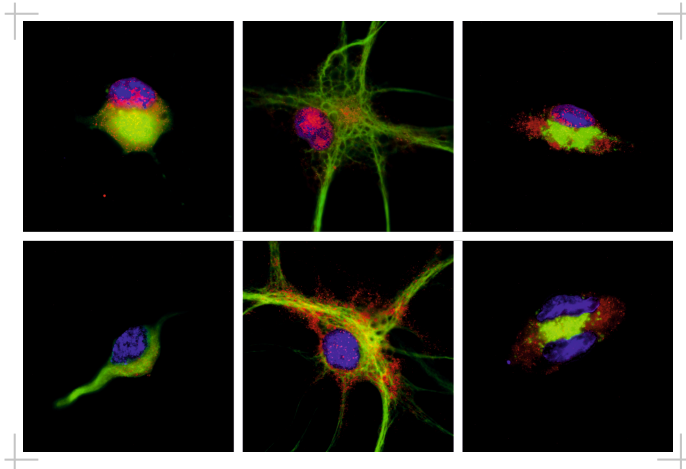


VERENA PEEK

Das Potenzial von endogenen „toll-like“
Rezeptor-Agonisten und ω -3-Fettsäuren zur
Modulation systemischer 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

**Das Potenzial von endogenen „toll-like“ Rezeptor-
Agonisten und ω -3-Fettsäuren zur Modulation
systemischer Entzündungsreaktionen**

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

eingereicht von

Verena Peek
Tierärztin aus Südlohn

Gießen 2017

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

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

Gutachter: PD Dr. Christoph Rummel
Prof. Dr. Melanie Hamann

Tag der Disputation: 14.07.2017

I	EINLEITUNG.....	8
IA	Die systemische Entzündungsreaktion	8
1	„Sickness behavior“	9
2	Signalwege der systemischen Entzündung.....	10
2.1	Der humorale Signalweg	11
2.1.1	Zirkumventrikuläre Organe.....	13
2.1.2	Inflammatorische Mediatoren	15
2.1.2.1	Transkriptionsfaktoren.....	15
2.1.2.2	Zytokine	17
2.1.2.3	Eicosanoide	20
IB	„Toll-like“ Rezeptoren und ausgewählte Agonisten	25
1	Exogene Agonisten extrazellulärer „toll-like“ Rezeptoren	26
1.1	Lipopolysaccharid	26
1.1.1	Die LPS-induzierte Entzündungsreaktion	27
2	Endogene Agonisten extrazellulärer “toll-like” Rezeptoren	28
2.1	“High-mobility group box 1”	29
2.2	Biglykan	32
IC	Bedeutung des Fettgewebes für Entzündungsreaktionen	33
1	Adiponektin.....	35
1.1	Die Bedeutung von Adiponektin für die Immunantwort und systemische Entzündungen.....	36
2	Leptin.....	36
2.1	Die Bedeutung von Leptin für die Immunantwort und systemische Entzündungen.....	37
3	Visfatin / PBEF / Nampt	38
3.1	Die Bedeutung von Visfatin für die Immunantwort und systemische Entzündungen.....	38
ID	Anti-inflammatorische Bedeutung von ω-3-Fettsäuren.....	39
1	Metabolisierung der ω -3-Fettsäuren zu Eicosanoiden oder Docosanoiden	40
2	Die Bedeutung von ω -3-Fettsäuren für das Gehirn und Neuroinflammation	42
3	Genauere Beschreibung der pro-entzündungsauflösenden Wirkung einiger ausgewählter „specialized pro-resolving lipid mediators“	44
4	Fat-1 Maus als Tiermodell	45
II	FRAGESTELLUNGEN UND ZIELSETZUNG DER ARBEIT	48
IIA	In welchem Maß können endogene TLR-Agonisten eine systemische Inflammation potenziell induzieren bzw. aufrechterhalten?	48
IIB	Welchen Einfluss haben ω-3-Fettsäuren auf physiologische Vitalparameter und periphere Entzündungsanzeichen?.....	50
III	MATERIAL UND METHODEN	51

IIIA Materialien	51
IIIB Versuchstiere	57
1 Ratten	57
2 Mäuse	58
2.1 Mausstämme.....	58
2.1.1 Fat-1 (B6.129P2-Tg(CAG-fat-1)Jxk).....	58
2.1.2 C57BL6/N	59
2.2 Haltung und Zucht der C57BL6/N Mäuse	59
2.3 Genotypisierung der Fat-1 Mäuse	59
2.3.1 DNA – Isolation aus Ohrstanzproben der Fat-1 Mäuse	61
2.3.2 Amplifikation der gewonnenen DNA mit Hilfe der Polymerase- Kettenreaktion.....	62
2.3.2.1 Grundlagen der Methode	62
2.3.2.2 Durchführung der PCR im Rahmen der Genotypisierung	64
2.3.3 Gelelektrophoretische Auftrennung und Auswertung.....	65
3 Sentineltiere	65
IIIC In vivo Modelle	69
1 Versuchsaufbau	72
2 Operation zur Senderimplantation	74
3 „Novel Environment Stress“	76
4 Induktion einer systemischen Entzündung durch LPS-Injektion	77
5 Erfassung physiologischer Daten	77
5.1 Telemetrie	78
5.1.1 Telemetrie-Sender	78
5.1.2 Erfassung der Körperkerntemperatur und der lokomotorischen Aktivität	79
5.2 Futter- und Wasseraufnahme.....	79
5.3 Entwicklung der Körpermasse.....	79
6 Perfusion und Gewinnung von Organ- und Blutproben	79
7 Auswertung und Statistik	81
IIID In vitro Modelle	83
1 Primärkultur der Area postrema	83
1.1 Präparation von Primärkulturen der <i>Area postrema</i>	87
1.1.1 Durchführung der Präparation.....	87
1.2 Stimulation von Primärkulturen der <i>Area postrema</i>	88
1.2.1 Durchführung der Stimulation.....	90
1.3 Messung der intrazellulären Kalziumkonzentration („Ca ²⁺ -Imaging“)	93
1.3.1 Grundlagen der Methode	93
1.3.2 Messstand für die Durchführung des „Ca ²⁺ -Imagings“	95
1.3.3 Versuchsdurchführung.....	96
1.3.4 Verwendete Messprotokolle	97

1.3.5	Datenevaluierung.....	101
2	Fat Explants	102
2.1	Präparation der Fat Explants.....	103
2.1.1	Durchführung der Präparation.....	104
2.2	Stimulation der „Fat Explants“	106
2.2.1	Durchführung der Stimulation.....	106
III E	Erfassung biochemischer Parameter.....	107
1	Immunzytochemie / Immunhistochemie	107
1.1	Grundlagen der Methode.....	108
1.2	Antikörper.....	109
1.3	Durchführung der Immunzytochemie.....	111
1.3.1	Versuchsprotokoll für die Durchführung der Immunzytochemie.....	112
1.4	Durchführung der Immunhistochemie.....	112
1.4.1	Anfertigung der Gefrierschnitte.....	113
1.4.2	Versuchsprotokoll für die Durchführung der Immunhistochemie.....	113
1.5	Mikroskopie und Auswertung	114
2	Zytokin-Bioassays	117
2.1	Grundlagen der Methode.....	118
2.2	Bestimmung der Konzentration von IL-6.....	119
2.3	Bestimmung der Konzentration von TNF α	119
2.4	Auswertung und Statistik	120
3	Quantitative „real-time“ RT-PCR	121
3.1	Grundlagen der Methode.....	122
3.2	Extraktion der RNA.....	124
3.3	Quantifizierung des RNA-Gehaltes.....	126
3.4	Reverse Transkription der RNA.....	126
3.5	Durchführung der quantitativen „real-time“ PCR.....	127
3.6	Ermittlung der optimalen endogenen Kontrollen	128
3.7	Auswertung und Statistik	129
4	Flüssigchromatographie mit Massenspektrometrikopplung (LC-MS/MS) ...	130
4.1	Grundlagen der Methode.....	132
4.1.1	Festphasenextraktion.....	132
4.1.2	Hochleistungsflüssigchromatographie	133
4.1.3	Massenspektrometrie.....	134
4.2	Durchführung	137
4.2.1	Verdünnung der Proben und Zusatz des internen Standards	138
4.2.2	Durchführung der Festphasenextraktion	138
4.2.3	Wichtige technische Parameter für die Durchführung der UHPLC.....	139
4.2.4	Wichtige technische Parameter der angewendeten Massenspektrometrie.....	140
4.3	Auswertung und Statistik.....	141
5	„Enzyme-linked immunosorbent assay“	143

5.1	Grundlagen der Methode.....	143
5.2	Untersuchte Proben und Versuchsdurchführung	144
5.3	Auswertung und Statistik	144
6	Färbung von Blutaussstrichen	145
6.1	Grundlagen der Methode.....	145
6.2	Durchführung der Pappenheim-Färbung	145
6.3	Auswertung	146
IV	ERGEBNISSE	147
IVA	Charakterisierung der Bedeutung des endogenen TLR-Agonisten HMGB1 während einer systemischen LPS-induzierten Sepsis.....	147
1	Veränderung der Körperkerntemperatur in Abhängigkeit der intraperitonealen Injektion einer septischen LPS-Dosis.....	147
2	Beeinflussung zirkulierender Mediatoren durch die intraperitoneale LPS-Injektion.....	148
3	Beeinflussung der peripheren und zentralen relativen Expression von HMGB1 und seiner Rezeptoren durch die LPS-induzierte Sepsis.....	149
4	Charakterisierung eines Einflusses der peripheren LPS-Injektion auf die zentrale Lokalisation von HMGB1 auf Proteinebene.....	150
5	Nähere Untersuchungen zur Aktivierung von Gehirnzellen der Area postrema durch Disulfid-HMGB1	153
5.1	Beurteilung der LPS-bedingten HMGB1-Freisetzung in vitro	153
5.2	Untersuchung einer potenziellen HMGB1-induziertenden Aktivierung von Transkriptionsfaktoren in vitro	155
5.2.1	Betrachtung der nukleären Translokation von NFκB	155
5.2.2	Untersuchung der nukleären NF-IL6-Immunreaktivität	157
5.3	Untersuchung der HMGB1-induzierten Zytokin-Synthese in Zellen der AP	159
5.3.1	Untersuchung der HMGB1-bedingten Freisetzung von IL-6 und TNFα aus primären Zellkulturen der Area postrema.....	159
5.3.2	Untersuchung einer induzierten IL-1β-Synthese auf Proteinebene.....	162
5.4	Charakterisierung der schnellen, direkten Zellantwort auf Stimulation mit den TLR-Agonisten HMGB1 und LPS	162
5.4.1	Charakterisierung der Responsivität auf HMGB1	163
5.4.2	Vergleichende Voruntersuchung der Responsivität auf LPS	165
5.4.3	Untersuchung einer gegenseitigen Modulation von LPS und HMGB1 auf die Zellantworten.....	167
6	Zusammenfassung der wichtigsten Ergebnisse zur Charakterisierung der Bedeutung von HMGB1 während einer Sepsis	170
IVB	Untersuchung der Freisetzung von pro- und anti-inflammatorischen Lipidmediatoren aus Primärkulturen der AP	171
1	Untersuchung einer induzierten Freisetzung von pro- und anti-inflammatorischen Lipidmediatoren aus den neuronalen sowie glialen Zellen von Primärkulturen der AP	172
1.1	Darstellung des Nachweises der anti-inflammatorischen Lipidmediatoren Resolvin D ₁ und Resolvin D ₂	174

1.2	Beispielhafte Darstellung einer Quantifizierung unter Einbeziehung interner Standards.....	175
2	Charakterisierung der Freisetzung der ω-6- und ω-3-Fettsäuren Arachidonsäure, Docosahexaensäure und Eicosapentaensäure aus Zellen von Primärkulturen der AP	176
3	Zusammenfassung der für die Fragestellung nach einer induzierten Synthese von Lipidmediatoren wichtigsten Ergebnisse.....	177
IVC	Charakterisierung der Sekretion durch das Fettgewebe während steriler und bakterieller Inflammation.....	178
1	Modulation der Adipokin-Synthese	180
2	Modulation der Zytokin-Synthese.....	183
3	Modulation auf Ebene der mRNA	187
4	Zusammenfassung der wichtigsten Ergebnisse zur Charakterisierung der Sekretion durch Fettgewebe während steriler und bakterieller Inflammation	190
IVD	Untersuchung des Einflusses von ω-3-Fettsäuren auf eine systemische LPS-induzierte Inflammation	191
1	Beeinflussung der physiologischen Parameter des „sickness behaviors“	192
1.1	Körperkerntemperatur	192
1.2	Lokomotorische Aktivität	196
1.3	Futter- und Wasseraufnahme.....	200
1.4	Entwicklung der Körpermasse.....	201
2	Beeinflussung LPS-induzierter peripherer pro-inflammatorischer Parameter durch ω-3-Fettsäuren.....	202
2.1	Zirkulierende Zytokine	202
2.2	Leukozyten im Blut.....	203
2.3	Genexpression wichtiger inflammatorischer Marker in Leber und Milz.....	204
3	Zusammenfassung der wichtigsten Ergebnisse für die Fragestellung nach dem Einfluss von ω-3-Fettsäuren auf eine LPS-induzierte Inflammation	211
IVE	Einfluss von ω-3-Fettsäuren auf die physiologischen Parameter des psychologischen Stresses.....	212
1	Körperkerntemperatur	213
2	Lokomotorische Aktivität.....	214
3	Zusammenfassung der wichtigsten Ergebnisse für die Fragestellung nach dem Einfluss von ω-3-Fettsäuren auf psychologischen Stress.....	216
V	DISKUSSION	217
VA	Untersuchungen zu endogenen TLR-Agonisten bei der Induktion bzw. Aufrechterhaltung systemischer Inflammation	217
1	HMGB1 als später Mediator der Sepsis.....	217
1.1	Anhaltendes LPS-induziertes Fieber trotz basaler IL-6- und TNF α -Konzentrationen im Plasma.....	217

1.2	Reduzierte mRNA-Expression von HMGB1, RAGE und TLR4 in der Leber von LPS-injizierten Ratten	220
1.3	LPS-abhängige Freisetzung von HMGB1 aus Gehirnstrukturen, die für Fieber relevant sind.....	222
1.4	Untersuchung zum pro-inflammatorischen Potenzial von Disulfid-HMGB1 auf neuronale sowie gliale Zellen der AP.....	224
1.4.1	Die Bedeutung von HMGB1 für die genomische Aktivierung von neuronalen sowie glialen Zellen der <i>Area postrema</i> und die resultierende Zytokin-Synthese	224
1.4.2	Direkte Aktivierung von neuronalen sowie glialen Zellen durch bei einer Sepsis zirkulierendes LPS und HMGB1	227
1.4.3	Beurteilung des Potenzials von Zellen der AP-Primärkultur zur induzierten Synthese von Lipidmediatoren.....	229
2	Bedeutung der induzierten Synthese von Adipokinen und Zytokinen durch das Fettgewebe im Rahmen von systemischen Entzündungen	235
2.1	Behandlungsabhängige Modulation der Sekretion von Adipokinen und Zytokinen aus dem Fettgewebe.....	235
2.1.1	LPS-abhängige Freisetzung von Zytokinen und Adipokinen.....	235
2.1.2	HMGB1-abhängige Freisetzung von Zytokinen und Adipokinen.....	240
2.1.3	Biglykan-abhängige Freisetzung von Zytokinen und Adipokinen.....	241
2.2	Alters- und lokalitätsabhängige Modulation der Sekretion von Adipokinen	243
2.3	mRNA Expression von HMGB1 sowie von Rezeptoren im subcutanen Fettgewebe	245
VB	Welchen Einfluss haben ω-3-Fettsäuren auf physiologische Vitalparameter und periphere Entzündungsanzeichen?.....	247
1	Bedeutung von ω-3-Fettsäuren im Rahmen systemischer LPS-induzierter Entzündungen.....	248
1.1	Beeinflussung der Vitalparameter bei einer LPS-induzierten Entzündung durch gesteigerte Konzentrationen von ω -3-Fettsäuren	248
1.2	Wirkung von ω -3-Fettsäuren auf basale und LPS-stimulierte periphere inflammatorische Parameter.....	252
1.2.1	Einfluss von ω -3-Fettsäuren auf zirkulierende Zytokine im Blutplasma ...	252
1.2.2	Der prozentuale Anteil verschiedener Leukozyten im Blut wird durch ω -3-FS nicht beeinflusst.....	255
1.3	Einfluss von ω -3-Fettsäuren auf die mRNA-Expression inflammatorischer Parameter	256
2	Charakterisierung des Einflusses von ω-3-Fettsäuren auf die durch psychologischen Stress ansteigenden Vitalparameter.....	262
VI	ZUSAMMENFASSUNG	265
VII	SUMMARY	269
VIII	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	273
IX	LITERATURVERZEICHNIS.....	276
X	ANHANG.....	301

INHALTSVERZEICHNIS

XA	Publikationsliste	301
XB	Danksagung	302
XC	Erklärung.....	304

I EINLEITUNG

IA Die systemische Entzündungsreaktion

Bei einer Entzündung handelt es sich um einen homöostatischen Prozess, der in der frühen Phase einer Zerstörung oder Neutralisation des auslösenden Agens dient und in der späten Entzündungsphase mit einer Beseitigung der entstandenen Zelltrümmer einhergeht [1]. Das Ziel besteht in einer *Restitutio ad integrum*, also einer Wiederherstellung eines vollständig funktionsfähigen Gewebes. Synonym wird auch die Bezeichnung Inflammation verwendet.

Als Ursachen für eine Inflammation kommen sowohl exogene als auch endogene Noxen in Frage. Die exogenen Noxen können belebt (Bakterien, Parasiten, Viren, Pilze) oder unbelebt (physikalische oder chemische Noxen) sein. Allen Agenzien ist gemeinsam, dass sie mit einer Zerstörung des Gewebes einhergehen. Dies bedingt zunächst meist lokal im vaskularisierten Gewebe eine Entzündungsreaktion. Sie ist durch die Kardinalsymptome Rötung, Schwellung, Wärme, Schmerz und einem eventuellen Funktionsverlust gekennzeichnet. Diese Symptome sind durch eine erhöhte Freisetzung von sogenannten Entzündungsmediatoren und der damit zusammenhängenden gesteigerten Gefäßpermeabilität, Vasodilatation und Einwanderung von Immunzellen in das Gewebe bedingt. In dem betroffenen Entzündungsgebiet kommt es lokal zu einer Aktivierung unterschiedlicher Zelltypen (u.a. Endothelzellen, Fibroblasten, Makrophagen, Granulozyten), die dadurch zur Synthese solcher löslichen Entzündungsmediatoren angeregt werden. Dazu gehören Prostaglandine, Chemokine und Zytokine, die alle an dem weiteren Verlauf der Inflammation beteiligt sind.

Zunächst reagieren Makrophagen und Monozyten mit einer Zytokin-Synthese auf ein exogenes oder endogenes Agens. Die hierbei freigesetzten Zytokine Interleukin-6 (IL-6) und Tumornekrosefaktor-α (TNF α) aktivieren wiederum Stromazellen wie Endothelzellen und Fibroblasten, wodurch eine zweite Welle der Zytokin-Sekretion initialisiert wird [1].

In Abhängigkeit von dem Ausmaß der Schädigung und der Art der Noxe kann eine zunächst lokal begrenzte Inflammation durch den Übertritt der löslichen Mediatoren oder des auslösenden Agens in das Blut in eine systemische, den gesamten Organismus betreffende Entzündungsreaktion übergehen. Die sogenannte Akute-Phase-Reaktion (APR) bezeichnet die Gesamtheit der induzierten, multifaktoriellen und stereotypen Reaktionen des Körpers bei systemischen Entzündungsreaktionen. An ihrer Initiierung ist die zweite Welle der Zytokin-Sekretion, die vor allem von Stromazellen ausgeht, maßgeblich beteiligt [1]. Im Rahmen der APR kommt es unter anderem zur Induktion einer Leukozytose, also einer vermehrten Freisetzung von Leukozyten aus dem Knochenmark, und zur Synthese von Akute-Phase-

Proteinen in der Leber. Zentralnervös kontrollierte Krankheitssymptome wie Fieber, *Anorexie* oder *Adipsie* sind Teil der APR [2]. Eine dysregulierte Reaktion kann zu chronischen Entzündungsprozessen führen.

Eine schwere systemische Inflammation, die durch konstantes oder periodisches Eindringen pathogener, belebter Keime in den Blutstrom ausgelöst wird, wird als Sepsis bezeichnet [3]. Die Keime gelangen in der Regel über einen lokalen Infektionsherd in das Blut und führen über die zuvor genannten Mechanismen einer systemischen Inflammation zur APR. Sowohl in der Human- als auch in der Tiermedizin tritt Sepsis mit hoher Inzidenz auf [4, 5]. Die Mortalität ist hoch [4] und selbst Überlebende zeigen langfristige kognitive und psychische sowie physische Einschränkungen [6, 7].

1 „Sickness behavior“

Im Rahmen von systemischen Entzündungsreaktionen kommt es wie bereits erwähnt zu zentralnervös insbesondere im Hypothalamus regulierten Krankheitssymptomen, welche als „sickness behavior“ zusammengefasst werden und aus der Kommunikation zwischen dem Immunsystem und dem Gehirn resultieren. Wichtige Krankheitssymptome sind dabei Fieber, *Lethargie*, *Adipsie* und *Anorexie* [8], die in der vorliegenden Arbeit als physiologische Hauptzielparameter erfasst werden.

Die präoptische Region des Hypothalamus wird auf unterschiedliche Weise aktiviert und bewirkt letztendlich eine aktive Hochregulation der Körperkerntemperatur [9]. Die im Rahmen einer physiologischen Fieberreaktion auftretende hohe Körpertemperatur führt zu einer effizienteren Immunabwehr. Diese resultiert beispielsweise aus einer gesteigerten Mobilität [10] und Phagozytoseleistung [11] der Leukozyten. Außerdem reduziert diese angehobene Temperatur die Aktivität thermosensitiver Mikroorganismen [12]. So wurde in verschiedenen Versuchen bereits gezeigt, dass eine antipyretische Behandlung bei schweren Infektionen zu einer gesteigerten Mortalität führen kann [13]. Dies wurde sowohl bei ektothermen und endothermen Tieren als auch bei Menschen festgestellt [14, 15].

Aber auch die typischen Verhaltensänderungen des „sickness behaviors“ stellen keine passiv im Rahmen der Inflammation auftretenden Symptome dar, sondern unterliegen einer zentralen Regulation aufgrund einer Prioritätenverschiebung des Organismus hin zu einer Bekämpfung der Pathogene (Übersicht [12]). So wird die durch das eisenbindende Akute-Phase-Protein Ferritin bedingte Reduktion des Eisengehaltes im Blut durch die Appetitlosigkeit unterstützt. In Verbindung mit der erhöhten Körpertemperatur führt eine geringe Konzentration von freiem Eisen zu einer verminderten Wachstumsrate von Bakterien [16]. Ein zu hoher Energieverlust wird dabei durch die Apathie und die Umstellung zu einem

katabolen Stoffwechsel verhindert. So kann der stark energieaufwendige Prozess der aktiven Temperatursteigerung trotz reduzierter Nahrungsaufnahme aufrechterhalten werden. Die Krankheitssymptome des „sickness behaviors“ gehen mit einem Gewichtsverlust einher. Die Apathie und die soziale Isolation liegen ebenfalls evolutionär stark konserviert vor. Sie reduzieren eine Verbreitungsmöglichkeit infektiöser Agenzien, die Gefahr einer Exposition geschwächter Tiere gegenüber Fressfeinden und die Abgabe von Wärme durch Bewegung [12].

2 Signalwege der systemischen Entzündung

Für die Auslösung der zentralnervös kontrollierten Krankheitssymptome des „sickness behaviors“ müssen hypothalamische Kerngebiete aktiviert werden. Eine Kommunikation zwischen dem Entzündungsherd, also der Peripherie, und dem zentralen Nervensystem (ZNS) ist dafür essentiell. Es werden drei Kommunikationswege differenziert (Abbildung 1).

