dabei wird die Hypothese überprüft, ob Mittelwerte der Kontrollgruppe mit Mittelwerten der Versuchsgruppe identisch sind (Nullhypothese H_0). Diese Nullhypothese wird verworfen, wenn der p-Wert kleiner als α war. Aufgrund des p-Wertes wurde das Testergebnis in Kategorien eingeteilt:

$p < 0,05$ (*): signifikant

$p < 0,01$ (**): hoch-signifikant

$p < 0,001$ (***): höchst-signifikant

4.5. Confokale Laserscanning Mikroskopie

4.5.1. Fixierung der Gewebe

Die Gehirne wurden direkt nach Entnahme in Bouin-Holland'scher Lösung gegeben.

Herstellung der Bouin-Holland'schen Lösung

1. Auflösen von 25g Kupfer-II-Acetat in Aqua bidest.
2. Hinzufügen von 60 g Pikrinsäure + 50% H_2O .
3. Auffüllen mit Aqua bidest. auf 1000 ml.
4. Filtrieren der Lösung.
5. Aufbewahrung über bei $+4^0$ C.
6. Zugabe von 10 ml Formaldehydlösung (37%ig, säurefrei) und 1 ml Eisessig zu jeweils 100 ml Bouin'scher Lösung.

4. Material und Methoden

Nach Fixierung der Gewebe in Bouin-Holland'scher Lösung für 48 h wurde das Fixants mit 70%-igem Alkohol, der über 6 Wochen täglich erneuert wurde ausgewaschen.

4.5.2. Einbettung und Schneiden der Gewebe

Die Gehirne wurden hierzu in einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert. Dann mit einem Frontalschnitt in anteriore und posteriore Hälfte geteilt und in Paraffin (Paraplast Plus, Merck, Darmstadt, Germany) eingebettet. Mit dem Rotationsmikrotom wurden 7 µm dicke Schnitte in der Frontalebene angefertigt.

Vorgehen der Gewebeschnittherstellung

1. Entgasen und anschließend Erwärmen von H₂O auf 42⁰ C.
2. Ausrichten des Blocks in der Frontalebene.
3. Anfertigung von Folgeschnitten (7 µm).
4. Trocknen des Schnitts über 30 min bei 37⁰ C auf der Heizplatte.
5. Trocknen der Objektträger bei 52⁰ C im Umluftofen über mindestens 7 h.
6. Lagerung bei Zimmertemperatur bis zur Weiterverarbeitung.

Zur Orientierung wurde eine Übersichtsfärbung in Hämatoxylin/Eosin durchgeführt

4.5.3. Immunzytochemie

Antikörper und Detektionssysteme

Die Detektion im Gewebe gebundener Antikörper erfolgte durch Sekundärantikörper und eine streptavidingekoppelte, biotinylierte Peroxidase mit anschließender Visualisierung durch Fluorochrome. Unspezifische Bindungen der Sekundärantikörper wurden ausgeschlossen, indem in entsprechenden Kontrollschnitten der Primärantikörper nicht aufgetragen und volumenäquivalent durch PBS-Puffer ersetzt wurde. Diese Schnitte zeigten keine Bindung der verwendeten Sekundärantikörper.

4. Material und Methoden

Primärantikörper	Bezeichnung	Verdünnung	Fluoreszenz
p55TNFR	NF-R1 [G20]: sc-1069	1:10	Alexa Fluor 647, 1:100
NeuN	Clone A60, MAB377	1:15	Alexa Fluor 488, 1:200

Lösungen und Chemikalien

Xylol

absteigende und aufsteigende Isopropanolreihen

Methanol

H₂O₂

Aqua bidest

Flurosafe

BSA Puffer: BSA in 50mM PBS

50 mM Phosphatpuffer: 9,5 mM Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat +
40,5 mM Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat

DAB-Lösung: 12,5 mg/ml Diaminodenzidin + 75mg/ml, Nickel-
Ammoniumsulfat

10 mM Citratpuffer: 0,01M Natriumcitratpuffers + 0,1 M Zitronensäure
+0,1 M Natriumcitratlösung

Primärantikörper

biotinylierter Sekundärantikörper

Streptavidin-Peroxidase

Geräte

PAP-Pen

Kochtopf

Kochplatte,

Thermometer

Deckgläschen

Ständer

Saugpumpe

Durchführung der Immunhistochemie:

1. Entparaffinieren der Schnitte in Xylol (3x10 min).
2. 100% Isopropanol (2x10 min).
3. Wässern in 3x100% Isopropanol (je 10 min) und 96%, 80%, 70% (je 5 min) und ddH₂O (2x5 min) parallel Erwärmen von 3 l 0,01 M Natriumcitratpuffer auf 95° C.
4. Kochen der Objektträger bei 85-92⁰ C (10 min).
5. Wässern in ddH₂O (2x10 min).
6. Trockensaugen und Umranden der Schnitte mit dem PAP-Pen.
7. Blockierung unspezifischer Bindungen in 5% BSA Puffer (30 min).
8. Waschen in 1% BSA-Puffer (3x5 min).

4. Material und Methoden

9. Trockensaugen der Schnitte und Auftragen beider Primärantikörper in der vorher optimierten Konzentration.
10. Inkubation im Wärmeschrank über Nacht bei 16⁰ C, anschließend 2 h bei 37⁰ C.
11. Entfernen von Antikörperüberschuss durch Waschen in ddH₂O (3x5 min).
12. Waschen in 50 mM Phosphatpuffer (10 min).
13. Trockensaugen des Schnittes und Auftragen der beiden jeweils für einen Erstantikörper spezifischen Sekundärantikörper in der entsprechenden Arbeitsverdünnung. Ein Sekundärantikörper ist direkt fluorochrommarkiert, der andere Sekundärantikörper ist biotinyliert.
14. Inkubation bei 37⁰ C im Wärmeschrank (45 min).
15. Waschen in Aqua bidest (3x5 min).
16. Waschen in 50 mM Phosphatpuffer (10 min).
17. Trockensaugen des Schnittes und Auftragen des biotinylierten zweiten Fluorochroms.
18. Inkubation bei 37⁰ C im Wärmeschrank (2 h).
19. Waschen in Aqua bidest (3x5 min).
20. Waschen in 50 mM Phosphatpuffer (10 min).
21. Waschen in H₂O (10 min).
22. Eindeckeln der gefärbten Schnitte mit Objektträgergläschen in Fluorosafe.

Auswertung der Immunzytochemischen Färbungen

Auswertung und Dokumentation erfolgte am Confokalen Laser Scanning-Mikroskop BX50 WI von Olympus.

4.6. Laser Capture Microdissection (LCM)

Bei der LCM werden einzelne Zellen mittels Laser aus dem Gewebeverband eines histologischen Schnittes mikrodisektiert. Dem gesamten Gewebe liegt eine thermoplastische Folie auf, die durch den Laserstrahl verformt wird und dadurch eine einzelne Zelle an die Folie adhärirt. Sowohl das Gewebe als auch der Laserstrahl werden durch ein Mikroskop betrachtet, dessen Bilder von einer Videokamera auf dem Bildschirm sichtbar sind, so dass jede gewünschte Zelle mit dem Laser anvisiert und dissektiert werden kann. Schließlich wird die Folie vom Gewebe abgehoben, alle an die Folie fixierten Zellen werden so aus

4. Material und Methoden

dem Gewebeverband entfernt, während das restliche Gewebe auf dem Objektträger verbleibt. Hochspezifisch können damit individuelle Zellen und somit definierte Zelltypen (Neurone, Oligodendrozyten u.a.) zur mRNA-, DNA- oder Protein-Extraktion isoliert werden.

4.6.1. Microdissection

Reagenzien und Lösungen

Kresylviolett (Fluka)

0,1%-iges DEPEC H₂O (US Biological)

Material und Geräte

Arcturus PixCell Ile Laser Capture

Microdissection System (Arcturus)

CapSure Macro LCM Caps (Arcturus)

Kryostat

Unbeschichtete Objektträger

Kryogewebe

Vorgehen

1. Im Kryostaten 10 µm dicke Gewebeschnitte herstellen.
2. Trocknen der Schnitte für 5 min bei RT.
3. Schnitte mit Kresylviolett färben, wobei hier kürzere Färbezeiten als bei der oben beschriebenen Kresylviolett Färbung verwendet wurden:

Kresylviolett	1 min
ddH ₂ O	30 sec
Differenzieren in 70% Ethanol	20 sec
100% Isopropanol (I)	30 sec
100% Isopropanol (II)	60 sec
Xylol (I)	5 min
Xylol (II)	5 min
Schnitte lufttrocknen	30 min

4. Mikrodisektion:

Power	Duration	Repeat	Target	Spot
65 mW	1,4 ms	0,2	0,120 V	7,5 µm

Folgende Regionen wurden gewählt: frontaler Kortex, Lamina V, 250 spots
Corpus callosum, 250 spots
Ncl. n. hypoglossi, 60 spots

4. Material und Methoden

Nach der Dissektion wurde das CapSure Macro LCM Cap entnommen und auf ein 0,5 ml Eppendorf Gefäß anstatt des Deckels gesetzt, das mit 0,8 µl β-Mercaptoethanol in 100 µl Lysis Puffer gefüllt war.

4.6.2. RNA-Extraktion aus den LCM Proben

Da es sich um sehr kleine Proben, und damit geringste Mengen an mRNA handelte, wurde ein für die LCM optimiertes Extraktionskit verwendet.

Reagenzien und Lösungen

Glykogen (20µg/µl)

70% Ethanol (-20°C)

100% Isopropanol

Absolutely RNA Microprep Kit (Stratagene), enthält alle im folgenden erwähnten Reagenzien, soweit nicht anders beschrieben

Material und Geräte

Wasserbad

Tischzentrifuge

Vorgehen

1. In ein 0,5 ml Eppendorf Gefäß je 0,7 µl β-Mercaptoethanol und 100 µl Lysis Puffer pipettieren.
2. Nach der Dissektion die Eppendorf Gefäße mit dem die Zellen tragenden CapSure Macro Cap auf dem Kopf stellen und über Nacht bei 4°C lagern.
3. Vortexen für 30 sec, dabei mehrmals invertieren.
4. Zugabe von 100 µl 70% Ethanol und vortexen für 5 sec.
5. Transfer der Lösung in ein RNA-Binding Spin Cup und Zentrifugation für 1 min bei 13.000 rpm.
6. Waschen mit 600 µl 1x Low Salt Wash Buffer und Zentrifugation für 1 min.
7. Zentrifugation für 2 min zum Trocknen des Spin Cup.
8. Herstellung der DNase-Lösung, indem 5 µl DNase (9U/µl) zu 25 µl DNase-Puffer pipettiert werden.
9. Zugabe von 30 µl DNase-Lösung zur Probe und Inkubation bei 37°C im Wasserbad.
10. Zugabe von 500 µl 1x High-Salt Buffer und Zentrifugation für 1 min bei 13.000 rpm.
11. Zugabe von 600 µl 1x Low-Salt Buffer und Zentrifugation für 1 min bei 13.000 rpm.

4. Material und Methoden

12. Addition von 300 µl 1x Low-Salt Buffer und Zentrifugation für 2 min.
13. Transfer der Lösung in ein 1,5 ml Eppendorf Gefäß und Zugabe von 30 µl Elutionspuffer. Inkubation für 2 min bei RT.
14. Zentrifugieren für eine 1 min bei 13.000 rpm.
15. Wiederholung von Schritt 12, um die mRNA-Ausbeute zu erhöhen.
16. Fällern der so gewonnene mRNA durch Zugabe von 1,5 µl Glykogen und 60 µl 100% Isopropanol 30 min bei -70°C.
17. Zentrifugation mit 13.000 rpm für 15 min.
18. Verwerfen des Überstands, Zugabe von 100 µl 70% Ethanol (-20°C), Vortexen und zentrifugieren mit 13.000 rpm für 10 min.
19. Das Pellet für 5-10 min an der Luft trocknen und in 10 µl ddH₂O lösen.

4.6.3. Reverse Transkription (RT)

Die RT wurde für die Mikrodissektion wie in 2.5. beschrieben durchgeführt, jedoch a) ohne die mRNA am Ende zu verdünnen, so dass man pro Probe 20µl cDNA für die PCR erhielt und b) ohne eine photometrische Quantifizierung, da die zu messende mRNA-Menge unter der Nachweisgrenze des Photometers lag. Deshalb kann man nur annäherungsweise von gleichen Ausgangsmengen mRNA in jeder Probe ausgehen.

4.6.4. PCR der cDNA aus der LCM

Die PCR wurde als Touch-Down PCR durchgeführt. Pro 25 µl-Ansatz wurden für alle Primer 5 µl der cDNA eingesetzt, außer für β-Actin, bei dem 1,25 µl verwendet wurden. Verwendete Primer siehe 4.3.4.

Programm Touch-down

Step	Temperatur	Dauer in min
1	94,0°C	4:00
2	94,0°C	0:30
3	70,0°C	3:00
4	5x Wiederholung Step 2-3	
5	94,0°C	0:30
6	68,0°C	3:00
7	5x Wiederholung Step 5-6	
8	94,0°C	0:30
9	60,0°C	0:30
10	72,0°C	3:00

4. Material und Methoden

11	18x Wiederholung Step 8-10	
12	94,0°C	0:30
13	58,0°C	0:30
14	72,0°C	3:00
15	18x Wiederholung Step 12-14	
16	94,0°C	0:30
17	56,0°C	0:30
18	72,0°C	3:00
19	18x Wiederholung Step 16-18	
20	72,0°C	5:00
21	8,0°C	∞

(für mβ-Actin 33 Zyklen)

Die Analyse der amplifizierten cDNA Fragmente erfolgte im Agarosegel.

Kapitel 5

Ergebnisse

5.1. Expression von c-fos mRNA im hypothalamischen Ncl. paraventricularis (PVN)

Die Applikation von LPS wie auch von SEB führte im hypothalamischen Ncl. paraventricularis (PVN) nachweislich zu einer Induktion von c-fos mRNA. Die *in-situ* Hybridisierungsanalysen zeigten eine deutliche Expression der c-fos mRNA im PVN, nicht aber im umgebenden Parenchym (Abb. 5.1). Hybridisierungen mit der sense-Probe ergaben keine Signale (Daten nicht gezeigt). Der Nachweis induzierter c-fos mRNA im PVN nach Gabe von LPS und SEB belegt, dass beide Mitogene, die durch unterschiedliche Aktivierungsmechanismen das Immunsystems stimulieren, gleichermaßen zu einer nachweisbar erhöhten neuronalen Aktivität im ZNS führen.

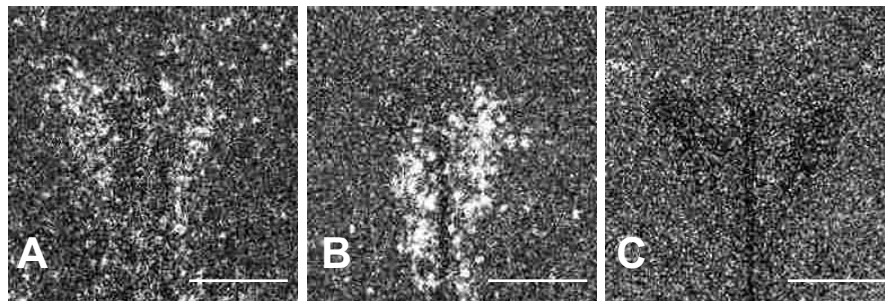


Abb. 5.1.: Nachweis der c-fos mRNA mittels ISH in Dunkel-Aufnahmen. 4 Stunden nach LPS (A) und SEB-Gabe (B) ist c-fos mRNA im Nucleus paraventricularis (PVN) des Hypothalamus induziert. Im sham-behandelten Tier (C) findet sich dagegen keine Expression von c-fos mRNA. Gezeigt werden repräsentative Gewebeschnitte aus einem Einzel-experiment mit n=2 und s=6 Gewebeproben. Balken: 200 μ m.

5.2. Expression von TNF α , p55TNFR und p75TNFR mRNA in Kontrolltieren

TNF α und p75TNFR mRNA wurde durch die Autoradiographie in keiner Region des Gehirns der sham-behandelten Tiere detektiert (Abb. 5.3., 5.5., Tab. 3).

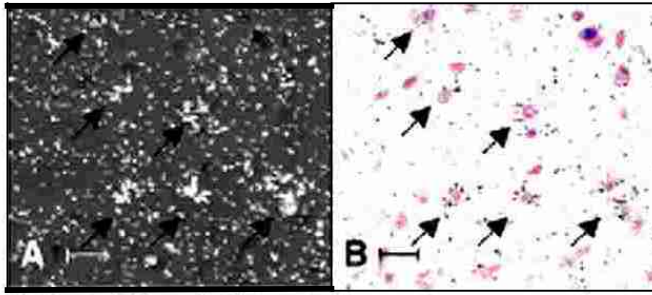


Abb. 5.2.: Nachweis der konstitutiven Expression von p75TNFR mRNA.

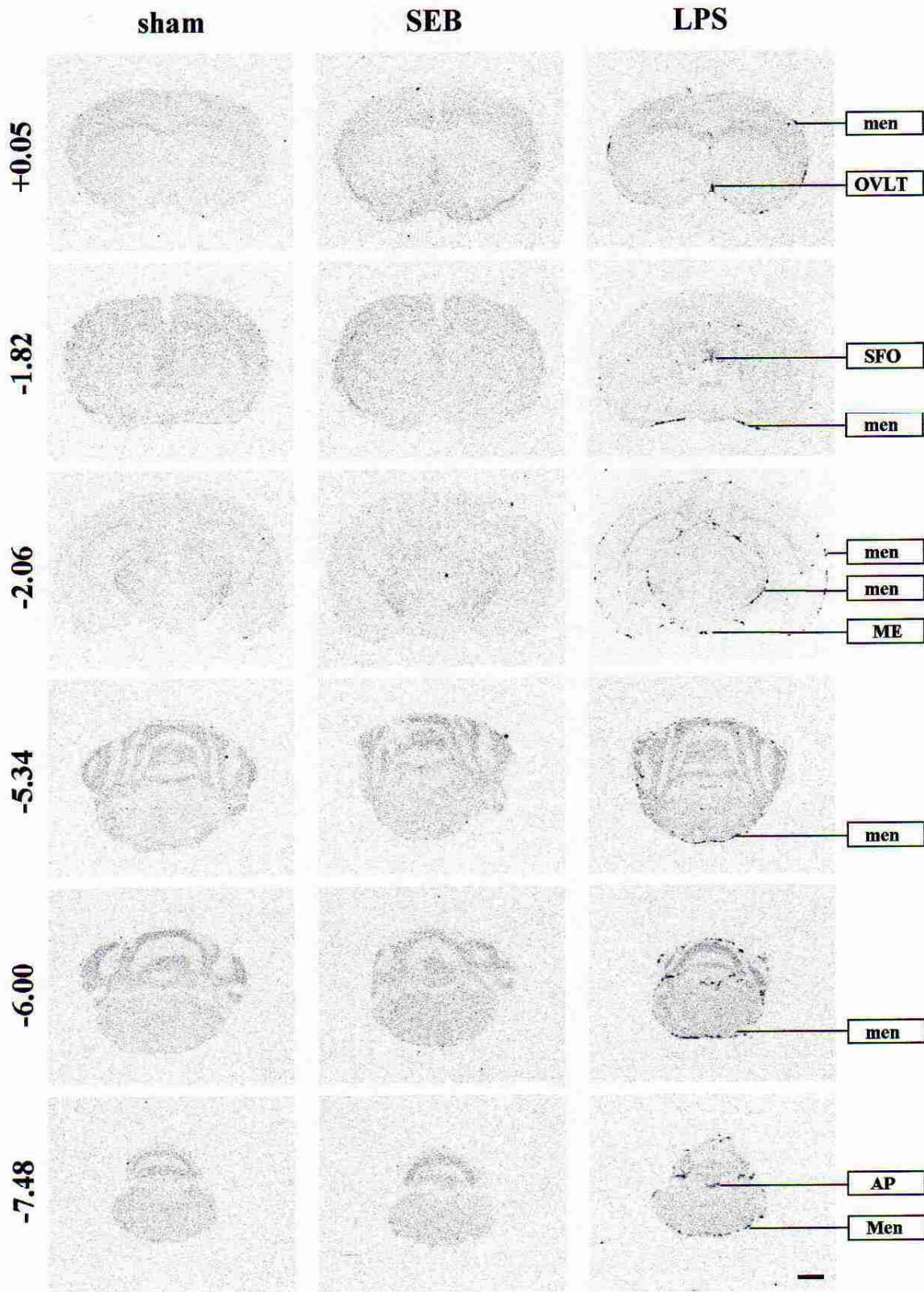
Emulsions-beschichtete Autoradiogramme zeigen in der Dunkelfeldanalyse im Mikroskop ein disseminiertes Expressionsmuster von p75TNFR mRNA-positiven Signalen (A). Diese können in der K.V.-gegegengefärbten Hellfeldanalyse kleinen intensiv gefärbten Zellkernen zugeordnet werden (B). Gezeigt ist ein repräsentativer Gewebeschnitt des Cortex aus n=25 Tieren. Balken 10 μ m

In den emulsions-beschichteten Autoradiogrammen von frontalen Hirnschnitten zeigten sich für TNF α mRNA lediglich Signale in oder nahe bei den Meningen, die jedoch sehr schwach vorhanden waren. mRNA für p75TNFR wurde in den emulsions-beschichteten Hirnschnitten überall im Gehirn relativ schwach über kleinen, dissiminiert verteilt-

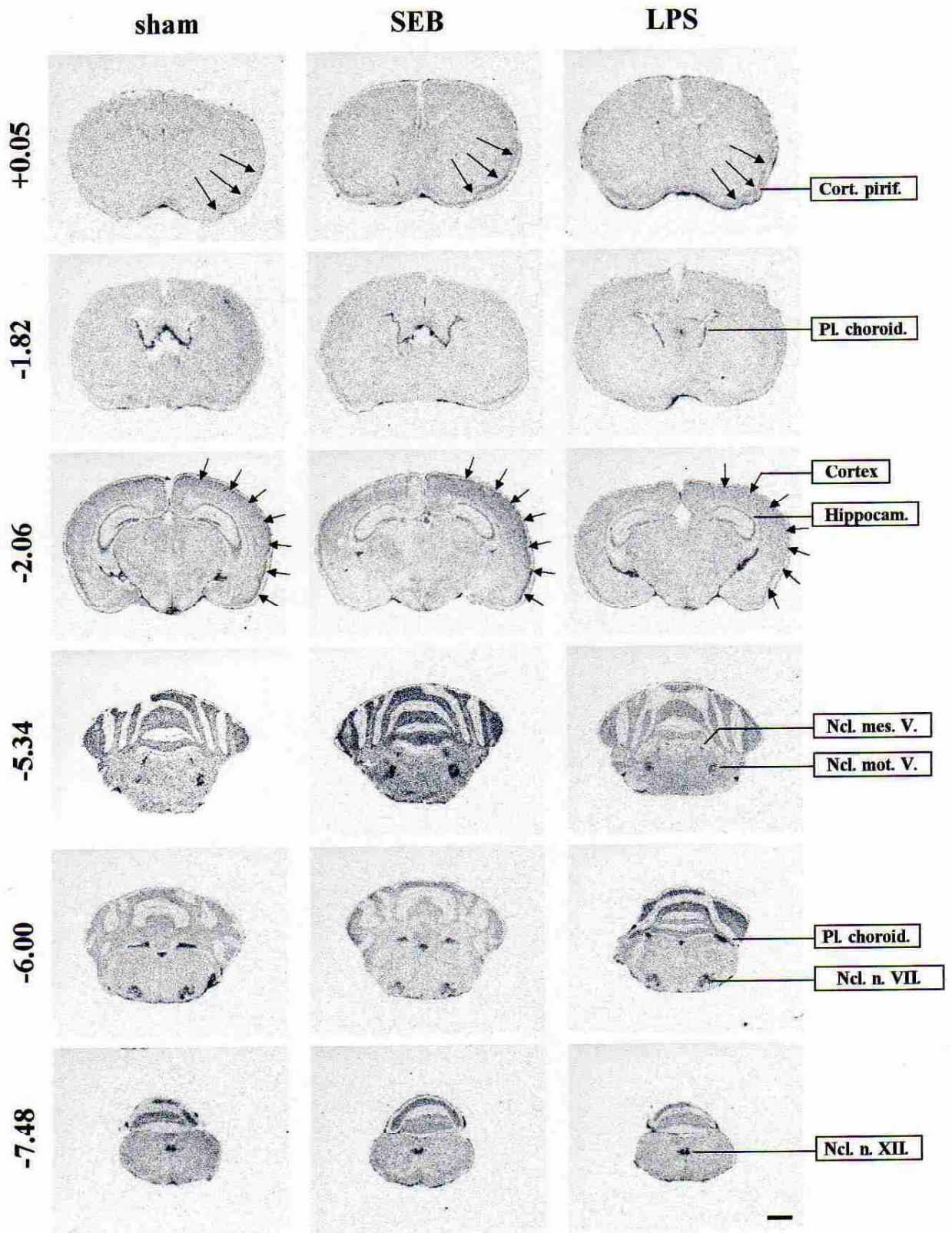
en Zellen beobachtet (Abb. 5.2.). Deren Zellkerne waren kleiner und in der KV-Färbung stärker gefärbt als die von Nervenzellen. Das dissiminierte Verteilungsmuster dieser gleichmäßig verteilten und auch in der weissen Substanz vorhandenen Zellen lässt vermuten, dass es sich dabei um gliöse, non-neuronale Zellen, am wahrscheinlichsten Mikroglia handelte.

