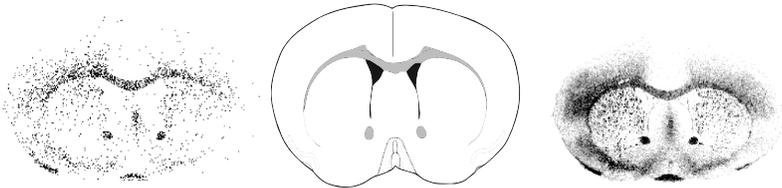


Janne Elisabeth Bredehöft

Untersuchungen zur Wirkung anti-inflammatorischer
Strategien auf zentralnervös induzierte Krankheits-
symptome im Gehirn bei systemischen
Entzündungsreaktionen



Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet.

beim Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Die rechtliche Verantwortung für den gesamten Inhalt dieses Buches liegt ausschließlich bei dem Autor dieses Werkes.

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

1. Auflage 2017

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

1st Edition 2017

© 2017 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



édition linguistique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

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

www.doktorverlag.de

Aus dem Institut für
Veterinär-Physiologie und –Biochemie der
Justus-Liebig-Universität Gießen

Betreuer: PD Dr. Christoph Rummel

**Untersuchungen zur Wirkung anti-
inflammatorischer Strategien auf zentralnervös
induzierte Krankheitssymptome im Gehirn bei
systemischen Entzündungsreaktionen**

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

Eingereicht von

Janne Elisabeth Bredehöft

Tierärztin aus Oldenburg

Gießen 2016

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

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

Gutachter: PD Dr. Christoph Rummel
Prof. Dr. Sabine Wenisch

Tag der Disputation: 14.03.2017

I.	EINLEITUNG	- 1 -
1.	Die systemische Entzündungsreaktion.....	- 2 -
1.1	Zentralnervös kontrollierte Krankheitssymptome	- 2 -
1.2	Kommunikationswege zwischen Peripherie und dem zentralen Nervensystem.....	- 3 -
2.	Die Entzündungsauflösung	- 14 -
2.1	Calciumabhängige Kaliumkanäle	- 14 -
2.2	Die Rolle von Lipiden und Lipidmediatoren für die Beendigung von Entzündungen und Fieber	- 17 -
3.	Versuchsmodelle	- 25 -
3.1	LPS-induzierte Entzündungsreaktion	- 25 -
3.2	Fat-1 Maus als Tiermodell	- 26 -
4.	Fragestellungen und Ziele der Arbeit.....	- 27 -
4.1	CyPPA: Untersuchung der Effekte des K ⁺ -Kanal Agonisten CyPPA	- 27 -
4.2	Fat-1: Charakterisierung des Einflusses von ω-3 FS auf Entzündungsverläufe.....	- 27 -
II.	MATERIAL UND METHODEN.....	- 29 -
1.	Allgemeine Materialien.....	- 29 -
1.1	Technische Geräte	- 29 -
1.2	Software	- 29 -
1.3	Chemikalien	- 29 -
1.4	Allgemeine Ge- und Verbrauchsmaterialien.....	- 30 -
2.	<i>In vivo</i> Versuchsmodelle	- 30 -
2.1	Materialien	- 30 -
2.2	Versuchstiere.....	- 33 -
2.3	Versuchsaufbau	- 41 -
2.4	Versuchsablauf.....	- 44 -
3.	MALDI-MSI	- 48 -
3.1	Materialien	- 48 -
3.2	Grundlagen der Methode.....	- 49 -
3.3	Probenvorbereitung / Aufbringen der Matrix	- 52 -
3.4	MALDI-MSI	- 55 -
4.	Immunfluoreszenz und Immunhistochemie.....	- 56 -
4.1	Materialien	- 56 -
4.2	Grundlagen der Methode.....	- 59 -
4.3	Herstellung der Gefrierschnitte	- 60 -
4.4	Versuchsprotokolle	- 60 -
4.5	Mikroskopie	- 63 -
5.	Zytokin Bioassays	- 63 -
5.1	Materialien	- 63 -
5.2	Grundlagen der Methode.....	- 64 -

5.3	Probengewinnung.....	- 65 -
5.4	Versuchsprotokoll.....	- 65 -
6.	Westernblot.....	- 67 -
6.1	Materialien.....	- 67 -
6.2	Grundlagen der Methode.....	- 68 -
6.3	Probenmaterial.....	- 69 -
6.4	Proteinextraktion.....	- 69 -
6.5	Gelelektrophorese und Westernblotanalyse.....	- 70 -
6.6	Proteindetektion mittels Antikörpermarkierung.....	- 72 -
7.	Quantitative <i>real-time</i> PCR.....	- 73 -
7.1	Materialien.....	- 73 -
7.2	Grundlagen der Methode.....	- 74 -
7.3	Probenmaterial.....	- 75 -
7.4	RNA-Extraktion.....	- 75 -
7.5	Reverse Transkription.....	- 77 -
7.6	Durchführung der quantitativen <i>real-time</i> PCR.....	- 77 -
7.7	Ermittlung eines geeigneten endogenen Referenzgens.....	- 78 -
8.	HPLC.....	- 78 -
8.1	Materialien.....	- 78 -
8.2	Grundlagen der Methode.....	- 80 -
8.3	Probenmaterial.....	- 80 -
8.4	Perchlorsäureextraktion.....	- 80 -
8.5	Messung der Nukleotidkonzentration.....	- 81 -
8.6	Quantifizierung der eingesetzten Proteinmenge.....	- 82 -
9.	Auswertung und Statistik.....	- 82 -
9.1	Physiologische Parameter.....	- 82 -
9.2	Biochemische Parameter.....	- 85 -
III.	ERGEBNISSE.....	- 96 -
1.	Beeinflussung LPS-induzierter systemischer Entzündungsreaktionen durch den K ⁺ -Kanal Agonisten CyPPA.....	- 96 -
1.1	Beeinflussung physiologischer Parameter über einen Zeitraum von 24 Stunden durch periphere Injektion von CyPPA.....	- 96 -
1.2	Beeinflussung peripherer Zytokine nach i.p. Injektion von CyPPA.....	- 100 -
1.3	Einfluss von CyPPA auf die zentrale mRNA-Expression inflammatorischer Marker.....	- 101 -
1.4	Immunreaktivität.....	- 103 -
2.	Weiterführende Untersuchungen der durch den K ⁺ -Kanal Agonisten CyPPA verursachten Wirkungen.....	- 105 -
2.1	Physiologische Parameter zwei Stunden nach peripherer Injektion von CyPPA.....	- 105 -
2.2	Erfassung peripherer Zytokine nach einer Behandlung mit CyPPA.....	- 107 -
2.3	Zentraler Einfluss auf inflammatorische Marker.....	- 107 -

2.4	Auswirkungen von CyPPA auf hepatische Nukleotidspiegel	- 112 -
3.	Basale Bedingungen und LPS-induzierte systemische Entzündung bei C57Bl/6N und Fat-1 Mäusen	- 115 -
3.1	Bei normaler Fütterung beider Genotypen.....	- 115 -
3.2	Unter ω -3 defizienter nutritiver Versorgung beider Genotypen	- 119 -
3.3	Vergleich physiologischer Parameter beider Fütterungsgruppen	- 124 -
3.4	Körpergewicht, Futter- und Wasseraufnahme	- 132 -
3.5	Periphere Zytokine	- 133 -
4.	Physiologische Parameter von C57Bl/6N und Fat-1 Mäusen unter ω -3 defizienter nutritiver Versorgung bei NES	- 134 -
5.	Verteilungsmuster verschiedener Phospholipide, Lysophospholipide und unveresterter Fettsäuren im Bereich der präoptischen Region und des OVLTs	- 136 -
5.1	Messungen im positiven Ionen-Modus	- 136 -
5.2	Messungen im negativen Ionen-Modus	- 173 -
6.	Darstellung inflammatorischer Marker	- 203 -
6.1	NF-IL6 und COX2 Immunreaktivität vor und nach MALDI-Messungen.....	- 203 -
6.2	Darstellung neutrophiler Granulozyten im Anschluss an MALDI-Messung und Immunfluoreszenzmarkierung inflammatorischer Marker	- 207 -
6.3	Verwendung anderer Matrices (3NBA, CLCCA).....	- 208 -
IV.	DISKUSSION	- 209 -
1.	Das anti-inflammatorische Potential des K^+ -Kanal Agonisten CyPPA.....	- 209 -
1.1	Auswirkungen von CyPPA auf Mediatoren des humoralen Signalweges	- 209 -
1.2	CyPPA hat keinen Einfluss auf die Expression mikroglialer Marker (CD68 und CD11b).....	- 212 -
1.3	Durch CyPPA bedingte Veränderungen unter nicht-inflammatorischen Bedingungen (ohne LPS-Stimulation).....	- 213 -
2.	Die Wirkung von ω -3 Fettsäuren und deren Metabolite auf LPS-induzierte Veränderungen im <i>in vivo</i> Modell	- 216 -
2.1	Auswirkungen des Genotyps und der nutritiven ω -3 Versorgung auf Fieber und andere Parameter der sickness response	- 216 -
2.2	Plasma-IL-6-Konzentrationen sind in Fat-1 nach LPS-Stimulation gegenüber WT reduziert.....	- 220 -
3.	Fat-1 zeigen vermehrte physiologische Stressreaktionen im NES	- 222 -
4.	Unterscheidbare Verteilungsmuster und die potentielle Rolle verschiedener Lipidspezies im Bereich der präoptischen Region und des OVLTs während LPS-induzierter systemischer Inflammation.....	- 225 -
4.1	Lipidspezies deren Nachweis nicht oder nicht eindeutig gelang (SPMs und Eicosanoide).....	- 236 -
4.2	Die überlagernde Darstellung von MALDI Bildern und die multimodale Verknüpfung mit immunhistologisch gewonnenen Bilddaten führt zu einem synergistischen Informationsgewinn.....	- 237 -
4.3	Limitationen und Grenzen von MALDI-MSI	- 239 -

5.	Zusammenfassung der gewonnenen Erkenntnisse und daraus abgeleitete Hypothesen.....	- 240 -
5.1	CyPPA als Therapeutikum und unerwartete Wirkungen	- 240 -
5.2	Fat-1	- 243 -
V.	ZUSAMMENFASSUNG.....	- 251 -
VI.	SUMMARY	- 254 -
VII.	GEMESSENE PARAMETER DER MALDI-EXPERIMENTE	- 257 -
1.	Messungen im positiven Ionen-Modus	- 257 -
1.1	Messung WT PBS 24h nach Stimulation.....	- 257 -
1.2	Messung WT LPS 24h nach Stimulation.....	- 262 -
1.3	Messung Fat-1 LPS 24h nach Stimulation.....	- 267 -
1.4	Nicht zuzuordnende Massen	- 272 -
2.	Messungen im negativen Ionen-Modus	- 273 -
2.1	Messung WT PBS 24h nach Stimulation.....	- 273 -
2.2	Messung WT LPS 24 nach Stimulation.....	- 277 -
2.3	Messung Fat-1 LPS 24h nach Stimulation.....	- 279 -
3.	In den Messungen nicht gefundene Massen	- 283 -
3.1	Im positiven Ionen-Modus nicht gefundene Massen	- 283 -
3.2	Im negativen Ionen-Modus nicht gefundene Massen	- 298 -
VIII.	ABKÜRZUNGEN	- 301 -
IX.	LITERATURVERZEICHNIS	- 305 -
X.	ANHANG	- 330 -
1.	Eigene Publikationen	- 330 -
1.1	Originalarbeiten in Fachzeitschriften.....	- 330 -
1.2	Veröffentlichte Abstracts	- 330 -
1.3	In Vorbereitung	- 330 -
2.	Danksagung.....	- 331 -
3.	Erklärung.....	- 332 -

I. Einleitung

Systemische Entzündungen sowie speziell Entzündungen des Gehirns sind wichtige Risikofaktoren für eine Reihe von Erkrankungen wie beispielsweise Alzheimer. Die meisten dieser Erkrankungen sind bisher nur teilweise verstanden. Aktuell werden verschiedene Ansätze verfolgt, deren direktes oder indirektes Ziel die Entzündungsauflösung ist. Um effektive anti-inflammatorische Therapien entwickeln zu können bedarf es einem besseren Verständnis der zugrunde liegenden Mechanismen.

Bei Untersuchungen des Gehirns sind Lipide, die 50% dessen Trockengewichtes ausmachen, von besonderem Interesse. Sie stellen die wichtigste strukturelle Komponente der Phospholipidmembranen dar, dienen als Speicherort chemischer Energie und spielen eine Schlüsselrolle für die Kommunikation von Zellen untereinander [163, 392, 393]. Die entscheidende Rolle von Lipiden für physiologische Prozesse im zentralen Nervensystem (ZNS) sowie ihre Beteiligung an verschiedenen neurologischen Erkrankungen wie der Alzheimerschen Krankheit und Parkinson konnte vielfach gezeigt werden [112, 482, 553].

Seit dem frühen 20. Jahrhundert ist bekannt, dass bestimmte Fettsäuren (FS) einen positiven Einfluss auf die Gesundheit und bestimmte Organfunktionen haben. Erste Publikationen hierzu wurden von Burr *et al.* 1929 verfasst [67]. Heute werden diese gesundheitsfördernden Effekte vor allem auf die ω -3 FS Docosahexaensäure (DHA) und Eicosapentaensäure (EPA), sowie deren Metabolite aus der Gruppe der kleinen pro-entzündungsauflösenden Mediatoren (*specialized pro resolving mediators*, SPM) zurückgeführt [34, 472, 475].

In den heutigen Industrienationen hat sich das Verhältnis von ω -3 zu ω -6 in der menschlichen Ernährung von ehemals 1:1 auf etwa 1:15 reduziert [33, 487]. Als Basis einer gesunden Ernährung wird jedoch die Aufnahme im Verhältnis 1:5 empfohlen [281, 537]. Große Mengen der relevanten FS sind unter anderem in marinen Algen, Kaltwasserfischen, aber auch Nüssen vorhanden [12, 520].

Die Wirkung von ω -3 FS in Bezug auf inflammatorische Geschehen und den Verlauf von Krankheitssymptomen ist noch unzureichend verstanden und sollte im Rahmen dieser Arbeit näher untersucht werden. Verschiedene experimentelle Studien erbrachten bisher zum Teil widersprüchliche Befunde [130, 263, 322]. Prinzipiell scheinen ω -3 FS allerdings vor allem eine anti-inflammatorische Aktivität zu besitzen. In einigen Studien wurden hingegen keine Effekte in Bezug auf inflammatorische Prozesse [377] nachgewiesen.

Des Weiteren konnten neuere Studien zeigen, dass schwach leitende, Calcium aktivierte Kaliumkanäle für die Behandlung von neurodegenerativen Erkrankungen von Bedeutung sein könnten [266]. Gehirninfrakt und neuronaler Zelltod konnten durch Gabe von Agonisten solcher Kaliumkanäle reduziert werden [9, 143]. Als weiterer Teilaspekt dieser Arbeit soll also der Frage nachgegangen werden, ob sich Agonisten solcher Kaliumkanäle auch für die

Hemmung der Inflammation und die Abschwächung zentralnervös kontrollierter Krankheitssymptome im Gehirn eignen.

Für das Verständnis anti-inflammatorischer und pro-entzündungsauflösender Prozesse, die potentielle Therapieansätze darstellen, ist zunächst ein allgemeiner Überblick über Entzündungsreaktionen sowie deren zugrundeliegenden Mechanismen der Entstehung und Beendigung wichtig. Diese werden nachfolgend beschrieben.

1. Die systemische Entzündungsreaktion

1.1 Zentralnervös kontrollierte Krankheitssymptome

Die *sickness response* beschreibt einen Komplex verschiedener, zentralnervös kontrollierter Krankheitssymptome, deren zugrunde liegendes Ziel die Elimination schädigender Noxe ist. Sie wird im Rahmen einer systemischen Entzündung eingeleitet und beinhaltet neben Fieber, einem der am besten beschriebenen Symptome, auch Anorexie sowie Adipsie und einen hiermit einhergehenden Gewichtsverlust. Außerdem tritt eine Reduktion sozialer Aktivität und Lethargie (reduzierte motorische Aktivität) ein [119]. Auslösende Stimuli können infektiöse Erreger, aber auch nicht-infektiöse Ursachen sein. In diesem Zusammenhang spielen *pathogen-associated molecular patterns* (PAMPs) eine entscheidende Rolle. Diese hochkonservierten Strukturen von Erregern / Pathogenen binden an spezifische Rezeptoren und aktivieren so Zellen des angeborenen Immunsystems, wie Makrophagen und Granulozyten [40, 460]. Diese wiederum reagieren unter anderem mit der Bildung von Zytokinen. Neben PAMPs als exogen wirkende Pyrogene, denen z.B. das bakterielle Lipopolysaccharid (LPS) zugeordnet wird [7], können auch *danger-associated molecular patterns* (DAMPs) als endogene Mediatoren bei Freisetzung durch Gewebeschäden Entzündungsreaktionen auslösen [435].

Diese Ereignisse führen zur Auslösung eingangs genannter Symptome. Das thermoregulatorische Kontrollzentrum, die präoptische Region des Hypothalamus, wird dabei auf unterschiedliche Weisen stimuliert, was eine aktive Erhöhung der Körpertemperatur (Fieber) zur Folge hat [53, 421]. Diese erhöhte Temperatur reduziert beispielsweise die Aktivität bzw. das Teilungsvermögen temperatursensitiver Bakterien [166]. Zusätzlich wird die für das bakterielle Wachstum unverzichtbare Verfügbarkeit von Eisen und Zink im Blut reduziert [118] und es kommt zu einer vermehrten Proliferation von Immunzellen, einhergehend mit einer erhöhten Phagozytoseleistung von Leukozyten [354, 536]. Erstaunlicherweise konnten verschiedene Studien sogar zeigen, dass eine antipyretische Behandlung die Mortalität bei schweren Infektionen erhöhen kann [286, 464, 551]. Es wird also eine positive Wirkung von Fieber bei Mensch und Tier diskutiert, die das Überleben fördert [203, 429].

1.2 Kommunikationswege zwischen Peripherie und dem zentralen Nervensystem

Um eine systemische Reaktion auslösen zu können, müssen die inflammatorischen Signale der peripher am Entzündungsort gebildeten Mediatoren an die zentralnervösen Regulationszentren übermittelt werden. Dieser Informationsfluss wird über drei bekannte Pfade sichergestellt (Abbildung 1).

Der am schnellsten induzierte Kommunikationsweg ist der neuronale Weg [427]. Dieser führt bereits zu einer Fieberantwort, noch bevor größere Mengen Zytokine im Blut nachweisbar sind [431]. Hier liegt die Stimulation afferenter Fasern des *Nervus vagus* [44] und kutaner sensorischer Nerven [427, 438] zugrunde. Beide projizieren im Weiteren über die *Area postrema* (AP) in die präoptische Region des Hypothalamus. Die Weiterleitung an das ZNS setzt in diesem Fall also die Umwandlung eines Immunsignals in ein neuronales Signal voraus. Da der neuronale Signalweg kein Teil der hier vorliegenden Arbeit ist, wird im Folgenden nicht weiter darauf eingegangen.

Ein zweiter, weniger bekannter Mechanismus ist eine Immunzellmigration in das Gehirn. Über diesen zellulären Signalweg kann die lokale Freisetzung von inflammatorischen Mediatoren im Gehirnparenchym induziert werden [4, 478].

Der dritte, und am längsten bekannte Pfad ist der humorale Kommunikationsweg [20, 35]. Dieser beschreibt eine direkte, fieberauslösende Wirkung von exogenen Pyrogenen, wie z.B. LPS und / oder endogen gebildeten Pyrogenen, wie z.B. Zytokinen.

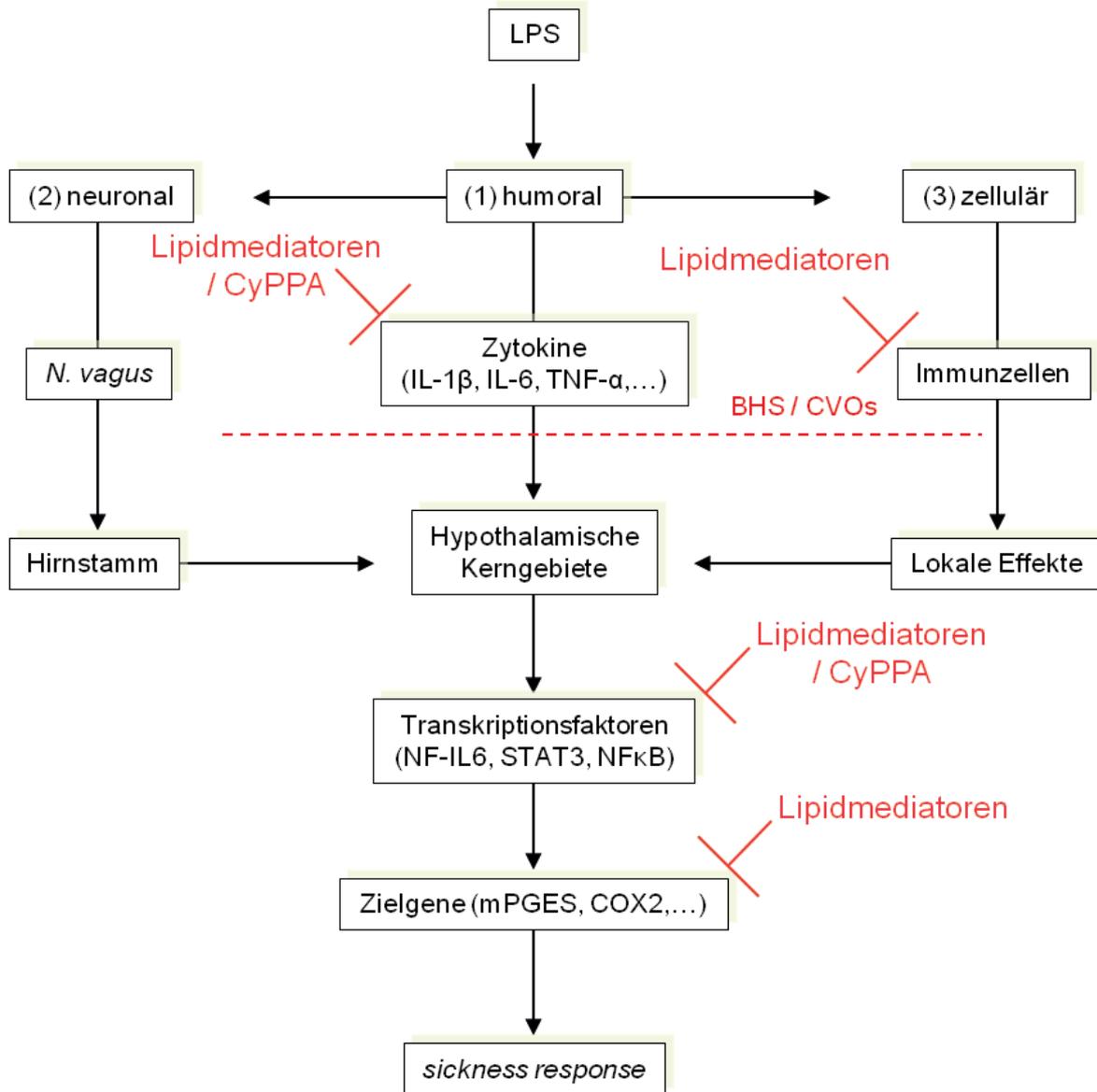


Abbildung 1

Überblick über die verschiedenen Kommunikationswege zwischen Immunsystem und Gehirn. *Pathogen-associated molecular patterns* wie beispielsweise Lipopolysaccharid (LPS) induzieren über (1) den humoralen, (2) den neuronalen und (3) den zellulären Kommunikationsweg die zentral gesteuerte *sickness response*. (1) Die Freisetzung peripherer Zytokine wie Interleukin (IL) -1 β , IL-6 oder Tumornekrosefaktor (TNF) - α aktiviert Zellen der Blut-Hirn-Schranke (BHS) oder Zellen der sensorischen circumventrikulären Organe (CVOs). Diese aktivieren wiederum direkt oder indirekt über sekundäre Mediatoren hypothalamische Zielregionen. Über die Induktion von Transkriptionsfaktoren kommt es zur Expression von *sickness response* regulierenden Zielgenen. Zu diesen zählen die mikrosomale Prostaglandin E Synthase (mPGES) sowie die Cyclooxygenase (COX) 2. Hypothalamische Kerngebiete können jedoch auch direkt neuronal über den *Nervus vagus* (2) angesteuert und aktiviert werden. Außerdem können periphere inflammatorische Zytokine Leukozyten aktivieren, die mit der BHS interagieren (3). Die folgende dadurch induzierte Zytokinproduktion führt zu lokalen Effekten. Siehe hierzu auch 1.2.2.

Eine in dieser Arbeit untersuchte anti-inflammatorische Strategie ist die Wirkung von Lipidmediatoren, denen hemmende Wirkungen auf Zellmigration und Zytokinproduktion zugeschrieben werden. Auch die Verwendung von Cyclohexyl-[2-(3,5-dimethyl-pyrazol-1-yl)-6-methyl-pyrimidin-4-yl]-amine (CyPPA) fand in dieser Arbeit Anwendung. CyPPA zeigte in

Zellkulturversuchen eine Reduktion der LPS-induzierten Zytokinfreisetzung von Mikrogliazellen. In dieser Arbeit untersuchte Angriffspunkte von Lipidmediatoren / CyPPA sind exemplarisch hervorgehoben.

1.2.1 Der humorale Signalweg

Zytokine nehmen eine entscheidende Rolle bei der Signalweiterleitung in das Gehirn ein. Zellen des angeborenen Immunsystems wie neutrophile Granulozyten, Makrophagen und Monozyten können eingedrungene PAMPs über *pattern-recognition-receptors* (im Fall von LPS der Toll-Like-Rezeptor (TLR) 4) binden [3, 38]. Diese Bindung eines PAMPs an seinen entsprechenden Rezeptor induziert die Synthese und Freisetzung pro-inflammatorischer Zytokine. Als erstes ist der Tumornekrosefaktor (TNF) α , gefolgt von geringen Mengen Interleukin (IL) -1β , im Blut nachweisbar [184]. Vorgenannte Zytokine können sich teilweise gegenseitig induzieren [137, 226] sowie die Expression weiterer Zytokine wie beispielsweise IL-6 bewirken [149, 578]. Diese sogenannten endogenen Pyrogene gelangen über den Blutstrom in die präoptische Region des Hypothalamus. Dort lösen sie über die Induktion einer lokalen Bildung von Prostaglandin E_2 (PGE_2) und dessen Wirkung auf temperatursensitive Neurone letztlich die Fieberentstehung aus [351, 451].

Da das Gehirn effektiv durch die Blut-Hirn-Schranke (BHS) von der peripheren Blutzirkulation abgegrenzt wird und zirkulierende Zytokine nicht oder nur begrenzt hindurch diffundieren können, stellt sich die Frage wie pyrogene Signale in hypothalamische Regionen weitergeleitet werden können. Diesbezüglich werden verschiedene Mechanismen beschrieben:

- Es wurde ein sättigbares, transendotheliales Transportsystem für IL- 1β , IL-6 sowie TNF- α beschrieben [26, 27], dessen Kapazitäten jedoch gering sind. Minimal fieberauslösende Konzentrationen werden nicht erreicht, was deren Relevanz fraglich erscheinen lässt [26].
- Zellen der BHS, beispielsweise Endothelzellen, perivaskuläre Makrophagen und Gliazellen tragen auf ihrer luminalen Seite Rezeptoren, die mit Zytokinen interagieren. Nach Aktivierung können diese Zellen dann sekundäre Mediatoren in das Gehirnparenchym sezernieren [321, 539].
- Zytokine treten über sensorische circumventrikuläre Organe (CVO), Regionen denen eine dichte BHS fehlt, in den Hypothalamus ein und agieren dort direkt [432].

Sensorische CVOs umfassen das *Organum vasculosum laminae terminalis* (OVLT), das *Organum subfornicale* (SFO), beide in der *Lamina terminalis* des dritten Ventrikels lokalisiert, sowie die AP im Dach des vierten Ventrikels [325]. Eine starke Vaskularisierung mit fenestriertem Endothel ist typisch, ebenso wie das Vorhandensein von Neuronen, deren Axone eine Signalweiterleitung in die präoptische hypothalamische Region, und hier v.a. den *Nucleus praeopticus medianus* (MnPO) erlauben [325, 489]. Speziell dem OVLT wird, auch aufgrund seiner räumlichen Nähe zur präoptischen Region des Hypothalamus und dem MnPO sowie seiner funktionellen Verbindung zur AP, eine Hauptrolle in der Entstehung einer

Fieberantwort beigemessen [429, 501]. Diese Annahme wurde schon früher durch Läsionsstudien postuliert [45].

Zytokine wie auch PAMPs gelangen in CVOs, aktivieren über verschiedene Mechanismen Gehirnzellen, in denen über pro-inflammatorische Transkriptionsfaktoren eine lokale Bildung weiterer inflammatorischer Zytokine stattfindet [350, 405]. Neben TLR4 [84, 272] wurden verschiedenen Zytokin-Rezeptoren, so z.B. für TNF- α [346], IL-1 β [258] und IL-6 [532] in sensorischen CVOs nachgewiesen.

1.2.1.1 Zytokine

Bei Zytokinen handelt es sich um relativ große, hydrophile Proteine, Glykoproteine und Polypeptide (15-25 kDa), die rasch induzierbar insbesondere von immunkompetenten, aber auch einer Vielzahl anderer Körperzellen synthetisiert und freigesetzt werden. Ihre Aufgabe besteht in der auto-, para- und endokrinen Regulation und Koordination der Immunantwort. Zytokine stehen in vielfältigen, wechselseitigen Beziehung zueinander. Ihre Expression wirkt teils selbstverstärkend und beeinflusst die Produktion und Freisetzung anderer Zytokine, wodurch ein umfangreiches Netzwerk von Zytokin-Wirkungen entsteht. Diese Beeinflussung und gegenseitige Induktion wird als „Zytokin-Kaskade“ bezeichnet [429]. Die Expression von Zytokinen und zugehörigen Rezeptoren konnte neben der Peripherie auch für gliale und neuronale Zellen des ZNS bestätigt werden [107]. In gesunden Individuen sind Zytokine mit wenigen Ausnahmen, wie z.B. IL-6, im Blut nicht nachweisbar, erreichen jedoch detektierbare Konzentrationen während verschiedener Krankheitsstadien [135]. Als die wichtigsten pro-inflammatorischen Zytokine und Hauptmediatoren der Fieberentstehung bei Infektionen mit gram-negativen Bakterien werden IL-1 β , TNF- α sowie IL-6 betrachtet [184, 228, 429]. Neben diesen als pro-inflammatorisch beschriebenen Zytokinen treten auch anti-inflammatorisch wirkende Mediatoren auf. Diese Stoffe dienen der Gegenregulation und Eindämmung entzündlicher Prozesse [373] und werden im Verlauf einer solchen Reaktion in die Zirkulation freigesetzt. Zu ihnen werden z.B. der IL-1-Rezeptor-Antagonist (IL-1ra) und IL-10 gezählt [167, 320].

TNF- α

TNF- α ist ein sehr vielseitiges Zytokin, welches nach einer systemischen Verabreichung von LPS als eines der ersten Zytokine im Serum auftritt [251, 430]. Als Ursprungszellen sind unter anderem Makrophagen [454], Mastzellen [498], T-Lymphozyten und natürliche Killerzellen [101, 113] beschrieben. Die biologische Wirkung von TNF- α wird über zwei ubiquitär exprimierte Rezeptoren vermittelt, nämlich TNF-R Typ I (p55) und TNF-R Typ II (p75), die nach ihren Molekulargewichten benannt sind. Die Aktivierung des TNF-R Typ I führt zu einer Aktivierung des Transkriptionsfaktors *nuclear factor* (NF) κ B und induziert hierdurch die Genexpression verschiedener pro-inflammatorischer Proteine [137, 542]. Die lösliche Form des TNF-R Typ I wird insbesondere unter inflammatorischen Bedingungen exprimiert. Dieser bindet und neutralisiert zirkulierendes TNF- α , womit er vor hohen Konzentrationen mit schädigender Wirkung schützt [155]. Unter Beteiligung von NF κ B

sowie anderen Transkriptionsfaktoren bewirkt TNF-R Typ II insgesamt eher anti-inflammatorische Effekte. Bei intravenöser Applikation vermag TNF- α eine normale Fieberreaktion, mit einem Anstieg von IL-1 β auszulösen [135, 137]. Hemmt man jedoch die TNF- α Antwort einer LPS-induzierten Fieberreaktion, wird in Kaninchen [348] sowie in Meerschweinchen [433] lediglich die späte Fieberphase hiervon beeinflusst. TNF- α könnte also an der Aufrechterhaltung, weniger jedoch an der Initiierung des Fiebers beteiligt sein [429]. Aber auch das Mitwirken von TNF- α an hypothermen Zuständen wurde beschrieben. So konnte eine durch eine septische LPS-Dosis ausgelöste Hypothermie bei Ratten durch die Gabe von TNF-bindendem Protein verkürzt werden [524]. Ebenfalls im Rattenmodell konnte eine Verbindung zwischen chronisch-nutritiver Unterversorgung mit langkettigen, mehrfach ungesättigten Fettsäuren (*polyunsaturated fatty acids*, PUFA) und der Synthese sowie Freisetzung von sowohl IL-6 als auch TNF- α gezeigt werden. Beide Mediatoren waren im Blut der Ratten signifikant erhöht [327]. Dieser Effekt von ω -3 defizienten Diäten konnte in Gehirnen adulter und älterer Mäuse so ebenfalls von anderen Arbeitsgruppen nachgewiesen werden [131, 334, 336]. Insgesamt ist es wichtig festzuhalten, dass TNF- α nicht nur rein pro-inflammatorische Wirkungen vermittelt, sondern ebenso anti-inflammatorische Funktionen besitzt [228, 557]. Die Form seiner Wirkung ist dabei noch nicht eindeutig geklärt, jedoch maßgeblich von der Phase der Entzündungsreaktion sowie dem zugrundeliegenden Stimulus abhängig [211].

IL-1 β

IL-1 ist ein sehr wichtiges pro-inflammatorisches Zytokin. In der vorliegenden Arbeit wurde es nicht näher untersucht und wird deswegen hier lediglich kurz beschrieben. Dieses Zytokin kommt in zwei verschiedenen Varianten, nämlich in einer α und β Form vor. Verschiedene Studien haben gezeigt, dass die periphere Injektion sowohl von IL-1 α als auch von IL-1 β in unterschiedlichen Spezies fieberauslösend wirkt [134, 136, 251]. IL-1 β erscheint nach LPS-Stimulation nur in geringen Mengen im Blut [184]. Tatsächlich kann LPS auch bei Abwesenheit von IL-1 β fieberauslösend wirken [80, 251]. Die Verwendung eines IL-1-Antiserums oder von IL-1ra vor der Verabreichung von LPS führt in verschiedenen Tiermodellen zu einer Abschwächung der späten Fieberphase, vergleichbar mit der Wirkung einer TNF- α Blockade [305, 306, 431, 490]. IL-1 β wird insgesamt eine wichtige Rolle in der Zytokin-Kaskade zugeschrieben, da es sowohl die Freisetzung der pro-inflammatorischen Zytokine TNF- α und IL-6 als auch der anti-inflammatorischen Mediatoren IL-10 und IL-1ra induziert [167, 257, 320].

IL-6

Als Reaktion auf entzündliche oder infektiöse Stimuli wird IL-6 unter anderem von Neuronen und Gliazellen [170] sowie von natürliche Killerzellen [22], Monozyten [356], Endothelzellen [366] und Fibroblasten [533] synthetisiert. Neben einer basalen Expression [396] taucht IL-6 in der Zirkulation nach einer LPS-Stimulation in guter Korrelation mit dem Anstieg der Körpertemperatur in hohen Konzentrationen auf [291, 430]. In diesem Sinne bewirkt die

Neutralisation von IL-6 mittels Antikörperapplikation eine Fieberreduktion [81, 202, 442]. Auch IL-6 defiziente Mäuse entwickelten auf eine LPS-Behandlung kein Fieber [83, 262]. Die alleinige periphere Gabe von IL-6 zeigt jedoch nur einen mäßigen pyrogenen Effekt [46, 207, 441, 442]. Im Sinne einer negativen Rückkopplung inhibiert IL-6 die Expression von IL-1 und TNF- α [458]. Bemerkenswert ist, dass bei ω -3 defizient gezogenen Mauswelpen am 21. Tag postnatal, nicht jedoch am Tag der Geburt, sowohl die IL-6-Expression, als auch die IL-1 β -Expression im Hippocampus signifikant erhöht ist [315]. Dieser pro-inflammatorische Status ist bei adulten Tieren nicht mehr nachweisbar [334]. Ein mit den juvenilen Mäusen vergleichbarer pro-inflammatorischer Zustand konnte bei einer Gruppe ältere Patienten, mit einem erhöhten ω -6 / ω -3 FS Verhältnis festgestellt werden. In Blutproben dieser Patienten waren erhöhte Konzentrationen von IL-6 und TNF- α nachweisbar [244].

Anti-inflammatorische Mediatoren

Als klassisches antipyretisch und anti-inflammatorisch wirkendes Zytokin ist an erster Stelle IL-10 zu nennen. Sowohl *in vivo* [204, 292] als auch *in vitro* [127, 205] Experimente konnten einen hemmenden Einfluss von IL-10 auf die Fieberdauer sowie / bzw. TNF- α -, IL-1 β - und IL-6-Expression bestätigen. Die Synthese pro-inflammatorischer Zytokine wird dabei durch die Hemmung der inhibitorischen κ B Kinase sowie der Bindung von NF κ B an die Desoxyribonukleinsäure (DNA) gehemmt [463]. Die Ganzkörperbestrahlung von Ratten führte in einer Studie zu einem hippocampalen Anstieg von IL-1 β und damit einhergehend zu einer vermehrten Apoptoserate. Interessanterweise konnten diese strahlungsbedingten Veränderungen durch eine orale Substitution mit EPA (250 oder 500 mg über 4 Wochen) vollständig aufgehoben werden. Ferner führte die EPA-Supplementation zu einem hippocampalen Anstieg der IL-10 Konzentration [308]. Weitere regulativ auf das Ausmaß und die Dauer der Fieberantwort hemmend wirkende Mediatoren sind der lösliche Rezeptor für TNF- α [162] sowie der oben genannte IL-1ra. So führte beispielsweise eine zentrale Applikation von IL-1ra zur Hemmung des fieberinduzierenden Effektes einer ebenfalls zentralen IL-1 β Injektion [374].

Neben den hier aufgeführten anti-inflammatorischen Mediatoren werden auch viele lipidbasierte Mediatoren in der Literatur beschrieben. Auf diese wird aus Gründen der Übersicht erst an späterer Stelle genauer eingegangen (I.2.2).

1.2.1.2 Transkriptionsfaktoren

Inflammatorische Mediatoren binden an membranständige Rezeptoren ihrer Zielzellen im ZNS und lösen so eine intrazelluläre Signalkaskade aus. Dies hat eine genomische Zellaktivierung hypothalamischer und anderer Gehirnstrukturen durch die Translokation und Bindung eines aktivierten Transkriptionsfaktors an regulatorische DNA-Elemente zur Folge. So wird die Transkription von Zielgenen eingeleitet. Auf Ebene der Transkriptionsfaktoren kommt es zu zahlreichen Protein-Wechselwirkungen, welche sowohl verstärkende als auch hemmende Wirkungen zeigen. Dieser, für alle regulatorischen Faktoren auf Transkriptionsebene bekannte Vorgang, wird auch als *cross-talk* bezeichnet [333].

Im Kontext systemischer Entzündungsreaktionen und Fieber gibt es drei wesentliche Transkriptionsfaktoren, welche die Expression inflammatorischer Mediatoren regulieren. Hierzu zählen NF κ B, der *signal transducer and activator of transcription* (STAT) 3 und der *nuclear factor* (NF) -IL6, auf die im Weiteren kurz eingegangen wird.

NF κ B

Diverse TLR Agonisten, wie LPS aber auch Zytokine wie IL-1 β und TNF- α , können NF κ B über unterschiedliche Rezeptoren aktivieren [437]. Etwa 15-30 Minuten nach Gabe dieser Stimuli kommt es zu einer nukleären Translokation, welche drei bis vier Stunden andauert [347, 382]. Dabei ist NF κ B essentiell für die LPS-induzierte Fieberantwort, was in Knock-out Mäusen bestätigt werden konnte [264].

Bindet LPS an den TLR4 bzw. IL-1 β an den IL-1-Rezeptor kommt es unter Mitwirken verschiedener Proteine und Enzyme letztlich zur Phosphorylierung und damit Aktivierung des I κ B–Kinase-Komplexes (IKK) [180]. Im Zytoplasma der ruhenden Zelle vorliegende NF κ B-Heterodimere, bestehend aus einer p50 und einer p65 Untereinheit, bilden zusammen mit dem inhibitorischen Faktor κ B (I κ B) einen inaktiven Komplex [24]. Durch die nun aktive IKK wird I κ B phosphoryliert, ubiquitinyliert und in der Folge im Proteasom abgebaut [132]. Das jetzt frei vorliegende p50 / p65-Heterodimer transloziert in den Nukleus um dort an das *κ B enhancer element* zu binden und die Transkription von Zielgenen zu regulieren [347]. Die Bindung von TNF- α an seinen Rezeptor TNF-R Typ I führt ebenfalls zur Aktivierung des IKK. Die Aktivierung wird hier jedoch nicht wie bei IL-1 β und LPS über das Adapterprotein MyD88 (*myeloid differentiation primary response protein*), sondern über das Adaptermolekül TRADD (*TNF-receptor 1-associated death domain protein*) vermittelt [180].

Durch NF κ B regulierte Zielgene sind unter anderem diverse Entzündungsmediatoren (TNF- α , IL-1 β , IL-6), die im Sinne eines positiven Feedback-Mechanismus wirken. Es sind hier aber auch anti-inflammatorische Mediatoren [280, 568] wie I κ B α zu nennen (Autoregulation durch negativen Feedback-Mechanismus) [284]. Die Aktivierungsmuster von NF κ B überschneiden sich dabei weitgehend mit denen seines regulatorischen Inhibitors [271]. Außerdem gehören Adhäsionsmoleküle, wie beispielsweise CD (*cluster of differentiation*) 11b ebenso wie Enzyme (z.B. Cyclooxygenase 2) zu den durch NF κ B regulierten Genen [280, 287]. Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass ω -3 PUFA wiederum die NF κ B-induzierte Genexpression in Neuronen hemmen können [319].

STAT3

Die STAT3-Aktivierung ist überwiegend durch Mitglieder der gp (Glykoprotein) 130 Zytokinfamilie, die IL-6 beinhaltet, vermittelt [248]. Zeitlich überlappend mit NF κ B kommt es nach Applikation von LPS oder IL-1 β nach etwa 60-90 Minuten zu einer massiven, nukleären Translokation von STAT3, welche etwa sechs Stunden anhält [179, 443]. In dieser Zeit lässt sich STAT3 in Blutgefäßen des gesamten Gehirns nachweisen [440, 443].

Die für die STAT3-Aktivierung hauptsächlich relevante IL-6-induzierte Signaltransduktion [285, 442] wird über eine rezeptorassoziierte Tyrosinkinase der Janus-Kinase (JAK) -Familie vermittelt. Es kommt zur Phosphorylierung von im Zytoplasma vorhandenen STAT3-Monomeren, welche in dieser aktivierten Form Dimere bilden und in den Nukleus translozieren. Dort binden sie an responsive Elemente der DNA und induzieren so die Expression von Zielgenen [214, 246]. Neben IL-6 ist unter anderem auch eine STAT3-Induktion über IL-10 beschrieben [165].

Enzyme der Prostaglandinsynthese, wie die mikrosomale Prostaglandin E Synthase (mPGES) [441] und die Cyclooxygenase (COX) 2, vermutlich unter Beteiligung weiterer Transkriptionsfaktoren [442, 461, 544], scheinen als Zielgene von STAT3 von Bedeutung zu sein.

Wie NF κ B reguliert auch STAT3 die Expression seines endogenen Regulators, dem *suppressor of cytokine signaling* (SOCS) 3. Im Rahmen eines negativen Feedback-Mechanismus hemmt SOCS3 JAK [452] und findet überdies als Indikator für die Aktivität des JAK-STAT3-Signalweges Verwendung [440, 442].

NF-IL6

NF-IL6 ist ursprünglich nach seiner Beteiligung an der IL-6-Expression benannt [5]. Das primär nukleär lokalisierte [401] NF-IL6 erscheint in seiner aktiven Form vier bis zehn Stunden nach einer systemischen Verabreichung von LPS [117]. Neben seiner Bedeutung für die Zellproliferation und -differenzierung [409] spielt es eine Rolle in der Bildung des Langzeitgedächtnisses [516] ebenso wie bei inflammatorischen Prozessen [148].

Der Signaltransduktionsweg nach Bindung von IL-6 an seinen Rezeptor beinhaltet die Aktivierung von JAK und daraufhin die Initiierung der *mitogen-activated protein* (MAP) Kinase-Kaskade. Die MAP Kinase-Kaskade mündet in der Aktivierung von *extracellular-signal regulated kinase* (ERK) und letztlich in der für die Dimerisierung essentiellen Phosphorylierung der NF-IL6-Monomere [349]. Vielfältige modulierende Effekte von Proteinkinasen auf die DNA-Bindungsfähigkeit von NF-IL6 sowie auf die zur Phosphorylierung führenden Signalwege wurden beschrieben [98, 104, 317, 468]. Neben der Induktion durch IL-6, sind auch LPS, IL-1 β und TNF- α zur Aktivierung von NF-IL6 befähigt [75, 518].

In seiner Funktion als inflammatorischer Transkriptionsfaktor ist NF-IL6 an der Induktion der Prostaglandinsynthese über COX2 und mPGES [503] beteiligt. Weitere Zielgene sind IL-1 β [579], IL-6 [5], TNF- α [398], die induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase [138] sowie IL-10 [302]. Außerdem wurde eine Beteiligung von NF-IL6 an der Regulation von Genen und Enzymen des Energiestoffwechsels in Astrozyten beschrieben [76]. Auch STAT3 und NF κ B unterliegen regulatorischen Einflüssen durch NF-IL6, so ist ein hemmender Einfluss auf I κ B α [74] sowie eine induzierende Wirkung auf SOCS3 bekannt [74, 571].

1.2.1.3 Zielgene

Die genomische Aktivierung von Gehirnzellen geht mit der Bildung und Aktivierung verschiedener, oben beschriebener Transkriptionsfaktoren einher. Essentielle Zielgene der Entstehung von Fieber und anderen Symptomen der *sickness response* werden hierdurch in ihrer Expression beeinflusst. Zu den für diese Arbeit relevanten Genen zählen die Schlüsselenzyme der PGE₂-Synthese COX2 sowie mPGES [530]. Die mRNA (*messenger Ribonukleinsäure*) -Expression beider Enzyme wurde untersucht. COX2 wurde des Weiteren mit Hilfe einer Immunfluoreszenz nachgewiesen.

PGE₂ gehört zu einer großen Gruppe bioaktiver Arachidonsäurederivate, gilt als entscheidender terminaler Mediator der Fieberantwort und wird von einer Reihe unterschiedlicher Zellen gebildet. Im Gehirn zählen hierzu Neurone [28], Mikroglia [503], Astrozyten [565], Endothelzellen [152] sowie perivaskuläre Zellen [477]. PGE₂ erfüllt zentral und peripher zahlreiche physiologische Funktionen. Im Rahmen einer peripheren Entzündungsreaktion ist es für die Schmerzentstehung [239] ebenso wie für eine Vasodilatation [556] und Erhöhung der Gefäßpermeabilität [372] verantwortlich. Seine intrazerebroventrikuläre Gabe [332] sowie Applikation in die präoptische Region [456] wirken Fieber erzeugend. Dabei ist sicher, dass PGE₂ über EP3-Rezeptoren wirkt und über die Aktivierung von absteigenden vegetativen Bahnen Effektororgane, wie das braune Fettgewebe und Gefäße, zur Thermogenese bzw. Kälteabwehr ansteuert [283]. Während eines Fiebers korrelieren endogene PGE₂-Spiegel sowohl im Gehirn als auch im Blut gut mit der Höhe der Körpertemperatur [469]. Auch eine Beteiligung von PGE₂ an LPS-induzierter Anorexie wurde beschrieben [259]. Die PGE₂-Synthese ist dabei auch durch die Nahrungszusammensetzung beeinflussbar. So führte die Supplementation von Fischölen in verschiedenen Studien zu einer Reduktion der PGE₂-Synthese [82, 527]. Außerdem wurde postuliert, dass PGE₂ nach seiner initial pro-inflammatorischen Wirkung die LPS-induzierte Bildung von Zytokinen über einen negativen Feedbackmechanismus hemmt und somit womöglich auch an der Beendigung von Neuroinflammationen beteiligt sein kann [62].

Die Synthese von PGE₂ erfolgt über die Freisetzung von Arachidonsäure (AA) aus Membranlipiden, jedoch nicht wie lange fälschlicherweise angenommen ausschließlich über die Aktivität der Phospholipase A₂ (PLA₂). Jüngst konnte gezeigt werden, dass im Gehirn vor allem die Monoacylglycerol Lipase (MGL) für die Freisetzung von AA aus dem Endocannabinoid 2-Arachidonylglycerol eine Rolle spielt [2-AG konnte in der vorliegenden Arbeit mit Hilfe von MALDI (*matrix assisted laser desorption / ionisation*) -Experimenten nicht eindeutig nachgewiesen werden; siehe hierzu auch VII.3]. Als Pool für die Bildung von 2-AG stehen AA-tragende Diacylglycerole, die wiederum aus verschiedenen Glycerophospholipidspezies freigesetzt werden, zur Verfügung [249, 363]. COX2 setzt freie AA zu Prostaglandin H₂ (PGH₂) um, welches anschließend von der mPGES zu PGE₂ umgewandelt wird [150] (siehe auch Abbildung 2). Ob neben diesen beiden auch die MGL

ein geschwindigkeitsbestimmendes Enzym für die PGE₂-Synthese darstellt bleibt zu klären [249].

Der therapeutische Einsatz von COX2-Inhibitoren ist weit verbreitet. Dabei wird unter anderem Fieber gesenkt [71] und die krankheitsbedingte Anorexie gemildert [509].

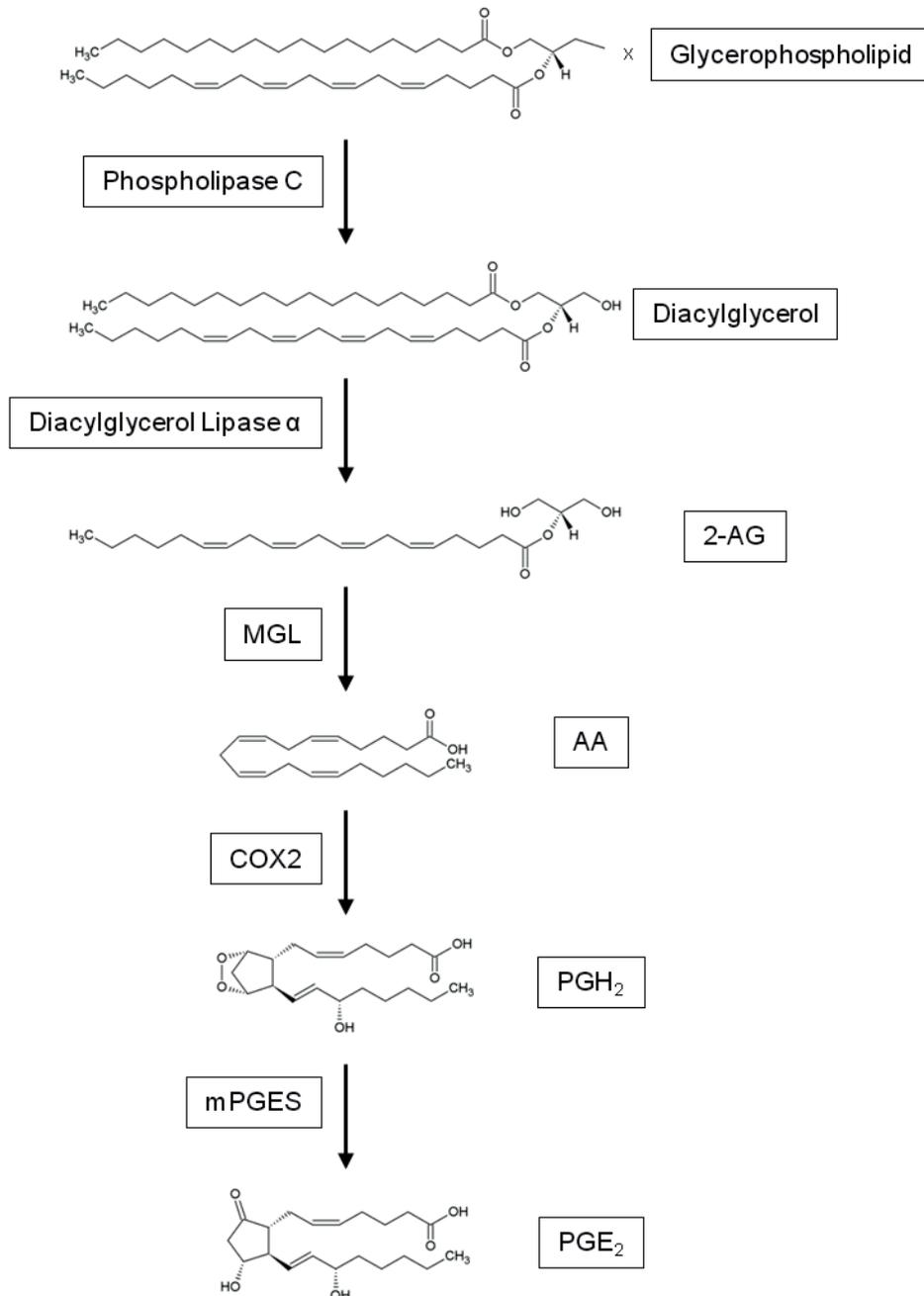


Abbildung 2
Schematische Darstellung der Synthese von PGE₂.

X = Phosphat- und Kopfgruppe, 2-AG = 2-Arachidonylglycerol, MGL = Monoacylglycerol Lipase, AA = Arachidonsäure, COX2 = Cyclooxygenase 2, PGH₂ = Prostaglandin H₂, mPGES = mikrosomale Prostaglandin E Synthase, PGE₂ = Prostaglandin E₂; frei nach Kita 2015 und Nomura 2011 [249, 363].

1.2.2 Der zelluläre Signalweg / die zelluläre Immunantwort

Damit eine zelluläre Immunantwort im Gehirn stattfinden kann, müssen Leukozyten zunächst im Rahmen der Extravasation Blutgefäßlumina verlassen und in das Gehirnparenchym migrieren. Hierzu bedarf es einer Aktivierung peripherer Immunzellen ebenso wie von Endothelzellen der Gehirngefäße [190]. Dies kann einerseits über zirkulierende Zytokine (IL-1 β , IL-6, TNF- α) und andererseits unmittelbar über PAMPs oder DAMPs stattfinden. Eine solche Form der Aktivierung geht mit einer erhöhten Expression von Oberflächenmolekülen wie Selektinen und Integrinen einher [309, 582]. Moleküle dieser Klassen erlauben die Bindung von Leukozyten an Endothelzellen. Diesem Prozess folgend kommt es zur para- sowie transzellulären Migration der Zellen durch das Gefäßendothel (Diapedese) [341].

Unter physiologischen Bedingungen sind neutrophile Granulozyten im Gehirnparenchym nicht anzutreffen, erscheinen jedoch nach Applikation eines ausreichend großen Stimulus (hohe Dosen LPS oder andere inflammatorische Stimuli) nach acht bis 24 Stunden im Gewebe [50]. Sie haben einen Anteil von 90 % an den einwandernden Leukozyten und scheinen sogar für einige Symptome der *sickness response* mitverantwortlich zu sein. So konnte gezeigt werden, dass eine Neutralisation von neutrophilen Granulozyten mit Hilfe eines spezifischen Antiserums bei starker LPS-induzierter Inflammation die Entstehung von depressionsartigem Verhalten sowie einem eingeschränkten Sozialverhalten hemmt [4]. In der vorliegenden Arbeit wurden neutrophile Granulozyten mittels immunhistochemischer Methoden (7/4- und CD11b-Antikörper) sowie als Teilmenge von CD68-positiven Zellen in der *real-time* Polymerase-Kettenreaktion (PCR) nachgewiesen.

1.2.2.1 Mikroglia

Als wichtigste residente Immunzellpopulation, die etwa 10 % der gesamten Gehirnzellpopulation ausmacht, werden die mesodermalen Mikrogliazellen angesehen [36, 87]. Sie sind essentieller Bestandteil des angeborenen Immunsystems des ZNS [185]. Unter physiologischen Bedingungen zeigen sie eine fein verzweigte Form, die auch als ruhender Phänotyp bezeichnet wird. Entgegen früherer Annahmen sind ihre Fortsätze sehr beweglich, und befähigen zur aktiven Überwachung der Umgebung [241, 359]. Eine Vielzahl von auf der Oberfläche exprimierten Rezeptoren erlaubt verschiedenste Signale wahrzunehmen, zu denen beispielsweise bakterielle Zellwandbestandteile, virale DNA oder RNA, aber auch inflammatorische Zytokine zählen [241]. Durch solche Stimuli aktivierte Mikroglia nehmen amöboide Formen an und sind zur Lokomotion ebenso wie zur Phagozytose, Antigenpräsentation, Chemokin- und Zytokinproduktion befähigt [122, 282, 364]. Als Antwort auf einen peripheren Immunstimulus, wie beispielsweise LPS, wurde gezeigt, dass Mikroglia *in vivo* die Zytokine IL-1 β , TNF- α und IL-6 sezernieren [120]. Mikroglia, die ein derartiges Zytokinprofil aufweisen, werden dem M1 Typ zugeordnet. Insgesamt zeichnen sich diese Zellen durch einen inflammationsverstärkenden, zytotoxischen Phänotyp aus. Zellen des M2 Typs hingegen haben durch die Synthese und Freisetzung von anti-inflammatorischen Zytokinen wie IL-10 [36] eher regenerative und immunmodulatorische Eigenschaften [123].

Es wurde berichtet, dass bei der LPS-induzierten und Zytokin-vermittelten Induktion verschiedener inflammatorischer Zielgene (z.B. IL-6) in Mikroglia auch der Transkriptionsfaktor STAT3 eine Rolle zu spielen scheint [400]. Abhängig vom Tiermodell und der verabreichten Dosis kommt es nach etwa sechs Stunden zu einer robusten Aktivierung von Mikroglia nach LPS-Gabe die für mehrere Tage nachweisbar bleibt. Klassische und zum Teil auch in dieser Arbeit verwendete Marker zum Nachweis aktivierter Mikroglia sind CD68 [30], CD11b und das *calcium binding adaptor molecule-1* (Iba-1) [221]. Insgesamt spielen Mikroglia eine Schlüsselrolle beim Schutz von Neuronen vor schädlichen Noxen oder Läsionen [282] und tragen zur Aufrechterhaltung der Homöostase im Gehirn bei [364]. Ihre Beteiligung an neuroinflammatorischen und neurodegenerativen Prozessen wird in der Literatur vielseitig beschrieben und diskutiert. Ihre Aktivierung wird als wichtiger Mechanismus der Pathogenese verschiedener Gehirnpathologien angesehen [517].

2. Die Entzündungsauflösung

Die Entzündungsreaktion des Körpers zielt generell darauf ab, Gewebe zu schützen und als Ursache und Folge von Gewebeverletzungen schädliche Noxen zu beseitigen [109]. Die Entzündungsauflösung wurde lange Zeit als rein passiver Prozess in Folge des Verschwindens pro-inflammatorischer Mediatoren eingeschätzt [511]. Spätestens seit der Entdeckung von Lipidmediatoren mit anti-inflammatorischen und entzündungsauflösenden Fähigkeiten, die sich aus ω -3 FS synthetisieren lassen, wird immer klarer, dass die Beendigung einer selbstlimitierten, akuten Entzündung nach einem strikt programmierten Ablauf von statten geht [473, 475]. Dabei werden auf systemischer Ebene verschiedene physiologische Mechanismen genutzt. Eine Erhöhung zirkulierender Glucocorticoide wird ebenso beobachtet wie die Aktivierung der Akuten-Phase-Reaktion. Auch ein cholinerg anti-inflammatorischer Weg über vagale Afferenzen wurde als protektive Reaktion auf Stress und Entzündungen beschrieben [37, 500, 526]. Versagen entzündungsauflösende Prozesse entwickeln sich chronische Erkrankungen [548]. In den letzten Jahren wurde deutlich, dass zunächst nicht primär inflammatorisch eingeordneten Krankheitsbildern, wie chronischen Entzündungsprozessen, eine bedeutende Rolle zukommt. Hierzu zählen zum Beispiel kardiovaskuläre und zerebrovaskuläre Erkrankungen ebenso wie Krebs, Obesitas und vor allem neurodegenerative Erkrankungen wie beispielsweise Alzheimer [68]. Dabei ist der zugrundeliegende Entzündungsreiz häufig unbekannt und / oder schwer zu beseitigen [511].

2.1 Calciumabhängige Kaliumkanäle

Kleine, schwach leitende, durch Ca^{2+} -aktivierte K^+ -Kanäle (SK) werden unter anderem im ZNS exprimiert [2, 445] und könnten zukünftig eine Rolle für die Behandlung von neurodegenerativen Erkrankungen spielen [266]. So konnten durch die Gabe entsprechender Agonisten Gehirnfarkt und neuronales Absterben reduziert werden [9, 143]. Ihnen wird außerdem eine Bedeutung bei neuroinflammatorischen Prozessen zugesprochen. Die *in vitro*

Modulation solcher Kanäle zeigt konzentrationsabhängige regulatorische Einflüsse auf Mikroglia [139, 141].

2.1.1 Nomenklatur und Aufbau

Alle Ca^{2+} -aktivierten K^+ -Kanäle werden einer Genfamilie zugesprochen. Sie untergliedern sich in zwei Gruppen [550], und zwar spannungsabhängige und spannungsunabhängige Kanäle. Zu den spannungsunempfindlichen Kanaltypen gehören drei SK Subtypen, die als SK1–3 [255] oder Synonym als $\text{K}_{\text{Ca}2.1}$, $\text{K}_{\text{Ca}2.2}$ und $\text{K}_{\text{Ca}2.3}$ bezeichnet werden. Zusätzlich wird dieser Gruppe ein intermediärer Kanaltyp, der IK1 oder $\text{K}_{\text{Ca}3.1}$ zugerechnet. SK1–3 werden in sich überlappenden Bereichen des Gehirns exprimiert [502], unter anderem auch im Hypothalamus [445]. Zur Gruppe der spannungsabhängigen Ca^{2+} -aktivierten K^+ -Kanäle gehört der BK oder $\text{K}_{\text{Ca}1.1}$ [550]. Für diese Arbeit relevante Kanaltypen sind Homomultimere aus den selektiv durch Cyclohexyl-[2-(3,5-dimethyl-pyrazol-1-yl)-6-methyl-pyrimidin-4-yl]-amine (CyPPA) aktivierbaren Untereinheiten SK2 und SK3 [222].

SK-Einheiten bestehen aus sechs transmembranären Domänen, einem zytosolischen N- und C-Terminus sowie einer *P loop* Region zwischen der Domäne fünf und sechs. Dieser Teil umfasst auch den K^+ -selektiven Filter [156]. Die Calciumsensitivität der Kanäle wird durch konstitutiv am C-Terminus gebundenes Calmodulin vermittelt [465, 562]. Bei Bindung von Ca^{2+} an Calmodulin kommt es zu einer Konformationsänderung und Öffnung des Kanals. Dies ermöglicht den Ausstrom von K^+ [240, 465, 562]. Calmodulin kann ferner an verschiedenen Positionen phosphoryliert werden, was eine direkte Modulation der Kanalaktivität nach sich zieht [255]. Findet beispielsweise die Phosphorylierung des geschlossenen Kanals durch eine am Kanal gebundene Caseinkinase statt, wird die Calciumsensitivität reduziert. Dahingegen bedingt die Dephosphorylierung des offenen Kanals durch die Proteinphosphatase 2A eine Erhöhung der Calciumsensitivität [8]. Die Calciumsensitivität ist außerdem direkt abhängig von intrazellulären Ca^{2+} -Konzentrationen, was SK-Aktivierung unmittelbar zeitlich an neuronale Aktivität koppelt [2].

2.1.2 Funktion und Pharmakologie

SK haben eine Vielzahl physiologischer Funktionen. Zu diesen zählt unter anderem das Mitwirken an der einem Aktionspotential folgenden Hyperpolarisation der Zelle. Dies steuert Form und Frequenz der Aktionspotentiale vieler Zelltypen [157, 386, 444]. Ferner führt die Aktivierung von SK zu einer reduzierten Erregbarkeit von Neuronen (siehe hierzu Abbildung 3). Des Weiteren tragen sie zur Regulation der Langzeit-Potenzierung (*long-term potentiation*, LTP) bei, welche als Maßstab für die synaptische Plastizität von Nervenzellen im Rahmen von Gedächtnisbildung und Lernen dient [2]. So konnte gezeigt werden, dass SK-Aktivität die synaptische Plastizität reduziert. CyPPA bindet in geringen micromolaren Konzentrationen an SK2 und 3 und führt zu einer Erhöhung der Calciumsensitivität der Kanäle [222]. Die Gabe dieses positiven Modulators verschlechterte dabei die Lernleistung von Mäusen [540], wohingegen die Gabe des SK Antagonisten Apamin (Bestandteil von

Bienengift) bei Mäusen mit verbessertem hippocampalen Lernen und einer vermehrten synaptischen Plastizität einhergeht [497].

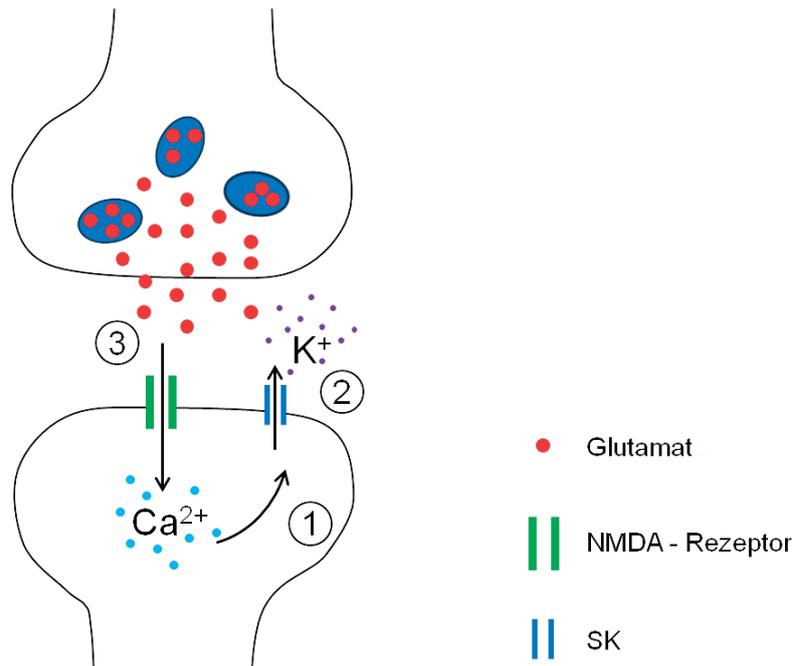


Abbildung 3

Aktiviert kleine, schwach leitende Ca^{2+} -sensitive K^+ -Kanäle (SK) reduzieren die Erregbarkeit von Neuronen und erhalten die Calciumhomöostase. Postsynaptische N-methyl-D-aspartat (NMDA) -Rezeptoren werden durch präsynaptische Glutamatfreisetzung in den synaptischen Spalt aktiviert, (1) es kommt zu einem Ca^{2+} -Einstrom in die Zelle, welcher SK aktiviert. (2) Durch den SK kommt es zum Ausstrom von K^+ , was die Zelle repolarisiert und (3) die erneute Aktivierung der NMDA-Rezeptoren blockiert. So wird der Ca^{2+} -Einstrom terminiert. Nach Dolga 2012 und Kuiper 2012 [141, 266].

Eine Beteiligung von SK an neurodegenerativen Prozessen konnte über zwei Mechanismen gezeigt werden. Zum einen kommt es durch SK-Aktivierung zum Schutz von Neuronen. SK terminieren dabei eine übermäßige Aktivierung von N-methyl-D-aspartat (NMDA) -Rezeptoren und einen dadurch bedingten Calciumeinstrom in die Zelle (Abbildung 3), so schützen sie vor Excitotoxizität [140]. An diesen Vorgängen scheinen auch in der mitochondrialen Membran exprimierte SK beteiligt zu sein [142, 419]. Zum anderen wird die LPS-induzierte Entzündungsantwort von Mikroglia reduziert [141]. Für die Aktivierung von Mikroglia spielt vor allem der SK3 eine bedeutende Rolle [139]. Dessen mRNA konnte in murinen Mikrogliazellen nachgewiesen werden [141, 242]. Ferner wird nach LPS-Stimulation von primären mikroglialen Kulturen der Ratte die mRNA-Expression signifikant vermehrt [459]. Es konnte gezeigt werden, dass die LPS-vermittelte inflammatorische Antwort primärer mikroglialer Zellkulturen der Maus durch die Behandlung mit CyPPA abgeschwächt wird. Dabei kam es zu einer reduzierten Produktion und Freisetzung von $\text{TNF-}\alpha$, IL-6 sowie Stickstoffmonoxid (NO). Zusätzlich wird morphologischen Veränderungen von

Mikrogliazellen vorgebeugt, welche mittels Echtzeit-Impedanzmessungen erfasst wurden [141].

Die Aktivierung von Mikroglia tritt *in vivo* sowohl als Folge von LPS-Stimulation auf als auch bei verschiedenen Gehirnpathologien [117, 179] und wird als einer der wichtigen Mechanismen bei der Pathogenese solcher Zustände angenommen. Daher sollten im Rahmen dieser Arbeit die vielversprechenden bisherigen Versuchsergebnisse bezüglich der Eigenschaften von CyPPA als anti-inflammatorische Strategie *in vivo* getestet werden.

2.2 Die Rolle von Lipiden und Lipidmediatoren für die Beendigung von Entzündungen und Fieber

2.2.1 Die Funktion von Fettsäuren für das Gehirn

Ungefähr 35 % der FS im ZNS gehören zur Gruppe der PUFA. PUFA sind langkettige, mehrfach ungesättigte FS wie die ω -3 FS DHA (22:6 ω -3) und EPA (20:5 ω -3) oder die ω -6 FS AA (20:4 ω -6) [54, 448]. Linolsäure (LA, 18:2 ω -6) und α -Linolensäure (α LNA, 18:3 ω -3) sind die Ausgangsverbindungen für die Synthese von ω -3 und ω -6 FS [145]. Das ω -1 Kohlenstoffatom definiert sich als das am weitesten von der Carboxylgruppe entfernte Kohlenstoffatom. Eine ω -3 FS trägt also ausgehend vom „ ω -Ende“ eine Doppelbindung zwischen dem dritten und vierten Kohlenstoffatom seiner Kette; eine ω -6 FS eine Doppelbindung zwischen dem sechsten und siebten Kohlenstoffatom. Im Gehirn machen DHA und AA den größten Anteil an PUFA aus [215]. DHA reichert sich aufgrund des hohen Bedarfs im ZNS rasch an [33]. Anders als in peripheren Geweben kommt EPA im Gehirn nur in sehr niedrigen Konzentrationen vor [33, 377] und kumuliert dort nicht [294].

Menschen und anderen Säugern fehlt die Δ 15-Desaturase und die Δ 12-Desaturase, so dass α LNA und LA für sie essentielle FS sind [389, 450] und mit der Nahrung aufgenommen werden müssen [450, 555]. EPA, DHA und deren Vorläufersubstanzen sind in Ölen von Makroalgen [389] sowie in relativ großen Mengen in Kaltwasserfischen [70] zu finden. α LNA kommt in Ölen von verschiedenen Samen und grünem Blattgemüse vor [70, 337, 389].

2.2.2 ω -3 Fettsäuren und deren fieberreduzierendes Potential

Sowohl für DHA als auch für EPA sind große anti-inflammatorische Potentiale beschrieben [537]. So konnte nach 42-tägiger oraler Substitution von 40 mg/kg EPA in Kaninchen eine Reduktion der Fieberantwort auf die intravenöse Gabe des viralen Mimetikums *polyinosinic: polycytidylic acid* (Poly I:C, 2,5 μ g/kg) gezeigt werden. Diese Fieberreduktion war begleitet von reduzierten IL-1 β - und PGE₂-Plasmakonzentrationen, jedoch einer Erhöhung von 15-deoxy Δ ^{12,14}Prostaglandin J₂ (PGJ₂) [124]. 15-deoxy Δ ^{12,14}PGJ₂ ist ein Abbauprodukt von Prostaglandin D₂ (PGD₂), dem anti-inflammatorische Eigenschaften zugesprochen werden [216]. Auch Untersuchungen an gesunden Freiwilligen bestätigen fieberhemmende Effekte von Fischölen. So wird nach zweimaliger intravenöser Fischölgabe von 5 ml/kg über sechs Stunden, jeweils 48 und 24 Stunden vor LPS-Applikation, eine reduzierte Fieberantwort beim

Menschen beobachtet, die von reduzierten TNF- α -Plasmakonzentrationen begleitet wurde [395]. Diesen Ergebnissen entsprechend zeigte sich nach oraler Substitution mit einer hohen Dosis EPA und DHA (3600 mg/Tag, über acht Wochen), jedoch nicht nach Verabreichung einer geringeren Dosierung (900 mg/Tag, über acht Wochen), eine signifikante Reduktion eines durch intravenöse Gabe von 0,6 ng/kg LPS induzierten Fiebers. Diese Beobachtung ging mit tendenziell reduzierten IL-6-, TNF- α -, IL-10-, IL-1ra-, und C-reaktivem Protein-Plasmakonzentrationen einher [161]. Dahingegen wurde in einer anderen Studie nach drei- bis vierwöchiger ω -3 PUFA Supplementation (7,2 g/Tag) die Fieberantwort, induziert durch eine intravenöse Verabreichung von 2 ng/kg LPS, geringfügig abgeschwächt und Zytokin-Konzentrationen nicht beeinflusst [330]. Die Bedeutung solcher therapiebegleitender diätetischer Ansätze bei inflammatorischen Prozessen ist demnach also sehr groß. Dennoch fehlen weiterführende, detaillierte Informationen bezüglich der Wirkweise von PUFA und deren Metaboliten.

2.2.2.1 Arachidonsäure und seine Metabolite

Freie AA ist Substrat zur Bildung einer großen Vielfalt verschiedener AA-Derivate. Dazu zählt der in Abbildung 2 gezeigte Syntheseweg zur Bildung von PGE₂. Im Folgenden soll ohne Anspruch auf Vollständigkeit ein kurzer Überblick zu wichtigen Synthesewegen gegeben werden.

Enzymatisch oder anderweitig freigesetzte AA wird entweder erneut in neuronale Membranen eingebaut oder über verschiedene enzymatische bzw. nicht-enzymatische Mechanismen zu oxidierten Metaboliten mit wichtigen neurochemischen Funktionen umgewandelt [159, 412]. COX, Lipoxygenasen (LOX) und Cytochrom P450 metabolisieren AA zu Prostaglandinen, Leukotrienen und Epoxy-Eicosatriensäuren. Durch einen Seitenast der Prostaglandinsynthese werden außerdem Thromboxane gebildet [261, 391]. Zusammenfassend werden diese Substanzen auch als Eicosanoide bezeichnet [391]. Neurone, Astrozyten und cerebrale Endothelzellen sind fähig, Eicosanoide zu bilden [368, 541, 558]. Den aus AA gebildeten Prostaglandinen der sogenannten 2er Reihe ebenso wie Leukotrienen der 4er Reihe wird generell ein hohes pro-inflammatorisches Potential zugesprochen (siehe auch Abbildung 4) [121]. Studien zur Rolle von Leukotrienen für die Fieberinduktion fanden jedoch auch Hinweise auf fieberhemmende Wirkungen solcher durch LOX-Enzyme gebildeter Mediatoren, die der Gruppe der sogenannten Kryogene angehören [261]. Kryogene sind endogene Substanz, die die Höhe von Fieber reduzieren und so im Sinne einer Temperaturreduktion wirken [261]. Leukotriene sind kein Schwerpunkt dieser Arbeit. Eine Hemmung von COX kann allerdings zu einer erhöhten Expression von LOX führen [97]. LOX ist sowohl für die Bildung von ω -6 als auch von ω -3 Lipidmediatoren relevant [496].

2.2.2.2 Docosahexaensäure, Eicosapentaensäure und ihre Metabolite

Für die ω -3 FS EPA und DHA wird schon lange eine anti-inflammatorische Wirkung angenommen. Sie können mit AA um Enzymsysteme konkurrieren und dabei die

Konzentrationen pro-inflammatorischer Eicosanoide reduzieren [472]. Des Weiteren spielt DHA eine wichtige Rolle für Wachstum, Entwicklung und einige Funktionen des Gehirns von Säugern [528]. So wirkt es neuroprotektiv [245] und moduliert die Aktivität hippocampaler Synapsen [72]. In Membranphospholipiden des Gehirns ist DHA stark angereichert [61], kann aber im ZNS selbst nicht gebildet werden [357]. Der zugrunde liegende Mechanismus der Anreicherung von DHA wurde lange diskutiert. Unverestertes DHA kann die BHS frei passieren [197, 198, 413]. Ferner wurde kürzlich der DHA-Transporter Mfsd2a entdeckt [357]. Dieser Transporter wird ausschließlich von Endothelzellen der BHS exprimiert und transportiert als Lysophosphocholin (LPC) verestertes DHA und andere langkettige FS. An Mfsd2a Knock-out Mäusen konnte dessen Bedeutung und Funktion bestätigt werden. Solche Tiere zeigen deutlich reduzierte DHA-Konzentrationen im Gehirn, die von einer Mikroencephalie, Verhaltensauffälligkeiten und einer reduzierten Zahl von Neuronen im Hippocampus und Cerebellum begleitet werden [357]. Ebenfalls konnten in Gehirnen von Alzheimer-Patienten reduzierte DHA-Konzentrationen nachgewiesen werden. Die Reduktion von DHA-tragendem Phosphatidylcholin (PC (18:0/22:6)) korreliert positiv mit der Dauer der Erkrankung [574]. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die Leukozyteninfiltration in ischämische Gebiete des Rattengehirns durch erhöhte DHA-Konzentrationen vermindert wird [381]. Somit trägt DHA zur Modulation von Neuroinflammation bei.

Interessanterweise konnte in einem Mausmodell für akute Neuroinflammation durch eine intrazerebroventrikuläre Gabe von LPS gezeigt werden, dass speziell unverestertes DHA neuroprotektiv wirkt. Dieser Effekt war zumindest zum Teil durch die Umwandlung von DHA in SPMs bedingt. Es wurde postuliert, dass der in Phospholipiden gebundene Anteil an DHA keine neuroprotektive Wirkung zeigt, jedoch als wichtige Quelle zur Freisetzung von DHA durch Deacylierung dient [375].

Prostaglandinen der 3er Reihe und Leukotrienen der 5er Reihe, deren Vorläufer EPA ist, werden im Gegensatz zu den Metaboliten der AA reduzierte pro-inflammatorische oder sogar anti-inflammatorische Potentiale zugesprochen. COX- und LOX-Enzymen dient neben AA auch DHA als Substrat. Entstehende Substanzen werden zu Docosanoiden zusammengefasst. Die Stoffgruppe beinhaltet Resolvine (Rv), Docosatriene und Neuroprotectine. Diese antagonisieren unter anderem Effekte von Eicosanoiden [121]. PUFA bilden also Ausgangssubstanzen sowohl für pro- als auch für anti-inflammatorische Moleküle. Das Verhältnis von ω -3 zu ω -6 nimmt dabei Einfluss auf das Verhältnis von pro-inflammatorischen zu anti-inflammatorischen Lipidmediatoren, was in Plasmalipidstudien von Fat-1 Tieren (Mäuse der Linie B6.129P2-Tg(CAG-fat-1)Jxk, siehe hierzu auch II.2.2.1.1) gezeigt werden konnte [19]. Es erscheint also äußerst wahrscheinlich, dass die Balance zwischen diesen sich wechselseitig antagonistisch beeinflussenden Lipidspezies Einfluss auf den Ausgang von Krankheitsgeschehen nimmt (siehe auch Abbildung 4).

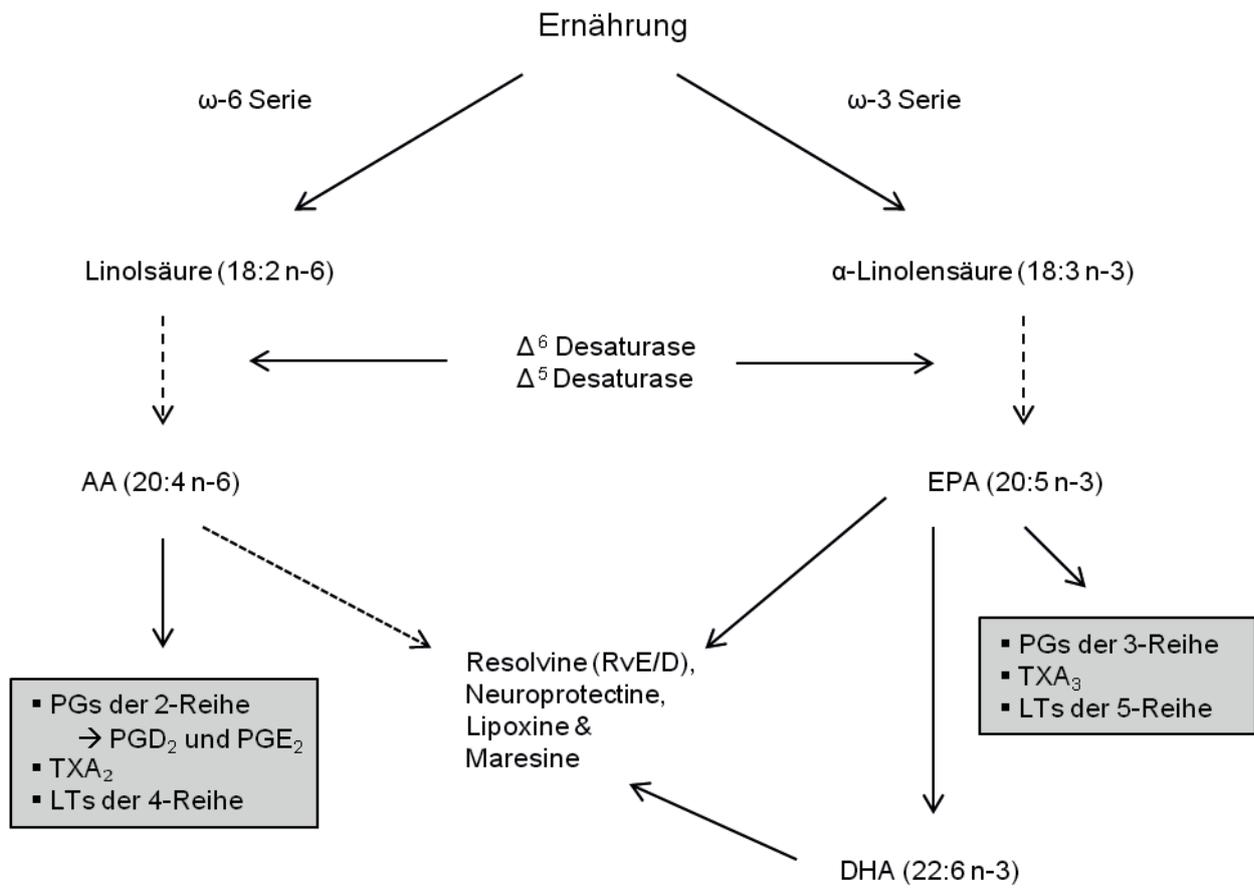


Abbildung 4

Stark vereinfachte, schematische Darstellung des Metabolismus essentieller Fettsäuren. Die über die Nahrung aufgenommene essentielle Linolsäure wird über mehrere Zwischenschritte enzymatisch zu Arachidonsäure (AA) umgewandelt. AA ist Ausgangssubstanz vieler pro-inflammatorischer Prostaglandine (PGs) der 2er Reihe, Leukotriene (LT) der 4er Reihe sowie von Thromboxan (TX) A₂. Die ebenfalls essentielle α-Linolensäure ist Vorläufer von Eicosapentaensäure (EPA), welche wiederum weiter verstoffwechselt wird zu Docosahexaensäure (DHA). Aus diesem Ast werden die eher anti-inflammatorischen Prostaglandine der 3er Reihe, LTs der 5er Reihe und TXA₃ gebildet. Außerdem werden via COX-, LOX- und Cytochrom P450 Enzymsysteme anti-inflammatorische und pro-entzündungsauflösende Resolvine, Neuroprotectine, Lipoxine und Maresine auch zu kleinen Teilen aus AA gebildet. Nach Das und Puskás 2009 [121]

Während systemischer LPS-induzierter Entzündung [131] oder bei altersinduzierter Neuroinflammation [270] führt die Gabe hoher Konzentrationen an DHA zu einer Reduktion der Expression pro-inflammatorischer Zytokine. Diese anti-inflammatorische Wirkung von ω-3 Lipidmediatoren kann zum einen durch Hemmung der LPS-stimulierten NFκB-Aktivierung erklärt werden [39]. Zum anderen kann eine gestörte Oberflächenexpression zugehöriger Rezeptoren wie TLR4 und CD14 [125] und damit beispielsweise auch eine Unterdrückung des IL-6 induzierten JAK-STAT3-Signalweges [334] daran beteiligt sein.

Es gibt also verschiedene Erklärungsansätze für die in früheren Studien beobachteten anti-inflammatorischen und fieberauflösenden Effekte der ω-3 PUFA. Diese werden in Abbildung 5 zusammenfassend dargestellt.

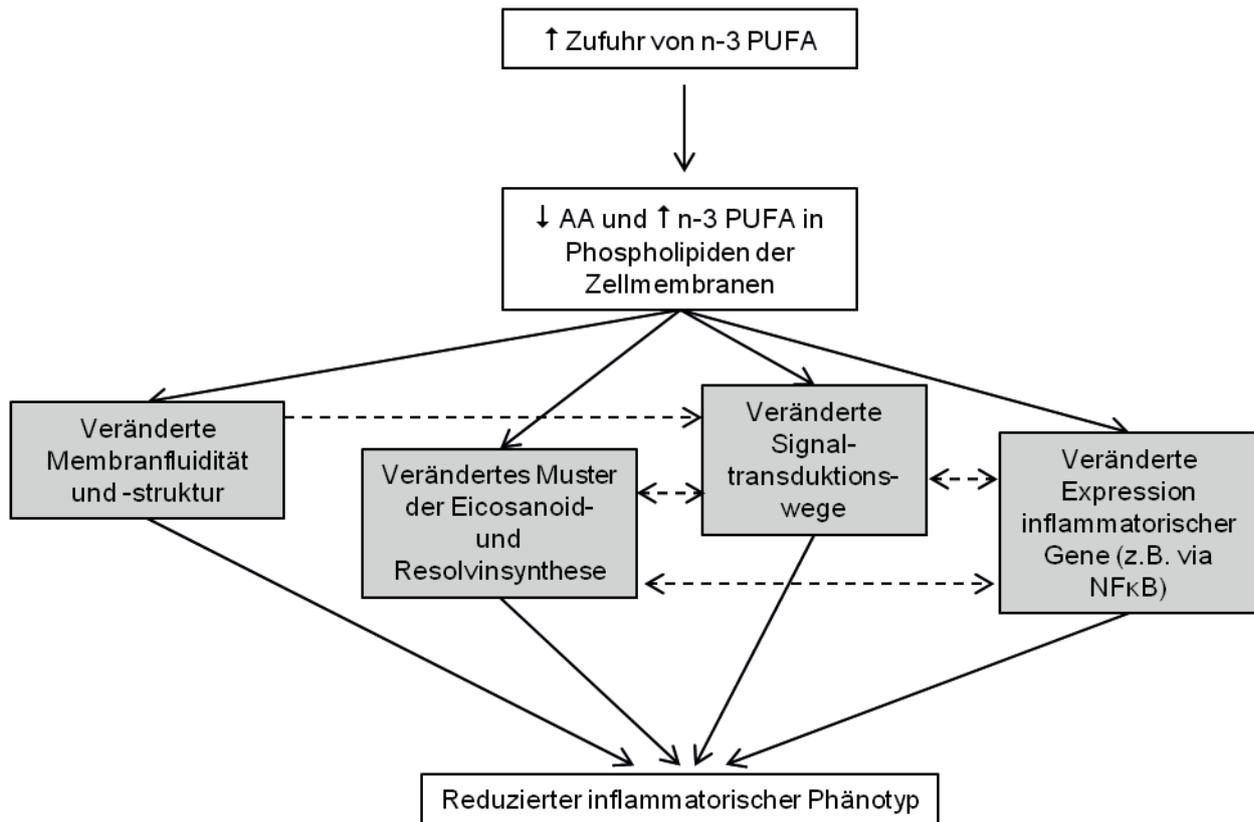


Abbildung 5

Zelluläre Mechanismen über die ω -3 polyunsaturated fatty acids (PUFA) zur Reduktion inflammatorischer Zustände (Phänotypen) führen. Eine erhöhte Zufuhr langkettiger, mehrfach ungesättigter Fettsäuren verdrängt Arachidonsäure (AA) aus Phospholipiden. Eine Anreicherung von PUFA in Zellmembranen führt zu einer Erhöhung der Membranfluidität, verändert die Synthesemuster von Lipidmediatoren und die Oberflächenpräsentation verschiedener Rezeptoren, was wiederum veränderte Signaltransduktionswege nach sich zieht. Zusätzlich interagieren freie Fettsäuren beispielsweise mit NF κ B. Modifiziert nach Calder 2009 [68].

2.2.3 Specialized pro-resolving mediators (SPMs)

Die weit verbreitete Ansicht, dass Lipidmediatoren generell eine pro-inflammatorische Wirkung haben, ist sicherlich auf die Tatsache zurück zu führen, dass nicht steroidale anti-inflammatorische Medikamente (NSAIDs) ihre Wirkung über die Blockade der Prostaglandinbiosynthese entfalten. Ganz im Gegenteil zu dieser Annahme ist heute jedoch die hohe Bedeutung von Lipiden und Lipidmediatoren für den Prozess der Entzündungsauflösung bekannt, wird aber nicht vollständig verstanden. Hier soll näher auf die entzündungsauflösenden Eigenschaften einer speziellen Gruppe von Lipidmediatoren nämlich den sogenannter *specialized pro-resolving mediators* eingegangen werden.

Anti-inflammatorische Prozesse sind generell nicht mit pro-entzündungsauflösenden Prozessen gleichzusetzen. Auf zellulärer Ebene beinhalten die Haupteffekte der Entzündungsauflösung die Beendigung des Einstroms neutrophiler Granulozyten in Entzündungsgebiete sowie die Phagozytose von Zelltrümmern, inklusive apoptotischer Neutrophiler durch Makrophagen (Efferozytose) [314, 476]. Eingeleitet wird diese im

normalen Verlauf einer Entzündung auftretende Phase durch einen sogenannten Klassenwechsel der beteiligten Lipidmediatoren von einem Prostaglandin und Leukotrien dominierten Milieu hin zu hohen Konzentrationen von Lipoxinen und Rv [293, 472]. Zu diesen entzündungsauflösenden Agonisten gehören neben Rv und Lipoxinen auch Protectine und Maresine, die kollektiv als SPMs bezeichnet werden [471]. SPMs sind Substanzen mit der Fähigkeit, Schlüsselereignisse der Entzündungsauflösung zu vermitteln [314, 511]. Sie wirken pro-inflammatorischen Mediatoren entgegen und reduzieren dabei das Ausmaß und die Dauer von Entzündungen [467].

Durch systematische Untersuchungen von Substanzen in entzündlichen Exsudaten der Maus konnten ihre Strukturen, ihre biologischen Funktionen und Synthesewege aufgeklärt werden [475, 476]. *In vitro* Studien zeigten außerdem, dass humane neutrophile Granulozyten und Makrophagen wichtige Syntheseorte dieser Mediatoren darstellen [115].

Aus EPA werden Rv der E-Reihe gebildet, von denen bis heute RvE1 bis RvE3 bekannt sind. DHA dient als Vorstufe zur Synthese von Rv der D-Reihe von denen bisher RvD1 bis RvD6 identifiziert wurden. Die Biosynthese von Rv wird durch LOX katalysiert. Beispielsweise wird DHA zunächst durch die 15-LOX zu 17S-hydroxy-DHA und in einem weiteren Schritt mit Hilfe der 5-LOX zu RvD1 umgewandelt. Für die Synthese von RvE1 ist zusätzlich das Cytochrom P450 notwendig [73]. Aspirin acetyliert COX2, was zu einer derartigen Modifikation seines katalytischen Zentrums führt, dass zwar die Prostaglandinsynthese gehemmt wird, AA, DHA und EPA jedoch weiterhin als Substrate fungieren können. Diese werden zu 15R-HETE, 17R-HDHA und 18R-HEPE umgesetzt, welche wiederum über Enzymsysteme, die in humanen neutrophilen Granulozyten vorhanden sind, *in vitro* zu sogenannten *aspirin-triggered* Lipoxinen, *aspirin-triggered* Resolvinen [473, 475] und *aspirin-triggered* Protectinen [474] transformiert werden können. Diese Lipidmediatoren zeichnen sich dadurch aus, dass sie zu natürlichen Formen vergleichbare Eigenschaften aufweisen. Außerdem wurde in Mäusen das Aspirin-induzierte 15-epi-LXA₄ nachgewiesen, was weitere Hinweise auf *in vivo* existente und durch Aspirin verstärkte Starthilfen der Entzündungsauflösung lieferte [59]. Andere Inhibitoren der Prostaglandinsynthese können vielmehr eine Verzögerung der entzündungsauflösenden Prozesse induzieren, da Prostaglandine Initiatoren des Klassenwechsels von Lipidmediatoren darstellen [86, 293, 467].

Rv entfalten ihre Wirkung unter anderem über die Bindung an G-Protein gekoppelte Rezeptoren (GPR). Auf neutrophile Granulozyten wirken SPMs allerdings nicht über Calciummobilisation, sondern durch Phosphorylierungen [472]. Für RvD1 ist bisher die Bindung sowohl an den GPR32 als auch an den Lipoxin A4 Rezeptor / Formyl Peptid Rezeptor 2 (ALX/fpr2) beschrieben worden [265]. Die Expression von ALX/fpr2 konnte in Rattenneuronen nachgewiesen werden [387], während dies für GPR32 bisher nicht gelang [232]. RvE1 bindet ebenfalls an zwei unterschiedliche GPR, zum einen an den *chemokine-like receptor 1* (ChemR23) zum anderen an den Leukotrien B4 Rezeptor (BLT1) [15, 16, 369].

ChemR23 wird unter anderem von Mikroglia [106], Makrophagen und Monozyten [449] exprimiert. BLT1 konnte auf humanen neutrophilen Granulozyten und Monozyten nachgewiesen werden [16]. Studien über die Expression von BLT1 auf Mikrogliazellen fehlen bisher [232]. Nichtsdestotrotz konnte gezeigt werden, dass *in vitro* die Inkubation von mikroglialen Zellkulturen mit RvE1 und RvD1 einen LPS-induzierten inflammatorischen Status abmildert und die Expression von TNF- α , IL-6 und IL-1 β reduziert [418, 566]. Vergleichbare Effekte von Resolvinen konnten auch auf Makrophagen nachgewiesen werden [380]. RvE1, RvD1 sowie Maresin 1 sind außerdem fähig einen Wechsel des Makrophagenphänotypes von M1 hin zu M2 zu bewirken [116, 355, 523]. Die Ergebnisse dieser Studie belegen eine Rolle von Resolvinen für die Auflösung von Entzündung und möglicherweise auch von Neuroinflammationen und stellen potentiell vielversprechende Therapeutika dar.

Zur Rolle von Rv im zentralen Nervensystem gibt es bis dato nur wenige Studien. Verschiedene von DHA abstammende Metabolite konnten im Gehirnparenchym nachgewiesen werden. Zu diesen gehören 17S-hydroxy-DHA, Neuroprotectin D1 (NPD1), RvD5, 14S-hydroxy-DHA und Maresin 1. Bisher gelang kein Nachweis von RvD2 im Gehirn, was den im Gehirn von anderen Geweben abweichenden DHA-Metabolismus verdeutlicht bzw. damit zu erklären sein könnte [375, 472]. In Gehirnen von Alzheimer Patienten konnte RvD1 sowie immunhistochemisch und mittels Westernblotanalysen der Rezeptor ALX/fpr2 in Neuronen und Gliazellen nachgewiesen werden. Die Darstellung von ChemR23 gelang in Pyramidenzellen sowie in Gliazellen. Die RvD1 Konzentrationen in der Zerebrospinalflüssigkeit korrelierten überdies positiv mit dem sogenannten *mini-mental state of examination*, einem Screening-Test zur Feststellung kognitiver Defizite [548]. Eine andere Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass in einem Mausmodell für Schädel-Hirn-Trauma die intraperitoneale Gabe von RvE1 über mehrere Tage zu einer reduzierten mikroglialen Aktivierung beiträgt und das inflammatorische Profil von Mikroglia in Richtung M2 Phänotyp positiv beeinflusst [208]. Die intrazerebroventrikuläre Injektion von Maresin 1 reduziert überdies das Infarktvolume in einem Modell für Gehirnschämie ebenso wie die NF κ B-Aktivierung [563].

2.2.4 Phospholipide und Lysophospholipide

Phospholipide sind Bausteine von Zellmembranen und Speicherort für FS. Im Gegensatz zu Lipiden des Fettgewebes kommen im ZNS kaum Triglyceride und Cholesterolester, sondern vor allem Glycerophospholipide und Sphingolipide vor [515]. Glycerophospholipide setzen sich grundsätzlich aus einem Glycerinmolekül, zwei FS, einem Phosphatmolekül sowie einer variablen Kopfgruppe zusammen (siehe hierzu auch Abbildung 6). Die Kopfgruppe kann dabei von Serin, Ethanolamin, Cholin, Glycerin oder Inositol gebildet werden. Fehlt die Kopfgruppe liegt ein Phosphatidylsäure-Molekül (PA) vor, welches in Membranen nur in geringen Mengen vorkommt, jedoch ein wichtiges Schlüsselmolekül bei der Biosynthese andere Glycerophospholipide ist. Tauscht man Glycerin gegen ein Sphingosin erhält man ein

Sphingomyelin (SM) [504]. Die Kohlenstoffatome des Glycerins in Glycerophospholipiden werden über ein stereospezifisches Nummerierungssystem identifiziert (sn-1, sn-2, sn-3) [1, 219]. An der sn-1 Position ist typischerweise eine gesättigte FS, an der sn-2 Position eine PUFA verestert [515]. In der grauen Substanz ist DHA häufiger in Glycerophospholipiden zu finden als AA, in der weißen Substanz ist dieses Verhältnis umgekehrt [508].

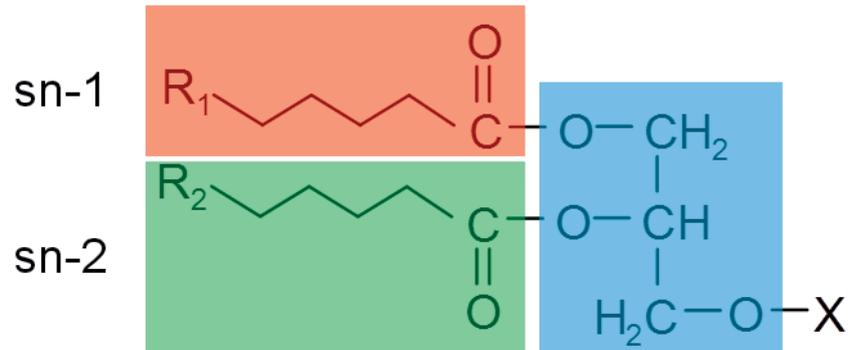


Abbildung 6

Schematischer Aufbau eines Membranphospholipids: Das Rückgrat bildet Glycerin (blau), das an der C-3- Hydroxylgruppe mit Phosphat verestert ist. Am Phosphat kann wiederum eine alkoholische Kopfgruppe gebunden sein (Phosphat + Kopfgruppe hier als X dargestellt). R₁ und R₂ stehen jeweils für eine beliebige an der C-1- und C-2-Hydroxylgruppe veresterte Fettsäure (blau und rot hinterlegt), R₂ ist im Gehirn häufig eine lange, mehrfach ungesättigte Fettsäure. Die C1 und C2 Position wird auch als sn-1 und sn-2 Position bezeichnet. Vergleiche auch mit der Darstellung des Glycerophospholipids in Abbildung 2. Abbildung nach Stryer 2013 [504].

Wird durch die Phospholipase A₁ / A₂ die FS an der sn-1 / sn-2 Position abgespalten, wird der verbleibende „Rest“ des Phospholipids als Lysophospholipid bezeichnet [65, 158]. Lysophospholipide entstehen während des Umbaus und Abbaus von Membranphospholipiden [425].

Lysophospholipide werden traditionell als *second-messenger* in intrazellulären Signalkaskaden gesehen und rückten erst kürzlich in den Fokus wissenschaftlichen Interesses. Heute ist ihre Beteiligung an physiologischen sowie pathologischen Prozessen bekannt. Sie sind unter anderem an Entzündungen wie Arthritis [172], aber auch an der Angiogenese [378], Tumorgenese [331] und regulatorischen Prozessen im ZNS [103] beteiligt und entfalten ihre Wirkungen häufig über Bindung an GPRs [525].

Lysophosphatidyl (LPA) wird durch aktivierte Mikrogliazellen über das Enzym PLA₂ gebildet und scheint an der Entstehung von neuropathischem Schmerz beteiligt zu sein [311]. LPA ist ein bioaktives und pro-inflammatorisches Lysophospholipid, kann zusätzlich zum Gehirngewebe auch im Blut und in Zerebrospinalflüssigkeit nachgewiesen werden und spielt bei Neurotraumata eine Rolle [171]. In einem Modell für traumatische Gehirnverletzungen konnte durch die Gabe von LPA-Antikörpern das Läsionsvolumen, die Gewebeschäden generell sowie auch die IL-6-Plasmakonzentration verringert werden [111]. Außerdem scheint die Lysophosphocholin-Bildung (LPC 16:0, 18:0 und 18:1) durch aktivierte Neurone an der Entstehung von Astroglie, Neuroinflammation und anschließender Neurodegeneration

beteiligt zu sein. Dies konnte in einem *in vitro* Experiment zur Untersuchung der Rolle des überexprimierten p25 Proteins in Neuronen als Beitrag zur Pathogenese der Alzheimerschen Krankheit gezeigt werden [507].

Lysophospholipide können darüber hinaus als Indikatoren für die Freisetzung von FS herangezogen werden. Beispielsweise konnte in einer Studie im Bereich einer Rückenmarksverletzung gezeigt werden, dass ein Anstieg von AA-tragendem Phosphatidylcholin mit einem gleichzeitigen Anstieg korrespondierenden Lysophosphocholins einherging. Dies wurde als hinweisend auf eine erhöhte AA-Freisetzung und einer damit einhergehenden Prostaglandinsynthese gedeutet [200].

3. Versuchsmodelle

3.1 LPS-induzierte Entzündungsreaktion

In dieser Arbeit wurde zur Induktion einer systemischen Entzündung und Fieber LPS appliziert; ein sehr gut untersuchtes und häufig verwendetes Entzündungsmodell. Als Bestandteil der Zellwand gram-negativer Bakterien besteht LPS aus zwei Einheiten. Die erste Einheit ist der Polysaccharidteil, der sich seinerseits aus zwei Regionen zusammensetzt, nämlich dem O-Antigen und der Kernregion. Letztere bildet das Verbindungsstück zur zweiten Einheit, dem hoch konservierten Lipid-A-Anteil. Dieser bildet die primär immunstimulierende Komponente, wirkt also als PAMP und dient der Verankerung von LPS in der äußeren Bakterienmembran [153].

Im Rahmen dieser Arbeit wurde LPS aus *Escherichia coli* des Serotyps O111:B4 verwendet, welches kommerziell und hochrein erhältlich ist. Nach systemischer Applikation bindet LPS an sein im Serum vorhandenes Bindungsprotein [466] und bildet einen Komplex, der an lösliche oder membranständige CD14-Rezeptoren bindet [560]. Dies führt zur Aktivierung des TLR4 [100]. Die TLR4-Aktivierung mündet letztendlich in der Expression spezifischer Gene (siehe hierzu auch I.1.2.1) und ist von einer stereotypen, reproduzierbaren, mehrphasigen und dosisabhängigen sowie generalisierten Inflammation und Fieberantwort begleitet [260].

Mäuse wurden als Versuchstiere zur Untersuchung von Fieber lange Zeit als ungeeignet angesehen, da sie auf pyrogene Stimuli häufig mit einem Abfall der Körpertemperatur reagieren. Heute weiß man, dass die Fieberantwort stark vom Mausstamm, dem verabreichten Pyrogen sowie von der Umgebungstemperatur abhängt [261]. C57BL/6 Mäuse beispielsweise entwickeln im Gegensatz zu Ratten bei einer mit Stress verbundenen Applikation (beispielsweise einer intraperitonealen Injektion) von LPS bei niedriger Umgebungstemperatur keine frühe Hyperthermie / Fieberphase, wohingegen sich die zweite Fieberphase auch als Hypothermie darstellen kann [436].

Versuche im Rahmen dieser Arbeit wurden bei für Mäuse thermoneutralen 30 °C durchgeführt. Die verabreichte geringe LPS-Dosis (50 µg/kg) induziert dabei ein über etwa

sieben Stunden lang anhaltendes Fieber [173], wohingegen die hohe Dosierung (2,5 mg/kg) in Mäusen in der Regel ein beinahe zweitägiges Fieber induziert [260].

3.2 Fat-1 Maus als Tiermodell

Für die Untersuchung der Wirkung von ω -3 FS und deren Metabolite im Kontext des Gesamtorganismus sind prinzipiell zwei Ansätze denkbar. Zum einen eine diätetische Anreicherung der Zielsubstanzen, zum anderen die Verwendung gentechnisch veränderter Organismen, die in der Lage sind endogenen ω -3 FS zu synthetisieren. Beide Strategien führen zu Tieren mit abgewandelten FS-Profilen in deren Geweben [25].

Bei der Verwendung von transgenen Fat-1 Mäusen, die zur endogenen Synthese von ω -3 FS fähig sind [235] (siehe auch II.2.2.1.1), bestehen im Gegensatz zur Fütterung mit fischöhlhaltigen Diäten klare Vorteile. Diäten bestehen aus vielen Komponenten und bedingen damit eine große Variabilität zwischen den Versuchsgruppen. So können FS aus verschiedenen Quellen (ω -3 aus Fischölen, ω -6 aus pflanzlichen Ölen) unterschiedliche bioaktive Substanzen enthalten und Fischöldiäten sich im Gehalt gesättigter FS, einfach ungesättigter FS, Antioxidantien sowie anderer Kontaminanten, wie beispielsweise angereicherter Schwermetalle, unterscheiden. Außerdem kommt es auf den Reinheitsgrad und die Frische und damit den Oxidationsgrad der Öle an. PUFA sind tatsächlich sehr oxidationsanfällig und besitzen eine geringe Haltbarkeit [234]. Auch die Akzeptanz von Futtermitteln kann variieren.

Die in dieser Arbeit verwendeten Fat-1 Tiere besitzen ähnliche Mengen an DHA im Gehirn wie nach Fütterung mit Fischölen [376], weisen jedoch dabei keine veränderte Gesamtfettgewebemenge auf [234]. Nach ω -6 reicher Fütterung zeigen Fat-1 Mäuse im Gehirn ein Verhältnis von ω -6 zu ω -3 FS von 0,8, wohingegen für Wildtyp Mäuse bei gleicher Fütterung ein Verhältnis von 3,9 nachgewiesen wurde [235]. Bei ausschließlicher Betrachtung der Zusammensetzung der Phospholipidfraktion des Cortex konnten diese Erkenntnisse bestätigt werden. DHA war in Fat-1 Tieren im Vergleich zu ω -3 defizient ernährten Wildtyp Tieren um 220 % erhöht, während ω -6 PUFA Konzentrationen auf 77 % reduziert waren. Dabei sind Phosphatidylethanolamine und Phosphatidylserine am stärksten mit DHA angereichert. Eine supraphysiologische Anreicherung von ω -3 PUFA in Fat-1 Mäusen findet jedoch nicht statt. Damit stellen Fat-1 Mäuse ein gutes Modell für die Untersuchung von Lipidmediatoren dar [52].

In einem Modell für Lungenentzündung konnte in vorherigen Studien bereits eine Reduktion der LPS-induzierten Lethargie und septischen Hypothermie in Fat-1 Tieren dokumentiert werden [322]. Ferner wurden positive Effekte bei Rückenmarksschäden [299], Hirninfarkt [307, 483], Parkinson [56] und kürzlich auch der Schutz vor LPS-induzierten kognitiven Defiziten und Entzündungen im Gehirn [131] beschrieben.

4. Fragestellungen und Ziele der Arbeit

Infektionen und Entzündungen werden von einer inflammatorischen Reaktion im Gehirn und im Rahmen der *sickness response* von zentralnervös kontrollierten Symptomen wie Fieber begleitet [251]. Zugrundeliegende Mechanismen und Folgen für das Gehirn sind noch unzureichend verstanden. Daher wurde in dieser Arbeit der Fokus auf Mechanismen der aktiven Termination akuter Entzündungsprozesse gelegt. Es wurden in zwei Teilstudien zwei verschiedene Strategien mit unterschiedlichen Angriffspunkten verfolgt. Zum einen der Einsatz eines Agonisten kleiner, schwach leitender durch Ca^{2+} -aktivierter K^+ -Kanäle, zum anderen die Modulation von Lipidmediatoren in Fat-1 Mäusen. Beide potentiell einsetzbare Strategien besitzen hohe therapeutische Relevanz.

4.1 CyPPA: Untersuchung der Effekte des K^+ -Kanal Agonisten CyPPA

Die Teilstudie „CyPPA“ beschäftigte sich mit der Wirkung des SK Agonisten CyPPA auf Inflammation im Gehirn und auf zentralnervös kontrollierte Krankheitssymptome während LPS-induzierter, systemischer Entzündungsreaktion. Dabei sollten folgende Fragenstellungen untersucht werden:

- Hat die Gabe von CyPPA einen Einfluss auf durch LPS ausgelöste Krankheitssymptome in C57BL/6J Mäusen?
 - Wirkt sich die *in vivo* Applikation von CyPPA modulierend auf die *sickness response* aus und wenn ja, in welcher Form; werden Fieberantwort, Lethargie, Anorexie und Adipsie beeinflusst?
- Beeinflusst CyPPA Signalwege des humoralen Kommunikationsweges?
 - Beeinflusst CyPPA periphere inflammatorische Mediatoren?
 - Wie beeinflusst CyPPA die Expression inflammatorischer Mediatoren, Transkriptionsfaktoren und Zielgene im Gehirn?
- Beeinflusst die CyPPA-Applikation LPS-induzierte mikrogliale Aktivierung *in vivo*, wie es in *in vitro* Untersuchungen bereits gezeigt werden konnte?
 - Finden sich auf mRNA-Ebene und Proteinebene Veränderungen mikroglialer Aktivitätsmarker?
- Gibt es Nebenwirkungen des K^+ -Kanal Agonisten CyPPA bei intraperitonealer Applikation in Mäusen?

4.2 Fat-1: Charakterisierung des Einflusses von ω -3 FS auf Entzündungsverläufe

Die Teilstudie „Fat-1“ beschäftigte sich mit der anti-inflammatorischen Rolle von ω -3 FS wie DHA und deren Metaboliten auf Inflammation und zentralnervös kontrollierte Krankheitssymptome im Verlauf systemischer LPS-induzierter Entzündungsreaktionen sowie mit der räumlichen Verteilung von ω -3 FS wie DHA und deren Metaboliten im Gehirn. Dabei sollten folgende Aspekte beleuchtet werden:

- Pilotuntersuchung zur vergleichenden Betrachtung physiologischer Parameter von Fat-1 und C57BL/6N Mäusen.
 - Unter basalen Bedingungen, unter normaler Diät sowie unter ω -3 defizienter Fütterung: Welchen Einfluss hat das „ ω -3 Transgen“ auf basale Parameter wie Körpertemperatur und Aktivitätsmuster.
 - Gibt es eine Dosisabhängigkeit der durch LPS-bedingten zentralnervös kontrollierten Krankheitssymptome in Abhängigkeit der Fütterung und des Genotyps der untersuchten Tiere?
 - Beeinflusst der Genotyp untersuchter Tiere die Reaktion auf den *novel environment stress* als Model für psychologischen Stress?
- Wie beeinflusst das „ ω -3 Transgen“ die Expression peripherer inflammatorischer Zytokine als Marker für den humoralen Kommunikationsweg zwischen Peripherie und Gehirn?
- Welche Rolle spielen FS wie DHA, EPA und AA während systemischer LPS-induzierter Entzündungsreaktionen im Gehirn?

Als Schwerpunkt dieser Arbeit beschäftigte ich mich vor allem mit folgenden Punkten:

- Gibt es spezifische, gehirnstrukturabhängige Verteilungsmuster der genannten FS und deren Metabolite (SPMs)? Welche möglichen Veränderungen gehen mit der Verabreichung von LPS einher? Wie sehen die Verteilungsmuster 24 Stunden *post injectionem* im Bereich des OVLTs und der präoptischen Region aus?
 - Lassen sich solche Verteilungsmuster mit hoher räumlicher Auflösung mittels bildgebender matrixassistierter Laserdesorption / Ionisations Massenspektrometrie (MALDI) nachweisen?
- Gibt es Lipidspezies, die als Marker / Indikator für Entzündungsprozesse im Gehirn herangezogen werden können?
 - Wie stellen sich räumliche Verteilungsmuster solcher Lipidspezies dar?
 - Welche Art von Lipiden erscheinen nach LPS Applikation spezifisch im OVLT / der präoptischen Region oder welche fehlen dort?
 - Wie sieht das räumliche Verteilungsmuster verschiedener Phospholipide, Lysophospholipide und Plasmalogenen in der Kontrollsituation im Vergleich zu LPS behandelten Tieren beider Genotypen aus?
- Welche Matrix ist für die geplanten Messungen geeignet? Sind Messungen im positiven oder im negativen Ionen-Modus erfolgversprechend?
 - Im Sinne des Tierschutzes und dem 3R-Prinzip von Russell und Burch wäre es wünschenswert die Nutzung der Organschnitte zu optimieren. Nach Verwendung welcher Matrizes ist dafür ein immunhistochemischer Nachweis inflammatorischer Marker auch nach erfolgter MALDI-Messung noch möglich? Lassen sich COX2, NF-IL6 sowie neutrophile Granulozyten nach Matrixeinsatz und massenspektrometrischer Bildgebung nachweisen?

II. Material und Methoden

1. Allgemeine Materialien

1.1 Technische Geräte

Bezeichnung	Typ	Hersteller
Aqua bidest. Anlage	Milli-Q Biocel	Millipore GmbH, Schwalbach
Autoklav	Systec 2540 EL	Systec GmbH Labor-Systemtechnik, Wettenberg
Eismaschine	Icematic F120	CastleMAC, S.p.A., Castelfranco Veneto, Italien
Heißluftsterilisator	ED 115 / E2	Binder GmbH, Tuttlingen
Kühlkammer	EP200ED	Viessmann, Allendorf
Lamina-Flow-Arbeitsbank	Herasafe	Kendo Laboratory Product GmbH, Hanau
Magnetrührer	PTFE-ummantelt	Roth GmbH, Karlsruhe
Microcentrifuge	Force 7	Denver Instrument Company, Bohemia, NY, USA
pH-Meter	inoLab Ph 7110	WTW GmbH, Weilheim
Schüttler	RotoMix Typ 50800	Thermo Fisher Scientific Inc., Walham, MA, USA
Spectrafuge Mini-Centrifuge	C1301B-230V	Labnet International Inc., Edison, NJ, USA
Tischrühr- und Heizgerät	RCT basic	IKA Labortechnik GmbH und Co. KG, Staufen
Vortexer	MS1 Minishaker	IKA-Werke GmbH und Co. KG, Staufen
Waage (Chemikalien)	AE163	Mettler Waagen GmbH, Gießen
Waage (Chemikalien)	P1210N	Mettler Waagen GmbH, Gießen
Waage (Chemikalien)	PM2500	Mettler Waagen GmbH, Gießen
Wärmeschrank	T5050 EK	Medizin- und Labortechnik H. Kretschmer, Gießen
Zentrifuge	Megafuge 1.0 R	Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich

1.2 Software

Bezeichnung	Hersteller
Adobe Photoshop 5.5	Adobe System Inc., San Jose, CA, USA
Corel Draw 9	Corel Corporation, Ottawa, Canada
EndNote X4	Adept Scientific GmbH, Frankfurt
GraphPad Prism 5	GraphPad Software, San Diego, CA, USA
Microsoft Office Excell 2007	Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA
Microsoft Office Word 2007	Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA
Micorsoft Office PowerPoint 2007	Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA
Statistica 10	Stat Soft Europe GmbH, Hamburg

1.3 Chemikalien

Bezeichnung	Katalog-Nr.	Hersteller
Ethanol (reinst)	34852-1L	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Ethanol (vergällt)	1611V	Berkel AHK Alkoholhandel GmbH und Co. KG, Ludwigshafen
Trockeneis		Cleanas GmbH und Co. KG, Willingen
Virkon	128054	Antec International, Sudbury, UK

1.4 Allgemeine Ge- und Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Typ	Hersteller
Alufolie	0954.1	Roth GmbH, Karlsruhe
Becherglas	Duran, versch. Größen	Schott AG, Mainz
Dualfilter T.I.P.S.	0,1-10 / 0,5-20 / 2- 100 / 50-1000 µl	Eppendorf AG, Hamburg
Einmalhandschuhe Latex	No. 1202	Unigloves Arzt- und Kliniksbedarf Handelsgesellschaft mbH, Troisdorf
Einmalhandschuhe Nitril	7005 PFS	Showa Best Gloves S.A.S., Paris, Frankreich
Einmalhandschuhe Supergrip	900-2536	Henry Schein Vet GmbH, Hamburg
Glasflasche mit Deckel	Duran, versch. Größen	Schott AG, Mainz
Kimtech Science Delicate Task Wipes	7216	Kimberley-Clark Europe Limited, Surrey, UK
Kimtech Science Precision Wipes	7552	Kimberley-Clark Europe Limited, Surrey, UK
Messkolben	1 / 2 / 5 l	Brand GmbH und Co. KG, Wertheim
Parafilm	PM-996	Bemis Flexible Packaging, Neenah, WI, USA
Pasteur-Pipette	2600111	MAGV GmbH, Rabenau
Pipettenspitze ohne Filter	10 / 100 / 1000 µl	Sarstedt AG und Co. KG, Nümbrecht
Reaktionsgefäß	15 / 50 ml	Sarstedt AG und Co. KG, Nümbrecht
Reaktionsgefäß	0,5 / 1,5 / 2 ml	MAGV GmbH, Rabenau
Reaktionsständer		Roth GmbH, Karlsruhe
Serologische Pipette	5 / 10 / 25 ml	Sarstedt AG und Co. KG, Nümbrecht

2. *In vivo* Versuchsmodelle

2.1 Materialien

2.1.1 Technische Geräte

Bezeichnung	Typ	Hersteller
Blockthermostat	BT100	Kleinfeld Labortechnik GmbH, Gehrden
Dataport	DP-24	Mini Mitter Co. Inc., Columbus, OH, USA
Dietscan Analyzer		Accuscan Instruments Inc., Columbus, OH, USA
Elektrophorese-Apparatur	PowerPac 200	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA
Elektrophorese-Kammer	G45/1	Biometra, Göttingen
Klimagerät (Stall)	RC-E3	Mitsubishi, Minato, Japan
Klimakammer	10 ² US /+5 to +40 DU	Weiss Umwelttechnik GmbH, Reiskirchen
Mikrowelle		Technostar
Molecular Imager	Chemiedoc TM XRS	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA
Perfusor		B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Schermaschine	Favorita II GT 104	Aesculap, Tuttlingen
Telemetrie-Empfängerplatte	RTA-500	Mini Mitter Co. Inc., Bend, OR, USA
Telemetrie-Sender (16 x 11 mm)	VM-FH TR-3000	Mini Mitter Co. Inc., Bend, OR, USA
Thermocycler	Mastercycler gradient	Eppendorf AG, Hamburg
Waage (Futter)	EK-200i	AD Instruments Ltd., Abingdon, UK

Bezeichnung	Typ	Hersteller
Waage (Tiere)	TB31000P-000D002	Sartorius GmbH, Göttingen
Waage (Wasser)	EW-300G	AD Instruments Ltd., Abingdon, UK
Wärmematte		MarMed GmbH, Cölbe
Wärmematte	Thermofol-Wärmefolie	Thermo Flächenheizungs GmbH, Rohrbach

2.1.2 Software

Bezeichnung	Hersteller
Accudiet 1.20	Accuscan Instruments Inc., Columbus, OH, USA
Quantity One 4.6.9	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA
VitalView 3.1	Mini Mitter Co. Inc., Bend, OR, USA

2.1.3 Chemikalien

Bezeichnung	Katalog-Nr.	Hersteller
Agarose	15510-019	Life technologies, Carlsbad, CA, USA
Borsäure	B-0252	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
N-cyclohexyl-N-[2-(3,5-dimethyl-pyrazol-1-yl)-6-methyl-4-pyrimidinamine (CyPPA)	C5493-5MG Lot: 087K4605V	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Ethidiumbromid	E1510-10ML	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	E-1644	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Kolliphore EL	C5135-500G Lot: BCBK5166V	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Korsolex AF	UN3267	Bode Chemie, Hamburg
Lipopolysaccharid aus E. coli O111:B4 (LPS)	L2630 Lot: 030 M 4114	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
peqGOLD Tissue DNA Mini Kit (S-line)	12-3396-01	PEQLAB Biotechnologies GmbH, Erlangen
phosphate bufferd saline (PBS)	L1825	Biochrome GmbH, Berlin
Ready-Load 100bp DNA-Ladder	10380-012	Life technologies, Carlsbad, CA, USA
RedTaq	R2648-20RXN	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Tissue Freezing Medium	020108926	Leica Microsystems Nussloch GmbH, Nussloch
Trizma-Base	T-1503	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

2.1.4 Ge- und Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Typ	Hersteller
0,2 ml 8er PCR-Strips Röhren farblos	781320	Brand GmbH und Co. KG, Wertheim
8er PCR-Strips Deckel farblos gewölbt	781340	Brand GmbH und Co. KG, Wertheim
Einmal-Spritze	1ml / 60 ml	BD Plastipak, Heidelberg
Einstreu	H1 505 29	Ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest
Filtertop		Ehret Labor- und Pharmatechnik GmbH, Emmendingen
Futter (n3 deficient) 12% Rohfett	Pellets 10mm S8909-E013	Ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest

Bezeichnung	Typ	Hersteller
Futter (n3 deficient) 7,1% Rohfett	Pellets 10mm S8909-E010	Ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest
Futter (n3 deficient) 7,1% Rohfett	Mehl S8909-E011	Ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest
Futterschale (Klimakammer)		Campuswerkstatt FB10, JLU Gießen
Gelgießform		Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA
Häuschen / Röhre		Ehret Labor- und Pharmatechnik GmbH, Emmendingen
HS Einmal-Hautklammergerät 35R 5,9x3,9mm	900-9734	Henry Schein Vet GmbH, Hamburg
Knopfzelle für Sender	319 SR527 SW	Renata SA, Itingen, Schweiz
Leukosilk	01022-00	BSN-medical GmbH, Hamburg
Messkäfig (Klimakammer)		Campuswerkstatt FB10, JLU Gießen
Nestlets		Ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest
Nicht-resorbierbares Nahtmaterial	7201519, Polyester	SMI AG, St. Vith, Belgien
Normalfutter	Extrudat / Mehl V1126	Ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest
Ohreclip	517 684 805	B.Y.T. Co., Bay City, MI, USA
OP-Besteck		Aesculap, Tuttlingen
Paraffinmischung	Elvax Coating	DuPont, Wilmington, DE, USA
Petrischale	83.1802	Sarstedt AG und Co. KG, Nümbrecht
Polycarbonat-Käfig	Typ III	Ehret Labor- und Pharmatechnik GmbH, Emmendingen
Resorbierbares Nahtmaterial	11201519, PGA	SMI AG, St. Vith, Belgien
Schale mit Gitter		Campuswerkstatt FB10, JLU Gießen
Skalpellklinge Figur 21	900-8946	Henry Schein Vet GmbH, Hamburg
Sterile Einmalkanüle	26 G x ½“	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Tunnel für Futterschale		Campuswerkstatt FB10, JLU Gießen
Tupfer	Schlinggazetupfer	Wilh. Weisweiler GmbH und Co. KG, Münster
Wasserflasche mit Tränkenippel		Ehret Labor- und Pharmatechnik GmbH, Emmendingen
Wasserflasche mit Tränkenippel für Klimakammer		Ehret Labor- und Pharmatechnik GmbH, Emmendingen
Zellstoff		MAGV GmbH, Rabenau
Zylinder zum Wiegen der Tiere		Campuswerkstatt FB10, JLU Gießen

2.1.5 Arzneimittel

Handelsname	Wirkstoff	Hersteller
Braunol	Povidon-Iod	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Heparin-Natrium-25000-ratiopharm	Heparin-Natrium	Ratiopharm GmbH, Ulm
Isotone NaCl-Lösung 0,9 %	Natriumchlorid	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Ketamin 10%	Ketamin	Medistar Arzneimittelvertrieb GmbH, Scheberg
Xylocain 2%	Lidocainhydrochlorid	Astra Zeneca GmbH, Wedel
Metacam oral 1,5 mg/ml	Meloxicam	Boehringer Ingelheim Vetmedica GmbH, Ingelheim

Handelsname	Wirkstoff	Hersteller
Narcoren	Pentobarbital-Natrium	Merial, Halbermoos
Thilo-Tears Gel	Carbomer	Alcon Pharma GmbH, Freiburg
Xylavet	Xylazin	Cp-pharma, Burgdorf

2.2 Versuchstiere

2.2.1 Mausstämme

Für die vorliegende Arbeit wurden insgesamt vier verschiedene Mausstämme verwendet: Fat-1 und C57BL/6N Mäuse für die erste Teilstudie („Fat-1“), C57BL/6J Mäuse für die zweite Teilstudie („CyPPA“) (zum Versuchsaufbau siehe auch II.2.3), CD1 Mäuse dienten als Sentinel-Tiere.

2.2.1.1 Fat-1 (B6.129P2-Tg(CAG-fat-1)Jxk)

Zur Durchführung der *in vivo* Versuche wurden männliche transgene Fat-1 Mäuse (Fat-1) verwendet. Diese Tiere tragen das Fat-1 Gen des Rundwurms *Caenorhabditis elegans*, welches für eine ω -3 Desaturase codiert und die Tiere damit befähigt endogen ω -6 FS zu ω -3 FS zu konvertieren [234]. Dies geschieht durch das Einfügen einer Doppelbindung in ω -6 FS an der ω -3 Position ihrer Kohlenwasserstoffkette. Um die ω -3 Desaturase heterolog in Mäusen exprimieren zu können, wurde das Fat-1 Gen so modifiziert und an einen Hühner-beta-Actin-Promoter gekoppelt, dass die Codon-Nutzung für Säugetiere optimal möglich war. Der adenovirale Vektor wurde in befruchtete Eier microinjiziert um die transgene Mauslinie zu erzeugen [235]. Die institutseigene Zucht wurde mittels fünf weiblicher und vier männlicher Fat-1 Elterntiere mit einem C57BL/6 Hintergrund [322] aus der Haltung der AG Mayer, Zentrum für Innere Medizin, Medizinische Klinik II, JLU Gießen aufgebaut.

Insgesamt drei männliche Tiere im Alter von fünf bis sechs Wochen, die nicht unter ω -3 defizienten Bedingungen gezogen wurden, wurden für den Versuch direkt über die AG Mayer bezogen.

2.2.1.2 C57BL/6N

Als Kontrollgruppe zu den Fat-1 dienten männliche C57BL/6N Mäuse (WT). Weibliche Tiere der institutseigenen Zucht dieses Stammes, die nicht zur Remontierung benötigt wurden, wurden als Sentinel-Tiere zur Überwachung des Hygienestatus im Stall verwendet. Die institutseigene Zucht wurde mit Hilfe von drei männlichen sowie drei weiblichen Tieren etabliert, diese wurden im Alter von sechs bis acht Wochen von Charles River, Sulzfeld bezogen (<http://www.criver.com>).

2.2.1.3 C57BL/6J

Alle C57BL/6J Tiere wurden in einem Alter von fünf bis sieben Wochen von Charles River, Sulzfeld bezogen. Im Versuch wurden ausschließlich männliche Tiere verwendet.

2.2.1.4 CD1

Neben dem weiblichen Zuchtüberschuss der C57BL/6N fanden auch CD1 Mäuse als Sentinel-Tiere Verwendung. Um den Aufbau der institutseigenen Zucht zu ermöglichen wurden drei weibliche sowie zwei männliche Tiere im Alter von sechs bis acht Wochen von Charles River, Sulzfeld erworben.

2.2.2 Haltung

Die Tiere wurden in der Mäusehaltung des Institutes für Veterinär-Physiologie und -Biochemie der JLU Gießen bei einer konstanten Raumtemperatur (RT), einem 12 Stunden Tag / Nacht Rhythmus (Hellphase 07:00 – 19:00 Uhr) und einer relativen Luftfeuchte von 50 ± 5 % aufgezogen und gehalten. Futter und Wasser stand *ad libitum* zur Verfügung. Die Haltung fand in transparenten Polycarbonat-Käfigen Typ III mit Filtertopabdeckung (wenn immer möglich) in Kleingruppen statt. Die Käfige verfügten über Einstreu, Beißhölzer, Nestlets als Nestbau- und Beschäftigungsmaterial sowie rot-transparente Röhren oder Häuschen. Lediglich die C57BL/6J Mäuse und sechs Fat-1 Tiere wurden nach der Anlieferung nicht in die Tierhaltung verbracht, sondern zur Eingewöhnung direkt in die Klimakammer als späteren Versuchsort eingestallt. Es herrschten mit Ausnahme einer Umgebungstemperatur von hier gemäß Tierversuchsantrag thermoneutralen 30 °C identische Bedingungen.

2.2.3 Zucht

Sowohl C57BL/6N, CD1 als auch Fat-1 Mäuse wurden am Institut selbst gezüchtet. Hierzu wurden jeweils, nach angemessener Eingewöhnungszeit zugekaufter Tiere, zwei zuchtreife Mäuse gegensätzlichen Geschlechts und gleichen Genotyps verpaart. Weibliche Mäuse wurden auf das Vorhandensein eines vaginalen Plugs untersucht. Der vaginale Plug besteht aus koaguliertem Sekret der akzessorischen Geschlechtsdrüsen des Männchens und ist acht bis 24 Stunden nach erfolgter Verpaarung der Tiere nachweisbar (<https://www.jax.org/news-and-insights/2006/april/how-to-time-mouse-pregnancy>). Nach einer Trächtigkeitsdauer von 18–21 Tagen wurden die Welpen geboren, nach vier Wochen von der Mutter abgesetzt und nach Geschlechtern getrennt in neuen Käfigen gehalten.

2.2.4 Fütterung

Für die erste Teilstudie „Fat-1“ wurden sowohl ω -3 defizient gefütterte Tiere beider Genotypen (Fat-1 sowie C57BL/6N) benötigt als auch Tiere mit einer „normalen“ Versorgung mit FS. Letztere wurden wie unter II.2.2.3 beschrieben gezüchtet und hatten *ad libitum* Zugang zu Normalfutter, mit einem ausgewogenen Verhältnis von ω -6 zu ω -3 FS (Ssniff V1126). Zur Erzeugung ω -3 defizienter Tiere hatten weibliche Tiere ab dem Zeitpunkt des positiven Plugchecks ausschließlich Zugang zu ω -3 defizientem Futter (7 % Rohfett), welches ihnen *ad libitum* zur Verfügung stand. Diese Fütterung wurde bis 14 Tage nach Wurfdatum beibehalten, zu diesem Zeitpunkt begannen die Welpen selbstständig Futter aufzunehmen. Die bis dahin gefütterte Diät besteht aus recht harten Pellets. Um eine optimale

Versorgung mit Nährstoffen zu gewährleisten, wurde den Welpen ab diesem Zeitpunkt über insgesamt 14 Tage eine etwas fettreichere ω -3 defiziente Diät *ad libitum* angeboten. Dieses Futter mit einem Rohfettanteil von 12 % ist deutlich weicher und damit für die Welpen einfacher aufzunehmen. Im Alter von vier Wochen erhielt die für die Versuche vorgesehene männliche Nachzucht weiterhin die ω -3 defiziente Diät mit 7 % Rohfett. Die weibliche Nachzucht, (die nicht für die Versuche benötigt wurde) sowie Muttertiere bekamen Normalfutter. Weibliche Zuchttiere wurden frühestens nach 14 Tagen normaler Fütterung für einen erneuten Zuchteinsatz verwendet.

Inhaltsstoffe	Normalfutter (V1126)	ω -3 defizientes Futter 12 % Fett (S8909)	ω -3 defizientes Futter 7 % Fett (S8909)
Rohprotein	22,1 %	18,5 %	18,5 %
Rohfett	4,5 %	12,1 %	7,1 %
Rohfaser	3,9 %	5,0 %	5,0 %
Rohasche	6,7 %	3,6 %	3,5 %
Stärke	35,8 %	24,9 %	28,9 %
Zucker	5,2 %	16,0 %	14,0 %
Energie	15,9 ME [MJ/kg]	16,8 ME [MJ/kg]	16,2 ME [MJ/kg]

Tabelle 1

Vergleichende Nährstoffzusammensetzung der während der Zucht, Aufzucht und im Versuch verwendeten Futtermittel. Angaben gemäß Hersteller.

Fettsäure	ω -3 defizientes Futter 7 % Fett (S8909)	Normalfutter (V1126)
C 14:0	0,80 %	0,01 %
C 16:0	0,66 %	0,56 %
C 18:0	0,56 %	0,14 %
C 20:0	0,02 %	0,02 %
C 18:1	0,38 %	0,96 %
C 18:2	2,26 %	2,42 %
C 18:3	0,02 %	0,31 %

Tabelle 2

Vergleichendes Fettsäuremuster anhand exemplarisch ausgewählter Fettsäuren des verwendeten ω -3 defizienten Futters verglichen mit dem Normalfutter. Angaben in % des Gesamtfuttermittels. Angaben gemäß Hersteller.

2.2.5 Genotypisierung der Fat-1 Mäuse

2.2.5.1 Probengewinnung

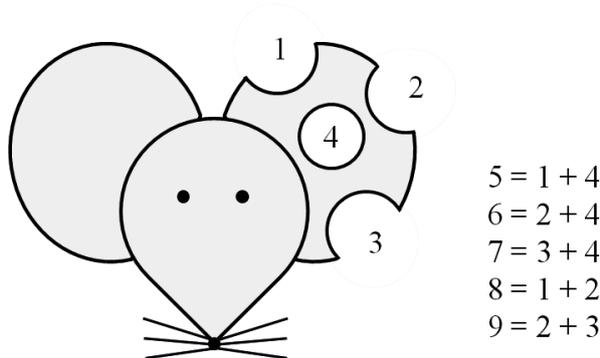


Abbildung 7
Schema zur ohrmarkenlosen Markierung der Mäuse.

Die Tiere wurden nach dem Absetzen mittels Markierung am linken Ohr gekennzeichnet (Abbildung 7), das gewonnene Gewebe (2 mm große Gewebeprobe) diente als Ausgangsmaterial für die Genotypisierung. Die gewonnene Probe wurde unmittelbar in ein steriles, eindeutig gekennzeichnetes 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Nach jeder Beprobung wurde das verwendete Besteck gereinigt und in 80%igem Ethanol desinfiziert und gewaschen um Kreuzkontaminationen zwischen den Proben zu vermeiden. War es nicht möglich die DNA-Extraktion noch am selben Tag durchzuführen, wurden die Proben bei -54 °C gelagert.

2.2.5.2 DNA-Isolation

Die DNA-Isolation aus den Ohrstanzproben erfolgte mittels eines DNA-Extraktions-Kits (PeqGOLD Tissue DNA Mini Kit) der Firma PEQLAB Biotechnologie, Erlangen. Das Prinzip der DNA-Gewinnung mittels solcher Kits beruht auf selektiven und reversiblen Bindungseigenschaften von Silikat-Membranen. Durch die Verwendung von Proteinase K, Ribonuklease (RNase) und DNA *Lysis Buffer* werden Gewebeverbände aufgelöst, RNA zerstört und DNA aus dem Zellkern befreit. Mit Hilfe chaotroper Salze werden DNA umgebende Hydrathüllen reversibel entfernt. Dieser Vorgang ermöglicht das Binden der DNA an die Membran. Im Folgenden werden Kontaminationen durch Waschschriffe entfernt. Final wird die Bindung der DNA an die Membran unter Verwendung salzloser Puffer gelöst, die gereinigte DNA wird in ein Auffanggefäß ausgeschwemmt.

Arbeitsschritt	Funktion	Dauer
400 µl DNA <i>Lysis Buffer</i> T 20 µl Proteinase K 15 µl RNase A vortexen und bei 50 °C inkubieren	Zellverband auflösen, DNA freisetzen, RNA zerstören	2–3 h
Zentrifugieren: 10.000 x g Überstand in neues Reaktionsgefäß überführen	unlöslichen Debris pelletieren und entfernen	30 s
200 µl DNA Binding Buffer Mischen mittels Pipette	Herstellung einer homogenen Mischung und Ausfällen der DNA (Präzipitatbildung möglich)	

Arbeitsschritt	Funktion	Dauer
Lösung inkl. aller Präzipitate auf die <i>PerfectBind DNA Column</i> laden Zentrifugieren: 10.000 x g Durchfluss verwerfen	DNA bindet an Silikat-Membran	2 min
650 µl Wash Buffer auf Column geben Zentrifugieren: 10.000 x g Durchfluss verwerfen diesen Schritt ein weiteres Mal durchführen	Entfernen von Proteinen, zellulärem Debris und anderen Kontaminationen	2 x 1 min
Zentrifugieren: 10.000 x g	Trocknung der Silikat-Membran	2 min
Säule in ein steriles 1,5 ml Reaktionsgefäß geben 200 µl <i>Elution Buffer</i> zugeben, zuvor auf 70 °C vorgewärmt Inkubation bei 70 °C	Lösen der DNA von der Silikat-Membran	3 min
Zentrifugieren: 6.000 x g	Überführen der DNA in das Reaktionsgefäß	1 min
Säule in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß geben <i>Elution Buffer</i> inkl. bereits gelöster DNA erneut auf die Säule laden Inkubation bei 70 °C	Lösen der DNA von der Silikat-Membran	3 min
Zentrifugieren: 6.000 x g	Überführen der DNA in das Reaktionsgefäß	1 min

Tabelle 3

Arbeitsschritte zur Extraktion von DNA aus Ohrstanzproben mittels kommerziellem DNA-Extraktions-Kit der Firma PEQLAB.

2.2.5.3 Amplifikation der gewonnenen DNA mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Ursprünglich wurde die heute weit verbreitete *in vitro* Technik zu Beginn der 1970er Jahre von K. Kleppe entwickelt [250]. Nachdem die PCR in Vergessenheit geriet wurde sie nach über 10 Jahren erneut von K. Mullis etabliert [342]. Die PCR dient einer exponentiellen Amplifikation eines von zwei spezifischen Oligonukleotiden (Primer) flankierten DNA-Abschnitts und besteht grundsätzlich aus drei Phasen:

1. Denaturierung
2. Annealing
3. Elongation

Zunächst wird im Schritt der Denaturierung bei 94 °C die doppelsträngige (ds) DNA aufgetrennt, dabei entstehende Einzelstränge dienen als Matrize für die weitere Multiplikation des betreffenden DNA-Abschnitts. Folgend wird die Temperatur abgesenkt (hier 53,5 °C), dies ermöglicht die Hybridisierung der Primer an die komplementären Sequenzen der DNA-Stränge (Annealing). Während der Elongation bei 72 °C werden die Primer von der thermostabilen Taq-Polymerase komplementär zur Matrizen-DNA in 5' – 3' Richtung verlängert. Hierzu ist die Zugabe freier Desoxyribonukleosidtriphosphat-Moleküle (dNTPs) und Mg²⁺-Ionen notwendig. Am Ende eines Zyklus liegen dsDNA-Moleküle vor; der Ablauf beginnt von neuem. Theoretisch wäre somit eine unendliche exponentielle Vervielfältigung möglich. Dies ist jedoch nicht der Fall. Nach einigen Zyklen geht die Anzahl der Kopien pro

Zyklus in eine lineare Phase und später in eine Plateauphase über. Dies ist der Anreicherung von Pyrophosphat, der Reduktion der zur Verfügung stehenden Primer und dNTPs sowie der Bindung von Amplifikaten untereinander geschuldet.

In der vorliegenden Arbeit wurde die PCR nach den Vorgaben der Tabelle 4 und Tabelle 5, unter Verwendung der Primer aus Tabelle 6 durchgeführt. Das Protokoll wurde modifiziert nach Angaben der AG Mayer, Zentrum für Innere Medizin, Medizinische Klinik II, JLU Gießen.

Substanzen	Eingesetzte Menge je Probe
RedTaq DNA-Polymerase	7,5 µl
autoklaviertes ddH ₂ O	3,9 µl
Primer 1 Fat-1F	0,6 µl
Primer 2 Fat-1R	0,6 µl
Einsatz in PCR je 8,7 µl Mastermix + 6,3 µl DNA-Probe	

Tabelle 4
Zusammensetzung des Mastermixes für den PCR-Einsatz

Schritt	Temperatur	Dauer
1	94 °C	2 min
2	94 °C	30 s
3	53,5 °C	1 min
4	72 °C	1 min
5	72 °C	5 min
37fache Wiederholung der Schritte 2–4 (insgesamt 38 Zyklen)		

Tabelle 5
Protokoll der für die Genotypisierung verwendeten PCR

Primer	Sequenz	Hersteller
Primer 1 Fat-1F	TGTTTCATGCCTTCTTCTTTTCC	Eurofins Genomics GmbH, Ebersberg
Primer 2 Fat-1R	GCGACCATACCTCAAACCTTGGA	Eurofins Genomics GmbH, Ebersberg

Tabelle 6
Primer wurden in einer Gebrauchskonzentration von 10 pmol/µl zur Genotypisierung der Mäuse verwendet

2.2.5.4 Gelelektrophoretische Auftrennung der amplifizierten DNA und Auswertung der Gele

Die PCR-Endprodukte wurden mittels gelelektrophoretischer Auftrennung qualitativ detektiert und optisch dargestellt [114]. Das dazu verwendete 2%ige Agarose-Gel wurde aus der Gießform in die Elektrophoresekammer überführt, mit TRIS-Borat-EDTA (TBE) -Gebrauchslösung bedeckt (siehe Tabelle 7), der Kamm entfernt und die Taschen mit jeweils 9 µl des PCR-Reaktionsgemisches beladen. Zu Kontrollzwecken wurde stets eine Tasche mit 3 µl einer 100 bp DNA-Leiter beladen und die letzte Tasche mit einem *Blank* befüllt. Das *Blank* ist eine Probe, die wie alle weiteren Proben durch die PCR lief, jedoch statt eines DNA-Zusatzes lediglich steriles Wasser enthielt. Dies dient dem Ausschluss einer DNA-Verunreinigung verwendeter Chemikalien. Die Auftrennung der DNA-Fragmente

mittels einer angelegten Spannung erfolgt vom negativen zum positiven Pol entsprechend ihrer Größe. Die hier durchgeführte Auftrennung geschah bei 100 V und 1 A über eine Laufzeit von 35–40 Minuten. Durch die Ethidiumbromidzugabe in das Gel war es nun im letzten Schritt möglich, die DNA-Banden durch UV-Licht einer Anregungswellenlänge von 254 nm im Molecular Imager sichtbar zu machen und fotografisch zu dokumentieren. Fat-1 Mäuse zeichneten sich durch eine etwa 120 bp schwere DNA-Bande aus, die bei Tieren die das entsprechende Gen nicht tragen, fehlte.