Der nervale Kommunikationsweg ist der schnellste und für die frühe Phase des „sickness behaviors“ verantwortlich [2]. Sensorische kutane Nerven [17, 18] und vagale Afferenzen [2, 19] werden durch lokale sekundäre Mediatoren oder die Noxe aktiviert und lösen ein Fieber aus, bevor größere Konzentrationen von zirkulierenden Zytokinen vorliegen [20]. Im Rahmen dieser Arbeit erfolgte keine Betrachtung des nervalen Kommunikationsweges zwischen der Peripherie und dem Gehirn, weshalb dieser nicht weiter beschrieben wird.

Der zelluläre Weg der Signalvermittlung geht mit einer Einwanderung von Immunzellen in das Gehirnparenchym einher [21]. Diese setzen lokal im Gehirn pro-inflammatorische Mediatoren frei, die wiederum eine Aktivierung hypothalamischer Kerngebiete bewirken und so am „sickness behavior“ beteiligt sind. Grundlage für die Leukozytendiapedese ist eine Aktivierung des Gefäßendothels, die mit einer Expression von Selektinen (z. B. E- / P- / L-Selektin) und Adhäsionsmolekülen (z. B. „intracellular adhesion molecule-1“, ICAM-1; „vascular cell adhesion molecule-1“, VCAM-1) einhergeht [22]. Es bestehen bereits Hinweise auf eine Beteiligung des Adipokins Leptin an der durch Lipopolysaccharid (LPS) induzierten Rekrutierung neutrophiler Granulozyten in das Gehirn [21, 23].

Der dritte und am längsten bekannte Kommunikationsweg zwischen der Peripherie und dem Gehirn ist die humorale Signalübertragung. Hierbei erreichen exogene und / oder endogene Pyrogene das Gehirn über das Blut und üben eine direkte Wirkung aus [24]. Da der humorale Signalweg im Rahmen dieser Arbeit im Fokus der Betrachtung stand, wird nachfolgend auf diesen genauer eingegangen.

2.1 *Der humorale Signalweg*

Als exogene Pyrogene werden körperfremde Substanzen bezeichnet, die über „pattern-recognition-receptors“ (PRRs) eine Stimulation des angeborenen Immunsystems bewirken [25] und dadurch Fieber induzieren können. Ein Beispiel für ein weitverbreitetes und experimentell häufig angewendetes exogenes Pyrogen ist LPS, ein Zellwandbestandteil gram-negativer Bakterien. Leukozyten synthetisieren als Reaktion auf die exogenen Pyrogene eine Reihe von endogenen Pyrogenen [24], die zur Gruppe der Zytokine gehören. Exogene und endogene Pyrogene werden über das Blut zum Gehirn transportiert, führen zu einer genomischen Aktivierung der neuronalen sowie glialen Zellen und lösen schlussendlich die zentralnervös kontrollierten Symptome des „sickness behaviors“, einschließlich des Prostaglandin E₂- (PGE₂) abhängigen Fiebers, aus [2].

Der bisher vereinfacht beschriebene humorale Signalweg wird durch die dichte Blut-Hirn-Schranke (BHS) limitiert. Ein direkter Kontakt von zirkulierenden Pyrogenen mit dem Gehirnparenchym ist nur im Bereich der zirkumventrikulären Organe („circum-ventricular organs“, CVOs) möglich [26]. Beim Vorliegen einer dichten BHS findet aber ebenfalls eine humorale Informationsübertragung statt. Zum einen können Endothelzellen [27] oder perivaskuläre Makrophagen [28] der BHS zur Freisetzung lipophiler Mediatoren stimuliert werden: dazu gehören die Prostaglandine (PGs), die durch Diffusion die BHS passieren und in das Gehirnparenchym übertreten können. Zum anderen ist für manche Zytokine wie beispielsweise IL-1 β , IL-6 und TNF α ein limitierter Transport durch die BHS mit Hilfe von sättigbaren, transendothelialen Transportern beschrieben worden [29].

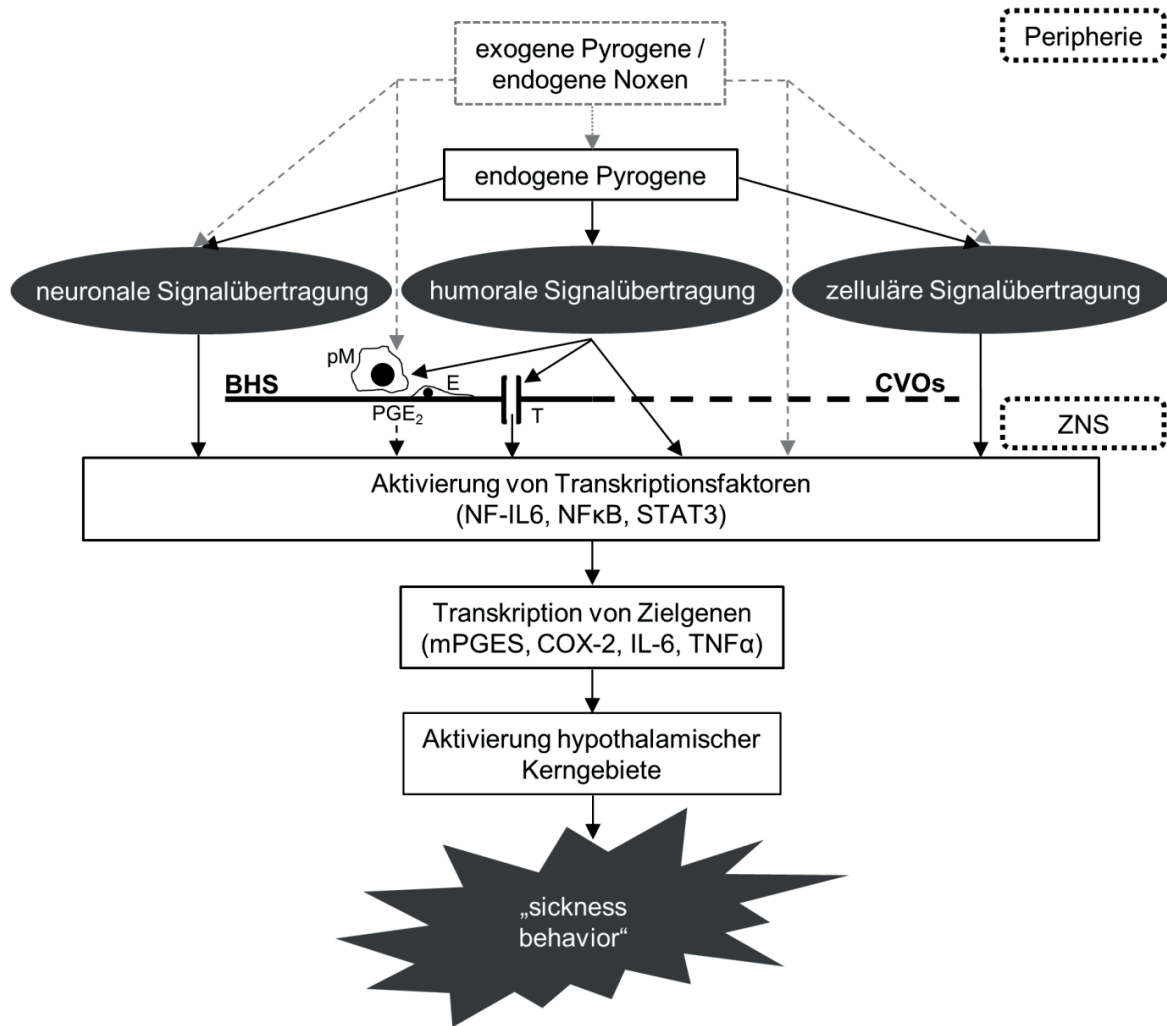


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Kommunikationswege zwischen der Peripherie und dem Gehirn

Exogene Pyrogene und endogene Noxen werden in der Peripherie von Immunzellen über „pattern recognition receptors“ detektiert. Dies führt zu einer Synthese endogener Pyrogenen, zu denen auch Zytokine gehören. Das Signal des Immunsystems kann über einen neuronalen, einen humoralen oder einen zellulären Signalweg an das Gehirn übertragen werden. Bei dem neuronalen Signalweg werden vagale Afferenzen oder sensorische kutane Nerven durch die sekundären Metaboliten oder die primären Noxen in der Peripherie erregt und übertragen das Signal an Kernregionen des Hirnstammes. Von dort wird das Signal über sekundäre Projektionen an hypothalamische Kerngebiete weitergeleitet. Die zelluläre Signalübertragung geht mit einer Einwanderung von Immunzellen in das Gehirnparenchym einher. So erfolgt lokal im Gehirnparenchym eine Synthese sekundärer Mediatoren durch eingewanderte Zellen wie neutrophile Granulozyten. Der humorale Signalweg beschreibt die Signalübertragung zwischen Peripherie und Gehirn durch zirkulierende Mediatoren. Über das Blut können sowohl exogene Pyrogene oder primäre endogene Noxen als auch endogene Pyrogene das Gehirn erreichen. Ein direkter Übertritt ist im Bereich der zirkumventrikulären Organe (CVOs) möglich, da diese eine undichte Blut-Hirn Schranke (BHS) aufweisen. Durch die dichte BHS im übrigen Gehirnparenchym wird der Übertritt zirkulierender Substanzen limitiert. Dennoch kann eine humorale Signalübertragung erfolgen. Zum einen können zirkulierende Zytokine mit perivaskulären Makrophagen (pM) oder Endothelzellen (E) in Kontakt treten und diese zur Synthese lipophiler Botenstoffe wie Prostaglandin E₂ (PGE₂) veranlassen. Diese können anschließend durch die BHS diffundieren. Zum anderen sind für verschiedene Zytokine spezifische Transporter (T) bekannt. Im Gehirn bewirken die Signale aus der Peripherie eine Aktivierung von Transkriptionsfaktoren und so eine Transkription von Zielgenen in verschiedenen Gehirngebieten. Durch diese lokale Bildung von Mediatoren wie Zytokinen und Prostaglandinen werden hypothalamische Kerngebiete aktiviert und ebenfalls zur Transkription veranlasst (nicht dargestellt). Hieraus resultiert das „sickness behavior“.

2.1.1 Zirkumventrikuläre Organe

Die CVOs sind zentrale neuronale Strukturen, die sich in unmittelbarer Nähe zu den Ventrikeln befinden (Abbildung 2). Sie sind stark vaskularisiert und zeichnen sich durch ein fenestriertes Endothel aus [30]. So können auch große und hydrophile Moleküle aus dem Blut direkt mit dem Parenchym der CVOs in Kontakt treten. Um aber einen unkontrollierten Übertritt der Mediatoren in das angrenzende Gehirnparenchym zu verhindern, sind die CVOs durch Tanyzyten vom umgebenden Gewebe abgegrenzt. Bei den Tanyzyten handelt es sich um spezialisierte Gliazellen, welche über „tight-junctions“ miteinander verbunden sind und so eine Barriere bilden [31]. Es wird zwischen den sekretorischen CVOs (*Eminentia mediana* [„median eminence“, ME], *Glandula pinealis* [„pineal gland“, PIN, Epiphyse], *Organum subcommissurale* [„subcommissural organ“, SCO], Neurohypophyse [„neural lobe of the pituitary“, NL]) und den sensorischen zirkumventrikulären Organen („sensory circumventricular organs“, sCVOs) (*Organum vasculosum laminae terminalis* [OVLT], *Organum subfornicale* [„subfornical organ“, SFO], *Area postrema* [AP]) differenziert.

Sensorische zirkumventrikuläre Organe sind definiert als CVOs, in denen neben Gliazellen, Dendriten und Axonen auch neuronale Zellkörper vorhanden sind [26, 32]. Die sCVOs zeichnen sich also im Gegensatz zu den sekretorischen CVOs dadurch aus, dass sie über die Neurone Informationen in das Gehirnparenchym weiterleiten können. Sie sind maßgeblich an der Homöostase des Wasser- und Salzhaushaltes, des Energiehaushaltes und der kardiovaskulären Funktionen, sowie an der Detektion emetischer Substanzen beteiligt.

Ebenso deuten viele bisher gewonnene Erkenntnisse auf eine direkte Beteiligung der sCVOs im Rahmen der Signalübertragung zwischen Immunsystem und Gehirn hin. So konnte eine bidirektionale neuronale Verbindung der einzelnen sCVOs mit hypothalamischen Kerngebieten der präoptischen Region nachgewiesen werden [30]. In den sCVOs werden Rezeptoren für die Zytokine TNF α , IL-1 β und IL-6 exprimiert [26]. Des Weiteren sind auch Rezeptoren für exogene Pyrogene in den sCVOs vorhanden. Es liegt in den sCVOs beispielsweise eine konstitutive Expression von „toll-like“ Rezeptor-4 (TLR4), dem Rezeptor für LPS, vor [33]. Eine funktionelle Bedeutung dieser Rezeptoren wurde bereits in verschiedenen Versuchen belegt. So geht eine Exposition mit LPS *in vitro* [34, 35] und *in vivo* [36, 37] mit einer Expression pro-inflammatorischer Zytokine in den sCVOs einher. Auch Zytokine führen zu einer direkten Zellaktivierung der sCVOs [34, 38]. Aus derartigen Hinweisen lässt sich ableiten, dass Zellen der sCVOs direkt durch zirkulierende exogene und endogene Pyrogene sowie durch lokal in den sCVOs synthetisierte Pyrogene aktiviert und anschließend die Informationen an hypothalamische Kerngebiete weitergeleitet werden.

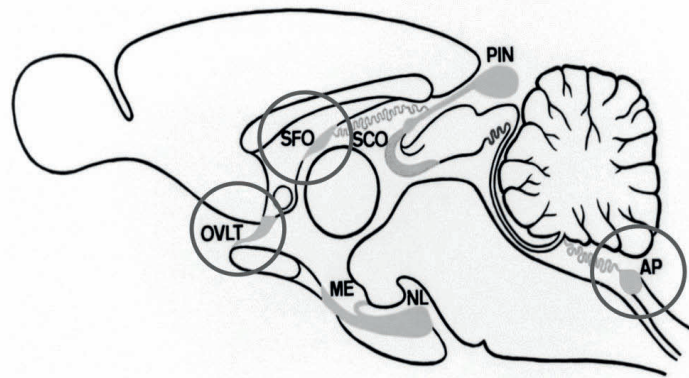


Abbildung 2: Schematische Darstellung der anatomischen Lage zirkumventrikulärer Organe im Sagittalschnitt des Rattengehirnes

Die CVOs der Ratte werden in grau dargestellt und die sensorischen CVOs sind durch einen zusätzlichen roten Kreis markiert. Es handelt sich um das *Organum vasculosum laminae terminalis* (OVL), das *Organum subfornicale* (SFO) und die *Area postrema* (AP). Zu den sekretorischen CVOs gehören die *Eminentia mediana* (ME), die *Glandula pinealis* (PIN, Epiphyse), das *Organum subcommissurale* (SCO) und Neurohypophyse (NL). (Modifiziert nach [2]).

Die besondere Bedeutung der Area postrema

Im Rahmen dieser Arbeit lag ein besonderes Augenmerk auf der Responsivität der AP. Die AP befindet sich als membranartige Struktur auf der dorsalen Oberfläche der *Medulla oblongata*. Sie ist in unmittelbarer Nähe zum *Nucleus tractus solitarius* (NTS) lokalisiert [30]. Die AP ist ein Bestandteil des dorsalen-vagalen-motorischen Komplexes, der viszerosensorische und autonom regulierende Funktionen übernimmt [26]. Bei Ratte und Maus ist die AP einfach angelegt, hingegen liegt sie bei vielen höheren Säugetieren wie Kaninchen und Primaten bilateral vor [39]. Aufgrund der Verteilung unterschiedlicher Zellpopulationen werden bei Nagern innerhalb der AP drei Regionen differenziert. Die dorsale perivaskuläre Mantelzone und die Zentralzone enthalten hauptsächlich neuronale Zellkörper und Axone. In der Ventralzone sind hingegen vornehmlich Gliazellen lokalisiert [30, 39].

Die AP war in dieser Arbeit von besonderem Interesse, da sie als Schnittstelle des humoralen und nervalen Kommunikationsweges zwischen Peripherie und Gehirn betrachtet werden kann. Sie enthält unter anderem über vagale Afferenzen [39-41] neuronal übertragene Informationen aus der Peripherie. Als sCVO dient diese Gehirnstruktur ebenfalls der Detektion humoraler Mediatoren aus dem Blut und einer Informationsübertragung an hypothalamische Kerngebiete.

2.1.2 Inflammatorische Mediatoren

2.1.2.1 Transkriptionsfaktoren

Einige Transkriptionsfaktoren werden für die Initiation der Ribonukleinsäure („ribonucleic acid“, RNA)-Polymerase und damit für die Transkription verschiedener Zielgene benötigt. Andere verändern auf unterschiedlichste Weise die Expression mit hemmender oder stimulierender Wirkung.

Exogene und endogene Pyrogene lösen durch die Bindung an ihre Rezeptoren eine intrazelluläre Signalkaskade aus, die zur Aktivierung von Transkriptionsfaktoren führt. Die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren geht beispielweise innerhalb kürzester Zeit mit einer Translokation in den Zellkern einher. Dort binden sie entweder direkt an die Desoxyribonukleinsäure („deoxyribonucleic acid“, DNA) oder an regulatorische DNA-bindende Elemente bzw. andere Transkriptionsfaktoren. In beiden Fällen kann die Transkription verschiedener Zielgene induziert werden, was als genomische Aktivierung der Zelle bezeichnet wird. Im Rahmen von systemischen Entzündungsreaktionen, die mit einer peripheren und zentralen genomischen Aktivierung verschiedener Zelltypen einhergehen, sind die Transkriptionsfaktoren „nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells“ (NFκB), „signal transducer and activator of transcription 3“ (STAT3) und „nuclear factor interleukin-6“ (NF-IL6) von besonderer Bedeutung [42]. Im ZNS findet eine zeitabhängige Aktivierung dieser Transkriptionsfaktoren statt [42]. NFκB ist dabei der erste Transkriptionsfaktor, der im ZNS aktiviert wird [43]. Darauf folgt eine Aktivierung von STAT3 [44] und erst im etwas späteren Verlauf der systemischen Entzündung liegt eine NF-IL6-Aktivierung im Gehirn vor [45].

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die immunzytochemische Detektion einer Akkumulation im Zellkern als Hinweis für eine genomische Aktivierung der Zelle verwendet. Außerdem wurde die Expression der Transkriptionsfaktoren bzw. ihrer spezifischen Inhibitoren als Aktivitätsmarker herangezogen. Nachfolgend wird auf die betrachteten Transkriptionsfaktoren genauer eingegangen.

NF-IL6

Der Transkriptionsfaktor NF-IL6 erhielt ursprünglich seinen Namen aufgrund seiner Beteiligung an der Expression von IL-6 [46]. Allerdings sind heute weitere Zielgene bekannt. Da NF-IL6 zur Gruppe der „CCAAT/enhancer binding proteins“ gehört, wird die Bezeichnung C/EBPβ in der Literatur synonym verwendet. Eine NF-IL6-Expression konnte bereits in vielen Geweben nachgewiesen werden. Im Gehirn exprimieren Neurone, Astrozyten, Mikrogliazellen, Endothelzellen sowie perivaskuläre Makrophagen NF-IL6 [45, 47, 48].

Neben der im Rahmen dieser Arbeit wichtigen Funktion als inflammatorischer Transkriptionsfaktor ist NF-IL6 beispielsweise auch an der Zellproliferation und -differenzierung, dem Glukose- und Fettstoffwechsel und der Bildung des Langzeitgedächtnisses beteiligt [49, 50]. Bei einer Inflammation durch verschiedene Pathogen-assoziierte Molekülstrukturen („pathogen-associated molecular patterns“, PAMPs) ist eine NF-IL6-Aktivierung im Gehirn nachweisbar [45, 48, 51, 52]. Sie geht mit einer Dimerisierung der phosphorylierten NF-IL6-Monomere einher. Die dafür notwendige intrazelluläre Signalkaskade wird unter anderem durch Zytokine wie IL-1 β oder TNF α initiiert [42, 53]. Zu den transkribierten Zielgenen gehören die mikrosomale Prostaglandin E-Synthase (mPGES) [54, 55] und Zytokine wie IL-1 β [56], IL-6 [46] und TNF α [57]. Die Cyclooxygenase-2 (COX-2) stellt, ebenso wie die mPGES, ein geschwindigkeitsbestimmendes Enzym der Prostaglandin-Synthese dar. Über eine direkte NF-IL6-Abhängigkeit der Expression von COX-2 liegen allerdings kontroverse Ergebnisse vor. So erfolgte bei Abwesenheit von NF-IL6 *in vivo* und *in vitro* eine unveränderte COX-2-Expression [54, 58]. Dennoch ist auf dem COX-2-Promotor eine Bindungsstelle für NF-IL6 nachweisbar [59]. NF-IL6 beeinflusst auch die Aktivität der Transkriptionsfaktoren NF κ B und STAT3. Beispielsweise indem die Expression von „suppressor of cytokine signaling 3“ (SOCS3) induziert [60] und von „inhibitor of κ B α “ (I κ B α) gehemmt wird [61].

NF κ B und I κ B α

Der Transkriptionsfaktor NF κ B besteht aus den Untereinheiten p50 und p65 und liegt als Homo- oder Heterodimer vor. In ruhenden Zellen geht I κ B α eine Komplexbildung mit den Dimeren ein, wodurch eine Translokation in den Zellkern verhindert wird [62]. Durch viele TLR-Agonisten wie LPS oder auch durch pro-inflammatorische Zytokine wie TNF α und IL-1 β wird eine intrazelluläre Signalkaskade aktiviert [42, 63], die mit einer Phosphorylierung von I κ B α einhergeht. Phosphoryliertes I κ B α löst sich von dem NF κ B-Dimer, wird polyubiquitiniert und anschließend im Proteasom abgebaut [64]. Als freies Dimer kann NF κ B in den Zellkern translozieren und dort die Transkription verschiedener Zielgene induzieren.

Als wichtiger Transkriptionsfaktor im Rahmen der systemischen Entzündung ist NF κ B essentiell für die Entwicklung von LPS-induziertem Fiebers [65, 66] und von IL-1 β -induziertem „sickness behavior“ [67]. Zu den Zielgenen gehören eine Reihe von pro-inflammatorischen Mediatoren wie Adhäsionsmoleküle, Zytokine und die für die Prostaglandin-Synthese benötigte COX-2 [63, 68]. Aber auch die Transkription von anti-inflammatorischen Faktoren wird durch NF κ B induziert [69]. So bewirkt NF κ B im Sinne einer Autoregulation die Transkription seines negativen Regulators I κ B α [70, 71]. Dadurch ist

die NFκB-Aktivität selbstlimitierend und die Expression von IκBα kann als Hinweis für die NFκB-Aktivität herangezogen werden.

STAT3 und SOCS3

STAT3 ist von sieben Mitgliedern der STAT-Familie der am weitesten verbreitete Transkriptionsfaktor [72]. STAT3 liegt in der inaktiven Zelle als Monomer hauptsächlich im Zytoplasma vor; es wurde aber auch in ruhenden Zellen intranukleäres STAT3 nachgewiesen [72]. Eine Aktivierung von STAT3 erfolgt unter anderem durch Zytokine wie IL-6 und IL-10 [73]. Durch eine Bindung der aktivierenden Moleküle an ihren Rezeptor erfolgt eine Phosphorylierung der STAT3-Monomere durch die rezeptorassoziierte Januskinase (JAK). Die phosphorylierten STAT3-Moleküle schließen sich zu Homodimeren zusammen oder gehen eine heterodimere Verbindung mit anderen Transkriptionsfaktoren der STAT-Familie ein [74, 75]. Die Dimere translozieren in den Zellkern und bewirken dort die Transkription verschiedener Zielgene [75]. Zu diesen gehören unter anderem Zytokine wie IL-6 und TNFα [76, 77]; aber auch die mPGES stellt ein wichtiges Zielgen von STAT3 dar [78]. Die Expression von COX-2 wird ebenfalls durch STAT3 reguliert [79, 80]. Allerdings war auf dem COX-2-Promotor bisher keine Bindungsstelle für STAT3 nachweisbar [59]. Es wird hierbei von einem indirekten Effekt durch andere Transkriptionsfaktoren ausgegangen [79].