Die mRNA für p55TNFR zeigte eine starke konstitutive Expression im Neokortex, Hippokampus, Cerebellum, in Kerngebieten im Hirnstamm wie dem Ncl. motorius n. trigemini, Ncl. mesencephalicus n. trigemini, Ncl. n. facialis, Ncl. n. hypoglossi, in den Plexus choroidei und den Meningen (Abb. 5.4., 5.6.). Die kortikalen Signale waren frontal betont und stärker in den äußeren Laminae (Lamina I-III/IV) des Neokortex verteilt (Abb. 5.4.). Es gab keine Unterschiede zwischen den untersuchten Zeitpunkten der Kontrolltiere (1, 4, 8, 12 und 24h nach sham-Injektion). Diese Beobachtung wurde in den emulsions-beschichteten Gewebeschnitten bestätigt. Zudem zeigte diese noch sensitivere Methode schwache Signale über fast allen Neuronen im Hirnstamm und im Stratum ganglionare des Cerebellums (Abb. 5.6.).

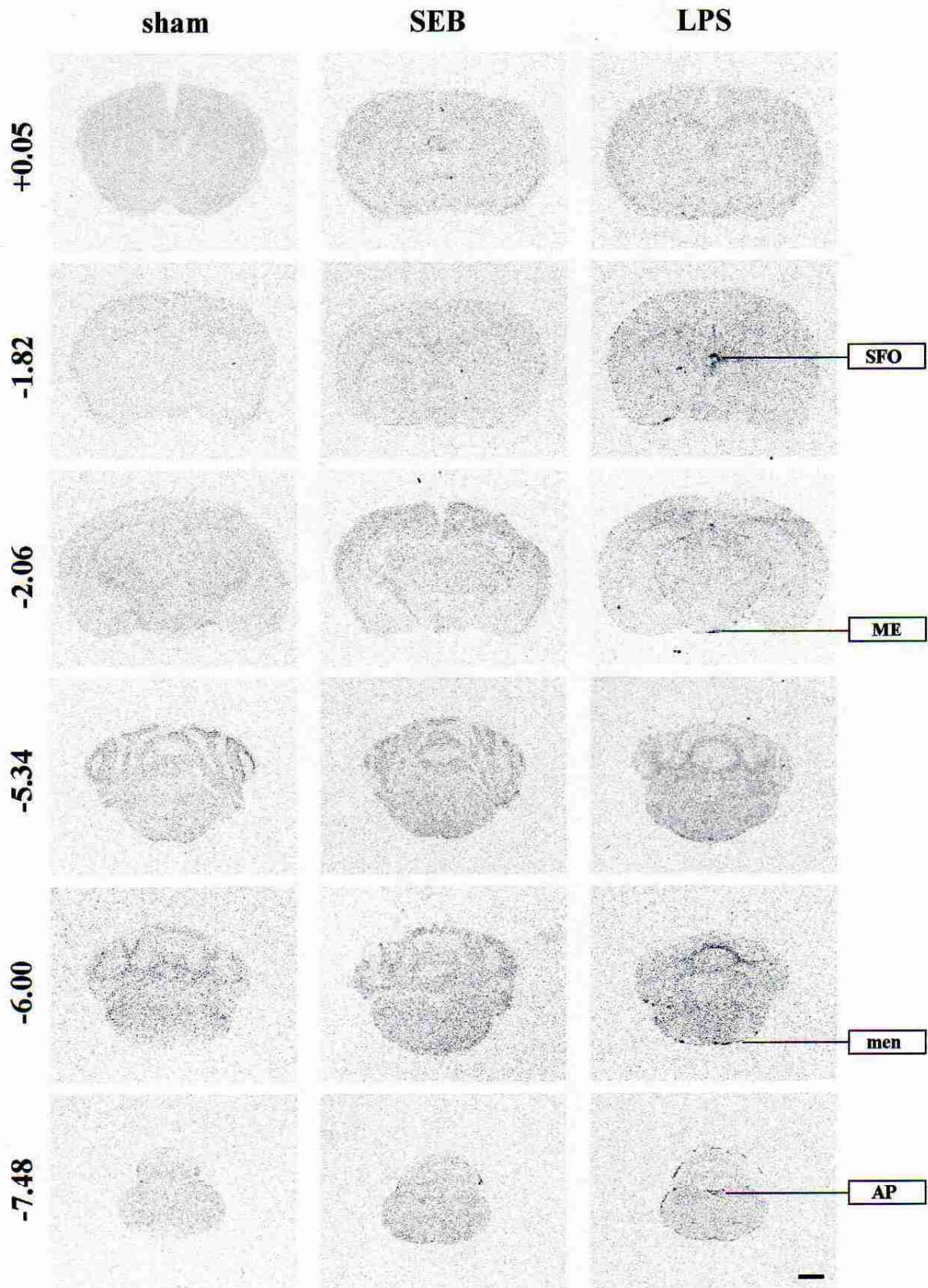
TNF α mRNA 1 h p.i.



p55TNFR mRNA 1 h p.i.



p75TNFR mRNA 1 h p.i.



5. Ergebnisse

Abb. 5.3., S. 63: Nachweis der TNF α mRNA in Autoradiogrammen.

Frontalschnitte unterschiedlicher Bregmaebenen wurden mit ^{35}S -markierter cRNA spezifisch für TNF α hybridisiert. ISH-Autoradiogramme von einem sham-behandelten Tier (linke Spalte), einem mit SEB stimulierten Tier (mittlere Spalte) und einem mit LPS stimulierten Tier (rechte Spalte) jeweils 1h nach i.p. Injektion der Substanz. Gezeigt sind repräsentative Autoradiogramme von n=5 Tieren mit 3-5 Gewebeschnitten pro Tier. Die gezeigten Bregmaebenen sind am linken Rand angegeben.

Nur in den LPS-stimulierten Tieren zeigte sich eine Expression von TNF α mRNA in den Meningen (men), dem Subfornikalorgan (SFO), der Eminentia mediana (ME) und der Area postrema (AP). Balken: 1 mm.

Abb. 5.4., S. 64: Nachweis der p55TNFR mRNA in Autoradiogrammen.

In den sham-behandelten Tieren zeigte sich eine starke Expression der p55TNFR mRNA im Cortex piriformis (Cort. pirif., Pfeile), Cortex (Cortex, Pfeile), Plexus choroideus (Pl. choroid.), Hippocampus (Hippocamp.), Ncl. mesencephalicus n. trigemini (Ncl. mes. V.), Ncl. motorius n. trigemini (Ncl. mot. V.), Ncl. n. facialis (Ncl. VII) und Ncl. n. hypoglossi (Ncl. XII). Dieses Verteilungsmuster änderte sich nicht nach SEB- oder LPS-Gabe. Bregmaebenen und Anzahl der untersuchten Tiere, bzw. Gewebeschnitte wie Abb. 5.3.. Balken: 1 mm.

Abb. 5.5., S. 65: Nachweis der p75TNFR mRNA in ISH-Autoradiogrammen.

In sham- und SEB-behandelten Tieren war 1h p.i. keine p75TNFR mRNA zu sehen. Nach LPS-Stimulation kam es zu einer p75TNFR mRNA-Expression in den Meningen (men), dem Subfornical Organ (SFO), der Eminentia mediana (ME) und der Area postrema (AP). Bregmaebenen und Anzahl der untersuchten Tiere, bzw. Gewebeschnitte wie Abb. 5.3.. Balken: 1 mm.

5.2.1. Quantifizierung der ISH-Autoradiografien für p55TNFR

Die meisten Signale der TNF α und p75TNFR mRNA lagen unterhalb der Sensitivitätsgrenze der Röntgenfilme und waren nur in den emulsions-beschichteten Hirnschnitten nachweisbar. Nur die Signale für p55TNFR waren in den Auto-

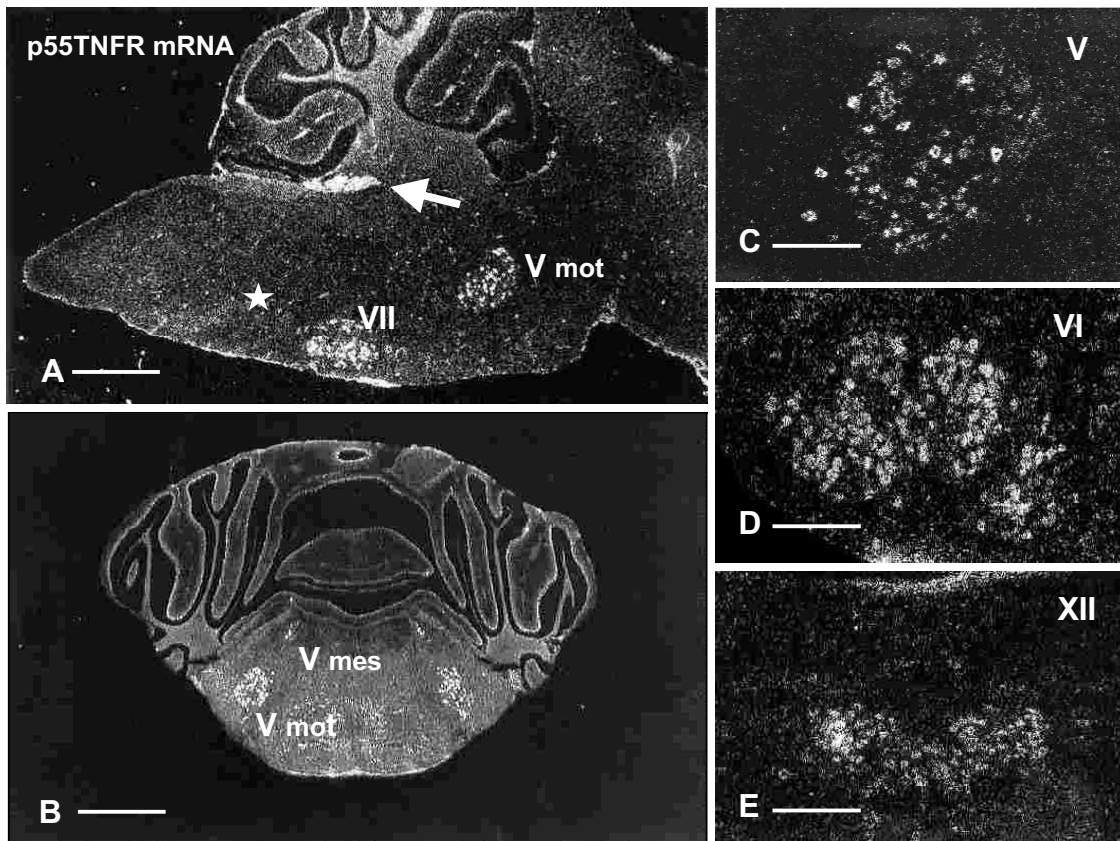


Abb. 5.6.: Nachweis der p55TNFR mRNA in Dunkelfeld-Aufnahmen von emulsionsbeschichteten Autoradiogrammen. (A) In der Sagittalansicht des Hirnstamms zeigte sich eine starke Expression des Rezeptors im Plexus choroideus des 4.Ventrikels (Pfeil), im Ncl. motorius n. trigemini (V mot), im Ncl. n. facialis (VII) und ubiquitär in Neuronen (Stern). Detailansicht des Trigeminskerns in (C) und des Faziliskerns in (D). (B) In der Frontalansicht sind der motorische und mesencephale Trigeminskern positiv (V mot., V mes.), sowie einzelne Neurone. (E) Detailansicht des Ncl. n. hypoglossi. Alle Abbildungen zeigen exemplarisch ein 1h p.i. sham-behandeltes Tier aus n=5 mit je 6-12 Gewebeschnitten. Balken: in A, B 1000 μ m, in C-E 250 μ m

radiogrammen klar sichtbar und stark genug, um für eine Quantifizierung herangezogen werden zu können.

Exemplarisch zur Quantifizierung der Expression von p55TNFR in Hirnstammkerngebieten wurden der Ncl. motorius n. trigemini und der Ncl. n. facialis ausgewählt. Untersuchte Zeitpunkte waren 1 und 12h der sham-behandelten Kontrolltiere, und 1 und 12h nach SEB- bzw. LPS-Applikation. Quantifiziert wurde die relative optische Dichte der Signale über einem Kerngebiet im Autoradiogramm, die dann anhand von gemessenen Gewebeäquivalenten in μ Ci/g Gewebe umgerechnet wurde.

Dabei ergab die statistische Analyse ein gleich bleibendes Expressionsniveau in den beiden Nuclei des 5. und 7. Hirnnervs bei 1h und 12h der sham-

5. Ergebnisse

behandelten Tiere. Nach Stimulation mit SEB oder LPS bei 1h und 12h p.i. kam es zu keiner signifikante Veränderung (Abb. 5.7.).

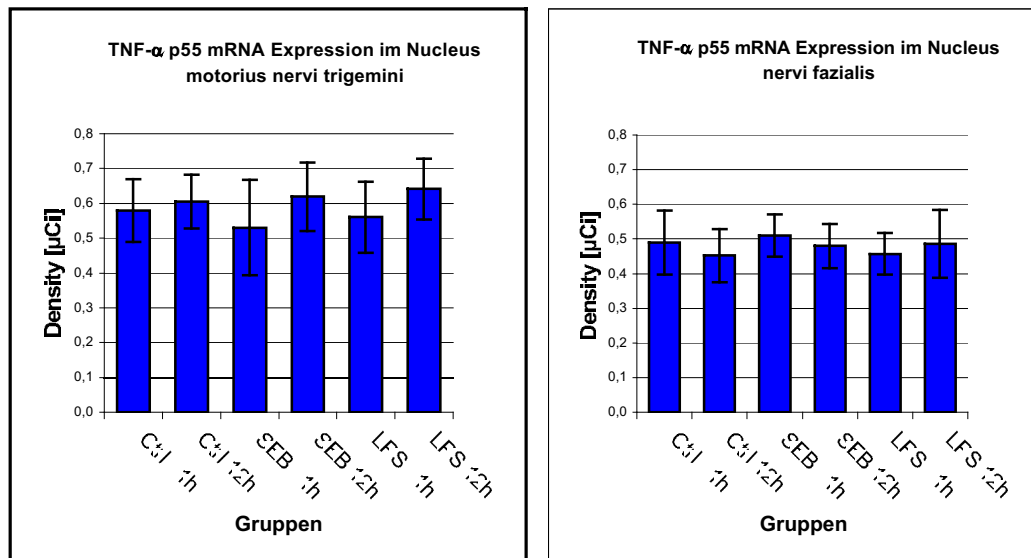


Abb. 5.7.: Quantifizierung der TNF α p55 mRNA Expression des Ncl. n. mot. trigemini und des Ncl. n. facialis.

Die Mittelwerte (blaue Balken) und die gezeigten Standardabweichungen wurden aus n=4 Tieren mit s=9 Geweben pro Tier ermittelt. Es liessen sich in den Spiegeln der p55TNFR mRNA im Ncl. n. motorius trigemini und Ncl. n. facialis zwischen den Versuchsgruppen keine statistisch signifikanten Unterschiede zu den Kontrolltieren nachweisen. Die statistische Analyse erfolgte mittels ANOVA, Messungen als Duplexmessung mittels MCID.

5.2.2. Nachweis mittels RT-PCR

In der PCR ließ sich die mRNA von TNF α , p55TNFR und p75TNFR im Kortex, Pons und Cerebellum bei Kontrolltieren nachweisen (Abb. 5.8.).

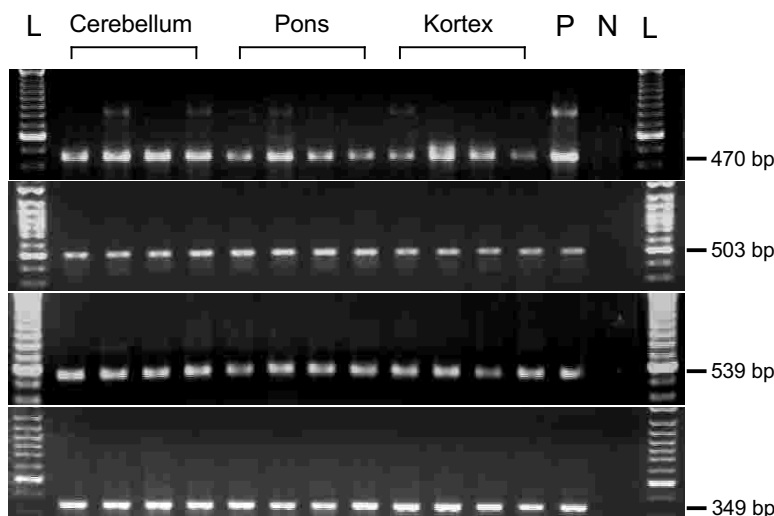


Abb. 5.8.: RT-PCR der mRNA von TNF α , p55TNFR und p75TNFR in verschiedenen Hirnarealen von 4 unstimulierten Tieren.

In Cerebellum, Pons und Kortex aller Tiere konnte die mRNA von TNF α (470 bp), p55TNFR (503 bp) und p75TNFR (539 bp) nachgewiesen werden. Als interner Standard diente β -Actin (349 bp). L, 1kb-Leiter; P, Positivkontrolle mit mRNA aus der Milz; N, Negativkontrolle, bei der Wasser statt mRNA eingesetzt wurde.

5. Ergebnisse

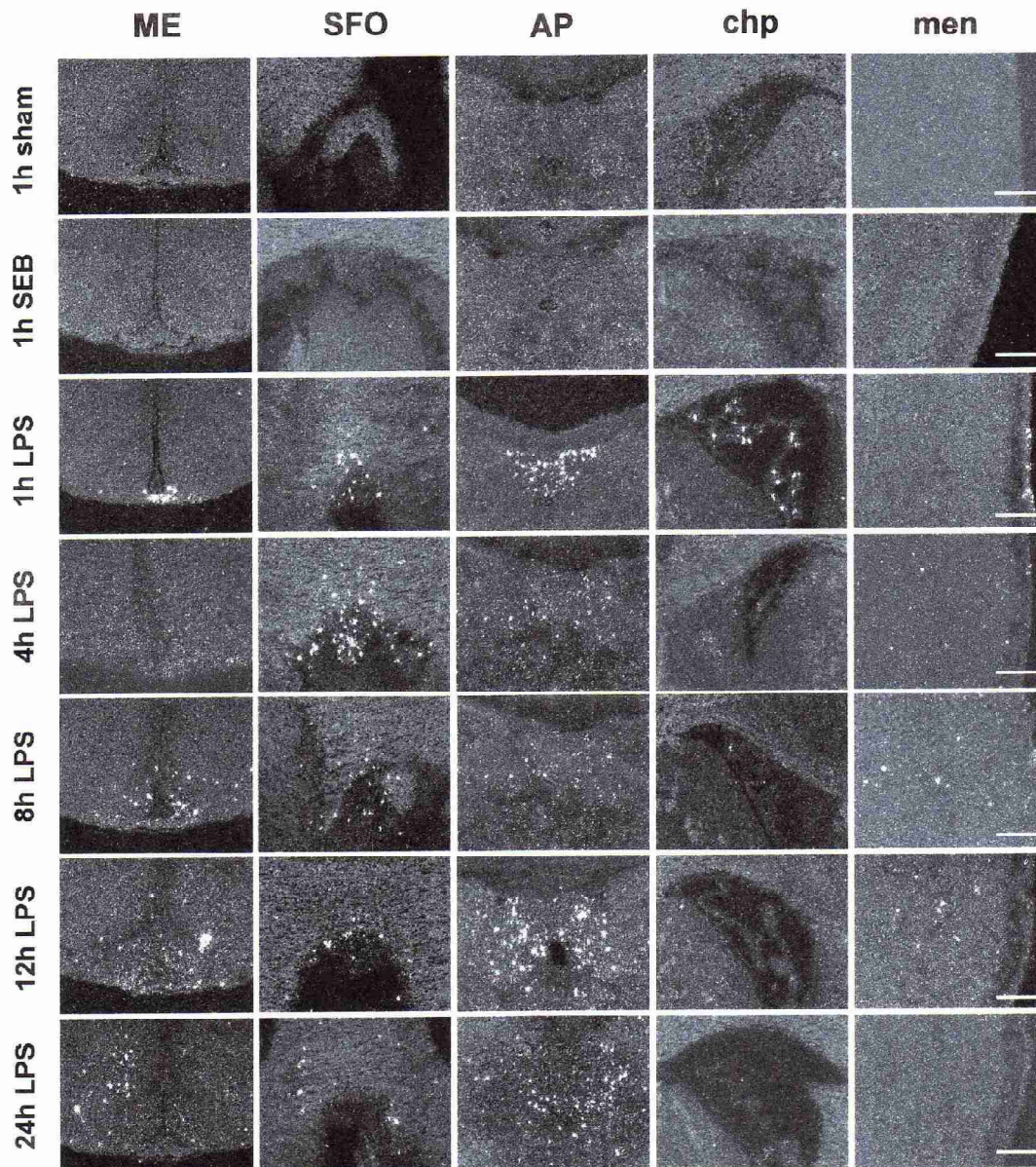


Abb. 5.9.: Nachweis der TNF α mRNA mittels ISH in der Dunkelfeld-Mikroskopie.