EDTA-Stammlösung 0,5 M	
EDTA	95,05 g
NaOH	einstellen des pH auf 8,0
ddH ₂ O	auffüllen auf 500 ml
durch sterilen Filter geben und autoklavieren	
TBE-Stammlösung	
Trizma-Base	54 g
Borsäure	27,5 g
EDTA-Stammlösung	20 ml
NaOH	einstellen des pH auf 8,26–8,3
ddH ₂ O	auffüllen auf 1 l
TBE-Gebrauchslösung	
TBE-Stammlösung	100 ml
ddH ₂ O	900 ml
2%iges Agarose-Gel	
Agarose	1 g
TBE-Gebrauchslösung	50 ml in der Mikrowelle aufkochen, unter Rühren abkühlen
Ethidiumbromid	2,5 µl in handwarmes Gemisch geben
blasenfrei in Gel-Gießform geben, Kamm einstecken und ca. 30 min aushärten lassen	

Tabelle 7
Anfertigung der TBE-Gebrauchslösung und Herstellung des Elektrophoresegels

2.2.6 Sentineltiere

Neben einer vierwöchig stattfindenden adspektorischen Untersuchung der Tiere in der Versuchstierhaltung wurde alle drei Monate eine Untersuchung eines mindestens 12 Wochen alten Tieres entsprechend der Richtlinien der FELASA-Working Group durchgeführt [316]. Dies sicherte einen einheitlichen Gesundheitsstatus der im Versuch verwendeten Tiere. Hierzu fanden je nach Verfügbarkeit nicht zur Remontierung benötigte weibliche C57BL/6N Mäuse oder wahlweise CD1 Mäuse beider Geschlechter Verwendung. Um eine gegebenenfalls auftretende Durchseuchung der Haltung nachweisen zu können und einen einheitlichen Gesundheitsstatus aller Tiere zu gewährleisten, wurde regelmäßig (mindestens einmal monatlich) Einstreu zwischen den Käfigen ausgetauscht. Die Euthanasie des zu untersuchenden Tiers wurde mit einer überdosierten, intraperitonealen (i.p.) Injektion von Pentobarbital durchgeführt. Tabelle 8 fasst die durchgeführten Untersuchungen zusammen.

Erreger	Methode	Probenmaterial	Untersuchungs-Frequenz
Untersucht durch mfd Diagnostics GmbH, Wendelsheim			
<i>Ectomelia Virus</i>	ELISA	Serum	jährlich
<i>Lymphocytic Choriomeningitis Virus</i>	ELISA	Serum	jährlich
<i>Mammalian Orthoreovirus Type 3</i>	ELISA	Serum	jährlich
<i>Mouse Norovirus</i>	ELISA	Serum	vierteljährlich
<i>Murine Adenovirus Type A and B</i>	ELISA	Serum	jährlich
<i>Murine Coronavirus (Mouse Hepatitis Virus)</i>	ELISA	Serum	vierteljährlich
<i>Murine Pneumonia Virus (Pneumonia Virus of Mice)</i>	ELISA	Serum	jährlich
<i>Mouse Parvovirus</i>	ELISA	Serum	vierteljährlich
<i>Minute Virus of Mice</i>	ELISA	Serum	vierteljährlich
<i>Rotavirus A (Mouse Rotavirus)</i>	ELISA	Serum	vierteljährlich
<i>Sendai Virus</i>	ELISA	Serum	jährlich
<i>Theilovirus (Theiler's Murine Encephalomyelitis Virus)</i>	ELISA	Serum	vierteljährlich
<i>Clostridium piliforme</i>	ELISA	Serum	jährlich
<i>Helicobacter spp.</i>	PCR	Kotprobe oder Darm	jährlich
<i>Mycoplasma pulmonis</i>	ELISA	Serum	jährlich
Untersucht durch das Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere der JLU Gießen			
<i>β-hemolytic Streptococcus spp.</i>	kulturell	Tupferprobe von Trachea, Caecum, Vagina / Präputium (TP)	vierteljährlich
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	kulturell	TP	vierteljährlich
<i>Bordetella hinzii</i>	kulturell	TP	vierteljährlich
<i>Citrobacter rodentium</i>	kulturell	TP	vierteljährlich
<i>Corynebacterium kutscheri</i>	kulturell	TP	vierteljährlich
<i>Klebsiella oxytoca</i>	kulturell	TP	vierteljährlich
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	kulturell	TP	vierteljährlich
<i>Pasteurella pneumotropica</i>	kulturell	TP	vierteljährlich
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	kulturell	TP	vierteljährlich
<i>Salmonella spp.</i>	kulturell	TP	vierteljährlich
<i>Staphylococcus aureus</i>	kulturell	TP	vierteljährlich
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	kulturell	TP	vierteljährlich
Untersucht durch das Institut für Parasitologie der JLU Gießen			
Endoparasiten	mikroskopisch nach Sedimentation bzw. Flotation	Enddarmkot und Caecum	vierteljährlich
Ektoparasiten	makro- und mikroskopisch	Fell inkl. Haut	vierteljährlich
Untersucht durch das Institut für Veterinär-Physiologie und –Biochemie der JLU Gießen			
Ektoparasiten	makroskopisch		vierteljährlich
Endoparasiten	mikroskopisch	Tesafilm-Abklatsch der Anogenital-region	vierteljährlich
Untersucht durch das Institut für Veterinär-Pathologie der JLU Gießen			
Allgemeine Auffälligkeiten, v.a. Zeichen für Infektionen mit <i>Clostridium piliforme</i> und <i>Streptobacillus moniliformis</i> .	makroskopische und histopathologische Untersuchung	Tierkörper (frisch oder in 4 % Paraformaldehyd (PFA) fixiert)	vierteljährlich

Tabelle 8

Übersicht über durchgeführte Untersuchungen, Probenmaterial, untersuchende Institute und Untersuchungsfrequenz zum Nachweis potentieller Erkrankungen bei Versuchstieren.

Sowohl serologische als auch parasitologische Untersuchungen waren stets negativ auch eine Infektion mit *Helicobacter spp.* wurde nicht nachgewiesen. Die pathologische Untersuchung fand regelmäßig euthanasie- oder altersbedingte Veränderungen, aber nie Hinweise auf infektiöse Geschehen. Ebenfalls wurden keine pathogenen Keime in der mikrobiologischen Untersuchung gefunden. Physiologische Haut-, Schleimhaut- und Darmkommensalen fanden sich stets.

2.3 Versuchsaufbau

In beiden Teilstudien („Fat-1“ und „CyPPA“) wurde einem weitgehend gleichen Versuchsaufbau gefolgt. Zunächst wurden Tiere in die Klimakammer verbracht, anschließend erfolgte der operative Eingriff zur intraabdominalen Senderimplantation (II.2.4.1) und nach einer Rekonvaleszenzphase wurden die Tiere einem *novel environment stress* (Käfigwechsel in die Messkäfige) ausgesetzt (II.2.4.2). Nach Eingewöhnung an die neue Umgebung und den veränderten Zugang zu Futter und Wasser wurden Injektionen zur Stimulation durchgeführt (II.2.4.3). Die *in vivo* Versuche endeten mit der transkardialen Perfusion und der Entnahme von Organen und Blut zur weiteren Analyse (II.2.4.5). Während des gesamten Versuchsablaufs wurden physiologische Daten aufgezeichnet (II.2.4.4).

Die Tierversuche wurden vor Studienbeginn beantragt und durch das Regierungspräsidium Hessen genehmigt (Projektnummer GI 18/2 Nr. 28/2013; JLU-Nummer: 675_GP)

2.3.1 Teilstudie „Fat-1“

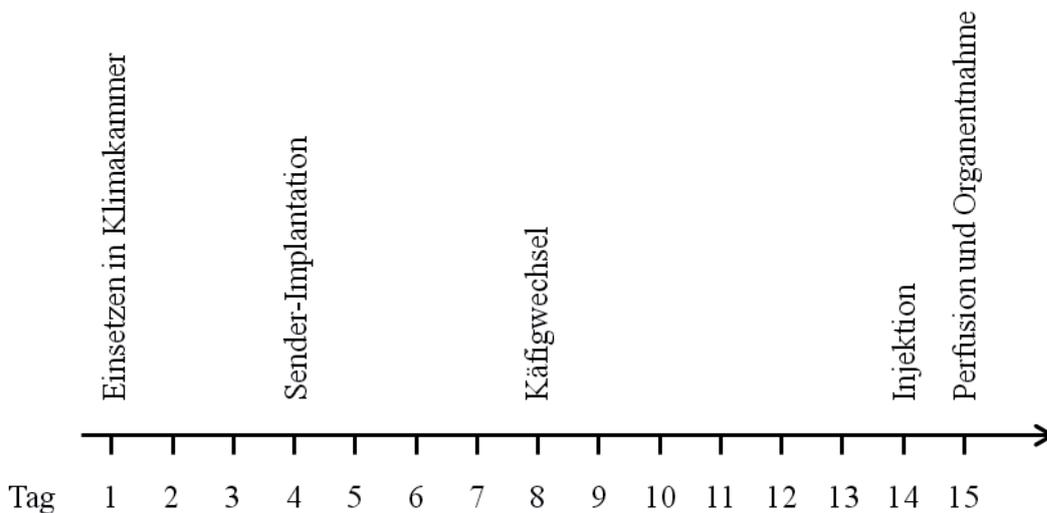


Abbildung 8

Schematische Darstellung des zeitlichen Versuchsablaufs der Teilstudie „Fat-1“. Nach der Implantation des Senders wurden die Versuchstiere einmal täglich an die menschliche Hand gewöhnt, sowie deren Gesundheitszustand kontrolliert. Etwa an Tag 10 wurde die Baseline aufgezeichnet.

Für den *in vivo* Anteil der „Fat-1“-Studie wurden Fat-1 Mäuse und WT Mäuse verwendet. Alle Tiere hatten zum Zeitpunkt der Operation im Alter von etwa sieben Wochen ein Gewicht von durchschnittlich 22,4 g. Es wurden sowohl ausgewogen ernährte Tiere (Normalfutter) als auch ω -3 defizient ernährte Tiere für den Versuch benötigt (II.2.2.4). Drei Tage vor der geplanten Operation wurden die Tiere in die Klimakammer verbracht. Hierbei wurden sie von der zuvor stattfindenden Gruppenhaltung in Einzelkäfige (Polycarbonat, Typ III) gesetzt. Somit hatten die Tiere ausreichend Zeit sich an die neue Umgebung mit einer Raumtemperatur von 30 °C und einer Luftfeuchtigkeit von 50 % zu gewöhnen. Die erhöhte Umgebungstemperatur im Vergleich zur Zucht und Haltung war zum einen der Einzelhaltung geschuldet, denn den Tieren war es nicht mehr möglich durch Gruppenbildung Thermoregulation zu betreiben. Daher die notwendige Korrektur der Umgebungstemperatur gemäß Tierversuchsantrag auf die Thermoneutraltemperatur von Mäusen [189]. Zum anderen beeinflusst die Umgebungstemperatur maßgeblich die durch LPS ausgelöste Fieberentstehung. So wurde gezeigt, dass eine unter thermoneutralen Bedingungen (dosisabhängig) zu erwartende Fieberreaktion sich in subneutraler Umgebungstemperatur als Hypothermie darstellt [436].

Im Anschluss an den operativen Eingriff zur Senderimplantation wurden die Tiere täglich zur selben Uhrzeit an die menschliche Hand gewöhnt, gewogen sowie einer Einschätzung ihres Gesundheitszustandes mit Hilfe eines *score sheets* unterzogen. Nach einer angemessenen Rekonvaleszenz wurden die Mäuse mit entweder einer hohen (2,5 mg/kg) oder einer geringen (50 µg/kg) LPS-Dosis injiziert Kontrollen erhielten *phosphate buffered saline* (PBS).

2.3.2 Teilstudie „CyPPA“

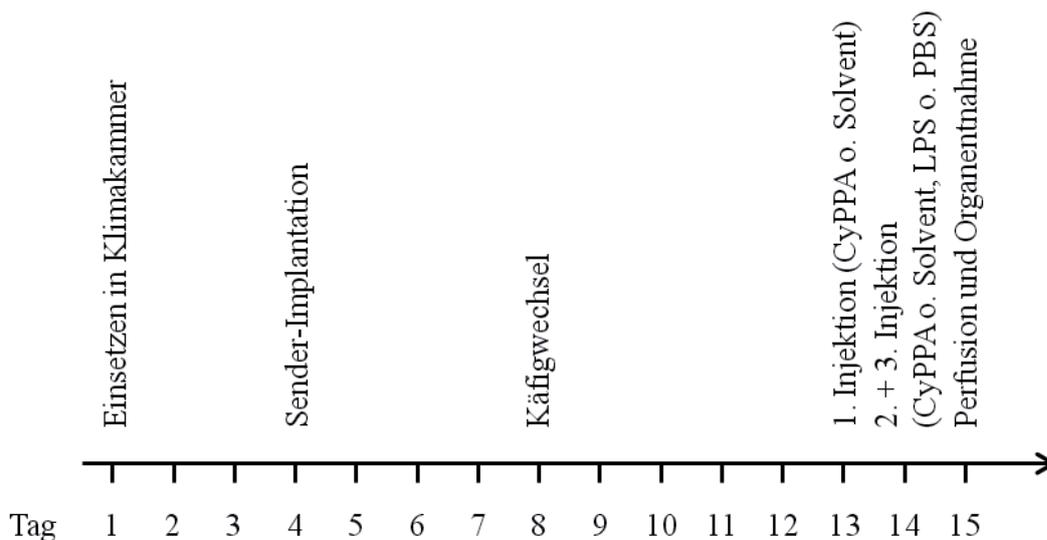


Abbildung 9

Schematische Darstellung des zeitlichen Versuchsablaufs der Teilstudie „CyPPA“: Analog zur Teilstudie „Fat-1“ wurden die Versuchstiere nach der Implantation *gehandelt*. Etwa an Tag 10 wurde die Baseline aufgezeichnet.

Für die *in vivo* Versuche der Teilstudie „CyPPA“ wurden männliche C57BL/6J Mäuse verwendet. Die Tiere wurden nach der Anlieferung zwischen drei und zehn Tage zur Eingewöhnung in der Klimakammer gehalten und anschließend im Alter von ca. sieben Wochen und mit einem durchschnittlichen Gewicht von 24 g operiert. Die Tiere erhielten über die gesamte Versuchsdauer Normalfutter (Mäusezuchtfutter) *ad libitum*. Das weitere Vorgehen war identisch zu dem des „Fat-1“-Projekts. Es wurden drei intraperitoneale Injektionen durchgeführt. Die erste enthielt entweder CyPPA in einer Konzentration von 15 mg/kg Körpergewicht oder dessen Lösungsmittel (Solvent). Die zweite und dritte Injektion erfolgten 24 Stunden später und enthielt erneut CyPPA oder dessen Lösungsmittel und 2,5 mg/kg LPS oder PBS.

2.3.3 Das score sheet

Während der Dauer des Tierversuches wurden die rechtlich verpflichtenden Aufzeichnungen über tierexperimentelle Tätigkeiten mit Wirbeltieren nach § 9a Tierschutzgesetz geführt. Diese Aufzeichnungen enthielten unter anderem eine Kontrolle des Gesundheitsstatuts der sich im Versuch befindenden Tiere anhand von *score sheets*. Die zu beurteilenden Kriterien waren ab dem Tag der Senderimplantation:

1. das Körpergewicht
2. der Allgemeinzustand
3. das Spontanverhalten
4. versuchsspezifische Kriterien, in diesem Fall die Wundheilung

Jeder dieser Punkte wurde ein- bis zweimal täglich anhand eines Punktesystems beurteilt. Die Addition aller Punkte der einzelnen Kriterien ergab einen Gesamtscore der zur Belastungsbeurteilung diente und gegebenenfalls der Einleitung weitere Maßnahmen (Tabelle 9).

Gesamtscore	Belastungsgrad	Maßnahmen
0-4	keine Belastung	keine spezifischen Maßnahmen erforderlich
5-10	geringgradige Belastung	1 x täglich zusätzliche Kontrolle der Futter- und Wasseraufnahme
11-15	mittelgradige Belastung	2 x täglich Kontrolle aller physiologischen Parameter; Gabe des Analgetikums Meloxicam
16-19	hochgradige Belastung	3-4 x täglich zusätzliche Kontrolle aller physiologischen Parameter; Gabe des Analgetikums Meloxicam; 5 %ige Glucoselösung oral anbieten, Informieren des Versuchsleiters (PD Dr. C. Rummel)
20 oder höher	Abbruchkriterium	Euthanasie mit Pentobarbital (200-500 mg/kg i.p.)

weitere Abbruchkriterien die eine Euthanasie des Tieres zur Folge hatten waren:

abdominale Temperatur unter 34 °C, trotz Behandlung mit Analgetikum und Glucose keine Besserung des Allgemeinzustandes nach zwei Tagen, Gewichtsverlust von mehr als 20 %, keine Wasser- und Futteraufnahme über drei Tage, Nahtdehiszenz

Tabelle 9

Bewertung und Maßnahmen bei der Belastungsbeurteilung operierter Mäuse.

Mit dem Tag der Injektion entfiel das versuchsspezifische Kriterium der Wundheilung, da diese bis dahin abgeschlossen war. Es wurden nur noch das Körpergewicht, der Allgemeinzustand sowie das Spontanverhalten beurteilt, da diese Kriterien bei einer LPS Stimulation bereits als versuchsspezifisch angesehen werden können.

2.4 Versuchsablauf

2.4.1 Implantation der Radiotransmitter

Präoperativ wurden die Tiere oral mit ein bis zwei Tropfen des nicht steroidal anti-inflammatorischen Analgetikums Meloxicam behandelt, anschließend mittels i.p. Injektion einer Mischspritze aus Ketamin 10 % : Xylacin 2 % : NaCl 0,9 % im Verhältnis 1 : 0,25 : 5 ihrem Gewicht entsprechend in Narkose gelegt (0,20–0,25 ml pro Tier). Die weitere OP-Vorbereitung bestand aus Rasur und Desinfektion des OP-Felds, Verabreichung einer Augensalbe und dem Vorlagern der Zunge zur besseren Narkoseüberwachung. Alle Schritte inkl. des operativen Eingriffs fanden auf einer mit Zellstoff gepolsterten Wärmematte statt, um ein Auskühlen der Tiere zu vermeiden. Bei ausreichender Narkosetiefe wurde die Haut in der Medianen auf einer Länge von ca. 1 cm beginnend am Nabel in *caudaler* Richtung mit einem Skalpell eröffnet und die Haut stumpf von der Bauchdecke getrennt, um dann unter größter Vorsicht und Schonung abdominalen Organe das Abdomen in der *linea alba* zunächst durch eine Inzision zu eröffnen und den Telemetriesender (*cranial* der linken Kniefalte) einzubringen. Die Bauchwunde wurde zweischichtig jeweils mit Einzelheften vernäht. Die äußere Naht wurde zusätzlich mit Hautklammern verstärkt. Die Aufwachphase wurde durch weitere Wärmezufuhr (Rotlichtlampe, Wärmematte) unterstützt. Postoperativ wurde für zwei weitere Tage Meloxicam oral verabreicht.

2.4.2 NES (*novel environment stress*)

Es ist bekannt, dass das Einbringen von Mäusen in eine neue Umgebung eine deutliche Stress-Reaktion hervorruft, welche mit einem intensiven Explorationsverhalten, einem Anstieg der abdominalen Temperatur [252, 576] sowie einer Erhöhung der IL-6 Plasmaspiegel [290] einhergeht. Diese Reaktion wurde durch das Umsetzen der Tiere in die für sie neuen Messkäfige (diese Käfige wurden für die spätere Erfassung von Futter- und Wasseraufnahme benötigt) induziert und über vier Stunden analysiert. Während dieser Zeit wurden die Körpertemperatur und die motorische Aktivität kontinuierlich aufgezeichnet.

2.4.3 Stimulation

2.4.3.1 „Fat-1“

Zur Induktion einer systemischen Entzündungsreaktion wurde LPS aus *E. coli* O111:B4 verwendet. Eine ausreichende Menge für den Gesamtversuch wurde einmalig unter sterilen

Bedingungen in PBS (500 µg/ml bzw. 10 µg/ml) gelöst. Aliquots von PBS und der LPS-Lösung wurden tiefgefroren, bei -20 °C gelagert und nach Bedarf aufgetaut.

Am Morgen des Versuchstags wurden die Tiere zwischen 08:45 und spätestens 10:40 Uhr in der Hellphase des Beleuchtungszyklus gewogen und entsprechend ihrem Gewicht mit einer geringen oder hohen LPS-Dosis i.p. injiziert. Kontrolltiere erhielten ein äquivalentes Volumen PBS.

geringe Dosis LPS	50 µg LPS pro kg Körpergewicht in 5 µl pro g Körpergewicht
hohe Dosis LPS	2,5 mg LPS pro kg Körpergewicht in 5 µl pro g Körpergewicht

2.4.3.2 „CyPPA“

LPS-induzierte mikrogliale Aktivierung kann durch den positiven SK-Modulator CyPPA *in vitro* inhibiert werden. Begleitet durch die Reduktion von TNF- α und IL-6 reduziert dies die Entzündungsantwort auf einen LPS-Stimulus [141]. Um diesen positiven Effekt auf ein Tiermodell zu übertragen, wurden Tiere zweimalig im Abstand von 24 Stunden mit CyPPA (15 mg/kg in 5 µl/g) oder einem äquivalenten Volumen von dessen Solvent i.p. behandelt. Zeitgleich mit der Zweiten, fand eine dritte Injektion statt. Diese enthielt wahlweise eine hohe Dosis LPS (2,5 mg/kg) oder ein gleiches Volumen PBS. CyPPA und dessen Solvent wurde zu diesem Zweck jeweils maximal eine Stunde vor der Applikation frisch angesetzt. Hierzu wurden 5 mg CyPPA in 175 µl Ethanol (99,9 %) gelöst und anschließend mit 5 % Kolliphor EL in physiologischer Kochsalzlösung auf ein Endvolumen von 1,67 ml aufgefüllt. Für das Solvent entfiel die Zugabe von CyPPA. Mit LPS und PBS wurde identisch wie in Teilstudie „Fat-1“ umgegangen. Alle Tiere wurden am Morgen zwischen 9:00 und 10:40 Uhr in der Hellphase des Beleuchtungsregimes ihrem Gewicht entsprechend behandelt. Perfusionen fanden zwei und 24 Stunden nach der letzten Injektion statt.

1. Injektionszeitpunkt	2. Injektionszeitpunkt	Zeitpunkt der Perfusion	Tierzahl
CyPPA	CyPPA + LPS	24 h	5
	CyPPA + PBS	2 und 24 h	6
Solvent	Solvent + LPS	24 h	5
	Solvent + PBS	2 und 24 h	6

Tabelle 10
Behandlungsregime und Perfusionszeitpunkte der experimentellen Gruppen der Teilstudie „CyPPA“

2.4.4 Erfassung physiologischer Parameter

2.4.4.1 Telemetrie

Die telemetrische Datenerfassung ermöglicht die stressfreie und kontinuierliche Aufzeichnung physiologischer Daten in einer für das Tier gewohnten Umgebung und fand in der Klimakammer bei einer Raumtemperatur von 30 °C, einer relativen Luftfeuchtigkeit von 50 % und einem 12 Stunden Tag / Nacht Rhythmus (Hellphase 07:00 – 19:00 Uhr) statt. Die einzeln gehaltenen Tiere befanden sich für die Dauer des Versuchs in Plexiglassmesskäfigen (30x22,5x24 cm), die auf einer Empfängerplatte positioniert waren. Zugang zu pulverisiertem

Futter entsprechend der Fütterungsgruppe bestand dauerhaft über einen Tunnel, der zu einer Futterschale führte, welche auf einer Waage platziert war. Ebenso auf einer Waage stand eine Wasserflasche, die über einen Schlauch mit einem Trinkenippel verbunden war. Beide Waagen wurden über den Dietscan Analyzer mit dem PC verbunden. Dieser Versuchsaufbau erlaubte in Echtzeit die Aufzeichnung der Futter- und Wasseraufnahme in fünf minütigen Intervallen mit der AccuDiet Software (Abbildung 10)

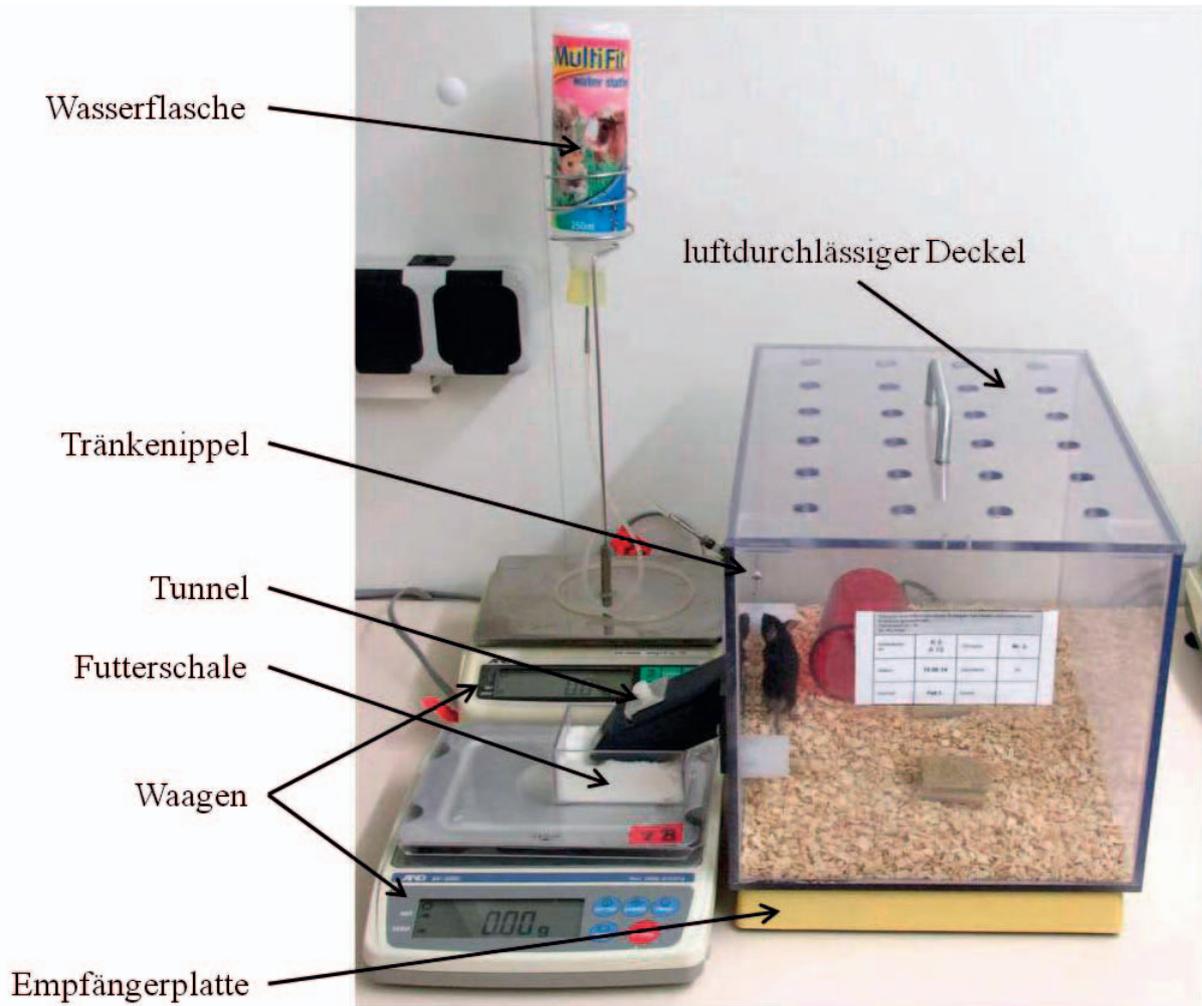


Abbildung 10

Aufbau des telemetrischen Systems zur Aufzeichnung der abdominalen Körpertemperatur, der motorischen Aktivität sowie der Futter- und Wasseraufnahmen.

Die Messelektronik des intraoperativ eingebrachten Senders wurde durch zwei ineinander gesteckte Polyethylenhalbschalen geschützt, welche zusätzlich mit einem Paraffin-Gemisch versiegelt wurden. Dieses Vorgehen führte zu einem effektiven Schutz vor eindringender Feuchtigkeit und verhindert intraperitoneale Fremdkörperreaktionen. Die Energieversorgung wurde durch eine jeweils vor der Implantation gewechselte Knopfzelle gesichert. Der Sender beinhaltet einen wärmeabhängigen Widerstand mit negativem Temperaturkoeffizienten und emittiert ein Radiosignal dessen Frequenz proportional zur Temperatur ist. Eine steigende Temperatur führt also zu einer erhöhten Impulsrate, welche von der Empfängerplatte erfasst

und über einen Dataport an das Computersystem weitergeleitet wird. Eine Eichung der Sender auf $37 \pm 0,1$ °C und $41 \pm 0,1$ °C ermöglicht eine genaue Erfassung der abdominalen Temperatur, die mit Hilfe der Software VitalView in fünf minütigen Intervallen aufgezeichnet wurde. Die motorische Aktivität der Mäuse wurde ebenfalls unter Verwendung der Sender, die zusätzlich ein Trägheitselement beinhalten, erfasst. Die Stärke des emittierten Signals variiert in Abhängigkeit von der Entfernung und Ausrichtung des Senders zur Empfängerplatte. Die Änderung der Signalstärke korreliert also direkt mit der lokomotorischen Aktivität der Versuchstiere. Die Aufzeichnung erfolgte jeweils innerhalb festgelegter fünf minütiger Intervalle in *activity counts* ebenfalls mit Hilfe der Software VitalView [206].

2.4.4.2 Entwicklung des Körpergewichts

Die Entwicklung des Körpergewichts wurde im Rahmen des täglichen Handlings morgens zwischen 8:30 und 9:00 erfasst. Die Tiere wurden so an die menschliche Hand gewöhnt, außerdem konnte dabei gleichzeitig in der postoperativen Phase die Genesung der Tiere überwacht werden (siehe hierzu auch *score sheet* II.2.3.3). Das Gewicht diente weiterhin als einer der Indikatoren, um Reaktionen auf applizierte Substanzen zu charakterisieren.

2.4.5 Transkardiale Perfusion und Probengewinnung

Die Perfusion der Versuchstiere fand zu verschiedenen Zeitpunkten nach der letzten Injektion statt. Für die Teilstudie „CyPPA“ waren dies zwei und 24 Stunden, für die Teilstudie „Fat-1“ zwei, vier, acht und 24 Stunden. Tiere wurden mit 60–100 mg/kg Körpergewicht Pentobarbital i.p. in eine sehr tiefe Narkose gelegt und der Bauch- und Brustraum vom Nabel beginnend eröffnet um einen Zugang zum Herzen zu schaffen. Nach Entnahme einer Blutprobe mit einer heparinisierten Spritze aus dem rechten Ventrikel wurde mit der Perfusionskanüle in den linken Ventrikel eingestochen und mit eiskalter physiologischer Kochsalzlösung kontinuierlich, langsam tropfend perfundiert. Zum Abfluss des Blutes und überschüssiger Perfusionslösung wurde das rechte Herzohr eröffnet. Die Perfusion wurde so lange durchgeführt, bis nur noch klare Flüssigkeit aus dem Herzohr austrat. Als weiterer Indikator für eine erfolgreiche Perfusion diente die Blässe aller Organe, insbesondere der Leber. Das für diesen Vorgang benötigte Gesamtvolumen an Kochsalzlösung lag in der Regel zwischen vier und sechs ml pro Tier. Nach erfolgter Entblutung der Tiere wurden das Gehirn, die Hypophyse, der gesamte linke Leberlappen, die Milz, zwei Stücke subkutanes Fettgewebe aus korrespondierenden Regionen der seitlichen Bauchwand sowie ein Stück Haut entnommen. Alle Organe wurden auf pulverisiertem Trockeneis schockgefroren und danach luft- und lichtdicht verpackt. Das Gehirn wurde zuvor in Großhirn und Kleinhirn entlang der *fissura transversa cranii* zerteilt und der Hypothalamus sowie die Hypophyse zum Schutz mit *Tissue Freezing Medium* überschichtet. Auf dieses Protektivum wurde bei Organen der „Fat-1“-Studie verzichtet, da das *Tissue Freezing Medium* die später geplanten MALDI-Analysen negativ beeinflusst hätte. Alle Organproben wurden bei -54 °C bis zur weiteren Analyse

verwahrt. Die Blutproben wurden bei 7.000 Umdrehungen die Minute (rpm) 7-8 Minuten lang zentrifugiert, das gewonnene Plasma abpipettiert und bis zur Analyse bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ tiefgefroren.

3. MALDI-MSI

Die MALDI-Messungen wurden in Kooperation mit der AG Spengler des Instituts für Anorganische und Analytische Chemie der JLU Gießen unter Mitarbeit von Sabine Schulz und Dhaka Ram Bhandari durchgeführt.

3.1 Materialien

3.1.1 Technische Geräte

Bezeichnung	Hersteller
AP-SMALDI10-Ionenquelle	TransMIT GmbH, Gießen
Exactive TM -Fourier-Transform-Orbitalfallen-Massenspektrometer (Q Exactive)	Thermo Fisher Scientific GmbH, Bremen
Olympus BX-40 Mikroskop	Olympus Europa GmbH, Hamburg
SMALDIprep, Matrix-Preparationssystem	TransMIT GmbH, Gießen
Stickstoff-Laser, LTB MNL-106	LTB Lasertechnik, Berlin

3.1.2 Software

Bezeichnung	Hersteller
Exactive Tune Software	Thermo Fisher Scientific GmbH, Bremen
imzML converter	Open Source, MALDI-MSI Interest Group, Entwickelt von Mitarbeitern des Instituts für Anorganische und Analytische Chemie, JLU Gießen
MCP Software	Entwickelt von Mitarbeitern des Instituts für Anorganische und Analytische Chemie, JLU Gießen
Microsoft Image Composite Editor	Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA
MIRION Software Packet	Entwickelt von Mitarbeitern des Instituts für Anorganische und Analytische Chemie, JLU Gießen
MSi Reader Release 0_05 standalone 64 bit	Open Source, The MathWorks, Inc., USA

3.1.3 Chemikalien

Bezeichnung	Katalog-Nr.	Hersteller
2,5-Dihydroxybenzoesäure (DHB) ($\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_4$)	39319	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
3-Nitrobenzylalkohol (3NBA) ($\text{C}_7\text{H}_7\text{NO}_3$)	73148	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
4-Chloro- α -Cyanozimtsäure (CLCCA)		Synthetisiert durch Mitarbeiter des Instituts für Anorganische und Analytische Chemie, JLU Gießen
Aceton	1000141000	Merck, Darmstadt
Ethanol	34852	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
para-Nitroanilin (pNA) ($\text{C}_6\text{H}_6\text{N}_2\text{O}_2$)	185310	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

Bezeichnung	Katalog-Nr.	Hersteller
Trifluoressigsäure (TFA) (C ₂ HF ₃ O ₂)	302031	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Wasser (HPLC Reinheit)	14263	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

3.1.4 Ge- und Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Typ	Hersteller
Aluminium Probenteller		Hergestellt von Mitarbeitern des Instituts für Anorganische und Analytische Chemie, JLU Gießen
Haft-Aufkleber	G304	Plano GmbH, Wetzlar
Exsikkator	handelsüblich	
Glasschneider	handelsüblich	
Seitenschneider	handelsüblich	

3.2 Grundlagen der Methode

Die Matrixassistierte Laserdesorption / Ionisation (*matrix assisted laser desorption / ionisation*; MALDI) ist ein Verfahren zur Ablation¹ und Ionisation von Biomolekülen und wurde erstmalig von Karas und Hillenkamp vorgestellt [236]. Später wurde diese Methode zur sogenannten bildgebenden MALDI-Massenspektrometrie (*scanning microprobe matrix assisted laser desorption / ionisation mass spectrometry*; SMALDI-MS oder *matrix assisted laser desorption / ionisation mass spectrometry imaging*; MALDI-MSI) erweitert [495]. Diese Anwendung ermöglicht die semiquantitative Darstellung der räumlichen Verteilung von Zielsubstanzen aus Probenmaterial, ähnlich der Kombination von spezifischen Färbetechniken und anschließender mikroskopischer Auswertung, wie sie bei klassischen histologischen Techniken verwendet wird [423]. Gegenüber histologischer Techniken, bei denen nur eine begrenzte Zahl vorher bekannter Zielsubstanzen im Gewebe markiert werden können, besitzt MALDI-MSI jedoch den großen Vorteil, eine nahezu unbegrenzte Zahl von Zielverbindungen ohne Vorauswahl in nur einer Messung erfassen zu können [423]. Wie bei der herkömmlichen Massenspektrometrie (MS) werden Moleküle oder Atome als Ionen in Gasphase gebracht, in einem elektrischen Feld beschleunigt und dabei nach ihrem Masse-zu-Ladung-Verhältnis (m/z) aufgetrennt. Dies geschieht allerdings punktweise, und erhobene MS-Daten werden anschließend positionsbezogen gespeichert. Auf diese Weise wird die gesamte Probe (hier Gewebeschnitte) rasterförmig gescannt (siehe hierzu auch Abbildung 11). Die so erfassten massenspektrometrischen Daten können anschließend dazu genutzt werden, Graustufenbilder der Verteilung einzelner Substanzen zu erstellen. Dabei ist die Helligkeit eines Bildpunktes definiert durch seine relative Signalintensität [494].

¹ Ablation beschreibt in der Massenspektrometrie das Überführen von Molekülen / Partikeln aus einem Festkörper in die Gasphase. Nach [554] J Wichmann, 2011: *Matrix-gestützte Laser-Desorption und Ionisation (MALDI) mit ultrakurzen Laserpulsen*.

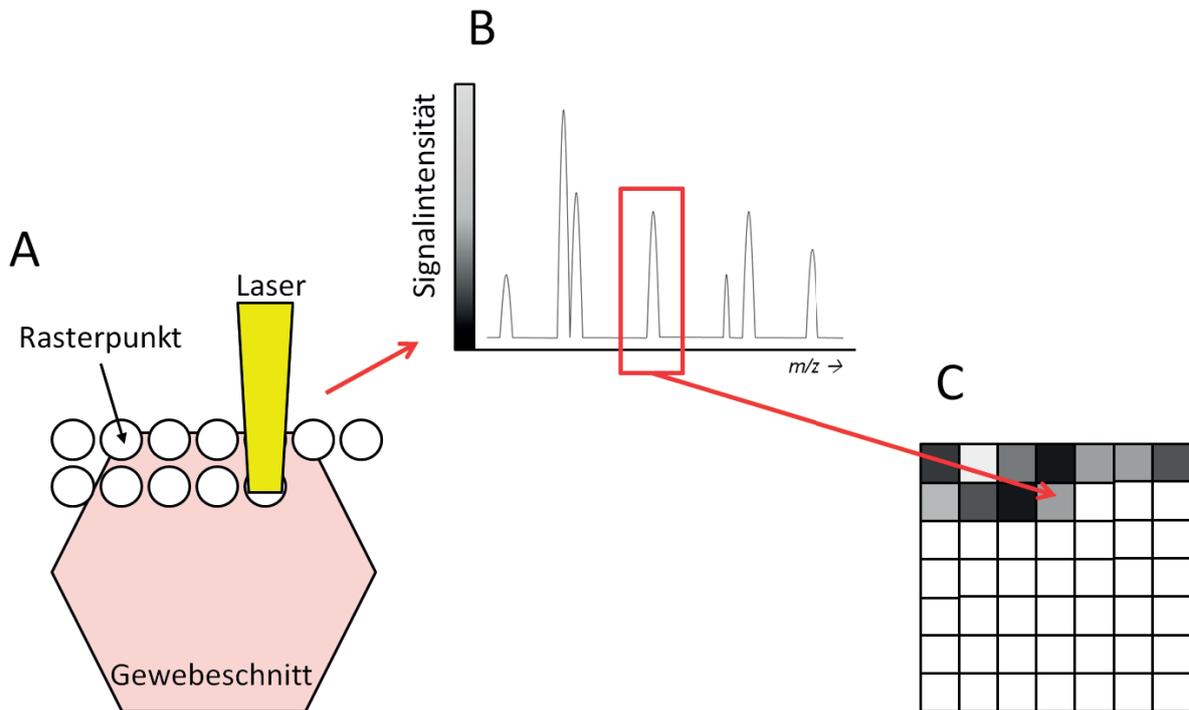


Abbildung 11

Schematische Darstellung bildgebender Massenspektrometrie: (A) Mit einem hochfokussierten Laser wird Material aus dem Gewebeverband gelöst (Ablation) und ionisiert. Ionen von jeweils einem Rasterpunkt werden massenspektrometrisch analysiert. Das entstehende Massenspektrum (B) wird positionsbezogen generiert und gespeichert. Nach der Erfassung eines Rasterpunktes wird die Probe zum nächsten Rasterpunkt bewegt, so wird nach und nach die gesamte Probe erfasst. Die gespeicherten Daten werden anschließend verwendet, um Bilder bestimmter Ionensignale zu erzeugen (C). Dabei werden die positionsspezifischen Signalintensitäten in Bildpunktwerte eines Graustufenbildes umgewandelt. Abbildung modifiziert nach Spengler 2012 [494].

Das MALDI-Verfahren ist ein sanftes Ionisationsverfahren, bei dem vorwiegend einfach geladene, unfragmentierte Ionen entstehen (siehe auch Abbildung 12). Dies ist möglich, da zugeführte Energie zunächst von der Matrix aufgenommen wird, und in einem zweiten Reaktionsschritt Protonen durch eine Säure-Base-Reaktion auf die Biomoleküle übertragen werden. Hierbei erfolgt sowohl eine Radikalbildung als auch eine Fragmentation der Matrixmoleküle, nicht jedoch der Analyte. Analog der Übertragung von Protonen können auch andere Kationen (z.B. Natrium, Kalium) übertragen werden. Es ist sowohl möglich positiv geladene Teilchen als auch negativ geladenen Teilchen (durch Deprotonierung) zu erzeugen. Entsprechend unterscheidet man einen positiven Ionen-Modus von einem negativen Ionen-Modus. Zur Durchführung dieser Methode ist es entscheidend, dass die Matrixkristalle mit dem Analyt eine Kokristallisation eingehen (siehe auch II.3.3). Um eine möglichst hohe räumliche Auflösung zu erzielen, sind die Größe dieser Matrixkristalle [55, 194, 494], die vollständig homogene Bedeckung des Analyts, sowie der Durchmesser des Laserbrennpunktes [193] maßgebend. Zudem ist eine niedrige Nachweisgrenze des Massenspektrometers unabdingbar, da die Menge des pro Rasterpunkt verfügbaren

Probenmaterials quadratisch mit dem Durchmesser des Laserbrennpunktes abnimmt [90, 254, 495].

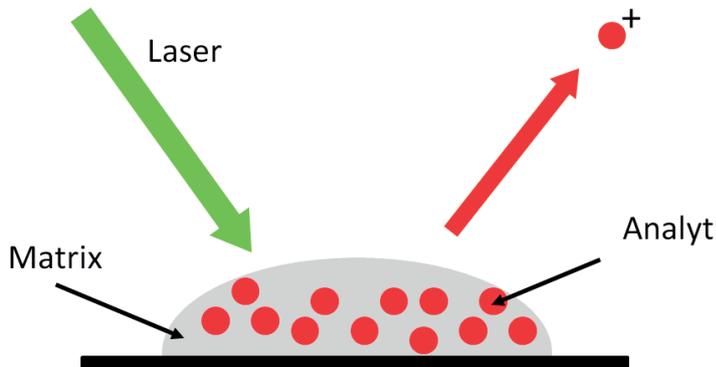


Abbildung 12

Stark vereinfachte Darstellung des Ionisationsmechanismus beim MALDI-Verfahren. Dabei dient die Matrix der Aufnahme und Übertragung der Laserenergie auf den Desorptions- und Ionisationsprozess [538]. Die für die Protonierung der Biomoleküle benötigten Protonen werden aus der Matrix zur Verfügung gestellt. Analog kann die Anlagerung anderer Kationen stattfinden (z.B. Kalium und Natrium). Neben der Bildung positiv geladener Teilchen (positiver Ionen-Modus) können auch deprotonierte Analytmoleküle erzeugt werden (negativer Ionen-Modus) [554].

Die für eine hohe räumliche Auflösung benötigten Voraussetzungen wurden in Kombination mit einer hohen Massengenauigkeit erstmals von der Arbeitsgruppe Spengler beschriebenen [254, 423] und durch den in dieser Arbeit verwendeten Aufbau (Abbildung 13) aus einer AP-SMALDI-Ionenquelle (Atmosphärendruck–Raster–Mikrosonden–MALDI-Massenspektrometrie-Systems) mit Kopplung an ein Fourier-Transform-Orbitalfallen-Massenspektrometer (Q Exactive) gut erfüllt.

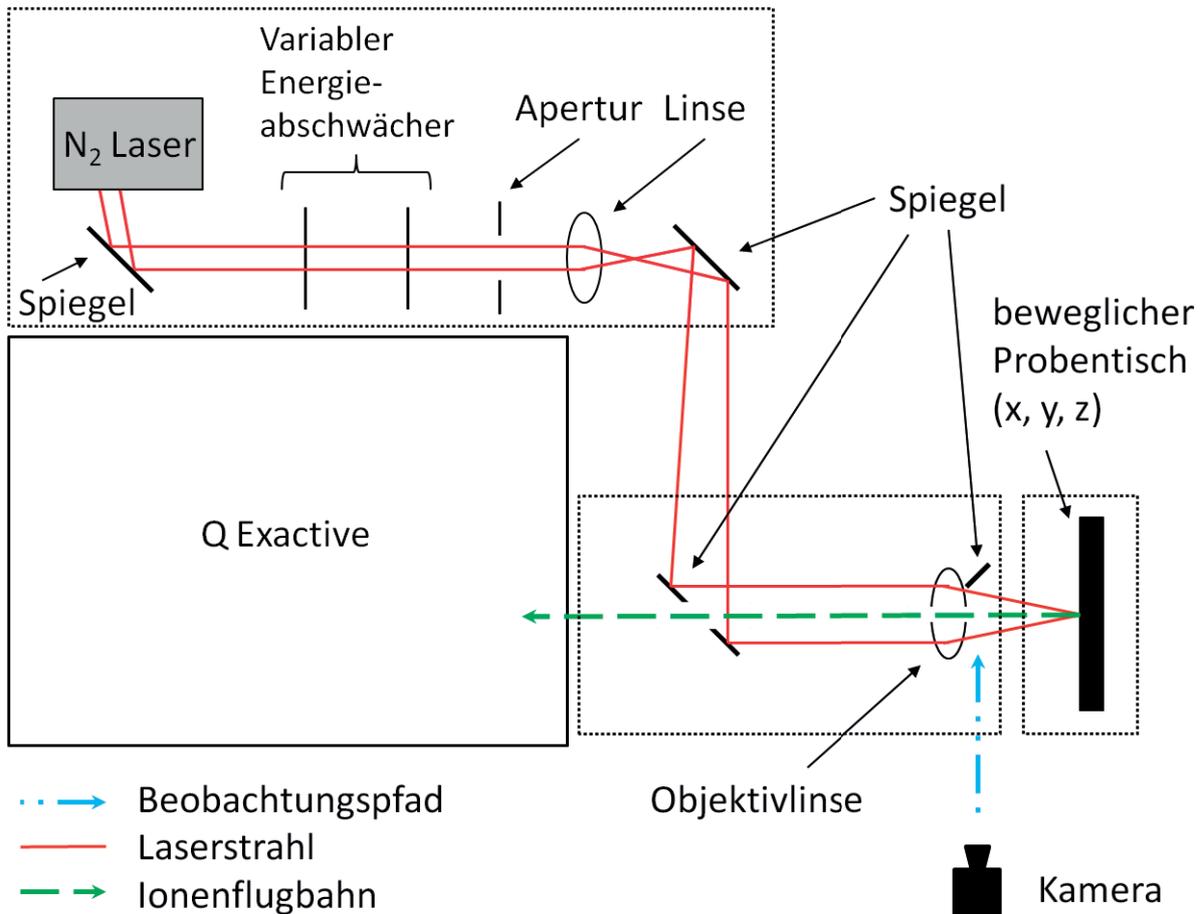


Abbildung 13

Aufbau der AP-SMALDI-Ionenquelle, gekoppelt an ein Fourier-Transform-Orbitalfallen-Massenspektrometer (Q Exactive). Abbildung modifiziert nach Koestler 2008 [254].

3.3 Probenvorbereitung / Aufbringen der Matrix

Für die MALDI-Analysen wurden Gefrierschnitte der Gehirne von Tieren der Teilstudie „Fat-1“ angefertigt. Dies erfolgte nach den Vorgaben aus Kapitel II.4.3. Die 20 µm dicken, coronalen Schnitte auf Höhe der Region des OVLTs wurden bei -54 °C gelagert. Unmittelbar vor der Messung wurde der Gewebeschnitt jeweils innerhalb von 30 min auf Raumtemperatur gebracht und getrocknet. Dies erfolgte in einem Exsikkator, um die Kondensation von Feuchtigkeit zu verhindern. Im Folgenden wurden mit einer am Mikroskop angeschlossenen Kamera einzelne Farbaufnahmen des fünffach vergrößerten Gewebeschnittes angefertigt. Alle Teilaufnahmen wurden mit dem Microsoft Image Composite Editor zu einer Gesamtaufnahme zusammengefügt. Als nächstes mussten die Schnitte mit der Matrixlösung besprüht werden. Hierzu wurde die Probenposition zunächst mit einem Permanentmarker auf dem Objektträgerglas markiert und überstehende Teile des Objektträgers mittel Glasschneider und Seitenschneider entfernt. Der so auf die Größe des Proben Tellers gebrachte Glaskörper wurde unter Verwendung doppelseitiger Klebpunkte (Haft-Aufkleber), mit nach oben gerichteter Probe, auf dem Proben teller befestigt. Eventuell vorhandene Glassplitter wurden unter größter Vorsicht mit Druckluft vom Schnitt geblasen. Nun konnte die Matrix aufgebracht werden. Dies geschah mit einem pneumatischen Sprühsystem, das ähnlich einem

Perfusor, kontinuierlich die Matrixlösung durch eine Spitze abgibt. Über ein Kapillarsystem wird diese Lösung in ein konisch zulaufendes Glasröhrchen geleitet, an dessen Öffnung ein Austreten der Lösung über eine Auslassspitze erfolgt. Die Auslassspitze hat dabei einen Durchmesser von etwa der Hälfte der Öffnung des Glasröhrchens. Über eine zweite Öffnung des Röhrchens besteht die Möglichkeit ein Treibgas (hier Stickstoff) zuzuleiten. Durch den hohen, an der Spitze auftretenden Gasfluss, ergibt sich ein sehr feines Zerstäuben der Matrixlösung. Die Größe der aufgesprühten Tröpfchen und die der daraus resultierenden Kristalle sind dabei entscheidend für die zu erzielende räumliche Auflösung. Ein Aufbringen der Matrix in einem flüssigen Zustand ist für die Kokristallisation von Matrix und Analyt vorteilhaft, kann jedoch auch zum Verlassen der nativen Position eines Moleküls im Analyt („aufschwimmen“) führen. Dieser Effekt kann durch Aufbringen möglichst kleiner Tröpfchen minimiert werden [55, 494]. Der probentragende Teller wurde unterhalb und senkrecht zur Sprüheinheit, auf ein Halterungssystem aufgesteckt und während des Sprühprozesses bei einer Spannung von ca. 450 V zum rotieren gebracht (zum schematischen Aufbau des Matrix-Preparationssystems siehe auch Abbildung 14, sowie [55]). Das Aufsprühen der Matrix wurde unter dem Abzug durchgeführt und der Aufbau durch einen Kunststoffcontainer abgedeckt. Dieser verhindert zum einen eine Umgebungskontamination mit Matrixlösung, zum anderen wird durch den Gasfluss ein Überdruck im Container erzeugt. Dieser sorgt für ein verlangsamtes Absinken der Matrixtröpfchen und eine dadurch bedingte homogene Verteilung auf der Probe.

Zufluss der Matrixlösung

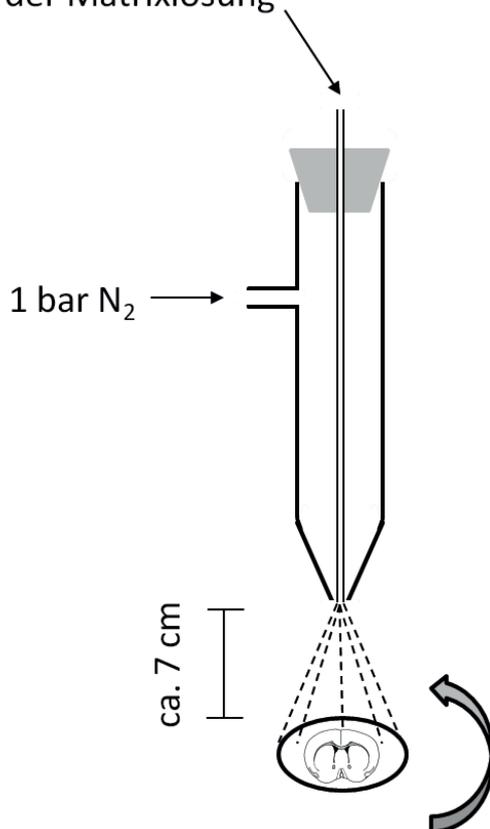


Abbildung 14

Schematischer Aufbau des Matrix-Präparationssystems: Eine Kapillare verläuft durch ein Glasröhrchen, dessen untere Öffnung als Auslass dient. Durch den zweiten, seitlichen Zulass des Glasröhrchens wird Stickstoff mit einem Druck von einem bar eingeleitet. Der am Auslass entstehende Gasfluss bedingt ein feines Zerstäuben der Matrixlösung, was zur homogenen Bedeckung der Probe führt. Der Abstand von Probe zu Auslass beträgt etwa 7 cm, der Probensteller rotiert kontinuierlich.

Die Zusammensetzung der verwendeten Matrixlösungen ist Tabelle 11 zu entnehmen. Zwei, typischerweise als Matrix verwendete Substanzen stellten sich in Vorversuchen als am geeignetsten für das Versuchsvorhaben heraus (Als Kriterium dienten die Intensität der gemessenen Signale, die direkt von der Ionisationseffizienz abhängt). Letztlich wurde para-Nitroanilin (pNA) für Messungen im negativen Ionen-Modus und 2,5-Dihydroxybenzoesäure (DHB) für Messungen im positiven Ionen-Modus verwendet. DHB ist für seine gute Effizienz in der Ablation und Ionisation von Lipiden im positiven Ionen-Modus bereits in der Literatur bekannt [89, 519]. Es wurden jeweils insgesamt 100 µl Matrixlösung mit einer Geschwindigkeit von 10 µl pro Minute auf die Probe aufgebracht. Nach dem Auftragen wurden die Homogenität des Matrixfilms und die Kristallgröße mikroskopisch beurteilt (Abbildung 15). Außerdem musste die vorgenommene Markierung noch einmal nachgezeichnet werden, da der Gewebeschnitt unter der Matrixabdeckung kaum noch und die Markierung nur noch schwer erkennbar war.

para-Nitroanilin (pNA) -Lösung	
pNA	20 mg
H ₂ O	1000 µl
Aceton	1000 µl
2,5-Dihydroxybenzoesäure (DHB) -Lösung	
DHB	60 mg
H ₂ O	1000 µl
Aceton	1000 µl
Trifluoressigsäure (TFA)	2 µl

Tabelle 11

Zusammensetzung der für die MALDI-Messungen verwendeten Matrixlösungen.

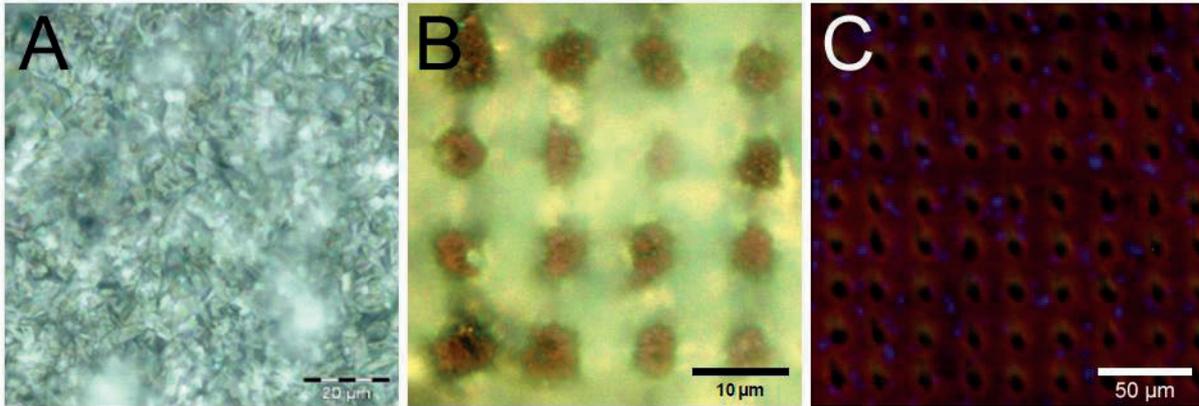


Abbildung 15

(A) Lichtbild einer Matrixpreparation (DHB). Die Kristallbildung ist deutlich zu sehen. Das unterliegende Gewebe (hier die Hypophyse einer Maus) ist nicht mehr erkennbar. (B) Lichtbild des Brand-/Ablationsmusters nach MALDI-Messung mit einer Schrittweite von 10 µm. Die Probe ist dieselbe wie in A. (C) Brand-/Ablationsmuster, wie es sich nach einer Immunfluoreszenz im Gehirngewebe einer Maus, ebenfalls nach einer MALDI-Messung mit einer Schrittweite von 10 µm, darstellt. Abbildung A stammt aus Römpp 2010 [423], B aus Günther 2011 [194].

Im Rahmen von Vorversuchen zur Identifizierung geeigneter Matrixsubstanzen wurden außerdem 4-Chloro- α -Cyanozimtsäure (CLCCA; 10 mg in je 500 µl Aceton und Wasser) [229] und die flüssige Substanz 3-Nitrobenzylalkohol (3NBA; 3 3NBA : 2 Ethanol : 1 Wasser) [144] getestet. Hiermit behandelte Schnitte wurden ebenfalls für Immunfluoreszenzmarkierungen nach Angaben in II.4.4.1 verwendet.

3.4 MALDI-MSI

Die Erzeugung der Massenspektren erfolgte durch Verwendung eines Atmosphärendruck-Raster-Mikrosonden-MALDI-Massenspektrometrie-Systems [254], welches an ein Fourier-Transform-Orbitalfallen-Massenspektrometer gekoppelt war. Unmittelbar nach der Probenvorbereitung wurde mit der Messung begonnen. Der probentragende Teller wurde auf den beweglichen Probenstisch aufgebracht, die Ionenquelle anschließend verschlossen. Der Probenstisch ist hochpräzise sowohl in x- als auch in y- und z-Richtung beweglich (Abbildung 13), was es ermöglichte, den Laser auf die zu messende Probenregion auszurichten. Diese Ausrichtung erfolgte mit Hilfe des Echtzeitbildes der im System integrierten Kamera und der farblichen Markierung auf dem Objektträgerglas. Zur Ionisation und Ablation der Analyte wurde ein hochfokussierter Stickstofflaser mit einer Wellenlänge von 337 nm und einer Wiederholrate von 60 Hz verwendet. Die Spannung am Probenstisch wurde für Messungen im positiven Ionen-Modus auf 4,3 kV, im negativen Ionen-Modus auf -4,3 kV eingestellt. Die Dauer der Aufnahme eines Messpunktes / Massenspektrums betrug 1,3 Sekunden. Dies schließt bereits die Bewegung des Probenstisches mit ein. Die Schrittgröße gibt an, mit welcher Weglänge sich der Probenstisch nach jedem Messpunkt verschiebt. Diese lag bei ausschließlicher Betrachtung des OVLs bei 10 µm, bei Messungen des gesamten Gewebeschnittes bei 35 µm oder 38 µm. Eine Überlappung der Messbereiche wurde so und

durch die Fokussierung des Lasers vermieden. Jeder Messpunkt lieferte Daten zur Erstellung eines Pixels im Endbild. Die Gesamtanzahl gemessener Pixel unterschied sich meist in den einzelnen Messungen voneinander, die Gesamtdauer der Messungen belief sich in der Regel auf 14 bis 20 Stunden. Der erfasste Massenbereich lag bei m/z 250-1000. Nach erfolgter Messung wurden die Schnitte zunächst bei Raumtemperatur und spätestens nach 48 Stunden bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ bis zur weiteren immunhistologischen Verwendung gelagert.

4. Immunfluoreszenz und Immunhistochemie

4.1 Materialien

4.1.1 Technische Geräte

Bezeichnung	Typ	Hersteller
Fluoreszenz-Mikroskop	BX50	Olympus Corporation, Tokio, Japan
Kamera (Durchlichtmikroskopie)	Camedia C-3030 Zoom	Olympus Corporation, Tokio, Japan
Kamera (Immunfluoreszenz)	Spot Insight B/W	Visitron Systems GmbH, Puchheim
Kryostat (Gefriermikrotom)	2800 Grigocut E	Reichert-Jung, Nußloch
Kryostat (Gefriermikrotom)	HM 500 O	Microm International GmbH, Walldorf
Mikroskop	Dialux 22 EB	Leitz GmbH und Co. KG, Stuttgart

4.1.2 Software

Bezeichnung	Hersteller
MetaMorph 7.7.5.0	Molecular Devices Inc., Downingtown, PA, USA
Fiji Mai 2014	Open Source basierend auf Image J, modifiziert nach Biovoxxel, Mutterstadt

4.1.3 Chemikalien

Bezeichnung	Katalog-Nr.	Hertseller
4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)	D3571	MoBiTec, Göttingen
Avidin / Biotin Blocking Kit	Sp – 2001	Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, USA
Citifluor	AF1	Citifluor Ltd., London, UK
D3,3'-Diaminobenzidin Tetrahydrochlorid (DAB)	D5637	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Di-Natriumhydrogenphosphat Monohydrat (Na_2HPO_4)	1.063.461.000	Merck, Darmstadt
Entellan	1.079.610.100	Merck, Darmstadt
Histoclear	HS-200	National diagnostics, Atlanta, GA, USA
Kresylviolett	61120	Fluka AG, Buchs, Schweizer
Natriumhydrogenphosphat dibasisches Dihydrat (NaH_2PO_4)	30435-500G	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
<i>normal donkey serum</i> (NDS)	GTX3245-500	Biozol, Eching
Paraformaldehyd (PFA)	P6148-1KG	Merck, Darmstadt

Bezeichnung	Katalog-Nr.	Hertseller
Poly-L-Lysin	L7240	Biochrom GmbH, Berlin
Triton X-100	T9284-500ML	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Vectastain ABC-Elite Standard: HRP	PK-6100	Linaris Biologische Produkte GmbH, Steinheim
Wasserstoffperoxid 30% (H ₂ O ₂)	822287	Merck, Darmstadt
Xylol	1.08685.2500	Merck, Darmstadt
Aceton	00585-2.5L	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

4.1.4 Lösungen und Puffer

Lösung	Zusammensetzung
Stocklösung A (0,2 M Na ₂ HPO ₄ -Lösung)	27,6 g Na ₂ HPO ₄ in 1 l <i>Aqua bidest.</i>
Stocklösung B (0,2 M NaH ₂ PO ₄ -Lösung)	35,6 g NaH ₂ PO ₄ in 1 l <i>Aqua bidest.</i>
PBS 0,1 M (pH = 7,2-7,4)	14 % Stocklösung A + 36 % Stocklösung B + 50 % <i>Aqua bidest.</i>
20 % PFA (Stocklösung, Lagerung im Kühlschrank)	Ansetzen von PFA (Pulverform) in <i>Aqua bidest.</i> unter ständigem Rühren bei 60-65 °C; Zugabe weniger Tropfen 1 N NaOH zur Klärung, anschließend Filtration mit Faltenfilter
2 % PFA (Gebrauchslösung)	Ansatz aus PFA Stocklösung in PBS (1 : 10)
Blockungslösung	10 % NDS + 0,3 bzw. 0,1 % Triton X-100 in PBS
DAPI-Lösung	DAPI 1 : 8000 in PBS
DAB-Lösung	1 % DAB in PBS
Alkoholreihe	50 %, 70 %, 90 % und 100 % Ethanol in <i>Aqua bidest.</i>
ABC-Lösung	Lösung A und Lösung B aus dem Vectastain-Kit je 1:100 in PBS
Kresylviolett-Lösung	0,2 g Kresylviolett in 200 ml <i>Aqua bidest.</i> unter Rühren und Erwärmen lösen, nach dem Abkühlen 0,5 ml Eisessig zugeben und durch Faltenfilter filtrieren
10 % H ₂ O ₂	Verdünnung aus 30 % H ₂ O ₂ mit <i>Aqua bidest.</i> (1 : 3)
Avidin-Blockung	50 µl Avidin + 1 ml Blockungslösung
Biotin-Blockung	50 µl Biotin + 1 ml Blockungslösung

4.1.5 Ge- und Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Typ	Hersteller
Deckgläschen	24 x 60 mm, Nr. H878	Roth GmbH, Karlsruhe
Faltenfilter	604	Schleicher und Schuell GmbH, Dassel
Frischhaltefolie	handelsübliche	diverse
Immersionsöl	Type F	Olympus Corporation, Tokio, Japan
Lens Tissue	101 020	Dörr GmbH, Neu-Ulm
Nagellack	handelsüblich	Diverse
Objektträger	76 x 26 mm	Menzel GmbH und Co. KG, Braunschweig
Objektträgermappe	für 20 Objektträger	LAT Labor- und Analysen-Technik GmbH, Garbsen
Pap-Pen	Z377821-1EA	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
pH-Indikatorpapier	9533	Merck, Darmstadt
Pinsel	Rotmarderhaar	Renensis, Flensburg

Bezeichnung	Typ	Hersteller
Rasierklinge		Wilkinson Sword, Solingen
Schnittbox		MAGV GmbH, Rabenau
8 Well Nunc Rectangular Multidish	267062	Thermo Fisher Scientific Inc., Walham, MA, USA

4.1.6 Primäre Antikörper

Antigen	Spezies, Typ	Verdünnung	Triton X-100	Nr.	Hersteller
7/4	rat, monoclonal IgG	1 : 500	0,3 %	MCA771GA	ABD Serotec, Puchheim
CD11b	rat, polyclonal IgG	1 : 500	0,1 %	101201	BioLegend, San Diego, CA, USA
COX2 (M-19)	goat, polyclonal IgG	1 : 2000	0,3 %	sc-1747	Santa Cruz Biotechnology Inc., Dallas, USA
NF-IL6	rabbit, polyclonal IgG	1 : 5000 *	0,3 %	sc-150 Lot: D0808	Santa Cruz Biotechnology Inc., Dallas, USA
STAT3 (C-20)	rabbit, polyclonal IgG	1 : 4000	0,3 %	sc-482	Santa Cruz Biotechnology Inc., Callas, USA
vWF	sheep, polyclonal IgG	1 : 3000	0,3 %	SARTW-IG	Affinity Biologicals, Ancaster; Kanada
vWF	rabbit, polyclonal IgG	1 : 5000	0,3 %	A0082	DAKO Deutschland GmbH, Hamburg

* Die Anwendung des NF-IL6 Antikörpers auf bereits in der MALDI-Messung verwendeten Schnitten wurde mit einer Verdünnung von 1:2000 durchgeführt.

4.1.7 Sekundäre Antikörper

Fluorochrom / Exzitationsmaximum	Aus Spezies	Anti-Spezies	Verdünnung	Nr.	Hersteller
Alexa Flour 488 (495nm)	donkey IgG	rabbit	1 : 500	A21206	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
		sheep	1 : 500	A11015	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
Cy TM 3 (550nm)	donkey IgG	goat	1 : 500	705-165-147	Jackson Immuno Research Europe Ltd., Newmarket, UK
		rabbit	1 : 500	711-165-152	Jackson Immuno Research Europe Ltd., Newmarket, UK
		rat	1 : 500	712-165-150	Jackson Immuno Research Europe Ltd., Newmarket, UK
biotinyliert	horse IgG	rabbit	1 : 200	BA-1000	Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, USA
		rat	1 : 200	BA-4000	Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, USA

4.1.8 Detektionssystem

Bezeichnung	Verdünnung	Nr.	Hersteller
Cy TM 3-conjugated Streptavidin	1 : 600	800-367-5296	Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc., West Grove, PS, USA

Cy3 bindet mit Hilfe des konjugierten Streptavidins an das Vitamin Biotin. Durch den Einsatz der Streptavidin-Biotin-Methode kommt es zur Amplifizierung der Fluoreszenz.

4.2 Grundlagen der Methode

Es kamen in dieser Arbeit zwei Techniken zum Einsatz, um spezifische Antigene mit hoher Sensitivität in Gewebeschnitten nachzuweisen: Immunhistochemie und Immunfluoreszenz. Hierbei werden bestimmte Antigene mit spezifisch gegen diese gerichteten primären Antikörpern (AK) detektiert und der sich bildende Antigen-Antikörper-Komplex sekundär über einen weiteren AK visualisiert.

In der hier vorliegenden Arbeit kamen als primäre AK überwiegend polyklonale Immunglobuline (Ig) des Typs G zum Einsatz (II.4.1.6). Dies sind AK aus dem Serum immunisierter Tiere, deren Ursprung also verschiedene B-Zellen sind. Der sekundäre AK ist gegen das Fc-Fragment der Wirtsspezies des primären AKs gerichtet. Diese können zum einen an Fluorochrome gekoppelt sein und so für die indirekte Immunfluoreszenz verwendet werden oder, zum anderen an Biotin gekoppelt für die Immunhistochemie eingesetzt werden. Durch die Anregung des fluoreszierenden Farbstoffs mit Licht einer bestimmten Wellenlänge emittiert dieser ein langwelligeres Fluoreszenzlicht (Tabelle 15), welches mit einem Fluoreszenzmikroskop unter Verwendung entsprechender Sperrfilter detektiert werden kann [108]. Biotinylierte AK werden an eine Meerrettich-Peroxidase (HRP) gekoppelt, welche unter Nutzung von Wasserstoffperoxid als Oxidationsmittel eine Redox-Reaktion katalysiert, die zur Bildung eines braunen Niederschlags führt (D3,3'-Diaminobenzidin Tetrahydrochlorid (DAB) -Reaktion). Dieser braune Niederschlag kann letztlich lichtmikroskopisch erfasst werden [352]. Zur verbesserten neuroanatomischen Übersicht wurden bei beiden Methoden unspezifische Zellkernmarker verwendet. 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) bindet DNA und hat fluoreszierende Eigenschaften (Tabelle 15) Kresylviolett färbt Zellkerne an und ist für den lichtmikroskopischen Nachweis verwendbar.

Der Vorteil der Fluoreszenzmarkierung ist eine besonders hohe Sensitivität und eine große Flexibilität, Doppelmarkierungen (Detektion zweier unterschiedlicher Antigene in einem Schnitt) durchzuführen. Allerdings verblasst das Fluorochromesignal trotz dunkler und gekühlter Lagerung rasch. Dieser Nachteil besteht bei DAB-markierten Antigenen nicht, jedoch sind Doppelmarkierungen aufwendiger in der Durchführung.

4.2.1 Spezifität der primären AK

Es wurden verschiedene primäre AK verwendet, die bereits in früheren Studien Verwendung fanden und dort für entsprechende Zielgewebe auf ihre Spezifität getestet wurden [117, 174, 223, 439, 442].

Die Spezifität der Markierung des Oberflächenproteins CD11b wurde durch eine Negativkontrolle bestätigt. Schnitte wurden dabei anstelle des ersten AKs mit speziesspezifischen Seren nicht immunisierter Kaninchen prozessiert. Zu detektierende Signale waren so nicht mehr nachweisbar.

4.3 Herstellung der Gefrierschnitte

Die Herstellung der Gehirnschnitte, die für immunhistologische Methoden Verwendung fanden, erfolgte an einem Gefriermikrotom mit einer Innentemperatur von -18 bis -22 °C und einer Objekttemperatur von -10 bis -12 °C. Das zuvor bei der Perfusion gewonnene und schockgefrorene Gehirn (II.2.4.5) wurde mit *Tissue Freezing Medium* auf den Objekthalter aufgeklebt. Bei Proben der Teilstudie „Fat-1“ wurde darauf verzichtet und das Gehirn (weniger gewebeschonend) alternativ mit Wasser auf den Objekthalter festgefroren. Nach senkrechter Ausrichtung der Längsachse des Gehirns zum Messer wurden von rostral beginnend $20\ \mu\text{m}$ dicke coronale Gewebeschnitte angefertigt. Diese wurden mit vorgekühlten Poly-L-Lysin beschichteten Objektträgern vom Messer abgenommen. Die Beschichtung fördert durch ihre zum Gewebe gegensätzliche Ladung (Gewebe ist eher negativ geladen und die Beschichtung eher positiv) die Adhäsion des Schnittes am Glas [323]. Die Schnitte der verschiedenen Zielregionen wurden entsprechend eines stereotaktischen Gehirnatlas der Maus [385] angefertigt. Für beide Teilstudien wurden jeweils pro Gehirn mindestens zwölf Schnitte aus der Region des OVLTs gesammelt. Für die Teilstudie „CyPPA“ wurden außerdem ebenso viele Schnitte des SFOs und der *fimbria hippocampi* angefertigt. Zwischen den erwähnten hypothalamischen Gehirnregionen anfallendes Gewebe wurde gesammelt und getrennt nach hypothalamischen und corticalen Anteilen jeweils zur Hälfte (linke oder rechte Hemisphäre) in ein steriles, vorgekühltes Reaktionsgefäß gegeben und für spätere Westernblot- (II.6) und PCR- (II.7) Analysen verwendet. Die Menge des Probenmaterials belief sich auf jeweils 10–25 mg. Alle so gewonnenen Proben wurden bis zur weiteren Verarbeitung bei -54 °C gelagert.

4.4 Versuchsprotokolle

4.4.1 Immunfluoreszenz

Die Immunfluoreszenz wurde in Teilen der „Fat-1“-Studie nach der Durchführung von MALDI-Messungen als zweites Analyseverfahren eingesetzt; alle weiteren Proben wurden in der Zwischenzeit bei -54 °C gelagert. Zum Nachweis von STAT3-Signalen wurde sich einer Signalverstärkung mittels der Streptavidin-Biotin-Methode bedient. Hierbei wird die hohe Affinität von Streptavidin zu Biotin ausgenutzt. Streptavidin besitzt vier Bindungsstellen für Biotin. Nach Inkubation mit dem primären AK wurde ein biotinylierter sekundärer AK gebunden und Cy3-konjugiertes Streptavidin hinzugegeben. An den sekundären AK gekoppeltes Biotin interagiert nun mit mehreren Cy3-konjugierten Streptavidin Molekülen. Dies führt letztlich zu einer Amplifizierung der Fluoreszenz.

Schritt	Arbeitsschritt	Dauer
1)	Aufwärmen der Schnitte bei -20 °C	15 min
2)	Schnitte mit Fettstift umranden	MALDI-Schnitte von Probenteller lösen
3)	Trocknen	5 – 7 min
4)	Fixation in 2 % PFA	10 min
5)	Waschen in PBS	3 x 5 min
6)	Blocken in Blockungslösung	1 h
7)	Inkubation, primärer Antikörper in Blockungslösung bei 4 °C in feuchter Kammer	20–24 h 44-48 h bei STAT3

Tabelle 12

Erster Teil des Arbeitsprotokolls für die Immunfluoreszenz; bis hier unterscheidet sich das Vorgehen zwischen dem herkömmlichen Protokoll und der Streptavidin-Biotin-Methode nicht. Alle Arbeitsschritte wurden, wenn nicht anders angegeben, bei Raumtemperatur durchgeführt.

Schritt	Arbeitsschritt herkömmliches Protokoll	Dauer	Arbeitsschritt Streptavidin-Biotin-Methode	Dauer
8)	Waschen in PBS	3 x 5 min	Waschen in PBS	3 x 5 min
9)	Inkubation, sekundärer Antikörper in Blockungslösung in feuchter Kammer	1 h	Blocken in Avidin-Blockungslösung	15 min
10)	Waschen in PBS	3 x 5 min	Waschen in PBS	3 x 5 min
11)	Inkubation in DAPI-Lösung	10 min	Blocken in Biotin-Blockungslösung	15 min
12)	Waschen in PBS	3 x 5 min	Waschen in PBS	3 x 5 min
13)	Überschichten mit Citifluor, abdecken mit Deckgläschen und versiegeln mit Nagellack		Inkubation, sekundärer Antikörper (biotinyliert) in Blockungslösung	15 min
14)			Waschen in PBS	3 x 5 min
15)			Inkubation mit dem Detektionssystem (Cy3-konjugiertes Streptavidin) in feuchter Kammer	1,5 h
16)			Waschen in PBS	3 x 5 min
17)			Inkubation in DAPI-Lösung	10 min
18)			Waschen in PBS	3 x 5 min
19)			Überschichten mit Citifluor, abdecken mit Deckgläschen und versiegeln mit Nagellack	
20)	Lagerung dunkel und bei 4 °C		Lagerung dunkel und bei 4 °C	

Tabelle 13

Zweiter Teil des Arbeitsprotokolls für die Immunfluoreszenz, links das herkömmliche, rechts das fluoreszenzverstärkte Protokoll. Alle Arbeitsschritte wurden, wenn nicht anders angegeben, bei Raumtemperatur durchgeführt.

Die vorgenommene Fixation in 2 % Paraformaldehyd (PFA) diene der Vernetzung reaktiver Gruppen im Gewebe vorhandener Polypeptide und führt im Idealfall zu einer Antigen-Stabilisierung. Der Serumanteil (NDS, *normal donkey serum*) in der Blockungslösung dient, ebenso wie die Anwendung von Avidin- und Biotin-Blockung, der Absättigung

unspezifischer Bindungsstellen. Das enthaltene Detergens Triton X-100 erhöht die Zellpermeabilität und gewährleistet damit ein Eindringen der Antikörper ins Gewebe bzw. in die Zellen.

4.4.2 Immunhistochemie

Die Immunhistochemie wurde nach der erfolgten MALDI-Messung und anschließender Immunfluoreszenzmarkierung der Schnitte als drittes Analyseverfahren durchgeführt. Hierbei wurde ein 7/4-AK als Marker für neutrophile Granulozyten als primärer AK verwendet. Bis zur Durchführung wurden entsprechend der Angaben in Tabelle 14 die Schnitte bei 4 °C gelagert.

Schritt	Arbeitsschritt	Dauer
1)	Entfernen der Nagellackversiegelung mit Aceton	
2)	Herunterschieben des Deckgläschens vom PBS-bedeckten Schnitt	
3)	Fixation in 2 % PFA	5 min
4)	Waschen in PBS	3 x 5 min
5)	Blocken in Blockungslösung	1 h
6)	Inkubation, primärer Antikörper in Blockungslösung	44 – 48 h
7)	Waschen in PBS	3 x 5 min
8)	Inkubation, sekundärer Antikörper in Blockungslösung	1 h
9)	Waschen in PBS	3 x 5 min
10)	Inkubation, ABC-Lösung	1 h
11)	Waschen in PBS	3 x 5 min
12)	Inkubation, DAB-Lösung	15 min
13)	Zugabe von 10 µl 10 % H ₂ O ₂ zum Start der Reaktion	4 – 6 min
14)	Waschen in PBS	3 x 5 min
15)	Waschen in HistoClear	2 h
16)	Rehydratation in absteigender Alkoholreihe (2 x 100 %, dann je 1 x 90, 70, 50 %)	je 2 min
17)	Abspülen in <i>Aqua bidest.</i>	2 – 3 sec
18)	Gegenfärben der Zellkerne in Kresylviolett	30 sec
19)	Dehydratation in aufsteigender Alkoholreihe (je 1 x 50, 70, 90, 100 %)	je 30 sec
20)	Dehydratation in 100 % Ethanol	2 min
21)	Waschen in HistoClear	5 min
22)	Xylol	bis zum aufbringen des Deckgläschens
23)	Überschichten mit Entellan und abdecken mit Deckgläschen	

Tabelle 14

Arbeitsprotokoll zur Immunhistochemie. Alle Arbeitsschritte wurden bei Raumtemperatur durchgeführt, mit Ausnahme der Inkubation des primären Antikörpers bei 4 °C.

Bei diesem Verfahren kam ein Biotin-konjugierter sekundärer AK zum Einsatz, an den während der Inkubation mit ABC-Lösung eine Peroxidase gebunden wurde. Die Substrate für eine Redox-Reaktion wurden mit DAB und Wasserstoffperoxid zur Verfügung gestellt. Beim Ablauf dieser Reaktion bildete sich ein brauner Niederschlag, der lichtmikroskopisch nachgewiesen werden konnte. Die Waschschritte in HistoClear entfernten überschüssige Niederschläge und erhöhten damit letztlich den Kontrast zwischen Signalen und dem Hintergrund.

4.5 Mikroskopie

4.5.1 Immunfluoreszenz

Nach der Immunfluoreszenz erfolgte die Auswertung der verwendeten Gehirnschnitte mit einem Fluoreszenzmikroskop. Objektive für eine 10-, 20-, 40- und 100-fache Vergrößerung waren verfügbar. Als Lichtquelle diente eine Quecksilberdampfampe (BH2-RFL-T3). Andere Wellenlängen als die zur Anregung der Fluorochrome benötigte Wellenlänge (Tabelle 15) wurde mit verschiedenen Filtern herausgefiltert. Das Mikroskop war mit einer digitalen schwarz-weiß Kamera verbunden. Angefertigte Aufnahmen der Präparate wurden mit der Software Metamorph zu Mehrkanal-RGB-Bildern zusammengefügt. Zur rein qualitativen Darstellung wurden diese Aufnahmen noch in Helligkeit und Kontrast angepasst, hierfür wurde das Programm Adobe Photoshop verwendet. Zu vergleichende Aufnahmen wurden hierbei stets identisch behandelt, um eine Vergleichbarkeit zu gewährleisten.

Fluorochrom	Anregungswellenlänge	emittiere Wellenlänge	Farbe
Alexa488 (Fluoreszeinisothiocyanat Konjugat)	460 – 490 nm	510 – 530	grün
Cy3 (Carboxymethylindocyanin)	530 – 550 nm	630 – 660	rot
DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol)	330 – 385	461	blau

Tabelle 15

Für die Immunfluoreszenz verwendete an sekundäre Antikörper gekoppelte Fluorochrome, deren Anregungs- und Emissionswellenlängen.

4.5.2 Immunhistochemie

Gewebe aus der Immunhistochemie wurden mit einem Lichtmikroskop betrachtet und die Ergebnisse als Farbaufnahmen mit einer am Mikroskop angeschlossenen Kamera dokumentiert. Hierbei standen gleiche Vergrößerungen wie bei der Immunfluoreszenz zur Verfügung.

5. Zytokin Bioassays

5.1 Materialien

5.1.1 Technische Geräte

Bezeichnung	Typ	Hersteller
Brutschrank	Nuaire-US-Autoflow	Nuaire, Plymouth, MN, USA
ELISA-Reader	Digiscan	Asys Hitech, Eugendorf, Österreich

5.1.2 Chemikalien

Bezeichnung	Hersteller
3-[4,5-Dimethylthiazol-2yl] 2,5-Diphenyl-Tetrazoliumbromid (MTT)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Actinomycin D	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Fetales Kälberserum (FKS)	Capricorn Scientific GmbH, Ebsdorfergrund
Gentamicin	Capricorn Scientific GmbH, Ebsdorfergrund
Glutamin	Capricorn Scientific GmbH, Ebsdorfergrund
Heparin-Natrium-25000-ratiopharm	Ratiopharm GmbH, Ulm
IL-6 Standard	National Institute for Biological Standards and Control, Potters Bar, UK
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt
PBS (1x)	Capricorn Scientific GmbH, Ebsdorfergrund
Penicillin-Streptomycin (5000 IU/ml)	Capricorn Scientific GmbH, Ebsdorfergrund
Rothwell Park Memorial Institute Medium (RPMI-Medium)	Rothwell Park Memorial Institute Medium 1640 Capricorn Scientific GmbH, Ebsdorfergrund
Salzsäure (HCl)	Merck, Darmstadt
TNF-Standard	National Institute for Biological Standards and Control, Potters Bar, UK
Trypsin (25 %)	Capricorn Scientific GmbH, Ebsdorfergrund

5.1.3 Ge- und Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Typ	Hersteller
Gewebekulturflasche	steril mit Filter, 50 / 75 / 250 / 550 ml	Sarstedt AG und Co. KG, Nümbrecht
Gewebekulturplatte	steril, mit Abdeckplatte, 96K	Sarstedt AG und Co. KG, Nümbrecht
Zählkammer	nach Neubauer	Biochrom, Berlin

5.2 Grundlagen der Methode

Zytokine können sowohl mittels ELISA als auch zellkulturbasiert und quantitativ anhand von hoch sensitiven Bioassays nachgewiesen werden. Zuletzt genanntes Detektionsverfahren ermöglicht im Gegensatz zum ELISA die Detektion von biologisch aktiven Zytokinen. Die Bioassays zu TNF- α und IL-6 sind am Institut für Veterinär-Physiologie und –Biochemie seit langem etabliert und sollen deswegen nur kurz beschrieben werden [117, 174, 207, 552]. Die Detektionsgrenzen lagen hierbei bei 3 I.U. IL-6/ml und 6 pg TNF- α /ml [426].

Bestimmte Zellen reagieren auf bestimmte Zytokine sehr spezifisch; diese biologischen Reaktionen bilden die Grundlage der hier verwendeten Zytokinbestimmungen. B9-Hybridoma-Zellen werden hochspezifisch und dosisabhängig von IL-6 in der Proliferation stimuliert [276, 535]. TNF- α hingegen wirkt auf murine Fibrosarkoma-Zellen (WEHI 164 Subklon 13) zytotoxisch. Daher werden diese Zellen zur Bestimmung von TNF- α -Konzentrationen in biologischen Proben herangezogen [154]. Die Zytokinmenge beeinflusst in beiden Assays die Anzahl vitaler Zellen und damit direkt deren biologische Aktivität, die anhand einer Farbreaktion (MTT-Test) nachgewiesen wird [338]. Die Durchführung der Zytokin-Bioassays fand durch Jolanta Murgott statt. Exemplarisch zeigte mir Frau Murgott die praktische Durchführung der Methode.

5.3 Probengewinnung

Die auf ihren Gehalt an TNF- α und IL-6 zu untersuchenden Plasmaproben der Mäuse wurden im Rahmen der transkardialen Perfusion gewonnen. Den in tiefer Narkose liegenden Tieren wurde mit Hilfe einer Heparin-gespülten 1 ml Spritze aus dem rechten, noch schlagenden Ventrikel zwischen 0,5 und 1 ml Blut entnommen. Dieses wurde in ein Reaktionsgefäß überführt und bei 7.000 rpm 7–8 min zentrifugiert, der Plasmaüberstand in ein sauberes Gefäß überführt und die Probe bis zur weiteren Verwendung bei –20 °C aufbewahrt.

5.4 Versuchsprotokoll

Lösung	Zusammensetzung
Assay-Medium (IL-6)	45 ml RPMI Medium 4 ml FKS 0,5 ml Glutamin (200 nM) 125 μ l Mercaptoethanol (200 nM) 65 μ l Gentamicin (10 ng/ml)
Assay-und Wachstumsmedium (TNF- α)	500 ml RPMI Medium 55 ml FKS 5 ml Penicillin-Streptomycin 5 ml Glutamin
Wachstumsmedium (IL-6)	Assay-Medium 50 I.U. IL-6 Standard / ml
Isopropanol-HCL-Lösung	4 ml 2N HCl 196 ml Isopropanol
MTT-Lösung	0,1 g MTT 20 ml PBS

Tabelle 16
Für das IL-6- und TNF- α -Bioassay verwendete Lösungen

5.4.1 IL-6-Bestimmung

Die B9-Hybridoma-Zellen mussten zunächst kultiviert und dafür alle drei Tage passagiert werden. Dies fand im Wachstumsmedium (Zusammensetzung siehe Tabelle 16) bei 37 °C, einer relativen Luftfeuchtigkeit von 95 % und einer 5%igen CO₂-Atmosphäre statt.

Die Durchführung des eigentlichen Assays erfolgte auf einer 96-Well-Mikrotiterplatte. In die Wells B1 bis K1 wurde eine Verdünnungsreihe des rekombinanten IL-6 Standards angelegt. A1 blieb als *Blank* frei, L2 wurde mit reinem Assay-Medium befüllt (Tabelle 16). In der zweiten und dritten Zeile wurden Qualitätskontrollen im Doppelansatz pipettiert. Diese Bestanden aus je einer bekannten Konzentration des IL-6 Standards (10 und 30 I.U./ml) und deren Verdünnungsreihen (1:2). Ab Zeile vier wurden die Proben, ebenfalls im Doppelansatz, und deren Verdünnungen (1:2) aufgetragen. Jedes Well enthielt ein Volumen von 100 μ l.

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L
1	blank	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	M
2	QK 1	QK 1	1:2	1:2	1:4	1:4	1:8	1:8	1:16	1:16	1:32	1:32
3	QK 2	QK 2	1:2	1:2	1:4	1:4	1:8	1:8	1:16	1:16	1:32	1:32
4	P 1	P 1	1:2	1:2	1:4	1:4	1:8	1:8	1:16	1:16	1:32	1:32
5	P 2	P 2	1:2	1:2	1:4	1:4	1:8	1:8	1:16	1:16	1:32	1:32
6	P 3	P 3	1:2	1:2	1:4	1:4	1:8	1:8	1:16	1:16	1:32	1:32
7	P 4	P 4	1:2	1:2	1:4	1:4	1:8	1:8	1:16	1:16	1:32	1:32
8	P 5	P 5	1:2	1:2	1:4	1:4	1:8	1:8	1:16	1:16	1:32	1:32

Abbildung 16

Pipettierschema einer 96-Well-Mikrotiterplatte für den IL-6-Bioassay:

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

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

Reihe 4–8: Verdünnungsreihen der Proben (P1–P5)

Vor dem Einbringen der B9-Hybridoma-Zellen in das Assay wurden diese dreimalig durch zehnmütiges Zentrifugieren bei 2300 rpm und anschließendes resuspendieren in Assay-Medium gewaschen und mit Hilfe einer Zählkammer nach Thoma auf eine Zellzahl von 5000 Zellen pro 100 µl eingestellt. Von dieser Suspension wurden je 100 µl zu jedem Well gegeben und die gesamte 96-Well-Mikrotiterplatte für 72 Stunden im Brutschrank inkubiert. Nach Ablauf dieser Zeit erfolgte eine Zugabe von 25 µl 3-[4,5-Dimethylthiazol-2yl] 2,5-Diphenyl-Tetrazoliumbromid (MTT) zu jedem Well. Während der folgenden vierstündigen Inkubation setzte das in den Zellen mitochondrial lokalisierte Enzym Succinat-Dehydrogenase das gelbe MTT zu blauen MTT-Formazan-Kristallen um [338]. Anschließend wurden dem Reaktionsgemisch 125 µl entnommen und der verbleibende Ansatz zum Stoppen der Reaktion mit 100 µl HCl-Isopropanol-Lösung versetzt. Während der sich anschließenden zwölfstündigen, lichtgeschützten Inkubation bei Raumtemperatur führte dies zur Lyse der Zellen sowie dem Lösen der MTT-Formazan-Kristalle. Letztlich wurde die optische Dichte (OD) mittels eines ELISA-Readers bei einer Wellenlänge von 550 nm bestimmt.

5.4.2 TNF- α -Bestimmung

Die Bestimmung der in den Plasmaproben vorhandenen TNF- α -Konzentrationen erfolgte in den wesentlichen Schritten analog zum IL-6-Bioassay (II.5.4.1).

Auch die Zellen der murinen Fibrosarkomazelllinie wurden zunächst kultiviert. Da diese ein adhärentes Wachstum zeigen, musste zusätzlich zum Lösen der Zellen aus den Kulturflaschen mit dem proteolytischen Enzym Trypsin gearbeitet werden. Zum Einsatz im Assay wurde eine Zellsuspension der Konzentration 50.000 Zellen pro 100 μ l verwendet. Ein Zusatz von 4 μ g Actinomycin D pro ml diente der Hemmung des Zellwachstums und der Sensibilisierung der Zellen gegenüber TNF- α . Die Verdünnungsreihe des TNF- α Standards wurde beginnend mit einer Konzentration von 1000 pg/ml absteigend angelegt. Die Zellen wurden 24 Stunden in den Proben inkubiert. Alle weiteren Arbeitsschritte erfolgt wie oben beschrieben.

6. Westernblot

In Kooperation mit Dr. Amalia Dolga wurden am Institut für Pharmakologie und klinische Pharmakologie der Philipps-Universität Marburg von Birgit Honrath und Maren Richter Westernblotanalysen durchgeführt, bei denen ich im Rahmen einer Laborrotation exemplarisch assistierte.

6.1 Materialien

6.1.1 Technische Geräte

Bezeichnung	Hersteller
Chemidoc-XRS Imaging System	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA
FluoStar OPTIMA	BMG Labtech, Offenbach
Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA
SG Ultra Clear UV plus pure Wasser System	VWR, Darmstadt
Systec V-40 Autoklav	Systec GmbH, Wetzlar
Westernblot-System	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA

6.1.2 Software

Bezeichnung	Hersteller
Optima Data Analysis	BMG Labtech, Offenbach
Quantity One	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA

6.1.3 Chemikalien

Bezeichnung	Hersteller
bovines Serumalbumin	Perbio Science, Bonn
Complete Mini Protease Inhibitor Cocktail	Roche, Penzberg
HRP-Juice	PJK GmbH, Kleinblittersdorf
PhosSTOP	Roche, Penzberg
Pierce BCA Protein Assay Kit	Thermo Fisher Scientific Inc., Walham, MA, USA
Katalog-Nr. 23228	

6.1.4 Ge- und Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Hersteller
PageRuler™ Plus gefärbte Proteinleiter	Fermentas, St. Leon-Rot,
Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran, Immobilon P	Millipore GmbH, Schwalbach

6.1.5 Primäre Antikörper

Antigen	Spezies, Typ	Verdünnung	Nr.	Hersteller
α -Tubulin	mouse, monoclonal IgG	1 : 10000	T6074	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
p65	rabbit, polyclonal IgG	1 : 1000	sc-372	Santa Cruz Biotechnology Inc., Dallas, USA
phospho p65 Ser535	rabbit, polyclonal IgG	1 : 1000	sc-33020	Santa Cruz Biotechnology Inc., Dallas, USA
I κ B α	mouse, monoclonal IgG	1 : 1000	4814	Cell Signaling Technology, Leiden

6.1.6 Sekundäre Antikörper

Detektionssystem	Anti-Spezies	Verdünnung	Hersteller
HRP-gekoppelt	mouse IgG	1 : 2500	Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, USA
HRP-gekoppelt	rabbit IgG	1 : 2500	Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, USA

Tabelle 17

Zusammenstellung der für die Westernblotanalysen verwendeten sekundären Antikörper. Alle Antikörper wurden in 5 % Blocklösung verdünnt (siehe hierzu Tabelle 21).

6.2 Grundlagen der Methode

Um Proteine nachzuweisen, rein nach ihrer Größe aufzutrennen und zu Quantifizieren bietet sich die Durchführung eines Westernblots an [417]. Hierbei wird zunächst eine Gelelektrophorese durchgeführt, gefolgt von der elektrophoretischen Übertragung der im Gel befindlichen Proteine auf eine Trägermembran und anschließender Markierung mit spezifischen Antikörpern.

Heute wird in der Regel eine sogenannte SDS-PAGE (Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid Gelelektrophorese) durchgeführt. Die Zugabe des Detergens SDS und des Reduktionsmittels β -Mercaptoethanol in den Versuchsansatz führen zu einer Denaturierung und Auflösung von Tertiärstrukturen der Proteine und verhindern damit Protein-Protein-Interaktionen. Proteineigene Ladungen werden damit vernachlässigbar. Dies ermöglicht eine Auftrennung in einer porösen Acrylamidmatrix von SDS-Protein-Komplexen anhand des Molekulargewichts [457, 481, 549]. In einem nächsten Schritt werden die Proteine elektrophoretisch auf eine Trägermembran (hier eine Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran) übertragen („Blot“). Diese Übertragung ist aufgrund von ionischen Wechselwirkungen zwischen Membran und Proteinen möglich [415]. Um bestimmte Proteine zu detektieren, werden diese mit spezifischen primären Antikörpern auf der Membran markiert. Nach einer Markierung dieser Primäantikörper mit HRP-gekoppelten, sekundären Antikörpern wird das zur Chemilumineszenz fähige Luminol zugegeben. HRP katalysiert die Oxidation von Luminol,

welches daraufhin detektierbares Licht emittiert und mittels einer Kamera oder eines lichtempfindlichen Films nachgewiesen und quantifiziert werden kann [6, 415].

6.3 Probenmaterial

Probenmaterial war Cortexgewebe der Tiere des Teilversuchs „CyPPA“ mit dem Endzeitpunkt zwei Stunden, welche während der Anfertigung von Gefrierschnitten für die immunhistologische Verwendung gewonnen wurden (siehe II.4.3).

6.4 Proteinextraktion

Stocklösung Lysispuffer, pH 7,8

D-Mannitol	4,56 g
TrisBase	0,788 g
EDTA	0,038 g
Ethylenglykoltetraessigsäure (EGTA)	0,038
Aqua bidest.	auf 100 ml auffüllen
Aliquots wurden bei -20 °C gelagert.	

Tabelle 18

Zusammensetzung der Stammlösung des Lysispuffers für die Proteinextraktion. Wenn nicht anders angegeben wurden alle Chemikalien von Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim oder Roth GmbH, Karlsruhe bezogen.

Gebrauchslösung Lysispuffer

Stocklösung Lysispuffer	10 ml
100 mM DTT	100 µl
Triton X-100	100 µl
Complete Mini Protease Inhibitor Cocktail	1 Tablette
PhosSTOP	1 Tablette
Gebrauchslösung wurde bei 4 °C aufbewahrt und maximal eine Woche verwendet.	

Tabelle 19

Zusammensetzung der Gebrauchslösung zur Proteinextraktion. Wenn nicht anders angegeben wurden alle Chemikalien von Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim oder Roth GmbH, Karlsruhe bezogen.

Proben mit einem Gewicht von 10–25 mg wurden mit ca. 1000 µl Gebrauchslösung des Lysispuffers (Tabelle 19) versetzt und mit Hilfe einer sauberen Spritze und aufgesetzter Kanüle, durch mehrmaliges Aufziehen und Entlassen mechanisch zerkleinert. Bei größeren Proben wurde das Volumen entsprechend angepasst. Anschließend wurden unlösliche Fragmente mit 10000 x g für 15 min bei 4 °C abzentrifugiert, und der gewonnene Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Alle Arbeitsschritte wurden, wenn nicht anders angegeben, auf Eis durchgeführt.

Zur Quantifizierung des Proteingehalts der Proben wurde ein Bicinchoninsäure (BCA) -Assay verwendet. Dieses Verfahren basiert auf einer kolorimetrischen Reaktion. In einem ersten Schritt wird Cu^{2+} durch die Peptidbindungen der zu analysierenden Proteine zu Cu^+ reduziert. Dieser Vorgang ist direkt proportional zur Menge des zur Verfügung stehenden Proteins und temperaturabhängig, weshalb das Assay bei 60 °C durchgeführt wird. Im zweiten Schritt erfolgt die Bildung eines violetten Chelat-Komplexes aus je einem Cu^+ -Ion und zwei

Bicinchoninsäure-Molekülen. Eine Quantifizierung des entstandenen Komplexes ist mittels Absorptionsmessung bei einer Wellenlänge von 562 nm möglich. Eine Protein-Standardkurve mit Konzentrationen von 0, 25, 50, 100, 125 und 200 µg / 10 µl bovinem Serumalbumin wurde erstellt und mit Hilfe der Software Optima Analysis eine Regressionsgerade ermittelt. Anhand dieser konnten die Proteinkonzentrationen der gemessenen Proben errechnet werden. Die Durchführung des BCA-Assays ist Tabelle 20 zu entnehmen.

Arbeitsschritt	Dauer
2,5 µl Probe bzw. Standardlösung + 100 µl Assay-Lösung (Lösung A : B im Verhältnis 50 : 1)	
Inkubation bei 60 °C und schütteln bei 650 rpm	30 min
Zentrifugation, bei maximaler Geschwindigkeit	20 s
je 100 µl des Reaktionsgemisches in 96-Well Platte überführen und photometrisch die Absorption bei 562 nm bestimmen.	

Tabelle 20

Durchführung des BCA-Assays zur Bestimmung der Proteinkonzentration.

6.5 Gelelektrophorese und Westernblotanalyse

1,5 M Tris pH 8,8

Tris-HCL	23,6 g
HCl	pH auf 8,8 einstellen
Aqua bidest.	auf 100 ml auffüllen
Aufbewahrung bei 5 °C	

0,5 M Tris pH 6,8

Tris-HCl	7,88 g
HCl	pH auf 6,8 einstellen
Aqua bidest.	auf 100 ml auffüllen
Aufbewahrung bei 5 °C	

10 % Sodiumdodecylsulfat (SDS)

SDS	1 g
Aqua bidest.	auf 10 ml auffüllen
Aufbewahrung bei RT	

10 % Ammoniumpersulfat (APS)

APS	1 g
Aqua bidest.	auf 10 ml auffüllen
bis zu einer Woche Aufbewahrung bei 5 °C möglich	

3,5 % Sammelgel

0,5 M Tris pH 6,8	2,5 ml
10 % SDS	0,1 ml
30 % Acrylamid / 0,8 % Bisacrylamid Lösung 37.5:1	1,2 ml
10 % APS	0,05 ml
Tetramethylethylenediamine (TEMED)	0,02 ml
Aqua bidest.	auf 10 ml auffüllen

12,5 % Separationsgel

1,5 M Tris pH 8,8	2,5 ml
10 % SDS	0,1 ml
30 % Acrylamid / 0,8 % Bisacrylamid Lösung 37.5:1	4 ml
10 % APS	0,05 ml
TEMED	0,01 ml

Material und Methoden

Aqua bidest.	auf 10 ml auffüllen
10 x Elektrophoresepuffer (Laufpuffer)	
TrisBase	30 g
SDS	10 g
Glycin	144 g
Aqua bidest.	auf 1 l auffüllen
Für die SDS-PAGE wurde der 10 x Elektrophoresepuffer 1 : 10 mit <i>Aqua bidest.</i> verdünnt	
Aufbewahrung bei RT	
5 x SDS Probenpuffer	
1,5 M Tris-HCL pH 6,8	4 ml
Glycerol	10 ml
SDS	2 g
β-Mercaptoethanol	5 ml
1 % Bromphenolblau	1 ml
Aufbewahrung bei 5 °C	
10 x Transferpuffer pH 8,3	
TrisBase	30 g
Glycin	144 g
HCl	pH auf 8,3 einstellen
Aqua bidest.	auf 1 l auffüllen
1 x Transferpuffer	
10 x Transferpuffer pH 8,3	100 ml
Methanol	100 ml
Aqua bidest.	auf 1 l auffüllen
10 x TBS (<i>tris-buffered saline</i>) pH 7,5	
NaCl	292 g
TrisBase	24,2 g
HCl	pH auf 7,5 einstellen
Aqua bidest.	auf 1 l auffüllen
Aufbewahrung bei RT	
1 x TBST (<i>tris-buffered saline</i> + <i>Tween 20</i>)	
10 x TBST	100 ml
Tween 20	0,5 ml
Aqua bidest.	auf 1 l auffüllen
Aufbewahrung bei RT	
5 % Blocklösung	
Magermilchpulver	25 g
1 x TBST	auf 500 ml auffüllen
Aufbewahrung bei 4 °C	
Strippingpuffer pH 2,2	
Glycin	15 g
SDS	1 g
Tween 20	10 ml
HCl	pH auf 2,2 einstellen
Aqua bidest.	auf 1 l auffüllen
PBS pH 7,4	
NaCl	9 g
Na ₂ HPO ₄	0,527 g
KH ₂ PO ₄	0,144 g
HCl	pH auf 7,4 einstellen
Aqua bidest.	auf 1 l auffüllen

Tabelle 21

Zusammensetzung der für den Westernblot verwendeten Lösungen: Alle Chemikalien wurden von Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim oder Roth GmbH, Karlsruhe bezogen.

Der Westernblot wurde nach dem Protokoll in Tabelle 22 durchgeführt. Pro Tasche wurden 20 µg Protein geladen.

Arbeitsschritt	Funktion	Dauer
Gele gießen		
Separationsgel gießen, mit Isopropanol überschichten	Polymerisation, Überschichtung verhindert Blasenbildung	25–30 min
Isopropanol abgießen		
Sammelgel gießen	Polymerisation, Kamm für Taschenbildung einstecken	25–30 min
Elektrophorese		
Proben mit 5 x SDS Probenpuffer verdünnen	Einbringen von 25 µg Protein, Beschweren der Proben mit SDS (erleichtert befüllen der Geltaschen)	
Erhitzen auf 96 °C	Denaturierung	10 min
Gel in Kammer einsetzen, mit Laufpuffer übergießen	Vorbereitung der Gelkammer	
Taschen mit Laufpuffer spülen	Luftblasen ausspülen	
Proben bzw. 5 µl Proteinleiter in Taschen füllen	Beladen des Gels	
Elektrophorese bei 60 V	Sammeln der Proben vor dem Separationsgel	
Elektrophorese bei 125 V	gleichzeitiger Eintritt der Proben in das Separationsgel	45–60 min
Blot		
Inkubation der PVDF-Membran in Methanol	Aktivieren der Membran	1 min
Inkubation der PVDF-Membran in 1 x Transferpuffer	Einweichen der Membran	10 min
Inkubation von SDS-Gel und Filterpapier in 1 x Transferpuffer	Einweichen	10 min
Schichtung von: Filterpapier, PVDF-Membran, SDS-Gel, Filterpapier	Aufbau der Schichtung für das Blotten	
20 mA, 4 °C	Transfer der Proteine auf die PVDF-Membran	21 h

Tabelle 22

Arbeitsprotokoll des Westernblots, sofern nicht anderes angegeben wurde bei Raumtemperatur gearbeitet.

6.6 Proteindetektion mittels Antikörpermarkierung

Die Detektion der auf die PVDF-Membran übertragenen Zielproteine erfolgte nach Angaben der Tabelle 23.

Arbeitsschritt	Funktion	Dauer
Inkubation der Membran in 1 x TBS	waschen	5 min
Inkubation in 5 % Blocklösung	Absättigen unspezifischer Bindungen	1 h
Inkubation in 1 x TBST	waschen	3 x 5 min
Inkubation mit primärem Antikörper, 4 °C	Binden des gesuchten Antigens	über Nacht
Inkubation mit primärem Antikörper	Binden des gesuchten Antigens	1 h

Arbeitsschritt	Funktion	Dauer
Inkubation mit 1 x TBST	waschen	3 x 5 min
Inkubation mit sekundärem Antikörper	Bindung an den primären Antikörper	1 h
Inkubation mit 1 x TBST	waschen um Hintergrundsignale zu reduzieren	3 x 5 min
Inkubation in Chemiluminescent Substrat Lösung (HRP-Juice)	Signaldetektion durch Lichtemission	1 – 2 min

Signale wurden im Anschluss mit dem Chemidoc-XRS Imaging System detektiert und mit der Software Quantity One quantifiziert.

Tabelle 23

Protokoll der Immunfärbung der PVDF-Membran und anschließender Detektion der Signale. Wenn nicht anders vermerkt, fanden alle Arbeitsschritte bei Raumtemperatur statt.

Eine Wiederverwendung der Membranen mit Detektion weiterer Proteine ist möglich. Dazu wurden vorhandene Antikörper mittels zehnmütiger Inkubation in Strippingpuffer von der Membran entfernt und die Membran einmalig in PBS und zweimalig in 1 x TBST für je 5 min gewaschen. Anschließend konnte erneut nach Angaben der Tabelle 23 verfahren werden.

7. Quantitative *real-time* PCR

7.1 Materialien

7.1.1 Technische Geräte

Bezeichnung	Typ	Hersteller
Bandelin Sonoplus	HD2070	Bandelin electronic GmbH und Co. KG, Berlin
Beckmann Spectrophotometer	UV-DU50	Beckmann Coulter GmbH, Krefeld
Photometer	Biophotometer Plus	Eppendorf AG, Hamburg
Schwingmühle	MM 301	Retsch GmbH, Haan
StepOne Plus	272001989	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
Zentrifuge für 96-Well-Platten	Perfect Spin P	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen

7.1.2 Software

Bezeichnung	Hersteller
DataAssist	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
Normfinder	Department of Molecular Medicine, Universität Aarhus, Aarhus, Dänemark
StepOne Software V2.1	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA

7.1.3 Chemikalien

Bezeichnung	Katalog-Nr.	Hersteller
Chloroform	C2432-500ML	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Deoxynucleotide Mix (dNTPs)	D7295-5ML	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	D5758-25ML	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Dithiothreitol (DTT)	Y00147	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
Isopropanol	I9516-500ML	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

Bezeichnung	Katalog-Nr.	Hersteller
M-MLV Reverse Transcriptase	AM2044	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
NucleoSpin RNA XS	740902.50	Macherey-Nagel, Düren
Precision Master Mix with ROX	Precision-R	PrimerDesign Ltd., Southampton, UK
Primer Design PerfectProbe geNorm 12 gene kit mouse	Ge-DD-12-mo	PrimerDesign Ltd., Southampton, UK
Random Hexamer	R02964	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
RNaseZap	R2020-250ML	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
RT-Puffer	Y02321	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
Taqman Gene Expression Master	4369016	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
Trizol Reagent	15596-018	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA

7.1.4 Ge- und Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Typ	Hersteller
Gehörschutz	1440	3M, Saint Paul, MN, USA
Micro Amp 8-Cap Strip	N8010535	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
Micro Amp 8-Tube Strip	N8010580	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
Micro Amp 96-Well Support Base	N4379590	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
Micro Amp Fast Optical 96-Well Reaction Plate	N4346907	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
Micro Amp Optical Adhesive Film	N4311971	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
Micro Amp Optical Adhesive Film Applicator	N4333183	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
Präzisionsküvette aus Quarzglas Suprasil	105.202-QS	Hellma GmbH und Co. KG, Müllheim
Schutzbrille		Infield Safety GmbH, Solingen
UVetten (Einmal-Küvetten)	220–1600 nm	Eppendorf AG, Hamburg

7.1.5 Verwendete Primer

Es wurden Taqman Gene Expression Assays der Firma Life Technologies verwendet.

Assay-ID	Gen
Mm03047340_ml	CD68
Mm00478374_ml	COX2
4352339E-1009032	GAPDH
Mm00446190_ml	IL-6
Mm00452105_ml	mPGES
Mm00843434_ml	NF-IL6
Mm00477798_ml	I κ B α
Mm00545913_sl	SOCS3

7.2 Grundlagen der Methode

Im Gegensatz zur konventionellen PCR, bei der eine Endpunkt Betrachtung der Amplifikation der Zielsequenz zu Grunde liegt (siehe hierzu auch II.2.2.5.3), beschreibt eine quantitative *real-time* PCR gleichzeitig die Amplifikation und Detektion von DNA-Sequenzen. Die Anwendung des Fluoreszenz-Resonanz-Energie Transfers (FRET) dient dabei heutzutage der

Ermittlung der Reaktionskinetik in Echtzeit [77]. Hierfür werden Fluoreszenzfarbstoff markierte Oligonukleotide als Sonden eingesetzt. Die gängige Taqman-Sonde [212] besteht aus einer kurzen, zur gesuchten DNA-Sequenz komplementären Sequenz, trägt an ihrem 5' Ende das Fluorochrome FAM (6-Carboxyfluorescein) und am 3' Ende einen *Quencher*. FAM hat eine Anregungswellenlänge von 495 nm. Die aufgenommene Energie wird als Licht einer Wellenlänge von 517 nm emittiert (Emissionswellenlänge). Der *Quencher* hat die Eigenschaft Licht der Emissionswellenlänge (517 nm) zu absorbieren, sofern sich *Quencher* und FAM als Reporter in ausreichend dichter räumlicher Nähe befinden. Dies ist bei einer intakten Sonde gegeben. Im Verlauf der PCR-Reaktion ist die Sonde zunächst im Bereich hinter dem Primer an die DNA hybridisiert, während der Elongation erfolgt ein Ablösen von FAM durch die Taq-Polymerase und eine Hydrolyse der restlichen Sonde. Dieser Vorgang führt zur Trennung des Reporters vom *Quencher* und emittiertes Licht wird in Folge nicht mehr absorbiert und kann detektiert werden. Die Menge des Emissionslichts ist hierbei proportional zur Anzahl synthetisierter Amplifikate und wird am Ende jeder Elongation erfasst.

Um eine Beurteilung der Expression bestimmter Zielgene auf mRNA-Ebene zu ermöglichen, wurde zunächst mRNA mittels reverser Transkription in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben [78, 147].

7.3 Probenmaterial

Als Untersuchungsmaterial fanden die Proben des Hypothalamus und des Cortex der Tiere aus dem Teilversuch „CyPPA“ Verwendung; diese wurden während der Anfertigung von Gefrierschnitten gewonnen (siehe II.4.3).

7.4 RNA-Extraktion

Für die RNA-Extraktion wurde die sogenannte Trizol-Methode, eine *single-step* RNA-Extraktionsmethode, verwendet [99]. Diese Methode bietet eine ideale Ausbeute von 1-1,5 µg RNA pro g des sehr fett- und polysaccharidreichen Gehirngewebes. Trizol ist eine monophasische Lösung aus Phenol und Guanidin-Isothiocyanat (GTC). Ersteres senkt den pH und löst DNA-Fragmente. GTC denaturiert Proteine, sodass neben der Zerstörung der Zellintegrität auch endogene RNasen inaktiviert und Nukleoproteine aufgebrochen werden. Dabei bleibt RNA unbeschädigt [340].

Vorbereitend wurden sämtliche Arbeitsflächen und verwendete Geräte mit 70 % Ethanol und RNase ZAP gereinigt um RNase-Kontaminationen sicher zu verhindern. Die Probenaufarbeitung fand nach dem Protokoll in Tabelle 24 statt. Falls nicht anders beschrieben wurden alle Arbeitsschritte auf Eis durchgeführt.

Arbeitsschritt	Funktion	Dauer
Zugabe von 500 µl eiskalter Trizol-Lösung zur Probe	Homogenisieren (lösen des Gewebeverbandes) mittels Ultraschallhomogenisator	15 s
Ultraschallkopf nach jeder Probe einmal in 100 % Ethanol, dann in DEPC-Wasser eintauchen	Reinigung des Ultraschallkopfs	je 5 s

Arbeitsschritt	Funktion	Dauer
Zentrifugation 12000 x g, 4 °C	Bildung eines Pellets nicht-relevanter Bestandteile (zelluläre Membranfragmente, Polysaccharide, DNA)	10 min
Überstand in neues Reaktionsgefäß überführen		
Inkubation bei RT	Dissoziation der Nucleo-Protein-Komplexe	5 min
100 µl Chloroform zugeben, kräftig schütteln	herauslösen von denaturierten Proteinen und DNA-Fragmenten	15 s
Inkubation bei RT	Separation	3 min
Zentrifugation 12000 x g, 4 °C	Phasentrennung	20 min
klare, wässrige Phase in 250 µl Isopropanol überführen, vortexen	RNA haltige Phase gewinnen, organische Phase verwerfen (Protein- und DNA-haltig)	
Inkubation bei -20 °C	Ausfällen der RNA, durch verdrängen der Hydrathülle	20 h
Zentrifugation 15000 x g, 4 °C	gelartiges, RNA-haltiges Pellet gewinnen	15 min
Überstand abgießen, Pellet kurz antrocknen lassen	Pellet sichern	
1 ml 70 % Ethanol zugeben, vortexen	Entfernen von Isopropanol und anderen Rückständen	
Zentrifugation 15000 x g, 4 °C	Pellet gewinnen	10 min
Überstand abgießen, Pellet kurz antrocknen lassen	Pellet sichern	
1 ml 100 % Ethanol zugeben, vortexen	Entfernen von Isopropanol und anderen Rückständen	
Zentrifugation 15000 x g, 4 °C	Pellet gewinnen	10 min
Überstand abgießen, Pellet trocknen lassen	Pellet sichern	20–25 min
20 µl DEPC-Wasser zugeben, vortexen	Pellet lösen	

Tabelle 24

Arbeitsschritte der RNA-Extraktion aus Gehirnproben mit einem Ausgangsgewicht von weniger als 40-50 mg.

Zur Herstellung von DEPC-Wasser wurde 1 ml Diethylpyrocarbonat (DEPC) in 1 l *Aqua bidest.* unter ständigem Rühren 24 Stunden inkubiert. Während dieser Zeit bilden sich kovalente Bindungen zwischen DEPC sowie primären und sekundären Aminen, und inaktiviert damit RNasen. Anschließendes Autoklavieren führt zum Zerfall von DEPC in Kohlenstoffdioxid und Ethanol [233].

7.4.1 Quantifizierung des RNA-Gehalts

Der RNA-Gehalt der gewonnenen Lösung wurde photometrisch bestimmt. Ziel war es eine Endkonzentration von 250 ng/µl einzustellen. Hierfür wurde die OD bei einer Wellenlänge von 260 nm (OD_{260} , Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren) einer 1 : 20 Verdünnung mit *Aqua bidest.* bestimmt. Eine OD_{260} von eins entspricht dabei einer Konzentration von 40 µg/ml. Die Berechnung der RNA-Konzentration und des zur Verdünnung benötigten

Volumens an DEPC-Wasser erfolgte mittels der Gleichungen in Tabelle 25. Die RNA wurde bis zur sich anschließenden reversen Transkription bei -54 °C gelagert.

Messgröße	Gleichung
RNA-Konzentration der 1 : 20 Verdünnung	$c(\text{RNA}_V) = \text{OD}_{260} \times 40\ \mu\text{g/ml}$
RNA-Konzentration der RNA-Lösung	$c(\text{RNA}_L) = c(\text{RNA}_V) \times 20$
zuzugebendes Volumen DEPC-Wasser	$V_{\text{DEPC}} = V_P \times c(\text{RNA}_L) / 250 - V_P$

Tabelle 25

Berechnungsgrundlage zum Einstellen der RNA-Konzentration auf 250 ng/μl. V_P entspricht hierbei dem Probenvolumen der RNA-Lösung.

Zusätzlich wurde die RNA durch Bestimmung der OD bei 280 nm Wellenlänge (OD_{280} , Absorptionsmaximum von Proteinen) qualitativ beurteilt. Bei reiner RNA liegt der Quotient aus OD_{260} und OD_{280} zwischen 1,9 und 2,1, Verunreinigungen der Probe mit genomischer DNA oder Proteinen reduziert diesen Quotienten auf kleiner 1,6.

7.5 Reverse Transkription

Mittels reverser Transkription wurde die gewonnene mRNA nach den Protokollen der Tabelle 26 in cDNA umgeschrieben.

Mix 1	
5 μl DEPC-Wasser	
1 μl Random Hexamer	
1 μl dNTPs	
7 μl des Mix 1 + je 4 μl RNA-Lösung (250 ng/μl)	65 °C für 10 min, anschließend auf 4 °C abkühlen
Blank 1: 7 μl Mix 1 + 4 μl DEPC-Wasser	
Mix 2	
4 μl RT-Puffer	
2 μl steriles Wasser	
2 μl 0,1 M DTT	
1 μl RT-Enzym (M-MLV RT)	
9 μl des Mix 2 zu jeder Probe geben	37 °C für 60 min, anschließend 90 °C für 5 min, gefolgt von Abkühlung auf 4 °C
Blank 2: 9 μl Mix 2 + 11 μl DEPC-Wasser	

Tabelle 26

Protokoll der reversen Transkription

Die Erhitzung auf 65 °C diente der Auflösung sekundärer Strukturen der RNA, dieser Prozess wurde durch die Zugabe des Reduktionsmittels Dithiothreitol (DTT) unterstützt. Als Startpunkt der RNA-abhängigen DNA-Polymerase (hier aus dem Moloney murine leukemia virus, M-MLV) wurden Random Hexamer-Primer zugegeben. Ein finales Erhitzen auf 90 °C inaktivierte die Polymerase.

Als Negativkontrollen für die spätere quantitative real-time PCR dienten das Blank 1 und 2.

7.6 Durchführung der quantitativen real-time PCR

Die real-time PCR erfolgte für alle Proben im Doppelansatz. Zur Kontrolle wurden beide Blanks aus der reversen Transkription, sowie ein dritter Ansatz, in dem die cDNA durch

Zugabe von autoklaviertem Wasser ersetzt wurde, verwendet. Die Durchführung erfolgte nach Angaben der Tabelle 27.

PCR-Mix			
3,5 µl autoklaviertes Wasser			
5 µl Gene Expression Master Mix			
0,5 µl Primer			
9 µl des PCR-Mix + je 1 µl cDNA-Lösung			
<i>Blank 3</i> : 9 µl PCR-Mix + 1 µl autoklaviertes Wasser			
Thermocycler-Protokoll:			
Schritt	Temperatur	Funktion	Dauer
1)	50 °C	Aktivierung der Polymerase	2 min
2)	95 °C	Denaturierung	10 min
3)	95 °C	Denaturierung	15 s
4)	60 °C	Annealing, Elongation	60 s
39fache Wiederholung der Schritte 3 + 4 (insgesamt 40 Zyklen)			

Tabelle 27

Protokoll der quantitativen *real-time* PCR

7.7 Ermittlung eines geeigneten endogenen Referenzgens

Als endogene Kontrolle zur Beurteilung von PCR-Ergebnissen wird herkömmlich ein ubiquitär und homogen exprimiertes Gen verwendet, welches keiner Beeinflussung durch durchgeführte Behandlungen oder verschiedener Genotypen unterliegt. Es dient der Normalisierung eventuell unterschiedlicher Mengen in die PCR eingebrachter cDNA [49]. Hier wurden zwölf häufig als Kontrollgene verwendete Gene der Maus auf ihre Expression hin untersucht (Primer Design „Reference Gene Kit“; B2M, EIF4A2, UBC, 18S, CYC1, ACTB, CANX, YWHAZ, RPL13A, SDHA, ATP5B, GAPDH). Anschließend wurden die Ergebnisse mit Hilfe der Software NormFinder und DataAssist ausgewertet. Als das Gen mit der stabilsten Expression stellte sich GAPDH heraus und wurde daher als endogene Kontrolle für die *real-time* PCR verwendet.

8. HPLC

Die HPLC-Messungen der von mir aufgearbeiteten Proben fanden in Kollaboration mit der AG Mazurek des Instituts für Veterinär-Physiologie und –Biochemie durch Sybille Wache und Alexander Eva statt.

8.1 Materialien

8.1.1 Technische Geräte

Bezeichnung	Typ	Hersteller
Bandelin Sonoplus	HD2070	Bandelin electronic GmbH und Co. KG, Berlin
HPLC-UV/Vis Detektor	LC 1210	Gamma Analysentechnik GmbH, Bremerhaven
Epoch Mikroplatten Spektralphotometer		Biotek Instruments Inc., Winooski, VT, USA
Gefriertrocknungsanlage	Alpha 1-2 LDplus	Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Osterode am Harz
HPLC-Organiser	LC 1431	Gamma Analysentechnik GmbH, Bremerhaven

Bezeichnung	Typ	Hersteller
HPLC-Pumpe	L-6200	Merck Hitachi, Berlin
Kryostat (Gefriermikrotom)	Leica CM3050S	Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar
pH-Meter		WTW GmbH, Weilheim
Säulenofen		KNAUER wissenschaftliche Geräte GmbH, Berlin
Schwingmühle	MM301	Retsch GmbH, Haan
Ultraschallbad		BANDELIN electronic GmbH und Co. KG, Berlin
Vakuumpumpe	RZ6	Vacuubrand GmbH und Co. KG, Wertheim
Vortexer	REAX1DR	Heidolph Instruments GmbH und Co. KG, Schwabach
Zentrifuge	Sorvall RC6 Plus	Thermo Fisher Scientific Inc., Walham, MA, USA

8.1.2 Software

Bezeichnung	Hersteller
Clarity 5.0.2.612	Data Apex, Prag, Tschechien
Gen5 Software	Biotek Instruments Inc., Winooski, VT, USA

8.1.3 Chemikalien

Bezeichnung	Katalog-Nr.	Hersteller
Acetonitril Rotislov HPLC	HN44.2	Roth GmbH, Karlsruhe
Bradford Reagenz	B6916	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Complete Protease Inhibitor, Cocktail Tablets	04693159001	Roche Holding GmbH, Grenzach-Whylen
Kaliumhydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	A3620	AppliChem GmbH, Darmstadt
Kaliumhydroxid (KOH)	1.05033.1000	Merck, Darmstadt
Methanol Rotisolv HPLC	7342.1	Roth GmbH, Karlsruhe
Perchlorsäure (HClO ₄)	244252	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Phosphatase Inhibitor Cocktail 2	P5726-1ML	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Tetra-butyl-ammonium-hydrogensulfat (TBA-HS)	155837	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

8.1.4 Standardsubstanzen

Substanz	Katalog-Nr.	Hersteller
Adenosin	6122.1	Roth GmbH, Karlsruhe
ADP	A0948	AppliChem GmbH, Darmstadt
AMP	A1622	AppliChem GmbH, Darmstadt
ATP	A26209	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
GDP	G7127	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
GTP	K056.1	Roth GmbH, Karlsruhe

8.1.5 Lösungen und Puffer

Ausgangspuffer	
KH ₂ PO ₄	22,7 g
TBA-HS	3,4 g
5 N KOH	pH auf 6 einstellen
Aqua bidest.	auf 2 l auffüllen
Puffer A	
Ausgangspuffer	50 %
Aqua bidest.	50 %

Puffer B	
Ausgangspuffer	70 %
Methanol	30 %
Puffer C	
Acetonitril	30 %
Aqua bidest.	70 %
0,6 N KOH-Lösung	
KOH	3,37 g
Aqua bidest.	auf 100 ml auffüllen
0,6 N HClO₄-Lösung	
HClO ₄	8,6 ml
Aqua bidest.	auf 100 ml auffüllen

8.1.6 Ge- und Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Typ	Hersteller
Mahlkugeln, Durchmesser 5 mm	handelsüblich	Retsch GmbH, Haan
EC 100/3 Nucleodur C18		
Gravitiy, 3 µm, HPLC Säule	761902.30	Macherey-Nagel GmbH und Co KG, Düren
Spritzenvorsatzfilter	AO-20/3	Macherey-Nagel GmbH und Co KG, Düren
Membranen Dull Side up	CX09.1	Merck, Darmstadt
Hamilton-Spritze	Microfilter	handelsüblich
Bottle-Top Filterhalter	KA90.1	Roth GmbH, Karlsruhe

8.2 Grundlagen der Methode

Zur Bestimmung der intrazellulären Nukleotidkonzentrationen wurde eine Ionenpaar-Umkehrphasen-Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (*high performance liquid chromatography*, HPLC) durchgeführt. Hierbei liegen die Zielsubstanzen (hier Nukleotide) ionisiert vor und werden jeweils an ein zweites organisches Ion gebunden (hier Tetra-butylammonium-hydrogensulfat, TBA-HS). Diese nach außen neutralen Ionenpaare lagern sich an die stationäre (hydrophobe) Phase. Die hydrophile, mobile Phase (Laufphase) verändert während des HPLC-Laufes kontinuierlich ihre Zusammensetzung (Laufmittelgradient), was zu einer Konkurrenzsituation um Bindungsstellen an der stationären Phase führt. So trennen sich im zeitlichen Verlauf die Zielsubstanzen von der stationären Phase und können detektiert werden [328].

8.3 Probenmaterial

Ausgangsmaterial der Untersuchung waren jeweils etwa 300 mg Lebergewebe der Tiere aus der Teilstudie „CyPPA“. Es wurden Proben der Mäuse verwendet, deren Perfusion zwei Stunden nach der letzten Injektion erfolgte. Bis zur Aufarbeitung mittels Perchlorsäureextraktion wurden die Proben bei -54 °C gelagert.

8.4 Perchlorsäureextraktion

Die Perchlorsäureextraktion erfolgte in Anlehnung an das von Reckels 1991 [414] beschriebene Protokoll. Modifikationen erfolgten entsprechend der Ergebnisse von durchgeführten Vorversuchen.

Die benötigte Menge Gewebe (etwa 300 mg) wurde von dem tiefgefrorenen Leberlappen abgetrennt und in ein vorgekühltes Reaktionsgefäß überführt, anschließend wurde das genaue Probengewicht erhoben. Das Gewebe taute währenddessen niemals an.

Die weiteren Arbeitsschritte der Nukleotidextraktion wurden nach Angaben der Tabelle 28 durchgeführt.

Arbeitsschritt	Funktion	Dauer
Zugabe von 3 ml 0,6 N eisgekühlter HClO ₄ -Lösung pro 1 g Lebergewebe in das Reaktionsgefäß	Probenaufschluss	5 min
Zugeben einer vorgekühlten Mahlkugel, bei 30 Hz in die Schwingmühle geben, RT	mechanische Zerkleinerung des Gewebes	15 sec
auf Eis stellen	abkühlen der Probe	1 min
bei 30 Hz in die Schwingmühle geben, RT	mechanische Zerkleinerung des Gewebes	15 sec
Inkubation	lösen des Gewebeverband	15 min
Zentrifugation bei 20000 rpm (47000 x g), 4 °C	pelletieren unlöslicher Bestandteile	20 min
Überstand abnehmen und mit eisgekühlter 0,6 N KOH auf pH 5 - 6 einstellen	Einstellen des Äquivalenzpunktes	
Zentrifugation bei 20000 rpm, 4 °C	abtrennen von ausgefallenem Perchlorat (KClO ₄)	20 min
Überstände abnehmen, Volumen bestimmen und auf zwei gleichgroße Portionen aufteilen		
Reaktionsgefäße in flüssigen Stickstoff geben	gefrieren der Probe	einige Minuten
Reaktionsgefäße entnehmen und mit einer Kanüle den Deckel durchstechen, dabei Kontamination der Proben untereinander vermeiden. Proben zur Lyophilisierung in die Gefriertrocknung geben (0,37 mbar, -30 °C)	vollständiger Wasserentzug	ca. 20 h
Proben aus dem Vakuum entnehmen, mit Parafilm verschließen		
Aufbewahrung bis zur Messung bei -80 °C		

Tabelle 28

Protokoll der Perchlorsäureaufarbeitung von Leberproben. Wenn nicht anders angegeben fanden alle Arbeitsschritte auf Eis statt.

8.5 Messung der Nukleotidkonzentration

Die lyophilisierten Proben wurden in 200 µl des Puffers A (II.8.1.5) gelöst und 15 Minuten auf Eis inkubiert. Nach erfolgter pH Messung (5-6) wurde die Probe bei 13000 rpm und 4 °C für fünf Minuten zentrifugiert und anschließend feinfiltriert um letzte unlösliche Bestandteile zu beseitigen. Es wurden 20 µl Probenvolumen in die HPLC eingebracht. Für alle Proben wurde eine Doppelbestimmung durchgeführt. Außerdem wurde jede Probe mit Standardlösungen aller Nukleotide (II.8.1.4; je 0,05 mM) aufgestockt um eine späterer Identifizierung der Peaks zu gewährleisten.

8.6 Quantifizierung der eingesetzten Proteinmenge

Aus der Perchlorsäureextraktion (II.8.4) angefallene Pellets aus unlöslichen Bestandteilen wurden bei $-55\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert und für eine spätere Proteinbestimmung mittels Bradford-Assay herangezogen.

Im Bradford-Reagenz enthaltenes Coomassie Brilliant-Blau bildet Proteinkomplexe. Diese Reaktion führt zu einer Verschiebung des Absorptionsmaximums von 465 nm (reiner Farbstoff) auf 595 nm. Die bei 595 nm gemessene OD einer Protein-Bradford-Mischung dient also als Maß für eine enthaltene Proteinkonzentration [58].

Auf Eis gelagerte Pellets wurden unter Verwendung von 1,5 ml PBS-Lösung (bestehend aus 100 ml PBS und 100 μl einer 10 ml Lösung aus autoklaviertem Wasser und je einer Tablette Proteaseinhibitor sowie 1 ml Phosphataseinhibitor) vollständig in 15 ml Falcontubes überführt. Alle Proben wurden anschließend für ein bis zwei Minuten mit dem Ultraschallstab homogenisiert. Eine 1:100 Verdünnung dieses Homogenisats wurde in den Bradford-Assay eingesetzt. Nach einer fünfminütigen Inkubation wurde die OD bei 595 nm bestimmt und gemessene Konzentrationen anhand einer Standardreihe ermittelt.

9. Auswertung und Statistik

9.1 Physiologische Parameter

Die Gruppengröße von $n = 2$ der Gruppe „2,5 mg LPS pro kg Körpergewicht, 24 Stunden“ der ω -3 defizient gezogenen Fat-1 Tiere des Teilversuchs „Fat-1“ konnte im Rahmen dieser Arbeit leider nicht erhöht werden. Bedingt durch einen Aufschub der erneuten Erteilung der Erlaubnis zur Zucht und Haltung von Versuchstieren nach § 11 des Tierschutzgesetzes kam es zu Verzögerung des Zuchtvorhabens. Damit war ein statistischer Vergleich schwierig und wurde vereinfacht mit limitierter Aussage durchgeführt. Die statistische Betrachtung sowohl des Temperatur- als auch des Aktivitätsverlaufs wurde auf Zeitfenster zwischen einer und vier, sowie zwischen zehn und fünfzehn Stunden *post injectionem* beschränkt. Diese Zeitfenster zeigten sich vielversprechend bezüglich eventuell auftretender Unterschiede zwischen Behandlungsgruppen und Genotypen.

9.1.1 Abdominale Temperatur

Die aufgezeichneten Temperaturdaten wurden aus dem Programm VitalView ausgelesen, in eine Excel-Tabelle konvertiert und 15 minütige Intervalle analysiert. Die graphische Darstellung erfolgte mittels des Programms GraphPad Prism für jede Gruppe unter Angabe von Mittelwert \pm Standardfehler. Eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ wurde als signifikant unterschiedlich angenommen. Betrachtete Zeitspannen waren dabei $t = -2$ Stunden (vor Injektion oder Käfigwechsel) bis Versuchsende (Perfusion bzw. vier Stunden nach Umsetzen in die neue Umgebung).

9.1.1.1 Teilversuch „CyPPA“:

Die statistische Auswertung erfolgte mittels einer drei-faktoriellen Varianzanalyse (ANOVA) mit Messwiederholung mit den Faktoren Behandlung 1, CyPPA/Solvent und Behandlung 2, LPS/PBS sowie der abhängigen Variable „Messwiederholungen über die Zeit“. Der aufgezeichnete Temperaturverlauf wurde hierzu in Intervalle von je zwei Stunden Dauer, beginnend eine Stunde nach Versuchsbeginn (Injektion), unterteilt. Diese Einteilung hatte zum einen den Vorteil, dass der stressbedingte Temperaturanstieg unmittelbar nach dem Handling und der Injektion der Tiere die Analyse nicht beeinflusste. Zum anderen fiel so die Intervallgrenze zwischen Hell- und Dunkelphase und trennte damit sinnvoll die Phasen erhöhter Aktivität von den Ruhephasen der Tiere. Mäuse haben physiologisch in der Dunkelphase ihr Aktivitätshoch, welches mit einer Erhöhung der Körpertemperatur einhergeht [189]. In den Teilversuchen mit einem Endpunkt nach zwei Stunden wurden halbstündige Intervalle gebildet. Auf jedes Intervall wurde die drei-faktorielle ANOVA angewendet. Diese Betrachtung des Datensatzes in Intervallen bedingte ein mehrfaches statistisches Auswerten des Datensatzes und damit auch ein erhöhtes Fehlerpotential. Um diesem Rechnung zu tragen, wurden aus der ANOVA erhaltene p-Werte einer p-Wertadjustierung nach Bonferroni unterzogen. Hierbei wurde jeweils der aus der ANOVA erhaltene p-Wert mit der Gesamtzahl der eingeteilten Intervalle (12 bei 24 h Zeitspannen) multipliziert. Nur p-Werte, die noch nach dieser Anpassung kleiner als 0,05 waren, wurden als statistisch signifikant erachtet. Bei signifikanter Interaktion von Behandlung 1 mit Behandlung 2 wurde außerdem ein *post-hoc* Test nach Tukey angeschlossen.

Zur anschaulichen Darstellung der Fieberstärke wurde an einigen Stellen der Fieberindex verwendet. Dieser ermittelte sich aus der Integration der Fläche zwischen der Fieberkurve und einem zuvor ermittelten Basiswerte (Mittelwert jedes Einzeltiers für den Zeitraum zwei Stunden vor Versuchsbeginn). Für jede Versuchsgruppe wurde der Mittelwert mit Standardfehler errechnet und die so gewonnenen Daten als Balkendiagramme dargestellt. Eine statistische Auswertung erfolgte mittels gepaartem Student's t-Test bzw. einer zwei-faktoriellen ANOVA. Bei Auftreten einer signifikanten Interaktion der Hauptparameter wurde ein Bonferroni *post-hoc* Test angeschlossen.

9.1.1.2 Teilversuch „Fat-1“

Die statistische Auswertung der über den Versuchszeitraum aufgezeichneten Daten der Körpertemperatur wurde auf die Zeiträume ein bis vier und zehn bis fünfzehn Stunden nach dem Injektionszeitpunkt beschränkt. Hierzu wurde jeweils separat für die Betrachtungszeiträume eine zwei- oder drei-faktorielle ANOVA mit Messwiederholung durchgeführt. Ein *post-hoc* Test nach Scheffé wurde bei positiver Interaktion angeschlossen.

Die Darstellung der während des Käfigwechsels (NES) erhobenen Temperaturdaten erfolgte als Delta-T Werte (ΔT abd.). Diese Art der Darstellung beinhaltet den Vergleich der Temperatur während des Versuchs mit einem zuvor ermittelten Basiswert. Dieser Basiswert ergibt sich aus den Mittelwerten der Temperaturdaten der Versuchstiere aller Gruppen im

Zeitraum zwei Stunden vor Versuchsbeginn. Die Auswertung der so dargestellten Daten erfolgte analog zu den Temperaturdaten des Teilversuchs „CyPPA“ mit einem Endpunkt nach zwei Stunden. Um die während des Käfigwechsels auftretende Erhöhung der abdominalen Temperatur besonders deutlich herauszuarbeiten, wurde identisch zum Fieberindex (Teilversuch „CyPPA“, II.9.1.1.1) weiterhin ein „Temperaturindex“ ermittelt. Ein statistischer Vergleich erfolgte mit einer zwei-faktoriellen ANOVA.

9.1.2 Aktivität

9.1.2.1 Teilversuch „CyPPA“

Die Auswertung der Aktivitätsaufzeichnungen erfolgte äquivalent zur Betrachtung der Temperaturdaten. Es wurde jedoch lediglich die Zeitspanne $t = 0$ (Injektionszeitpunkt) bis Versuchsende einbezogen. Zusätzlich zur Verlaufsbeobachtung wurden die Aktivitätsdaten auch kumulativ, also als Summe der *activity counts* über einen bestimmten Zeitraum, betrachtet. Diese Daten wurden mit dem Programm GraphPad Prism einem gepaarten Student's t-Test oder einer zwei-faktoriellen ANOVA (Faktoren: Behandlung 1, CyPPA/Solvent und Behandlung 2, LPS/PBS) unterzogen. Beim Vorliegen einer positiven Interaktion ($p < 0,05$) wurde ein *post-hoc* Test nach Bonferroni angeschlossen.

Messwerte, die um mehr als das 1,5-fache *interquartile-range* (IQR) unter dem 25%-Perzentil oder über dem 75%-Perzentil lagen, wurden als Ausreißer betrachtet und aus der statistischen Betrachtung ausgeschlossen.

9.1.2.2 Teilversuch „Fat-1“

Die Auswertung der Aktivitätsaufzeichnungen erfolgte analog zur Auswertung der Temperaturdaten des Teilversuchs. Für den Aktivitätsverlauf während des Käfigwechsels (NES) wurde zusätzlich die kumulative Aktivität ermittelt (vergleiche II.9.1.2.1).

9.1.3 Futter- und Wasseraufnahme

Es erfolgte die kumulative Betrachtung der mit der Software AccuDiet erfassten Daten zur Futter- und Wasseraufnahme. Die aufgenommenen Mengen in Gramm wurden dabei prozentual auf das Körpergewicht des Tieres bezogen (Futter- bzw. Wasseraufnahme in Prozent des Körpergewichts). Die graphische Darstellung erfolgte durch GraphPad Prism unter Angabe von Mittelwert \pm Standardfehler. Die statistische Auswertung erfolgte mittels ein- oder zwei-faktorieller ANOVA und anschließendem *post-hoc* Test nach Bonferroni. Ausreißer wurden nach dem Verfahren aus II.9.1.2.1 ausgeschlossen.

9.1.4 Körpergewicht

Das Gewicht der Tiere wurde als Änderung pro Tag in Prozent des Körpergewichts ausgedrückt und ebenfalls als Mittelwert \pm Standardfehler mit GraphPad Prism dargestellt. Die statistische Auswertung erfolgte analog zu der Betrachtung der Futter- und Wasseraufnahme.

9.2 Biochemische Parameter

9.2.1 MALDI-MSI

Es ist möglich sowohl gezielt nach Substanzen mit bekannter Masse zu suchen als auch ungezielt Bilder von Ionensignalen zu generieren und diesen Massen später Substanzen zuzuordnen. Beide Verfahren fanden in dieser Arbeit Anwendung.

Grundsätzlich lassen sich die Schritte der Datenerhebung, -analyse und Bilderstellung wie folgt zusammenfassen:

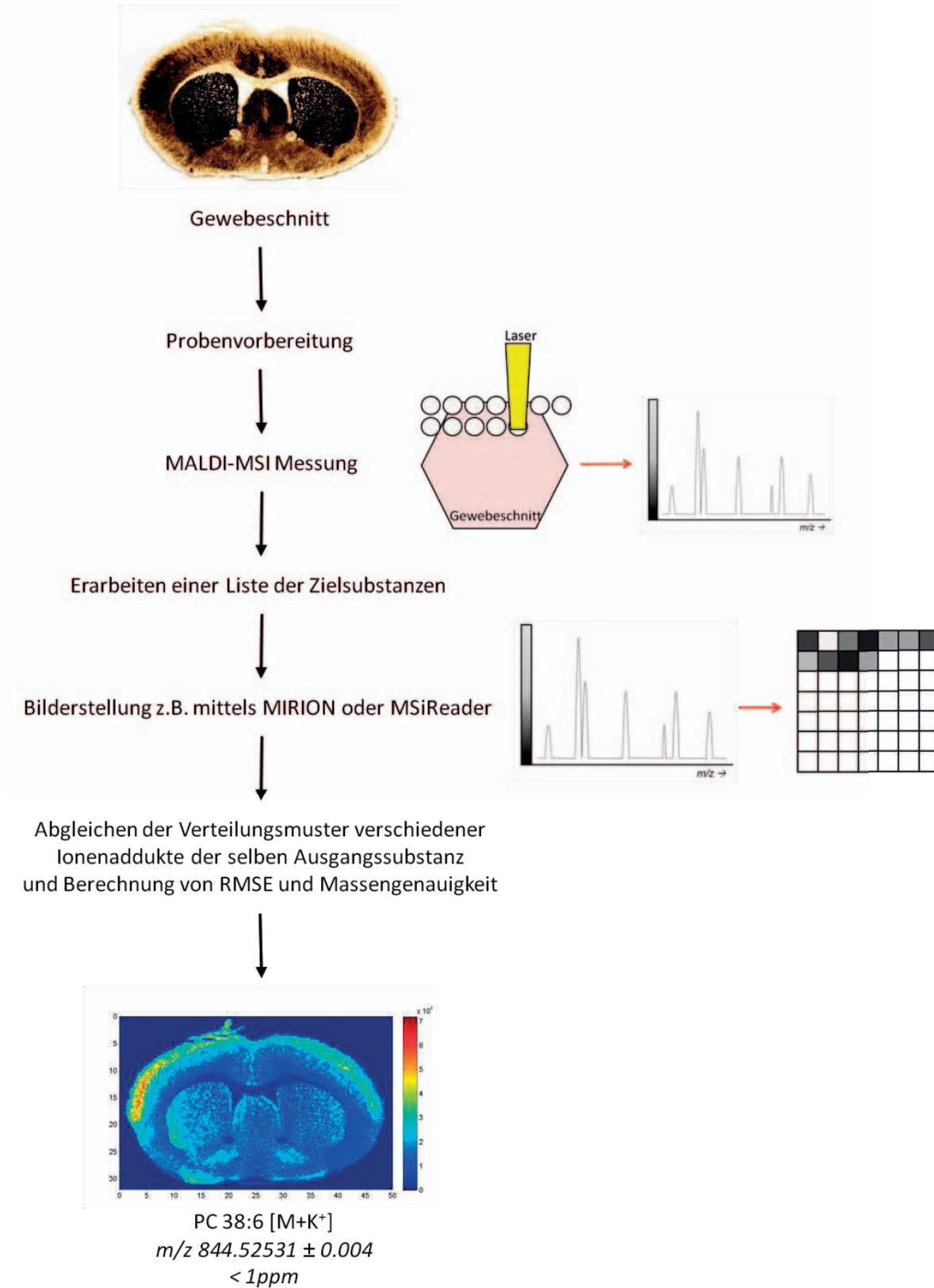


Abbildung 17
Flussdiagramm der Arbeitsschritte einer bildgebenden Massenspektrometrie.