Ähnlich wie NFκB induziert auch STAT3 die Transkription seines eigenen negativen Regulators, dem SOCS3 [81]. Dies ist ein Inhibitor der JAK [81, 82]. SOCS3 verhindert die Phosphorylierung der intrazellulär vorliegenden STAT3-Moleküle und damit die intranukleäre Translokation. Die Expression von SOCS3 kann als Hinweis auf die STAT3-Aktivität verwendet werden [79, 83, 84].

2.1.2.2 Zytokine

Bei Zytokinen handelt es sich um relativ große, stark induzierbare, hydrophile Proteine, Glykoproteine und Polypeptide. Sie können auf die synthetisierende Zelle selbst einwirken (autokrin), aber auch benachbarte Zellen beeinflussen (parakrin) oder über den Blutstrom eine systemische Wirkung entfalten (endokrin). Unter physiologischen Bedingungen sind die Plasmakonzentrationen sehr gering und liegen für viele Zytokine unterhalb der Nachweisgrenze [85]. Verschiedene infektiöse, inflammatorische oder anderweitig bedingte Krankheitszustände führen aber zu einem sehr schnellen und starken Anstieg der Zytokin-Konzentration im Blut [85-87]. Dabei erfolgt die Induktion nach einer programmierten Reihenfolge, die als „Zytokin-Kaskade“ bezeichnet wird und unter anderem durch eine wechselseitige Beeinflussung der Zytokine bedingt ist [2]. Es findet eine induzierte *de novo* Synthese und ein relativ schneller Abbau der synthetisierten Zytokine statt, wodurch eine

eingeschränkte Wirkdauer besteht. Dadurch erklärt sich auch, warum die Konzentration der meisten Zytokine unter Basalbedingungen im Blut unterhalb der Nachweisgrenze liegt. Im ZNS konnte eine Expression von Zytokinen und ihrer Rezeptoren in Endothelzellen sowie glialen und neuronalen Zellen nachgewiesen werden [87, 88]. Dies ist eine Grundvoraussetzung für die zuvor beschriebene Hypothese der humoralen Signalübertragung. Dabei führen Zytokine zu einer Stimulation von Transkriptionsfaktoren in Gehirnzellen, stellen aber auch wichtige Zielgene der Transkriptionsfaktoren dar.

Bei einer Infektion mit gram-negativen Bakterien sind TNF α , IL-1 β und IL-6 die wichtigsten pro-inflammatorischen Zytokine [2, 85, 89]. Es werden aber auch anti-inflammatorische Zytokine im Laufe der Entzündung synthetisiert [90]. Sie dienen der Gegenregulation von Entzündungsreaktionen, sind aber in der hier vorliegenden Arbeit nicht untersucht worden. TNF α ist nach einer Stimulation mit LPS als erstes Zytokin im Blut nachweisbar, gefolgt von einem geringeren Anstieg der IL-1 β -Konzentration und einer höheren Steigerung der IL-6-Konzentration [89, 91]. TNF α und IL-1 β können sowohl die Synthese und Freisetzung von IL-6 induzieren [92, 93] als auch ihre gegenseitige Synthese bewirken [94, 95]. IL-6 führt hingegen nicht zu einer gesteigerten Freisetzung von TNF α oder IL-1 β ; es hemmt sogar die Freisetzung dieser Zytokine [96].

Da unterschiedliche Zelltypen die gleichen Zytokine synthetisieren, ein Zytokin verschiedenartige Wirkungen auslösen kann (Pleiotropie) und auf der anderen Seite gleiche oder überlappende Wirkungen durch unterschiedliche Zytokine induziert werden können (Redundanz) [97], ist die Erforschung der Zytokinwirkungen erschwert und eine funktionelle Gruppierung nur eingeschränkt möglich. Nachfolgend wird eine kurze Charakterisierung der Zytokine TNF α , IL-1 β und IL-6 vorgenommen, da diese auch im Rahmen der vorliegenden Arbeit als Hinweis auf Entzündungsreaktionen herangezogen wurden und für die Entstehung des „sickness behaviors“ von entscheidender Bedeutung sind.

TNF α

TNF α wird unter anderem von Makrophagen, Mastzellen, T-Lymphozyten und natürlichen Killerzellen (NK) freigesetzt [98-100]. Auch im ZNS konnte eine Synthese von TNF α nachgewiesen werden [88]. TNF α kann seine Wirkung über zwei unterschiedliche Rezeptoren entfalten, die nur in ihrer extrazellulären Domäne identisch sind und demnach unterschiedliche Signalkaskaden auslösen [101]. Der TNF-Rezeptor Typ I (TNFR-I, p55) wird konstitutiv in vielen Geweben exprimiert, wohingegen eine stark regulierte Expression von TNFR-II (p75) vorliegt, welche insbesondere in immunologischen Zellen zu finden ist [102]. Eine Bindung von TNF α an den TNFR-I (p55) führt zu einer NF κ B-Aktivierung und so zu einer Transkription von pro-inflammatorischen Mediatoren [103]. Hingegen werden TNFR-II

von vielen Autoren eher anti-inflammatorische und neuroprotektive Wirkungen zugesprochen [104], die ebenfalls über eine Aktivierung von NFκB oder anderen Transkriptionsfaktoren vermittelt werden. Aufgrund der pleiotropen Funktion liegen kontroverse Ergebnisse zur Wirkung von TNFα vor. Es konnte gezeigt werden, dass eine systemische Applikation zu einer Auslösung von Fieber führt [94, 105]. Durch eine Blockade der TNFα-Bioaktivität wurde jedoch lediglich die späte Fieberphase gehemmt [106, 107]. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde TNFα eine Bedeutung für die Aufrechterhaltung von Fieber zugesprochen und weniger für die Initiierung [2]. Hingegen führte bei den Versuchen von Long *et al.* (1990) die Neutralisierung von TNFα zu einem verstärkten LPS-induzierten Fieber [108]. Die bei der Anwendung einer septischen LPS-Dosis auftretende Hypothermie konnte durch die Neutralisation von TNFα verkürzt werden. Außerdem entwickelten die Ratten bei diesem Versuch ebenfalls ein stärkeres Fieber [109]. Dem Zytokin TNFα werden demzufolge sowohl pyrogene als auch antipyrogene Wirkungen zugesprochen [87], die abhängig von der Entzündungsphase und dem zugrunde liegenden Stimulus ausgelöst werden. TNFα gilt außerdem als Mediator für krankheitsbedingte Kachexie [110]. Auch eine Bedeutung für die Entstehung von Anorexie als Teil des „sickness behaviors“ wird diskutiert.

IL-1β

Es sind drei Mitglieder der IL-1-Familie bekannt: zwei Agonisten (IL-1α, IL-1β) und ein IL-1 Rezeptor Antagonist (IL-1ra). IL-1α und IL-1β binden an die gleichen Rezeptoren und lösen bei einer peripheren Applikation beide ein vergleichbares Fieber aus [111, 112]. Doch für die Induktion der APR und des resultierenden Fiebers scheint IL-1β von besonderer Bedeutung zu sein [111]. IL-1β ist im Rahmen von systemischen LPS-induzierten Entzündungen verzögert zu TNFα im Blut nachweisbar, allerdings in einer deutlich geringeren Konzentration [89]. IL-1β wird von verschiedenen Zelltypen als Pro-Protein synthetisiert, dazu gehören unter anderem Makrophagen, neutrophile Granulozyten, Endothelzellen, Epithelzellen, aber auch Mikrogliazellen sowie perivaskuläre und perimeningeale Makrophagen [88, 113]. Das „IL-1 converting enzyme“ bewirkt im Anschluss eine Spaltung des IL-1β Pro-Proteins in seine aktive Form [111, 114]. Es sind drei Rezeptoren für IL-1 bekannt; allerdings erfolgt nach Bindung an den IL-1 Rezeptor Typ II (IL-1RII) keine Aktivierung der intrazellulären Signalkaskade [115, 116]. Eine Bindung von IL-1 an den IL-1RI führt hingegen zu einer intranukleären Translokation von NFκB und damit zur Transkription verschiedener Zielgene [87, 117] wie beispielsweise der Gene für TNFα oder IL-6. LPS stimuliert nicht nur die Expression von IL-1 und seinem Antagonisten IL-1ra, sondern bedingt in Monozyten auch eine gesteigerte Expression von IL-1RI und eine reduzierte IL-1RII Expression [118]. Der IL-1RIII wird vornehmlich im ZNS exprimiert. Dessen Bindung initiiert eine schnelle,

NFκB-unabhängige Signalkaskade, die zur Aktivierung von Neuronen führt [119]. Eine Neutralisation von IL-1β reduziert LPS-induziertes Fieber, insbesondere in der späten Fieberphase [120-122]. IL-1β scheint also, ebenso wie TNFα, an der Aufrechterhaltung von Fieber und weniger an dessen Initiierung beteiligt zu sein [2].

IL-6

NK, Monozyten, Fibroblasten, Endothelzellen, Gliazellen und Neurone sind nur einige der Zellen, die IL-6 synthetisieren [88, 123, 124]. IL-6 entfaltet seine Wirkung über den membrangebundenen IL-6-Rezeptor, der durch eine Aktivierung der JAK-Kaskade die STAT3-Monomere phosphoryliert und eine nukleäre Translokation von entstehenden STAT3-Dimeren bewirkt [125]. Der Konzentrationsanstieg von IL-6 im Plasma korreliert mit der ansteigenden Körperkerntemperatur [126, 127] sowie der höchsten Immunreaktivität von STAT3 [18, 128]. Allerdings steigt die LPS-induzierte IL-6-Konzentration im Plasma erst verzögert nach der Initiierung des Fiebers an. IL-6 wird gemeinsam mit IL-1β als eines der wichtigsten endogenen Pyrogene in Betracht gezogen [87]. Bei einer peripheren Injektion weist IL-6 interessanterweise lediglich eine geringe pyrogene Aktivität auf [79, 126, 129, 130]. Eine zentrale Injektion löst hingegen auch bei geringeren IL-6-Konzentrationen Fieber aus [126, 129]. Für eine essentielle pyrogene Wirkung spricht ebenfalls, dass eine Neutralisation von IL-6 [79, 131, 132] sowie dessen Abwesenheit in entsprechend defizienten Mäusen [133] die Entstehung von LPS-induziertem Fieber vollständig verhindert. In kürzlich durchgeführten Studien konnte durch zelltypspezifische genetische Veränderungen von Mäusen die Bedeutung von IL-6 als zirkulierendes endogenes Pyrogen, das eine STAT3-Aktivierung und eine Induktion der COX-2-Expression in Endothelzellen des Gehirns bewirkt, bestätigt werden [80, 134]. Die beschriebenen Ergebnisse deuten darauf hin, dass IL-6 seine Wirkung im Rahmen der systemischen Entzündungsreaktion hauptsächlich im Gehirn und weniger in der Peripherie zu entfalten scheint [2].

2.1.2.3 Eicosanoide

Eicosanoide sind hydrophobe Lipidmediatoren, die aus mehrfach ungesättigten Fettsäuren („polyunsaturated fatty acids“, PUFAs) synthetisiert werden. Dabei konkurriert die ω-6-Fettsäure (FS) Arachidonsäure („arachidonic acid“, AA) mit der ω-3-FS Eicosapentaensäure („eicosapentaenoic acid“, EPA) um die gleichen Enzymsysteme [135, 136]. AA und EPA werden durch die Phospholipase A₂ (PLA₂) aus der Zellmembran freigesetzt und anschließend durch eine Cyclooxygenase oder eine Lipoxygenase (LOX) zu Eicosanoiden umgebaut (Abbildung 4). Für die Bereitstellung von AA wurde im Gehirn außerdem ein PLA₂-unabhängiger Weg identifiziert. Bei diesem ist die Monoacylglycerol-

Lipase von entscheidender Bedeutung [137]. Die Eicosanoide der AA weisen vorwiegend pro-inflammatorische Eigenschaften auf. Hingegen werden den Eicosanoiden der EPA weniger pro-inflammatorische und teilweise sogar anti-inflammatorische Wirkungen zugesprochen [138]. Auch die ω -3-FS Docosahexaensäure („docosahexaenoic acid“, DHA) konkurriert um die gleichen Enzymsysteme. Die dabei entstehenden Docosanoide werden in Kapitel ID1 genauer beschrieben.

Während einer Entzündung liegt eine gesteigerte Expression der induzierbaren Enzyme COX-2 und mPGES vor [139]. Die angehobene COX-2-Expression geht mit einer gesteigerten Synthese von pro-inflammatorischen Eicosanoiden der AA (Prostaglandine der 2-er Serie, Leukotriene der 4er-Serie, Thromboxane und Prostazykline) einher. Die Synthese von PGE₂ wird dadurch stärker induziert als die Bildung anderer Prostaglandine [139].

Die erhöhte Expression der Zielgene COX-2 und mPGES wird allgemein als Hinweis auf eine Inflammation mit PGE₂-Synthese betrachtet. Die induzierbare Expression von COX-2 ist dabei auch an der Fieberentstehung beteiligt [140]. COX-1 wird hingegen konstitutiv exprimiert und unter anderem für LPS-induzierte Hypothermie verantwortlich gemacht [140]. In der vorliegenden Arbeit wurde die Expression von COX-1, COX-2 und mPGES nach einer LPS-induzierten Inflammation in Wildtyp (WT) und Fat-1 Mäusen analysiert (siehe Kapitel IVD2.3).

Außerdem wurde untersucht, ob Zellen der AP-Primärkulturen als Reaktion auf einen bakteriellen oder sterilen inflammatorischen Stimulus Lipidmediatoren freisetzen (siehe Kapitel IVB). Die dabei analysierten Eicosanoide (PGE₂, PGD₂, PGJ₂, Leukotrien B₄) werden nachfolgend beschrieben.

Prostaglandin E₂

Nach der Freisetzung von AA aus der Zellmembran wird diese über COX zu PGH₂ metabolisiert. Dieses bildet die Ausgangssubstanz für die Synthese der Prostaglandine [141] und wird durch die mPGES zu PGE₂ umgesetzt. Die konstitutiv exprimierte COX-1 liegt vor allem in Assoziation mit der zytoplasmatischen PGES („cytoplasmatic pGES“, cPGES) im Bereich des Endoplasmatischen Retikulums vor [142]. Die Expression der COX-1 wird durch inflammatorische Stimuli nicht gesteigert. Generell scheint ihre Expression nur schwach regulierbar zu sein [143]. Der COX-1 wird gemeinsam mit der cPGES eine Bedeutung für die basale PGE₂-Synthese zugesprochen [144]. Die bei Entzündungsreaktionen überexprimierten Enzyme COX-2 und mPGES befinden sich insbesondere im perinukleären Bereich [142].

Prostaglandin E₂ kann seine Wirkung durch die Bindung an vier verschiedene Rezeptor-Subtypen entfalten [145]. Es sind G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, die in unterschiedliche Signalkaskaden münden und darüber vermutlich die vielseitigen Wirkungen von PGE₂ bedingen. Neben seiner Bedeutung als pro-inflammatorischer Mediator ist PGE₂ auch an einer Reihe physiologischer Funktionen beteiligt. So schützt PGE₂ beispielsweise die Magenschleimhaut und verbessert die Durchblutung der Niere.

PGE₂ ist maßgeblich an den Kardinalsymptomen der Entzündung beteiligt. Für die Entstehung von Fieber ist PGE₂ der wichtigste nachgeschaltete Mediator [87, 143]. Dies ergibt sich aus den Ergebnissen vieler Studien. Einige werden nachfolgend zusammengefasst. Eine zentrale Injektion von PGE₂ in den dritten Ventrikel [146] oder die präoptische Region des Hypothalamus [147] bewirkt eine Fieberinduktion. Zentrale Mikroinjektionen in andere Bereiche des Gehirns führen hingegen nicht zur Auslösung von Fieber, was die Bedeutung der präoptischen Region als pyrogene Zone unterstützt [148, 149]. Außerdem kann LPS-induziertes Fieber bei der Anwendung von COX-Hemmern [150-152] sowie bei COX-2- [153, 154] oder mPGES-defizienten Mäusen [155] nicht induziert werden. In der Peripherie stellen Kupfer-Zellen der Leber einen wichtigen Syntheseort von PGE₂ dar. So führte eine Depletion der Kupfer Zellen zu einer reduzierten PGE₂-Konzentration im Plasma und verhinderte das LPS-induzierte Fieber [91]. Plasma PGE₂ spielt wahrscheinlich vor allem bei der Initiierung von Fieber eine wichtige Rolle. Das im Gehirn vorkommende PGE₂ wird allerdings vermutlich lokal im Gehirn synthetisiert [2]. Während eines Fieberzustandes konnte in Endothelzellen, perivaskulären Makrophagen und perivaskulären Mikrogliazellen bereits eine Synthese von COX-2 und mPGES nachgewiesen werden [28, 79, 156, 157]. Durch eine spezifische Deletion von COX-2 und mPGES in Endothelzellen des Gehirns [158] sowie von mPGES in nicht-hämatopoetischen Zellen [156] wird Fieber gehemmt.

Prostaglandin D₂

Die Synthese von Prostaglandin D₂ geht ebenfalls mit einer AA-Freisetzung aus der Zellmembran und einer COX-abhängigen Metabolisierung der freigesetzten AA zu PGH₂ einher. PGH₂ wird anschließend durch die PGD-Synthase zu PGD₂ umgebaut [139]. Von der PGD-Synthase sind zwei Subtypen bekannt: der hämatopoetische- und der lipocalin-Typ [159, 160]. Die beiden PGD-Synthasen unterscheiden sich auf vielfältige Weise, nämlich in ihrer Aminosäuresequenz, der Tertiärstruktur, ihrer Verteilung im Gewebe und auch in ihrer immunologischen Bedeutung. Die PGD-Synthase vom hämatopoetischen Typ („hematopoietic PGD synthase“, H-PGDS) befindet sich in Antigen-präsentierenden Zellen, Mastzellen und Megakaryozyten in verschiedenen Geweben [160]. Aufgrund ihres

Verteilungsmusters ergibt sich eine Bedeutung der H-PGDS für die PGD₂-Synthese im Rahmen von allergischen Reaktionen und allergischen Erkrankungen [160, 161]. Die PGD-Synthase vom lipocalin Typ („lipocalin-type PGD synthase“, L-PGDS) scheint hingegen für die PGD₂-Synthese im Gehirn hauptverantwortlich zu sein [162]. Ihre Expression wurde allerdings auch in weiteren Geweben wie Herz, Niere und Lunge nachgewiesen [160, 163, 164]. Interessanterweise führte eine LPS-bedingte Entzündungsreaktion in Makrophagen *in vitro* und *in vivo* zu einer erhöhten Expression von L-PGDS. Demgegenüber deuteten die Ergebnisse auf eine konstitutive Expression von H-PGDS hin [164].

Für die Bindung von PGD₂ sind zwei G-Protein gekoppelte Rezeptoren bekannt, die über unterschiedliche intrazelluläre Signalkaskaden zu einer Zellaktivierung führen [165, 166]. PGD₂ bindet mit einer höheren Affinität an den „PGD₂ receptor 1“ (DP1) als an den DP2 [167]. PGD₂ galt lange als unbedeutend und sogar biologisch inaktiv. Heute sind eine Vielzahl regulatorischer Funktionen sowie pro- und anti-inflammatorische Eigenschaften von PGD₂ bekannt [160]. Im Gehirn stellt PGD₂ unter physiologischen Bedingungen sogar das hauptsächlich vorkommende Prostaglandin dar [168]. Eine Beteiligung an der Regulation des Schlaf-Wach-Rhythmus, der Modulation von Geruchs- und Schmerzempfindungen, der Freisetzung verschiedener Hormone und ein Einfluss auf die Thermoregulation werden postuliert [160]. In der Peripherie ist PGD₂ hauptsächlich als Mediator bei allergischen Prozessen von Bedeutung [169]. Es induziert beispielsweise eine Vasodilatation und eine Bronchokonstriktion [160]. Allgemein ist festzuhalten, dass PGD₂ sowohl pro- als auch anti-inflammatorische Eigenschaften aufweist, die in Abhängigkeit des Krankheitsverlaufes und der Ätiologie unterschiedlich stark ausgeprägt sind [160]. In wie weit die anti-inflammatorischen Eigenschaften durch 15d-Prostaglandin J₂, das nicht-enzymatisch aus PGD₂ entsteht, ausgelöst werden, ist noch nicht vollständig geklärt.

Prostaglandin J₂

PGJ₂ entsteht durch Dehydratisierung aus PGD₂ und kann im weiteren Verlauf spontan zu 15-deoxy-Δ^{12,14}-PGJ₂ (15d-PGJ₂) dehydratisieren oder Albumin-abhängig zu Δ¹²-PGJ₂ umgebaut werden [170]. Die Eigenwirkung von PGJ₂ wurde bisher nicht hinreichend untersucht. Zur anti-inflammatorischen Aktivität seines Metaboliten 15d-PGJ₂ liegen hingegen viele Ergebnisse vor.

Es ist mittlerweile bekannt, dass die Beendigung von Entzündungen kein passiver Prozess ist, sondern auf aktiven Mechanismen beruht. Auf die „specialized pro-resolving lipid mediators“ (SPMs), die hauptsächlich aus ω-3-FS synthetisiert werden, wird in den Kapiteln ID2 und ID3 genauer eingegangen. Es werden aber auch den Mitgliedern der PGJ₂-Familie entzündungsauflösenden Eigenschaften zugesprochen [171, 172], die aufgrund ihres

Syntheseweges über PGH_2 und PGD_2 verzögert zur Entzündungsinduktion auftreten. Diese Hypothese wird durch die biphasische Wirkung von COX-2 unterstützt. Seine Aktivität bewirkt zu Beginn der Entzündung einen pro-inflammatorischen Phänotyp (über die Induktion von PGE_2). Im Verlauf der Entzündungsreaktion wird durch seine Aktivität allerdings eher ein anti-inflammatorischer Phänotyp begünstigt (über die Bildung von PGD_2 und damit auch von PGJ_2) [173].

Für PGJ_2 (15d- PGJ_2) konnte bisher kein transmembraner Rezeptor identifiziert werden [171]. Stattdessen kann es über die PGD_2 -Rezeptoren wirken. PGJ_2 bindet mit hoher Affinität an DP1 [174] und mit einer geringeren Affinität an DP2 [167]. DP2 bindet hingegen 15d- PGJ_2 mit einer höheren Affinität als PGJ_2 [167], allerdings weist DP1 eine sehr deutlich reduzierte Affinität gegenüber 15d- PGJ_2 auf [167].

Die wohl entscheidendere anti-inflammatorische Funktion entfaltet 15d- PGJ_2 aber vermutlich aufgrund von direkten intrazellulären Interaktionen [171]. So kann 15d- PGJ_2 an den „peroxisome proliferator-activated receptor γ “ (PPAR γ) binden [175, 176]. Bei PPARs handelt es sich um Transkriptionsfaktoren, die eine komplexe Aktivität aufweisen, aber im Allgemeinen anti-inflammatorisch wirken. Sie führen beispielsweise zu einer I κ B α -abhängigen Inhibition des NF κ B-Signalweges [177]. Es sind aber auch PPAR-unabhängige Aktivitäten des 15d- PGJ_2 bekannt. Über eine Bindung von 15d- PGJ_2 an die I κ B α -Kinase wird die Phosphorylierung von I κ B α und damit die nukleäre Translokation von NF κ B verhindert [178, 179]. Auch eine direkte Beeinträchtigung der Bindung von intranukleärem NF κ B an die DNA durch 15d- PGJ_2 wurde von Straus *et al.* (2000) nachgewiesen [178].