Die Expression der TNF α mRNA wurde in der Eminentia mediana (ME), dem Subfornikalorgan (SFO), der Area postrema (AP), dem Plexus choroideus (chp) und im Bereich der Meningen (men) untersucht. Die Analyse der TNF α mRNA Expression erfolgte in sham-injizierten Kontrolltieren (1. Zeile), in SEB-stimulierten Tieren (2. Zeile, für alle Zeitpunkte mit SEB-Stimulation wurde repräsentativ 1h p.i. ausgewählt) sowie in LPS-stimulierten Tieren zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Injektion (wie in der Abbildung angegeben). Gezeigt werden jeweils repräsentative Gewebeschnitte. Experimentell wurden mit n=5 und s=9 alle Zeitpunkte für sham-, SEB- und LPS-Behandlung untersucht.

Alle Abbildungen einer Spalte zeigen jeweils die gleiche Struktur.

Balken: 250 μ m

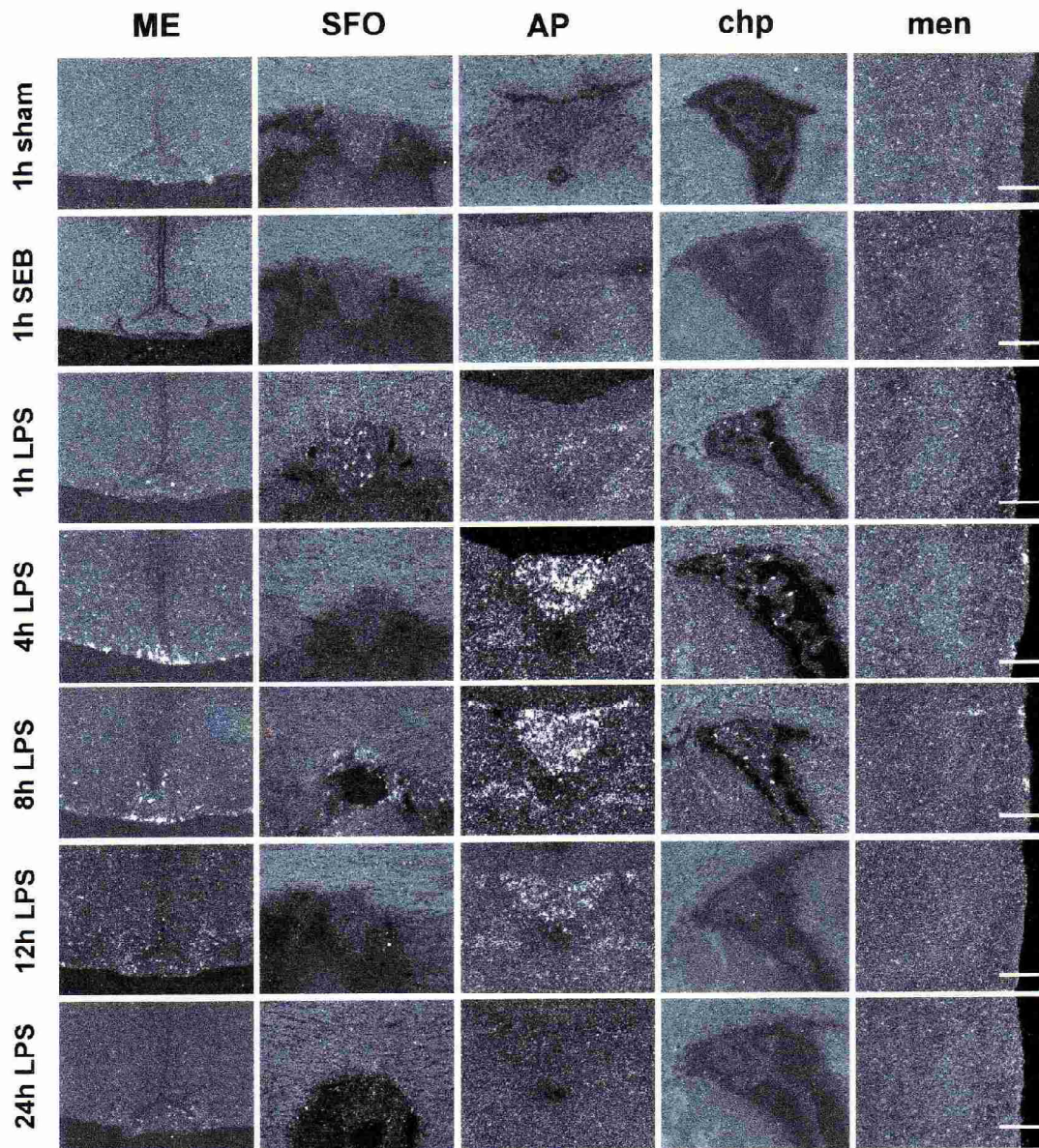


Abb. 5.10: Nachweis der p75TNFR mRNA mittels ISH in Dunkelfeld-Aufnahmen.

Die Expression der p75TNFR mRNA wurde in der Eminentia mediana (ME, linke Spalte), dem Subfornikalorgan (SFO, 2. Spalte von links), der Area postrema (AP, 3. Spalte von links), dem Plexus choroideus (chp, 4. Spalte) und im Bereich der Meningen (men, rechte Spalte) untersucht. Die Analyse der TNF α mRNA Expression erfolgte in sham-injizierten Kontrolltieren (1. Zeile), in SEB-stimulierten Tieren (2. Zeile, für alle Zeitpunkte mit SEB-Stimulation wurde repräsentativ 1h p.i. ausgewählt) sowie in LPS-stimulierten Tieren zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Injektion (wie in der Abbildung angegeben). Gezeigt werden jeweils repräsentative Gewebeschnitte. Experimentell wurden mit n=5 und s=9 alle Zeitpunkte für sham-, SEB- und LPS-Behandlung untersucht.

Alle Abbildungen einer Spalte zeigen jeweils die gleiche Struktur.

Balken: 250 μ m

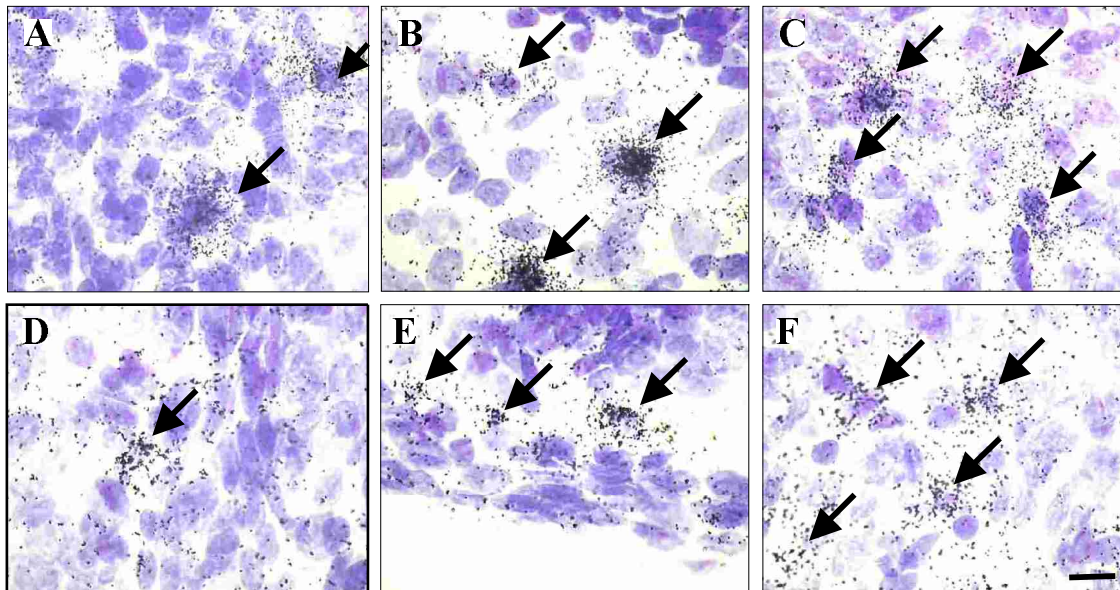


Abb. 5.11.: Zelluläre Verteilung der TNF α - und p75TNFR mRNA Expression.

Der Nachweis der TNF α mRNA (A-C) und der p75TNFR mRNA (D-F) erfolgte in Kresylviolettgefärbten, emulsions-beschichteten Gewebeschnitte in der Hellfeldmikroskopie. Repräsentative Hirngewebe von LPS-stimulierten Mäusen 1h nach Injektion sind gezeigt. Es handelt sich um vergrößerte Ausschnitte in Hellfeldmikroskopie der in Abb. 5.10. gezeigten Gewebeschnitte. A und D, Subfornikalorgan; B und E, Eminentia mediana; C und F, Area postrema.

Balken 10 μ m

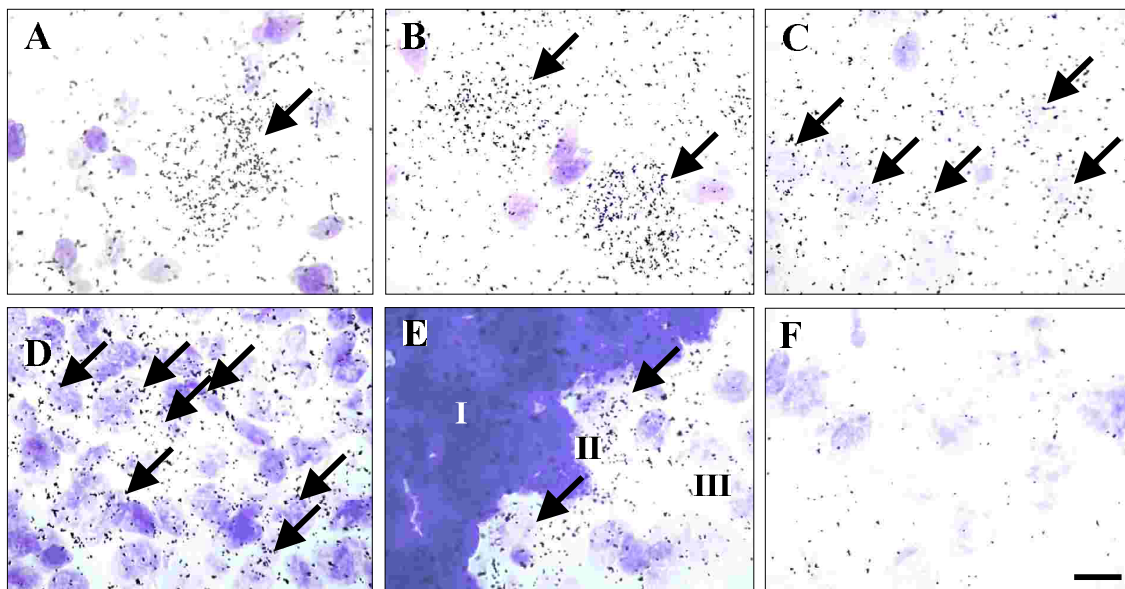


Abb. 5.12.: Zelluläre Verteilung der basalen p55TNFR mRNA Expression in der hochauflösenden Hellfeldmikroskopie emulsions-beschichteter Gewebeschnitte.

A, Trigemiuskern; B, Facialiskern; C, Cortexneurone; D, Plexus choroideus; E, Cerebellum mit (I) Stratum granulosum, (II) Stratum ganglionare, (III) Stratum moleculare. Purkinjezellen (Pfeil in E) exprimieren p55TNFR mRNA. Es handelt sich bei A, B, D, E um vergrößerte Ausschnitte in Hellfeldmikroskopie der in Abb. 5.10, bzw. bei C der in Abb. 5.4. gezeigten Gewebeschnitte.

A - E sind antisense-, F sense-Proben. Zellkerne sind mit Kresylviolett gefärbt, Größensmaßstab in F steht für alle Abbildungen.

Balken 10 μ m

5.3. Expression von $TNF\alpha$, p55TNFR und p75TNFR mRNA nach SEB

Nach Gabe von SEB blieben die Expressionsmuster von $TNF\alpha$, p55TNFR und p75TNFR mRNA zu allen Zeitpunkten unverändert (Abb. 5.3., 5.4., 5.5.).

5.4. Expression von $TNF\alpha$, p55TNFR und p75TNFR mRNA nach LPS

Eine Stunde nach Gabe von LPS kam es in allen Tieren dieser Gruppe zu einer starken Expression von $TNF\alpha$ mRNA in Zirkumventrikulären Organen wie dem Subfornikal Organ, der Eminentia mediana und der Area postrema, wie auch in den Meningen und allen Plexus choroidei (Abb. 5.9., 5.11., Tab. 4). 4h nach

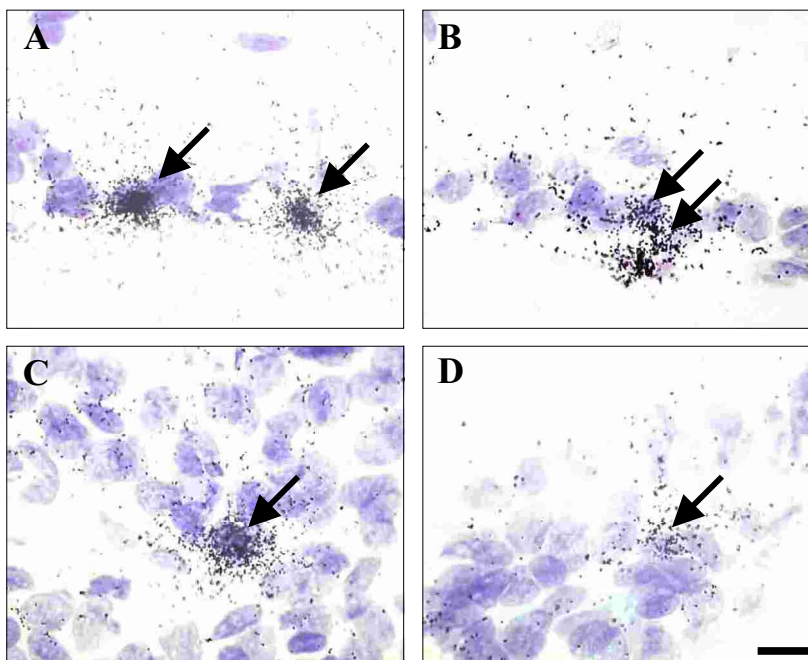


Abb. 5.13.: Zelluläre Verteilung der induzierten $TNF\alpha$ - und p75TNFR mRNA Expression nach LPS 1h p.i..

In den Meningen waren Zellen für $TNF\alpha$ mRNA (A) und p75TNFR (B) positiv, sowie im Plexus choroideus für $TNF\alpha$ (C) und p75TNFR (D). Zellkerne sind mit Kresylviolett gefärbt, Größenmaßstab in F steht für alle Abbildungen. Gezeigt sind in A und C repräsentative Schnitte der in Abb. 5.9, bzw in B und D der in Abb. 5.10 dargestellten Schnittpräparate.

Balken 10 μ m

LPS- Gabe verschwanden oder verminderten sich die Signale in den CVOs, waren dafür aber in direkt sich an die CVOs anschließende Regionen nachweisbar. Im weiteren Verlauf bei 8, 12 und 24h p.i. breiteten sich die Signale tiefer in das Hirnparenchym aus, während sie teilweise - wenn auch sehr schwach und nur vereinzelt -

noch in den CVOs nachweisbar waren. Ein ähnlicher „spreading effect“ der auch als "migratory-like pattern" bezeichnet werden kann, zeigte sich bei den Meningen. Hier waren Signale ausschließlich 1h p.i. in den Hirnhäuten nachweisbar und bei 4h und später zunehmend weiter weg von der Hirnoberfläche im Parenchym sichtbar (Abb. 5.9., Tab. 4).

5. Ergebnisse

In der lichtmikroskopischen Hochauflösung ließ sich immer derselbe Zelltyp TNF α mRNA-positiver Zellen erkennen, unabhängig vom Analysezeitpunkt und der untersuchten Hirnregion: Zellen mit kleinen Zellkernen, die sich stark mit Kresyl-Violett (KV) anfärben ließen und sich damit morphologisch von Neuronen unterschieden (Abb. 5.11., A-C). Ohne Doppelmarkierung war eine weitere Identifikation dieser Zellen jedoch nicht möglich.

Das Expressionsmuster der p55TNFR mRNA veränderte sich nach LPS-Gabe nicht und entsprach damit dem des basalen Expressionsmusters. Lichtmikroskopisch waren die Signale über Zellen mit großen, schwach mit KV gefärbten Zellkernen. Dabei handelte es sich am wahrscheinlichsten um Neurone (Abb. 5.12.).

In den emulsions-beschichteten Hirnschnitten zeigte sich 1h nach LPS-Gabe eine schwache Expression der p75TNFR mRNA in der Area postrema, der Eminentia mediana und den Meningen (Abb. 5.11., D-F). Zum selben Zeitpunkt ließ sich im Subfornikalorgan und in den Plexus choroidei schon eine deutlichere Expression nachweisen. Nach 4h LPS schwächte sich die Expression im Subfornikalorgan ab, wurde bei 8h wieder stärker und war zu allen späteren Zeitpunkten nicht mehr detektierbar. In der Eminentia mediana steigerte sich die Expression bis zu einem Maximum bei 8h LPS, war bei 12h nur noch schwach und bei 24h LPS überhaupt nicht mehr nachweisbar. In der Area postrema lag das Expressionsmaximum bei 4h nach LPS-Gabe. Bei 8 und 12h war noch eine deutliche, dagegen bei 24h fast keine Expression der p75TNFR mRNA erkennbar.

In den Meningen wurde bei 4h p.i. die stärkste Expression der p75TNFR mRNA für diese Struktur beobachtet, bei 8h war die mRNA nur noch schwach und ab 12h nicht mehr nachweisbar. Die Plexus choroidei zeigten unabhängig in welchem Hirnventrikel sie lokalisiert waren ein weitgehend konsistentes Verteilungsmuster, sodass das Expressionsmaximum bei 4 und 8h nach LPS-Gabe lag, bei 12h die mRNA nur noch schwach und bei 24h nicht mehr detektiert werden konnte (Tab. 4).

Im Gegensatz zur TNF α mRNA-Expression blieb die p75TNFR mRNA zu allen Zeitpunkten strikt auf die CVOs und die Meningen beschränkt und breitete sich zu keinem Zeitpunkt in das umgebende Hirnparenchym aus (Abb.5.10).

5. Ergebnisse

Die in den Kontrolltieren beobachteten Signale über kleinen wahrscheinlich glären Zellen blieb nach LPS-Gabe zu allen untersuchten Zeitpunkten unverändert.

5.5. Nachweis von $TNF\alpha$, p55TNFR und p75TNFR mRNA mittels LCM

Es ließ sich keine mRNA für $TNF\alpha$ und p75TNFR bei Kontroll- wie auch LPS-stimulierten Tieren im Kortex, Corpus callosum und Ncl. n. hypoglossi nachweisen. Hingegen zeigten mikrodissizierte Neurone des Neokortex und des Hypoglossuskerns, sowie non-neuronale Zellen aus dem Corpus callosum, eine starke p55TNFR mRNA Expression, ohne Unterschied zwischen Kontrolle und LPS behandelten Tieren (Abb. 5.15.).

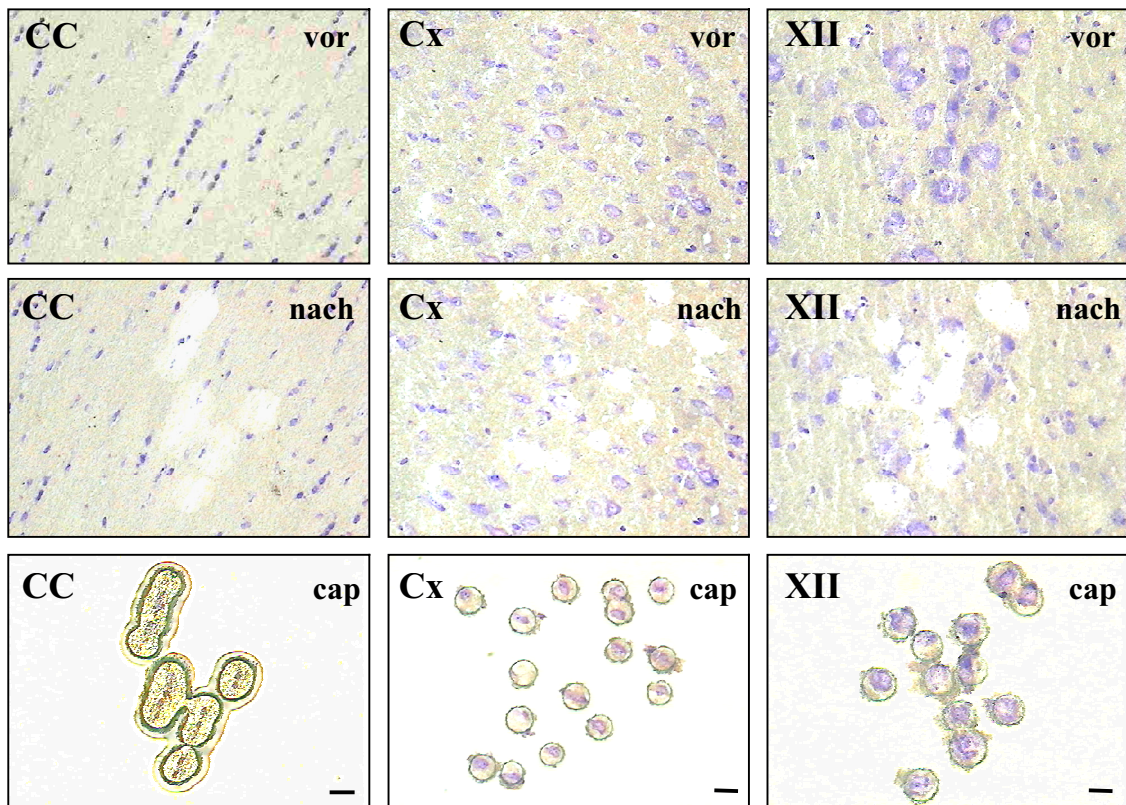


Abb. 5.14.: Darstellung der LaserCaptureMicrodissection.