9.2.1.1 Analyse der Rohdaten

Die Exactive Tune Software steuert das verwendete Massenspektrometer und speichert während des Messvorgangs die erhobenen Daten als „raw“-Datei. Metadaten werden erfasst und von der MCP Software als UDP-Datei gespeichert. Die Metadaten enthalten Angaben wie Anzahl der gemessenen Zeilen und Spalten sowie die Pixelanzahl, die „raw“-Datei die erfassten Massenspektren. Das Softwarepaket MIRION wurde verwendet um gewonnene Daten in ausgewählte Ionenbilder zu „übersetzen“. Außerdem wurde mit der Open Source Software MSiReader gearbeitet. Eine Massenfensterbreite von $\Delta m/z$ 0,01 wurde zur Erzeugung aller Bilder verwendet. Diese ist sehr gering und damit stark diskriminierend und ermöglicht dadurch Substanzen zu unterscheiden, die ein sehr ähnliches Masse-zu-Ladungs-Verhältnis zeigen [423]. Alle Bilder wurden auf die höchste Signalintensität pro Bild skaliert. Außerdem wurden im Ergebnisteil (III.5) gezeigte Bilder invertiert, was eine bessere Beurteilbarkeit gewährleistet (Abbildung 18).

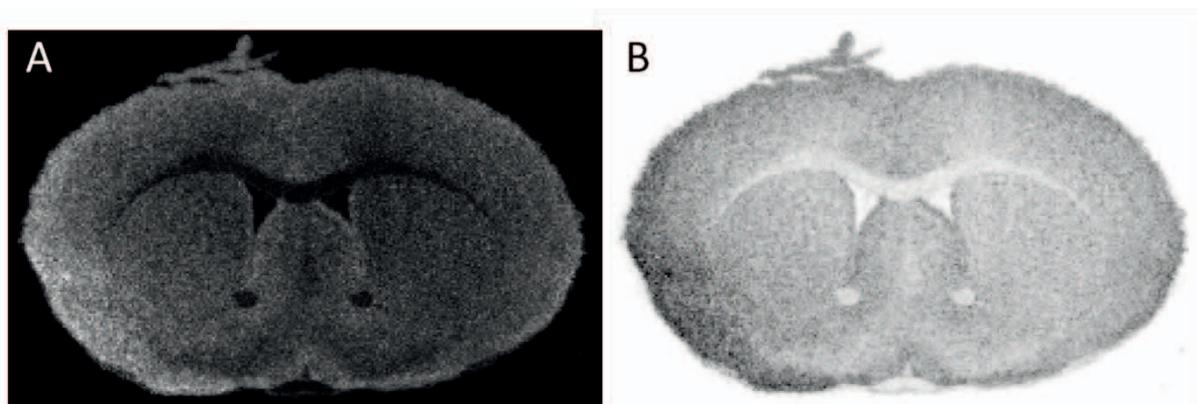


Abbildung 18
In A die Originaldarstellung eines mit dem Softwarepaket MIRION erstellten MALDI-Bildes; in B die invertierte, in dieser Arbeit verwendete Version.

9.2.1.2 Erstellen von Listen der zu suchenden Zielsubstanzen

Um gezielt nach Substanzen zu suchen, muss deren exakte oder theoretische Masse ($[M]$, m_t) bekannt sein. Diese wird anhand der Summenformel, bis auf sieben Nachkommastellen genau, berechnet (z.B. mit Hilfe folgender Webseite: <http://www.sisweb.com/referenc/tools/exactmass.htm>). Anschließend muss für jede Substanz die exakte Masse ihrer potentiellen Ionenaddukte ($[M+X]^\pm$) unter Berücksichtigung der Addition bzw. Subtraktion der Masse eines Elektrons bestimmt werden. Hierzu wurden folgende Massen verwendet:

Addukt	Berechnung der Masse des Addukts
$[M-H]^-$	$[M] - 1,00837361$
$[M+H]^+$	$[M] + 1,007276$
$[M+K]^+$	$[M] + 38,963158$
$[M+Na]^+$	$[M] + 22,989221$
$[M+NH_4]^+$	$[M] + 18,033826$
$[M+H-H_2O]^+$	$[M] + 17,00328823$

Tabelle 29**Zugrunde gelegte Massen zur Berechnung der exakten Masse [M] von Ionenaddukten.**

Jeder theoretischen Masse (m_t = „mid-value“) wird ein Wert zugeordnet, der 5 ppm oberhalb und 5 ppm unterhalb dieser Masse liegt (unterer Wert = „from-value“ = $-5 \times 10^6 \times m_t + m_t$; oberer Wert = „to-value“ = $+5 \times 10^6 \times m_t + m_t$). Die errechneten Werte wurden entsprechend Abbildung 19 in tabellarischer Form angegeben. Eine solche Liste (txt-Format) kann später in Programme wie MIRION oder MSiReader eingelesen werden.

From	to	mid
496.3372843	496.3422477	496.339766
518.3191187	518.3243019	518.3217103
478.3268097	478.331593	478.3292013
534.2929762	534.2983192	534.2956477
494.3216443	494.3265876	494.324116
532.2773362	532.282659	532.2799976
516.3034787	516.3086417	516.3060602
524.3684443	524.373688	524.3710662
546.3502786	546.3557422	546.3530104
562.3241362	562.3297594	562.3269478
522.3528043	522.3580279	522.3554161
544.3346387	544.340082	544.3373603
504.3423297	504.3473731	504.3448514
550.3084067	550.3140007	550.3112037

Abbildung 19

Tabelle exemplarisch ausgewählter theoretischer Massenwerte („mid“) je ± 5 ppm („from“ – „to“).

9.2.1.3 Verwendung von MIRION

MIRION ist ein Softwarepaket, das für die Verarbeitung massenspektrometrischer Bilder entwickelt wurde [383]. Für dessen Verwendung muss sowohl die „raw“-Datei einer Messung als auch die zugehörige UDP-Datei in das Programm geladen werden. Bei der gezielten Suche nach Substanzen wird anschließend die erstellte Liste mit Massen der Zielsubstanzen (Abbildung 19) eingelesen und das Programm erstellt Bilder mit einer gewünschten Massenfensterbreite (hier von $\Delta m/z = 0,01$). Generierte Bilder können anschließend, inkl. der zugehörigen Messdaten (z.B. akkurate bzw. gemessene Masse, m_g), gespeichert werden. Für die ungezielte Suche nach gemessenen Ionensignalen und deren Verteilungsmustern werden Parameter wie zu betrachtender Massenbereich, minimale Bildabdeckung, maximale Bildabdeckung, maximal zu generierende Bildanzahl und gewünschte Massenfensterbreite ausgewählt. MIRION generiert nun Bilder vorhandener Ionensignale entsprechend der angegebenen Kriterien. Diese Bilder können wiederum inkl. zugehöriger Messdaten gespeichert werden.

9.2.1.4 Verwendung von MSiReader

Für die Verwendung des MSiReaders muss die gespeicherte „raw“-Datei zunächst in ein imzML-Format überführt werden [424]; dies geschieht mit dem „imzML converter“ (frei erhältlich unter <http://www.imzML.org>). Anschließend kann analog zu MIRION, sowohl gezielt als auch ungezielt, nach Ionensignalen gesucht werden. Außerdem bietet dieses Programm die Option Bilder von Ionensignalen einer Zielregion (ROI, region of interest) zu

filtern. Dazu wird frei Hand ein ROI bestimmt und anschließend ein Signalgrenzwert, der Hintergrundrauschen von echten Signalen diskriminiert, festgelegt. Generierte Daten und zugehörige Bilder werden exportiert.

9.2.1.5 Zuordnung von Ionensignalen

Zur eindeutigen Identifizierung einer Substanz müssten sehr arbeitsaufwendige MS/MS-Analysen (Fragmentierung von Vorläuferionen) durchgeführt werden. Alternativ kann eine weitgehend zuverlässige Massenzuordnung über die Betrachtung der Verteilungsmuster verschiedener Ionenaddukte einer Substanz als Screeningmethode zum Nachweis vieler verschiedener Substanzen erfolgen. Die räumlichen Verteilungsmuster der Addukte einer Ausgangssubstanz sollen hierbei identisch sein (Beispiel in Abbildung 20). Ist dies nicht der Fall, spricht das für das Vorliegen eines Ionensignals einer anderen Substanz oder für eine Überlagerung mehrerer Substanzen im betrachteten Peak. Die Datenbanksuche ist dabei nur erfolgversprechend, wenn ein schmales Suchfenster verwendet werden kann. Die Suchfensterbreite kann dabei umso enger gefasst werden, je höher die Massengenauigkeit der Messung ist. Die Massengenauigkeit kann anhand der Betrachtung von bekannten Matrixpeaks beurteilt werden. Außerdem ist ein ausreichend hohes Massenaufklärungsvermögen des verwendeten Massenspektrometers notwendig, um eine Substanz anhand der akkuraten Masse (m_g) bestimmen zu können. Die Massenaufklärung (R) beschreibt dabei den minimalen Massenunterschied, den zwei Ionen haben müssen, um noch als getrennt wahrgenommen zu werden. Hierbei gilt: $R = \frac{m_1}{(m_2 - m_1)}$

Das hier verwendete Gerät verfügte nach Herstellerangaben über ein Massenaufklärungsvermögen von 140000 bei m/z von 200.

Beispielsweise wird ein Ionensignal m/z 535,30064 im positiven Ionen-Modus gefunden. Die Suche nach möglichen zugehörigen Substanzen mit Hilfe einer Datenbank (hier https://metlin.scripps.edu/metabo_batch.php?&return=yes) ergibt den Verdacht, dass es sich um das Na-Addukt eines Lysophospholipids der Summenformel $C_{24}H_{49}O_9P$ ($C_{24}H_{49}O_9P$ $[M+Na]^+$; LPG (18:0)) handeln könnte. Die korrespondierenden m/z Werte anderer LPG (18:0)-Addukte wie:

$C_{24}H_{49}O_9P$ $[M+K]^+$, m/z 551,27458

$C_{24}H_{49}O_9P$ $[M+H]^+$, m/z 513,31870

$C_{24}H_{49}O_9P$ $[M+NH_4]^+$, m/z 530,34525

ergeben bei der Suche im gemessenen Spektrum allerdings keinerlei Treffer. Die entsprechenden Ionensignale wurden also nicht detektiert. Dies spricht in diesem Fall für das Vorliegen des Ionensignals eines $[M+H]^+$ -Addukts einer Aminosäuresequenz (MetArgLysThr $[M+H]^+$, m/z 535,30208), deren $[M+K]^+$ - sowie $[M+Na]^+$ -Addukt in der Messung nachweisbar sind. Das m/z -Verhältnis von $C_{24}H_{49}O_9P$ $[M+Na]^+$ und MetArgLysThr $[M+H]^+$ ist zufällig nahezu identisch (siehe hierzu auch Abbildung 21).

LPC(16:0) $C_{24}H_{50}O_7P$

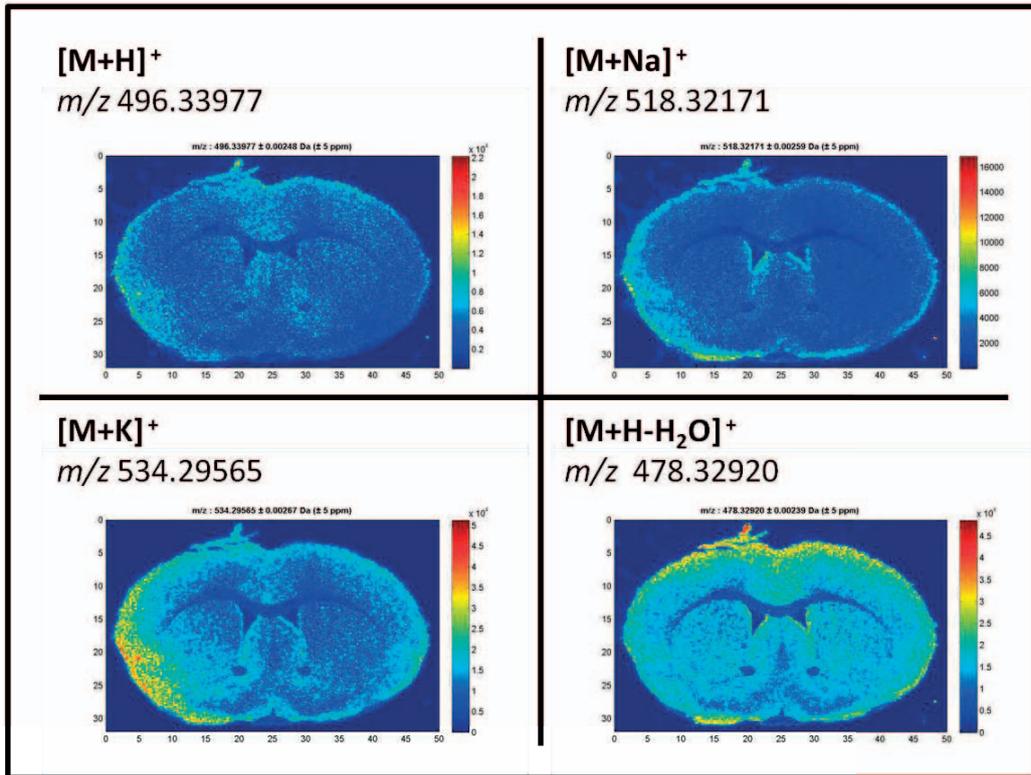


Abbildung 20

Beispiel der Zuordnung von Ionensignalen mit Hilfe von online verfügbaren Datenbanken und dem Vorhandensein von Ionensignalen verschiedener Addukte. Dieses Beispiel zeigt die Verteilung verschiedener Addukte einer Ausgangssubstanz (LPC (16:0)). Verteilungsmuster sind hierbei vergleichbar, Signalintensitäten sind bei verschiedenen Addukten unterschiedlich ausgeprägt. Erläuterungen siehe auch Text II.9.2.1.5

LPG(18:0) C₂₄H₄₉O₉P

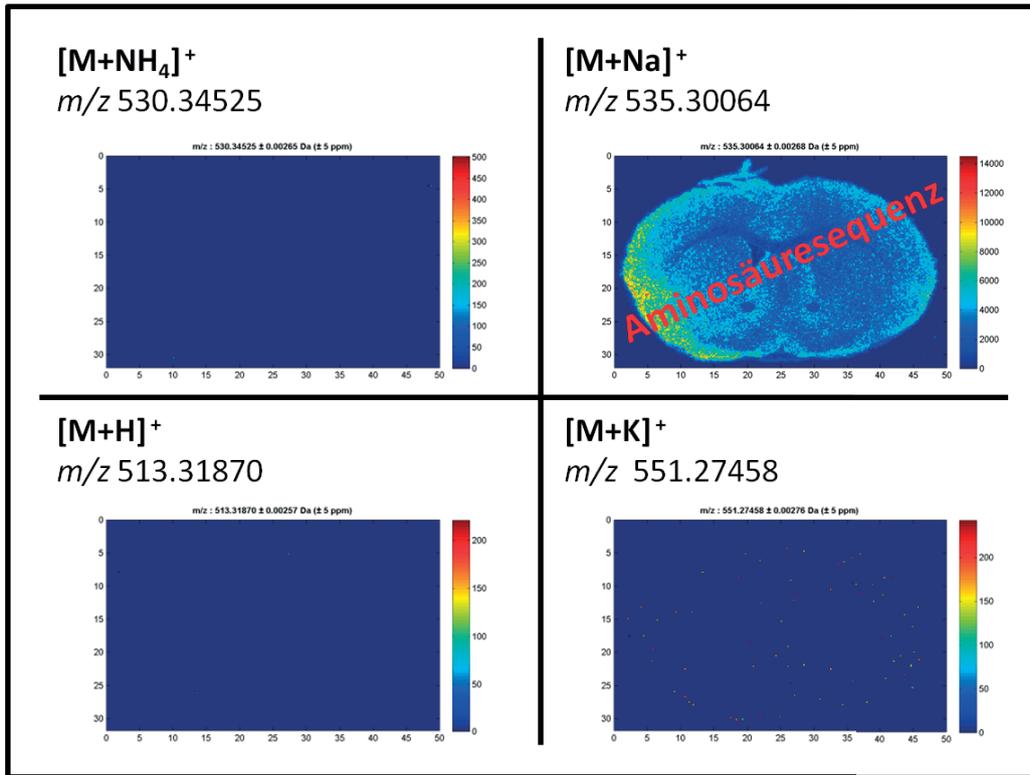


Abbildung 21

Beispiel der Zuordnung von Ionensignalen mit Hilfe von online verfügbaren Datenbanken und dem Vorhandensein von Ionensignalen verschiedener Addukte. Das Signal mit einem m/z Wert von 535,30064 könnte sowohl zum Na⁺-Addukt von LPG (18:0) als auch zu einer Aminosäuresequenz (MetArgLysThr) gehören. Das Fehlen von korrespondierenden LPG (18:0)-Addukten spricht gegen das Vorliegen von LPG (18:0) und für das Vorliegen einer Aminosäuresequenz. Weitere Erläuterungen siehe Text II.9.2.1.5

9.2.1.6 Berechnung der Massengenauigkeit und der mittleren quadratischen Abweichung (*root mean square error, RMSE*)

Um eine abgebildete Substanz auf der Grundlage der akkuraten Masse identifizieren zu können und ein Ionensignal zweifelsfrei einem Verteilungsmuster zuzuordnen, muss eine Massengenauigkeit im unteren ppm-Bereich gegeben sein [423]. Um diese Voraussetzungen für jedes angesprochene Ionensignal garantieren zu können, wurde die Massengenauigkeit sowie die mittlere quadratische Abweichung (RMSE) bestimmt. Dabei gilt:

m_g = akkurate / gemessene Masse

m_t = exakte / theoretische Masse

$$m_a = \text{Massengenauigkeit in ppm} = \frac{(m_g - m_t)}{m_t} \times 10^6$$

$$\text{RMSE in ppm} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (m_a)^2}{n}}$$

RMSE beschreibt im Grunde die Massengenauigkeit eines Ionensignals über alle Einzelspektren einer Gesamtmessung und kann graphisch dargestellt werden. Hierbei wird die Abweichung in ppm von der zugrundegelegten theoretischen Massen gegen die gemessene Signalintensität aufgetragen. Im Idealfall ergibt sich eine Gaußverteilung mit sehr geringer Streuung wie in Abbildung 22 A zu sehen ist, wodurch dieser Peak eindeutig als Ionensignal einer einzelnen Substanz angesprochen werden kann. In Abbildung 22 B hingegen sind eindeutig zwei Gaußverteilungen voneinander zu unterscheiden. Hier würde es in einem erstellten Bild also zur Überlagerung von Signalen zweier Massen und damit verschiedener Substanzen kommen. In einem solchen Fall müsste die Massenfensterbreite manuell angepasst werden.

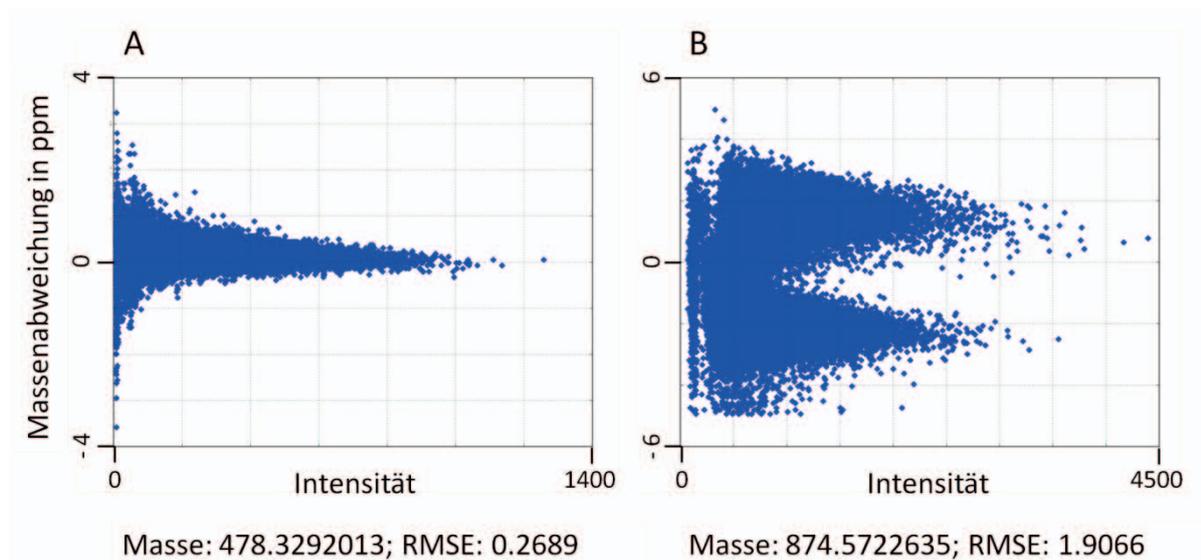


Abbildung 22
Exemplarische Darstellung von RMSE-Verteilungsmustern. Erläuterungen siehe Text II.9.2.1.6.

Die Massengenauigkeit lag für nahezu alle zugeordneten Signale aus Messungen im positiven Ionen-Modus bei kleiner 2 ppm, RMSE war stets kleiner als 3 ppm.

Bei den im negativen Ionen-Modus vorgenommenen Messungen kam es zu Problemen der internen Kalibrierung des Massenspektrometers. Dies hatte die Verschiebung aller Messwerte um einige ppm zur Folge. Zur Korrektur dieser Verschiebung wurde im Nachhinein eine manuelle Kalibrierung vorgenommen. Zu diesem Zweck wurde auf eine korrekte interne Messung zurückgegriffen und die eigenen Messungen anhand dieser rekaliert (siehe hierzu auch Abbildung 23). Als Folge dieses Vorgehens sind die Massengenauigkeiten aus Messung im negativen Ionen-Modus häufig ungenauer als 2 ppm. Zur Erstellung der gezeigten Abbildungen wurde jeweils manuell die Massenfensterbreite dem entsprechende Peak angepasst, was die Abbildung aller gemessenen Signale einer Masse gewährleistet. Hieraus ergeben sich korrekte, mit Werten aus Messung im positiven Ionen-Modus vergleichbare, RMSE-Werte.

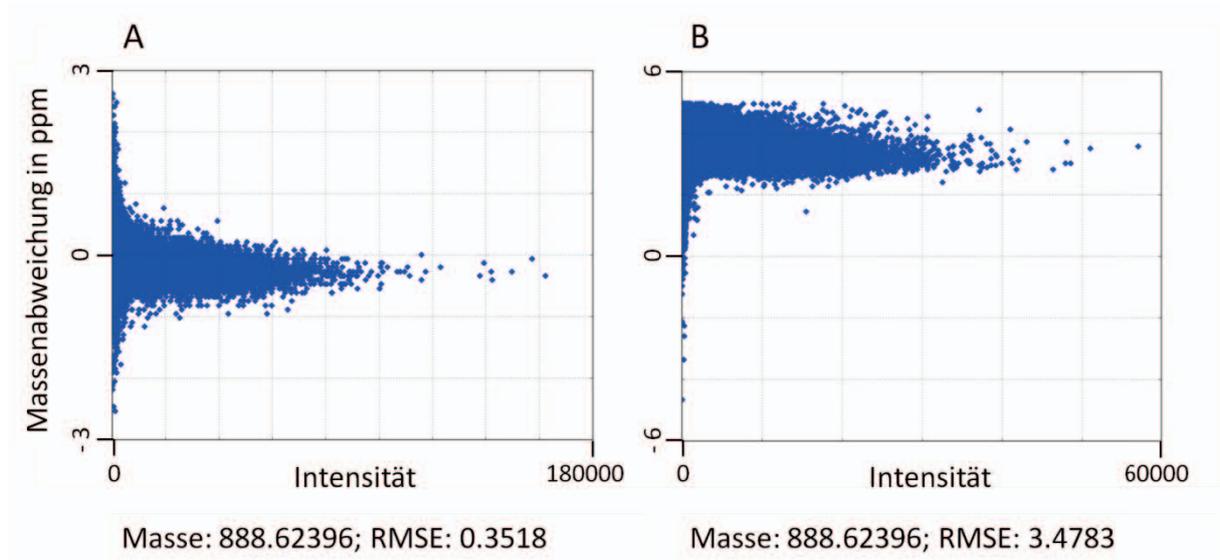


Abbildung 23

Darstellung der quadratischen Massenabweichung einer korrekten internen Messung (A) und einer eigenen Messung (B) im negativen Ionen-Modus für ein ubiquitär in Zellmembranen vorkommendes Sphingolipid (m/z 888,62; $C_{48}H_{91}NO_{11}S$). In B wird eine Abweichung von mehr als 3 ppm von der zu erwartenden theoretischen Masse deutlich.

Nach Validierung, Massenzuordnung gefundener Signale und Fertigstellung aller Bilder wurden diese qualitativ beurteilt und vergleichend betrachtet.

9.2.2 Immunfluoreszenz

9.2.2.1 Semiquantitativ

Die Intensität und Anzahl von STAT3 Signalen wurde in der Teilstudie „CyPPA“ für jeweils alle sechs Tiere einer Gruppe beurteilt. Jeder Beurteilung wurde ein Zahlenwert zugeordnet. Dies geschah entsprechend dem Schema in Tabelle 30. Es wurden für jedes Tier jeweils zwei Schnitte des OVLs beurteilt und anschließend arithmetisch gemittelt. Aus diesen Werten wurde der Mittelwert sowie der Standardfehler für beide Versuchsgruppen zum Perfusionszeitpunkt zwei Stunden nach Behandlung berechnet. Mit der Software GraphPad Prism erfolgte der statistische Vergleich der erhobenen Daten beider Gruppen mittels gepaartem Student’s t-Test. Ausreißer wurden nach dem Verfahren aus II.9.1.2.1 ausgeschlossen.

Beurteilung	Zahlenwert	Symbol
viele, starke Signale	5	+++
einige, stärkere Signale	4	++
wenige Signale	3	+
einzelne, schwache Signale	2	-+
keine Signale	1	-

Tabelle 30

Semiquantitativer Bewertungsmaßstab für die Beurteilung der Immunfluoreszenz.

9.2.2.2 Quantitativ

Zur Bestimmung der CD11 positiven Fläche wurde das Programm ImageJ-win64 verwendet. Mindestens vier Fotos der 20 fach vergrößerten Region der *fimbria hippocampi* wurden pro Tier (fünf Tiere pro Gruppe) ausgewertet. Hierzu wurde zunächst identisch für alle Fotos der Kontrast mittels der *rolling ball* Methode mit einem Radius von 30 Pixel angepasst und anschließend ein repräsentatives Areal der Größe 500 x 500 Pixel ausgewertet. Damit erhielt man den prozentualen Anteil der von Mikroglia bedeckten Fläche. Diese Werte wurden pro Tier arithmetisch gemittelt. Ausreißer wurden nach dem Verfahren aus II.9.1.2.1 ausgeschlossen. Alle Werte wurden als Mittelwert \pm Standardfehler mit GraphPad Prism dargestellt. Der Vergleich aller vier Behandlungsgruppen erfolgte mittels zwei-faktorieller ANOVA.

9.2.3 Bioassays

Die Menge des in der Probe vorhandenen biologisch aktiven Zytokins ist proportional (IL-6; Wachstumsrate) bzw. antiproportional (TNF- α ; Überlebensrate) zur Zahl vitaler Zellen und damit zur Menge gebildeter MTT-Formazan-Kristalle, deren Konzentration anhand der OD direkt bestimmt wurde. Mit Hilfe der gemessenen Werte für die Verdünnungsreihen der Standards konnte eine Eichkurve ermittelt werden. Diese zeigt typischerweise bei Abtragung der Zytokinkonzentration nach logarithmischer Skalierung gegen die gemessene OD in einem begrenzten Bereich einen linearen Verlauf. Anhand der Regressionsgleichung der Eichkurve sowie des Verdünnungsfaktors der Probe konnten die vorhandenen Zytokinmengen bestimmt werden. Es wurden nur Proben ausgewertet, deren OD im linearen Bereich der Eichkurve lagen. War dies nicht der Fall wurde die Bestimmung der entsprechenden Probe mit einer angepassten Verdünnung wiederholt.

Die statistische Auswertung erfolgte bei lediglich zwei zu vergleichenden Gruppen mit einem gepaarten Student's t-Test. Ansonsten wurde eine ein- oder zwei-faktorielle ANOVA nach Vorgaben aus II.9.1 angewendet.

9.2.4 Westernblot

Die Banden wurden mit dem ChemiDoc XRS Imaging System detektiert. Eine Quantifizierung der optischen Dichte der Banden wurde in Relation zu α -Tubulin als Kontrolle mittels der Quantity One Software durchgeführt. Molekulargewichte der detektierten Proteine waren 65 kDa für p65 und phospho-p65, 55 kDa für α -Tubulin und 35 kDa für I κ B α .

Die Ergebnisse wurden als Mittelwert \pm Standardfehler mit GraphPad Prism dargestellt. Die statistische Auswertung erfolgte bei zwei zu vergleichenden Gruppen mit einem Student's t-Test; bei vier zu vergleichenden Gruppen wurde eine zwei-faktorielle ANOVA angewendet.

9.2.5 Quantitative *real-time* PCR

Die erhobenen PCR-Daten wurden mittels relativer Quantifizierung auf Grundlage der $2^{-\Delta\Delta C_T}$ -Methode ausgewertet. Diese Methode beschreibt die relative Expression eines Zielgens in Relation zu einer Referenzgruppe [303]. Der C_T -Wert beschreibt dabei den Zyklus der PCR an dem die Signalstärke erstmals die Hintergrundfluoreszenz überschreitet. Dieser Punkt liegt in der exponentiellen Phase der Amplifikation (II.2.2.5.3). Da die PCR im Doppelansatz erfolgte, wurden die C_T -Werte beider Bestimmungen einer Probe arithmetisch gemittelt. ΔC_T ergab sich jeweils aus der Differenz des gemittelten C_T -Werts der Probe und dem C_T -Wert des Gens der endogenen Kontrolle. Um letztlich den $\Delta\Delta C_T$ -Wert bestimmen zu können, musste noch eine Referenzprobe festgelegt werden. Als Referenzprobe diente eine Probe der Kontrollgruppe mit einer basalen Expression des untersuchten Gens. Idealerweise war dies die Probe mit dem kleinste C_T -Wert. Die Differenz aus ΔC_T der Probe und ΔC_T der Referenz ergab den gesuchten $\Delta\Delta C_T$ -Wert. Mit der Formel $2^{-\Delta\Delta C_T}$ konnte die relative Expression jeder Probe gegenüber der Referenzprobe ermittelt werden. Voraussetzung für eine derartige Betrachtung ist dabei immer eine 100%ige Effizienz der PCR, also eine Verdopplung der Genkopien in jedem Zyklus. Dies wird vom Hersteller Life Technologies unter Verwendung der Originalprodukte und entsprechender Primer garantiert.

Variable	Rechnung
ΔC_T	C_T -Zielgen - C_T -endogene Kontrolle
$\Delta\Delta C_T$	ΔC_T -Zielgen - ΔC_T -Zielgen der Referenzprobe
relative Expression	$2^{-\Delta\Delta C_T}$

Für jede Tiergruppe wurden Mittelwert \pm Standardfehler der relativen Expression berechnet. Die Daten wurden zum zwei Stunden Perfusionszeitpunkt mittels gepaartem Student's t-Test betrachtet (zwei Gruppen). Zum 24 Stunden Perfusionszeitpunkt wurde eine zwei-faktorielle ANOVA (vier Gruppen) mit sich anschließendem Bonferroni *post-hoc* Test durchgeführt. Signifikante Unterschiede wurden bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ festgelegt. Ausreißer wurden, wie in II.9.1.2.1 beschrieben, nicht berücksichtigt.

9.2.6 HPLC

Über die Integration der Peak-Flächen (*area under the curve*) von Standardläufen und Probenmessungen wurden die Konzentration der Nukleotide der Proben ($n = 6$, nmol/mg Feuchtgewicht) bestimmt. Hierzu wurden die Verdünnungen der Proben und die Einwaagen (Feuchtgewicht der Probe) berücksichtigt. Die Werte der Doppelbestimmung je einer Probe wurden arithmetisch gemittelt. Für jede der beiden Gruppen wurden diese Daten als Mittelwert \pm Standardfehler dargestellt und mittels gepaartem Student's t-Test verglichen. Ausreißer wurde nach Vorgaben aus II.9.1.2.1 erfasst und nicht in die Analyse einbezogen.

III. Ergebnisse

1. Beeinflussung LPS-induzierter systemischer Entzündungsreaktionen durch den K⁺-Kanal Agonisten CyPPA

1.1 Beeinflussung physiologischer Parameter über einen Zeitraum von 24 Stunden durch periphere Injektion von CyPPA

Als Basis für die Überprüfung der anti-inflammatorischen Wirkung von CyPPA auf Entzündungsgeschehen wurde das etablierte Modell der LPS-induzierten, systemischen Entzündung verwendet. Es wurde allen als „LPS“ gekennzeichneten Tiergruppen einmalig 2,5 mg/kg KGW LPS i.p. verabreicht; Kontrollen erhielten PBS. Eine zweimalige Medikation im Abstand von 24 Stunden mit 15 mg/kg KGW CyPPA i.p. wurde bei allen als „CyPPA“ gekennzeichneten Tieren durchgeführt. Kontrollen zu CyPPA erhielten das Lösungsmittel und sind als „Solvent“ kenntlich gemacht. Die jeweils zweite Injektion mit Solvent bzw. CyPPA fand zeitgleich mit der LPS- bzw. PBS-Behandlung statt. Die Versuchsgruppen sind zur Übersicht in Tabelle 10 zusammengefasst.

1.1.1 Abdominale Temperatur

Alle Mäuse wurden zum Zeitpunkt $t = 0$ entsprechend der Legende in Abbildung 24 A injiziert. Jedes Tier wurde 24 Stunden zuvor, entsprechend des Injektionsregimes, vorbehandelt. Die telemetrische Erfassung der Körperkerntemperatur (T_{abd} [°C]) erfolgte ab dem Zeitpunkt $t = -2$ Stunden bis zum Zeitpunkt $t = 24$ Stunden. Die gewonnenen Daten wurden graphisch aufgetragen. Als Reaktion auf das Handling und die Injektion zeigten alle Tiere einen initialen Temperaturanstieg (Stresspeak). In Kontrolltieren (Solvent + PBS) wurde abgesehen vom Stresspeak ein normaler zirkadianer Temperaturverlauf mit erhöhter Körpertemperatur während der Dunkelphase / Aktivitätsphase aufgezeichnet. Dieser zirkadiane Rhythmus ging in Tieren nach LPS-Behandlung (Solvent + LPS sowie CyPPA + LPS) verloren. LPS induzierte eine erste Fieberphase im Zeitraum von ein bis drei Stunden (Haupteffekt Behandlung 2, LPS vs. PBS) nach der Behandlung. Dieser Phase schloss sich eine ausgeprägte Hypothermie an (Haupteffekt Behandlung 2, LPS vs. PBS Zeitraum 7 bis 20,75 Stunden). Neben diesem LPS-vermittelten Effekt konnte eine weitere interessante Beobachtung gemacht werden. Mit CyPPA behandelte Tiere (CyPPA + PBS / LPS) zeigten im Vergleich zu entsprechenden Kontrolltieren (Solvent + PBS / LPS) im Zeitraum bis drei Stunden nach der Injektion eine signifikant höhere Körpertemperatur (Haupteffekt Behandlung 1, CyPPA vs. Solvent). Dieser Effekt erschien bei näherer Betrachtung additiv zum LPS-induzierten Temperaturanstieg. Lediglich mit CyPPA behandelte Tiere zeigten einen vergleichbaren Temperaturanstieg wie Tiere, die nur mit LPS behandelt wurden. Der Temperaturanstieg der Gruppe „CyPPA + LPS“ wies tendenziell die stärkste Temperaturerhöhung auf. Der Fieberindex bestätigte diese Beobachtung genau wie die signifikante Erhöhung der Körpertemperatur nach LPS-Behandlung im Vergleich zu PBS-

behandelten Tieren (Haupteffekt Behandlung 2, sowie im *post-hoc* Test zwischen den Gruppen „Solvent + PBS“ und „Solvent + LPS“; $p < 0,01$) und die signifikante Erhöhung der Körpertemperatur von mit CyPPA + PBS im Vergleich zu mit Solvent + PBS behandelten Tieren ($p < 0,05$) über einen Zeitraum bis vier Stunden nach Injektion (Abbildung 24 B). Durch CyPPA bedingte Unterschiede im Fieberindex sind statistisch über einen Zeitraum von 24 Stunden (Abbildung 24 C) nicht mehr nachweisbar. Hingegen war eine massive LPS-bedingte Reduktion der Körpertemperatur über 24 Stunden nachweisbar (Haupteffekt Behandlung 2).

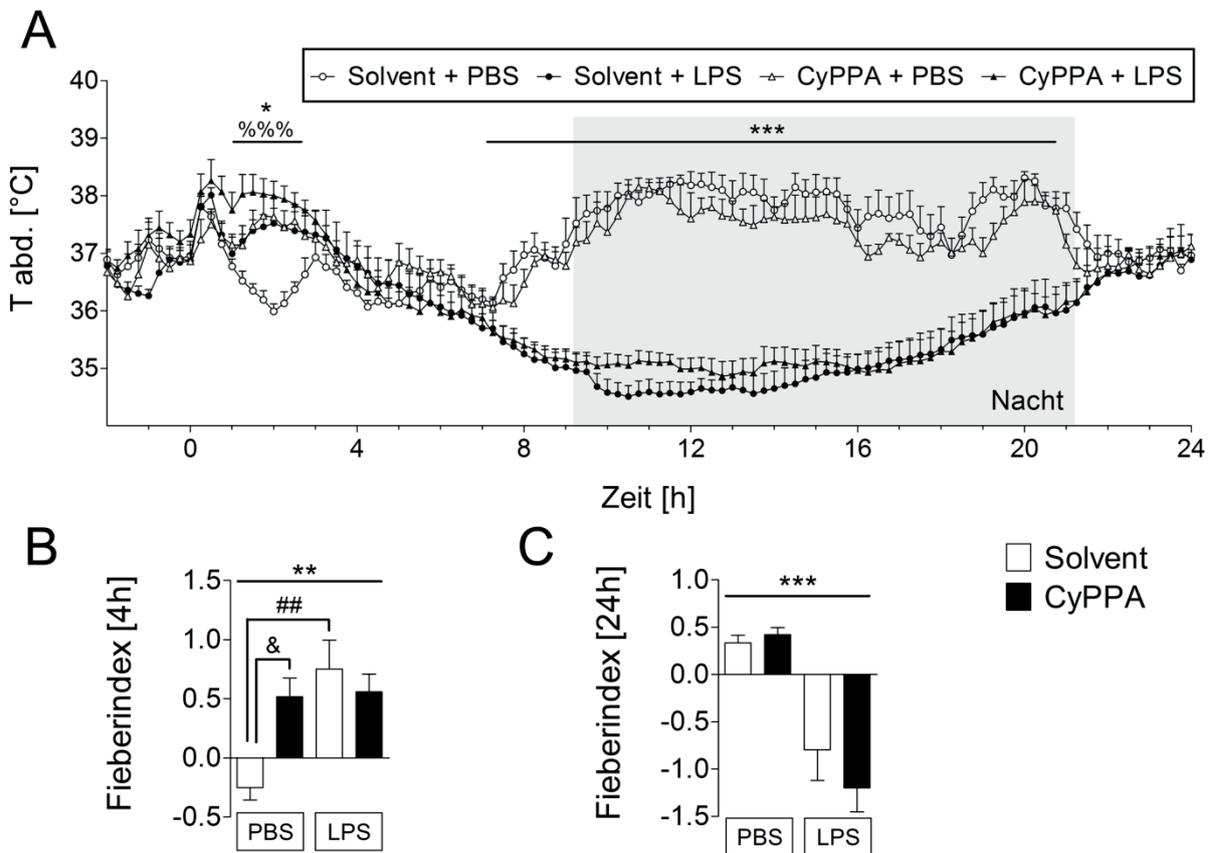


Abbildung 24

Darstellung der abdominal gemessenen Körpertemperatur (T abd.) und des Fieberindex (B und C) der i.p. mit CyPPA oder Solvent und PBS oder LPS behandelten Tiere der Teilstudie „CyPPA“. In A ist der Temperaturverlauf dargestellt. Die Dunkelphase ist mit einem grauen Kasten hinterlegt und mit „Nacht“ gekennzeichnet. Alle Tiere zeigten in der ersten Stunden *post injectionem* einen stressbedingten Anstieg der Körpertemperatur. LPS-behandelte Tiere zeigten im Zeitraum ein bis drei Stunden nach der Injektion eine Erhöhung der Körpertemperatur, gefolgt von einer signifikanten Reduktion der Körpertemperatur im Zeitraum 7-20,75 Stunden im Vergleich zu mit PBS behandelten Tieren. Mit CyPPA behandelte Tiere wiesen eine signifikante Erhöhung der Körpertemperatur im Zeitraum von 1-2,75 Stunden auf. Zeitpunkt der Injektion $t = 0$; % Haupteffekt Behandlung 1 = CyPPA vs. Solvent; * Haupteffekt Behandlung 2 = LPS vs. PBS; # Solvent + PBS vs. Solvent + LPS; & Solvent + PBS vs. CyPPA + PBS; Tierzahlen: $n = 5$ pro Gruppe

p-Werte: A: % $p = 0$, * $p = 0,012$, 0; B: * $p = 0,0079$; # $p < 0,01$, & $p < 0,05$; C: * $p < 0,0001$

1.1.2 Motorische Aktivität

Auch die motorische Aktivität der Mäuse wurde nach der Injektion für alle Gruppen telemetrisch im Zeitraum $t = 0$ (Injektion) bis $t = 24$ Stunden erfasst und sowohl im Verlauf als auch kumulativ betrachtet (Abbildung 25 und Abbildung 26). Das deutlich erhöhte Aktivitätsprofil der PBS-behandelten Gruppen in der Dunkelphase spiegelt den natürlichen zirkadianen Rhythmus wider (Abbildung 25). LPS reduzierte insbesondere die nächtliche Aktivität der Tiere (Abbildung 25, Haupteffekt Behandlung 2, LPS vs. PBS im Zeitraum 1–6,75 und 9–21,75 Stunden). Ähnlich den Temperaturdaten fiel jedoch eine Besonderheit in der Behandlungsgruppe „CyPPA + PBS“ auf. Tiere dieser Gruppe zeigten in der Verlaufsdarstellung tendenziell eine gegenüber Tieren der Kontrollgruppe (Solvent + PBS) erhöhte Aktivität in den ersten vier Stunden *post injectionem*. Dieser aktivitätsinduzierende Effekt stellte sich in der kumulativen Betrachtung der Aktivitätsprofile deutlicher dar (Abbildung 26).

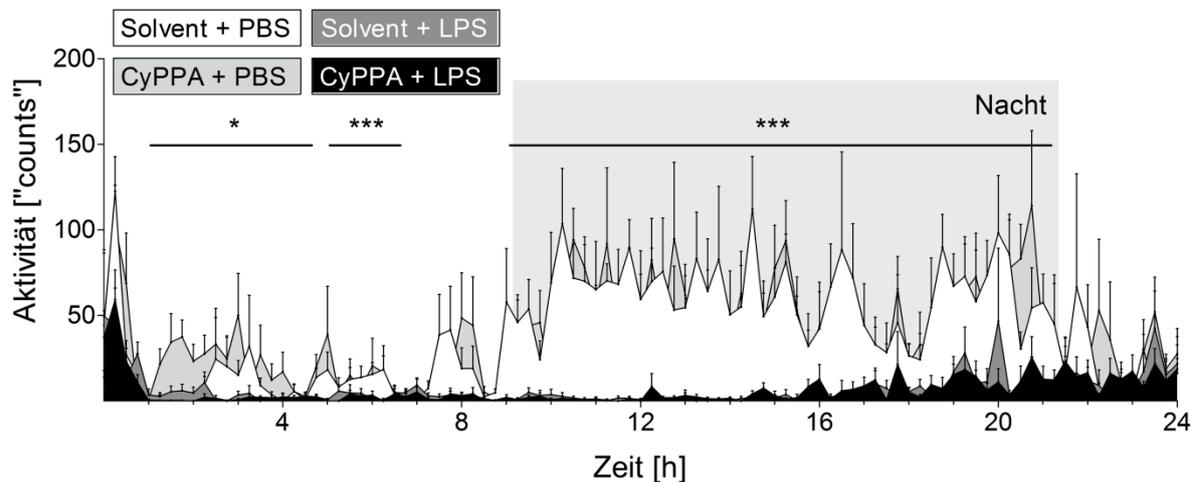


Abbildung 25

Verlauf der Aktivität der i.p. mit CyPPA oder Solvent und PBS oder LPS behandelten Tiere der Teilstudie „CyPPA“ über einen Zeitraum von 24 Stunden. Die Dunkelphase ist mit einem grauen Kasten hinterlegt und mit „Nacht“ gekennzeichnet. Alle Tiere zeigten in der ersten Stunden *post injectionem* einen stressbedingten Anstieg der motorischen Aktivität. LPS reduzierte die motorische Aktivität im Zeitraum 1–6,75 Stunden, sowie 9–21,75 Stunden. Tiere der Gruppe „CyPPA + PBS“ zeigten im Vergleich zu Tieren der Gruppe „Solvent + PBS“ initial eine Tendenz zu erhöhter motorischer Aktivität. Zeitpunkt der Injektion $t = 0$; * Haupteffekt Behandlung 2, LPS vs. PBS; Tierzahlen: $n = 5$ pro Gruppe, Solvent + LPS: $n = 4$
p-Werte: * $p = 0,012$ und $p = 0$

Kumulative Aktivitätscounts waren nach LPS-Behandlung signifikant in allen betrachteten Zeiträumen verringert (2, 4, 8, 12 und 24 Stunden, Haupteffekt Behandlung 2, LPS vs. PBS). Die Aktivität „CyPPA + PBS“-behandelter Tiere über zwei, vier sowie über acht Stunden zeigte eine statistisch signifikante Erhöhung verglichen mit Tieren der Gruppe „CyPPA + LPS“ und „Solvent + PBS“.

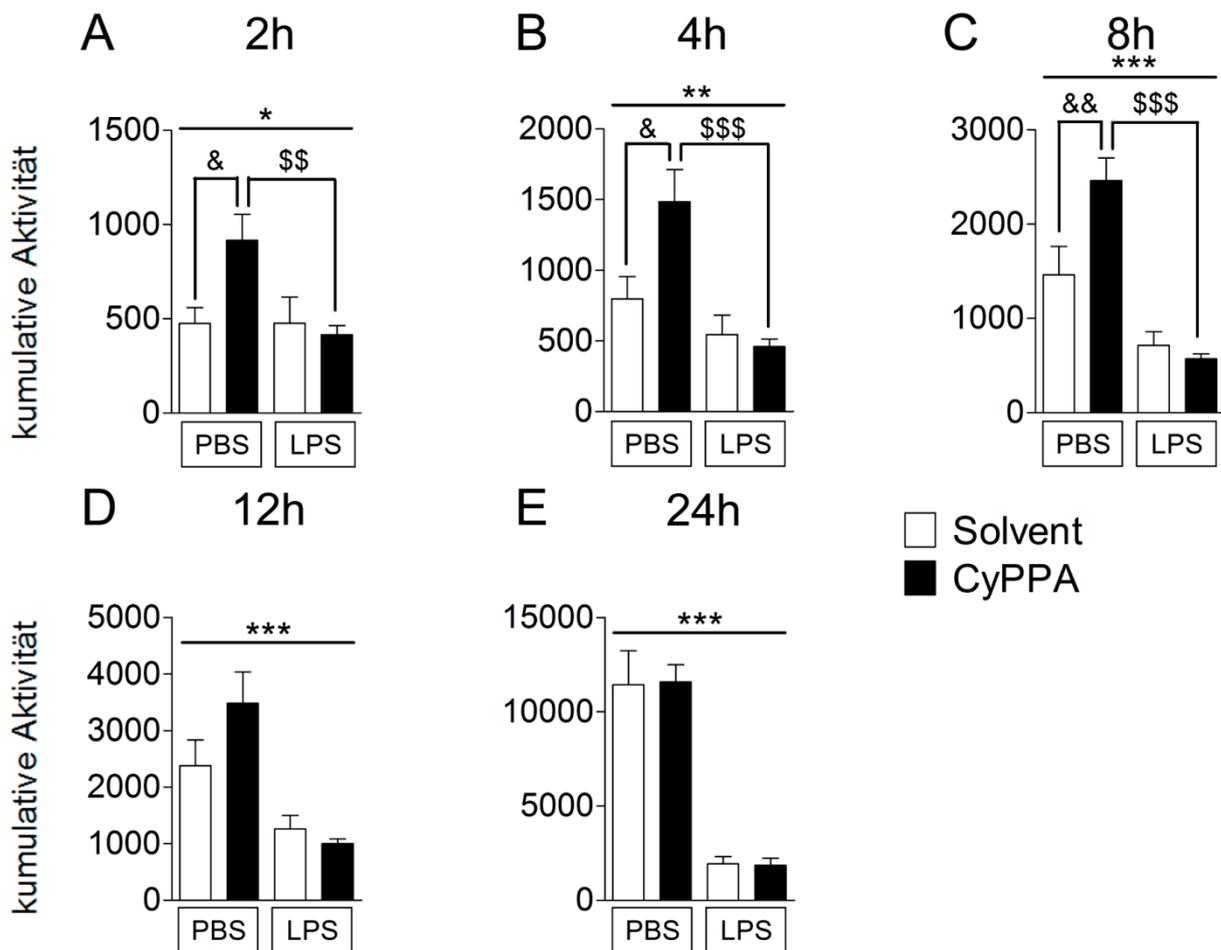


Abbildung 26

Kumulative Aktivität über verschiedene Zeiträume (A-E, 2, 4, 8, 12 und 24 Stunden) nach Gabe von Solvent oder CyPPA und PBS oder LPS. LPS reduziert die motorische Aktivität verglichen mit den Kontrollen. Die Gabe von CyPPA + PBS hingegen erhöhte die Aktivität der Mäuse über zwei, vier und acht Stunden signifikant. * Haupteffekt Behandlung 2, LPS vs. PBS; & Solvent + PBS vs. CyPPA + PBS; \$ CyPPA + PBS vs. CyPPA + LPS. Tierzahlen: n = 5 pro Gruppe; Tierzahlen: n = 4 für Solvent + LPS

p-Werte: A: * $p = 0,0323$, \$ $p < 0,01$, & $p < 0,05$; B: * $p = 0,0013$, \$ $p < 0,001$, & $p < 0,05$; C: * $p < 0,0001$, \$ $p < 0,001$, & $p < 0,01$; D: * $p = 0,0004$; E: * $p < 0,0001$

1.1.3 Futter- und Wasseraufnahme

Abbildung 27 stellt die Futter- und Wasseraufnahme über 24 Stunden, prozentual gemessen zum Körpergewicht der Tiere, dar. Es war eine deutliche LPS-abhängige Anorexie sowie Adipsie nachweisbar (Haupteffekt Behandlung 2, LPS vs. PBS). CyPPA hatte keinen Einfluss auf die Futter- und Wasseraufnahme der Tiere.

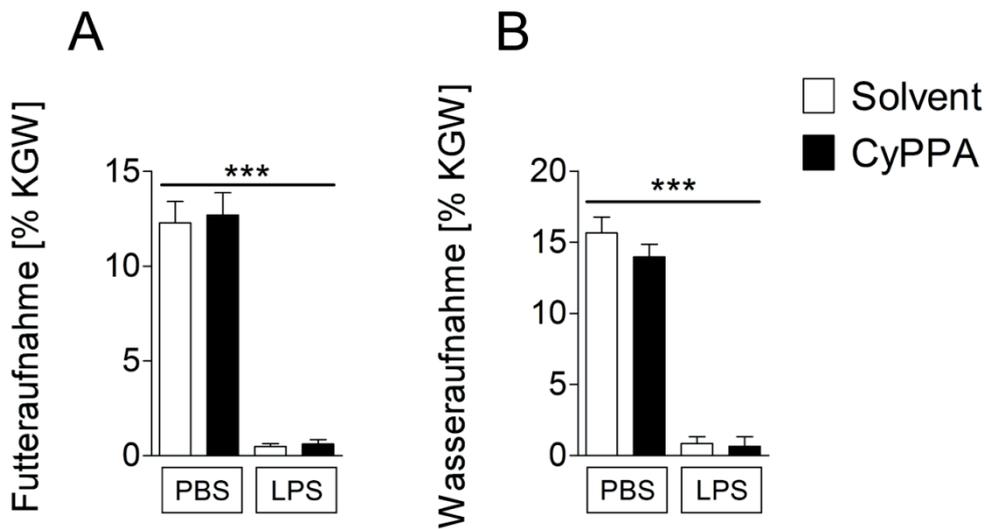


Abbildung 27

Darstellung der Futter- (A) und Wasseraufnahme (B) der Tiere prozentual zu ihrem Körpergewicht (KGW) über 24 Stunden nach Behandlung mit Solvent oder CyPPA und PBS oder LPS. * Haupteffekt Behandlung 2, LPS vs. PBS; Tierzahl: n=5 pro Gruppe
p-Werte: A: * $p < 0,0001$; B: * $p < 0,0001$

1.1.4 Körpergewicht

Das Körpergewicht der Tiere wurde unmittelbar vor sowie 24 Stunden nach der Behandlung erhoben und dokumentiert. Die LPS-Gabe führte in beiden Gruppen zu einer signifikanten Gewichtsabnahme. Dahingegen hatte CyPPA keinen Einfluss auf die Gewichtsentwicklung.

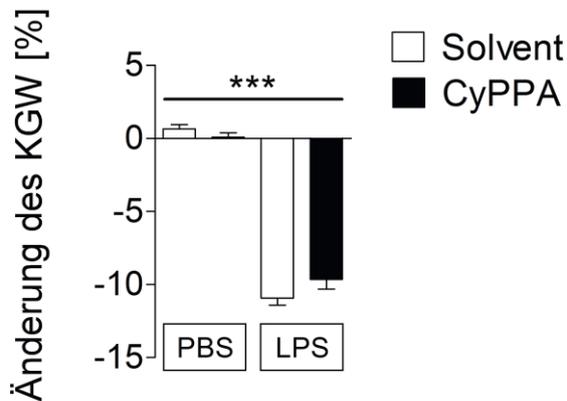


Abbildung 28

Änderung des Körpergewichts (KGW) der Tiere in % 24 Stunden nach Injektion von Solvent oder CyPPA und PBS oder LPS. * Haupteffekt Behandlung 2, LPS vs. PBS; Tierzahl: n = 5 pro Gruppe
p-Wert: * $p < 0,0001$

1.2 Beeinflussung peripherer Zytokine nach i.p. Injektion von CyPPA

Um einen eventuellen Einfluss von CyPPA auf die Konzentration im Blut zirkulierender bioaktiver und inflammatorischer Mediatoren zu erfassen wurden IL-6- und TNF- α -Plasmaproben mittels Bioassays 24 Stunden nach Stimulation analysiert.

1.2.1 IL-6

Kontrollgruppen zeigten basale zirkulierende IL-6-Werte. LPS-Stimulation erhöhte die IL-6-Plasmakonzentration (Haupteffekt Behandlung 2, LPS vs. PBS). IL-6-Werte im Plasma „CyPPA + LPS“-behandelter Tiere erschienen verglichen mit Tieren der Gruppe „Solvent + LPS“ tendenziell erhöht. Ein statistisch signifikantes Niveau wurde aber nicht erreicht.

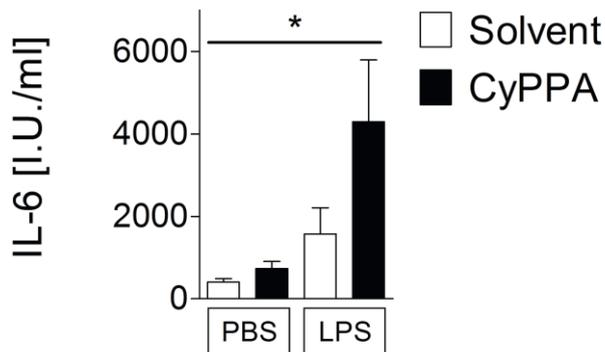


Abbildung 29

Plasmakonzentrationen von IL-6 zum Zeitpunkt 24 Stunden nach Behandlung mit CyPPA oder Solvent und LPS oder PBS. * Haupteffekt Behandlung 2, LPS vs. PBS; Tierzahl: n = 5 pro Gruppe

p-Wert: * p = 0,0108

1.2.2 TNF- α

Bioaktives TNF- α wurde im Rahmen der Untersuchungen in keiner Plasmaprobe detektiert.

1.3 Einfluss von CyPPA auf die zentrale mRNA-Expression inflammatorischer Marker

Die hypothalamische mRNA-Expression wichtiger inflammatorischer Marker wurde mittels PCR untersucht. Dabei wurden IL-6, SOCS3 (als negativer Regulator von STAT3 und Aktivitätsmarker einer JAK-STAT3 Aktivierung), COX2, mPGES, CD 68 (als Marker aktivierter Mikroglia und Makrophagen), NF-IL6 sowie I κ B α (als Inhibitor und Aktivitätsmarker von NF κ B) betrachtet.

24 Stunden nach Behandlung mit CyPPA oder Solvent und LPS oder PBS (Abbildung 30) konnte kein Effekt von CyPPA auf die zentrale Expression inflammatorischer Marker festgestellt werden. Zu diesem Zeitpunkt dominierte der statistisch signifikante, LPS-induzierte Anstieg von SOCS3 (B), COX2 (C), mPGES (D) sowie I κ B α (G) (Haupteffekt Behandlung 2, LPS vs. PBS).

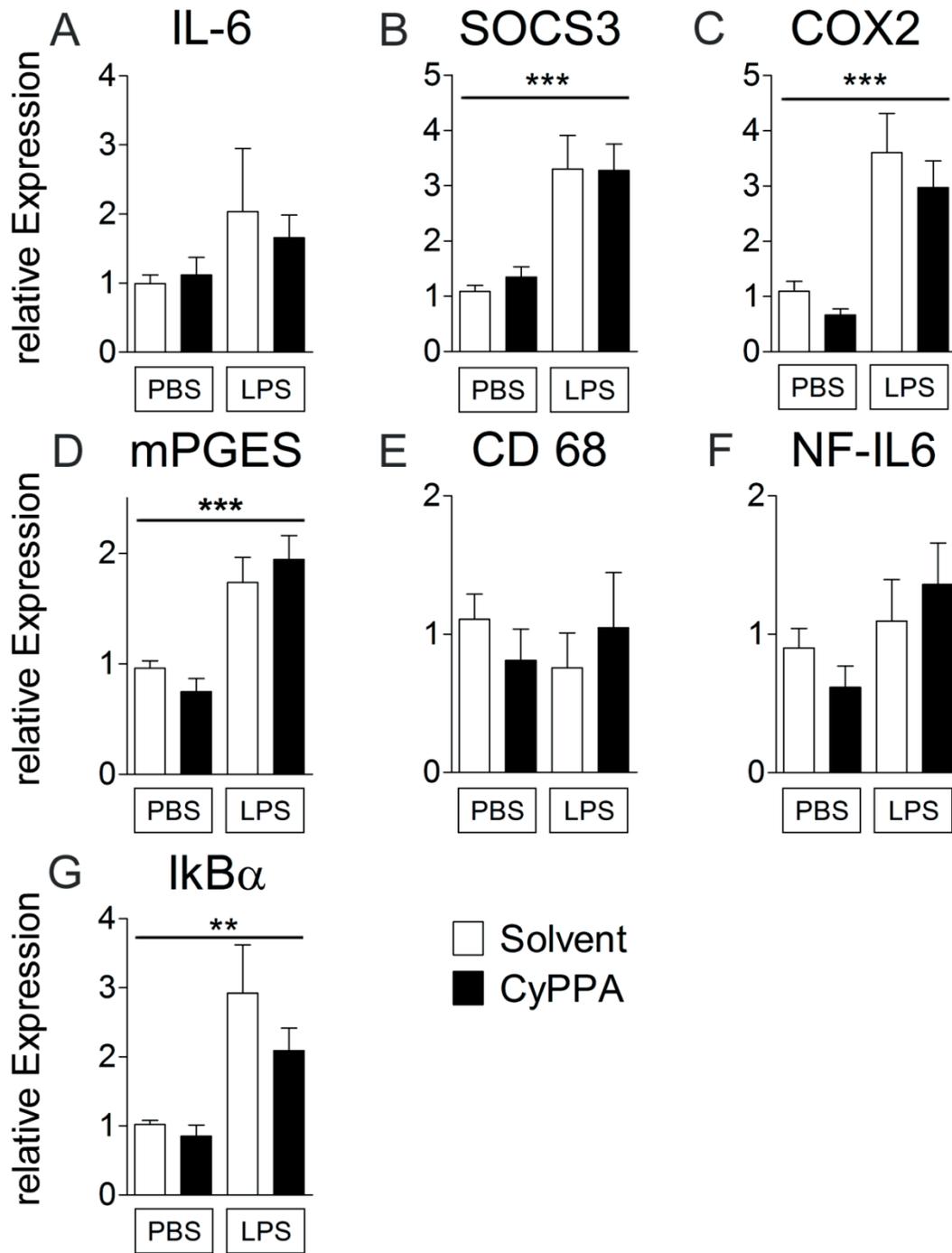


Abbildung 30

Hypothalamische Expression verschiedener inflammatorischer Marker 24 Stunden nach Stimulation mit CyPPA oder Solvent und LPS oder PBS. * Haupteffekt Behandlung 2, LPS vs. PBS; Tierzahl: n = 5 pro Gruppe

p-Werte: B: * p < 0,0001; C: * p < 0,0001; D: * p < 0,0001; G: * p = 0,0011

1.4 Immunreaktivität

1.4.1 Qualitative und quantitative Betrachtung von CD11b als Marker der mikroglialen Aktivierung

Da kürzlich *in vitro* gezeigt werden konnte, dass CyPPA die LPS-induzierte Aktivierung von Mikrogliazellen konzentrationsabhängig antagonisiert [141], wurde zur näheren Charakterisierung des Einflusses von CyPPA auf mikrogliale Aktivierung *in vivo* eine Immunfluoreszenz zum Nachweis von CD11b 24 Stunden nach der Stimulation durchgeführt. Die CD11b-Expression mikroglialer Zellen wurde als Maßstab für deren Reaktivität genutzt.

In der Immunfluoreszenz stellten sich die CD11b-Signale im Bereich der *fimbria hippocampi* in den Kontrollgruppen als wenig bis feinverzweigte, zum Teil punktförmige, feinmaschige Fortsätze dar. In LPS-behandelten Tieren nahm die Intensität des Fluoreszenzsignals zu. Die Zellfortsätze waren in ihrer Anzahl reduziert, deutlich vielverzweigter, größer und flächiger ausgebildet (Abbildung 31, IV). Im Rahmen der quantitativen Betrachtung wurden keine Unterschiede in der durch Mikroglia bedeckten Fläche zwischen den Gruppen nachgewiesen (Abbildung 31, III).

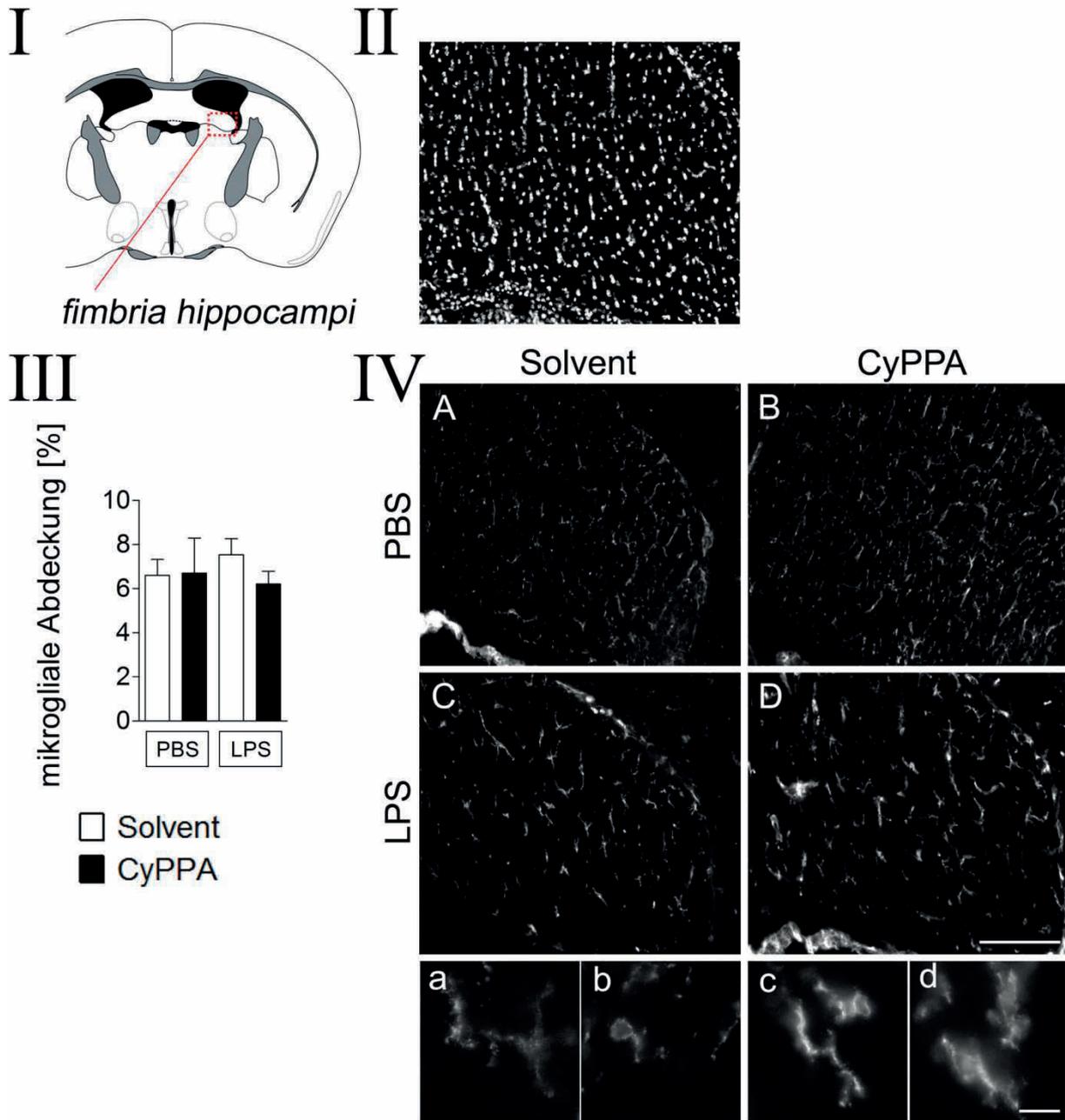


Abbildung 31

Erfassung der mikroglialen Aktivierung anhand einer CD11b Immunfluoreszenz aus Gewebeschnitten der *fimbria hippocampi* (I) 24 Stunden nach Verabreichung von CyPPA oder Solvent und LPS oder PBS. Eine Kernfärbung (DAPI-Signal) ist für die untersuchte Region zur besseren Strukturerkennung exemplarisch in II dargestellt. CD11b-Signale (IV) sind weiß auf schwarzem Grund abgebildet. Mit LPS behandelte Tiere (IV C, D, c und d) zeigten generell „gröbere“ und hellere CD11b-Signale als Lösungsmittelkontrollen (IV A, B, a und b). Die quantitative Betrachtung der mikroglial bedeckten Fläche ließ keinerlei Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen erkennen (III). Alle Schnitte wurden gleichzeitig prozessiert und CD11b Immunfluoreszenz zwischen den Versuchsgruppen mit gleicher Belichtung dokumentiert. Größenmarker in D = 100 μm , gilt für A-D; Größenmarker in d = 10 μm , gilt für a-d; Tierzahl: n = 5 pro Gruppe

2. Weiterführende Untersuchungen der durch den K⁺-Kanal Agonisten CyPPA verursachten Wirkungen

CyPPA-Behandlung in PBS-behandelten Kontrolltieren führte zu einem Anstieg sowohl der abdominal gemessenen Körpertemperatur als auch der motorischen Aktivität in den ersten drei bis vier Stunden nach CyPPA-Gabe. Um zu untersuchen, ob es sich hierbei um eine spezifische Wirkung von CyPPA handelt und welche Mechanismen hierbei eine Rolle spielen wurden weitere Untersuchungen angeschlossen. Hierzu wurden jeweils weitere Tiere zwei Stunden nach Behandlung mit „CyPPA + PBS“ oder mit „Solvent + PBS“ perfundiert und Organe und Blutproben gewonnen (je Gruppe n = 6).

2.1 Physiologische Parameter zwei Stunden nach peripherer Injektion von CyPPA

Abbildung 32 fasst die erhobenen Daten der untersuchten physiologischen Parameter zusammen. Die telemetrische Erfassung der Körperkerntemperatur (T abd. [°C]) erfolgte ab dem Zeitpunkt t = -2 Stunden bis zum Zeitpunkt t = 2 Stunden. Die motorische Aktivität ist ab dem Zeitpunkt der Injektion dargestellt (t = 0). CyPPA erhöhte die Körpertemperatur; dies erreichte 1,75 Stunden nach Stimulation ein signifikantes Niveau (Abbildung 32 A). Der Fieberindex zeigte über die gesamten zwei Stunden die gleiche Tendenz, erreichte aber keine statistische Signifikanz (Abbildung 32 B).

Die aktivitätssteigernde Wirkung von CyPPA erreichte in diesem Experiment kein signifikantes Niveau (Abbildung 32 C und D), korrelierte also zeitlich nicht direkt mit der Temperaturerhöhung.

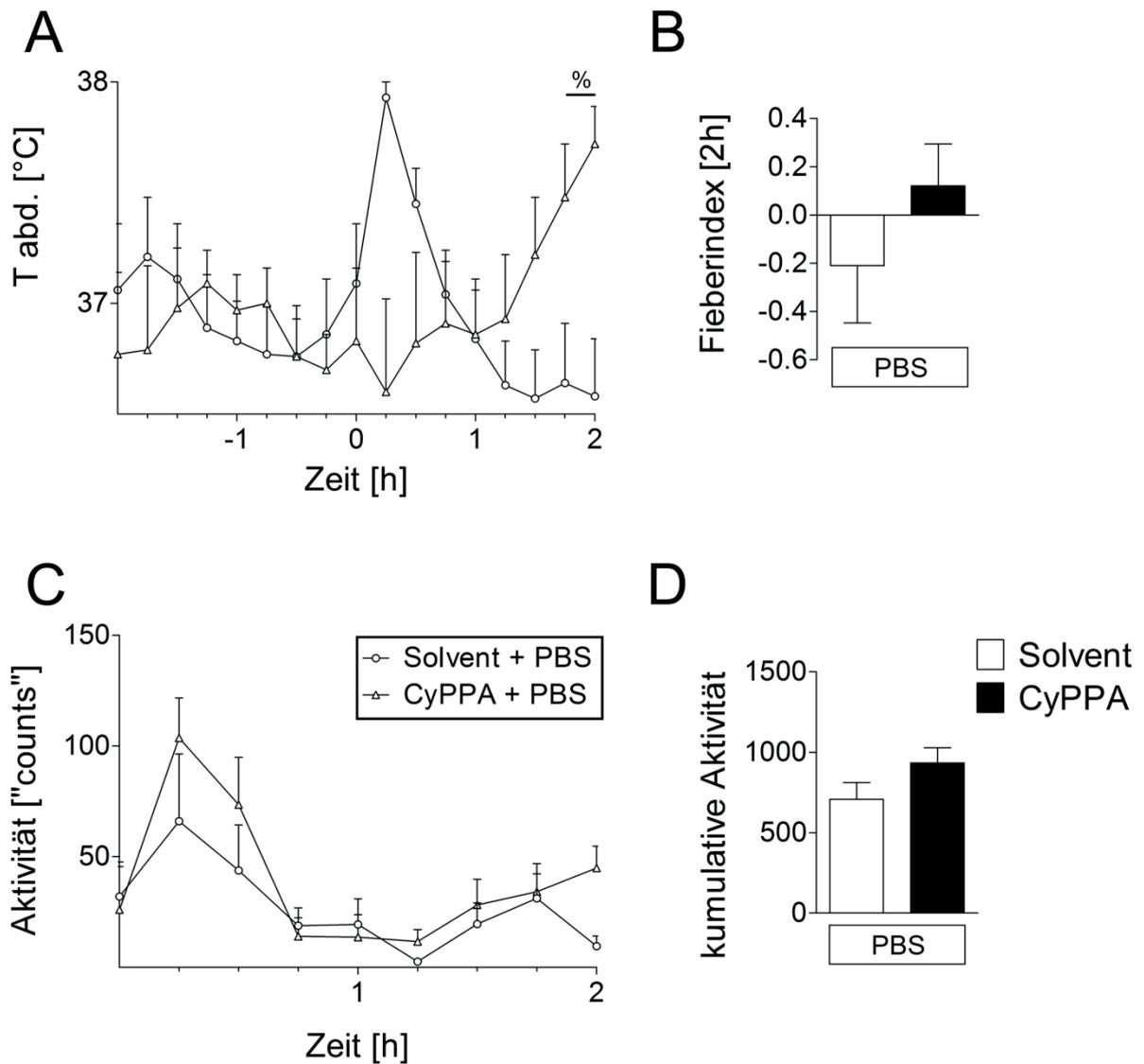


Abbildung 32

Körpertemperatur (T abd., A), Fieberindex (B) sowie motorische Aktivität (C) und kumulative Aktivität über zwei Stunden (D) von Mäusen nach Injektion mit „CyPPA + PBS“ oder „Solvent + PBS“. Mit CyPPA behandelte Tiere zeigten einen signifikanten Anstieg der abdominal erfassten Temperatur am Ende (letzten 15 Minuten) des Beobachtungszeitraums. % Solvent + PBS vs. CyPPA + PBS; Tierzahl: n = 6 pro Gruppe
 p-Wert: A: * p = 0,016

2.2 Erfassung peripherer Zytokine nach einer Behandlung mit CyPPA

2.2.1 IL-6

IL-6-Plasmakonzentrationen zum Zeitpunkt zwei Stunden *post injectionem* entsprachen basalen Werten und unterschieden sich nicht zwischen den Gruppen.

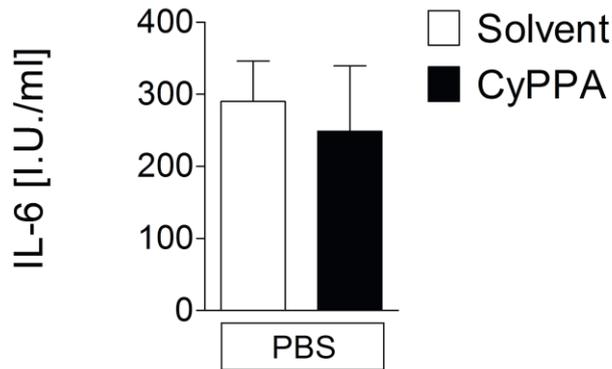


Abbildung 33

Plasmakonzentrationen von IL-6 zum Zeitpunkt zwei Stunden nach Injektion mit CyPPA bzw. Solvent und PBS. Tierzahl: n = 6 pro Gruppe
p-Wert: p = 0,7058

2.2.2 TNF- α

Bioaktives TNF- α wurde im Rahmen der Untersuchungen in keiner Plasmaprobe detektiert.

2.3 Zentraler Einfluss auf inflammatorische Marker

Analog zu den Untersuchungen mit einem Endzeitpunkt nach 24 Stunden (III.1.3) wurden hypothalamische sowie corticale mRNA-Expressionen inflammatorischer Marker zwei Stunden nach der Behandlung mit CyPPA oder dessen Lösungsmittel analysiert.

2.3.1 Hypothalamische mRNA-Expression

Interessanterweise erschien auf hypothalamischer Ebene nach CyPPA-Stimulation die Expression (Abbildung 34) von NF-IL6 (F) und I κ B α (G) gegenüber der Kontrolle erhöht; ein ebensolcher Trend ließ sich bei der Untersuchung von CD68 erkennen (E). Die Expression von SOCS3, in seiner Funktion als negativer Regulator von STAT3, war hingegen deutlich reduziert (B). Sowohl IL-6, COX2 als auch mPGES zeigten sich unbeeinflusst von der Behandlung mit CyPPA (A, C, D).

Hypothalamus

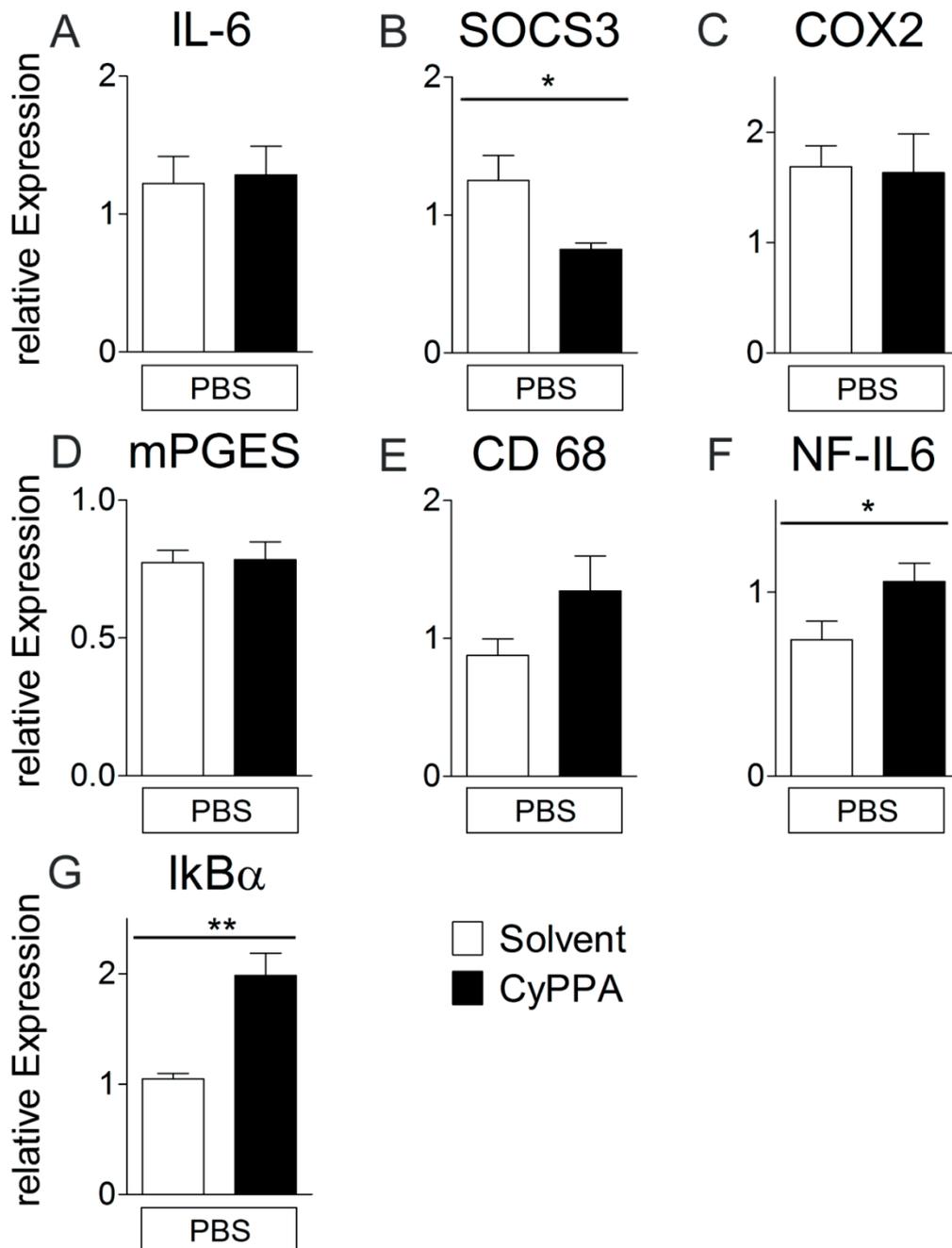


Abbildung 34

Hypothalamische Expression verschiedener inflammatorischer Marker zwei Stunden nach Stimulation mit CyPPA bzw. Solvent und PBS. * CyPPA vs. Solvent; Tierzahl: n = 6 pro Gruppe
 p-Werte: B: * p = 0,0144; F: * p = 0,0494; G: * p = 0,0011

2.3.2 Corticale mRNA-Expression

Die corticale Expression von IκBα war ebenso wie im Hypothalamus nach der Behandlung signifikant erhöht (Abbildung 35 G). Dahingegen erreichte die NF-IL6-Expression kein signifikantes Niveau wie im Hypothalamus (F). Die Reduktion der SOCS3-Expression des

Hypothalamus war im Cortex nicht nachweisbar (B). Ebenso zeigten sich keine Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen für mPGES, CD 68, COX2 und IL-6 (D, E, C, A).

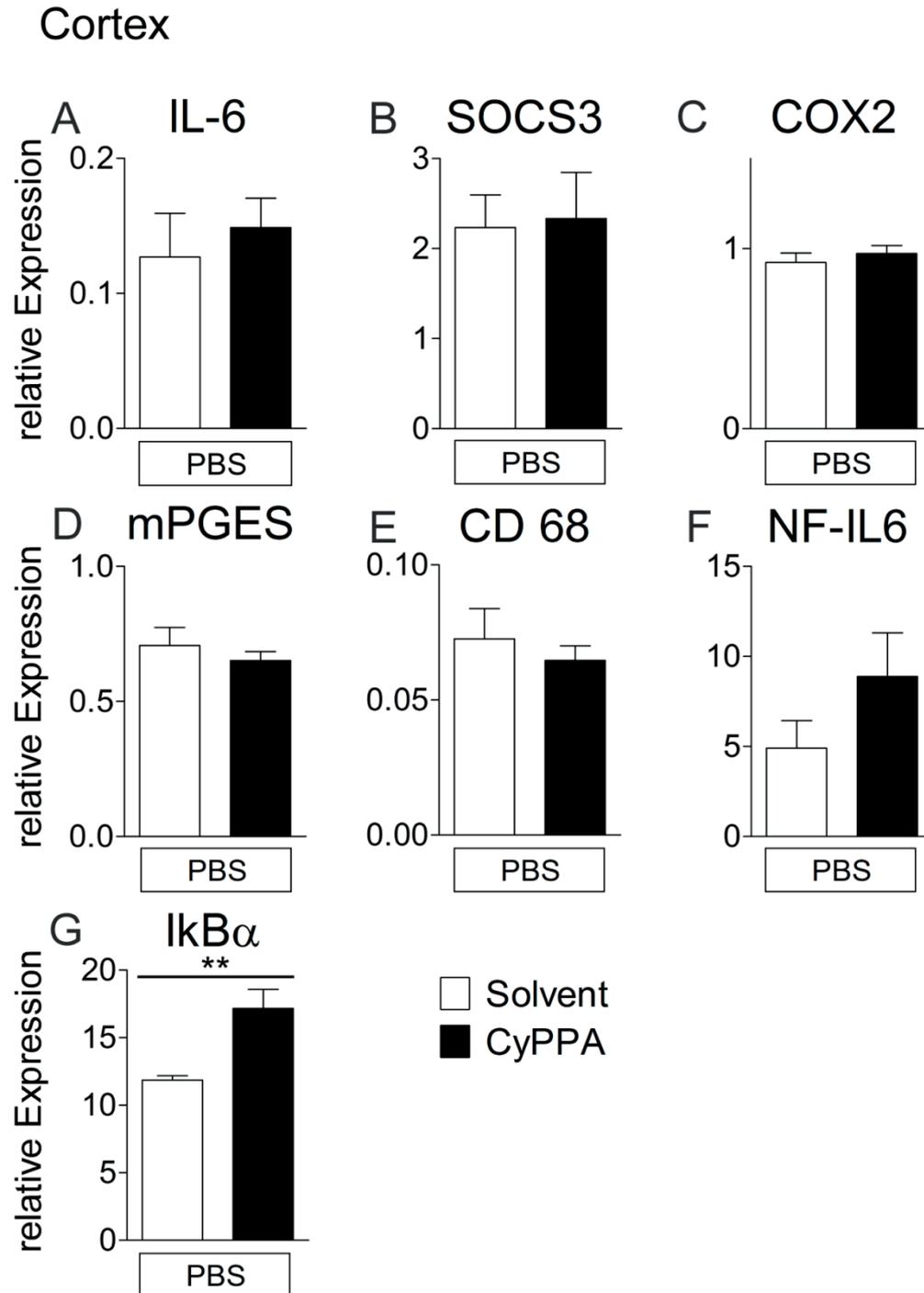


Abbildung 35
 Corticale Expression verschiedener inflammatorischer Marker zwei Stunden nach Stimulation mit CyPPA bzw. Solvent und PBS. * CyPPA vs. Solvent; Tierzahl: n = 6 pro Gruppe
 p-Wert: G: * p = 0,0045

2.3.3 Corticale Expressionsmuster auf Proteinebene

Die erhöhte mRNA-Expression von I κ B α im Hypothalamus und Cortex zwei Stunden nach CyPPA-Behandlung war ein Hinweis auf eine modulatorische Wirkung des K⁺-Kanal Agonisten auf den NF κ B-Signalweg. Um diese Hypothese weiter zu untersuchen wurden Analysen verschiedener spezifischer Marker dieses Signalwegs auf Proteinebene (Westernblot) angeschlossen (Abbildung 36). Es ist bekannt, dass die Phosphorylierung von p65 (pp65) zeitlich mit dem Abbau von I κ B zusammenfällt und schließlich in der Aktivierung von p65 mündet [390]. In der vorliegenden Studie waren I κ B α sowie pp65 in Cortexproben nicht durch CyPPA-Behandlung beeinflusst (B und C). CyPPA reduzierte hingegen p65-Protein signifikant gegenüber der Kontrolle (A). Der Anteil von phosphoryliertem zu unphosphoryliertem p65 differierte jedoch nicht zwischen den Behandlungsgruppen (D und E).

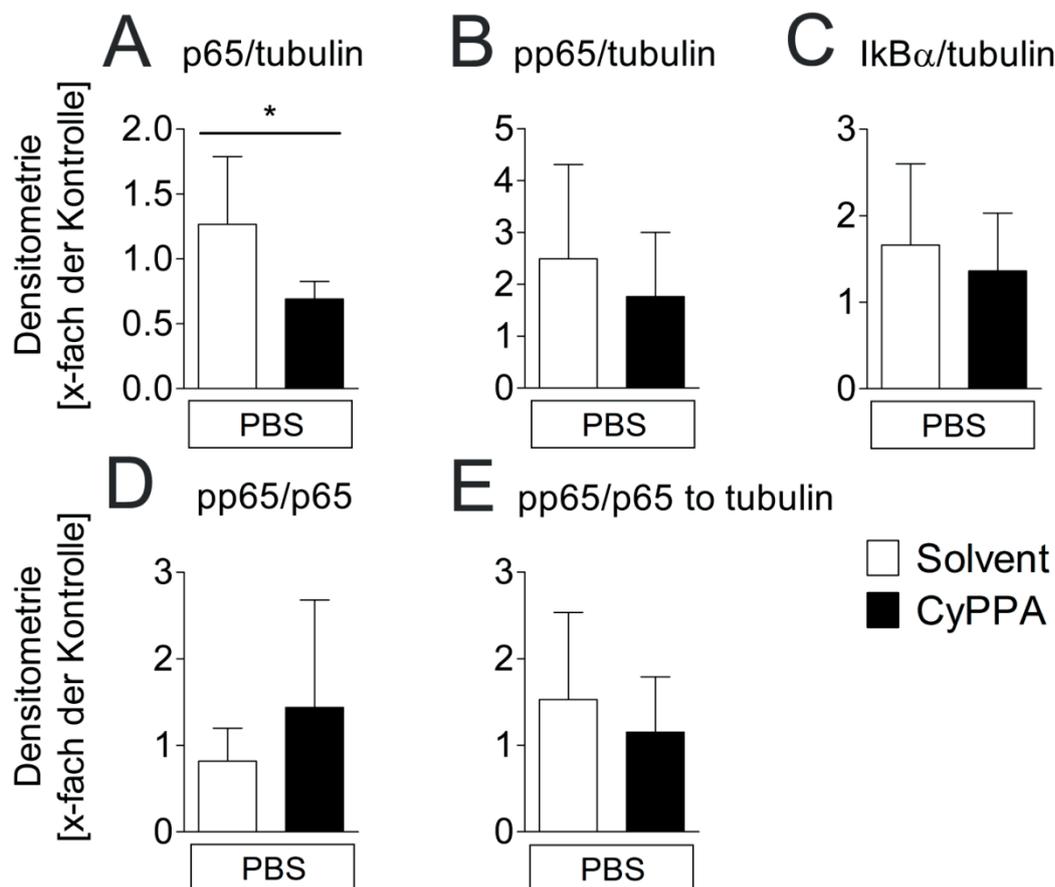


Abbildung 36

Relative Quantifizierung verschiedener inflammatorischer Marker auf Proteinebene (Westernblot) zwei Stunden nach Stimulation mit CyPPA bzw. Solvent und PBS. Lediglich die p65-Expression war in der behandelten Tiergruppe signifikant gegenüber den Kontrollen reduziert. * CyPPA vs. Solvent; Tierzahl: n = 6 pro Gruppe
p-Wert: A: * p = 0,0257

2.3.4 Semiquantitative Bewertung des Immunfluoreszenznachweises von STAT3

Da die Expression von SOCS3 zwei Stunden nach Behandlung mit CyPPA in der PCR reduziert war (III.2.3), wurde weiterführend eine Analyse der möglichen STAT3-Aktivierung auf Proteinebene mittel Immunfluoreszenz angeschlossen. In beiden Gruppen fanden sich im OVLT keine nukleären sondern nur wenige, schwache zytoplasmatische STAT3-Signale (rot) (Abbildung 37). Eine Semiquantitative Betrachtung der STAT3-Signalstärke ergab keine sichtbaren Unterschiede zwischen den zwei Behandlungsgruppen.

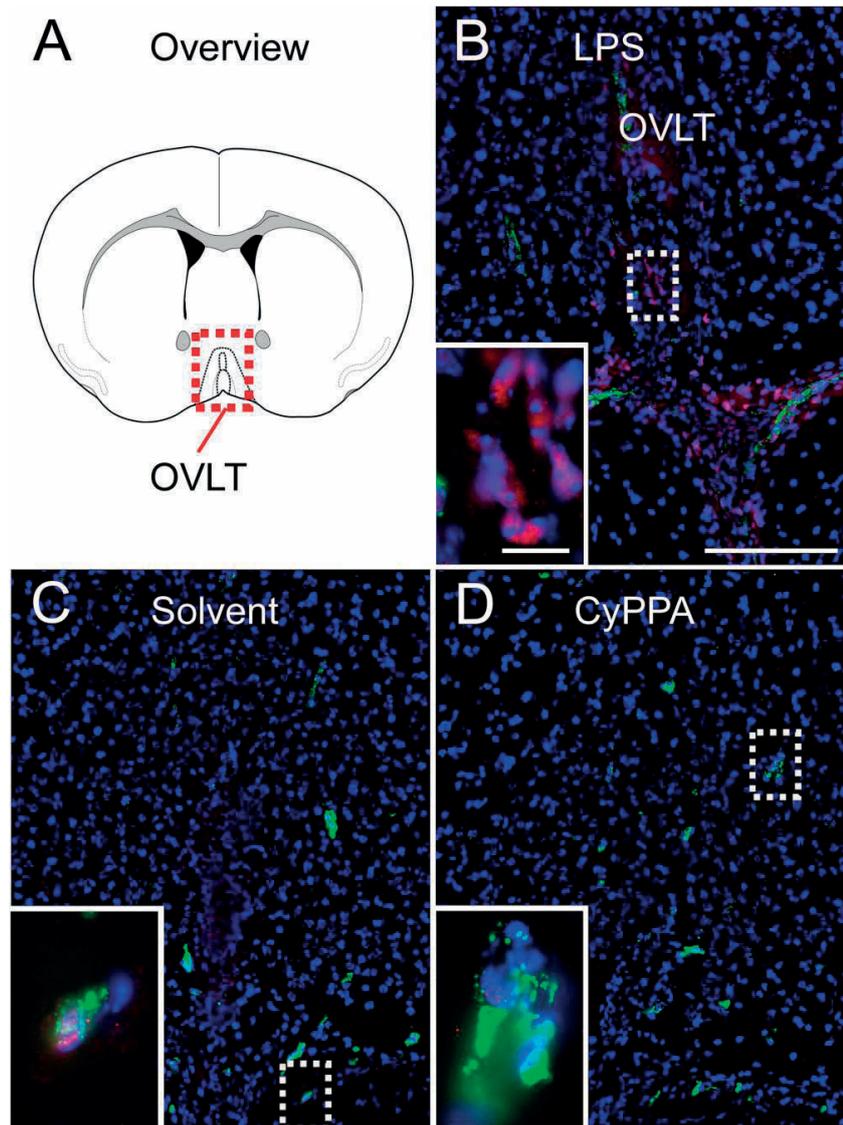


Abbildung 37

Nachweis von *signal transducer and activator of transcription 3* (STAT3, rot) mittels Immunfluoreszenz in Gehirnschnitten im Bereich des *Organum vasculosum laminae terminalis* (OVLT). Zur besseren Orientierung wurde zusätzlich der von Willebrandt Faktor (grün) als Gefäßmarker dargestellt. Zellkerne sind blau (DAPI) markiert. A zeigt eine schematische Übersicht der betrachteten Region. In B ist eine Aufnahme eines mit 2,5 mg/kg LPS behandelten Tieres zu sehen, welches zahlreiche nukleäre STAT3-Signale aufweist. Diese Signale waren in mit Solvent (C) oder CyPPA (D) behandelten Tieren nur sehr vereinzelt und dann lediglich in zytoplasmatischer Lokalisation nachweisbar. Größenmarker in B = 100 µm, repräsentativ für B-D; Größenmarker in den Detailaufnahmen = 10 µm, repräsentativ für alle Detailaufnahmen.

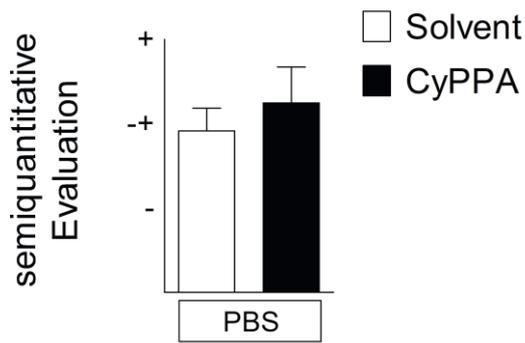


Abbildung 38

Semiquantitative Evaluation der Immunfluoreszenz von *signal transducer and activator of transcription 3* (STAT3) 2 Stunden nach Injektion von Solvent oder CyPPA im *Organum vasculosum laminae terminalis*. In beiden Gruppen waren lediglich vereinzelt schwache zytoplasmatische STAT3-Signale detektierbar. Tierzahl: n = 6 pro Gruppe

2.4 Auswirkungen von CyPPA auf hepatische Nukleotidspiegel

Als denkbarer Erklärungsansatz für den beobachteten Anstieg der Körpertemperatur in CyPPA-behandelten Tieren kommt eine induzierte Erhöhung der metabolischen Rate in Betracht. Zur Abklärung dieser möglichen Ursache wurden mittels der Ionenpaar-Umkehrphasen-HPLC verschiedene im Energiestoffwechsel relevante Nukleotide aus Leberproben als Maß des Energieumsatzes bestimmt (Abbildung 39).

Es wurden die Konzentrationen von Adenosin (A), Adenosinmonophosphat (AMP, B), Adenosindiphosphat (ADP, C), Adenosintriphosphat (ATP, D), Guanosindiphosphat (GDP, E) und Guanosintriphosphat (GTP, F) bezogen auf das Feuchtgewicht (FG) der eingewogenen Lebermenge bestimmt.

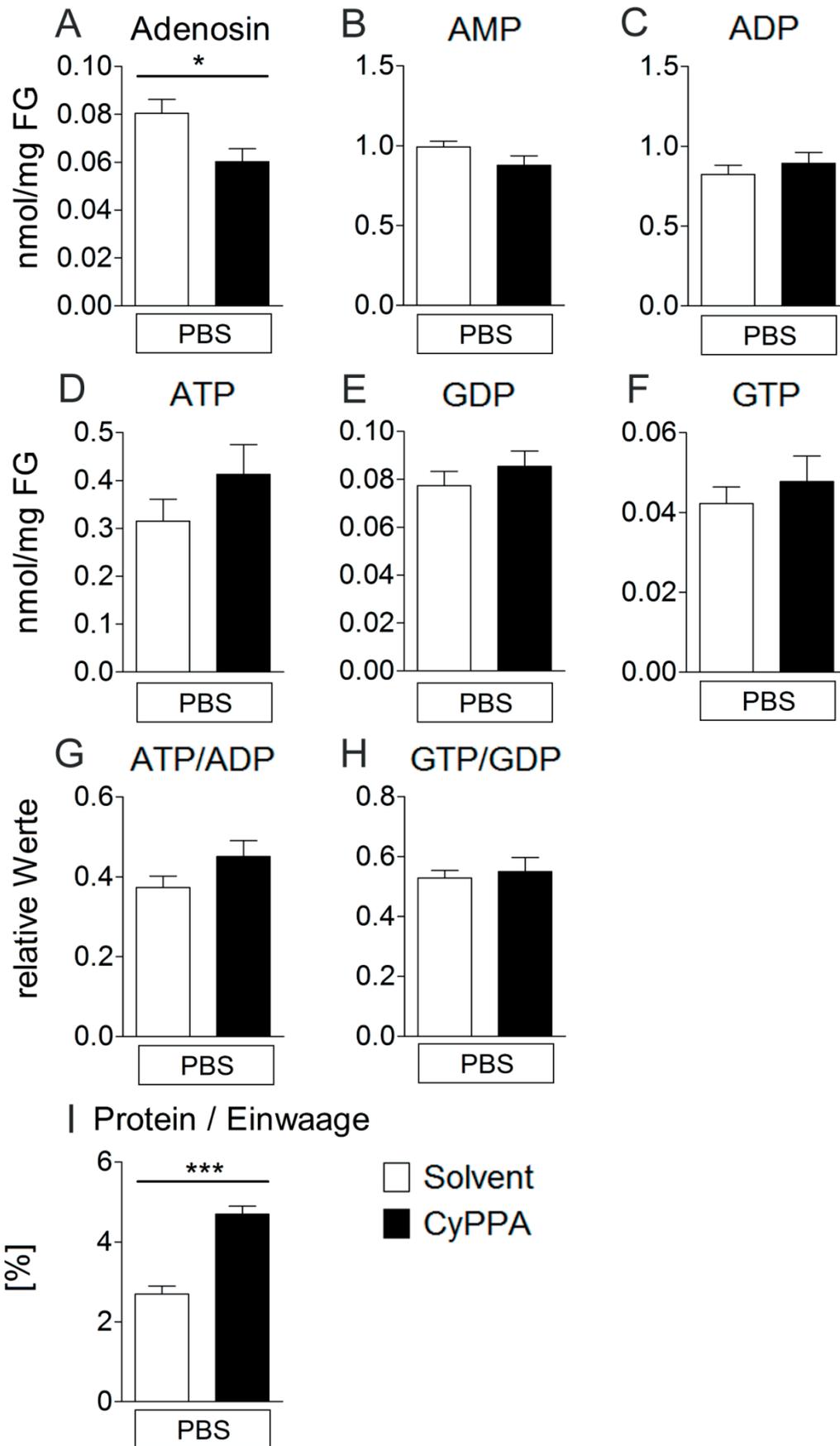


Abbildung 39

**Ergebnisse der Nukleotid- und Proteinbestimmung aus Leberproben von Tieren der Versuchsgruppen „CyPPA + PBS“ und „Solvent + PBS“ jeweils zwei Stunden nach der Behandlung: Nukleotidkonzentrationen wurden auf das eingewogene Feuchtgewicht (FG) bezogen. Für Adenosin ließ sich ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen nachweisen. Der Quotient aus ATP und ADP (G) lässt, ebenso wie die Einzelbetrachtung vor allem von ATP (D), eine Tendenz hin zu energiereichen Formen der Nukleotide nach der Behandlung mit CyPPA vermuten. Des Weiteren wurde ein massiver Anstieg des Leberproteingehalts nach einer CyPPA-Behandlung nachgewiesen (I). * CyPPA + PBS vs Solvent + PBS; Tierzahl: n = 6 pro Gruppe
p-Werte: A: * p = 0,0273; I: * p < 0,0001**

Eine signifikante Reduktion nach der Behandlung mit „CyPPA + PBS“ konnte für Adenosin gezeigt werden (A). Die ATP-Konzentration stieg dahingegen tendenziell im Vergleich zur Kontrollgruppe an (D).

Um eine sichere Validierung der erhobenen Daten zu ermöglichen, wurden Quotienten (G und H) aus jeweils energiereicher (ATP, GTP) und energieärmerer Form (ADP, GDP) der Nukleotide gebildet. Nach der Behandlung mit dem K⁺-Kanal Agonisten CyPPA wurde hier vor allem für das Verhältnis von ATP zu ADP ein leichter Trend in Richtung der energiereichen Form erkennbar, erreichte aber keine statistische Signifikanz.

Nebenbefundlich wurde bei der Proteinbestimmung eine deutliche Erhöhung des Proteingehalts der Leber im Vergleich zur Kontrollgruppe festgestellt (I).

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass sich durch die Gabe von CyPPA energiebereitstellende Nukleotide sowie Proteine in der Leber in ihrer Zusammensetzung ändern.

3. Basale Bedingungen und LPS-induzierte systemische Entzündung bei C57Bl/6N und Fat-1 Mäusen

Auf der Grundlage des etablierten Modells einer systemischen, LPS-induzierten Entzündung sollte der vielfach postulierte anti-inflammatorische Effekt von ω -3 FS und deren Metaboliten überprüft werden. Außerdem sollte der Fragestellung nachgegangen werden, ob erhöhte Konzentrationen von ω -3 FS in Fat-1 Mäusen zu verringerten LPS-induzierten Krankheitssymptomen führen. Hierzu wurden sowohl Fat-1 Tiere als auch C57Bl/6N Tiere unter Normalfutter oder unter einer ω -3 defizienten Diät gehalten. Stimulationen der Tiere wurden sowohl mit einer niedrigen (50 μ g/kg) als auch mit einer hohen (2,5 mg/kg) LPS-Dosis durchgeführt. Kontrollen erhielten PBS. Statistische Vergleiche beschränken sich jeweils auf zwei ausgewählte Zeiträume (1-4 Stunden und 10-15 Stunden) und decken die erste und bei hoch dosierten LPS-Gaben die zweite Fieberphase ab.

3.1 Bei normaler Fütterung beider Genotypen

Zunächst wurden Tiere beider Genotypen unter Normaldiät mit einer geringen LPS-Dosis (50 μ g/kg) stimuliert.

3.1.1 Einfluss auf physiologische Parameter

3.1.1.1 Abdominale Temperatur

Die vergleichende Betrachtung der abdominalen Temperaturverläufe beider Genotypen ist in Abbildung 40 dargestellt. Tiere erhielten zum Zeitpunkt $t = 0$ einmalig 50 μ g/kg Körpergewicht (KGW) LPS. Als Vergleichswerte wurden hier abdominale Temperaturen unter basalen Bedingungen (Baseline) einige Tage vor Behandlung herangezogen. Tiere zeigten als Reaktion auf Handling und Injektion einen kurzen, stressbedingten Temperaturanstieg. Unbehandelte Tiere hatten einen regulären zirkadianen Tag-Nacht-Rhythmus. Nach der Stimulation entwickelten WT eine Fieberantwort, die zur Baseline im Zeitraum von ein bis vier Stunden signifikant unterschiedlich war (A, $p = 0,001$). Dieser LPS-induzierte Effekt war zwar auch tendenziell in Fat-1 erkennbar, erreichte aber kein statistisches Signifikanzniveau (B, $p = 0,121$). Der direkte, statistische Vergleich beider Genotypen ergab interessanterweise jedoch keinen Unterschied in der initialen Fieberphase (C, $p = 0,357$). Trotzdem konnte die Gegenüberstellung aller vier Versuchsgruppen einen signifikanten Effekt auf die Temperaturentwicklung aufzeigen (D, Haupteffekt Behandlung, $p = 0,003$).

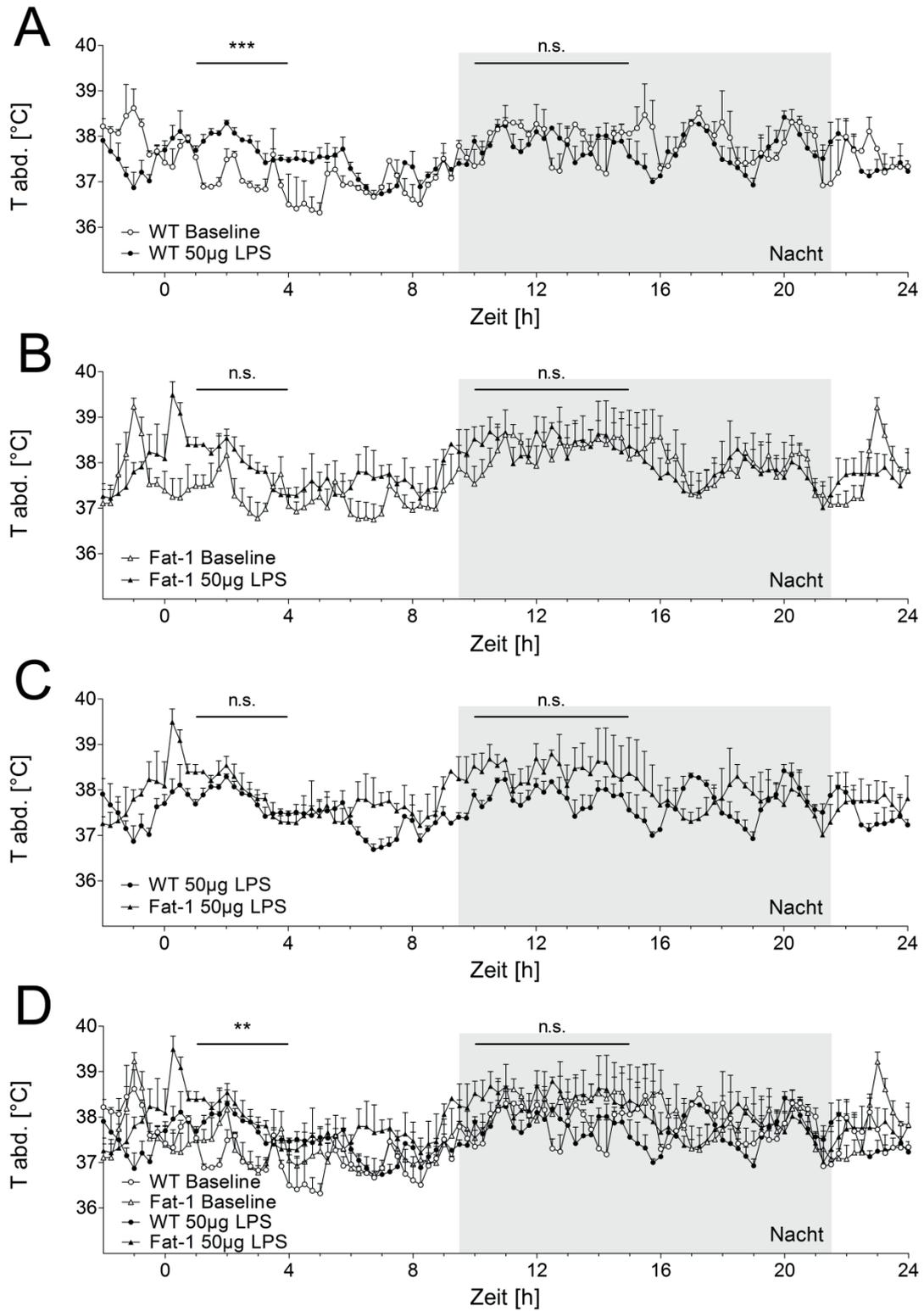


Abbildung 40

Darstellung der abdominal gemessenen Körpertemperatur (T abd.) der LPS (50 µg/kg KGW) stimulierten, normal gefütterten Tiere der Teilstudie „Fat-1“. Es sind jeweils Temperaturverläufe dargestellt. Die Dunkelphase ist mit einem grauen Kasten hinterlegt und mit „Nacht“ gekennzeichnet. In A ist der Fieberverlauf von Wildtyp Mäusen (WT) verglichen mit basalen Bedingungen dargestellt. Ein signifikanter Temperaturanstieg findet hier im Zeitfenster 1-4 Stunden statt, wohingegen der zirkardiane Rhythmus bereits in der Nacht (Zeitraum 10-15 Stunden) wieder hergestellt ist. In B ist eine analoge Darstellung der Verhältnisse bei normal gefütterten Fat-1 Tieren (Fat-1) dargestellt. Hier fällt auf, dass die Erhöhung der Temperatur nach LPS-Gabe im Zeitraum 1-4 Stunden nicht signifikant gegenüber der Baseline für diesen Genotyp ist. (C) Die Reaktion beider Genotypen auf den LPS-Stimulus wies keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen auf. (D) Der statistische Vergleich aller Versuchsgruppen aus A-C ist hier noch einmal in einem Graphen zusammengestellt. Zeitpunkt der Injektion t = 0; * verglichen wie angegeben, in D * Haupteffekt Behandlung = 50 µg/kg KGW LPS vs. Baseline, n.s. = nicht signifikant unterschiedlich; Tierzahlen: n = 3 pro Gruppe
 p-Werte: A: p = 0,001, 0,789; B: p = 0,121, 0,748; C: p = 0,357, 0,168; D: p = 0,003, 0,785

3.1.1.2 Motorische Aktivität

In Abbildung 41 ist die motorische Aktivität der normal gefütterten (Fettsäureversorgung ausgewogen) Mäuse dargestellt. Alle Tiere zeigten nach Handling und Injektion parallel zur Erhöhung der Körpertemperatur einen Anstieg der Aktivität, der sich rasch wieder an Kontrollwerte anglich. In Dunkelphasen wiesen Mäuse erwartungsgemäß eine gesteigerte Aktivität verglichen mit Hellphasen auf. Nach der Applikation einer geringen LPS-Dosis (50 µg/kg KGW) reduzierte sich die Aktivität der Tiere beider Genotypen im Zeitraum ein bis vier Stunden *post injectionem*, ohne jedoch ein signifikantes Niveau zu erreichen (A und B). Der direkte Vergleich beider Genotypen (C) ergab keinen Unterschied in der motorischen Aktivität. Trotzdem konnte ein Haupteffekt der Behandlung nach statistischer Auswertung aller vier Versuchsgruppen auf die motorische Aktivität nachgewiesen werden (D, Haupteffekt Behandlung, p = 0,046).

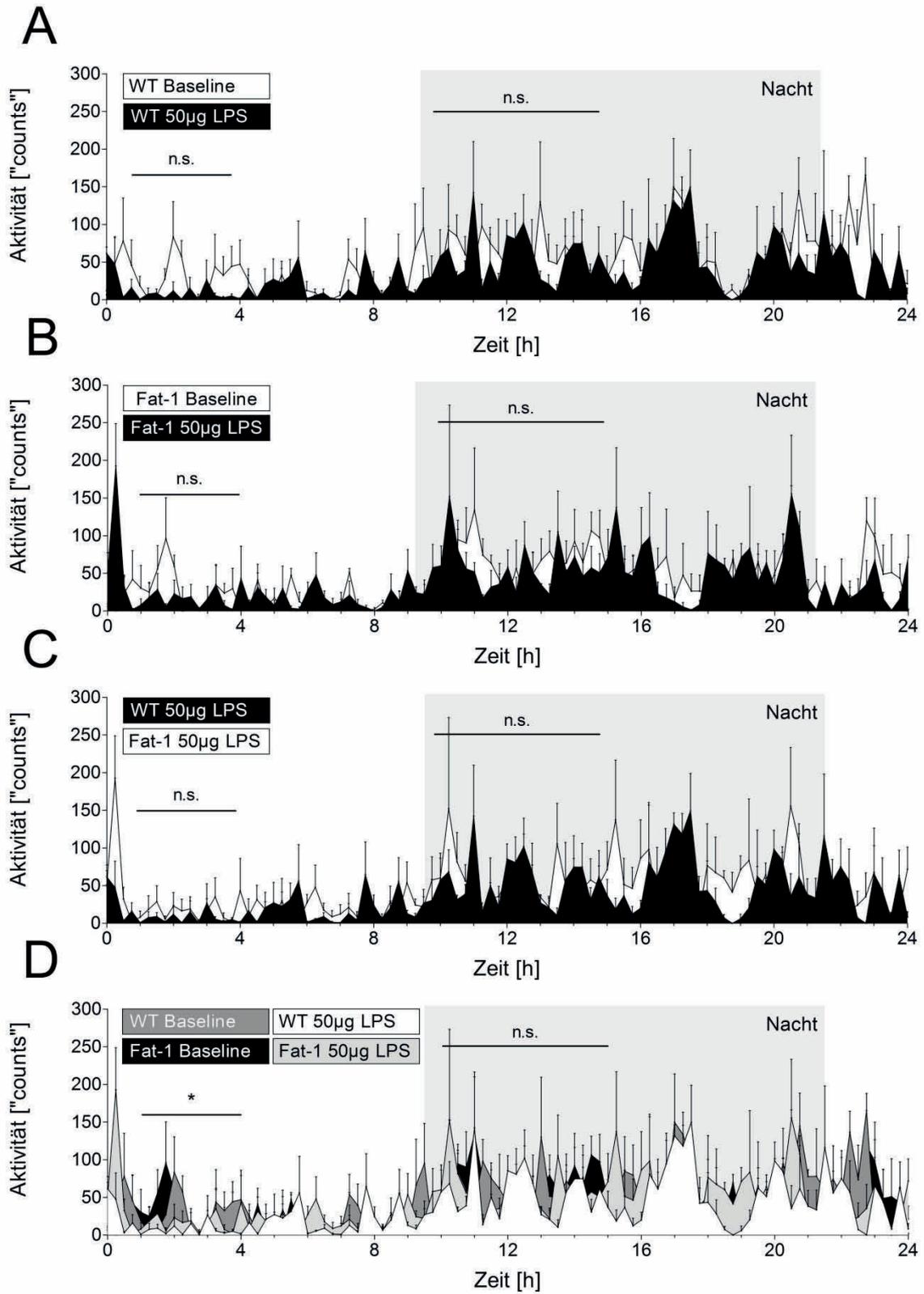


Abbildung 41

Darstellung der motorischen Aktivität der LPS (50 µg/kg KGW) stimulierten normal gefütterten Tiere der Teilstudie „Fat-1“. Die Dunkelphase ist mit einem grauen Kasten hinterlegt und mit „Nacht“ gekennzeichnet. LPS reduziert in der Gegenüberstellung aller vier Gruppen im Zeitraum 1-4 Stunden die motorische Aktivität signifikant (D). Der Zeitpunkt der Injektion war jeweils t = 0. * Haupteffekt Behandlung = 50 µg/kg KGW LPS vs. Baseline, n.s. = nicht signifikant unterschiedlich; Tierzahlen: n = 3 pro Gruppe

p-Werte: A: p = 0,062, 0,887; B: p = 0,379, 0,749; C: p = 0,313, 0,812; D: p = 0,046, 0,724

3.2 Unter ω-3 defizienter nutritiver Versorgung beider Genotypen

Unter den in III.3.1 verwendeten Bedingungen war kein bzw. nur ein marginaler (Fieber in WT und Fat-1) positiver Effekt auf LPS-induzierte Krankheitssymptome (abdominale Temperatur sowie motorische Aktivität) und kein Effekt auf Futter- und Wasseraufnahme sowie Entwicklung des Körpergewichts (siehe III.3.4) und die IL-6-Plasmakonzentration (siehe III.3.5) bei Fat-1 gegenüber WT nachzuweisen. In Rücksprache mit Kollaborationspartnern (Frau Dr. Sophie Layé, Bordeaux, Frankreich) wurde die Möglichkeit diskutiert, dass eine ω-3 defiziente nutritive Versorgung bereits während der Zucht notwendig sein könnte, um positive Effekte entzündungsaflösender Mediatoren für das Gehirn untersuchen und nachweisen zu können. Tatsächlich sind einige der bekannten positiven Effekte in Fat-1 Mäusen unter solchen Spezialdiäten nachgewiesen worden; diese Tatsache wird in der Literatur allerdings lediglich in kurzen Nebensätzen im „Material- und Methodenteil“ erwähnt (z.B. [376]). Gesundheitliche Einschränkungen waren durch die Fütterung der Tiere mit der ω-3 defizienten Spezialdiät (S8909-E013 / E010, Ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest) nicht zu erwarten. Lediglich leicht reduzierte soziale Interaktionen zwischen den Tieren sind bereits beschrieben worden [273, 336]. Diese Änderungen im Versuchsvorhaben wurden ordnungsgemäß bei der mittleren Veterinärbehörde angezeigt (Anzeige der Änderung gemäß §8 Absatz 7 (2) des Tierschutzgesetzes im September 2013).

3.2.1 Einfluss auf physiologische Parameter

Aufgrund der geringen Anzahl an Tieren in der Fat-1 Gruppe sind die statistischen Auswertungen im folgenden Teil mit Vorbehalt zu betrachten. Weiterführende Untersuchungen zur Erhöhung der Tierzahlen werden derzeit ausgeführt, wären aber über den Umfang und das Ziel dieser Arbeit hinaus gegangen. Der Fokus dieser Arbeit lag primär auf den MALDI-Analysen. Die offensichtlichen Trends der physiologischen Parameter lassen aber durchaus sinnvolle qualitative Bewertungen zu.

Ferner erwecken die folgenden Daten den Anschein, ω-3 defizient ernährte Tiere hätten insgesamt deutlich homogenere Temperaturkurvenverläufe mit weniger Schwankungen als Tiere die eine Normaldiät erhielten. Durch Betrachtung der Einzeltierdaten (nicht gezeigt) konnte dies jedoch klar widerlegt werden. In Gruppen mit höheren Tierzahlen mitteln sich Temperatur- und Aktivitätsspitzen heraus, was zu einem homogenen Gesamteindruck beiträgt.

3.2.1.1 Abdominale Temperatur

Mit dem Ziel die oben genannte Hypothese zu bestätigen und mögliche Unterschiede zwischen Fat-1 und WT weiter zu untersuchen, wurden ω -3 defizient gezogene Tiere mit einer hohen LPS-Dosis (2,5 mg/kg KGW) stimuliert und deren Reaktion über einen Zeitraum von 24 Stunden aufgezeichnet. WT Kontrollen erhielten PBS.

Abbildung 42 A stellt den Temperaturverlauf dieser WT Kontrollen verglichen mit basalen Bedingungen (Baseline) dar. PBS injizierte Tiere zeigen einen sehr kleinen Anstieg der Temperatur unmittelbar nach der Injektion ($t = 0$), welcher unter basalen Bedingungen fehlt. Im Weiteren sind die Temperaturkurven jedoch identisch, weshalb die Baseline weiterhin als Bezugssystem verwendet wurde. Die Injektion von 2,5 mg/kg KGW LPS induzierte bei beiden Genotypen zunächst einen kurzen Temperaturanstieg, der auf Handling und Injektion zurückgeführt werden konnte. Dieser Temperaturspitze schloss sich zeitlich unmittelbar eine erste Phase der Fieberantwort an (B und C; 1-4 Stunden). Lediglich bei den WT erreichte die Körpertemperatur zwischen diesen beiden Ereignissen kurz basales Niveau (B). Im weiteren Verlauf war ein starkes Absinken der Körpertemperatur zu beobachten (für beide Genotypen signifikant im Zeitraum 10–15 Stunden gegenüber der Baseline). Etwa 18 Stunden nach der Stimulation näherte sich die Körpertemperatur wieder an das jeweilige Basalniveau an. Danach stieg die Körpertemperatur ca. ab Stunde 22 in einem fließenden Prozess über das Basalniveau. Bei vergleichender Betrachtung der LPS-induzierten Reaktionen beider Genotypen (D) zeigte sich ein signifikant höherer Temperaturanstieg in Fat-1 in der Zeit 1–4 Stunden nach der Injektion als in WT. Ab Stunde zehn *post injectionem* wurde der Trend einer beschleunigten Normalisierung der Körpertemperatur bei Fat-1 gegenüber WT erkennbar. Eine Signifikanz wurde nicht erreicht.

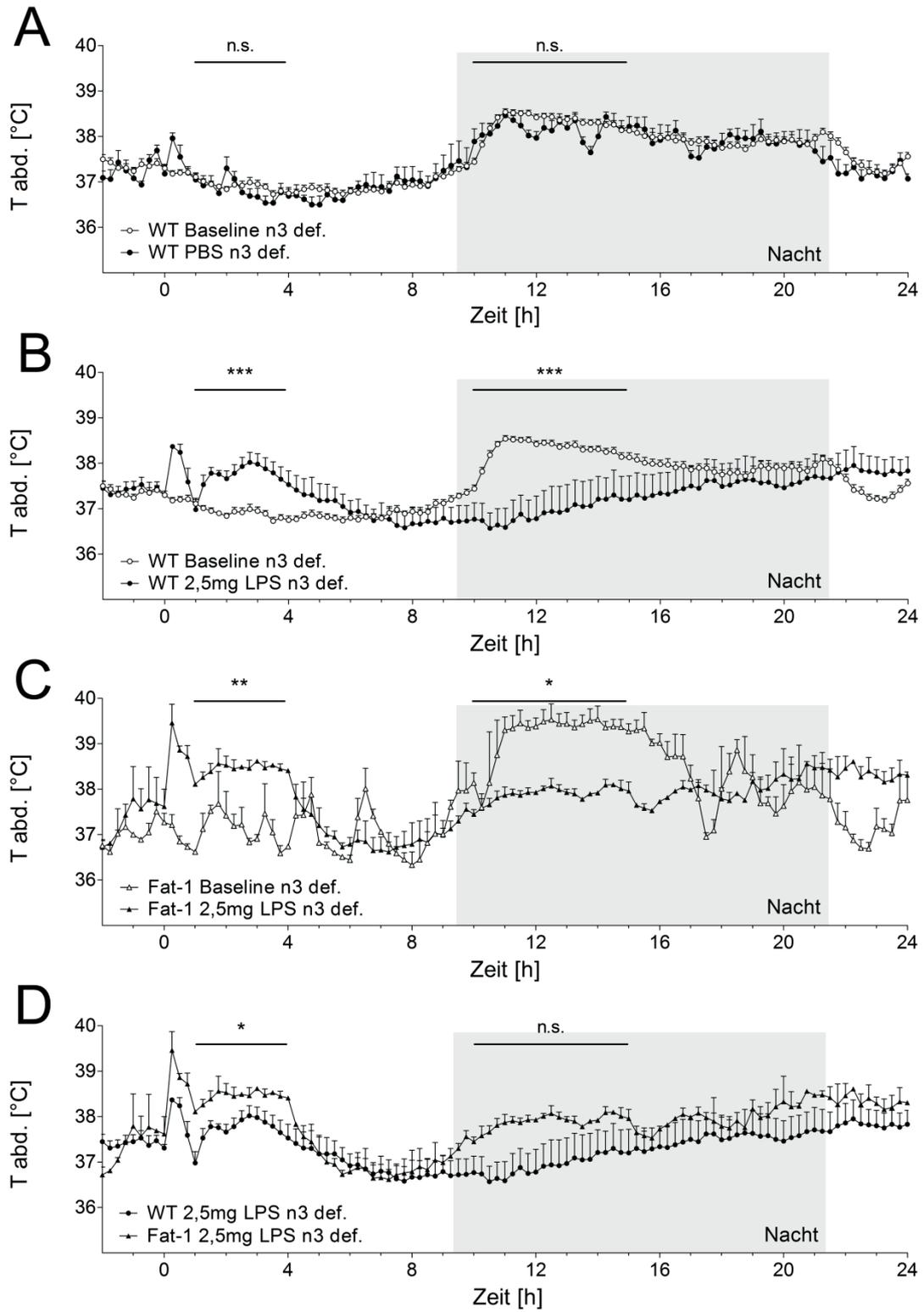


Abbildung 42

Darstellung der abdominal gemessenen Körpertemperatur (T abd.) der mit einer hohen LPS-Dosis (2,5 mg/kg KGW) stimulierten, ω -3 defizient (n3 def.) gezogenen Mäuse der Teilstudie „Fat-1“. Die Dunkelphase ist mit einem grauen Kasten hinterlegt und mit „Nacht“ gekennzeichnet. In A ist die vergleichende Darstellung mit PBS-behandelter Wildtyp Mäuse (WT, Kontrollen) und WT unter basalen Bedingungen dargestellt. Zu keinem Zeitpunkt waren Unterschiede der Körpertemperatur feststellbar. Der zirkardiane Temperaturverlauf war deutlich nachvollziehbar. Die Verabreichung einer hohen LPS-Dosis (2,5 mg/kg KGW) führt bei beiden Genotypen zunächst zu einem signifikanten Anstieg der abdominalen Temperatur (1-4 Stunden), gefolgt von einer zweiten Phase einhergehend mit einem starken Abfall der Körperkerntemperatur während der Dunkelphase (10–15 Stunden, B und C). Die Gegenüberstellung von LPS-behandelten Tieren beider Genotypen ergab einen signifikant höheren Temperaturanstieg in der ersten Phase (1–4 Stunden) bei Fat-1 gegenüber WT. Im späteren Verlauf der hypothermen Phase der LPS-Antwort (10–15 Stunden) zeigten Fat-1 jedoch die Tendenz einer rascheren Rekonvaleszenz (D). t = 0, Zeitpunkt der Injektion; * verglichen wie angegeben, n.s. = nicht signifikant unterschiedlich; Tierzahlen: WT Baseline: n = 26, WT PBS: n = 5, WT 2,5 mg LPS: n = 6, Fat-1 Baseline: n = 2, Fat-1 2,5 mg LPS: n = 2
p-Werte: A: p = 0,503, 0,149; B: p = 0; C: p = 0,006, 0,047; D: p = 0,034, 0,296

3.2.1.2 Motorische Aktivität

Die Aufzeichnung der Aktivitätsprofile unter ω -3 defizienten Bedingungen ergab keinerlei Unterschiede zwischen PBS-stimulierten und unbehandelten WT (Abbildung 43 A). Jedoch war sehr auffällig, dass Fat-1 unter basalen Bedingungen deutlich höhere *activity counts* aufwies (bis zu 1000) als WT (bis maximal 200) im selben Zeitraum. Hierbei war der Tag / Nacht-Rhythmus mit Phasen der reduzierten / erhöhten Aktivität aber für beide Genotypen klar erkennbar (B und C). Die Stimulation mit der hohen LPS-Dosis reduzierte die Aktivität bei beiden Genotypen über den gesamten Versuchszeitraum dramatisch. Es kam zum völligen Verlust des Aktivitätsanstiegs während der Dunkelphase. Diese Veränderungen erreichten bei den WT ein signifikantes Niveau in den untersuchten Zeitfenstern (B). Der direkte Vergleich der LPS-behandelten Gruppen zeigte keine genotypspezifischen Unterschiede auf (D).

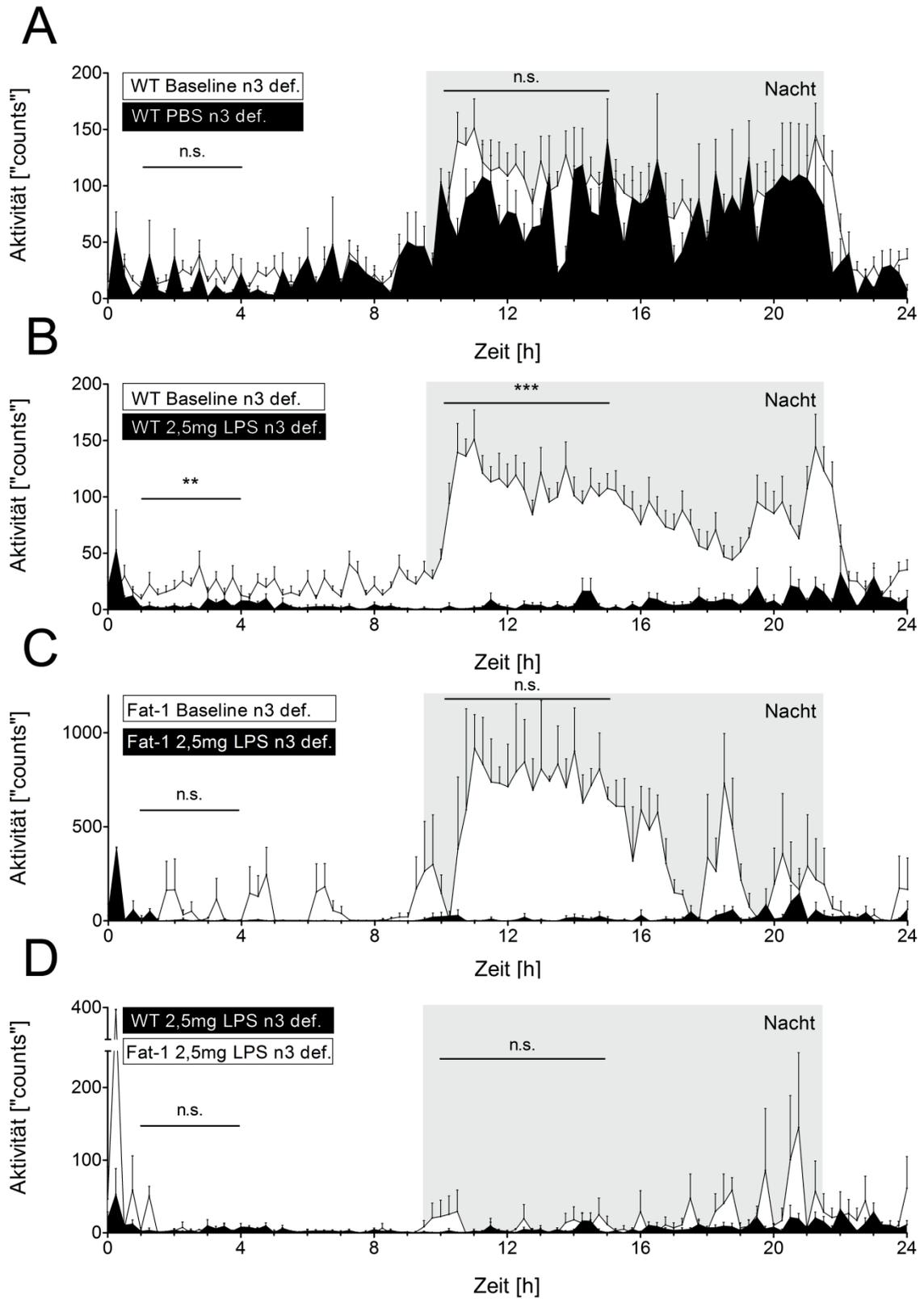


Abbildung 43

Darstellung der motorischen Aktivität der mit einer hohen LPS-Dosis (2,5 mg/kg KGW) stimulierten, ω -3 defizient (n3 def.) gefütterten Tiere der Teilstudie „Fat-1“. Die Dunkelphase ist mit einem grauen Kasten hinterlegt und mit „Nacht“ gekennzeichnet. In A ist die vergleichende Untersuchung von mit PBS-behandelten Wildtyp Mäuse (WT, Kontrollen) mit WT unter basalen Bedingungen dargestellt. Zu keinem Zeitpunkt waren Unterschiede in der Aktivität feststellbar. Der Tag / Nacht-Verlauf war deutlich nachvollziehbar. Die Verabreichung einer hohen LPS-Dosis (2,5 mg/kg KGW) führte bei beiden Genotypen zu einem massiven Aktivitätsverlust über den gesamten Versuchszeitraum, der jedoch lediglich bei WT ein signifikantes Niveau erreichte (B und C). Die Gegenüberstellung LPS-behandelter Tiere beider Genotypen ergab vergleichbar reduzierte motorische Aktivität in Fat-1 und WT (D). Zeitpunkt der Injektion $t = 0$; * verglichen wie angegeben, n.s. = nicht signifikant unterschiedlich; Tierzahlen: WT Baseline: $n = 25$, WT PBS: $n = 5$, WT 2,5 mg LPS: $n = 6$, Fat-1 Baseline: $n = 2$, Fat-1 2,5 mg LPS: $n = 2$
 p-Werte: A: $p = 0,27, 0,239$; B: $p = 0,003$ und $p = 0$; C: $p = 0,22, 0,074$; D: $p = 0,507, 0,138$

3.3 Vergleich physiologischer Parameter beider Fütterungsgruppen

Da sowohl Tiere mit einer ausgewogenen Fütterung als auch mit einer ω -3 defizienten Fütterung im Versuchsvorhaben Verwendung fanden, lag die Untersuchung potentieller, fütterungsbedingter Unterschiede im Hinblick auf LPS-bedingte Krankheitssymptome nahe. Die Gruppe „Fat-1 ω -3 defizient, 50 μ g/kg KGW LPS“ konnte aufgrund von Verzögerungen im Zuchtvorhaben im Rahmen dieser Arbeit jedoch leider noch nicht aufgefüllt werden.

3.3.1 Physiologische Parameter**3.3.1.1 Abdominale Temperatur**

Der Verlauf der abdominalen Körpertemperatur beider Genotypen sowohl unter ausgewogener als auch unter ω -3 defizienter Futtermittellieferung ist in Abbildung 44 dargestellt. WT beider Fütterungsgruppen zeigten nach Verabreichung einer geringen LPS-Dosis (50 μ g/kg KGW) einen gleichförmigen Anstieg der Körpertemperatur im Zeitintervall ein bis vier Stunden nach der Injektion, ohne detektierbare fütterungsbedingte Unterschiede. Während der Dunkelphase zeigten ausgewogen ernährte WT größere Schwankungen der Körpertemperatur, was zu einem signifikanten Unterschied im Vergleich zu ω -3 defizient ernährten WT im Zeitraum 10–15 Stunden führte (A). Da die Versuchsgruppe „Fat-1 ω -3 defizient, 50 μ g/kg KGW LPS“ leider nicht aufgefüllt werden konnte, entfällt der Vergleich der Fütterungsgruppen dieses Genotyps (B). Unter basalen Bedingungen (Baseline) und ω -3 ausgewogener Ernährung (C) war im Gegensatz zu ω -3 defizienter Ernährung (D) kein Unterschied zwischen den untersuchten Genotypen nachweisbar. Defizient ernährte Fat-1 zeigten im Intervall 10–15 Stunden *post-injectionem* und darüber hinaus (bis ca. 17 Stunden) eine im Vergleich zur WT-Gruppe signifikant erhöhte Körpertemperatur (D).

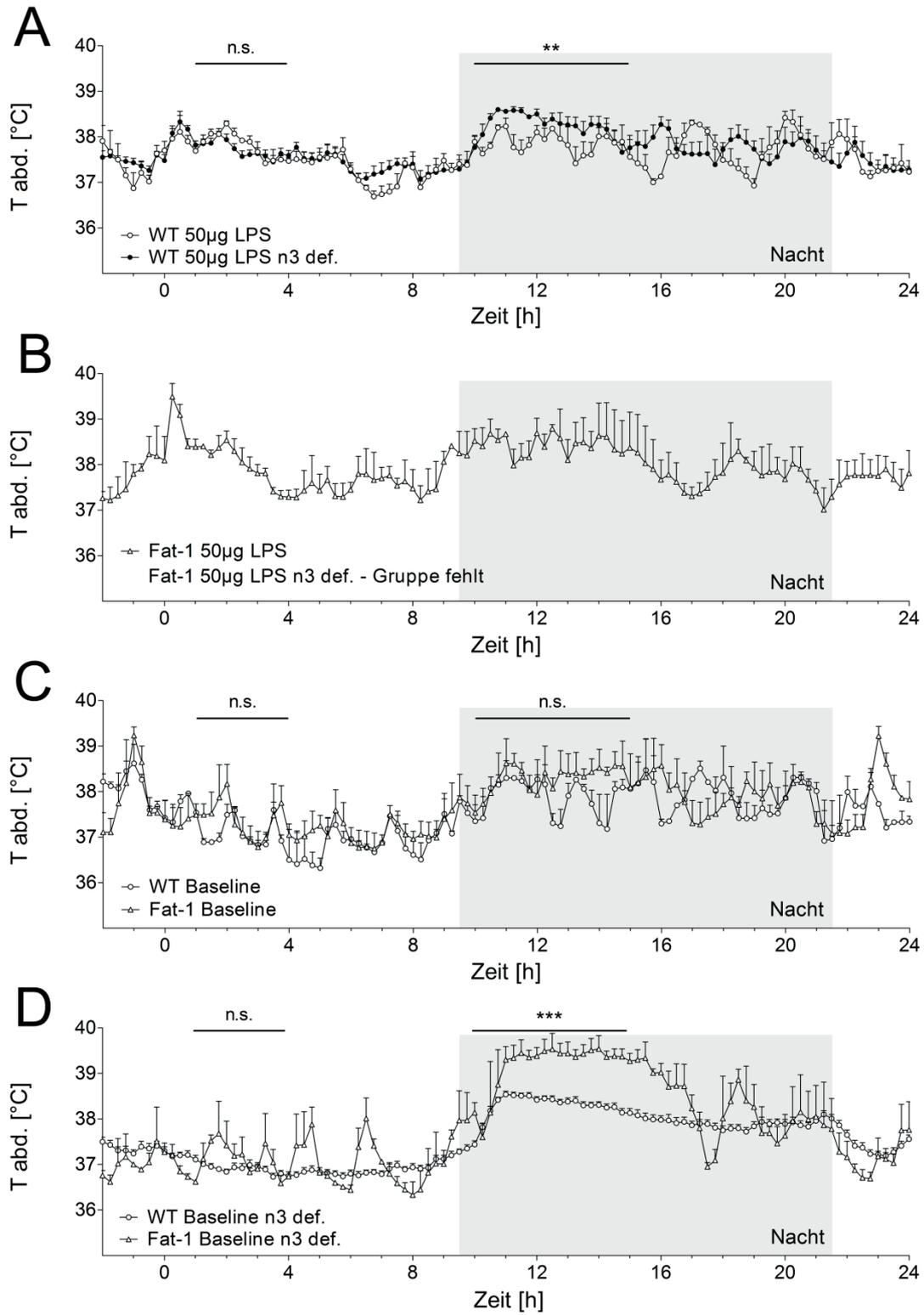


Abbildung 44

ω -3 defiziente (n3 def.) Ernährung hatte keinen Einfluss auf die frühe, LPS-induzierte (50 μ g/kg KGW) Fieberphase bei Wildtyp Mäusen (WT), erhöhte aber die Körpertemperatur während der Nachtphase (A, Zeitraum 10–15 Stunden). Die Stimulation von ω -3 defizient gefütterten Fat-1 Tieren (Fat-1) mit 50 μ g/kg KGW LPS konnte leider nicht durchgeführt werden (B). Unter basalen und ω -3 ausgewogenen Bedingungen konnte kein Unterschied der Temperaturverläufe zwischen beiden Genotypen gefunden werden (C). Hingegen fiel eine signifikant höhere Körpertemperatur bei ω -3 defizienten Fat-1 gegenüber ω -3 defizienten WT in der Zeit 10–15 Stunden *post-injectionem* auf (D). Die Dunkelphase ist mit einem grauen Kasten hinterlegt und mit „Nacht“ gekennzeichnet. t = 0, Zeitpunkt der Injektion; * verglichen wie angegeben, n.s. = nicht signifikant unterschiedlich; Tierzahlen: WT Baseline: n = 3, WT Baseline n3 def.: n = 26, WT 50 μ g LPS: n = 3, WT 50 μ g LPS n3 def.: n = 14 in den ersten 2h, 11 in den folgenden 2h, 8 in den folgenden 4h und 5 im gesamten restlichen Zeitraum, Fat-1 Baseline: n = 3, Fat-1 Baseline n3 def.: n = 2, Fat-1 50 μ g LPS n3 def.: n = 2
p-Werte: A: p = 0,588, 0,006; C: p = 0,324, 0,295; D: p = 0,257 und p = 0

Der Einfluss einer ω -3 defizienten Ernährung auf die Körpertemperatur von C57BL/6N Mäusen in Abhängigkeit eines geringen LPS-Stimulus (50 μ g/kg KGW) über 24 Stunden ist in Abbildung 45 zusammenfassend dargestellt. In beiden Fütterungsgruppen führte die Stimulation mit LPS zu einer Fieberentwicklung in den ersten Stunden *post injectionem* (A und B, signifikantes Niveau wurde im Zeitraum ein bis vier Stunden erreicht). In der Dunkelphase war der reguläre zirkardiane Temperaturanstieg unbeeinflusst. Der direkte statistische Vergleich der LPS-stimulierten Gruppen ist bereits in Abbildung 44 A dargestellt und ergab keinen Unterschied in der Ausprägung der frühen Fieberphase, deckte jedoch einen Unterschied zwischen beiden Gruppen in der Dunkelphase auf. Hier zeigten ω -3 defizient gefütterte Tiere einen stabileren Anstieg der Körpertemperatur, der einer größeren Zahl untersuchter Tiere geschuldet ist (C).

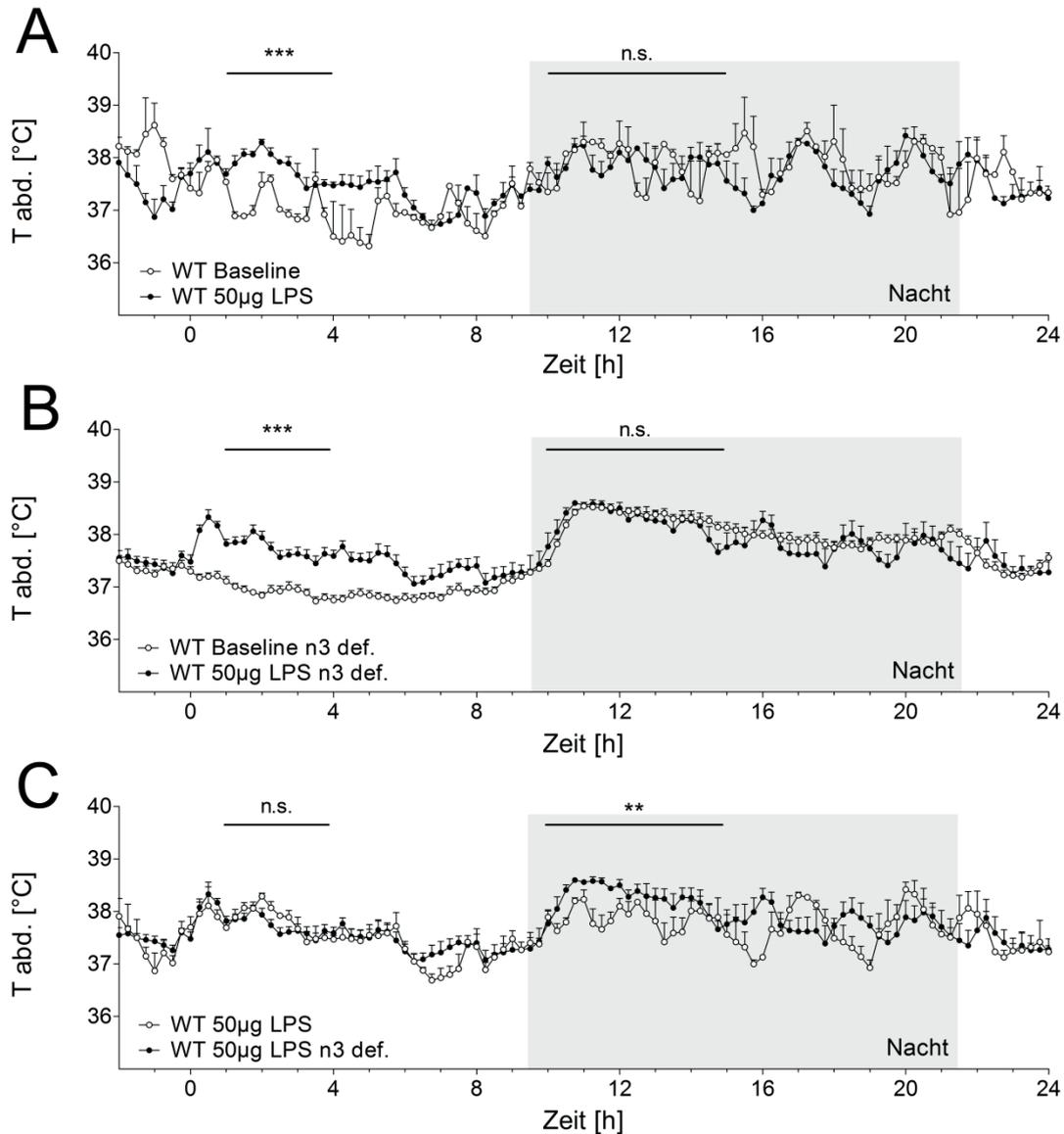


Abbildung 45

Wirkung von LPS (50 µg/kg KGW) auf ω -3 defizient (n3 def.) und ausgewogen gefütterte Wildtyp Mäuse (WT). ω -3 defiziente Ernährung hatte dabei keinen Einfluss auf die frühe, LPS-induzierte (50 µg/kg KGW) Fieberphase, erhöhte aber die Körpertemperatur während der Nachtphase (C ist identisch mit Abbildung 44 A). A ist identisch mit Abbildung 40 A und zeigt die Reaktion ausgewogen gefütterter WT auf LPS. Tiere beider Fütterungsgruppen zeigten identische Reaktionen auf den LPS-Stimulus, mit einem signifikanten Temperaturanstieg im Zeitraum 1–4 h *post injectionem* und einem regulären Temperaturanstieg während der Dunkelphase (B und C). Die Dunkelphase ist mit einem grauen Kasten hinterlegt und mit „Nacht“ gekennzeichnet. t = 0, Zeitpunkt der Injektion; * verglichen wie angegeben, n.s. = nicht signifikant unterschiedlich; Tierzahlen: WT Baseline: n = 3, WT Baseline n3 def.: n = 26, WT 50 µg LPS: n = 3, WT 50 µg LPS n3 def.: n = 14 in den ersten 2h, 11 in den folgenden 2h, 8 in den folgenden 4h und 5 im gesamten restlichen Zeitraum

p-Werte: A: p = 0,001, 0,789; B: p = 0, 0,631; C: p = 0,588, 0,006

3.3.1.2 Motorische Aktivität

Analog zu den Temperaturdaten wurden auch die aufgezeichneten Aktivitätsdaten auf fütterungsbedingte Unterschiede zwischen den Gruppen analysiert. Dabei waren keine fütterungsbedingten Abweichungen der Reaktion auf die Verabreichung einer geringen LPS-Dosis (50 $\mu\text{g/kg}$ LPS) bei WT zu erkennen (Abbildung 46 A). Wie oben bereits erwähnt fehlt die Gruppe „Fat-1 ω -3 defizient, 50 μg LPS 24h“. Somit konnte für diesen Genotyp kein direkter Vergleich angestellt werden. Ähnliche Ergebnisse wie bei entsprechenden Temperaturdaten wurden für die Aktivität beider Genotypen unter basalen Bedingungen (Baseline) gefunden. Normal gefütterte Fat-1 waren dabei nicht von WT zu unterscheiden (C), wohingegen in den ω -3 defizient gefütterten Gruppen deutliche Unterschiede ausgemacht werden konnten. Sowohl im Zeitraum ein bis vier Stunden als auch im Zeitraum 10–15 Stunden waren Fat-1 Tiere mit Aktivitäten von bis über 1000 *counts* signifikant mobiler als WT (D).