Leukotrien B₄

Neben den Prostaglandinen gehören auch Leukotriene zu den Eicosanoiden. Leukotrien B₄ (LTB₄) ist ein pro-inflammatorisches Leukotrien der 4er-Serie, das aus der freigesetzten AA entsteht. Für die Synthese von LTB₄ muss AA ebenfalls zunächst durch die PLA₂ mobilisiert werden. Die weitere Metabolisierung erfolgt allerdings nicht durch die Cyclooxygenasen, sondern durch die 5-Lipoxygenase (5-LOX) (Abbildung 4). Durch diese wird die freigesetzte AA zu Leukotrien A₄ (LTA₄) umgewandelt. LTA₄ stellt die Ausgangssubstanz für die Herstellung weiterer Leukotriene dar. So wird LTB₄ beispielsweise durch die LTA₄-Hydrolase in verschiedenen Zellen aus LTA₄ synthetisiert [139]. Die LTB₄-Produktion wurde unter anderem in neutrophilen Granulozyten, Monozyten, peritonealen und alveolären Makrophagen, Bronchialepithelzellen und dendritischen Zellen nachgewiesen [180-182]. Eine Synthese von LTB₄ sowie eine Expression der benötigten Enzyme wurde auch im Gehirn beschrieben [183, 184]. Es bleibt zu erwähnen, dass eine Hemmung der COX zu

einer gesteigerten Expression der 5-LOX führt und damit eine verstärkte Metabolisierung der AA zu Leukotrienen bewirkt [185].

Zwei Rezeptoren („Leukotriene B₄ receptor 1“, BLT1 / „Leukotriene B₄ receptor 2“, BLT2) sind beschrieben, die mit unterschiedlicher Affinität LTB₄ binden. Der Rezeptor BLT1 wird unter anderem in Leukozyten, Lymphozyten sowie Makrophagen exprimiert, bindet LTB₄ mit hoher Affinität und ist für die Auslösung der chemotaktischen sowie pro-entzündlichen Wirkung hauptverantwortlich [182, 186]. BLT2 weist eine geringe Affinität für LTB₄ auf und wird ubiquitär in humanen Geweben exprimiert [182, 186]. Ein Nebenprodukt der Thromboxan-Synthese, die 12(S)-hydroxy-5Z,8E-10E-Heptadecaatriensäure (12-HHT), galt ursprünglich als biologisch inaktiv, ist aber vor kurzem als hoch affiner Ligand von BLT2 identifiziert worden [186]. Neben einer Bedeutung für die Chemotaxis [187] weist BLT2 auch anti-inflammatorische Wirkungsweisen auf. So ist BLT2 an einer verbesserten intestinalen [188] und kutanen [189] Barrierefunktion beteiligt. LTB₄ hat eine chemotaktische Wirkung auf Immunzellen, die funktionell aktiven BLT1 oder BLT2 aufweisen. So konnte eine chemotaktische Wirkung auf neutrophile Granulozyten [190] und dendritische Zellen [191] nachgewiesen werden. Auch für Monozyten, Makrophagen, eosinophile Granulozyten und T-Lymphozyten wurde eine chemotaktische Wirkung von LTB₄ nachgewiesen [182]. Durch die Chemotaxis von T-Lymphozyten stellt LTB₄ eine Verbindung zwischen der Reaktion des angeborenen und erworbenen Immunsystems her [182]. Zusätzlich wird durch die Einwirkung von LTB₄ die Gefäßpermeabilität erhöht [192]. Über eine LTB₄-abhängige Permeabilitätserhöhung im ZNS liegen allerdings widersprüchliche Ergebnisse vor [193, 194]. So wurde die Gefäßpermeabilität im Gehirn durch eine Injektion von LTB₄ in das Gehirnparenchym in Abhängigkeit der verwendeten Dosis erhöht [193], hingegen konnte eine LTB₄-Injektion in die Halsschlagader keine Steigerung der Gefäßpermeabilität im Gehirn bewirken [194].

IB „Toll-like“ Rezeptoren und ausgewählte Agonisten

TLRs sind Bestandteil des angeborenen Immunsystems und gehören zur Übergruppe der „pattern recognition receptors“. Es sind bisher 13 TLRs bekannt, die tierartlich unterschiedlich exprimiert werden. In der Maus werden 12 funktionelle TLRs synthetisiert (TLR1 – TLR9, TLR11 – TLR13) und im menschlichen Organismus erfolgt die Expression von 10 funktionellen TLRs (TLR1 – TLR10) [195]. Anhand ihrer Lokalisation werden extrazelluläre und endosomale TLRs differenziert. Die extrazellulären TLRs sind in der Zellmembran zu finden und dienen der Detektion extrazellulärer PAMPs oder extrazellulärer „danger / damage-associated molecular patterns“ (DAMPs). Bei den DAMPs handelt es sich um körpereigene Molekülstrukturen, die durch Gewebeschäden aus ihrem physiologischen

Zellkompartiment freigesetzt werden und schließlich über spezifische Rezeptoren wie beispielsweise die TLRs eine Inflammation auslösen können [196]. Endosomale TLRs dienen der Erkennung intrazellulärer Pathogene und befinden sich im Phagosom bzw. Endosom sowie im Zytoplasma. Die Expression von TLRs kann induziert und moduliert werden [197]. Als zentralnervöse Komponenten des angeborenen Immunsystems konnten viele der „toll-like“ Rezeptoren bereits im Gehirn nachgewiesen werden [198]. In der Tabelle 1 sind die für die vorliegende Arbeit relevanten TLRs samt ihrer relevanten Agonisten aufgelistet.

Tabelle 1: Auflistung der TLRs, die von relevanten Liganden der vorliegenden Arbeit stimuliert werden

„toll-like“ Rezeptor	Lokalisation	für diese Arbeit relevanter Agonist
TLR2	extrazellulär	Biglykan, HMGB1
TLR4	extrazellulär	Biglykan, HMGB1, LPS

1 Exogene Agonisten extrazellulärer „toll-like“ Rezeptoren

Die exogenen TLR-Agonisten sind in der Regel essentielle Bestandteile der Mikroorganismen und hoch konserviert; sie werden auch als PAMPs bezeichnet. PAMPs sind für ein breites Spektrum von Mikroorganismen charakteristisch. Nukleinsäuren von Bakterien oder Viren, in einer bestimmten Form angeordnete Zuckermoleküle oder auch Zellwandbestandteile der Mikroorganismen können als derartige exogene TLR-Agonisten fungieren. So kann das Immunsystem ein Eindringen von verschiedenen Fremdorganismen wie Bakterien, Viren, Pilzen oder Parasiten über diese Struktur motive erkennen und selbst beim erstmaligen Kontakt sofort eine Immunreaktion auslösen.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde LPS als exogener TLR-Agonist des extrazellulären TLR4 angewendet und wird nachfolgend beschrieben.

1.1 *Lipopolysaccharid*

LPS ist ein thermostabiler Zellwandbestandteil gram-negativer Bakterien. Es wird bei einer Lyse gram-negativer Bakterien in großen Mengen freigesetzt, kann aber in geringeren Mengen auch beim Wachstum lebender Bakterien anfallen bzw. abgesondert werden [199]. Über die Darmflora kommen Säugetiere von Geburt an mit LPS in Kontakt. LPS besteht aus drei Anteilen [200]. Der Polysaccharidanteil ist ein Polymer aus einer variablen Anzahl wiederholter Oligosaccharidsequenzen und vermittelt die Antigenität. Über eine Kernregion, die ihrerseits in einen inneren und äußeren Kern gegliedert werden kann, ist der Polysaccharidanteil mit dem wirkungsvermittelnden Lipid-A-Anteil verbunden [200]. Der Lipid-A-Anteil ist stark lipophil, hoch konserviert und verankert das LPS in der äußeren Membran gram-negativer Bakterien. Lipid-A ist der Bereich von LPS, der als eigentliches

PAMP fungiert [201-203]. Aufgrund seiner fiebererzeugenden Wirkung wird LPS auch als Endotoxin bezeichnet und gehört zur Gruppe der exogenen Pyrogene [199].

Nach einer Freisetzung von LPS oder einer experimentellen Verabreichung bindet dieses lipophile PAMP an sein Bindungsprotein, das „lipopolysaccharide binding protein“ (LBP) [204]. LBP gehört zu den Akute-Phase-Proteinen und wird im Rahmen von systemischen Entzündungen vermehrt exprimiert [204]. Es kann die Bindung von LPS an den „cluster of differentiation 14“ (CD14) katalysieren und demnach beschleunigen [205, 206]. CD14 ist sowohl löslich („soluble cluster of differentiation 14“, sCD14) als auch membrangebunden auf Monozyten und Makrophagen zu finden. Über eine Bindung an lösliches sCD14 kann LPS seine Wirkung auch in Zellen entfalten, die kein membrangebundenes CD14 tragen [205, 207]. Die eigentliche fieberauslösende und pro-entzündliche Signalkaskade wird schließlich über eine Interaktion von CD14 mit TLR4 vermittelt [208, 209]. CD14 weist keine intrazelluläre Domäne auf und bewirkt ohne TLR4 keine Signaltransduktion in der Zelle. In TLR4-defizienten Mäusen konnte eine essentielle Beteiligung von TLR4 für Fieber belegt werden, da die Mäuse kein LPS-induziertes Fieber entwickelten [210]. Sowohl CD14 als auch TLR4 konnten bereits in Zellen der sCVOs identifiziert werden [33]. Das „myeloid differentiation protein 2“ (MD-2) interagiert mit den extrazellulären Anteilen von TLR4 und ist für die LPS-abhängige Induktion der intrazellulären Signalkaskade essentiell [211]. Es bleibt noch zu erwähnen, dass auch intrazelluläre Rezeptoren für eine Interaktion mit dem lipophilen LPS in Frage kommen. Es wurde eine Bedeutung der intranukleären „nucleotide-binding oligomerization domain 1“ (Nod1) und Nod2 nachgewiesen [212]. Eine Aktivierung dieser intranukleären Rezeptoren ist, synergistisch zu dem TLR4-abhängigen Signalweg, an der Auslösung des LPS-induzierten „sickness behaviors“ beteiligt [213].

1.1.1 Die LPS-induzierte Entzündungsreaktion

LPS kann kommerziell in einer hoch reinen Form bezogen werden und ist für den Anwender leicht zu handhaben. Prinzipiell können auch lebende Bakterien, Viren oder Pilze eine systemische Inflammation induzieren, allerdings bietet das purifizierte LPS die Vorteile einer guten Dosierbarkeit und der Auslösung einer gut reproduzierbaren Inflammation.

Im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit wurde Ratten (siehe Kapitel IVA1 - IVA4) und Mäusen (siehe Kapitel IVD) LPS aus *Escherichia coli* des Serotyps O111:B4 *intraperitoneal* (i.p.) verabreicht. Ratten und Mäuse reagieren weniger sensitiv auf eine LPS-Applikation als beispielsweise Kaninchen [78]. Mäuse galten ursprünglich als ungeeignete Versuchstiere für die Untersuchung von Fieber, da eine Applikation von pyrogenen Stimuli häufig mit einer Hypothermie einhergeht [214]. Mittlerweile ist aber bekannt, dass die Reaktionen stark vom

Mausstamm, dem Pyrogen und vor allem auch der Umgebungstemperatur abhängig sind [214-216].

Bei C57/BL6 Mäusen führt eine i.p. Injektion von LPS, mit einer Dosis von 2,5 mg/kg Körpergewicht (KGW), bei einer thermoneutralen Temperatur von 30 °C zur Induktion einer ungefähr zweitägigen Beeinträchtigung der Vitalparameter und eines Fiebers, das rund 33 Stunden anhält [217]. Dies entspricht den Versuchsbedingungen, die im Rahmen des Fat-1 Projektes in der vorliegenden Arbeit angewendet wurden (siehe Kapitel IIIC1).

Bei Versuchen im eigenen Haus konnte nachgewiesen werden, dass Wistar Ratten nach einer i.p. Injektion von LPS, mit einer Dosis von 10 mg/kg KGW, eine ungefähr 90-minütige Hypothermie entwickeln, die anschließend in ein Fieber übergeht [218]. Diese Dosis wurde bei den Versuchen der vorliegenden Doktorarbeit ebenfalls als Modell zur Induktion einer Sepsis-ähnlichen Entzündung (im Weiteren als Sepsis bezeichnet) bei den Ratten des „high-mobility group box 1“ (HMGB1) Projektes angewendet (siehe Kapitel IIIC1).

2 Endogene Agonisten extrazellulärer “toll-like” Rezeptoren

Mittlerweile ist bekannt, dass auch bei aseptischen Gewebeschädigungen, die beispielweise durch Verletzungen, Hitze, Kälte, Intoxikationen oder Ischämie entstehen, eine Aktivierung von TLRs erfolgt, obwohl keine PAMPs im betroffenen Organismus nachweisbar sind. Ursächlich kommen dafür endogene TLR-Agonisten in Frage [196, 219]. Bei dem im Februar 2006 durchgeführten „EMBO Workshop on Innate Danger Signals and HMGB1“ wurde vorgeschlagen die endogenen TLR-Agonisten als Alarmine zu bezeichnen und den Begriff der „damage-associated molecular patterns“ als gemeinsamen Überbegriff für PAMPs und Alarmine zu verwenden [196]. Diese Nomenklatur setzte sich allerdings nicht vollständig durch. Heute werden die Bezeichnungen DAMP und Alarmin häufig synonym verwendet. In der hier vorliegenden Arbeit werden die endogenen TLR-Agonisten als DAMPs bezeichnet.

Endogene TLR-Agonisten liegen normalerweise intrazellulär vor oder sind fest an extrazelluläre Bestandteile gebunden und können physiologische Funktionen übernehmen. Durch verschiedene Pathologien gelangen die DAMPs in das extrazelluläre Kompartiment, werden dort von PRRs wie TLRs detektiert und führen so zur genomischen Aktivierung von Zellen [196]. Die DAMPs werden nicht nur durch nekrotische Zellen freigesetzt, sondern können auch aktiv von Immunzellen sezerniert werden [196].

Als DAMPs wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit „high-mobility group box 1“ sowie Biglykan verwendet. Beide werden im folgenden Abschnitt detaillierter beschrieben.

2.1 “High-mobility group box 1”

HMGB1 ist ein DNA-bindendes Protein, das seinen Namen aufgrund der hohen elektrophoretischen Motilität in Polyacrylamidgelen erhielt [220] und in allen kerntragenden Zellen vorkommt. Ferner werden die Bezeichnung Amphoterin und HMG-1 synonym verwendet. Im Zellkern ist es an einer Modulation der Chromatinstruktur [221], einer Reparatur von DNA-Schäden [222] und an einer Regulation der Transkription [223] beteiligt. Seine Bedeutung für die Regulation spezifischer Transkriptionsfaktoren zeigt sich bei HMGB1-defizienten Mäusen. Diese versterben innerhalb eines Tages nach der Geburt aufgrund einer Hypoglykämie [224]. Die Letalität der HMGB1-defizienten Mäuse könnte die starke Konservierung von HMGB1 zwischen verschiedenen Säugetierspezies erklären [225].

Durch die Versuche von Wang *et al.* (1999) wurde erstmals gezeigt, dass extrazelluläres HMGB1 ein inflammatorisches Potenzial aufweist und in der späten Phase einer Sepsis von Bedeutung ist [226]. So konnte *in vitro* eine Freisetzung von HMGB1 aus aktivierten Makrophagen festgestellt werden. *In vivo* waren 8 - 32 Stunden nach einer Applikation von LPS erhöhte HMGB1-Konzentrationen im Serum nachweisbar und selbst eine verspätete Verabreichung neutralisierender Antikörper verhinderte die Endotoxin-induzierte Letalität der Mäuse [226]. Seitdem rückte HMGB1 in seiner Funktion als DAMP in den Fokus der Forschung.

Strukturell besteht es aus 215 Aminosäuren und setzt sich aus drei Komponenten zusammen, nämlich aus den zwei positiv geladenen, DNA-bindenden Domänen A-Box und B-Box sowie einem negativ geladenen C-Terminus [227]. HMGB1 weist drei konservierte, hoch reaktive Cysteine auf, die sich an der Position 23, 45 und 106 befinden. Cystein 23 (C23) und C45 sind in der A-Box lokalisiert und C106 ist Bestandteil der B-Box [228].

Eine Freisetzung von HMGB1 erfolgt passiv aus nekrotischen Zellen oder über eine aktive Sezernierung durch aktivierte Immunzellen wie Monozyten, Makrophagen, dendritische Zellen oder natürliche Killerzellen [229]. Eine aktive Sekretion wurde unter anderem bereits für Neurone, Enterozyten, glatte Muskelzellen und Endothelzellen nachgewiesen [196]. HMGB1 steht nur über eine schwache Bindung mit der DNA in Kontakt und kann daher bei einem Nekrose-abhängigen Verlust der Integrität von Kern- und Zellmembran in den Extrazellularraum diffundieren [227, 230]. Hingegen wird bei einem programmierten apoptotischen Zelltod kein HMGB1 freigesetzt, da es durch eine Deacetylierung des Chromatins irreversibel mit diesem verbunden wird [231]. Allerdings werden Makrophagen, die apoptotische Zellkörper phagozytieren, zur aktiven Sekretion von HMGB1 stimuliert [232]. Die aktive Sekretion erfolgt ohne vorherige Synthese, sondern geht mit einer Translokation aus dem Zellkern in das Zytoplasma einher.

Für die Wirkungsweise von HMGB1 ist die posttranslationale Modifikation an den drei bereits erwähnten Cysteinen von entscheidender Bedeutung [227, 233] (Abbildung 3). Im Zellkern liegt HMGB1 vornehmlich als vollständig reduziertes HMGB1 vor [234]. Die korrekte Bezeichnung lautet HMGB1C23hC45hC106h, da die Zustände der drei Cysteine hierbei genau definiert werden und über eine derartige Nomenklatur auch Hinweise über mögliche Addukte gegeben werden können [234]. Auch die Bezeichnung all-thiol HMGB1 ist gebräuchlich. Durch eine Oxidation entsteht zwischen dem C23 und dem C45 eine Doppelbindung, die für das Disulfid-HMGB1 (HMGB1C23-C45C106h) charakteristisch ist [234]. Eine weitere Oxidation geht mit der Bildung von Sulfonylgruppen an den reaktiven Cysteinen einher, weshalb dieses HMGB1 als Sulfonyl-HMGB1 (HMGB1C23soC45soC106so) bezeichnet wird [234].

Ursprünglich wurde der „receptor for advanced glycation end-products“ (RAGE) als HMGB1-Rezeptor identifiziert [235]. Allerdings ließen sich nicht alle Funktionen über die Interaktion mit diesem Rezeptor erklären. Auch eine Blockade mit anti-RAGE Antikörpern führte nicht zur vollständigen Aufhebung der HMGB1-abhängigen Zytokin-Sekretion [236]. Heute ist bekannt, dass die HMGB1-Rezeptorinteraktion stark von der posttranslationalen Modifikation abhängt und so die vielseitigen redoxspezifischen Wirkungen ausgelöst werden [227]. Außerdem kann HMGB1 an eine Vielzahl von endogenen und exogenen Molekülen binden und über deren Rezeptoren eine Wirkung entfalten [237-239]. So bewirkt vollständig reduziertes HMGB1 durch eine Komplexbildung mit dem „C-X-C motif chemokine ligand 12“ (CXCL12) und der entsprechenden Interaktion mit dem „C-X-C motif chemokine receptor 4“ (CXCR4) eine Zellmigration [240-242]. Dabei wird durch diesen CXCL12-HMGB1 Heterokomplex ein anderer Konformationswechsel von CXCR4 induziert als bei einer alleinigen Interaktion mit CXCL12 [240].

Die über RAGE vermittelten Wirkungen werden ebenfalls durch vollständig reduziertes HMGB1 induziert [243, 244]. Dabei können differenzierte intrazelluläre Signalwege ablaufen, die zum einen eine Zytokin- sowie eine Chemokin-Sekretion auslösen und zum anderen die Motilität der Zellen regulieren können [245].

Nach der Oxidation zu Disulfid-HMGB1 kann dieses über TLR4/MD-2 seine zytokininduzierende Wirkung entfalten [246]. Für die Auslösung der Zytokinexpression ist sowohl die Doppelbindung als auch das reduzierte C106 essentiell [247]. In einem geschädigten Gewebe liegen vermehrt Sauerstoff- und Stickstoffradikale vor, die eine derartige Oxidation bewirken können. Allerdings lassen sich Ursache und Wirkung nicht klar voneinander trennen, denn eine Bindung von Disulfid-HMGB1 führt wiederum zu einer Freisetzung von Radikalen aus neutrophilen Granulozyten [227, 248]. Dieses Disulfid-HMGB1 wurde auch bei der vorliegenden Arbeit für die *in vitro* Analysen verwendet.

Durch die weitere Oxidation zum Sulfonyl-HMGB1 wird sowohl die chemotaktische als auch die zytokininduzierende Wirkung aufgehoben [233, 246, 247]. Da Sulfonyl-HMGB1 vornehmlich während der Entzündungsauflösung nachweisbar ist [247], wird ihm eine Funktion für ein negatives „Feedback“ zugesprochen [227].

Zusammenfassend und vereinfacht lässt sich also sagen, dass das freigesetzte vollständig reduzierte HMGB1 eine Rekrutierung von Leukozyten bewirkt, die anschließend durch Disulfid-HMGB1 zur Zytokin-Synthese angeregt werden. Eine weitere Oxidation zu Sulfonyl-HMGB1 verhindert schließlich sowohl die chemotaktische als auch die zytokininduzierende Wirkung. Bei der Interpretation von Forschungsergebnissen über die Funktion von HMGB1 ist die redoxabhängige Wirkungsweise zu beachten.