Die erste Zeile (vor) zeigt die intakten Hirnschnitte vor, die zweite Zeile (nach) nach der Mikrodissektion. In der dritten Zeile kommen die aus dem Gewebeschnitten isolierten Zellen zur Darstellung, die am cup-Deckel (cap) adhären. Alle Schnitte zeigen KV-Färbung. Abk.: CC, Corpus callosum; CX, Cortex; XII, Ncl. n. hypoglossi.

Balken: 5 μ m

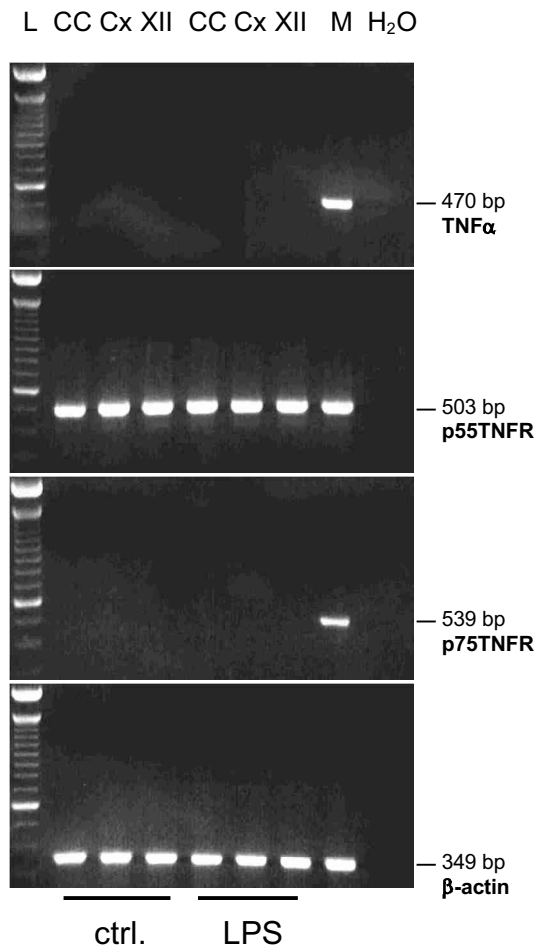


Abb. 5.15. RT-PCR der mit LaserCapture Microdissection (LCM) dissektierten Proben.

Die RT-PCR-Analyse zeigte die Präsenz von p55-TNFR mRNA im Cortex, Corpus callosum und Ncl. n. hypoglossi bei einem sham- wie auch LPS-behandelten Tier.

Es fand sich keine Expression von TNF α - und p75TNFR mRNA in sham- oder LPS-stimuliertem Tier. Als Positivkontrolle wurde mRNA aus der Milz verwendet, als Negativprobe Wasser statt mRNA eingesetzt. β -Actin diente als interner Standard. n pro Gruppe =1.

L	1KB-Leiter
CC	Cortex
Cx	Corpus callosum
XII	Ncl. n. hypoglossi
M	Milz
H ₂ O	Wasser.

5.6. Immunzytochemische Doppelmarkierung mit p55TNFR- und NeuN-Antikörpern im Ncl. n. facialis

Fast alle NeuN-immunreaktiven Neurone des Fazialiskernes der Kontrolltiere waren mit p55TNFR-immunreaktiven Zellen kolokalisiert, so dass die neuronale Expression des TNF- α p55 Rezeptors eindeutig demonstriert werden konnte (Abb. 5.16.).

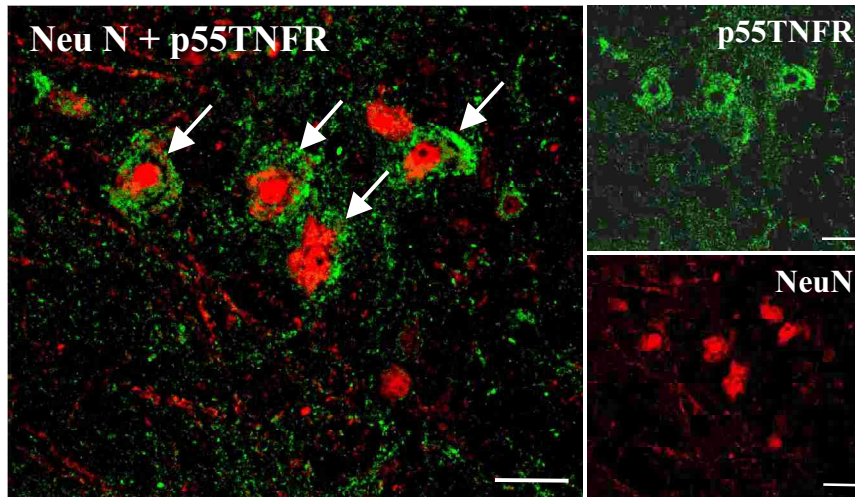


Abb. 5.16.: Zelluläre Kolokalisation von NeuN und p55TNFR in Neuronen des Ncl. n. facialis.

In der Konfokalen Laserscanning Mikroskopie sind p55TNFR-immunreaktive Zellen grün, NeuN-reaktive rot markiert. Deutlich zeichnen sich die markierten Rezeptoren ringförmig an der Oberfläche der Nervenzellen ab. Repräsentativer Gewebeschnitt von insgesamt 12 Schnitten eines sham-behandelten Tieres. **Balken:** 5 μ m

Tab. 3.: Semi-quantitative Analyse der Expression von TNF α , p55-TNFR und p75TNFR mRNA im normalen Hirn der Maus (n=5)

Region	TNF α	p55TNFR	p75TNFR
Cortex piriformis	-	+	-
Plexus choroideus	-	++	-
Ependym	-	-	-
Hippocampus	-	+	-
Leptomeninx	- / +	-	-
Tegmentum	-	+	+
Ncl. mesencephalicus n. trigemini	-	+++	-
Ncl. motorius n. trigemini	-	+++	-
Ncl. n. facialis	-	+++	-
Ncl. n. hypoglossi	-	++	-
Cerebellum (stratum ganglionare)	-	++	- / +
Subfornical Organ	-	-	-
Eminentia mediana	-	-	-
Area postrema	-	-	-

Symbole: -, kein Signal; +, schwaches Signal; ++, mittelstarkes Signal; +++, starkes Signal; Abkürzungen: Ncl., nucleus; n., nervus.

Tab. 4: Semi-quantitative Analyse der mRNA-Expression von TNF α und p75TNFR im Hirn der Maus nach LPS-Stimulation (n = 5)

Region	1h		4h		8h		12h		24h	
	TNF α	p75TNFR	TNF α	p75TNFR	TNF α	p75TNFR	TNF α	p75TNFR	TNF α	p75TNFR
Cortex piriformis	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Plexus choroideus	++	+	++	++	-	++	-	+	-	-
Ependym	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hippocampus	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Leptomeninx	++	+	++	++	+	+	-	-	-	-
Tegmentum	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ncl. mesencephalicus	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
n. trigemini	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ncl. motorius n. trigemini	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ncl. n. facialis	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ncl. n. hypoglossi	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cerebellum (stratum ganglionare)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Subfornical organ	++	+	++	-/+	+	+	-	-	-	-
Eminitia mediana	++	-/+	++	+	+	++	-	+	-	-
Area postrema	++	-/+	++	++	+	+	+	+	-	-

Symbole: -, kein Signal; +, schwaches Signal; ++, mittelstarkes Signal; +++, starkes Signal; Abkürzungen: Ncl., nucleus; n., nervus.

5. Ergebnisse

Tab. 3.: Erläuterungen zum Auswertungsverfahren

Pro Zeitpunkt wurden sham-behandelte Tiere mit je n=5 zu den Zeitpunkten 1h, 4h, 8h, 12h und 24h p.i. untersucht. Dabei wurden pro Struktur jeweils 3-12 Gewebeschnitte pro Tier entsprechend der Größe des Kerngebietes ausgewertet. Die Untersuchung erfolgte durch zwei unabhängige Untersucher, wobei einer über die Versuchsgruppen informiert war, der andere nicht. Das Experiment wurde einmalig durchgeführt.

Tab. 4.: Erläuterungen zum Auswertungsverfahren

Untersucht wurden LPS-behandelte Tiere mit n=5 zu den Zeitpunkten 1h, 4h, 8h, 12h und 24h p.i.. Sonstiges Auswertungsverfahren wie oben zu Tab. 3 beschrieben.

Bei allen dargestellten Experimenten dieser Arbeit handelt es sich jeweils um ein einmalig durchgeführtes Experiment.

Kapitel 6

Diskussion

6.1. Expression des TNF α -Systems im Gehirn unter Kontrollbedingungen

6.1.1. Expression von TNF α im Gehirn unter Kontrollbedingungen

Die Ergebnisse der RT-PCR Analysen definierter Hirnabschnitte zeigten eine basale Expression der TNF α mRNA im Gehirn, was in der Literatur Bestätigung findet (Gatti et al., 1993; Buttini et al., 1996; Pitossi et al., 1997; Taupin et al., 1997). Da bei den eigenen RT-PCR Untersuchungen wie auch denen in der Literatur publizierten immer mRNA aus Homogenisaten von Teilen des Gehirns aufgereingt wurde, muss die ermittelte TNF α mRNA nicht notwendigerweise von Zellen des ZNS stammen. In kompletten Gewebestücken sind auch Gefäße und die darin enthaltenen Leukozyten wie Blut-Monozyten vorhanden, die basal TNF α mRNA enthalten können (Rothwell et al., 1996). Eine TNF α -Expression von Nervenzellen kann damit aus diesen Daten keinesfalls gefolgert werden.

Die histologische Beobachtung, dass sich unter Kontrollbedingungen TNF α mRNA in vereinzelt meningealen Zellen nachweisen ließ, spricht aber für eine konstitutive zerebral lokalisierte Expression der TNF α mRNA. Dies ist konsistent mit den Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen (Breder et al., 1994; Nadeau und Rivest 1999a; Quan et al., 1999).

Zum Nachweis von mRNA Templaten in definierten Zellpopulationen bietet die Methode der LaserCaptureMicrodissection (LCM) ein ausgezeichnetes neues Verfahren, das es erlaubt identifizierte Zelltypen selektiv aus einem Gewebeverband zu isolieren und deren mRNA aufzureinigen. So wurden in dieser Studie selektiv Neurone und Oligodendrozyten dissektiert und ihre mRNA mittels RT-PCR analysiert. Dabei gab es weder für Neurone, noch für Oligodendrozyten Hinweise für das Vorliegen von TNF α mRNA. Diese Beobachtung wurde durch die morphologischen Analyse der Hirnschnitte mit *in-situ*

Hybridisierung untermauert, bei der sich keine TNF α mRNA-exprimierenden Nervenzellen fanden. Somit ist eine neuronale und oligodendrozytäre Expression von TNF α unter normalen physiologischen Bedingungen eher unwahrscheinlich.

Die in der RT-PCR aus Hirnhomogenisaten beobachtete Expression von TNF α mRNA stammte daher aus anderen, non-neuronalen Zellentypen. Hier müssen insbesondere meningealen Zellen, Blutmonozyten oder Makrophagen vermutet werden. Es gibt demnach im unstimulierten Gehirn nur eine äußerst geringe TNF α Expression, die non-neuronaler Herkunft ist.

6.1.2. Expression von p55TNFR im Gehirn unter Kontrollbedingungen

Im Ncl. motorius n. trigemini, Ncl. mesencephalicus n. trigemini, Ncl. n. facialis und Ncl. n. hypoglossus konnte eine starke Expression von p55TNFR mRNA nachgewiesen werden, die sich auch auf niedrigerem Expressionsniveau in den meisten Neuronen des Gehirns sowie in den Zellen des Plexus choroideus zeigte. Die Daten der LCM-Analysen waren dazu konsistent und zeigten p55TNFR mRNA sowohl in Kortex- als auch Hypoglossusneuronen. Die Expression in kortikalen Neuronen wurde später auch in der Arbeit von Yin (Yin et al., 2004) bestätigt. Die immunzytochemischen Untersuchungen zur Expression des p55TNFR Proteins in Neuronen des Ncl. n. facialis untermauerten die Ergebnisse der LCM-Analyse. Neben der mRNA war in der Konfokalen Laserscanning Mikroskopie p55TNFR auch als Protein nachweisbar. Diese Beobachtung findet in der kürzlich erschienen Arbeit von Hermann Bestätigung, bei der p55TNFR-immunoreaktive Neurone im Hirnstamm nachgewiesen wurden (Hermann et al., 2004).

Die Beobachtung, dass p55TNFR konstitutiv pan-neuronal exprimiert ist steht im Widerspruch zu den Untersuchungen von Nadeau, die mit der Methode der *in-situ* Hybridisierung p55TNFR mRNA weder in Hirnnervenkernen noch pan-neuronal nachwiesen. Sie beschreiben dafür eine basale Expression der p55TNFR mRNA in Ependymzellen, zerebralen Blutgefäßen, der Area postrema und der Eminentia mediana (Nadeau et al., 1999b).

Nach den eigenen Daten exprimierten Oligodendrozyten p55TNFR mRNA im Nachweis mittels LCM. Dies konnte in der ISH jedoch nicht bestätigt werden.

Möglicherweise war die Expressionsstärke zu schwach, um ohne Amplifikation im Rahmen der PCR auch in der ISH gesehen zu werden. Aber auch in anderen Untersuchungen wurde die mRNA für p55TNFR in kultivierten Oligodendrozyten (Agresti et al., 1998; Wilt et al., 1995) sowie die Expression des Rezeptors auf Proteinebene (Dopp et al., 1997) nachgewiesen. Diese Befunde unterstützen die Daten der eigenen LCM-Analysen. Kritisch muss jedoch angemerkt werden, daß die eigenen durch LCM gewonnenen Oligodendrozyten-Proben möglicherweise auch andere Zelltypen enthielten. Wie in Abb. 5.14. zu erkennen ist, war die Dissektion auf Oligodendrozyten aus dem Corpus callosum fokussiert. So wurde zumindest eine Kontamination mit Somata von Nervenzellen verhindert, trotzdem ist aber nicht auszuschliessen, dass Teile von Astrozyten oder Mikroglia mitdissektiert wurden. Auch diese Zelltypen sind *in vitro* als p55TNF α -positiv beschrieben (Astrozyten: Tada et al., 1994; Aranguéz et al., 1995; Dopp et al., 1997; Lung et al., 2001; Mikroglia: Wilt et al., 1995; Dopp et al., 1997) und könnten für die ermittelte Expression der p55TNFR in der LCM-Analyse verantwortlich sein.

In der ISH wurde eine Differenz in der Expressionsstärke zwischen Neuronen von Hirnnervenkernen und anderen Neuronen beobachtet. Diese Differenz könnte durch die unterschiedliche Größe der einzelnen Zelle erklärt werden, indem größere Zellen der Hirnnervkerne auch entsprechend mehr mRNA im Vergleich zu kleineren Zellen enthalten. Alternative könnten Neurone in den Hirnnervenkernen unabhängig von ihrer Größe mehr mRNA exprimieren. Mit der verwendeten Methode konnte diese Frage nicht endgültig geklärt werden.

Der Befund, dass einzelne Nuclei wie die des V., VII. und XII. Hirnnerven eine hohe Expression von p55TNFR aufweisen, könnte klinisch relevant sein, da bei Multipler Sklerose neurologische Ausfälle beobachtet werden, die auf Schädigungen dieser Hirnnervkerne hinweisen (Masuhr et al., 1998). Möglicherweise erklärt sich das dadurch, dass diese Kerne durch starke Expression des Apoptose-vermittelnden TNF α Rezeptors (p55TNFR) suszeptibler als andere Regionen sind.

Die ISH ermöglichte in Kombination mit Konfokaler LaserScanning Mikroskopie und den LCM Analysen den bisher noch nicht erbrachten *in vivo*

Nachweis der p55TNFR Expression auf mRNA- und Proteinniveau in zerebralen Neuronen, vor allem in den oben genannten Hirnstammkerngebieten.

6.1.3. Expression von p75TNFR im Gehirn unter Kontrollbedingungen

Auch die p75TNFR mRNA findet sich im Gehirn basal exprimiert wie RT-PCR Untersuchungen zeigten. LCM Analysen konnten Neurone als Quelle der p75TNFR mRNA ausschließen. Die morphologische Analyse bestätigt die Expression der p75TNFR mRNA in non-neuronalen Zellen des Gehirns. Das in der ISH beobachtete dissimilierte Verteilungsmuster der p75TNFR positiven Zellen weist am ehesten auf Mikrogliazellen als die p75TNFR mRNA exprimierenden Zelltyp hin. Dieser Zelltyp zeigt bekanntermaßen ein charakteristisches Verteilungsmuster, indem die Zellen gleichmäßig singular verteilt im gesamten Hirn auftreten (Perry et al., 1985; Schafer et al., 2000) und damit dem hier beobachteten Verteilungsmuster entsprechen.

Aufgrund der in der Literatur beschriebenen p75TNFR mRNA Expression in kultivierten Astrozyten (Tada et al., 1994; Dopp et al., 1997; Lung et al., 2001) müssen auch Astrozyten in Betracht gezogen werden. Allerdings tritt dieser Zelltyp gehäuft in der Nähe von Gefäßen und der Glia limitans auf und es wäre damit ein anderes Verteilungsmuster als das beobachtete zu erwarten. Letztendlich war eine eindeutige Klärung der zellulären Identifikation im Rahmen der ISH nicht möglich. Dazu ist eine Doppelmarkierung mit einem Mikroglia/Makrophagen-Marker, wie z.B. OX-42 in Kombination mit einem p75TNR spezifischen Antikörper notwendig.

6.2. Expression des TNF α -Systems im Gehirn nach Stimulation mit SEB

Die Stimulation des Immunsystems mit SEB führte bei keinem der untersuchten Zeitpunkte zu einer Reaktion des zerebralen TNF α -Systems. Dieses Ergebnis ist mit der einzigen in der Literatur bekannten Untersuchung konsistent, die ebenfalls die Expression der TNF α mRNA nach SEB-Gabe untersuchte. Diese RT-PCR Untersuchungen wurde jedoch nur für den Hypothalamus durchgeführt. Dabei kam es zu keiner Änderung der TNF α mRNA Level im

Hypothalamus (Del Rey et al., 2000). Andere Arbeiten hinsichtlich der Expression der TNF Rezeptoren nach SEB existieren in der wissenschaftlichen Literatur bisher nicht.

Eine entscheidende Frage, die sich aus den eigenen Beobachtungen zu den Stimulationsuntersuchungen mit SEB ergibt, ist warum das zerebrale TNF α -Systems nicht auf die Mitogengabe reagierte? Denkbar wäre dabei ein methodischer Fehler innerhalb des verwendeten Versuchsdesigns, indem die verabreichte SEB-Menge möglicherweise zu niedrig dosiert war, um eine Antwort im ZNS auszulösen.

Anhand der Expression des als neuronalen Aktivitätsmarker etablierten c-fos konnte allerdings gezeigt werden, dass peripher appliziertes SEB in der Lage ist, Wirkung auf das ZNS zu entwickeln. So ist bekannt, dass es im Nucleus paraventricularis (PVN) zu einer Hochregulation von c-fos mit SEB-Dosen von 1 mg/kg KG bei Ratten (Goehler et al., 2001) und 50 μ g/Tier intraperitoneal bei Mäusen (Shurin et al., 1997) kommt. Die bei Goehler verwendete Dosis entsprach ca. 25 μ g/Maus. Folglich war die im eigenen Versuch verwendete SEB-Dosis von 50 μ g/Maus ausreichend hoch. Nimmt man die Aktivierung der HPA-Achse, gemessen am Serum-Corticosteronspiegel als Marker für eine SEB-induzierte zerebrale Reaktion auf das Mitogen, so sind sogar schon 10 μ g/Maus SEB i.p. ausreichend (Del Rey et al., 2000). Zudem wurde die Wirksamkeit der verwendeten SEB Konzentration im eigenen Experiment durch die beobachtete Hochregulation von c-fos im PVN bestätigt. Höhere Dosierung des Mitogens sollten ohnehin vermieden werden, da SEB i.p. ab 80 μ g/Maus letal ist (Wood et al., 1995).

6.3. Expression des TNF α -Systems im Gehirn nach Stimulation mit LPS

6.3.1. Expression von TNF α nach LPS

Die periphere Applikation von LPS induzierte die Synthese von TNF α mRNA ab 1h p.i. in den CVOs, den Meningen und den Plexus choroidei. Zu späteren Zeitpunkten ab 4h p.i. des Mitogens wurde TNF α mRNA zunehmend im die CVOs umgebenden Hirnparenchym beobachtet, was hier als „spreading effect“

bezeichnet wurde, während die initial positiven Strukturen immer weniger TNF α zeigten. Da die Signale über einzelnen Zellen lagen, war dieses Phänomen nur in den emulsions-beschichteten Schnitten unter Hochauflösung sichtbar, nicht jedoch in den Autoradiogrammen, die nur eine maximale Auflösung von 50 μ m ermöglichen. Die Hochregulation zerebraler TNF α mRNA nach LPS wurde durch zahlreiche andere Publikationen bestätigt, bei denen RT-PCR oder RNase Protection Assay verwendet worden waren (Gatti et al., 1993; Pitossi et al., 1997; Ilyin et al., 1998; Gayle et al., 1998; Stern et al., 2000; Turrin et al., 2001). Auch der gezeigte „spreading effect“ stimmt mit anderen publizierten Daten überein, wurde dabei aber als „migratory-like pattern“ benannt (Nadeau et al., 1999a). Eine irreführende Begriffsbildung, da dadurch eine „Wanderungs-ähnliche“ Bewegung der TNF α positiven Zellen suggeriert wird, von der *in vivo* aber eher nicht auszugehen ist.