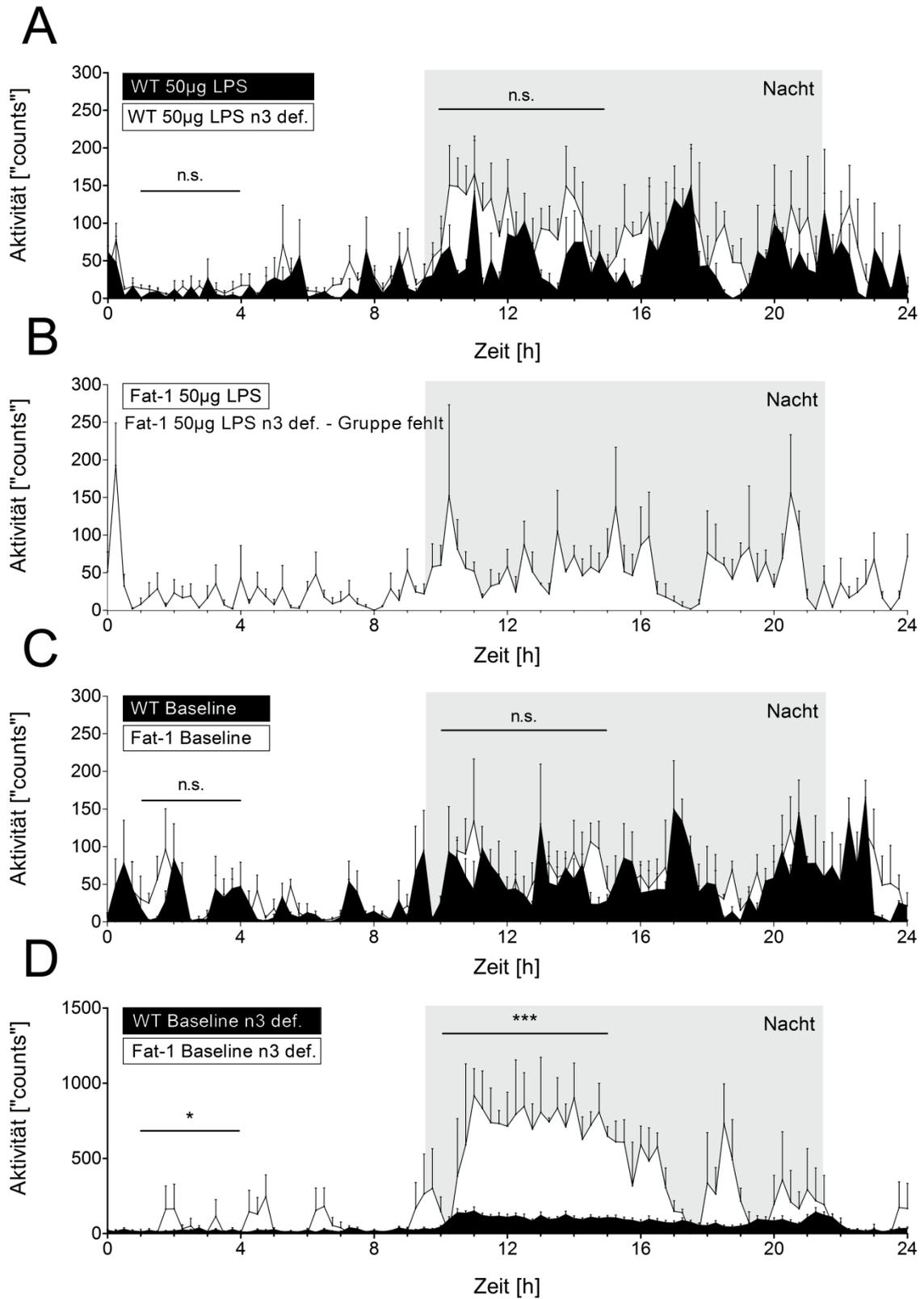


Abbildung 46

**ω -3 defiziente (n3 def.) Ernährung hatte keinen Effekt auf das Aktivitätsprofil nach Stimulation mit einer geringen LPS-Dosis (50 μ g/kg KGW) bei Wildtyp Mäusen (WT, A). Die Stimulation von ω -3 defizient gefütterten Fat-1 Tieren (Fat-1) mit 50 μ g/kg KGW LPS konnte leider nicht durchgeführt werden (B). Unter basalen und ω -3 nutritiv ausgewogenen Bedingungen konnte kein Unterschied des Aktivitätsprofils beider Genotypen nachgewiesen werden (C). Hingegen fiel eine signifikant höhere Aktivität bei ω -3 defizienten Fat-1 gegenüber ω -3 defizienten WT in beiden betrachteten Zeiträumen auf (D). Die Dunkelphase ist mit einem grauen Kasten hinterlegt und mit „Nacht“ gekennzeichnet. t = 0, Zeitpunkt der Injektion; * verglichen wie angegeben, n.s. = nicht signifikant unterschiedlich; Tierzahlen: WT Baseline: n = 3, WT Baseline n3 def.: n = 25, WT 50 μ g LPS: n = 3, WT 50 μ g LPS n3 def.: n = 13 in den ersten 2h, 10 in den folgenden 2h, 8 in den folgenden 4h und 5 im gesamten restlichen Zeitraum, Fat-1 Baseline: n = 3, Fat-1 Baseline n3 def.: n = 2, Fat-1 50 μ g LPS n3 def.: n = 2
p-Werte: A: p = 0,528, 0,122; C: p = 0,976, 0,699; D: p = 0,015, 0**

Eine zusammenfassende Darstellung des ernährungsbedingten Einflusses auf die motorische Aktivität von WT in Abhängigkeit eines LPS-Stimulus (50 μ g/kg KGW) über 24 Stunden ist in Abbildung 47 zu finden. Nur bei den ω -3 defizienten WT erreichte die LPS-bedingte Reduktion der motorischen Aktivität im Zeitraum ein bis vier Stunden ein signifikantes Niveau (B). Die Gegenüberstellung beider Fütterungsvarianten unter LPS-Einfluss deckte keinerlei Unterschiede auf (C).

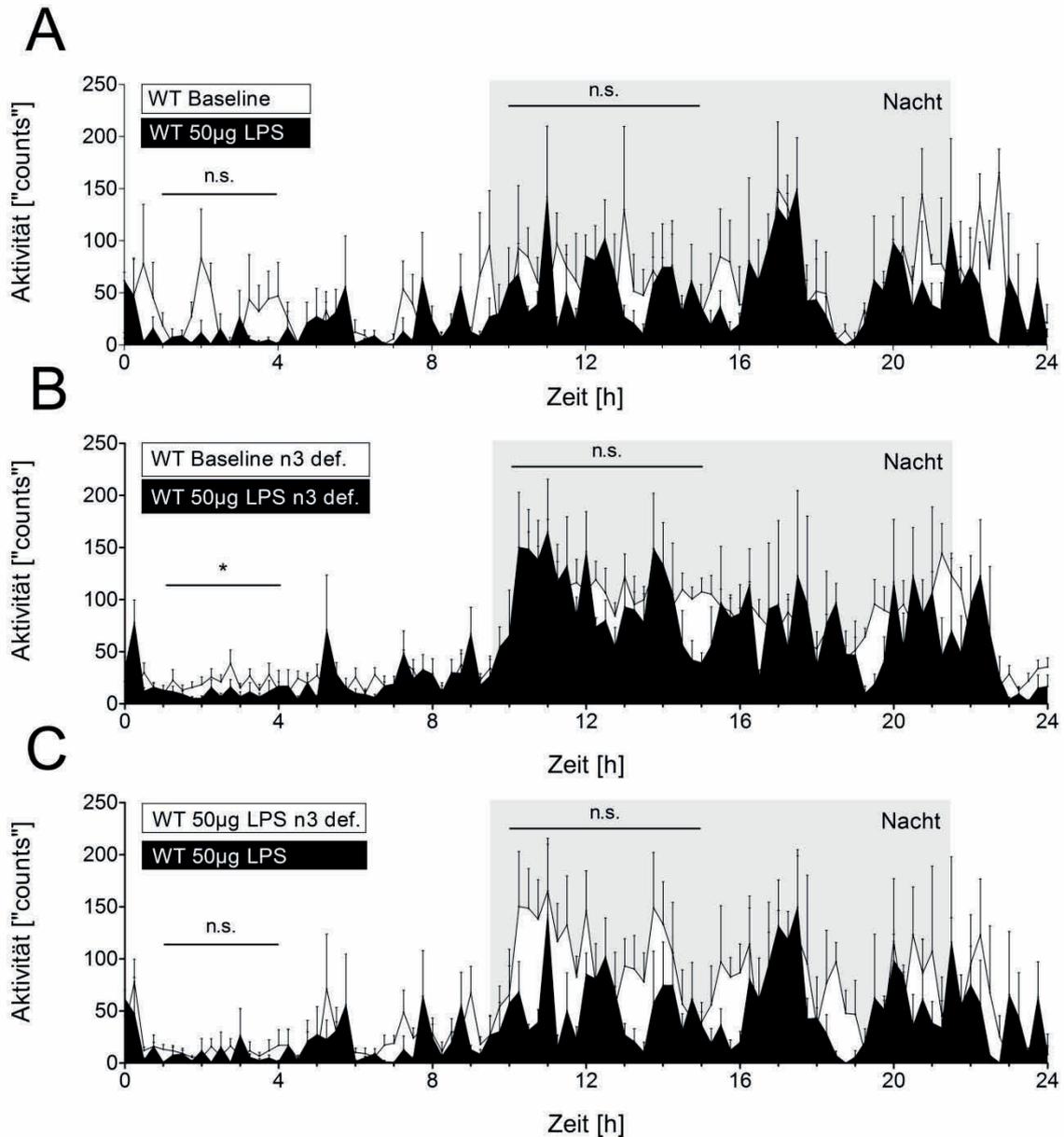


Abbildung 47

Wirkung von LPS (50 µg/kg KGW) auf die Aktivität ω -3 defizient (n3 def.) und ω -3 ausgewogen gefütterter Wildtyp Mäuse (WT). ω -3 defiziente Ernährung hatte dabei im direkten Vergleich keinen Einfluss auf das Ausmaß der LPS-bedingten (50 µg/kg KGW) frühen Aktivitätsverringern. Auch zum späteren Zeitpunkt waren keine Einflüsse der Ernährung auf das Aktivitätsverhalten erkennbar (C ist identisch mit Abbildung 46 A). A ist identisch mit Abbildung 41 A und zeigt die LPS-induzierte Verringerung der Aktivität bis etwa vier Stunden nach Injektion bei ausgewogen gefütterten Tieren, wobei kein signifikanter LPS-Effekt erreicht wurde. ω -3 defizient gezogene WT zeigten dagegen eine ausgeprägtere Reduktion der Aktivität bis vier Stunden *post injectionem*, die ein signifikantes Niveau erreichte (B). Die Dunkelphase ist mit einem grauen Kasten hinterlegt und mit „Nacht“ gekennzeichnet. t = 0, Zeitpunkt der Injektion; * verglichen wie angegeben, n.s. = nicht signifikant unterschiedlich; Tierzahlen: WT Baseline: n = 3, WT Baseline n3 def.: n = 25, WT 50 µg LPS: n = 3, WT 50 µg LPS n3 def.: n = 13 in den ersten 2h, 10 in den folgenden 2h, 8 in den folgenden 4h und 5 im gesamten restlichen Zeitraum

p-Werte: A: p = 0,062, 0,887; B: p = 0,019, 0,769; C: p = 0,357, 0,168; D: p = 0,528, 0,122

3.4 Körpergewicht, Futter- und Wasseraufnahme

Abbildung 48 stellt die Entwicklung des Körpergewichts (A) sowie die Futter (B) - und Wasseraufnahme (C) prozentual zum Körpergewicht der Tiere dar. Daten wurden über einen Zeitraum von 24 Stunden erhoben. Ein Stimulus von 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ KGW LPS bedingte bei ω -3 ausgewogen ernährten Tieren beider Genotypen gleichermaßen eine Reduktion des Körpergewichtes sowie eine Adipsie und Anorexie (A-C, linke Spalte). Für ω -3 defizient gezogene WT ließ sich ein dosisabhängiger Effekt für alle drei Parameter beobachten, wobei sich die Situation unter basalen Bedingungen (Baseline) erwartungsgemäß nicht von einer Behandlung mit PBS unterschied (A-C, mittlere Spalte). ω -3 defizient gezogene Mäuse beider Genotypen reagierten ebenfalls identisch mit einem signifikanten Gewichtsverlust, einer dramatischen Anorexie sowie Adipsie auf die Injektion einer hohen LPS-Dosis (2,5 mg/kg KGW; Haupteffekt Behandlung, Wasseraufnahme und Änderung des Körpergewichts jeweils $p < 0,001$, Futteraufnahme $p < 0,001$).

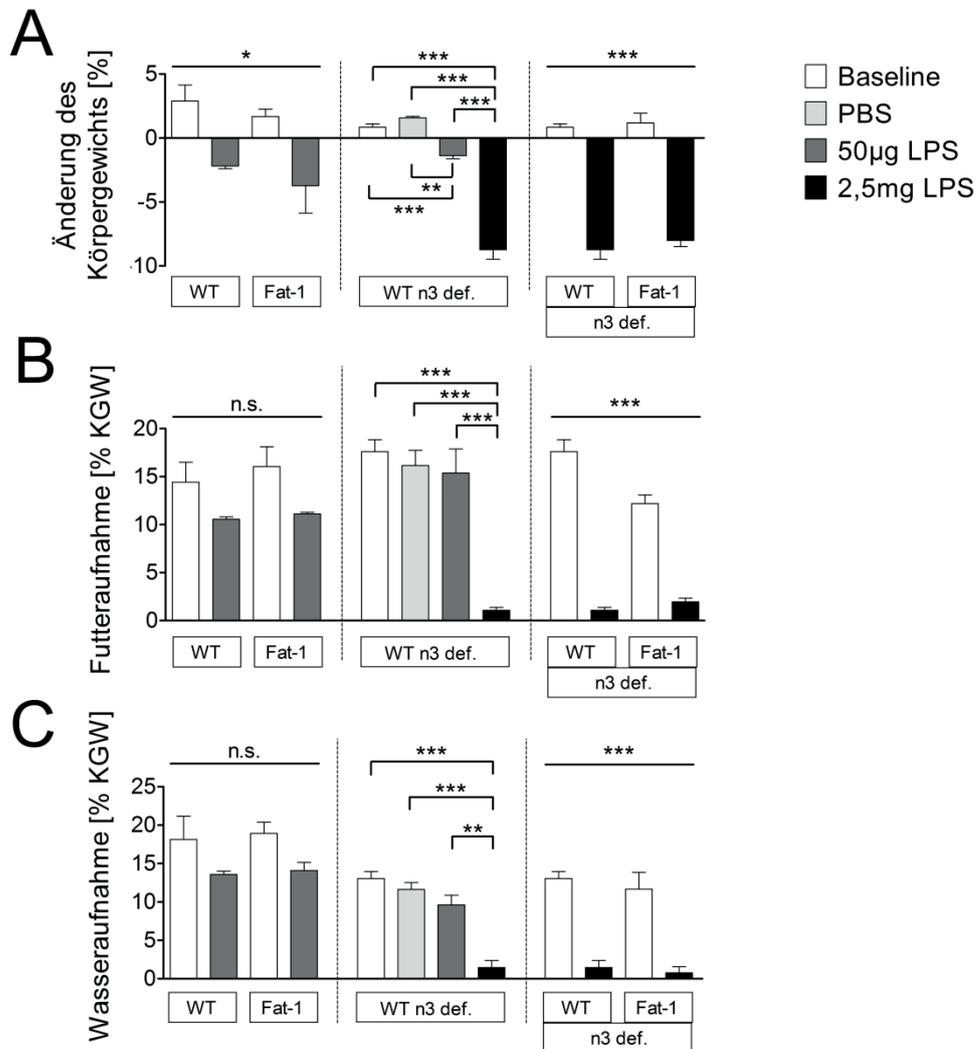


Abbildung 48

Körpergewicht (A, KGW), Futter- (B) und Wasseraufnahme (C) der Tiere aller Gruppen über einen Zeitraum von 24 Stunden unter basalen Bedingungen (Baseline) und nach Behandlung mit PBS, 50 µg/kg KGW LPS oder 2,5 mg/kg KGW LPS. Es sind sowohl Daten von ω-3 ausgewogen ernährten Tieren als auch Daten ω-3 defizient (n3 def.) ernährter Tiere dargestellt. Mäuse jeweils beider Fütterungsgruppen und Genotypen zeigten eine LPS-bedingte, signifikante Reduktion des Körpergewichtes (A, links und rechts) sowie eine Anorexie und Adipsie (B und C, links und rechts). Bei ω-3 defizient (n3 def.) gefütterten Wildtyp Tieren (WT, A – C, Mitte) war jeweils ein dosisabhängiger Effekt nachvollziehbar. * verglichen wie angegeben (Mitte), * Haupteffekt Behandlung (links und rechts), n.s. = nicht signifikant unterschiedlich; Tierzahlen: WT normal gefüttert: n = 2 pro Gruppe, Fat-1 normal gefüttert: n = 3 pro Gruppe, WT n3 def. Baseline: n = 25 für Futter, n = 26 für Wasser und KGW, WT n3 def. PBS: n = 5, WT n3 def. 50 µg LPS: n = 5, WT n3 def. 2,5 mg LPS: n = 6, Fat-1 n3 def. Baseline: n = 3, Fat-1 n3 def. 2,5 mg LPS: n = 3

p-Werte: A, links: Haupteffekt LPS vs. Baseline p = 0,0181; mitte: * p < 0,001, 0,01; rechts: Haupteffekt LPS vs. Baseline p = 0,0001; B, mitte: * p < 0,001; rechts: Haupteffekt LPS vs. Baseline p < 0,001; C, mitte: * p < 0,001, 0,01; rechts: Haupteffekt LPS vs. Baseline p < 0,0001

3.5 Periphere Zytokine

Es wurden Bioassays aus gewonnenen Plasmaproben zur Erfassung von IL-6 und TNF-α durchgeführt, um den Einfluss von Genotyp (WT / Fat-1) und Behandlung (PBS / 50 µg LPS / 2,5 mg LPS) auf im Blut zirkulierende bioaktive und inflammatorische Mediatoren zu untersuchen.

3.5.1 IL-6 Konzentrationen

Ausgewogen ω-3 gefütterte Tiere beider Genotypen zeigten 24 Stunden nach Stimulation mit 50 µg/kg KGW LPS weitgehend identische IL-6-Plasmakonzentrationen (Abbildung 49, links). ω-3 defizient ernährte WT reagierten auf den LPS-Stimulus mit einem dosisabhängigen Anstieg der IL-6-Plasmakonzentration. Entsprechend der beschleunigten Normalisierung der Körpertemperatur von Fat-1 Tieren, zeigten diese Tiere 24 Stunden nach Behandlung mit der hohen LPS-Dosis signifikant reduzierte Plasma-IL-6-Werte, die vergleichbar mit Werten von WT nach PBS-Behandlung waren (Abbildung 49, rechts).

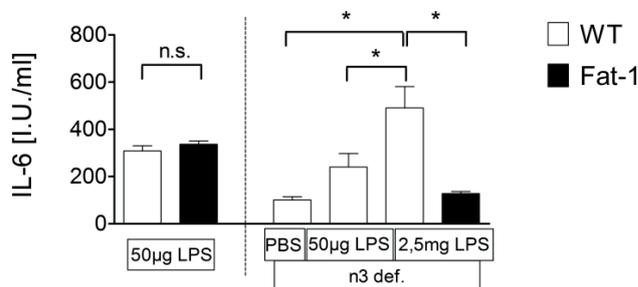


Abbildung 49

Plasmakonzentrationen von Interleukin (IL)-6 24 Stunden nach Stimulation mit *phosphate-buffered saline* (PBS), 50 µg/kg Körpergewicht (KGW) Lipopolysaccharid (LPS) oder 2,5 mg/kg KGW LPS. Links sind Daten für Fat-1 Tiere (Fat-1) und Wildtyp Tiere (WT) unter normaler Diät und nach 50 µg/kg LPS abgebildet. Rechts sind Ergebnisse unter ω-3 defizienter Diät (n3 def.) dargestellt. * verglichen wie angegeben, n.s. = nicht signifikant unterschiedlich; Tierzahlen: Normalfutter: n = 3 pro Gruppe, WT PBS: n = 4, WT 50 µg LPS: n = 5, WT 2,5 mg LPS: n = 6, Fat-1 2,5 mg: n = 2; p-Werte: links: p = 0,3327; rechts: * p < 0,05

3.5.2 TNF- α Konzentration

Bioaktives TNF- α wurde im Rahmen der Versuche mit einem Endzeitpunkt von 24 Stunden in keiner Plasmaprobe detektiert.

4. Physiologische Parameter von C57Bl/6N und Fat-1 Mäusen unter ω -3 defizienter nutritiver Versorgung bei NES

Ein Käfigwechsel von Haltungskäfigen in Experimentalkäfige war für den Versuchsablauf ohnehin nötig. Dieser induziert eine psychologische Stresssituation bei Mäusen und wird auch als *novel environment stress* (NES) bezeichnet. Die Körpertemperatur und motorische Aktivität wurde für jedes Tier während der ersten vier Stunden in der neuen Umgebung aufgezeichnet.

4.1.1.1 Abdominale Temperatur

Beide Genotypen reagierten mit einem Anstieg der Körpertemperatur während der ersten 2,5 Stunden nach Beginn des Käfigwechsels. Folgend fiel die Körpertemperatur auf basales Niveau. Als Auffälligkeit ist die Tatsache zu nennen, dass die Ausprägung des stressinduzierten Temperaturanstieges genotypspezifisch differierte, Fat-1 waren empfindlicher als WT und zeigten einen statistisch signifikant höheren Anstieg der Körperkerntemperatur (Abbildung 50).

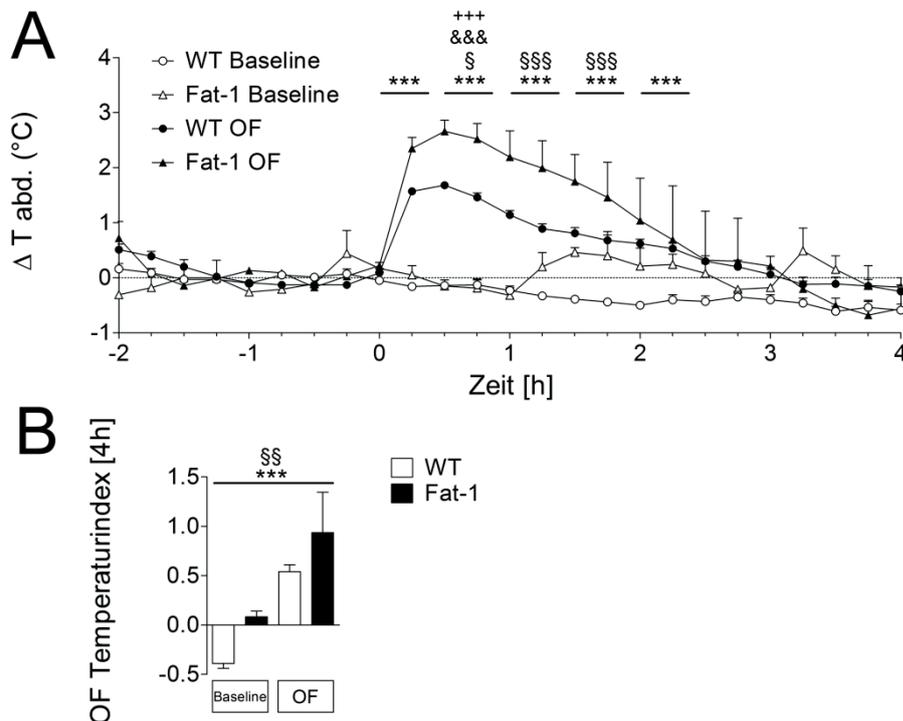


Abbildung 50

Verlauf der Körperkerntemperatur (ΔT abd.) während des Käfigwechsels (NES, OF) und unter basalen Bedingungen (Baseline, A) sowie die Darstellung als Temperaturindex (B). Fat-1 zeigten dabei eine höhere Stressempfindlichkeit als WT, was sich in einem signifikant höheren Temperaturanstieg widerspiegelte. * Haupteffekt Behandlung (NES vs. Baseline), § Haupteffekt Genotyp (WT vs. Fat-1), & WT NES vs. Fat-1 NES, + vs. Baseline; Tierzahlen: WT je: n = 26, Fat-1 je: n = 3

p-Werte: A: * Haupteffekt Behandlung p = 0, § Haupteffekt Genotyp p = 0,027 und p = 0, & p = 0,000422, + p = 0,000161; B: * p < 0,0001, § p = 0,0037

4.1.1.2 Motorische Aktivität

Als Reaktion auf den Käfigwechsel erhöhte sich die Aktivität aller Mäuse deutlich, was als Erkunden der unbekannteren Umgebung interpretiert werden kann. Nach 1,5 Stunden reduzierte sich die Aktivität auf basale Werte. Analog zum Verlauf der abdominalen Körpertemperatur zeigten Fat-1 eine erhöhte Aktivität gegenüber WT im Zeitraum 0,75 bis 1,25 Stunden. Ein Haupteffekt des Genotyps bei Betrachtung der kumulativen Aktivität lag allerdings nicht vor (Abbildung 51).

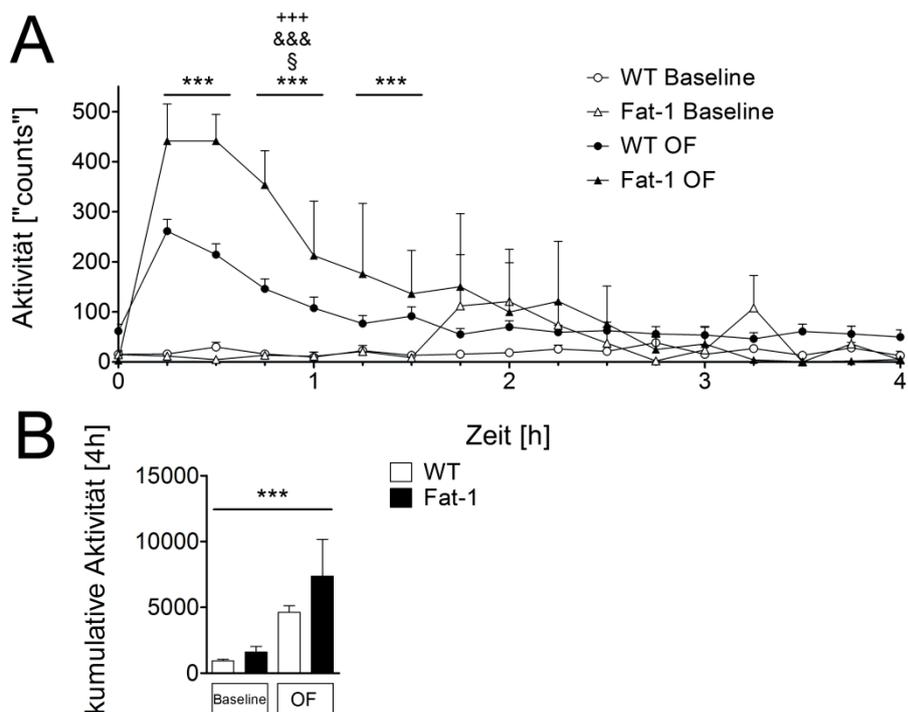


Abbildung 51

Aktivitätsprofil der Mäuse während des Käfigwechsels (NES, OF) und unter basalen Bedingungen (Baseline, A) sowie die kumulative Darstellung der Aktivität über den Zeitraum von vier Stunden (B). Fat-1 zeigten eine erhöhte Aktivität im Vergleich zu WT. * Haupteffekt Behandlung (NES vs. Baseline), § Haupteffekt Genotyp (WT vs. Fat-1), & WT NES vs. Fat-1 NES, + vs. Baseline; Tierzahlen: WT Baseline: n = 2, WT NES: n = 26, Fat-1 je: n = 3

p-Werte: A: * Haupteffekt Behandlung p = 0, § Haupteffekt Genotyp p = 0,018, & p = 0,000197, + p = 0,000162; B: * p < 0,0001

5. Verteilungsmuster verschiedener Phospholipide, Lysophospholipide und unveresterter Fettsäuren im Bereich der präoptischen Region und des OVLTs

Die Auswertung der durchgeführten MALDI-Experimente zeigte unter anderem spezifische Verteilungsmuster verschiedener Phospholipide sowie einiger unveresterter FS auf. Hierbei ist zunächst die generell sehr hohe Korrelation lichtmikroskopischer Bilder und aus MALDI-Daten generierter Bilder festzuhalten. Neben den in Zellmembranen am häufigsten vertretenden Phosphatidylcholinen (PC), Phosphatidylethanolaminen (PE), Phosphatidylserinen (PS) und Sphingomyelinen (SM) konnten auch Phosphatidylinositole (PI), Phosphatidylglycerine (PG) sowie Phosphatidylsäure (PA, *phosphatidic acid*) angesprochen werden. Des Weiteren gelang der Nachweis von Lysophospholipiden, die sich durch den Verlust der veresterten FS an der sn-2 Position auszeichnen, hier sind LysoPC (LPC), LysoPE (LPE), LysoPA (LPA) und LysoPI (LPI) zu nennen. Weiterhin existieren Plasmalogene, deren Nachweis ebenfalls gelang. Plasmalogene sind sogenannte Vinyl-ether, an deren sn-1 Position statt einer FS ein langkettiger Alkohol gebunden ist und die typischerweise an der sn-2 Position eine langkettige ungesättigte FS tragen (PUFA). Ihre Funktion als Speicher für DHA und AA wird in der Literatur immer wieder diskutiert [42, 60, 168, 178]. Die Kopfgruppe ist üblicherweise ein Cholin (PC P) oder ein Ethanolamin [64]. Analog kommen auch hier Lysoformen vor, die lediglich eine Kohlenwasserstoffkette an der sn-1 Position tragen. Im Rahmen dieser Arbeit gelang der Nachweis eines Lysocholin Plasmalogens (LPC P) sowie verschiedener Ethanolamin Plasmalogene (PE P). Massenspektrometrisch lassen sich Plasmalogene aufgrund identischer Summenformeln nicht von entsprechenden 1-O-Alkylethern (PC O, PE O) unterscheiden [66], weshalb neben der Plasmalogenbezeichnung meist eine Alkyletherbezeichnung aufgeführt wurde. Die Gesamtzahl der in den beiden Seitenketten vorhandenen Kohlenstoffatome sowie die Anzahl an enthaltenen Doppelbindungen sind nach dem Schema (C-Atome : Doppelbindungen) angegeben. Soll eine Differenzierung der FS an der sn-1 und sn-2 Position vorgenommen werden, wird das Schema (sn-1 / sn-2) angewendet. Im Folgenden sind vornehmlich Bilder von Massensignalen gezeigt, die in jeweils allen Messungen des entsprechenden Ionen-Modus detektiert werden konnten.

5.1 Messungen im positiven Ionen-Modus

Es wurden coronale Gehirnschnitte von Mäusen auf Höhe der präoptischen Region und des OVLTs angefertigt und gemessen. Um einen Eindruck der Gesamtverteilung verschiedener Zielsubstanz zu gewinnen, wurde ein Gehirnschnitt eines Kontrolltiers (WT PBS) in seiner Gesamtheit gemessen (38 μm Pixelgröße). Schnitte von mit LPS behandelten Tieren sollten mit einer höheren räumlichen Auflösung betrachtet werden (10 μm Pixelgröße). Dafür wurde die Messung auf den Bereich des OVLTs und die präoptische Region beschränkt.

Nach MALDI-Messungen im positiven Ionen-Modus wurde im gewonnen Datensatz sowohl gezielt nach Massensignalen bekannter Substanzen wie z.B. verschiedener Rv, FS und Phospholipide als auch ungezielt nach Substanzen mit spezifischem Vorkommen im OVLT gesucht. Rv, NPD1, Maresin-1 und Prostaglandine konnten nicht sicher angesprochen werden. Außerdem gelang kein Nachweis unveresterter FS. Vollständige Listen angesprochener und nicht aufgefundener Massen befindet sich am Ende dieser Arbeit (siehe VII).

Im positiven Ionen-Modus nachgewiesene Lysophosphocholine (LPCs)

Im positiven Ionen-Modus konnten LPC (16:0), (16:1), (18:0), (18:1) sowie (18:2) (Abbildung 52, Abbildung 53, Abbildung 54, Abbildung 55 und Abbildung 56) erfasst werden. Die Betrachtung der Verteilungsmuster all dieser Verbindungen zeigte eine erhöhte Signalintensität im Bereich des OVLTs und der präoptischen Region für das mit LPS behandelte Fat-1 Tier. Im Kontrolltier war hingegen eher eine homogene Verteilung der oben genannten LPCs im Bereich der präoptischen Region und dem OVLT festzustellen. Als Ausnahme von diesem Muster muss hierbei LPC (18:2) (Abbildung 56) genannt werden. Diese Substanz zeigte in alle Situationen (Behandlung und Genotyp) ein scharf umrissenes, deutlich verstärktes Signal in der entsprechenden Zielregion. Am deutlichsten war dieser Effekte jedoch wieder bei dem mit LPS-behandelten Fat-1 Tier zu sehen.

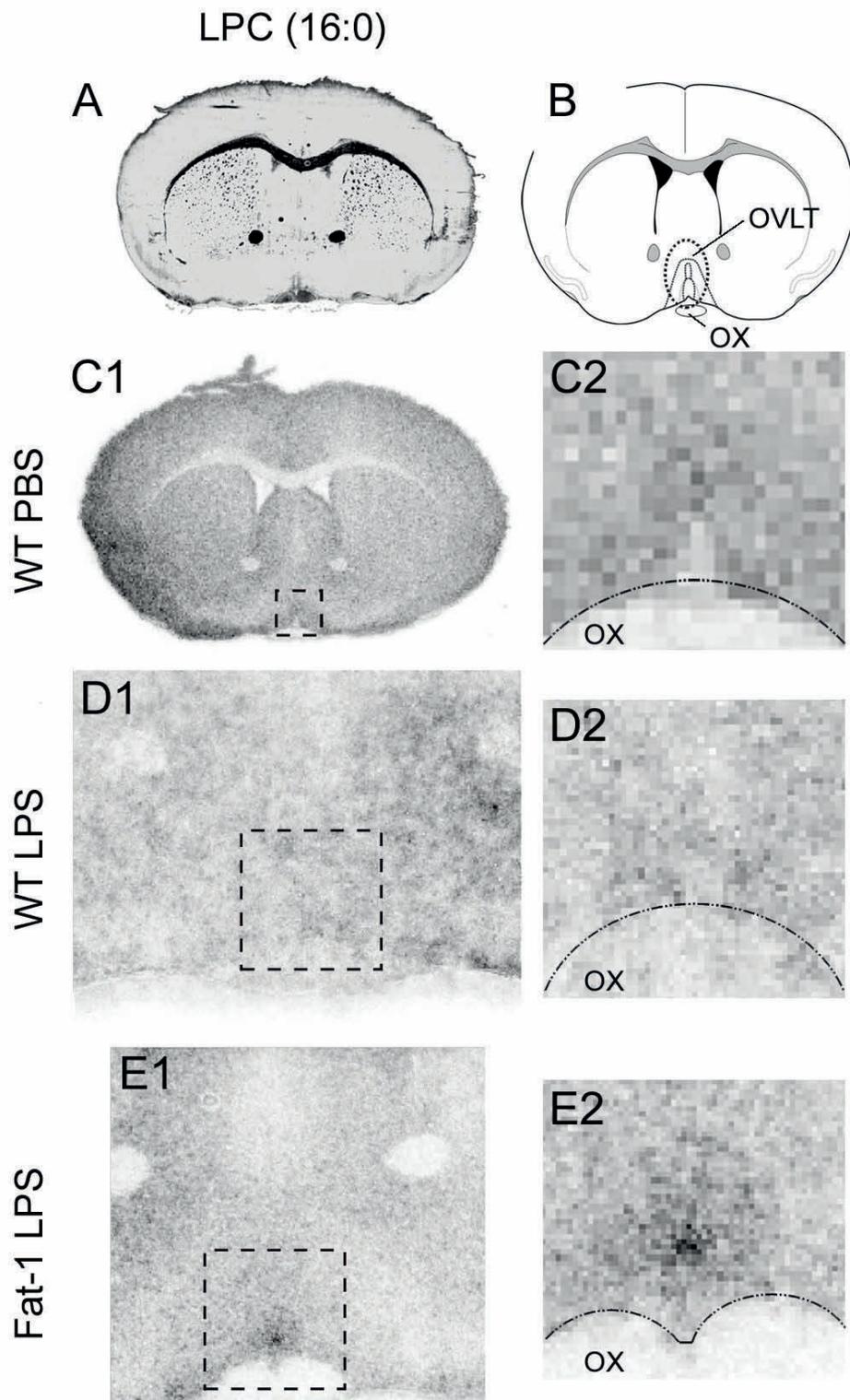


Abbildung 52

LPC (16:0) Signale im Bereich des *Organum vasculosum laminae terminalis* (OVLT) und der präoptischen Region 24 Stunden nach intraperitonealer Applikation von 2,5 mg/kg Lipopolysaccharid (LPS, D und E) oder Lösungsmittel (PBS, C) bei Wildtypmäusen (C und D) sowie einem Fat-1 Tier (E). Teilbild A stellt eine Lichtmikroskopische Aufnahme der anatomischen Gegebenheiten dar. Teilbild B zeigt eine schematische Darstellung der Region sowie die Lokalisation der Sehnervenkreuzung (ox). In D2 und E2 sind jeweils eine zweifache Vergrößerung des gekennzeichneten Bereichs aus D1 und E1, in C2 eine vierfache Vergrößerung der Darstellung in C1 zu sehen. Gemessene Pixelgröße in C = 38 μm , in D und E = 10 μm ; gemessene Pixelanzahl: C1 = 250 x 160, D1 = 250 x 200, E1 = 240 x 230.

Angaben zu gemessenen Parametern finden sich in Tabelle 32, Tabelle 33 und Tabelle 34 jeweils in Zeile 3.

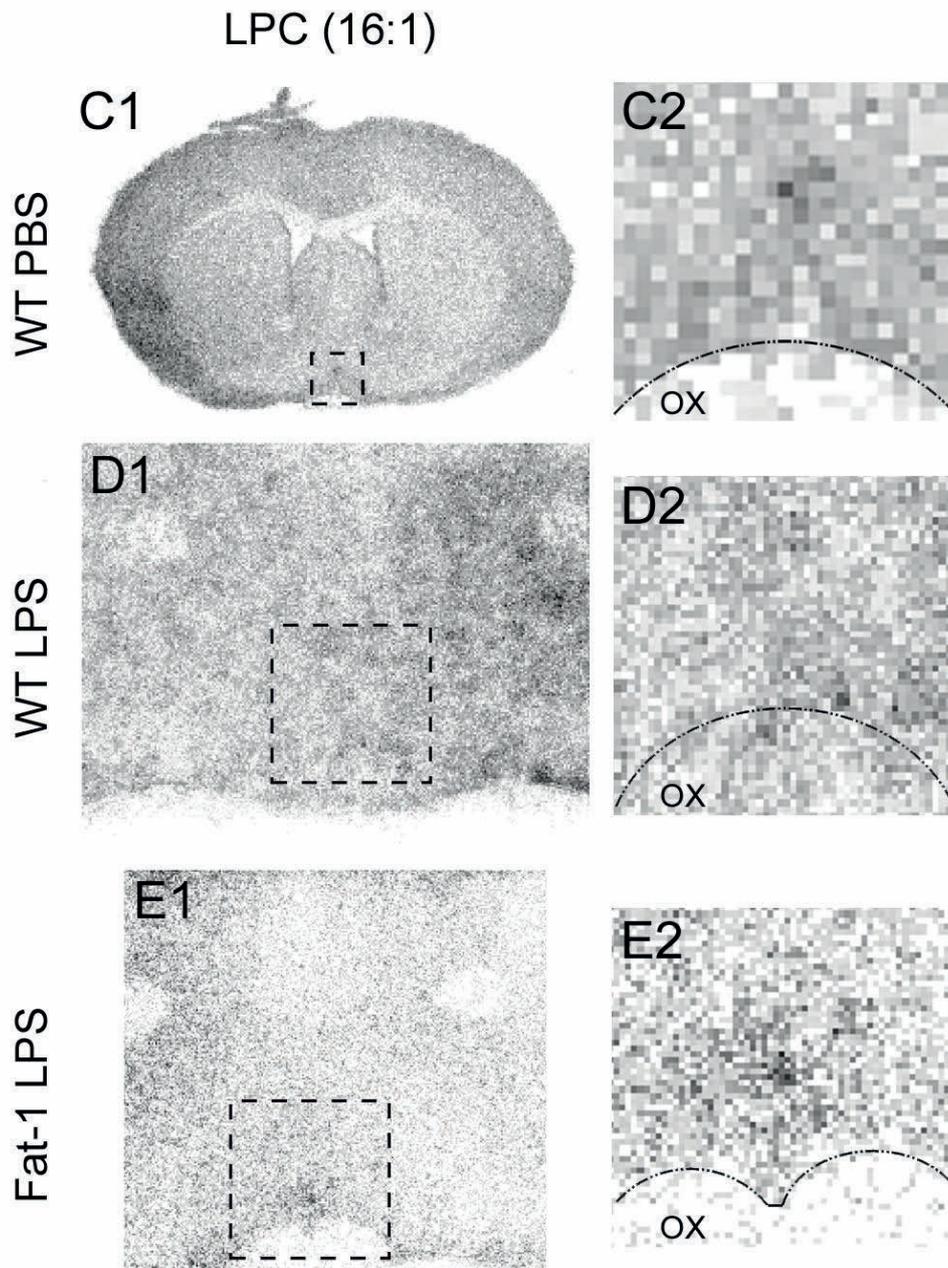


Abbildung 53

LPC (16:1) Signale im Bereich des *Organum vasculosum laminae terminalis* (OVLT) und der präoptischen Region 24 Stunden nach intraperitonealer Applikation von 2,5 mg/kg Lipopolysaccharid (LPS, D und E) oder Lösungsmittel (PBS, C) bei Wildtypmäusen (C und D) sowie einem Fat-1 Tier (E). Ein Überblick über anatomische Gegebenheiten ist in Teilbild A und B der Abbildung 52 dargestellt. In D2 und E2 ist jeweils eine zweifache Vergrößerung des gekennzeichneten Bereichs aus D1 und E1 zu sehen; in C2 eine vierfache Vergrößerung der Darstellung in C1. Gemessene Pixelgröße in C = 38 μm , in D und E = 10 μm ; gemessene Pixelanzahl: C1 = 250 x 160, D1 = 250 x 200, E1 = 240 x 230.

Angaben zu gemessenen Parametern finden sich in Tabelle 32, Tabelle 33 und Tabelle 34 jeweils in Zeile 7.

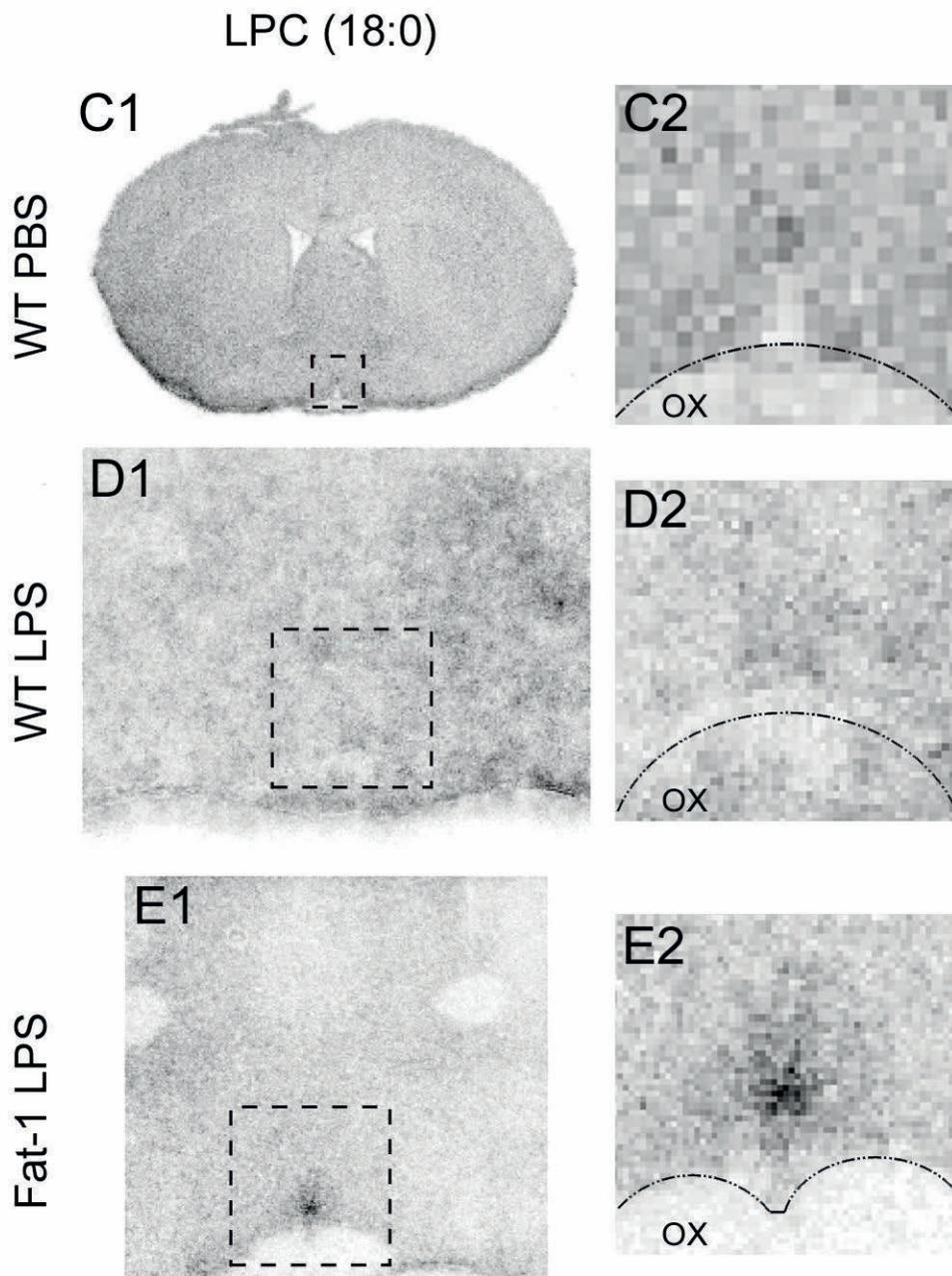


Abbildung 54

LPC (18:0) Signale im Bereich des *Organum vasculosum laminae terminalis* (OVLT) und der präoptischen Region 24 Stunden nach intraperitonealer Applikation von 2,5 mg/kg Lipopolysaccharid (LPS, D und E) oder Lösungsmittel (PBS, C) bei Wildtypmäusen (C und D) sowie einem Fat-1 Tier (E). Ein Überblick über anatomische Gegebenheiten ist in Teilbild A und B der Abbildung 52 dargestellt. In D2 und E2 ist jeweils eine zweifache Vergrößerung des gekennzeichneten Bereichs aus D1 und E1 zu sehen; in C2 eine vierfache Vergrößerung der Darstellung in C1. Gemessene Pixelgröße in C = 38 μm , in D und E = 10 μm ; gemessene Pixelanzahl: C1 = 250 x 160, D1 = 250 x 200, E1 = 240 x 230.

Angaben zu gemessenen Parametern finden sich Tabelle 32, Tabelle 33 und Tabelle 34 jeweils in Zeile 10.

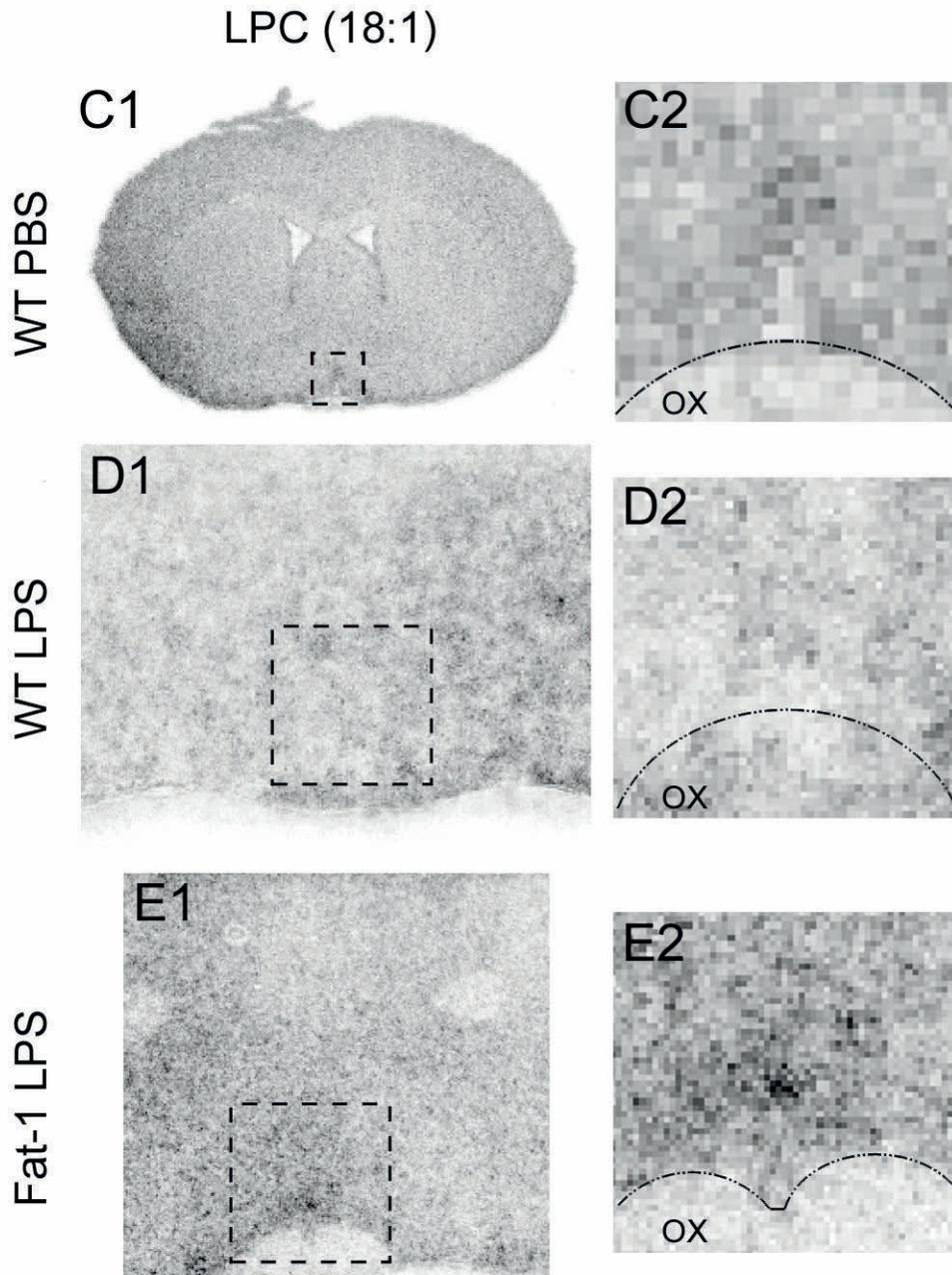


Abbildung 55

LPC (18:1) Signale im Bereich des *Organum vasculosum laminae terminalis* (OVLT) und der präoptischen Region 24 Stunden nach intraperitonealer Applikation von 2,5 mg/kg Lipopolysaccharid (LPS, D und E) oder Lösungsmittel (PBS, C) bei Wildtypmäusen (C und D) sowie einem Fat-1 Tier (E). Ein Überblick über anatomische Gegebenheiten ist in Teilbild A und B der Abbildung 52 dargestellt. In D2 und E2 ist jeweils eine zweifache Vergrößerung des gekennzeichneten Bereichs aus D1 und E1 zu sehen; in C2 eine vierfache Vergrößerung der Darstellung in C1. Gemessene Pixelgröße in C = 38 μm , in D und E = 10 μm ; gemessene Pixelanzahl: C1 = 250 x 160, D1 = 250 x 200, E1 = 240 x 230.

Angaben zu gemessenen Parametern finden sich in Tabelle 32, Tabelle 33 und Tabelle 34 in Zeile 13, 13 bzw. 12.

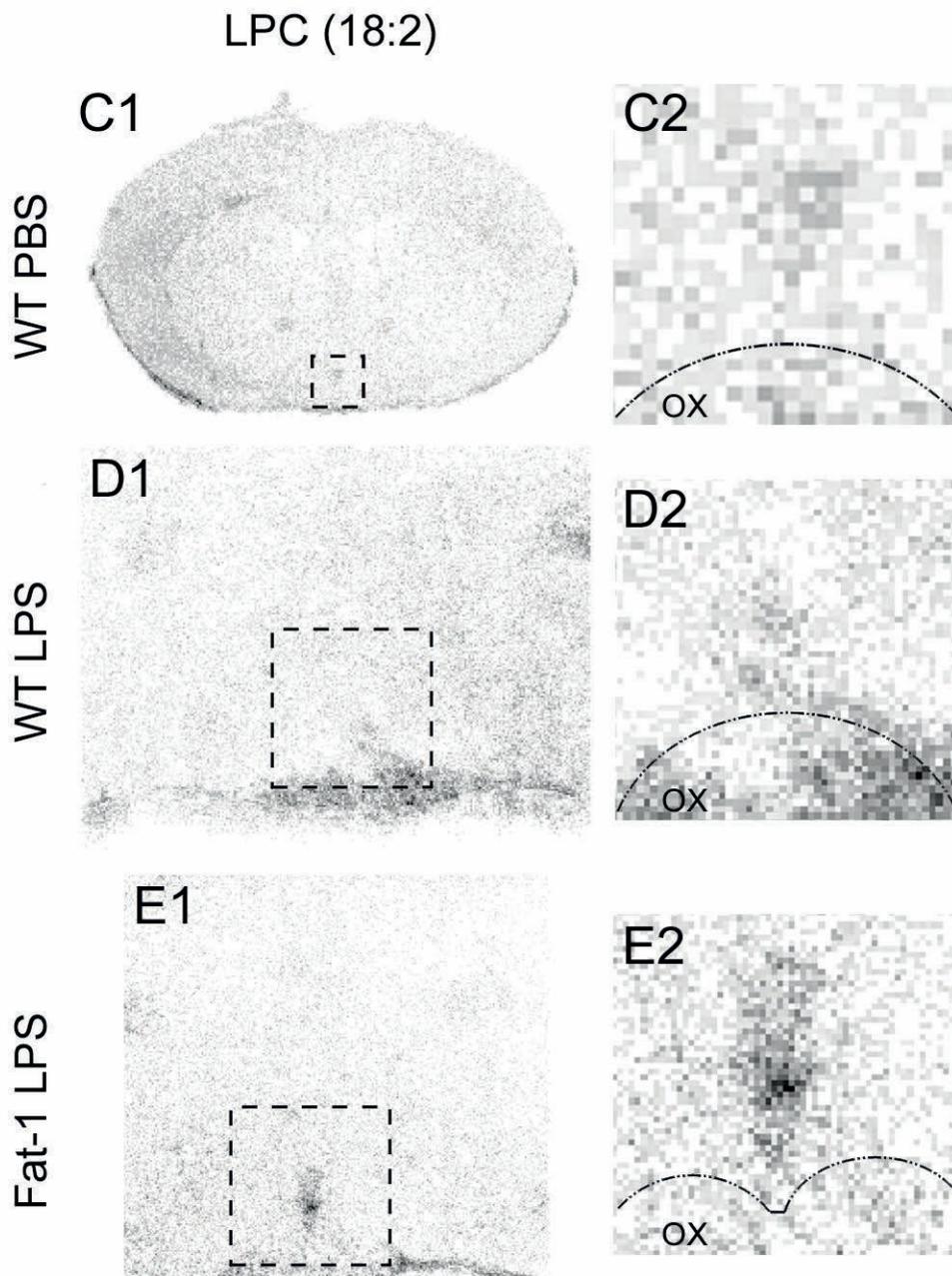


Abbildung 56

LPC (18:2) Signale im Bereich des *Organum vasculosum laminae terminalis* (OVLT) und der präoptischen Region 24 Stunden nach intraperitonealer Applikation von 2,5 mg/kg Lipopolysaccharid (LPS, D und E) oder Lösungsmittel (PBS, C) bei Wildtypmäusen (C und D) sowie einem Fat-1 Tier (E). Ein Überblick über anatomische Gegebenheiten ist in Teilbild A und B der Abbildung 52 dargestellt. In D2 und E2 ist jeweils eine zweifache Vergrößerung des gekennzeichneten Bereichs aus D1 und E1 zu sehen; in C2 eine vierfache Vergrößerung der Darstellung in C1. Gemessene Pixelgröße in C = 38 μm , in D und E = 10 μm ; gemessene Pixelanzahl: C1 = 250 x 160, D1 = 250 x 200, E1 = 240 x 230.

Angaben zu gemessenen Parametern finden sich in Tabelle 32, Tabelle 33 und Tabelle 34 in Zeile 17, 17 bzw. 15.

Im positiven Ionen-Modus nachgewiesene Lysophosphoethanolamine (LPEs)

Die Verteilungsmuster angesprochener LPEs unterschieden sich deutlich von denen der LPCs. LPE (16:0) (Abbildung 57) und (18:0) (Abbildung 58) waren nahezu über den gesamten analysierten Bereich hinweg homogen verteilt. Ein deutlicher Unterschied der Verteilung beider Substanzen war allerdings im Bereich des OVLTs zu sehen. Im Gegensatz zu LPE (18:0) gelang hier kein Nachweis von LPE (16:0). Dieser ausgesparte Bereich konnte vor allem für das LPS-stimulierte Fat-1 Tier gezeigt werden. Leitungsstrukturen (corpus callosum, Sehnerv und vordere Kommissuren) stellten sich in Teilen für LPE (16:0) geringgradig signalintensiver als die Umgebung dar. Ein wiederum anderes Verteilungsmuster mit deutlichen Signalen in allen Leitungsbahnen wies LPE (18:1) auf (Abbildung 59).

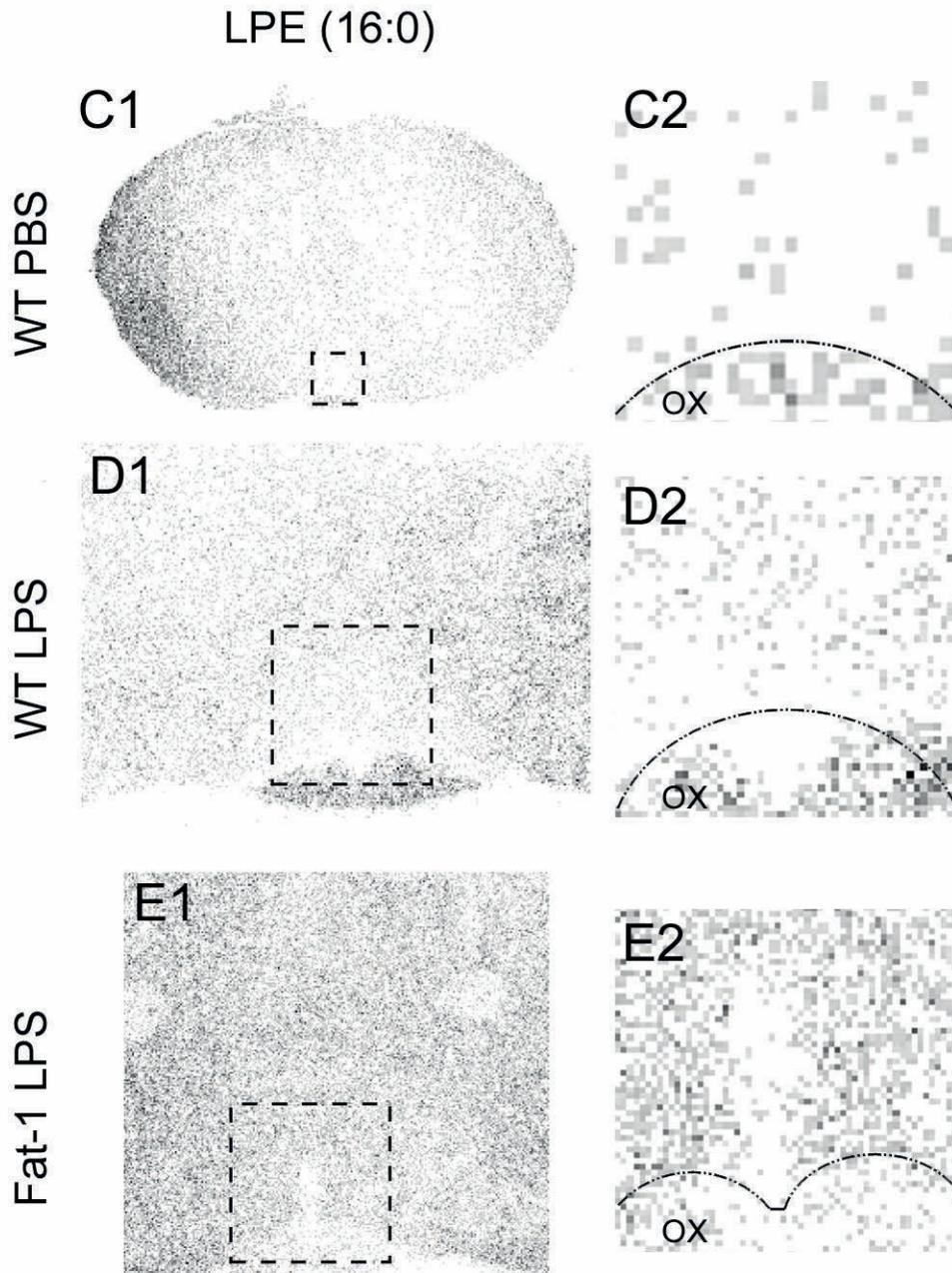


Abbildung 57

LPE (16:0) Signale im Bereich des *Organum vasculosum laminae terminalis* (OVLT) und der präoptischen Region 24 Stunden nach intraperitonealer Applikation von 2,5 mg/kg Lipopolysaccharid (LPS, D und E) oder Lösungsmittel (PBS, C) bei Wildtypmäusen (C und D) sowie einem Fat-1 Tier (E). Ein Überblick über anatomische Gegebenheiten ist in Teilbild A und B der Abbildung 52 zu sehen. In D2 und E2 ist jeweils eine zweifache Vergrößerung des gekennzeichneten Bereichs aus D1 und E1 zu sehen; in C2 eine vierfache Vergrößerung der Darstellung in C1. Gemessene Pixelgröße in C = 38 μm , in D und E = 10 μm ; gemessene Pixelanzahl: C1 = 250 x 160, D1 = 250 x 200, E1 = 240 x 230.

Angaben zu gemessenen Parametern finden sich in Tabelle 32, Tabelle 33 und Tabelle 34 in Zeile 27, 26 bzw. 23.

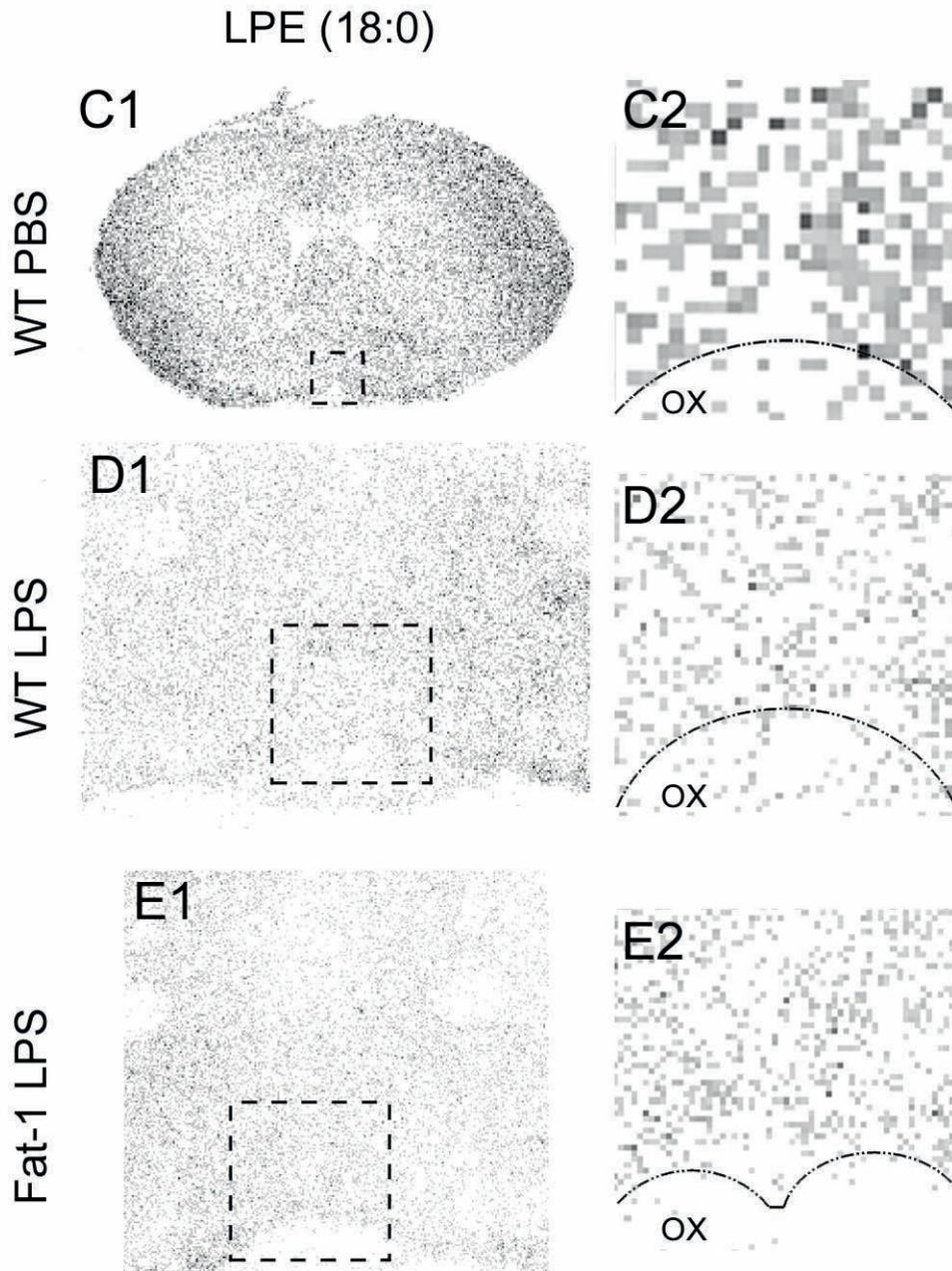


Abbildung 58

LPE (18:0) Signale im Bereich des *Organum vasculosum laminae terminalis* (OVLT) und der präoptischen Region 24 Stunden nach intraperitonealer Applikation von 2,5 mg/kg Lipopolysaccharid (LPS, D und E) oder Lösungsmittel (PBS, C) bei Wildtypmäusen (C und D) sowie einem Fat-1 Tier (E). Ein Überblick über anatomische Gegebenheiten ist in Teilbild A und B der Abbildung 52 zu sehen. In D2 und E2 ist jeweils eine zweifache Vergrößerung des gekennzeichneten Bereichs aus D1 und E1 zu sehen; in C2 eine vierfache Vergrößerung der Darstellung in C1. Gemessene Pixelgröße in C = 38 μm , in D und E = 10 μm ; gemessene Pixelanzahl: C1 = 250 x 160, D1 = 250 x 200, E1 = 240 x 230.

Angaben zu gemessenen Parametern finden sich in Tabelle 32, Tabelle 33 und Tabelle 34 in Zeile 29, 28 bzw. 25.

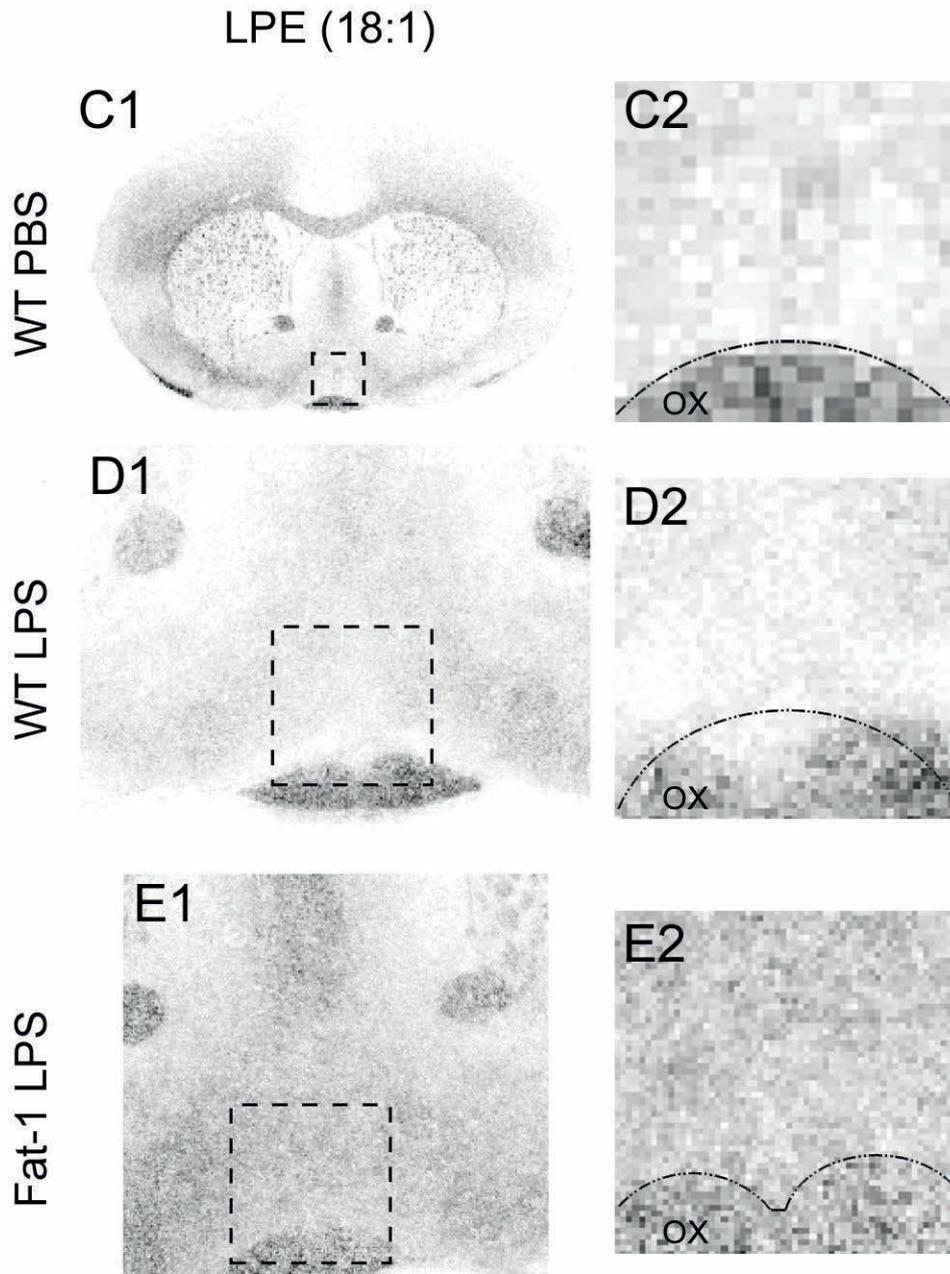


Abbildung 59

LPE (18:1) Signale im Bereich des *Organum vasculosum laminae terminalis* (OVLT) und der präoptischen Region 24 Stunden nach intraperitonealer Applikation von 2,5 mg/kg Lipopolysaccharid (LPS, D und E) oder Lösungsmittel (PBS, C) bei Wildtypmäusen (C und D) sowie einem Fat-1 Tier (E). Ein Überblick über anatomische Gegebenheiten ist in Teilbild A und B der Abbildung 52 dargestellt. In D2 und E2 ist jeweils eine zweifache Vergrößerung des gekennzeichneten Bereichs aus D1 und E1 zu sehen; in C2 eine vierfache Vergrößerung der Darstellung in C1. Gemessene Pixelgröße in C = 38 μm , in D und E = 10 μm ; gemessene Pixelanzahl: C1 = 250 x 160, D1 = 250 x 200, E1 = 240 x 230.

Angaben zu gemessenen Parametern finden sich in Tabelle 32, Tabelle 33 und Tabelle 34 in Zeile 23, 22 bzw. 19.

Im positiven Ionen-Modus nachgewiesene Phosphatidylsäure (PA)

Darüber hinaus gelang der Nachweis eines PAs, welches zu geringen Teilen mit Arachidonsäure verestert ist [23]. Hierbei handelte es sich um das in der präoptischen Region vorwiegend homogen verteilte PA (38:5) (Abbildung 60). Leitungsbahnen zeigten reduzierte Signale. Ebenso zeichnet sich dezent der Bereich des *Nucleus praeopticus medianus* (MnPO) durch eine reduzierte Signalintensität ab. In der Kontrollmessung (WT PBS) fiel ein deutlich abgeschwächtes Signal im Bereich des OVLTs auf. Ein mit dem Auftreten von PA (38:5) vergleichbares Verteilungsmuster fand sich für PC (36:4) (Abbildung 61).

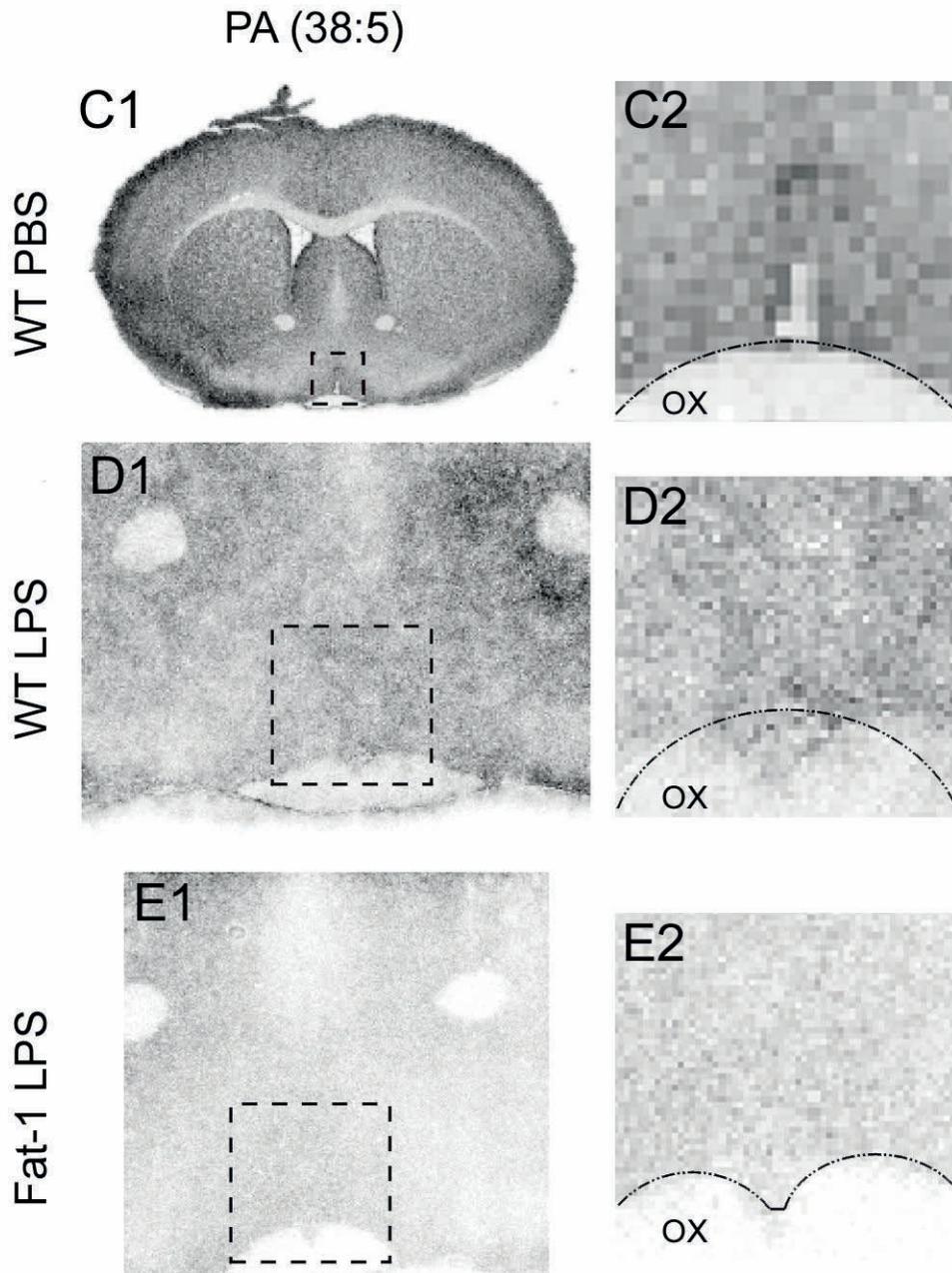


Abbildung 60

PA (38:5) Signale im Bereich des *Organum vasculosum laminae terminalis* (OVLT) und der präoptischen Region 24 Stunden nach intraperitonealer Applikation von 2,5 mg/kg Lipopolysaccharid (LPS, D und E) oder Lösungsmittel (PBS, C) bei Wildtypmäusen (C und D) sowie einem Fat-1 Tier (E). Ein Überblick über anatomische Gegebenheiten ist in Teilbild A und B der Abbildung 52 zu sehen. In D2 und E2 ist jeweils eine zweifache Vergrößerung des gekennzeichneten Bereichs aus D1 und E1 zu sehen; in C2 eine vierfache Vergrößerung der Darstellung in C1. Gemessene Pixelgröße in C = 38 μm , in D und E = 10 μm ; gemessene Pixelanzahl: C1 = 250 x 160, D1 = 250 x 200, E1 = 240 x 230.

Angaben zu gemessenen Parametern finden sich in Tabelle 32, Tabelle 33 und Tabelle 34 in Zeile 67, 71 bzw. 69.

Im positiven Ionen-Modus nachgewiesene Phosphatidylcholine (PCs)

Andere nachgewiesene PCs als PC (36:4) (PC (38:4), (40:6) und (40:7)) zeigten sehr ähnliche, nahezu identische Verteilungsmuster mit fehlendem Signal im OVLT (Abbildung 62, Abbildung 63, Abbildung 64). Als Besonderheit ist PC (38:6) zu nennen. In beiden Messungen der WT Tiere (LPS und PBS) waren Signale im OVLT reduziert, jedoch im LPS-stimulierten Fat-1 Tier erhöht (Abbildung 65). Sowohl für PC (36:4) als auch für PC (38:4) und PC (38:6) sind Veresterungen mit AA beschrieben. In PC (38:6) kommen diese allerdings nur selten vor. PC (40:6) sowie PC (40:7) tragen typischerweise eher DHA an ihrer sn-2 Position [23].

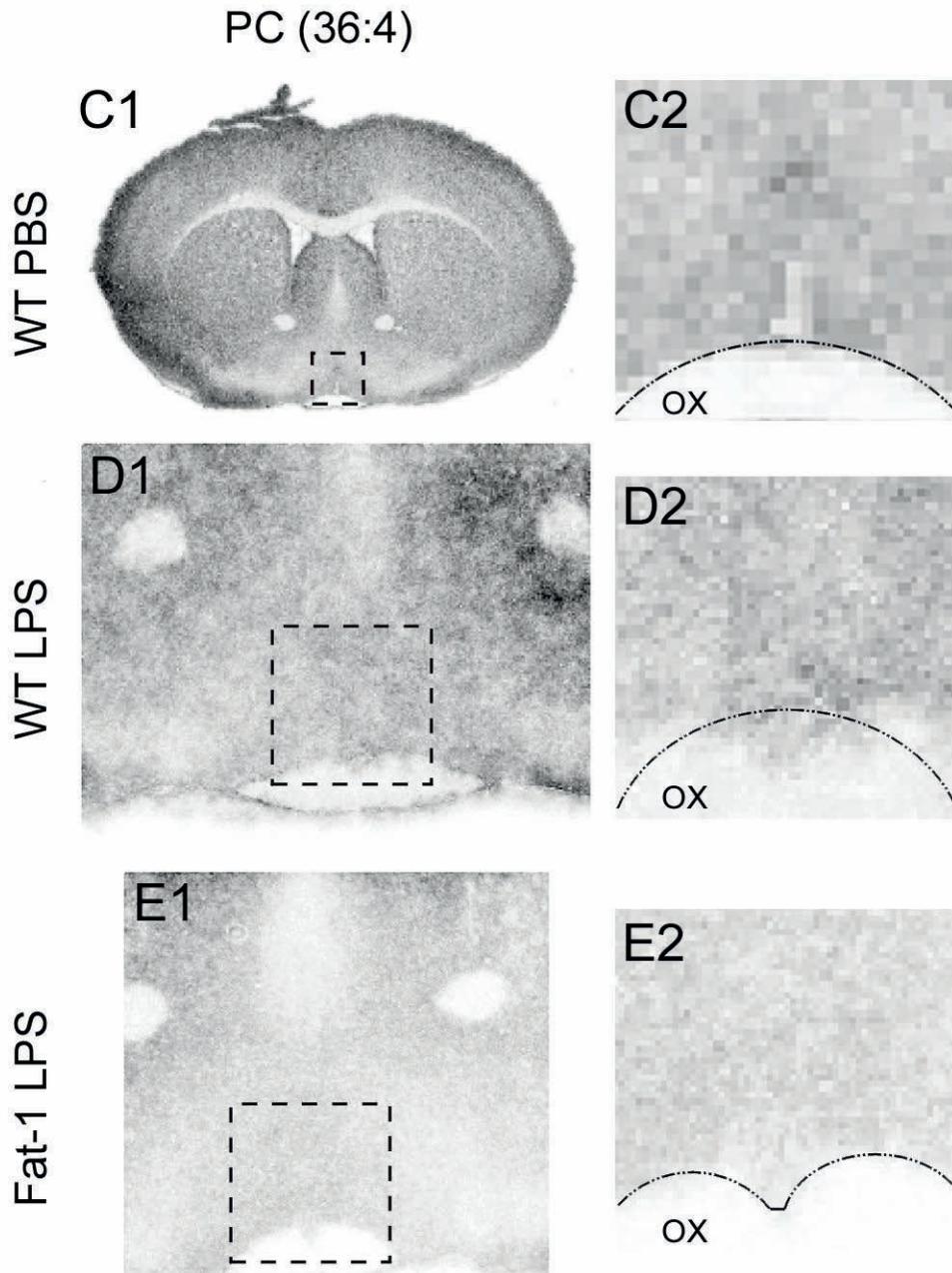


Abbildung 61

PC (36:4) Signale im Bereich des *Organum vasculosum laminae terminalis* (OVLT) und der präoptischen Region 24 Stunden nach intraperitonealer Applikation von 2,5 mg/kg Lipopolysaccharid (LPS, D und E) oder Lösungsmittel (PBS, C) bei Wildtypmäusen (C und D) sowie einem Fat-1 Tier (E). Ein Überblick über anatomische Gegebenheiten ist in Teilbild A und B der Abbildung 52 dargestellt. In D2 und E2 ist jeweils eine zweifache Vergrößerung des gekennzeichneten Bereichs aus D1 und E1 zu sehen; in C2 eine vierfache Vergrößerung der Darstellung in C1. Gemessene Pixelgröße in C = 38 μm , in D und E = 10 μm ; gemessene Pixelanzahl: C1 = 250 x 160, D1 = 250 x 200, E1 = 240 x 230.

Angaben zu gemessenen Parametern finden sich in Tabelle 32, Tabelle 33 und Tabelle 34 in Zeile 31, 31 bzw. 28.

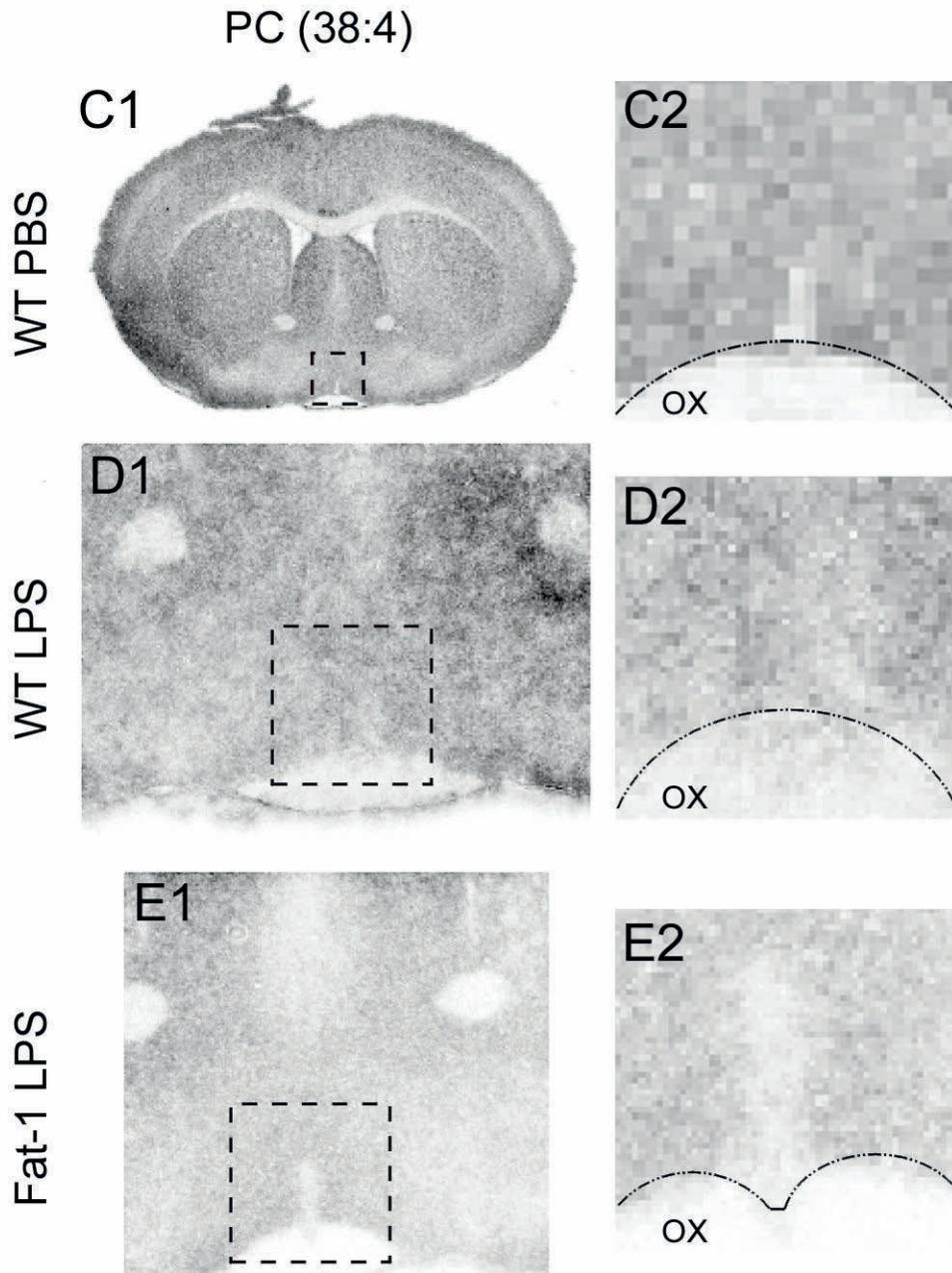


Abbildung 62

PC (38:4) Signale im Bereich des *Organum vasculosum laminae terminalis* (OVLT) und der präoptischen Region 24 Stunden nach intraperitonealer Applikation von 2,5 mg/kg Lipopolysaccharid (LPS, D und E) oder Lösungsmittel (PBS, C) bei Wildtypmäusen (C und D) sowie einem Fat-1 Tier (E). Ein Überblick über anatomische Gegebenheiten ist in Teilbild A und B der Abbildung 52 dargestellt. In D2 und E2 ist jeweils eine zweifache Vergrößerung des gekennzeichneten Bereichs aus D1 und E1 zu sehen; in C2 eine vierfache Vergrößerung der Darstellung in C1. Gemessene Pixelgröße in C = 38 μm , in D und E = 10 μm ; gemessene Pixelanzahl: C1 = 250 x 160, D1 = 250 x 200, E1 = 240 x 230.

Angaben zu gemessenen Parametern finden sich in Tabelle 32, Tabelle 33 und Tabelle 34 in Zeile 33, 33 bzw. 31.

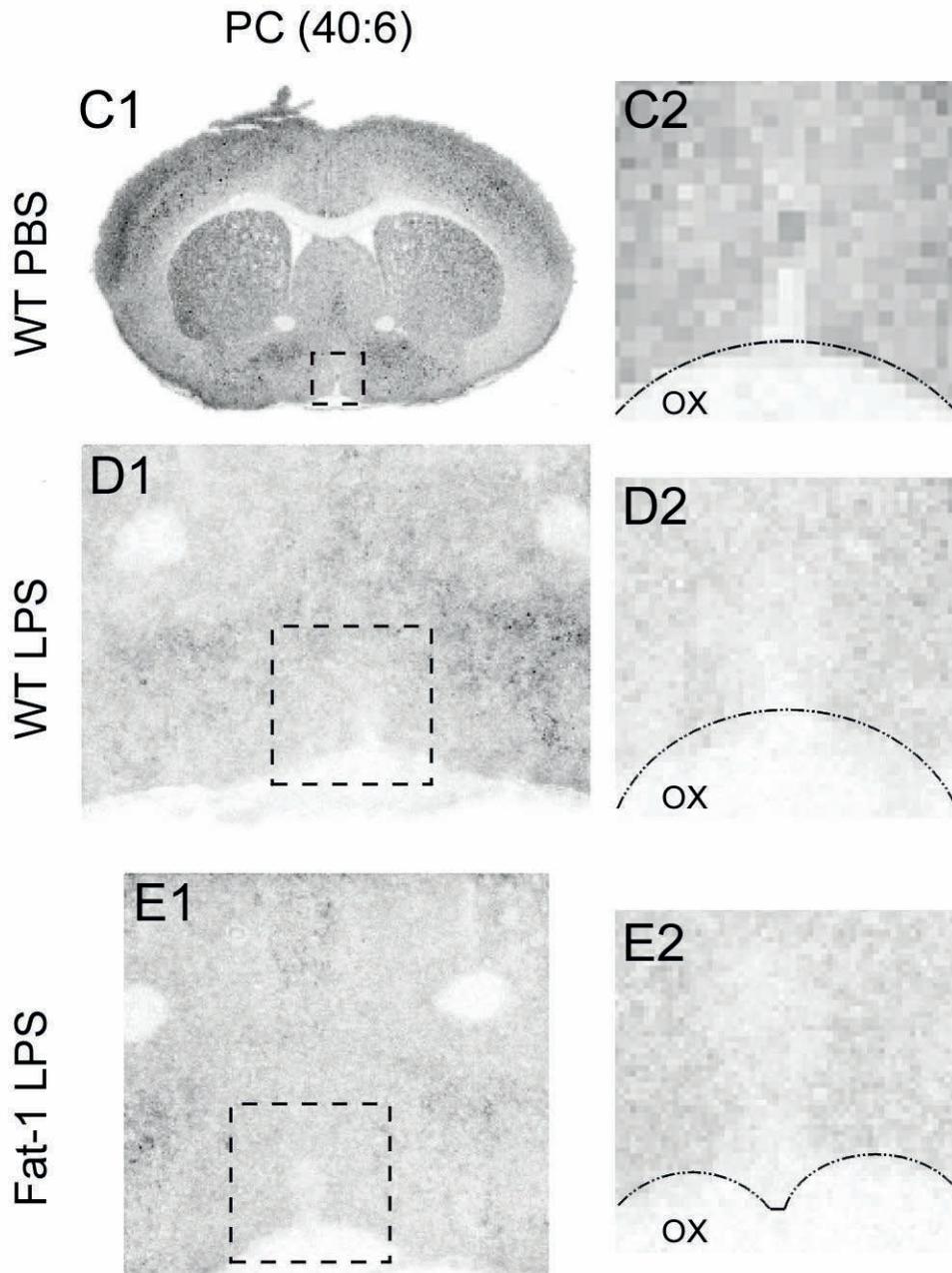


Abbildung 63

PC (40:6) Signale im Bereich des *Organum vasculosum laminae terminalis* (OVLT) und der präoptischen Region 24 Stunden nach intraperitonealer Applikation von 2,5 mg/kg Lipopolysaccharid (LPS, D und E) oder Lösungsmittel (PBS, C) bei Wildtypmäusen (C und D) sowie einem Fat-1 Tier (E). Ein Überblick über anatomische Gegebenheiten ist in Teilbild A und B der Abbildung 52 dargestellt. In D2 und E2 ist jeweils eine zweifache Vergrößerung des gekennzeichneten Bereichs aus D1 und E1 zu sehen; in C2 eine vierfache Vergrößerung der Darstellung in C1. Gemessene Pixelgröße in C = 38 μm , in D und E = 10 μm ; gemessene Pixelanzahl: C1 = 250 x 160, D1 = 250 x 200, E1 = 240 x 230.

Angaben zu gemessenen Parametern finden sich in Tabelle 32, Tabelle 33 und Tabelle 34 in Zeile 44, 45 bzw. 44.

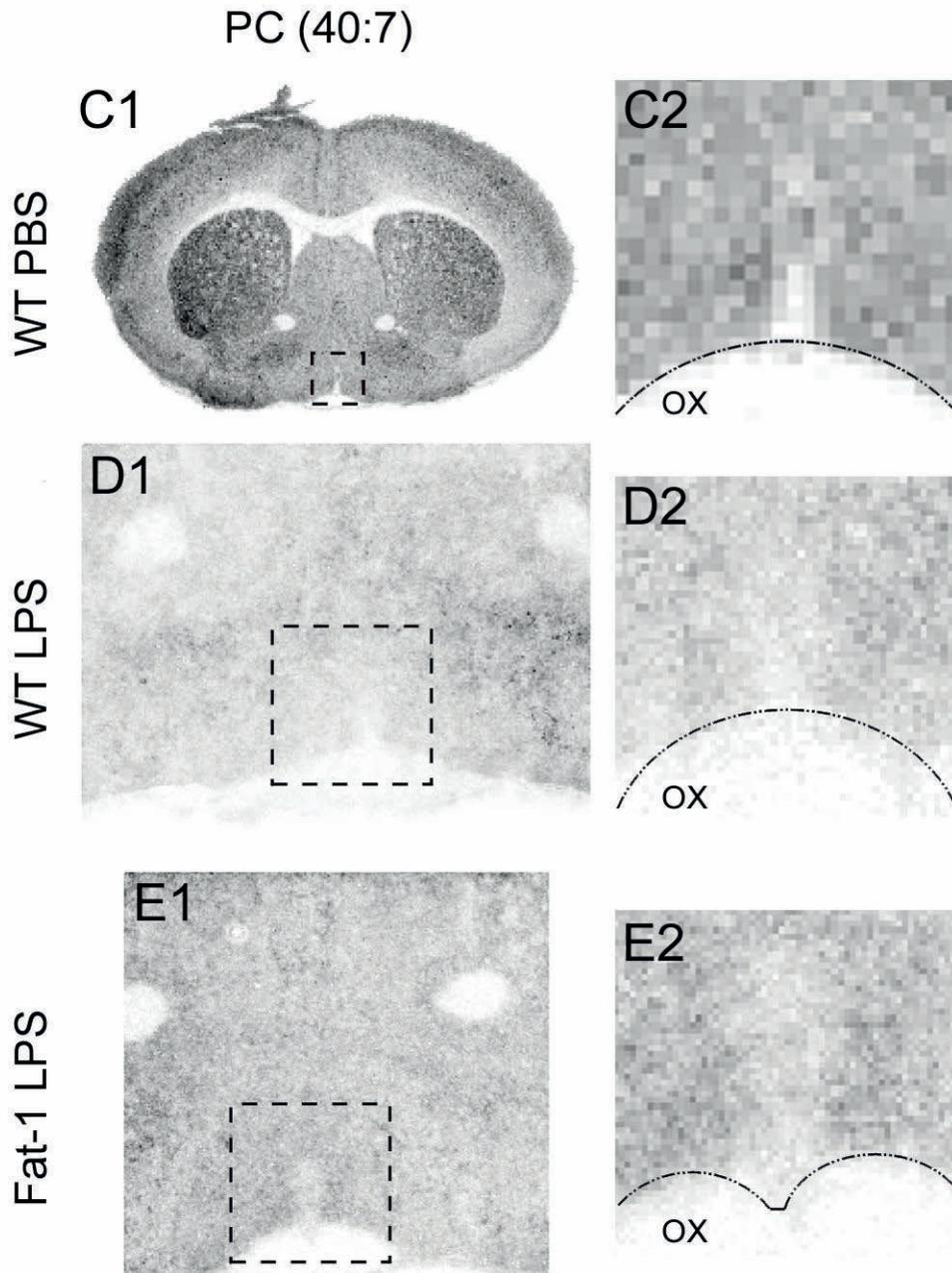


Abbildung 64

PC (40:7) Signale im Bereich des *Organum vasculosum laminae terminalis* (OVLT) und der präoptischen Region 24 Stunden nach intraperitonealer Applikation von 2,5 mg/kg Lipopolysaccharid (LPS, D und E) oder Lösungsmittel (PBS, C) bei Wildtypmäusen (C und D) sowie einem Fat-1 Tier (E). Ein Überblick über anatomische Gegebenheiten ist in Teilbild A und B der Abbildung 52 dargestellt. In D2 und E2 ist jeweils eine zweifache Vergrößerung des gekennzeichneten Bereichs aus D1 und E1 zu sehen; in C2 eine vierfache Vergrößerung der Darstellung in C1. Gemessene Pixelgröße in C = 38 μm , in D und E = 10 μm ; gemessene Pixelanzahl: C1 = 250 x 160, D1 = 250 x 200, E1 = 240 x 230.

Angaben zu gemessenen Parametern finden sich in Tabelle 32, Tabelle 33 und Tabelle 34 in Zeile 46, 47 bzw. 46.

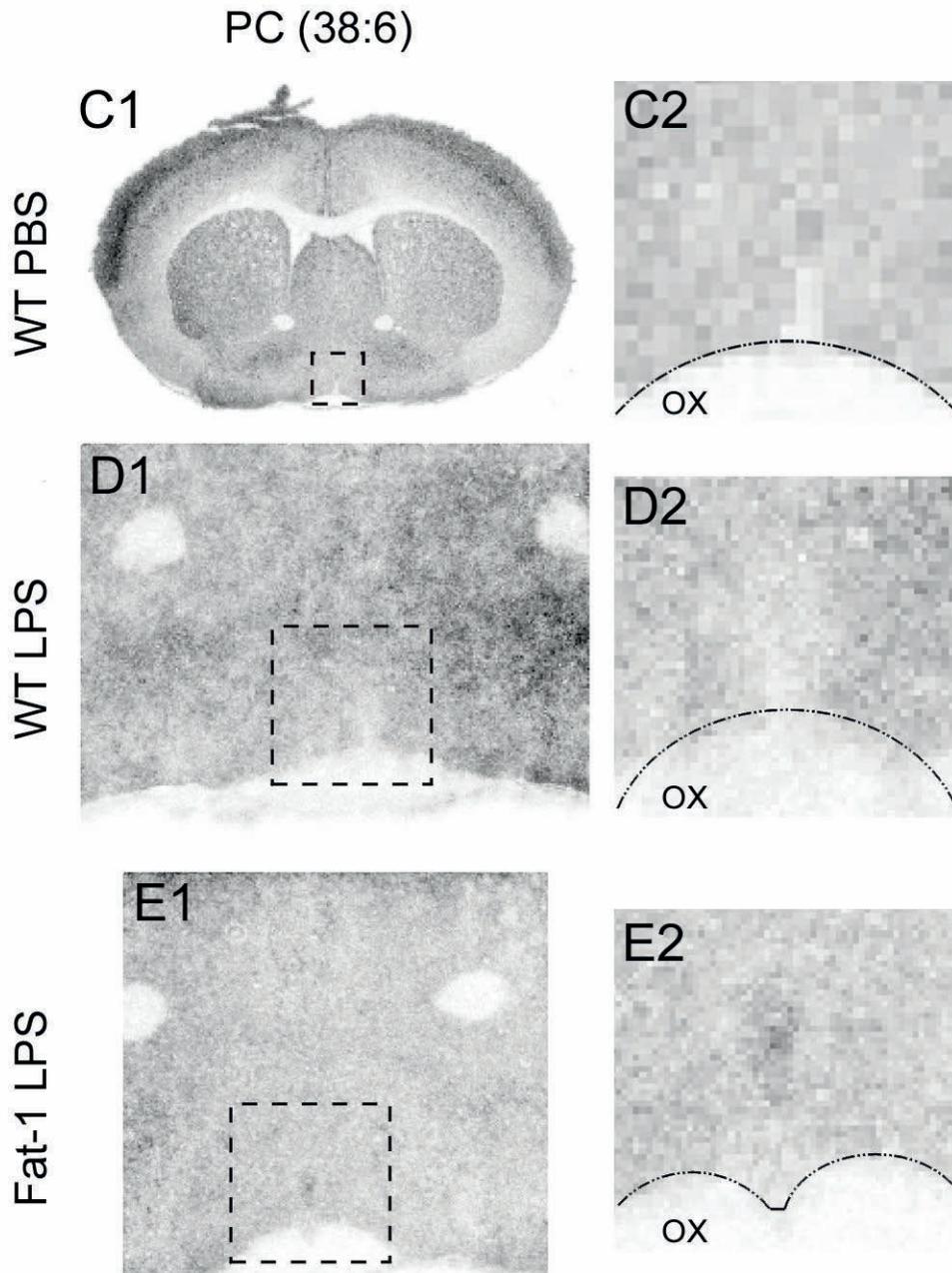


Abbildung 65

PC (38:6) Signale im Bereich des *Organum vasculosum laminae terminalis* (OVLT) und der präoptischen Region 24 Stunden nach intraperitonealer Applikation von 2,5 mg/kg Lipopolysaccharid (LPS, D und E) oder Lösungsmittel (PBS, C) bei Wildtypmäusen (C und D) sowie einem Fat-1 Tier (E). Ein Überblick über anatomische Gegebenheiten ist in Teilbild A und B der Abbildung 52 zu sehen. In D2 und E2 ist jeweils eine zweifache Vergrößerung des gekennzeichneten Bereichs aus D1 und E1 zu sehen; in C2 eine vierfache Vergrößerung der Darstellung in C1. Gemessene Pixelgröße in C = 38 μm , in D und E = 10 μm ; gemessene Pixelanzahl: C1 = 250 x 160, D1 = 250 x 200, E1 = 240 x 230.

Angaben zu gemessenen Parametern finden sich in Tabelle 32, Tabelle 33 und Tabelle 34 in Zeile 38, 39 bzw. 37.

Im positiven Ionen-Modus nachgewiesene Phosphatidylethanolamine (PEs) und Phosphatidylserin (PS)

Entsprechend dem Auftreten der meisten PCs stellten sich gefundene PEs dar. Sowohl PE (38:6) als auch PE (40:6) zeichneten sich durch ein abgeschwächtes bis fehlendes Signal im Bereich des OVLTs aus (Abbildung 66, Abbildung 67). Das Selbe galt für das einzige im positiven Ionen-Modus ansprechbare PS (Abbildung 68). Nachgewiesene PEs sowie PS (40:6) tragen verschieden häufig, aber regelmäßig DHA [23].

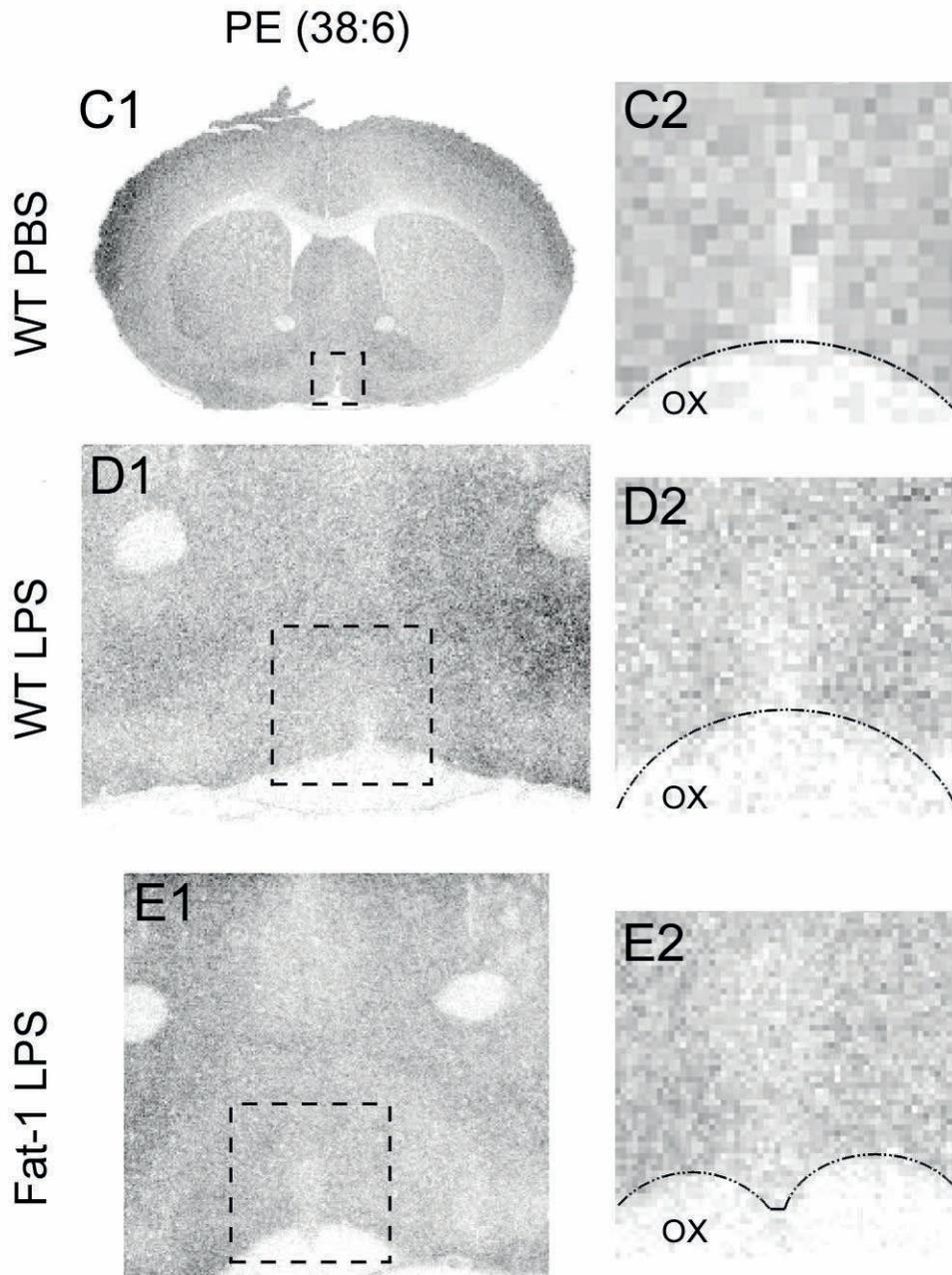


Abbildung 66

PE (38:6) Signale im Bereich des *Organum vasculosum laminae terminalis* (OVLT) und der präoptischen Region 24 Stunden nach intraperitonealer Applikation von 2,5 mg/kg Lipopolysaccharid (LPS, D und E) oder Lösungsmittel (PBS, C) bei Wildtypmäusen (C und D) sowie einem Fat-1 Tier (E). Ein Überblick über anatomische Gegebenheiten ist in Teilbild A und B der Abbildung 52 dargestellt. In D2 und E2 ist jeweils eine zweifache Vergrößerung des gekennzeichneten Bereichs aus D1 und E1 zu sehen; in C2 eine vierfache Vergrößerung der Darstellung in C1. Gemessene Pixelgröße in C = 38 μm , in D und E = 10 μm ; gemessene Pixelanzahl: C1 = 250 x 160, D1 = 250 x 200, E1 = 240 x 230.

Angaben zu gemessenen Parametern finden sich in Tabelle 32, Tabelle 33 und Tabelle 34 in Zeile 52, 55 bzw. 53.

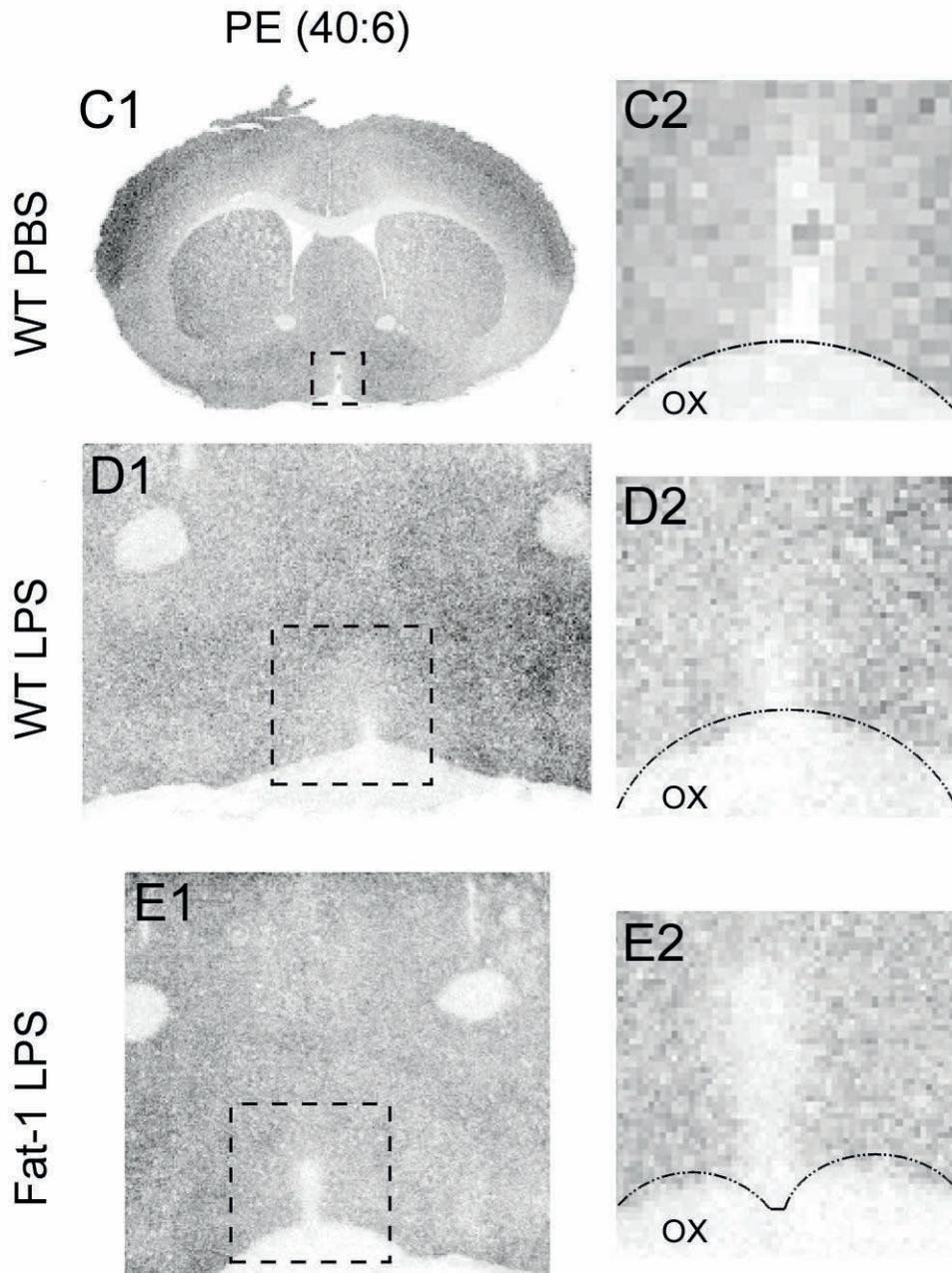


Abbildung 67

PE (40:6) Signale im Bereich des *Organum vasculosum laminae terminalis* (OVLT) und der präoptischen Region 24 Stunden nach intraperitonealer Applikation von 2,5 mg/kg Lipopolysaccharid (LPS, D und E) oder Lösungsmittel (PBS, C) bei Wildtypmäusen (C und D) sowie einem Fat-1 Tier (E). Ein Überblick über anatomische Gegebenheiten ist in Teilbild A und B der Abbildung 52 zu sehen. In D2 und E2 ist jeweils eine zweifache Vergrößerung des gekennzeichneten Bereichs aus D1 und E1 zu sehen; in C2 eine vierfache Vergrößerung der Darstellung in C1. Gemessene Pixelgröße in C = 38 μm , in D und E = 10 μm ; gemessene Pixelanzahl: C1 = 250 x 160, D1 = 250 x 200, E1 = 240 x 230.

Angaben zu gemessenen Parametern finden sich in Tabelle 32, Tabelle 33 und Tabelle 34 in Zeile 55, 58 bzw. 56.

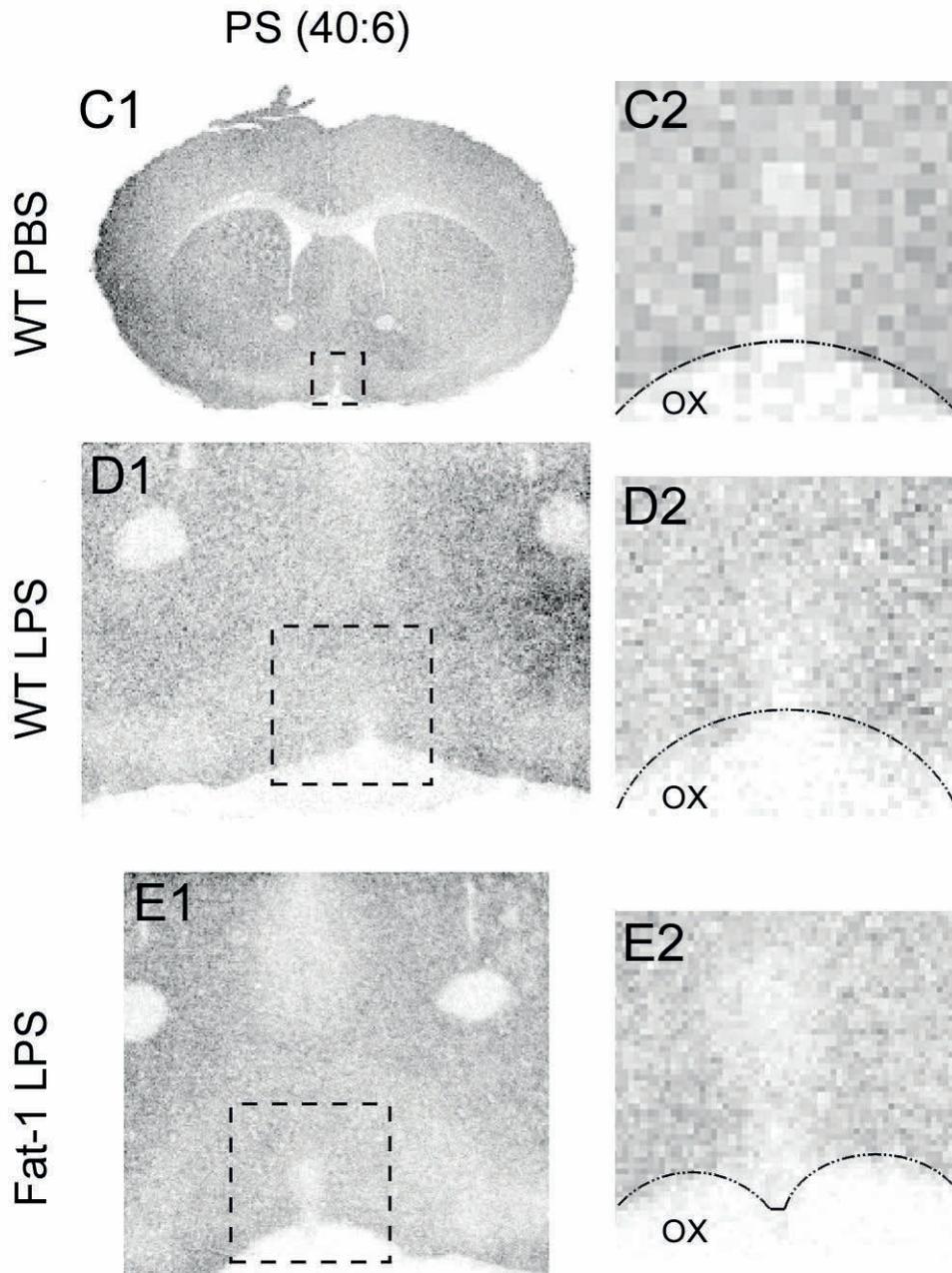


Abbildung 68

PS (40:6) Signale im Bereich des *Organum vasculosum laminae terminalis* (OVLT) und der präoptischen Region 24 Stunden nach intraperitonealer Applikation von 2,5 mg/kg Lipopolysaccharid (LPS, D und E) oder Lösungsmittel (PBS, C) bei Wildtypmäusen (C und D) sowie einem Fat-1 Tier (E). Ein Überblick über anatomische Gegebenheiten ist in Teilbild A und B der Abbildung 52 dargestellt. In D2 und E2 ist jeweils eine zweifache Vergrößerung des gekennzeichneten Bereichs aus D1 und E1 zu sehen; in C2 eine vierfache Vergrößerung der Darstellung in C1. Gemessene Pixelgröße in C = 38 μm , in D und E = 10 μm ; gemessene Pixelanzahl: C1 = 250 x 160, D1 = 250 x 200, E1 = 240 x 230.

Angaben zu gemessenen Parametern finden sich in Tabelle 32, Tabelle 33 und Tabelle 34 in Zeile 71, 76 bzw. 75.

Im positiven Ionen-Modus nachgewiesene Plasmalogene

Weniger gleichförmig bezüglich ihres räumlichen Auftretens stellte sich die Gruppe der Plasmalogene dar. Für PE (P-40:4) sowie PE (P-40:6) lag ein ähnliches Verteilungsmuster wie bei den bereits beschriebenen PEs und PCs mit abgeschwächten Signalen in der Region des OVLTs vor (Abbildung 69, Abbildung 70). In Bereichen von Leitungsbahnen unterschieden sich jedoch beide voneinander. PE (P-40:4) zeigte nicht die für die meisten Substanzen typische Signalabschwächung im Bereich des *Corpus callosum*. PE (P-38:6) war im Bereich des OVLTs weitgehend homogen verteilt, jedoch mit einem wie bereits für PA (38:5) beschrieben, dezent abgeschwächten Signal in der Region des MnPO (Abbildung 71). Ein weiteres Plasmalogen konnte nachgewiesen werden. Hierbei handelte es sich um PE (P-36:4) (Abbildung 72). Dieses Plasmalogen wies ein weiteres, bisher noch nicht erwähntes, räumliches Auftreten / Verteilungsmuster auf. Leitungsbahnen (*Corpus callosum*, Sehnerv und vordere Kommissur) sowie Regionen des Striatums wiesen deutliche Signale auf. Außerdem waren Signalstärken im OVLT beider LPS-stimulierter Genotypen höher ausgeprägt als in der Kontrollsituation. Die Region des MnPO hingegen wies in allen Behandlungssituationen eine Signalreduktion im Vergleich zu umgebendem Gewebe auf.

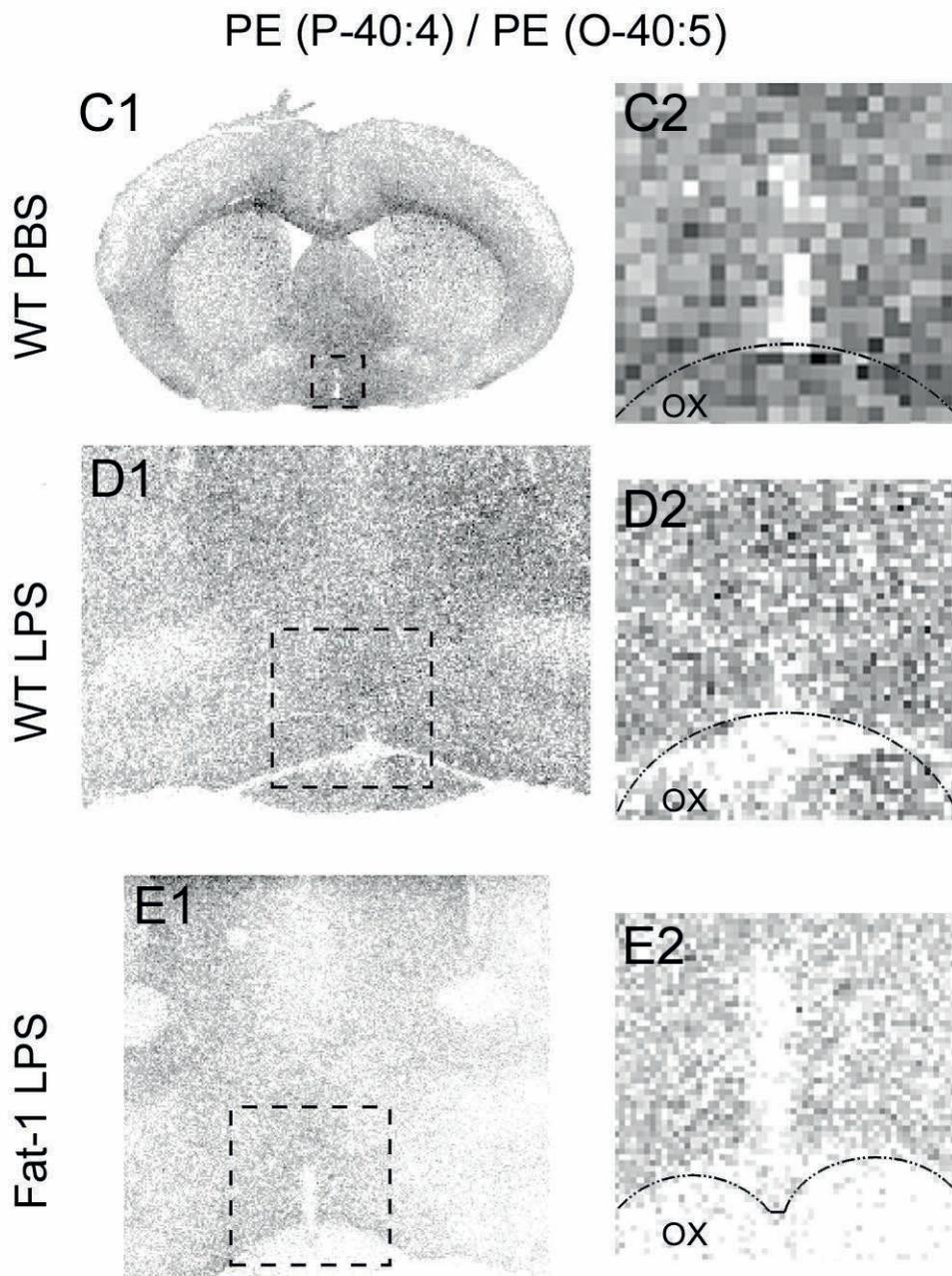


Abbildung 69

PE (P-40:4) / PE (O-40:5) Signale im Bereich des *Organum vasculosum laminae terminalis* (OVLT) und der präoptischen Region 24 Stunden nach intraperitonealer Applikation von 2,5 mg/kg Lipopolysaccharid (LPS, D und E) oder Lösungsmittel (PBS, C) bei Wildtypmäusen (C und D) sowie einem Fat-1 Tier (E). Ein Überblick über anatomische Gegebenheiten ist in Teilbild A und B der Abbildung 52 dargestellt. In D2 und E2 ist jeweils eine zweifache Vergrößerung des gekennzeichneten Bereichs aus D1 und E1 zu sehen; in C2 eine vierfache Vergrößerung der Darstellung in C1. Gemessene Pixelgröße in C = 38 μm , in D und E = 10 μm ; gemessene Pixelanzahl: C1 = 250 x 160, D1 = 250 x 200, E1 = 240 x 230.

Angaben zu gemessenen Parametern finden sich in Tabelle 32, Tabelle 33 und Tabelle 34 in Zeile 62, 67 bzw. 65.

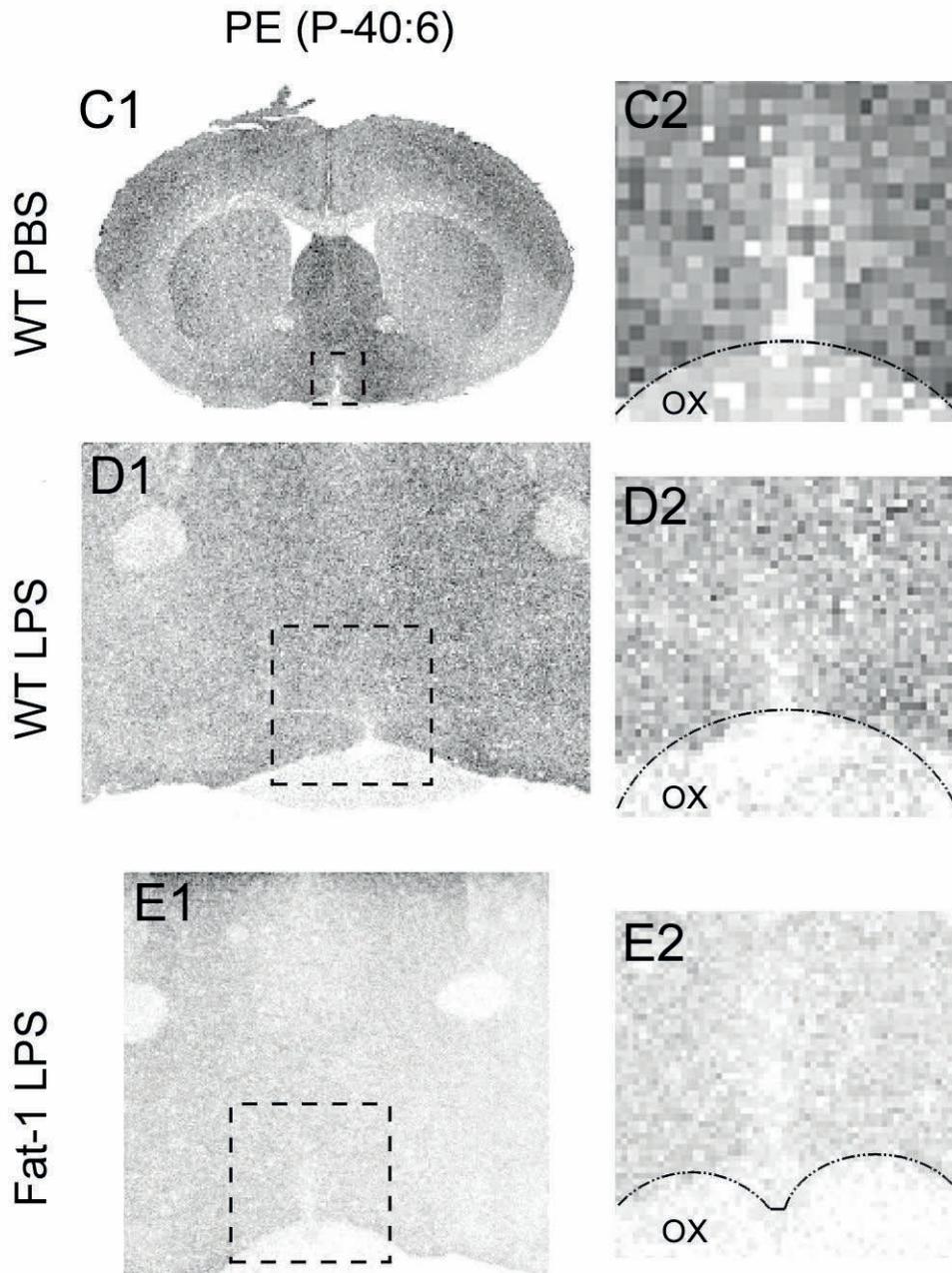


Abbildung 70

PE (P-40:6) Signale im Bereich des *Organum vasculosum laminae terminalis* (OVLT) und der präoptischen Region 24 Stunden nach intraperitonealer Applikation von 2,5 mg/kg Lipopolysaccharid (LPS, D und E) oder Lösungsmittel (PBS, C) bei Wildtypmäusen (C und D) sowie einem Fat-1 Tier (E). Ein Überblick über anatomische Gegebenheiten ist in Teilbild A und B der Abbildung 52 dargestellt. In D2 und E2 ist jeweils eine zweifache Vergrößerung des gekennzeichneten Bereichs aus D1 und E1 zu sehen; in C2 eine vierfache Vergrößerung der Darstellung in C1. Gemessene Pixelgröße in C = 38 μm , in D und E = 10 μm ; gemessene Pixelanzahl: C1 = 250 x 160, D1 = 250 x 200, E1 = 240 x 230.

Angaben zu gemessenen Parametern finden sich in Tabelle 32, Tabelle 33 und Tabelle 34 in Zeile 65, 69 bzw. 67.

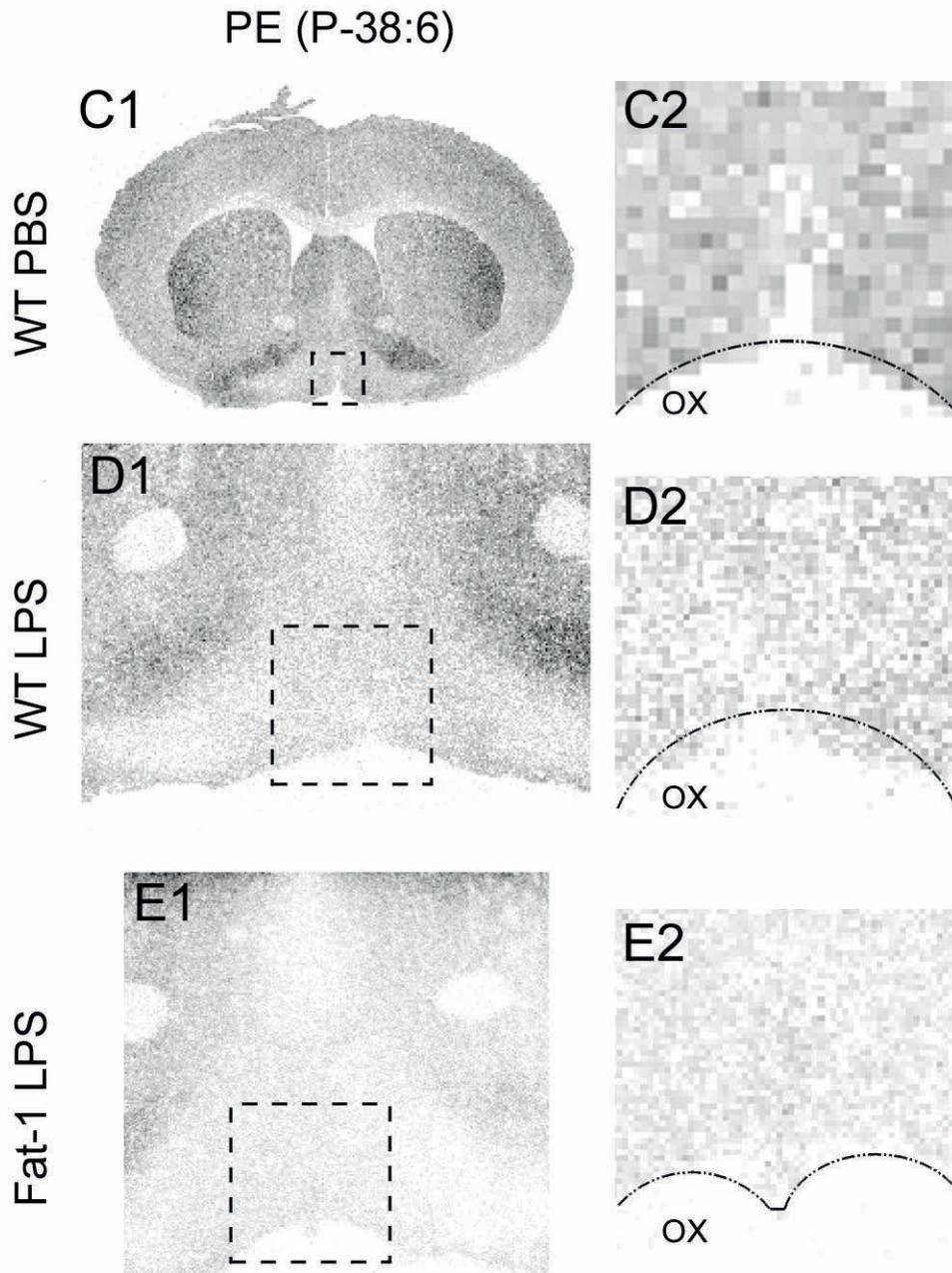


Abbildung 71

PE (P-38:6) Signale im Bereich des *Organum vasculosum laminae terminalis* (OVLT) und der präoptischen Region 24 Stunden nach intraperitonealer Applikation von 2,5 mg/kg Lipopolysaccharid (LPS, D und E) oder Lösungsmittel (PBS, C) bei Wildtypmäusen (C und D) sowie einem Fat-1 Tier (E). Ein Überblick über anatomische Gegebenheiten ist in Teilbild A und B der Abbildung 52 dargestellt. In D2 und E2 ist jeweils eine zweifache Vergrößerung des gekennzeichneten Bereichs aus D1 und E1 zu sehen; in C2 eine vierfache Vergrößerung der Darstellung in C1. Gemessene Pixelgröße in C = 38 μm , in D und E = 10 μm ; gemessene Pixelanzahl: C1 = 250 x 160, D1 = 250 x 200, E1 = 240 x 230.

Angaben zu gemessenen Parametern finden sich Tabelle 32, Tabelle 33 und Tabelle 34 in Zeile 61, 65 bzw. 63.

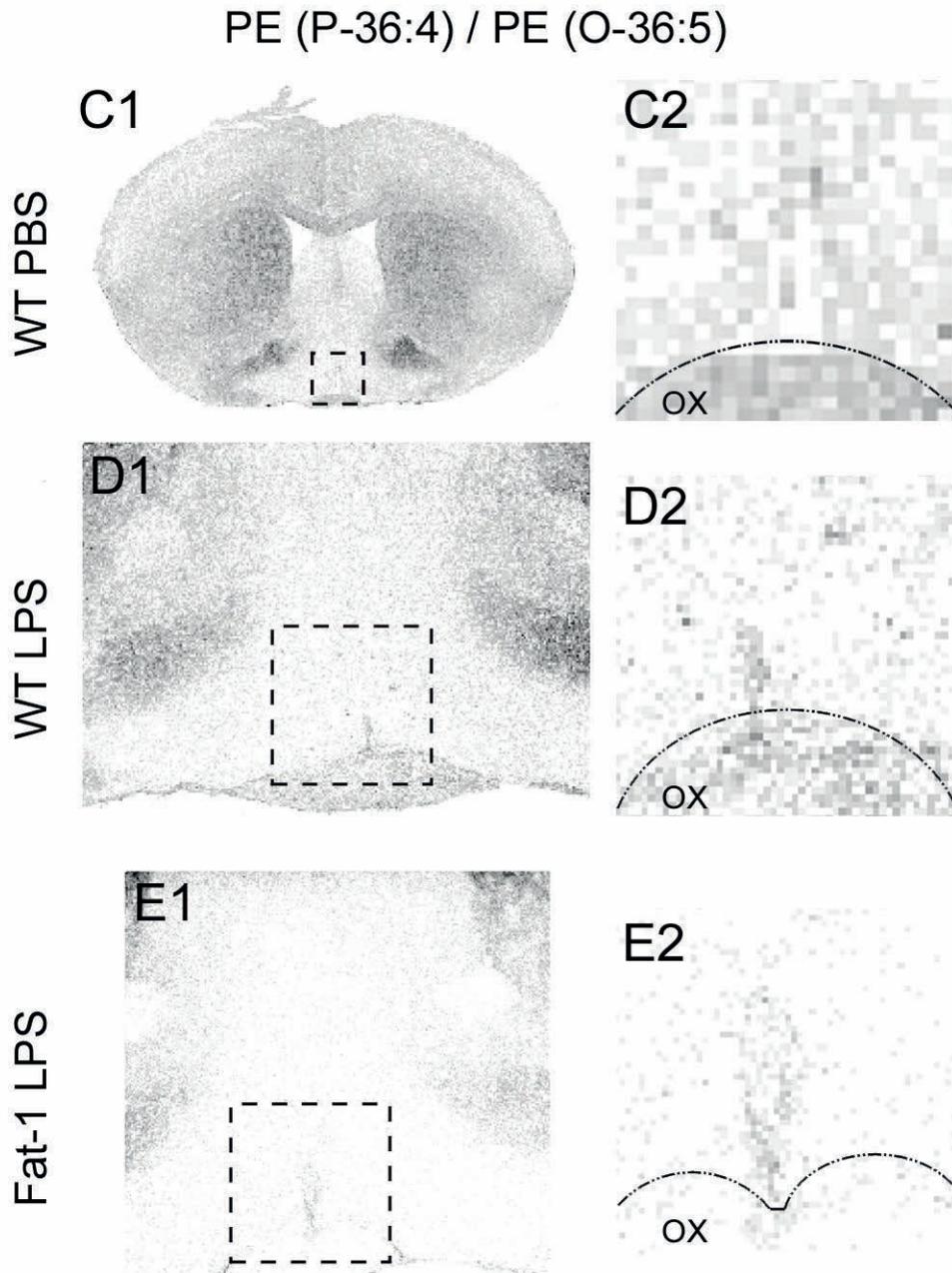


Abbildung 72

PE (P-36:4) / PE (O-36:5) Signale im Bereich des *Organum vasculosum laminae terminalis* (OVLT) und der präoptischen Region 24 Stunden nach intraperitonealer Applikation von 2,5 mg/kg Lipopolysaccharid (LPS, D und E) oder Lösungsmittel (PBS, C) bei Wildtypmäusen (C und D) sowie einem Fat-1 Tier (E). Ein Überblick über anatomische Gegebenheiten ist in Teilbild A und B der Abbildung 52 dargestellt. In D2 und E2 ist jeweils eine zweifache Vergrößerung des gekennzeichneten Bereichs aus D1 und E1 zu sehen; in C2 eine vierfache Vergrößerung der Darstellung in C1. Gemessene Pixelgröße in C = 38 μm , in D und E = 10 μm ; gemessene Pixelanzahl: C1 = 250 x 160, D1 = 250 x 200, E1 = 240 x 230.

Angaben zu gemessenen Parametern finden sich in Tabelle 32, Tabelle 33 und Tabelle 34 in Zeile 57, 61 bzw. 59.

Im positiven Ionen-Modus nachgewiesenes Lysocholin Plasmalogen (LPC P)

Nur ein einziges Lysocholin Plasmalogen konnte dokumentiert werden. LPC (P-18:0) zeigte ein sporadisches, gleichmäßig diffuses Vorkommen im Gehirnschnitt (Abbildung 73). Bei der Auswertung fielen keine Bereiche mit erhöhter oder reduzierter Signalintensität auf.

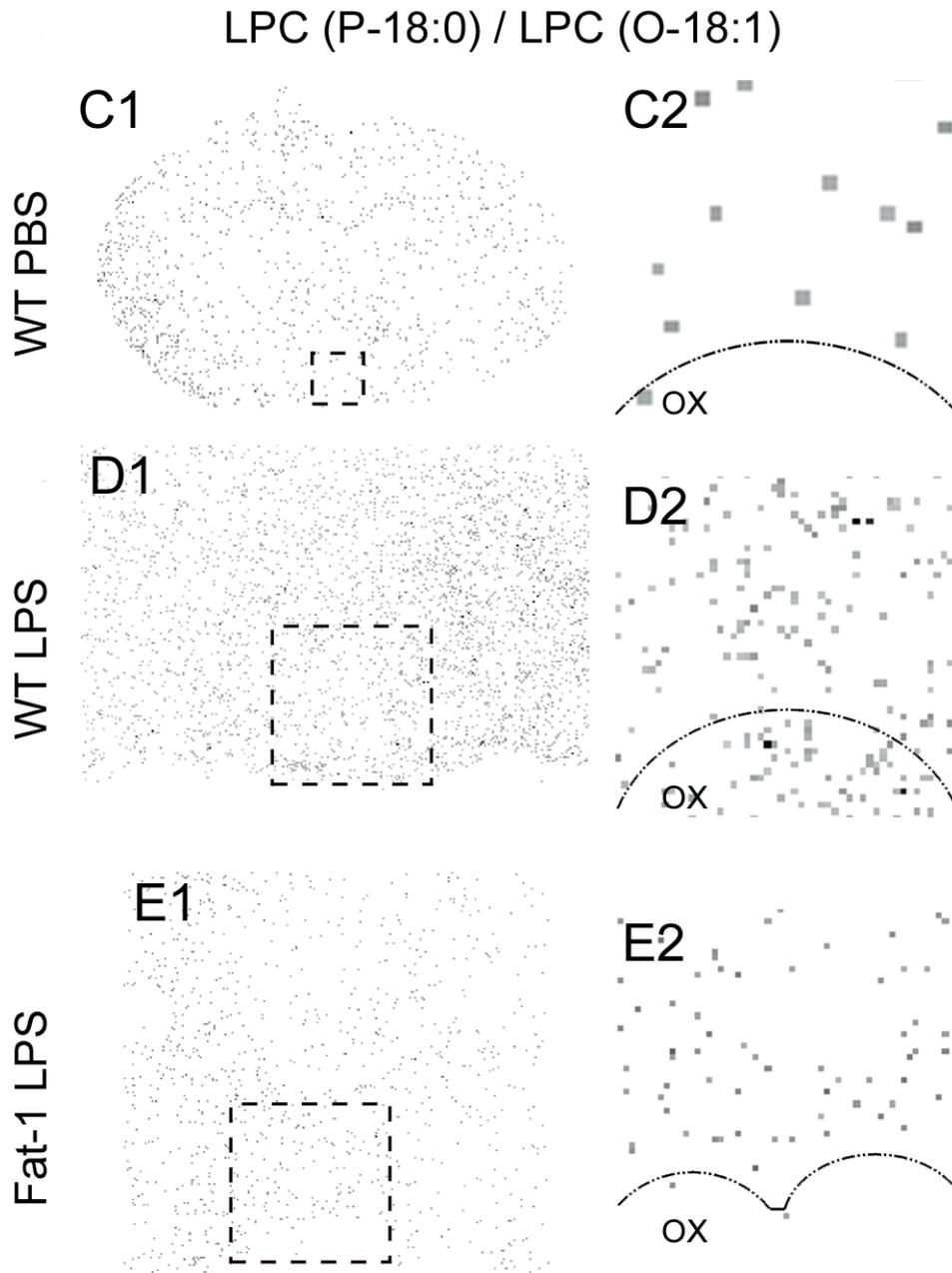


Abbildung 73

LPC (P-18:0) / LPC (O-18:1) Signale im Bereich des *Organum vasculosum laminae terminalis* (OVLT) und der präoptischen Region 24 Stunden nach intraperitonealer Applikation von 2,5 mg/kg Lipopolysaccharid (LPS, D und E) oder Lösungsmittel (PBS, C) bei Wildtypmäusen (C und D) sowie einem Fat-1 Tier (E). Ein Überblick über anatomische Gegebenheiten ist in Teilbild A und B der Abbildung 52 dargestellt. In D2 und E2 ist jeweils eine zweifache Vergrößerung des gekennzeichneten Bereichs aus D1 und E1 zu sehen; in C2 eine vierfache Vergrößerung der Darstellung in C1. Gemessene Pixelgröße in C = 38 μm , in D und E = 10 μm ; gemessene Pixelanzahl: C1 = 250 x 160, D1 = 250 x 200, E1 = 240 x 230.