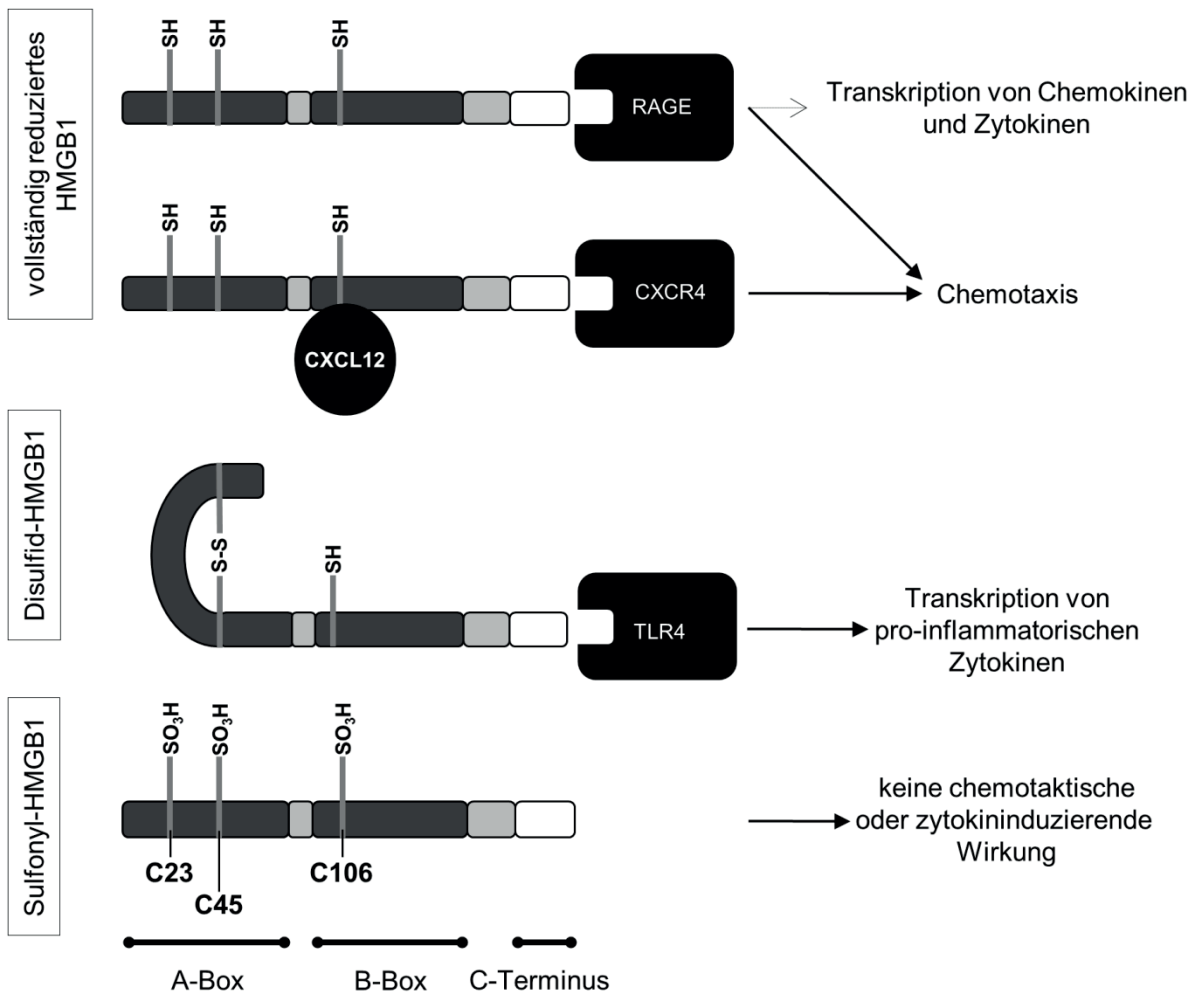


Abbildung 3: Stark vereinfachte schematische Darstellung von HMGB1, seiner Redox-Modulation sowie der jeweiligen Rezeptorinteraktion

Das physiologischerweise intranukleär vorliegende HMGB1 setzt sich aus der A-Box, der B-Box und einem negativ geladenen C-Terminus zusammen. Die Oxidation der drei reaktiven Cysteine (Cystein 23 [C23], C45 und C106) bestimmt maßgeblich die Wirkungsweise von HMGB1. Es liegt vollständig reduziert im Zellkern vor und kann passiv oder durch eine aktive Sekretion in den Extrazellularraum gelangen. Vollständig reduziertes HMGB1 bewirkt hier insbesondere eine Rekrutierung von Leukozyten. Diese wird durch eine Stimulation des „receptor for advanced glycation end-products“ (RAGE) oder nach Bildung eines Heterokomplexes mit „C-X-C motif chemokine ligand 12“ (CXCL12) und der entsprechenden Interaktion mit „C-X-C motif chemokine receptor 4“ induziert. In geringerem Umfang wird durch die Bindung des vollständig reduzierten HMGB1 an RAGE auch eine Transkription von Chemokinen und Zytokinen ausgelöst. Durch eine Oxidation im Extrazellularraum entsteht Disulfid-HMGB1. Dieses weist über die Stimulation des „toll-like“ Rezeptor-4 (TLR4) eine stark zytokininduzierende Wirkung auf. Eine weitere Oxidation geht mit der Bildung von Sulfonylgruppen an den reaktiven Cysteinen einher. Sulfonyl-HMGB1 kann weder eine chemotaktische noch eine zytokininduzierende Wirkung auslösen. (Modifiziert nach [227])

2.2 Biglykan

Biglykan ist ein kleines, Leucin-reiches, ubiquitär exprimiertes Proteoglykan [249]. Es besteht aus einer hoch konservierten Kernregion und 1 - 2 Glykosaminoglykan-Ketten [250]. Bei den kovalent gebundenen Glykosaminoglykan-Ketten handelt es sich um die linearen, sauren

Polysaccharide Chondroitinsulfat oder Dermatansulfat. Biglykan kann über seine Kernregion und die Glykosaminoglykane mit einer Vielzahl von Komponenten der extrazellulären Matrix („extracellular matrix“, ECM) in Verbindung treten [251-253] und ist daher in den meisten Organen ein Bestandteil der ECM [250].

Ursprünglich galt Biglykan nur als statisches strukturelles Protein. Allerdings zeigten Biglykan-„knockout“ Mäuse einen osteoporotisch veränderten Phänotyp [254]. Eine veränderte Struktur der Kollagenfibrillen in Knochen, Haut und Sehnen [255] ging bei diesen „knockout“ Mäusen mit einer reduzierten Knochenmasse und einem eingeschränkten Wachstum einher [254]. Durch diese und weiterführende Ergebnisse wurden Biglykan schließlich regulatorische Eigenschaften für die ECM zugesprochen [255-257]. Es wurde auch bereits nachgewiesen, dass Biglykan eine Bindung mit „transforming growth factor- β “ [258] und TNF α [259] eingehen kann.

Heute wird Biglykan als DAMP eingestuft [260]. Nach einer Freisetzung aus der ECM durch proteolytische Enzyme wie Matrix-Metalloproteinasen [250] oder nach einer *de novo* Synthese durch aktivierte Makrophagen [261] kann freies Biglykan als endogener TLR-Agonist (TLR2, TLR4) fungieren [261] und eine Inflammation induzieren [261, 262]. Über eine Stimulation der „toll-like“ Rezeptoren TLR2 und TLR4 bewirkt Biglykan die Aktivierung von NF κ B und weiterer intrazellulärer Kinasen („extracellular-signal kinase“, „mitogen activated protein kinase p38“), wodurch letztendlich eine Transkription von TNF α sowie verschiedener chemotaktischer Faktoren induziert werden kann [261]. Über eine zusätzliche Interaktion von Biglykan mit dem G-Protein gekoppelten Purinrezeptor P2X₇ scheint das durch TLR-Aktivierung transkribierte pro-IL-1 β aktiviert zu werden [262]. Freies Biglykan kann über diese Signalwege sowohl autonom eine sterile Entzündung auslösen als auch eine durch Pathogene induzierte Entzündungsreaktion verstärken [250]. So weisen die Biglykan-defizienten Mäuse bei einer LPS-induzierten Sepsis verbesserte Überlebensraten und geringerer TNF α -Konzentrationen im Plasma auf [261].

IC Bedeutung des Fettgewebes für Entzündungsreaktionen

Adipositas und damit assoziierte Erkrankungen stellen weltweit ein großes Problem dar. Die Prävalenz der Adipositas hat sich seit 1980 mehr als verdoppelt [263]. In der gleichen Zeit kam es zu einem Anstieg Adipositas-assoziiierter Krankheiten wie Diabetes mellitus und kardiovaskulären Erkrankungen. Diätinduzierte Adipositas resultiert aus einer Imbalance zwischen der Kalorienaufnahme und dem Kalorienverbrauch. Als besondere Form gilt altersassoziierte Adipositas. Diese geht weniger mit einer Zunahme der Fettmasse, sondern mit einer Umverteilung des Fettgewebes von *subcutanen* zu *viszeralen* Fettdepots einher [264].

Das Fettgewebe stellt ein wichtiges endokrines Organ dar. Sowohl die Adipozyten als auch Zellen der stromalen vaskulären Fraktion (nicht differenzierte Adipozyten, Endothelzellen, Fibroblasten, Immunzellen) synthetisieren und sezernieren eine Vielzahl von Hormonen und Proteinen [265]. Definitionsgemäß wird der Begriff der Adipokine auf Faktoren beschränkt, die unter anderem von Adipozyten des weißen oder braunen Fettgewebes synthetisiert werden. Proteine, die ausschließlich von Zellen der stromalen Fraktion des Fettgewebes synthetisiert und freigesetzt werden, fallen hingegen genau genommen nicht unter den Begriff der Adipokine [265].

Sowohl die Adipositas [266, 267] als auch das Altern [268] gehen mit einer chronischen subklinischen Inflammation einher, die als Ursache für die assoziierten Erkrankungen diskutiert wird. Altersassoziierte Adipositas weist dabei eine positive Korrelation zu erhöhten Plasmakonzentrationen von TNF α und IL-6 auf [269] und ist der diätinduzierten Adipositas sehr ähnlich [270]. In adipösen Individuen liegen höhere Plasmakonzentrationen der pro-inflammatorischen Marker Fibrinogen, C-reaktives Protein (CRP), TNF α und IL-6 vor [266, 267]. Außerdem steigt die Konzentration des anti-inflammatorischen Zytokins IL-1ra in Korrelation zur steigenden Fettmasse [271].

Nachfolgend werden verschiedene mögliche Pathomechanismen für die Entstehung der chronischen subklinischen Entzündung bei Adipositas beschrieben. Grundlage vieler dieser Pathomechanismen ist die Hypertrophie der Adipozyten bei Adipositas. In adipösen Individuen liegt eine verstärkte Fetteinlagerung in den ausdifferenzierten Adipozyten vor. Hingegen bleibt die während der Kindheit determinierte Anzahl der Adipozyten, trotz einer Gewichtszu- oder auch -abnahme, in erwachsenen Individuen konstant [272]. Die Hypertrophie bedingt eine lokale Hypoperfusion, die mit einer Hypoxie des Fettgewebes [273] und einer vermehrten Nekrose der Adipozyten einhergeht [274]. Durch die Hypoxie des Fettgewebes werden Expression und Sekretion der pro-inflammatorischen Marker (IL-6, Leptin) gesteigert und die von Adiponektin reduziert [275, 276].

Makrophagen liegen im Fettgewebe nicht homogen verteilt vor, sondern sind als sogenannte „crown like structures“ (CLS) um einen individuellen nekrotischen Adipozyten lokalisiert. Die CLS konnten von Cinti *et al.* (2005) sowohl im Fettgewebe dünner als auch dicker Mäuse festgestellt werden. Allerdings war deren Auftreten im Fettgewebe der genetisch induziert adipösen Mäuse 30-fach höher [274]. Die vermehrt vorliegenden Makrophagen sind an der gesteigerten Sekretion der Hormone und Proteine aus dem Fettgewebe beteiligt [277]. So finden annähernd die gesamte TNF α -Expression und signifikante Anteile der IL-6-Expression des Fettgewebes in Makrophagen statt [277]. Deshalb werden diese im Rahmen der

vorliegenden Arbeit auch bei der Betrachtung der Sekretion durch das Fettgewebe als Zytokine bezeichnet und von den Adipokinen Adiponektin, Leptin sowie Visfatin differenziert. Die zusätzlich rekrutierten Makrophagen stellen besondere Fettgewebsmakrophagen dar, die ein einzigartiges pro-inflammatorisches Expressionsmuster aufweisen [278]. Lumeng *et al.* (2007) konnten ebenfalls zeigen, dass die bereits im Fettgewebe der dünnen Mäuse auftretenden residualen, anti-inflammatorischen Makrophagen durch diätinduzierte Adipositas Verschiebungen zu einem pro-inflammatorischen Aktivitäts- und Expressionsmuster aufweisen [279]. Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass das DAMP HMGB1 von nekrotischen Adipozyten sezerniert wird, dadurch den pro-inflammatorischen Phänotyp der Makrophagen induziert und damit die Adipozytenfunktion beeinflusst [280]. Interessanterweise scheint aber auch das DAMP Biglykan an dem pro-inflammatorischen Status des Fettgewebes beteiligt zu sein. So liegt in adipösem Fettgewebe eine gesteigerte Expression von Biglykan vor. Die Biglykan-Expression korreliert wiederum positiv mit der Expression pro-inflammatorischer Gene wie beispielsweise TNF α [281].

Auch die im Rahmen der Adipositas vermehrt vorliegenden freien FS sind an der chronischen subklinischen Inflammation beteiligt. Sie können TLRs der Makrophagen und Adipozyten aktivieren [282-284].

Zusammenfassend lässt sich also sagen, dass durch eine Adipositas das Gleichgewicht zwischen pro- und anti-inflammatorischen Mediatoren aus dem Fettgewebe in Richtung einer verstärkten Sekretion pro-inflammatorischer Mediatoren verschoben wird [285].

Es werden aber auch vom Fettgewebe unabhängige Pathomechanismen mit der chronischen subklinischen Inflammation bei Adipositas in Verbindung gebracht. Dazu gehört beispielsweise eine metabolische Endotoxämie aufgrund einer erhöhten Darmpermeabilität [286]. Im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit wurde die akute Reaktion des Fettgewebes auf die genannten exogenen (LPS) oder endogenen (HMGB1, Biglykan) Stimuli untersucht (siehe Kapitel IVC).

Hervorzuheben bleibt, dass sowohl die diätinduzierte als auch die altersassoziierte Adipositas zu einer verstärkten LPS-induzierten Entzündung mit verlängerter Fieberantwort führen [287-289].

1 **Adiponektin**

Adiponektin stellt das häufigste Gentranskript des Fettgewebes dar [290] und wird hauptsächlich durch Adipozyten sezerniert. Dennoch liegt bei einer Adipositas eine reduzierte Adiponektin-Konzentration im Plasma vor [291, 292], die in einer Reduktion der Adiponektin-Synthese in hypoxischen Adipozyten begründet ist [275, 276]. Im Plasma sind

hohe Konzentrationen von Adiponektin nachweisbar, welches als Trimer, als Hexamer oder als Oligomer zirkuliert [293]. Seine Hauptwirkung entfaltet Adiponektin in der Muskulatur und der Leber. Es führt zu einer Modulation des Glukose- und Fettstoffwechsels mit einer Erhöhung der Insulin-Sensitivität, der Glukosetoleranz und der Fettsäureoxidation [294, 295].

1.1 Die Bedeutung von Adiponektin für die Immunantwort und systemische Entzündungen

Adiponektin werden vornehmlich anti-inflammatorische Wirkungen zugesprochen, allerdings gibt es auch widersprüchliche Hinweise auf eine pro-inflammatorische Aktivität. Die kontroversen Ergebnisse könnten auf differierende Effekte der verschiedenen Adiponektinkonformationen mit unterschiedlichen Molekulargewichten zurückzuführen sein [296]. In einer Reihe von klinischen Studien konnte eine Korrelation zwischen reduzierter Adiponektin-Konzentration und dem Auftreten von Adipositas-assoziierten Erkrankungen [297-299] sowie dem Anstieg der Plasmakonzentrationen von CRP festgestellt werden [300]. Die Aktivität der Makrophagen wird durch Adiponektin stark beeinflusst. Es erfolgt eine Verschiebung des Expressionsmusters der pro-inflammatorischen M1-Makrophagen zu dem der anti-inflammatorischen M2-Makrophagen [301]. Außerdem unterstützt Adiponektin die Phagozytose apoptotischer Zellen [302]. *In vitro* wird die LPS-induzierte TNF α -Synthese der Makrophagen durch Adiponektin reduziert [303]. Auch *in vivo* bewirkte eine experimentell erhöhte systemische Adiponektin-Konzentration eine Verbesserung der klinischen Parameter in verschiedenen inflammatorischen Tiermodellen [304-306]. So scheint Adiponektin eine hemmende Bedeutung für die Leukozytendiapedese aufzuweisen. Tatsächlich konnte sowohl unter basalen Bedingungen als auch LPS-induziert in Adiponektin-“knockout“ Mäusen eine höhere Expression der endothelialen Adhäsionsmoleküle VCAM-1 und ICAM-1 festgestellt werden [307, 308].

2 Leptin

Leptin ist ein 16 kDa schweres Protein, das durch das „obese gene“ (ob) kodiert wird [309] und die Nahrungsaufnahme sowie den Energieumsatz maßgeblich reguliert [310]. Zhang *et al.* (1994) fanden heraus, dass im Fettgewebe von ob/ob Mäusen, die aus einer spontanen Mutation hervorgingen und einen stark adipösen Phänotyp aufweisen [311], kein ob-Genprodukt nachzuweisen war [309]. Eine Substitution von Leptin, welches ursprünglich noch als OB-Protein bezeichnet wurde, führte in ob/ob Mäusen zu einer Gewichtsreduktion. Diese wurde damit erklärt, dass Leptin die Futteraufnahme reduzierte und den Energieverbrauch erhöhte [310, 312]. In einer Studie von Fischer *et al.* (2016) wurde kürzlich allerdings der Einfluss von Leptin auf den Energieumsatz in Frage gestellt. Sie wiesen stattdessen eine vermehrte Vasokonstriktion nach, die einen Wärmeverlust über den

Schwanz vermindert und so zur thermogenen Wirkung von Leptin führt [313]. Es konnte weder ein gesteigerter Energieumsatz noch eine zitterfreie Thermogenese im braunen Fettgewebe nachgewiesen werden.

Da Leptin hauptsächlich im Fettgewebe exprimiert wird, besteht sowohl bei Nagern als auch beim Menschen eine direkte Korrelation zwischen der Masse des vorhandenen Fettgewebes und der Menge an zirkulierendem Leptin [292, 314].

2.1 Die Bedeutung von Leptin für die Immunantwort und systemische Entzündungen

Neben den bereits beschriebenen Wirkungen beeinflusst Leptin ebenfalls Immunreaktionen bzw. das Immunsystem. So führen eine genetische Leptindefizienz (ob/ob Mäuse) sowie eine Leptinresistenz (db/db Mäuse) zu einer Thymusatrophie [315] und einer damit einhergehenden Immunsuppression sowie einer erhöhten Anfälligkeit gegenüber bakterieller Infektionen [316, 317]. Im Rahmen einer akuten Unterernährung konnten vergleichbare Pathologien festgestellt werden [318]. Eine externe Leptinsubstitution führte in ob/ob Mäusen und während einer akuten Unterernährung zu einer Verbesserung der pathologisch verminderten Immunantwort [315, 318]. Die Leptinresistenz wird durch eine Mutation des db-Gens, welches für den Leptin-Rezeptor kodiert, ausgelöst [319].

Leptin-Rezeptoren, von denen sechs Isoformen bekannt sind, wurden auf Monozyten / Makrophagen [320], neutrophilen Granulozyten [321], natürlichen Killerzellen [322] sowie auf T-Lymphozyten [318] und B-Lymphozyten [323] nachgewiesen. Über diese Rezeptoren führt Leptin zu einer vielseitigen Aktivierung der Immunzellfunktion [324].

Im Rahmen von systemischen Entzündungen kommt es zu einer verstärkten Freisetzung von Leptin aus dem Fettgewebe. Die Zytokine TNF α und IL-1 sind auch bei der durch LPS induzierten systemischen Entzündung von Bedeutung und scheinen direkt an der Freisetzung von Leptin beteiligt zu sein [325-327]. Eine alleinige zentrale oder periphere Injektion von Leptin führte zu einer erhöhten Körperkerntemperatur und einer Anorexie [328], was die Hypothese einer Beteiligung von freigesetztem Leptin an der Entstehung des „sickness behaviors“ unterstützt. Durch eine Neutralisierung von Leptin konnten das LPS-bedingte Fieber und die induzierte Anorexie reduziert oder sogar ganz verhindert werden [131, 289, 329], ebenso wie die durch Leptin vermittelte Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten in das Gehirn [21, 23]. Letztere ist unter anderem durch eine Beteiligung von Leptin an der LPS-induzierten Steigerung der ICAM-1-Expression zu erklären [23].

3 Visfatin / PBEF / Nampt

Für Visfatin sind zwei weitere Bezeichnungen gebräuchlich, nämlich „pre-B-cell colony-enhancing factor“ (PBEF) und Nikotinamid Phosphoribosyltransferase (Nampt). Eine der neueren Entdeckungen zu diesem Protein führte zum Namen Visfatin, da es vornehmlich durch das *viszerale* Fettgewebe sezerniert wird [330]. Wie bereits erwähnt entspricht es dem zuvor entdeckten PBEF. PBEF wird in Knochenmark, Leber und Muskulatur transkribiert und führt als sezernierter Wachstumsfaktor zu einer Proliferation von B-Lymphozyten [331]. Außerdem entspricht das Adipokin Visfatin der Nikotinamid Phosphoribosyltransferase [332]. Diese Transferase ist sowohl intrazellulär (iNampt) [333] als auch extrazellulär (eNampt) als geschwindigkeitsbestimmendes Enzym an der NAD-Biosynthese beteiligt [334, 335]. Heute geht man davon aus, dass die Regulation des Glukosehaushaltes nicht auf eine insulinmimetische, sondern auf eine enzymatische Wirkung von Visfatin / PBEF / Nampt zurückzuführen ist [335, 336]. Die Begriffe Visfatin, PBEF und Nampt können synonym gebraucht werden. Da allerdings bei der hier vorliegenden Arbeit die Freisetzung aus dem Fettgewebe, also die Bedeutung als Adipokin untersucht wurde, wird fortan die Bezeichnung Visfatin verwendet.

Es gibt viele Hinweise auf eine angehobene Serumkonzentration von Visfatin bei Adipositas [292, 337], allerdings liegen diesbezüglich auch widersprüchliche Ergebnisse vor [338].

3.1 Die Bedeutung von Visfatin für die Immunantwort und systemische Entzündungen

Für Visfatin sind eine Reihe von immunmodulierenden Effekten bekannt, allerdings bestehen kontroverse Diskussionen über eine enzymatische oder Zytokin-ähnliche Wirkungsweise von Visfatin [336]. Moschen *et al.* (2007) konnten nachweisen, dass Visfatin *in vitro* eine Produktion der Zytokine IL-1 β , TNF α und IL-6 in Leukozyten induziert und, dass eine Visfatin-Injektion *in vivo* zu einer erhöhten Konzentration von zirkulierendem IL-6 führt [339]. Außerdem löste eine *intra*cerebroventrikuläre (i.c.v.) Injektion von Visfatin in Ratten „sickness behavior“ mit PGE₂-abhängigem Fieber, Anorexie und Lethargie aus [340]. Neutrophile Granulozyten werden durch inflammatorische Stimuli wie LPS zu einer Freisetzung von Visfatin angeregt [341]. Ebenso konnten Jia *et al.* (2004) in ihren Versuchen feststellen, dass neutrophile Granulozyten, die von septischen Patienten isoliert wurden, Visfatin freisetzen. Wie für Adiponektin und Leptin konnte auch für Visfatin eine Interaktion mit dem Endothel nachgewiesen werden. So führte Visfatin *in vitro* und *in vivo* zu einer gesteigerten Leukozytenadhäsion aufgrund einer Induktion relevanter Adhäsionsmoleküle (ICAM-1, VCAM-1, E-Selectin) [342].

ID Anti-inflammatorische Bedeutung von ω -3-Fettsäuren

Den ω -3-FS werden seit vielen Jahren anti-inflammatorische Bedeutungen zugesprochen. Die ersten Beobachtungen dazu wurden in Bevölkerungsgruppen gemacht, die aufgrund ihrer Lebensweise eine große Menge ω -3-FS mit der Nahrung zu sich nehmen (z. B. Eskimos) und deutlich weniger chronische Erkrankungen aufwiesen [343, 344]. Nachfolgend wird zunächst auf die Nomenklatur von Fettsäuren und deren Synthese sowie das Verhältnis zwischen ω -6- und ω -3-FS eingegangen.

FS sind Kohlenstoffketten, die durch eine Carboxylgruppe an der einen Seite und eine Methylgruppe an der anderen Seite „begrenzt“ sind [345]. Sie variieren stark in ihrer Länge und unterscheiden sich neben der Anzahl von Kohlenstoffatomen auch in der Anzahl und der Lokalisation ihrer Doppelbindungen. Gesättigte FS weisen keine Doppelbindung auf. Hingegen enthalten ungesättigte FS eine variable Anzahl an Doppelbindungen [345]. Ausgehend von der Methylgruppe wird das Kohlenstoffatom mit der ersten Doppelbindung als ω -Kohlenstoffatom bezeichnet [345]. Die Nomenklatur (20:4, ω -6) für AA besagt, dass diese FS aus 20 Kohlenstoffatomen mit vier Doppelbindungen besteht und, dass sich die erste Doppelbindung an der ω -6-Position befindet.

Im Rahmen der Entzündungsreaktionen sind insbesondere lange, mehrfach ungesättigte FS von Bedeutung. Dabei handelt es sich um die ω -6-FS AA (20:4, ω -6) sowie die ω -3-FS EPA (20:5, ω -3) und DHA (22:6, ω -3) [346]. Als Ausgangssubstanz für die AA-Synthese dient die essentielle Linolsäure (LA, 18:2, ω -6) [345, 347]. Sie muss über die Nahrung aufgenommen werden und ist in den Samen der meisten Pflanzen, in Getreide, in vielen Pflanzenölen sowie in Margarine vorhanden [348, 349]. Die α -Linolensäure (α LNA, 18:3, ω -3) ist ebenfalls essentiell und bildet die Ausgangssubstanz zur Synthese der ω -3-FS EPA und DHA [347]. Sie wird beispielsweise über Leinsamen und Leinöl aufgenommen [349]. Die DHA entsteht über mehrere Schritte aus der EPA [347]. Allerdings ist die Synthese der ω -3-FS EPA und DHA durch Elongasen und Desaturasen (Abbildung 5) im Säugetierorganismus nur wenig effizient [350, 351]. Demnach werden auch EPA und DHA als essentiell angesehen. Ihre Aufnahme ist deutlich effektiver als die Aufnahme der Ausgangssubstanz α LNA. EPA und DHA sind hauptsächlich in Kaltwasserfischen und Algen vorhanden [349]. Säugetieren ist es nicht möglich FS einer ω -Klassifizierung in eine andere zu überführen [345]. Demnach können ω -3-FS nicht aus ω -6-FS synthetisiert werden. Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten transgenen Fat-1 Mäuse sind hingegen dazu befähigt (siehe Kapitel ID4).