Morphologisch handelt es sich bei diesen Zellen wahrscheinlich um non-neuronale Zellen. Immunhistochemische Doppelmarkierung zur Identifikation dieses Zelltyps wurde von Nadeau durchgeführt und identifizierten die fraglichen Zellen mittels OX-42 Antikörper als Mikroglia (Nadeau et al., 1999a). Von kultivierten Mikrogliazellen sind hohe TNF α mRNA Spiegel nach LPS-Stimulation bekannt, so dass die Beobachtung von Nadeau et al., durch *in vitro* Daten Unterstützung erfährt (Hetier et al., 1991; Zajicek et al., 1992; Nakamura et al., 1999; Liu et al., 2001). Ob es sich dabei um residente oder invadierte Mikrogliazellen handelte (Ling et al., 2001; Kaur et al., 2001) bleibt jedoch unklar.

6.3.2. Expression von p55TNFR nach LPS

Die Gabe von LPS veränderte das Expressionsmuster des p55TNFR nicht. Die anhand der Autoradiogramme für die Kerngebiete des 5. und 7. Hirnnerven durchgeführte Quantifizierung konnte diese Beobachtung objektivieren. Keiner der errechneten p-Werte war <10%, so dass keine Signifikanz erreicht wurde. Die LCM-PCR zeigte ebenfalls kein Unterschied zwischen sham- und LPS-behandelten Tieren, wobei mit der hier verwendeten PCR ohnehin nur qualitative Aussagen getroffen werden können und ein eventuell vorhandener kleiner Unterschied nicht detektierbar gewesen wäre.

Anders als in den eigenen Experimenten, beobachtete Nadeau et al., eine Hochregulation der p55TNFR mRNA nach LPS-Stimulation im OVLT, ME, AP, Plexus choroideus und kleinen Gefäßen (Nadeau et al., 1999b). Die Unterschiede zwischen eigenen Ergebnissen und denen von Nadeau et al., können nicht durch unterschiedlich hohe LPS-Dosen erklärt werden, da beide in vergleichbarer Konzentration eingesetzt wurden (20 µg/100 g KG im eigenen Versuch, 25 µg/100 g KG bei Nadeau). Die von Nadeau beschriebene Hochregulation der p55TNFR mRNA nach LPS würde der bisher vertretenen Ansicht widersprechen, dass p55TNFR vor allem konstitutiv und nicht-induzierbar expremiert ist (Übersicht in Vandenabeele et al., 1995a). Wobei es auch dazu kontroverse Publikationen gibt. So ist der Rezeptor in zerebralem Endothel nach INF- γ und IL-1 β als hochreguliert (Bebo et al., 1995), in kultivierten Astrozyten nach LPS-Stimulation jedoch als nicht-reguliert beschrieben worden (Aranguéz et al., 1995; Lung et al., 2001).

Eine Bindung von TNF α an den p55TNFR führt in der Zelle zur Apoptose via Aktivierung von TRAD, FADD, Caspase-8 und Caspase-3 (Chen et al., 2002a). Da wie in der eigenen Studie gezeigt, p55TNFR konstitutiv neuronal und TNF α LPS-induziert im Gehirn expremiert werden, müsste es nach LPS-Gabe massenhaft zu Apoptose-vermitteltem Neuronenuntergang kommen. Dies ist jedoch offensichtlich nicht der Fall, denn schwerwiegende neurologische Ausfälle sind nach LPS-Exposition nicht bekannt. Aber wieso kam es nicht zur Apoptose?

Innerhalb der Signaltransduktionskaskade können Mitglieder der „inhibitors of apoptosis proteins“ (IAPs), wie z.B. cIAP-1 und -2 Apoptose verhindern (Abb. 3.1.). RIAP-2 in der Ratte, homolog dem humanen cIAP-1/HiAP-2 ist in Neuronen konstitutiv expremiert (Belluardo et al., 2002). In Hepatozytenkultur, zu der eine Mischung aus LPS, TNF α und anderen Zytokinen gegeben wurde, verhinderte eine starke cIAP-2 Expression nachweislich Apoptosevorgänge (Schoemaker et al., 2002). In Makrophagen kann LPS die cIAP-2 Expression induzieren (Cui et al., 2000). Zusammengefasst wäre durchaus denkbar, dass die konstitutive neuronale cIAP-Expression Nervenzellen (Belluardo et al., 2002) vor LPS/TNF-induzierter Apoptose schützt, weshalb LPS auch keine ernsthaften neurologischen Ausfälle bedingt. Möglicherweise wird bei LPS-

Exposition die neuronale cIAP-Expression sogar hochreguliert, ähnlich wie in Makrophagen, um zusätzlichen Schutz vor Apoptose zu bieten.

6.3.3. Expression von p75TNF nach LPS

LPS bewirkte eine deutliche Hochregulation von p75TNFR mRNA in den CVOs, den Meningen und den Plexus choroidei. Ein „spreading effect“ wie bei TNF α mRNA konnte nicht beobachtet werden. Die in Meningen und Plexus choroidei demonstrierte LPS-induzierte Hochregulation ist mit den Daten von Nadeau konsistent (Nadeau et al., 1999b). Im Widerspruch zu den eigenen Daten waren jedoch in dieser Arbeit auch Blutgefäße positiv und CVOs gänzlich negativ. Um welche Zellentyp aber handelte es sich bei den in den eigenen Experimenten positiven Zellen? Zur Klärung dieser Frage führten wir Doppelmarkierungen mit p75TNFR spezifischen Antikörpern durch. Aufgrund der unzureichenden Spezifität und Sensitivität der verwendeten Antikörper waren diese Daten aber nicht aussagekräftig.

Die p75TNFR positiven, Kresyl-Violett gefärbten Zellen erfüllten in der rein morphologisch orientierten Analyse der ISH-Hochauflösung die Kriterien non-neuronaler Zellen. Zudem expremierten Neurone und Oligodendrozyten, die durch LCM gewonnen worden waren, kein p75TNFR nach LPS-Gabe. Insofern handelt es sich also weder um Nervenzellen, noch um Oligodendrozyten. Denkbar wären dann z. B. Astrozyten, von denen bekannt ist, dass sie in Kultur auf LPS mit erhöhten Level von p75TNFR mRNA reagierten (Lung et al., 2001).

Die von Nadeau/Rivest durchgeführten Arbeiten zur Charakterisierung des TNF α -Systems im Gehirn der Ratte nach LPS-Stimulation (Nadeau et al., 1999a; 1999b) stimmen in einigen Punkten mit den eigenen Ergebnissen überein, stehen mit einigen aber auch im Widerspruch.

So stimmen die Ergebnisse bezüglich der TNF α Expression sowohl bei Kontroll- als auch LPS-stimulierten Tieren überein, insbesondere das Phänomen des „spreading effects“ wurde bestätigt. Auch der Nachweis von p75TNFR nach LPS-Applikation in Meningen und Plexus choroidei ist konsistent mit den von Nadeau publizierten Daten, wie auch der Nachweis von p55TNFR im zerebellären Stratum ganglionare.

Gegensätzliche Ergebnisse fanden sich hinsichtlich der konstitutiven Expression von p55TNFR: hier demonstrierten wir eine starke pan-neuronale Expression, besonders in motorischen und sensiblen Hirnnervenkerengebieten (V., VII., XII.), die bei Nadeau nicht die geringste Bestätigung findet. Während hingegen in dieser Arbeit derselbe Rezeptor induziert durch LPS in CVOs detektiert wurde, wo er nach der eigenen Untersuchung nie beobachtet wurde. Nach LPS konnten wir ein fokales Verteilungsmuster von p75TNFR in den CVOs zeigen, während Nadeau diesen Rezeptor nie in den CVOs gesehen hatte, dafür aber im Hippocampus und in Blutgefäßen.

6.4. Bedeutung für das Modell der Neuroimmunen Kommunikation: Zytokin- oder Mitogen-vermittelter afferenter Schenkel?

Die neuroimmune Kommunikation ist bidirektional organisiert, wobei ein afferenter Schenkel (afferent loop) Informationen aus der Peripherie in das ZNS vermittelt und ein efferenter Schenkel (efferent loop) Informationen aus dem ZNS in die Peripherie leitet (Szelenyi, 2001). Zielsetzung dieser Untersuchung war die genauere Charakterisierung der Funktion des Zytokins $\text{TNF}\alpha$ und seiner Rezeptoren innerhalb des afferenten Schenkels. Konkret stellt sich dabei die Frage, ob durch Mitogene erhöhte Serumzytokinspiegel in der Lage sind, Veränderungen der Expressionsmuster des $\text{TNF}\alpha$ -Systems im Gehirn a) durch sich selbst hervorzurufen oder b) in Kombination mit einem Mitogen oder c) ob diese sogar *ohne* $\text{TNF}\alpha$ und nur durch das Mitogen bewirkt werden können?

Die intraperitoneale Gabe von LPS führt im Serum zu erhöhten $\text{TNF}\alpha$ Level und zur Hochregulation der $\text{TNF}\alpha$ mRNA in CVOs und anschließend im zerebralen Parenchym. Wird zerebral synthetisiertes $\text{TNF}\alpha$ durch vorherige Gabe von $\text{TNF}\alpha$ neutralisierenden Antikörpern geblockt, so wird nur noch $\text{TNF}\alpha$ mRNA in den CVOs, nicht aber im Parenchym hochreguliert (Nadeau et al., 2000). Das Mitogen allein ohne Beteiligung von $\text{TNF}\alpha$ kann also eine, wenn auch unvollständige Veränderung des zerebralen $\text{TNF}\alpha$ -Systems hervorrufen (Nadeau et al., 2000).

Es stellt sich dann die Frage, ob $\text{TNF}\alpha$ alleine ohne Mitogen ebenfalls Einfluss auf das zerebrale $\text{TNF}\alpha$ -System nehmen könnte. Nach intravenöser

Gabe von rekombinantem $\text{TNF}\alpha$ konnte eine Hochregulation von p55TNFR in Meningen, Blutgefäßen, CVOS und von p75TNFR in Meningen und Plexus choroidei gezeigt werden (Nadeau et al., 1999b). Offensichtlich ist also auch $\text{TNF}\alpha$ im Serum ohne Mitogen zur Einflussnahme auf die Expression zerebraler TNF -Rezeptoren in der Lage. Die bei diesem Experiment applizierte i.v.-Dosis des rekombinanten Zytokins führte jedoch zu einer $\text{TNF}\alpha$ Konzentration im Serum, die weit über den bei stimulierten Immunsystem *in vivo* zu erwartenden Konzentrationen liegt. So wurden nach SEB-Stimulation $\text{TNF}\alpha$ Konzentrationen zwischen 0,4 pg/ml (Methode: ELISA, Wood et al., 1995) nach 60 μg SEB i.p. und 0,7 ng/ml nach 10 μg SEB in foodpad (ELISA, Miethke et al., 1993), sowie 1,6 ng/ml nach 50 μg SEB i.p. (Bioassay, Bette et al., 1993) gemessen. Im Versuchsdesign von Nadeau erreichte das $\text{TNF}\alpha$ eine Serumkonzentration von umgerechnet 41,2 ng/ml und damit eine um das 26- bis 59-fache der bei SEB-Stimulation *in vivo* gemessenen Konzentrationen. Insofern ist fraglich, ob die bei Nadeau verwendeten extrem artifiziellen Experimentalbedingungen Aussagen über einen normalerweise unter entzündlichen Bedingungen funktionierenden neuroimmunen Dialog zulassen.

Um diesem Einwand artefizieller Versuchsparameter zu entgehen, verwendeten wir ein Modell, das auf unphysiologische hohe Zytokinwerte verzichtet, aber trotzdem die Funktionen von Mitogen und $\text{TNF}\alpha$ im neuroimmunen Kontext differenzieren kann. Dazu wurden zwei verschiedene Mitogene verabreicht, von denen bekannt ist, dass beide potente Induktoren erhöhter $\text{TNF}\alpha$ -Spiegel im Blut sind: SEB und LPS.

LPS bindet zusammen mit dem LPS-binding protein (LBP) an den LPS-Rezeptor mCD14 , der es an den Toll-like receptor (TRL) 4 transferiert (Beutler, 2000; Akira et al., 2001; Beutler, 2002; Kopp et al., 2003). Beide sind konstitutiv in Meningen und CVOs des ZNS expremiert (Lacroix et al., 1998; Laflamme et al., 2001) und nach i.v.-Gabe von LPS oder rekombinantem $\text{TNF}\alpha$ in diesen Regionen sowie den Plexus choroidei hochreguliert (Nadeau et al., 2000).

SEB bindet an MHC II (Neumann, 2001) und/oder an die $\text{V}\beta$ -isotyp spezifischen T-Zell Rezeptor (TcR) β -Kette (Müller-Alouf et al., 2001). Beide Rezeptoren sind im nicht-immunstimulierten Hirn jedoch nicht expremiert, so dass für SEB keine bekannten Bindungsmöglichkeiten im ZNS existieren. SEB-

induzierte Effekte, wie z.B. c-fos Hochregulation im PVN können folglich nicht durch das Mitogen selbst vermittelt werden, sondern sind wahrscheinlich Auswirkungen erhöhter Serumzytokinspiegel.

Wenn $\text{TNF}\alpha$ allein -wie bei Nadeau beschrieben- für die Hochregulation von p55TNFR und p75TNR verantwortlich ist, dann müsste nach SEB-Gabe das durch SEB-induzierte $\text{TNF}\alpha$ im Serum auch die beiden Rezeptoren im ZNS hochregulieren können. Erstaunlicherweise aber wurde nach SEB-Applikation überhaupt keine Veränderung der zerebralen $\text{TNF}\alpha$, p55TNFR und p75TNR Expressionsmuster beobachtet. Offensichtlich scheint $\text{TNF}\alpha$ alleine nicht in der Lage zu sein, das $\text{TNF}\alpha$ -System im Hirn zu beeinflussen.

Gibt es neben dem Fehlen der Bindungstellen für SEB im Gehirn zusätzlich andere Gründe für die non-response der zerebralen $\text{TNF}\alpha$ -Expression?

Eine mögliche Erklärung wäre, dass LPS bzw. SEB die Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke (BBB) unterschiedlich stark verändern. So könnte es nach LPS zu einer Zerstörung der BBB kommen, während diese nach SEB intakt bliebe. Bei Ratten war die BBB noch bei intraperitonealen LPS-Dosen von 560 $\mu\text{g}/\text{Tier}$ unbeschädigt, was ca. 56 μg LPS/Maus entspricht (Bickel et al., 1998). Erst ab 100 $\mu\text{g}/\text{Tier}$ wurde eine Läsion der BBB beschrieben (Lustig et al., 1992). Für SEB sind selbst hohe Dosen von 100 $\mu\text{g}/\text{Maus}$ i.p. als ungefährlich für die BBB demonstriert worden (Kuschnaroff et al., 1999). Die im eigenen Experiment verwendete Dosen von 5 μg LPS/Maus i.p. und 50 μg SEB/Maus i.p. liegen damit weit unterhalb der kritischen Werte, so dass sowohl für LPS als auch SEB von der gleichen physiologischen Permeabilität/Impermeabilität der BBB ausgegangen werden kann.

Die im eigenen Versuch gemessenen $\text{TNF}\alpha$ Serumspiegel (Bette et al., 2003) waren bei LPS-stimulierten Tieren ca. 5 mal so hoch wie die der SEB-stimulierten Tiere. Die niedrige $\text{TNF}\alpha$ Serumkonzentration der SEB-Tiere könnte eine Erklärung der non-response der zerebralen TNF-Rezeptoren sein. Denn es kann nicht völlig ausgeschlossen werden, dass mit der durch SEB erzielten Serum-TNF Konzentration ein anzunehmender Schwellenwert, ab dem es möglicherweise zu einer zerebralen Reaktion käme nicht erreicht wurde.

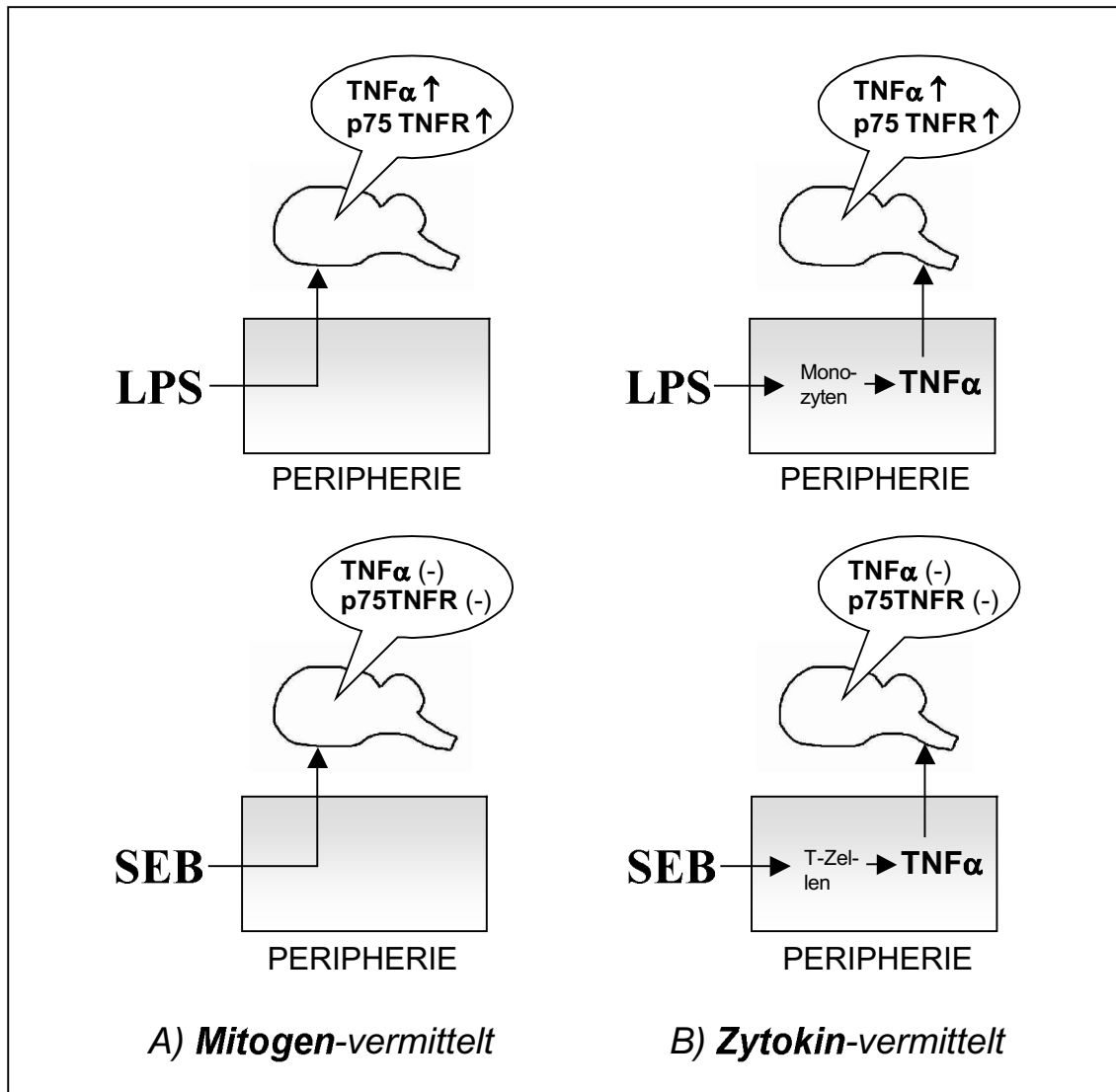


Abb. 6.1.: Schematische Darstellung der Hypothesen des Mitogen- und Zytokin-vermittelten afferenten Schenkel innerhalb der neuroimmunen Kommunikation.

A) Das Mitogen selbst (LPS oder SEB) wirkt direkt auf die zerebrale Expression des $\text{TNF}\alpha$ -Systems. B) Die Mitogene stimulieren Monozyten oder T-Zellen in der Peripherie zur $\text{TNF}\alpha$ -Synthese. Das dadurch freigesetzte $\text{TNF}\alpha$ wirkt dann auf das ZNS.

Theoretisch sind zwei Wege des afferenten Schenkels der neuroimmunen Kommunikation im Kontext des $\text{TNF}\alpha$ -Systems denkbar: a) eine Zytokin-vermittelte Transduktion und b) eine Mitogen-vermittelte Transduktion (Abb. 6.1.).

Aufgrund der eigenen Ergebnisse scheint die Mitogen-vermittelte Transduktion die beobachteten Veränderung der Zytokinexpression im ZNS zu verursachen. Die non-response nach SEB wird am plausibelsten durch das Fehlen entsprechender SEB-Bindungsstellen im ZNS erklärt. Die Hypothese der

Zytokin-vermittelten Transduktion wird folglich als unwahrscheinlich verworfen, da das durch die Mitogene induzierten Serum-TNF α nicht in beiden Fällen zu einer Reaktion der zerebralen TNF-Expression führte. Vielmehr scheint der afferente Schenkel der „immune-to-brain communication“ vom jeweiligen Mitogen abhängig zu sein.

Zusammenfassend konnte die Beteiligung der Mitogene innerhalb der neuroimmunen Kommunikation gezeigt werden. Durch den direkten Vergleich der Effekte der beiden unterschiedlich wirkenden Mitogene SEB und LPS auf das zerebrale TNF-System konnte klargelegt werden, dass der Mechanismus dieser Kommunikation auch Mitogen-abhängig organisiert ist. Bei der Informationsvermittlung zwischen Immunsystem und ZNS sind demnach nicht nur Nerven wie z.B. der N. vagus und Zytokine wie z.B. IL-1 β beteiligt, sondern auch Mitogene wie LPS.

Das bereits für TNF α bekannte Phänomen des „spreadings“ nach LPS-Gabe wurde bestätigt. Erstmals (zum Zeitpunkt der Publikation der Daten) wurde eine starke konstitutive neuronale p55TNFR Expression in Hirnnerven-kerngebieten und eine schwache non-neuronale p75TNFR Expression *in vivo* im Gehirn nachgewiesen. Eine konstitutive Expression von TNF α mRNA in Nervenzellen konnte eindeutig ausgeschlossen werden.

Zudem wurde ein bisher noch nicht publiziertes komplettes mapping der TNF α -, p55TNFR- und p75TNFR-Expression im Gehirn nach SEB-Stimulation durchgeführt und die non-response des Systems aufgezeigt.