Angaben zu gemessenen Parametern finden sich in Tabelle 32, Tabelle 33 und Tabelle 34 in Zeile 20, 19 bzw. 17.

Im positiven Ionen-Modus nachgewiesene Sphingomyeline (SMs)

Sphingomyeline als Untergruppe der Sphingolipide sind vor allem für ihr Vorkommen in der Myelinschicht bekannt, die Axone umgibt [220]. Eingang in diese Arbeit fanden zwei Vertreter, zum einen SM (d38:1) und zum anderen SM (d38:2) (Abbildung 74, Abbildung 75). Beide zeichneten sich durch ein starkes, scharf abgegrenztes Signal vor allem in der Region des OVLTs aus. SM (d38:1) zeigte darüber hinaus ein weitgehend homogenes Auftreten im gesamten Gehirnparenchym. Signale waren zusätzlich in der Peripherie und dem Ependym des ersten und zweiten Ventrikels leicht verstärkt. Der Nachweis von SM (d38:2) hingegen gelang fast ausschließlich im Bereich des OVLTs sowie mit einem sehr schwachen Signal im Ependym des ersten und zweiten Gehirnventrikels.

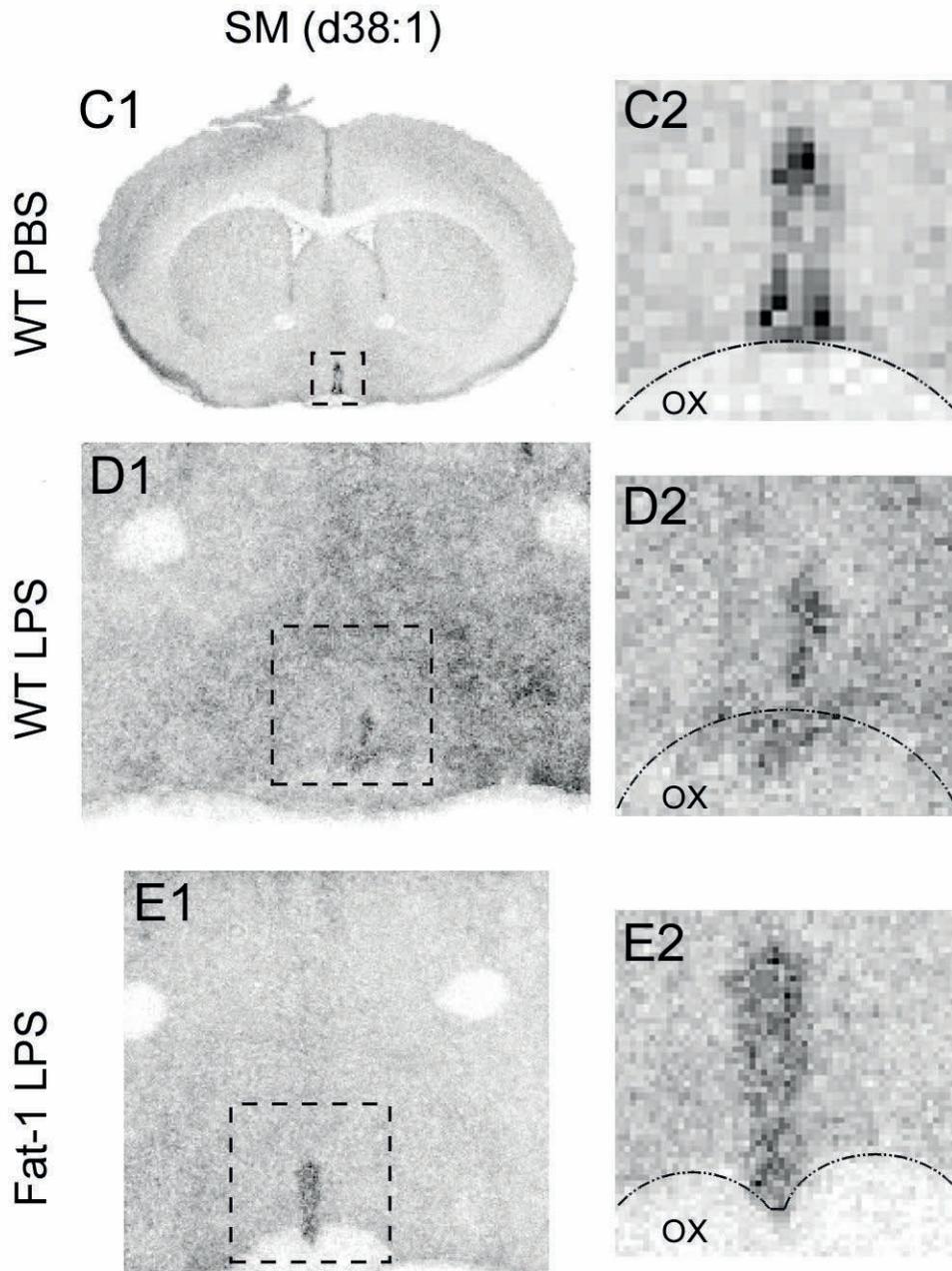


Abbildung 74

Sphingomyelin (SM) d38:1 Signale im Bereich des *Organum vasculosum laminae terminalis* (OVLT) und der präoptischen Region 24 Stunden nach intraperitonealer Applikation von 2,5 mg/kg Lipopolysaccharid (LPS, D und E) oder Lösungsmittel (PBS, C) bei Wildtypmäusen (C und D) sowie einem Fat-1 Tier (E). Ein Überblick über anatomische Gegebenheiten ist in Teilbild A und B der Abbildung 52 dargestellt. In D2 und E2 ist jeweils eine zweifache Vergrößerung des gekennzeichneten Bereichs aus D1 und E1 zu sehen; in C2 eine vierfache Vergrößerung der Darstellung in C1. Gemessene Pixelgröße in C = 38 μm , in D und E = 10 μm ; gemessene Pixelanzahl: C1 = 250 x 160, D1 = 250 x 200, E1 = 240 x 230.

Angaben zu gemessenen Parametern finden sich in Tabelle 32, Tabelle 33 und Tabelle 34 in Zeile 74, 79 bzw. 78.

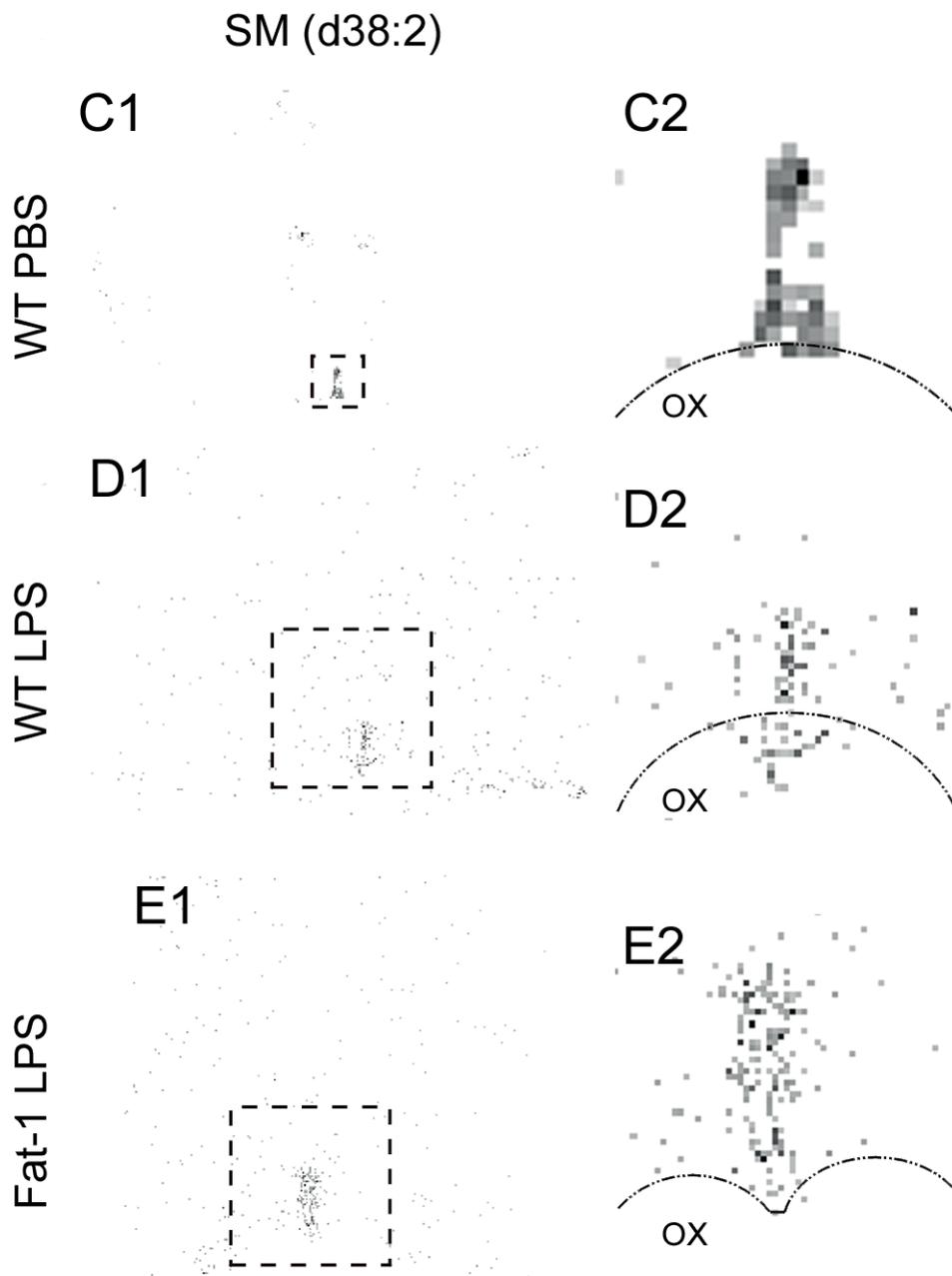


Abbildung 75

Sphingomyelin (SM) d38:2 Signale im Bereich des *Organum vasculosum laminae terminalis* (OVLT) und der präoptischen Region 24 Stunden nach intraperitonealer Applikation von 2,5 mg/kg Lipopolysaccharid (LPS, D und E) oder Lösungsmittel (PBS, C) bei Wildtypmäusen (C und D) sowie einem Fat-1 Tier (E). Ein Überblick über anatomische Gegebenheiten ist in Teilbild A und B der Abbildung 52 dargestellt. In D2 und E2 ist jeweils eine zweifache Vergrößerung des gekennzeichneten Bereichs aus D1 und E1 zu sehen; in C2 eine vierfache Vergrößerung der Darstellung in C1. Gemessene Pixelgröße in C = 38 μm , in D und E = 10 μm ; gemessene Pixelanzahl: C1 = 250 x 160, D1 = 250 x 200, E1 = 240 x 230.

Angaben zu gemessenen Parametern finden sich in Tabelle 32, Tabelle 33 und Tabelle 34 in Zeile 75, 80 bzw. 80.

Andere im positiven Ionen-Modus nachgewiesene Signale

Ein analoges räumliches Auftreten zu den angesprochenen Sphingomyelinen konnte für eine Substanz der Masse m/z 874,53 nachgewiesen werden. Trotz intensiver Suche in diversen Datenbanken konnte dieser Masse keine Substanz zugeordnet werden (Abbildung 76). Um eine eventuelle Identifizierung zu ermöglichen, müssten weitere Experimente (z.B. MS/MS) angeschlossen werden.

N-Acetylaspartylglutamat ist ein nahezu ausschließlich im Nervensystem vorkommendes Neuropeptid [195], dessen Nachweis mittels MALDI im positiven Ionen-Modus gelang (Abbildung 77). Bei der hier zum Einsatz gekommenen räumlichen Auflösung von 38 oder 10 μm erscheint die räumliche Verteilung diffus über das gesamte Parenchym verteilt, jedoch mit einer starken Anreicherung im Sehnerv. Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Peptid N-Acetylaspartylglutamat exemplarisch und beispielhaft als ein Zielparameter dargestellt, der nicht zur Gruppe der Lipide zählt.

Phosphatidylinositole konnten im positiven Ionen-Modus generell nicht angesprochen werden.

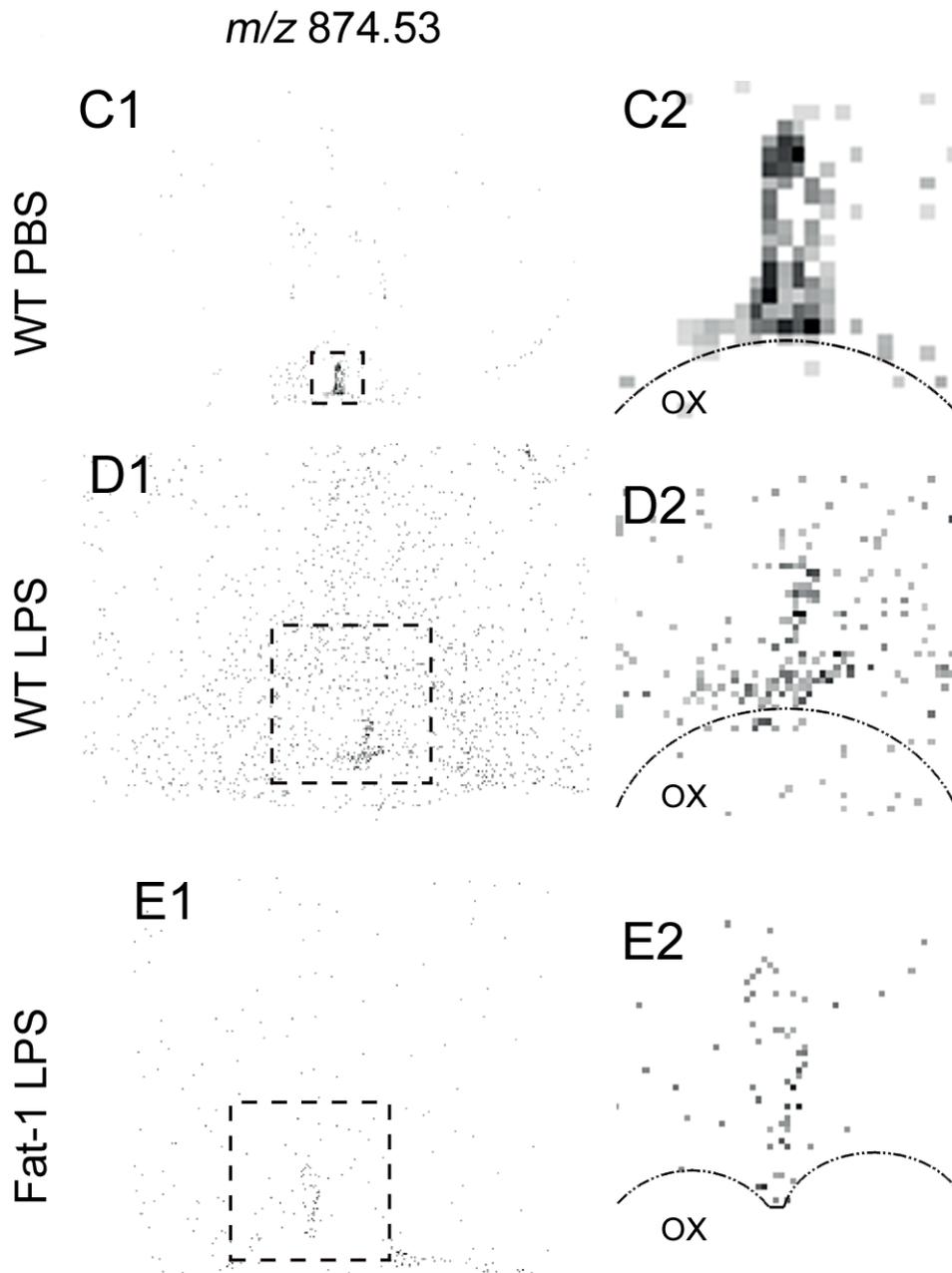


Abbildung 76

Signale der Masse m/z 874,53 einer unbekannt Substanz im Bereich des *Organum vasculosum laminae terminalis* (OVL) und der präoptischen Region 24 Stunden nach intraperitonealer Applikation von 2,5 mg/kg Lipopolysaccharid (LPS, D und E) oder Lösungsmittel (PBS, C) bei Wildtypmäusen (C und D) sowie einem Fat-1 Tier (E). Ein Überblick über anatomische Gegebenheiten ist in Teilbild A und B der Abbildung 52 dargestellt. In D2 und E2 ist jeweils eine zweifache Vergrößerung des gekennzeichneten Bereichs aus D1 und E1 zu sehen; in C2 eine vierfache Vergrößerung der Darstellung in C1. Gemessene Pixelgröße in C = 38 μm , in D und E = 10 μm ; gemessene Pixelanzahl: C1 = 250 x 160, D1 = 250 x 200, E1 = 240 x 230.

Weitere gefundene Massensignale denen keine Substanz zugeordnet werden konnte sind in Tabelle 35 aufgeführt.

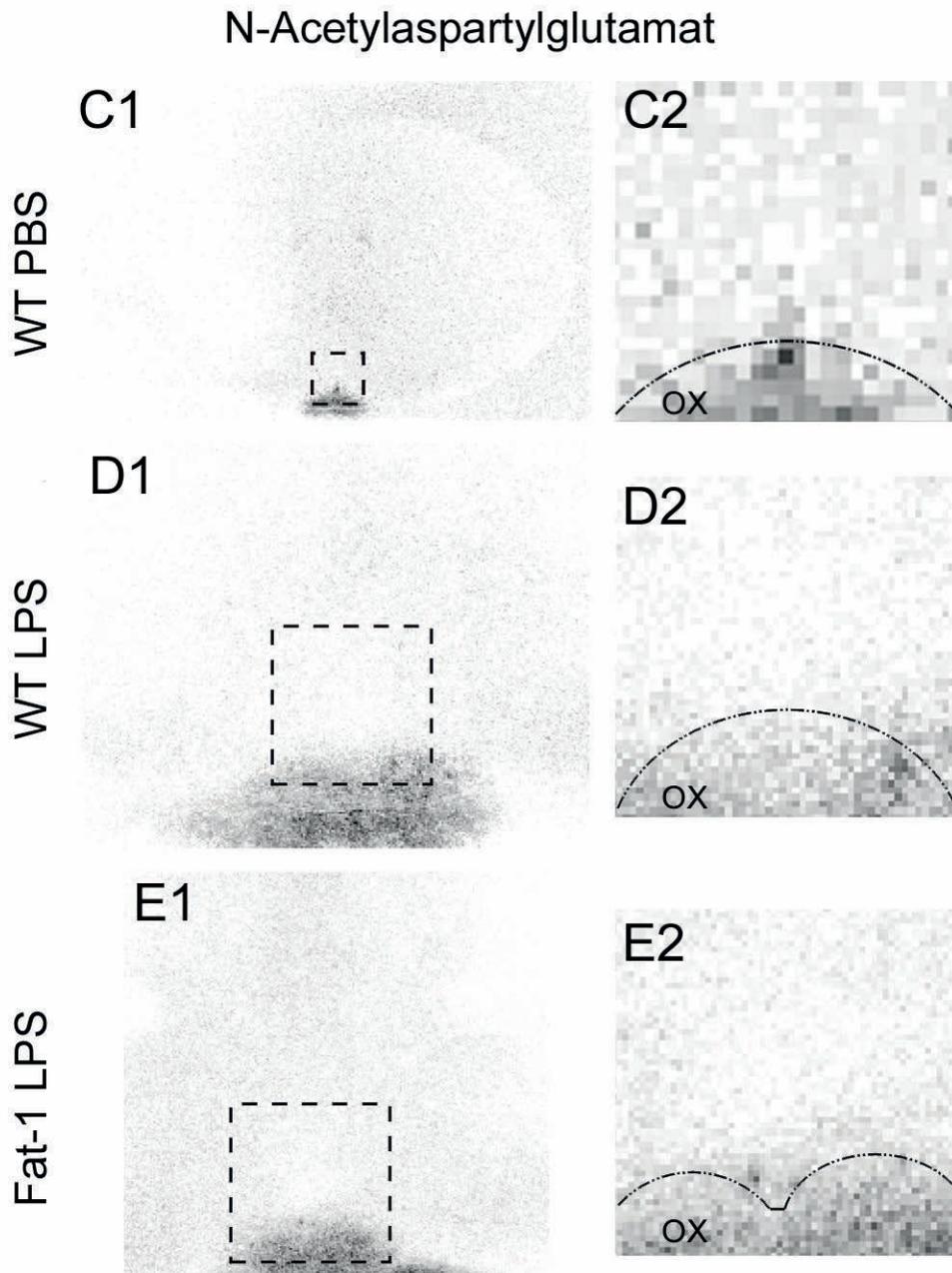


Abbildung 77

N-Acetylaspartylglutamat Signale im Bereich des *Organum vasculosum laminae terminalis* (OVLT) und der präoptischen Region 24 Stunden nach intraperitonealer Applikation von 2,5 mg/kg Lipopolysaccharid (LPS, D und E) oder Lösungsmittel (PBS, C) bei Wildtypmäusen (C und D) sowie einem Fat-1 Tier (E). Ein Überblick über anatomische Gegebenheiten ist in Teilbild A und B der Abbildung 52 zu sehen. In D2 und E2 ist jeweils eine zweifache Vergrößerung des gekennzeichneten Bereichs aus D1 und E1 zu sehen; in C2 eine vierfache Vergrößerung der Darstellung in C1. Gemessene Pixelgröße in C = 38 μm , in D und E = 10 μm ; gemessene Pixelanzahl: C1 = 250 x 160, D1 = 250 x 200, E1 = 240 x 230.

Angaben zu gemessenen Parametern finden sich in Tabelle 32, Tabelle 33 und Tabelle 34 in Zeile 77, 83 bzw. 83.

5.2 Messungen im negativen Ionen-Modus

Auch bei Messungen im negativen Ionen-Modus wurden coronale Gehirnschnitte von Mäusen auf Höhe der präoptischen Region und des OVLTs angefertigt und gemessen. Hier wurde auf die Messung eines Gesamtschnittes in geringer räumlicher Auflösung verzichtet. Schnitte aller Gruppen sollten mit einer hohen räumlichen Auflösung vergleichend ausgewertet werden (10 µm Pixelgröße). Dafür wurden erneut der für die Fieberentstehung wichtige kleine Bereich des OVLTs und die umliegende präoptische Region als Zielregion ausgewählt. Um eine der MALDI-Messung anschließende Teilbetrachtung mittels Immunfluoreszenzfärbung zu testen, wurde in einigen Versuchen eine Vertikale durch das OVLT gelegt und lediglich eine Seite dieser Spiegelachse mit Hilfe von MALDI gemessen.

Nach MALDI-Messungen im negativen Ionen-Modus wurde im gewonnen Datensatz gezielt nach Massensignalen bekannter Substanzen wie z.B. verschiedenen Rv, FS und Phospholipiden gesucht. Kleine Lipidmediatoren wie Prostaglandine, Rv, Leukotriene, 2-AG, Maresine und Neuroprotectine konnten auch im negativen Ionen-Modus nicht sicher nachgewiesen werden. Ebenso gelang kein Nachweis von unveresterter EPA. Vollständige Listen angesprochener sowie nicht aufgefundener Massen befindet sich am Ende dieser Arbeit (siehe VII). Auf eine ungezielte Suche von Massensignalen mit spezifischem, auf das OVLT beschränktem Vorkommen wurde hier verzichtet. Bei Messungen im negativen Ionen-Modus kam es zu Problemen der internen Kalibrierung des Massenspektrometers, was die Verschiebung aller Messwerte um einige ppm zur Folge hatte. Eine Zuordnung dieser Signale auf Grundlage der hier nicht absolut korrekt erfassten akkuraten Masse hätte zu massiven Analyseungenauigkeiten beigetragen (siehe hierzu auch II.9.2.1.6).

Während der Messungen des mit LPS behandelten WT Tieres kam es zu einem nicht erklärbareren Verlust der Signalintensität (Pixeldichte nimmt von rechts nach links ab). Die gewonnenen Daten wurden dennoch vollständig und analog zu anderen Messungen ausgewertet. Bedingt durch die aufgetretenen Komplikationen konnten jedoch weniger Signale angesprochen und zugeordnet werden. Auch die Qualität der erstellten Bilder ist leider sehr mäßig, was die Beurteilbarkeit einschränkt. Dieser Aspekt muss bei der Betrachtung jeweils der mittleren Bilder (B1 und B2) der folgenden Abbildungen berücksichtigt werden.

Im negativen Ionen-Modus nachgewiesene freie Fettsäuren

Messungen im negativen Ionen-Modus ermöglichten sowohl die Dokumentation räumlicher Verteilungsmuster einiger gesättigter als auch einiger ungesättigter freier FS. Die beiden gesättigten FS Palmitinsäure (C 16:0) und Stearinsäure (C 18:0) kommen ubiquitär in tierischen Zellen vor [504] und konnten im Rahmen dieser Arbeit nachgewiesen werden. Stearinsäure (Abbildung 78) zeigte ein gleichmäßiges Verteilungsmuster über den gesamten Messbereich hinweg. In der vorderen Kommissur sowie im Sehnerv waren die Signale allerdings reduziert. Eine ebensolche Reduktion der Signalstärke in Bereichen von Leitungsbahnen konnte für Palmitinsäure beobachtet werden (Abbildung 79). Auffällig war

jedoch eine Signalanreicherung für Palmitinsäure im Bereich des OVLTs, des dritten Ventrikels und den Meningen. Des Weiteren konnten die mehrfach ungesättigten FS DHA (C 22:6) und Docosatetraensäure (C 22:4) identifiziert werden (Abbildung 80). Beide zeigten in unterschiedlicher Ausprägung reduzierte Signale in Bereichen von Leitungsbahnen. Docosahexaensäure zeichnete sich im Gegensatz zu Docosatetraensäure durch eine Signalabschwächung im Bereich des OVLTs aus. Hingegen war für Docosatetraensäure im Bereich des OVLTs eine diffuse Verstärkung des Massensignals erkennbar. Dieses Verteilungsmuster erweckte gleichzeitig den Eindruck einer Signalstärkenreduktion im Bereich des *nucleus praeopticus medianus*. Diese Beobachtung gilt trotz ansonsten weitgehend gleichmäßigen Signalen auch für die vierfach ungesättigte Arachidonsäure (C 20:4) (Abbildung 79). Docosapentaensäure (C 22:5) konnte lediglich in der Kontrollmessung (WT PBS) nachgewiesen werden und zeigte hier verglichen mit anderen freien FS ein sehr viel schwächeres Signal (nicht abgebildet, Messparameter finden sich in Tabelle 36, Zeile 3). Grundsätzlich entsprach das Verteilungsmuster am ehesten dem von Arachidonsäure.

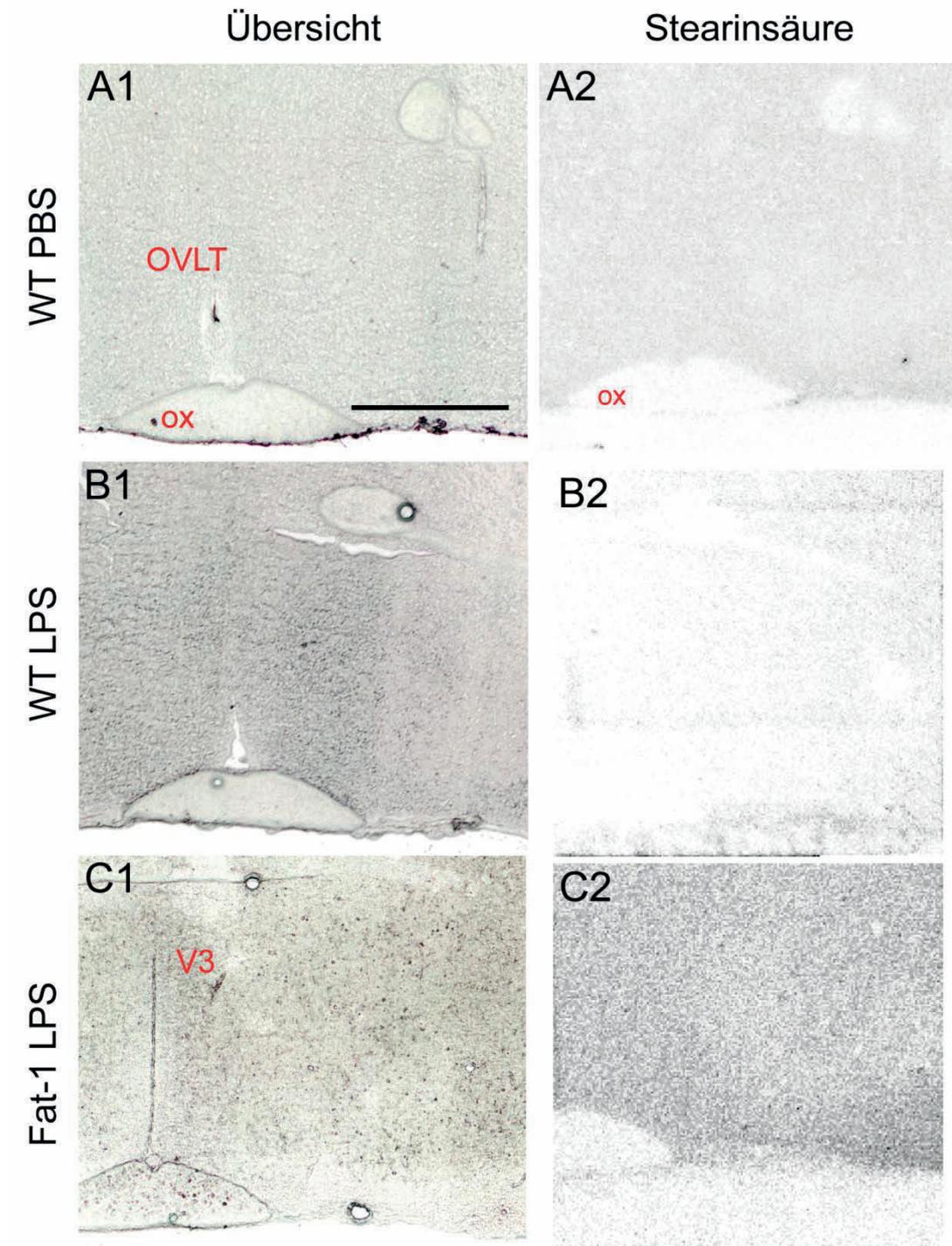


Abbildung 78

Lichtmikroskopische Übersichtsaufnahmen (1) der mittels MALDI gemessenen Gehirnregion sowie Signale der Stearinsäure (2) im Bereich des *Organum vasculosum laminae terminalis* (OVLT) und der präoptischen Region 24 Stunden nach intraperitonealer Applikation von 2,5 mg/kg Lipopolysaccharid (LPS, B1 und 2 sowie C1 und 2) oder Lösungsmittel (PBS, A1 und 2) bei Wildtypmäusen (A und B) sowie einem Fat-1 Tier (C). Bei der in B2 dargestellten Messung kam es zu einem Verlust der Signalintensität, weswegen eine qualitative und quantitative Beurteilung nur unter Vorbehalt stattfinden kann. Ein weiterer Überblick über anatomische Verhältnisse ist in Abbildung 52 dargestellt. Gemessene Pixelgröße je 10 µm, gemessene Pixelanzahl: A = 215 x 270, B = 195 x 195, C = 195 x 195; Größenmarker in A1 = 1000 µm, gilt ebenso für B und C1; V3 = dritter Ventrikel, ox = Sehnervenkreuzung.

Angaben zu gemessenen Parametern finden sich in Tabelle 36, Tabelle 37 und Tabelle 38 in Zeile 6, 5 bzw. 5.

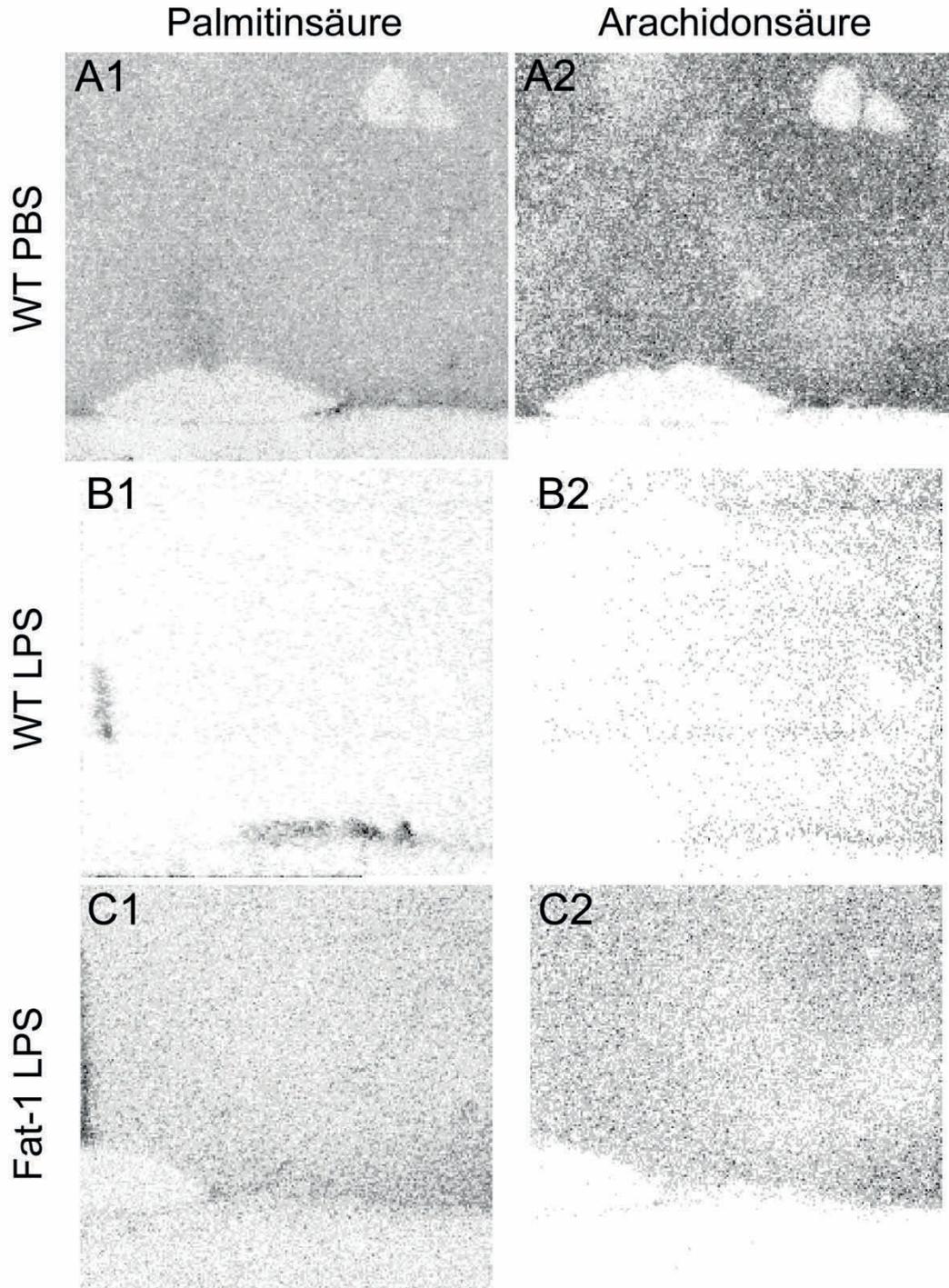


Abbildung 79

Palmitinsäure (1) sowie Arachidonsäure (2) Signale im Bereich des *Organum vasculosum laminae terminalis* und der präoptischen Region 24 Stunden nach intraperitonealer Applikation von 2,5 mg/kg Lipopolysaccharid (LPS, B1 und 2 sowie C1 und 2) oder Lösungsmittel (PBS, A1 und 2) bei Wildtypmäusen (A und B) sowie einem Fat-1 Tier (C). Ein Überblick der anatomischen Verhältnisse ist in Abbildung 52 und Abbildung 78 dargestellt. Bei der in B1 und B2 dargestellten Messung kam es zu einem Verlust der Signalintensität, weswegen eine qualitative und quantitative Beurteilung nur unter Vorbehalt stattfinden kann. Gemessene Pixelgröße je 10 µm; gemessene Pixelanzahl: A = 215 x 270, B = 195 x 195, C = 195 x 195.

Angaben zu gemessenen Parametern finden sich in Tabelle 36, Tabelle 37 und Tabelle 38 in den Zeilen 5, 4 und 4 bzw. Zeile 1.

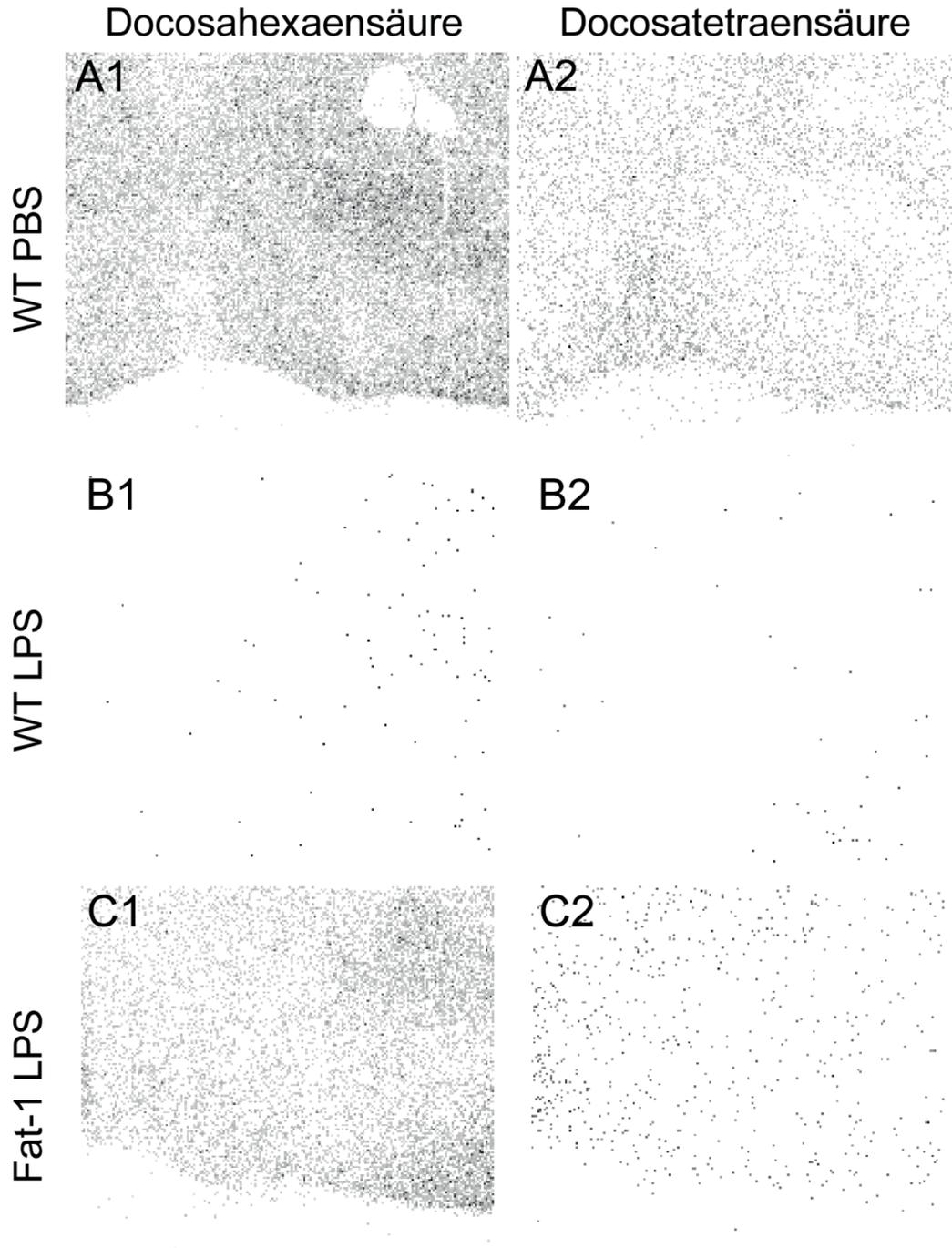


Abbildung 80

Docosahexaensäure (1) sowie Docosatetraensäure (2) Signale im Bereich des *Organum vasculosum laminae terminalis* und der präoptischen Region 24 Stunden nach intraperitonealer Applikation von 2,5 mg/kg Lipopolysaccharid (LPS, B1 und 2 sowie C1 und 2) oder Lösungsmittel (PBS, A1 und 2) bei Wildtypmäusen (A und B) sowie einem Fat-1 Tier (C). Ein Überblick der anatomischen Verhältnisse ist in Abbildung 52 und Abbildung 78 dargestellt. Bei der in B1 und B2 dargestellten Messung kam es zu einem Verlust der Signalintensität, weswegen eine qualitative und quantitative Beurteilung nur unter Vorbehalt stattfinden kann. Gemessene Pixelgröße je 10 µm; gemessene Pixelanzahl: A = 215 x 270, B = 195 x 195, C = 195 x 195.

Angaben zu gemessenen Parametern finden sich in Tabelle 36, Tabelle 37 und Tabelle 38 in Zeile 2 sowie Zeile 4, 3 bzw. 3.

Im negative Ionen-Modus nachgewiesene Lysophosphoethanolamine (LPEs)

In allen drei Messungen im negativen Ionen-Modus gelang der Nachweis verschiedener LPE-Spezies. LPE (16:0) sowie LPE (18:0) zeigten nahezu identische, gleichmäßig diffuse Verteilungsmuster über den vollständigen Messbereich hinweg. Es waren jeweils reduzierte Signale im Sehnerv und der vorderen Kommissur nachweisbar (Abbildung 81 und Abbildung 82). In der Gruppe der LPEs konnte für LPE (18:1) ein auffälliges Alleinstellungsmerkmal beobachtet werden. Die im Messbereich befindlichen Leitungsbahnen (Sehnerv, vordere Kommissur) zeichneten sich durch starke Massensignale aus (Abbildung 82). Dieser Befund korreliert gut mit den Ergebnissen der Messungen im positiven Ionen-Modus (vergleiche Abbildung 59).

Auch LPE (16:0) und (18:0) wurden jeweils in beiden Messmodalitäten nachgewiesen (siehe hierzu auch Abbildung 57 und Abbildung 58). Für LPE (18:0) und (18:1) waren die gewonnenen Erkenntnisse bezüglich der räumlichen Verteilungen zwischen beiden Messmodi sehr ähnlich. LPE (16:0) wies im positiven Ionen-Modus ein reduziertes Signal im Bereich des OVLTs, vor allem für das LPS-stimulierte Fat-1 Tier, auf. Dieses Verteilungsmuster konnte im negativen Ionen-Modus allerdings nicht nachvollzogen werden. Eventuell könnte dieser Unterschied an den leicht unterschiedlichen coronalen Niveaus der untersuchten Messausschnitte liegen.

Des Weiteren wurden Massensignale des AA-tragenden LPE (20:4), sowie des DHA-tragenden LPE (22:6) detektiert (Abbildung 83). Beide traten kaum in Leitungsbahnen auf. LPE (22:6) zeichnete sich durch ein weitgehend gleichförmiges Vorkommen aus. LPE (20:4) Signale hingegen waren in den Bereichen die vordere Kommissur umgebend, beidseitig des Sehnervs sowie in der Region des OVLTs deutlich intensiviert.

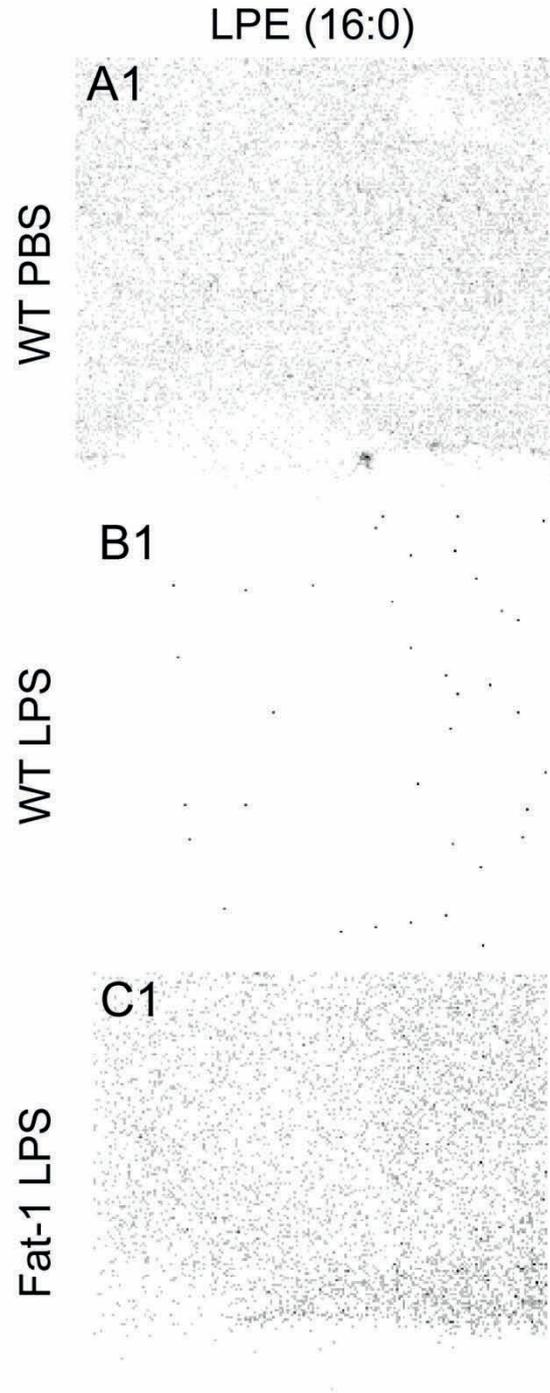


Abbildung 81

LPE (16:0) (1) Signale im Bereich des *Organum vasculosum laminae terminalis* und der präoptischen Region 24 Stunden nach intraperitonealer Applikation von 2,5 mg/kg Lipopolysaccharid (LPS, B1 sowie C1) oder Lösungsmittel (PBS, A1) bei Wildtypmäusen (A und B) sowie einem Fat-1 Tier (C). Ein Überblick der anatomischen Verhältnisse ist in Abbildung 52 und Abbildung 78 dargestellt. Bei der in B1 dargestellten Messung kam es zu einem Verlust der Signalintensität, weswegen eine qualitative und quantitative Beurteilung nur unter Vorbehalt stattfinden kann. Gemessene Pixelgröße je 10 μm ; gemessene Pixelanzahl: A = 215 x 270, B = 195 x 195, C = 195 x 195.

Angaben zu gemessenen Parametern finden sich in Tabelle 36, Tabelle 37 und Tabelle 38 in Zeile 11, 6 bzw. 10.

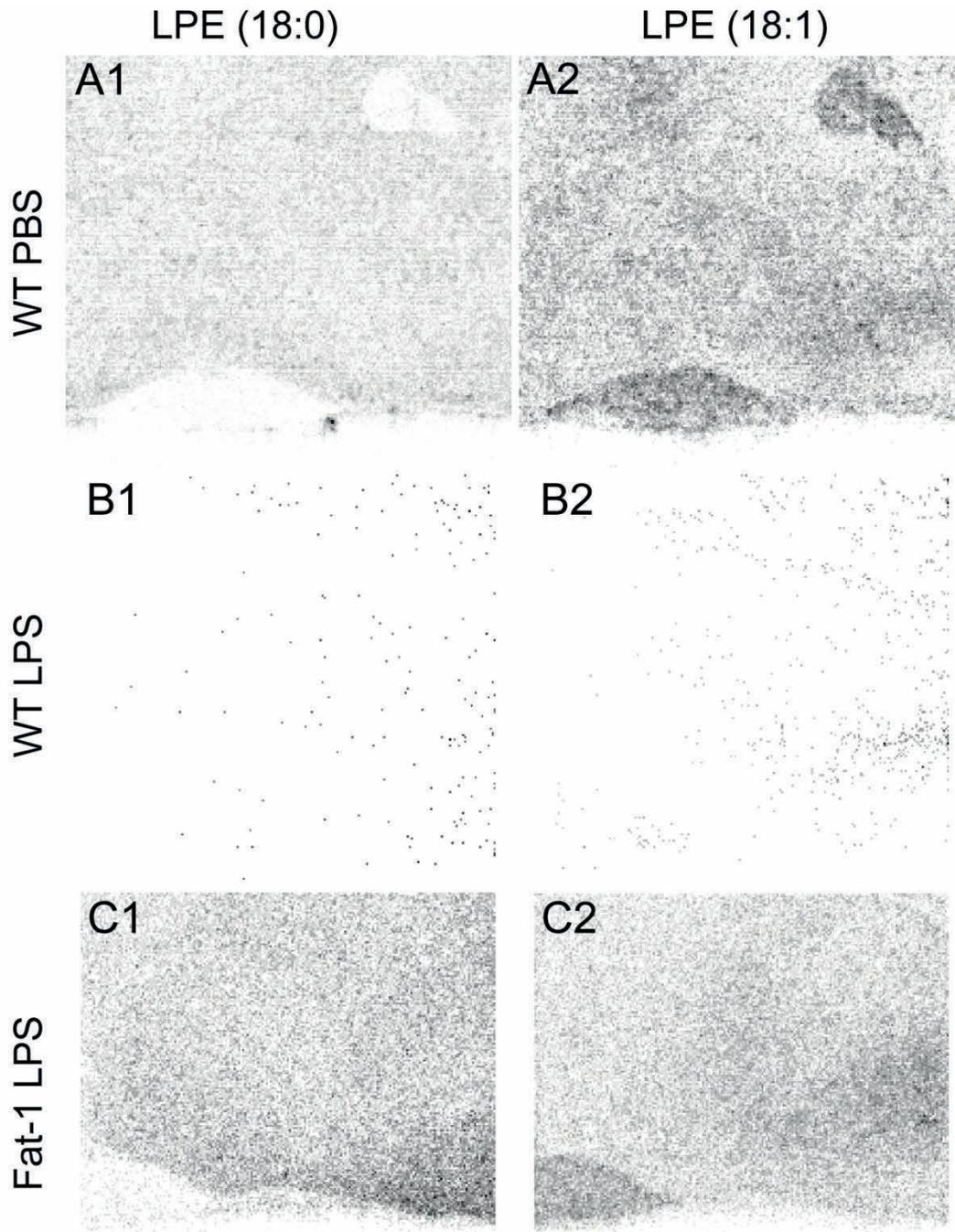


Abbildung 82

LPE (18:0) (1) sowie LPE (18:1) (2) Signale im Bereich des *Organum vasculosum laminae terminalis* und der präoptischen Region 24 Stunden nach intraperitonealer Applikation von 2,5 mg/kg Lipopolysaccharid (LPS, B1 und 2 sowie C1 und 2) oder Lösungsmittel (PBS, A1 und 2) bei Wildtypmäusen (A und B) sowie einem Fat-1 Tier (C). Ein Überblick der anatomischen Verhältnisse ist in Abbildung 52 und Abbildung 78 dargestellt. Bei der in B1 und B2 dargestellten Messung kam es zu einem Verlust der Signalintensität, weswegen eine qualitative und quantitative Beurteilung nur unter Vorbehalt stattfinden kann. Gemessene Pixelgröße je 10 μm ; gemessene Pixelanzahl: A = 215 x 270, B = 195 x 195, C = 195 x 195.

Angaben zu gemessenen Parametern finden sich in Tabelle 36, Tabelle 37 und Tabelle 38 in Zeile 12, 7 bzw. 11 sowie Zeile 13, 8 bzw. 12.

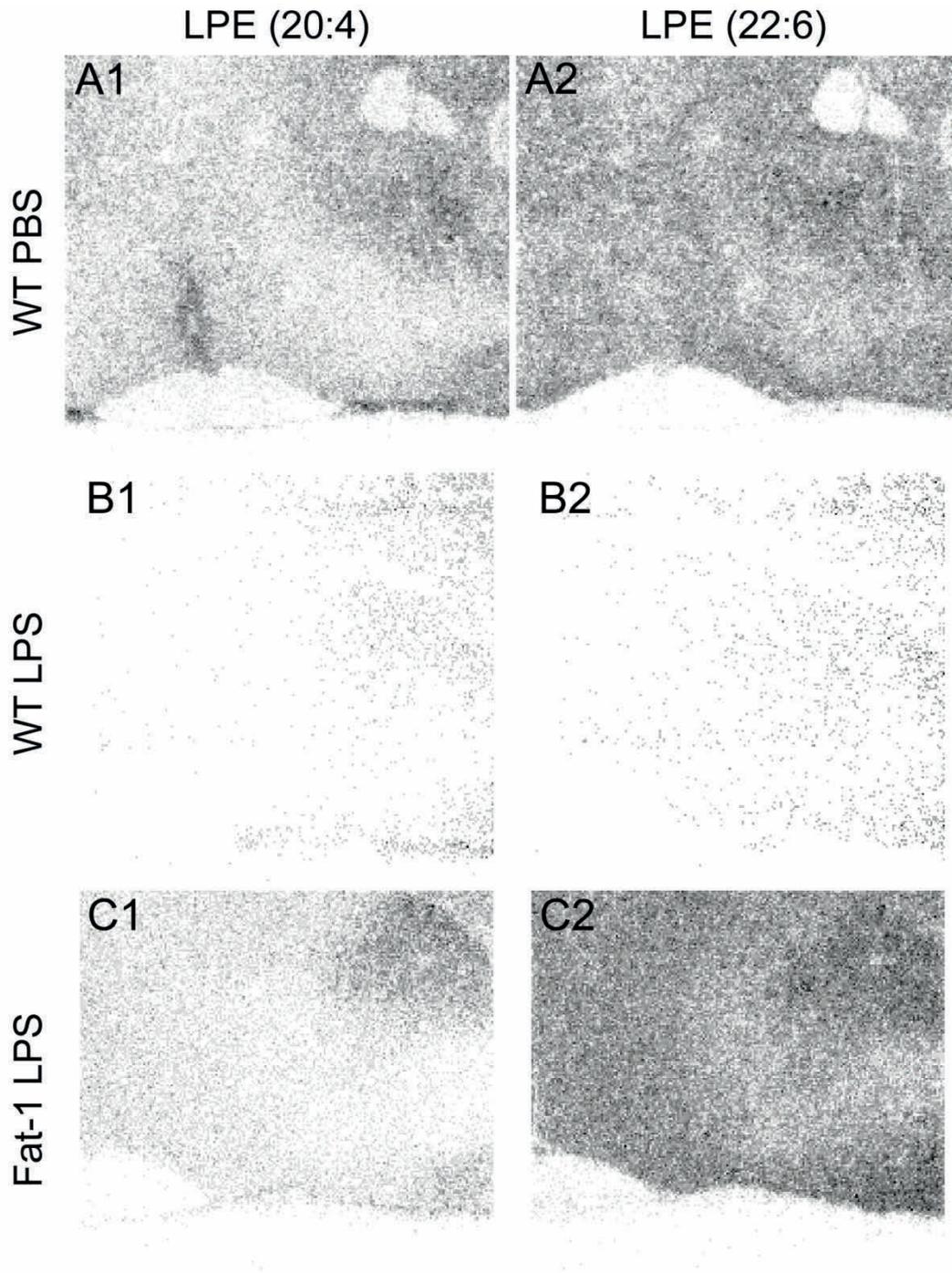


Abbildung 83

LPE (20:4) (1) sowie LPE (22:6) (2) Signale im Bereich des *Organum vasculosum laminae terminalis* und der präoptischen Region 24 Stunden nach intraperitonealer Applikation von 2,5 mg/kg Lipopolysaccharid (LPS, B1 und 2 sowie C1 und 2) oder Lösungsmittel (PBS, A1 und 2) bei Wildtypmäusen (A und B) sowie einem Fat-1 Tier (C). Ein Überblick der anatomischen Verhältnisse ist in Abbildung 52 und Abbildung 78 dargestellt. Bei der in B1 und B2 dargestellten Messung kam es zu einem Verlust der Signalintensität, weswegen eine qualitative und quantitative Beurteilung nur unter Vorbehalt stattfinden kann. Gemessene Pixelgröße je 10 μm ; gemessene Pixelanzahl: A = 215 x 270, B = 195 x 195, C = 195 x 195.

Angaben zu gemessenen Parametern finden sich in Tabelle 36, Tabelle 37 und Tabelle 38 in Zeile 14, 9 bzw. 13 sowie Zeile 15, 10 bzw. 14.

Im negativen Ionen-Modus nachgewiesene Lysophosphatidylsäure-Moleküle (LPAs)

Weitere Lysophospholipide konnten in Form von LPA (16:0), (18:1), (18:0) und (22:6) identifiziert werden. Der Nachweis von Molekülen dieser Gruppe gelang nicht in der WT LPS Messung. LPA (18:0) und das DHA-tragende LPA (22:6) zeichneten sich durch ein gleichförmiges, homogenes Verteilungsmuster aus (Abbildung 85). Insgesamt waren LPA (22:6) Signale deutlich schwächer als LPA (18:0) Signale. LPA (16:0) sowie (18:1) waren vor allem im PBS-behandelten WT Tier im Bereich um das OVLT verstärkt detektierbar, auch wenn die Abgrenzung etwas verwaschen und unscharf erscheint (Abbildung 84).

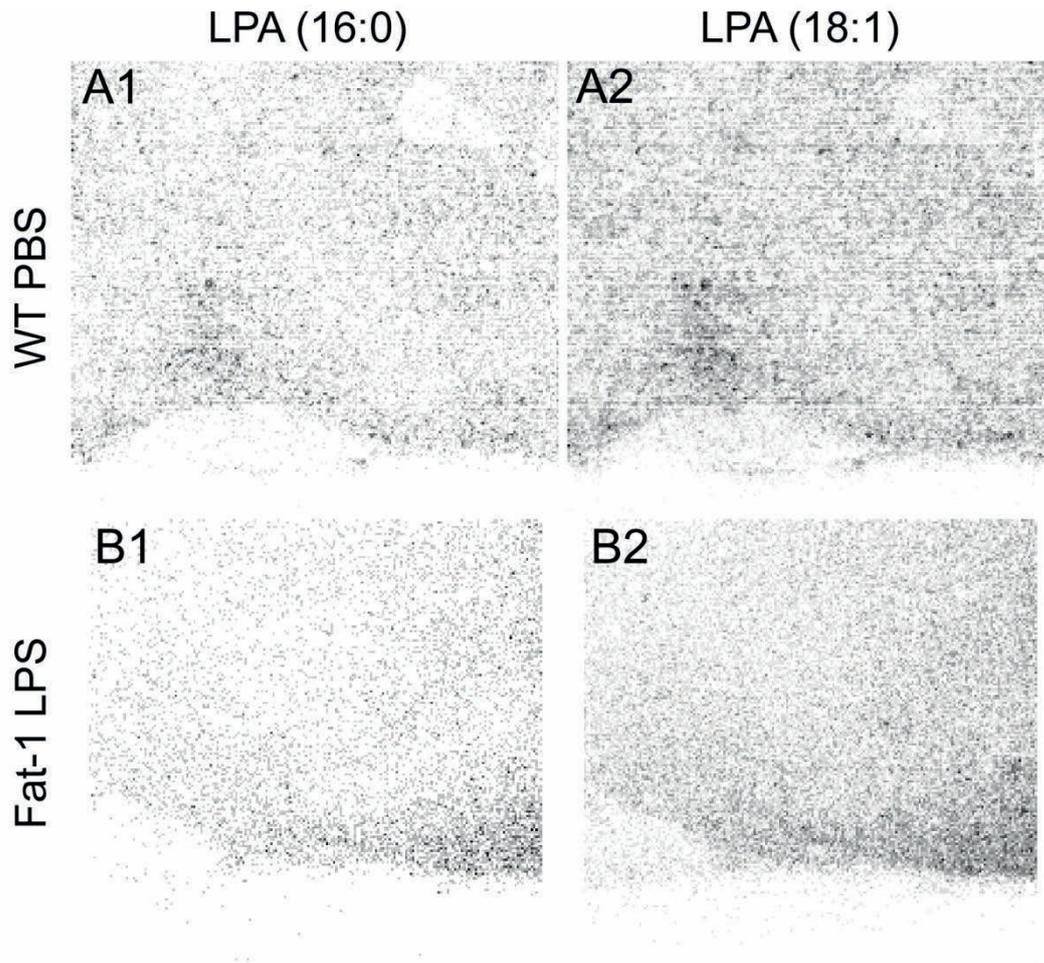
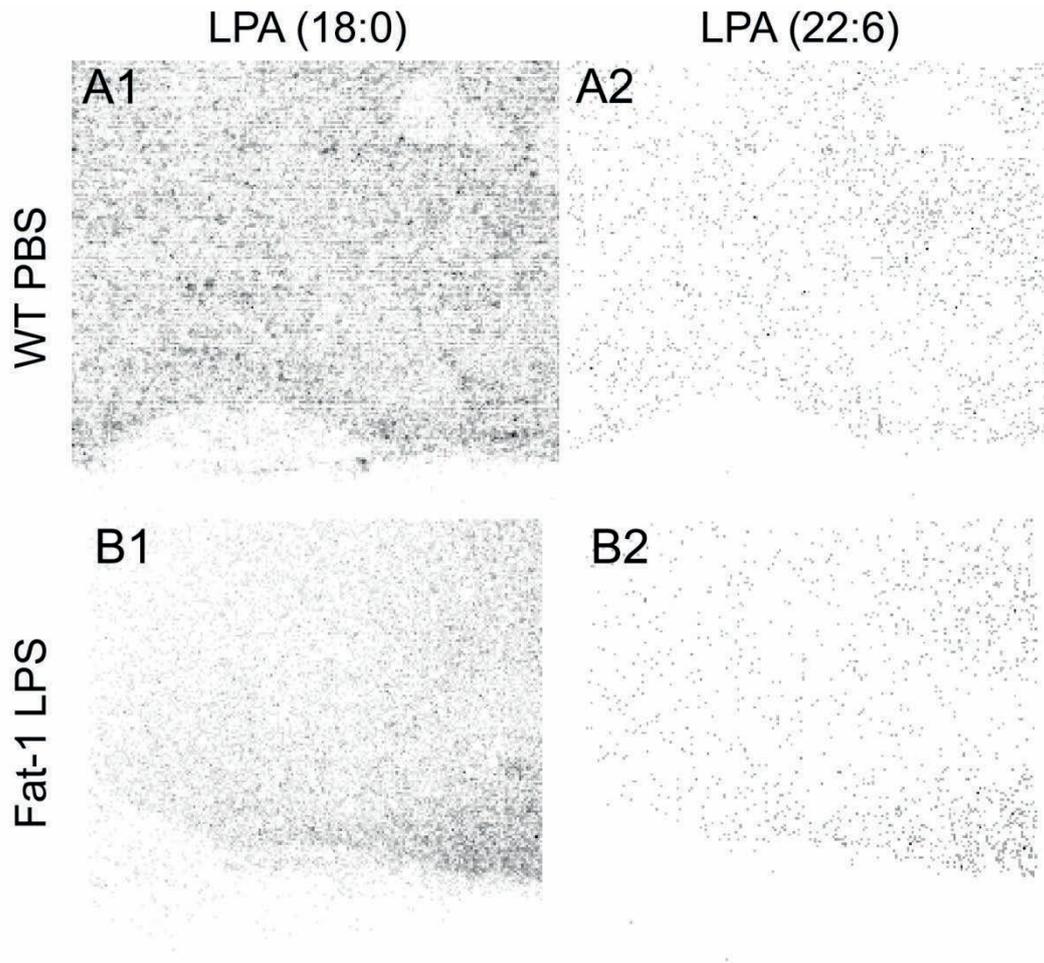


Abbildung 84

LPA (16:0) (1) sowie LPA (18:1) (2) Signale im Bereich des *Organum vasculosum laminae terminalis* und der präoptischen Region 24 Stunden nach intraperitonealer Applikation von 2,5 mg/kg Lipopolysaccharid (LPS) bei einer Fat-1 Maus (B1 und 2) oder Lösungsmittel (PBS) bei einer WT Maus (A1 und 2). Ein Überblick der anatomischen Verhältnisse ist in Abbildung 52 und Abbildung 78 dargestellt. Gemessene Pixelgröße je 10 µm; gemessene Pixelanzahl: A = 215 x 270, B = 195 x 195.

Angaben zu gemessenen Parametern finden sich in Tabelle 36 bzw. Tabelle 38 in Zeile 7 bzw. 6 sowie Zeile 9 bzw. 8.

**Abbildung 85**

LPA (18:0) (1) sowie LPA (22:6) (2) Signale im Bereich des *Organum vasculosum laminae terminalis* und der präoptischen Region 24 Stunden nach intraperitonealer Applikation von 2,5 mg/kg Lipopolysaccharid (LPS) bei einer Fat-1 Maus (B1 und 2) oder Lösungsmittel (PBS) bei einer WT Maus (A1 und 2). Ein Überblick der anatomischen Verhältnisse ist in Abbildung 52 und Abbildung 78 dargestellt. Gemessene Pixelgröße je 10 µm; gemessene Pixelanzahl: A = 215 x 270, B = 195 x 195.

Angaben zu gemessenen Parametern finden sich in Tabelle 36 bzw. Tabelle 38 in Zeile 8 bzw. 7 sowie Zeile 10 bzw. 9.

Im negativen Ionen-Modus nachgewiesene Phosphatidylsäure-Moleküle (PAs)

Insgesamt konnten im negativen Ionen-Modus vier verschiedene PAs angesprochen werden, die sich im Verteilungsmuster voneinander unterschieden. (I) PA (32:0) erschien weitgehend homogen verteilt, zeigte aber zusätzlich eine bereits mehrfach beschriebene Aufhellung im Bereich des MnPO (Abbildung 86). (II) PA (34:1) und (II) (36:2) wiesen ein identisches räumliches Auftreten auf, welches sich durch eine verwaschene Signalanreicherung im Bereich des OVLTs und weniger deutliche Signale in den Leitungsbahnen auszeichnete (Abbildung 86 und Abbildung 87). (III) Ein sich deutlich von der Umgebung abzeichnendes OVLT konnte für das Massensignal von PA (38:5) nachgewiesen werden (Abbildung 87). Diese Beobachtung gilt vor allem für das mit PBS-behandelte WT Tier. Die hohe Signalintensität im OVLT, wie hier im negativen Ionen-Modus gezeigt, konnte für das gleiche Massensignal PA (38:5) nicht ganz so deutlich im positiven Ionen-Modus gezeigt werden (Abbildung 60).

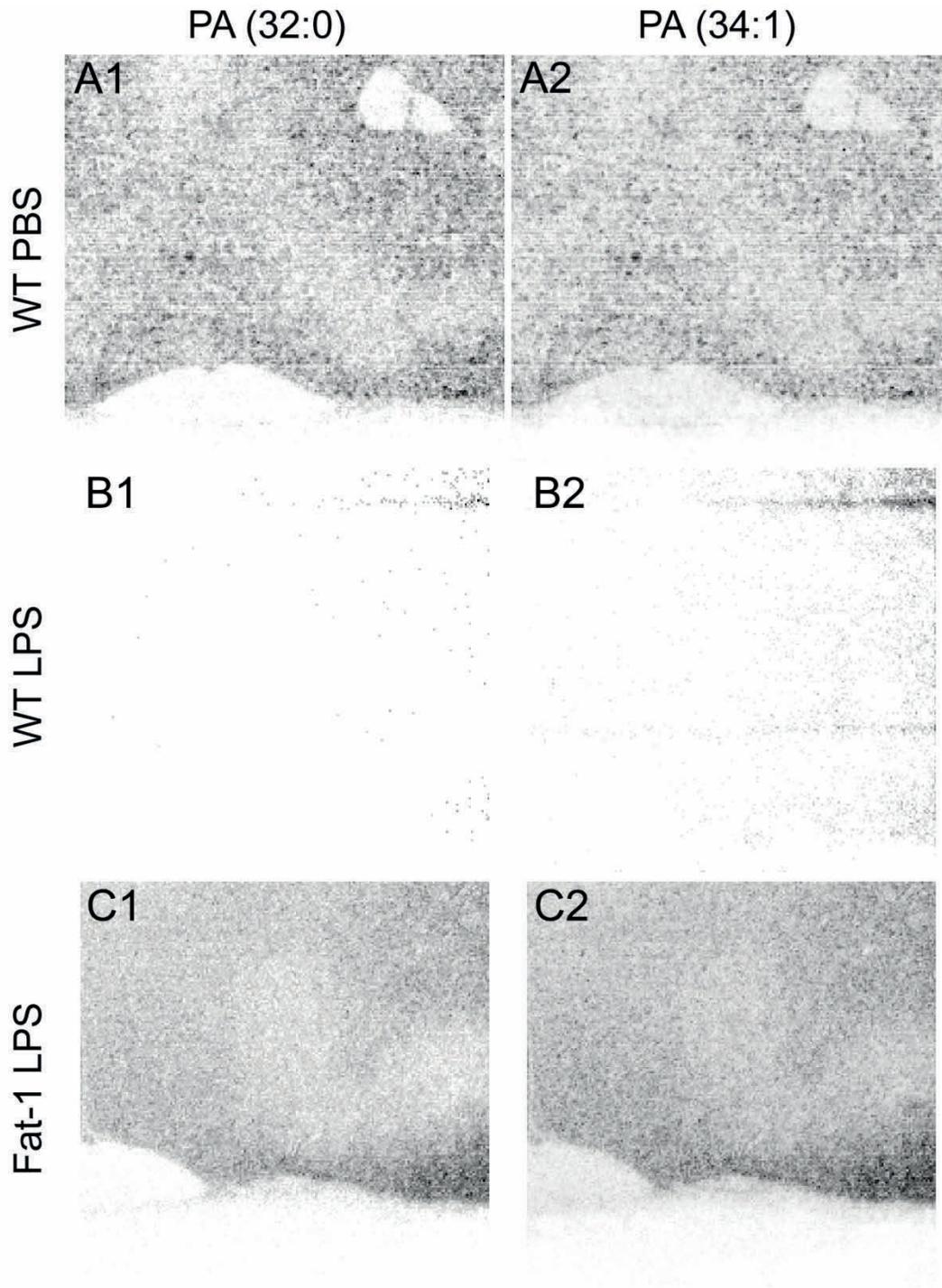


Abbildung 86

PA (32:0) (1) sowie PA (34:1) (2) Signale im Bereich des *Organum vasculosum laminae terminalis* und der präoptischen Region 24 Stunden nach intraperitonealer Applikation von 2,5 mg/kg Lipopolysaccharid (LPS, B1 und 2 sowie C1 und 2) oder Lösungsmittel (PBS, A1 und 2) bei Wildtypmäusen (A und B) sowie einem Fat-1 Tier (C). Ein Überblick der anatomischen Verhältnisse ist in Abbildung 52 und Abbildung 78 dargestellt. Bei der in B1 und B2 dargestellten Messung kam es zu einem Verlust der Signalintensität, weswegen eine qualitative und quantitative Beurteilung nur unter Vorbehalt stattfinden kann. Gemessene Pixelgröße je 10 μm ; gemessene Pixelanzahl: A = 215 x 270, B = 195 x 195, C = 195 x 195.

Angaben zu gemessenen Parametern finden sich in Tabelle 36, Tabelle 37 und Tabelle 38 in Zeile 20, 11 bzw. 19 sowie Zeile 21, 12 bzw. 20.

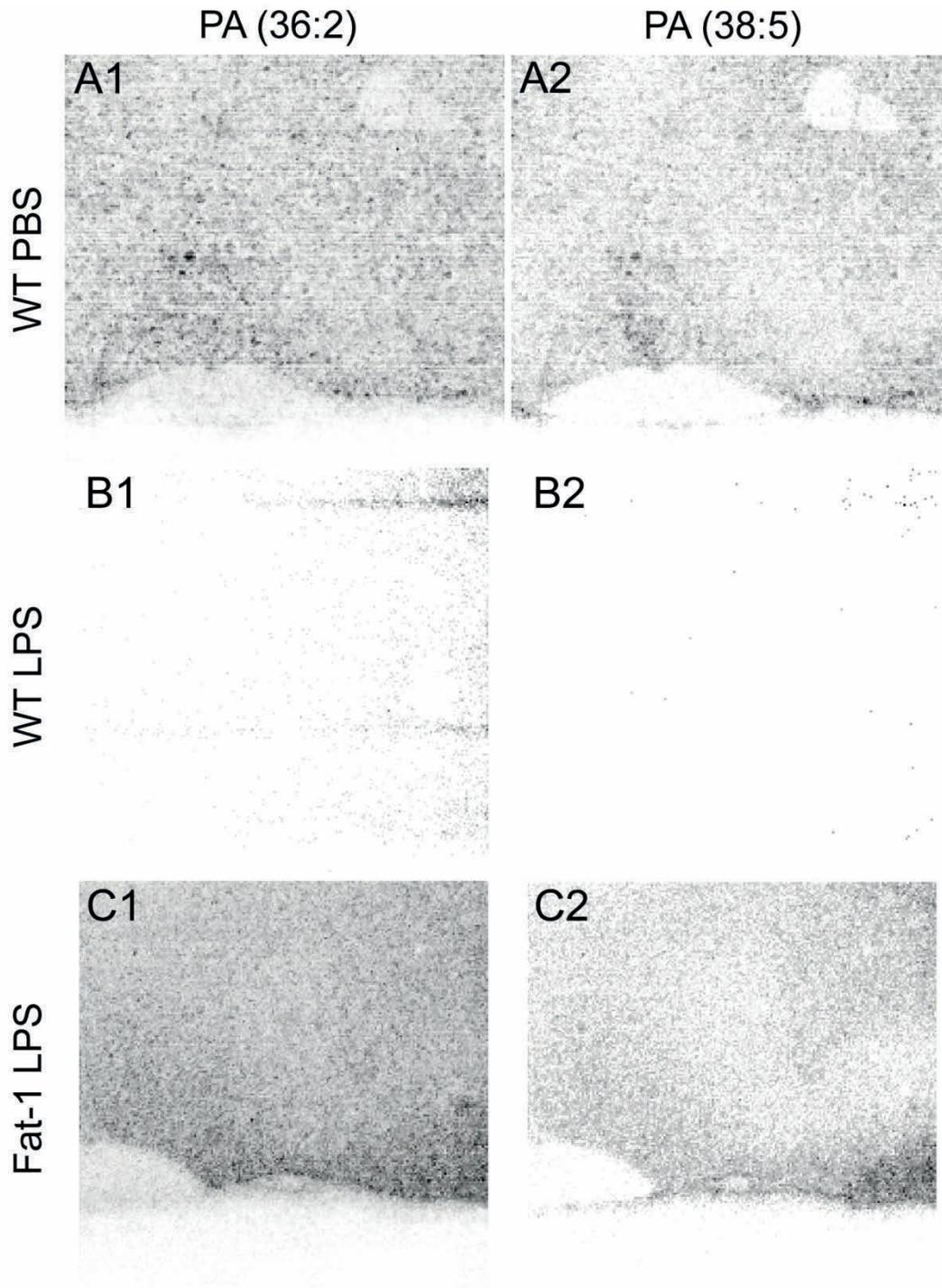


Abbildung 87

PA (36:2) (1) sowie PA (38:5) (2) Signale im Bereich des *Organum vasculosum laminae terminalis* und der präoptischen Region 24 Stunden nach intraperitonealer Applikation von 2,5 mg/kg Lipopolysaccharid (LPS, B1 und 2 sowie C1 und 2) oder Lösungsmittel (PBS, A1 und 2) bei Wildtypmäusen (A und B) sowie einem Fat-1 Tier (C). Ein Überblick der anatomischen Verhältnisse ist in Abbildung 52 und Abbildung 78 dargestellt. Bei der in B1 und B2 dargestellten Messung kam es zu einem Verlust der Signalintensität, weswegen eine qualitative und quantitative Beurteilung nur unter Vorbehalt stattfinden kann. Gemessene Pixelgröße je 10 μm ; gemessene Pixelanzahl: A = 215 x 270, B = 195 x 195, C = 195 x 195.

Angaben zu gemessenen Parametern finden sich in Tabelle 36, Tabelle 37 und Tabelle 38 in Zeile 23, 13 bzw. 22 sowie Zeile 26, 14 bzw. 25.

Im negativen Ionen-Modus nachgewiesene Phosphatidylethanolamine (PEs)

Mit zehn angesprochenen Varianten ist die Gruppe der PEs die größte Gruppe der im negativen Ionen-Modus identifizierten Lipide. Es fanden sich verschiedene Abstufungen verstärkter Signalintensität in Regionen von Leitungsbahnen. Ansonsten waren PE (36:1), (40:7), (36:4), (38:4) und (34:1) weitgehend homogen im Messbereich verteilt und ließen sich hierdurch zu einer Gruppe von Massensignalen zusammenfassen (Abbildung 88, Abbildung 89 und Abbildung 90).

Die Kohlenstoff- zu Doppelbindungs-Kombination von 38:5 zeigte wie schon bei PA (38:5) erneut ein besonderes Verteilungsmuster (Abbildung 90). Vergleichbar mit den Mustern von PA (34:1) und PA (36:2) war PE (38:5) das einzige nachgewiesene PE mit einer tendenziellen Verstärkung der Signalintensität im Bereich des OVLTs.

PE (34:0), (36:2), (38:6) und (40:6), von denen PE (38:6) und (40:6) ebenso wie PE (40:7) als potentiell DHA-tragend in Frage kommen, wiesen jeweils eine recht scharf umrissene, in unterschiedlichen Ausprägungen auftretende, Abschwächung ihres Massensignals im Bereich des OVLTs auf (Abbildung 91 und Abbildung 92). Dieses Phänomen war jeweils in der Messung des PBS-behandelten WT Tieres am deutlichsten nachweisbar.

Es ist weiterhin hervorzuheben, dass PE (36:4), PE (38:4) sowie PE (38:5) mit AA verestert auftreten können [23].

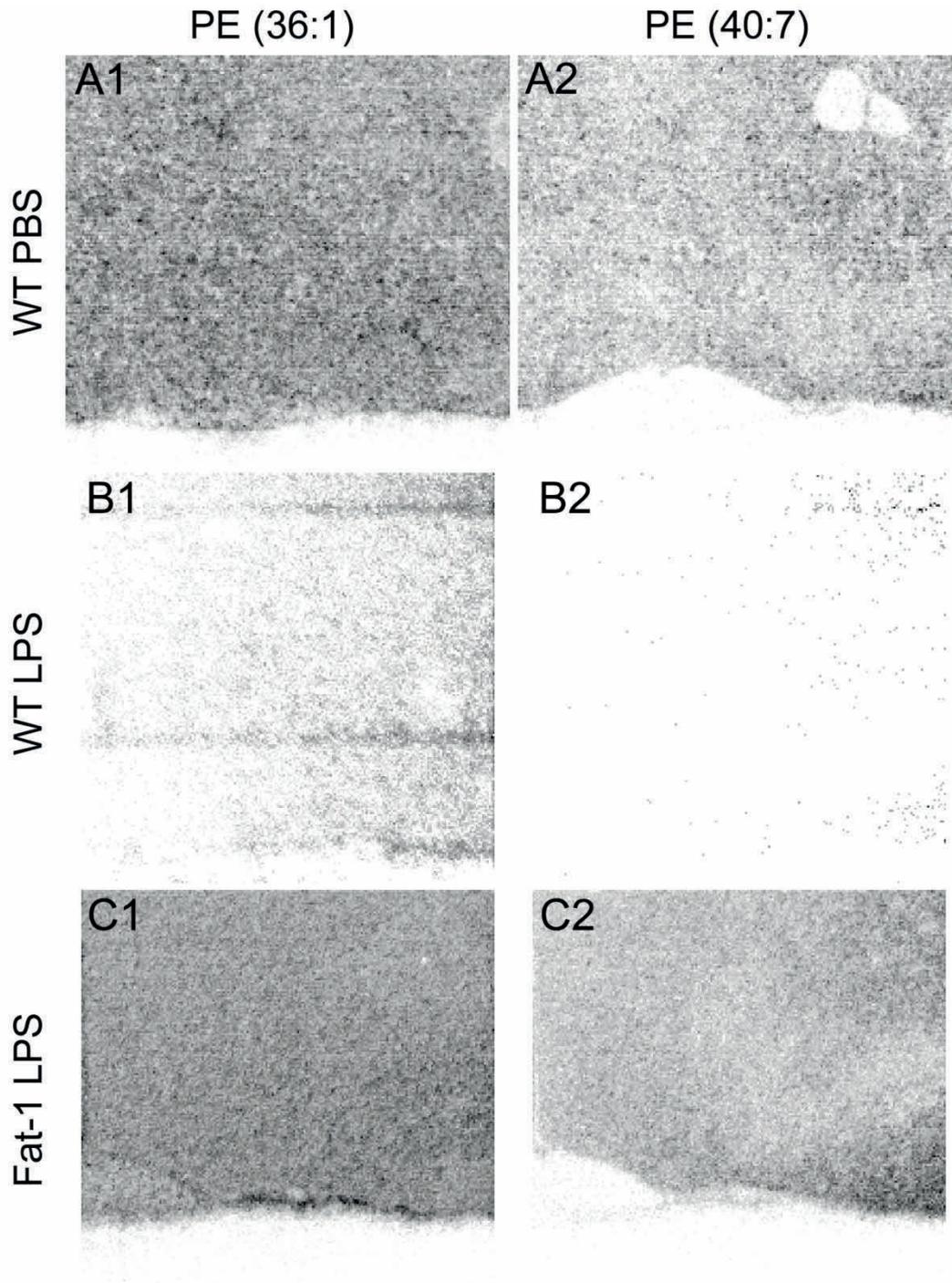


Abbildung 88

PE (36:1) Signale (1) sowie PE (40:7) Signale (2) im Bereich des *Organum vasculosum laminae terminalis* und der präoptischen Region 24 Stunden nach intraperitonealer Applikation von 2,5 mg/kg Lipopolysaccharid (LPS, B1 und 2 sowie C1 und 2) oder Lösungsmittel (PBS, A1 und 2) bei Wildtypmäusen (A und B) sowie einem Fat-1 Tier (C). Ein Überblick der anatomischen Verhältnisse ist in Abbildung 52 und Abbildung 78 dargestellt. Bei der in B1 und B2 dargestellten Messung kam es zu einem Verlust der Signalintensität, weswegen eine qualitative und quantitative Beurteilung nur unter Vorbehalt stattfinden kann. Gemessene Pixelgröße je 10 μm ; gemessene Pixelanzahl: A = 215 x 270, B = 195 x 195, C = 195 x 195.

Angaben zu gemessenen Parametern finden sich in Tabelle 36, Tabelle 37 und Tabelle 38 in Zeile 33, 17 bzw. 32 sowie Zeile 40, 24 bzw. 39.

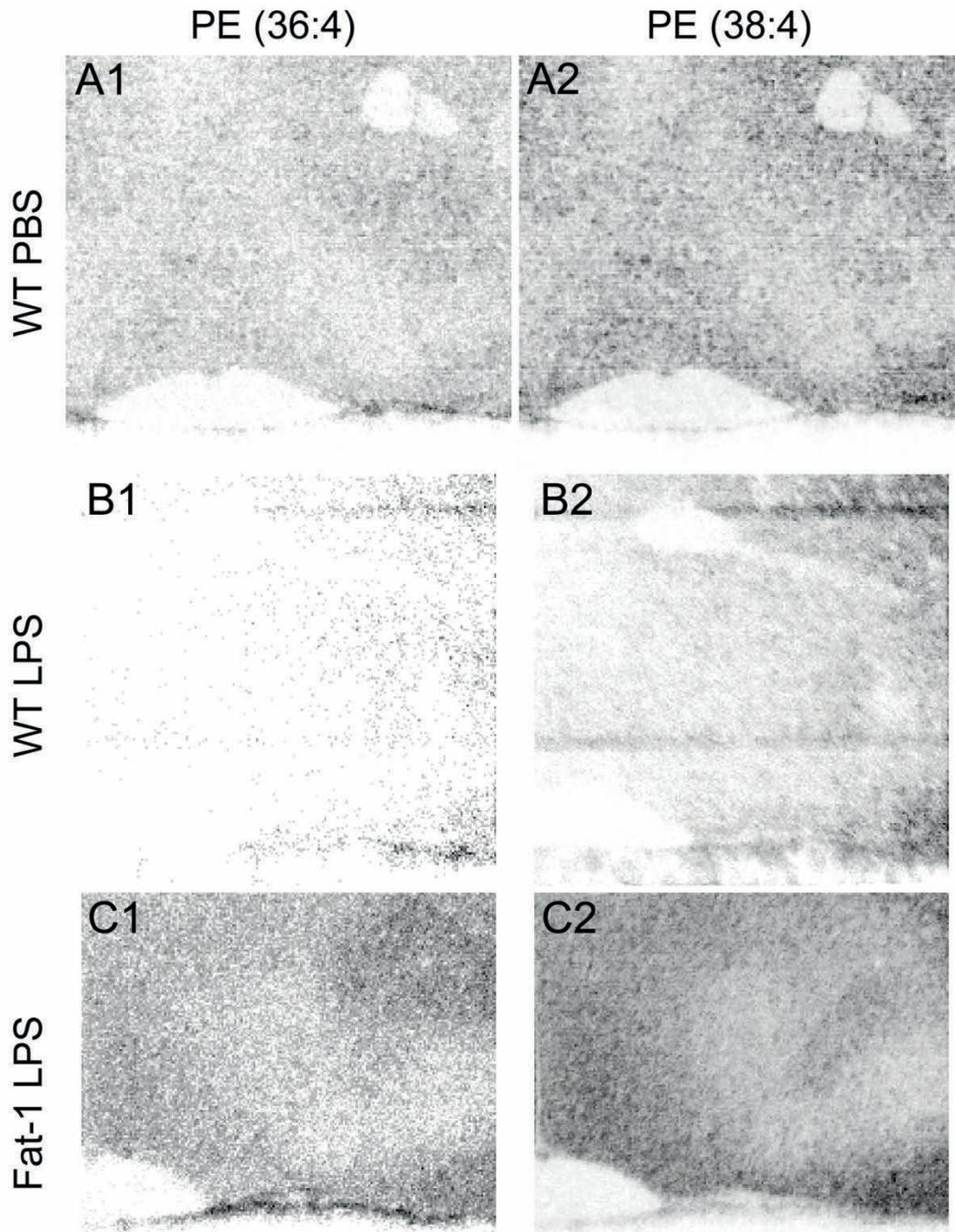


Abbildung 89

PE (36:4) Signale (1) sowie PE (38:4) Signale (2) im Bereich des *Organum vasculosum laminae terminalis* und der präoptischen Region 24 Stunden nach intraperitonealer Applikation von 2,5 mg/kg Lipopolysaccharid (LPS, B1 und 2 sowie C1 und 2) oder Lösungsmittel (PBS, A1 und 2) bei Wildtypmäusen (A und B) sowie einem Fat-1 Tier (C). Ein Überblick der anatomischen Verhältnisse ist in Abbildung 52 und Abbildung 78 dargestellt. Bei der in B1 und B2 dargestellten Messung kam es zu einem Verlust der Signalintensität, weswegen eine qualitative und quantitative Beurteilung nur unter Vorbehalt stattfinden kann. Gemessene Pixelgröße je 10 μm ; gemessene Pixelanzahl: A = 215 x 270, B = 195 x 195, C = 195 x 195.

Angaben zu gemessenen Parametern finden sich in Tabelle 36, Tabelle 37 und Tabelle 38 in Zeile 35, 19 bzw. 34 sowie Zeile 36, 20 bzw. 35.

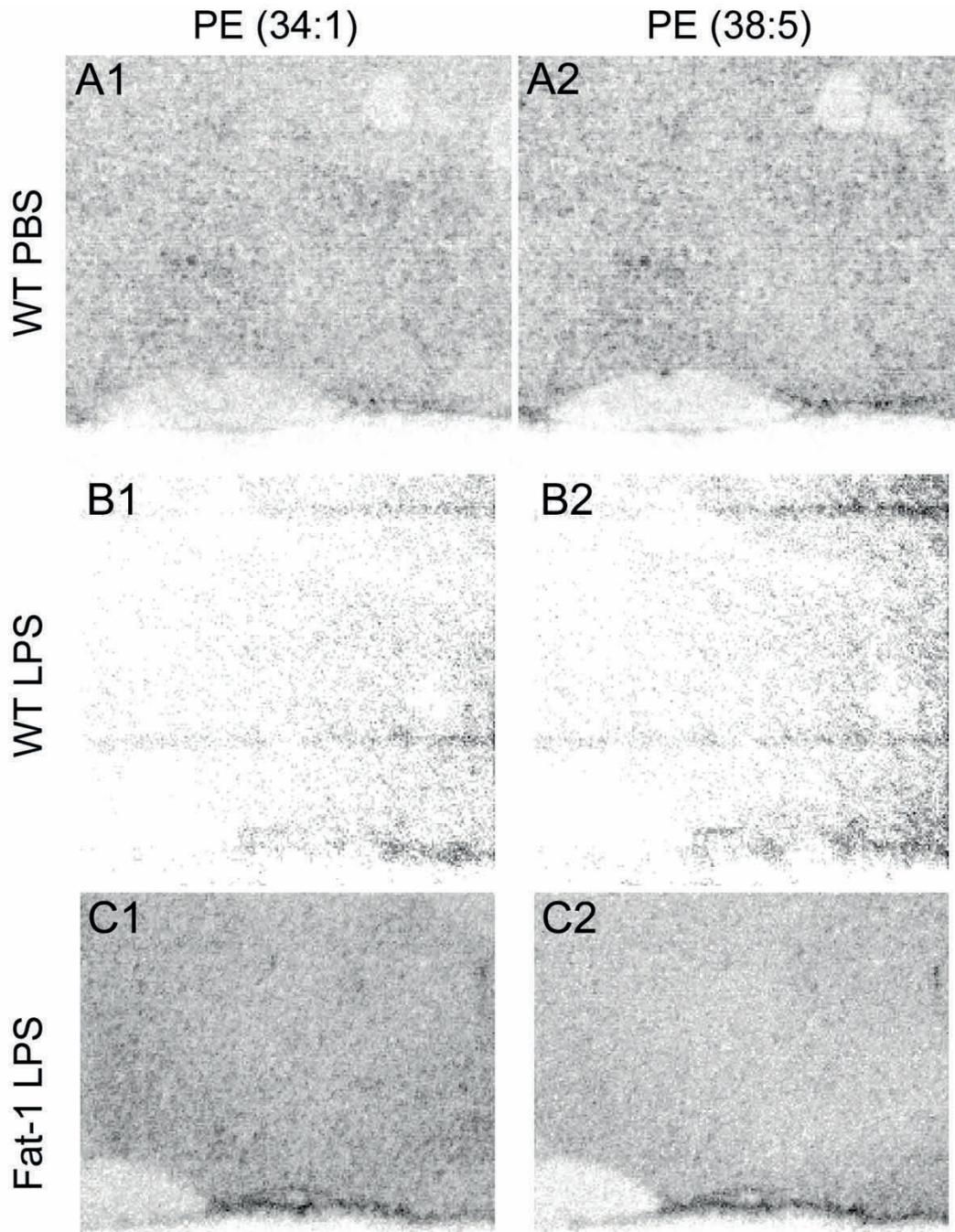


Abbildung 90

PE (34:1) (1) sowie PE (38:5) (2) Signale im Bereich des *Organum vasculosum laminae terminalis* und der präoptischen Region 24 Stunden nach intraperitonealer Applikation von 2,5 mg/kg Lipopolysaccharid (LPS, B1 und 2 sowie C1 und 2) oder Lösungsmittel (PBS, A1 und 2) bei Wildtypmäusen (A und B) sowie einem Fat-1 Tier (C). Ein Überblick der anatomischen Verhältnisse ist in Abbildung 52 und Abbildung 78 dargestellt. Bei der in B1 und B2 dargestellten Messung kam es zu einem Verlust der Signalintensität, weswegen eine qualitative und quantitative Beurteilung nur unter Vorbehalt stattfinden kann. Gemessene Pixelgröße je 10 μm ; gemessene Pixelanzahl: A = 215 x 270, B = 195 x 195, C = 195 x 195.

Angaben zu gemessenen Parametern finden sich in Tabelle 36, Tabelle 37 und Tabelle 38 in Zeile 32, 16 bzw. 31 sowie Zeile 37, 21 bzw. 36.

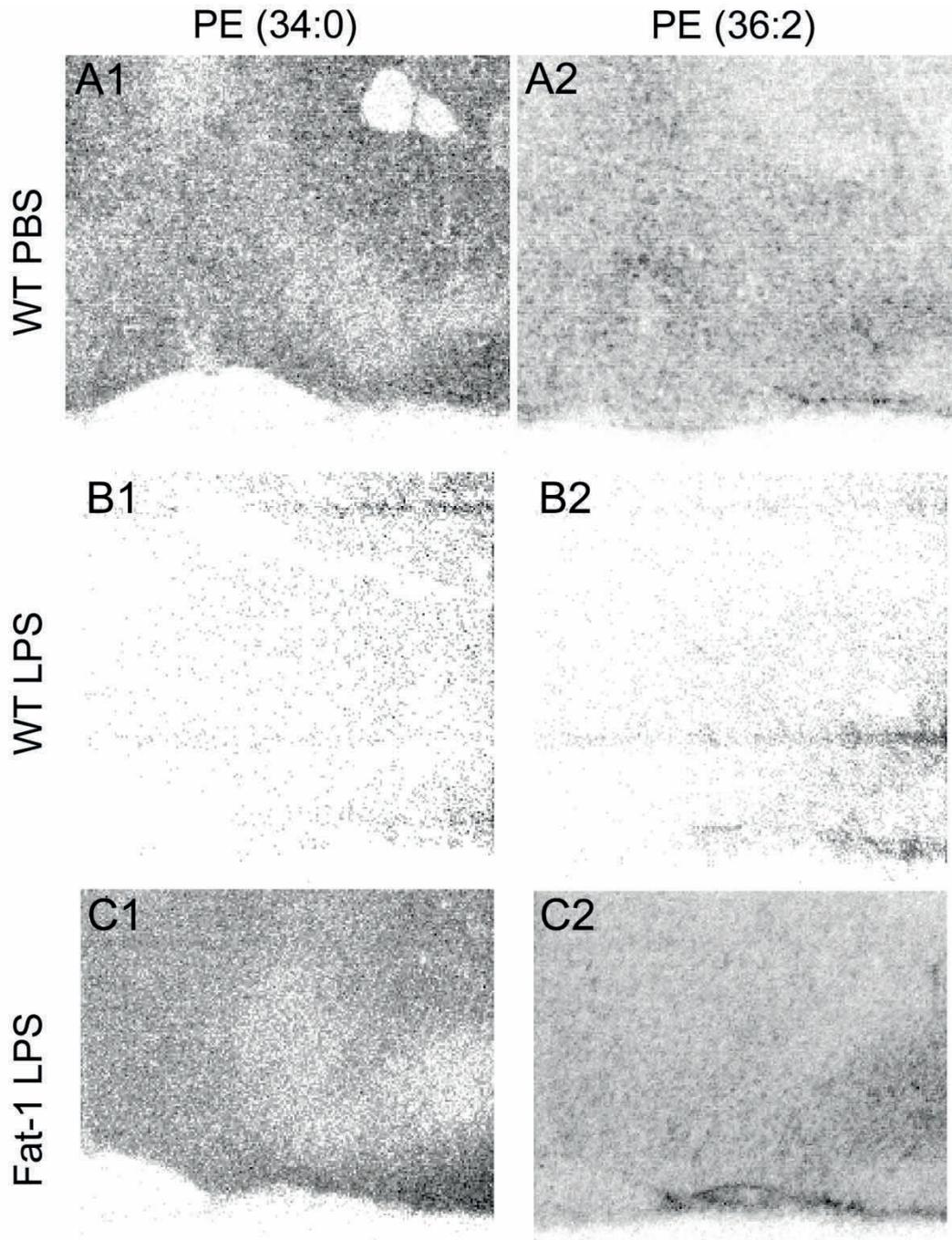


Abbildung 91

PE (34:0) (1) sowie PE (36:2) (2) Signale im Bereich des *Organum vasculosum laminae terminalis* und der präoptischen Region 24 Stunden nach intraperitonealer Applikation von 2,5 mg/kg Lipopolysaccharid (LPS, B1 und 2 sowie C1 und 2) oder Lösungsmittel (PBS, A1 und 2) bei Wildtypmäusen (A und B) sowie einem Fat-1 Tier (C). Ein Überblick der anatomischen Verhältnisse ist in Abbildung 52 und Abbildung 78 dargestellt. Bei der in B1 und B2 dargestellten Messung kam es zu einem Verlust der Signalintensität, weswegen eine qualitative und quantitative Beurteilung nur unter Vorbehalt stattfinden kann. Gemessene Pixelgröße je 10 μm ; gemessene Pixelanzahl: A = 215 x 270, B = 195 x 195, C = 195 x 195.

Angaben zu gemessenen Parametern finden sich in Tabelle 36, Tabelle 37 und Tabelle 38 in Zeile 31, 15 bzw. 30 sowie Zeile 34, 18 bzw. 33.

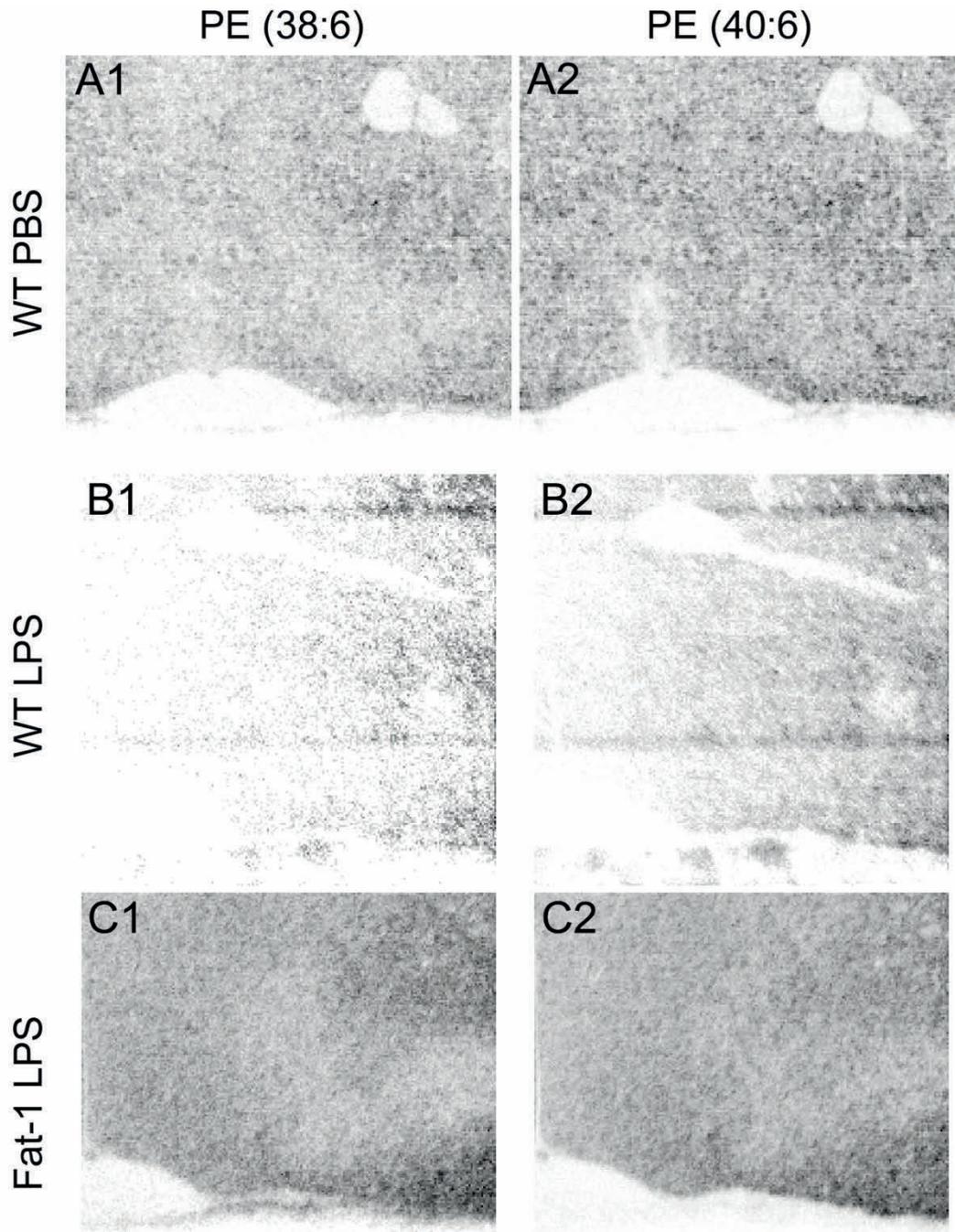


Abbildung 92

PE (38:6) (1) sowie PE (40:6) (2) Signale im Bereich des *Organum vasculosum laminae terminalis* und der präoptischen Region 24 Stunden nach intraperitonealer Applikation von 2,5 mg/kg Lipopolysaccharid (LPS, B1 und 2 sowie C1 und 2) oder Lösungsmittel (PBS, A1 und 2) bei Wildtypmäusen (A und B) sowie einem Fat-1 Tier (C). Ein Überblick der anatomischen Verhältnisse ist in Abbildung 52 und Abbildung 78 dargestellt. Bei der in B1 und B2 dargestellten Messung kam es zu einem Verlust der Signalintensität, weswegen eine qualitative und quantitative Beurteilung nur unter Vorbehalt stattfinden kann. Gemessene Pixelgröße je 10 μm ; gemessene Pixelanzahl: A = 215 x 270, B = 195 x 195, C = 195 x 195.

Angaben zu gemessenen Parametern finden sich in Tabelle 36, Tabelle 37 und Tabelle 38 in Zeile 38, 22 bzw. 37 sowie Zeile 39, 23 bzw. 38.

Im negativen Ionen-Modus nachgewiesene Phosphatidylglycerine (PGs)

PG (34:1) zeigte ein mit PA (38:5) vergleichbares räumliches Auftreten, wohingegen PG (36:2) ein eher gleichmäßiges Signal über den gesamten Messbereich aufwies (Abbildung 93). Beide angesprochenen PGs zeigten wie die meisten anderen Substanzen ein abgeschwächtes Signal in abgebildeten Leitungsstrukturen.

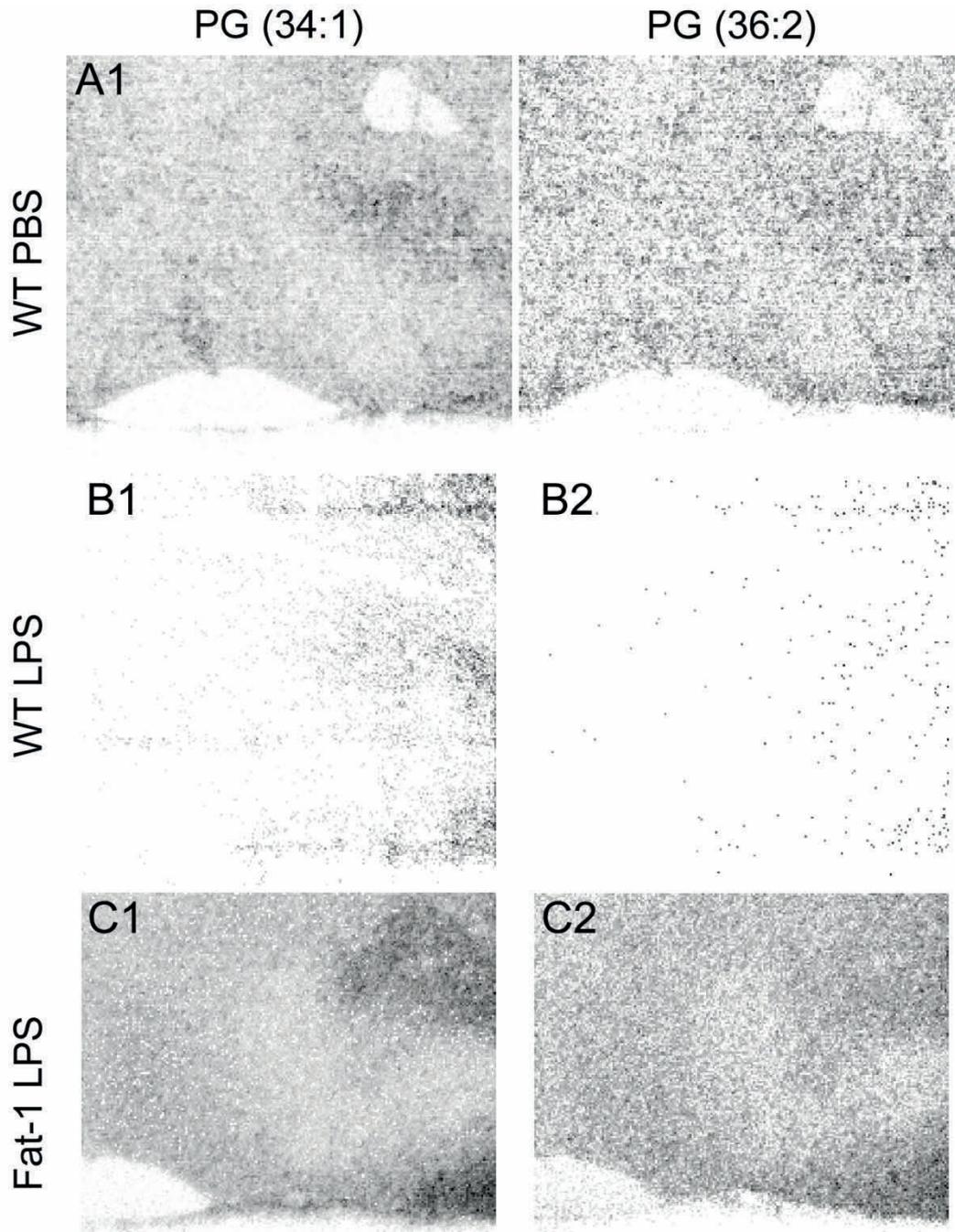


Abbildung 93

PG (34:1) (1) sowie PG (36:2) (2) Signale im Bereich des *Organum vasculosum laminae terminalis* und der präoptischen Region 24 Stunden nach intraperitonealer Applikation von 2,5 mg/kg Lipopolysaccharid (LPS, B1 und 2 sowie C1 und 2) oder Lösungsmittel (PBS, A1 und 2) bei Wildtypmäusen (A und B) sowie einem Fat-1 Tier (C). Ein Überblick der anatomischen Verhältnisse ist in Abbildung 52 und Abbildung 78 dargestellt. Bei der in B1 und B2 dargestellten Messung kam es zu einem Verlust der Signalintensität, weswegen eine qualitative und quantitative Beurteilung nur unter Vorbehalt stattfinden kann. Gemessene Pixelgröße je 10 μm ; gemessene Pixelanzahl: A = 215 x 270, B = 195 x 195, C = 195 x 195.

Angaben zu gemessenen Parametern finden sich in Tabelle 36, Tabelle 37 und Tabelle 38 in Zeile 41, 25 bzw. 40 sowie Zeile 42, 26 bzw. 41.

Im negativen Ionen-Modus nachgewiesene Phosphatidylinositole (PIs)

Auch der Nachweis von verschiedenen PIs gelang im negativen Ionen-Modus. Hierbei fiel auf, dass PI (38:5) ein sehr vergleichbares Verteilungsmuster zu PE (38:5) mit einem verstärkten Signal im OVLT umgebenden Bereich aufwies (Abbildung 95). Demgegenüber waren die Signalstärken für PI (36:4) sowie PI (38:4) im OVLT erhöht (Abbildung 94), was vor allem in der Messung des PBS-behandelten WT Tieres zu sehen war. Im LPS-behandelten Fat-1 Tier war dieses Phänomen weniger deutlich zu beobachten. Alle hier angesprochenen PIs könnten potentiell mit AA verestert sein [23].

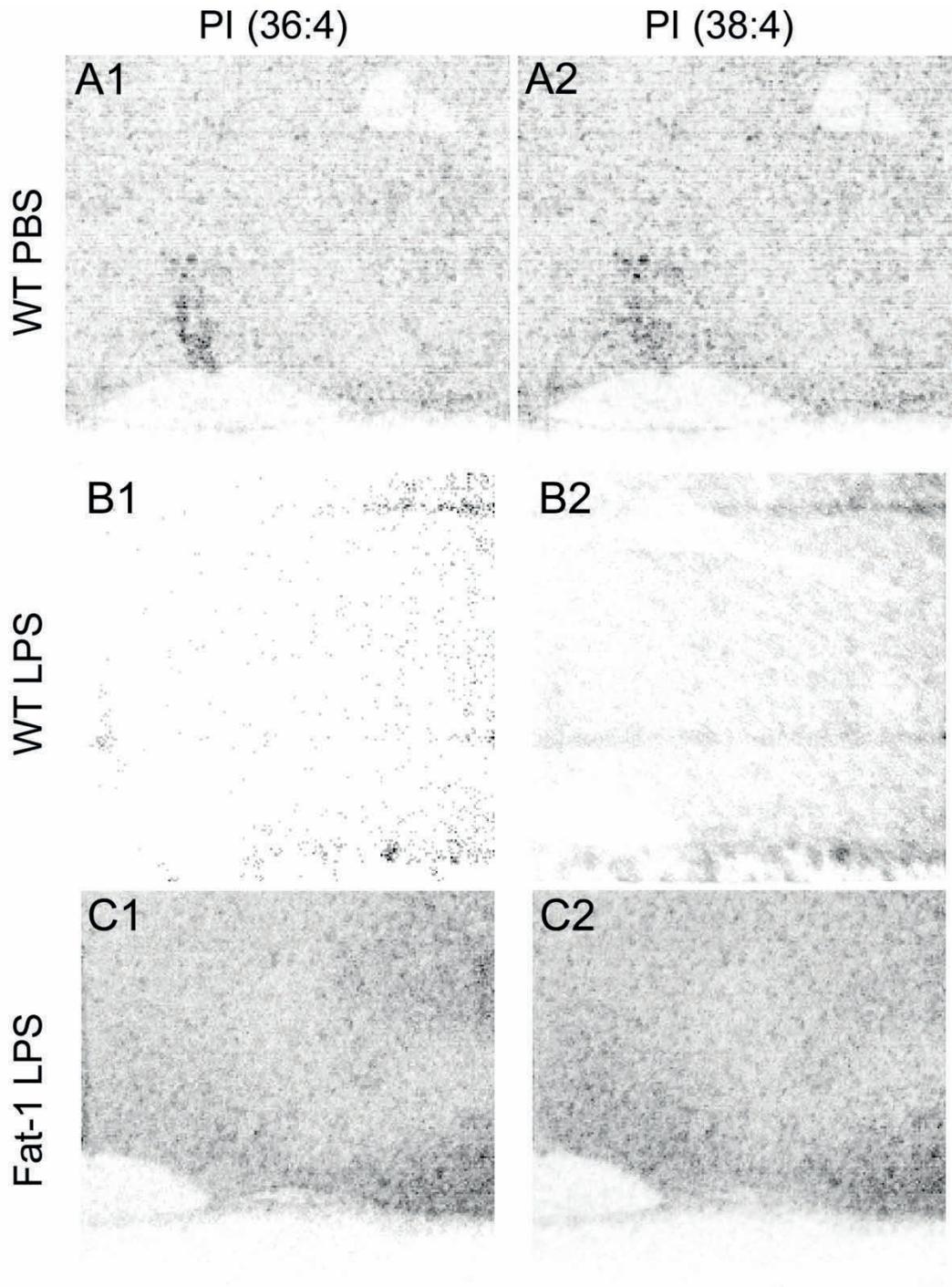


Abbildung 94

PI (36:4) (1) sowie PI (38:4) (2) Signale im Bereich des *Organum vasculosum laminae terminalis* und der präoptischen Region 24 Stunden nach intraperitonealer Applikation von 2,5 mg/kg Lipopolysaccharid (LPS, B1 und 2 sowie C1 und 2) oder Lösungsmittel (PBS, A1 und 2) bei Wildtypmäusen (A und B) sowie einem Fat-1 Tier (C). Ein Überblick der anatomischen Verhältnisse ist in Abbildung 52 und Abbildung 78 dargestellt. Bei der in B1 und B2 dargestellten Messung kam es zu einem Verlust der Signalintensität, weswegen eine qualitative und quantitative Beurteilung nur unter Vorbehalt stattfinden kann. Gemessene Pixelgröße je 10 μm ; gemessene Pixelanzahl: A = 215 x 270, B = 195 x 195, C = 195 x 195.

Angaben zu gemessenen Parametern finden sich in Tabelle 36, Tabelle 37 und Tabelle 38 in Zeile 46, 27 bzw. 45 sowie Zeile 47, 28 bzw. 46.

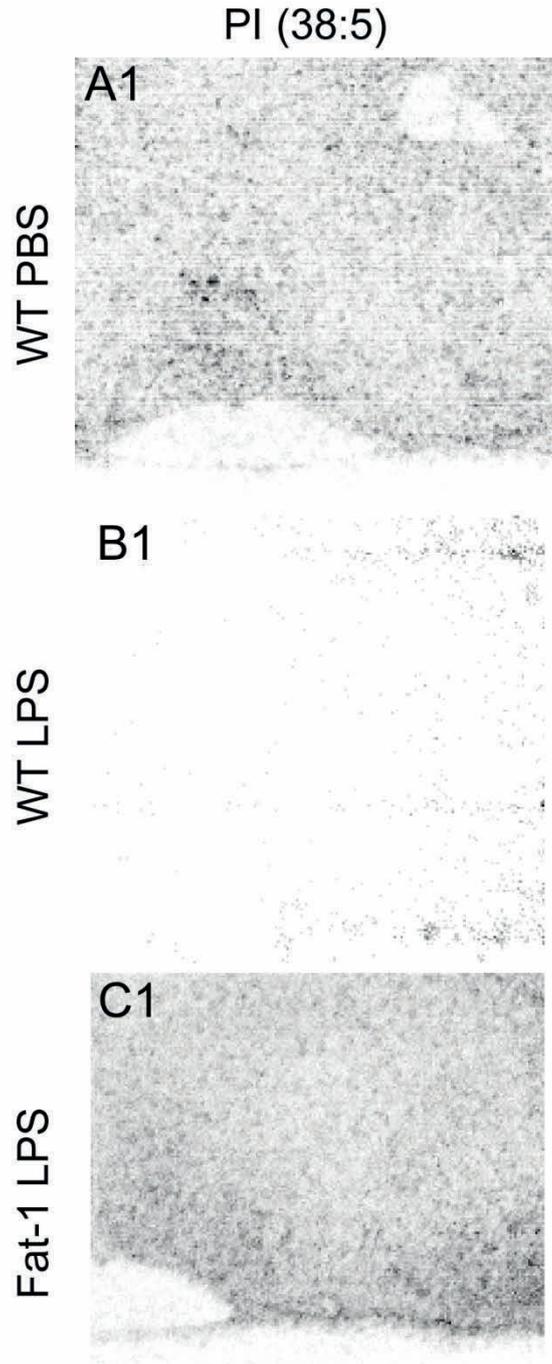


Abbildung 95

PI (38:5) (1) Signale im Bereich des *Organum vasculosum laminae terminalis* und der präoptischen Region 24 Stunden nach intraperitonealer Applikation von 2,5 mg/kg Lipopolysaccharid (LPS, B1 sowie C1) oder Lösungsmittel (PBS, A1) bei Wildtypmäusen (A und B) sowie einem Fat-1 Tier (C). Ein Überblick der anatomischen Verhältnisse ist in Abbildung 52 und Abbildung 78 dargestellt. Bei der in B1 dargestellten Messung kam es zu einem Verlust der Signalintensität, weswegen eine qualitative und quantitative Beurteilung nur unter Vorbehalt stattfinden kann. Gemessene Pixelgröße je 10 μm ; gemessene Pixelanzahl: A = 215 x 270, B = 195 x 195, C = 195 x 195.

Angaben zu gemessenen Parametern finden sich in Tabelle 36, Tabelle 37 und Tabelle 38 in Zeile 48, 29 bzw. 47.

Im negativen Ionen-Modus nachgewiesene Phosphatidylserine (PSs)

Als Letzte zu nennende Gruppe der Phospholipide wurden verschiedene PS-Spezies detektiert. PS (36:1) und PS (38:4) zeigten eine Anreicherung im OVLT (Abbildung 96). Letzteres ist potentiell AA-tragend [23] und zeigte im Gegensatz zu PS (36:1) kaum eine Anreicherung in Leitungsbahnen. PS (34:1), (36:2) und (40:6) Signale waren im Bereich des OVLTs abgeschwächt. Eine zusätzliche Signalverstärkung unmittelbar am Übergang von OVLT zum umgebenden Parenchym konnte ebenfalls beobachtet werden, was den Eindruck einer Signalreduktion im Bereich des MnPO weiter verstärkte (Abbildung 97 und Abbildung 98). Interessanterweise trägt PS (40:6) regelmäßig DHA an der sn-2 Position [23]. Die Darstellung von PS (40:7) zeigte sich ohne Auffälligkeiten des Verteilungsmusters im Bereich des OVLTs weitgehend homogen (Abbildung 98). Rein rechnerisch könnte PS (40:7) mit DHA verestert sein, dies ist aber nur selten der Fall [23].

Phosphatidylcholine und Plasmalogene konnten im negativen Ionen-Modus nicht angesprochen werden.

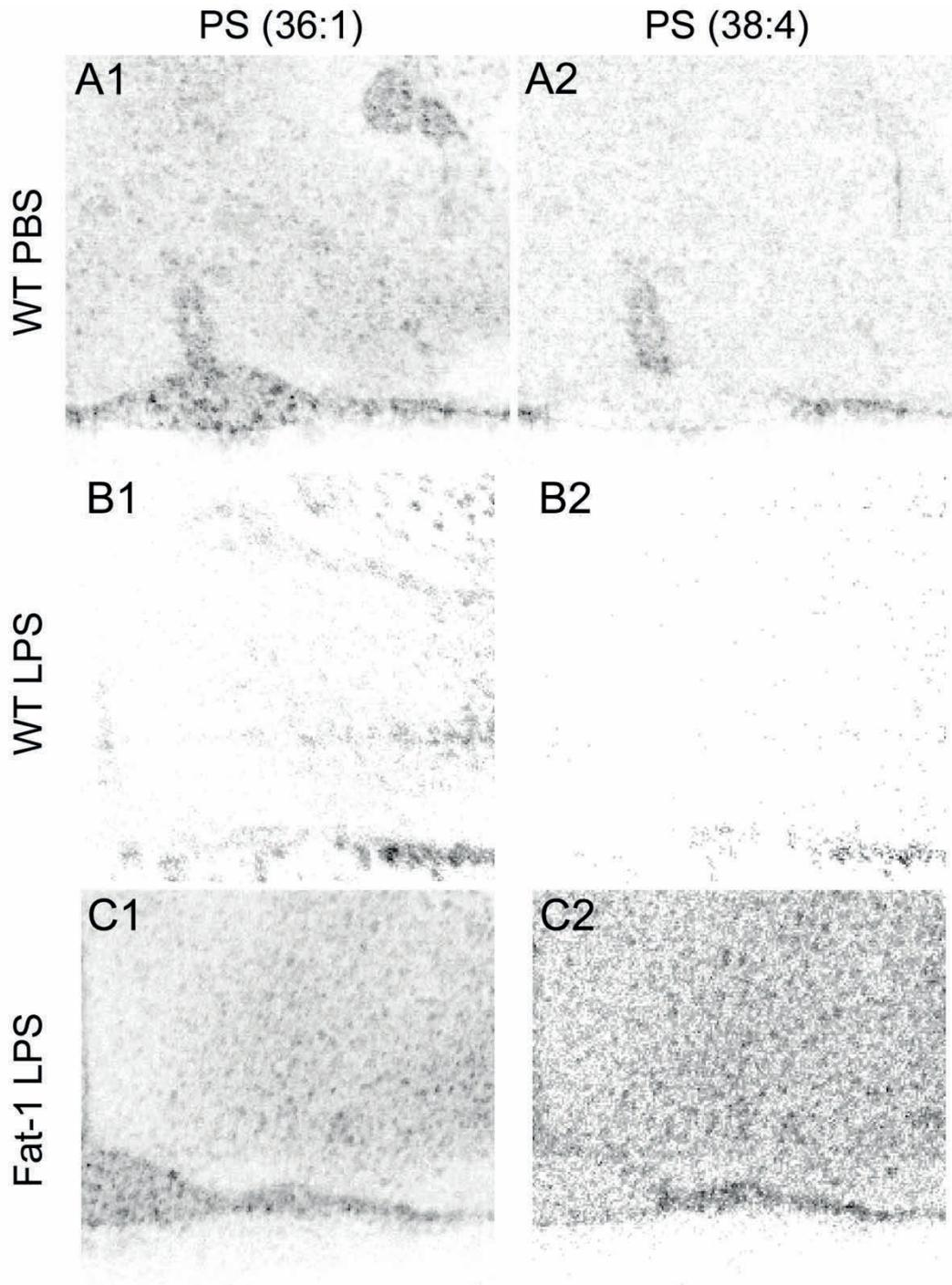


Abbildung 96

PS (36:1) (1) sowie PS (38:4) (2) Signale im Bereich des *Organum vasculosum laminae terminalis* und der präoptischen Region 24 Stunden nach intraperitonealer Applikation von 2,5 mg/kg Lipopolysaccharid (LPS, B1 und 2 sowie C1 und 2) oder Lösungsmittel (PBS, A1 und 2) bei Wildtypmäusen (A und B) sowie einem Fat-1 Tier (C). Ein Überblick der anatomischen Verhältnisse ist in Abbildung 52 und Abbildung 78 dargestellt. Bei der in B1 und B2 dargestellten Messung kam es zu einem Verlust der Signalintensität, weswegen eine qualitative und quantitative Beurteilung nur unter Vorbehalt stattfinden kann. Gemessene Pixelgröße je 10 μm ; gemessene Pixelanzahl: A = 215 x 270, B = 195 x 195, C = 195 x 195.

Angaben zu gemessenen Parametern finden sich in Tabelle 36, Tabelle 37 und Tabelle 38 in Zeile 50, 31 bzw. 49 sowie Zeile 52, 33 bzw. 51

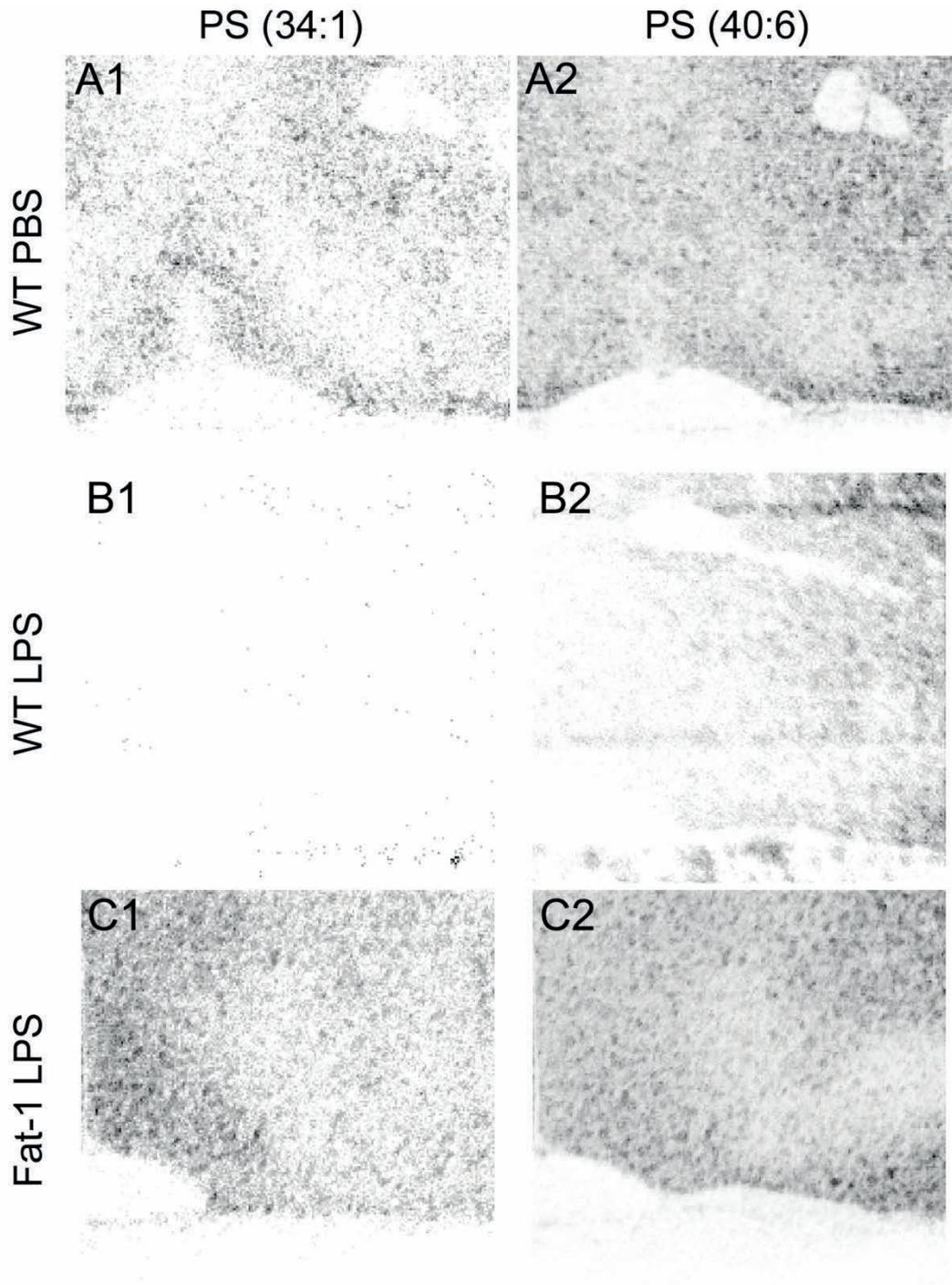


Abbildung 97

PS (34:1) (1) sowie PS (40:6) (2) Signale im Bereich des *Organum vasculosum laminae terminalis* und der präoptischen Region 24 Stunden nach intraperitonealer Applikation von 2,5 mg/kg Lipopolysaccharid (LPS, B1 und 2 sowie C1 und 2) oder Lösungsmittel (PBS, A1 und 2) bei Wildtypmäusen (A und B) sowie einem Fat-1 Tier (C). Ein Überblick der anatomischen Verhältnisse ist in Abbildung 52 und Abbildung 78 dargestellt. Bei der in B1 und B2 dargestellten Messung kam es zu einem Verlust der Signalintensität, weswegen eine qualitative und quantitative Beurteilung nur unter Vorbehalt stattfinden kann. Gemessene Pixelgröße je 10 μm ; gemessene Pixelanzahl: A = 215 x 270, B = 195 x 195, C = 195 x 195.

Angaben zu gemessenen Parametern finden sich Tabelle 36, Tabelle 37 und Tabelle 38 jeweils in Zeile 49, 30 bzw. 48 sowie Zeile 54, 34 bzw. 53

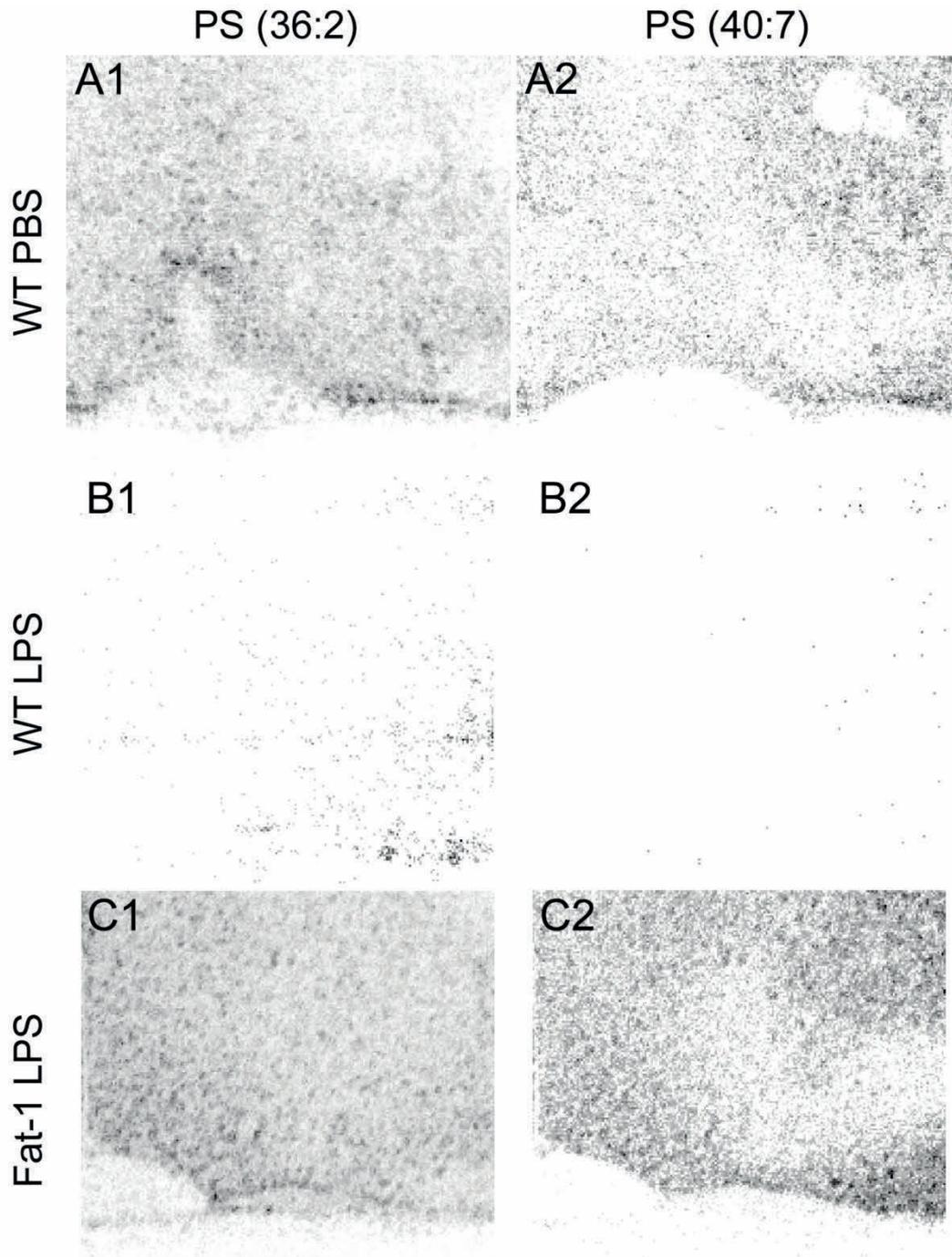


Abbildung 98

PS (36:2) (1) sowie PS (40:7) (2) Signale im Bereich des *Organum vasculosum laminae terminalis* und der präoptischen Region 24 Stunden nach intraperitonealer Applikation von 2,5 mg/kg Lipopolysaccharid (LPS, B1 und 2 sowie C1 und 2) oder Lösungsmittel (PBS, A1 und 2) bei Wildtypmäusen (A und B) sowie einem Fat-1 Tier (C). Ein Überblick der anatomischen Verhältnisse ist in Abbildung 52 und Abbildung 78 dargestellt. Bei der in B1 und B2 dargestellten Messung kam es zu einem Verlust der Signalintensität, weswegen eine qualitative und quantitative Beurteilung nur unter Vorbehalt stattfinden kann. Gemessene Pixelgröße je 10 μm ; gemessene Pixelanzahl: A = 215 x 270, B = 195 x 195, C = 195 x 195.

Angaben zu gemessenen Parametern finden sich in Tabelle 36, Tabelle 37 und Tabelle 38 jeweils in Zeile 51, 32 und 50 sowie Zeile 55, 35 und 54

6. Darstellung inflammatorischer Marker

6.1 NF-IL6 und COX2 Immunreaktivität vor und nach MALDI-Messungen

Um gewonnenes Gewebe von Versuchstieren möglichst optimal auszunutzen sowie Korrelationen zwischen MALDI-Ergebnissen und Proteinnachweisen zu ermöglichen, wurde ein Protokoll entwickelt, welches immunhistochemische Nachweise auch nach erfolgter MALDI-Messung erlaubt. Als Kontrollen wurden sowohl COX2- als auch NF-IL6-Nachweise von unbehandelten (keine Matrix) Gewebeschnitten durchgeführt. Hier wurden erwartungsgemäß perinukleäre COX2-Signale sowie nukleäre NF-IL6-Signale 24 Stunden nach Stimulation mit 2,5 mg/kg KGW LPS in beiden untersuchten Genotypen (WT und Fat-1) detektiert (Abbildung 99 und Abbildung 100, je B – D). Bei Färbungen nach MALDI-Messung konnten deutliche Gewebeverluste (Abbildung 15 B und C), die Zerstörung von Zellkernen sowie reichlich Zelldetritus dargestellt werden. Des Weiteren zeichnete sich die Immunfluoreszenz von Schnitten nach der MALDI-Messung durch erhöhte Hintergrundfluoreszenz aus. Der spezifische Nachweis von COX2 oder NF-IL6 gelang nach Behandlung der Schnitte mit DHB (2,5-Dihydroxybenzoesäure) als Matrix nicht mehr (Abbildung 99 E – G und Abbildung 100 E). Auch der Nachweis des von Willebrand Faktors (vWF) war dann nur sehr eingeschränkt möglich. Signale waren unklar konturiert, verwaschen und z.T. unspezifisch. Nach Messungen im negativen Ionen-Modus unter Verwendung von pNA (Para-nitroanilin) als Matrix gelangen generell Nachweise für COX2, NF-IL6 (Abbildung 101) und vWF. Trotz der laserbedingten Gewebeschäden waren auch in MALDI-erfassten Bereichen noch schwache Immunfluoreszenzsignale detektierbar. In nicht vom Laser erfassten Bereichen wie dem Cortex gelang allerdings der Nachweis generell zuverlässiger.

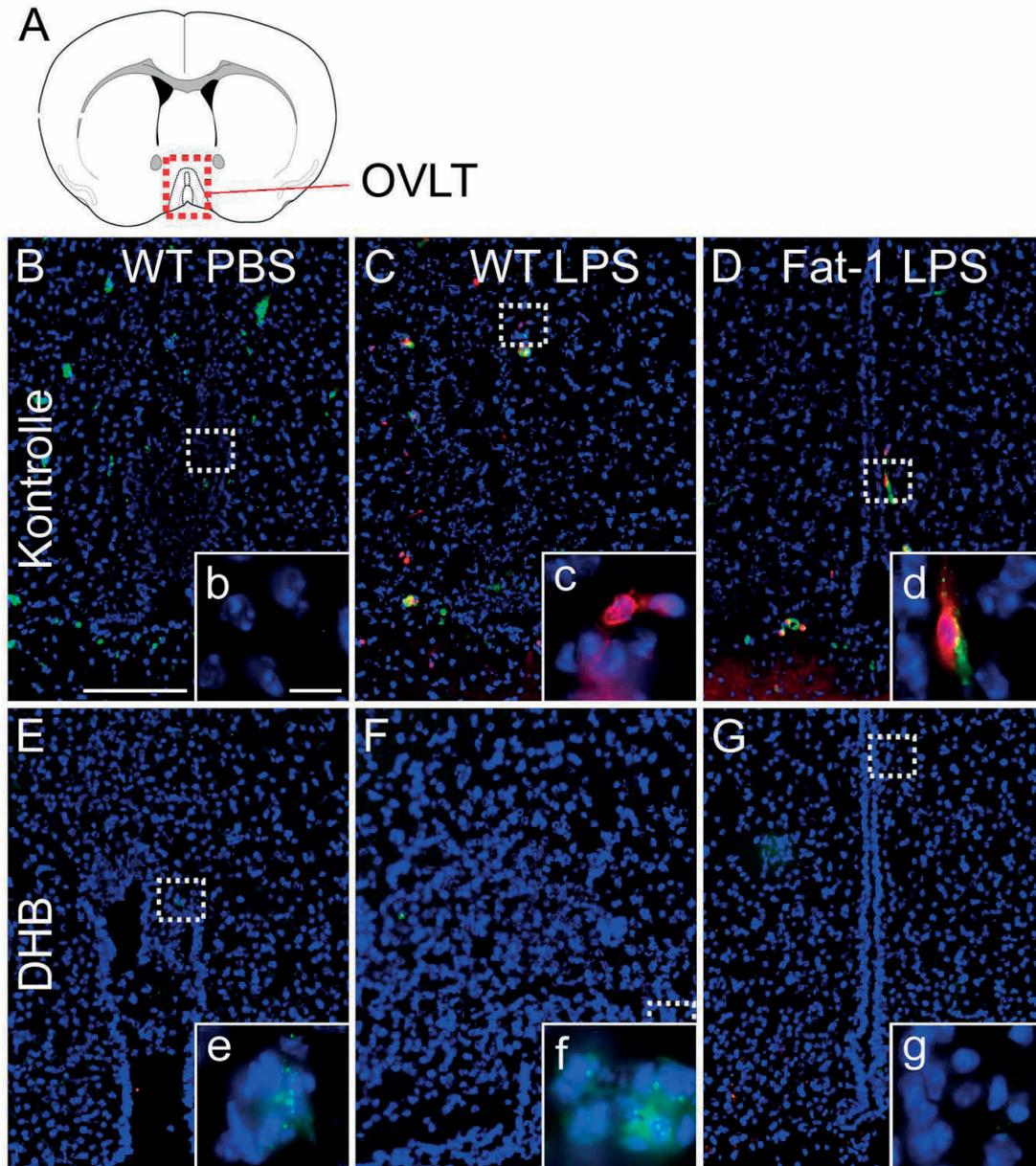


Abbildung 99

Immunfluoreszenznachweis von Cyclooxygenase 2 (COX2, rot) und von Willebrandt Faktor (vWF, grün) in Gewebeschnitten im Bereich des *Organum vasculosum laminae terminalis* (OVLT) und zum Teil etwas caudal davon. Zellkerne sind blau dargestellt (DAPI). A zeigt eine schematische Übersicht der anatomischen Strukturen. Der Fluoreszenznachweis wurde in E – G nach erfolgter MALDI-Messung durchgeführt. Die Schnitte B – D dienten als Kontrollen und wurden ohne vorhergehende MALDI-Messung und Matrixkontakt angefärbt. Ausschnitte in E – G wurden nach Messung im positiven Ionen-Modus und Behandlung mit 2,5-Dihydroxybenzoesäure (DHB) als Matrix angefärbt. Die Schnitte wurden dabei vollständig vom Laser durchmustert. *Phosphat-buffered-saline* (PBS) -behandelte WT Tiere (B und E) zeigten erwartungsgemäß keinerlei COX2-Immunreaktivität, wohingegen perinukleäre COX2-Signale bei nicht matrixbehandelten Schnitten sowohl bei mit 2,5 mg/kg KGW LPS-stimulierten WT Tieren (C) als auch bei LPS-behandelten Fat-1 Tieren (D) nachweisbar waren. Der Nachweis von COX2 war bei MALDI-gemessenen Schnitten nicht mehr möglich (E – G), vWF-Signale waren nur noch sehr verwaschen und unspezifisch detektierbar.

Größenmarker in B = 100 μm , repräsentativ für B – G; Größenmarker in b = 10 μm , repräsentativ für b – g; b – g = Detailaufnahme aus B – G.

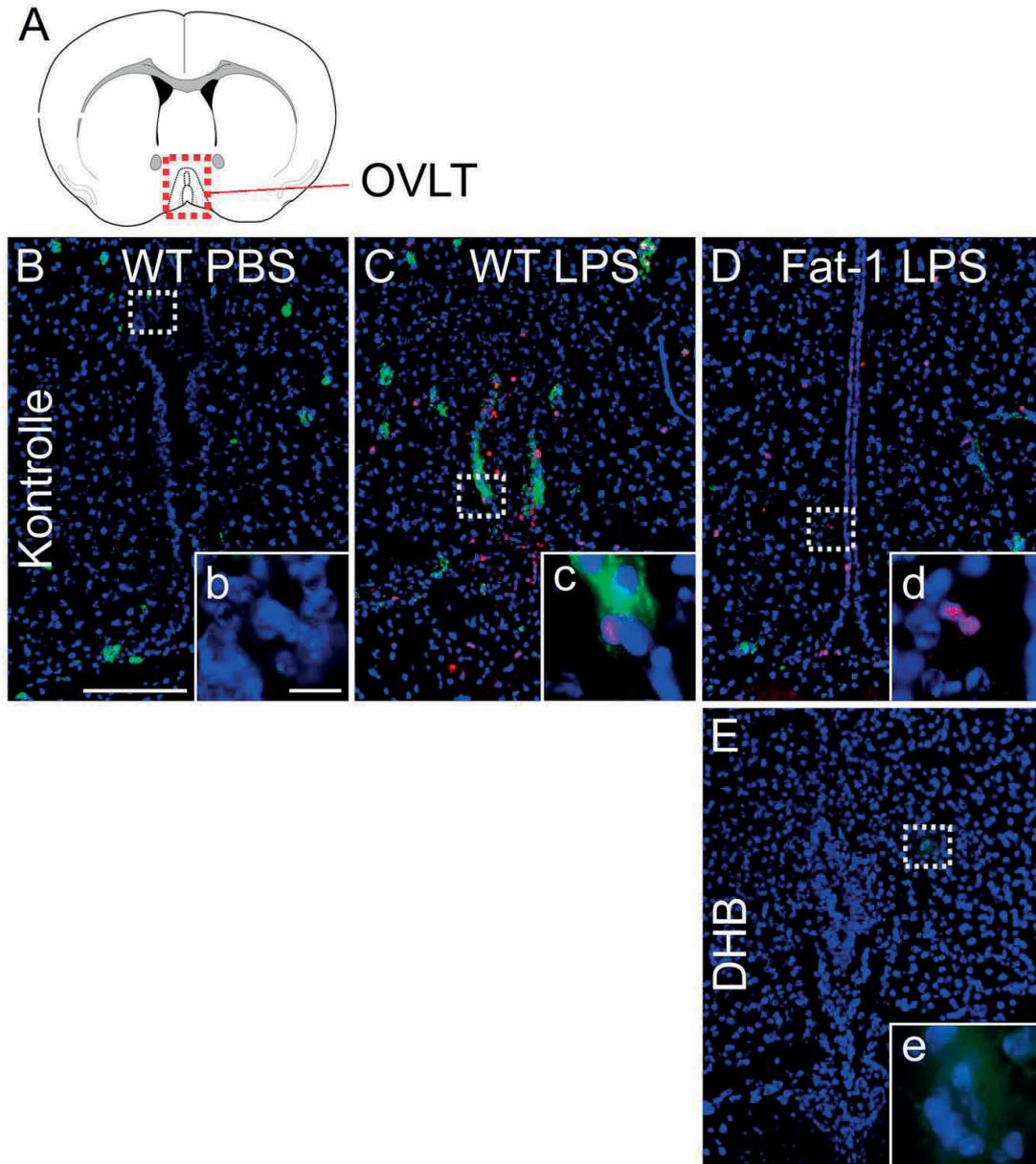


Abbildung 100

Immunfluoreszenznachweis von *nuclear factor interleukin 6* (NF-IL6, rot) und von Willebrandt Faktor (vWF, grün) in Gewebeschnitten im Bereich des *Organum vasculosum laminae terminalis* (OVLT) und zum Teil etwas caudal davon. Zellkerne sind blau dargestellt (DAPI). A zeigt eine schematische Übersicht der anatomischen Strukturen. Der Fluoreszenznachweis wurde in E nach erfolgter MALDI-Messung durchgeführt. Die Bilder B – D dienen als Kontrollen und wurden ohne vorhergehende MALDI-Messung und Matrixkontakt angefärbt. Der in E abgebildete Gewebeschnitt wurde nach Messung im positiven Ionen-Modus und Behandlung mit 2,5-Dihydroxybenzoesäure (DHB) als Matrix angefärbt. Der Schnitt wurde dabei vollständig vom Laser durchmustert. *Phosphat-buffered-saline* (PBS) -behandelte WT Tiere (B) zeigten erwartungsgemäß keinerlei NF-IL6-Immunreaktivität, wohingegen nukleäre NF-IL6-Signale bei nicht matrixbehandelten Schnitten sowohl bei mit 2,5 mg/kg KGW LPS-behandelten WT Tieren (C) als auch bei LPS-stimulierten Fat-1 Tieren (D) nachweisbar waren. Der Nachweis von NF-IL6 war bei MALDI-gemessenen Schnitten nicht mehr möglich (E); vWF-Signale waren nur noch sehr verwaschen und unspezifisch detektierbar.