Durch die veränderte Nahrungsaufnahme in den Industrienationen hat sich das ω -6- / ω -3-Fettsäureverhältnis maßgeblich verändert. Von ursprünglich 1:1 ist es nun bei 15-20:1, da

AA aufgrund der getreidebasierten Fütterung ein Hauptbestandteil tierischer Zellmembranen ist und mit tierischen Fetten aufgenommen wird [348, 352]. Weil ω -6- und ω -3-FS um die gleichen Enzymsysteme konkurrieren, die dabei entstehenden Metaboliten jedoch eine gegensätzliche Wirkung aufweisen, wird aus gesundheitlichen Gründen ein Verhältnis von 5:1 empfohlen [353].

1 Metabolisierung der ω -3-Fettsäuren zu Eicosanoiden oder Docosanoiden

Die Beschreibung der Synthese und Bedeutung von Eicosanoiden, die aus der ω -6-FS AA synthetisiert werden, erfolgte bereits in Kapitel IA2.1.2.3. Die Metaboliten der ω -3-FS EPA werden ebenfalls zur Gruppe der Eicosanoide gezählt [136]. Die Metabolisierung erfolgt über die gleichen Enzymsysteme wie bei der Synthese der AA-abhängigen Eicosanoide. Über die konstitutiv exprimierte COX-1 oder die induzierbare COX-2 werden aus der EPA Prostaglandine der 3er-Serie sowie Thromboxan A₃ gebildet [136] (Abbildung 4). Eine Katalyse durch die 5-LOX führt zur Bildung von Leukotrienen der 5er-Serie [136]. EPA-abhängige Eicosanoide weisen allerdings weniger starke pro-inflammatorische Wirkungen auf. So ist Thromboxan A₃ im Vergleich zum AA-abhängigen Thromboxan A₂ nicht in der Lage eine Thrombozytenaggregation auszulösen [354]. Auch dem PGD₃ wird eine stark anti-thrombotische Wirkung zugesprochen [355]. Durch derartige Ergebnisse lässt sich auch die beobachtete Blutungsneigung der Eskimos erklären, die Sinclair 1981 in einem Selbstversuch mit fischhaltiger Ernährung ebenfalls zeigte [356]. Das aus EPA hergestellte Leukotrien B₅ weist im Vergleich zum LTB₄ eine deutlich reduzierte chemotaktische Wirkung auf [357, 358]. Es konnte *in vitro* bereits nachgewiesen werden, dass PGE₃ ein deutlich geringeres Potenzial zur Induktion einer IL-6-Sekretion in Makrophagen und einer COX-2-Expression in Fibroblasten besitzt als PGE₂ [359]. *In vivo* wirkte eine Applikation von PGE₃ weniger ödematisierend als PGE₂ [360]. Über die stark reduzierten pro-inflammatorischen Eigenschaften der EPA-abhängigen Eicosanoide, die von mir nur beispielhaft in Auszügen angeführt wurden, lassen sich einige der gesundheitsfördernden Wirkungen von ω -3-FS erklären.

Außerdem sind auch Substanzen bekannt, die maßgeblich an der Beendigung von Entzündungsreaktionen beteiligt sind, ohne dabei eine Immunsuppression auszulösen [361]. Sie werden als „specialized pro-resolving lipid mediators“ (SPMs) bezeichnet, entstammen hauptsächlich einer Metabolisierung der ω -3-FS DHA, können aber auch aus EPA oder AA gebildet werden. Ihre Synthese erfolgt *in vivo* nur in geringen Mengen (pg – ng Bereich) und ihre Wirkung entfalten sie lokal an ihrem Produktionsort [361].

Mit Hilfe der 15-LOX wird DHA zur 17-(S) hydroxy Docosahexaensäure („17-(S) hydroxy docosahexaenoic acid“, 17(S)-HDHA) umgebaut. Als Zwischenprodukt entsteht dabei

17 hydroperoxy Docosahexaensäure, die zu Protektin D₁ umgesetzt werden kann [135, 362]. Protektin D₁ wird als Neuroprotektin D₁ bezeichnet, wenn es in neuronalem Gewebe synthetisiert wird. Durch die 5-LOX können aus 17(S)-HDHA Resolvine der D-Reihe (RvD) gebildet werden [136]. Von diesen sind bisher RvD₁ bis RvD₆ bekannt. Durch die humane 12-LOX kann DHA über einen Zwischenschritt auch zu Maresin umgebaut werden [363]. Von Maresin wurden bisher zwei Vertreter nachgewiesen.

EPA kann mit Hilfe des Enzyms Cytochrom P450 über den Zwischenschritt der 18-hydroxy Eicosapentaensäure zu den Resolvinen der E-Serie metabolisiert werden [364], von denen RvE₁ bis RvE₃ bekannt sind.

Auch aus der ω -6-FS AA können pro-entzündungsauflösende SPMs synthetisiert werden. Dabei handelt es sich um Lipoxine [136]. Ein Wechsel zwischen der Synthese von pro-inflammatorischen Eicosanoiden zu den entzündungsauflösenden Lipoxinen wird auch als Klassenwechsel bezeichnet [135]. Dieser wird vermutlich durch PGE₂ eingeleitet, indem es die Expression des 15-LOX-Gens induziert [365]. Außerdem weist 5-LOX zum Zeitpunkt der Beendigung der Entzündungsreaktion eine reduzierte Aktivität auf [365].

Es bleibt noch zu erwähnen, dass eine Anwendung von Aspirin zu einer acetylierten Form von COX-2 führt (aCOX-2) und über diese weitere Metabolisierungsmöglichkeiten entstehen. Der aCOX-2 können AA, DHA und EPA als Substrat dienen. Dabei werden aber hauptsächlich Metaboliten in der R-Konformation gebildet, was eine Synthese von Prostaglandinen verhindert [366-368]. Stattdessen entstehen sogenannte Aspirin-getriggerte Lipoxine, Aspirin-getriggerte Resolvine und Aspirin-getriggerte Protektine [136, 367-369]. Diese weisen eine veränderte Konfiguration auf, besitzen aber ebenfalls eine pro-entzündungsauflösende Wirkung.

Es ist zu beachten, dass insbesondere für 12-LOX und 15-LOX starke speziesspezifische Unterschiede vorliegen [370]. Außerdem entspricht die leukozytäre 12-LOX der Maus der humanen 15-LOX Typ1 [371]. Beide weisen jeweils sowohl eine 12-LOX als auch 15-LOX Aktivität auf und werden auch als 12/15-LOX bezeichnet. Das noch recht junge Forschungsgebiet der SPMs wächst stetig. In Abbildung 4 ist der aktuelle Erkenntnisstand zur Eicosanoid- und Docosanoid-Synthese vereinfacht dargestellt. Insbesondere bei den durch die 12/15-LOX synthetisierten Metabolisierungen sind speziesspezifische Unterschiede nicht berücksichtigt worden.

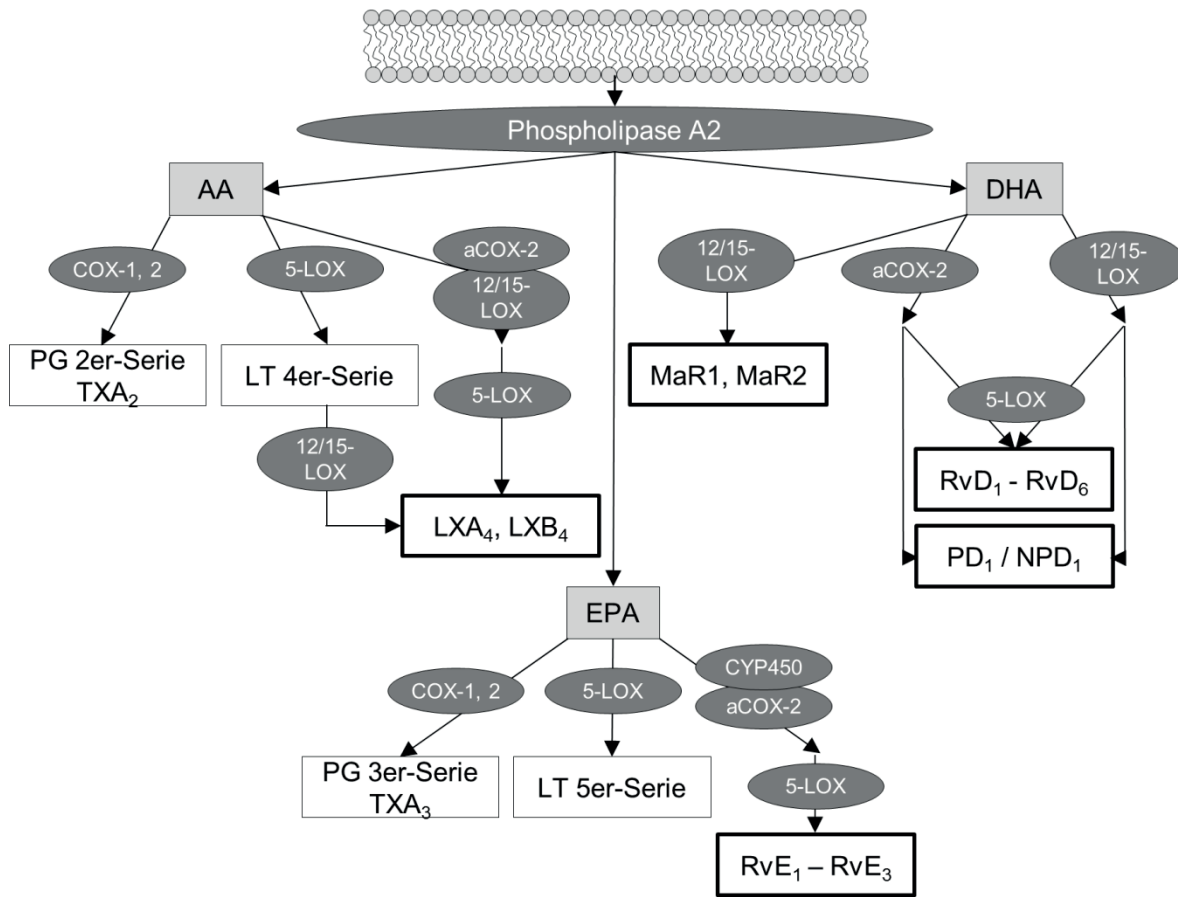


Abbildung 4: Stark vereinfachte schematische Darstellung der Synthese von Eicosanoiden und Docosanoiden in der Maus

Die ω -3- und ω -6-Fettsäuren (FS) sind Bestandteil der Phospholipide von Zellmembranen und werden durch die Phospholipase A2 freigesetzt. Aus Arachidonsäure (AA) und Eicosapentaensäure (EPA) werden Eicosanoide gebildet und aus Docosahexaensäure (DHA) Docosanoide. Prinzipiell konkurrieren die ω -3-FS EPA und DHA mit der ω -6-FS AA um die gleichen Enzymsysteme, Cyclooxygenasen (COXs) und Lipoxygenasen (LOXs). Durch COX-1 oder COX-2 wird AA zu Prostaglandinen (PG) der 2er-Reihe sowie Thromboxan A₂ (TXA₂) und durch 5-LOX zu Leukotrienen (LT) der 4er-Reihe umgebaut. Diese Metaboliten besitzen eine starke pro-inflammatorische Wirkung. Es können aber auch „specialized pro-resolving lipid mediators“ (SPMs) bei einer enzymatischen Metabolisierung von AA entstehen. Lipoxin A₄ (LXA₄) bzw. LXB₄ können auf unterschiedlichen Wegen durch die enzymatische Wirkung verschiedener LOX oder auch über Mitwirkung der acetylierten COX-2 (aCOX-2) synthetisiert werden. PG der 3er-Reihe, TXA₃ und LT der 5er-Reihe werden aus EPA produziert, ebenfalls durch COX-1 oder COX-2 sowie 5-LOX. Unter Zuhilfenahme von Cytochrom P450 (CYP450) oder aCOX-2 entstehen aus EPA Zwischenprodukte, die durch 5-LOX zu Resolvin E₁ (RvE₁) – RvE₃ umgebaut werden. DHA wird über 12/15-LOX zu Maresin (MaR1, MaR2) metabolisiert. Durch aCOX-2 oder 12/15-LOX entstehen aus DHA Zwischenprodukte, die mit Hilfe der 5-LOX zu Resolvin D₁ (RvD₁) – RvD₆ metabolisiert werden können. Aus diesen Zwischenprodukten kann allerdings auch Protektin D₁ (PD₁) bzw. Neuroprotektin D₁ (NPD₁) entstehen. SPMs sind mit einem fetten Kasten gekennzeichnet. Es ist zu beachten, dass durch die Wirkung der aCOX-2 SPMs mit abweichender Konformation entstehen, was allerdings bei dieser schematischen Darstellung nicht berücksichtigt wurde. (Modifiziert nach [136, 372, 373]).

2 Die Bedeutung von ω -3-Fettsäuren für das Gehirn und Neuroinflammation

Im Gehirn gehört über ein Drittel der vorhandenen FS zur Gruppe der mehrfach ungesättigten Fettsäuren („polyunsaturated fatty acids“, PUFAs) [374]. Davon machen AA und DHA den größten Anteil aus, weniger ihre Vorläufer LA und α LNA [374]. In den

Zellmembranen des ZNS liegen ungefähr 50 % der PUFAs als DHA vor, wobei die höchsten DHA-Konzentrationen in Synapsen und Photorezeptorzellen zu finden sind [352]. DHA kann im Gehirn nicht synthetisiert werden, sondern wird in der Leber produziert und gelangt über die Zirkulation zum Gehirn [375]. Unverestertes DHA kann die BHS frei passieren oder über „*fatty acid transporter proteins*“ (FATPs) in das Gehirn transportiert werden [376]. Für den Übertritt von veresterter Lysophosphatidylcholin-DHA wurde ebenfalls ein Transporter entdeckt. Dieses „*major facilitator superfamily domain-containing protein 2*“ (Mfsd2a) wird ausschließlich von Endothelzellen der BHS exprimiert und dient dem Transport von verschiedenen Lysophosphatidylcholin-PUFAs [377]. DHA wird eine große Bedeutung für das Wachstum, die Entwicklung und die Funktion des Gehirns zugesprochen. Es wirkt neuroprotektiv [378], fördert die Neurogenese [379] und die hippocampale Synaptogenese [380]. So ging eine reduzierte DHA-Konzentration im Gehirn von Mfsd2a-defizienten Mäusen mit einer Mikroencephalie, kognitiven Defiziten, Angstzuständen und einer reduzierten Neuronenanzahl in Hippocampus und Cerebellum einher [377]. In Gehirnen von Alzheimer-Patienten sind ebenfalls reduzierte DHA-Konzentrationen in Korrelation zur Dauer der Erkrankung nachweisbar [381]. Im Gegensatz zu DHA liegt EPA im Gehirn nur in sehr geringen Konzentrationen vor und kumuliert dort nicht [352, 382].

Nachfolgend werden einige ausgewählte Ergebnisse zur Bedeutung von ω -3-FS in Bezug auf Neuroinflammation dargestellt.

In verschiedenen Studien wurde ein hemmender Effekt von DHA auf die Aktivität von Mikrogliazellen nachgewiesen. Dies ging beispielsweise mit einer reduzierten Produktion von pro-inflammatorischen Zytokinen wie TNF α , IL-6 und IL-1 β einher [383-385]. Sowohl eine akute als auch chronische, über sechs Wochen täglich erfolgte, i.p. Injektion von DHA führten in einem Ischämie-Reperfusion-Modell der Ratte zu einer reduzierten Leukozyteninfiltration und einer geringeren IL-6 Expression in den betroffenen Gehirnarealen [386]. In einer humanen Studie wurde bei Freiwilligen durch eine zweimalige, sechsstündige *intravenöse* (i.v.) Applikation von Fischöl (48 und 24 Stunden vor LPS i.v.) LPS-induziertes Fieber und die Konzentration von TNF α im Plasma reduziert [387]. In einer anderen Untersuchung führte eine tägliche Substitution von ω -3-FS über einen Zeitraum von 3 – 4 Wochen ebenfalls zu vermindertem LPS-induziertem Fieber, allerdings zeigte sich dieser Unterschied erst vier Stunden *post injectionem* (p.i.). Die TNF α -Konzentrationen im Plasma der humanen Probanden blieben bei diesem Versuch unverändert [388]. Ferguson *et al.* (2014) verglichen die Wirkungen einer hohen Dosis von EPA und DHA (3600 mg/d, 6 – 8 Wochen) aus Fischöl sowie einer geringeren Dosis (900 mg/d, 6 - 8 Wochen) mit der eines Placebos in gesunden Freiwilligen. Das LPS-induzierte Fieber konnte nur durch die hohe

Dosis des Fischöls verhindert werden und ging mit reduzierten Konzentrationen an zirkulierenden Zytokinen einher [389]. In Mäusen konnten die Symptome einer i.c.v. Verabreichung von LPS durch unveresterte DHA reduziert werden [390]. Ein 23 %iger Anstieg der veresterten DHA-Phospholipide zeigte in diesen Versuchen hingegen keine protektive Wirkung gegenüber der akuten LPS-induzierten Neuroinflammation. Dennoch wurde ein Anstieg der veresterten DHA-Phospholipide als wichtige Quelle zur Freisetzung der unveresterten, entzündungsauflösend-wirkenden DHA postuliert [390]. Orr *et al.* (2013) machen für den beobachteten Effekt zumindest teilweise eine Metabolisierung von DHA zu SPMs (Neuroprotektin D1, Protektin D1) verantwortlich [390].

Neben der DHA-abhängigen Wirkung durch die Metabolisierung zu entzündungsauflösenden SPMs werden einige der Effekte auch direkt auf DHA zurückgeführt. In Splenozyten von Fat-1 Mäusen konnte unter anderem eine hemmende Wirkung auf die LPS-stimulierte NFκB-Aktivierung gezeigt werden [391]. Eine durch den Einbau von DHA in die Zellmembran gestörte Oberflächenpräsentation der LPS-Rezeptoren CD14 und TLR4 [385] kommt dafür ursächlich in Frage. Da auch SPMs eine der TLR4-Bindung nachgeschaltete NFκB-Aktivierung zu reduzieren vermögen [392, 393], könnten SPMs als Metaboliten der DHA allerdings ebenfalls zur Hemmung des NFκB-Signalweges beitragen.

3 Genauere Beschreibung der pro-entzündungsauflösenden Wirkung einiger ausgewählter „specialized pro-resolving lipid mediators“

In der vorliegenden Arbeit wurde unter Zuhilfenahme der Flüssigchromatographie mit Massenspektrometrikopplung („liquid chromatography-mass spectrometry“, LC-MS/MS) untersucht, ob LPS- oder HMGB1-Stimulation der Primärkulturen eine Freisetzung von Eicosanoiden sowie Docosanoiden induziert (siehe Kapitel IVB). Deshalb wird nachfolgend genauer auf die untersuchten SPMs RvD₁, RvD₂, Maresin 1 und Neuroprotektin D₁ eingegangen. Die analysierten Eicosanoide wurden in Kapitel IA2.1.2.3 bereits beschrieben.

Grundsätzlich ist zu sagen, dass sich die Wirkungen der SPMs überschneiden. Die durch SPMs induzierte Entzündungsauflösung geht im Allgemeinen mit einer Verhinderung der weiteren Leukozyteninfiltration in das Gewebe und einer gesteigerten Phagozytose von Zelltrümmern und apoptotischen Zellen einher [135]. Nachfolgend werden die unvollständig verstandene Wirkung und das Vorkommen der verschiedenen SPMs in ausgewählten Organsystemen zusammengefasst.

Im Hippocampus der Maus wurden unter anderem Neuroprotektin D₁, Maresin 1, RvE₁ und RvD₅ nachgewiesen, allerdings weder RvD₁ noch RvD₂ [390]. In Serumproben von gesunden Menschen wurden RvD₁, RvE₁ und RvE₂ detektiert [394, 395]. Nach einer Supplementierung von ω-3-FS lagen diese Resolvine in Konzentrationen vor, die *in vitro* und *in vivo* für einen

entzündungsauflösenden Effekt benötigt werden [396]. Exsudatproben eines Maus-Peritonitis-Modells enthielten RvE₂, RvD₁, RvD₃ und RvD₅ [395, 397].

Die SPMs können ihre Wirkung über G-Protein gekoppelte Rezeptoren (GPR) entfalten. So bindet RvD₁ an den „N-formyl peptide receptor 2“, der aufgrund seiner Interaktion mit Lipoxin A₄ auch ALX genannt wird, und an den humanen GPR32 [398]. Der GPR32 ist allerdings auch in der Lage weitere Resolvine der D-Reihe zu binden, nämlich RvD₅, RvD₃ und Aspirin-getriggertes RvD₃ [397, 399]. Auf Neuronen und Satelliten-Gliazellen aus Spinalganglien von Ratten konnte ALX immunhistochemisch detektiert werden [400]. Eine Expression von ALX in Mikrogliazellen wurde auch bereits nachgewiesen [392]. Protektin D₁ aktiviert spezifisch beispielsweise humane neutrophile Granulozyten [401]. Das führte zu der Annahme eines spezifischen Rezeptors; dieser ist allerdings noch nicht identifiziert worden.

Die Inkubation mikroglialer Zellkulturen mit RvD₁ oder RvE₁ bewirkte eine Reduktion der LPS-induzierten Expression von Zytokinen wie TNF α , IL-6 und IL-1 β [392]. Allerdings lagen zeitabhängige Effekte von RvD₁ und RvE₁ vor, die über unterschiedliche Signalwege vermittelt wurden [392]. Vergleichbare Ergebnisse waren auch bei einer Inkubation von Makrophagen ersichtlich. So sind RvE₁, RvD₁ und Maresin 1 in der Lage einen Wechsel des Phänotypes von Makrophagen zu bewirken, nämlich vom pro-inflammatorischen M1- zum anti-inflammatorischen M2-Phänotyp [402-404]. Anti-inflammatorische M2-Makrophagen produzieren wiederum SPMs wie Maresin und Lipoxin A₄ und weniger Prostaglandine sowie LTB₄ als M1-Makrophagen [361]. RvE₁, RvD₁ und Protektin D₁ bewirken eine Inhibition der induzierten transendothelialen Bewegung von neutrophilen Granulozyten [372]. Bei einem induzierten Schädel-Hirn Trauma konnte die mikrogliale Aktivierung durch mehrtägige i.p. Applikation von RvE₁ reduziert werden [405]. In einem Ischämie-Reperfusion-Modell der Maus wurde durch eine i.c.v. Injektion von Maresin 1 das Infarktvolume sowie die NF κ B-Aktivierung und die Expression pro-inflammatorischer Zytokine im Gehirn reduziert [393]. Resolvine sind außerdem durch zentrale und periphere Mechanismen auch an der Regulation des Schmerzes beteiligt [406, 407]. Insgesamt stellen SPMs demnach sehr vielversprechende therapeutische Strategien dar, sind in ihrer Bildung und Funktion allerdings noch unvollständig verstanden. Im Rahmen dieser Arbeit soll ein eigener kleiner Beitrag zum besseren Verständnis geleistet werden.

4 Fat-1 Maus als Tiermodell

Aufgrund der medizinischen Relevanz besteht ein großes Interesse der Wissenschaft sowie der pharmazeutischen Industrie darin, die molekularen Grundlagen der gesundheitsfördernden Wirkungen von ω -3-FS aufzuklären. Um die Bedeutung der ω -3-FS

für den Gesamtorganismus zu untersuchen, können Modelle einer diätetischen Substitution oder einer endogenen Synthese von transgenen Tieren verwendet werden.