Kapitel 7

Literaturverzeichnis

Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. (1994). *Cellular and molecular immunology*, Philadelphia Saunders

Aggarwal BB, Vilcek J (Eds.) (1992). *Tumor necrosis factor: structure, function and mechanism of action*, pp 1-624. Marcel Dekker, New York

Aggarwal BB, Kohr WJ, Hass PE, Moffat B, Spencer SA, Henzel WJ, Bringman TS, Nedwin GE, Goeddel DV Harkins RN (1985). Human tumor necrosis factor. Production, purification, and characterization. *J Biol Chem* **260**:2345-2354

Agresti C, Bernado A, Bel Russo N, Marziali G, Battistini A, Aloisi F, Levi G, Coccia EM (1998). Synergistic stimulation of MHC class I and IRF-1 gene expression by IFN-gamma and TNF-alpha in oligodendrocytes. *Eur J Neurosci* **10**:297-283

Akira S, Takeda K, Kaisho T (2001). Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nat Immunol* **2**:675-680

Alber G, Hammer DK, Fleischer B (1990). Relationship between enterotoxic- and T lymphocyte-stimulating activity of staphylococcal enterotoxin B. *J Immunol* **144**:4501-4506

Alikhani M, Alikhani Z, Graves DT (2004). Apoptotic effects of LPS on fibroblasts are indirectly mediated through TNFR1. *J Dent Res* **83**:671-676

Andersson J, Nagy S, Bjork L, Abrams J, Holm S, Andersson U (1992). Bacterial toxin-induced cytokine production studied at the single-cell level. *Immunol Rev* **127**:69-96

Angerer LM, Cox KH, Angerer RC (1987). Demonstration of tissue-specific gene expression by in-situ hybridization. *Methods Enzymol* **152**:649-661

Armitage RJ (1994). Tumor necrosis factor receptor superfamily members and their ligands. *Curr Opin Immunol* **6**:407-413

Aranguéz I, Torres C, Rubio N (1995). The receptor for tumor necrosis factor on murine astrocytes: characterization, intracellular degradation, and regulation by cytokines and Theiler's murine encephalomyelitis virus. *Glia* **13**:185-194

Arnett HA, Masson J, Marino M, Suzuki K, Matsushima GK, Ting JP (2001). TNF alpha promotes proliferation of oligodendrocyte progenitors and remyelination. *Nat Neurosci* **4**:1116-1122

Banks WA, Kastin AJ (1987). Saturable transport of peptides across the blood-brain barrier. *Life Sci* **41:1319-1338**

Banks WA, Kastin AJ, Durham DA (1989). Bidirectional transport of interleukin-1 alpha across the blood-brain barrier. *Brain Res Bull* **23:433-437**

Banks WA, Ortiz L, Plotkin SR, Kastin AJ (1991a). Human interleukin (IL) 1 alpha, murine IL-1 alpha and murine IL-1 beta are transported from blood to brain in the mouse brain by a shared saturable mechanism. *J Pharmacol Exp Ther* **259:988-996**

Banks WA, Kastin AJ (1991b). Blood to brain transport of interleukin links the immune and central nervous systems. *Life Sci* **48:PL117-121**

Banks WA, Kastin AJ (1992). The interleukin-1 alpha, -1 beta, and -2 do not actually disrupt the murine blood-brain barrier. *Int J Immunopharmacol* **14:629-636**

Banks WA, Kastin AJ, Gutierrez EG (1993). Interleukin-1 alpha in blood has direct access to cortical brain cells. *Neurosci Lett* **163:41-44**

Banks WA, Kastin AJ, Gutierrez EG (1994). Penetration of interleukin-6 across the murine blood-brain barrier. *Neurosci Lett* **179:53-56**

Baud V, Karin M (2001). Signal transduction by tumor necrosis factor and its relatives. *Trends Cell Biology* **11:372-377**

Bazzoni F, Beutler B (1996). The tumor necrosis factor ligand and receptor families. *N Engl J Med* **334:1717-1725**

Bebo BF Jr, Linthicum DS (1995). Expression of mRNA for p55-kDa and 75-kDa tumor necrosis factor (TNF) receptors in mouse cerebrovascular endothelium: effects of interleukin-1 beta, interferon-gamma and TNF-alpha on cultured cells. *J Neuroimmunol* **62:161-167**

Belluardo N, Korhonen L, Mudo G, Lindholm D (2002). Neuronal expression and regulation of rat inhibitor of apoptosis protein-2 by kainic acid in the rat brain. *Eur Neurosci* **15:78-100**

Besedovsky H, Sorkin E, Keller M, Müller J (1975). Changes in blood hormone levels during the immune response. *Proc Soc Exp Biol Med* **150:466-470**

Besedovsky H, Sorkin E, Felix D, Haas H (1977). Hypothalamic changes during the immune response. *Eur J Immunol* **7:323-235**

Besedovsky HO, del Rey A, Sorkin E (1981). Lymphokine-containing supernatants from con A-stimulated cells increase corticosterone blood levels. *J Immunol* **126:385-387**

Besedovsky H, del Rey A, Sorkin E, Dinarello CA (1987). Immunoregulatory feedback between interleukin-1 and glucocorticoid hormones. *Science* **233:652-654**

Bette M, Schafer MK, van Rooijen N, Weihe E, Fleischer B (1993). Distribution and kinetics of superantigen-induced cytokine gene expression in mouse spleen. *J Exp Med* **178:1531-1519**

Bette M, Kaut O, Schafer MK, Weihe E (2003). Constitutive expression of p55TNFR mRNA and mitogen-specific up-regulation of TNF alpha and p75TNFR mRNA in mouse brain. *J Comp Neurol* **465:417-430**

Beutler B, Mahoney J, Le Trang H, Pekala P, Cerami A (1985a). Purification of cachectin, a lipoprotein lipase-suppressing hormone secreted by endotoxin-induced RAW 264.7 cells. *J Exp Med* **161:984-995**

Beutler B, Greenwald D, Hulmes JD, Chang JD, Pan YC, Mathison J, Ulevitch R, Cerami A (1985b). Identity of tumour necrosis factor and the macrophage-secreted factor cachectin. *Nature* **316:552-554**

Beutler BA, Milsark IW, Cerami A (1985c). Cachectin/tumor necrosis factor: production, distribution, and metabolic fate in vivo. *J Immun* **135:3972-3977**

Beutler B, Krochin N, Milsark IW, Luedke C, Cerami A (1986a). Control of cachectin (tumor necrosis factor) synthesis: mechanisms of endotoxin resistance. *Science* **232:977-80**

Beutler B, Cerami A (1986b). Cachectin and tumor necrosis factor as two sides of the same biological coin. *Nature* **320:584-588**

Beutler BA (1999). The role of tumor necrosis factor in health and disease. *J Rheumatol* **26 (Suppl) 57:16-21**

Beutler B (2000). Tlr4: central component of the sole mammalian LPS sensor. *Curr Opin Immunol* **12:20-26 2000**

Beutler B (2002). Toll-like receptors: how they work and what they do. *Curr Opin Hematol* **9:2-10**

Beyaert R, Fiers W (1994). Molecular mechanisms of tumor necrosis factor-induced cytotoxicity. What do we understand and what we do not. *FEBS Lett* **340:9-16**

Bickel U, Grave B, Kang YS, del Rey A, Voigt K (1998). No increase in blood-brain barrier permeability after intraperitoneal injection of endotoxin in the rat. *J Neuroimmunol* **85:131-136**

Blais V, Rivest S (2004). Effects of TNF-alpha and IFN-gamma on nitric oxide-induced neurotoxicity in the mouse brain. *J Immunol* **172:7043-7052**

Blatteis CM (1992). Role of the OVLT in the febrile response to circulating pyrogens. *Prog Brain Res* **91:409-412**

Blatteis CM, Sehic E (1997). Circulating pyrogen signaling of the brain. A new working hypothesis. *Ann N Y Acad Sci* **813:445-447**

Blumberg DD (1987). Creating a ribonuclease-free environment. *Methods Enzymol* **152:20-24**

Bohatschek M, Kloss CU, Hristova M, Pfeffer K, Raivich G (2004). Microglial major histocompatibility complex glycoprotein-1 in the axotomized facial motor nucleus: regulation and role of tumor necrosis factor receptors 1 and 2. *J Comp Neurol* **470:382-399**

Branes PJ, Karin M (1997). Nuclear factor- κ B: a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. *New Engl J Med* **336:1066-1071**

Breder CD, Hazuka C, Ghayur T, Klug C, Huginin M, Yasuda K, Teng M, Saper B (1994). Regional induction of tumor necrosis factor alpha expression in the mouse brain after systemic lipopolysaccharide administration. *Proc Natl Acad Sci USA, Neurobiology* **91:11393-11397**

Brennan FM, Maini RN, Feldmann M (1992). TNF-alpha: A pivotal role in rheumatoid arthritis? *Br J Rheumatol Int* **31:293-298**

Brockhaus M, Schoenfeld HJ, Schlaeger EJ, Hunziker W, Lesslauer W, Loetscher H (1990). Identification of two types of tumor necrosis factor receptors on human cell lines by monoclonal antibodies. *Proc Natl Acad Sci USA* **87:3127-3131**

Buller KM (2001). Role of circumventricular organs in pro-inflammatory cytokine-induced activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Clin Exp Pharmacol Physiol* **28:581-589**

Buttini M, Appel K, Sauter A, Gebicke-Haerter PJ, Boddeke HW (1996). Expression of tumor necrosis factor alpha after focal cerebral ischaemia in the rat. *Neuroscience* **71:1-16**

Cacquevel M, Lebeurrier N, Cheenne S, Vivien D (2004). Cytokines in neuroinflammation and Alzheimer's Disease. *Curr Drug Targets* **5:529-534**

Camussi G, Albano E, Tetta C, Bussolino F (1991). The molecular action of tumor necrosis factor-alpha. *Eur J Biochem* **202:3-14**

Caldwell FT, Graves DB, Wallace BH (1999). Humoral versus neural pathways for fever production in rats after administration of lipopolysaccharide. *J Trauma* **47:120-129**

7. Literaturverzeichnis

Carswell EA, Old LJ, Kassel RL, Green S, Fiore N, Williamson B (1975). An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **72:3666-3670**

Cerami A, Beutler B (1988). The role of cachectin/TNF in endotoxic shock and cachexia. *Immunol Today* **9:28-31**

Chen G, Goeddel DV (2002a). TNF-R1 signaling: a beautiful pathway. *Science* **296:1634-1635**

Chen G, Goeddel DV (2002b). TNF Pathway. *Science's STKE (Connections Map, as seen April 2004)*, http://stke.sciencemag.org/cgi/cm/CMP_7107

Ching S, He L, Lai W, Quan N (2005). IL-1 type I receptor plays a key role in mediating the recruitment of leukocytes into the central nervous system. *Brain Behav Immun* **19:127-137**

Chomzynsky P, Sacchi N (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* **162:156-159**

Chung IY, Benveniste EN (1990). Tumor necrosis factor-alpha production by astrocytes. Induction by lipopolysaccharide, IFN-gamma, and IL-1 beta. *J Immunol* **144:2999-3007**

Coley WB (1893). The treatment of malignant tumors by repeated inoculations of erysipeloid: with a report of ten original cases. *Am J Med Sci* **105:487-511**

Cox KH, DeLeon DV, Angerer LM, Angerer RC (1984). Detection of mRNAs in sea urchin embryos by in situ hybridization. *Dev Biol* **101:485-502**

Cui X, Imaizumi T, Yoshida H, Tanji K, Matsumiya T, Satoh K (2000). Lipopolysaccharide induces the expression of cellular inhibitor of apoptosis protein-2 in human macrophages. *Biochem Biophys Acta* **1524:178-82**

Cunha FQ, Poole S, Lorenzetti BB, Ferreira SH (1992). The pivotal role of tumour necrosis factor alpha in the development of inflammatory hyperalgesia. *Br J Pharmacol* **107:660-664**

Cunningham ET Jr, Stalder AK, Sanna PP, Liu SS, Bloom FE, Howes EL Jr, Campbell IL, Margolis TP (1997). Distribution of tumor necrosis factor receptor messenger RNA in normal and herpes simplex virus infected trigeminal ganglia in the mouse. *Brain Res* **758:99-106**

Dantzer R, Konsman JP, Bluthé RM, Kelley KW (2000). Neural and humoral pathways of communication from the immune system to the brain: parallel or convergent? *Auton Neurosci* **85:60-65**

Dascombe MJ, Milton AS (1979). Study on the possible entry of bacterial endotoxin and prostaglandin E2 into the central nervous system from the blood. *Brit J Pharmacol* **66:562-572**

Davson H, Welch K, Segal MB (Eds.) (1987). In: *The Physiology and Pathophysiology of the Cerebrospinal Fluid*, pp 247-374, Churchill Livingstone, Edinburgh

Dayer JM, Beutler B, Cerami A (1985). Cachectin/tumor necrosis factor stimulates collagenase and prostaglandin E2 production by human synovial cells and dermal fibroblasts. *J Exp Med* **162:2163-2168**

Del Rey A, Randolph A, Pitossi F, Rogausch H, Besedovsky HO (2000). Not all peripheral immune stimuli that activate the HPA axis induce proinflammatory cytokine gene expression in the hypothalamus. *Ann N Y Acad Sci* **917:169-174**

Dembic Z, Loetscher H, Gubler U, Pan YC, Lahm HW, Gentz R, Brockhaus M, Lesslauer W (1990). Two human TNF receptors have similar extracellular, but distinct intracellular, domain sequences. *Cytokine* **2:231-237**

Dinarello CA, Endres S, Meydani SN, Meydani M, Hellerstein MK (1990). Interleukin-1, anorexia, and dietary fatty acids. *Ann N Y Acad Sci* **587:332-338**

Dopp JM, Mackenzie-Graham A, Otero GC, Merrill JE (1997). Differential expression, cytokine modulation, and specific functions of type-1 and type-2 tumor necrosis factor receptors in rat glia. *J Neuroimmunol* **75:104-112**

Dziewulska D, Mossakowski MJ (2003). Cellular expression of tumor necrosis factor α and its receptors in human ischemic stroke. *Clinical Neuropathol* **22:35-40**

Ek M, Kurosawa M, Lundeberg T, Ericsson A (1998). Activation of vagal afferents after intravenous injection of interleukin-1 beta: role of endogenous prostaglandins. *J Neurosci* **18:9471-9479**

Ericsson A, Arias C, Sawchenko PE (1997). Evidence for an intramedullary prostaglandin-dependent mechanism in the activation of stress-related neuroendocrine circuitry by intravenous interleukin-1. *J Neurosci* **17:7166-7179**

Erikstein BK, Smeland EB, Blomhoff HK, Funderud S, Prydz K, Lesslauer W, Espevik T (1991). Independent regulation of 55-kDa and 75-kDa tumor necrosis factor receptors during activation of human peripheral blood B lymphocytes. *Eur J Immunol* **21:1033-1037**

Farrah T, Smith CA (1992). Emerging cytokine family. *Nature* **358:26**

Feldmann M, Maini RN (2003). Lasker Clinical Medical Research Award. TNF defined as therapeutic target for rheumatoid arthritis and other autoimmune diseases. *Nat Med* **9:1245-1250**

Felten DL, Livnat S, Felten SY, Carlson SL, Bellinger DL, Yeh P (1984). Sympathetic innervation of lymph nodes in mice. *Brain Res Bull* **13:693-696**

Ferreira SH, Lorenzetti BB, Bristow AF, Poole S (1988). Interleukin-1 beta as a potent hyperalgesic agent antagonized by a tripeptide analogue. *Nature* **334:698-700**

Fink T, Weihe E (1988). Multiple neuropeptides in nerves supplying mammalian lymph nodes: messenger candidates for sensory and autonomic neuroimmunomodulation? *Neurosci Lett* **90:39-44**

Fitzgerald KA, O'Neill LAJ, Gearing AJH, Callard RE. (Eds.)(2001). *The Cytokine Factsbook*. Factsbook Series. Academic Press

Fleischer B, Schrezenmeier H, Conradt P (1989). T cell stimulation by staphylococcal enterotoxins. Role of class II molecules and T cell surface structures. *Cell Immunol* **119:92-101**

Franciosi S, Choi HB, Kim SU, McLarnon JG (2005). IL-8 enhancement of amyloid-beta (A β 1-42)-induced expression and production of pro-inflammatory cytokines and COX-2 in cultured human microglia. *J Neuroimmunol* **159:66-74**

Franklin BJK, George Paxinos, *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*, San Diego (1997), Academic Press

Fukuoka H, Kawatani M, Hisamitsu T, Takeshige C (1994). Cutaneous hyperalgesia induced by peripheral injection of interleukin-1 beta in the rat. *Brain Res* **657:133-140**

Gatti S, Bartfai T (1993). Induction of tumor necrosis factor-alpha mRNA in the brain after peripheral endotoxin treatment : comparison with interleukin-1 family and interleukin-6. *Brain Res* **624:291-294**

Gaykema RP, Dijkstra L, Tilders FJ (1995). Subdiaphragmatic vagotomy suppresses endotoxin-induced activation of hypothalamic corticotropin-releasing hormone neurons and ACTH secretion. *Endocrinology* **136:4717-4720**

Gayle D, Ilyin SE, Flynn MC, Plata-Salaman CR (1998). Lipopolysaccharide (LPS) – and muramyl dipeptide (MDP) – induced anorexia during refeeding following acute fasting: characterization of brain cytokine and neuropeptide systems mRNAs. *Brain Res* **795:77-86**

Gehr G, Gentz R, Brockhaus M, Loetscher H, Lesslauer W (1992). Both tumor necrosis factor receptor types mediate proliferative signals in human mononuclear cell activation. *J Immunol* **149:911-917**

Goehler LE, Relton JK, Dripps D, Kiechle R, Tartaglia N, Maier SF, Watkins LR (1997). Vagal paraganglia bind biotinylated interleukin-1 receptor antagonist: a

possible mechanism for immune-to-brain communication. *Brain Res Bull* **43:357-364**

Goehler LE, Gaykema RP, Hansen MK, Anderson K, Maier SF, Watkins LR (2000). Vagal immune-to-brain communication: a visceral chemosensory pathway. *Auton Neurosci* **85:49-59**

Goehler LE, Gaykema RP, Hansen MK, Kleiner JL, Maier SF, Watkins LR (2001). Staphylococcal enterotoxin B induces fever, brain c-Fos expression, and serum corticosterone in rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **280:R1434-R1439**

Goldbach JM, Roth J, Zeisberger E (1997). Fever suppression by sub-diaphragmatic vagotomy in guinea pigs depends on the route of pyrogen administration. *Am J Physiol* **272:R675-R681**

Goldfeld AE, Strominger JL, Doyle C (1991). Human tumor necrosis factor-alpha gene regulation in phorbol ester-stimulated T and B cell lines. *J Exp Med* **174:73-81**

Goodwin RG, Anderson K, Jerzy R, Davis T, Brannan CI, Copeland NG, Jenkins NA, Smith CA (1991). Molecular cloning and expression of the type 1 and type 2 murine receptors for tumor necrosis factor. *Mol Cell Biol* **11:3020-3026**

Grassi F, Mileo AM, Monaco L, Punturieri A, Santoni A, Eusebi F (1994). TNF-alpha increases the frequency of spontaneous miniature synaptic currents in cultured rat hippocampal neurons. *Brain Res* **659:226-230**

Gravestain LA, Borst J (1998). Tumor necrosis factor receptor family members in the immune system. *Semin Immunol* **10:423-34**

Greig NH, Mattson MP, Perry T, Chan SL, Giordano T, Sambamurti K, Rogers JT, Ovadia H, Lahiri DK (2004). New Therapeutic Strategies and Drug Candidates for Neurodegenerative Diseases: p53 and TNF-(alpha) Inhibitors, and GLP-1 Receptor Agonists. *Ann N Y Acad Sci* **1035:290-315**

Grell M, Douni E, Wajant H, Lohden M, Clauss M, Maxeiner B, Georgopoulos S, Lesslauer W, Koolias G, Pfizenmaier K et al. (1995). The transmembrane form of tumor necrosis factor is the prime activating ligand of the 80 kDa tumor necrosis factor receptor. *Cell* **83:793-80**

Grell M, Becke FM, Wajant H, Mannel DN, Scheurich P (1998). TNF receptor type 2 mediates thymocyte proliferation independently of TNF receptor type 1. *Eur J Immunol* **28:257-263**

Gutierrez EG, Banks WA, Kastin AJ (1993). Murine tumor necrosis factor alpha is transported from blood to brain in the mouse. *J Neuroimmunol* **47:169-176**

Hanahan D (1986). Techniques for Transformation of E. coli. In: Glower, DM (Ed.) *DNA Cloning: A Practical Approach*. Vol. 1, IRL Press, Oxford, 109-135

Hansen MK, Krueger JM (1998). Subdiaphragmatic vagotomy blocks the sleep- and fever-promoting effects of interleukin-1 β . *Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol* **273**:R1246-R1253

Hansen MK, Daniels S, Goehler LE, Gaykema RP, Maier SF, Watkins LR (2000a). Subdiaphragmatic vagotomy does not block intraperitoneal lipopolysaccharide-induced fever. *Auton Neurosci* **85**:83-87

Hansen MK, Nguyen KT, Fleshner M, Goehler LE, Gaykema RPA, Maier SF, Watkins LR (2000b). Effects of vagotomy on serum endotoxin, cytokines, and corticosterone after intraperitoneal lipopolysaccharide. *Am J Physiol* **278**:R331-R336

Hansen MK, O'Conner KA, Goehler LE, Watkins LR, Maier SF (2001). The contribution of the vagus nerve in interleukin-1 β -induced fever is dependent on dose. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **280**:R929-R934

Hart BL (1988) Biological basis of the behavior of sick animals. *Neurosci Biobehav Rev* **12**:123-137

Hashimoto M, Ishikawa Y, Yokota S, Goto F, Bando T, Sakakibara Y, Iriki M (1991). Action site of circulating interleukin-1 on the rabbit brain. *Brain Res* **540**:217-223

Hetier E, Ayala J, Bousseau A, Prochiantz A (1991). Modulation of interleukin-1 and tumor necrosis factor expression by beta-adrenergic agonists in mouse ameboid microglial cells. *Exp Brain Res* **86**:407-13

Hermann GE, Emch GS, Tovar CA, Rogers RC (2001). c-Fos generation in the dorsal vagal complex after systemic endotoxin is not dependent on the vagus nerve. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **280**:289-299

Hermann GE, Hebert SL, Van Meter MJ, Holmes GM, Rogers RC (2004). TNF alpha-p55 receptors: medullary brainstem immunocytochemical localization in normal and vagus nerve-transected rats. *Brain Res* **1004**:156-166