Größenmarker in B = 100 μm , repräsentativ für B – E; Größenmarker in b = 10 μm , repräsentativ für b – e; b – g = Detailaufnahme aus B – E.

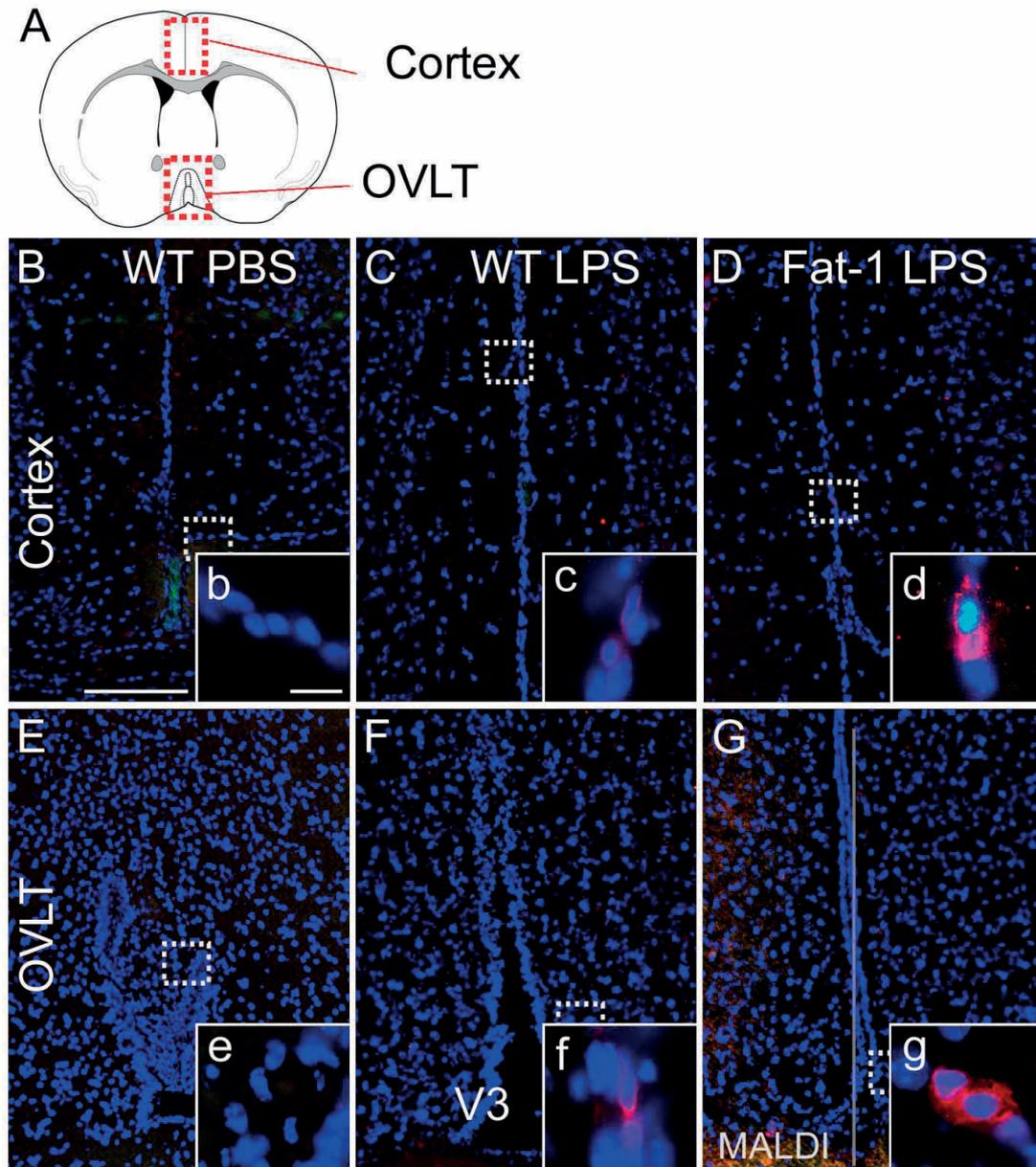


Abbildung 101

Immunfluoreszenznachweis von *nuclear factor interleukin 6* (NF-IL6, grün) und Cyclooxygenase 2 (COX2, rot) in Gewebeschnitten im Bereich des Cortex (B – D) und in der Region des *Organum vasculosum laminae terminalis* (OVLT) sowie leicht caudal des OVLTs (Bereich des dritten Ventrikels (V3))(E – G). Zellkerne sind blau dargestellt (DAPI). A zeigt eine schematische Übersicht der anatomischen Strukturen. Der Fluoreszenznachweis erfolgte nach durchgeführter MALDI-Messung im negativen Ionen-Modus und Behandlung mit Paranitroanilin (pNA) als Matrix. Die Bilder B – D zeigen einen Bereich aus dem Cortex und wurden selbst nicht mit dem Laser durchmustert. Ausschnitte E – G zeigen Bereiche des OVLTs, die Bildausschnitte E und F wurden dabei vollständig mit dem Laser durchmustert; der Bildausschnitt G lediglich im Bereich links von der grauen Markierungslinie. *Phosphat-buffered-saline* (PBS) -behandelte WT Tiere (B und E) zeigten erwartungsgemäß weder COX2- noch NF-IL6-Immunreaktivität, wohingegen nukleäre NF-IL6-Signale und perinukleäre COX2-Signale in Schnitten beider LPS-behandelter Gruppen (WT und Fat-1, je 2,5 mg/kg KGW LPS (C, D, F und G)) nachweisbar waren. Die Signalintensität war in nicht mit dem Laser durchmusterten Regionen deutlich besser (C, D und G), jedoch konnte generell in allen Bereichen ein COX2-Nachweis und in vielen Bereichen auch ein NF-IL6-Nachweis erfolgen.

Größenmarker in B = 100 μm , repräsentativ für B – G; Größenmarker in b = 10 μm , repräsentativ für b – g; b – g = Detailaufnahme aus B – E.

6.2 Darstellung neutrophiler Granulozyten im Anschluss an MALDI-Messung und Immunfluoreszenzmarkierung inflammatorischer Marker

Der Immunfluoreszenz nachfolgend wurde eine immunhistochemische Untersuchung auf in das Gehirn migrierte neutrophile Granulozyten durchgeführt. Dabei gelang ein Nachweis in zuvor mit pNA besprühten und im negativen Ionen-Modus gemessenen Schnitten, jedoch misslang eine Anfärbung in zuvor mit DHB besprühten und im positiven Ionen-Modus gemessenen Schnitten. In DHB besprühten Schnitten waren lediglich Zellkerne durch eine Kresylviolett-Gegenfärbung darstellbar (Abbildung 102).

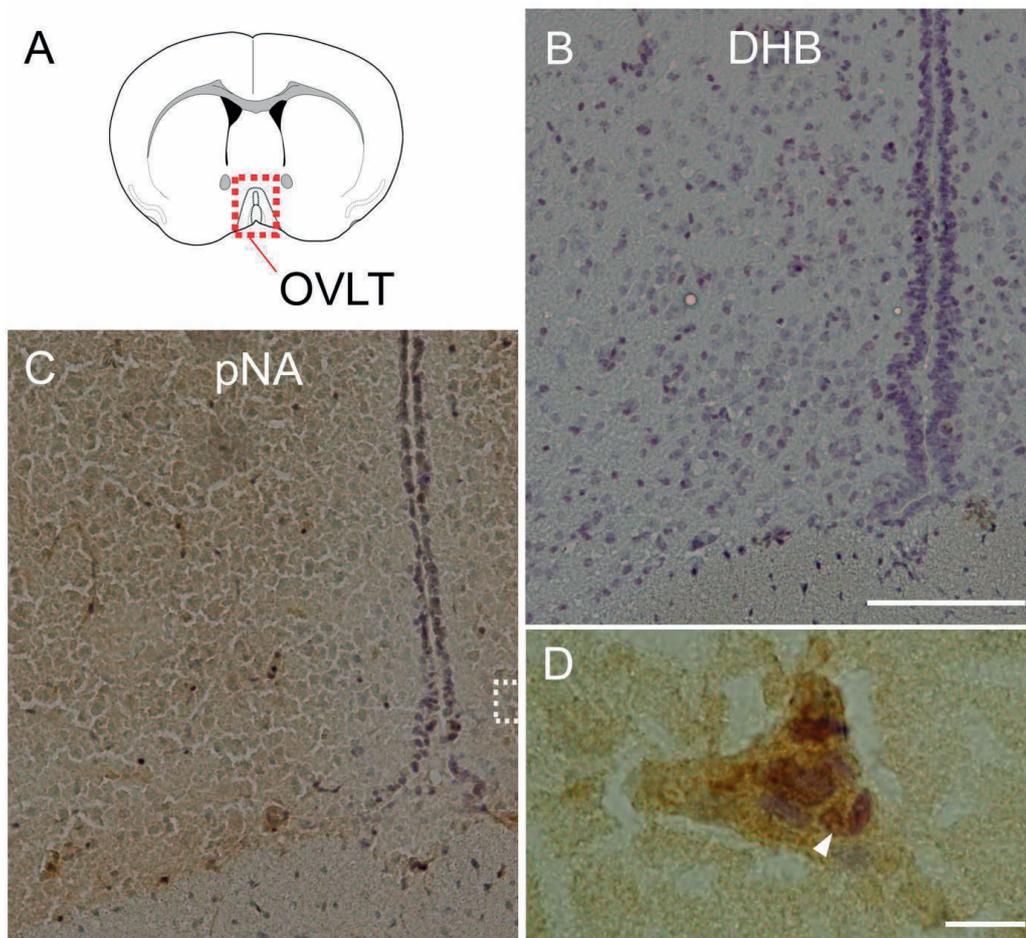


Abbildung 102

7/4 Immunhistochemie zur Detektion von neutrophilen Granulozyten (weiße Pfeilspitze) im Bereich des dritten Ventrikels, caudal des *Organum vasculosum laminae terminalis* (OVLT) 24 Stunden nach Stimulation mit 2,5 mg/kg KGW LPS. Zellkerne sind violett gefärbt. A zeigt eine schematische Übersicht der anatomischen Strukturen. Braunes Präzipitat zeigt das Vorliegen von 7/4-Antigen an. Sowohl B als auch C wurden zuvor mittels MALDI-Messung und Immunfluoreszenz untersucht. Der Gewebeschnitt aus Abbildung B wurde im positiven Ionen-Modus mit 2,5-Dihydroxybenzoesäure (DHB) als Matrix, der aus Abbildung C im negativen Ionen-Modus mit Para-nitroanilin (pNA) als Matrix behandelt. D ist eine Detailaufnahme des in C abgebildeten Schnittes. Der Antigennachweis gelang in pNA-besprühten Gewebeschnitten; nicht jedoch in DHB-besprühten.

Größenmarker in B = 100 μm , gilt auch für C; in D = 10 μm

6.3 Verwendung anderer Matrices (3NBA, CLCCA)

Neben den letztlich verwendeten Matrices DHB und pNA wurden zwei weitere Matrices auf ihre Tauglichkeit zur Detektion von Lipiden in Gehirnschnitten getestet. 3-Nitrobenzylalkohol (3NBA) ist eine Flüssigkeit und zeigte nach dem Aufsprühen auf das Gewebe ein unerwünschtes konfluierendes Verhalten (Abbildung 103 F). 4-Chloro- α -Cyanozimtsäure (CLCCA) bildete auf dem Schnitt relativ große, unregelmäßig verteilte Kristalle (Abbildung 103 E), was ebenfalls unerwünscht war. Nach der Verwendung beider Matrices war ein sicherer Immunfluoreszenznachweis von COX2 und vWF nicht mehr möglich, Hintergrundfluoreszenz und unspezifische Ablagerungen von Antikörpern dominierten das Bild (Abbildung 103 B und C).

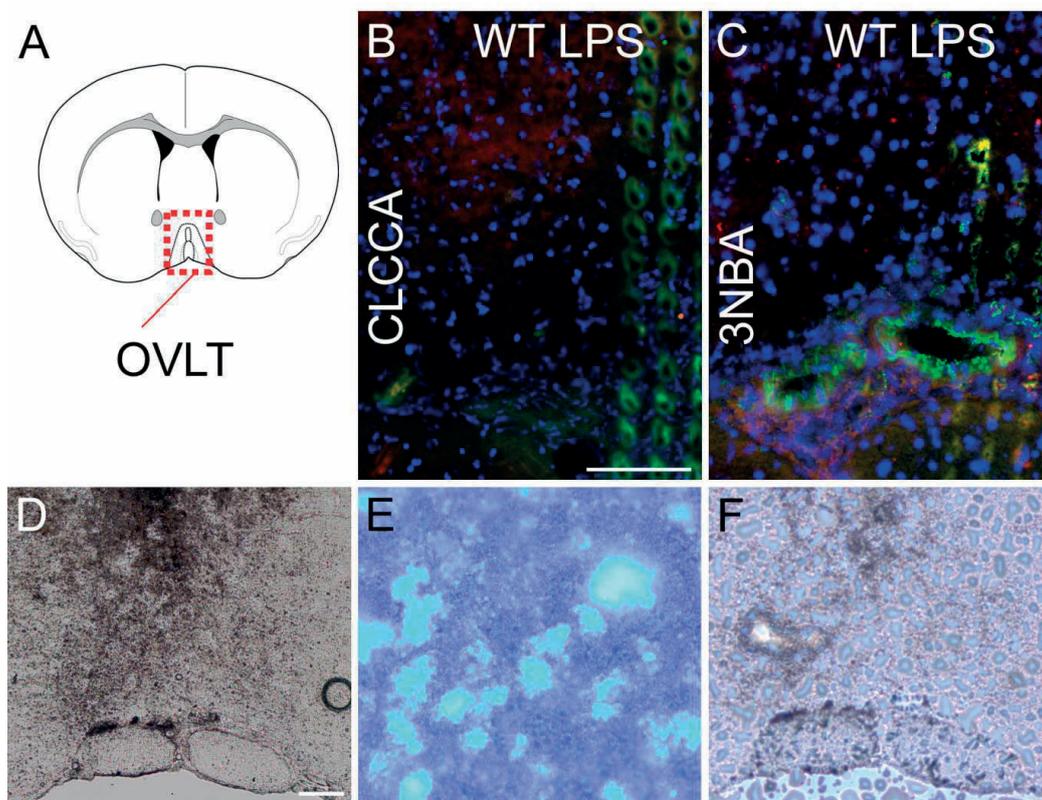


Abbildung 103

Verwendung von 3-Nitrobenzylalkohol (3NBA) und 4-Chloro- α -Cyanozimtsäure (CLCCA) als Matrixsubstanzen auf Gewebeschnitten der Region rostral des *Organum vasculosum laminae terminalis* (OVLT). A zeigt eine schematische Übersicht der anatomischen Strukturen. B und C zeigen eine Immunfluoreszenz zum Nachweis von Cyclooxygenase 2 (COX2, rot) und von Willebrandt Faktor (vWF, grün) im Gewebeschnitt einer mit 2,5 mg/kg KGW LPS behandelten WT-Maus (24 Stunden nach Injektion). Zellkerne wurden blau (DAPI) markiert. Der gezeigte Gewebeschnitt in B wurde zuvor mit CLCCA, der in C mit 3NBA besprüht und mittels MALDI gemessen. Es waren keinerlei spezifischen COX2-Signale nachweisbar. vWF-Signale waren lediglich in C im Bereich großer Gefäße erkennbar. In beiden Ausschnitten sind deutlich die Einschusslöcher des Lasers erkennbar, in denen sich unspezifisch Antikörper angereichert haben. D zeigt eine lichtmikroskopische Aufnahme eines unbehandelten Gewebeschnitts. E zeigt eine lichtmikroskopische Aufnahme von auf einen Schnitt aufgebrachtem CLCCA; F von 3NBA mit ungleichmäßiger Verteilung.

Größenmarker in B = 100 μ m, repräsentativ für B und C; Größenmarker in D = 200 μ m, repräsentativ für D - F.

IV. Diskussion

1. Das anti-inflammatorische Potential des K⁺-Kanal Agonisten CyPPA

Mit LPS behandelte Mäuse zeigten erwartungsgemäß eine Adipsie, Anorexie sowie Fieber gefolgt von einer Hypothermie. Diese Veränderungen gingen 24 Stunden nach Stimulation mit erhöhten mRNA-Konzentrationen diverser inflammatorischer Marker einher. Ein statistisch signifikanter Einfluss des K⁺-Kanal Agonisten auf die LPS-induzierten inflammatorischen Marker und Krankheitssymptome wie Fieber, Lethargie, Anorexie, Adipsie und Gewichtsverlust konnte jedoch unter den gewählten Bedingungen nicht beobachtet werden. Vielmehr war ein Eigeneffekt von CyPPA auf physiologische Parameter erkennbar. Die Tiere der mit CyPPA behandelten Gruppen zeigten in den ersten zwei bis acht Stunden nach Behandlung eine erhöhte motorische Aktivität sowie bis etwa vier Stunden nach der Applikation eine erhöhte Körpertemperatur. Diese Eigenwirkungen von CyPPA waren vollkommen unerwartet und machten die Ableitung weiterer Ziele und Fragestellungen erforderlich:

- Welche zentralen oder peripheren, zellulären Mechanismen liegen den gemachten Beobachtungen zugrunde? Und welche Signalwege spielen eine Rolle um beobachtete Effekte zu vermitteln?
- In welchen Hirnregionen (Cortex oder Hypothalamus) manifestieren sich Veränderungen?

Um diesen Fragen nachzugehen wurden zusätzlich zum initialen Versuchsplan zwei weitere Versuchsgruppen in die Studie aufgenommen; Tiere wurden wie gehabt zweimalig im Abstand von 24 Stunden mit CyPPA oder dessen Solvent behandelt. Die zweite Behandlung fand zusammen mit der Applikation von PBS statt. Zwei Stunden nach der letzten Injektion wurden die Tiere perfundiert und Proben entnommen.

1.1 Auswirkungen von CyPPA auf Mediatoren des humoralen Signalweges

1.1.1 CyPPA kann die SOCS3-Expression im Hypothalamus reduzieren

Die Wirkung der Aktivierung von SK2 und SK3 auf den JAK-STAT-Signalweg war bisher noch nicht untersucht worden. In der vorliegenden Studie konnte erstmals ein Einfluss von CyPPA auf die Expression des STAT3-Aktivitätsmarkers SOCS3 nachgewiesen werden. Als endogener Regulator inhibiert SOCS3 JAK [452] und reguliert damit die Wirkung von STAT3. Ein Einfluss von CyPPA auf die LPS-bedingte Expressionszunahme von SOCS3 im Hypothalamus konnte allerdings nicht dokumentiert werden. Lediglich in Tieren ohne LPS-Behandlung reduzierte CyPPA die SOCS3-mRNA-Expression im Hypothalamus zwei Stunden nach Applikation. Im Cortex hingegen war keine Einfluss nachweisbar. Die STAT3-Expression unterschied sich in beiden Gruppen nicht voneinander.

CyPPA scheint also die SOCS3-Expression nicht über eine Hemmung der STAT3-Aktivierung zu beeinflussen. Neben STAT3 [213] kann aber auch NF-IL6 die SOCS3 regulieren. So konnte für verschiedene Zellen eine Bindung von NF-IL6 an den SOCS3-Promoter gezeigt werden [571]. Im hier vorliegenden Fall lag zwei Stunden nach Behandlung mit CyPPA eine erhöhte NF-IL6-Expression bei gleichzeitig reduzierter SOCS3-Expression im Hypothalamus vor, was prinzipiell gegen solch eine Regulation spricht. Dies könnte jedoch auch mit einer Modulation der Aktivität des Transkriptionsfaktors NF-IL6 zusammen hängen. Im Rahmen der endogenen Calciumhomöostase könnte CyPPA solche Prozesse beeinflussen bzw. hemmen. Die Stimulation von cAMP (zyklisches AMP) oder Ca^{2+} als *second messenger* Signale in hippocampalen Neuronen erhöht beispielsweise die mRNA-Expression und DNA-Bindungs-fähigkeit von NF-IL6 [573]. Im Umkehrschluss könnte also ein durch CyPPA begrenztes intrazelluläres Ca^{2+} -Angebot die DNA-Bindungs-fähigkeit von NF-IL6 am SOCS3-Promotor reduziert haben und damit zur reduzierten Expression von SOCS3 beigetragen haben. Solche Zusammenhänge könnten allerdings zukünftig nur in Versuchen mit *in vitro* Modellen bestätigt werden.

Insgesamt konnte hier erstmals aufgezeigt werden, dass CyPPA die STAT3 / SOCS3-Signalkaskade moduliert. Tatsächlich ist für STAT3 / SOCS3 eine wichtige Funktion bei Neuroinflammation bekannt [403]. Die hier beobachtete Modulation könnte an der beschriebenen neuroprotektiven Wirkung von CyPPA [140, 142] beteiligt sein. Für dessen zukünftigen therapeutischen Einsatz sind aber wie gesagt weiterführende Studien notwendig.

1.1.2 CyPPA erhöhte die hypothalamische und corticale I κ B α -mRNA-Expression und reduzierte die corticale p65-Proteinkonzentration

Im Rahmen der hier vorliegenden Studie erhobene Daten zeigen auch eine deutliche Wirkung von CyPPA auf den NF κ B-Signalweg. Zum Zeitpunkt 24 Stunden nach Behandlung war kein modulierender Einfluss von CyPPA auf die LPS-bedingte genomische Aktivierung von I κ B α im Hypothalamus nachweisbar. Im Gegensatz dazu waren zwei Stunden nach Applikation von CyPPA ohne vorherige LPS-Stimulation sowohl die corticale als auch die hypothalamische mRNA-Expression von I κ B α erhöht. Im Cortex wurde auf Proteinebene eine reduzierte Aktivierung von NF κ B in Form einer reduzierten Expression von p65 festgestellt, die mit einer verstärkten Wirkung von I κ B α zusammenhängen könnte. Entgegen der eigenen Beobachtungen konnte in einer anderen Studie durch die Blockade von SK3 mittels Apamin *in vitro* kein Einfluss auf die NF κ B-Aktivierung festgestellt werden. Hier war I κ B α in mikroglialen Zellkulturen nach LPS-Stimulation nicht signifikant, sondern lediglich tendenziell reduziert [459]. Daraus lässt sich schließen, dass im hier untersuchten Modell vor allem der SK2, nicht aber der SK3 und / oder andere Zelltypen als Mikroglia eine Rolle zu spielen scheinen.

Umgekehrt ist bekannt, dass die Promotorregion des SK2-Gens zwei responsive Elemente für NF κ B besitzt. NF κ B kann also die Expression von SK2 regulieren [269]. Dabei ist nicht abschließend geklärt, ob die NF κ B-Aktivität auch die SK2-Transkription in Mikroglia

beeinflusst [139]. Für Neurone konnte dies allerdings bereits gezeigt werden [140]. TNF- α induziert (abhängig von seinem Rezeptor TNF-R Typ II) über NF κ B die SK2-Expression in corticalen Neuronen, nicht jedoch die SK3-Expression. Die Inhibition von NF κ B führt zu einer Unterdrückung dieses Effekts [140].

In der vorliegenden Studie wurde ein Einfluss von CyPPA bei nicht-entzündlichen Bedingungen auf den NF κ B-Signalweg im *in vivo* Modell auf Protein- und mRNA-Ebene erstmalig nachgewiesen. Als potenter Modulator des NF κ B-Signalweges ist der therapeutische Nutzen von CyPPA zur Behandlung von neuroentzündlichen Zuständen von großem Interesse.

1.1.3 Periphere Zytokinkonzentrationen und geschwindigkeitsbestimmende Enzyme der Prostaglandinsynthese wurden *in vivo* durch CyPPA nicht beeinflusst

Inflammation kann mit erhöhten TNF- α -Konzentrationen im ZNS, der Zerebrospinalflüssigkeit und dem Plasma einhergehen. Dabei gibt es Untersuchungen die zeigen, dass TNF- α wie bereits erwähnt die Expression von SK2-Kanälen in corticalen Neuronen erhöht [140, 344]. Es wird angenommen, dass eine solch vermehrte Expression neuroprotektiv wirkt [192, 274] ebenso wie TNF- α selbst, in Abhängigkeit angesprochener Rezeptoren, neuroprotektiv wirken kann (Vergleiche auch mit dem Abschnitt TNF- α in I.1.2.1.1). So konnte *in vitro* ein durch TNF- α vermittelter schützender Effekt gegen den Glutamat-induzierten Zelltod nachgewiesen werden, welcher durch die pharmakologische Blockade des SK2-Kanals mit Apamin aufgehoben werden konnte [140]. Eine SK-Kanal-Aktivierung könnte demnach ebenfalls protektive Wirkungen zusammen mit TNF- α induzieren. Ein Einfluss der Applikation des SK-Kanal Agonisten CyPPA auf die Expression von TNF- α und die Ausprägung der *sickness response* und Inflammation konnte hier allerdings 24 Stunden nach LPS-Gabe nicht nachgewiesen werden. CyPPA hat hingegen *in vitro* die Freisetzung von TNF- α aus Mikrogliazellen reduziert. Dies erfolgte auch in Anwesenheit von SK-Kanal inhibierenden Peptiden. Die Reduktion der TNF- α Freisetzung muss also Ca²⁺-unabhängig stattgefunden haben [141]. Die zugrunde liegenden Mechanismen waren kein Fokus der hier vorliegenden Arbeit. Hier wurden aber auch weder unter entzündlichen noch unter nicht-entzündlichen Bedingungen ein signifikanter Effekt auf die TNF- α -Expression nachgewiesen, was gegen eine entscheidende Rolle von TNF- α in der CyPPA-Wirkung *in vivo* spricht. Für ein weitergehendes Verständnis der Zusammenhänge müssten weitere *in vitro* wie *in vivo* Untersuchungen folgen.

LPS-induzierte oder basale Expression der Enzyme COX2 und mPGES wurden ebenfalls nicht durch Behandlung mit CyPPA beeinflusst. Frühere Studien haben bisher lediglich zeigen können, dass umgekehrt die Aktivität von SK durch PGE₂ beeinflusst wird [186]. Eigene Daten liefern keine Hinweise auf eine gegenseitige Beeinflussung.

Im Zusammenhang mit Fieber und der *sickness response* gilt IL-6 als eines der wichtigsten zirkulierenden Zytokine [81]. Seine Plasmakonzentration korreliert dabei direkt mit der

Fieberantwort [291]. In mikroglialer Zellkultur konnte CyPPA erfolgreich den LPS-bedingten Anstieg von IL-6 reduzieren [141]. Dieses Phänomen ließ sich *in vivo* nicht reproduzieren. Weder unter nicht-inflammatorischen Bedingungen noch nach simultaner Gabe von LPS und CyPPA waren die hypothalamische Expression oder die Plasmakonzentration von IL-6 zur jeweiligen Kontrolle reduziert. Im Gegenteil waren 24 Stunden nach der Behandlung mit CyPPA und LPS die IL-6-Plasmakonzentrationen der Tiere tendenziell sogar erhöht; dies erreichte aber keine statistische Signifikanz. Die fehlende systemische Wirkung könnte daher rühren, dass peripher zirkulierendes IL-6 natürlich nicht primär von mikroglialen Zellen synthetisiert und freigesetzt wird. Es ist denkbar, dass hierfür verantwortliche Zellen, wie periphere Immunzellen und Endothelzellen, durch CyPPA nicht oder zumindest nicht auf dieselbe Art und Weise wie Mikroglia beeinflusst werden. Ebenso ergibt sich die Expression im Hypothalamus aus der Summe verschiedener Zelltypen mit eventuell abweichender Ansprechbarkeit auf CyPPA.

1.2 CyPPA hat keinen Einfluss auf die Expression mikroglialer Marker (CD68 und CD11b)

Die Expression aller SKs (SK1-3) durch mikrogliale Zellen ist belegt worden [139, 210, 238, 459]. Die wichtigste Rolle für die Aktivierung von Mikroglia kommt, wie bereits erwähnt, SK3 zu [139]. Dessen pharmakologische Inhibition reduzierte neurotoxische Effekte aktivierter mikroglialer Zellen in primären Zellkulturen der Ratte [139, 459]. Ebenfalls reichlich in Mikroglia exprimiert wird der KCa3.1 / IK1 [238], dessen Aktivität wird von CyPPA jedoch nicht moduliert [222].

CyPPA hat nicht nur einen inhibitorischen Einfluss auf die Sekretion von Zytokinen durch Neurone und Mikroglia, sondern beeinflusst auch die durch LPS-induzierten morphologischen Veränderungen von Mikroglia. Die simultane Applikation von LPS und CyPPA begünstigt konzentrationsabhängig die Reduktion der durch LPS-induzierten Erhöhung der elektrischen Impedanz von murinen Mikrogliazellen [141]. Die Impedanz ist dabei ein Maß für die Größe der durch die Zelle bedeckten Fläche. Eine Vergrößerung tritt beim Übergang vom ruhenden zum aktivierten Zustand (M1/M2) ein. CyPPA reduziert den Anstieg der Impedanz, also die Aktivierung von Mikroglia nach etwa acht Stunden für eine Dauer von mindestens 48 Stunden [141]. Aufgrund dieser Beobachtungen wurde für die Übertragung ins *in vivo* Experiment 24 Stunden als Endzeitpunkt gewählt. Zu diesem Zeitpunkt hatte eine robuste Aktivierung von Mikroglia in den Fimbria des Hippocampus stattgefunden. Dies zeigte sich in der CD11b-Immunfluoreszenz deutlich in Form reduzierter, jedoch stärker verzweigter Zellfortsätze. Insgesamt erschienen Signale flächiger und größer als bei LPS-freien Kontrollen. Es konnte jedoch weder qualitativ noch quantitativ eine Wirkung von CyPPA auf die LPS-induzierte mikrogliale Aktivierung detektiert werden. Dabei besteht natürlich auch die Möglichkeit, dass hier verwendete Methoden nicht sensitiv genug waren um Unterschiede auszumachen. Die qualitative Auswertung fand visuell statt und wurde durch eine semiquantitative Einschätzung anhand eines fünf Punkte Schemas

ergänzt. Die quantitative Erfassung erfolgte in Anlehnung an publizierte Vorgehensweisen [279, 388]. Zur Absicherung eigener Ergebnisse wäre eine sogenannte quantifizierbare, morphometrische, stereologische Analyse unter Verwendung von konfokaler Mikroskopie, wie sie von einer anderen Arbeitsgruppe beschrieben wurde, denkbar [394]. Ob mit dieser aufwendigen Analyse statistisch signifikante Veränderungen nachweisbar wären bleibt jedoch fraglich und wurde daher im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit nicht zusätzlich durchgeführt.

24 Stunden nach Stimulation mit CyPPA und LPS konnten außerdem keine Unterschiede in der CD68-Expression im Hypothalamus zwischen den verschiedenen Gruppen festgestellt werden. Zusätzlich waren zum Zeitpunkt zwei Stunden nach Behandlung mit CyPPA weder im Hypothalamus noch im Cortex Eigeneffekte von CyPPA auf die CD68-Expression nachweisbar. Eine *in vivo* Wirkung von CyPPA auf die LPS-induzierte mikrogliale Aktivierung, vergleichbar mit den *in vitro* gemachten Beobachtungen anderer Studien, konnte hier nicht gezeigt werden. Unterschiede zwischen beiden Behandlungsgruppen in weiteren als den untersuchten Parametern der Mikrogliaaktivierung können natürlich nicht ausgeschlossen werden. Ebenso ist ein Einfluss von CyPPA auf Mikroglia zu einem anderen Zeitpunkt als dem untersuchten, auch unabhängig von Parametern der *sickness response*, denkbar. Für eine Darstellung solcher eventuellen Unterschiede wäre die Anwendung weiterer Methoden notwendig und bleibt experimentell zu prüfen. Außerdem könnte auch eine nicht ausreichende Verteilung von CyPPA in das Gehirn zu den beobachteten Unterschieden beigetragen haben. Eine gute Penetration von CyPPA in das Gehirn wurde allerdings durch die Herstellerfirma bestätigt. Insgesamt scheint sich demnach die Wirkung von CyPPA *in vitro* von der Situation *in vivo* deutlich zu unterscheiden.

1.3 Durch CyPPA bedingte Veränderungen unter nicht-inflammatorischen Bedingungen (ohne LPS-Stimulation)

1.3.1 CyPPA erhöht die Körpertemperatur und die motorische Aktivität

Die Gabe von CyPPA ohne zusätzlichen inflammatorischen Stimulus zeigte einen deutlichen Eigeneffekt gegenüber der Kontrollgruppe. Die Körpertemperatur der mit CyPPA behandelten Tiere stieg nach etwa einer Stunde an und erreichte mit dem Ende der zweiten Stunde ein signifikantes Niveau (Abbildung 32 A). Der über zwei Stunden gebildete Fieberindex unterschied sich zwischen CyPPA und Solvent nicht signifikant (Abbildung 32 B); dies war jedoch über einen Zeitraum von vier Stunden der Fall (Abbildung 24 B). Ein zweistündiges Aufzeichnungsfenster war allerdings zu kurz um diesen Effekt signifikant abzubilden. Ebenso erreichte der CyPPA-bedingte Anstieg der Aktivität in der Kohorte an Tieren, die nach zwei Stunden perfundiert wurden kein signifikantes Niveau (Abbildung 32 C und D). In Tieren, bei denen die Aktivität über 24 Stunden aufgezeichnet wurde, erreichte die motorische Aktivität jedoch einen statistisch signifikanten Anstieg sowohl nach zwei, vier als auch acht Stunden (Abbildung 26 A, B und C). Die Unterschiede zwischen den

Versuchsteilen sind wahrscheinlich vor allem durch die geringere Tierzahl in der zwei Stunden Kohorte bedingt.

CyPPA und andere positive SK-Kanal Modulatoren sind dafür bekannt, motorische Fähigkeiten im Mausmodell zu verbessern. So zeigten SK Agonisten wie 1-EBIO, SKA-31 und NS13001 positive Wirkungen in Modellen der episodischen Ataxie und der spinocerebralen Ataxie [11, 177, 237, 479, 543]. Dabei beugte die SK-Aktivierung unter anderem der Degeneration von Purkinjezellen vor [237]. Ferner wurde gezeigt, dass nach Verabreichung von 15 mg/kg CyPPA Mäuse im *open-field* eine signifikant reduzierte Wegstrecke zurücklegten [540] sowie konzentrationsabhängig (3–30 mg/kg) die Methylphenidat-induzierte Hyperaktivität und stereotypes Verhalten bei Mäusen reduziert wird [217]. Gleichzeitig gibt es auch das Bestreben, mit der Verabreichung von SK Agonisten Symptome der Parkinsonschen Krankheit zu therapieren [274]. In diesem Zusammenhang konnte gezeigt werden, dass CyPPA die Aktivität von dopaminergen Neuronen reduziert und dabei auch konzentrationsabhängig die Freisetzung von Dopamin herab reguliert [217]. Potentiell könnte der telemetrisch erfasste Anstieg der motorischen Aktivität der Tiere also Folge von reduzierten Dopaminkonzentrationen im ZNS und daraus resultierendem Tremor, wie man es von Parkinsonpatienten kennt, sein. Tatsächlich wurde in früheren Studien ein Krampfen bei Überdosierung von SK-Kanal Inhibitoren beschrieben [274]. Anzeichen für Krämpfe oder Tremor wurden in der eigenen Studie nach der Behandlung der Tiere allerdings nicht beobachtet. Eine Überdosierung des SK Agonisten CyPPA und eine daraus resultierende paradoxe Reaktion ist damit auszuschließen.

Spezifische Interaktionen von CyPPA mit seinem Lösungsmittel, die zu höheren effektiv im Tier ankommenden Dosierungen führen könnten, sind in der vorliegenden Studie theoretisch denkbar. Von einer durch das ölige Cremophor verbesserten Aufnahme von beispielsweise LPS wurde bei Forschungsarbeiten aus dem Institut für Veterinär-Physiologie und – Biochemie bereits berichtet [253]. Cremophor als Lösungsmittel von CyPPA fand jedoch auch in anderen Studien Verwendung [217, 540]. Im Unterschied zur eigenen Anwendung wurde in diesen Studien jedoch auf den Zusatz von Ethanol verzichtet. Ein Eigeneffekt des Lösungsmittels aus Ethanol und Cremophor kann insgesamt aber als äußerst unwahrscheinlich eingeordnet werden, da auch Kontrolltiere dieses erhielten und bei diesen keine Eigenwirkungen beobachtet wurden.

Zur Abklärung der Ursache für die erhöhte Aktivität und Körpertemperatur wurden weiterführende Untersuchungen angeschlossen. Sowohl IL-6-Plasmakonzentrationen als auch die hypothalamische IL-6-mRNA-Expression (sowohl zum zwei als auch zum 24 Stunden Zeitpunkt) waren nicht signifikant durch CyPPA erhöht. Entsprechend war auch keine STAT3-Aktivierung nachweisbar, die vor allem durch zirkulierendes IL-6 vermittelt wird. IL-6 ist einer der wichtigsten endogenen humoralen Mediatoren zur Fieberentstehung [441, 442]. Diese Ergebnisse sprachen also gegen ein klassisches Fieber, das typischerweise mit einer Vasokonstriktion von Schwanzgefäßen, einer Aktivierung des braunen Fettgewebes sowie

Kältezittern als Mechanismen der Thermogenese einhergeht [429]. Zudem war die Expression von SOCS3-mRNA zwei Stunden nach CyPPA-Behandlung gegenüber der Kontrolle sogar noch reduziert. Es handelt sich hier also eher um eine nicht Pyrogen-induzierte Hyperthermie als um ein Fieber. Die erhöhte motorische Aktivität könnte theoretisch zu einer Hyperthermie geführt haben. Interessanterweise stieg aber die Körperkerntemperatur schon bereits vor Erhöhung der Aktivität signifikant an. Folglich muss es weitere Mechanismen geben, die die Erhöhung der Körpertemperatur erklären.

1.3.2 CyPPA hat einen Einfluss auf hepatische Energielevel

Als Erklärung für das Vorliegen eines hyperthermen Zustandes ist ein erhöhter metabolischer Umsatz denkbar. Dies könnte ebenfalls die vermehrte Aktivität erklären, welche sekundär zum weiteren Temperaturanstieg beigetragen haben könnte. Durch den Nachweis energiebereitstellender Nukleotide sollte diese These untersucht werden. Als wichtigstes metabolisches Organ wurde die Leber analysiert, welche die durch CyPPA ansprechbaren SK-Kanäle (SK2 und SK3) exprimiert [96]. Der hierbei erfasste Abfall von Adenosin als energiearmes Molekül und der tendenzielle Anstieg von ATP als energiereiche Formen im Lebergewebe passen zu den gemachten Beobachtungen. Sie spiegeln eine Verschiebung des Metabolismus hin zu einer erhöhten Energiebereitstellung und einem damit gekoppelten erhöhten Energieverbrauch wieder. Kürzlich wurde eine Arbeit veröffentlicht, die einen ebensolchen Einfluss von CyPPA auf den energetischen Zustand beschreibt. In einer immortalisierten hippocampalen Zelllinie (HT-22) konnte gezeigt werden, dass die Zugabe von CyPPA ins Zellkulturmedium zu einer vermehrten Glykolyse führt, was über die extrazelluläre Ansäuerung erfasst wurde. Dieser glykolytische Boost war zwei bis sechs Stunden nach der Zugabe von CyPPA nachweisbar [420], also in den ersten Stunden nach Exposition. Die initial durch CyPPA induzierte Glykolyse ging zu späteren Zeitpunkten (48 Stunden) mit einer reduzierten mitochondrialen Atmung (oxidative Vorgänge wie Atmungskette und Zitratzyklus) und ATP-Synthese einher [419, 420]. Wie die Öffnung von SK dabei den mitochondrialen Metabolismus im Detail moduliert bleibt unklar. Nichtsdestotrotz können die bisherigen Erkenntnisse die nach zwei Stunden erhöhten ATP-Konzentrationen der Leber sowie die durch CyPPA induzierte erhöhte Proteinsynthese gut erklären. Der Wirkungsgrad biologischer Oxidationen, also der ATP-Synthese, liegt bei nur etwa 50%, daher wird bei diesem Prozess immer auch viel Wärme frei [428]. Dieser Wärmeverlust zeigt sich im *in vivo* Experiment als erhöhte Körpertemperatur. Bei Betrachtung der endogenen Verhältnisse zum Zeitpunkt 24 Stunden nach CyPPA-Applikation wären, bei gleichen Verhältnissen wie im Zellkulturmodell, reduzierte ATP-Konzentrationen durch Hemmung der mitochondrialen Atmung zu erwarten. Dies war anhand der gewonnenen *in vivo* Daten zu diesem Zeitpunkt jedoch nicht anzunehmen. Auf die Untersuchung entsprechender Leberproben wurde daher verzichtet.

Ein weiterer zur erhöhten motorischen Aktivität beitragender Faktor könnte NF-IL6 sein. Die NF-IL6-Expression im Hypothalamus stieg zwei Stunden nach CyPPA-Gabe signifikant an.

Im Cortex war ein vergleichbarer Trend erkennbar. Daten aus der eigenen Arbeitsgruppe haben gezeigt, dass ein Knock-out von NF-IL6 die motorische Aktivität bei Mäusen basal reduziert, was beispielsweise durch die Beeinflussung endogener Corticosteron- und Proopiomelanocortin (POMC) -Spiegel bedingt sein könnte [461]. Ob CyPPA durch die Induktion von NF-IL6 das vorgenannte System beeinflusst und somit zum Anstieg der Aktivität beiträgt, bleibt zu klären. Zur Überprüfung dieser Hypothese wäre es von Interesse NF-IL6 Knock-out Tiere mit CyPPA oder dessen Solvent zu behandeln und deren motorische Aktivität sowie Corticosteron- und POMC-Spiegel zu analysieren.

Abschließend ist festzuhalten, dass CyPPA unter nicht-inflammatorischen Bedingungen nachweisbare Wirkungen sowohl auf den JAK-STAT- als auch auf den NF κ B-Signalweg besitzt. *In vivo* konnte nach Verabreichung eines starken LPS-Stimulus keine Wirkung auf die LPS-induzierte mikrogliale Aktivierung und auf Parameter der *sickness response* nachgewiesen werden. Bei einer denkbaren therapeutischen Anwendung von CyPPA gilt es Eigeneffekte wie die induzierte Hyperthermie, gesteigerte Aktivität und den erhöhte Metabolismus in der Leber zu beachten.

2. Die Wirkung von ω -3 Fettsäuren und deren Metabolite auf LPS-induzierte Veränderungen im *in vivo* Modell

2.1 Auswirkungen des Genotyps und der nutritiven ω -3 Versorgung auf Fieber und andere Parameter der *sickness response*

2.1.1 Fat-1 Mäuse erholen sich schneller von einer LPS-induzierten Hypothermie als WT

In der vorliegenden Studie konnte erstmals gezeigt werden, dass ω -3 defizient ernährte Fat-1 Mäuse nach intraperitonealer Applikation einer hohen LPS-Dosis (2,5 mg/kg) zwar ein kurzfristig höheres LPS-induziertes Fieber bekommen, die Tiere sich jedoch auch schneller von der darauf folgenden Hypothermie erholen als WT. Dahingegen waren unter ω -3 ausgewogener Ernährung weder basal noch nach geringer LPS-Dosis (50 μ g/kg) genotypspezifische Unterschiede erkennbar.

ω -3 defizient ernährte Fat-1 zeigten basal eine signifikant erhöhte Körpertemperatur in der Dunkelphase sowie eine generell signifikant erhöhte lokomotorische Aktivität gegenüber Kontrollen. Es ist wahrscheinlich, dass dieser Effekt kein „echter“ genotypspezifischer Unterschied ist. Auch WT zeigten abhängig von der Ernährung zum Teil signifikante Unterschiede in der Körpertemperatur und im Aktivitätsprofil. Bei Betrachtung der Einzeltierdaten wurde jedoch deutlich, dass Tiere beider Gruppen sich nicht grundsätzlich unterschieden. Die Zusammenfassung größerer Tiergruppen führt lediglich dazu, dass im Mittel weniger Schwankungen im Temperatur- bzw. Aktivitäts-Verlauf auftraten. So kommt es bei statistischem Vergleich unterschiedlich großer Tiergruppen zu signifikanten

Unterschieden, die jedoch unter Vorbehalt zu betrachten sind. Insgesamt lassen die hier erfassten Daten keinen sicheren Einfluss des nutritiven ω -3 Status auf Parameter wie Körpertemperatur und motorische Aktivität innerhalb eines Genotyps nach geringer LPS-Dosis (50 μ g/kg) erkennen.

Die neuronale Informationsweiterleitung von der Peripherie zum ZNS ist vor allem bei geringen LPS-Dosen (50 μ g/kg KGW) von Bedeutung, wohingegen bei zunehmender Dosis (2,5 mg/kg LGW) der humorale Signalweg an Bedeutung gewinnt und neuronale Effekte verdeckt [422]. Dies könnte erklären, warum in der vorliegenden Studie weder ein klarer genotypabhängiger noch ein fütterungsbedingter Effekt auf die Fieberentwicklung nach geringem LPS-Stimulus nachgewiesen werden konnte. Während die Versorgung mit ω -3 FS direkten Einfluss auf die Zusammensetzung von Mediatoren des humoralen Wegs nimmt, scheint der Einfluss auf den neuronalen Weg für das hier untersuchte Modell nicht von Belang zu sein.

Generell wird ω -3 FS in Tiermodellen eine neuroprotektive Wirkung zugeschrieben [377]. Bislang sind jedoch nur wenige Studien verfügbar, die sich mit dem Einfluss von ω -3 FS auf die *sickness response* beschäftigen. Parameter wie Fieververlauf, Lethargie, Anorexie und Kachexie als *readout* finden im Gegensatz zu anderen inflammatorischen Markern kaum Beachtung. Neben den vor allem am Menschen durchgeführten Studien zur fieberreduzierenden Wirkung einer meist kurzfristigen, aber hochdosierten Substitution von ω -3 FS, die bereits in I.2.2.2 angesprochen wurden, wurde kürzlich auch eine Untersuchung an Ferkeln publiziert. Sauen erhielten bereits während der Trächtigkeit eine ω -3 angereicherte Fütterung. Bei diesem Vorgehen konnte keine fütterungsbedingte Reduktion der LPS-bedingten Fieberentwicklung bei den Ferkeln nachgewiesen werden. Ebenso waren TNF- α und Interferon γ im Plasma unbeeinflusst von der im Gehirn erhöhten DHA-Konzentration [105]. Interessanterweise unterschied sich in weiteren Studien die Reaktion von Meerschweinchen auf einen IL-1-Stimulus in Abhängigkeit von der Dauer der Verabreichung einer mit Fischöl angereicherten Diät. Eine sechswöchige Fütterung schützte vor IL-1-induziertem Fieber, wohingegen dies nach lediglich fünfwöchiger Fütterung nicht der Fall war. IL-1-Applikation nach sechswöchiger diätetischer Intervention reduzierte die Körpertemperatur sogar bis hin zu einem negativen Fieberindex in den ersten vier Stunden *post injectionem* [397]. Wie in eigenen Versuchen nach Verabreichung einer hohen LPS-Dosis kann dies als Folge einer hypothermen Reaktion gewertet werden. Plasmazytokinlevel wurden von Pomposelli et al. allerdings nicht bestimmt.

Es gibt nur sehr wenige Untersuchungen zur Fieberreaktion / *sickness response* von Mäusen im Zusammenhang mit deren ω -3 Versorgung. Eine Studie von Mayer et al. zeigte, dass Fat-1 Mäuse eine deutlich reduzierte Lethargie gegenüber Kontrolltieren im Zeitraum 24 Stunden nach LPS-Instillation in die Lunge aufwiesen. Dies war begleitet von einer reduzierten septischen Hypothermie am zweiten Tag nach der Behandlung [322]. Solch deutliche Effekte waren in eigenen Untersuchungen nach systemischer LPS-Stimulation nicht zu beobachten.

Dies lässt vermuten, dass die Applikationsform von LPS einen wichtigen Einfluss auf die Entwicklung des hier untersuchten Krankheitsbildes hat. Eine andere Arbeitsgruppe hat bereits 1997 Versuche veröffentlicht, die deutlich zeigten, dass eine orale Fischölgabe über einen Zeitraum von sechs Wochen die *sickness response* von Swiss Webster Mäusen moduliert. Tiere die Kontrolldiäten (Kokosnussöl oder normales Nagerfutter) erhielten, entwickelten auf die i.p. Gabe von 2,5 mg/kg LPS, trotz einer Umgebungstemperatur von 30 °C, zunächst eine Hypothermie gefolgt von einem Fieber, dessen Höhepunkt nach 24 Stunden erreicht war. Tiere die zuvor eine mit Fischöl angereicherte Diät erhielten, entwickelten eine drastische Hypothermie, welche länger als 72 Stunden anhielt. Die Mortalität der Fischöl-Gruppe war in diesen Versuchen mit 50 % sehr hoch. In den Kontrollgruppen lag sie bei 0 %. Die ausgeprägte Hypothermie wurde zum Zeitpunkt 90 Minuten von dreifach erhöhten TNF- α -Plasmakonzentrationen begleitet [263]. Für Ratten konnte eine Beteiligung von TNF- α an der Entstehung der septischen Hypothermie gezeigt werden. Die gleichzeitige Verabreichung einer septischen Dosis LPS (5 mg/kg) und einem TNF-bindendem Protein führte zu einer verkürzten hypothermen Reaktion und einem früheren Einsetzen von Fieber [524]. Reduzierte PGE₂-Level der Tiere der Fischölgruppe lassen Rückschlüsse auf Störungen des negativen Feedbacks von PGE₂ auf TNF- α zu [268]. Ein solcher negativer Feedback konnte kürzlich *in vitro* an primären neuronalen Zellkulturen des MnPO belegt werden [486]. Die überhöhten TNF- α -Plasmawerte könnten also auch im Mausmodell durch reduzierte PGE₂-Konzentrationen bedingt gewesen sein und damit ursächlich für die beobachtete Hypothermie. Für einen solchen Zusammenhang spricht außerdem die Tatsache, dass Tiere der Fischölgruppe im Modell einer lokalen Entzündungsreaktion ohne systemische Beteiligung von TNF- α vor der Entwicklung von Fieber bzw. Hypothermie geschützt waren [263]. Eine generelle Erhöhung von TNF- α als Reaktion auf eine ω -3 Supplementation in Mäusen konnte in älteren Studien sowohl *in vivo* [88, 513] als auch *in vitro* [48, 304] nachgewiesen werden. Andererseits wurde jedoch auch gezeigt, dass eine chronische ω -3 Defizienz bei Ratten ebenfalls zu erhöhten basalen TNF- α -Konzentrationen führte [327]. Zudem konnte unter ω -3 defizienter Fütterung für das geschwindigkeitsbestimmende Enzym der PGE₂-Synthese, die mPGES, eine reduzierte mRNA-Expression in Fat-1 Tieren im Vergleich zu WT nach LPS-Stimulus gezeigt werden [375]. Eine dadurch reduzierte PGE₂-Synthese, unterstützt durch erhöhte DHA-Konzentrationen und ein reduziertes AA-Angebot, könnte in einem Fieberzustand zu verminderten Temperaturanstiegen beitragen. Während einer hypothermen Phase findet keine vermehrte PGE₂-Synthese im Gehirn statt, was eine direkte Beteiligung von PGE₂ an hypothermen Reaktionen auf LPS unwahrscheinlich macht [499]. Diese Unabhängigkeit von PGE₂ könnte die nur geringen Unterschiede der hypothermen Reaktion von Fat-1 und WT im eigenen Experiment erklären. Eine potentielle Beteiligung von PGD₂ ist ebenfalls denkbar. PGD₂ ist neben PGE₂ ein weiterer Metabolit von AA, welcher der COX2 nachgeschaltet durch die PGD-Synthase produziert wird. Dieses Prostaglandin ist das häufigste im Gehirn und spielt vor allem eine Rolle bei der Schlafregulation [404]. Die Rolle von PGD₂ bei Fieber ist unklar und könnte hemmend oder

aktivierend sein. Während reduzierte PGD-Synthese Fieber unterdrückt [176] oder sogar zu einer Hypothermie beitragen könnte [85], hemmt in einer anderen Untersuchung ein natürliches weiteres Abbauprodukt von PGD₂ (PGJ₂) sogar Fieber [339]. Abgewandelte Synthesewege von PGD₂ oder PGJ₂ könnten in Fat-1 Tieren vorliegen und zur hier beobachteten Modulation der hypothermen Reaktion beitragen. Jedoch bleibt die Beteiligung von TNF- α wahrscheinlich. Der in der vorliegenden Arbeit untersuchte Endzeitpunkt von 24 Stunden erlaubte keinen Nachweis von bioaktivem TNF- α im Plasma. Untersuchungen mit früheren Endzeitpunkten (1,5 bis 3 Stunden) und folgender TNF- α und PGE₂- / D₂- / J₂-Bestimmung sind nötig, um die hier zugrunde liegenden Mechanismen der Entstehung einer septischen Hypothermie sowie die genotypspezifischen Differenzen aufzuklären. Ebenso wären systematische immunhistochemische Untersuchungen zur Aktivierung von NF κ B, NF-IL6, STAT3 sowie COX2 und mPGES als inflammatorische Marker von größtem Interesse.

Ein weiterer ursächlicher Punkt, der die teilweise widersprüchlichen Ergebnisse von Studien zur Wirkung von ω -3 FS an Mensch und Tier erklären könnte, ist eine hohe interindividuelle Variabilität verschiedener Aspekte des Fettstoffwechsels, wie sie mit Hilfe von Phänotypisierungen anhand von Lipidomanalysen belegt werden konnten [365]. Diesem bisher meist unbeachteten Aspekt kommt sicher eine bedeutende Rolle zu und sollte in der vorliegenden Arbeit zum ersten Mal spezifisch für an Fieber beteiligte Gehirnregionen, wie dem OVLT, mittels MALDI-MSI untersucht werden.

2.1.2 Die motorische Aktivität ist vom ω -3 Status wahrscheinlich unbeeinflusst

ω -3 defizient gezogene Fat-1 Tiere zeigten interessanterweise eine basal drastisch erhöhte Aktivität im Vergleich zu den WT (Abbildung 46 D), die mit einer erhöhten basalen Temperatur während der Dunkelperiode einherging (Abbildung 44 D). Diese erhöhte Körpertemperatur ist wohl am ehesten durch die erhöhte motorische Aktivität bedingt. Unterschiede der Aktivität zwischen ω -3 defizient und ausgewogen ernährten WT waren nicht zu beobachten, was einen primären Einfluss der Fütterung unwahrscheinlich macht. Entgegen dieser Annahme, konnte jedoch ein ähnlicher Zusammenhang bei Schweinen gezeigt werden. Tiere deren Mütter bereits eine fischöhlhaltige Diät erhielten zeigten ein ausgeprägteres Spiel- und Sozialverhalten als Kontrolltiere [105]. In Einklang mit diesen Beobachtungen zeigen ω -3 defizient gezogene Mäuse verminderte soziale Interaktion [273, 336]. Dies kann jedoch nicht mit einer absoluten motorischen Aktivität gleichgesetzt werden. Aussagen über die absolute Aktivität der Tiere fehlten in allen Studien. Ein weiterer unsicherer Aspekt ist die statistische Auswertung einer Gruppengröße von zwei Fat-1 gegenüber 25 WT. Die Aktivitätsdaten der Fat-1 Tiere zeigten eine hohe Standardabweichung. Diese Tatsache muss bei der Beurteilung der vorliegenden Daten berücksichtigt werden. Nach Erhöhung der Gruppengröße von Fat-1 Tieren können Erkenntnisse abgesichert werden. Weitere Aspekte werden im Abschnitt IV.3 beschrieben.

2.1.3 LPS-induzierte Anorexie und Adipsie sind vom ω -3 Status unabhängig

Die von Ma und Kollegen (2016) gemachte Beobachtung eines reduzierten Verhältnisses von Körpergewicht zu Körperlänge bei Fat-1 Tieren verglichen zu WT [313] konnte anhand der erhobenen Körpergewichte im Rahmen dieser Studie nicht nachvollzogen werden. Insgesamt wurde neben einer LPS-dosisabhängigen Anorexie, Adipsie und einer damit einhergehenden Reduktion des Körpergewichtes kein genotyp- oder fütterungsspezifischer Einfluss gefunden. Dies entspricht Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen. ω -3 defizient ernährte CD1 Mäuse [334] ebenso wie C57BL6/J Mäuse [130] zeigten eine LPS-induzierte (30 μ g/kg oder 125 μ g/kg) Reduktion der Futteraufnahme und des Körpergewichts. Diese Reduktion unterschied sich jedoch nicht von der ω -3 ausgewogen ernährter LPS-behandelter Tiere entsprechender Mauslinien [130, 334]. Ebenso wenig war ein Unterschied der LPS-induzierten (125 μ g/kg) Verringerung der Futteraufnahme und des Körpergewichts bei Fat-1 Tieren im Vergleich zu WT nachweisbar [131]. Im Gegensatz hierzu konnte eine Fischöldiät in einer anderen Studie zwar eine LPS-induzierte Anorexie nicht verhindern, jedoch die dadurch bedingte Abnahme des Körpergewichtes [263]. Die zu diesem Studienzweck verwendeten Diäten hatten jedoch leicht unterschiedliche metabolische Energiedichten, was den Verdacht nahe legt, dass vor allem die Kalorienaufnahme der Tiere für diesen Effekt verantwortlich war, und weniger die FS-Zusammensetzungen der unterschiedlichen Futtermittel.

2.2 Plasma-IL-6-Konzentrationen sind in Fat-1 nach LPS-Stimulation gegenüber WT reduziert

In der vorliegenden Arbeit konnte eine Beteiligung von ω -3 FS an zirkulierenden LPS-induzierten IL-6-Konzentrationen nachgewiesen werden. Für ω -3 defizient gezogene WT war erwartungsgemäß ein dosisabhängiger Anstieg der IL-6-Werte nachvollziehbar. Plasma-IL-6 war 24 Stunden nach Verabreichung der hohen LPS-Dosis bei Fat-1 Tieren nur in geringen Konzentrationen nachweisbar, die denen von WT unter Kontrollbedingungen entsprachen. Zu diesem Zeitpunkt war die Körperkerntemperatur beider LPS-behandelter Genotypen vergleichbar und lag im Mittel bei etwa 38 °C. Genotypspezifische Unterschiede waren nach Behandlung mit 50 μ g/kg nicht detektierbar (Abbildung 49). Diese Beobachtung untermauert die Annahme, dass eine ω -3 Defizienz vor allem Auswirkungen auf den humoralen Kommunikationsweg hat, nicht jedoch auf Mechanismen des neuronalen Kommunikationsweges zwischen Peripherie und ZNS. Im Einklang mit eigenen Ergebnissen wird ein reduzierter ω -3 Status häufig mit einer vermehrten Aktivierung pro-inflammatorischer Signalkaskaden in Verbindung gebracht. In klinischen Studien [164, 329], ebenso wie im Rattenmodell [327] konnte dabei eine inverse Korrelation von ω -3-Plasmakonzentrationen und pro-inflammatorischen Markern gezeigt werden. Als Folge einer langfristigen nutritiven ω -3 Unterversorgung werden via Δ -6-Desaturase der Leber vermehrt ω -6 FS in AA umgesetzt [225]. Hohe AA-Konzentrationen sind wiederum positiv mit der Synthese von PGE₂ korreliert [69, 491], welches NF κ B-abhängig die IL-6-Biosynthese stimulieren kann [399, 547] (Abbildung 104). Diese Annahme wird dadurch gestützt, dass

Enzyme der PGE₂-Synthese im Cortex ω -3 defizienter Ratten vermehrt exprimiert werden [411], sowie basale IL-6-Plasmakonzentrationen erhöht sind [327]. Untersuchungen von Mingam et al. (2008) legen nahe, dass vergleichbare Verhältnisse nach i.p. Gabe von 30 μ g/kg LPS bestehen. Eine ω -3 Deprivation führte in Mäusen zu einem frühen Zeitpunkt zu signifikant höheren IL-6-Anstiegen als in ausgewogen ernährten Tieren, wobei basal erhöhte Plasma-IL-6-Konzentrationen hier ebenso wenig nachgewiesen werden konnten wie Unterschiede in der hippocampalen IL-6-Expression [334]. In Übereinstimmung hiermit konnte nach Verabreichung von 125 μ g/kg LPS weder nach zwei Stunden, noch nach 24 Stunden ein unterschiedlicher Anstieg von IL-6 im Hippocampus von ausgewogen ernährten Fat-1 zu WT gezeigt werden [131]. Dieser Zusammenhang unterstützt die von Mingam et al. gemachte Beobachtung, dass es unter ω -3 Defizienz zu einer Entkopplung der IL-6-Expression vom STAT3-Signalweg kommt [130, 334]. Ob in dem hier verwendeten Mausmodell ebenfalls ein genereller Anstieg der basalen Plasma-IL-6-Werte bei den ω -3 defizient gezogenen WT gegenüber den Fat-1 vorlag, bleibt zu klären. Für ω -3 ausgewogen ernährte Tiere dieser Genotypen konnte ein solcher Zusammenhang bereits nachgewiesen werden [408]. Das wiederum legt die Vermutung nahe, noch verschärfte Verhältnisse in ω -3 defizient gefütterten Tieren vorzufinden obwohl der rein fütterungsbedingte Einfluss auf die IL-6-Konzentrationen als gering einzuschätzen ist. Die eigene Untersuchung ebenso wie die Untersuchungen von Delpech *et al.* (2015) zeigten tatsächlich keine signifikanten Plasma-IL-6-Unterschiede zwischen mit LPS (eigene Studie 50 μ g/kg, Delpech 125 μ g/kg) stimulierten ω -3 defizient oder ω -3 ausgewogen ernährten C57BL/6 Tieren [130].

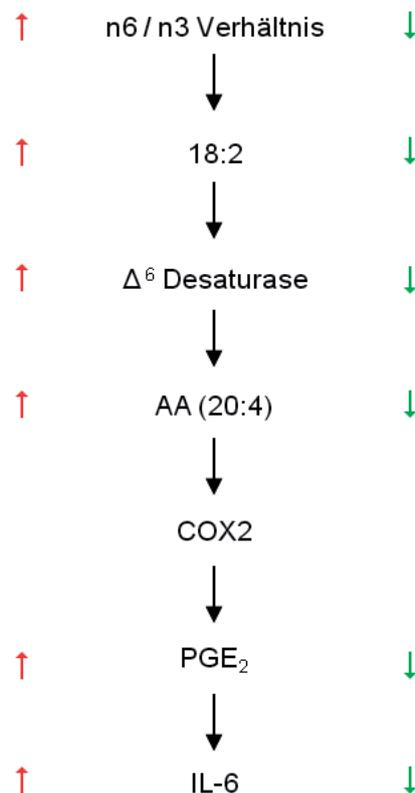


Abbildung 104

Durch das ω -6 / ω -3 Verhältnis vermittelte Mechanismen der Beeinflussung von IL-6-Plasmakonzentrationen als Reaktion auf einen LPS-Stimulus. Ein hohes ω -6 / ω -3 FS Verhältnis, wie es in ω -3 defizient gezogenen WT vorliegt, führt zu einer erhöhten Aktivität der delta-6-Desaturase der Leber und damit zu einer hohen Verfügbarkeit von Arachidonsäure (AA). Diese kann über die Cyclooxygenase (COX) 2 vermehrt zu Prostaglandin E₂ (PGE₂) umgesetzt werden. PGE₂ bedingt wiederum NF κ B-abhängig hohe Interleukin (IL) -6 Plasmakonzentrationen (rote Pfeile). Umgekehrte Verhältnisse liegen in Fat-1 Tieren vor (grüne Pfeile).

3. Fat-1 zeigen vermehrte physiologische Stressreaktionen im NES

Ein Teil der für diese Studie verwendeten Tiere (ω -3 defizient ernährte Fat-1 und WT) wurde neben einem immunologischen Stress durch Applikation von LPS auch einem psychologischen Stress ausgesetzt. Dieser wurde durch einen Käfigwechsel induziert. Während der Dauer von vier Stunden wurden der Verlauf der Körpertemperatur und die Aktivität der Tiere aufgezeichnet. Ein Anstieg der Körpertemperatur als Reaktion auf psychologischen Stress ist dabei sowohl im Tiermodell [43, 63] als auch beim Menschen [218, 371] ein bekanntes Phänomen. Ob es sich dabei um ein echtes Fieber oder eher eine Hyperthermie handelt wird bis heute kontrovers diskutiert. Verschiedene Studien belegen eine Prostaglandinabhängigkeit des Temperaturanstiegs [488] sowie einen korrelierenden IL-6-Anstieg im Plasma [290]. Andere Studien hingegen konnten weder einen peripheren IL-6-Anstieg [174] noch eine Prostaglandinabhängigkeit [577] nachvollziehen, was für eine Hyperthermie spricht.

Die endokrine Stressantwort basiert auf der Aktivierung der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse (HPA-Achse). Neben der Stressantwort reguliert die HPA-Achse weitere physiologische Prozesse wie Wachstum, Reproduktion und Stoffwechselfvorgänge. Im Rahmen der Stressantwort gelangen afferente Informationen über das limbischen System und den präfrontalen Cortex an den Hypothalamus [470]. Hierbei spielt der *Nucleus paraventricularis* (PVN) eine entscheidende Rolle. Afferenzen verschiedener Hirngebiete münden hier, außerdem bestehen efferente Verbindungen zur *Eminentia mediana* (ME) und dem Hypophysenvorderlappen (HVL). Auf entsprechende Stimuli hin wird im PVN *corticotropin releasing hormone* (CRH) gebildet, welches über neuronale Projektionen in die ME gelangt und anschließend über das hypophysäre Pfortadersystem in den HVL. Das im HVL vorliegende Prohormon POMC wird hierauf zum adrenocorticotropen Hormon (ACTH) gespalten, welches letztlich die Freisetzung von immunsuppressiven Glucocorticoiden aus der Nebennierenrinde bedingt. Bei der Maus ist dies vor allem Corticosteron [407]. Die Aktivierung der HPA-Achse kann auch durch inflammatorische Stimuli (LPS oder Zytokine) erfolgen [174], vor allem induziert IL-1 β eine CRH-Freisetzung [196]. Auch das Zytokin IL-6 kann die HPA-Achse beeinflussen [529].

Tiere beider Genotypen entwickelten als Reaktion auf den NES eine erhöhte Körpertemperatur, die etwa zwei Stunden nach dem Käfigwechsel auf das Ausgangsniveau

zurückkehrte. Dabei war auffällig, dass Fat-1 Tiere eine signifikant ausgeprägtere Stressreaktion zeigten als WT. Vergleichbare Ergebnisse ließen sich für die Aktivität festhalten. Auch hier zeigten Fat-1 einen im Vergleich zur eigenen Baseline signifikant höheren Anstieg der lokomotorischen Aktivität als WT (Abbildung 50 und Abbildung 51). Diese Feststellung korreliert gut mit der bereits basal erhöhten Körpertemperatur und Aktivität der ω -3 defizient gezogenen Fat-1 vor allem während der Dunkelphase. Sowohl basale als auch stressinduzierte physiologische Parameter scheinen also durch das ω -3 Transgen und / oder die Fütterung beeinflusst zu sein.

Dieser Befund war völlig unerwartet. Einige Untersuchungen konnten nämlich zeigen, dass die endokrine Stressantwort auf einen LPS-Stimulus und der damit verbundene Anstieg der Körpertemperatur nach Verabreichung von DHA und EPA reduziert ist [161, 330]. Als Konsequenz einer dreiwöchigen Fütterung einer mit Fischöl supplementierten Diät zeigten Ferkel eine mildere Aktivierung der HPA-Achse auf einen LPS-Stimulus als Kontrolltiere. Diese Tiere zeigten eine DHA- und EPA-Anreicherung im Hypothalamus sowie in der Hypophyse. Dies war begleitet von reduzierten ACTH- und Cortisol-Plasmakonzentrationen, verminderten hypothalamischen CRH-Konzentrationen und reduzierter hypophysärer POMC-mRNA-Expression. Die Fischölfütterung reduzierte überdies die Expression von TNF- α - und COX2-mRNA im Hypothalamus [301]. Eine während der Gehirnentwicklung von Ratten nutritiv herbeigeführte DHA-Defizienz führte im späteren Leben zu einem verlängerten und um über ein Grad höheren Anstieg der Kolontemperatur als Reaktion auf eine Fixierung als psychologischen Stressor. Dieser Temperaturanstieg fiel bei Tieren, die erst ab der dritten Lebenswoche eine defiziente Diät erhielten bedeutend milder aus [95]. Plasmacorticosteronkonzentrationen verhielten sich entsprechend. Die DHA-defiziente Fütterung während der Gehirnentwicklung erhöhte den stressinduzierten Corticosteronanstieg signifikant gegenüber Tieren, die erst ab der dritten Lebenswoche ω -3 defizient ernährt wurden [95]. Dies legt den Verdacht nahe, dass bereits während der fetalen Entwicklung eine „Programmierung“ der HPA-Achse stattfindet [95]. Ferner konnte gezeigt werden, dass eine nutritive ω -3 Defizienz während der frühen postnatalen Periode eine nachhaltige DHA-Depletion in der Phospholipidfraktion des Hypothalamus verursacht [295]. Die diätetische DHA-Supplementation von Mäusen bedingte zudem ein verbessertes Abschneiden im *forced swimming test*, ebenso wie im *tail suspension test*, einem Test zur Einschätzung der antidepressiven Wirkung von Substanzen. Diese Form des Stresses ging ebenfalls mit signifikant reduzierten hypothalamischen CRH-Konzentrationen und hypophysären ACTH-Konzentrationen einher [231]. Eine Vielzahl von Studien legt also einen positiven, dämpfenden Einfluss von ω -3 PUFA auf physiologische Stressreaktionen nahe. In diesem Sinne führte eine ω -3 Deprivation in C57BL/6J Mäusen zu einem Phänotyp, der ähnlich einer chronischen Stressreaktion mit basal erhöhten Plasmacorticosteronkonzentrationen zu bewerten sein müsste. Dieser Phänotyp entsteht als Folge einer chronischen Aktivierung der Nebenniere und ging mit einer neuronalen Atrophie in Regionen des präfrontalen Cortex und einer inaktivierten Glucocorticoidrezeptor-Signalkaskade einher. Solche Tiere zeigten zudem

ein gestörtes Sozialverhalten sowie gesteigertes Angstverhalten im *open-field test* [277, 278]. Die Hypophyse ist überdies eine der Gehirnregionen, die bei einer ω -3 defizienten Zucht besonders von einem DHA-Verlust betroffen ist [79]. Die ω -3 Defizienz trägt also sowohl zur anatomischen als auch zur funktionellen Dysregulation der HPA-Achse bei. Eigene Daten sind hierzu jedoch teilweise widersprüchlich. Tiere mit mindestens physiologischen bzw. höheren ω -3-Konzentrationen (Fat-1) schnitten schlechter ab als ω -3 defiziente Tiere (WT). Eine mögliche Ursache hierfür könnte beispielsweise eine Beeinflussung von NF-IL6 durch den ω -3 Status der Tiere sein. Kürzlich wurde eine gegenüber Wildtyp Mäusen verlängerte Aktivitätserhöhung im NES von NF-IL6 Knock-out Mäusen beschrieben [461]. Auch Fat-1 zeigten tendenziell eine verlängerte Aktivitätserhöhung, die parallel mit dem Temperaturanstieg verlief. Bisher wurde die Rolle von ω -3 PUFA auf NF-IL6 noch kaum untersucht. So konnten unterschiedliche Effekte von ω -6 oder ω -3 PUFA auf die Aktivierung glatter Muskelzellen durch IL-1 β beschrieben werden. Die Inkorporation von DHA und EPA in Zellmembranen unterdrückte die IL-1 β -induzierte Expression der sezernierten PLA₂ sowie von COX2 und damit auch von PGE₂. Diese Wirkung soll über eine modulierte Bindungsfähigkeit der beteiligten Transkriptionsfaktoren NF-IL6 und NF κ B vermittelt werden. Eine AA-Supplementation führte zu einer erhöhten, wohingegen DHA und EPA zu einer reduzierten Bindungsfähigkeit beitrugen [57]. Es besteht also die Möglichkeit einer ω -3-abhängigen Suppression der NF-IL6-Aktivität, die womöglich die Stressantwort im NES ähnlich wie bei NF-IL6 Knock-out Tieren beeinflusst.

Des Weiteren könnte ein veränderter Energiestoffwechsel ursächlich sein. Einerseits stehen Fat-1 Tieren andere FS-Muster für die Energiegewinnung durch β -Oxidation zur Verfügung, andererseits gibt es auch Hinweise auf eine erhöhte Glukosetoleranzen bei männlichen Fat-1 Tieren [230]. Beide Faktoren könnten dazu führen, dass Fat-1 Tiere über mehr Energie für motorische Aktivität verfügen und es damit einhergehenden zu einem Temperaturanstieg kommt.

Um eine kausale Erklärung der vorliegenden Verhältnisse zu gewährleisten wäre es neben der Erfassung physiologischer Daten von größtem Interesse weitere Untersuchung anzuschließen. Zielparameter könnten hierbei beispielsweise Corticosteron-, ACTH-, TNF- α - sowie IL-6-Plasmakonzentrationen, hypophysäre CRH- und POMC-Spiegel sowie Expressionsmuster verschiedener inflammatorischer Marker in unterschiedlichen hypothalamischen Gehirnregionen und der Hypophyse zu unterschiedlichen Zeitpunkten des NES sein. Auch eine Betrachtung energiebereitstellender Nukleotide (beispielsweise ATP, ADP und Adenosin) verspricht interessante Ergebnisse. Ziel hierbei wäre es auf molekularer Ebene die erhöhte Stressanfälligkeit der Fat-1 Tiere zu untersuchen, die sich neben den Befunden im NES auch durch reduzierte Reproduktionsraten sowie durch einen höheren Temperaturanstieg während der ersten Phase des LPS-induzierten Fiebers (2,5 mg/kg LPS, Stresspeak) bemerkbar machte. Der Fokus der vorliegenden Arbeit lag allerdings auf der Untersuchung

der Lipid-Verteilungsmuster in Gehirnen von Fat-1 und WT sowie deren Beeinflussung während systemischer Entzündungsreaktionen.

4. Unterscheidbare Verteilungsmuster und die potentielle Rolle verschiedener Lipidspezies im Bereich der präoptischen Region und des OVLTs während LPS-induzierter systemischer Inflammation

Das Gehirn ist stark angereichert mit PUFA wie AA und DHA. Sie regulieren sowohl die Struktur als auch die Funktion von Neuronen [34]. Daher ist es nicht überraschend, dass eine Modifikation des PUFA-Gehalts im Gehirn an der Entstehung von Neuropsychopathologien sowie neurodegenerativen Erkrankungen beteiligt zu sein scheint. Zur Beantwortung biologischer Fragestellungen bezüglich der Pathogenese solcher Erkrankungen bediente man sich in den letzten Jahren immer häufiger der Nutzung von Lipidomanalysen. Das Lipidom beschreibt dabei das gesamte Spektrum von Lipiden in einem biologischen System. Deren Kartierung wird im angloamerikanischen Sprachgebrauch in Anlehnung an *genomics* und *proteomics* als *lipidomics* bezeichnet [493]. Im ZNS findet diese Technik vor allem Anwendung zur Untersuchung von traumatisch bedingten Gehirn- [434] und Rückenmarkserkrankungen [200], aber auch Veränderungen des Lipidstoffwechsels bei Krebserkrankungen, infektiösen Geschehen [581] sowie im Verlauf der Alzheimer-Krankheit [220] werden so erfasst. In vielen Studien wird bei der Analyse der FS-Zusammensetzungen nicht zwischen verschiedenen Gehirnregionen differenziert. Andere Untersuchungen konnten jedoch bereits regionale Unterschiede in verschiedenen Gehirnstrukturen nachweisen, denen mit hoher Wahrscheinlichkeit eine funktionelle Bedeutung zukommt. So zeigen α LNA defizient ernährte Ratten nur im Bereich des frontalen Cortex Veränderungen des dopaminergen und serotonergen Systems [129]. Die erhöhte Sensitivität dieser Region gegenüber einer ω -3 PUFA Defizienz bestätigte sich in weiteren Studien [79, 275]. Carrié et al. (2000) erfassten Phospholipidzusammensetzungen in elf verschiedenen Gehirnregionen bei α LNA defizient ernährten Mäusen. Dabei zeigte sich bei Kontrolltieren eine signifikant erhöhte DHA-Konzentration des frontalen Cortex gegenüber allen weiteren untersuchten Gehirnregionen [79]. Auch Mäuse die lediglich einer fünfwöchigen Anreicherung ihrer Umgebung (*environmental enrichment*) ausgesetzt wurden, zeigten gegenüber Kontrolltieren ein vermehrtes Vorkommen von DHA-tragenden Phospholipiden im cerebralen Cortex [453]. Bei ω -3 defizient ernährten Tieren zeigte sich vor allem im Cortex, im Striatum sowie in der Hypophyse eine kompensatorische Anreicherung mit Docosapentaensäure (DPA; 22:5, ω -6) anstelle von DHA [79]. Ähnliche Verhältnisse ließen sich bei Ratten aufzeigen. In adulten Tieren war ebenfalls der Cortex die Region mit dem größten DHA-Anteil; bei Neonaten war es das Striatum. Die geringsten DHA-Konzentrationen bei Neonaten zeigten der Hippocampus und der Hypothalamus [564]. Die Anreicherung mit DHA ist also stark vom Alter der Tiere, der betrachteten Gehirnregion aber auch der Futterzusammensetzung

abhängig und wurde bisher kaum systematisch untersucht. Plasmalipidomanalysen zeigten eine generelle Anreicherung von EPA und DHA im Plasma von Fat-1 Tieren gegenüber WT [19]. Die Dynamik der genauen räumlichen Verteilung und Zusammensetzung von Phospholipiden und freien FS im Gehirn und vor allem in der präoptischen Region während einer systemischen Entzündungsreaktion war jedoch bisher nicht untersucht und ist somit völlig unklar. Hochauflösende *in situ* Analysen z.B. für die CVOs sind nur mit bildgebender MALDI-MS möglich und wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit im Bereich der präoptischen Region und des OVLTs erstmalig durchgeführt. Dabei gelang es eine Vielzahl verschiedener Lipidspezies mit ihrem Verteilungsmuster nachzuweisen. In einer kürzlich veröffentlichten Studie wurde gezeigt, dass Ceramide, Diacylglycerol sowie Cholesterolester im zeitlichen Verlauf als Biomarker für traumatisch herbeigeführte Gehirnverletzungen genutzt werden können. Interessanterweise konnte im Zuge eines Anstiegs von Diacylglycerol ein Verlust von AA- und DHA-tragenden PEs im Bereich der verletzten Cortexregion beobachtet werden [434]. Vergleichbar zu diesen Untersuchungen wurde in der vorliegenden Studie nach Markern / Indikatoren für LPS-bedingte Veränderungen gesucht, jedoch mit einer weit höheren räumlichen Auflösung als in allen vorgenannten Arbeiten. Dabei wurden repetitiv auftretende Verteilungsmuster nachgewiesen und in Gruppen eingeteilt. Folgende Einteilung wurde vorgenommen: (I) Lipidspezies mit weitgehend homogener Verteilung im Bereich der präoptischen Region und umgebendem Gewebe, (II) Spezies mit einem verstärkten, keilförmigen aber verwaschenen Signal in der Zielregion (III) Spezies mit einem klaren auf das OVLT beschränktem Signal und (IV) Spezies die kein Signal im OVLT, aber dafür im umgebenden Gewebe zeigten. PC (38:6), PC (38:7) und PG (38:5) sowie viele detektierte LPCs wiesen eine gemeinsame Besonderheit auf. Alle zeigten ein (V) verstärktes Signal in der präoptischen Region des LPS-behandelten Fat-1 Tieres, in den Kontrolltieren jedoch fehlte ein Signal oder lag eine homogene Verteilung vor. Diese Lipidspezies wurden zu einer fünften Gruppe zusammengefasst. Insgesamt konnten also bereits innerhalb der Genotypen von Mäusen (Fat-1 im Vergleich zu WT) nach PBS- oder LPS-Behandlung mehrere verschiedene Verteilungsmuster auf der Ebene des OVLTs und des umgebenden Gewebes für verschiedene Lipide beobachtet werden. Eine weitere Sonderstellung, und in dieser Arbeit nur exemplarisch aufgeführt, nimmt N-Acetylaspartylglutamat ein. Dieses Molekül ist kein Lipid und zeigte ein deutlich vermehrtes Signal im Sehnerv. Eine Übersicht der zusammengestellten Verteilungsgruppen ist in Tabelle 31 dargestellt. Fett- und kursivgedruckte Substanzen wurden sowohl im positiven als auch im negativen Ionen-Modus detektiert. Dabei zeigten fettgedruckte Substanzen in beiden Modi ein übereinstimmendes Verteilungsmuster. Die kursivgedruckten Substanzen zeigten kein übereinstimmendes Verteilungsmuster in Aufnahmen beider Messmodalitäten. Dies könnte an den leicht variierenden coronalen Schnittebenen der gemessenen Schnitte liegen. Im Folgenden sollen ausgewählte Lipide / Lipidgruppen näher betrachtet werden.

	positiver Ionen-Modus	negativer Ionen-Modus
(I) homogene Verteilung		
	LysoPE (18:0)	LysoPE (18:0)
	LysoPE (18:1)	LysoPE (18:1)
	PA (40:6) (nicht abgebildet)	PA (40:6) (nicht abgebildet)
	<i>PA (38:5)</i>	<i>LysoPE (16:0)</i>
	<i>PE (38:5) (nicht abgebildet)</i>	
	LysoPC (P-18:0) / LysoPC (O-18:1)	Arachidonsäure
	PC (36:4)	Docosapentaensäure (nicht abgebildet)
	PC (38:5) (nicht abgebildet)	Stearinsäure
	PC (40:8) (nicht abgebildet)	LysoPA (18:0)
	PE (P-38:4) (nicht abgebildet)	LysoPA (22:6)
	PE (P-38:6)	LysoPE (22:6)
	<i>m/z 427.99 (nicht abgebildet)</i>	PA (32:0)
	<i>m/z 564.01 (nicht abgebildet)</i>	PA (36:1) (nicht abgebildet)
		PA (38:6) (nicht abgebildet)
		PA (40:7) (nicht abgebildet)
		PE (34:1)
		PE (36:1)
		PE (36:4)
		PE (38:4)
		PE (40:7)
		PG (36:2)
		PI (36:1) (nicht abgebildet)
		PS (40:7)
(II) verwaschenes Signal im Bereich der präoptischen Region		
		<i>PE (38:5)</i>
	<i>m/z 760.08 (nicht abgebildet)</i>	Docosatetraensäure
		LysoPA (16:0)
		LysoPA (18:1)
		LysoPI (16:0) (nicht abgebildet)
		LysoPI (18:0) (nicht abgebildet)
		LysoPI (18:1) (nicht abgebildet)
		LysoPI (20:4) (nicht abgebildet)
		PA (34:1)
		PA (36:2)
		PG (38:4) (nicht abgebildet)
		PI (38:5)
		PS (38:5) (nicht abgebildet)
(III) scharf umrissenes Signal im Bereich der präoptischen Region		
		<i>PA (38:5)</i>
	LysoPC (18:2)	Palmitinsäure
	PE (P-36:4) / PE (O-36:5)	LysoPE (20:4)
	SM (d38:1)	PA (36:4) (nicht abgebildet)
	SM (d38:2)	PA (38:4) (nicht abgebildet)
	<i>m/z 874.53</i>	PE (32:0) (nicht abgebildet)
		PG (34:1)
		PI (36:4)

positiver Ionen-Modus	negativer Ionen-Modus
	PI (38:4)
	PS (36:1)
	PS (38:4)
(IV) kein Signal im Bereich der präoptischen Region („ausgespartes“ OVLT)	
PE (38:6)	PE (38:6)
PE (40:6)	PE (40:6)
PS (40:6)	PS (40:6)
<i>LysoPE (16:0)</i>	
PC (38:4)	Docosahexaensäure
PC (40:5) (nicht abgebildet)	PE (34:0)
PC (40:6)	PE (36:2)
PC (40:7)	PI (34:1) (nicht abgebildet)
PE (P-40:4) / PE (O-40:5)	PS (34:1)
PE (P-40:6)	PS (36:2)
<i>m/z 956.59 (nicht abgebildet)</i>	
(V) Signal im Bereich der präoptischen Region fehlt oder ist homogen verteilt, tritt jedoch verstärkt im LPS behandelten Fat-1 Tier auf	
LysoPC (16:0)	
LysoPC (16:1)	
LysoPC (18:0)	
LysoPC (18:1)	
PC (38:6)	
PC (38:7) (nicht abgebildet)	
PG (38:5) (nicht abgebildet)	
(VI) starke Signale im Sehnerv	
N-Acetylaspartylglutamat	

Tabelle 31

Zusammenfassende Darstellung der in MALDI-Experimenten (sowohl positiver als auch negativer Ionen-Modus) detektierten Substanzen und deren Zuordnung zu verschiedenen Verteilungsgruppen. Fett- und kursivgedruckte Substanzen wurden sowohl im positiven als auch im negativen Ionen-Modus angesprochen.

Freie Fettsäuren

Der Nachweis freier FS gelang aufgrund ihrer Ionisationseigenschaften erwartungsgemäß nur im negativen Ionen-Modus [183]. Prinzipiell ist aufgrund unterschiedlicher Ionisationseffizienzen die Peakintensität nicht mit der molekularen Konzentration einer Zielsubstanz im Gewebe gleich zu setzen. Es ist jedoch eine Standardannahme, dass die relative Peakintensität gleicher Moleküle in vergleichbaren Geweben in etwa die intrinsischen Konzentrationen widerspiegeln [133, 318, 561]. Diese Annahme gilt so auch für Phospholipide, solange sie der selben Phospholipid-Familie angehören [201]. Für AA sowie für Palmitinsäure wurde insgesamt eine höhere Signalintensität im Kontrolltier (WT PBS) als im Fat-1 Tier (LPS) beobachtet; umgekehrte Verhältnisse waren für den Nachweis von Stearinsäure erkennbar. In der Messungen des Kontrolltiers (WT PBS) waren die Signalintensitäten jedoch generell etwas höher als die Peaks des LPS-behandelten Fat-1 Tieres. Diese Aussage gilt so auch für Peaks von Massen die der Matrix zugeordnet werden

konnten. Daher ist ein direkter Vergleich der Signalintensitäten hier leider nicht möglich. Hierzu müssten Singalintensitäten verschiedener Matrix und nicht-Matrix Peaks gemittelt und zueinander ins Verhältnis gesetzt werden (Normalisierung). Ein solches vorgehen würde eine relative Quantifizierung ermöglichen und damit eine Vergleichbarkeit herstellen. Generell ist es jedoch mit der verwendeten Methode möglich freie FS darzustellen und Aussagen über deren räumliches Verteilungsmuster zu machen. Interessanterweise zeigte AA in allen auswertbaren Messungen eine homogene Verteilung im Gewebe, wohingegen DHA im Bereich des OVLTs ein abgeschwächtes Signal aufwies. Entgegen früherer Annahmen kann das ZNS freie FS durchaus zur Energiegewinnung nutzen [146]. Ein fehlendes Signal im Bereich des OVLTs ist also ein Hinweis für eine potentiell erhöhte Energieumsetzung. Darüber hinaus ist es denkbar und wahrscheinlich, dass DHA genotypunabhängig vermehrt zur Synthese von beispielsweise Docosanoiden eingesetzt wird. Eine weitere Ursache für fehlende DHA-Signale im Bereich des OVLTs könnte eine fehlende Expression von DHA durch im OVLT vorhandene Zellen sein. Um diese Frage abschließend zu klären ist es notwendig beispielsweise mittels radioaktiv markiertem DHA dessen Metabolisierung zu verfolgen oder auch einen Nachweis entsprechender Docosanoide zu führen (Methodisch wäre hier in Anlehnung an [29, 531] vorzugehen.). Ebenso ist bisher nicht bekannt, wie sich die Expression von MGL in Fat-1 und WT basal und nach LPS-Stimulation verhält.

Phospholipide

Die dominierende Phospholipidspezies bei massenspektrometrischen Untersuchungen von Gehirnmaterial im positiven Ionen-Modus sind PCs und dabei vor allem PC (16:0/18:1), PC (16:0/16:0) und PC (18:0/18:0) [23]. Alle drei zeichnen sich durch einen hohen Sättigungsgrad und kurze Kohlenstoffketten aus und lagen daher nicht im Fokus der vorliegenden Arbeit. Vielmehr wurden hier nur solche PCs analysiert, die mindestens vier Doppelbindungen und einen Gesamtgehalt von 36 Kohlenstoffatomen aufweisen, also PC (36:4) und aufsteigend. Das am häufigsten AA-tragende PC im Gehirn ist PC (18:0/20:4), das am häufigsten DHA-tragende PC (18:0/22:6) [23]. Sowohl PC (38:4) als auch PC (40:6), die mindestens anteilig den vorgenannten Kriterien entsprechen, wurden hier nachgewiesen. Eine sichere Identifizierung der FS der sn-1 sowie der sn-2 Position hätte MS/MS Untersuchungen nötig gemacht. Auf diese Analysen wurde hier verzichtet, da die Studie zunächst überprüfen sollte, ob prinzipiell Unterschiede der Lipidmuster beider untersuchten Genotypen detektierbar sind. Alle hier untersuchten PCs [PC (36:4), PC (38:4-7) und PC (40:5-8)] können potentiell AA tragen. Als häufig AA-tragend beschrieben sind jedoch lediglich PC (36:4), PC (38:4) und PC (38:5) [23]. Potentiell können PC (38:6-7) und PC (40:6-8) DHA tragen. Nachgewiesen wurde DHA aber vor allem in PC (38:6) sowie in PC (40:6-7) [23].

Mittels MALDI-MSI konnte bisher eine transiente Reduktion von DHA-tragenden PCs in einem Modell für traumatisch herbeigeführte Rückenmarksverletzungen in Ratten nachgewiesen werden (v.a. PC (38:6) und PC (40:6)). Diese Reduktion war im Zeitraum von einem Tag bis acht Wochen nach Läsionssetzung erkennbar. PC (38:6) wurde dabei

vorwiegend im Bereich von Motoneuronen detektiert. Etwa eine Woche nach der traumatischen Intervention stieg die Konzentration AA-tragender PCs an [v.a. PC (36:4) und PC (38:4)]. Der zeitliche Verlauf wie auch das räumliche Verteilungsmuster wiesen daraufhin, dass über eine geschädigte BHS einwandernde Immunzellen vermehrt PCs zu LPCs umsetzen (Anstieg von LPCs wurde hier ebenfalls nachgewiesen) und dabei freiwerdendes AA zur Synthese inflammatorischer Mediatoren, wie Prostaglandinen, nutzen [200]. In einem vergleichbaren Mausmodell konnte die Reduktion des DHA-tragenden PC (38:6) durch gleichzeitige Gabe eines gegen den IL-6-Rezeptor gerichteten Antikörpers signifikant reduziert werden [13]. Eine Reduktion von AA-tragenden PCs [(PC (36:4) und PC (38:4)] wurde hierdurch jedoch nicht induziert. Nichtsdestotrotz ließ sich auch klinisch ein neuroprotektiver Effekt durch die Unterbrechung des IL-6-Signalweges nachweisen. Ferner korreliert das Auftreten von PC (38:6) mit dem Nachweis GFAP (saures Gliafaserprotein) - positiver Zellen, was den Verdacht nahe legt, dass DHA auch von Astrozyten exprimiert wird [13]. Ein Rückgang DHA-tragender PCs [PC (38:6), PC (40:6) und PC (40:7)] in betroffenen Regionen des Rückenmarks ließ sich auch in einem Mausmodell der amyotropischen Lateralsklerose nachweisen [14]. Die Erkenntnis dieser Studien erlauben es den Verlust von PC (38:6) als Korrelat zu einem neuronalen Verlust zu interpretieren [14, 200]. Betrachtet man nun die Tatsache, dass das LPS-behandelte Fat-1 Tier eine Anreicherung des PC (38:6) Signals im Bereich des OVLTs zeigte, könnte dies einem neuronalen Schutz vor LPS-bedingten Schäden entsprechen. Dieser Schutz / dieses Signal fehlte in beiden WT Tieren (PBS und LPS) (vergleiche die Verteilung in Abbildung 65). Unterschiede im Vorkommen anderer DHA-tragender PCs [PC (40:6) und PC (40:7)] konnten in der eigenen Studie nicht nachgewiesen werden. Diese scheinen auf Ebene des OVLTs eine gegenüber PC (38:6) untergeordnete Rolle zu spielen.

Gerade PC (40:6) zeigt sich in anderen Zusammenhängen als weitere interessante Zielsubstanz. Wie bereits erwähnt korreliert die Reduktion von PC (40:6) in Gehirnregionen mit der Bildung amyloider Plaques von Alzheimer-Patienten und der Dauer der Erkrankung [574]. Ferner wurde PC (40:6) in der Retina der Maus [209] sowie der Retina des Menschen und hier vor allem im Bereich der Photorezeptoren nachgewiesen [575]. Es ist bekannt, dass DHA für die gesunde Funktion der Retina benötigt wird [31-33]. Eigene Untersuchungen zeigten keine genotyp- oder behandlungsabhängigen Unterschiede in der Verteilung von PC (40:6). Weshalb PC (40:6), trotz des Wissens um dessen Wichtigkeit für die ordnungsgemäße Funktion vor allem des Auges, nach eigenen Erkenntnissen im Kontext systemischer Entzündungen im Bereich des OVLTs zunächst nicht vordergründig als Zielsubstanz in Frage kommt. Dahingegen ist die Anreicherung von PC (38:6) im Bereich des OVLTs des LPS-behandelten Fat-1 Tieres im Gegensatz zu den Verhältnissen in den Kontrollsituationen vielversprechend. Die Verteilung von PC (38:6) sollte als potentieller Marker für systemische Entzündungen weiter verfolgt werden. Für eine abschließende Evaluation auch der Beteiligung von PC (40:6) sind weitere MALDI-Messungen nötig, nicht zuletzt um eine Reproduzierbarkeit der Ergebnisse zu bestätigen.

Lysophospholipide

LPCs sind die am häufigsten im Blut und anderen Geweben vorkommenden Lysophospholipide [247, 370] und scheinen im Allgemeinen eine wichtige Rolle in der Pathogenese von beispielsweise Artherosklerose und anderen inflammatorischen Erkrankungen zu spielen [370]. Dabei beeinflussen sie eine Vielzahl verschiedener Zellen, wie z.B. Endothelzellen, glatte Muskelzellen [47, 256] aber auch Immunzellen. Es sind stimulierende Einflüsse auf Monozyten [110, 300, 353, 406], Makrophagen [126, 187, 358, 410, 446], T-Lymphozyten [17, 18, 326, 360, 361] und neutrophile Granulozyten [362, 455, 485] beschrieben. Ihr Einfluss auf die Bildung des Gefäßtonus [335], die Induktion von Apoptose [512], die Expression von Adhäsionsmolekülen und Chemokinen [345, 379, 522] sowie die Reduktion der NO-Freisetzung [128] und die Erhöhung der Permeabilität der BHS [379] sind nachgewiesen. Außerdem wirken LPCs als Mediatoren der Demyelinisierung im ZNS [41, 169, 379], was prinzipiell regenerative Prozesse verzögern kann [546]. Bei der Beurteilung all dieser Studien ist jedoch Vorsicht geboten. Häufig wird der Begriff LPC als Sammelbegriff einer nicht näher definierten Menge von LPCs mit verschiedenen Kohlenstoffkettenlängen verwendet. So kommt häufig ein aus bovinem ZNS gewonnenes Gemisch aus hauptsächlich LPC (16:0), LPC (18:0) und LPC (18:1) zum Einsatz. Eine Beurteilung der Wirkung von Einzelsubstanzen aus Daten der vorgenannten Studien stellt sich also an einigen Stellen schwierig dar. Manche Studien verwendeten jedoch kein undefiniertes Stoffgemisch und lassen folglich differenziertere Aussagen zur Wirkung von LPCs bestimmter Kettenlängen zu. Bei eigenen MALDI-Analysen war es ebenso möglich die gebundene Kohlenstoffkettenlänge über die akkurate Masse zu bestimmen, weshalb differenzierte Aussagen zur Verteilung verschiedener LPCs möglich waren.

Für alle dargestellten LPCs [(16:0), (16:1), (18:0), (18:1) und (18:2)] zeigten eigene Ergebnisse eine erhöhte Signalintensität im Bereich des OVLTs des LPS-behandelten Fat-1 Tieres. Die Signale waren in den Kontrollsituationen (WT PBS und WT LPS) schwach bis moderat ausgebildet und häufig homogen verteilt. Diese Beobachtung steht im Einklang mit dem Nachweis basal erhöhter LPC (16:1) Konzentrationen im Blutplasma von Fat-1 Tieren gegenüber Kontrolltieren [19].

Interessanterweise konnte in verschiedenen Modellen der experimentell herbeigeführten ischämischen Gehirn- oder Rückenmarksschäden bei Ratten eine lokale Induktion von LPC (16:0) [256, 480], LPC (18:0), LPC (18:1) und eventuell auch LPE (18:0) [546] massenspektrometrisch nachgewiesen werden. Ischämische Schäden bedingen dabei eine Ca^{2+} -abhängige Aktivierung von PLA_2 , welche ihrerseits die Umsetzung von PCs aus der Zellmembranen und damit die Freisetzung von FS und LPCs katalysiert [183, 288, 343]. Ähnliche Verhältnisse wurden in einem Mausmodell der Alzheimerschen Krankheit beschrieben. Ein signifikanter Anstieg von LPC (16:0) im Bereich amyloider Plaques ging mit einer erhöhten Expression von PLA_2 einher [220]. Ein vermehrtes Auftreten von LPC (16:0), LPC (18:0) und LPC (18:1) wurde auch in artherosklerotischen Plaques detektiert

[188]. Alle drei vorgenannten LPCs induzieren nach ihrer Bildung mitochondriale reaktive Sauerstoffspezies (mtROS) in Endothelzellen verschiedener Herkunft [267, 296]. Die Aktivierung dieser Zellen induziert ferner die Expression von *intercellular adhesion molecule 1* (ICAM-1) und begünstigt darüber die Adhäsion von Monozyten [267]. Zusätzlich induziert LPC (16:0) in humanen umbilicalen Endothelzellen pro-inflammatorische Transkriptionsfaktoren wie NFκB [506] und aktiviert Makrophagen [297]. LPC (18:1) stimuliert Gliazellen und trägt somit zu neuroinflammatorischen Zuständen bei [507]. Weiter konnte ein Beitrag von LPC (18:1) an der phagozytotischen Infiltration bei lysosomalen Speicherkrankheiten wie der neuronalen Ceroid-Lipofuszinose gezeigt werden [580]. Eine Beteiligung von LPCs an entzündlichen und neurodegenerativen Veränderungen ist somit in verschiedenen Zusammenhängen nachgewiesen. Untersuchungen zur Rolle von LPCs bei der Fieberentstehung und *sickness response* gibt es meines Wissens jedoch bisher noch nicht.

Die Induktion der PLA₂ ist ein bekannter Effekt einer LPS-Stimulation und tritt gleichermaßen bei Fat-1 Tieren wie bei C57BL/6N Mäusen auf [375]. Es stellt sich die Frage, warum die Fat-1 Tiere dann in der vorliegenden Studie deutlich ausgeprägtere LPC-Signale im Bereich des OVLTs zeigten und das ohne einen korrelierenden Anstieg freier FS. Ein möglicher Erklärungsansatz könnte dabei ein erhöhter Energieumsatz der Fat-1 Tiere sein. Sollte im Gehirn der Fat-1 Tiere mehr Energie über freie FS gewonnen werden als in WT, würde eine Metabolisierung in der β-Oxidation einen fehlenden Nachweis freier FS im OVLT erklären können. Der vermehrte Nachweis von LPCs wäre in diesem Fall als sekundäres Phänomen aufzufassen. Andererseits könnten freie FS aber auch vermehrt für die Synthese von Eicosanoiden und SPMs zur Verfügung stehen. Substanzen beider Gruppen waren in MALDI-Experimenten allerdings nicht nachweisbar. Eigene Daten liegen hierzu also nicht vor. Es ist jedoch bekannt, dass RvD1 nach einer global-cerebralen Ischämie im Hippocampus von Fat-1 Mäusen stärker als in Kontrolltieren exprimiert wird [307]. Es ist also sehr wahrscheinlich, dass auch im eigenen Modell vermehrt SPMs im ZNS von Fat-1 Tieren gebildet werden und wurden. Der Nachweis akkumulierter LPCs stellt also auch in dem hier untersuchten LPS-Modell einen wichtigen und interessanten Zielparameter dar, um Mechanismen näher zu untersuchen.

Das Vorhandensein von LPCs könnte ferner einen guten Erklärungsansatz für die beobachteten fehlenden Unterschiede in den Temperaturverläufen der LPS-stimulierten Tiere liefern. Fat-1 Tiere zeigten nach der hohen LPS-Dosis eine ähnlich stark ausgeprägte Hypothermie wie WT Tiere. Es könnten also negative / pro-inflammatorische LPC-bedingte Effekte die positive / anti-inflammatorische Wirkung durch SPM-Wirkung überlagert haben.

Darüber hinaus gibt es aber auch Berichte über anti-inflammatorische Wirkungen von LPCs in Sepsismodellen. Die viermalige subkutane Gabe von LPC (18:0) reduzierte dosisabhängig die Letalität in einem *cecal ligation and puncture* (CLP) Modell in Mäusen sowie nach intraperitonealer Applikation von *E. coli*. Eine durch LPCs gesteigerte Beseitigung eindringender Krankheitserreger durch stimulierte neutrophile Granulozyten scheint hierfür

verantwortlich zu sein [569]. Ferner reduziert die Gabe von LPC (18:0) nicht jedoch die Gabe von LPC (6:0) die Freisetzung von *high-mobility group box 1* (HMGB1) aus zirkulierenden Monozyten in einem CLP-Modell und nach einer intraperitonealen LPS-Injektion (10 mg/kg) *in vivo* und *in vitro* [94]. HMGB1 wird bei Gewebeschädigungen von körpereigenen Zellen freigesetzt, wirkt als DAMP [435] und ist an späteren Phasen von Entzündung bei Sepsis maßgeblich beteiligt [545, 570]. Ferner ist DHA-tragendes LPC effizient mit protektiven Eigenschaften experimentell für Modelle von Gehirnfarkten therapeutisch eingesetzt worden [91].

Die Rolle von LPCs in Fat-1 Mäusen nach LPS-Gabe kann hier also nicht abschließend bewertet werden. Festzuhalten bleibt, dass sowohl pro-inflammatorische wie auch anti-inflammatorische Effekte dieser Lipidmediatoren beschrieben sind. Weitere Erkenntnisse, auch bezüglich der Dynamik der Expression von LPCs im Kontext einer systemischen, LPS-bedingten Entzündung in Fat-1 Mäusen, wären von größtem Interesse. In weiteren Studien wäre es daher interessant, hier erstmalig nachgewiesene Verteilungsmuster verschiedener LPCs mit beispielsweise immunhistochemischen Nachweisen von PLA₂, HMGB1 sowie der Aktivierung von Mikroglia und einer Quantifizierung migrierender neutrophiler Granulozyten zu korrelieren. Die Korrelation mit Daten zur Freisetzung von FS und der Entstehung von Lipidmediatoren (Prostaglandine, SPMs) könnte zu einem Durchbruch im weiterführenden Verständnis der Mechanismen einer systemischen, LPS-bedingten Entzündung sowie deren Beendigung unter Beteiligung der CVOs beitragen.

Wie bereits in der Einleitung erwähnt, könnten pro-inflammatorische LPAs ebenfalls interessante Zielsubstanzen im Kontext einer systemischen Entzündung darstellen. Neben Berichten die LPAs mit Modellen der Neuroinflammation und Neurodegeneration in Zusammenhang bringen [111, 171, 507] gibt es auch Untersuchungen zu neuropathischem Schmerz. Intrathekale Injektion von LPA (1 nmol, ohne Spezifizierung der Kettenlänge) induziert Symptome, die denen bei neuropathischem Schmerz gleichen. Hierzu zählen unter anderem das Auftreten von thermischer Hyperalgesie und mechanischer Allodynie (gesteigerte Schmerzempfindlichkeit). Dieses Phänomen ließ sich durch Blockade des entsprechenden LPA₁-Rezeptors vollständig blockieren [310]. Intrathekal appliziertes LPC (18:1) wird durch die Lysophospholipase Autotaxin zu LPA umgesetzt [312]. Wird dieser enzymatische Umsatz durch die Gabe eines spezifischen Inhibitors gezielt verhindert, zeigten Tiere nach einer experimentell herbeigeführten Nervenverletzungen eine verbesserte Regeneration [510].

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Ergebnisse sind im Hinblick auf genannte Studien schwer einzuordnen. LPA (16:0) und LPA (18:0) sind die in Zerebrospinalflüssigkeit mengenmäßig die am meisten nachgewiesenen LPAs [111]. Generell gelang in eigenen MALDI-Experimenten deren Nachweis ebenso wie der Nachweis von LPA (18:1) und LPA (22:6). Bedingt durch technische Komplikationen konnten diese Signale nicht im mit LPS-behandelten WT detektiert werden. Die Information über die räumliche Verteilung fehlt hier.

Unter basalen Bedingungen (WT PBS) zeigten sich LPA (18:0) und LPA (22:6) homogen verteilt. LPA (18:1) und LPA (16:0) zeigten in einem keilförmigen Bereich der präoptischen Region ein verstärktes Signal. Diese Signalverteilung ließ sich im LPS-behandelten Fat-1 Tier nicht klar nachvollziehen. Ob hier tatsächlich keine Anreicherung von LPAs stattgefunden hat oder ob ein entsprechendes Signal aufgrund des Bildausschnittes nicht ansprechbar ist, bleibt unklar. Wiederholungen der durchgeführten Messungen würden hier für Klarheit sorgen, waren aber im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht mehr möglich. Desweiteren wäre es von großem Interesse die Expression entsprechender LPA-Rezeptoren (bisher sind sechs Subtypen dieser G-Protein gekoppelten Rezeptoren bekannt [160]) in Regionen mit undichter BHS, beispielsweise durch Anwendung von PCR und immunhistochemischen Techniken, aufzuklären. Entsprechende Antikörper sind mittlerweile kommerziell erhältlich. Ein solches Vorgehen könnte helfen auch eine funktionelle Einordnung von LPA (18:1) und LPA (16:0) als potentiell vielversprechende Markersubstanzen für neuroinflammatorische Geschehen zu erlauben.

Plasmalogene

Plasmalogene waren ursprünglich kein Schwerpunkt dieser Arbeit, wurden aber z.T. bei der gezielten Suche nach PCs aufgrund vergleichbarer Massen angesprochen und in den weiteren Analysen mitgeführt. Im Gegensatz zu Herzmuskulatur besitzt das ZNS vor allem Ethanolamin Plasmalogene (PE P) und weniger Cholin Plasmalogene (PC P) [60, 64]. Daher überrascht es nicht in den eigenen Messungen nur PE Ps gefunden zu haben. Diese Gruppe von Lipiden lässt sich in nahezu allen Verteilungsgruppen wiederfinden (siehe Tabelle 31). Es ist bekannt, dass Plasmalogenkonzentrationen im Gehirn von Alzheimererkrankten schon in einem frühen Krankheitsstadium reduziert sind [182, 199]. Mittlerweile weiß man, dass dieser Zustand eine Folge erhöhter Konzentrationen reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) ist. ROS bedingen zum einen eine reduzierte *de novo* Synthese von Plasmalogenen, indem sie die Expression beteiligter Enzyme reduzieren [191]. Andererseits sind Plasmalogene aufgrund ihrer Vinyl-ether Bindung an der sn-1 Position sehr oxidationsanfällig und damit auch direkte Ziele von ROS [151, 243]. Die intraperitoneale Applikation von 250 µg LPS pro kg KGW an sieben aufeinander folgenden Tagen wird als Modell chronischer Entzündungen verwendet. Dieses Vorgehen führt bei Mäusen zu einem Gewichtsverlust, zur Aktivierung von Mikroglia und Astrozyten im präfrontalen Cortex sowie im Hippocampus und einer erhöhten genomischen Aktivierung von TNF- α und IL-1 β in diesen Regionen. Ferner kommt es zur Akkumulation von β -Amyloid und einer reduzierten Expression von Plasmalogenen im gesamten ZNS. Die gleichzeitige Applikation von 20 mg Plasmalogenen pro kg KGW mit jeder LPS-Injektion konnte alle diese Effekte deutlich abmildern [224]. In dieser Studie wurde jedoch ein nicht weiter definiertes Gemisch verschiedener PE Ps und PC Ps mit mannigfaltiger FS-Komposition verabreicht. Es ist also äußerst unklar ob peripher applizierte Plasmalogene überhaupt ins ZNS gelangen um dort beschriebene Effekte zu vermitteln oder ob beobachtete Wirkungen primär durch enthaltene ω -3 PUFA bedingt wurden.

Vorgenannte Studien haben ihre Daten zu PE P-Konzentrationen durchweg durch Extraktionsanalysen gewonnen. Es wurden keine detaillierten Auskünfte über die genaue räumliche Verteilung oder Längen der gebundenen Kohlenstoffketten der Plasmalogenespezies angegeben. Eigene MALDI-Experimente zeigen also erstmals hochauflösend die Plasmalogenverteilung im Bereich der präoptischen Region. Dabei erscheint besonders interessant, dass PE P (36:4) sehr deutlich vermehrt im OVLT beider LPS-stimulierter Genotypen nachweisbar war, eine solche Akkumulation aber in der Kontrolle fehlte. Diese Beobachtung passt zunächst nicht zu generell reduzierten Plasmalogenkonzentrationen unter Bedingungen von oxidativem Stress (s.o.). Weiterführende Untersuchungen unter Berücksichtigung des oxidativen Potentials im OVLT unter LPS-induzierter systemischer Entzündungsreaktion und zur biologischen Funktion von PE P (36:4) wären in diesem Zusammenhang von sehr hohem Interesse.

Weniger vielversprechend zeigte sich die Verteilung von PE P (40:4) und PE P (40:6). Beide fehlten im Bereich des OVLTs in allen drei Situationen. Ebenso war kein genotyp- oder behandlungsabhängiger Einfluss auf die homogene Verteilung von PE P (38:6) erkennbar. Alle drei Substanzen gehören unseren neuen Erkenntnissen nach also nicht zu potentiellen Marken im Kontext systemischer LPS-induzierter Entzündungen.

Sphingomyeline

SM tragen in der Regel gesättigte oder einfach ungesättigte FS [505] und waren daher kein Schwerpunkt dieser Arbeit. Aufgrund ihres äußerst interessanten räumlichen Verteilungsmusters sind SM (d38:1) und SM (d38:2) jedoch aufgefallen. Beide zeigten vor allem eine sehr deutliche Signalanreicherung im OVLT, dem Ependym sowie dem Plexus des ersten und zweiten Ventrikels. Des Weiteren konnten diffus über das gesamte Parenchym verteilte Signale nachgewiesen werden. Ein vergleichbares räumliches Auftreten zeigte *m/z* 874,53. Diese Verteilungsmuster erinnern deutlich an das Verteilungsmuster wie es LPS-bedingt für die nukleäre Translokation von STAT3 im Gehirn beschrieben wurde. Dabei treten Signale im gesamten Gehirnendothel (diffus über das gesamte Parenchym), im OVLT sowie in den Meningen auf [437, 440, 443]. Es ist bekannt, dass Neurone vor allem C18-tragende Sphingolipide synthetisieren [181], wohingegen Oligodendrozyten und Schwannsche Zellen hauptsächlich C24-tragende Sphingolipide synthetisieren [227]. Diese Tatsache erklärt das beschriebene Vorkommen von SM mit hohen Massen (> C22) in der weißen Substanz sowie in Bereichen der Ventrikel [434]. Das Auftreten von SM (d18:1/20:0) und SM (d18:2/20:1), welche mit hoher Wahrscheinlichkeit den hier nachgewiesenen SM (d38:1) und SM (d38:2) entsprechen, wurde bereits im Vorderhirn sowie im Cerebellum von Mäusen [505] und im Gehirn von Ratten [434] nachgewiesen. In diesen Publikationen wird jedoch keine weitere Aufschlüsselung der räumlichen Verteilung speziell dieser SMs vorgenommen. Ein mit den hier gezeigten Verteilungsmustern übereinstimmendes Auftreten im Gehirn von Ratten wurde jedoch für SM (16:0/d18:1) gezeigt, welches sich zusätzlich noch im Bereich einer traumatisch herbeigeführten Gehirnverletzung im Cortex anreicherte

[434]. Generell wird SMs eine Beteiligung an verschiedenen Signalwegen des Zellwachstums und der Zelldifferenzierung zugesprochen [220]. Auch die Beteiligung an Signalwegen die zu Zelltod und Apoptose führen wird häufig beschrieben [21, 514, 534, 559]. Ferner ist bekannt, dass eine Aktivierung solcher SM-abhängiger zellulärer Mechanismen z.B. nach ischämischen Zuständen wie Schlaganfällen eintritt [10, 367, 572]. Inwiefern auch eine Beteiligung an primär entzündlichen Vorgängen vorliegt bleibt zu klären. Klar ist jedoch, dass verschiedene SM-Spezies unterschiedliche Verteilungsmuster im Gehirn aufweisen. Was den Verdacht nahe legt, dass unterschiedlich lange Kohlenstoffketten auch unterschiedlichen molekularen Funktionen entsprechen [505].

4.1 Lipidspezies deren Nachweis nicht oder nicht eindeutig gelang (SPMs und Eicosanoide)

SPMs entfalten ihre entzündungsaflösende Wirkung im Bereich nanomolarer Konzentrationen [484]. Auch Eicosanoide sind im Gehirn in ähnlichen Konzentrationen nachweisbar [402]. Der Nachweis von SPMs gelang bisher vor allem aus extrahierten Geweben und anschließender *liquid chromatography* Tandem Massenspektrometrie (LC-MS/MS) -Untersuchungen. So konnte für Fat-1 Mäuse ein signifikant höherer NPD1 Anstieg als in WT 30 Minuten nach traumatischer Gehirnverletzung gezeigt werden. Fat-1 Tiere zeigten Konzentrationen von um die 80 pg/ml, wohingegen WT lediglich bei um die 20 pg/ml extrahiertem Cortexgewebe lagen [416]. Luo und Kollegen gelang der Nachweis von RvD1 aus dem Hippocampus von Mäusen. Auch hier ließ sich ein signifikant höherer Anstieg in Fat-1 Tieren verglichen mit WT in einem Modell der global-cerebralen Ischämie nachvollziehen. Konzentrationen lagen zwischen 400 und 600 pg/ml [307]. Gewebekonzentrationen verschiedener Prostaglandine liegen ebenfalls im Bereich von unter 100 bis 800 pg/mg Gewebe [200]. Die geringen zu erwartenden Konzentrationen von SPMs und Prostaglandinen sind wahrscheinlich der Hauptgrund, warum diese in eigenen MALDI-Experimenten nicht nachgewiesen werden konnten. Gleiches gilt für den fehlenden Nachweis von EPA, welches zusätzlich einer raschen Metabolisierung unterliegt [92, 93]. Des Weiteren zeigen viele Prostaglandine, andere Eicosanoide und SPMs gleiche Molekulargewichte, was eine Unterscheidung erschwert. Eine sichere Differenzierung wäre in solchen Fällen ohnehin nur mittels MS/MS-Experimenten möglich.

Docosapentaensäure

DPA ist eine ω -6 FS, die eine Kettenlänge von 22 Kohlenstoffatomen besitzt und fünf Doppelbindungen beinhaltet [447]. Es ist bekannt, dass bei einem DHA-Mangel DPA dessen Platz im Gehirn einnimmt [175], DHA aber nicht funktionell ersetzen kann [298]. Erwartungsgemäß zeigten ω -3 defizient gefütterten WT Mäusen im Cortex tatsächlich signifikant erhöhte DPA-Konzentrationen im Vergleich zu Fat-1 Mäusen [416]. DPA konnte in eigenen Untersuchungen nur im PBS behandelten WT nachgewiesen werden und zeigte sich hier im Bereich des OVLTs homogen verteilt (nicht abgebildet). Es wäre jedoch von hohem Interesse, auch das räumliche wie zeitliche Auftreten von DPA im Bereich des OVLTs

während systemischer Entzündung und deren Auflösung zu analysieren. Wiederholungsmessungen LPS-behandelter Tiere beider Genotypen würden hier sicherlich interessante neue Erkenntnisse erbringen.

4.2 Die überlagernde Darstellung von MALDI Bildern und die multimodale Verknüpfung mit immunhistologisch gewonnenen Bilddaten führt zu einem synergistischen Informationsgewinn

Prinzipiell ist es ohne weiteres möglich gewonnene räumliche Information aus MALDI-Messungen farblich zu codieren und miteinander zu korrelieren. Dieses Vorgehen ist exemplarisch in Abbildung 105 nachvollziehbar. In dieser Darstellung wird noch einmal sehr viel deutlicher, dass LPC (18:0) (rot) eine erhöhte Signalintensität spezifisch im Bereich des OVLTs lediglich im LPS-behandelten Fat-1 Tier zeigt. In den WT hingegen war die Verteilung von LPC (18:0) homogen. LPE (18:1) (grün) hingegen zeigt in allen drei Situationen ein vergleichbares Verteilungsmuster mit intensiven Signalen in Leitungsbahnen und im Bereich des MnPOs, was bei überlagernder Darstellung besonders im Fat-1 Tier deutlich wird (C4).

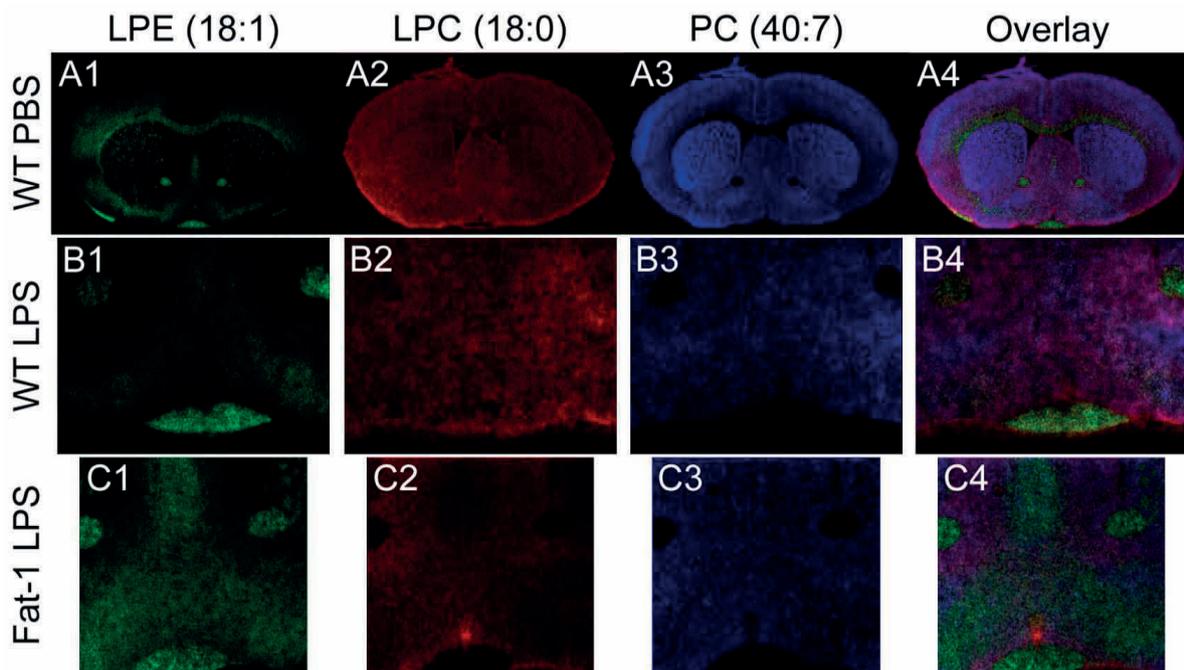


Abbildung 105

Farbige und überlagernde Darstellung verschiedener Massensignale im Bereich des *Organum vasculosum laminae terminalis* (OVLt) und der präoptischen Region 24 Stunden nach intraperitonealer Applikation von 2,5 mg/kg Lipopolysaccharid (LPS, B und C) oder Lösungsmittel (PBS, A) bei Wildtypmäusen (A und B) sowie einem Fat-1 Tier (C). Ein Überblick über anatomische Gegebenheiten ist in Teilbild A und B der Abbildung 52 dargestellt.

(1) LPE (18:1), (2) LPC (18:0), (3) PC (40:7) und (4) überlagernde Darstellung der drei vorgenannten Substanzen; gemessene Pixelgröße in A = 38 μm , in B und C = 10 μm ; gemessene Pixelanzahl: A = 250 x 160, B = 250 x 200, C = 240 x 230.

Angaben zu gemessenen Parametern finden sich in Tabelle 32, Tabelle 33 und Tabelle 34

Neben dem erstmaligen immunhistochemischen Nachweis von Entzündungsmarkern wie COX2, NF-IL6 und neutrophilen Granulozyten auf Gehirnschnitten nach negativ-Modus MALDI-MSI, kann mit diesen und entsprechenden MALDI-Daten ein direkter Zusammenhang zu den entsprechenden Enzymen und Aktivierungsmustern im Gehirn gelingen. Eine Korrelation immunhistochemischer Daten und MALDI-MSI ist exemplarisch in Abbildung 106 dargestellt. Die Analyse einzelner Zellen mittels MALDI wurde von der Arbeitsgruppe Spengler bereits erfolgreich durchgeführt [462]. Es ist also möglich durch kombinierten Einsatz verschiedener bildgebender Verfahren die Korrelation exprimierter Entzündungsmarker mit zellspezifischen oder regionalen Lipidprofilen vorzunehmen. Der ausgedehntere Einsatz dieser Techniken zu unterschiedlichen Zeitpunkten im Verlaufe einer systemischen Entzündung und deren Auflösung, würden erlauben die Dynamik von Lipid-Wechseln und Entzündungsmarkern hochauflösend zu verfolgen. Es gibt bereits Daten die bestätigen, dass ω -6 PUFA sowie die COX2-Expression im Cortex von Fat-1 Mäusen geringer sind als in WT Mäusen [52]. Über die Verteilung in Strukturen mit unvollständiger BHS sind die Daten allerdings nach wie vor völlig unzureichend.

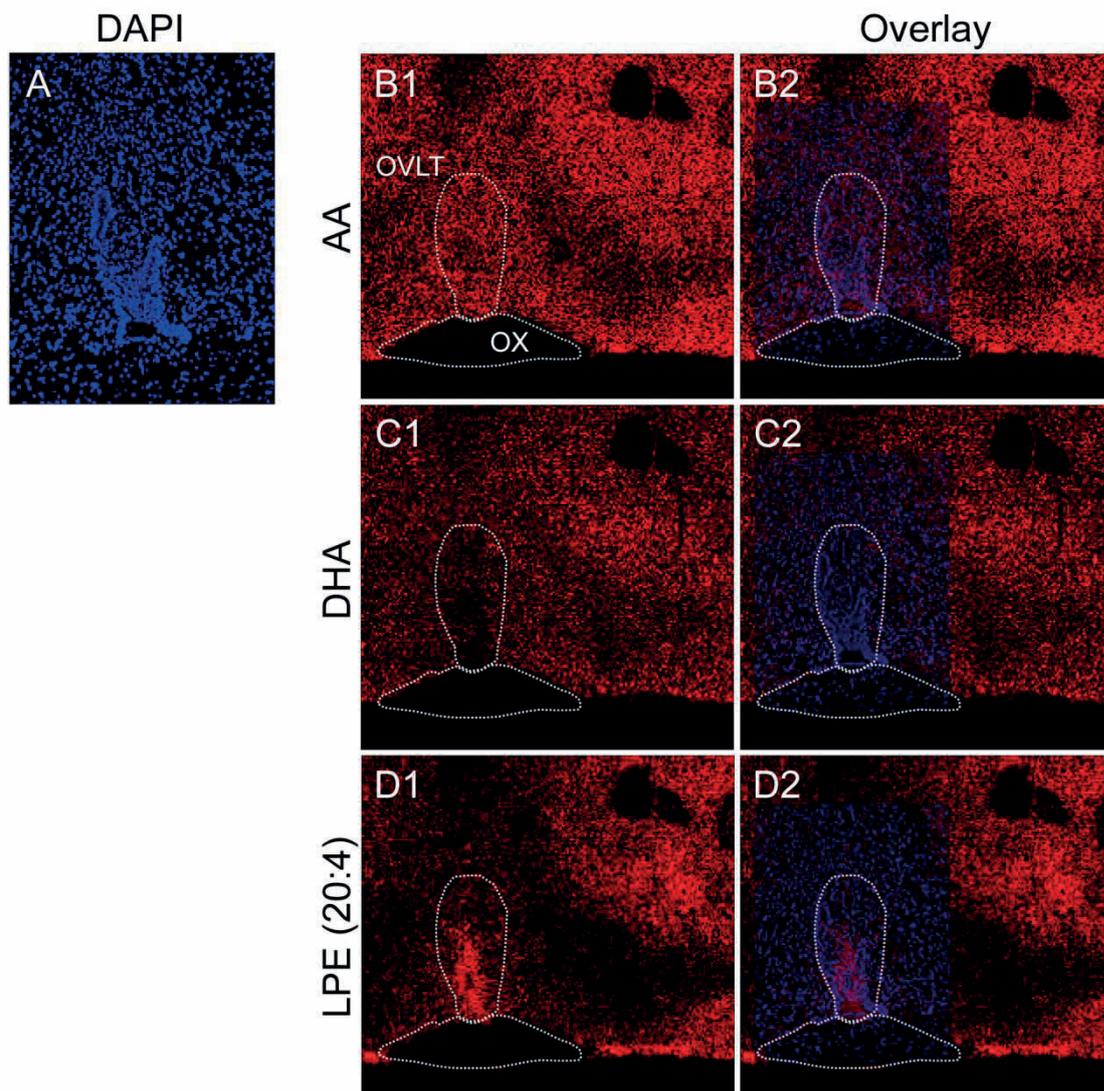


Abbildung 106

Überlagernde Darstellung von immunhistochemischer Zellkernfärbung (DAPI, A) im Bereich des OVLTs und ortsgleichen MALDI-Daten des selben Schnittes. Darstellung einer Wildtypmaus, 24 Stunden nach intraperitonealer Applikation von Lösungsmittel (PBS). Die Signalstärke des gemessenen AA-Signals ist deutlich höher als die des DHA-Signals, weswegen das entsprechende Lipidsignal (rot) in der Überlagerung B2 deutlicher hervortritt als in C2. D2 zeigt besonders deutlich die sehr gute Korrelation des OVLTs mit dem verstärkten LPE (20:4) Signal. Ein Überblick über anatomische Gegebenheiten ist in Teilbild A und B der Abbildung 52 dargestellt. (B) Arachidonsäure (AA), (C) Docosahexaensäure (DHA), (D) LPE (20:4); (2) jeweils überlagernde Darstellung von (1) mit Zellkernfärbung (A); ox = Sehnervenkreuzung; gemessene Pixelgröße in B - D = 10 µm; gemessene Pixelanzahl in B - D = 215 x 270. Angaben zu gemessenen Parametern finden sich in Tabelle 36.

4.3 Limitationen und Grenzen von MALDI-MSI

Wie bereits angesprochen gibt es eine Beziehung zwischen der mit MALDI-MSI gemessenen Signalintensität eines Ions und dessen Konzentration im Gewebe. Diese Beziehung wird durch diverse Faktoren beeinflusst. Zum einen ist die Effizienz der Ionisierung bei verschiedenen Molekülen unterschiedlich, zum anderen sind sogenannte Unterdrückungseffekte bekannt [201]. Diese beschreiben Interaktionen von Analyten untereinander wie auch mit Matrixmolekülen. Generell ist aber eine gute Korrelation zwischen der Stärke von Phospholipidsignalen und deren Vorkommen im Gewebe gegeben [201]. Soll also eine absolute Quantifizierung oder eine Konzentrationsberechnung auf Basis von MALDI-Ergebnissen erfolgen, müsste zunächst die Ionisationseffizienz einzelner Moleküle spezifisch für das Zielgewebe (hier Gehirn) ermittelt werden. Hierzu wäre die Verwendung von isopenmarkierten Lipidstandards für jede Zielsubstanz notwendig. Einfacher, und für eine differenzierte Aussage zwischen Versuchsgruppen völlig ausreichend, ist eine relative Quantifizierung unter Einbezug der Signalintensität eines Matrixpeaks oder gemittelter Peaks aller Signale zur Normalisierung (interner Standard). Eine Vergleichbarkeit unterschiedlicher Messungen sollte dann bei gleicher Einstellung weitere Messparameter möglich sein. Eine weitere Möglichkeit einer Quantifizierung besteht in der Anwendung von *liquid chromatography* (LC) -Verfahren, wobei jedoch die räumliche Auflösung völlig verloren geht. Eine parallele Anwendung beider Techniken (LC-MS und MALDI) wäre für eine Quantifizierung und gleichzeitige Ortsauflösung denkbar.

Die Fülle an detektierbaren Phospholipid-Spezies ist interessanterweise bei MALDI-MSI kleiner als beispielsweise bei der Anwendung von *electrospray ionisation liquid chromatography-MS* (ESI-LC-MS) [492]. Allerdings ist es mittels ESI nicht möglich eine örtliche Auflösung in Gewebeschnitten zu erzielen, da gelöstes Probenmaterial zur Ionisation versprüht wird [51]. Zudem können vor allem kleine Moleküle analysiert werden [102]. Somit wurde diese Methode für die verfolgten Zwecke als ungeeignet eingestuft.

Weiterhin nicht auflösbar auf der Basis der akkuraten Masse sind Isomeren von Phospholipiden gleicher Elementarzusammensetzung, wie sie in großer Zahl in der Natur vorkommen. Weder sind Fettsäurepaare gleicher Gesamt-Kettenlänge unterscheidbar, noch können Doppelbindungspositionen (z.B. ω -3 / ω -6) mittel einfachem MALDI-MSI

identifiziert werden. Hierzu müssten MS/MS-Messungen angeschlossen werden [423]. Diese Methode wird auch als Tandem-MS bezeichnet. Hierbei werden Vorläuferionen fragmentiert, wobei für verschiedene Lipidspezies typische Fragmente oder Bruchstücke entstehen, die Rückschlüsse auf die Struktur der Ausgangssubstanzen zulassen [51]. Diese Methode ist jedoch extrem arbeits- und zeitintensiv. Daher war es nicht möglich, solche Experimente durchzuführen ehe ein Screening detektierbarer, potentieller Zielsubstanz erfolgte. Zur Aufklärung beispielsweise der Struktur der Substanz m/z 874,53 oder der sicheren Identifizierung isomerer Strukturen wären solche Untersuchungen anzuschließen.

Außerdem ist bei MS-Untersuchungen von Lipidspezies immer auch auf die Lagerungsdauer der zu untersuchenden Gewebe besonders zu achten. So kommt es zeit- und temperaturabhängig zu einer Abnahme von Phospholipidsignalen und einer Zunahme von Lysophospholipidspezies [384]. Es wird empfohlen, Proben nach dem Schneiden nicht länger als ein Jahr bei -80 °C zu lagern [567]. Um diesem Umstand Rechnung zu tragen und eine Oxidation von Zielsubstanzen zu vermeiden, wurden im Rahmen dieser Arbeit Schnittpräparate für MALDI-Messungen erst wenige Tage vor der Messung vorbereitet und bis zur Messung bei wenigstens -54 °C gelagert.

5. Zusammenfassung der gewonnenen Erkenntnisse und daraus abgeleitete Hypothesen

5.1 CyPPA als Therapeutikum und unerwartete Wirkungen

- Weder LPS-induzierte Parameter der *sickness response* (Adipsie, Anorexie, motorische Aktivität sowie Fieber und die sich anschließende Hypothermie) noch die genomische Aktivierung hypothalamischer und systemischer inflammatorischer Marker wurden durch die Behandlung mit CyPPA (24 Stunden und zusammen mit LPS) beeinflusst. Auch periphere Zytokin-Konzentrationen blieben unbeeinflusst.
 - Die Dosierung von CyPPA wurde zwar entsprechend früherer Studien ausgewählt, es besteht jedoch die Möglichkeit einer zu kurzen Halbwertszeit, die eine häufigere Gabe von CyPPA notwendig macht. Zudem könnte der LPS-Stimulus zu stark für den Nachweis kleinerer Effekte gewesen sein.
- Weder die basale noch die LPS-induzierte hypothalamische oder corticale Expression von CD68 wurde durch CyPPA beeinflusst. Ferner gab es keine nachweisbare Veränderung der mikroglialen Morphologie (CD11b Immunfluoreszenz).
 - Die Wirkung von CyPPA auf diese Faktoren zu einem anderen als den analysierten Zeitpunkten erscheint möglich. Ebenso können Unterschiede zwischen mit CyPPA und mit Solvent behandelten Tieren in weiteren Parametern der Mikrogliaaktivierung nicht ausgeschlossen werden.

- CyPPA-Behandlung unter nicht-entzündlichen Bedingungen führte ohne Einfluss auf periphere Zytokine zu einer erhöhten Körpertemperatur und motorischen Aktivität. Überdies zeigten mit CyPPA behandelte Mäuse reduzierte Adenosin-Konzentrationen und tendenziell erhöhte ATP-Konzentrationen in der Leber.
 - CyPPA scheint den Metabolismus zu erhöhen. Die Induktion einer initial gesteigerten extra-mitochondrialen Atmung durch CyPPA konnte in anderen Studien im Zellkultursystem kürzlich unter Verwendung von *seahorse*-Analysen gezeigt werden [419, 420]. Eine erhöhte ATP-Synthese geht mit einer vermehrten Wärmebildung einher und kann so die erhöhte motorische Aktivität und Körpertemperatur erklären.
- Zwei Stunden nach Behandlung mit CyPPA zeigte sich eine reduzierte hypothalamische mRNA-Expression von SOCS3 und eine erhöhte Expression von NF-IL6 im Hypothalamus und I κ B α im Hypothalamus und Cortex. Immunfluoreszenz-Analysen wiesen keinen Einfluss auf die STAT3-Expression nach. Westernblot-Analysen zeigten eine durch CyPPA reduzierte NF κ B-Aktivierung im Cortex.
 - CyPPA zeigt *in vivo* modulatorische Eigenschaften auf die zellulären STAT3- und NF κ B-Signalwege im Gehirn die von therapeutischem Nutzen sein können.

Zusammenfassend kann bestätigt werden, dass CyPPA prinzipiell geeignet ist, LPS-induzierte neuroinflammatorische Prozesse *in vivo* zu modulieren. Dabei müssen jedoch potentielle Unterschiede der Dosis-Wirkung und Nebenwirkungen wie eine erhöhte Körpertemperatur, ein Anstieg der motorischen Aktivität sowie eine Erhöhung des metabolischen Umsatzes beachtet werden.

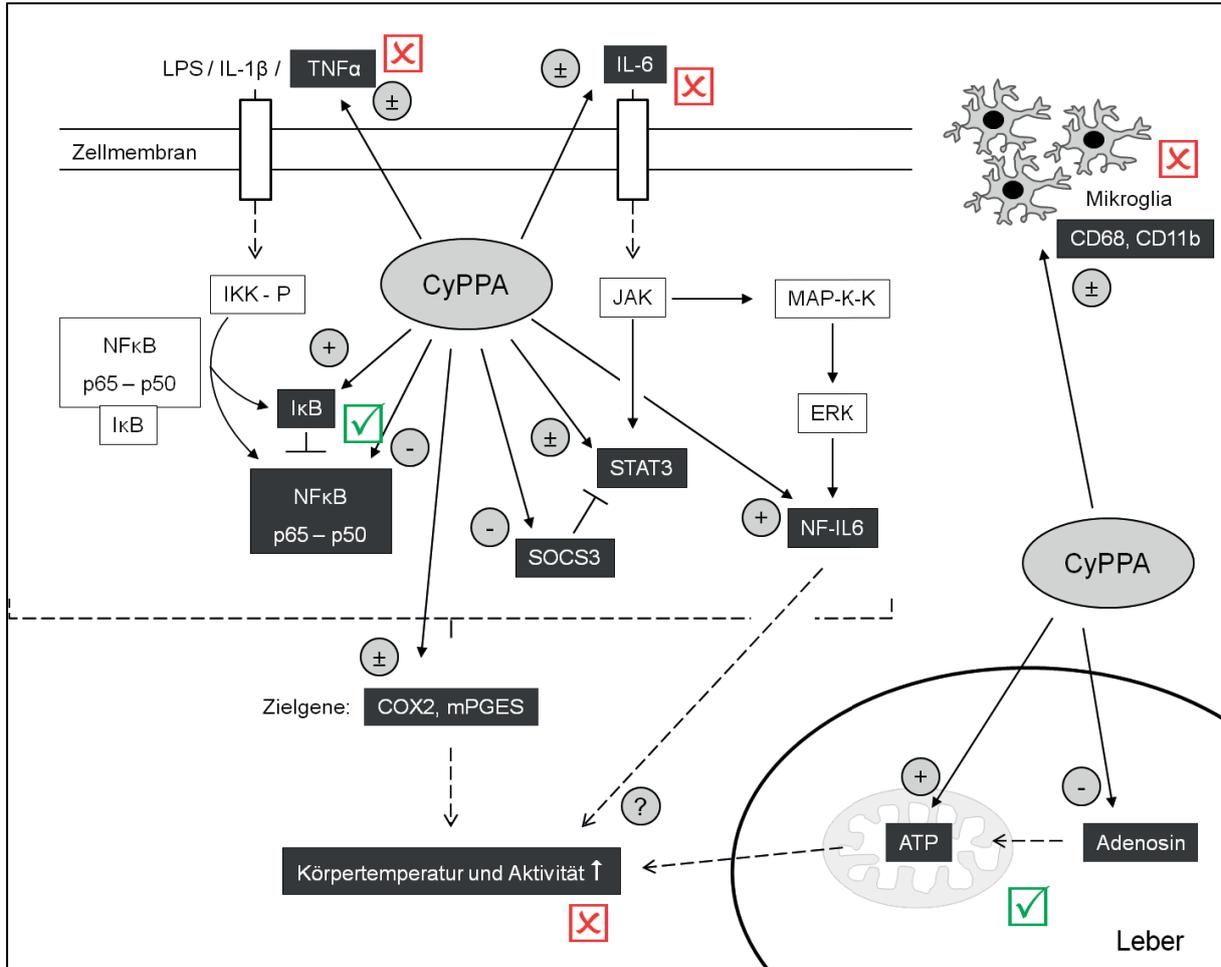


Abbildung 107

Schematische Darstellung der hier ermittelten Daten zu CyPPA-bedingten Wirkungen auf ausgewählte inflammatorische Kaskaden im Gehirn sowie die Wirkung auf die Körpertemperatur und motorische Aktivität, auf Mikroglia und den Metabolismus der Leber. Die Abbildung zeigt stark vereinfacht die in Kapitel 1.1.2 beschriebenen inflammatorischen Signalwege und die durch CyPPA-bedingten Veränderungen dieser. Zudem wird der Einfluss von CyPPA auf die Expression mikroglialer Marker und die Synthese von für den Energiestoffwechsel wichtigen Nukleotiden der Leber dargestellt.

Periphere Zytokinkonzentrationen waren zu keinem Zeitpunkt von CyPPA beeinflusst (TNF- α und IL-6). CyPPA wirkte ebenfalls nicht auf die Expression hypothalamischer und corticaler mRNA-Expression inflammatorischer Zielgene wie mPGES und COX2. Es erhöhte jedoch die motorische Aktivität sowie die Körpertemperatur. Beides wurde am ehesten durch den erhöhten Energieumsatz in der Leber bedingt, welcher sich durch tendenziell erhöhte ATP-Konzentrationen und damit einhergehend signifikant reduzierten Adenosin-Konzentrationen darstellte. Ein Einfluss auf Parameter mikroglialer Aktivierung war nicht nachweisbar. Sowohl der JAK-STAT-Signalweg als auch der NF-IL6- und NF κ B-Signalweg wurden durch CyPPA moduliert. Auf mRNA-Ebene wurde eine Aktivierung von NF κ B (I κ B α), auf Proteinebene (p65) eine Reduktion der Aktivierung beobachtet. Ferner war CyPPA fähig die SOCS3 mRNA-Expression im Hypothalamus zu reduzieren; die NF-IL6-Expression stieg an. Eine Beteiligung der vermehrten NF-IL6-Expression an der erhöhten Aktivität erscheint möglich [461].

☒ = In eigenen Versuchen gemachte Beobachtungen sind unterschiedlich zu Angaben in der Literatur; ☑ = gemachte Beobachtungen sind in Einklang mit Angaben in der Fachliteratur, CyPPA = Cyclohexyl-[2-(3,5-dimethyl-pyrazol-1-yl)-6-methyl-pyrimidin-4-yl]-amine, \pm = keine Beeinflussung durch CyPPA, + = Expression wurde durch CyPPA erhöht, - = Expression wurde durch CyPPA reduziert, LPS = Lipopolysaccharid, IL-1 β = Interleukin-1 β , TNF- α =

Tumornekrosefaktor α , IL-6 = Interleukin-6, IKK-P = phosphorylierter I κ B-Kinase-Komplex, NF κ B = nuclear factor kappa B, I κ B = inhibitor of kappa B, JAK = Janus-Kinase, STAT3 = signal transducer and activator of transcription 3, SOCS3 = suppressor of cytokine signaling 3, MAP-K-K = mitogen-activated protein-kinase-Kaskade, ERK = extracellular-signal regulated kinase, NF-IL6 = nuclear factor interleukin 6, COX2 = Cyclooxygenase 2, mPGES = mikrosomale Prostaglandin E Synthase, ATP = Adenosintriphosphat, CD68 = cluster of differentiation 68, CD11b = cluster of differentiation 11b

5.2 Fat-1

Die zusammenfassende Betrachtung der in dieser Arbeit gewonnenen physiologischen Parameter während einer LPS-induzierten *sickness response* zeigte nur schwach ausgeprägte Differenzen zwischen beiden untersuchten Genotypen. Wesentlich deutlicher war der Einfluss von ω -3 FS auf einen psychologischen Stressstimulus. Zum ersten Mal gelang es innerhalb der beiden untersuchten Genotypen nach PBS- oder LPS-Behandlung mehrere verschiedene Verteilungsmuster für Lipide auf der Ebene des OVLTs und des umgebenden Gewebes zu beschreiben. Ebenfalls hervorzuheben ist, dass es im Rahmen dieser Arbeit erstmals gelang nach erfolgter MALDI-Messung immunhistochemische Proteinnachweise zu führen.

5.2.1 Genotypabhängige Unterschiede in der LPS-bedingten Entzündungsreaktion

- ω -3 ausgewogen ernährte Tiere beider Genotypen zeigten keine Unterschiede der basalen Körpertemperatur und motorischen Aktivität. Ein moderater LPS-Stimulus induzierte keine genotypabhängigen Unterschiede der *sickness response* (Aktivität, Temperatur, IL-6-Plasmakonzentration, Futter- und Wasseraufnahme, Körpergewicht).
 - Endogen erhöhte ω -3-Konzentrationen in Fat-1 Mäusen haben keinen Einfluss auf basale oder durch 50 μ g/kg LPS induzierte Parameter während systemischer Inflammation.
- ω -3 defizient gefütterte Fat-1 Mäuse zeigten basal eine erhöhte Körpertemperatur während der Dunkelphase sowie eine generell erhöhte lokomotorische Aktivität gegenüber ω -3 defizient ernährten WT.
 - Ob diese Beobachtung einen „echten“ Unterschied widerspiegelt oder der kleinen Fat-1-Gruppengröße geschuldet ist bleibt in weiterführenden Untersuchungen zu klären.
- ω -3 defizient ernährte WT zeigten gegenüber ω -3 ausgewogen ernährten WT nach geringer LPS-Dosis (50 μ g/kg KGW) signifikante Unterschiede der Körpertemperatur während der Dunkelphase. Die initiale LPS-induzierte Lethargie erreichte nur bei ω -3 defizient ernährten WT ein signifikantes Niveau. Der direkte Vergleich beider LPS-behandelter Fütterungsgruppen zeigte keinen Unterschied auf.
 - Unterschiede sind mit hoher Wahrscheinlichkeit auf die unterschiedliche Anzahl untersuchter Tiere pro Gruppe zurückzuführen.
- ω -3 defizient ernährte Fat-1 zeigten nach einer hohen LPS-Dosis (2,5 mg/kg KGW) eine signifikant höhere erste Fieberphase als ω -3 defizient ernährte WT. Fat-1 Tiere

zeigten jedoch eine schnellere Genesung von der sich anschließenden Hypothermie. Weitere Parameter der *sickness response* waren unbeeinflusst.