Diätetisch erfolgt die Substitution in der Regel durch eine orale Verabreichung von Fischöl, das einen hohen ω -3-Fettsäuregehalt aufweist [349]. Ein Problem der diätetischen Supplementierung besteht in der reduzierten Vergleichbarkeit unterschiedlicher Fütterungsgruppen. Fischöle und pflanzliche Öle unterscheiden sich nicht nur in ihrem Gehalt an ω -6- und ω -3-FS, sondern weisen auch eine abweichende Zusammensetzung von gesättigten FS, einfach ungesättigten FS und Antioxidantien auf [408]. Außerdem sind in Fischölen häufig Kontaminationen mit Schwermetallen nachweisbar [409]. Der Reinheitsgrad sowie die Frische und damit der Oxidationsgrad der Öle sind entscheidende Faktoren für die Wirkung, da insbesondere PUFAs eine geringe Halbwertszeit aufweisen [410]. Auch eine unterschiedliche Akzeptanz der Futtermittel kann die Vergleichbarkeit einschränken. Die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse ist also ebenso schwer zu gewährleisten wie eine gute Vergleichbarkeit der diätetischen Gruppen untereinander.

Die Verwendung transgener Mäuse, welche zu einer endogenen Synthese von ω -3-FS befähigt sind, bietet demnach viele Vorteile gegenüber der diätetischen Supplementierung [410]. Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Fat-1 Mäuse sind transgen für das *Fat-1* Gen des Rundwurms *Caenorhabditis elegans* [411]. Die durch dieses Gen kodierte Desaturase ermöglicht den Einbau einer Doppelbindung an der ω -3-Position und damit eine Konvertierung von ω -6- zu ω -3-FS [412] (Abbildung 5).

Nach einer Fütterung von Distelöl wiesen Fat-1 Mäuse im Gehirn vergleichbare Mengen der ω -3-FS DHA auf, wie WT Mäuse nach einer Fütterung von Fischölen [413]. Bei gleicher Fütterung liegt in sämtlichen Geweben der Fat-1 Mäuse ein stark zu den ω -3-FS verschobenes Verhältnis vor [411]. So wurde im Gehirn der WT Mäuse ein ω -6 / ω -3-Fettsäureverhältnis von 3,9 nachgewiesen, hingegen wiesen die Gehirne der Fat-1 Mäuse ein Verhältnis von 0,8 auf [411]. Dabei ändert sich lediglich das Fettsäureverhältnis; die Gesamtmenge der FS im Gewebe von Fat-1 und WT Mäusen ist gleich [410]. Es bleibt außerdem noch zu erwähnen, dass die ω -3-FS bei den Fat-1 Mäusen nicht über ein physiologisches Maß hinaus angereichert werden [413, 414].

Als gutes Modell zur Untersuchung der gesundheitsfördernden Effekte von ω -3-FS wurden Fat-1 Mäuse bereits in zahlreichen Studien eingesetzt. So zeigten sie beispielsweise nach einer *intratrachealen* Applikation von LPS im Vergleich zu WT Mäusen reduzierte lokale Entzündungserscheinungen sowie eine beschleunigte Wiederherstellung der physiologischen Aktivität und der Körperkerntemperatur [415]. Auch eine LPS-induzierte hypothalamische Expression pro-inflammatorischer Zytokine konnte durch das veränderte

Fettsäureverhältnis der Fat-1 Mäuse reduziert werden [416]. Dabei blieben die LPS-induzierten kognitiven Defizite der WT Mäuse bei Fat-1 Mäusen aus.

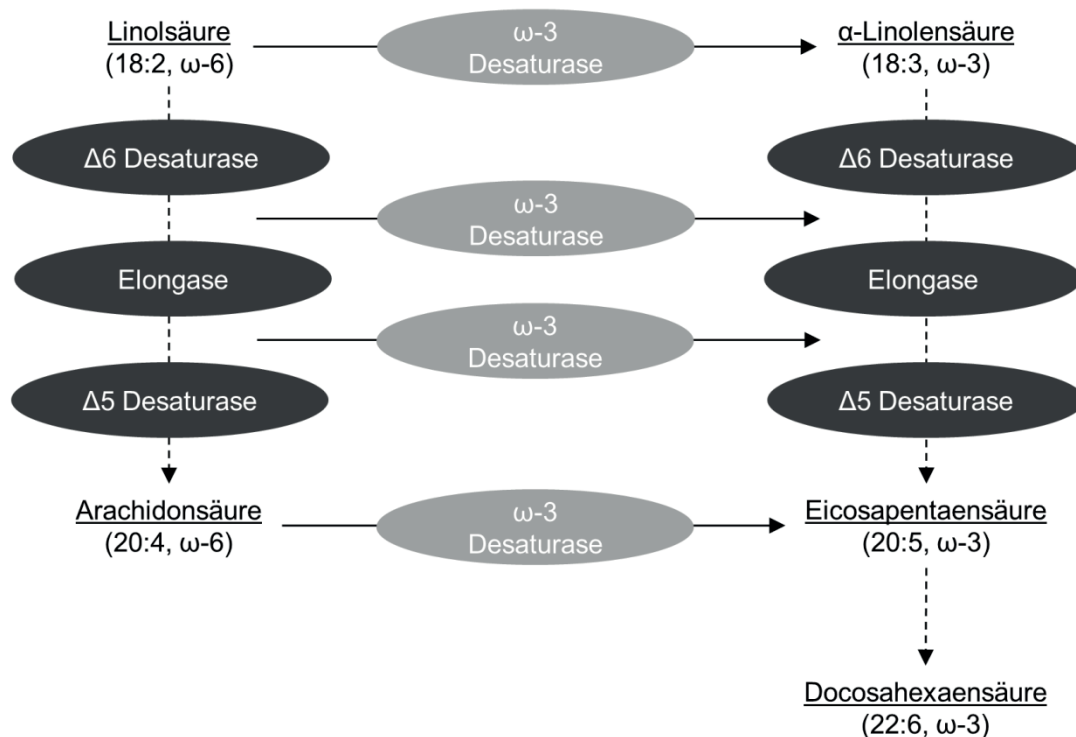


Abbildung 5: Vereinfachte schematische Darstellung des Metabolismus essentieller Fettsäuren in Fat-1 Mäusen

Die über die Nahrung aufgenommenen essentiellen Fettsäuren (FS) Linolsäure (18:2, ω -6) und α -Linolensäure (18:3, ω -3) werden durch die Δ 6 Desaturase, eine Elongase und die Δ 5 Desaturase über verschiedene Zwischenschritte zu Arachidonsäure (20:4, ω -6) bzw. Eicosapentaensäure (20:5, ω -3) metabolisiert. Dabei konkurrieren ω -3- und ω -6-FS um die gleichen Enzymsysteme. Im Säugetierorganismus ist keine Konvertierung von ω -6- zu ω -3-FS möglich. Hingegen kodiert das *Fat-1* Gen der transgenen Fat-1 Mäuse für die ω -3 Desaturase. Diese ermöglicht in sämtlichen Metabolisierungsschritten eine Umwandlung von ω -6 zu ω -3-FS. Aus der Eicosapentaensäure kann die Docosahexaensäure über verschiedene Wege metabolisiert werden. Da die einzelnen Zwischenprodukte sowie die genauen Synthesewege der Docosahexaensäure im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht von Bedeutung sind, wurde der Übersichtlichkeit halber auf ihre Darstellung verzichtet.

II FRAGESTELLUNGEN UND ZIELSETZUNG DER ARBEIT

Sicherlich sind jedes Tier und jeder Mensch irgendwann einer systemischen Entzündungsreaktion mit den einhergehenden zentralnervös kontrollierten Krankheitssymptomen des „sickness behaviors“ ausgesetzt. Diese Inflammation ist physiologischerweise selbstlimitierend und dient der Elimination des auslösenden Agens und einer vollständigen Wiederherstellung [1]. Doch auch sehr schwere, septische Inflammationen kommen mit einer hohen Inzidenz bei Tieren und in der Bevölkerung vor. Hierbei ist eine hohe Mortalitätsrate und eine andauernde Beeinträchtigung der Überlebenden zu verzeichnen [6, 7]. Altersassoziierte bzw. diätinduzierte Adipositas geht mit einer chronischen subklinischen Entzündung einher [266, 267, 269]. Diese chronischen Entzündungen sind Risikofaktoren für eine Reihe weiterer Erkrankungen (z. B. Diabetes mellitus) und sind ebenfalls von depressionsartigen Zuständen geprägt [285, 417], die in Grundzügen den Symptomen des „sickness behaviors“ entsprechen. Die molekularen Grundlagen der Aufrechterhaltung von inflammatorischen Prozessen sowie deren Auswirkung auf das Gehirn sind allerdings noch nicht hinreichend bekannt.

Der Fokus der hier vorliegenden Arbeit liegt auf der Betrachtung zweier möglicher Ursachen der dysregulierten Inflammation.

Zum einen wird untersucht, inwieweit endogene „toll-like“ Rezeptor (TLR)-Agonisten mit ihrem pro-inflammatorischen Potenzial an einer systemischen Entzündung beteiligt sein können. Zum anderen werden Untersuchungen zur Bedeutung der ω -3-Fettsäure (FS) in Hinblick auf eine Modulation physiologischer Parameter des „sickness behaviors“ durchgeführt. Sowohl die Neutralisation endogener TLR-Agonisten als auch die Substitution von ω -3-FS können als therapeutische Strategien weiterentwickelt werden. Dafür sind allerdings zusätzliche Erkenntnisse notwendig. In der hier vorliegenden Arbeit soll hierfür ein eigener Beitrag geleistet werden.

IIA In welchem Maß können endogene TLR-Agonisten eine systemische Inflammation potenziell induzieren bzw. aufrechterhalten?

Das Hauptaugenmerk liegt dabei auf dem „danger / damage-associated molecular pattern“ (DAMP) „high-mobility group box 1“ (HMGB1), das bereits für seine Funktion als später Mediator der Sepsis bekannt ist [226]. Ob HMGB1 aber direkt für die sich bei einer Sepsis entwickelnde Neuroinflammation verantwortlich ist, wurde bisher noch nicht untersucht. Diesbezüglich dient die vorliegende Arbeit der Beantwortung folgender Fragestellungen:

- Wird HMGB1 durch eine *intraperitoneale* (i.p.) Injektion von Lipopolysaccharid (LPS) freigesetzt? Wenn ja, zu welchen Zeitpunkten?
- Ist in peripheren Organen eine modulierte Expression von HMGB1 und seinen Rezeptoren nachweisbar?
- Führt eine systemische LPS-induzierte Inflammation zu einer Freisetzung von HMGB1 in Gehirnstrukturen, die für die Auslösung von Fieber wichtig sind?
- Werden durch HMGB1 Gehirnzellen in der *Area postrema* aktiviert?
 - Führt eine Inkubation mit HMGB1 zu einer genomischen Aktivierung der Zellen?
 - Wenn ja, welche Transkriptionsfaktoren werden aktiviert und welche Zytokine werden dadurch möglicherweise synthetisiert?
 - Reagieren neuronale sowie gliale Zellen der *Area postrema* direkt auf HMGB1?
 - Inwiefern bewirkt HMGB1 im Vergleich zu LPS eine gesteigerte Synthese von pro-inflammatorischen oder anti-inflammatorischen Lipidmediatoren in Primärkulturen der *Area postrema*?

Das Fettgewebe ist ein Syntheseort für eine Reihe von zirkulierenden pro- und anti-inflammatorischen Mediatoren. Es beeinflusst neben lokalen inflammatorischen Prozessen auch die Entwicklung systemischer Entzündungsreaktionen und ist dadurch auch an der sich hierbei entwickelnden Neuroinflammation bzw. der Entzündung im Gehirn beteiligt [285]. Eine umfangreiche, vergleichende Untersuchung der durch DAMPs oder „pathogen-associated molecular patterns“ (PAMPs) induzierten Freisetzung von Zytokinen und Adipokinen aus dem Fettgewebe wurde jedoch bisher noch nicht durchgeführt. Folgende Fragestellungen werden in der hier vorliegenden Arbeit diesbezüglich behandelt:

- Wird durch eine Inkubation des Fettgewebes mit den relevanten DAMPs HMGB1 und Biglykan eine Synthese von Adipokinen und Zytokinen induziert?
- Welchen Einfluss hat im Vergleich dazu eine Inkubation mit dem PAMP LPS auf die Sekretion durch das Fettgewebe?
- Führt altersassoziierte Adipositas zu einer Modulation der Sekretion?
- Wie unterscheiden sich die Fettgewebslokalisationen in ihrem Sekretionsprofil?

IIB Welchen Einfluss haben ω -3-Fettsäuren auf physiologische Vitalparameter und periphere Entzündungsanzeichen?

Die Bedeutung von ω -3-FS wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit insbesondere hinsichtlich einer möglichen Beeinflussung physiologischer Vitalparameter sowie peripherer Entzündungsreaktionen untersucht:

- Zeigen Fat-1 Mäuse verglichen mit Wildtyp (WT) Mäusen eine abweichende Reaktion auf die i.p. Injektion von LPS?
 - Liegen veränderte Vitalparameter oder abweichende, periphere Entzündungsparameter vor?
- Gibt es unterschiedliche Veränderungen der Vitalparameter von Fat-1 Mäusen im Vergleich zu WT Mäusen als Reaktion auf psychologischen Stress?

III MATERIAL UND METHODEN

IIIA Materialien

Technische Geräte

Tabelle 2: Allgemeine technische Geräte für die Bearbeitung dieses Dissertationsprojektes

Gerät	Typ	Hersteller
Absaugpumpe	Minni A	Leybold-Heraeus, D-Hanau
Autoklav	2540 E	Systec, D-Wettenberg
Binokular mit Kamera	SMZ-U	Nikon Deutschland, D-Düsseldorf
Binokular	Stemi SV 11	Carl Zeiss AG, D-Oberkochen
Bipolarer Temperaturfühler	CL-100	Warner Instruments, Hamden, CT, USA
Calcium-Imaging System bestehend aus		Visitron Systemns GmbH, D-Puchheim
digitale Schwarz/weiß Kamera	Spot Pursuit, Model 23.0	Visitron Systems GmbH, D-Puchheim
Filterrad und Steuereinheit	MAC 5000	Ludl Electronic Products Ltd, New York, NY, USA
Fluoreszenzlampe	BH2-RFL-T3	Olympus Optical, D-Hamburg
Inverses Mikroskop	IMT-2	Olympus-Optical D-Hamburg
Kompressor	Silent 30	MAGV GmbH, D-Rabenau
Kondensator	IMT-NAC 2	Olympus Optical D-Hamburg
Schwingungsfreier Tisch	WS-5	TMC, Peabody, MA, USA
Teflon Zellkultur Messkammer		Werkstatt Kerckhoff Institut, D- Bad Nauheim
Wechselspannungs- stabilisator		Wandel & Goltermann, D-Reutlingen
CO ₂ -Inkubator	BB-15 Function Line	Thermo Scientific, D-Dreieich
Dataport	Dietscan Analyser	Accu Scan Instruments Inc., Columbus, OH, USA
Eismaschine	Icematic F120 und D100	CastelMAC S.p.A., I-Castefranco Veneto
Elektrophorese-Kammer	G45/1	Biometra, D-Göttingen
Elektrospray Ionisationsquelle		
ELISA-Reader	Digiscan	Asys Hitech, Eugendorf, Österreich
Fluoreszenzmikroskop mit:	BX50	Olympus Optical, D-Hamburg
digitale schwarz/weiß Kamera	Spot Insight, Model 3.1.0	Visitron Systems GmbH, D-Puchheim

Gerät	Typ	Hersteller
Kryostat	CryoStar NX50	Thermo Scientific, D-Dreieich
Heißluftsterilisator	ED 115/E2	Binder GmbH, D-Tuttlingen
Hybrid-Quadrupol-Orbitrap Massenspektrometer	Q-Exactive	Thermo Scientific, D-Dreieich
Klimagerät (Stall, Mäuse)	RC-E3	Mitsubishi, Minato, Japan
Klimagerät (Stall, Ratten)	RTE 7,5 TR/P	Rosenberg Ventilatoren GmbH, D-Künzelsau
Klimakammer	10'US/+5 to +40 DU	Firma Weiss Umwelttechnik, D-Reiskirchen
Kühlkammer	EP200ED	Viessmann, D-Allendorf
Luftstromschränke	UniProtect	Bioscape GmbH, D-Emmendingen
Mikroplatten Photometer	Digiscan	Asys Hitech, A-Eugendorf
Mikroskop	Fluovert FU	Leica Microsystems, D-Wetzlar
Mikrowelle		Technostar
Mikrozentrifuge	Force 7	Denver Instrument, Bohemia, NY, USA
Molecular Imager®	ChemiDoc™ XRS Imaging System	BioRad, D-München
Minizentrifuge	D-6015	neoLab, D-Heidelberg
Peltier Kühlung		Werkstatt Kerckhoff Institut, D-Bad Nauheim
Perfusionsanlage		Werkstatt Kerckhoff Institut, D-Bad Nauheim
pH-Meter	inoLab® 7110	WTW GmbH, D-Weilheim
Pipetten	8-Kanal, 0,1-2,5 / 0,5-2 / 2-10 / 2-20 / 10-100 / 20-200 / 100-1000 / 200-1000 / 500-2500 µl	Eppendorf AG, D-Hamburg
Pipetten	20 / 200 / 0,5-2 µl	Gilson Inc., Middleton, WI, USA
Pipettierhilfe	Pipetboy	Integra Biosciences GmbH, D-Fernwald
Power Supply	Power Pac 200	BioRad, D-München
„real-time“ PCR System	StepOnePlus™	Applied Biosystems, Foster City, Ca, USA
Reinstwassersystem zur Herstellung von doppelt entionisiertem Wasser (<i>Aqua bidest.</i>)	Milli-Q Biocel	Millipore, D-Eschborn
Schermaschine	GT104/GH204	Aesculap, D-Tuttlingen
Schlauchpumpe	Minipuls-3	Abimed Analysen Technik GmbH, D-Langenfeld
Schüttelapparat	3006	GFL GmbH, D-Burgwedel
Schüttelapparat	Polymax 2040	Heidolph Instruments GmbH & CO. KG, D-Schwabach

Gerät	Typ	Hersteller
Schüttelapparat	RotoMix Typ 50800	Thermo Fisher Scientific Inc., Walham, MA, USA
Schwanenhalslampe	KL 1500	Schott AG, D-Mainz
Sicherheits-Bunsenbrenner	Fireboy eco	Integra Biosciences GmbH, D-Fernwald
Solution In-Line Heater/Cooler Two Line		Harvard Apparatus, Holliston, MA, USA
Spectrophotometer	DU® 50	Beckman Coulter, Brea, CA, USA
Sterilbank	Microflow Biological Safety Cabinet	Thermo Scientific, D-Dreieich
Telemetrie-Dataport	DP-24 Dataport	Mini-Mitter Company Inc., Sunriver, OR, USA
Telemetrie-Empfängerplatten (Mäuse)	RA-1010	Mini-Mitter Company Inc., Sunriver, OR, USA
Telemetrie-Empfängerplatten (Mäuse)	RTA-500	Mini-Mitter Company Inc., Sunriver, OR, USA
Telemetrie-Empfängerplatten (Ratten)	ER-4000	Mini-Mitter Company Inc., Sunriver, OR, USA
Telemetrie-Sender (Mäuse)	VM-FH TR-3000	Mini-Mitter Company Inc., Sunriver, OR, USA
Telemetrie-Sender (Ratten)	PTD-4000 E-Mitter	Mini-Mitter Company Inc., Sunriver, OR, USA
Thermoblock	Blockthermostat BT 100	Kleinfeld Labortechnik GmbH, D-Gehrden
Thermoblock	QBT	VWR, D-Darmstadt
Thermocycler	Mastercycler gradient	Eppendorf AG, D-Hamburg
Tischrühr- und Heizgerät	RCT Basic	IKA® Werke GmbH & Co, KG, D-Staufen
Ultra-Hochleistungs-flüssigchromatograph	Dionex Ultimate 3000 RSLC	Thermo Scientific, D-Dreieich
Ultraschall-Homogenisator	SONOPLUS	Bandelin Electronic GmbH & Co KG, D-Berlin
Ultraschall-Wasserbad	EMMI 30	EMAG AG, D-Mörfelden-Waldorf
Vortexmischer	VF und VF2	IKA® Werke GmbH & Co, KG, D-Staufen
Waagen zum Abwiegen von Trockensubstanzen	P1210N, AE 50 und PM 2500	Mettler Toledo, D-Gießen
Waagen (Futter)	EK-200i	AD Instruments Ltd., Abingdon, UK
Waage (Tiere)	TB31000P-000D002	Sartorius AG, D-Göttingen
Waagen (Wasser)	EW-300G	AD Instruments Ltd., Abingdon, UK
Wärmematte		MarMed GmbH, D-Cölbe
Wärmematten	Thermofol-Wärmefolie	Thermo Flächenheizungs GmbH, D-Rohrbach
Zentrifuge	Megafuge 1.0 R	Heraeus Sepatech GmbH, D-Osterode

Gerät	Typ	Hersteller
Zentrifuge	D-6015	
Zentrifuge	Spectrafuge mini	Neo Lab, D-Heidelberg
Zentrifuge für 96well Platten	Perfect Spin P	Peqlab Biotechnologie GmbH, D-Erlangen

Allgemeine Gebrauchsmaterialien

Tabelle 3: Allgemeine Gebrauchsmaterialien für die Bearbeitung dieses Dissertationsprojektes

Bezeichnung	Typ	Hersteller
Glasflaschen mit Deckel	Duran, verschiedene Volumina	Schott AG, D-Mainz
Bechergläser	Duran, verschiedene Volumina	Schott AG, D-Mainz
Magnetrührstäbchen	PTFE ummantelt	Roth GmbH, D-Karlsruhe
Messkolben	Klasse A, 1-, 2- und 5 l	Roth GmbH, D-Karlsruhe
Messzylinder	Klasse A, 100- und 250 ml	Roth GmbH, D-Karlsruhe
Reaktionsgefäßständer		Roth GmbH, D-Karlsruhe
Schraubdeckeldosen	unsteril: 40 ml	Roth GmbH, D-Karlsruhe

Allgemeine Verbrauchsmaterialien**Tabelle 4: Allgemeine Verbrauchsmaterialien für die Bearbeitung dieses Dissertationsprojektes**

Bezeichnung	Typ	Hersteller
Alufolie	0954.1	Roth GmbH, D-Karlsruhe
Dualfilter T.I.P.S.	0,1-10 / 0,5-20 / 2-100 / 50-1000 µl	Eppendorf AG, D-Hamburg
Einmalhandschuhe Latex	No. 1202	Unigloves GmbH, D-Troisdorf
Einmalhandschuhe Nitril	7005 PFS	Showa Best Glove, Menlo, GA, USA
Einmalhandschuhe Supergrip	900-2536	Henry Schein Vet GmbH, D-Hamburg
Labortücher	Kimtech Science Delicate Task Wipes	Kimberley-Clark Europe Limited, Surrey, UK
Labortücher	Kimtech Science Precision Wipes	Kimberley-Clark Europe Limited, Surrey, UK
Parafilm®	PM-996	Bemis Flexible Packaging, Neenah, WI, USA
Pasteur-Pipetten	einweg	MAGV GmbH, D-Rabenau
Pipettenspitzen ohne Filter	10 / 100 / 1000 µl	MAGV GmbH, D-Rabenau
PS-Röhrchen	steril: 12 / 15 / 50 ml	
Reaktionsgefäße	15 / 50 ml	Sarstedt AG und Co. KG, D-Nümbrecht
Reaktionsgefäße	0,5 / 1,5 / 2 ml	MAGV GmbH, D-Rabenau
Safe-Lock Tubes	Reaktionsgefäße 3810, 0,5 / 1,5 / 2 ml	Greiner Bio-One GmbH, D-Frickenhausen
serologische Pipetten	steril: 5 / 10 / 25 ml	Sarstedt AG und Co. KG, D-Nümbrecht
Skalpellklingen	BB522	Aesculap-Werke AG, D-Tuttlingen
Zentrifugenröhrchen	steril: 15 / 20 ml	Sarstedt AG und Co. KG, D-Nümbrecht

Software**Tabelle 5: Im Rahmen dieses Dissertationsprojektes benötigte Software**

Programm	Version	Hersteller
Accudiet	1.20	Accuscan Instruments Inc., Columbus, OH, USA
Adobe Photoshop	6.0	Adobe System Inc., San Jose, CA, USA
Corel Draw	9	Corel Corporation, Ottawa, Canada
EndNote	X5	Adept Scientific GmbH, D-Frankfurt
GraphPad Prism®	5	GraphPad Software, San Diego, CA, USA
IrfanView	64 4.41	Irfan Skiljan, Wien, Österreich

Programm	Version	Hersteller
Metafluor	7.7.8.0	Visitron Systems GmbH, D-Puchheim
Metamorph	7.7.5.0	Visitron Systems GmbH, D-Puchheim
Microsoft Office Excel	2003 / 2007	Microsoft Corporation, D-Unterschleißheim
Microsoft Office Word	2003 / 2007	Microsoft Corporation, D-Unterschleißheim
Normfinder		Department of Molecular Medicine, Universität Aarhus, Aarhus, Dänemark
Quantity One® Software	4.6.9	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA
Statistica	10	Stat Soft Europe GmbH, D- Hamburg
StepOne Software	V2.1	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
VitalView	3.1	Mini Mitter Co. Inc., Bend, OR, USA

Die für die angewendeten Methoden speziell benötigten Ge- und Verbrauchsmaterialien, Chemikalien sowie Lösungen und Puffer sind zu Beginn der entsprechenden Kapitel angeführt.