Ibelgaufts H (2003). Horst Ibelgaufts' *COPE* (Cytokine Online Pathfinder Encyclopaedia), Version 10.3., Juli 2003

Idriss HT, Naismith JH (2000). TNF alpha and the TNF receptor superfamily: structure-function relationship(s). *Microsc Res Tech* **50**:184-195

Ilyin SE, Gayle D, Flynn MC, Plata-Salaman CR (1998). Interleukin-1 β system (ligand, receptor type I, receptor accessory protein and receptor antagonist), TNF-alpha, TGF-beta and neuropeptide Y mRNAs in specific brain regions bacterial LPS-induced anorexia. *Brain Res Bull* **45**:507-15

Janeway CA Jr. (2001). How the immune system works to protect the host from infection: a personal view. *Proc Natl Acad Sci USA* **98:7461-7468**

Janeway CA Jr., Medzhitov R (2002). Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol* **20:197-216**

Jue DM, Sherry B, Luedke C, Manogue KR, Cerami A (1990). Processing of newly synthesized cachectin/tumor necrosis factor in endotoxin-stimulated macrophages. *Biochemistry* **29:8371-8377**

Kalthoff H, Roeder C, Brockhaus M, Thiele HG, Schmiegel W (1993) J Tumor necrosis factor (TNF) up-regulates the expression of p75 but not p55 TNF receptors, and both receptors mediate, independently of each other, up-regulation of transforming growth factor alpha and epidermal growth factor receptor mRNA. *J Biol Chem* **268:2762-2766**

Kapas L, Hansen MK, Chang HY, Krueger JM (1998). Vagotomy attenuates but does not prevent somnogenic and febrile effects of lipopolysaccharide in rats. *Am J Physiol* **274:R406-R411**

Kapcala LP, He JR, Gao Y, Pieper JO, DeTolla LJ (1996). Subdiaphragmatic vagotomy inhibits intraabdominal interleukin-1beta stimulation of adrenocorticotropin secretion. *Brain Res* **728:247-254**

Katsuura G, Gottschalk PE, Dahl RR, Arimura A (1989). Interleukin-1 beta increases prostaglandin E2 in rat astrocyte cultures: modulatory effect of neuropeptides. *Endocrinology* **124:3125-3127**

Katsuura G, Arimura A, Koves K, Gottschall PE (1990). Involvement of organum vasculosum of lamina terminalis and preoptic area in interleukin 1 beta-induced ACTH release. *Amer J Physiol* **258:E163-E131**

Kaur C, Hao AJ, Wu CH, Ling EA (2001). Origin of microglia. *Microsc Res Tech* **54:2-9**

Keeney TS, Nomura LE, Maecker HT, Sastry KJ (2003). Flow cytometric analysis of macaque whole blood for antigen-specific intracellular cytokine production by T lymphocytes. *J Med Primatol* **32:23-30**

Kent S, Bluth RM, Kelley KW, Dantzer R (1992a). Sickness behavior as a new target for drug development. *Trends Pharmacol Sci* **13:24-28**

Kent S, Bluth RM, Dantzer R, Hardwick AJ, Kelley KW, Rothwell NJ, Vannice JL (1992b). Different receptor mechanisms mediate the pyrogenic and behavioral effects of interleukin-1. *Proc Natl Acad Sci USA* **89:9117-9120**

Kluger MJ (1991). Fever: role of pyrogens and cryogens. *Physiol Rev* **71:93-127**

Komaki G, Arimura A, Koves K (1992). Effect of intravenous injection of IL-1 beta on PGE2 levels in several brain areas as determined by microdialysis. *Amer J Physiol* **262**:E246-E251

Knoblach SM, Fan L, Faden AI (1999). Early neuronal expression of TNF-alpha after experimental brain injury contributes to neurological impairment. *J Neuroimmunol* **95**:115-125

Kobierski LA, Srivasta S, Borsook D (2000). Systemic lipopolysaccharide and interleukin-1beta activate the interleukin 6: STAT intracellular signaling pathway in neurons of mouse trigeminal ganglion. *Neurosci Lett* **281**:61-64

Kopp E, Medzhitov R (2003). Recognition of microbial infection by Toll-like receptors. *Curr Opin Immunol* **15**:396-401

Kriegler M, Perez C, DeFay K, Albert I, Lu SD (1988). A novel form of TNF/cachectin is a cell surface cytotoxic transmembrane protein: Ramifications for the complex physiology of TNF. *Cell* **53**:45-53

Krueger JM, Fang J, Taishi P, Chen Z, Kushikata T, Gardi J (1998). Sleep. A physiological role for IL-1 beta and TNF-alpha. *Ann N Y Acad Sci* **856**:148-159

Kuschnaroff LM, Overbeck L, Sefriouni H, Sobis H, Vandeputte M, Waer M (1999). Effect of staphylococcal enterotoxin B injection on the development of experimental autoimmune encephalomyelitis: influence of cytokine and inducible nitric oxide synthetase production. *J Neuroimmunol* **99**:157-168

Kuwabara S, Ogawara K, Misawa S, Mori M, Hattori T (2002). Distribution patterns of demyelination correlate with clinical profiles in chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* **72**:37-42

Kwon B, Youn BS, Kwon BS (1999). Functions of newly identified members of the tumor necrosis factor receptor/ligand superfamilies in lymphocytes. *Curr Opin Immunol* **11**:340-345

Lacroix S, Feinstein D, Rivest S (1998). The bacterial endotoxin lipopolysaccharide has the ability to target the brain in upregulating its membrane CD14 receptor within specific cellular populations. *Brain Pathol* **8**:625-640

Laflamme N, Rivest S (2001). Toll-like receptor 4: the missing link of the cerebral innate immune response triggered by circulating gram-negative bacterial cell wall components. *FASEB J* **15**:155-163

Lafortune L, Nalbantoglu J, Antel JP (1996). Expression of tumor necrosis factor alpha (TNF alpha) and interleukin 6 (IL-6) mRNA in adult human astrocytes: comparison with adult microglia and fetal astrocytes. *J Neuropathol Exp Neurol* **55**:515-521

7. Literaturverzeichnis

Laye S, Bluthé RM, Kent S, Combe C, Medina C, Parnet P, Kelley K, Dantzer R (1995). Subdiaphragmatic vagotomy blocks induction of IL-1 beta mRNA in mice brain in response to peripheral LPS. *Am J Physiol* **268**:R1327-R1331

Lee YB, Schrader JW, Kim SU (2000). P38 map kinase regulates TNF-alpha production in human astrocytes and microglia by multiple mechanisms. *Cytokine* **12**:874-880

Lee YB, Nagai A, Kim SU (2002). Cytokines, chemokines, and cytokine receptors in human microglia. *J Neurosci Res* **69**:94-103

LeVine SM, Brown DC (1997). IL-6 and TNF alpha expression in brains of twitcher, quaking and normal mice. *J Neuroimmunol* **73**:47-56

Levin VA (1980). Relationship of octanol/water partition coefficient and molecular weight to rat brain capillary permeability. *J Med Chem* **23**:682-684

Levy O, Jean-Jaques RM, Cywes C, Sisson RB, Zarembek KA, Godowski PJ, Christianson JL, Guttormsen HK, Carroll MC, Nicholson-Weller A, Wessels MR (2003). Critical role of the complement system in group B streptococcus-induced tumor necrosis factor alpha release. *Infect Immun* **71**:6344-6353

Lewis M, Tartaglia LA, Lee A, Bennett GL, Rice GC, Wong GH, Chen EY, Goeddel DV (1991). Cloning and expression of cDNAs for two distinct murine tumor necrosis factor receptors demonstrate one receptor is species specific. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**:2830-2834

Lindenlaub T, Sommer C (2003). Cytokine in sural nerve biopsies from inflammatory and non-inflammatory neuropathies. *Acta Neuropathol (Berl)* **105**:593-602

Ling EA, Ng YK, Wu CH, Kaur C (2001). Microglia: its development and role as a neuropathology sensor. *Prog Brain Res* **132**:61-79

Liu B, Wang K, Gao HM, Manavilli B, Wang JY, Hong JS (2001). Molecular consequences of activated microglia in the brain: overactivation induces apoptosis. *J Neurochem* **77**:182-189

Liu CC, Detmers PA, Jiang S, Young JD (1989). Identification and characterization of a membrane-bound cytotoxin of murine cytolytic lymphocytes that is related to tumor necrosis factor/cachectin. *Proc Natl Acad Sci USA* **86**:3286-3290

Liu L, Kita T, Tanaka N, Kinoshita Y (1996). The expression of tumor necrosis factor in the hypothalamus after treatment with lipopolysaccharide. *Int J Exp Pathol* **77**:37-44

Li Y, Ji A, Weihe E, Schafer MK (2004). Cell-specific expression and lipopolysaccharide-induced regulation of tumor necrosis factor alpha (TNFalpha) and TNF receptors in rat dorsal root ganglion. *J Neurosci* **24**:9623-9631

Locksley RM, Killeen N, Lenardo MJ (2001). The TNF and TNF receptor super-families: integrating mammalian biology. *Cell* **104:487-501**

Lossinsky AS, Shivers RR (2004). Structural pathways for macromolecular and cellular transport across the blood-brain barrier during inflammatory conditions. Review. *Histol Histopathol* **19:535-564**

Lung HL, Leung KN, Stadlin A, Ma CM, Tsang D (2001). Induction of tumor necrosis factor receptor type 2 gene expression by tumor necrosis factor-alpha in rat primary astrocytes. *Life Sci* **68:2081-2091**

Lustig S, Danenberg HD, Kobri Y, Kobiler D, Ben-Nathan D (1992). Viral neuroinvasion and encephalitis induced by lipopolysaccharide and its mediators. *J Exp Med* **176:707-712**

MacEwan DJ (2002). TNF receptor subtype signalling: Differences and cellular consequences. *Cell Signal* **14:477-492**

Mackay F, Loetscher H, Stueber D, Gehr G, Lesslauer W (1993). Tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha)-induced cell adhesion to human endothelial cells is under dominant control of one TNF receptor type TNF-R55. *J Exp Med* **177:1277-1286**

Maier SF, Watkins LR (2003). Immun-to-central nervous system communication an ist role in modulating pain and cognition: Implications for cancer and cancer treatment. *Brain Behav Immun* **17:S125-S131**

Malmberg AB, Yaksh TL (1992). Hyperalgesia mediated by spinal glutamate or substance P receptor blocked by spinal cyclooxygenase inhibition. *Science* **257:1276-1279**

Malmberg AB, Rafferty MF, Yaksh TL (1994). Antinociceptive effect of spinally delivered prostaglandin E receptor antagonists in the formalin test on the rat. *Neurosci Lett* **173:193-196**

Markham A, Lamb HM (2000). Infliximab: a review of its use in the management of rheumatoid arthritis. *Drugs* **59:1341-1359**

Marrack P, and Kappler J (1990). The staphylococcal enterotoxins and their relatives. *Science* **248:705-711**

Masuhr KF, Neumann M (1998). *Neurologie*, 4. Auflage Stuttgart, S. 283

Medana IM, Hunt NH, Chaudhri G (1997). TNF-alpha expression in the brain during fatal murine cerebral malaria: evidence for production by microglia and astrocytes. *Am J Pathol* **150:1473-1486**

Mei FJ, Ishizu T, Murai H, Osoegawa M, Minohara M, Zhang KN, Kira J (2005). Th1 shift in CIDP versus Th2 shift in vasculitic neuropathy in CSF. *J Neurol Sci* **228:75-85**

Miethke T, Wahl C, Heeg K, Wagner H (1993). Acquired resistance to superantigen-induced T cell shock. V beta selective T cell unresponsiveness unfolds directly from a transient state of hyperreactivity. *J Immunol* **150**:3776-3784

Miller VE, Rogers K, Muirden KD (1993). Detection of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1beta in the rheumatoid osteoarthritic cartilagepannus junction by immunohistochemical methods. *Rheumatol Int* **13**:77-82

Mizuno T, Kawanokuchi J, Numata K, Suzumura A (2003). Production and neuroprotective functions of fractalkine in the central nervous system. *Brain Res* **979**:65-70

Müller-Alouf H, Carnoy C, Simonet M, Alouf JE (2001). Superantigen bacterial toxins : state of the art. *Toxicon* **39**:1691-1701

Müller U, Jongeneel CV, Nedospasov SA, Lindahl KF, Steinmetz M (1987). Tumor necrosis factor and lymphotoxins genes map close to H-2D in the mouse major histocompatibility complex. *Nature* **325**:265-267

Nadeau S, Rivest S (1999a). Regulation of the gene encoding tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) in the rat brain and pituitary in response to different models of systemic immune challenge. *J Neuropathol Exp Neurol* **58**:61-77

Nadeau S, Rivest S (1999b). Effects of circulating tumor necrosis factor on the neuronal activity and expression of the genes encoding the tumor necrosis factors (p55 and p75) in the rat brain: a view from the blood-brain barrier. *Neurosci* **93**:1449-1464

Nadeau S, Rivest S (2000). Role of microglia-derived tumor necrosis factor in mediating CD14 transcription and NF-κB activity in the brain during endotoxemia. *J Neurosci* **20**:3456-3468

Nadeau S, Rivest S (2002). Endotoxemia prevents the cerebral inflammatory wave induced by intraparenchymal lipopolysaccharide injection: role of glucocorticoids and CD14. *J Immunol* **169**:3370-3381

Nakamura Y, Si Qs, Kataoka K (1999). Lipopolysaccharide-induced microglial activation in culture : temporal profiles of morphological change and release of cytokines and nitric oxide. *Neurosci Res* **35**:95-100

Natoli G, Costanzo A, Guido F, Moretti F, Levrero M (1998). Apoptotic, non-apoptotic, and anti-apoptotic pathways of tumor necrosis factor signalling. *Biochem Pharmacol* **56**:915-920

Naume B, Shalaby R, Lesslauer W, Espevik T (1991). Involvement of the 55- and 75-kDa tumor necrosis factor receptors in the generation of lymphokine-activated killer cell activity and proliferation of natural killer cells. *J Immunol* **146**:3045-3048

Nedospasov SA, Hirt B, Shakhov AN, Dobrynin VN, Kawashima E, Accolla RS, Jongeneel CV (1986). The genes for tumor necrosis factor (TNF-alpha) and lymphotoxin (TNF-beta) are tandemly arranged on chromosome 17 of the mouse. *Nucleic Acids Res* **14:7713-77125**

Neumann H, Schmidt H, Cavalie A, Jenne D, Wekerle H. (1997). Major histocompatibility complex (MHC) class I gene expression in single neurons of the central nervous system: differential regulation by interferon (IFN)-gamma and tumor necrosis factor (TNF)-alpha. *J Exp Med* **185:305-316**

Neumann H (2001). Control of glial immune function by neurons. *Glia* **36:191-199**

Niehorster M, Tiegs G, Schade UF, Wendel A (1990). In vivo evidence for protease-catalysed mechanism providing bioactive tumor necrosis factor-alpha. *Biochem Pharmacol* **40:1601-1603**

Niijima A (1996). The afferent discharges from sensors for interleukin-1-b in the hepatoportal system in the anaesthetized rat. *J Auton Nerv Syst* **61:287-291**

Nophar Y, Kemper O, Brakebusch C, Englemann H, Zwang R, Aderka D, Holtmann H, Wallach D (1990). Soluble forms of tumor necrosis factor receptors (TNF-Rs). The cDNA for the type I TNF-R, cloned using amino acid sequence data of its soluble form, encodes both the cell surface and a soluble form of the receptor. *EMBO J* **9:3269-3278**

Opp MR, Toth LA (1998). Somnogenic and pyrogenic effects of interleukin-1beta and lipopolysaccharide in intact and vagotomized rats. *Life Sci* **62:923-936**

Pennica D, Hayflick JS, Bringman TS, Palladino MA, Goeddel DV (1985). Cloning and expression in Escherichia coli of the cDNA for murine tumor necrosis factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **82:6060-6064**

Perez C, Albert I, DeFay K, Zachariades N, Gooding L, Krieger M (1990). A nonsecretable cell surface mutant of tumor necrosis factor (TNF) kills by cell-to-cell contact. *Cell* **63:251-258**

Perry VH, Hume DA, Gordon S (1985). Immunohistochemical localization of macrophages and microglia in the adult and developing mouse brain. *Neuroscience* **15:313-326**

Pfeffer K, Matsuyama T, Kundig TM, Wakeham A, Kishihara K, Shahinian A, Wiegmann K, Ohashi PS, Kronke M, Mak TW (1993). Mice deficient for the 55 kd tumor necrosis factor receptor are resistant to endotoxic shock, yet succumb to L. monocytogenes infection. *Cell* **73:457-467**

Pitossi F, del Rey A, Kabiersch A, Besedovsky H (1997). Induction of cytokine transcripts in the central nervous system and pituitary following

peripheral administration of endotoxin of mice. ***J Neurosci Res* 48:287-298**

Quan N, Stern EL, Whiteside MB, Herkenham M (1999). Induction of pro-inflammatory cytokine mRNAs in the brain after peripheral injection of subseptic doses of lipopolysaccharide in the rat. ***J Neuroimmunol* 93:72-80**

Rath PC, Aggarwal BB (1999). TNF-induced signaling in apoptosis. ***J Clin Immunol* 19:350-364**

Renno T, Krakowski M, Piccirillo C, Lin JY, Owens T (1995). TNF-alpha expression by resident microglia and infiltrating leukocytes in the central nervous system of mice with experimental allergic encephalomyelitis. Regulation by Th1 cytokines. ***J Immunol* 154:944-953**

Radhakrishnan VV, Sumi MG, Reuben S, Mathai A, Nair MD (2004). Serum tumor necrosis factor-alpha and soluble tumor necrosis factor receptors levels in patients with Guillain-Barre syndrome. ***Acta Neurol Scand* 109:71-74**

Riches DW, Chan ED, Zahradka EA, Winston BW, Remigio LK, Lake FR (1998). Cooperative signaling by tumor necrosis factor receptors CD120a (p55) and CD 120b (p75) in the expression of nitric oxide and inducible nitric oxide synthase by mouse macrophages. ***J Biol Chem* 273:22800-22806**

Richtlinien des Bundesausschusses der Ärzte und Krankenkassen über die Verordnung von Arzneimitteln in der vertragsärztlichen Versorgung, veröffentlicht im Bundesanzeiger Nr. 246 vom 31. Dezember 1993, zuletzt geändert am 13. Mai 2002, veröffentlicht im ***Bundesanzeiger Nr. 103 vom 8. Juni 2002***

Romanovsky AA, Simons CT, Székely M, Kulchitsky VA (1997). The vagus nerve in the thermoregulatory response to systemic inflammation. ***Am J Physiol* 273:R407-R413**

Romeo HE, Tio DL, Rahman SU, Chiappelli F, Taylor AN (2001). The glossopharyngeal nerve as a novel pathway in immune-to-brain communication: relevance to neuroimmune surveillance of the oral cavity. ***J Neuroimmunol* 115:91-100**

Romeo HE, Tio DL, Taylor AN (2003). Effects of glossopharyngeal nerve transection on central and peripheral cytokines and serum corticosterone induced by localized inflammation. ***J Neuroimmunology* 136:104-111**

Rosenstreich DL, Vogel SN, Jacques AR, Wahl LM, Oppenheim JJ (1978). Macrophages sensitivity to endotoxin. Genetic control by a single codominant gene. ***J Immunol* 121:1664-1670**

Ross G, Roth J, Storr B, Voigt K, Zeisberger E (2000). Afferent nerves are involved in the febrile response to injection of LPS into artificial subcutaneous chambers in guinea pigs. ***Physiol Behav* 71:305-313**

Rothe M, Wong SC, Henzel WJ, Goeddel DV (1994). A novel family of putative signal transducers associated with the cytoplasmatic domain of the 75 kDa tumor necrosis factor receptor. *Cell* **78:681-692**

Rothe M, Sarma V, Dixit VM, Goeddel DV (1995). TRAF2-mediated activation of NF-kappaB by TNF receptor 2 and CD40. *Science* **269:1424-1427**

Rothwell NJ (1991). Functions and mechanisms of interleukin 1 in the brain. *Trends Pharmacol Sci* **12:430-436**

Rothwell NJ, Luheshi G, Toulmond S (1996). Cytokines and their receptors in the central nervous system: physiology, pharmacology, and pathology. *Pharmacol Ther* **69:85-95**

Ryffel B, Mihatsch MJ (1993) TNF receptor distribution in human tissues. *Int Rev Exp Pathol* **34:149-156**

Safieh-Garabedian B, Poole S, Haddad JJ, Massaad CA, Jabbur SJ, Saade NE (2002a). The role of the sympathetic efferents in endotoxin-induced localized inflammatory hyperalgesia and cytokine upregulation. *Neuropharmacology* **42:864-872**

Safieh-Garabedian B, Dardenne M, Pleau JM, Saade NE (2002b). Potent analgesic and anti-inflammatory actions of a novel thymulin-related peptide in the rat. *Br J Pharmacol* **136:947-955**

Sawada M, Kondo N, Suzumura A, Marunouchi T (1989). Production of tumor necrosis factor-alpha by microglia and astrocytes in culture. *Brain Res* **491:394-397**

Schafer MKH, Schwaebeler WJ, Post C, Salvati P, Calabresi M, Sim RB, Petry F, Loos M, Weihe E (2000). Complement C1q is dramatically up-regulated in brain microglia in response to transient global cerebral ischemia. *J Immunol* **164:5446-5452**

Schwalb DM, Han HM, Marino M, Warren R, Porter A, Goh C, Fair WR, Donner DB (1993). Identification of a new receptor subtype for tumor necrosis factor-alpha. *J Biol Chem* **268:9949-9952**

Schattner A (2004). Review: Etanercept (25 mg subcutaneously twice weekly) reduces symptoms and disease activity in rheumatoid arthritis. *ACP J Club* **141:15**

Schoemaker MH, Ros JE, Homan M, Trautwein C, Liston P, Poelstra K, van Goor H, Jansen PLM, Moshage H (2002). Cytokine regulation of pro- and anti-apoptotic genes in rat hepatocytes: NF-kappaB regulated inhibitor of apoptosis protein 2 (cIAP2) prevents apoptosis. *J Hepatology* **36:742-750**

Sehic EC, Blatteis CM (1996). Blockade of lipopolysacchride-induced fever by subdiaphragmatic vagotomy in guinea pigs. *Brain Res* **726:160-166**