- Bei ω -3 defizienter Fütterung bedingen endogen vermehrte ω -3 FS ein Eingangs höheres Fieber, später erholten sich Fat-1 Mäuse aber auch schneller. Der ω -3 Status hat in Verbindung mit dem Genotyp also einen komplexen Einfluss auf LPS-bedingte Veränderungen der Körpertemperatur. Ein einfacher Zusammenhang von ω -3 Status und „Gesundheitszustand“ ist nicht erkennbar.
- Die Plasmakonzentration des inflammatorischen Zytokins IL-6 stieg nach Immunstimulus in ω -3 defizienten WT dosisabhängig an. ω -3 defizient ernährte Fat-1 Mäuse zeigten nach einem starken Immunstimulus signifikant geringere Plasmakonzentrationen, die vergleichbar mit basalen Konzentrationen von Kontrolltieren waren.
 - Der ω -3 Status hat einen Einfluss auf LPS-induzierte IL-6-Plasmawerte.

5.2.2 Der Einfluss endogen erhöhter ω -3 FS auf Reaktionen im NES

- Die durch einen Käfigwechsel induzierte Temperatur- und Aktivitätszunahme war bei Fat-1 Mäusen signifikant höher als bei WT Tieren. Endzeitpunkte nach dem NES waren nicht vorgesehen. Somit standen keine Tiere zur Untersuchung von peripheren und zentralen Zytokinkonzentrationen zur Verfügung.
 - Eine Modulation der Stressreaktion durch den ω -3 Status ist trotz der geringen Gruppengröße wahrscheinlich. Bedingt durch die hohe Relevanz stressinduzierter Erkrankungen für den Menschen wäre ein detaillierteres Verständnis zugrundeliegender Einflüsse auf die HPA-Achse wünschenswert.

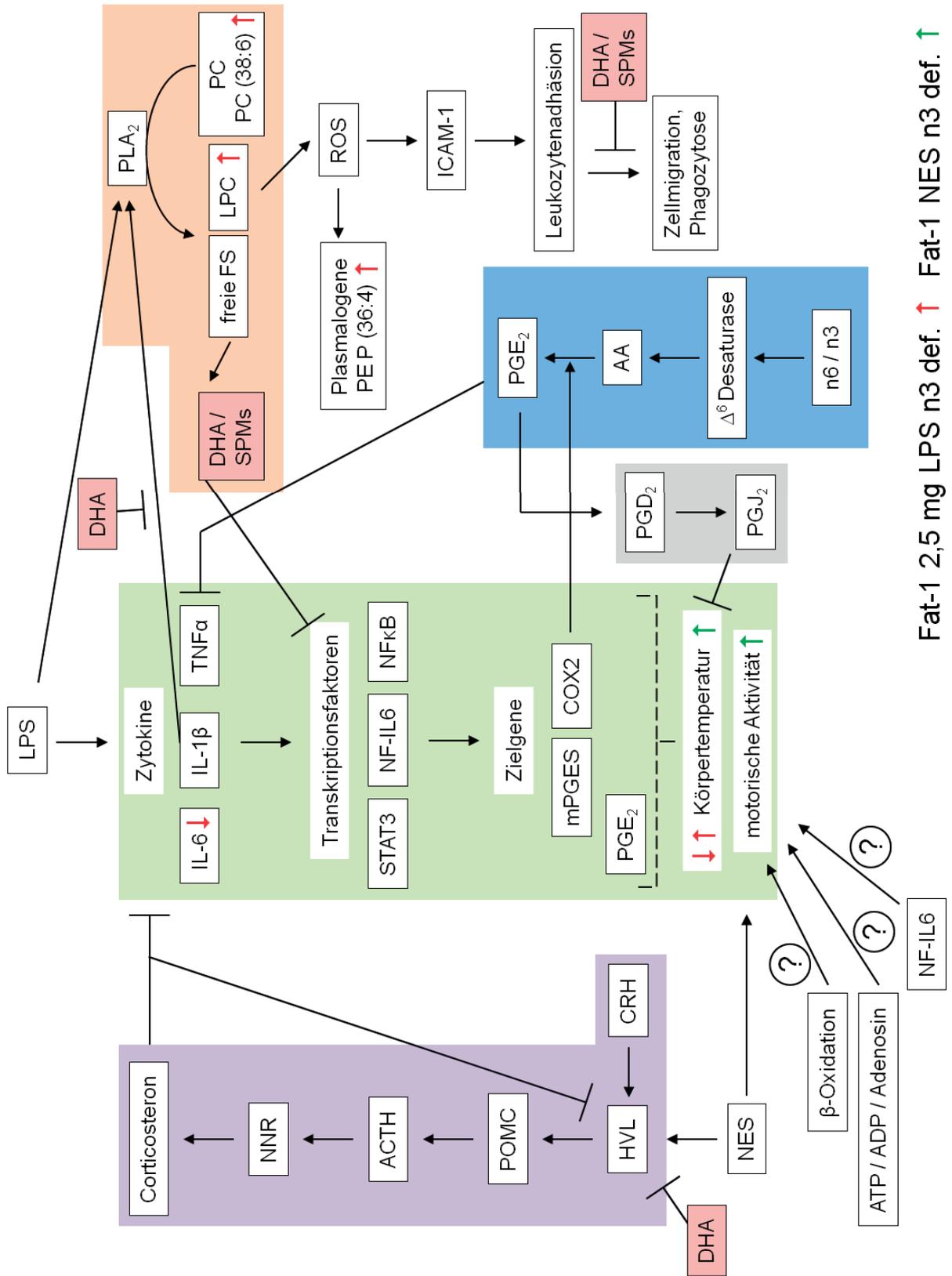
5.2.3 Lipide und Lipidmediatoren als pro-inflammatorische oder entzündungsauflösende Signale

5.2.3.1 Verteilung und Rolle detektierter Lipidspezies

- Lipidspezies zeigten wiederkehrende Distributionen mit Akkumulation im OVLT oder Abwesenheit in dieser Region im Vergleich zu benachbarten Hirnregionen und der Sehnervenkreuzung. Sowohl LPC (16:0), LPC (16:1), LPC (18:0), LPC (18:1) als auch PC (38:6), PC (38:7) und PG (38:5) zeigten eine Signalakkumulation im Bereich des OVLTs des LPS behandelten Fat-1 Tieres. Diese Signalverteilung war in Kontrolltieren nicht nachvollziehbar.
 - Die Anreicherung solcher Lipide im OVLT könnte Unterschiede in der LPS-induzierten Fieberreaktion erklären. Die Frage ob LPCs als pro- oder anti-inflammatorisch einzuordnen sind kann nicht abschließend beurteilt werden. In der Literatur gibt es diesbezüglich unterschiedliche Berichte. Das vermehrte Aufkommen in Fat-1 Tieren könnte entweder positive Effekte

von SPMs überlagern oder anderweitig Einfluss auf eine systemische Entzündung nehmen. Das neuroprotektive Potential von PC (38:6) macht dieses Phospholipid zu einer vielversprechenden Zielsubstanz / einem vielversprechenden Marker / Indikator für neuroinflammatorische Prozesse. Auch genannte LPCs sollten aufgrund ihrer vielseitigen Fähigkeiten als Zielsubstanzen weiter verfolgt werden.

- Die gesättigte Palmitinsäure zeigte ebenso wie die mehrfach ungesättigten FS AA und Docosatetraensäure verstärkte Signale im Bereich des OVLTs; eine homogene Verteilung konnte für die gesättigte Stearinsäure gezeigt werden. DHA-Signale waren im OVLT reduziert. Genotyp- oder behandlungsabhängige Unterschiede waren nicht nachweisbar.
 - Der Sättigungsgrad einer freien FS lässt keine Rückschlüsse auf deren Verteilung im Bereich des OVLTs zu. Die Bedeutung des OVLTs in der Informationsübertragung zwischen Peripherie und Gehirn wird aber durch die spezifische Anreicherung bestimmter FS hervorgehoben.
- Wie für andere Lipidspezies waren Verteilungsmuster von Plasmalogenen vielfältig. Als potentiell interessante Markersubstanz stellte sich PE P (36:4) heraus. Dieses Plasmalogen zeigte als einziges nachgewiesenes Plasmalogen eine Anreicherung im OVLT nach LPS-Stimulation, nicht jedoch in der Kontrollsituation.
 - PE P (36:4) könnte entsprechend der Literatur [182, 199] Bedeutung während systemischer Entzündungsreaktionen besitzen und sollte diesbezüglich weiter untersucht werden.
- SMs zeigten ein sehr auffälliges Verteilungsmuster, mit sehr deutlicher Abgrenzung des OVLTs zum umliegenden Gewebe. Genotyp- oder behandlungsabhängige Beeinflussung der Expression waren nicht nachweisbar.
 - Die biologische Funktion von SMs in der Region des OVLTs bleibt zunächst unklar, soll jedoch weiter untersucht werden.
- Es gelang erstmals nach einer MALDI-Messung (negativer Ionen-Modus, pNA als Matrix) der immunhistochemische Nachweis von COX2, NF-IL6, vWF und neutrophilen Granulozyten.
 - Die multimodale Verknüpfung (Überlagerung, Korrelation) der histologischen und massenspektrometrischen Bilddaten ergeben so die Möglichkeit eines erheblichen synergistischen Informationsgewinns. Zudem ist die Ausnutzung der tierischen Gewebe im Sinne des 3R-Prinzips optimiert, die Anzahl benötigter Tiere für verschiedene bildgebende Anwendungen kann so reduziert werden.



Fat-1 2,5 mg LPS n3 def. ↑ Fat-1 NES n3 def. ↑

Abbildung 108

Schematische Darstellung verschiedener Kommunikationswege zwischen Immunsystem, Gehirn und Peripherie. Die Stimulation mit *pathogen-associated molecular patterns* wie beispielsweise Lipopolysaccharid (LPS) bewirkt eine periphere Freisetzung von inflammatorischen Zytokinen wie Interleukin (IL)-1 β , IL-6 und dem Tumornekrosefaktor (TNF) - α , welche Zellen der Blut-Hirn-Schranke oder sensorischer circumventrikulärer Organe aktivieren. Über die Bildung sekundärer Mediatoren aktivieren diese wiederum hypothalamische Kerngebiete. Dabei kommt es zur Aktivierung von Transkriptionsfaktoren wie *nuclear factor kappa B* (NF κ B), *nuclear factor interleukin 6* (NF-IL6) und *signal transducer and activator of transcription* (STAT3), welche die Expression von Zielgenen regulieren. Zu diesen gehören geschwindigkeitsbestimmende Enzyme der Prostaglandin E (PGE) Synthese wie die mikrosomale Prostaglandin E Synthase (mPGES) und die Cyclooxygenase (COX) 2. Diese Vorgänge induzieren letztlich die *sickness response*.

Weiterhin stimulieren LPS und IL-1 β die Phospholipase A₂ (PLA₂). Dieses Enzym spaltet unter Freisetzung von Lysophosphocholinen (LPC) freie Fettsäuren (FS) der sn-2 Position von Phosphatidylcholinen (PC) ab. Entstehende LPC können dabei unter anderem die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) induzieren, welche wiederum zur Expression von Adhäsionsmolekülen (ICAM-1) auf Endothelzellen beitragen. Dadurch kommt es zur Leukozytenadhäsion und anschließender Diapedese von z.B. neutrophilen Granulozyten. ROS können ferner zur Oxidation von Plasmalogenen beitragen. Freigesetzte FS wie Docosahexaensäure (DHA) und Eicosapentaensäure (EPA) können zu *specialized pro resolving mediators* (SPMs) verstoffwechselt werden, FS wie Arachidonsäure (AA) zu Prostaglandinen und anderen Eicosanoiden. Dabei ist bekannt, dass ein zugunsten von ω -6 FS verschobenes FS-Muster in der Leber die Umsetzung von Vorläufersubstanzen zu AA begünstigt. PGE₂, als Stoffwechselprodukt von AA, ist zunächst klar pro-inflammatorisch. Die Rolle dessen Abbauproduktes PGD₂ ist weitgehend unklar. Einem weiteren Abbauprodukt 15-deoxy $\Delta^{12,14}$ PGJ₂ werden anti-inflammatorische Eigenschaften zugesprochen.

Sowohl durch inflammatorische (z.B. IL-1 β , TNF- α , IL-6) als auch durch psychologische Stressoren (NES) kann die Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse (HPA-Achse) aktiviert werden. Aus dem Hypothalamus freigesetztes *corticotropin releasing hormone* (CRH) bedingt eine Proopiomelanocortin (POMC) -Freisetzung aus dem Hypophysenvorderlappen (HVL). POMC wird zum adrenocorticotropen Hormon (ACTH) abgebaut und in die Blutbahn abgegeben. ACTH bewirkt eine Freisetzung von Corticosteron aus der Nebennierenrinde (NNR). Corticosteron wirkt als endogenes Glucocorticoid stark anti-inflammatorisch.

Sowohl für SPMs als auch für DHA sind etliche Wirkungen auf verschiedenen Ebenen der beschriebenen Vorgänge belegt. ω -3 defizient (n3 def.) gefütterte Fat-1 Mäuse zeigten nach einem starken LPS-Stimulus eine signifikant höhere erste Fieberphase, im späteren Temperaturverlauf jedoch eine beschleunigte Normalisierung gegenüber Wildtyp-Tieren. Ferner waren IL-6-Plasmakonzentrationen nach 24 Stunden signifikant reduziert. Diese Veränderungen gingen mit vermehrten LPC (16:0), (16:1), (18:0), (18:1) und (18:2), PE P (36:4) und PC (38:6) Signalen im Bereich des OVLTs einher. Interessanterweise ist für PC (38:6) eine neuroprotektive Wirkung beschrieben. Eine Erhöhung der Körpertemperatur ebenso wie die induzierte motorische Aktivität im *novel environment stress* (NES) war bei Fat-1 Mäusen signifikant ausgeprägter. Ob an diesen Veränderungen beispielsweise auch NF-IL6, veränderte ATP/Adenosin-Verhältnisse (vgl. Teilstudie „CyPPA“) oder abgewandelte, für die β -Oxidation zur Verfügung stehende FS-Muster beteiligt sind bleibt durch zukünftige Studien zu klären.

5.2.3.2 Methodik:

- Prinzipiell lassen sich freie FS, verschiedene Phospholipide, Lysophospholipide und diverse andere im Rahmen dieser Arbeit nicht näher definierte Substanzen mittels MALDI-MSI hochauflösend räumlich darstellen. Die Darstellung von SPMs und Eicosanoiden gelang nicht.
- Für den Nachweis freier FS ist die Messung im negativen Ionen-Modus vorteilhaft. Die Darstellung der meisten PCs und LPCs gelang im positiven Ionen-Modus.
 - Eicosanoide und SPMs sind aufgrund ihrer Ionisationseigenschaften wahrscheinlich im negativen-Ionenmodus detektierbar. pNA eignet sich generell als Matrix für Messungen im negativen Ionen-Modus.
- Eine Auflösung von 10 μm pro Pixel ist ausreichend um Bereiche wie das OVLT darzustellen. Einzelzellnachweise sind im Gewebeverband denkbar.
 - Eine noch höhere räumliche Auflösung wäre hierzu wünschenswert. Eine Erweiterung der Methode mit Mikroinjektion von Matrixlösung in individuelle Zellen ist dabei denkbar [492].
- Um eine höhere Sensitivität der Methode zu erzielen erscheint es sinnvoll MALDI-MSI beispielsweise mit LC-MS Verfahren zu kombinieren, dann sollte auch der Nachweis von Eicosanoiden und SPMs problemlos möglich sein. Jedoch ginge bei einem solchen Vorgehen die Ortsauflösung weitgehend verloren.
 - Die Entwicklung sensitiverer MALDI-Verfahren, eventuell unter Verwendung neu synthetisierter Matrices, muss dafür vorangetrieben werden.
- Um eine höhere Sicherheit der richtigen Zuordnung der potentiellen Markersubstanzen (LPCs, SMs, einige PCs und PE Ps) zu erhalten, sollten spezifisch für diese vorausgewählten Massen in weiteren Studien MS/MS-Untersuchungen angeschlossen werden.
- Um den Nachweis eines breiteren Spektrums verschiedener Substanzen aus einem Gewebeschnitt zu ermöglichen, wäre es denkbar ein Messverfahren zu entwickeln, dass die wechselnde, bildgebende Aufnahme beider Ionenpolaritäten während eines Messvorgangs ermöglicht.
 - Aufnahmen nebeneinanderliegender Pixel mit abwechselnden Messmodi würden zu einem Gesamtpixel zusammengefasst. Einer daraus resultierenden Reduktion der Messauflösung stünde ein Vielfaches an gewonnenen Informationen entgegen.

5.2.3.3 Weiterführende Untersuchungen

- Untersuchungen zu weiteren Endzeitpunkten als 24 Stunden wären wünschenswert um die Dynamik der Expression der hier ausgemachten potentiellen Marker beschreiben zu können. Auch die Analyse nach Applikation weiterer Dosierungen

(MALDI-MSI auch nach Gabe von 50 µg/kg LPS oder septischen Dosen) sowie die Verabreichung beispielsweise viraler Immunstimuli sind denkbar.

- Es wäre außerdem von großem Interesse auch oxidierte PUFA und Phospholipide in Analysen zu integrieren. In einer Studie wurde berichtet, dass eine vermehrte Oxidation von FS das Metabolom von Neuronen des Hypothalamus beeinflusst und dabei vor inflammatorischen Schäden schützt [324].
 - Die räumliche Darstellung von oxidativem Stress und entsprechend resultierenden Metaboliten könnte helfen diese Prozesse besser zu verstehen und gegebenenfalls therapeutisch nutzbar zu machen. Ferner könnten Hinweise auf Ursachen für im Bereich des OVLTs verstärkte PE P (36:4) Signale aufgedeckt werden.
- Neutrophile Granulozyten können durch die Bildung von pro-inflammatorischen Mediatoren Inflammation verstärken, gleichzeitig tragen sie aber auch Enzymsysteme für die SPM-Synthese. SPMs selbst limitieren die Einwanderung von Leukozyten in periphere Organe. Im Rahmen dieser Arbeit gelang der Nachweis von neutrophilen Granulozyten in MALDI-gemessenen Gewebeschnitten.
 - Eine Verknüpfung von Verteilungsmustern von SPMs und der Quantifizierung ins ZNS migrierter Neutrophiler würde die Bedeutung von SPMs für das Gehirn herausarbeiten.
- Heute ist bekannt, dass RvD1 seine Wirkung nicht nur über GPRs entfaltet, sondern die Entzündungsantwort auch über kleine, nicht kodierende RNA-Stränge (MicroRNAs) moduliert. MicroRNAs sind beispielsweise in die posttranskriptionale Genregulation eingebunden [289] und beeinflussen das Immunsystem sowie Neuroinflammation [521]. Die Modulation von miRNA-155 und miRNA-146 ist sehr wahrscheinlich Teil des Wirkmechanismus von NPD1 und RvD1 [232, 418].
 - Eine Untersuchung von MicroRNAs als Mediatoren im hier untersuchten Zusammenhang ist sicherlich lohnend.

Neuroinflammation ist eine wichtige Komponente vieler neurodegenerativer Pathologien wie Parkinson und Alzheimer. In der Fachliteratur finden sich einige Studien, die vielversprechendes Potential zur Behandlung solcher Pathologien durch den K⁺-Kanal Agonisten CyPPA versprechen. Die meisten dieser Erkenntnisse beruhen auf *in vitro* Untersuchungen. Die hier erfolgten *in vivo* Untersuchungen zur Wirkung von CyPPA zeigten, dass die Anwendung als anti-inflammatorisches Agens abhängig vom Ausmaß und der Stärke der Entzündungsreaktion denkbar ist. CyPPA besitzt die Fähigkeit inflammatorische Mechanismen auch *in vivo*, und hier vor allem im Hypothalamus und Cortex, zu modulieren. Vor einem möglichen klinischen Einsatz gilt es aber beobachtete Nebeneffekte weiter zu charakterisieren.

Weitaus größere Popularität als anti-inflammatorische Strategie besitzt der Einsatz von ω-3 FS. Dabei sind Ergebnisse der eigenen Pilotuntersuchungen im Hinblick auf die Wirkung auf

Parameter der *sickness response* hinter den Erwartungen zurück geblieben. Nichtsdestotrotz konnten in dieser Arbeit überaus interessante Erkenntnisse gewonnen werden. Der Einsatz von MALDI-MSI hat sehr vielversprechende, mögliche Markersubstanzen detektiert, deren Expressions-Dynamik innerhalb systemischer Entzündungsreaktionen und deren genauen biologischen Funktionen im Bereich von CVOs gilt es in zukünftigen Studien näher zu beschreiben. Damit könnte ein Durchbruch für neue therapeutische Optionen erzielt werden.

V. Zusammenfassung

Systemische Entzündungsreaktionen führen zur sogenannten Akuten Phase Reaktion. Als zentralnervöse Komponente dieser Reaktion kommt es zu Krankheitssymptomen wie Fieber, Lethargie, Adipsie und Anorexie, die zusammenfassend als *sickness response* bezeichnet werden. Experimentell lässt sich eine solche Reaktion zuverlässig und reproduzierbar durch die intraperitoneale Verabreichung von bakteriellem Lipopolysaccharid (LPS) induzieren. Systemische Entzündungsprozesse können außerdem primär nicht entzündliche oder neurodegenerative Erkrankungen verstärken oder zumindest beeinflussen. So ist ein besseres Verständnis zugrundeliegender Mechanismen speziell auch für die Entwicklung anti-inflammatorischer Strategien und Therapien von immenser Bedeutung zur Behandlung von Erkrankungen des Gehirns. Heute ist bekannt, dass die Beendigung von Entzündungen einem strikt programmierten Ablauf folgt und Lipidmediatoren dabei wichtige terminale Mediatoren der Kommunikation zwischen Immunsystem und Gehirn sind. Dabei beinhaltet die Auflösung von Entzündungen einen sogenannten Klassenwechsel von beteiligten Lipidmediatoren von einem Prostaglandin und Leukotrien dominierten Milieu hin zu hohen Konzentrationen von Lipoxinen und Resolvinen. Lipoxine und Resolvine gehören zu den sogenannten *specialized pro-resolving mediators* (SPMs), die aus ω -3 Fettsäuren synthetisiert werden. Informationen über deren Bildung speziell im Gehirn sind unzureichend; die ihrer Wirkung zugrundeliegenden Mechanismen und Signalwege vielfach unbekannt. Neben der Erforschung solcher Lipidmediatoren gibt es weitere Ansätze modulierend in Entzündungsreaktionen einzugreifen. Hierzu zählt die Anwendung von pharmakologischen Agonisten kleiner Ca^{2+} -abhängiger K^{+} -Kanäle, wie beispielsweise CyPPA (Cyclohexyl-[2-(3,5-dimethyl-pyrazol-1-yl)-6-methyl-pyrimidin-4-yl]amine). CyPPA wurde *in vitro* bereits erfolgreich zur Reduktion der LPS-bedingten Expression inflammatorischer Zytokine durch Mikroglia eingesetzt. Die vorliegende Arbeit beschäftigte sich im Mausmodell (I) sowohl mit dem therapeutischen Potential von CyPPA für die Behandlung neuroinflammatorischer Zustände (II) als auch mit der anti-inflammatorischen Wirkung und Verteilung von Lipiden und Lipidmediatoren im Gehirn.

(I) Eine zweimalige Behandlung von C57BL/6J Mäusen mit CyPPA (15 mg/kg KGW) 24 Stunden vor und gleichzeitig mit der Applikation eines starken LPS-Stimulus (2,5 mg/kg) hatte weder einen Einfluss auf die LPS-induzierte Aktivierung von Mikroglia (*cluster of differentiation* (CD)11b, CD68) noch auf zentralnervös kontrollierte Krankheitssymptome und die Expressionsprofile inflammatorischer Marker im Hypothalamus und der Peripherie. CyPPA induzierte jedoch unter nicht-inflammatorischen Bedingungen einen Anstieg der Körpertemperatur sowie eine Erhöhung der motorischen Aktivität. Diese Veränderungen gingen zum Zeitpunkt zwei Stunden nach CyPPA-Applikation mit einer reduzierten genomischen Aktivierung von SOCS3 (*suppressor of cytokine signaling 3*) und einer erhöhten mRNA-Expression von NF-IL6 (*nuclear factor interleukin 6*) im Hypothalamus und $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ (*inhibitor of kappa B*) im Hypothalamus und Cortex einher. Überdies war die NF κ B

(*nuclear factor kappa B*) -Aktivierung in corticalen Neuronen reduziert. Diese Ergebnisse könnten potentiell mit zuvor beschriebenen neuroprotektiven Wirkungen von CyPPA im Zusammenhang stehen. Außerdem ist bekannt, dass die Beeinflussung der genannten Signalwege ebenfalls neuroprotektiv wirken kann. Periphere Zytokine waren zu beiden untersuchten Zeitpunkten unbeeinflusst. Interessanterweise war in CyPPA behandelten Tieren die erhöhte Körpertemperatur und Aktivität von reduzierten Adenosin-Konzentrationen und tendenziell erhöhten Adenosintriphosphat-Konzentrationen in der Leber begleitet. Dieser Zusammenhang spricht dafür, dass CyPPA den Metabolismus verstärken kann, wie andere es kürzlich in Zellkultur zeigen konnten. Insgesamt ist CyPPA in der Lage neuroinflammatorische Prozesse zu modulieren. Die beobachteten metabolischen Effekte mit Wirkung auf die Körpertemperatur und die motorische Aktivität sind jedoch potentielle, wichtige Nebenwirkungen, die bei einer therapeutischen Anwendung Berücksichtigung finden müssen.

(II) Das zweite Teilprojekt dieser Arbeit beschäftigte sich mit der Rolle von ω -3 Fettsäuren und Lipidmediatoren bei der Beendigung von Inflammation und deren Einfluss auf die Entwicklung zentralnervös gesteuerter Krankheitssymptome. Hierzu verwendete transgene Fat-1 Mäuse besitzen die Fähigkeit endogen große Mengen ω -3 Fettsäuren zu synthetisieren. Weder bei ω -3 ausgewogener noch bei ω -3 defizienter Fütterung zeigten sich nach einem geringen LPS-Stimulus (50 μ g/kg) Unterschiede in der Ausprägung der *sickness response* oder peripherer Zytokinkonzentrationen von Fat-1 Tieren und Wildtypieren (C57BL/6N, WT) im Vergleich zu *phosphate buffered saline* (PBS) -stimulierten Kontrollen. Nach der Gabe einer hohen LPS-Dosis (2,5 mg/kg) zeigten ω -3 defizient ernährte Fat-1 Tiere einen signifikant höheren Temperaturanstieg in der ersten Fieberphase, jedoch auch eine tendenziell beschleunigte Erholung von der sich anschließenden Hypothermie sowie reduzierte Interleukin-6-Plasmakonzentrationen zum Zeitpunkt 24 Stunden nach Stimulation. Zudem waren die Stress-induzierte Aktivitätserhöhung sowie die Körpertemperaturerhöhung in Fat-1 Mäusen gegenüber WT signifikant erhöht. Ein Einfluss des ω -3 Status auf die Funktion der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse ist bereits beschrieben worden, jedoch wurde bisher angenommen, dass eine suffiziente Versorgung mit ω -3 Fettsäuren Stress-induzierten Veränderungen vorbeugt und diese nicht zusätzlich verstärkt. Die eigenen Beobachtungen zeigen deutlich die Vielschichtigkeit und Komplexität der Funktion von ω -3 Fettsäuren und dass es keinen einfachen Zusammenhang zwischen dem „ ω -3 Status“ und dem „Gesundheitszustand“ gibt.

Ein weiterer Schwerpunkt dieser Arbeit war die vergleichende Analyse der räumlichen Verteilung von Lipiden während eines inflammatorischen Insults im Gehirn von Fat-1 und WT Mäusen. Dabei wurden das OVLT (*Organum vasculosum laminae terminalis*) und die präoptische Region als Zielregion definiert. Das OVLT ist ein sensorisches circumventrikuläres Organ mit einer unvollständigen Bluthirnschranke, welches für seine besondere Bedeutung für die Kommunikation von Immunsystem und Gehirn bekannt ist.

Sowohl die präoptische Region als auch das OVLT sind an der Entstehung und Aufrechterhaltung von Fieber beteiligt. Zur Darstellung von ω -3 Fettsäure-haltigen Lipiden und freien Fettsäuren in diesen Regionen wurde eine bildgebende Matrixassistierte Laserdesorption / Ionisation Massenspektrometrie (MALDI-MSI) durchgeführt. Dieses Verfahren erlaubte zum ersten Mal die hochauflösende, räumliche Darstellung verschiedenster Massensignale in diesen Gehirnstrukturen. Es gelang der Nachweis von freien Fettsäuren und verschiedenen Phospholipiden. Die Suche nach Substanzen mit spezifischem, auf das OVLT beschränktem Vorkommen, zeigte erstmals eine Akkumulation von Lysophosphocholin (LPC) (16:0), LPC (16:1), LPC (18:0), LPC (18:1) sowie Phosphatidylcholin (PC) (38:6), PC (38:7) und Phosphatidylglycerin (38:5) in der Zielregion lediglich des LPS-behandelten Fat-1 Tieres 24 Stunden nach Stimulation, nicht jedoch in Kontrollsituationen (WT PBS und WT LPS). Dabei kann eine lokale Anreicherung von LPCs einerseits als Indikator für einen erhöhten Umsatz von Fettsäuren dienen. Andererseits gibt es unterschiedliche Berichte über pro- oder anti-inflammatorische Eigenschaften von LPCs. Die Anreicherung von LPCs macht eine funktionelle Beteiligung im Kontext von Fieber und der *sickness response* wahrscheinlich. Außerdem wurde PC (38:6) in vorherigen Studien ein neuroprotektives Potential zugesprochen, was auch diese Substanz als potentiellen Marker für neuroinflammatorische Prozesse interessant macht. Hier konnte also erstmals gezeigt werden, dass sich die Verteilungsmuster von Lipiden in Gehirnregionen mit undichter Bluthirnschranke unter inflammatorischen Bedingungen in Fat-1 Mäusen von denen in WT Mäusen unterscheiden. Eine funktionelle Relevanz ist sehr wahrscheinlich und sollte in zukünftigen Studien weiter untersucht werden.

Ebenfalls erstmalig gelang nach erfolgter MALDI-Messung im negativen Ionen-Modus von Gehirnschnitten der immunhistochemische Nachweis inflammatorischer Marker wie der Cyclooxygenase 2 und NF-IL6. Zusätzlich konnten auch neutrophile Granulozyten nachgewiesen werden. Diese sind aufgrund ihrer Enzymausstattung, die eine Beteiligung an der SPM-Synthese ermöglicht, im Rahmen der hier gemachten Untersuchungen von besonderem Interesse. Die multimodale Verknüpfung (Überlagerung, Korrelation) der histologischen und massenspektrometrischen Bilddaten wurde erstmalig erfolgreich im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt und ermöglicht einen erheblichen synergistischen Informationsgewinn.

VI. Summary

Systemic inflammation is accompanied by an inflammatory response in the brain and brain controlled sickness symptoms such as fever, lethargy, anorexia and adipisia. Experimentally, this response can be reliably induced by intraperitoneal injection of bacterial lipopolysaccharid (LPS). Interestingly, non-inflammatory or neurodegenerative diseases are often associated with, influenced or even enhanced by systemic inflammation. Therefore, a better understanding of underlying mechanisms is highly important especially to develop anti-inflammatory strategies and therapies and to treat diseases of the brain. Emerging evidence suggests that lipid mediators are involved in the active, coordinated resolution of inflammatory responses and that they are crucial terminal mediators of the communication between the immune system and the brain. Resolution of inflammation is referred to a class switch from prostaglandins and leukotrienes to lipoxins and resolvins, which help to resolve / terminate inflammation. Lipoxins and resolvins, synthesized from ω -3 fatty acids belong to a group of substances called specialized pro-resolving mediators (SPMs). Knowledge about their production in the brain is sparse. The exact underlying mechanisms and pathways of their action are poorly understood. In addition to such lipid mediators, there are approaches to interfere inflammatory reactions by the application of CyPPA (Cyclohexyl-[2-(3,5-dimethylpyrazol-1-yl)-6-methyl-pyrimidin-4-yl]-amine) a positive pharmacological activator of small conductance calcium-activated potassium-channels. CyPPA has been shown to antagonize LPS-induced cytokine-expression in microglial cell cultures and, thus, has potential to treat neuroinflammation.

The present study dealt with both **(I)** the therapeutic potential of CyPPA under neuroinflammatory conditions and **(II)** the anti-inflammatory potential and the distribution of lipids and lipid mediators in the brain of mice.

(I) Pretreatment with CyPPA (15 mg/kg) injected 24 hours prior and simultaneously with LPS-stimulation (2.5 mg/kg, high dose) did not affect LPS-induced microglial activation (cluster of differentiation (CD)11b, CD68), illness response (depressed activity, anorexia and fever) and expression profiles of inflammatory mediators in the hypothalamus and in the periphery. However, CyPPA-treatment alone induced a rise in body core temperature that was accompanied by increased locomotor activity, decreased mRNA-expression of SOCS3 (suppressor of cytokine signaling 3), increased expression of NF-IL6 (nuclear factor interleukin 6) in the hypothalamus and I κ B α (inhibitor of kappa B α) in the hypothalamus and cortex while circulating cytokines were unaltered. Moreover, NF κ B (nuclear factor kappa B) - activation was reduced in cortical neurons as revealed by western blot analyses potentially linked to some previously described neuroprotective capacities of CyPPA. In addition it is known, that influencing the above mentioned signaling pathways itself may be neuroprotective. Interestingly, the increased body temperature and locomotor activity of CyPPA-treated mice was accompanied by reduced levels of adenosine, but a tendency of enhanced adenosine triphosphate in the liver as measured by HPLC. These results could be

due to enhanced metabolism induced by CyPPA, as others previously have shown in cell culture by seahorse analysis. Overall, while CyPPA might be suitable to modulate and treat neuroinflammatory processes, the observed effects on metabolism, body core temperature and locomotor activity represent potential important side effects that should be taken into account.

(II) The aim of the second study was to investigate the role of ω -3 fatty acids and related lipid mediators in resolving inflammation and brain-controlled sickness symptoms during systemic inflammatory insults. For this purpose, so called fat-1 transgenic mice, which are able to produce large quantities of ω -3 fatty acids endogenously, were used. Neither ω -3 balanced nor ω -3 deficient bred mice (fat-1 or wildtype (C57BL/6N, WT)) showed differences in the sickness response or peripheral cytokine levels after LPS-injection (50 μ g/kg, low dose) in comparison to phosphate buffered saline (PBS) -treated controls. However, following administration of a high dose of LPS (2.5 mg/kg) fat-1 mice bred under a ω -3 deficient diet exhibited a higher first febrile phase but an accelerated recovery from the subsequent hypothermia, as well as reduced interleukin-6 plasma levels 24 hours after LPS-stimulation. In addition, the stress induced rise in locomotor activity and body temperature was significantly higher in fat-1 mice compared to WT, which might have been due to alterations of the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) -axis. However, sufficient ω -3 fatty acid supply has been assumed to be protective in case of stress-induced alterations in previous studies. Overall, the results of the present study clearly highlight the diversity and complexity of the function of ω -3 fatty acids and their influence on the HPA-axis. A simply relationship between nutritional status of ω -3 fatty acids and health status does not seem to exist.

Another focus of this study was to analyze the spatial distribution of lipids and lipid mediators in the OVLT (vascular organ of the lamina terminalis) and the surrounding tissue known as the preoptic area. The OVLT is a circumventricular organ with a leaky blood-brain-barrier known to be important for the communication of the immune system and the brain. Both, the preoptic area as well as the OVLT participate in mechanisms to induce and maintain fever. Lipid signals were measured by matrix assisted laser desorption / ionisation mass spectrometry imaging (MALDI-MSI). For the first time, this method allowed illustration of different mass signals in these brain structures at high spatial resolution. Free fatty acids and various phospholipids were successfully detected. Indeed, several distinct distribution patterns were observed at the level of the OVLT within the different genotypes of mice (fat-1 versus WT) after PBS- or LPS-treatment. A localized increase of lysophosphatidylcholine (LPC) (16:0), LPC (16:1), LPC (18:0), LPC (18:1), phosphatidylcholine (PC) (38:6), PC (38:7), and phosphatidylglycerin (38:5) was found exclusively in the OVLT after LPS injection in fat-1 mice but not in LPS-stimulated WT and WT controls. On the one hand, LPC accumulation was indicative of enhanced turnover of fatty acid metabolism. On the other hand, there are several reports of pro- or anti-inflammatory properties of LPCs suggesting a role of LPCs in the context of fever and the sickness response. Moreover, PC (38:6) has been accounted to be neuroprotective. Thus, PC (38:6) is highly interesting as a potential marker for

neuroinflammatory processes. In summary, for the first time, it was shown that distribution patterns of lipids in a brain region with a leaky blood brain barrier, namely the OVLT, differs in fat-1 mice compared to WT mice under inflammatory conditions. A functional relevance is very likely and should be further investigated in future studies.

In addition, we were the first who succeeded in performing immunohistochemistry for inflammatory markers including cyclooxygenase 2 and NF-IL6 on brain slices after negative mode MALDI-MSI. Even neutrophil granulocytes could still be detected. Neutrophils are of special interest due to their enzyme capacities that enables them to participate in SPM synthesis. Moreover, we have successfully combined histological and mass spectrometry data (correlation and merging), which allows extensive synergistic information gain.

VII. Gemessene Parameter der MALDI-Experimente

1. Messungen im positiven Ionen-Modus

In den unten aufgeführten Tabellen werden jeweils die folgenden Parameter aufgeführt:

Substanz, zugehörige Summenformel, Addukt, theoretische Masse, gemessene Masse, mittlere Massenabweichung sowie RMSE für jeweils eine durchgeführte Messung.

1.1 Messung WT PBS 24h nach Stimulation

Substanz	Summenformel	Addukt	Berechnete Masse/ theoretische Masse	Gemessene Masse	Mittlere Massenabweichung (10ppm Massenfensterbreite) in ppm	RMSE (10ppm Massenfensterbreite)
1 LysoPC (16:0)	$C_{24}H_{50}NO_7P$	$[M+H]^+$	496.33977	496.33969	-0.15	0.35
3 LysoPC (16:0)	$C_{24}H_{50}NO_7P$	$[M+K]^+$	534.29565	534.29557	-0.59	0.69
4 LysoPC (16:0)	$C_{24}H_{50}NO_7P$	$[M+H-H_2O]^+$	478.32920	478.32892	-0.14	0.26
5 LysoPC (16:1)	$C_{24}H_{48}NO_7P$	$[M+H]^+$	494.32412	494.32409	-0.05	1.24
6 LysoPC (16:1)	$C_{24}H_{48}NO_7P$	$[M+Na]^+$	516.30606	516.30539	-1.31	1.87
7 LysoPC (16:1)	$C_{24}H_{48}NO_7P$	$[M+K]^+$	532.28000	532.27983	-0.32	0.61
8 LysoPC (18:0)	$C_{26}H_{54}NO_7P$	$[M+H]^+$	524.37107	524.37103	-0.06	0.45
9 LysoPC (18:0)	$C_{26}H_{54}NO_7P$	$[M+Na]^+$	546.35301	546.35270	-0.58	0.80

10	LysoPC (18:0)	C₂₆H₅₄NO₇P	[M+K]⁺	562.32695	562.32697	0.05	0.43
11	LysoPC (18:1)	C ₂₆ H ₅₂ NO ₇ P	[M+H] ⁺	522.35542	522.35526	-0.31	0.52
12	LysoPC (18:1)	C ₂₆ H ₅₂ NO ₇ P	[M+Na] ⁺	544.33736	544.33784	0.87	1.46
13	LysoPC (18:1)	C₂₆H₅₂NO₇P	[M+K]⁺	560.31130	560.31106	-0.43	0.55
14	LysoPC (18:1)	C ₂₆ H ₅₂ NO ₇ P	[M+H-H ₂ O] ⁺	504.34485	504.34427	-1.12	1.13
15	LysoPC (18:2)	C ₂₆ H ₅₀ NO ₇ P	[M+H] ⁺	520.33977	520.33945	-0.62	0.97
16	LysoPC (18:2)	C ₂₆ H ₅₀ NO ₇ P	[M+Na] ⁺	542.32171	542.32231	1.11	1.49
17	LysoPC (18:2)	C₂₆H₅₀NO₇P	[M+K]⁺	558.29565	558.29566	0.02	1.79
18	LysoPC (18:2)	C ₂₆ H ₅₀ NO ₇ P	[M+H-H ₂ O] ⁺	502.32920	502.32891	-0.57	0.65
19	LysoPC (P-18:0) / LysoPC (O-18:1)	C ₂₆ H ₅₄ NO ₆ P	[M+H] ⁺	508.37615	508.37617	0.04	1.00
20	LysoPC (P-18:0) / LysoPC (O-18:1)	C₂₆H₅₄NO₆P	[M+K]⁺	546.33203	546.33241	0.70	1.47
21	LysoPC (P-18:0) / LysoPC (O-18:1)	C ₂₆ H ₅₄ NO ₆ P	[M+H-H ₂ O] ⁺	490.36559	490.36554	-0.10	1.52
22	LysoPE (18:1)	C ₂₃ H ₄₆ NO ₇ P	[M+H] ⁺	480.30847	480.30833	-0.28	1.19
23	LysoPE (18:1)	C₂₃H₄₆NO₇P	[M+K]⁺	518.26435	518.26397	-0.71	1.12
24	LysoPE (18:1)	C ₂₃ H ₄₆ NO ₇ P	[M+H-H ₂ O] ⁺	462.29790	462.29783	-0.15	0.89
25	LysoPE (16:0)	C ₂₁ H ₄₄ NO ₇ P	[M+H] ⁺	454.29282	454.29241	-0.90	1.82
26	LysoPE (16:0)	C ₂₁ H ₄₄ NO ₇ P	[M+Na] ⁺	476.27476	476.27458	-0.39	1.42

27	LysoPE (16:0)	C₂₁H₄₄NO₇P	[M+K]⁺	492.24870	492.24830	-0.81	1.17
28	LysoPE (18:0)	C ₂₃ H ₄₈ NO ₇ P	[M+H] ⁺	482.32412	482.32392	-0.41	0.85
29	LysoPE (18:0)	C₂₃H₄₈NO₇P	[M+K]⁺	520.28000	520.27981	-0.36	1.31
30	PC (36:4)	C ₄₄ H ₈₀ NO ₈ P	[M+Na] ⁺	804.55138	804.55051	-1.08	1.11
31	PC (36:4)	C₄₄H₈₀NO₈P	[M+K]⁺	820.52531	820.52498	-0.41	0.46
32	PC (38:4)	C ₄₆ H ₈₄ NO ₈ P	[M+Na] ⁺	832.58268	832.58247	-0.25	0.50
33	PC (38:4)	C₄₆H₈₄NO₈P	[M+K]⁺	848.55661	848.55619	-0.50	0.58
34	PC (38:5)	C ₄₆ H ₈₂ NO ₈ P	[M+Na] ⁺	830.56703	830.56582	-1.45	1.78
35	PC (38:5)	C ₄₆ H ₈₂ NO ₈ P	[M+K] ⁺	846.54096	846.54077	-0.23	0.39
36	PC (38:6)	C ₄₆ H ₈₀ NO ₈ P	[M+H] ⁺	806.56943	806.56887	-0.70	2.01
37	PC (38:6)	C ₄₆ H ₈₀ NO ₈ P	[M+Na] ⁺	828.55138	828.55088	-0.59	0.78
38	PC (38:6)	C₄₆H₈₀NO₈P	[M+K]⁺	844.52531	844.52496	-0.42	0.56
39	PC (38:7)	C ₄₆ H ₇₈ NO ₈ P	[M+K] ⁺	842.50966	842.50979	0.14	0.96
40	PC (40:5)	C ₄₈ H ₈₆ NO ₈ P	[M+H] ⁺	836.61638	836.61580	-0.69	1.62
41	PC (40:5)	C ₄₈ H ₈₆ NO ₈ P	[M+Na] ⁺	858.59833	858.59834	0.02	1.83
42	PC (40:5)	C ₄₈ H ₈₆ NO ₈ P	[M+K] ⁺	874.57226	874.57292	0.75	1.32
43	PC (40:6)	C ₄₈ H ₈₄ NO ₈ P	[M+Na] ⁺	856.58268	856.58278	0.12	1.37

44	PC (40:6)	C₄₈H₈₄NO₈P	[M+K]⁺	872.55661	872.55686	0.28	0.60
45	PC (40:7)	C ₄₈ H ₈₂ NO ₈ P	[M+Na] ⁺	854.56703	854.56701	-0.02	1.46
46	PC (40:7)	C₄₈H₈₂NO₈P	[M+K]⁺	870.54096	870.54195	1.13	1.32
47	PC (40:8)	C ₄₈ H ₈₀ NO ₈ P	[M+K] ⁺	868.52531	868.52448	-0.96	1.26
48	PE (38:5)	C ₄₃ H ₇₆ NO ₈ P	[M+Na] ⁺	788.52008	788.51950	-0.74	1.19
49	PE (38:5)	C ₄₃ H ₇₆ NO ₈ P	[M+K] ⁺	804.49401	804.49305	-1.19	1.50
50	PE (38:6)	C ₄₃ H ₇₄ NO ₈ P	[M+H] ⁺	764.52248	764.52284	0.47	1.24
51	PE (38:6)	C ₄₃ H ₇₄ NO ₈ P	[M+Na] ⁺	786.50443	786.50432	-0.13	0.86
52	PE (38:6)	C₄₃H₇₄NO₈P	[M+K]⁺	802.47836	802.47812	-0.30	0.84
53	PE (40:6)	C ₄₅ H ₇₈ NO ₈ P	[M+H] ⁺	792.55378	792.55375	-0.04	1.40
54	PE (40:6)	C ₄₅ H ₇₈ NO ₈ P	[M+Na] ⁺	814.53572	814.53531	-0.51	0.79
55	PE (40:6)	C₄₅H₇₈NO₈P	[M+K]⁺	830.50966	830.50939	-0.33	0.62
56	PE (P-36:4) / PE (O-36:5)	C ₄₁ H ₇₄ NO ₇ P	[M+Na] ⁺	746.50951	746.50994	0.57	1.34
57	PE (P-36:4) / PE (O-36:5)	C₄₁H₇₄NO₇P	[M+K]⁺	762.48345	762.48264	-1.06	1.44
58	PE (P-38:4) / PE (O-38:5)	C ₄₃ H ₇₈ NO ₇ P	[M+K] ⁺	790.51475	790.51467	-0.10	0.84
59	PE (P-38:6)	C ₄₃ H ₇₄ NO ₇ P	[M+H] ⁺	748.52757	748.52740	-0.22	0.84
60	PE (P-38:6)	C ₄₃ H ₇₄ NO ₇ P	[M+Na] ⁺	770.50951	770.51014	0.82	0.83

61	PE (P-38:6)	C₄₃H₇₄NO₇P	[M+K]⁺	786.48345	786.48337	-0.10	0.96
62	PE (P-40:4) / PE (O-40:5)	C₄₅H₈₂NO₇P	[M+K]⁺	818.54605	818.54642	0.45	1.22
63	PE (P-40:6)	C ₄₅ H ₇₈ NO ₇ P	[M+H] ⁺	776.55887	776.55818	-0.88	1.27
64	PE (P-40:6)	C ₄₅ H ₇₈ NO ₇ P	[M+Na] ⁺	798.54081	798.54063	-0.22	0.38
65	PE (P-40:6)	C₄₅H₇₈NO₇P	[M+K]⁺	814.51475	814.51439	-0.45	0.85
66	PA (38:5)	C ₄₁ H ₇₁ O ₈ P	[M+Na] ⁺	745.47788	745.47772	-0.20	0.92
67	PA (38:5)	C₄₁H₇₁O₈P	[M+K]⁺	761.45181	761.45166	0.20	0.71
68	PA (40:6)	C ₄₆ H ₇₉ O ₁₀ P	[M+K] ⁺	787.46746	787.46808	0.78	1.14
69	PG (38:5)	C ₄₄ H ₇₇ O ₁₀ P	[M+Na] ⁺	819.51466	819.51403	-0.76	1.32
70	PS (40:6)	C ₄₆ H ₇₈ NO ₁₀ P	[M+H] ⁺	836.54361	836.54442	0.96	2.16
71	PS (40:6)	C₄₆H₇₈NO₁₀P	[M+K]⁺	874.49949	874.49939	-0.12	1.09
72	SM (d38:1)	C ₄₃ H ₈₇ N ₂ O ₆ P	[M+H] ⁺	759.63745	759.63720	-0.34	0.95
73	SM (d38:1)	C ₄₃ H ₈₇ N ₂ O ₆ P	[M+Na] ⁺	781.61940	781.61969	0.37	0.96
74	SM (d38:1)	C₄₃H₈₇N₂O₆P	[M+K]⁺	797.59333	797.59337	0.04	1.25
75	SM (d38:2)	C₄₃H₈₅N₂O₆P	[M+Na]⁺	779.60375	779.60363	-0.15	1.00
76	N-Acetylaspartyl- glutamat	C ₁₁ H ₁₆ N ₂ O ₉	[M+Na] ⁺	327.07989	327.08007	0.55	1.77
77	N-Acetylaspartyl- glutamat	C₁₁H₁₆N₂O₉	[M+K]⁺	343.05383	343.05330	-1.54	2.02

Tabelle 32

WT PBS → Liste angesprochener Substanzen, sowie Summenformeln, theoretische und gemessene Massen, mittlerer Massenabweichungen und RMSE-Werten eines einzigen MALDI Experimentes im positiven Ionen-Modus. Fettgedruckte Substanzen sind im Ergebnissteil abgebildet.

1.2 Messung WT LPS 24h nach Stimulation

Substanz	Summenformel	Addukt	Berechnete Masse/ theoretische Masse	Gemessene Masse	Mittlere Massenabweichung (10ppm Massenfensterbreite) in ppm	RMSE (10ppm Massenfensterbreite)
1 LysoPC (16:0)	$C_{24}H_{50}NO_7P$	$[M+H]^+$	496.33977	496.33987	0.20	0.36
2 LysoPC (16:0)	$C_{24}H_{50}NO_7P$	$[M+Na]^+$	518.32171	518.32185	0.27	0.46
3 LysoPC (16:0)	$C_{24}H_{50}NO_7P$	$[M+K]^+$	534.29565	534.29580	0.30	0.37
4 LysoPC (16:0)	$C_{24}H_{50}NO_7P$	$[M+H-H_2O]^+$	478.32920	478.32927	0.15	0.27
5 LysoPC (16:1)	$C_{24}H_{48}NO_7P$	$[M+H]^+$	494.32412	494.32422	0.21	0.85
6 LysoPC (16:1)	$C_{24}H_{48}NO_7P$	$[M+Na]^+$	516.30606	516.30594	-0.23	1.00
7 LysoPC (16:1)	$C_{24}H_{48}NO_7P$	$[M+K]^+$	532.28000	532.28017	0.32	0.60
8 LysoPC (18:0)	$C_{26}H_{54}NO_7P$	$[M+H]^+$	524.37107	524.37127	0.40	0.61
9 LysoPC (18:0)	$C_{26}H_{54}NO_7P$	$[M+Na]^+$	546.35301	546.35318	0.31	0.63
10 LysoPC (18:0)	$C_{26}H_{54}NO_7P$	$[M+K]^+$	562.32695	562.32711	0.29	0.48
11 LysoPC (18:1)	$C_{26}H_{52}NO_7P$	$[M+H]^+$	522.35542	522.35560	0.34	0.53
12 LysoPC (18:1)	$C_{26}H_{52}NO_7P$	$[M+Na]^+$	544.33736	544.33802	1.22	1.59

13	LysoPC (18:1)	C₂₆H₅₂NO₇P	[M+K]⁺	560.31130	560.31138	0.14	0.27
14	LysoPC (18:1)	C ₂₆ H ₅₂ NO ₇ P	[M+H-H ₂ O] ⁺	504.34485	504.34482	-0.06	0.32
15	LysoPC (18:2)	C ₂₆ H ₅₀ NO ₇ P	[M+H] ⁺	520.33977	520.33992	0.29	0.82
16	LysoPC (18:2)	C ₂₆ H ₅₀ NO ₇ P	[M+Na] ⁺	542.32171	542.32284	2.08	2.48
17	LysoPC (18:2)	C₂₆H₅₀NO₇P	[M+K]⁺	558.29565	558.29589	0.44	0.84
18	LysoPC (P-18:0) / LysoPC (O-18:1)	C ₂₆ H ₅₄ NO ₆ P	[M+H] ⁺	508.37615	508.37639	0.47	1.13
19	LysoPC (P-18:0) / LysoPC (O-18:1)	C₂₆H₅₄NO₆P	[M+K]⁺	546.33203	546.33231	0.51	1.17
20	LysoPC (P-18:0) / LysoPC (O-18:1)	C ₂₆ H ₅₄ NO ₆ P	[M+H-H ₂ O] ⁺	490.36559	490.36565	0.13	1.20
21	LysoPE (18:1)	C ₂₃ H ₄₆ NO ₇ P	[M+H] ⁺	480.30847	480.30856	0.19	0.70
22	LysoPE (18:1)	C₂₃H₄₆NO₇P	[M+K]⁺	518.26435	518.26446	0.21	0.56
23	LysoPE (18:1)	C ₂₃ H ₄₆ NO ₇ P	[M+H-H ₂ O] ⁺	462.29790	462.29789	-0.04	0.90
24	LysoPE (16:0)	C ₂₁ H ₄₄ NO ₇ P	[M+H] ⁺	454.29282	454.29282	0.01	0.99
25	LysoPE (16:0)	C ₂₁ H ₄₄ NO ₇ P	[M+Na] ⁺	476.27476	476.27481	0.11	1.15
26	LysoPE (16:0)	C₂₁H₄₄NO₇P	[M+K]⁺	492.24870	492.24870	0.01	0.77
27	LysoPE (18:0)	C ₂₃ H ₄₈ NO ₇ P	[M+H] ⁺	482.32412	482.32418	0.13	0.81
28	LysoPE (18:0)	C₂₃H₄₈NO₇P	[M+K]⁺	520.28000	520.28009	0.17	0.92
29	LysoPE (18:0)	C ₂₃ H ₄₈ NO ₇ P	[M+H-H ₂ O] ⁺	464.31355	464.31367	0.25	0.85

30	PC (36:4)	$C_{44}H_{80}NO_8P$	$[M+Na]^+$	804.55138	804.55061	-0.95	1.05
31	PC (36:4)	$C_{44}H_{80}NO_8P$	$[M+K]^+$	820.52531	820.52503	-0.35	0.37
32	PC (38:4)	$C_{46}H_{84}NO_8P$	$[M+Na]^+$	832.58268	832.58253	-0.18	0.43
33	PC (38:4)	$C_{46}H_{84}NO_8P$	$[M+K]^+$	848.55661	848.55625	-0.42	0.44
34	PC (38:5)	$C_{46}H_{82}NO_8P$	$[M+H]^+$	808.58508	808.58348	-1.99	2.08
35	PC (38:5)	$C_{46}H_{82}NO_8P$	$[M+Na]^+$	830.56703	830.56556	-1.77	2.10
36	PC (38:5)	$C_{46}H_{82}NO_8P$	$[M+K]^+$	846.54096	846.54135	0.45	0.70
37	PC (38:6)	$C_{46}H_{80}NO_8P$	$[M+H]^+$	806.56943	806.56964	0.25	1.48
38	PC (38:6)	$C_{46}H_{80}NO_8P$	$[M+Na]^+$	828.55138	828.55070	-0.82	0.96
39	PC (38:6)	$C_{46}H_{80}NO_8P$	$[M+K]^+$	844.52531	844.52488	-0.52	0.60
40	PC (38:7)	$C_{46}H_{78}NO_8P$	$[M+K]^+$	842.50966	842.50958	-0.10	1.06
41	PC (40:5)	$C_{48}H_{86}NO_8P$	$[M+Na]^+$	858.59833	858.59707	-1.46	2.04
42	PC (40:5)	$C_{48}H_{86}NO_8P$	$[M+K]^+$	874.57226	874.57185	-0.47	1.90
43	PC (40:6)	$C_{48}H_{84}NO_8P$	$[M+H]^+$	834.60073	834.60116	0.52	1.67
44	PC (40:6)	$C_{48}H_{84}NO_8P$	$[M+Na]^+$	856.58268	856.58272	0.06	1.17
45	PC (40:6)	$C_{48}H_{84}NO_8P$	$[M+K]^+$	872.55661	872.55672	0.13	0.52
46	PC (40:7)	$C_{48}H_{82}NO_8P$	$[M+Na]^+$	854.56703	854.56679	-0.27	1.24

47	PC (40:7)	C₄₈H₈₂NO₈P	[M+K]⁺	870.54096	870.54163	0.77	1.03
48	PC (40:7)	C ₄₈ H ₈₂ NO ₈ P	[M+NH ₄] ⁺	849.61163	849.61051	-1.32	2.18
49	PC (40:8)	C ₄₈ H ₈₀ NO ₈ P	[M+K] ⁺	868.52531	868.52452	-0.91	1.42
50	PE (38:5)	C ₄₃ H ₇₆ NO ₈ P	[M+H] ⁺	766.53813	766.53661	-1.98	2.46
51	PE (38:5)	C ₄₃ H ₇₆ NO ₈ P	[M+Na] ⁺	788.52008	788.51914	-1.19	1.84
52	PE (38:5)	C ₄₃ H ₇₆ NO ₈ P	[M+K] ⁺	804.49401	804.49286	-1.43	1.69
53	PE (38:6)	C ₄₃ H ₇₄ NO ₈ P	[M+H] ⁺	764.52248	764.52252	0.06	1.03
54	PE (38:6)	C ₄₃ H ₇₄ NO ₈ P	[M+Na] ⁺	786.50443	786.50419	-0.30	1.19
55	PE (38:6)	C₄₃H₇₄NO₈P	[M+K]⁺	802.47836	802.47812	-0.30	0.80
56	PE (40:6)	C ₄₅ H ₇₈ NO ₈ P	[M+H] ⁺	792.55378	792.55340	-0.48	1.32
57	PE (40:6)	C ₄₅ H ₇₈ NO ₈ P	[M+Na] ⁺	814.53572	814.53527	-0.56	0.91
58	PE (40:6)	C₄₅H₇₈NO₈P	[M+K]⁺	830.50966	830.50924	-0.51	0.74
59	PE (P-36:4) / PE (O-36:5)	C ₄₁ H ₇₄ NO ₇ P	[M+H] ⁺	724.52757	724.52640	-1.61	2.36
60	PE (P-36:4) / PE (O-36:5)	C ₄₁ H ₇₄ NO ₇ P	[M+Na] ⁺	746.50951	746.50996	0.60	1.37
61	PE (P-36:4) / PE (O-36:5)	C₄₁H₇₄NO₇P	[M+K]⁺	762.48345	762.48291	-0.70	1.28
62	PE (P-38:4) / PE (O-38:5)	C ₄₃ H ₇₈ NO ₇ P	[M+H] ⁺	752.55887	752.55686	-2.67	2.99
63	PE (P-38:4) / PE (O-38:5)	C ₄₃ H ₇₈ NO ₇ P	[M+K] ⁺	790.51475	790.51467	-0.10	0.88

64	PE (P-38:6)	$C_{43}H_{74}NO_7P$	$[M+H]^+$	748.52757	748.52743	-0.18	0.93
65	PE (P-38:6)	$C_{43}H_{74}NO_7P$	$[M+K]^+$	786.48345	786.48334	-0.13	0.82
66	PE (P-40:4) / PE (O-40:5)	$C_{45}H_{82}NO_7P$	$[M+H]^+$	780.59017	780.58933	-1.08	1.65
67	PE (P-40:4) / PE (O-40:5)	$C_{45}H_{82}NO_7P$	$[M+K]^+$	818.54605	818.54604	-0.01	0.99
68	PE (P-40:6)	$C_{45}H_{78}NO_7P$	$[M+H]^+$	776.55887	776.55817	-0.90	1.33
69	PE (P-40:6)	$C_{45}H_{78}NO_7P$	$[M+K]^+$	814.51475	814.51431	-0.54	0.88
70	PA (38:5)	$C_{41}H_{71}O_8P$	$[M+Na]^+$	745.47788	745.47803	0.21	1.05
71	PA (38:5)	$C_{41}H_{71}O_8P$	$[M+K]^+$	761.45181	761.45143	-0.50	0.84
72	PA (40:6)	$C_{46}H_{79}O_{10}P$	$[M+Na]^+$	775.525	775.52623	1.80	2.39
73	PA (40:6)	$C_{46}H_{79}O_{10}P$	$[M+K]^+$	787.46746	787.46773	0.34	1.51
74	PG (38:5)	$C_{44}H_{77}O_{10}P$	$[M+Na]^+$	819.51466	819.51392	-0.90	1.56
75	PS (40:6)	$C_{46}H_{78}NO_{10}P$	$[M+H]^+$	836.54361	836.54380	0.22	2.05
76	PS (40:6)	$C_{46}H_{78}NO_{10}P$	$[M+K]^+$	874.49949	874.49912	-0.43	1.03
77	SM (d38:1)	$C_{43}H_{87}N_2O_6P$	$[M+H]^+$	759.63745	759.63732	-0.17	0.74
78	SM (d38:1)	$C_{43}H_{87}N_2O_6P$	$[M+Na]^+$	781.61940	781.61940	0.00	0.74
79	SM (d38:1)	$C_{43}H_{87}N_2O_6P$	$[M+K]^+$	797.59333	797.59333	0.00	0.81
80	SM (d38:2)	$C_{43}H_{85}N_2O_6P$	$[M+Na]^+$	779.60375	779.60343	-0.41	1.33

81	SM (d38:2)	$C_{43}H_{85}N_2O_6P$	$[M+K]^+$	795.57768	795.57660	-1.36	2.27
82	N-Acetylaspartyl- glutamat	$C_{11}H_{16}N_2O_9$	$[M+Na]^+$	327.07989	327.07984	-0.16	0.73
83	N-Acetylaspartyl- glutamat	$C_{11}H_{16}N_2O_9$	$[M+K]^+$	343.05383	343.05372	-0.31	0.65

Tabelle 33

WT LPS → Liste angesprochener Substanzen, sowie Summenformeln, theoretische und gemessene Massen, mittlerer Massenabweichungen und RMSE-Werten eines einzigen MALDI Experimentes im positiven Ionen-Modus. Fettgedruckte Substanzen sind im Ergebnissteil abgebildet.

1.3 Messung Fat-1 LPS 24h nach Stimulation

	Substanz	Summenformel	Addukt	Berechnete Masse/ theoretische Masse	Gemessene Masse	Mittlere Massen- abweichung (10ppm Massenfensterbreite) in ppm	RMSE (10ppm Massenfensterbreite)
1	LysoPC (16:0)	$C_{24}H_{50}NO_7P$	$[M+H]^+$	496.33977	496.33984	0.15	0.28
2	LysoPC (16:0)	$C_{24}H_{50}NO_7P$	$[M+Na]^+$	518.32171	518.32186	0.29	0.53
3	LysoPC (16:0)	$C_{24}H_{50}NO_7P$	$[M+K]^+$	534.29565	534.29581	0.31	0.31
4	LysoPC (16:0)	$C_{24}H_{50}NO_7P$	$[M+H-H_2O]^+$	478.32920	478.32935	0.31	0.54
5	LysoPC (16:1)	$C_{24}H_{48}NO_7P$	$[M+H]^+$	494.32412	494.32412	0.11	0.81
6	LysoPC (16:1)	$C_{24}H_{48}NO_7P$	$[M+Na]^+$	516.30606	516.30601	-0.09	1.24
7	LysoPC (16:1)	$C_{24}H_{48}NO_7P$	$[M+K]^+$	532.28000	532.28020	0.39	0.77
8	LysoPC (18:0)	$C_{26}H_{54}NO_7P$	$[M+H]^+$	524.37107	524.37128	0.41	0.61
9	LysoPC (18:0)	$C_{26}H_{54}NO_7P$	$[M+Na]^+$	546.35301	546.35301	0.69	1.10

10	LysoPC (18:0)	C₂₆H₅₄NO₇P	[M+K]⁺	562.32695	562.32713	0.33	0.56
11	LysoPC (18:1)	C ₂₆ H ₅₂ NO ₇ P	[M+H] ⁺	522.35542	522.35561	0.38	0.52
12	LysoPC (18:1)	C₂₆H₅₂NO₇P	[M+K]⁺	560.31130	560.31138	0.15	0.32
13	LysoPC (18:1)	C ₂₆ H ₅₂ NO ₇ P	[M+H-H ₂ O] ⁺	504.34485	504.34491	0.12	0.56
14	LysoPC (18:2)	C ₂₆ H ₅₀ NO ₇ P	[M+H] ⁺	520.33977	520.33998	0.41	0.86
15	LysoPC (18:2)	C₂₆H₅₀NO₇P	[M+K]⁺	558.29565	558.29590	0.45	0.87
16	LysoPC (P-18:0) / LysoPC (O-18:1)	C ₂₆ H ₅₄ NO ₆ P	[M+H] ⁺	508.37615	508.37641	0.51	1.26
17	LysoPC (P-18:0) / LysoPC (O-18:1)	C₂₆H₅₄NO₆P	[M+K]⁺	546.33203	546.33224	0.38	1.31
18	LysoPE (18:1)	C ₂₃ H ₄₆ NO ₇ P	[M+H] ⁺	480.30847	480.30855	0.17	0.53
19	LysoPE (18:1)	C₂₃H₄₆NO₇P	[M+K]⁺	518.26435	518.26449	0.27	0.48
20	LysoPE (18:1)	C ₂₃ H ₄₆ NO ₇ P	[M+H-H ₂ O] ⁺	462.29790	462.29788	-0.05	0.87
21	LysoPE (16:0)	C ₂₁ H ₄₄ NO ₇ P	[M+H] ⁺	454.29282	454.29281	-0.02	0.77
22	LysoPE (16:0)	C ₂₁ H ₄₄ NO ₇ P	[M+Na] ⁺	476.27476	476.27485	0.18	1.02
23	LysoPE (16:0)	C₂₁H₄₄NO₇P	[M+K]⁺	492.24870	492.24875	0.10	0.69
24	LysoPE (18:0)	C ₂₃ H ₄₈ NO ₇ P	[M+H] ⁺	482.32412	482.32418	0.13	0.82
25	LysoPE (18:0)	C₂₃H₄₈NO₇P	[M+K]⁺	520.28000	520.28009	0.19	0.88
26	LysoPE (18:0)	C ₂₃ H ₄₈ NO ₇ P	[M+H-H ₂ O] ⁺	464.31355	464.31363	0.16	0.99

27	PC (36:4)	$C_{44}H_{80}NO_8P$	$[M+Na]^+$	804.55138	804.55069	-0.86	1.04
28	PC (36:4)	$C_{44}H_{80}NO_8P$	$[M+K]^+$	820.52531	820.52504	-0.34	0.38
29	PC (38:4)	$C_{46}H_{84}NO_8P$	$[M+H]^+$	810.60073	810.59943	-1.60	1.61
30	PC (38:4)	$C_{46}H_{84}NO_8P$	$[M+Na]^+$	832.58268	832.58308	0.48	0.77
31	PC (38:4)	$C_{46}H_{84}NO_8P$	$[M+K]^+$	848.55661	848.55630	-0.37	0.40
32	PC (38:5)	$C_{46}H_{82}NO_8P$	$[M+H]^+$	808.58508	808.58421	-1.08	1.35
33	PC (38:5)	$C_{46}H_{82}NO_8P$	$[M+Na]^+$	830.56703	830.56577	-1.51	2.06
34	PC (38:5)	$C_{46}H_{82}NO_8P$	$[M+K]^+$	846.54096	846.54166	0.82	1.51
35	PC (38:6)	$C_{46}H_{80}NO_8P$	$[M+H]^+$	806.56943	806.56909	-0.42	0.59
36	PC (38:6)	$C_{46}H_{80}NO_8P$	$[M+Na]^+$	828.55138	828.55084	-0.65	1.04
37	PC (38:6)	$C_{46}H_{80}NO_8P$	$[M+K]^+$	844.52531	844.52487	-0.53	0.57
38	PC (38:7)	$C_{46}H_{78}NO_8P$	$[M+K]^+$	842.50966	842.50950	-0.20	1.04
39	PC (40:5)	$C_{48}H_{86}NO_8P$	$[M+H]^+$	836.61638	836.61529	-1.31	2.02
40	PC (40:5)	$C_{48}H_{86}NO_8P$	$[M+Na]^+$	858.59833	858.59719	-1.33	2.24
41	PC (40:5)	$C_{48}H_{86}NO_8P$	$[M+K]^+$	874.57226	874.57082	-1.65	2.27
42	PC (40:6)	$C_{48}H_{84}NO_8P$	$[M+H]^+$	834.60073	834.60116	0.52	0.99
43	PC (40:6)	$C_{48}H_{84}NO_8P$	$[M+Na]^+$	856.58268	856.58257	-0.12	1.23

44	PC (40:6)	C₄₈H₈₄NO₈P	[M+K]⁺	872.55661	872.55681	0.22	0.53
45	PC (40:7)	C ₄₈ H ₈₂ NO ₈ P	[M+Na] ⁺	854.56703	854.56725	0.26	1.37
46	PC (40:7)	C₄₈H₈₂NO₈P	[M+K]⁺	870.54096	870.54173	0.89	1.11
47	PC (40:7)	C ₄₈ H ₈₂ NO ₈ P	[M+NH ₄] ⁺	849.61163	849.61046	-1.38	2.15
48	PC (40:8)	C ₄₈ H ₈₀ NO ₈ P	[M+K] ⁺	868.52531	868.52447	-0.97	1.44
49	PE (38:5)	C ₄₃ H ₇₆ NO ₈ P	[M+Na] ⁺	788.52008	788.51907	-1.28	2.02
50	PE (38:5)	C ₄₃ H ₇₆ NO ₈ P	[M+K] ⁺	804.49401	804.49282	-1.48	1.89
51	PE (38:6)	C ₄₃ H ₇₄ NO ₈ P	[M+H] ⁺	764.52248	764.52239	-0.12	0.77
52	PE (38:6)	C ₄₃ H ₇₄ NO ₈ P	[M+Na] ⁺	786.50443	786.50399	-0.56	1.25
53	PE (38:6)	C₄₃H₇₄NO₈P	[M+K]⁺	802.47836	802.47805	-0.39	0.64
54	PE (40:6)	C ₄₅ H ₇₈ NO ₈ P	[M+H] ⁺	792.55378	792.55357	-0.26	0.92
55	PE (40:6)	C ₄₅ H ₇₈ NO ₈ P	[M+Na] ⁺	814.53572	814.53526	-0.57	0.82
56	PE (40:6)	C₄₅H₇₈NO₈P	[M+K]⁺	830.50966	830.50950	-0.19	0.45
57	PE (P-36:4) / PE (O-36:5)	C ₄₁ H ₇₄ NO ₇ P	[M+H] ⁺	724.52757	724.52673	-1.15	2.03
58	PE (P-36:4) / PE (O-36:5)	C ₄₁ H ₇₄ NO ₇ P	[M+Na] ⁺	746.50951	746.50983	0.43	1.52
59	PE (P-36:4) / PE (O-36:5)	C₄₁H₇₄NO₇P	[M+K]⁺	762.48345	762.48312	-0.43	1.12
60	PE (P-38:4) / PE (O-38:5)	C ₄₃ H ₇₈ NO ₇ P	[M+H] ⁺	752.55887	752.55750	-1.82	2.34

61	PE (P-38:4) / PE (O-38:5)	C ₄₃ H ₇₈ NO ₇ P	[M+K] ⁺	790.51475	790.51471	-0.04	1.11
62	PE (P-38:6)	C ₄₃ H ₇₄ NO ₇ P	[M+H] ⁺	748.52757	748.52738	-0.25	0.93
63	PE (P-38:6)	C₄₃H₇₄NO₇P	[M+K]⁺	786.48345	786.48339	-0.08	0.77
64	PE (P-40:4) / PE (O-40:5)	C ₄₅ H ₈₂ NO ₇ P	[M+H] ⁺	780.59017	780.58951	-0.84	1.50
65	PE (P-40:4) / PE (O-40:5)	C₄₅H₈₂NO₇P	[M+K]⁺	818.54605	818.54594	-0.13	1.03
66	PE (P-40:6)	C ₄₅ H ₇₈ NO ₇ P	[M+H] ⁺	776.55887	776.55818	-0.88	1.25
67	PE (P-40:6)	C₄₅H₇₈NO₇P	[M+K]⁺	814.51475	814.51435	-0.49	0.83
68	PA (38:5)	C ₄₁ H ₇₁ O ₈ P	[M+Na] ⁺	745.47788	745.47833	0.61	1.71
69	PA (38:5)	C₄₁H₇₁O₈P	[M+K]⁺	761.45181	761.45153	-0.37	0.92
70	PA (40:6)	C ₄₆ H ₇₉ O ₁₀ P	[M+Na] ⁺	775.525	775.52602	1.54	2.17
71	PA (40:6)	C ₄₆ H ₇₉ O ₁₀ P	[M+K] ⁺	787.46746	787.46732	-0.19	1.12
72	PG (38:5)	C ₄₄ H ₇₇ O ₁₀ P	[M+Na] ⁺	819.51466	819.51328	-1.68	1.94
73	PS (40:6)	C ₄₆ H ₇₈ NO ₁₀ P	[M+H] ⁺	836.54361	836.54300	-0.73	1.32
74	PS (40:6)	C ₄₆ H ₇₈ NO ₁₀ P	[M+Na] ⁺	858.52556	858.52464	-1.06	1.54
75	PS (40:6)	C₄₆H₇₈NO₁₀P	[M+K]⁺	874.49949	874.49909	-0.46	0.65
76	SM (d38:1)	C ₄₃ H ₈₇ N ₂ O ₆ P	[M+H] ⁺	759.63745	759.63739	-0.08	0.63
77	SM (d38:1)	C ₄₃ H ₈₇ N ₂ O ₆ P	[M+Na] ⁺	781.61940	781.61931	-0.11	0.79

78	SM (d38:1)	C₄₃H₈₇N₂O₆P	[M+K]⁺	797.59333	797.59321	-0.16	0.87
79	SM (d38:2)	C ₄₃ H ₈₇ N ₂ O ₆ P	[M+H] ⁺	757.62180	757.62113	-0.89	2.06
80	SM (d38:2)	C₄₃H₈₅N₂O₆P	[M+Na]⁺	779.60375	779.60347	-0.36	1.21
81	SM (d38:2)	C ₄₃ H ₈₅ N ₂ O ₆ P	[M+K] ⁺	795.57768	795.57707	-0.77	1.70
82	N-Acetylaspartyl- glutamat	C ₁₁ H ₁₆ N ₂ O ₉	[M+Na] ⁺	327.07989	327.07981	-0.23	0.62
83	N-Acetylaspartyl- glutamat	C₁₁H₁₆N₂O₉	[M+K]⁺	343.05383	343.05377	-0.16	0.46

Tabelle 34

Fat-I LPS → Liste angesprochener Substanzen, sowie Summenformeln, theoretische und gemessene Massen, mittlerer Massenabweichungen und RMSE-Werten eines einzigen MALDI Experimentes im positiven Ionen-Modus. Fettgedruckte Substanzen sind im Ergebnisstil abgebildet.

1.4 Nicht zuzuordnende Massen

Bei der ungezielten Suche mit dem Ziel, Substanzen zu finden, die ausschließlich oder vorwiegend im Bereich des OVLTs und der präoptischen Region vorkommen, wurden verschiedene Massensignale gefunden, denen keine Substanzen zuzuordnen waren. Diese in Tabelle 35 aufgeführten Massen wurden in allen Messungen im positiven Ionen-Modus gefunden.

	Gemessene Masse
1	874.53
2	427.99
3	564.01
4	760.08
5	956.59

Tabelle 35

Im positiven Ionen-Modus gefundene Massensignale, denen keine Substanz zugeordnet werden konnte.

2. Messungen im negativen Ionen-Modus

In den unten aufgeführten Tabellen werden jeweils die folgenden Parameter aufgeführt:

Substanz, zugehörige Summenformel, Addukt, theoretische Masse, gemessene Masse, mittlere Massenabweichung sowie RMSE für jeweils eine durchgeführte Messung

2.1 Messung WT PBS 24h nach Stimulation

Substanz	Summenformel	Addukt	Berechnete		Mittlere Massenabweichung (10ppm in ppm)	RMSE (10ppm Massenfensterbreite)
			Masse/theoretische Masse	Gemessene Masse		
1 Arachidonsäure	$C_{20}H_{32}O_2$	$[M-H]^-$	303.23295	303.23344	1.62	1.60
2 Docosahexensäure	$C_{22}H_{32}O_2$	$[M-H]^-$	327.23295	327.23354	1.80	0.86
3 Docosapentaensäure	$C_{22}H_{34}O_2$	$[M-H]^-$	329.24860	329.24916	1.69	2.00
4 Docosatetraensäure	$C_{22}H_{36}O_2$	$[M-H]^-$	331.26425	331.26488	1.89	2.10
5 Palmitinsäure	$C_{16}H_{32}O_2$	$[M-H]^-$	255.23295	255.23323	1.08	1.35
6 Stearinsäure	$C_{18}H_{36}O_2$	$[M-H]^-$	283.26425	283.26471	1.61	0.91
7 LysoPA (16:0)	$C_{19}H_{39}O_7P$	$[M-H]^-$	409.23606	409.23679	1.77	1.90
8 LysoPA (18:0)	$C_{21}H_{43}O_7P$	$[M-H]^-$	437.26736	437.26820	1.91	1.46
9 LysoPA (18:1)	$C_{21}H_{41}O_7P$	$[M-H]^-$	435.25171	435.25252	1.85	0.85
10 LysoPA (22:6)	$C_{25}H_{39}O_7P$	$[M-H]^-$	481.23606	481.23712	2.19	1.14

11	LysoPE (16:0)	C₂₁H₄₄NO₇P	[M-H]⁻	452.27826	452.27934	2.38	1.19
12	LysoPE (18:0)	C₂₃H₄₈NO₇P	[M-H]⁻	480.30956	480.31057	2.10	0.82
13	LysoPE (18:1)	C₂₃H₄₆NO₇P	[M-H]⁻	478.29391	478.29487	2.00	0.84
14	LysoPE (20:4)	C₂₅H₄₄NO₇P	[M-H]⁻	500.27826	500.27943	2.33	1.13
15	LysoPE (22:6)	C₂₇H₄₄NO₇P	[M-H]⁻	524.27826	524.27936	2.09	1.29
16	LysoPI (16:0)	C ₂₅ H ₄₉ O ₁₂ P	[M-H] ⁻	571.28889	571.29047	2.77	1.28
17	LysoPI (18:0)	C ₂₇ H ₅₃ O ₁₂ P	[M-H] ⁻	599.32019	599.32211	3.21	0.92
18	LysoPI (18:1)	C ₂₇ H ₅₁ O ₁₂ P	[M-H] ⁻	597.30454	597.30649	3.27	1.31
19	LysoPI (20:4)	C ₂₉ H ₄₉ O ₁₂ P	[M-H] ⁻	619.28889	619.29075	3.01	1.11
20	PA (32:0)	C₃₅H₆₉O₈P	[M-H]⁻	647.46573	647.46784	3.26	0.82
21	PA (34:1)	C₃₇H₇₁O₈P	[M-H]⁻	673.48138	673.48331	2.87	1.55
22	PA (36:1)	C ₃₉ H ₇₅ O ₈ P	[M-H] ⁻	701.51268	701.51510	3.45	1.56
23	PA (36:2)	C₃₉H₇₃O₈P	[M-H]⁻	699.49703	699.49917	3.06	1.38
24	PA (36:4)	C ₃₉ H ₆₉ O ₈ P	[M-H] ⁻	695.46573	695.46790	3.12	1.07
25	PA (38:4)	C ₄₁ H ₇₃ O ₈ P	[M-H] ⁻	723.49703	723.49947	3.37	1.10
26	PA (38:5)	C₄₁H₇₁O₈P	[M-H]⁻	721.48138	721.48376	3.30	1.02
27	PA (38:6)	C ₄₁ H ₆₉ O ₈ P	[M-H] ⁻	719.46573	719.46815	3.36	1.25

28	PA (40:6)	$C_{43}H_{73}O_8P$	[M-H] ⁻	747.49703	747.49964	3.49	1.20
29	PA (40:7)	$C_{43}H_{71}O_8P$	[M-H] ⁻	745.48138	745.48392	3.40	1.23
30	PE (32:0)	$C_{37}H_{74}NO_8P$	[M-H] ⁻	690.50793	690.50957	2.38	1.46
31	PE (34:0)	$C_{39}H_{78}NO_8P$	[M-H] ⁻	718.53923	718.54166	3.38	1.18
32	PE (34:1)	$C_{39}H_{76}NO_8P$	[M-H] ⁻	716.52358	716.52539	2.53	1.06
33	PE (36:1)	$C_{41}H_{80}NO_8P$	[M-H] ⁻	744.55488	744.55748	3.49	0.98
34	PE (36:2)	$C_{41}H_{78}NO_8P$	[M-H] ⁻	742.53923	742.54160	3.19	0.90
35	PE (36:4)	$C_{41}H_{74}NO_8P$	[M-H] ⁻	738.50793	738.51016	3.02	1.00
36	PE (38:4)	$C_{43}H_{78}NO_8P$	[M-H] ⁻	766.53923	766.54142	2.86	1.54
37	PE (38:5)	$C_{43}H_{76}NO_8P$	[M-H] ⁻	764.52358	764.52602	3.19	1.06
38	PE (38:6)	$C_{43}H_{74}NO_8P$	[M-H] ⁻	762.50793	762.50978	2.43	1.14
39	PE (40:6)	$C_{45}H_{78}NO_8P$	[M-H] ⁻	790.53923	790.54133	2.66	0.95
40	PE (40:7)	$C_{45}H_{76}NO_8P$	[M-H] ⁻	788.52358	788.52602	3.10	1.17
41	PG (34:1)	$C_{40}H_{77}O_{10}P$	[M-H] ⁻	747.51816	747.51938	1.63	1.86
42	PG (36:2)	$C_{42}H_{79}O_{10}P$	[M-H] ⁻	773.53381	773.53475	1.22	1.56
43	PG (38:4)	$C_{44}H_{79}O_{10}P$	[M-H] ⁻	797.53381	797.53618	2.97	1.55
44	PI (34:1)	$C_{43}H_{81}O_{13}P$	[M-H] ⁻	835.53420	835.53548	1.53	1.38

45	PI (36:1)	$C_{45}H_{85}O_{13}P$	$[M-H]^-$	863.56550	863.56713	1.88	2.22
46	PI (36:4)	$C_{45}H_{79}O_{13}P$	$[M-H]^-$	857.51855	857.52103	2.89	1.45
47	PI (38:4)	$C_{47}H_{83}O_{13}P$	$[M-H]^-$	885.54985	885.55227	2.73	0.93
48	PI (38:5)	$C_{47}H_{81}O_{13}P$	$[M-H]^-$	883.53420	883.53695	3.11	1.59
49	PS (34:1)	$C_{40}H_{76}NO_{10}P$	$[M-H]^-$	760.51341	760.51558	2.86	1.20
50	PS (36:1)	$C_{42}H_{80}NO_{10}P$	$[M-H]^-$	788.54471	788.54685	2.72	1.18
51	PS (36:2)	$C_{42}H_{78}NO_{10}P$	$[M-H]^-$	786.52906	786.53128	2.83	1.08
52	PS (38:4)	$C_{44}H_{78}NO_{10}P$	$[M-H]^-$	810.52906	810.53121	2.66	1.27
53	PS (38:5)	$C_{44}H_{76}NO_{10}P$	$[M-H]^-$	808.51341	808.51524	2.27	1.72
54	PS (40:6)	$C_{46}H_{78}NO_{10}P$	$[M-H]^-$	834.52906	834.53145	2.87	1.03
55	PS (40:7)	$C_{46}H_{76}NO_{10}P$	$[M-H]^-$	832.51341	832.51579	2.86	1.64

Tabelle 36

WT PBS → Liste angesprochener Substanzen, sowie Summenformeln, theoretische und gemessene Massen, mittlerer Massenabweichungen und RMSE-Werten eines einzigen MALDI Experimentes im negativen Ionen-Modus. Fettgedruckte Substanzen sind im Ergebnisteil abgebildet.

2.2 Messung WT LPS 24 nach Stimulation

Substanz	Summenformel	Addukt	Berechnete Masse/ theoretische Masse	Gemessene Masse	Mittlere Massenabweichung (10ppm Massenfensterbreite) in ppm	RMSE (10ppm Massenfensterbreite)
1 Arachidonsäure	C ₂₀ H ₃₂ O ₂	[M-H] ⁻	303.23295	303.23339	1.45	1.67
2 Docosahexensäure	C ₂₂ H ₃₂ O ₂	[M-H] ⁻	327.23295	327.23326	0.95	2.37
3 Docosatetraensäure	C ₂₂ H ₃₆ O ₂	[M-H] ⁻	331.26425	331.26459	1.01	2.40
4 Palmitinsäure	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	[M-H] ⁻	255.23295	255.23296	0.02	1.47
5 Stearinsäure	C ₁₈ H ₃₆ O ₂	[M-H] ⁻	283.26425	283.26442	0.59	1.40
6 LysoPE (16:0)	C ₂₁ H ₄₄ NO ₇ P	[M-H] ⁻	452.27826	452.27878	1.14	2.46
7 LysoPE (18:0)	C ₂₃ H ₄₈ NO ₇ P	[M-H] ⁻	480.30956	480.31025	1.43	2.26
8 LysoPE (18:1)	C ₂₃ H ₄₆ NO ₇ P	[M-H] ⁻	478.29391	478.29454	1.31	1.93
9 LysoPE (20:4)	C ₂₅ H ₄₄ NO ₇ P	[M-H] ⁻	500.27826	500.27920	1.87	1.67
10 LysoPE (22:6)	C ₂₇ H ₄₄ NO ₇ P	[M-H] ⁻	524.27826	524.27906	1.52	2.10
11 PA (32:0)	C ₃₅ H ₆₉ O ₈ P	[M-H] ⁻	647.46573	647.46745	2.66	2.25
12 PA (34:1)	C ₃₇ H ₇₁ O ₈ P	[M-H] ⁻	673.48138	673.48318	2.67	1.86
13 PA (36:2)	C ₃₉ H ₇₃ O ₈ P	[M-H] ⁻	699.49703	699.49893	2.72	2.10
14 PA (38:5)	C ₄₁ H ₇₁ O ₈ P	[M-H] ⁻	721.48138	721.48138	1.82	2.45

15	PE (34:0)	$C_{39}H_{78}NO_8P$	[M-H] ⁻	718.53923	718.54042	1.66	2.27
16	PE (34:1)	$C_{39}H_{76}NO_8P$	[M-H] ⁻	716.52358	716.52532	2.43	1.98
17	PE (36:1)	$C_{41}H_{80}NO_8P$	[M-H] ⁻	744.55488	744.55643	2.08	1.88
18	PE (36:2)	$C_{41}H_{78}NO_8P$	[M-H] ⁻	742.53923	742.54106	2.47	1.95
19	PE (36:4)	$C_{41}H_{74}NO_8P$	[M-H] ⁻	738.50793	738.50983	2.57	2.02
20	PE (38:4)	$C_{43}H_{78}NO_8P$	[M-H] ⁻	766.53923	766.54060	1.79	1.63
21	PE (38:5)	$C_{43}H_{76}NO_8P$	[M-H] ⁻	764.52358	764.52489	1.72	1.93
22	PE (38:6)	$C_{43}H_{74}NO_8P$	[M-H] ⁻	762.50793	762.50958	2.17	1.88
23	PE (40:6)	$C_{45}H_{78}NO_8P$	[M-H] ⁻	790.53923	790.54057	1.70	1.69
24	PE (40:7)	$C_{45}H_{76}NO_8P$	[M-H] ⁻	788.52358	788.52442	1.07	2.17
25	PG (34:1)	$C_{40}H_{77}O_{10}P$	[M-H] ⁻	747.51816	747.51935	1.59	2.08
26	PG (36:2)	$C_{42}H_{79}O_{10}P$	[M-H] ⁻	773.53381	773.53428	0.61	2.12
27	PI (36:4)	$C_{45}H_{79}O_{13}P$	[M-H] ⁻	857.51855	857.52019	1.91	2.37
28	PI (38:4)	$C_{47}H_{83}O_{13}P$	[M-H] ⁻	885.54985	885.55107	1.37	2.05
29	PI (38:5)	$C_{47}H_{81}O_{13}P$	[M-H] ⁻	883.53420	883.53622	2.28	2.59
30	PS (34:1)	$C_{40}H_{76}NO_{10}P$	[M-H] ⁻	760.51341	760.51504	2.15	2.09
31	PS (36:1)	$C_{42}H_{80}NO_{10}P$	[M-H] ⁻	788.54471	788.54664	2.45	1.98

32	PS (36:2)	$C_{42}H_{78}NO_{10}P$	$[M-H]^-$	786.52906	786.53064	2.01	2.22
33	PS (38:4)	$C_{44}H_{78}NO_{10}P$	$[M-H]^-$	810.52906	810.53071	2.04	2.16
34	PS (40:6)	$C_{46}H_{78}NO_{10}P$	$[M-H]^-$	834.52906	834.53088	2.18	1.71
35	PS (40:7)	$C_{46}H_{76}NO_{10}P$	$[M-H]^-$	832.51341	832.51455	1.37	2.74

Tabelle 37

WT LPS → Liste angesprochener Substanzen, sowie Summenformeln, theoretische und gemessene Massen, mittlerer Massenabweichungen und RMSE-Werten eines einzigen MALDI Experimentes im negativen Ionen-Modus. Fettgedruckte Substanzen sind im Ergebnisfeld abgebildet.

2.3 Messung Fat-1 LPS 24h nach Stimulation

	Substanz	Summenformel	Addukt	Berechnete Masse/ theoretische Masse	Gemessene Masse	Mittlere Massenabweichung (10ppm Massenfensterbreite) in ppm	RMSE (10ppm Massenfensterbreite)
1	Arachidonsäure	$C_{20}H_{32}O_2$	$[M-H]^-$	303.23295	303.23380	2.80	1.36
2	Docosahexensäure	$C_{22}H_{32}O_2$	$[M-H]^-$	327.23295	327.23389	2.87	1.33
3	Docosatetraensäure	$C_{22}H_{36}O_2$	$[M-H]^-$	331.26425	331.26523	2.95	1.47
4	Palmitinsäure	$C_{16}H_{32}O_2$	$[M-H]^-$	255.23295	255.23351	2.18	0.74
5	Stearinsäure	$C_{18}H_{36}O_2$	$[M-H]^-$	283.26425	283.26499	2.60	0.65
6	LysoPA (16:0)	$C_{19}H_{39}O_7P$	$[M-H]^-$	409.23606	409.23703	2.36	1.86
7	LysoPA (18:0)	$C_{21}H_{43}O_7P$	$[M-H]^-$	437.26736	437.26858	2.78	1.46

8	LysoPA (18:1)	C₂₁H₄₁O₇P	[M-H]⁻	435.25171	435.25290	2.73	2.40
9	LysoPA (22:6)	C₂₅H₃₉O₇P	[M-H]⁻	481.23606	481.23752	3.03	1.06
10	LysoPE (16:0)	C₂₁H₄₄NO₇P	[M-H]⁻	452.27826	452.27974	3.27	1.89
11	LysoPE (18:0)	C₂₃H₄₈NO₇P	[M-H]⁻	480.30956	480.31108	3.16	1.99
12	LysoPE (18:1)	C₂₃H₄₆NO₇P	[M-H]⁻	478.29391	478.29535	3.00	2.09
13	LysoPE (20:4)	C₂₅H₄₄NO₇P	[M-H]⁻	500.27826	500.27987	3.21	1.14
14	LysoPE (22:6)	C₂₇H₄₄NO₇P	[M-H]⁻	524.27826	524.27989	3.10	1.12
15	LysoPI (16:0)	C₂₅H₄₉O₁₂P	[M-H]⁻	571.28889	571.29091	3.54	1.61
16	LysoPI (18:0)	C₂₇H₅₃O₁₂P	[M-H]⁻	599.32019	599.32259	4.01	2.01
17	LysoPI (18:1)	C₂₇H₅₁O₁₂P	[M-H]⁻	597.30454	597.30686	3.89	1.29
18	LysoPI (20:4)	C₂₉H₄₉O₁₂P	[M-H]⁻	619.28889	619.29115	3.65	1.55
19	PA (32:0)	C₃₅H₆₉O₈P	[M-H]⁻	647.46573	647.46840	4.12	2.39
20	PA (34:1)	C₃₇H₇₁O₈P	[M-H]⁻	673.48138	673.48395	3.82	2.32
21	PA (36:1)	C₃₉H₇₅O₈P	[M-H]⁻	701.51268	701.51553	4.06	2.56
22	PA (36:2)	C₃₉H₇₃O₈P	[M-H]⁻	699.49703	699.49985	4.03	1.15
23	PA (36:4)	C₃₉H₆₉O₈P	[M-H]⁻	695.46573	695.46838	3.81	1.41
24	PA (38:4)	C₄₁H₇₃O₈P	[M-H]⁻	723.49703	723.50004	4.16	1.04

25	PA (38:5)	$C_{41}H_{71}O_8P$	[M-H] ⁻	721.48138	721.48436	4.13	1.87
26	PA (38:6)	$C_{41}H_{69}O_8P$	[M-H] ⁻	719.46573	719.46861	4.00	1.03
27	PA (40:6)	$C_{43}H_{73}O_8P$	[M-H] ⁻	747.49703	747.50026	4.32	1.68
28	PA (40:7)	$C_{43}H_{71}O_8P$	[M-H] ⁻	745.48138	745.48444	4.11	1.07
29	PE (32:0)	$C_{37}H_{74}NO_8P$	[M-H] ⁻	690.50793	690.51003	3.04	2.04
30	PE (34:0)	$C_{39}H_{78}NO_8P$	[M-H] ⁻	718.53923	718.54220	4.14	1.12
31	PE (34:1)	$C_{39}H_{76}NO_8P$	[M-H] ⁻	716.52358	716.52608	3.49	0.92
32	PE (36:1)	$C_{41}H_{80}NO_8P$	[M-H] ⁻	744.55488	744.55818	4.43	1.45
33	PE (36:2)	$C_{41}H_{78}NO_8P$	[M-H] ⁻	742.53923	742.54233	4.18	0.97
34	PE (36:4)	$C_{41}H_{74}NO_8P$	[M-H] ⁻	738.50793	738.51086	3.97	2.01
35	PE (38:4)	$C_{43}H_{78}NO_8P$	[M-H] ⁻	766.53923	766.54219	3.86	1.29
36	PE (38:5)	$C_{43}H_{76}NO_8P$	[M-H] ⁻	764.52358	764.52656	3.90	1.92
37	PE (38:6)	$C_{43}H_{74}NO_8P$	[M-H] ⁻	762.50793	762.51054	3.42	1.73
38	PE (40:6)	$C_{45}H_{78}NO_8P$	[M-H] ⁻	790.53923	790.54213	3.67	2.49
39	PE (40:7)	$C_{45}H_{76}NO_8P$	[M-H] ⁻	788.52358	788.52667	3.92	1.29
40	PG (34:1)	$C_{40}H_{77}O_{10}P$	[M-H] ⁻	747.51816	747.51993	2.37	2.65
41	PG (36:2)	$C_{42}H_{79}O_{10}P$	[M-H] ⁻	773.53381	773.53532	1.95	1.00

42	PG (38:4)	$C_{44}H_{79}O_{10}P$	$[M-H]^-$	797.53381	797.53662	3.52	1.64
43	PI (34:1)	$C_{43}H_{81}O_{13}P$	$[M-H]^-$	835.53420	835.53631	2.52	1.05
44	PI (36:1)	$C_{45}H_{85}O_{13}P$	$[M-H]^-$	863.56550	863.56761	2.44	2.02
45	PI (36:4)	$C_{45}H_{79}O_{13}P$	$[M-H]^-$	857.51855	857.52176	3.74	1.29
46	PI (38:4)	$C_{47}H_{83}O_{13}P$	$[M-H]^-$	885.54985	885.55312	3.69	0.64
47	PI (38:5)	$C_{47}H_{81}O_{13}P$	$[M-H]^-$	883.53420	883.53777	4.04	1.07
48	PS (34:1)	$C_{40}H_{76}NO_{10}P$	$[M-H]^-$	760.51341	760.51621	3.68	1.54
49	PS (36:1)	$C_{42}H_{80}NO_{10}P$	$[M-H]^-$	788.54471	788.54755	3.60	1.66
50	PS (36:2)	$C_{42}H_{78}NO_{10}P$	$[M-H]^-$	786.52906	786.53204	3.79	1.41
51	PS (38:4)	$C_{44}H_{78}NO_{10}P$	$[M-H]^-$	810.52906	810.53180	3.38	1.78
52	PS (38:5)	$C_{44}H_{76}NO_{10}P$	$[M-H]^-$	808.51341	808.51541	2.48	1.63
53	PS (40:6)	$C_{46}H_{78}NO_{10}P$	$[M-H]^-$	834.52906	834.53229	3.87	0.98
54	PS (40:7)	$C_{46}H_{76}NO_{10}P$	$[M-H]^-$	832.51341	832.51646	3.67	1.48

Tabelle 38

Fat-1 LPS → Liste angesprochener Substanzen, sowie Summenformeln, theoretische und gemessene Massen, mittlerer Massenabweichungen und RMSE-Werten eines einzigen MALDI Experimentes im negativen Ionen-Modus. Fettgedruckte Substanzen sind im Ergebnissteil abgebildet.

3. In den Messungen nicht gefundene Massen

Die folgenden Tabellen stellen eine Zusammenfassung in den MALDI-Daten gesuchter, jedoch nicht eindeutig ansprechbarer Substanzen dar.

3.1 Im positiven Ionen-Modus nicht gefundene Massen

	Substanz	Summenformel	Addukt	Berechnete Masse/ theoretische Masse
1	Arachidonsäure	C ₂₀ H ₃₂ O ₂	[M+H] ⁺	305.24751
2	Arachidonsäure	C ₂₀ H ₃₂ O ₂	[M+Na] ⁺	327.22945
3	Arachidonsäure	C ₂₀ H ₃₂ O ₂	[M+K] ⁺	343.20339
4	Arachidonsäure	C ₂₀ H ₃₂ O ₂	[M+H-H ₂ O] ⁺	287.23694
5	Arachidonsäure	C ₂₀ H ₃₂ O ₂	[M+NH ₄] ⁺	322.27406
6	Docosahexaensäure	C ₂₂ H ₃₂ O ₂	[M+H] ⁺	329.24751
7	Docosahexaensäure	C ₂₂ H ₃₂ O ₂	[M+Na] ⁺	351.22945
8	Docosahexaensäure	C ₂₂ H ₃₂ O ₂	[M+K] ⁺	367.20339
9	Docosahexaensäure	C ₂₂ H ₃₂ O ₂	[M+H-H ₂ O] ⁺	311.23694
10	Docosahexaensäure	C ₂₂ H ₃₂ O ₂	[M+NH ₄] ⁺	346.27406
11	Docosapentaensäure	C ₂₂ H ₃₄ O ₃	[M+H] ⁺	331.26316
12	Docosapentaensäure	C ₂₂ H ₃₄ O ₃	[M+Na] ⁺	353.24510
13	Docosapentaensäure	C ₂₂ H ₃₄ O ₃	[M+K] ⁺	369.21904
14	Docosapentaensäure	C ₂₂ H ₃₄ O ₃	[M+H-H ₂ O] ⁺	313.25314
15	Docosapentaensäure	C ₂₂ H ₃₄ O ₃	[M+NH ₄] ⁺	348.28971
16	Eicosapentaensäure	C ₂₀ H ₃₀ O ₂	[M+H] ⁺	303.23186
17	Eicosapentaensäure	C ₂₀ H ₃₀ O ₂	[M+Na] ⁺	325.21380
18	Eicosapentaensäure	C ₂₀ H ₃₀ O ₂	[M+K] ⁺	341.18774
19	Eicosapentaensäure	C ₂₀ H ₃₀ O ₂	[M+H-H ₂ O] ⁺	285.22129
20	Eicosapentaensäure	C ₂₀ H ₃₀ O ₂	[M+NH ₄] ⁺	320.25841
21	2-Arachidonylglycerol	C ₂₃ H ₃₈ O ₄	[M+H] ⁺	379.28429

Gemessene Parameter der MALDI-Experimente

22	2-Arachidonylglycerol	C ₂₃ H ₃₈ O ₄	[M+Na] ⁺	401.26623
23	2-Arachidonylglycerol	C ₂₃ H ₃₈ O ₄	[M+K] ⁺	417.24017
24	Resolvin D1	C ₂₂ H ₃₂ O ₅	[M+H] ⁺	377.23225
25	Resolvin D1	C ₂₂ H ₃₂ O ₅	[M+Na] ⁺	399.21419
26	Resolvin D1	C ₂₂ H ₃₂ O ₅	[M+K] ⁺	415.18813
27	Resolvin D1	C ₂₂ H ₃₂ O ₅	[M+H-H ₂ O] ⁺	359.22169
28	Resolvin D1	C ₂₂ H ₃₂ O ₅	[M+NH ₄] ⁺	394.25880
29	Resolvin D2	C ₂₂ H ₃₂ O ₅	[M+H] ⁺	377.23225
30	Resolvin D2	C ₂₂ H ₃₂ O ₅	[M+Na] ⁺	399.21419
31	Resolvin D2	C ₂₂ H ₃₂ O ₅	[M+K] ⁺	415.18813
32	Resolvin D2	C ₂₂ H ₃₂ O ₅	[M+H-H ₂ O] ⁺	359.22169
33	Resolvin D2	C ₂₂ H ₃₂ O ₅	[M+NH ₄] ⁺	394.25880
34	Resolvin D3	C ₂₂ H ₃₂ O ₅	[M+H] ⁺	377.23225
35	Resolvin D3	C ₂₂ H ₃₂ O ₅	[M+Na] ⁺	399.21419
36	Resolvin D3	C ₂₂ H ₃₂ O ₅	[M+K] ⁺	415.18813
37	Resolvin D3	C ₂₂ H ₃₂ O ₅	[M+H-H ₂ O] ⁺	359.22169
38	Resolvin D3	C ₂₂ H ₃₂ O ₅	[M+NH ₄] ⁺	394.25880
39	Resolvin D4	C ₂₂ H ₃₂ O ₅	[M+H] ⁺	377.23225
40	Resolvin D4	C ₂₂ H ₃₂ O ₅	[M+Na] ⁺	399.21419
41	Resolvin D4	C ₂₂ H ₃₂ O ₅	[M+K] ⁺	415.18813
42	Resolvin D4	C ₂₂ H ₃₂ O ₅	[M+H-H ₂ O] ⁺	359.22169
43	Resolvin D4	C ₂₂ H ₃₂ O ₅	[M+NH ₄] ⁺	394.25880
44	Resolvin D5	C ₂₂ H ₃₂ O ₄	[M+H] ⁺	361.23734
45	Resolvin D5	C ₂₂ H ₃₂ O ₄	[M+Na] ⁺	383.21928
46	Resolvin D5	C ₂₂ H ₃₂ O ₄	[M+K] ⁺	399.19322
47	Resolvin D5	C ₂₂ H ₃₂ O ₄	[M+H-H ₂ O] ⁺	343.22677
48	Resolvin D5	C ₂₂ H ₃₂ O ₄	[M+NH ₄] ⁺	378.26389

Gemessene Parameter der MALDI-Experimente

49	Resolvin E1	C ₂₀ H ₃₀ O ₅	[M+H] ⁺	351.21660
50	Resolvin E1	C ₂₀ H ₃₀ O ₅	[M+Na] ⁺	373.19854
51	Resolvin E1	C ₂₀ H ₃₀ O ₅	[M+K] ⁺	389.17248
52	Resolvin E1	C ₂₀ H ₃₀ O ₅	[M+H-H ₂ O] ⁺	333.20604
53	Resolvin E1	C ₂₀ H ₃₀ O ₅	[M+NH ₄] ⁺	368.24315
54	Resolvin E2	C ₂₀ H ₃₀ O ₄	[M+H] ⁺	335.22169
55	Resolvin E2	C ₂₀ H ₃₀ O ₄	[M+Na] ⁺	357.20363
56	Resolvin E2	C ₂₀ H ₃₀ O ₄	[M+K] ⁺	373.17757
57	Resolvin E2	C ₂₀ H ₃₀ O ₄	[M+H-H ₂ O] ⁺	317.21112
58	Resolvin E2	C ₂₀ H ₃₀ O ₄	[M+NH ₄] ⁺	352.24823
59	Prostaglandin D2	C ₂₀ H ₃₂ O ₅	[M+H] ⁺	353.23225
60	Prostaglandin D2	C ₂₀ H ₃₂ O ₅	[M+Na] ⁺	375.21419
61	Prostaglandin D2	C ₂₀ H ₃₂ O ₅	[M+K] ⁺	391.18813
62	Prostaglandin D2	C ₂₀ H ₃₂ O ₅	[M+H-H ₂ O] ⁺	335.22169
63	Prostaglandin D2	C ₂₀ H ₃₂ O ₅	[M+NH ₄] ⁺	370.25880
64	Prostaglandin E2	C ₂₀ H ₃₂ O ₅	[M+H] ⁺	353.23225
65	Prostaglandin E2	C ₂₀ H ₃₂ O ₅	[M+Na] ⁺	375.21419
66	Prostaglandin E2	C ₂₀ H ₃₂ O ₅	[M+K] ⁺	391.18813
67	Prostaglandin E2	C ₂₀ H ₃₂ O ₅	[M+H-H ₂ O] ⁺	335.22169
68	Prostaglandin E2	C ₂₀ H ₃₂ O ₅	[M+NH ₄] ⁺	370.25880
69	Prostaglandin J2	C ₂₀ H ₃₀ O ₄	[M+H] ⁺	335.22169
70	Prostaglandin J2	C ₂₀ H ₃₀ O ₄	[M+Na] ⁺	357.20363
71	Prostaglandin J2	C ₂₀ H ₃₀ O ₄	[M+K] ⁺	373.17757
72	Prostaglandin J2	C ₂₀ H ₃₀ O ₄	[M+H-H ₂ O] ⁺	317.21112
73	Prostaglandin J2	C ₂₀ H ₃₀ O ₄	[M+NH ₄] ⁺	352.24823
74	10(S),17(S)-DiHDoHE	C ₂₂ H ₃₂ O ₄	[M+H] ⁺	361.23734
75	10(S),17(S)-DiHDoHE	C ₂₂ H ₃₂ O ₄	[M+Na] ⁺	383.21928

Gemessene Parameter der MALDI-Experimente

76	10(S),17(S)-DiHDoHE	C ₂₂ H ₃₂ O ₄	[M+K] ⁺	399.19322
77	10(S),17(S)-DiHDoHE	C ₂₂ H ₃₂ O ₄	[M+H-H ₂ O] ⁺	343.22677
78	10(S),17(S)-DiHDoHE	C ₂₂ H ₃₂ O ₄	[M+NH ₄] ⁺	378.26389
79	18-HEPE	C ₂₀ H ₃₀ O ₃	[M+H] ⁺	319.22677
80	18-HEPE	C ₂₀ H ₃₀ O ₃	[M+Na] ⁺	341.20872
81	18-HEPE	C ₂₀ H ₃₀ O ₃	[M+K] ⁺	357.18265
82	18-HEPE	C ₂₀ H ₃₀ O ₃	[M+H-H ₂ O] ⁺	301.21621
83	18-HEPE	C ₂₀ H ₃₀ O ₃	[M+NH ₄] ⁺	336.25332
84	7(S)-Maresin 1	C ₂₂ H ₃₂ O ₄	[M+H] ⁺	361.23734
85	7(S)-Maresin 1	C ₂₂ H ₃₂ O ₄	[M+Na] ⁺	383.21928
86	7(S)-Maresin 1	C ₂₂ H ₃₂ O ₄	[M+K] ⁺	399.19322
87	7(S)-Maresin 1	C ₂₂ H ₃₂ O ₄	[M+H-H ₂ O] ⁺	343.22677
88	7(S)-Maresin 1	C ₂₂ H ₃₂ O ₄	[M+NH ₄] ⁺	378.26389
89	Neuroprotectin D1	C ₂₂ H ₃₂ O ₄	[M+H] ⁺	361.23734
90	Neuroprotectin D1	C ₂₂ H ₃₂ O ₄	[M+Na] ⁺	383.21928
91	Neuroprotectin D1	C ₂₂ H ₃₂ O ₄	[M+K] ⁺	399.19322
92	Neuroprotectin D1	C ₂₂ H ₃₂ O ₄	[M+H-H ₂ O] ⁺	343.22677
93	Neuroprotectin D1	C ₂₂ H ₃₂ O ₄	[M+NH ₄] ⁺	378.26389
94	LysoPA (16:0)	C ₁₉ H ₃₉ O ₇ P	[M+H] ⁺	411.25267
95	LysoPA (16:0)	C ₁₉ H ₃₉ O ₇ P	[M+Na] ⁺	433.23473
96	LysoPA (16:0)	C ₁₉ H ₃₉ O ₇ P	[M+K] ⁺	449.20874
97	LysoPA (16:0)	C ₁₉ H ₃₉ O ₇ P	[M+H-H ₂ O] ⁺	393.24202
98	LysoPA (16:0)	C ₁₉ H ₃₉ O ₇ P	[M+NH ₄] ⁺	428.27931
99	LysoPA (18:0)	C ₂₁ H ₄₃ O ₇ P	[M+H] ⁺	439.28411
100	LysoPA (18:0)	C ₂₁ H ₄₃ O ₇ P	[M+Na] ⁺	461.26617
101	LysoPA (18:0)	C ₂₁ H ₄₃ O ₇ P	[M+K] ⁺	477.24019
102	LysoPA (18:0)	C ₂₁ H ₄₃ O ₇ P	[M+H-H ₂ O] ⁺	421.27346

Gemessene Parameter der MALDI-Experimente

103	LysoPA (18:0)	C ₂₁ H ₄₃ O ₇ P	[M+NH ₄] ⁺	456.31075
104	LysoPA (18:1)	C ₂₁ H ₄₁ O ₇ P	[M+H] ⁺	437.26845
105	LysoPA (18:1)	C ₂₁ H ₄₁ O ₇ P	[M+Na] ⁺	459.25051
106	LysoPA (18:1)	C ₂₁ H ₄₁ O ₇ P	[M+K] ⁺	475.22452
107	LysoPA (18:1)	C ₂₁ H ₄₁ O ₇ P	[M+H-H ₂ O] ⁺	419.25780
108	LysoPA (18:1)	C ₂₁ H ₄₁ O ₇ P	[M+NH ₄] ⁺	454.29509
109	LysoPA (20:1)	C ₂₃ H ₄₅ O ₇ P	[M+H] ⁺	465.29989
110	LysoPA (20:1)	C ₂₃ H ₄₅ O ₇ P	[M+Na] ⁺	487.28195
111	LysoPA (20:1)	C ₂₃ H ₄₅ O ₇ P	[M+K] ⁺	503.25597
112	LysoPA (20:1)	C ₂₃ H ₄₅ O ₇ P	[M+H-H ₂ O] ⁺	447.28924
113	LysoPA (20:1)	C ₂₃ H ₄₅ O ₇ P	[M+NH ₄] ⁺	482.32653
114	LysoPA (20:4)	C ₂₃ H ₃₉ O ₇ P	[M+H] ⁺	459.25291
115	LysoPA (20:4)	C ₂₃ H ₃₉ O ₇ P	[M+Na] ⁺	481.23497
116	LysoPA (20:4)	C ₂₃ H ₃₉ O ₇ P	[M+K] ⁺	497.20898
117	LysoPA (20:4)	C ₂₃ H ₃₉ O ₇ P	[M+H-H ₂ O] ⁺	441.24226
118	LysoPA (20:4)	C ₂₃ H ₃₉ O ₇ P	[M+NH ₄] ⁺	476.27955
119	LysoPA (22:6)	C ₂₅ H ₃₉ O ₇ P	[M+H] ⁺	483.25303
120	LysoPA (22:6)	C ₂₅ H ₃₉ O ₇ P	[M+Na] ⁺	505.23509
121	LysoPA (22:6)	C ₂₅ H ₃₉ O ₇ P	[M+K] ⁺	521.20910
122	LysoPA (22:6)	C ₂₅ H ₃₉ O ₇ P	[M+H-H ₂ O] ⁺	465.24238
123	LysoPA (22:6)	C ₂₅ H ₃₉ O ₇ P	[M+NH ₄] ⁺	500.27967
124	LysoPC (20:1)	C ₂₈ H ₅₆ NO ₇ P	[M+H] ⁺	550.38947
125	LysoPC (20:1)	C ₂₈ H ₅₆ NO ₇ P	[M+Na] ⁺	572.37152
126	LysoPC (20:1)	C ₂₈ H ₅₆ NO ₇ P	[M+K] ⁺	588.34554
127	LysoPC (20:1)	C ₂₈ H ₅₆ NO ₇ P	[M+H-H ₂ O] ⁺	532.37881
128	LysoPC (20:1)	C ₂₈ H ₅₆ NO ₇ P	[M+NH ₄] ⁺	567.41610
129	LysoPE (16:1)	C ₂₁ H ₄₂ NO ₇ P	[M+H] ⁺	452.27943

Gemessene Parameter der MALDI-Experimente

130	LysoPE (16:1)	C ₂₁ H ₄₂ NO ₇ P	[M+Na] ⁺	474.26148
131	LysoPE (16:1)	C ₂₁ H ₄₂ NO ₇ P	[M+K] ⁺	490.23550
132	LysoPE (16:1)	C ₂₁ H ₄₂ NO ₇ P	[M+H-H ₂ O] ⁺	434.26877
133	LysoPE (16:1)	C ₂₁ H ₄₂ NO ₇ P	[M+NH ₄] ⁺	469.30606
134	LysoPE (P-16:0)	C ₂₁ H ₄₄ NO ₆ P	[M+H] ⁺	438.30009
135	LysoPE (P-16:0)	C ₂₁ H ₄₄ NO ₆ P	[M+Na] ⁺	460.28215
136	LysoPE (P-16:0)	C ₂₁ H ₄₄ NO ₆ P	[M+K] ⁺	476.25616
137	LysoPE (P-16:0)	C ₂₁ H ₄₄ NO ₆ P	[M+H-H ₂ O] ⁺	420.28944
138	LysoPE (P-16:0)	C ₂₁ H ₄₄ NO ₆ P	[M+NH ₄] ⁺	455.32673
139	LysoPE (P-18:0)	C ₂₃ H ₄₈ NO ₆ P	[M+H] ⁺	466.33153
140	LysoPE (P-18:0)	C ₂₃ H ₄₈ NO ₆ P	[M+Na] ⁺	488.31359
141	LysoPE (P-18:0)	C ₂₃ H ₄₈ NO ₆ P	[M+K] ⁺	504.28760
142	LysoPE (P-18:0)	C ₂₃ H ₄₈ NO ₆ P	[M+H-H ₂ O] ⁺	448.32088
143	LysoPE (P-18:0)	C ₂₃ H ₄₈ NO ₆ P	[M+NH ₄] ⁺	483.35817
144	LysoPE (P-20:0)	C ₂₅ H ₅₂ NO ₆ P	[M+H] ⁺	494.36297
145	LysoPE (P-20:0)	C ₂₅ H ₅₂ NO ₆ P	[M+Na] ⁺	516.34503
146	LysoPE (P-20:0)	C ₂₅ H ₅₂ NO ₆ P	[M+K] ⁺	532.31905
147	LysoPE (P-20:0)	C ₂₅ H ₅₂ NO ₆ P	[M+H-H ₂ O] ⁺	476.35232
148	LysoPE (P-20:0)	C ₂₅ H ₅₂ NO ₆ P	[M+NH ₄] ⁺	511.38961
149	LysoPG (16:0)	C ₂₂ H ₄₅ O ₉ P	[M+H] ⁺	485.28982
150	LysoPG (16:0)	C ₂₂ H ₄₅ O ₉ P	[M+Na] ⁺	507.27188
151	LysoPG (16:0)	C ₂₂ H ₄₅ O ₉ P	[M+K] ⁺	523.24589
152	LysoPG (16:0)	C ₂₂ H ₄₅ O ₉ P	[M+H-H ₂ O] ⁺	467.27917
153	LysoPG (16:0)	C ₂₂ H ₄₅ O ₉ P	[M+NH ₄] ⁺	502.31646
154	LysoPG (16:1)	C ₂₂ H ₄₃ O ₉ P	[M+H] ⁺	483.27416
155	LysoPG (16:1)	C ₂₂ H ₄₃ O ₉ P	[M+Na] ⁺	505.25622
156	LysoPG (16:1)	C ₂₂ H ₄₃ O ₉ P	[M+K] ⁺	521.23023

Gemessene Parameter der MALDI-Experimente

157	LysoPG (16:1)	C ₂₂ H ₄₃ O ₉ P	[M+H-H ₂ O] ⁺	465.26351
158	LysoPG (16:1)	C ₂₂ H ₄₃ O ₉ P	[M+NH ₄] ⁺	500.30080
159	LysoPG (18:1)	C ₂₄ H ₄₇ O ₉ P	[M+H] ⁺	511.30560
160	LysoPG (18:1)	C ₂₄ H ₄₇ O ₉ P	[M+Na] ⁺	533.28766
161	LysoPG (18:1)	C ₂₄ H ₄₇ O ₉ P	[M+K] ⁺	549.26167
162	LysoPG (18:1)	C ₂₄ H ₄₇ O ₉ P	[M+H-H ₂ O] ⁺	493.29495
163	LysoPG (18:1)	C ₂₄ H ₄₇ O ₉ P	[M+NH ₄] ⁺	528.33224
164	LysoPG (18:2)	C ₂₄ H ₄₅ O ₉ P	[M+H] ⁺	509.28994
165	LysoPG (18:2)	C ₂₄ H ₄₅ O ₉ P	[M+Na] ⁺	531.27200
166	LysoPG (18:2)	C ₂₄ H ₄₅ O ₉ P	[M+K] ⁺	547.24601
167	LysoPG (18:2)	C ₂₄ H ₄₅ O ₉ P	[M+H-H ₂ O] ⁺	491.27929
168	LysoPG (18:2)	C ₂₄ H ₄₅ O ₉ P	[M+NH ₄] ⁺	526.31658
169	LysoPI (16:0)	C ₂₅ H ₄₉ O ₁₂ P	[M+H] ⁺	573.30631
170	LysoPI (16:0)	C ₂₅ H ₄₉ O ₁₂ P	[M+Na] ⁺	595.28836
171	LysoPI (16:0)	C ₂₅ H ₄₉ O ₁₂ P	[M+K] ⁺	611.26238
172	LysoPI (16:0)	C ₂₅ H ₄₉ O ₁₂ P	[M+H-H ₂ O] ⁺	555.29565
173	LysoPI (16:0)	C ₂₅ H ₄₉ O ₁₂ P	[M+NH ₄] ⁺	590.33294
174	LysoPI (18:0)	C ₂₇ H ₅₃ O ₁₂ P	[M+H] ⁺	601.33775
175	LysoPI (18:0)	C ₂₇ H ₅₃ O ₁₂ P	[M+Na] ⁺	623.31980
176	LysoPI (18:0)	C ₂₇ H ₅₃ O ₁₂ P	[M+K] ⁺	639.29382
177	LysoPI (18:0)	C ₂₇ H ₅₃ O ₁₂ P	[M+H-H ₂ O] ⁺	583.32709
178	LysoPI (18:0)	C ₂₇ H ₅₃ O ₁₂ P	[M+NH ₄] ⁺	618.36438
179	LysoPI (18:1)	C ₂₇ H ₅₁ O ₁₂ P	[M+H] ⁺	599.32209
180	LysoPI (18:1)	C ₂₇ H ₅₁ O ₁₂ P	[M+Na] ⁺	621.30414
181	LysoPI (18:1)	C ₂₇ H ₅₁ O ₁₂ P	[M+K] ⁺	637.27816
182	LysoPI (18:1)	C ₂₇ H ₅₁ O ₁₂ P	[M+H-H ₂ O] ⁺	581.31143
183	LysoPI (18:1)	C ₂₇ H ₅₁ O ₁₂ P	[M+NH ₄] ⁺	616.34872

Gemessene Parameter der MALDI-Experimente

184	LysoPI (20:0)	C ₂₉ H ₅₇ O ₁₂ P	[M+H] ⁺	629.36919
185	LysoPI (20:0)	C ₂₉ H ₅₇ O ₁₂ P	[M+Na] ⁺	651.35124
186	LysoPI (20:0)	C ₂₉ H ₅₇ O ₁₂ P	[M+K] ⁺	667.32526
187	LysoPI (20:0)	C ₂₉ H ₅₇ O ₁₂ P	[M+H-H ₂ O] ⁺	611.35853
188	LysoPI (20:0)	C ₂₉ H ₅₇ O ₁₂ P	[M+NH ₄] ⁺	646.39582
189	LysoPI (22:0)	C ₃₁ H ₆₁ O ₁₂ P	[M+H] ⁺	657.40063
190	LysoPI (22:0)	C ₃₁ H ₆₁ O ₁₂ P	[M+Na] ⁺	679.38268
191	LysoPI (22:0)	C ₃₁ H ₆₁ O ₁₂ P	[M+K] ⁺	695.35670
192	LysoPI (22:0)	C ₃₁ H ₆₁ O ₁₂ P	[M+H-H ₂ O] ⁺	639.38997
193	LysoPI (22:0)	C ₃₁ H ₆₁ O ₁₂ P	[M+NH ₄] ⁺	674.42726
194	LysoPI (22:1)	C ₃₁ H ₅₉ O ₁₂ P	[M+H] ⁺	655.38497
195	LysoPI (22:1)	C ₃₁ H ₅₉ O ₁₂ P	[M+Na] ⁺	677.36702
196	LysoPI (22:1)	C ₃₁ H ₅₉ O ₁₂ P	[M+K] ⁺	693.34104
197	LysoPI (22:1)	C ₃₁ H ₅₉ O ₁₂ P	[M+H-H ₂ O] ⁺	637.37431
198	LysoPI (22:1)	C ₃₁ H ₅₉ O ₁₂ P	[M+NH ₄] ⁺	672.41160
199	LysoPS (14:1)	C ₂₀ H ₃₈ NO ₉ P	[M+H] ⁺	468.23804
200	LysoPS (14:1)	C ₂₀ H ₃₈ NO ₉ P	[M+Na] ⁺	490.22009
201	LysoPS (14:1)	C ₂₀ H ₃₈ NO ₉ P	[M+K] ⁺	506.19411
202	LysoPS (14:1)	C ₂₀ H ₃₈ NO ₉ P	[M+H-H ₂ O] ⁺	450.22738
203	LysoPS (14:1)	C ₂₀ H ₃₈ NO ₉ P	[M+NH ₄] ⁺	485.26467
204	LysoPS (16:0)	C ₂₂ H ₄₄ NO ₉ P	[M+H] ⁺	498.28514
205	LysoPS (16:0)	C ₂₂ H ₄₄ NO ₉ P	[M+Na] ⁺	520.26719
206	LysoPS (16:0)	C ₂₂ H ₄₄ NO ₉ P	[M+K] ⁺	536.24121
207	LysoPS (16:0)	C ₂₂ H ₄₄ NO ₉ P	[M+H-H ₂ O] ⁺	480.27448
208	LysoPS (16:0)	C ₂₂ H ₄₄ NO ₉ P	[M+NH ₄] ⁺	515.31177
209	LysoPS (16:1)	C ₂₂ H ₄₂ NO ₉ P	[M+H] ⁺	496.26948
210	LysoPS (16:1)	C ₂₂ H ₄₂ NO ₉ P	[M+Na] ⁺	518.25153

Gemessene Parameter der MALDI-Experimente

211	LysoPS (16:1)	C ₂₂ H ₄₂ NO ₉ P	[M+K] ⁺	534.22555
212	LysoPS (16:1)	C ₂₂ H ₄₂ NO ₉ P	[M+H-H ₂ O] ⁺	478.25882
213	LysoPS (16:1)	C ₂₂ H ₄₂ NO ₉ P	[M+NH ₄] ⁺	513.29611
214	LysoPS (18:0)	C ₂₄ H ₄₈ NO ₉ P	[M+H] ⁺	526.31658
215	LysoPS (18:0)	C ₂₄ H ₄₈ NO ₉ P	[M+Na] ⁺	548.29863
216	LysoPS (18:0)	C ₂₄ H ₄₈ NO ₉ P	[M+K] ⁺	564.27265
217	LysoPS (18:0)	C ₂₄ H ₄₈ NO ₉ P	[M+H-H ₂ O] ⁺	508.30592
218	LysoPS (18:0)	C ₂₄ H ₄₈ NO ₉ P	[M+NH ₄] ⁺	543.34321
219	LysoPS (18:1)	C ₂₄ H ₄₆ NO ₉ P	[M+H] ⁺	524.30092
220	LysoPS (18:1)	C ₂₄ H ₄₆ NO ₉ P	[M+Na] ⁺	546.28297
221	LysoPS (18:1)	C ₂₄ H ₄₆ NO ₉ P	[M+K] ⁺	562.25699
222	LysoPS (18:1)	C ₂₄ H ₄₆ NO ₉ P	[M+H-H ₂ O] ⁺	506.29026
223	LysoPS (18:1)	C ₂₄ H ₄₆ NO ₉ P	[M+NH ₄] ⁺	541.32755
224	LysoPS (20:3)	C ₂₆ H ₄₆ NO ₉ P	[M+H] ⁺	548.30104
225	LysoPS (20:3)	C ₂₆ H ₄₆ NO ₉ P	[M+Na] ⁺	570.28309
226	LysoPS (20:3)	C ₂₆ H ₄₆ NO ₉ P	[M+K] ⁺	586.25711
227	LysoPS (20:3)	C ₂₆ H ₄₆ NO ₉ P	[M+H-H ₂ O] ⁺	530.29038
228	LysoPS (20:3)	C ₂₆ H ₄₆ NO ₉ P	[M+NH ₄] ⁺	565.32767
229	LysoPS (20:4)	C ₂₆ H ₄₄ NO ₉ P	[M+H] ⁺	546.28538
230	LysoPS (20:4)	C ₂₆ H ₄₄ NO ₉ P	[M+Na] ⁺	568.26743
231	LysoPS (20:4)	C ₂₆ H ₄₄ NO ₉ P	[M+K] ⁺	584.24145
232	LysoPS (20:4)	C ₂₆ H ₄₄ NO ₉ P	[M+H-H ₂ O] ⁺	528.27472
233	LysoPS (20:4)	C ₂₆ H ₄₄ NO ₉ P	[M+NH ₄] ⁺	563.31201
234	LysoPS (22:6)	C ₂₈ H ₄₄ NO ₉ P	[M+H] ⁺	570.28550
235	LysoPS (22:6)	C ₂₈ H ₄₄ NO ₉ P	[M+Na] ⁺	592.26755
236	LysoPS (22:6)	C ₂₈ H ₄₄ NO ₉ P	[M+K] ⁺	608.24157
237	LysoPS (22:6)	C ₂₈ H ₄₄ NO ₉ P	[M+H-H ₂ O] ⁺	552.27484

Gemessene Parameter der MALDI-Experimente

238	LysoPS (22:6)	C ₂₈ H ₄₄ NO ₉ P	[M+NH ₄] ⁺	587.31213
239	LysoPS (P-16:0)	C ₂₂ H ₄₄ NO ₈ P	[M+H] ⁺	482.29014
240	LysoPS (P-16:0)	C ₂₂ H ₄₄ NO ₈ P	[M+Na] ⁺	504.27220
241	LysoPS (P-16:0)	C ₂₂ H ₄₄ NO ₈ P	[M+K] ⁺	520.24621
242	LysoPS (P-16:0)	C ₂₂ H ₄₄ NO ₈ P	[M+H-H ₂ O] ⁺	464.27949
243	LysoPS (P-16:0)	C ₂₂ H ₄₄ NO ₈ P	[M+NH ₄] ⁺	499.31678
244	PA (36:4)	C ₃₉ H ₆₉ O ₈ P	[M+H] ⁺	697.48377
245	PA (36:4)	C ₃₉ H ₆₉ O ₈ P	[M+Na] ⁺	719.46582
246	PA (36:4)	C ₃₉ H ₆₉ O ₈ P	[M+K] ⁺	735.43984
247	PA (36:4)	C ₃₉ H ₆₉ O ₈ P	[M+H-H ₂ O] ⁺	679.47312
248	PA (36:4)	C ₃₉ H ₆₉ O ₈ P	[M+NH ₄] ⁺	714.51040
249	PA (38:4)	C ₄₁ H ₇₃ O ₈ P	[M+H] ⁺	725.51521
250	PA (38:4)	C ₄₁ H ₇₃ O ₈ P	[M+Na] ⁺	747.49726
251	PA (38:4)	C ₄₁ H ₇₃ O ₈ P	[M+K] ⁺	763.47128
252	PA (38:4)	C ₄₁ H ₇₃ O ₈ P	[M+H-H ₂ O] ⁺	707.50456
253	PA (38:4)	C ₄₁ H ₇₃ O ₈ P	[M+NH ₄] ⁺	742.54184
254	PA (40:5)	C ₄₃ H ₇₅ O ₈ P	[M+H] ⁺	751.53099
255	PA (40:5)	C ₄₃ H ₇₅ O ₈ P	[M+Na] ⁺	773.51304
256	PA (40:5)	C ₄₃ H ₇₅ O ₈ P	[M+K] ⁺	789.48706
257	PA (40:5)	C ₄₃ H ₇₅ O ₈ P	[M+H-H ₂ O] ⁺	733.52034
258	PA (40:5)	C ₄₃ H ₇₅ O ₈ P	[M+NH ₄] ⁺	768.55762
259	PA (40:8)	C ₄₃ H ₆₉ O ₈ P	[M+H] ⁺	745.48401
260	PA (40:8)	C ₄₃ H ₆₉ O ₈ P	[M+Na] ⁺	767.46606
261	PA (40:8)	C ₄₃ H ₆₉ O ₈ P	[M+K] ⁺	783.44008
262	PA (40:8)	C ₄₃ H ₆₉ O ₈ P	[M+H-H ₂ O] ⁺	727.47336
263	PA (40:8)	C ₄₃ H ₆₉ O ₈ P	[M+NH ₄] ⁺	762.51064
264	PA (42:10)	C ₄₅ H ₆₉ O ₈ P	[M+H] ⁺	769.48413

Gemessene Parameter der MALDI-Experimente

265	PA (42:10)	C ₄₅ H ₆₉ O ₈ P	[M+Na] ⁺	791.46618
266	PA (42:10)	C ₄₅ H ₆₉ O ₈ P	[M+K] ⁺	807.44020
267	PA (42:10)	C ₄₅ H ₆₉ O ₈ P	[M+H-H ₂ O] ⁺	751.47348
268	PA (42:10)	C ₄₅ H ₆₉ O ₈ P	[M+NH ₄] ⁺	786.51076
269	PC (36:5)	C ₄₄ H ₇₈ NO ₈ P	[M+H] ⁺	780.55768
270	PC (36:5)	C ₄₄ H ₇₈ NO ₈ P	[M+Na] ⁺	802.53974
271	PC (36:5)	C ₄₄ H ₇₈ NO ₈ P	[M+K] ⁺	818.51376
272	PC (36:5)	C ₄₄ H ₇₈ NO ₈ P	[M+H-H ₂ O] ⁺	762.54703
273	PC (36:5)	C ₄₄ H ₇₈ NO ₈ P	[M+NH ₄] ⁺	797.58432
274	PC (42:9)	C ₅₀ H ₈₂ NO ₈ P	[M+H] ⁺	842.60582
275	PC (42:9)	C ₅₀ H ₈₂ NO ₈ P	[M+Na] ⁺	878.56703
276	PC (42:9)	C ₅₀ H ₈₂ NO ₈ P	[M+K] ⁺	894.54096
277	PC (42:11)	C ₅₀ H ₇₈ NO ₈ P	[M+H] ⁺	852.55378
278	PC (42:11)	C ₅₀ H ₇₈ NO ₈ P	[M+Na] ⁺	874.53573
279	PC (42:11)	C ₅₀ H ₇₈ NO ₈ P	[M+K] ⁺	890.50966
280	PC (42:11)	C ₅₀ H ₇₈ NO ₈ P	[M+NH ₄] ⁺	869.58033
281	PC (P-38:4)	C ₄₆ H ₈₄ NO ₇ P	[M+H] ⁺	794.60979
282	PC (P-38:4)	C ₄₆ H ₈₄ NO ₇ P	[M+Na] ⁺	816.59184
283	PC (P-38:4)	C ₄₆ H ₈₄ NO ₇ P	[M+K] ⁺	832.56586
284	PC (P-38:4)	C ₄₆ H ₈₄ NO ₇ P	[M+H-H ₂ O] ⁺	776.59914
285	PC (P-38:4)	C ₄₆ H ₈₄ NO ₇ P	[M+NH ₄] ⁺	811.63642
286	PE (36:4)	C ₄₁ H ₇₄ NO ₈ P	[M+H] ⁺	740.52618
287	PE (36:4)	C ₄₁ H ₇₄ NO ₈ P	[M+Na] ⁺	762.50824
288	PE (36:4)	C ₄₁ H ₇₄ NO ₈ P	[M+K] ⁺	778.48226
289	PE (36:4)	C ₄₁ H ₇₄ NO ₈ P	[M+H-H ₂ O] ⁺	722.51553
290	PE (36:4)	C ₄₁ H ₇₄ NO ₈ P	[M+NH ₄] ⁺	757.55282
291	PE (36:5)	C ₄₁ H ₇₂ NO ₈ P	[M+H] ⁺	738.51052

Gemessene Parameter der MALDI-Experimente

292	PE (36:5)	C ₄₁ H ₇₂ NO ₈ P	[M+Na] ⁺	760.49258
293	PE (36:5)	C ₄₁ H ₇₂ NO ₈ P	[M+K] ⁺	776.46660
294	PE (36:5)	C ₄₁ H ₇₂ NO ₈ P	[M+H-H ₂ O] ⁺	720.49987
295	PE (36:5)	C ₄₁ H ₇₂ NO ₈ P	[M+NH ₄] ⁺	755.53716
296	PE (38:4)	C ₄₃ H ₇₈ NO ₈ P	[M+H] ⁺	768.55762
297	PE (38:4)	C ₄₃ H ₇₈ NO ₈ P	[M+Na] ⁺	790.53968
298	PE (38:4)	C ₄₃ H ₇₈ NO ₈ P	[M+K] ⁺	806.51370
299	PE (38:4)	C ₄₃ H ₇₈ NO ₈ P	[M+H-H ₂ O] ⁺	750.54697
300	PE (38:4)	C ₄₃ H ₇₈ NO ₈ P	[M+NH ₄] ⁺	785.58426
301	PE (P-38:5)	C ₄₃ H ₇₆ NO ₇ P	[M+H] ⁺	750.54697
302	PE (P-38:5)	C ₄₃ H ₇₆ NO ₇ P	[M+Na] ⁺	772.52902
303	PE (P-38:5)	C ₄₃ H ₇₆ NO ₇ P	[M+K] ⁺	788.50304
304	PE (P-38:5)	C ₄₃ H ₇₆ NO ₇ P	[M+H-H ₂ O] ⁺	732.53632
305	PE (P-38:5)	C ₄₃ H ₇₆ NO ₇ P	[M+NH ₄] ⁺	767.57360
306	PG (36:4)	C ₄₂ H ₇₅ O ₁₀ P	[M+H] ⁺	771.52092
307	PG (36:4)	C ₄₂ H ₇₅ O ₁₀ P	[M+Na] ⁺	793.50297
308	PG (36:4)	C ₄₂ H ₇₅ O ₁₀ P	[M+K] ⁺	809.47699
309	PG (36:4)	C ₄₂ H ₇₅ O ₁₀ P	[M+H-H ₂ O] ⁺	753.51027
310	PG (36:4)	C ₄₂ H ₇₅ O ₁₀ P	[M+NH ₄] ⁺	788.54755
311	PG (36:5)	C ₄₂ H ₇₃ O ₁₀ P	[M+H] ⁺	769.50526
312	PG (36:5)	C ₄₂ H ₇₃ O ₁₀ P	[M+Na] ⁺	791.48731
313	PG (36:5)	C ₄₂ H ₇₃ O ₁₀ P	[M+K] ⁺	807.46133
314	PG (36:5)	C ₄₂ H ₇₃ O ₁₀ P	[M+H-H ₂ O] ⁺	751.49460
315	PG (36:5)	C ₄₂ H ₇₃ O ₁₀ P	[M+NH ₄] ⁺	786.53189
316	PG (38:4)	C ₄₄ H ₇₉ O ₁₀ P	[M+H] ⁺	799.55236
317	PG (38:4)	C ₄₄ H ₇₉ O ₁₀ P	[M+Na] ⁺	821.53441
318	PG (38:4)	C ₄₄ H ₇₉ O ₁₀ P	[M+K] ⁺	837.50843

Gemessene Parameter der MALDI-Experimente

319	PG (38:4)	C ₄₄ H ₇₉ O ₁₀ P	[M+H-H ₂ O] ⁺	781.54171
320	PG (38:4)	C ₄₄ H ₇₉ O ₁₀ P	[M+NH ₄] ⁺	816.57899
321	PG (38:6)	C ₄₄ H ₇₅ O ₁₀ P	[M+H] ⁺	795.52104
322	PG (38:6)	C ₄₄ H ₇₅ O ₁₀ P	[M+Na] ⁺	817.50309
323	PG (38:6)	C ₄₄ H ₇₅ O ₁₀ P	[M+K] ⁺	833.47711
324	PG (38:6)	C ₄₄ H ₇₅ O ₁₀ P	[M+H-H ₂ O] ⁺	777.51039
325	PG (38:6)	C ₄₄ H ₇₅ O ₁₀ P	[M+NH ₄] ⁺	812.54767
326	PI (36:4)	C ₄₅ H ₇₉ O ₁₃ P	[M+H] ⁺	859.53740
327	PI (36:4)	C ₄₅ H ₇₉ O ₁₃ P	[M+Na] ⁺	881.51946
328	PI (36:4)	C ₄₅ H ₇₉ O ₁₃ P	[M+K] ⁺	897.49348
329	PI (36:4)	C ₄₅ H ₇₉ O ₁₃ P	[M+H-H ₂ O] ⁺	841.52675
330	PI (36:4)	C ₄₅ H ₇₉ O ₁₃ P	[M+NH ₄] ⁺	876.56404
331	PI (38:4)	C ₄₇ H ₈₃ O ₁₃ P	[M+H] ⁺	887.56884
332	PI (38:4)	C ₄₇ H ₈₃ O ₁₃ P	[M+Na] ⁺	909.55090
333	PI (38:4)	C ₄₇ H ₈₃ O ₁₃ P	[M+K] ⁺	925.52492
334	PI (38:4)	C ₄₇ H ₈₃ O ₁₃ P	[M+H-H ₂ O] ⁺	869.55820
335	PI (38:4)	C ₄₇ H ₈₃ O ₁₃ P	[M+NH ₄] ⁺	904.59548
336	PI (38:5)	C ₄₇ H ₈₁ O ₁₃ P	[M+H] ⁺	885.55318
337	PI (38:5)	C ₄₇ H ₈₁ O ₁₃ P	[M+Na] ⁺	907.53524
338	PI (38:5)	C ₄₇ H ₈₁ O ₁₃ P	[M+K] ⁺	923.50926
339	PI (38:5)	C ₄₇ H ₈₁ O ₁₃ P	[M+H-H ₂ O] ⁺	867.54253
340	PI (38:5)	C ₄₇ H ₈₁ O ₁₃ P	[M+NH ₄] ⁺	902.57982
341	PI (40:4)	C ₄₉ H ₈₇ O ₁₃ P	[M+H] ⁺	915.60028
342	PI (40:4)	C ₄₉ H ₈₇ O ₁₃ P	[M+Na] ⁺	937.58234
343	PI (40:4)	C ₄₉ H ₈₇ O ₁₃ P	[M+K] ⁺	953.55636
344	PI (40:4)	C ₄₉ H ₈₇ O ₁₃ P	[M+H-H ₂ O] ⁺	897.58963
345	PI (40:4)	C ₄₉ H ₈₇ O ₁₃ P	[M+NH ₄] ⁺	932.62692

Gemessene Parameter der MALDI-Experimente

346	PI (42:4)	$C_{51}H_{91}O_{13}P$	$[M+H]^+$	943.63172
347	PI (42:4)	$C_{51}H_{91}O_{13}P$	$[M+Na]^+$	965.61378
348	PI (42:4)	$C_{51}H_{91}O_{13}P$	$[M+K]^+$	981.58780
349	PI (42:4)	$C_{51}H_{91}O_{13}P$	$[M+H-H_2O]^+$	925.62107
350	PI (42:4)	$C_{51}H_{91}O_{13}P$	$[M+NH_4]^+$	960.65836
351	PI (42:5)	$C_{51}H_{89}O_{13}P$	$[M+H]^+$	941.61606
352	PI (42:5)	$C_{51}H_{89}O_{13}P$	$[M+Na]^+$	963.59812
353	PI (42:5)	$C_{51}H_{89}O_{13}P$	$[M+K]^+$	979.57214
354	PI (42:5)	$C_{51}H_{89}O_{13}P$	$[M+H-H_2O]^+$	923.60541
355	PI (42:5)	$C_{51}H_{89}O_{13}P$	$[M+NH_4]^+$	958.64270
356	PS (34:5)	$C_{40}H_{68}NO_{10}P$	$[M+H]^+$	754.46913
357	PS (34:5)	$C_{40}H_{68}NO_{10}P$	$[M+Na]^+$	776.45119
358	PS (34:5)	$C_{40}H_{68}NO_{10}P$	$[M+K]^+$	792.42520
359	PS (34:5)	$C_{40}H_{68}NO_{10}P$	$[M+H-H_2O]^+$	736.45848
360	PS (34:5)	$C_{40}H_{68}NO_{10}P$	$[M+NH_4]^+$	771.49577
361	PS (36:4)	$C_{42}H_{74}NO_{10}P$	$[M+H]^+$	784.51623
362	PS (36:4)	$C_{42}H_{74}NO_{10}P$	$[M+Na]^+$	806.49829
363	PS (36:4)	$C_{42}H_{74}NO_{10}P$	$[M+K]^+$	822.47231
364	PS (36:4)	$C_{42}H_{74}NO_{10}P$	$[M+H-H_2O]^+$	766.50558
365	PS (36:4)	$C_{42}H_{74}NO_{10}P$	$[M+NH_4]^+$	801.54287
366	PS (36:5)	$C_{42}H_{72}NO_{10}P$	$[M+H]^+$	782.50057
367	PS (36:5)	$C_{42}H_{72}NO_{10}P$	$[M+Na]^+$	804.48263
368	PS (36:5)	$C_{42}H_{72}NO_{10}P$	$[M+K]^+$	820.45665
369	PS (36:5)	$C_{42}H_{72}NO_{10}P$	$[M+H-H_2O]^+$	764.48992
370	PS (36:5)	$C_{42}H_{72}NO_{10}P$	$[M+NH_4]^+$	799.52721
371	PS (38:4)	$C_{44}H_{78}NO_{10}P$	$[M+H]^+$	812.54767
372	PS (38:4)	$C_{44}H_{78}NO_{10}P$	$[M+Na]^+$	834.52973

Gemessene Parameter der MALDI-Experimente

373	PS (38:4)	C ₄₄ H ₇₈ NO ₁₀ P	[M+K] ⁺	850.50375
374	PS (38:4)	C ₄₄ H ₇₈ NO ₁₀ P	[M+H-H ₂ O] ⁺	794.53702
375	PS (38:4)	C ₄₄ H ₇₈ NO ₁₀ P	[M+NH ₄] ⁺	829.57431
376	PS (38:5)	C ₄₄ H ₇₆ NO ₁₀ P	[M+H] ⁺	810.53201
377	PS (38:5)	C ₄₄ H ₇₆ NO ₁₀ P	[M+Na] ⁺	832.51407
378	PS (38:5)	C ₄₄ H ₇₆ NO ₁₀ P	[M+K] ⁺	848.48809
379	PS (38:5)	C ₄₄ H ₇₆ NO ₁₀ P	[M+H-H ₂ O] ⁺	792.52136
380	PS (38:5)	C ₄₄ H ₇₆ NO ₁₀ P	[M+NH ₄] ⁺	827.55865
381	PS (40:7)	C ₄₆ H ₇₆ NO ₁₀ P	[M+H] ⁺	834.53213
382	PS (40:7)	C ₄₆ H ₇₆ NO ₁₀ P	[M+Na] ⁺	856.51419
383	PS (40:7)	C ₄₆ H ₇₆ NO ₁₀ P	[M+K] ⁺	872.48821
384	PS (40:7)	C ₄₆ H ₇₆ NO ₁₀ P	[M+H-H ₂ O] ⁺	816.52148
385	PS (40:7)	C ₄₆ H ₇₆ NO ₁₀ P	[M+NH ₄] ⁺	851.55877
386	PS (40:8)	C ₄₆ H ₇₄ NO ₁₀ P	[M+H] ⁺	832.51647
387	PS (40:8)	C ₄₆ H ₇₄ NO ₁₀ P	[M+Na] ⁺	854.49853
388	PS (40:8)	C ₄₆ H ₇₄ NO ₁₀ P	[M+K] ⁺	870.47255
389	PS (40:8)	C ₄₆ H ₇₄ NO ₁₀ P	[M+H-H ₂ O] ⁺	814.50582
390	PS (40:8)	C ₄₆ H ₇₄ NO ₁₀ P	[M+NH ₄] ⁺	849.54311
391	PS (42:10)	C ₄₈ H ₇₄ NO ₁₀ P	[M+H] ⁺	856.51659
392	PS (42:10)	C ₄₈ H ₇₄ NO ₁₀ P	[M+Na] ⁺	878.49865
393	PS (42:10)	C ₄₈ H ₇₄ NO ₁₀ P	[M+K] ⁺	894.47267
394	PS (42:10)	C ₄₈ H ₇₄ NO ₁₀ P	[M+H-H ₂ O] ⁺	838.50594
395	PS (42:10)	C ₄₈ H ₇₄ NO ₁₀ P	[M+NH ₄] ⁺	873.54323
396	PS (P-36:4)	C ₄₂ H ₇₄ NO ₉ P	[M+H] ⁺	768.52124
397	PS (P-36:4)	C ₄₂ H ₇₄ NO ₉ P	[M+Na] ⁺	790.50329
398	PS (P-36:4)	C ₄₂ H ₇₄ NO ₉ P	[M+K] ⁺	806.47731
399	PS (P-36:4)	C ₄₂ H ₇₄ NO ₉ P	[M+H-H ₂ O] ⁺	750.51058

400	PS (P-36:4)	$C_{42}H_{74}NO_9P$	$[M+NH_4]^+$	785.54787
-----	-------------	---------------------	--------------	-----------

Tabelle 39

Auflistung von im positiven Ionen-Modus nicht detektierbaren Substanzen. Entsprechende Massen wurden in allen im positiven Ionen-Modus durchgeführten Messungen gesucht, waren jedoch nicht sicher ansprechbar.