Semon D, Kawashima E, Jongeneel CV, Shakhov AN, Nedospasov SA (1987). Nucleotide sequence of the murine TNF locus, including the TNF-alpha (tumor necrosis factor) and TNF-beta (lymphotoxin) genes. *Nucleic Acids Res* **15:9083-9084**

Serafein A, Gordon J (2001). The immune system gets nervous. *Curr Opin Pharmacol* **1:398-403**

Shalaby MR, Aggarwal BB, Rinderknecht E, Svederski LP, Findle BS, Palladino MA Jr. (1985). Activation of human polymorphonuclear neutrophil functions by interferon-gamma and tumor necrosis factor. *J Immun* **135:2069-2073**

Sharif SF, Hariri RJ, Chang VA, Barie PS, Wang RS, Ghajar JB (1993). Human astrocyte production of tumor necrosis factor-alpha, interleukin-1 beta, and interleukin-6 following exposure to lipopolysaccharide endotoxin. *Neurol Res* **15:109-111**

Shakhow AN, Collart MA, Vassalli P, Nedospasov SA, Jongeneel CV (1990) Kappa B-type enhancers are involved in lipopolysaccharide-mediated transcriptional activation of the tumor necrosis factor alpha gene in primary macrophages. *J Exp Med* **171:35-47**

Shibata M, Blatteis CM (1991). Human recombinant tumor necrosis factor and interferon affect the activity of neurons in the organum vasculosum laminae terminalis. *Brain Res* **562:323-326**

Sheng M, Greenberg ME (1990). The regulation and function of c-fos and other immediate early genes in the central nervous system. *Neuron* **4:477-485**

Shurin G, Shanks N, Nelson L, Hoffman G, Huang L, Kusnecov AW. (1997) Hypothalamic-pituitary-adrenal activation by the bacterial superantigen staphylococcal enterotoxin B: role of macrophages and T cells. *Neuroendocrinology* **65:18-28**

Silberstein DS, David JR (1986). Tumor necrosis factor enhances eosinophil toxicity to *Schistosoma mansoni* larvae. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83:1055-1059**

Simth RA, Baglioni C (1987). The active form of tumor necrosis factor is a trimer. *J Biol Chem* **262:6951-6954**

Singh AK, Jiang Y (2003). Lipopolysaccharide (LPS) induced activation of the immune system in control rats and rats chronically exposed to a low level of the organothiophosphate insecticide, acephate. *Toxicol Ind Health* **19:93-108**

Sipe KJ, Srisawasdi D, Dantzer R, Kelley KW, Weyhenmeyer JA (1996). An endogenous 55 kDa TNF receptor mediates cell death in a neuroal cell line. *Brain Res Mol Brain Res* **38:222-232**

Smith CA, Davis T, Anderson D, Solam L, Beckmann MP, Jerzy R, Dower SK, Cosman D, Goodwin RG (1990). A receptor for tumor necrosis factor defines an unusual family of cellular and viral proteins. *Science*, **248:1019-1023**

Spriggs DR, Deutsch S, Kufe DW. (1992). Genomic structure, induction, and production of TNF-alpha. In: *Tumor necrosis factor: structure, function and mechanism of action*, Aggarwal BB, Vilcek J (Eds.), pp 3-34. Marcel Dekker, New York

Stitt JT (1985). Evidence for the involvement of the organum vasculum laminae terminalis in the febrile response of rabbits and rats. *J Physiol* **368, 501-511**

Stitt JT (1990) Passage of immunomodulators across the blood-brain barrier. *Yale J Biol Med* **63:121-131**

Stern EL, Quan N, Proescholdt MG, Herkenham M (2000). Spatiotemporal induction patterns of cytokine and related immune signal molecule mRNAs in response to intrastriatal injection of lipopolysaccharide *J Neuroimmunol* **109:245-260**

Szelenyi J (2001). Cytokines and the central nervous system. *Brain Res Bull* **54:329-338**

Tada M, Diserens AC, Desbaillets I, de Tribolet N (1994). Analysis of cytokine receptor messenger RNA expression in human glioblastoma cells and normal astrocytes by reverse-transcription polymerase chain reaction. *J Neurosurg* **80:1063-1073**

Tannenbaum CS, Major JA, Hamilton TA (1993). IFN-gamma and lipopolysaccharide differentially modulate expression of tumor necrosis factor receptor mRNA in murine peritoneal macrophages. *J Immunol* **151:6833-6839**

Tartaglia LA, Goeddel DV (1992). Two TNF receptors. *Immunol Today* **13: 151-153**

Tartaglia LA, Ayres TM, Wong GH, Goeddel DV (1993a). A novel domain within the 55 kd TNF receptor signals cell death. *Cell* **74:845-853**

Tartaglia LA, Pennica D, Goeddel DV (1993b). Ligand passing: the 75-kDa tumor necrosis factor (TNF) receptor recruits TNF for signaling by the 55-kDa TNF receptor. *J Biol Chem* **268:18542-18548**

Tartaglia LA, Goeddel DV, Reynolds C, Figari IS, Weber RF, Fendly BM, Palladino MA Jr (1993c). Stimulation of human T-cell proliferation by specific activation of the 75-kDa tumor necrosis factor. *J Immun* **151:4637-4641**

Taupin V, Renno T, Bouronniere L, Peterson AC, Rodriguez M, Owens T (1997). Increased severity of experimental autoimmune encephalomyelitis, chronic macrophage/microglia reactivity, and demyelination in transgenic mice

producing tumor necrosis factor-alpha in the central nervous system. *Eur J Immunol* **27:905-913**

Turnbull AV, Pitossi FJ, Lebrun JJ, Lee S, Meltzer JC, Nance DM, del Rey A, Besedovsky HO, Rivier C (1997). Inhibition of tumor necrosis factor-alpha action within the CNS markedly reduces the plasma adrenocorticotropin response to peripheral local inflammation in rats. *J Neurosci* **17:3262-3273**

Turnbull AV, Rivier CL (1999). Regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis by cytokines: actions and mechanisms of action. *Physiol Rev* **79:1-71**

Turrin NP, Gayle D, Ilyin SE, Flynn MC, Langhans W, Schwartz GJ, Plata-Salamán CR (2001). Pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokine mRNA induction in the periphery and brain following intraperitoneal administration of bacterial lipopolysaccharide. *Brain Res Bull* **54:443-453**

Tracey KJ, Lowrey SF (1990). The role of cytokine mediators in septic shock. *Adv Surg* **23:21-56**

Tracey KJ, Cerami A (1993). Tumor necrosis factor (cachectin) in septic/endotoxic shock. *Handb Mediators Septic Shock* **291-308**

Tracey KJ, Cerami A (1994). Tumor necrosis factor: a pleiotropic cytokine and therapeutic target. *Annu Rev Med* **45:491-503**

Uehara A, Sekiya C, Takasugi Y, Namiki M, Arimura M (1989). Anorexia induced by interleukin 1: involvement of corticotropin-releasing factor. *Am J Physiol* **257:R613-R617**

Van Dam AM, Brouns M, Man-A-Hing W, Berkenbosch F (1993). Immunocytochemical detection of prostaglandin E2 in microvasculature and in neurons of rat brain after administration of bacterial endotoxin. *Brain Res* **613:331-336**

Van Dam AM, De Vries HE, Kuiper J, Zijlstra FJ, De Boer AG, Tilders FJ, Berkenbosch F (1996). Interleukin-1 receptors on rat brain endothelial cells : a role in neuroimmune interaction? *FASEB J* **10:351-356**

Van Dam AM, Bol JG, Gaykema RP, Goehler LE, Maier SF, Watkins LR, Tilders FJ. (2000). Vagotomy does not inhibit high dose lipopolysaccharide-induced interleukin-1beta immunoreactivity in rat brain and pituitary gland. *Neurosci Lett* **285:169-172**

Vandenabeele P, Declercq W, Beyaert R, Fiers W (1995a). Two tumor necrosis factor receptors: structure and function. *Trends Cell Biol* **5:392-399**

Vandenabeele P, Declercq W, Vanhaesebroeck B, Grooten J, Fiers W (1995b). Both TNF receptors are required for TNF-mediated induction of apoptosis in PC60 cells. *J Immunol* **154:2904-2913**

Wan W, Wetmore L, Sorensen CM, Greenberg AH, Nance DM (1993). Neural and biochemical mediation of endotoxin and stress-induced c-fos protein in the brain. *Brain Res Bull* **34:7-14**

Watkins LR, Wiertelak EP, Goehler LE, Mooney-Heiberger K, Martinez J, Furness L, Smith KP, Maier SF (1994). Neurocircuitry of illness-induced hyperalgesia. *Brain Res* **639:283-299**

Watkins LR, Maier SF, Goehler LE (1995). Cytokine-to-brain communication: a review and analysis of alternative mechanisms. *Life Sci* **57:1011-1026**

Wesselingh SL, Gough NM, Finlay-Jones JJ, McDonald PJ (1990). Detection of cytokine mRNA in astrocyte cultures using the polymerase chain reaction. *Lymphokine Res* **9:177-185**

Weindel A (1973) In: *Frontiers in Neuroendocrinology*, pp 4-32, Oxford Uni. Press, NY

Weihe E, Nohr D, Michel S, Muller S, Zentel HJ, Fink T, Krekel J (1991). Molecular anatomy of the neuro-immune connection. *Int J Neurosci* **51:1-23**

Weihe E, Bette M, Fink T, Romeo EH, Schäfer MKH (1998). Molecular anatomical basis of interactions between nervous and immune systems in health and disease, in: *Textbook Psychoneuroimmunology*, (Eds.) Schedlowski M, Tewes U

Wilkinson LS, Edwards JC (1991). Binding of antibodies raised against tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) to blood vessels and macrophages in inflamed synovial tissue. *Rheumatol Int* **11:19-25**

Wilt SG, Milward E, Zhou JM, Nagasato K, Patton H, Rusten R, Griffin DE, O'Connor M, Dubois-Dalcq M (1995). In vitro evidence for a dual role of tumor necrosis factor-alpha in human immunodeficiency virus type 1 encephalopathy. *Ann Neurol* **37:381-394**

Wingfield P, Pain RH, Craig S (1987). Tumor necrosis factor is a compact trimer. *FEBS Lett* **211:179-184**

Wong GH, Goeddel DV (1986). Tumor necrosis factor alpha and beta inhibit virus replication and synergize with interferons. *Nature* **323:819-822**

Wood AC, Todd I. (1995). Staphylococcal enterotoxin B toxicity in BALB/c mice: effect on T-cells, plasma cytokine levels and biochemical markers. *FEMS Immunol Med Microbiol* **11:91-97**

Xu S, Guo S, Jiang X, Yin Q, Umezawa T, Hismitsu T (2003). Effects of indomethacin on the c-fos expression in AVP and TH neurons in rat brain induced by lipopolysaccharide. *Brain Research* **966:13-18**

7. Literaturverzeichnis

Yin L, Ohtaki H, Nakamachi T, Kudo Y, Makino R, Shioda S (2004). Delayed expressed TNFR1 co-localize with ICAM-1 astrocyte in mice brain after transient focal ischemia. *Neurosci Lett* **370:30-35**

Yirmiya R (1997). Behavioral and psychological effects of immune activation: Implications for depression due to a general medical condition. *Curr Opin Psychol* **10:470-476**

Yu AC, Lau LT (2000). Expression of interleukin-1 alpha, tumor necrosis factor alpha and interleukin-6 genes in astrocytes under ischemic injury. *Neurochem Int* **36:369-377**

Zajicek JP, Wing M, Scolding NJ, Compston DA (1992). Interactions between oligodendrocytes and microglia. A major role for complement and tumor necrosis factor in oligodendrocyte adherence and killing. *Brain* **115:1611-1631**

Kapitel 8

Anhang

8.1. Abkürzungsverzeichnis

ACTH	Adrenokortikotropes Hormon
AIDS	acquired immune deficiency syndrom
AP	Area postrema
ARDS	adult respiratory distress syndrom
BBB	blood brain barrier
BCG	Bacillus Calmette-Guerin
bp	base pair
BSA	Rinderserumalbumin
CD	cluster of distribution
cDNA	complementary DNA
clAP	cellular inhibitor of apoptosis protein
Ci	Curie
CSF	colony stimulating factor
CVO	Zirkumventrikuläre Organe
ddH ₂ O	double distilled water
DEPEC	Diethylpyrocarbonat
DIC	Dissiminierte Intravasale Koagulation
FADD	fas-associated death domain
GM-CSF	granulocyte-macrophage colony stimulating factor
HPA	hypothalamus-pituitary-adrenal gland
IAP	inhibitor of apoptosis protein
ICAM	intercellular adhesion molecule
IFN	Interferon
IL	Interleukin
i.p.	intraperitoneal
i.c.v.	intracerebroventrikulär
kb	Kilobasen

8. Anhang

kDa	KiloDalton
LCM	LaserCaptureMicrodissection
LPB	LPS-binding protein
LPS	Lipopolysaccharide
MCH	major histocompatibility complex
ME	Eminentia mediana
MPOA	Mediane präoptische Area
M _R	Molekulargewicht
mRNA	messenger RNA
NF-κB	nuclear factor kappa B
NK-Zellen	natural killer
Ncl	Nucleus
NO	Stickstoff
OT	Objektträger
OVLT	Organum vasculosum laminae terminalis
PAF	platelet activating factor
PBS	phosphate buffered saline
PCR	Polymerasekettenreaktion
PG	Prostaglandin
p.i.	post injectionem
PVN	Nucleus paraventricularis hypothalami
RIAP	rat IAP
RIP	receptor-interactin protein
RNA	ribonucleic acid
rpm	revolutions per minute
RT	Reverse Transkription bzw. Raumtemperatur
SEB	Staphylokokken Enterotoxin B
SFO	subfornical organ
SP	substance P
TLR	Toll-like receptor
T _m	annealing temperature
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
TRADD	TNFR-associated death domain
TRAF2	TNFR-associated factor 2

8. Anhang

TSST	toxic shock syndrom toxin
VCAM	vascular cell adhesion molecule
ZNS	Zentrales Nervensystem

8.2. Tabellarischer Lebenslauf

Persönliche Daten

Name:	Oliver Kaut
Adresse:	Johansenstr. 12 32423 Minden
Telefon:	0571 / 801-1694
E-mail:	oliver_kaut@hotmail.com
Geburtsdatum:	19.12.1970
Geburtsort:	Speyer
Familienstand:	ledig

Ausbildung

1977-80	Grundschule Dudenhofen
1981-90	F.M.-Schwerdt-Gymnasium Speyer
1990	Abitur
1990-91	Zivildienst im St.Vincentius Krankenhaus Speyer
1991-94	5 Semester Philosophie- und Biologiestudium an der Philipps-Universität Marburg mit Zwischenprüfung Biologie
1994-95	Beginn des Medizinstudiums an der Georg-August Universität Göttingen
1995	Fortsetzung des Studiums an der Philipps-Universität Marburg
2000-01	Praktisches Jahr
	Innere Medizin: Tulane University, School of Medicine, New Orleans, USA
	Chirurgie: Philipps-Universität Marburg
	Neurologie: Philipps-Universität Marburg
2001	3. Staatsexamen

Wissenschaftliche Tätigkeit

1998	Beginn der Doktorarbeit bei Prof. E. Weihe in der Abteilung „Molekulare Neurowissenschaften“, SFB 297
------	---

8. Anhang

Nov. 01-03 Wissenschaftlicher Mitarbeiter (BAT IIa/2) an der Philipps-Universität Marburg, Institut für Anatomie und Zellbiologie, Abt. Molekulare Neurowissenschaften, Prof. E. Weihe

AiP

2003 3 Monate an der RWTH Aachen, Klinik für Neurologie

10/03 Klinkum Minden, Akademisches Lehrkrankenhaus der Universität Münster, Klinik für Neurologie

Assistenzarzt

seit 10/04 Klinikum Minden

Lehrtätigkeit

als studentische Hilfskraft

Praktische Übung Makroskopische Anatomie (1x)
Kurs Neuroanatomie für Humanmediziner (1x)
Kurs Anamnese und Selbstuntersuchung (3x)
Kurs Kardiale Auskultation (2x)

als Assistent

Praktische Übung Makroskopische Anatomie (hier ohne Kopf / Hals-Testat)
Praktische Übung Neuroanatomie für Humanmediziner
Praktische Übung als Blockpraktikum: Neuroanatomie für Humanbiologen

als AiP in der Krankenpflegeschule Minden

Kurs Neurologie, dabei Kurstage 1-3

Auslandsaufenthalte

1994 4 Monate als „nursing aid“ im Alzheimer Center Grand Rapids, Michigan, USA

00/01 ein Tertial Innere Medizin an der Tulane University, New Orleans, USA

Sprachkenntnisse

Englisch: sehr gut (TOEFL-score: 87 % richtige Antworten)
Französisch: nur Lesefähigkeit
Großes Latinum und Graecum

8.3. Verzeichnis der akademischen Lehrer

Arnold, Aumüller, Bartsch, Barth, Bartalanffy, Basler, Baum, Bauer, Beato, Berger, Berndt, Bien, Brilla, Christiansen, Daut, Doss, Effendy, Elsässer, Engel, Eschenbach, Fehmann, Feuser, Fischer, Fruhstorfer, Fuhrmann, Ganz, Gauthier, Geus, Göke, Görg, Gohlenhofen, Gotzen, Greger, Gressner, Grezeschick, Griss, Habermehl, Happle, Hasilik, Hesse, Heeg, Hellwig, Hellige, Herken, Herzum, Heufelder, Hildebrandt, Hilgermann, Hoffmann, Hofmann, Huffmann, Kaffarnik, Kälble, Kern, Kienapfel, Kleine, Kleinsasser, Klenk, Klose, Koolmann, Kraus, Kretschmer, Krieg, Kuhn, Lang, Lasky, Lennarz, Lill, Lorenz, Löffler, Lührmann, Maisch, Meinhardt, Mennel, Mönnikes, Moosdorf, Mühlberger, Müller R., Müller U., Mutters, Netter, Neubauer, Neumann, Nies, Niessing, Noll, Oertel, Ortiz, Peter, Prinz, Radsak, Remschmidt, Rheder, Richter, Riedmiller, Rogausch, Röhm, Rothmund, Schäfer, Schachtschabel, Schlegel, Schmidt, Schüffel, Schulz, Schwarz, Seifart, Seitz, Sommer, Slenczka, Steininger, Stinner, Stempel, Sturm, Stempel, Thomas, Tröhler, Vogt, Vohland, Voigt, Wagner, Weihe, Wesemann, Westermann, von Wichert, Wilke, Wolf

8.4. Publikationen

Kongressbeiträge

2001 International Symposium: Mechanisms of Neuro-Immune-Endocrine Interactions, ausgerichtet vom SFB 297, 13.-14. Oktober, 2001 Marburg
Posterpräsentation: O. Kaut, M. Bette, E. Weihe, Expression of TNF α and TNF α receptor p55 and p75 after systemical application of mitogens.

2002 Neuroimmunology - Recent Developments and New Avenues, 30. Mai – 1. Juni, 2002 Bonn
Posterpräsentation: O. Kaut, M. Bette, E. Weihe, Differential plasticity of TNF α expression in mouse brain after peripheral challenge with LPS and SEB.

Deutsche Gesellschaft für Immunologie (DGfI) 33th Annual Meeting of the DGfI 25. –28. September, 2002 Marburg
Posterpräsentation: O. Kaut, M. Bette, E. Weihe, Systemic LPS but not SEB induces TNF α expression in mouse brain spreading from meninges and circumventricular organs (CVOs) into the cerebral parenchym.

Society for Neuroscience 32nd Annual Meeting, 2.–7. November, 2002 Orlando, Florida, USA
Posterpräsentation: O. Kaut, M. Bette, E. Weihe, Novel findings of tumor necrosis factor receptors p55 and p75 expression in mouse brain and plasticity of TNF-system after systemic lipopolysaccharide in contrast to staphylococcal enterotoxin B.

Finanzierung durch Reisekostenzuschuß in Höhe von 900 Euro der Medizinstiftung des Fachbereichs Medizin.

Veröffentlichungen

Bette M, Kaut O, Schäfer MK, Weihe E (2003). Constitutive expression of p55 TNFR mRNA and mitogen-specific up-regulation of TNF and p75TNFR mRNA in mouse brain. ***J Comp Neurol* 465(3):417-30**

Öffentliche Vorträge

Deutsche Gesellschaft für Immunologie (DGfI) 33th Annual Meeting of the DGfI 25. –28. September, 2002 Marburg
“oral presentation” im Workshop “Neuro-Endocrino-Immunology”

8.5. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt allen, die zur Durchführung und Fertigstellung dieser Arbeit beigetragen haben.

Ich danke besonders Prof. Dr. E. Weihe (Institut für Anatomie und Zellbiologie, Arbeitsgruppe für Molekulare Neurowissenschaften, Universität Marburg) für die Überlassung des Themas, intensive Betreuung und Einführung in kritisch-wissenschaftliches Denken,

sowie meinem Betreuer Dr. M. Bette für die ebenfalls intensive Betreuung, zudem für die ausführliche Anleitung zur praktischen Arbeit im Labor und zahlreiche anregende wissenschaftliche Diskussionen.

Ich danke Dr. M.K.-H. Schäfer, Mitglied der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. E. Weihe für die Unterstützung bei der praktischen Arbeit im Labor, insbesondere bei der Durchführung der LCM. Dr. J. Mika danke ich für die Einführung in das MCID Image System.

Dank gilt auch den Medizinsch-Technischen-Assistenten E. Rodenberg-Frank, S. Roscher, P. Sack, H. Schneider, J. Seifert, B. Wiegand, M. Zimbuschka.

Besonderer Dank gilt der medizinischen Fakultät für die Anschaffung und Bereitstellung des LaserCapture Mikroskops.

Diese Arbeit wurde durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft (SFB 297), sowie ein Reisestipendium der Medizinstiftung der Universität Marburg unterstützt.

Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, daß ich die dem Fachbereich Medizin Marburg zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel „Expression von TNF α und seinen Rezeptoren p55TNFR und p75TNFR im Gehirn der Maus nach SEB- und LPS-Stimulation“ im Institut für Anatomie und Zellbiologie der Philipps-Universität Marburg unter Leitung von Prof. Dr. E. Weihe mit Unterstützung durch Dr. M. Bette ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe. Ich habe bisher an keinem in- und ausländischen Medizinischen Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Die vorliegende Arbeit wurde im **J Comp Neurol** veröffentlicht.

(Bette M, Kaut O, Schäfer MK, Weihe E (2003). Constitutive expression of p55 TNFR mRNA and mitogen-specific up-regulation of TNF and p75TNFR mRNA in mouse brain. *J Comp Neurol* 465(3):417-30)

Marburg, den 29.03.05