3.2 Im negativen Ionen-Modus nicht gefundene Massen

	Substanz	Summenformel	Addukt	Berechnete Masse/ theoretische Masse
1	Eicosapentaensäure	$C_{20}H_{30}O_2$	$[M+H]^-$	301.21730
2	2-Arachidonylglycerol	$C_{23}H_{38}O_4$	$[M+H]^-$	377.26973
3	Resolvin D1	$C_{22}H_{32}O_5$	$[M+H]^-$	375.21770
4	Resolvin D2	$C_{22}H_{32}O_5$	$[M+H]^-$	375.21770
5	Resolvin D3	$C_{22}H_{32}O_5$	$[M+H]^-$	375.21770
6	Resolvin D4	$C_{22}H_{32}O_5$	$[M+H]^-$	375.21770
7	Resolvin D5	$C_{22}H_{32}O_4$	$[M+H]^-$	359.22278
8	Resolvin E1	$C_{20}H_{30}O_5$	$[M+H]^-$	349.20205
9	Resolvin E2	$C_{20}H_{30}O_4$	$[M+H]^-$	333.20713
10	Prostaglandin D2	$C_{20}H_{32}O_5$	$[M+H]^-$	351.21770
11	Prostaglandin E2	$C_{20}H_{32}O_5$	$[M+H]^-$	351.21770
12	Prostaglandin J2	$C_{20}H_{30}O_4$	$[M+H]^-$	333.20713
13	18-HEPE	$C_{20}H_{30}O_3$	$[M+H]^-$	317.21222
14	7(S)-Maresin 1	$C_{22}H_{32}O_4$	$[M+H]^-$	359.22278
15	Neuroprotectin D1	$C_{22}H_{32}O_4$	$[M+H]^-$	359.22278
16	10(S),17(S)-DiHDoHE	$C_{22}H_{32}O_4$	$[M+H]^-$	359.22278
17	Leukotrien A4	$C_{20}H_{30}O_3$	$[M+H]^-$	317.21222
18	Leukotrien B4	$C_{20}H_{32}O_4$	$[M+H]^-$	335.22278
19	Leukotrien C4	$C_{30}H_{47}N_3O_9S$	$[M+H]^-$	624.29602
20	LysoPA (20:4)	$C_{23}H_{39}O_7P$	$[M+H]^-$	457.23606
21	LysoPG (16:0)	$C_{22}H_{45}O_9P$	$[M+H]^-$	483.27284

Gemessene Parameter der MALDI-Experimente

22	LysoPG (18:0)	$C_{24}H_{49}O_9P$	$[M+H]^+$	511.30414
23	LysoPG (18:1)	$C_{24}H_{47}O_9P$	$[M+H]^+$	509.28849
24	LysoPG (20:4)	$C_{26}H_{45}O_9P$	$[M+H]^+$	531.27284
25	LysoPG (22:6)	$C_{28}H_{45}O_9P$	$[M+H]^+$	555.27284
26	LysoPI (22:6)	$C_{31}H_{49}O_{12}P$	$[M+H]^+$	643.28889
27	LysoPS (16:0)	$C_{22}H_{44}NO_9P$	$[M+H]^+$	496.26809
28	LysoPS (18:0)	$C_{24}H_{48}NO_9P$	$[M+H]^+$	524.29939
29	LysoPS (18:1)	$C_{24}H_{46}NO_9P$	$[M+H]^+$	522.28374
30	LysoPS (20:4)	$C_{26}H_{44}NO_9P$	$[M+H]^+$	544.26809
31	LysoPS (22:6)	$C_{28}H_{44}NO_9P$	$[M+H]^+$	568.26809
32	PA (34:0)	$C_{37}H_{73}O_8P$	$[M+H]^+$	675.49703
33	PA (36:0)	$C_{39}H_{77}O_8P$	$[M+H]^+$	703.52833
34	PA (40:8)	$C_{43}H_{69}O_8P$	$[M+H]^+$	743.46573
35	PA (42:10)	$C_{45}H_{69}O_8P$	$[M+H]^+$	767.46573
36	PA (44:12)	$C_{47}H_{69}O_8P$	$[M+H]^+$	791.46573
37	PE (36:0)	$C_{41}H_{82}NO_8P$	$[M+H]^+$	746.57053
38	PE (40:8)	$C_{45}H_{74}NO_8P$	$[M+H]^+$	786.50793
39	PE (42:10)	$C_{47}H_{74}NO_8P$	$[M+H]^+$	810.50793
40	PE (44:12)	$C_{49}H_{74}NO_8P$	$[M+H]^+$	834.50793
41	PG (32:0)	$C_{38}H_{75}O_{10}P$	$[M+H]^+$	721.50251
42	PG (34:0)	$C_{40}H_{79}O_{10}P$	$[M+H]^+$	749.53381
43	PG (36:0)	$C_{42}H_{83}O_{10}P$	$[M+H]^+$	777.56511
44	PG (36:1)	$C_{42}H_{81}O_{10}P$	$[M+H]^+$	775.54946
45	PG (36:4)	$C_{42}H_{75}O_{10}P$	$[M+H]^+$	769.50251
46	PG (38:5)	$C_{44}H_{77}O_{10}P$	$[M+H]^+$	795.51816
47	PG (38:6)	$C_{44}H_{75}O_{10}P$	$[M+H]^+$	793.50251
48	PG (40:6)	$C_{46}H_{79}O_{10}P$	$[M+H]^+$	821.53381

Gemessene Parameter der MALDI-Experimente

49	PG (40:7)	$C_{46}H_{77}O_{10}P$	$[M+H]^-$	819.51816
50	PG (40:8)	$C_{46}H_{75}O_{10}P$	$[M+H]^-$	817.50251
51	PG (42:10)	$C_{48}H_{75}O_{10}P$	$[M+H]^-$	841.50251
52	PG (44:12)	$C_{50}H_{75}O_{10}P$	$[M+H]^-$	865.50251
53	PI (32:0)	$C_{41}H_{79}O_{13}P$	$[M+H]^-$	809.51855
54	PI (34:0)	$C_{43}H_{83}O_{13}P$	$[M+H]^-$	837.54985
55	PI (36:0)	$C_{45}H^{87}O^{13}P$	$[M+H]^-$	865.58115
56	PI (36:1)	$C_{45}H_{85}O_{13}P$	$[M+H]^-$	863.56550
57	PI (36:2)	$C_{45}H_{83}O_{13}P$	$[M+H]^-$	861.54985
58	PI (38:6)	$C_{47}H_{79}O_{13}P$	$[M+H]^-$	881.51855
59	PI (40:6)	$C_{49}H_{83}O_{13}P$	$[M+H]^-$	909.54985
60	PI (40:7)	$C_{49}H_{81}O_{13}P$	$[M+H]^-$	907.53420
61	PI (40:8)	$C_{49}H_{79}O_{13}P$	$[M+H]^-$	905.51855
62	PI (42:10)	$C_{51}H_{79}O_{13}P$	$[M+H]^-$	929.51855
63	PI (44:12)	$C_{53}H_{79}O_{13}P$	$[M+H]^-$	953.51855
64	PS (32:0)	$C_{38}H_{74}NO_{10}P$	$[M+H]^-$	734.49776
65	PS (34:0)	$C_{40}H_{78}NO_{10}P$	$[M+H]^-$	762.52906
66	PS (36:0)	$C_{42}H_{82}NO_{10}P$	$[M+H]^-$	790.56036
67	PS (36:4)	$C_{42}H_{74}NO_{10}P$	$[M+H]^-$	782.49776
68	PS (38:6)	$C_{44}H_{74}NO_{10}P$	$[M+H]^-$	806.49776
69	PS (40:8)	$C_{46}H_{74}NO_{10}P$	$[M+H]^-$	830.49776
70	PS (42:10)	$C_{48}H_{74}NO_{10}P$	$[M+H]^-$	854.49776
71	PS (44:12)	$C_{50}H_{74}NO_{10}P$	$[M+H]^-$	878.49776

Tabelle 40

Auflistung von im negativen Ionen-Modus nicht detektierbaren Substanzen. Entsprechende Massen wurden in allen im negativen Ionen-Modus durchgeführten Messungen gesucht, waren jedoch nicht sicher ansprechbar.

VIII. Abkürzungen

[M]	exakte bzw. theoretische Masse
2-AG	2-Arachidonylglycerol
3NBA	3-Nitrobenzylalkohol
α LNA	α -Linolensäure
AA	Arachidonsäure
ACTH	Adrenocorticotropes Hormon
ADP	Adenosindiphosphat
AK	Antikörper
ALX/fpr2	Lipoxin A4 Rezeptor / Formyl Peptid Rezeptor 2
AMP	Adenosinmonophosphat
ANOVA	Varianzanalyse
AP	<i>Area postrema</i>
APS	Ammoniumpersulfat
AP-SMALDI	Atmosphärendruck-Raster-Mikrosonden-MALDI-Massenspektrometrie-Systeme
ATP	Adenosintriphosphat
BCA	Bicinchoninsäure
BHS	Blut-Hirn-Schranke
BK, $K_{Ca1.1}$	spannungsabhängige Calcium aktivierte Kaliumkanäle
BLT1	Leukotrien B4 Rezeptor
bp	Basenpaare
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CD11b	<i>cluster of differentiation 11b</i>
CD14	<i>cluster of differentiation 14</i>
CD68	<i>cluster of differentiation 68</i>
cDNA	komplementäre DNA
ChemR23	<i>chemokine-like receptor 1</i>
CLCCA	4-Chloro- α -Cyanozimtsäure
CLP	<i>cecal ligation and puncture</i>
COX	Cyclooxygenase
COX2	Cyclooxygenase 2
CRH	<i>corticotropin releasing hormone</i>
CVO	circumventrikuläres Organ
CyPPA	Cyclohexyl-[2-(3,5-dimethyl-pyrazol-1-yl)-6-methyl-pyrimidin-4-yl]-amine
DAB	D3,3'-Diaminobenzidin Tetrahydrochlorid
DAMPs	<i>danger-associated molecular patterns</i>
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
ddH ₂ O	demineralisiertes Wasser
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DHA	Docosahexaensäure
DHB	2,5-Dihydroxybenzoesäure
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphat-Moleküle
DPA	Docosapentaensäure
ds	doppelsträngig
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglykoltetraessigsäure
EPA	Eicosapentaensäure
ERK	<i>extracellular-signal regulated kinase</i>

Abkürzungen

ESI-LC-MS	<i>electrospray ionisation liquid chromatography-MS</i>
FAM	6-Carboxyfluorescein
Fat-1	Mäuse der Linie B6.129P2-Tg(CAG-fat-1)Jxk
FG	Feuchtgewicht
FKS	fetales Kälberserum
FRET	Fluoreszenz-Resonanz-Energie Transfers
FS	Fettsäure
GDP	Guanosindiphosphat
GFAP	saures Gliafaserprotein
gp	Glykoprotein
GPR	G-Protein gekoppelter Rezeptor
GTC	Guanidin-Isothiocyanat
GTP	Guanosintriphosphat
HMGB1	<i>high-mobility group box 1</i>
HPA-Achse	Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse
HPLC	<i>high-performance liquid chromatography</i>
HRP	Meerrettich-Peroxidase
HT-22	immortalisierten hippocampalen Zelllinie
HVL	Hypophysenvorderlappen
Hz	Hertz
i.p.	intraperitoneal
Iba-1	<i>calcium binding adaptor molecule-1</i>
ICAM-1	<i>intercellular adhesion molecule 1</i>
Ig	Immunglobulin
IK, K _{Ca} 3.1	intermediäre, schwach leitende durch Calcium aktivierte Kaliumkanäle
IKK	IκB-Kinase-Komplex
IKK-P	phosphorylierter IκB-Kinase-Komplex
IL-10	Interleukin-10
IL-1ra	IL-1-Rezeptor-Antagonist
IL-1β	Interleukin-1β
IL-6	Interleukin-6
IQR	<i>interquartile-range</i>
IκB	inhibitorischer Faktor κB
IκBα	<i>inhibitor of kappa B</i>
JAK	Janus-Kinase
KGW	Körpergewicht
LA	Linolsäure
LC	<i>liquid chromatography</i>
LC-MS	<i>liquid chromatography</i> Massenspektrometrie
LC-MS/MS	<i>liquid chromatography</i> Tandem Massenspektrometrie
LOX	Lipoxygenasen
LPA	Lysophosphatidyl
LPC	Lysophosphocholin
LPC O	Lyso-Form von PC O
LPC P	Lysocholin Plasmalogen
LPE	Lysophosphoethanolamin
LPI	Lysophosphoinositol
LPS	Lipopolysaccharid
LT	Leukotriene
LTP	<i>long-term potentiation</i>
m/z	Masse-zu-Ladungsverhältnis
m _a	Massengenauigkeit in ppm
MALDI	<i>matrix assisted laser desorption / ionisation</i>

Abkürzungen

MALDI-MSI	<i>matrix assisted laser desorption / ionisation mass spectrometry imaging</i>
MAP	<i>mitogen-activated protein</i>
MAP-K-K	<i>mitogen-activated protein-kinase-Kaskade</i>
ME	<i>Eminentia mediana</i>
m _g	akkurate bzw. gemessene Masse
MGL	Monoacylglycerol Lipase
MnPO	<i>Nucleus praeopticus medianus</i>
mPGES	mikrosomale Prostaglandin E Synthase
mRNA	<i>messenger</i> Ribonukleinsäure
MS	Massenspektrometrie
MS/MS	Tandem Massenspektrometrie
MSI	<i>mass spectrometry imaging</i>
m _t	exakte bzw. theoretische Masse
mtROS	mitochondriale reaktive Sauerstoffspezies
MTT	3-[4,5-Dimethylthiazol-2yl] 2,5-Diphenyl-Tetrazoliumbromid
MyD88	<i>myeloid differentiation primary response protein</i>
n.s.	nicht signifikant unterschiedlich
n3 def.	ω-3 defizient gefüttert
NDS	<i>normal donkey serum</i>
NES	<i>novel environment stress</i>
NF	<i>nuclear factor</i>
NF-IL6	<i>nuclear factor interleukin 6</i>
NFκB	<i>nuclear factor kappa B</i>
NMDA	N-methyl-D-aspartat
NNR	Nebennierenrinde
NO	Stickstoffmonoxid
NPD1	Neuroprotectin D1
NSAIDs	nicht steroidale anti-inflammatorische Medikamente
OD	optische Dichte
OF	Synonym zu NES verwendet
OVLT	<i>Organum vasculosum laminae terminalis</i>
PA	Phosphatidylsäure
PAMPs	<i>pathogen-associated molecular patterns</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PC	Phosphatidylcholin
PC O / PE O	1-O-Alkylether
PC P	Cholin Plasmalogen
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PE	Phosphatidylethanolamin
PE P	Ethanolamin Plasmalogen
PFA	Paraformaldehyd
PG	Phosphatidylglycerin
PGD ₂	Prostaglandin D ₂
PGE ₂	Prostaglandin E ₂
PGH ₂	Prostaglandin H ₂
PGJ ₂	Prostaglandin J ₂
PI	Phosphatidylinositol
PLA ₂	Phospholipase A ₂
pNA	Para-nitroanilin
poly I:C	<i>polyinosinic: polycytidylic acid</i>
POMC	Proopiomelanocortin
pp65	phospho-p65
ppm	<i>parts per million</i>

Abkürzungen

PS	Phosphatidylserin
PUFA	<i>polyunsaturated fatty acids</i>
PVDF	Polyvinylidenfluorid
PVN	<i>Nucleus paraventricularis</i>
R	Massenauflösung
RMSE	mittleren quadratischen Abweichung, <i>root mean square error</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
ROI	Zielregion (<i>region of interest</i>)
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>rounds per minute</i>)
RT	Raumtemperatur
Rv	Resolvine
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid Gelelektrophorese
SFO	<i>Organum subfornicale</i>
SK1-3, K _{Ca} 2.1-3	kleine, schwach leitende durch Calcium aktivierte Kaliumkanäle
SM	Sphingomyelin
SMALDI-MS	<i>scanning microprobe matrix assisted laser desorption / ionisation mass spectrometry</i>
sn	stereospezifische Nummerierung
SOCS	<i>suppressor of cytokine signaling</i>
SOCS3	<i>suppressor of cytokine signaling 3</i>
SPM	<i>specialized pro resolving mediators</i>
STAT	<i>signal transducer and activator of transcription</i>
STAT3	<i>signal transducer and activator of transcription 3</i>
T abd.	Körperkerntemperatur
TBA-HS	Tetra-butyl-ammonium-hydrogensulfat
TBE	TRIS-Borat-EDTA
TBS	<i>tris-buffered saline</i>
TBST	<i>tris-buffered saline + Tween 20</i>
TEMED	Tetramethylethylenediamin
TLR	Toll-Like-Rezeptor
TNF-R	Tumornekrosefaktor-Rezeptor
TNF- α	Tumornekrosefaktor α
TP	Tupferprobe von Trachea, Caecum, Vagina / Präputium
TRADD	<i>TNF-receptor 1-associated death domain protein</i>
Tx	Thromboxan
vWF	von Willebrandt Faktor
WT	Mäuse der Linie C57BL/6N
ZNS	Zentrales Nervensystem

IX. Literaturverzeichnis

- [1] IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature (CBN), 1967: The nomenclature of lipids. *Eur J Biochem*, **2**, 127-131.
- [2] JP Adelman, J Maylie and P Sah, 2012: Small-Conductance Ca²⁺-Activated K⁺Channels: Form and Function. *Annual Review of Physiology*, **74**, 245-269.
- [3] A Aderem and RJ Ulevitch, 2000: Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. *Nature*, **406**, 782-787.
- [4] A Aguilar-Valles, J Kim, S Jung, et al., 2014: Role of brain transmigrating neutrophils in depression-like behavior during systemic infection. *Mol Psychiatry*, **19**, 599-606.
- [5] S Akira, H Isshiki, T Sugita, et al., 1990: A nuclear factor for IL-6 expression (NF-IL6) is a member of a C/EBP family. *EMBO J*, **9**, 1897-1906.
- [6] A Alegria-Schaffer, 2014: Western blotting using chemiluminescent substrates. *Methods Enzymol*, **541**, 251-259.
- [7] C Alexander and ET Rietschel, 2001: Bacterial lipopolysaccharides and innate immunity. *J Endotoxin Res*, **7**, 167-202.
- [8] D Allen, B Fakler, J Maylie, et al., 2007: Organization and regulation of small conductance Ca²⁺-activated K⁺ channel multiprotein complexes. *J Neurosci*, **27**, 2369-2376.
- [9] D Allen, S Nakayama, M Kuroiwa, et al., 2011: SK2 channels are neuroprotective for ischemia-induced neuronal cell death. *J Cereb Blood Flow Metab*, **31**, 2302-2312.
- [10] BM Altura, A Gebrewold, T Zheng, et al., 2002: Sphingomyelinase and ceramide analogs induce vasoconstriction and leukocyte-endothelial interactions in cerebral venules in the intact rat brain: Insight into mechanisms and possible relation to brain injury and stroke. *Brain Res Bull*, **58**, 271-278.
- [11] K Alvina and K Khodakhah, 2010: KCa channels as therapeutic targets in episodic ataxia type-2. *J Neurosci*, **30**, 7249-7257.
- [12] KM Appleton, HM Sallis, R Perry, et al., 2015: Omega-3 fatty acids for depression in adults. *Cochrane Database Syst Rev*, **11**, CD004692.
- [13] H Arima, M Hanada, T Hayasaka, et al., 2014: Blockade of IL-6 signaling by MR16-1 inhibits reduction of docosahexaenoic acid-containing phosphatidylcholine levels in a mouse model of spinal cord injury. *Neuroscience*, **269**, 1-10.
- [14] H Arima, T Omura, T Hayasaka, et al., 2015: Reductions of docosahexaenoic acid-containing phosphatidylcholine levels in the anterior horn of an ALS mouse model. *Neuroscience*, **297**, 127-136.
- [15] M Arita, F Bianchini, J Aliberti, et al., 2005: Stereochemical assignment, antiinflammatory properties, and receptor for the omega-3 lipid mediator resolvin E1. *J Exp Med*, **201**, 713-722.
- [16] M Arita, T Ohira, YP Sun, et al., 2007: Resolvin E1 selectively interacts with leukotriene B4 receptor BLT1 and ChemR23 to regulate inflammation. *J Immunol*, **178**, 3912-3917.
- [17] Y Asaoka, M Oka, K Yoshida, et al., 1991: Lysophosphatidylcholine as a possible second messenger synergistic to diacylglycerol and calcium ion for T-lymphocyte activation. *Biochem Biophys Res Commun*, **178**, 1378-1385.
- [18] Y Asaoka, M Oka, K Yoshida, et al., 1992: Role of lysophosphatidylcholine in T-lymphocyte activation: involvement of phospholipase A2 in signal transduction through protein kinase C. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **89**, 6447-6451.
- [19] G Astarita, JH McKenzie, B Wang, et al., 2014: A protective lipidomic biosignature associated with a balanced omega-6/omega-3 ratio in fat-1 transgenic mice. *PLoS One*, **9**, e96221.
- [20] E Atkins, 1960: Pathogenesis of fever. *Physiol Rev*, **40**, 580-646.
- [21] M Aureli, V Murdica, N Loberto, et al., 2014: Exploring the link between ceramide and ionizing radiation. *Glycoconj J*, **31**, 449-459.
- [22] GC Avanzi, A Cessano, MF Brizzi, et al., 1989: Biological and molecular evidence for the production of IL-6 by human natural killer cells in culture. *Life Sci*, **45**, 2621-2626.
- [23] PH Axelsen and RC Murphy, 2010: Quantitative analysis of phospholipids containing arachidonate and docosahexaenoate chains in microdissected regions of mouse brain. *J Lipid Res*, **51**, 660-671.
- [24] PA Baeuerle and D Baltimore, 1996: NF-kappa B: ten years after. *Cell*, **87**, 13-20.
- [25] EM Balk, TA Horsley, SJ Newberry, et al., 2007: A collaborative effort to apply the evidence-based review process to the field of nutrition: challenges, benefits, and lessons learned. *Am J Clin Nutr*, **85**, 1448-1456.

- [26] WA Banks, 2005: Blood-brain barrier transport of cytokines: a mechanism for neuropathology. *Curr Pharm Des*, **11**, 973-984.
- [27] WA Banks, AJ Kastin and RD Broadwell, 1995: Passage of cytokines across the blood-brain barrier. *Neuroimmunomodulation*, **2**, 241-248.
- [28] W Barakat, O Herrmann, B Baumann, et al., 2009: NF-kappaB induces PGE2-synthesizing enzymes in neurons. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, **380**, 153-160.
- [29] M Basselin, E Ramadan and SI Rapoport, 2012: Imaging brain signal transduction and metabolism via arachidonic and docosahexaenoic acid in animals and humans. *Brain Research Bulletin*, **87**, 154-171.
- [30] J Bauer, T Sminia, FG Wouterlood, et al., 1994: Phagocytic activity of macrophages and microglial cells during the course of acute and chronic relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neurosci Res*, **38**, 365-375.
- [31] NG Bazan, 2007: Homeostatic regulation of photoreceptor cell integrity: significance of the potent mediator neuroprotectin D1 biosynthesized from docosahexaenoic acid: the Proctor Lecture. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, **48**, 4866-4881; biography 4864-4865.
- [32] NG Bazan, JM Calandria and CN Serhan, 2010: Rescue and repair during photoreceptor cell renewal mediated by docosahexaenoic acid-derived neuroprotectin D1. *J Lipid Res*, **51**, 2018-2031.
- [33] NG Bazan, MF Molina and WC Gordon, 2011: Docosahexaenoic Acid Signalolipidomics in Nutrition: Significance in Aging, Neuroinflammation, Macular Degeneration, Alzheimer's, and Other Neurodegenerative Diseases. *Annual Review of Nutrition*, **31**, 321-351.
- [34] RP Bazinet and S Layé, 2014: Polyunsaturated fatty acids and their metabolites in brain function and disease. *Nature Reviews Neuroscience*, **15**, 771-785.
- [35] PB Beeson, 1948: Temperature-elevating effect of a substance obtained from polymorphonuclear leucocytes. *J Clin Invest*, **27**, 524.
- [36] EE Benarroch, 2013: Microglia: Multiple roles in surveillance, circuit shaping, and response to injury. *Neurology*, **81**, 1079-1088.
- [37] I Berczi, A Quintanar-Stephano and K Kovacs, 2009: Neuroimmune regulation in immunocompetence, acute illness, and healing. *Ann N Y Acad Sci*, **1153**, 220-239.
- [38] B Beutler, 2002: TLR4 as the mammalian endotoxin sensor. *Curr Top Microbiol Immunol*, **270**, 109-120.
- [39] A Bhattacharya, B Chandrasekar, MM Rahman, et al., 2006: Inhibition of inflammatory response in transgenic fat-1 mice on a calorie-restricted diet. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **349**, 925-930.
- [40] ME Bianchi, 2007: DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. *J Leukoc Biol*, **81**, 1-5.
- [41] E Birgbauer, TS Rao and M Webb, 2004: Lysolecithin induces demyelination in vitro in a cerebellar slice culture system. *J Neurosci Res*, **78**, 157-166.
- [42] ML Blank, ZL Smith, YJ Lee, et al., 1989: Effects of eicosapentaenoic and docosahexaenoic acid supplements on phospholipid composition and plasmalogen biosynthesis in P388D1 cells. *Arch Biochem Biophys*, **269**, 603-611.
- [43] J Blasig, V Holtt, U Bauerle, et al., 1978: Involvement of endorphins in emotional hyperthermia of rats. *Life Sci*, **23**, 2525-2531.
- [44] CM Blatteis, 2006: Endotoxic fever: new concepts of its regulation suggest new approaches to its management. *Pharmacol Ther*, **111**, 194-223.
- [45] CM Blatteis, SL Bealer, WS Hunter, et al., 1983: Suppression of fever after lesions of the anteroventral third ventricle in guinea pigs. *Brain Res Bull*, **11**, 519-526.
- [46] CM Blatteis, N Quan, L Xin, et al., 1990: Neuromodulation of acute-phase responses to interleukin-6 in guinea pigs. *Brain Res Bull*, **25**, 895-901.
- [47] RC Block, R Duff, P Lawrence, et al., 2010: The effects of EPA, DHA, and aspirin ingestion on plasma lysophospholipids and autotaxin. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, **82**, 87-95.
- [48] WL Blok, MT Vogels, JH Curfs, et al., 1992: Dietary fish-oil supplementation in experimental gram-negative infection and in cerebral malaria in mice. *J Infect Dis*, **165**, 898-903.
- [49] E Boda, A Pini, E Hoxha, et al., 2009: Selection of reference genes for quantitative real-time RT-PCR studies in mouse brain. *J Mol Neurosci*, **37**, 238-253.
- [50] M Bohatschek, A Werner and G Raivich, 2001: Systemic LPS injection leads to granulocyte influx into normal and injured brain: effects of ICAM-1 deficiency. *Exp Neurol*, **172**, 137-152.

- [51] M Bou Khalil, W Hou, H Zhou, et al., 2010: Lipidomics era: Accomplishments and challenges. *Mass Spectrometry Reviews*, **29**, 877-929.
- [52] C Boudrault, RP Bazinet, JX Kang, et al., 2010: Cyclooxygenase-2 and n-6 PUFA are lower and DHA is higher in the cortex of fat-1 mice. *Neurochemistry International*, **56**, 585-589.
- [53] JA Boulant, 2000: Role of the preoptic-anterior hypothalamus in thermoregulation and fever. *Clin Infect Dis*, **31 Suppl 5**, S157-161.
- [54] JM Bourre, M Bonneil, M Clement, et al., 1993: Function of dietary polyunsaturated fatty acids in the nervous system. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, **48**, 5-15.
- [55] W Bouschen, O Schulz, D Eikel, et al., 2010: Matrix vapor deposition/recrystallization and dedicated spray preparation for high-resolution scanning microprobe matrix-assisted laser desorption/ionization imaging mass spectrometry (SMALDI-MS) of tissue and single cells. *Rapid Commun Mass Spectrom*, **24**, 355-364.
- [56] M Bousquet, K Gue, V Emond, et al., 2011: Transgenic conversion of omega-6 into omega-3 fatty acids in a mouse model of Parkinson's disease. *J Lipid Res*, **52**, 263-271.
- [57] S Bousserouel, A Brouillet, G Bereziat, et al., 2003: Different effects of n-6 and n-3 polyunsaturated fatty acids on the activation of rat smooth muscle cells by interleukin-1 beta. *J Lipid Res*, **44**, 601-611.
- [58] MM Bradford, 1976: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, **72**, 248-254.
- [59] V Brancaleone, T Gobetti, N Cenac, et al., 2013: A vasculo-protective circuit centered on lipoxin A4 and aspirin-triggered 15-epi-lipoxin A4 operative in murine microcirculation. *Blood*, **122**, 608-617.
- [60] NE Braverman and AB Moser, 2012: Functions of plasmalogen lipids in health and disease. *Biochim Biophys Acta*, **1822**, 1442-1452.
- [61] WC Breckenridge, G Gombos and IG Morgan, 1972: The lipid composition of adult rat brain synaptosomal plasma membranes. *Biochim Biophys Acta*, **266**, 695-707.
- [62] C Brenneis, O Coste, K Altenrath, et al., 2011: Anti-inflammatory role of microsomal prostaglandin E synthase-1 in a model of neuroinflammation. *J Biol Chem*, **286**, 2331-2342.
- [63] E Briese and MG De Quijada, 1970: Colonic temperature of rats during handling. *Acta Physiol Lat Am*, **20**, 97-102.
- [64] P Brites, HR Waterham and RJ Wanders, 2004: Functions and biosynthesis of plasmalogens in health and disease. *Biochim Biophys Acta*, **1636**, 219-231.
- [65] JE Burke and EA Dennis, 2009: Phospholipase A2 biochemistry. *Cardiovasc Drugs Ther*, **23**, 49-59.
- [66] CSA Burlingame A. L., 2012: Mass Spectrometry in the Biological Sciences. Springer Science & Business Media.
- [67] GO Burr and MM Burr, 1929: A NEW DEFICIENCY DISEASE PRODUCED BY THE RIGID EXCLUSION OF FAT FROM THE DIET. *Journal of Biological Chemistry*, **82**, 345-367.
- [68] PC Calder, 2006: Polyunsaturated fatty acids and inflammation. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, **75**, 197-202.
- [69] PC Calder, 2008: The relationship between the fatty acid composition of immune cells and their function. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, **79**, 101-108.
- [70] PC Calder, 2012: Mechanisms of action of (n-3) fatty acids. *J Nutr*, **142**, 592S-599S.
- [71] C Cao, K Matsumura, K Yamagata, et al., 1997: Involvement of cyclooxygenase-2 in LPS-induced fever and regulation of its mRNA by LPS in the rat brain. *Am J Physiol*, **272**, R1712-1725.
- [72] D Cao, K Kevala, J Kim, et al., 2009: Docosahexaenoic acid promotes hippocampal neuronal development and synaptic function. *J Neurochem*, **111**, 510-521.
- [73] JH Capdevila, S Wei, C Helvig, et al., 1996: The highly stereoselective oxidation of polyunsaturated fatty acids by cytochrome P450BM-3. *J Biol Chem*, **271**, 22663-22671.
- [74] C Cappello, A Zwergal, S Kanclerski, et al., 2009: C/EBPbeta enhances NF-kappaB-associated signalling by reducing the level of IkappaB-alpha. *Cell Signal*, **21**, 1918-1924.
- [75] JR Cardinaux, I Allaman and PJ Magistretti, 2000: Pro-inflammatory cytokines induce the transcription factors C/EBPbeta and C/EBPdelta in astrocytes. *Glia*, **29**, 91-97.
- [76] JR Cardinaux and PJ Magistretti, 1996: Vasoactive intestinal peptide, pituitary adenylate cyclase-activating peptide, and noradrenaline induce the transcription factors CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP)-beta and C/EBP delta in mouse cortical astrocytes: involvement in cAMP-regulated glycogen metabolism. *J Neurosci*, **16**, 919-929.

- [77] RA Cardullo, S Agrawal, C Flores, et al., 1988: Detection of nucleic acid hybridization by nonradiative fluorescence resonance energy transfer. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **85**, 8790-8794.
- [78] AM Carothers, G Urlaub, J Mucha, et al., 1989: Point mutation analysis in a mammalian gene: rapid preparation of total RNA, PCR amplification of cDNA, and Taq sequencing by a novel method. *Biotechniques*, **7**, 494-496, 498-499.
- [79] I Carrie, M Clement, D de Javel, et al., 2000: Specific phospholipid fatty acid composition of brain regions in mice. Effects of n-3 polyunsaturated fatty acid deficiency and phospholipid supplementation. *J Lipid Res*, **41**, 465-472.
- [80] T Cartmell, GN Luheshi, SJ Hopkins, et al., 2001: Role of endogenous interleukin-1 receptor antagonist in regulating fever induced by localised inflammation in the rat. *J Physiol*, **531**, 171-180.
- [81] T Cartmell, S Poole, AV Turnbull, et al., 2000: Circulating interleukin-6 mediates the febrile response to localised inflammation in rats. *J Physiol*, **526 Pt 3**, 653-661.
- [82] GE Caughey, E Mantzioris, RA Gibson, et al., 1996: The effect on human tumor necrosis factor alpha and interleukin 1 beta production of diets enriched in n-3 fatty acids from vegetable oil or fish oil. *Am J Clin Nutr*, **63**, 116-122.
- [83] Z Chai, S Gatti, C Toniatti, et al., 1996: Interleukin (IL)-6 gene expression in the central nervous system is necessary for fever response to lipopolysaccharide or IL-1 beta: a study on IL-6-deficient mice. *J Exp Med*, **183**, 311-316.
- [84] S Chakravarty and M Herkenham, 2005: Toll-like receptor 4 on nonhematopoietic cells sustains CNS inflammation during endotoxemia, independent of systemic cytokines. *J Neurosci*, **25**, 1788-1796.
- [85] CC Chan, M Panneton, AM Taylor, et al., 1997: A selective inhibitor of cyclooxygenase-2 reverses endotoxin-induced pyretic responses in non-human primates. *Eur J Pharmacol*, **327**, 221-225.
- [86] MM Chan and AR Moore, 2010: Resolution of inflammation in murine autoimmune arthritis is disrupted by cyclooxygenase-2 inhibition and restored by prostaglandin E2-mediated lipoxin A4 production. *J Immunol*, **184**, 6418-6426.
- [87] WY Chan, S Kohsaka and P Rezaie, 2007: The origin and cell lineage of microglia: new concepts. *Brain Res Rev*, **53**, 344-354.
- [88] HR Chang, D Arsenijevic, JC Pechere, et al., 1992: Dietary supplementation with fish oil enhances in vivo synthesis of tumor necrosis factor. *Immunol Lett*, **34**, 13-17.
- [89] P Chaurand, DS Cornett, PM Angel, et al., 2011: From whole-body sections down to cellular level, multiscale imaging of phospholipids by MALDI mass spectrometry. *Mol Cell Proteomics*, **10**, O110 004259.
- [90] P Chaurand, KE Schriver and RM Caprioli, 2007: Instrument design and characterization for high resolution MALDI-MS imaging of tissue sections. *J Mass Spectrom*, **42**, 476-489.
- [91] F Chauveau, TH Cho, M Perez, et al., 2011: Brain-targeting form of docosahexaenoic acid for experimental stroke treatment: MRI evaluation and anti-oxidant impact. *Curr Neurovasc Res*, **8**, 95-102.
- [92] CT Chen and RP Bazinet, 2015: β -oxidation and rapid metabolism, but not uptake regulate brain eicosapentaenoic acid levels. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids (PLEFA)*, **92**, 33-40.
- [93] CT Chen, Z Liu and RP Bazinet, 2011: Rapid de-esterification and loss of eicosapentaenoic acid from rat brain phospholipids: an intracerebroventricular study. *Journal of Neurochemistry*, **116**, 363-373.
- [94] G Chen, J Li, X Qiang, et al., 2005: Suppression of HMGB1 release by stearyl lysophosphatidylcholine: an additional mechanism for its therapeutic effects in experimental sepsis. *J Lipid Res*, **46**, 623-627.
- [95] HF Chen and HM Su, 2013: Exposure to a maternal n-3 fatty acid-deficient diet during brain development provokes excessive hypothalamic-pituitary-adrenal axis responses to stress and behavioral indices of depression and anxiety in male rat offspring later in life. *J Nutr Biochem*, **24**, 70-80.
- [96] MX Chen, SA Gorman, B Benson, et al., 2004: Small and intermediate conductance Ca^{2+} -activated K^{+} channels confer distinctive patterns of distribution in human tissues and differential cellular localisation in the colon and corpus cavernosum. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, **369**, 602-615.

- [97] N Chen and CS Reis, 2002: Distinct roles of eicosanoids in the immune response to viral encephalitis: or why you should take NSAIDs. *Viral Immunol*, **15**, 133-146.
- [98] R Chinery, JA Brockman, DT Dransfield, et al., 1997: Antioxidant-induced nuclear translocation of CCAAT/enhancer-binding protein beta. A critical role for protein kinase A-mediated phosphorylation of Ser299. *J Biol Chem*, **272**, 30356-30361.
- [99] P Chomczynski and N Sacchi, 1987: Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*, **162**, 156-159.
- [100] JC Chow, DW Young, DT Golenbock, et al., 1999: Toll-like receptor-4 mediates lipopolysaccharide-induced signal transduction. *J Biol Chem*, **274**, 10689-10692.
- [101] SE Christmas, A Meager and M Moore, 1987: Production of interferon and tumour necrosis factor by cloned human natural cytotoxic lymphocytes and T cells. *Clin Exp Immunol*, **69**, 441-450.
- [102] K Chughtai and RMA Heeren, 2010: Mass Spectrometric Imaging for Biomedical Tissue Analysis. *Chemical Reviews*, **110**, 3237-3277.
- [103] J Chun, 2005: Lysophospholipids in the nervous system. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*, **77**, 46-51.
- [104] KA Cieslik, Y Zhu, M Shtivelband, et al., 2005: Inhibition of p90 ribosomal S6 kinase-mediated CCAAT/enhancer-binding protein beta activation and cyclooxygenase-2 expression by salicylate. *J Biol Chem*, **280**, 18411-18417.
- [105] C Clouard, AS Souza, WJ Gerrits, et al., 2015: Maternal Fish Oil Supplementation Affects the Social Behavior, Brain Fatty Acid Profile, and Sickness Response of Piglets. *J Nutr*, **145**, 2176-2184.
- [106] KM Connor, JP SanGiovanni, C Lofqvist, et al., 2007: Increased dietary intake of omega-3-polyunsaturated fatty acids reduces pathological retinal angiogenesis. *Nat Med*, **13**, 868-873.
- [107] B Conti, I Tabarean, C Andrei, et al., 2004: Cytokines and fever. *Front Biosci*, **9**, 1433-1449.
- [108] AH Coons and MH Kaplan, 1950: Localization of antigen in tissue cells; improvements in a method for the detection of antigen by means of fluorescent antibody. *J Exp Med*, **91**, 1-13.
- [109] RS Cotran, 2005: Robbins and Cotran pathologic basis of disease. Elsevier Saunders, Philadelphia.
- [110] F Coutant, L Perrin-Cocon, S Agaogue, et al., 2002: Mature dendritic cell generation promoted by lysophosphatidylcholine. *J Immunol*, **169**, 1688-1695.
- [111] PJ Crack, M Zhang, M Morganti-Kossmann, et al., 2014: Anti-lysophosphatidic acid antibodies improve traumatic brain injury outcomes. *Journal of Neuroinflammation*, **11**, 37.
- [112] RG Cutler, J Kelly, K Storie, et al., 2004: Involvement of oxidative stress-induced abnormalities in ceramide and cholesterol metabolism in brain aging and Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**, 2070-2075.
- [113] MC Cuturi, M Murphy, MP Costa-Giomi, et al., 1987: Independent regulation of tumor necrosis factor and lymphotoxin production by human peripheral blood lymphocytes. *J Exp Med*, **165**, 1581-1594.
- [114] PB Dallas, JL Flanagan, BN Nightingale, et al., 1989: Polymerase chain reaction for fast, nonradioactive detection of high- and low-risk papillomavirus types in routine cervical specimens and in biopsies. *J Med Virol*, **27**, 105-111.
- [115] J Dalli and CN Serhan, 2012: Specific lipid mediator signatures of human phagocytes: microparticles stimulate macrophage efferocytosis and pro-resolving mediators. *Blood*, **120**, e60-72.
- [116] J Dalli, M Zhu, NA Vlasenko, et al., 2013: The novel 13S,14S-epoxy-maresin is converted by human macrophages to maresin 1 (MaR1), inhibits leukotriene A4 hydrolase (LTA4H), and shifts macrophage phenotype. *FASEB J*, **27**, 2573-2583.
- [117] J Damm, GN Luheshi, R Gerstberger, et al., 2011: Spatiotemporal nuclear factor interleukin-6 expression in the rat brain during lipopolysaccharide-induced fever is linked to sustained hypothalamic inflammatory target gene induction. *J Comp Neurol*, **519**, 480-505.
- [118] R Dantzer, 2001: Cytokine-induced sickness behavior: where do we stand? *Brain Behav Immun*, **15**, 7-24.
- [119] R Dantzer, RM Bluthé, G Gheusi, et al., 1998: Molecular basis of sickness behavior. *Ann N Y Acad Sci*, **856**, 132-138.
- [120] R Dantzer, JC O'Connor, GG Freund, et al., 2008: From inflammation to sickness and depression: when the immune system subjugates the brain. *Nat Rev Neurosci*, **9**, 46-56.
- [121] UN Das and LG Puskás, 2009: Transgenic fat-1 mouse as a model to study the pathophysiology of cardiovascular, neurological and psychiatric disorders. *Lipids in Health and Disease*, **8**, 61.

- [122] D Davalos, J Grutzendler, G Yang, et al., 2005: ATP mediates rapid microglial response to local brain injury in vivo. *Nat Neurosci*, **8**, 752-758.
- [123] S David and A Kroner, 2011: Repertoire of microglial and macrophage responses after spinal cord injury. *Nat Rev Neurosci*, **12**, 388-399.
- [124] J Davidson, W Higgs and D Rotondo, 2013: Eicosapentaenoic acid suppression of systemic inflammatory responses and inverse up-regulation of 15-deoxy Δ 12,14Prostaglandin J2 production. *British Journal of Pharmacology*, **169**, 1130-1139.
- [125] V De Smedt-Peyrusse, F Sargueil, A Moranis, et al., 2008: Docosahexaenoic acid prevents lipopolysaccharide-induced cytokine production in microglial cells by inhibiting lipopolysaccharide receptor presentation but not its membrane subdomain localization. *Journal of Neurochemistry*, **105**, 296-307.
- [126] HE De Vries, E Ronken, JH Reinders, et al., 1998: Acute effects of oxidized low density lipoprotein on metabolic responses in macrophages. *FASEB J*, **12**, 111-118.
- [127] R de Waal Malefyt, J Abrams, B Bennett, et al., 1991: Interleukin 10(IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. *J Exp Med*, **174**, 1209-1220.
- [128] V Deckert, A Brunet, F Lantoin, et al., 1998: Inhibition by cholesterol oxides of NO release from human vascular endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **18**, 1054-1060.
- [129] S Delion, S Chalon, J Herault, et al., 1994: Chronic dietary alpha-linolenic acid deficiency alters dopaminergic and serotonergic neurotransmission in rats. *J Nutr*, **124**, 2466-2476.
- [130] J-C Delpech, A Thomazeau, C Madore, et al., 2015: Dietary n-3 PUFAs Deficiency Increases Vulnerability to Inflammation-Induced Spatial Memory Impairment. *Neuropsychopharmacology*.
- [131] JC Delpech, C Madore, C Joffre, et al., 2015: Transgenic increase in n-3/n-6 fatty acid ratio protects against cognitive deficits induced by an immune challenge through decrease of neuroinflammation. *Neuropsychopharmacology*, **40**, 525-536.
- [132] JA DiDonato, M Hayakawa, DM Rothwarf, et al., 1997: A cytokine-responsive IkappaB kinase that activates the transcription factor NF-kappaB. *Nature*, **388**, 548-554.
- [133] AL Dill, DR Ifa, NE Manicke, et al., 2009: Mass spectrometric imaging of lipids using desorption electrospray ionization. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, **877**, 2883-2889.
- [134] CA Dinarello, 1996: Biologic basis for interleukin-1 in disease. *Blood*, **87**, 2095-2147.
- [135] CA Dinarello, 2004: Infection, fever, and exogenous and endogenous pyrogens: some concepts have changed. *J Endotoxin Res*, **10**, 201-222.
- [136] CA Dinarello, JG Cannon and SM Wolff, 1988: New concepts on the pathogenesis of fever. *Rev Infect Dis*, **10**, 168-189.
- [137] CA Dinarello, JG Cannon, SM Wolff, et al., 1986: Tumor necrosis factor (cachectin) is an endogenous pyrogen and induces production of interleukin 1. *J Exp Med*, **163**, 1433-1450.
- [138] M Dlaska and G Weiss, 1999: Central role of transcription factor NF-IL6 for cytokine and iron-mediated regulation of murine inducible nitric oxide synthase expression. *J Immunol*, **162**, 6171-6177.
- [139] AM Dolga and C Culmsee, 2012: Protective Roles for Potassium SK/K(Ca)₂ Channels in Microglia and Neurons. *Front Pharmacol*, **3**, 196.
- [140] AM Dolga, I Granic, T Blank, et al., 2008: TNF- α mediates neuroprotection against glutamate-induced excitotoxicity via NF- κ B-dependent up-regulation of KCa_{2.2} channels. *Journal of Neurochemistry*.
- [141] AM Dolga, T Letsche, M Gold, et al., 2012: Activation of KCNN3/SK3/K(Ca)_{2.3} channels attenuates enhanced calcium influx and inflammatory cytokine production in activated microglia. *Glia*, **60**, 2050-2064.
- [142] AM Dolga, MF Netter, F Perocchi, et al., 2013: Mitochondrial Small Conductance SK2 Channels Prevent Glutamate-induced Oxytosis and Mitochondrial Dysfunction. *Journal of Biological Chemistry*, **288**, 10792-10804.
- [143] AM Dolga, N Terpolilli, F Kepura, et al., 2011: KCa₂ channels activation prevents [Ca²⁺]_i deregulation and reduces neuronal death following glutamate toxicity and cerebral ischemia. *Cell Death and Disease*, **2**, e147.
- [144] T-W Dominic Chan, Colburn, A. W., Derrick, P. J., 1992: Matrix-assisted laser desorption/ionization using a liquid matrix: Formation of high-mass cluster ions from proteins. *Organic Mass Spectrometry*.

- [145] SC Dyall and AT Michael-Titus, 2008: Neurological Benefits of Omega-3 Fatty Acids. *NeuroMolecular Medicine*, **10**, 219-235.
- [146] D Ebert, RG Haller and ME Walton, 2003: Energy contribution of octanoate to intact rat brain metabolism measured by ¹³C nuclear magnetic resonance spectroscopy. *J Neurosci*, **23**, 5928-5935.
- [147] A Efstratiadis, FC Kafatos, AM Maxam, et al., 1976: Enzymatic in vitro synthesis of globin genes. *Cell*, **7**, 279-288.
- [148] A Ejarque-Ortiz, MG Medina, JM Tusell, et al., 2007: Upregulation of CCAAT/enhancer binding protein beta in activated astrocytes and microglia. *Glia*, **55**, 178-188.
- [149] VM Elner, W Scales, SG Elner, et al., 1992: Interleukin-6 (IL-6) gene expression and secretion by cytokine-stimulated human retinal pigment epithelial cells. *Exp Eye Res*, **54**, 361-368.
- [150] D Engblom, M Ek, S Saha, et al., 2002: Prostaglandins as inflammatory messengers across the blood-brain barrier. *J Mol Med (Berl)*, **80**, 5-15.
- [151] B Engelmann, 2004: Plasmalogens: targets for oxidants and major lipophilic antioxidants. *Biochem Soc Trans*, **32**, 147-150.
- [152] L Engstrom, J Ruud, A Eskilsson, et al., 2012: Lipopolysaccharide-induced fever depends on prostaglandin E2 production specifically in brain endothelial cells. *Endocrinology*, **153**, 4849-4861.
- [153] C Erridge, E Bennett-Guerrero and IR Poxton, 2002: Structure and function of lipopolysaccharides. *Microbes Infect*, **4**, 837-851.
- [154] T Espevik and J Nissen-Meyer, 1986: A highly sensitive cell line, WEHI 164 clone 13, for measuring cytotoxic factor/tumor necrosis factor from human monocytes. *J Immunol Methods*, **95**, 99-105.
- [155] TJ Evans, D Moyes, A Carpenter, et al., 1994: Protective effect of 55- but not 75-kD soluble tumor necrosis factor receptor-immunoglobulin G fusion proteins in an animal model of gram-negative sepsis. *J Exp Med*, **180**, 2173-2179.
- [156] ES Faber, 2009: Functions and modulation of neuronal SK channels. *Cell Biochem Biophys*, **55**, 127-139.
- [157] ES Faber and P Sah, 2003: Calcium-activated potassium channels: multiple contributions to neuronal function. *Neuroscientist*, **9**, 181-194.
- [158] E Fahy, S Subramaniam, HA Brown, et al., 2005: A comprehensive classification system for lipids. *J Lipid Res*, **46**, 839-861.
- [159] AA Farooqui, LA Horrocks and T Farooqui, 2000: Deacylation and reacylation of neural membrane glycerophospholipids. *J Mol Neurosci*, **14**, 123-135.
- [160] Y Feng and JF Liu, 2014: Expression of lysophosphatidic acid receptors in the human lower esophageal sphincter. *Exp Ther Med*, **7**, 423-428.
- [161] JF Ferguson, CK Mulvey, PN Patel, et al., 2014: Omega-3 PUFA supplementation and the response to evoked endotoxemia in healthy volunteers. *Molecular Nutrition & Food Research*, **58**, 601-613.
- [162] R Fernandez-Botran, 2000: Soluble cytokine receptors: novel immunotherapeutic agents. *Expert Opin Investig Drugs*, **9**, 497-514.
- [163] AZ Fernandis and MR Wenk, 2007: Membrane lipids as signaling molecules. *Curr Opin Lipidol*, **18**, 121-128.
- [164] L Ferrucci, A Cherubini, S Bandinelli, et al., 2006: Relationship of plasma polyunsaturated fatty acids to circulating inflammatory markers. *J Clin Endocrinol Metab*, **91**, 439-446.
- [165] DS Finbloom and KD Winestock, 1995: IL-10 induces the tyrosine phosphorylation of tyk2 and Jak1 and the differential assembly of STAT1 alpha and STAT3 complexes in human T cells and monocytes. *J Immunol*, **155**, 1079-1090.
- [166] MP Fischler and WH Reinhart, 1997: [Fever: friend or enemy?]. *Schweiz Med Wochenschr*, **127**, 864-870.
- [167] AD Foey, SL Parry, LM Williams, et al., 1998: Regulation of monocyte IL-10 synthesis by endogenous IL-1 and TNF-alpha: role of the p38 and p42/44 mitogen-activated protein kinases. *J Immunol*, **160**, 920-928.
- [168] DA Ford and RW Gross, 1989: Plasmylethanolamine is the major storage depot for arachidonic acid in rabbit vascular smooth muscle and is rapidly hydrolyzed after angiotensin II stimulation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **86**, 3479-3483.

- [169] RE Foster, JD Kocsis, RC Malenka, et al., 1980: Lysophosphatidyl choline-induced focal demyelination in the rabbit corpus callosum. Electron-microscopic observations. *J Neurol Sci*, **48**, 221-231.
- [170] K Frei, UV Malipiero, TP Leist, et al., 1989: On the cellular source and function of interleukin 6 produced in the central nervous system in viral diseases. *Eur J Immunol*, **19**, 689-694.
- [171] F Frisca, RA Sabbadini, Y Goldshmit, et al., 2012: Biological effects of lysophosphatidic acid in the nervous system. *Int Rev Cell Mol Biol*, **296**, 273-322.
- [172] B Fuchs, J Schiller, U Wagner, et al., 2005: The phosphatidylcholine/lysophosphatidylcholine ratio in human plasma is an indicator of the severity of rheumatoid arthritis: investigations by ³¹P NMR and MALDI-TOF MS. *Clin Biochem*, **38**, 925-933.
- [173] F Fuchs, 2013: Untersuchungen zur Rolle des Transkriptionsfaktors NF-IL6 in der Hypothalamus-Hypophysen-Achse bei Ratten und Mäusen nach psychologischem und inflammatorischem Stress, p. 239 S. Laufersweiler, Giessen.
- [174] F Fuchs, J Damm, R Gerstberger, et al., 2013: Activation of the inflammatory transcription factor nuclear factor interleukin-6 during inflammatory and psychological stress in the brain. *J Neuroinflammation*, **10**, 140.
- [175] C Galli, HI Trzeciak and R Paoletti, 1971: Effects of dietary fatty acids on the fatty acid composition of brain ethanolamine phosphoglyceride: Reciprocal replacement of n-6 and n-3 polyunsaturated fatty acids. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism*, **248**, 449-454.
- [176] W Gao, A Schmidtko, I Wobst, et al., 2009: Prostaglandin D2 produced by hematopoietic prostaglandin D synthase contributes to LPS-induced fever. *J Physiol Pharmacol*, **60**, 145-150.
- [177] Z Gao, B Todorov, CF Barrett, et al., 2012: Cerebellar ataxia by enhanced Ca(V)2.1 currents is alleviated by Ca²⁺-dependent K⁺-channel activators in Cacna1a(S218L) mutant mice. *J Neurosci*, **32**, 15533-15546.
- [178] DP Gaposchkin and RA Zoeller, 1999: Plasmalogen status influences docosahexaenoic acid levels in a macrophage cell line. Insights using ether lipid-deficient variants. *J Lipid Res*, **40**, 495-503.
- [179] L Gautron, P Lafon, M Chaigniau, et al., 2002: Spatiotemporal analysis of signal transducer and activator of transcription 3 activation in rat brain astrocytes and pituitary following peripheral immune challenge. *Neuroscience*, **112**, 717-729.
- [180] S Ghosh and M Karin, 2002: Missing pieces in the NF-kappaB puzzle. *Cell*, **109 Suppl**, S81-96.
- [181] C Ginkel, D Hartmann, K vom Dorp, et al., 2012: Ablation of Neuronal Ceramide Synthase 1 in Mice Decreases Ganglioside Levels and Expression of Myelin-associated Glycoprotein in Oligodendrocytes. *Journal of Biological Chemistry*, **287**, 41888-41902.
- [182] L Ginsberg, S Rafique, JH Xuereb, et al., 1995: Disease and anatomic specificity of ethanolamine plasmalogen deficiency in Alzheimer's disease brain. *Brain Res*, **698**, 223-226.
- [183] M Girod, Y Shi, JX Cheng, et al., 2011: Mapping lipid alterations in traumatically injured rat spinal cord by desorption electrospray ionization imaging mass spectrometry. *Anal Chem*, **83**, 207-215.
- [184] L Givalois, J Dornand, M Mekaouche, et al., 1994: Temporal cascade of plasma level surges in ACTH, corticosterone, and cytokines in endotoxin-challenged rats. *Am J Physiol*, **267**, R164-170.
- [185] CK Glass, K Saijo, B Winner, et al., 2010: Mechanisms underlying inflammation in neurodegeneration. *Cell*, **140**, 918-934.
- [186] MS Gold, MJ Shuster and JD Levine, 1996: Role of a Ca(2+)-dependent slow afterhyperpolarization in prostaglandin E2-induced sensitization of cultured rat sensory neurons. *Neurosci Lett*, **205**, 161-164.
- [187] A Gomez-Munoz, L O'Brien, R Hundal, et al., 1999: Lysophosphatidylcholine stimulates phospholipase D activity in mouse peritoneal macrophages. *J Lipid Res*, **40**, 988-993.
- [188] I Goncalves, A Edsfeldt, NY Ko, et al., 2012: Evidence supporting a key role of Lp-PLA2-generated lysophosphatidylcholine in human atherosclerotic plaque inflammation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **32**, 1505-1512.
- [189] CJ Gordon, 2012: Thermal physiology of laboratory mice: Defining thermoneutrality. *Journal of Thermal Biology*, **37**, 654-685.
- [190] J Greenwood, SJ Heasman, JI Alvarez, et al., 2011: Review: leucocyte-endothelial cell crosstalk at the blood-brain barrier: a prerequisite for successful immune cell entry to the brain. *Neuropathol Appl Neurobiol*, **37**, 24-39.

- [191] MOW Grimm, J Kuchenbecker, TL Rothhaar, et al., 2011: Plasmalogen synthesis is regulated via alkyl-dihydroxyacetonephosphate-synthase by amyloid precursor protein processing and is affected in Alzheimer's disease. *Journal of Neurochemistry*, **116**, 916-925.
- [192] M Grunnet, T Jespersen, K Angelo, et al., 2001: Pharmacological modulation of SK3 channels. *Neuropharmacology*, **40**, 879-887.
- [193] S Guenther, M Koestler, O Schulz, et al., 2010: Laser spot size and laser power dependence of ion formation in high resolution MALDI imaging. *International Journal of Mass Spectrometry*, **294**, 7-15.
- [194] S Guenther, A Römpf, W Kummer, et al., 2011: AP-MALDI imaging of neuropeptides in mouse pituitary gland with 5µm spatial resolution and high mass accuracy. *International Journal of Mass Spectrometry*, **305**, 228-237.
- [195] H Guo, J Liu, K Van Shura, et al., 2015: N-acetyl-aspartyl-glutamate and inhibition of glutamate carboxypeptidases protects against soman-induced neuropathology. *NeuroToxicology*, **48**, 180-191.
- [196] AR Gwosdow, MS Kumar and HH Bode, 1990: Interleukin 1 stimulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Am J Physiol*, **258**, E65-70.
- [197] JA Hamilton and K Brunaldi, 2007: A model for fatty acid transport into the brain. *J Mol Neurosci*, **33**, 12-17.
- [198] JA Hamilton, RA Johnson, B Corkey, et al., 2001: Fatty acid transport: the diffusion mechanism in model and biological membranes. *J Mol Neurosci*, **16**, 99-108; discussion 151-107.
- [199] X Han, DM Holtzman and DW McKeel, Jr., 2001: Plasmalogen deficiency in early Alzheimer's disease subjects and in animal models: molecular characterization using electrospray ionization mass spectrometry. *J Neurochem*, **77**, 1168-1180.
- [200] M Hanada, Y Sugiura, R Shinjo, et al., 2012: Spatiotemporal alteration of phospholipids and prostaglandins in a rat model of spinal cord injury. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **403**, 1873-1884.
- [201] JA Hankin and RC Murphy, 2010: Relationship between MALDI IMS intensity and measured quantity of selected phospholipids in rat brain sections. *Anal Chem*, **82**, 8476-8484.
- [202] LM Harden, I du Plessis, S Poole, et al., 2006: Interleukin-6 and leptin mediate lipopolysaccharide-induced fever and sickness behavior. *Physiol Behav*, **89**, 146-155.
- [203] LM Harden, S Kent, QJ Pittman, et al., 2015: Fever and sickness behavior: Friend or foe? *Brain Behav Immun*, **50**, 322-333.
- [204] LM Harden, C Rummel, HP Laburn, et al., 2014: Critical role for peripherally-derived interleukin-10 in mediating the thermoregulatory manifestations of fever and hypothermia in severe forms of lipopolysaccharide-induced inflammation. *Pflugers Arch*, **466**, 1451-1466.
- [205] LM Harden, C Rummel, GN Luheshi, et al., 2013: Interleukin-10 modulates the synthesis of inflammatory mediators in the sensory circumventricular organs: implications for the regulation of fever and sickness behaviors. *J Neuroinflammation*, **10**, 22.
- [206] A Harkin, JM O'Donnell and JP Kelly, 2002: A study of VitalView for behavioural and physiological monitoring in laboratory rats. *Physiol Behav*, **77**, 65-77.
- [207] EM Harre, J Roth, U Pehl, et al., 2002: Selected contribution: role of IL-6 in LPS-induced nuclear STAT3 translocation in sensory circumventricular organs during fever in rats. *J Appl Physiol (1985)*, **92**, 2657-2666.
- [208] JL Harrison, RK Rowe, TW Ellis, et al., 2015: Resolvins AT-D1 and E1 differentially impact functional outcome, post-traumatic sleep, and microglial activation following diffuse brain injury in the mouse. *Brain, Behavior, and Immunity*, **47**, 131-140.
- [209] T Hayasaka, N Goto-Inoue, Y Sugiura, et al., 2008: Matrix-assisted laser desorption/ionization quadrupole ion trap time-of-flight (MALDI-QIT-TOF)-based imaging mass spectrometry reveals a layered distribution of phospholipid molecular species in the mouse retina. *Rapid Commun Mass Spectrom*, **22**, 3415-3426.
- [210] Y Hayashi, K Kawaji, L Sun, et al., 2011: Microglial Ca(2+)-activated K(+) channels are possible molecular targets for the analgesic effects of S-ketamine on neuropathic pain. *J Neurosci*, **31**, 17370-17382.
- [211] T Hehlhans and K Pfeffer, 2005: The intriguing biology of the tumour necrosis factor/tumour necrosis factor receptor superfamily: players, rules and the games. *Immunology*, **115**, 1-20.
- [212] CA Heid, J Stevens, KJ Livak, et al., 1996: Real time quantitative PCR. *Genome Res*, **6**, 986-994.
- [213] PC Heinrich, I Behrmann, S Haan, et al., 2003: Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. *Biochem J*, **374**, 1-20.

- [214] PC Heinrich, I Behrmann, G Muller-Newen, et al., 1998: Interleukin-6-type cytokine signalling through the gp130/Jak/STAT pathway. *Biochem J*, **334 (Pt 2)**, 297-314.
- [215] D Heras-Sandoval, J Pedraza-Chaverri and JM Perez-Rojas, 2016: Role of docosahexaenoic acid in the modulation of glial cells in Alzheimer's disease. *J Neuroinflammation*, **13**, 61.
- [216] JL Herlong and TR Scott, 2006: Positioning prostanoids of the D and J series in the immunopathogenic scheme. *Immunol Lett*, **102**, 121-131.
- [217] KF Herrik, JP Redrobe, D Holst, et al., 2012: CyPPA, a Positive SK3/SK2 Modulator, Reduces Activity of Dopaminergic Neurons, Inhibits Dopamine Release, and Counteracts Hyperdopaminergic Behaviors Induced by Methylphenidate. *Frontiers in Pharmacology*, **3**.
- [218] T Hiramoto, T Oka, K Yoshihara, et al., 2009: Pyrogenic cytokines did not mediate a stress interview-induced hyperthermic response in a patient with psychogenic fever: a case report. *Psychosom Med*, **71**, 932-936.
- [219] H Hirschmann, 1960: The nature of substrate asymmetry in stereoselective reactions. *J Biol Chem*, **235**, 2762-2767.
- [220] JH Hong, JW Kang, DK Kim, et al., 2016: Global changes of phospholipids identified by MALDI imaging mass spectrometry in a mouse model of Alzheimer's disease. *J Lipid Res*, **57**, 36-45.
- [221] IC Hoogland, C Houbolt, DJ van Westerloo, et al., 2015: Systemic inflammation and microglial activation: systematic review of animal experiments. *J Neuroinflammation*, **12**, 114.
- [222] C Hougaard, BL Eriksen, S Jørgensen, et al., 2007: Selective positive modulation of the SK3 and SK2 subtypes of small conductance Ca²⁺-activated K⁺ channels. *British Journal of Pharmacology*, **151**, 655-665.
- [223] T Hubschle, E Thom, A Watson, et al., 2001: Leptin-induced nuclear translocation of STAT3 immunoreactivity in hypothalamic nuclei involved in body weight regulation. *J Neurosci*, **21**, 2413-2424.
- [224] M Ifuku, T Katafuchi, S Mawatari, et al., 2012: Anti-inflammatory/anti-amyloidogenic effects of plasmalogens in lipopolysaccharide-induced neuroinflammation in adult mice. *J Neuroinflammation*, **9**, 197.
- [225] M Igarashi, K Ma, L Chang, et al., 2007: Dietary n-3 PUFA deprivation for 15 weeks upregulates elongase and desaturase expression in rat liver but not brain. *J Lipid Res*, **48**, 2463-2470.
- [226] T Ikejima, S Okusawa, P Ghezzi, et al., 1990: Interleukin-1 induces tumor necrosis factor (TNF) in human peripheral blood mononuclear cells in vitro and a circulating TNF-like activity in rabbits. *J Infect Dis*, **162**, 215-223.
- [227] S Imgrund, D Hartmann, H Farwanah, et al., 2009: Adult Ceramide Synthase 2 (CERS2)-deficient Mice Exhibit Myelin Sheath Defects, Cerebellar Degeneration, and Hepatocarcinomas. *Journal of Biological Chemistry*, **284**, 33549-33560.
- [228] L Jansky, S Vybiral, D Pospisilova, et al., 1995: Production of systemic and hypothalamic cytokines during the early phase of endotoxin fever. *Neuroendocrinology*, **62**, 55-61.
- [229] T Jaskolla, B Fuchs, M Karas, et al., 2009: The new matrix 4-Chloro- α -cyanocinnamic acid allows the detection of phosphatidylethanolamine chloramines by MALDI-TOF mass spectrometry. *Journal of The American Society for Mass Spectrometry*, **20**, 867-874.
- [230] S Ji, RW Hardy and PA Wood, 2009: Transgenic expression of n-3 fatty acid desaturase (fat-1) in C57/BL6 mice: Effects on glucose homeostasis and body weight. *Journal of Cellular Biochemistry*, **107**, 809-817.
- [231] LH Jiang, QY Liang and Y Shi, 2012: Pure docosahexaenoic acid can improve depression behaviors and affect HPA axis in mice. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, **16**, 1765-1773.
- [232] C Joffre, C Rey, A Nadjar, et al., 2015: Role of n-3 PUFAs in inflammation via resolvin biosynthesis. *Ocl*, **23**, D104.
- [233] A Jones, C Fujiyama and K Smith, 2001: RNA purification and quantification methods. *Methods Mol Med*, **57**, 241-253.
- [234] JX Kang, 2007: Fat-1 transgenic mice: A new model for omega-3 research. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, **77**, 263-267.
- [235] JX Kang, J Wang, L Wu, et al., 2004: Transgenic mice: fat-1 mice convert n-6 to n-3 fatty acids. *Nature*, **427**, 504.
- [236] M Karas and F Hillenkamp, 1988: Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. *Anal Chem*, **60**, 2299-2301.

- [237] Adebimpe W Kasumu, C Hougaard, F Rode, et al., 2012: Selective Positive Modulator of Calcium-Activated Potassium Channels Exerts Beneficial Effects in a Mouse Model of Spinocerebellar Ataxia Type 2. *Chemistry & Biology*, **19**, 1340-1353.
- [238] V Kaushal, PD Koeberle, Y Wang, et al., 2007: The Ca²⁺-activated K⁺ channel KCNN4/KCa3.1 contributes to microglia activation and nitric oxide-dependent neurodegeneration. *J Neurosci*, **27**, 234-244.
- [239] A Kawabata, 2011: Prostaglandin E2 and pain--an update. *Biol Pharm Bull*, **34**, 1170-1173.
- [240] JE Keen, R Khawaled, DL Farrens, et al., 1999: Domains responsible for constitutive and Ca(2+)-dependent interactions between calmodulin and small conductance Ca(2+)-activated potassium channels. *J Neurosci*, **19**, 8830-8838.
- [241] H Kettenmann, UK Hanisch, M Noda, et al., 2011: Physiology of microglia. *Physiol Rev*, **91**, 461-553.
- [242] R Khanna, L Roy, X Zhu, et al., 2001: K⁺ channels and the microglial respiratory burst. *Am J Physiol Cell Physiol*, **280**, C796-806.
- [243] N Khaselev and RC Murphy, 1999: Susceptibility of plasmenyl glycerophosphoethanolamine lipids containing arachidonate to oxidative degradation. *Free Radic Biol Med*, **26**, 275-284.
- [244] JK Kiecolt-Glaser, MA Belury, K Porter, et al., 2007: Depressive Symptoms, omega-6:omega-3 Fatty Acids, and Inflammation in Older Adults. *Psychosomatic Medicine*, **69**, 217-224.
- [245] HY Kim, M Akbar and YS Kim, 2010: Phosphatidylserine-dependent neuroprotective signaling promoted by docosahexaenoic acid. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, **82**, 165-172.
- [246] T Kishimoto, 1994: Signal transduction through homo- or heterodimers of gp130. *Stem Cells*, **12 Suppl 1**, 37-44; discussion 44-35.
- [247] T Kishimoto, Y Soda, Y Matsuyama, et al., 2002: An enzymatic assay for lysophosphatidylcholine concentration in human serum and plasma. *Clin Biochem*, **35**, 411-416.
- [248] T Kisseleva, S Bhattacharya, J Braunstein, et al., 2002: Signaling through the JAK/STAT pathway, recent advances and future challenges. *Gene*, **285**, 1-24.
- [249] Y Kita, K Yoshida, SM Tokuoka, et al., 2015: Fever Is Mediated by Conversion of Endocannabinoid 2-Arachidonoylglycerol to Prostaglandin E2. *PLoS One*, **10**, e0133663.
- [250] K Kleppe, E Ohtsuka, R Kleppe, et al., 1971: Studies on polynucleotides. XCVI. Repair replications of short synthetic DNA's as catalyzed by DNA polymerases. *J Mol Biol*, **56**, 341-361.
- [251] MJ Kluger, 1991: Fever: role of pyrogens and cryogens. *Physiol Rev*, **71**, 93-127.
- [252] MJ Kluger, B O'Reilly, TR Shope, et al., 1987: Further evidence that stress hyperthermia is a fever. *Physiol Behav*, **39**, 763-766.
- [253] S Koenig, 2015: Altersabhängige Effekte auf inflammatorische Mediatoren und zentralnervös kontrollierte Krankheitssymptome bei systemischen Entzündungsreaktionen der Ratte. *Edition scientifique*. Laufersweiler, Giessen.
- [254] M Koestler, D Kirsch, A Hester, et al., 2008: A high-resolution scanning microprobe matrix-assisted laser desorption/ionization ion source for imaging analysis on an ion trap/Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometer. *Rapid Commun Mass Spectrom*, **22**, 3275-3285.
- [255] M Kohler, B Hirschberg, CT Bond, et al., 1996: Small-conductance, calcium-activated potassium channels from mammalian brain. *Science*, **273**, 1709-1714.
- [256] S Koizumi, S Yamamoto, T Hayasaka, et al., 2010: Imaging mass spectrometry revealed the production of lyso-phosphatidylcholine in the injured ischemic rat brain. *Neuroscience*, **168**, 219-225.
- [257] JP Konsman, V Tridon and R Dantzer, 2000: Diffusion and action of intracerebroventricularly injected interleukin-1 in the CNS. *Neuroscience*, **101**, 957-967.
- [258] JP Konsman, S Vignes, L Mackerlova, et al., 2004: Rat brain vascular distribution of interleukin-1 type-1 receptor immunoreactivity: relationship to patterns of inducible cyclooxygenase expression by peripheral inflammatory stimuli. *J Comp Neurol*, **472**, 113-129.
- [259] BS Kopf, W Langhans, N Geary, et al., 2011: Evidence that PGE2 in the dorsal and median raphe nuclei is involved in LPS-induced anorexia in rats. *Pharmacol Biochem Behav*, **99**, 437-443.
- [260] W Kozak, CA Conn and MJ Kluger, 1994: Lipopolysaccharide induces fever and depresses locomotor activity in unrestrained mice. *Am J Physiol*, **266**, R125-135.
- [261] W Kozak and V Fraifeld, 2004: Non-prostaglandin eicosanoids in fever and anapyrexia. *Front Biosci*, **9**, 3339-3355.

- [262] W Kozak, MJ Kluger, D Soszynski, et al., 1998: IL-6 and IL-1 beta in fever. Studies using cytokine-deficient (knockout) mice. *Ann N Y Acad Sci*, **856**, 33-47.
- [263] W Kozak, D Soszynski, K Rudolph, et al., 1997: Dietary n-3 fatty acids differentially affect sickness behavior in mice during local and systemic inflammation. *Am J Physiol*, **272**, R1298-1307.
- [264] W Kozak, S Wrotek and A Kozak, 2006: Pyrogenicity of CpG-DNA in mice: role of interleukin-6, cyclooxygenases, and nuclear factor-kappaB. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, **290**, R871-880.
- [265] S Krishnamoorthy, A Recchiuti, N Chiang, et al., 2010: Resolvin D1 binds human phagocytes with evidence for proresolving receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **107**, 1660-1665.
- [266] EFE Kuiper, A Nelemans, P Luiten, et al., 2012: KCa2 and KCa3 Channels in Learning and Memory Processes, and Neurodegeneration. *Frontiers in Pharmacology*, **3**.
- [267] N Kume, MI Cybulsky and MA Gimbrone, Jr., 1992: Lysophosphatidylcholine, a component of atherogenic lipoproteins, induces mononuclear leukocyte adhesion molecules in cultured human and rabbit arterial endothelial cells. *J Clin Invest*, **90**, 1138-1144.
- [268] SL Kunkel, RC Wiggins, SW Chensue, et al., 1986: Regulation of macrophage tumor necrosis factor production by prostaglandin E2. *Biochem Biophys Res Commun*, **137**, 404-410.
- [269] MJ Kye, J Spiess and T Blank, 2007: Transcriptional regulation of intronic calcium-activated potassium channel SK2 promoters by nuclear factor-kappa B and glucocorticoids. *Mol Cell Biochem*, **300**, 9-17.
- [270] VF Labrousse, A Nadjar, C Joffre, et al., 2012: Short-term long chain omega3 diet protects from neuroinflammatory processes and memory impairment in aged mice. *PLoS One*, **7**, e36861.
- [271] N Laflamme and S Rivest, 1999: Effects of systemic immunogenic insults and circulating proinflammatory cytokines on the transcription of the inhibitory factor kappaB alpha within specific cellular populations of the rat brain. *J Neurochem*, **73**, 309-321.
- [272] N Laflamme and S Rivest, 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.
- [273] M Lafourcade, T Larrieu, S Mato, et al., 2011: Nutritional omega-3 deficiency abolishes endocannabinoid-mediated neuronal functions. *Nature Neuroscience*, **14**, 345-350.
- [274] J Lam, N Coleman, AL Garing, et al., 2013: The therapeutic potential of small-conductance KCa2 channels in neurodegenerative and psychiatric diseases. *Expert Opin Ther Targets*, **17**, 1203-1220.
- [275] A Lamaziere, D Richard, U Barbe, et al., 2011: Differential distribution of DHA-phospholipids in rat brain after feeding: A lipidomic approach. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, **84**, 7-11.
- [276] PM Lansdorp, LA Aarden, J Calafat, et al., 1986: A growth-factor dependent B-cell hybridoma. *Curr Top Microbiol Immunol*, **132**, 105-113.
- [277] T Larrieu, ML Hilal, V De Smedt-Peyrusse, et al., 2016: Nutritional Omega-3 Deficiency Alters Glucocorticoid Receptor-Signaling Pathway and Neuronal Morphology in Regionally Distinct Brain Structures Associated with Emotional Deficits. *Neural Plast*, **2016**, 8574830.
- [278] T Larrieu, ML Hilal, C Fourrier, et al., 2014: Nutritional omega-3 modulates neuronal morphology in the prefrontal cortex along with depression-related behaviour through corticosterone secretion. *Transl Psychiatry*, **4**, e437.
- [279] CH Latta, TL Sudduth, EM Weekman, et al., 2015: Determining the role of IL-4 induced neuroinflammation in microglial activity and amyloid- β using BV2 microglial cells and APP/PS1 transgenic mice. *Journal of Neuroinflammation*, **12**, 41.
- [280] T Lawrence, DW Gilroy, PR Colville-Nash, et al., 2001: Possible new role for NF-kappaB in the resolution of inflammation. *Nat Med*, **7**, 1291-1297.
- [281] S Laye, 2013: What do you eat? Dietary omega 3 can help to slow the aging process. *Brain Behav Immun*, **28**, 14-15.
- [282] S Layé, C Madore, I St-Amour, et al., 2015: N-3 polyunsaturated fatty acid and neuroinflammation in aging and Alzheimer's disease. *Nutrition and Aging*, **3**, 33-47.
- [283] M Lazarus, K Yoshida, R Coppari, et al., 2007: EP3 prostaglandin receptors in the median preoptic nucleus are critical for fever responses. *Nat Neurosci*, **10**, 1131-1133.
- [284] O Le Bail, R Schmidt-Ullrich and A Israel, 1993: Promoter analysis of the gene encoding the I kappa B-alpha/MAD3 inhibitor of NF-kappa B: positive regulation by members of the rel/NF-kappa B family. *EMBO J*, **12**, 5043-5049.

- [285] E Lebel, L Vallieres and S Rivest, 2000: Selective involvement of interleukin-6 in the transcriptional activation of the suppressor of cytokine signaling-3 in the brain during systemic immune challenges. *Endocrinology*, **141**, 3749-3763.
- [286] BH Lee, D Inui, GY Suh, et al., 2012: Association of body temperature and antipyretic treatments with mortality of critically ill patients with and without sepsis: multi-centered prospective observational study. *Crit Care*, **16**, R33.
- [287] DH Lee, SS Tam, E Wang, et al., 1996: The NF-kappa B inhibitor, tepoxalin, suppresses surface expression of the cell adhesion molecules CD62E, CD11b/CD18 and CD106. *Immunol Lett*, **53**, 109-113.
- [288] JM Lee, MC Grabb, GJ Zipfel, et al., 2000: Brain tissue responses to ischemia. *J Clin Invest*, **106**, 723-731.
- [289] RC Lee, RL Feinbaum and V Ambros, 1993: The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*, **75**, 843-854.
- [290] LG LeMay, AJ Vander and MJ Kluger, 1990: The effects of psychological stress on plasma interleukin-6 activity in rats. *Physiol Behav*, **47**, 957-961.
- [291] LG LeMay, AJ Vander and MJ Kluger, 1990: Role of interleukin 6 in fever in rats. *Am J Physiol*, **258**, R798-803.
- [292] LR Leon, W Kozak, K Rudolph, et al., 1999: An antipyretic role for interleukin-10 in LPS fever in mice. *Am J Physiol*, **276**, R81-89.
- [293] BD Levy, CB Clish, B Schmidt, et al., 2001: Lipid mediator class switching during acute inflammation: signals in resolution. *Nat Immunol*, **2**, 612-619.
- [294] Q Leyrolle, S Layé and A Nadjar, 2016: N-3 PUFAs and neuroinflammatory processes in cognitive disorders. *Ocl*, **23**, D103.
- [295] D Li, HS Weisinger, RS Weisinger, et al., 2006: Omega 6 to omega 3 fatty acid imbalance early in life leads to persistent reductions in DHA levels in glycerophospholipids in rat hypothalamus even after long-term omega 3 fatty acid repletion. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, **74**, 391-399.
- [296] X Li, P Fang, Y Li, et al., 2016: Mitochondrial Reactive Oxygen Species Mediate Lysophosphatidylcholine-Induced Endothelial Cell Activation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **36**, 1090-1100.
- [297] YF Li, RS Li, SB Samuel, et al., 2016: Lysophospholipids and their G protein-coupled receptors in atherosclerosis. *Front Biosci (Landmark Ed)*, **21**, 70-88.
- [298] S-Y Lim, J Hoshiba and N Salem, 2005: An extraordinary degree of structural specificity is required in neural phospholipids for optimal brain function: n-6 docosapentaenoic acid substitution for docosahexaenoic acid leads to a loss in spatial task performance. *Journal of Neurochemistry*, **95**, 848-857.
- [299] SN Lim, SJ Gladman, SC Dyall, et al., 2013: Transgenic mice with high endogenous omega-3 fatty acids are protected from spinal cord injury. *Neurobiol Dis*, **51**, 104-112.
- [300] Y Liu-Wu, E Hurt-Camejo and O Wiklund, 1998: Lysophosphatidylcholine induces the production of IL-1beta by human monocytes. *Atherosclerosis*, **137**, 351-357.
- [301] Y Liu, F Chen, Q Li, et al., 2013: Fish Oil Alleviates Activation of the Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis Associated with Inhibition of TLR4 and NOD Signaling Pathways in Weaned Piglets after a Lipopolysaccharide Challenge. *Journal of Nutrition*, **143**, 1799-1807.
- [302] YW Liu, HP Tseng, LC Chen, et al., 2003: Functional cooperation of simian virus 40 promoter factor 1 and CCAAT/enhancer-binding protein beta and delta in lipopolysaccharide-induced gene activation of IL-10 in mouse macrophages. *J Immunol*, **171**, 821-828.
- [303] KJ Livak and TD Schmittgen, 2001: Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, **25**, 402-408.
- [304] BR Lokesh, TJ Sayers and JE Kinsella, 1990: Interleukin-1 and tumor necrosis factor synthesis by mouse peritoneal macrophages is enhanced by dietary n-3 polyunsaturated fatty acids. *Immunol Lett*, **23**, 281-285.
- [305] NC Long, I Otterness, SL Kunkel, et al., 1990: Roles of interleukin 1 beta and tumor necrosis factor in lipopolysaccharide fever in rats. *Am J Physiol*, **259**, R724-728.
- [306] G Luheshi, AJ Miller, S Brouwer, et al., 1996: Interleukin-1 receptor antagonist inhibits endotoxin fever and systemic interleukin-6 induction in the rat. *Am J Physiol*, **270**, E91-95.
- [307] C Luo, H Ren, JB Wan, et al., 2014: Enriched endogenous omega-3 fatty acids in mice protect against global ischemia injury. *J Lipid Res*, **55**, 1288-1297.

- [308] AM Lynch, M Moore, S Craig, et al., 2003: Analysis of interleukin-1 beta-induced cell signaling activation in rat hippocampus following exposure to gamma irradiation. Protective effect of eicosapentaenoic acid. *J Biol Chem*, **278**, 51075-51084.
- [309] WA Lynn, CR Raetz, N Qureshi, et al., 1991: Lipopolysaccharide-induced stimulation of CD11b/CD18 expression on neutrophils. Evidence of specific receptor-based response and inhibition by lipid A-based antagonists. *J Immunol*, **147**, 3072-3079.
- [310] L Ma, M Matsumoto, W Xie, et al., 2009: Evidence for lysophosphatidic acid 1 receptor signaling in the early phase of neuropathic pain mechanisms in experiments using Ki-16425, a lysophosphatidic acid 1 receptor antagonist. *J Neurochem*, **109**, 603-610.
- [311] L Ma, J Nagai and H Ueda, 2010: Microglial activation mediates de novo lysophosphatidic acid production in a model of neuropathic pain. *J Neurochem*, **115**, 643-653.
- [312] L Ma, H Uchida, J Nagai, et al., 2009: Lysophosphatidic acid-3 receptor-mediated feed-forward production of lysophosphatidic acid: an initiator of nerve injury-induced neuropathic pain. *Mol Pain*, **5**, 64.
- [313] S Ma, Y Ge, X Gai, et al., 2016: Transgenic n-3 PUFAs enrichment leads to weight loss via modulating neuropeptides in hypothalamus. *Neurosci Lett*, **611**, 28-32.
- [314] P Maderna and C Godson, 2009: Lipoxins: resolutionary road. *Br J Pharmacol*, **158**, 947-959.
- [315] C Madore, A Nadjar, J-C Delpech, et al., 2014: Nutritional n-3 PUFAs deficiency during perinatal periods alters brain innate immune system and neuronal plasticity-associated genes. *Brain, Behavior, and Immunity*, **41**, 22-31.
- [316] M Mahler Convenor, M Berard, R Feinstein, et al., 2014: FELASA recommendations for the health monitoring of mouse, rat, hamster, guinea pig and rabbit colonies in breeding and experimental units. *Lab Anim*, **48**, 178-192.
- [317] CW Mahoney, J Shuman, SL McKnight, et al., 1992: Phosphorylation of CCAAT-enhancer binding protein by protein kinase C attenuates site-selective DNA binding. *J Biol Chem*, **267**, 19396-19403.
- [318] NE Manicke, M Nefliu, C Wu, et al., 2009: Imaging of lipids in atheroma by desorption electrospray ionization mass spectrometry. *Anal Chem*, **81**, 8702-8707.
- [319] VL Marcheselli, S Hong, WJ Lukiw, et al., 2003: Novel Docosanoids Inhibit Brain Ischemia-Reperfusion-mediated Leukocyte Infiltration and Pro-inflammatory Gene Expression. *Journal of Biological Chemistry*, **278**, 43807-43817.
- [320] CB Marsh and MD Wewers, 1994: Cytokine-induced interleukin-1 receptor antagonist release in mononuclear phagocytes. *Am J Respir Cell Mol Biol*, **10**, 521-525.
- [321] K Matsumura and S Kobayashi, 2004: Signaling the brain in inflammation: the role of endothelial cells. *Front Biosci*, **9**, 2819-2826.
- [322] K Mayer, A Kiessling, J Ott, et al., 2009: Acute Lung Injury Is Reduced in Fat-1 Mice Endogenously Synthesizing n-3 Fatty Acids. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, **179**, 474-483.
- [323] D Mazia, G Schatten and W Sale, 1975: Adhesion of cells to surfaces coated with polylysine. Applications to electron microscopy. *J Cell Biol*, **66**, 198-200.
- [324] JW McFadden, S Aja, Q Li, et al., 2014: Increasing fatty acid oxidation remodels the hypothalamic neurometabolome to mitigate stress and inflammation. *PLoS One*, **9**, e115642.
- [325] MJ McKinley, RM McAllen, P Davern, et al., 2003: The sensory circumventricular organs of the mammalian brain. *Adv Anat Embryol Cell Biol*, **172**, III-XII, 1-122, back cover.
- [326] HF McMurray, S Parthasarathy and D Steinberg, 1993: Oxidatively modified low density lipoprotein is a chemoattractant for human T lymphocytes. *J Clin Invest*, **92**, 1004-1008.
- [327] RK McNamara, R Jandacek, T Rider, et al., 2010: Omega-3 fatty acid deficiency increases constitutive pro-inflammatory cytokine production in rats: Relationship with central serotonin turnover. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids (PLEFA)*, **83**, 185-191.
- [328] VR Meyer, 2004: Praxis der Hochleistungs-Flüssigchromatographie. Wiley-VCH, St. Gallen.
- [329] MA Micallef, IA Munro and ML Garg, 2009: An inverse relationship between plasma n-3 fatty acids and C-reactive protein in healthy individuals. *Eur J Clin Nutr*, **63**, 1154-1156.
- [330] B Michaeli, M M. Berger, J-P Revelly, et al., 2007: Effects of fish oil on the neuro-endocrine responses to an endotoxin challenge in healthy volunteers. *Clinical Nutrition*, **26**, 70-77.
- [331] GB Mills and WH Moolenaar, 2003: The emerging role of lysophosphatidic acid in cancer. *Nat Rev Cancer*, **3**, 582-591.

- [332] AS Milton and S Wendlandt, 1971: Effects on body temperature of prostaglandins of the A, E and F series on injection into the third ventricle of unanaesthetized cats and rabbits. *J Physiol*, **218**, 325-336.
- [333] JN Miner and KR Yamamoto, 1991: Regulatory crosstalk at composite response elements. *Trends Biochem Sci*, **16**, 423-426.
- [334] R Mingam, A Moranis, R-M Bluthé, et al., 2008: Uncoupling of interleukin-6 from its signalling pathway by dietary n-3-polyunsaturated fatty acid deprivation alters sickness behaviour in mice. *European Journal of Neuroscience*, **28**, 1877-1886.
- [335] Y Miwa, K Hirata, S Kawashima, et al., 1997: Lysophosphatidylcholine inhibits receptor-mediated Ca²⁺ mobilization in intact endothelial cells of rabbit aorta. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **17**, 1561-1567.
- [336] A Moranis, J-C Delpech, V De Smedt-Peyrusse, et al., 2012: Long term adequate n-3 polyunsaturated fatty acid diet protects from depressive-like behavior but not from working memory disruption and brain cytokine expression in aged mice. *Brain, Behavior, and Immunity*, **26**, 721-731.
- [337] NL Morse, 2012: Benefits of docosahexaenoic acid, folic acid, vitamin D and iodine on foetal and infant brain development and function following maternal supplementation during pregnancy and lactation. *Nutrients*, **4**, 799-840.
- [338] T Mosmann, 1983: Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*, **65**, 55-63.
- [339] A Mouihate, 2004: A Novel Antipyretic Action of 15-Deoxy- 12,14-Prostaglandin J2 in the Rat Brain. *Journal of Neuroscience*, **24**, 1312-1318.
- [340] C Mülhardt, 2009: *Der Experimentator Molekularbiologie/Genomics*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.
- [341] WA Muller, 2013: Getting leukocytes to the site of inflammation. *Vet Pathol*, **50**, 7-22.
- [342] K Mullis, F Faloon, S Scharf, et al., 1986: Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, **51 Pt 1**, 263-273.
- [343] M Murakami, Y Nakatani, G Atsumi, et al., 1997: Regulatory functions of phospholipase A2. *Crit Rev Immunol*, **17**, 225-283.
- [344] SRK Murthy, G Teodorescu, IM Nijholt, et al., 2008: Identification and characterization of a novel, shorter isoform of the small conductance Ca²⁺-activated K⁺channel SK2. *Journal of Neurochemistry*, **106**, 2312-2321.
- [345] G Murugesan, MR Sandhya Rani, CE Gerber, et al., 2003: Lysophosphatidylcholine regulates human microvascular endothelial cell expression of chemokines. *J Mol Cell Cardiol*, **35**, 1375-1384.
- [346] S Nadeau and S Rivest, 1999: Effects of circulating tumor necrosis factor on the neuronal activity and expression of the genes encoding the tumor necrosis factor receptors (p55 and p75) in the rat brain: a view from the blood-brain barrier. *Neuroscience*, **93**, 1449-1464.
- [347] A Nadjar, C Combe, S Laye, et al., 2003: Nuclear factor kappaB nuclear translocation as a crucial marker of brain response to interleukin-1. A study in rat and interleukin-1 type I deficient mouse. *J Neurochem*, **87**, 1024-1036.
- [348] M Nagai, T Saigusa, Y Shimada, et al., 1988: Antibody to tumor necrosis factor (TNF) reduces endotoxin fever. *Experientia*, **44**, 606-607.
- [349] T Nakajima, S Kinoshita, T Sasagawa, et al., 1993: Phosphorylation at threonine-235 by a ras-dependent mitogen-activated protein kinase cascade is essential for transcription factor NF-IL6. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **90**, 2207-2211.
- [350] T Nakamori, A Morimoto, K Yamaguchi, et al., 1994: Interleukin-1 beta production in the rabbit brain during endotoxin-induced fever. *J Physiol*, **476**, 177-186.
- [351] K Nakamura, 2011: Central circuitries for body temperature regulation and fever. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, **301**, R1207-1228.
- [352] PK Nakane and GB Pierce, Jr., 1966: Enzyme-labeled antibodies: preparation and application for the localization of antigens. *J Histochem Cytochem*, **14**, 929-931.
- [353] T Nakano, EW Raines, JA Abraham, et al., 1994: Lysophosphatidylcholine upregulates the level of heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor mRNA in human monocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**, 1069-1073.

- [354] O Narvanen, I Jokinen, K Poikonen, et al., 1986: Effect of elevated temperature on human immunoglobulin synthesis, lymphokine production and lymphocyte proliferation in vitro. *Acta Pathol Microbiol Immunol Scand C*, **94**, 239-244.
- [355] RA Navarro-Xavier, J Newson, VL Silveira, et al., 2010: A new strategy for the identification of novel molecules with targeted proresolution of inflammation properties. *J Immunol*, **184**, 1516-1525.
- [356] S Navarro, N Debili, JF Bernaudin, et al., 1989: Regulation of the expression of IL-6 in human monocytes. *J Immunol*, **142**, 4339-4345.
- [357] LN Nguyen, D Ma, G Shui, et al., 2014: Mfsd2a is a transporter for the essential omega-3 fatty acid docosahexaenoic acid. *Nature*, **509**, 503-506.
- [358] BZ Ngwenya and N Yamamoto, 1986: Effects of inflammation products on immune systems. Lysophosphatidylcholine stimulates macrophages. *Cancer Immunol Immunother*, **21**, 174-182.
- [359] A Nimmerjahn, F Kirchhoff and F Helmchen, 2005: Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. *Science*, **308**, 1314-1318.
- [360] E Nishi, N Kume, H Ochi, et al., 1997: Lysophosphatidylcholine induces heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor and interferon-gamma in human T-lymphocytes. *Ann N Y Acad Sci*, **811**, 519-524.
- [361] E Nishi, N Kume, H Ochi, et al., 1997: Lysophosphatidylcholine increases expression of heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor in human T lymphocytes. *Circ Res*, **80**, 638-644.
- [362] H Nishioka, H Horiuchi, H Arai, et al., 1998: Lysophosphatidylcholine generates superoxide anions through activation of phosphatidylinositol 3-kinase in human neutrophils. *FEBS Lett*, **441**, 63-66.
- [363] DK Nomura, BE Morrison, JL Blankman, et al., 2011: Endocannabinoid Hydrolysis Generates Brain Prostaglandins That Promote Neuroinflammation. *Science*, **334**, 809-813.
- [364] DM Norden, MM Muccigrosso and JP Godbout, 2015: Microglial priming and enhanced reactivity to secondary insult in aging, and traumatic CNS injury, and neurodegenerative disease. *Neuropharmacology*, **96**, 29-41.
- [365] ML Nording, J Yang, K Georgi, et al., 2013: Individual variation in lipidomic profiles of healthy subjects in response to omega-3 Fatty acids. *PLoS One*, **8**, e76575.
- [366] K Norioka, M Hara, M Harigai, et al., 1988: Production of B cell stimulatory factor-2/interleukin-6 activity by human endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*, **153**, 1045-1050.
- [367] SA Novgorodov and TI Gudz, 2011: Ceramide and mitochondria in ischemic brain injury. *Int J Biochem Mol Biol*, **2**, 347-361.
- [368] MK O'Banion and JA Olschowka, 1999: Localization and distribution of cyclooxygenase-2 in brain tissue by immunohistochemistry. *Methods Mol Biol*, **120**, 55-66.
- [369] T Ohira, M Arita, K Omori, et al., 2010: Resolvin E1 receptor activation signals phosphorylation and phagocytosis. *J Biol Chem*, **285**, 3451-3461.
- [370] PJ Ojala, TE Hirvonen, M Hermansson, et al., 2007: Acyl chain-dependent effect of lysophosphatidylcholine on human neutrophils. *J Leukoc Biol*, **82**, 1501-1509.
- [371] T Oka, Y Kanemitsu, N Sudo, et al., 2013: Psychological stress contributed to the development of low-grade fever in a patient with chronic fatigue syndrome: a case report. *Biopsychosoc Med*, **7**, 7.
- [372] K Omori, T Kida, M Hori, et al., 2014: Multiple roles of the PGE2 -EP receptor signal in vascular permeability. *Br J Pharmacol*, **171**, 4879-4889.
- [373] SM Opal and VA DePalo, 2000: Anti-inflammatory cytokines. *Chest*, **117**, 1162-1172.
- [374] MR Opp and JM Krueger, 1991: Interleukin 1-receptor antagonist blocks interleukin 1-induced sleep and fever. *Am J Physiol*, **260**, R453-457.
- [375] SK Orr, S Palumbo, F Bosetti, et al., 2013: Unesterified docosahexaenoic acid is protective in neuroinflammation. *Journal of Neurochemistry*, **127**, 378-393.
- [376] SK Orr, JYM Tong, JX Kang, et al., 2010: The Fat-1 Mouse has Brain Docosahexaenoic Acid Levels Achievable Through Fish Oil Feeding. *Neurochemical Research*, **35**, 811-819.
- [377] SK Orr, M-O Trépanier and RP Bazinet, 2013: n-3 Polyunsaturated fatty acids in animal models with neuroinflammation. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids (PLEFA)*, **88**, 97-103.
- [378] N Osborne and DY Stainier, 2003: Lipid receptors in cardiovascular development. *Annu Rev Physiol*, **65**, 23-43.

- [379] SS Ousman and S David, 2000: Lysophosphatidylcholine induces rapid recruitment and activation of macrophages in the adult mouse spinal cord. *Glia*, **30**, 92-104.
- [380] CD Palmer, CJ Mancuso, JP Weiss, et al., 2011: 17(R)-Resolvin D1 differentially regulates TLR4-mediated responses of primary human macrophages to purified LPS and live E. coli. *Journal of Leukocyte Biology*, **90**, 459-470.
- [381] HC Pan, TK Kao, YC Ou, et al., 2009: Protective effect of docosahexaenoic acid against brain injury in ischemic rats. *J Nutr Biochem*, **20**, 715-725.
- [382] P Parnet, F Pousset and S Laye, 2003: NF kappa B activation in mouse pituitary: comparison of response to interleukin-1 beta and lipopolysaccharide. *J Neuroendocrinol*, **15**, 304-314.
- [383] C Paschke, A Leisner, A Hester, et al., 2013: Mirion—A Software Package for Automatic Processing of Mass Spectrometric Images. *Journal of The American Society for Mass Spectrometry*, **24**, 1296-1306.
- [384] NH Patterson, A Thomas and P Chaurand, 2014: Monitoring time-dependent degradation of phospholipids in sectioned tissues by MALDI imaging mass spectrometry. *J Mass Spectrom*, **49**, 622-627.
- [385] G Paxinos, Franklin, K. B. J., 2001: *The Mouse Brain In Stereotaxic Coordinates*. Academic Press, San Diego, California, USA.
- [386] P Pedarzani and M Stocker, 2008: Molecular and cellular basis of small- and intermediate-conductance, calcium-activated potassium channel function in the brain. *Cellular and Molecular Life Sciences*, **65**, 3196-3217.
- [387] L Pei, J Zhang, F Zhao, et al., 2011: Annexin 1 exerts anti-nociceptive effects after peripheral inflammatory pain through formyl-peptide-receptor-like 1 in rat dorsal root ganglion. *Br J Anaesth*, **107**, 948-958.
- [388] C Perego, S Fumagalli and M-G De Simoni, 2011: Temporal pattern of expression and colocalization of microglia/macrophage phenotype markers following brain ischemic injury in mice. *Journal of Neuroinflammation*, **8**, 174.
- [389] H Pereira, L Barreira, F Figueiredo, et al., 2012: Polyunsaturated Fatty acids of marine macroalgae: potential for nutritional and pharmaceutical applications. *Mar Drugs*, **10**, 1920-1935.
- [390] ND Perkins, 2006: Post-translational modifications regulating the activity and function of the nuclear factor kappa B pathway. *Oncogene*, **25**, 6717-6730.
- [391] JW Phillis, LA Horrocks and AA Farooqui, 2006: Cyclooxygenases, lipoxygenases, and epoxygenases in CNS: Their role and involvement in neurological disorders. *Brain Research Reviews*, **52**, 201-243.
- [392] D Piomelli, 2005: The challenge of brain lipidomics. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*, **77**, 23-34.
- [393] D Piomelli, G Astarita and R Rapaka, 2007: A neuroscientist's guide to lipidomics. *Nature Reviews Neuroscience*, **8**, 743-754.
- [394] BA Plog, KM Moll, H Kang, et al., 2014: A novel technique for morphometric quantification of subarachnoid hemorrhage-induced microglia activation. *Journal of Neuroscience Methods*, **229**, 44-52.
- [395] T-T Pluess, D Hayoz, MM Berger, et al., 2007: Intravenous fish oil blunts the physiological response to endotoxin in healthy subjects. *Intensive Care Medicine*, **33**, 789-797.
- [396] T Pollmacher, M Haack, A Schuld, et al., 2002: Low levels of circulating inflammatory cytokines--do they affect human brain functions? *Brain Behav Immun*, **16**, 525-532.
- [397] JJ Pomposelli, EA Mascioli, BR Bistrain, et al., 1989: Attenuation of the febrile response in guinea pigs by fish oil enriched diets. *JPEN J Parenter Enteral Nutr*, **13**, 136-140.
- [398] RM Pope, A Leutz and SA Ness, 1994: C/EBP beta regulation of the tumor necrosis factor alpha gene. *J Clin Invest*, **94**, 1449-1455.
- [399] JP Portanova, Y Zhang, GD Anderson, et al., 1996: Selective neutralization of prostaglandin E2 blocks inflammation, hyperalgesia, and interleukin 6 production in vivo. *J Exp Med*, **184**, 883-891.
- [400] P Przanowski, M Dabrowski, A Ellert-Miklaszewska, et al., 2014: The signal transducers Stat1 and Stat3 and their novel target Jmjd3 drive the expression of inflammatory genes in microglia. *J Mol Med (Berl)*, **92**, 239-254.
- [401] M Pulido-Salgado, JM Vidal-Taboada and J Saura, 2015: C/EBPbeta and C/EBPdelta transcription factors: Basic biology and roles in the CNS. *Prog Neurobiol*, **132**, 1-33.
- [402] M Puppalo, D Varma and SA Jansen, 2014: A review of analytical methods for eicosanoids in brain tissue. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, **964**, 50-64.

- [403] H Qin, WI Yeh, P De Sarno, et al., 2012: Signal transducer and activator of transcription-3/suppressor of cytokine signaling-3 (STAT3/SOCS3) axis in myeloid cells regulates neuroinflammation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **109**, 5004-5009.
- [404] WM Qu, ZL Huang, XH Xu, et al., 2006: Lipocalin-type prostaglandin D synthase produces prostaglandin D2 involved in regulation of physiological sleep. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**, 17949-17954.
- [405] N Quan, EL Stern, MB Whiteside, et al., 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.
- [406] MT Quinn, S Parthasarathy and D Steinberg, 1988: Lysophosphatidylcholine: a chemotactic factor for human monocytes and its potential role in atherogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **85**, 2805-2809.
- [407] AS R. Nickel, E. Seiferle, 2004: Lehrbuch der Anatomie der Haustiere, Band IV, Nervensystem, Sinnesorgane, Endokrine Drüsen. Pary-Verlag, Stuttgart.
- [408] M Rahman, GV Halade, A Bhattacharya, et al., 2009: The fat-1 transgene in mice increases antioxidant potential, reduces pro-inflammatory cytokine levels, and enhances PPAR-gamma and SIRT-1 expression on a calorie restricted diet. *Oxid Med Cell Longev*, **2**, 307-316.
- [409] DP Ramji and P Foka, 2002: CCAAT/enhancer-binding proteins: structure, function and regulation. *Biochem J*, **365**, 561-575.
- [410] MA Ramos, M Kuzuya, T Esaki, et al., 1998: Induction of macrophage VEGF in response to oxidized LDL and VEGF accumulation in human atherosclerotic lesions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **18**, 1188-1196.
- [411] JS Rao, RN Ertley, JC DeMar, et al., 2006: Dietary n-3 PUFA deprivation alters expression of enzymes of the arachidonic and docosahexaenoic acid cascades in rat frontal cortex. *Molecular Psychiatry*, **12**, 151-157.
- [412] SI Rapoport, 1999: In vivo fatty acid incorporation into brain phospholipids in relation to signal transduction and membrane remodeling. *Neurochem Res*, **24**, 1403-1415.
- [413] SI Rapoport, MC Chang and AA Spector, 2001: Delivery and turnover of plasma-derived essential PUFAs in mammalian brain. *J Lipid Res*, **42**, 678-685.
- [414] D Reckels, 1991: Untersuchungen zum Adenosintriphosphat-, Adenosindiphosphat- und Adenosinmonophosphatgehalt in Myometrium, Endometrium und Karunkeln post partum bei Rindern mit ungestörtem Geburtsverlauf. na.
- [415] H Rehm, Letzel, T., 2010: *Der Experimentator Proteinbiochemie/Proteomics*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.
- [416] H Ren, Z Yang, C Luo, et al., 2016: Enriched Endogenous Omega-3 Fatty Acids in Mice Ameliorate Parenchymal Cell Death After Traumatic Brain Injury. *Mol Neurobiol*.
- [417] J Renart, J Reiser and GR Stark, 1979: Transfer of proteins from gels to diazobenzoyloxymethyl-paper and detection with antisera: a method for studying antibody specificity and antigen structure. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **76**, 3116-3120.
- [418] C Rey, A Nadjar, B Buaud, et al., 2015: Resolvin D1 and E1 promote resolution of inflammation in microglial cells in vitro. *Brain, Behavior, and Immunity*.
- [419] M Richter, C Nickel, L Apel, et al., 2015: SK channel activation modulates mitochondrial respiration and attenuates neuronal HT-22 cell damage induced by H2O2. *Neurochemistry International*, **81**, 63-75.
- [420] M Richter, N Vidovic, B Honrath, et al., 2016: Activation of SK2 channels preserves ER Ca(2+) homeostasis and protects against ER stress-induced cell death. *Cell Death Differ*, **23**, 814-827.
- [421] AA Romanovsky, 2007: Thermoregulation: some concepts have changed. Functional architecture of the thermoregulatory system. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, **292**, R37-46.
- [422] AA Romanovsky, CT Simons, M Szekely, et al., 1997: The vagus nerve in the thermoregulatory response to systemic inflammation. *Am J Physiol*, **273**, R407-413.
- [423] A Rompp, S Guenther, Y Schober, et al., 2010: Histology by mass spectrometry: label-free tissue characterization obtained from high-accuracy bioanalytical imaging. *Angew Chem Int Ed Engl*, **49**, 3834-3838.
- [424] A Rompp, T Schramm, A Hester, et al., 2011: imzML: Imaging Mass Spectrometry Markup Language: A common data format for mass spectrometry imaging. *Methods Mol Biol*, **696**, 205-224.

- [425] BM Ross and SJ Kish, 1994: Characterization of lysophospholipid metabolizing enzymes in human brain. *J Neurochem*, **63**, 1839-1848.
- [426] G Ross, T Hubschle, U Pehl, et al., 2003: Fever induction by localized subcutaneous inflammation in guinea pigs: the role of cytokines and prostaglandins. *J Appl Physiol (1985)*, **94**, 1395-1402.
- [427] G Ross, J Roth, B Storr, et al., 2000: Afferent nerves are involved in the febrile response to injection of LPS into artificial subcutaneous chambers in guinea pigs. *Physiol Behav*, **71**, 305-313.
- [428] J Roth, 2015: Energiehaushalt. In: GB W. von Engelhardt, M. Diener, G. Gäbel (ed.), *Physiologie der Haustiere*. Enke Verlag.
- [429] J Roth and CM Blatteis, 2014: Mechanisms of fever production and lysis: lessons from experimental LPS fever. *Compr Physiol*, **4**, 1563-1604.
- [430] J Roth, CA Conn, MJ Kluger, et al., 1993: Kinetics of systemic and intrahypothalamic IL-6 and tumor necrosis factor during endotoxin fever in guinea pigs. *Am J Physiol*, **265**, R653-658.
- [431] J Roth and GE De Souza, 2001: Fever induction pathways: evidence from responses to systemic or local cytokine formation. *Braz J Med Biol Res*, **34**, 301-314.
- [432] J Roth, EM Harre, C Rummel, et al., 2004: Signaling the brain in systemic inflammation: role of sensory circumventricular organs. *Front Biosci*, **9**, 290-300.
- [433] J Roth, D Martin, B Storr, et al., 1998: Neutralization of pyrogen-induced tumour necrosis factor by its type 1 soluble receptor in guinea-pigs: effects on fever and interleukin-6 release. *J Physiol*, **509 (Pt 1)**, 267-275.
- [434] A Roux, L Muller, SN Jackson, et al., 2016: Mass spectrometry imaging of rat brain lipid profile changes over time following traumatic brain injury. *J Neurosci Methods*.
- [435] A Rubartelli and MT Lotze, 2007: Inside, outside, upside down: damage-associated molecular-pattern molecules (DAMPs) and redox. *Trends Immunol*, **28**, 429-436.
- [436] AY Rudaya, AA Steiner, JR Robbins, et al., 2005: Thermoregulatory responses to lipopolysaccharide in the mouse: dependence on the dose and ambient temperature. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, **289**, R1244-1252.
- [437] C Rummel, 2015: Inflammatory transcription factors as activation markers and functional readouts in immune-to-brain communication. *Brain, Behavior, and Immunity*.
- [438] C Rummel, T Hubschle, R Gerstberger, et al., 2004: Nuclear translocation of the transcription factor STAT3 in the guinea pig brain during systemic or localized inflammation. *J Physiol*, **557**, 671-687.
- [439] C Rummel, W Inoue, S Poole, et al., 2010: Leptin regulates leukocyte recruitment into the brain following systemic LPS-induced inflammation. *Mol Psychiatry*, **15**, 523-534.
- [440] C Rummel, W Inoue, C Sachot, et al., 2008: Selective contribution of interleukin-6 and leptin to brain inflammatory signals induced by systemic LPS injection in mice. *J Comp Neurol*, **511**, 373-395.
- [441] C Rummel, K Matsumura and GN Luheshi, 2011: Circulating IL-6 contributes to peripheral LPS-induced mPGES-1 expression in the rat brain. *Brain Res Bull*, **86**, 319-325.
- [442] C Rummel, C Sachot, S Poole, et al., 2006: Circulating interleukin-6 induces fever through a STAT3-linked activation of COX-2 in the brain. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, **291**, R1316-1326.
- [443] C Rummel, T Voss, K Matsumura, et al., 2005: Nuclear STAT3 translocation in guinea pig and rat brain endothelium during systemic challenge with lipopolysaccharide and interleukin-6. *J Comp Neurol*, **491**, 1-14.
- [444] P Sah and ES Faber, 2002: Channels underlying neuronal calcium-activated potassium currents. *Prog Neurobiol*, **66**, 345-353.
- [445] CA Sailer, WA Kaufmann, J Marksteiner, et al., 2004: Comparative immunohistochemical distribution of three small-conductance Ca²⁺-activated potassium channel subunits, SK1, SK2, and SK3 in mouse brain. *Molecular and Cellular Neuroscience*, **26**, 458-469.
- [446] M Sakai, A Miyazaki, H Hakamata, et al., 1994: Lysophosphatidylcholine plays an essential role in the mitogenic effect of oxidized low density lipoprotein on murine macrophages. *J Biol Chem*, **269**, 31430-31435.
- [447] N Salem, Jr., B Litman, HY Kim, et al., 2001: Mechanisms of action of docosahexaenoic acid in the nervous system. *Lipids*, **36**, 945-959.
- [448] N Salem, Jr. and CD Niebylski, 1995: The nervous system has an absolute molecular species requirement for proper function. *Mol Membr Biol*, **12**, 131-134.

- [449] M Samson, AL Edinger, P Stordeur, et al., 1998: ChemR23, a putative chemoattractant receptor, is expressed in monocyte-derived dendritic cells and macrophages and is a coreceptor for SIV and some primary HIV-1 strains. *Eur J Immunol*, **28**, 1689-1700.
- [450] JP SanGiovanni and EY Chew, 2005: The role of omega-3 long-chain polyunsaturated fatty acids in health and disease of the retina. *Prog Retin Eye Res*, **24**, 87-138.
- [451] CB Saper, AA Romanovsky and TE Scammell, 2012: Neural circuitry engaged by prostaglandins during the sickness syndrome. *Nat Neurosci*, **15**, 1088-1095.
- [452] A Sasaki, H Yasukawa, A Suzuki, et al., 1999: Cytokine-inducible SH2 protein-3 (CIS3/SOCS3) inhibits Janus tyrosine kinase by binding through the N-terminal kinase inhibitory region as well as SH2 domain. *Genes Cells*, **4**, 339-351.
- [453] Y Sato, F Bernier, I Suzuki, et al., 2013: Comparative lipidomics of mouse brain exposed to enriched environment. *J Lipid Res*, **54**, 2687-2696.
- [454] N Satomi, K Haranaka and O Kunii, 1981: Research on the production site of tumor necrosis factor (TNF). *Jpn J Exp Med*, **51**, 317-322.
- [455] JE Savage, AJ Theron and R Anderson, 1993: Activation of neutrophil membrane-associated oxidative metabolism by ultraviolet radiation. *J Invest Dermatol*, **101**, 532-536.
- [456] TE Scammell, JK Elmquist, JD Griffin, et al., 1996: Ventromedial preoptic prostaglandin E2 activates fever-producing autonomic pathways. *J Neurosci*, **16**, 6246-6254.
- [457] H Schagger and G von Jagow, 1987: Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal Biochem*, **166**, 368-379.
- [458] R Schindler, J Mancilla, S Endres, et al., 1990: Correlations and interactions in the production of interleukin-6 (IL-6), IL-1, and tumor necrosis factor (TNF) in human blood mononuclear cells: IL-6 suppresses IL-1 and TNF. *Blood*, **75**, 40-47.
- [459] LC Schlichter, V Kaushal, I Moxon-Emre, et al., 2010: The Ca²⁺ activated SK3 channel is expressed in microglia in the rat striatum and contributes to microglia-mediated neurotoxicity in vitro. *Journal of Neuroinflammation*, **7**, 4.
- [460] M Schnare, M Rollinghoff and S Qureshi, 2006: Toll-like receptors: sentinels of host defence against bacterial infection. *Int Arch Allergy Immunol*, **139**, 75-85.
- [461] J Schneiders, F Fuchs, J Damm, et al., 2015: The transcription factor nuclear factor interleukin 6 mediates pro- and anti-inflammatory responses during LPS-induced systemic inflammation in mice. *Brain Behav Immun*, **48**, 147-164.
- [462] Y Schober, S Guenther, B Spengler, et al., 2012: Single cell matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry imaging. *Anal Chem*, **84**, 6293-6297.
- [463] AJ Schottelius, MW Mayo, RB Sartor, et al., 1999: Interleukin-10 signaling blocks inhibitor of kappaB kinase activity and nuclear factor kappaB DNA binding. *J Biol Chem*, **274**, 31868-31874.
- [464] CI Schulman, N Namias, J Doherty, et al., 2005: The effect of antipyretic therapy upon outcomes in critically ill patients: a randomized, prospective study. *Surg Infect (Larchmt)*, **6**, 369-375.
- [465] MA Schumacher, AF Rivard, HP Bachinger, et al., 2001: Structure of the gating domain of a Ca²⁺-activated K⁺ channel complexed with Ca²⁺/calmodulin. *Nature*, **410**, 1120-1124.
- [466] RR Schumann, SR Leong, GW Flaggs, et al., 1990: Structure and function of lipopolysaccharide binding protein. *Science*, **249**, 1429-1431.
- [467] JM Schwab, N Chiang, M Arita, et al., 2007: Resolvin E1 and protectin D1 activate inflammation-resolution programmes. *Nature*, **447**, 869-874.
- [468] M Schwaninger, N Petersen, S Prinz, et al., 2000: Adenosine-induced expression of interleukin-6 in astrocytes through protein kinase A and NF-IL-6. *Glia*, **31**, 51-58.
- [469] E Sehic, M Szekely, AL Ungar, et al., 1996: Hypothalamic prostaglandin E2 during lipopolysaccharide-induced fever in guinea pigs. *Brain Res Bull*, **39**, 391-399.
- [470] H Selye, 1950: Stress and the general adaptation syndrome. *Br Med J*, **1**, 1383-1392.
- [471] CN Serhan, 2009: Systems approach to inflammation resolution: identification of novel anti-inflammatory and pro-resolving mediators. *J Thromb Haemost*, **7 Suppl 1**, 44-48.
- [472] CN Serhan, 2014: Pro-resolving lipid mediators are leads for resolution physiology. *Nature*, **510**, 92-101.
- [473] CN Serhan, CB Clish, J Brannon, et al., 2000: Novel functional sets of lipid-derived mediators with antiinflammatory actions generated from omega-3 fatty acids via cyclooxygenase 2-nonsteroidal antiinflammatory drugs and transcellular processing. *J Exp Med*, **192**, 1197-1204.

- [474] CN Serhan, G Fredman, R Yang, et al., 2011: Novel Proresolving Aspirin-Triggered DHA Pathway. *Chemistry & Biology*, **18**, 976-987.
- [475] CN Serhan, S Hong, K Gronert, et al., 2002: Resolvins: A Family of Bioactive Products of Omega-3 Fatty Acid Transformation Circuits Initiated by Aspirin Treatment that Counter Proinflammation Signals. *Journal of Experimental Medicine*, **196**, 1025-1037.
- [476] CN Serhan and J Savill, 2005: Resolution of inflammation: the beginning programs the end. *Nature Immunology*, **6**, 1191-1197.
- [477] J Serrats, JC Schiltz, B García-Bueno, et al., 2010: Dual Roles for Perivascular Macrophages in Immune-to-Brain Signaling. *Neuron*, **65**, 94-106.
- [478] SS Shaftel, TJ Carlson, JA Olschowka, et al., 2007: Chronic interleukin-1beta expression in mouse brain leads to leukocyte infiltration and neutrophil-independent blood brain barrier permeability without overt neurodegeneration. *J Neurosci*, **27**, 9301-9309.
- [479] VG Shakkottai, M do Carmo Costa, JM Dell'Orco, et al., 2011: Early changes in cerebellar physiology accompany motor dysfunction in the polyglutamine disease spinocerebellar ataxia type 3. *J Neurosci*, **31**, 13002-13014.
- [480] SR Shanta, CS Choi, JH Lee, et al., 2012: Global changes in phospholipids identified by MALDI MS in rats with focal cerebral ischemia. *J Lipid Res*, **53**, 1823-1831.
- [481] AL Shapiro, E Vinuela and JV Maizel, Jr., 1967: Molecular weight estimation of polypeptide chains by electrophoresis in SDS-polyacrylamide gels. *Biochem Biophys Res Commun*, **28**, 815-820.
- [482] R Sharon, I Bar-Joseph, MP Frosch, et al., 2003: The formation of highly soluble oligomers of alpha-synuclein is regulated by fatty acids and enhanced in Parkinson's disease. *Neuron*, **37**, 583-595.
- [483] Z Shi, H Ren, C Luo, et al., 2015: Enriched Endogenous Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids Protect Cortical Neurons from Experimental Ischemic Injury. *Mol Neurobiol*.
- [484] M Shinohara and CN Serhan, 2016: Novel Endogenous Proresolving Molecules: Essential Fatty Acid-Derived and Gaseous Mediators in the Resolution of Inflammation. *J Atheroscler Thromb*, **23**, 655-664.
- [485] CC Silliman, DJ Elzi, DR Ambruso, et al., 2003: Lysophosphatidylcholines prime the NADPH oxidase and stimulate multiple neutrophil functions through changes in cytosolic calcium. *J Leukoc Biol*, **73**, 511-524.
- [486] B Simm, D Ott, E Pollatzek, et al., 2016: Effects of prostaglandin E2 on cells cultured from the rat organum vasculosum laminae terminalis and median preoptic nucleus. *Neuroscience*, **313**, 23-35.
- [487] AP Simopoulos, 2009: Evolutionary aspects of the dietary omega-6:omega-3 fatty acid ratio: medical implications. *World Rev Nutr Diet*, **100**, 1-21.
- [488] R Singer, CT Harker, AJ Vander, et al., 1986: Hyperthermia induced by open-field stress is blocked by salicylate. *Physiol Behav*, **36**, 1179-1182.
- [489] S Siso, M Jeffrey and L Gonzalez, 2010: Sensory circumventricular organs in health and disease. *Acta Neuropathol*, **120**, 689-705.
- [490] BK Smith and MJ Kluger, 1992: Human IL-1 receptor antagonist partially suppresses LPS fever but not plasma levels of IL-6 in Fischer rats. *Am J Physiol*, **263**, R653-655.
- [491] C Song, X Li, BE Leonard, et al., 2003: Effects of dietary n-3 or n-6 fatty acids on interleukin-1beta-induced anxiety, stress, and inflammatory responses in rats. *J Lipid Res*, **44**, 1984-1991.
- [492] LJ Sparvero, AA Amoscato, CE Dixon, et al., 2012: Mapping of phospholipids by MALDI imaging (MALDI-MSI): realities and expectations. *Chemistry and Physics of Lipids*, **165**, 545-562.
- [493] F Spener, M Lagarde, A G elo en, et al., 2003: Editorial: What is lipidomics? *European Journal of Lipid Science and Technology*, **105**, 481-482.
- [494] B Spengler, 2012: Mass Spectrometry Imaging. In: A Lebedev (ed.), *Comprehensive Environmental Mass Spectrometry*. ILM Publications, Hertfordshire.
- [495] B Spengler, Hubert, M., Kaufmann, R., MALDI Ion Imaging and Biological Ion Imaging with a new Scanning UV-Laser Microprobe. in Proceedings of the Proceedings of the 42nd Annual Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, Chicago, Illinois, 1994, p. 1041.
- [496] M Spite, 2013: Deciphering the role of n-3 polyunsaturated fatty acid-derived lipid mediators in health and disease. *Proceedings of the Nutrition Society*, **72**, 441-450.
- [497] RW Stackman, RS Hammond, E Linardatos, et al., 2002: Small conductance Ca²⁺-activated K⁺ channels modulate synaptic plasticity and memory encoding. *J Neurosci*, **22**, 10163-10171.

- [498] M Steffen, M Abboud, GK Potter, et al., 1989: Presence of tumour necrosis factor or a related factor in human basophil/mast cells. *Immunology*, **66**, 445-450.
- [499] AA Steiner, JC Hunter, SM Phipps, et al., 2009: Cyclooxygenase-1 or -2--which one mediates lipopolysaccharide-induced hypothermia? *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, **297**, R485-494.
- [500] EM Sternberg, 2001: Neuroendocrine regulation of autoimmune/inflammatory disease. *J Endocrinol*, **169**, 429-435.
- [501] JT Stitt, 1985: Evidence for the involvement of the organum vasculosum laminae terminalis in the febrile response of rabbits and rats. *J Physiol*, **368**, 501-511.
- [502] M Stocker and P Pedarzani, 2000: Differential distribution of three Ca(2+)-activated K(+) channel subunits, SK1, SK2, and SK3, in the adult rat central nervous system. *Mol Cell Neurosci*, **15**, 476-493.
- [503] M Straccia, G Dentesano, T Valente, et al., 2013: CCAAT/enhancer binding protein beta regulates prostaglandin E synthase expression and prostaglandin E2 production in activated microglial cells. *Glia*, **61**, 1607-1619.
- [504] JMB Stryer L. , J. L. Tymoczko, 2013: *Stryer Biochemie*. Springer Verlag, Berlin Heidelberg.
- [505] M Sugimoto, Y Shimizu, T Yoshioka, et al., 2015: Histological analyses by matrix-assisted laser desorption/ionization-imaging mass spectrometry reveal differential localization of sphingomyelin molecular species regulated by particular ceramide synthase in mouse brains. *Biochim Biophys Acta*, **1851**, 1554-1565.
- [506] S Sugiyama, K Kugiyama, N Ogata, et al., 1998: Biphasic regulation of transcription factor nuclear factor-kappaB activity in human endothelial cells by lysophosphatidylcholine through protein kinase C-mediated pathway. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **18**, 568-576.
- [507] JR Sundaram, ES Chan, CP Poore, et al., 2012: Cdk5/p25-Induced Cytosolic PLA2-Mediated Lysophosphatidylcholine Production Regulates Neuroinflammation and Triggers Neurodegeneration. *Journal of Neuroscience*, **32**, 1020-1034.
- [508] L Svennerholm, 1968: Distribution and fatty acid composition of phosphoglycerides in normal human brain. *J Lipid Res*, **9**, 570-579.
- [509] AH Swiergiel and AJ Dunn, 2002: Distinct roles for cyclooxygenases 1 and 2 in interleukin-1-induced behavioral changes. *J Pharmacol Exp Ther*, **302**, 1031-1036.
- [510] F Szepanowski, A Derksen, I Steiner, et al., 2016: Fingolimod promotes peripheral nerve regeneration via modulation of lysophospholipid signaling. *J Neuroinflammation*, **13**, 143.
- [511] I Tabas and CK Glass, 2013: Anti-inflammatory therapy in chronic disease: challenges and opportunities. *Science*, **339**, 166-172.
- [512] M Takahashi, H Okazaki, Y Ogata, et al., 2002: Lysophosphatidylcholine induces apoptosis in human endothelial cells through a p38-mitogen-activated protein kinase-dependent mechanism. *Atherosclerosis*, **161**, 387-394.
- [513] GK Takeda, N Starobinas, MC Marcondes, et al., 1995: Oral administration of fish-oil induces high levels of seric TNF in Trypanosoma cruzi infected C57BL/6 mice. *Acta Trop*, **60**, 215-219.
- [514] M Taniguchi and T Okazaki, 2014: The role of sphingomyelin and sphingomyelin synthases in cell death, proliferation and migration-from cell and animal models to human disorders. *Biochim Biophys Acta*, **1841**, 692-703.
- [515] D Tassoni, G Kaur, RS Weisinger, et al., 2008: The role of eicosanoids in the brain. *Asia Pac J Clin Nutr*, **17 Suppl 1**, 220-228.
- [516] SM Taubenfeld, MH Milekic, B Monti, et al., 2001: The consolidation of new but not reactivated memory requires hippocampal C/EBPbeta. *Nat Neurosci*, **4**, 813-818.
- [517] JL Teeling and VH Perry, 2009: Systemic infection and inflammation in acute CNS injury and chronic neurodegeneration: underlying mechanisms. *Neuroscience*, **158**, 1062-1073.
- [518] TS Tengku-Muhammad, TR Hughes, H Ranki, et al., 2000: Differential regulation of macrophage CCAAT-enhancer binding protein isoforms by lipopolysaccharide and cytokines. *Cytokine*, **12**, 1430-1436.
- [519] A Thomas, JL Charbonneau, E Fournaise, et al., 2012: Sublimation of New Matrix Candidates for High Spatial Resolution Imaging Mass Spectrometry of Lipids: Enhanced Information in Both Positive and Negative Polarities after 1,5-Diaminonaphthalene Deposition. *Analytical Chemistry*, **84**, 2048-2054.

- [520] J Thomas, CJ Thomas, J Radcliffe, et al., 2015: Omega-3 Fatty Acids in Early Prevention of Inflammatory Neurodegenerative Disease: A Focus on Alzheimer's Disease. *BioMed Research International*, **2015**, 1-13.
- [521] MC Thounaojam, DK Kaushik and A Basu, 2013: MicroRNAs in the brain: it's regulatory role in neuroinflammation. *Mol Neurobiol*, **47**, 1034-1044.
- [522] AK Thukkani, J McHowat, FF Hsu, et al., 2003: Identification of alpha-chloro fatty aldehydes and unsaturated lysophosphatidylcholine molecular species in human atherosclerotic lesions. *Circulation*, **108**, 3128-3133.
- [523] E Titos, B Rius, A Gonzalez-Periz, et al., 2011: Resolvin D1 and its precursor docosahexaenoic acid promote resolution of adipose tissue inflammation by eliciting macrophage polarization toward an M2-like phenotype. *J Immunol*, **187**, 5408-5418.
- [524] B Tollner, J Roth, B Storr, et al., 2000: The role of tumor necrosis factor (TNF) in the febrile and metabolic responses of rats to intraperitoneal injection of a high dose of lipopolysaccharide. *Pflugers Arch*, **440**, 925-932.
- [525] TI Torkhovskaya, OM Ipatova, TS Zakharova, et al., 2007: Lysophospholipid receptors in cell signaling. *Biochemistry (Mosc)*, **72**, 125-131.
- [526] KJ Tracey, 2007: Physiology and immunology of the cholinergic antiinflammatory pathway. *J Clin Invest*, **117**, 289-296.
- [527] TM Trebble, SA Wootton, EA Miles, et al., 2003: Prostaglandin E2 production and T cell function after fish-oil supplementation: response to antioxidant cosupplementation. *Am J Clin Nutr*, **78**, 376-382.
- [528] WC Tu, RJ Cook-Johnson, MJ James, et al., 2012: Barramundi (*Lates calcarifer*) desaturase with Delta6/Delta8 dual activities. *Biotechnol Lett*, **34**, 1283-1296.
- [529] AV Turnbull, S Prehar, AR Kennedy, et al., 2003: Interleukin-6 is an afferent signal to the hypothalamo-pituitary-adrenal axis during local inflammation in mice. *Endocrinology*, **144**, 1894-1906.
- [530] S Uematsu, M Matsumoto, K Takeda, et al., 2002: Lipopolysaccharide-dependent prostaglandin E(2) production is regulated by the glutathione-dependent prostaglandin E(2) synthase gene induced by the Toll-like receptor 4/MyD88/NF-IL6 pathway. *J Immunol*, **168**, 5811-5816.
- [531] JC Umhau, W Zhou, RE Carson, et al., 2009: Imaging incorporation of circulating docosahexaenoic acid into the human brain using positron emission tomography. *J Lipid Res*, **50**, 1259-1268.
- [532] L Vallieres and S Rivest, 1997: Regulation of the genes encoding interleukin-6, its receptor, and gp130 in the rat brain in response to the immune activator lipopolysaccharide and the proinflammatory cytokine interleukin-1beta. *J Neurochem*, **69**, 1668-1683.
- [533] J Van Damme, MR Schaafsma, WE Fibbe, et al., 1989: Simultaneous production of interleukin 6, interferon-beta and colony-stimulating activity by fibroblasts after viral and bacterial infection. *Eur J Immunol*, **19**, 163-168.
- [534] G van Echten-Deckert and J Walter, 2012: Sphingolipids: critical players in Alzheimer's disease. *Prog Lipid Res*, **51**, 378-393.
- [535] MH Van Oers, AA Van der Heyden and LA Aarden, 1988: Interleukin 6 (IL-6) in serum and urine of renal transplant recipients. *Clin Exp Immunol*, **71**, 314-319.
- [536] CJ van Oss, DR Absolom, LL Moore, et al., 1980: Effect of temperature on the chemotaxis, phagocytic engulfment, digestion and O2 consumption of human polymorphonuclear leukocytes. *J Reticuloendothel Soc*, **27**, 561-565.
- [537] D Vauzour, A Martinsen and S Layé, 2015: Neuroinflammatory processes in cognitive disorders: Is there a role for flavonoids and n-3 polyunsaturated fatty acids in counteracting their detrimental effects? *Neurochemistry International*, **89**, 63-74.
- [538] FM Vaz, M Pras-Raves, AH Bootsma, et al., 2014: Principles and practice of lipidomics. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, **38**, 41-52.
- [539] S Verma, R Nakaoke, S Dohgu, et al., 2006: Release of cytokines by brain endothelial cells: A polarized response to lipopolysaccharide. *Brain Behav Immun*, **20**, 449-455.
- [540] KA Vick, M Guidi and RW Stackman, 2010: In vivo pharmacological manipulation of small conductance Ca²⁺-activated K⁺ channels influences motor behavior, object memory and fear conditioning. *Neuropharmacology*, **58**, 650-659.
- [541] L Vila, 2004: Cyclooxygenase and 5-lipoxygenase pathways in the vessel wall: role in atherosclerosis. *Med Res Rev*, **24**, 399-424.

- [542] H Wajant, K Pfizenmaier and P Scheurich, 2003: Tumor necrosis factor signaling. *Cell Death Differ*, **10**, 45-65.
- [543] JT Walter, K Alvina, MD Womack, et al., 2006: Decreases in the precision of Purkinje cell pacemaking cause cerebellar dysfunction and ataxia. *Nat Neurosci*, **9**, 389-397.
- [544] JN Walters, JS Bickford, KJ Newsom, et al., 2012: Regulation of human microsomal prostaglandin E synthase-1 by IL-1beta requires a distal enhancer element with a unique role for C/EBPbeta. *Biochem J*, **443**, 561-571.
- [545] H Wang, O Bloom, M Zhang, et al., 1999: HMG-1 as a late mediator of endotoxin lethality in mice. *Science*, **285**, 248-251.
- [546] HY Wang, CB Liu, HW Wu, et al., 2010: Direct profiling of phospholipids and lysophospholipids in rat brain sections after ischemic stroke. *Rapid Commun Mass Spectrom*, **24**, 2057-2064.
- [547] P Wang, F Zhu and K Konstantopoulos, 2010: Prostaglandin E2 induces interleukin-6 expression in human chondrocytes via cAMP/protein kinase A- and phosphatidylinositol 3-kinase-dependent NF-kappaB activation. *Am J Physiol Cell Physiol*, **298**, C1445-1456.
- [548] X Wang, M Zhu, E Hjorth, et al., 2015: Resolution of inflammation is altered in Alzheimer's disease. *Alzheimer's & Dementia*, **11**, 40-50.e42.
- [549] K Weber and M Osborn, 1969: The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *J Biol Chem*, **244**, 4406-4412.
- [550] AD Wei, 2005: International Union of Pharmacology. LII. Nomenclature and Molecular Relationships of Calcium-Activated Potassium Channels. *Pharmacological Reviews*, **57**, 463-472.
- [551] MP Weinstein, PB Iannini, CW Stratton, et al., 1978: Spontaneous bacterial peritonitis. A review of 28 cases with emphasis on improved survival and factors influencing prognosis. *Am J Med*, **64**, 592-598.
- [552] J Welsch, T Hubschle, J Murgott, et al., 2012: Fever induction by systemic stimulation with macrophage-activating lipopeptide-2 depends upon TLR2 but not CD36. *Innate Immun*, **18**, 541-559.
- [553] MR Wenk, 2005: The emerging field of lipidomics. *Nat Rev Drug Discov*, **4**, 594-610.
- [554] J Wichmann, 2011: Matrix-gestützte Laser-Desorption und Ionisation (MALDI) mit ultrakurzen Laserpulsen.
- [555] CM Williams and G Burdge, 2006: Long-chain n-3 PUFA: plant v. marine sources. *Proc Nutr Soc*, **65**, 42-50.
- [556] TJ Williams, 1979: Prostaglandin E2, prostaglandin I2 and the vascular changes of inflammation. *Br J Pharmacol*, **65**, 517-524.
- [557] JJ Wirth and F Kierszenbaum, 1988: Recombinant tumor necrosis factor enhances macrophage destruction of *Trypanosoma cruzi* in the presence of bacterial endotoxin. *J Immunol*, **141**, 286-288.
- [558] LS Wolfe, 1982: Eicosanoids: prostaglandins, thromboxanes, leukotrienes, and other derivatives of carbon-20 unsaturated fatty acids. *J Neurochem*, **38**, 1-14.
- [559] J Woodcock, 2006: Sphingosine and ceramide signalling in apoptosis. *IUBMB Life*, **58**, 462-466.
- [560] SD Wright, RA Ramos, PS Tobias, et al., 1990: CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. *Science*, **249**, 1431-1433.
- [561] C Wu, DR Ifa, NE Manicke, et al., 2010: Molecular imaging of adrenal gland by desorption electrospray ionization mass spectrometry. *Analyst*, **135**, 28-32.
- [562] XM Xia, B Fakler, A Rivard, et al., 1998: Mechanism of calcium gating in small-conductance calcium-activated potassium channels. *Nature*, **395**, 503-507.
- [563] W Xian, Y Wu, W Xiong, et al., 2016: The pro-resolving lipid mediator Maresin 1 protects against cerebral ischemia/reperfusion injury by attenuating the pro-inflammatory response. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **472**, 175-181.
- [564] Y Xiao, Y Huang and ZY Chen, 2005: Distribution, depletion and recovery of docosahexaenoic acid are region-specific in rat brain. *Br J Nutr*, **94**, 544-550.
- [565] J Xu, M Chalimoniuk, Y Shu, et al., 2003: Prostaglandin E2 production in astrocytes: regulation by cytokines, extracellular ATP, and oxidative agents. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, **69**, 437-448.
- [566] M-X Xu, B-C Tan, W Zhou, et al., 2013: Resolvin D1, an Endogenous Lipid Mediator for Inactivation of Inflammation-Related Signaling Pathways in Microglial Cells, Prevents Lipopolysaccharide-Induced Inflammatory Responses. *CNS Neuroscience & Therapeutics*, **19**, 235-243.

- [567] EB Yalcin and SM de la Monte, 2015: Review of Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Imaging Mass Spectrometry for Lipid Biochemical Histopathology. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, **63**, 762-771.
- [568] Y Yamamoto and RB Gaynor, 2001: Therapeutic potential of inhibition of the NF-kappaB pathway in the treatment of inflammation and cancer. *J Clin Invest*, **107**, 135-142.
- [569] JJ Yan, JS Jung, JE Lee, et al., 2004: Therapeutic effects of lysophosphatidylcholine in experimental sepsis. *Nat Med*, **10**, 161-167.
- [570] H Yang, M Ochani, J Li, et al., 2004: Reversing established sepsis with antagonists of endogenous high-mobility group box 1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**, 296-301.
- [571] SJ Yarwood, G Borland, WA Sands, et al., 2008: Identification of CCAAT/enhancer-binding proteins as exchange protein activated by cAMP-activated transcription factors that mediate the induction of the SOCS-3 gene. *J Biol Chem*, **283**, 6843-6853.
- [572] ZF Yu, M Nikolova-Karakashian, D Zhou, et al., 2000: Pivotal role for acidic sphingomyelinase in cerebral ischemia-induced ceramide and cytokine production, and neuronal apoptosis. *J Mol Neurosci*, **15**, 85-97.
- [573] K Yukawa, T Tanaka, S Tsuji, et al., 1998: Expressions of CCAAT/Enhancer-binding proteins beta and delta and their activities are intensified by cAMP signaling as well as Ca²⁺/calmodulin kinases activation in hippocampal neurons. *J Biol Chem*, **273**, 31345-31351.
- [574] D Yuki, Y Sugiura, N Zaima, et al., 2014: DHA-PC and PSD-95 decrease after loss of synaptophysin and before neuronal loss in patients with Alzheimer's disease. *Sci Rep*, **4**, 7130.
- [575] KA Zemski Berry, WC Gordon, RC Murphy, et al., 2014: Spatial organization of lipids in the human retina and optic nerve by MALDI imaging mass spectrometry. *J Lipid Res*, **55**, 504-515.
- [576] TJ Zethof, JA Van der Heyden, JT Tolboom, et al., 1994: Stress-induced hyperthermia in mice: a methodological study. *Physiol Behav*, **55**, 109-115.
- [577] TJ Zethof, JA Van der Heyden, JT Tolboom, et al., 1995: Stress-induced hyperthermia as a putative anxiety model. *Eur J Pharmacol*, **294**, 125-135.
- [578] M Zetterstrom, AK Sundgren-Andersson, P Ostlund, et al., 1998: Delineation of the proinflammatory cytokine cascade in fever induction. *Ann NY Acad Sci*, **856**, 48-52.
- [579] Y Zhang and WN Rom, 1993: Regulation of the interleukin-1 beta (IL-1 beta) gene by mycobacterial components and lipopolysaccharide is mediated by two nuclear factor-IL6 motifs. *Mol Cell Biol*, **13**, 3831-3837.
- [580] Z Zhang, YC Lee, SJ Kim, et al., 2007: Production of lysophosphatidylcholine by cPLA2 in the brain of mice lacking PPT1 is a signal for phagocyte infiltration. *Hum Mol Genet*, **16**, 837-847.
- [581] Y-Y Zhao, H Miao, X-L Cheng, et al., 2015: Lipidomics: Novel insight into the biochemical mechanism of lipid metabolism and dysregulation-associated disease. *Chemico-Biological Interactions*, **240**, 220-238.
- [582] H Zhou, G Andonegui, CH Wong, et al., 2009: Role of endothelial TLR4 for neutrophil recruitment into central nervous system microvessels in systemic inflammation. *J Immunol*, **183**, 5244-5250.

X. Anhang

1. Eigene Publikationen

1.1 Originalarbeiten in Fachzeitschriften

Krüger K, Bredehöft J, Mooren FC, Rummel C (2016)

Different effects of strength and endurance exercise training on COX-2 and mPGES expression in mouse brain are independent of peripheral inflammation.

J Appl Physiol (1985), 121, 248-254.

Rummel C, Bredehöft J, Damm J, Schweighöfer H, Peek V, Harden LM (2016)

Obesity Impacts Fever and Sickness Behavior During Acute Systemic Inflammation.

Physiology (Bethesda), 31, 117-130.

1.2 Veröffentlichte Abstracts

Bredehöft J, Dolga AM, Mazurek S, Honrath B, Culmsee C, Gerstberger R, Roth J, Rummel C (2016)

Abstract # 1717 Effects of CyPPA on lipopolysaccharide-induced sickness responses, microglial activation as well as brain and systemic inflammatory mediators in mice.

Brain, Behavior, and Immunity, 57, Supplement, e5.

Schneiders J, Fuchs F, Damm J, Bredehöft J, Gerstberger R, Soares DM, Roth J, Rummel C (2014)

60. Nuclear factor interleukin 6 deficient mice show alterations in the stress-axis and the serotonin metabolism.

Brain, Behavior, and Immunity, 40, Supplement, e18.

1.3 In Vorbereitung

Bredehöft J, Dolga AM, Mazurek S, Culmsee C, Gerstberger R, Roth J, Rummel C (2016)

The potential neuroprotective agonist of small conductance calcium-activated potassium channels CyPPA increases locomotor activity, energy metabolism and body core temperature in mice.

Bredehöft J, Bhandari DR, Schulz S, Gerstberger R, Roth J, Spengler B and Rummel C (2016)

Specific lipid distribution patterns in the vascular organ of the lamina terminalis and surrounding mouse brain tissue during systemic inflammation using MALDI MSI.

2. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben herzlichst bedanken.

Allen voran möchte ich mich bei Herrn PD Christoph Rummel für die außergewöhnlich engagierte, konstruktive und unkomplizierte Betreuung dieser Doktorarbeit bedanken. Ferner natürlich auch für die Überlassung des spannenden Themas und das in mich gesetzte Vertrauen sowie die Eröffnung so vieler Möglichkeiten.

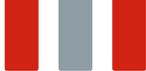
Prof. Rüdiger Gerstberger danke ich für die Möglichkeit meine Dissertation am Institut für Veterinär-Physiologie und –Biochemie anfertigen zu können. Insbesondere danke ich Doreen Marks, Jolanta Murgott und Daniela Ott für die großartige Unterstützung und zuverlässige Hilfe bei allen Laborarbeiten. Ebenso danke ich allen anderen (auch ehemaligen) Mitarbeitern des Instituts. Ihr wart alle maßgeblich daran beteiligt „die Physio“ für mich zu einem unvergesslichen Arbeitsplatz werden zu lassen.

Danke auch an Dhaka Ram Bhandari und Sabine Schulz, die mir mit viel Geduld die Welt der analytischen Chemie ein Stück verständlicher gemacht haben.

3. Erklärung

„Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der "Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis" niedergelegt sind, eingehalten.“

Janne Bredehöft



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFBENGRING 15
D-35396 GIESSEN

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

ISBN: 978-3-8359-6551-5



9 783835 196551 5