IIIB Versuchstiere

1 Ratten

Ge- und Verbrauchsmaterialien für die Rattenzucht und -haltung

Tabelle 6: Für die Rattenzucht und –haltung benötigte Ge- und Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Typ	Hersteller
Einstreu für Tierkäfige	Lignocel	JRS, GmbH, D-Rosenberg
Polycarbonatkäfige	Typ III	Ehret GmbH & Co. KG Labor- und Pharmatechnik, D-Emmendingen
Polycarbonatkäfige	Typ IV	Ehret GmbH & Co. KG Labor- und Pharmatechnik, D-Emmendingen
Standard Rattenfutter	R-Z V1324-000	Ssniff Spezialdiäten GmbH, D-Soest
Wasserflasche		Ehret GmbH & Co. KG Labor- und Pharmatechnik, D-Emmendingen

Wistar-Ratten der hauseigenen Zucht wurden für die *in vitro* Versuche (IIID1, IIID2) sowie für die *in vivo* Versuche, die im Rahmen des „high-mobility group box 1“ (HMGB1) Projektes (IIIC1) durchgeführt wurden, verwendet. Die Elterntiere wurden von Charles River WIGA Deutschland GmbH (Sulzfeld) bezogen. Die Zucht und Haltung erfolgte bei einer kontinuierlichen Raumtemperatur von 21 ± 1 °C sowie einer Luftfeuchtigkeit von 50 %. Dabei lag ein künstliches Lichtregime mit einem 12 / 12 Stunden hell / dunkel Rhythmus, mit Licht von 7.00 Uhr bis 19.00 Uhr, vor. Die Polycarbonatkäfige befanden sich in Luftstromschränken.

Für die Zucht wurden getrenntgeschlechtliche Paare gebildet, die bis zum Auftreten eindeutiger Trächtigkeitssymptome als Paar in transparenten Typ IV Polycarbonatkäfigen verblieben. Anschließend wurde der Bock in eine gleichgeschlechtliche Gruppe (Typ III Polycarbonatkäfig) oder zu einem anderen Weibchen gesetzt. Die Jungtiere blieben bis zum Erreichen eines Absetzgewichtes von 110 ± 10 g bei dem Muttertier. Nach dem Absetzen der Jungtiere wurden gleichgeschlechtliche Gruppen von bis zu fünf Tieren gebildet, die gemeinsam in transparenten Typ III Polycarbonatkäfigen gehalten wurden. Während der gesamten Zucht- und Halungsperiode standen Futter und Wasser *ad libitum* zur Verfügung.

2 Mäuse

Ge- und Verbrauchsmaterialien für die Mäusezucht und –haltung (C57BL6/N)

Tabelle 7: Für die Mäusezucht und –haltung (C57BL6/N) benötigte Ge- und Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Typ	Hersteller
Einstreu	H1 505 29	Ssniff Spezialdiäten GmbH, D-Soest
Filtertops		Ehret GmbH & Co. KG Labor- und Pharmatechnik, D-Emmendingen
Futter	M-Z Extrudat V1126	Ssniff Spezialdiäten GmbH, D-Soest
Häuschen / Röhren		Ehret GmbH & Co. KG Labor- und Pharmatechnik, D-Emmendingen
Nagehölzer	ABEDD® Nagehölzer Größe S, NGS E-021	Lab & Vet Service GmbH, D-Köflach
Nestlets		Ssniff Spezialdiäten GmbH, D-Soest
Polycarbonat-Käfig	Typ III	Ehret GmbH & Co. KG Labor- und Pharmatechnik, D-Emmendingen
Wasserflaschen mit Tränkenippel		Ehret GmbH & Co. KG Labor- und Pharmatechnik, D-Emmendingen
Zellstoff		MAGV GmbH, D-Rabenau

2.1 **Mausstämme**

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

Bei den Fat-1 Mäusen handelt es sich um transgene Tiere, die durch das Fat-1 Gen des Rundwurms *Caenorhabditis elegans* zu einer endogenen Synthese von ω -3-Fettsäuren (FS) befähigt sind. Dieses Gen kodiert für eine ω -3 Desaturase, welche das Einfügen einer Doppelbindung an der ω -3 Position von ω -6-FS bewirkt. So wird eine endogene Konvertierung von ω -6- zu ω -3-FS ermöglicht [411] (siehe Kapitel ID4). Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Fat-1 Mäuse wurden direkt aus der Zucht der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Mayer, Zentrum für Innere Medizin, Medizinische Klinik II, der Justus-Liebig-Universität (JLU) Gießen bezogen. Die Genotypisierung potenziell für den Versuch einzusetzender Tiere (IIIB2.3) erfolgte unmittelbar nach dem Absetzen, um geventuelle männliche Fat-1 Mäuse für eine drei- bis vierwöchige Akklimatisierungsphase in die institutseigene Haltung zu überführen.

2.1.2 C57BL6/N

Männliche C57BL6/N Mäuse dienten als Kontrolltiere zu den Fat-1 Mäusen und werden im weiteren Verlauf dieser Arbeit als Wildtyp (WT) bezeichnet. Die Zucht und Haltung dieser Mäuse erfolgte in den institutseigenen Stallungen. Sie wurde durch männliche und weibliche Mäuse, die in einem Alter von 6 - 8 Wochen von Charles River WIGA Deutschland GmbH (Sulzfeld) bezogen wurden, etabliert und regelmäßig aufgefrischt.

2.2 Haltung und Zucht der C57BL6/N Mäuse

Da lediglich die Haltung und Zucht der Mäuse vom C57BL6/N Stamm in der institutseigenen Tierhaltung erfolgte, wird im Rahmen dieser Arbeit lediglich die Haltung dieser Mäusen beschrieben. Ich war an der tierärztlichen Überwachung maßgeblich beteiligt.

Die Mäuse wurden in Polycarbonatkäfigen (Typ III) mit Filtertopabdeckung in Kleingruppen gehalten. Eine Einzeltierhaltung fand nur im Rahmen der genehmigten Tierversuche statt, oder wenn eine Gruppenhaltung zum Schutz einzelner Tiere nicht möglich war. In dem Haltungs- und Zuchtraum lag eine konstante Raumtemperatur von 23 ± 1 °C, eine relative Luftfeuchtigkeit von 50 % und ein künstliches Beleuchtungsregime vor, welches auf eine Lichtphase von 07.00 Uhr bis 19.00 Uhr eingestellt war. Die Polycarbonatkäfige befanden sich in einem Luftstromschrank. Die Käfige wurden mit Einstreu und rot transparenten Röhren oder Häuschen bestückt. Außerdem standen den Mäusen Nestlets als Nestbau- und Beschäftigungsmaterial sowie Nagehölzer zur Verfügung.

Für die Zucht wurden „Mating Trios“ gebildet. Sie bestehen aus einem Mausbock und zwei weiblichen Mäusen. Dies diente der Etablierung einer effizienten Zucht und der gegenseitigen Unterstützung bei der Aufzucht der Jungtiere. Kurz vor der Geburt erfolgte ein Umsetzen der männlichen Tiere zu anderen Weibchen. Nach 3 - 4 Wochen wurden die Jungtiere abgesetzt und getrenntgeschlechtliche Kleingruppen gebildet. Männliche Nachzucht wurde als WT Maus für die *in vivo* Versuche des Fat-1 Projektes verwendet. In regelmäßigen Abständen wurden Männchen aus der Nachzucht nicht für den Versuch, sondern für die Remontierung genutzt. Weibchen, die nicht für die Remontierung benötigt wurden, dienten als Sentineltiere (IIIB3). Zusätzlich zur Remontierung aus der eigenen Nachzucht wurden Jungtiere von Charles River WIGA Deutschland GmbH bezogen. Sie wurden in der institutseigenen Haltung aufgezogen und schließlich als Zuchttiere verwendet.

2.3 Genotypisierung der Fat-1 Mäuse

Die Entnahme der Gewebeproben für die Genotypisierung von Fat-1 Mäusen erfolgte durch die Tierpfleger in der Tierhaltung der Arbeitsgruppe Mayer im biomedizinischen

Forschungszentrum Seltersberg der JLU. Diese Proben wurden im Rahmen der Kennzeichnung als Ohrstanzproben gewonnen. Die weitere Bearbeitung erfolgte am Institut für Veterinär-Physiologie und –Biochemie.

Ge- und Verbrauchsmaterialien für die Genotypisierung der Fat-1 Mäuse

Tabelle 8: Für die Genotypisierung benötigte Ge- und Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Typ	Hersteller
0,2 ml 8er PCR-Strips Röhrchen farblos	781320	Brand GmbH und Co. KG, D-Wertheim
18er - Kamm		Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA
8er PCR-Strips Deckel farblos gewölbt	781340	MAGV GmbH, D-Rabenau
Gelgießform		Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA
Papierfilter	Hahnemühle, DF 604 240	MAGV GmbH, D-Rabenau

Chemikalien für die Genotypisierung der Fat-1 Mäuse

Tabelle 9: Für die Genotypisierung benötigte Chemikalien

Bezeichnung	Hersteller
Borsäure	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, D-München
doppelt entionisiertes Wasser (<i>Aqua bidest.</i>)	Millipore Reinstwassersystem
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, D-München
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, D-München
peqGOLD Tissue DNA Mini Kit (S-line)	PEQLAB Biotechnologies GmbH, D-Erlangen
Ready-Load 100bp DNA-Ladder	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
RedTaq DNA-Polymerase	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, D-München
Trizma-Base	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, D-München
UltraPure™ Agarose	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA

Tabelle 10: Für die Genotypisierung der Fat-1 Mäuse verwendete Primer. Diese wurden in einer Gebrauchskonzentration von 10 pmol/µl verwendet

Primer	Sequenz	Hersteller
Primer 1 FAT-1F	5'-TG TTCATGCCTTCTTCTTTTCC-3'	Eurofins Genomics GmbH, D-Ebersberg
Primer 1 FAT-1R	5'-GCGACCATACCTCAA ACTTGGA-3'	Eurofins Genomics GmbH, D-Ebersberg

Lösungen und Puffer für die Genotypisierung der Fat-1 Mäuse**Tabelle 11: Für die Genotypisierung benötigte Lösungen und Puffer**

Bezeichnung	Zusammensetzung	
EDTA Stammlösung (0,5 M)	EDTA	95,05 g
	NaOH	pH einstellen (8,0)
	<i>Aqua bidest.</i>	auffüllen auf 500 ml
	durch Papierfilter geben und autoklavieren	
Lösung für 2 %iges Agarose-Gel	Agarose	1 g
	TBE–Gebrauchslösung	50 ml
	Ethidiumbromid	2,5 µl
Mastermix für die PCR	Zusammensetzung pro Probe:	
	RedTaq DNA-Polymerase	7,5 µl
	Primer 1 FAT-1F	0,6 µl
	Primer 1 FAT-1R	0,6 µl
TRIS-Borat-EDTA (TBE) Stammlösung	Trizma Base	54 g
	Borsäure	27,5 g
	EDTA–Stammlösung	20 ml
	NaOH	pH einstellen (8,26 – 8,3)
TBE Gebrauchslösung	<i>Aqua bidest.</i>	auffüllen auf 1 l
	TBE Stammlösung	100 ml
	<i>Aqua bidest.</i>	900 ml

2.3.1 DNA – Isolation aus Ohrstanzproben der Fat-1 Mäuse

Für die Isolation der Desoxyribonukleinsäure („deoxyribonucleic acid“, DNA) aus den Ohrstanzproben wurde ein DNA-Extraktions-Kit der Firma PEQLAB Biotechnologie verwendet (peqGOLD Tissue DNA Mini Kit). Die Isolation erfolgte dabei aufgrund der selektiven und reversiblen Bindungseigenschaften der mitgelieferten Silikamembranen, die bis zu 30 µg DNA binden können. Zunächst wurde eine Homogenisierung der Ohrstanzproben durchgeführt und so eine Freisetzung der DNA aus dem Zellkern bewirkt. Anschließend wurde die entstandene Lösung auf eine mitgelieferte Säule geladen und die DNA an die Silikamembran gebunden. Weiterführende Waschschrte dienen der Beseitigung von zellulärem Debris, Proteinen sowie sonstigen Kontaminationen. So wurde schlussendlich die reine DNA von der Membran gelöst und für die weiterführende Bearbeitung in einem sterilen Reaktionsgefäß aufgefangen. Bis zur Amplifikation der gewonnenen DNA erfolgte eine Lagerung bei -18 °C.

Tabelle 12: Arbeitsschritte für die Isolation von DNA aus Ohrstanzproben der Fat-1 Mäuse

Arbeitsschritt	Funktion	Dauer
400 µl „DNA Lysis Buffer T“ 20 µl Proteinase K 15 µl RNase A in das Reaktionsgefäß mit der Gewebeprobe geben, vortexen und bei 50 °C inkubieren	Auflösung des Zellverbands, Zerstörung der RNA und Freisetzung der DNA	1 h
zentrifugieren: 10.000 rpm	Pelletieren von unlöslichem Debris	30 sec
Überführen des Überstands in ein neues Reaktionsgefäß	Entfernung des unlöslichen Debris	
200 µl „DNA Binding Buffer“ dem Lysat zugeben und mit Hilfe der Pipette mischen	Herstellung einer homogenen Mischung mit ausgefallter DNA	
Mischung auf die Säule geben zentrifugieren: 10.000 rpm Durchfluss verwerfen	Bindung der DNA an Silikamembran	2 min
650 µl „DNA Wash Buffer“ auf die Säule geben zentrifugieren: 10.000 rpm Durchfluss verwerfen	Entfernung von löslichem Debris, Proteinen und anderen Kontaminationen	1 min
650 µl „DNA Wash Buffer“ auf die Säule geben zentrifugieren: 10.000 rpm Durchfluss verwerfen	Entfernung von löslichem Debris, Proteinen und anderen Kontaminationen	1 min
zentrifugieren: 10.000 rpm	essentielle Trocknung der Silikamembran	2 min
Säule in ein steriles 2 ml Reaktionsgefäß stellen		
200 µl „Elution Buffer“ (70 °C) auf die Säule geben Inkubation bei 70 °C	Ablösung der DNA von der Silikamembran der Säule	3 min
zentrifugieren: 6.000 rpm	Überführung der im „Elution Buffer“ <i>gelösten DNA in das Reaktionsgefäß</i>	1 min
Säule in ein neues, steriles 2 ml Reaktionsgefäß stellen		
zuvor durch die Säule gelaufenen „Elution Buffer“, inklusive gelöster DNA auf die Säule geben Inkubation bei 70 °C	Ablösung der DNA von der Silikamembran der Säule	3 min
zentrifugieren: 6.000 rpm	Überführung der im „Elution Buffer“ gelösten DNA in das Reaktionsgefäß	1 min
Aufbewahrung der im „Elution Buffer“ gelösten DNA bei -18 °C		

2.3.2 Amplifikation der gewonnenen DNA mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion

2.3.2.1 Grundlagen der Methode

Bei der Polymerase-Kettenreaktion („polymerase chain reaction“, PCR) handelt es sich um eine Methode, bei der *in vitro* eine Vervielfältigung der DNA erfolgt (Abbildung 6). Dabei

werden im Wesentlichen drei Phasen unterschieden, die in jedem Temperaturzyklus neu ablaufen und so die Vervielfältigung bewirken. Die Denaturierung findet bei 94 °C statt und dient einer Trennung der doppelsträngigen DNA in ihre beiden Einzelstränge. Nach einem Absenken der Temperatur kommt es zur komplementären Anlagerung der Primer („Annealing“) an beide Einzelstränge. Bei Primern handelt es sich um kurze Oligonukleotide, die den Startpunkt für die Elongation durch die thermostabile Taq-Polymerase festlegen. Die DNA-Polymerase benötigt eine Hydroxylgruppe (-OH) für den Synthesestart, weshalb die Primer ein 3'-OH-Ende aufweisen. Damit eine Amplifikation beider Einzelstränge erfolgen kann, müssen zwei unterschiedliche Primer verwendet werden. Die für die Anlagerung der Primer benötigte Temperatur ist von der Länge und der Sequenz des Primers abhängig. Bei der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Genotypisierung wurde eine „Annealing“ Temperatur von 53,3 °C gewählt. Schließlich erfolgt bei 72 °C die „Elongation“. Bei dieser werden mit Hilfe der DNA-Polymerase komplementäre Deoxyribonukleosidtriphosphat-Moleküle (dNTPs) in 5' – 3' Richtung an den Primer angelagert. Nach dem 4. – 5. Zyklus liegen die Amplifikate gewünschter Länge in Überzahl vor. Diese werden exponentiell vermehrt. Hingegen unterliegen die unerwünschten Amplifikate intermediärer Länge nur einer linearen Vermehrung, da lediglich die Ausgangs-DNA als Matrize vorliegt. Der theoretisch exponentiellen Zunahme der Amplifikate gesuchter Sequenz steht jedoch in der Praxis nach vielfachen Zyklen eine Reduktion der Amplifikationsgeschwindigkeit entgegen. Dies ist durch Abnahme von Primern und dNTPs in der Lösung sowie einer Zunahme von Pyrophosphaten zu erklären.

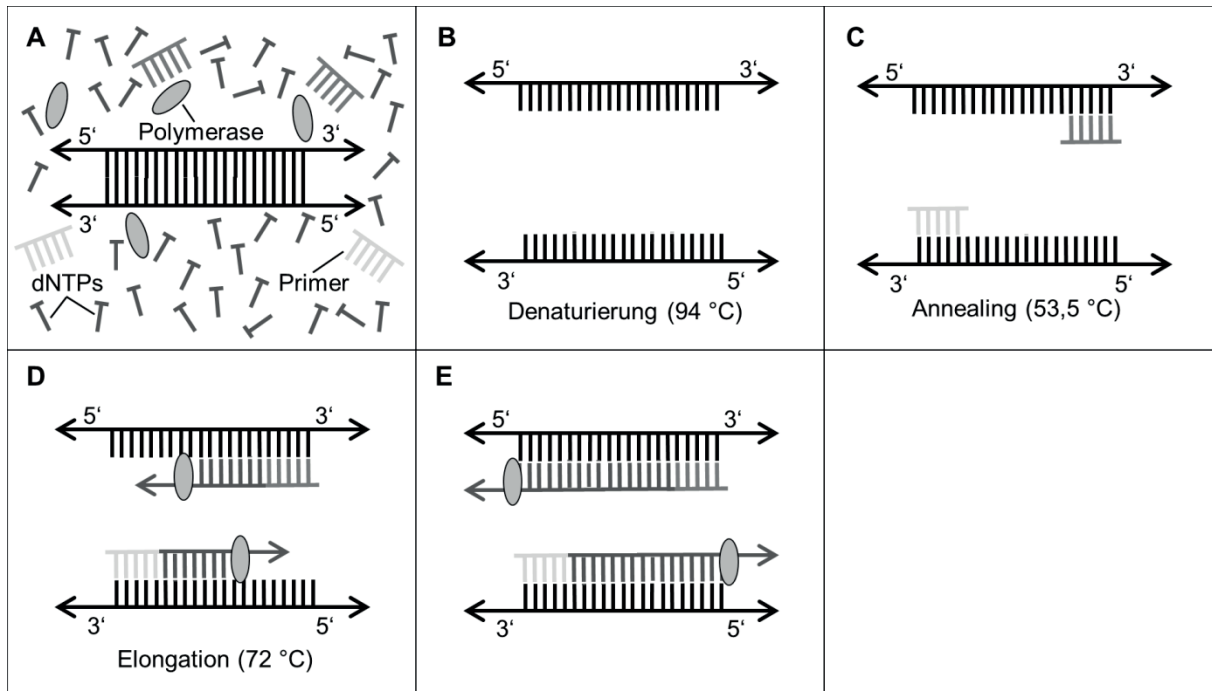


Abbildung 6: Schematische Darstellung des ersten PCR Zyklus

A: Die Ausgangssituation für die PCR bildet eine doppelsträngige DNA. Es werden zwei unterschiedliche Primer benötigt, damit auf beiden Einzelsträngen der DNA der gewünschte Startpunkt für die Elongation festgelegt werden kann. Außerdem müssen Polymerasen und Desoxyribonukleosidtriphosphat-Moleküle (dNTPs) zur Verfügung stehen sowie geeignete chemische Bedingungen für die Aktivität der DNA-Polymerase vorliegen. **B:** Die Denaturierung, die die Trennung der beiden Einzelstränge beschreibt, erfolgt bei 94 °C. **C:** Nach einem Absinken der Temperatur auf 53,5 °C lagern sich die Primer komplementär an die Einzelstränge an („Annealing“). **D:** Bei der Elongation der zu amplifizierenden DNA werden dNTPs durch die DNA-Polymerase komplementär an die DNA-Einzelstränge gebunden. **E:** Am Ende des ersten Zyklus liegen Amplifikate mit einer intermediären Länge vor, da nur der Startpunkt der Synthese durch die spezifischen Primer festgelegt wurde, nicht jedoch der Endpunkt. Am Ende des zweiten Zyklus wurden erstmalig Amplifikate gewünschter Länge gebildet.

2.3.2.2 Durchführung der PCR im Rahmen der Genotypisierung

Für die Amplifikation der DNA im Rahmen der Genotypisierung wurden 8,2 µl des Mastermixes (siehe Tabelle 11) in 8er PCR-Strips mit 6,3 µl der DNA Probe versetzt. Die als „Blank“ bezeichnete Negativkontrolle erhielt anstelle der DNA Probe 6,3 µl *Aqua bidest.* Die PCR verlief in einem Thermocycler nach dem in Tabelle 13 beschriebenen Protokoll.

Tabelle 13: Das für die Genotypisierung der Fat-1 Mäuse verwendete PCR-Protokoll

Schritt	gewählte Temperatur	Dauer
1	94 °C	2 min
2	94 °C	30 sec
3	53,5 °C	1 min
4	72 °C	1 min
5	72 °C	5 min

Einsatz: 8,2 µl Mastermix + 6,3 µl DNA-Probe („Blank“ Probe: 8,2 µl Mastermix + 6,3 µl *Aqua bidest.*)
Die Schritte 2 – 4 werden 37fach wiederholt (insgesamt 38 Zyklen)

2.3.3 Gelelektrophoretische Auftrennung und Auswertung

Für den qualitativen Nachweis des Fat-1-Gens wurde eine gelelektrophoretische Auftrennung durchgeführt. Aufgrund einer angelegten Spannung wanderte das zuvor hergestellte Amplifikat in einem Agarosegel vom Minus- zum Plus-Pol. Die Geschwindigkeit ist dabei grundsätzlich größenabhängig. Dadurch ermöglicht eine mitwandernde DNA-Leiter, welche Fragmente definierter Größen enthält, die Einschätzung der Größe des Amplifikates.

Die Herstellung des Agarosegels (2 %) erfolgte mit Hilfe der in Tabelle 11 angegebenen Lösungen. Die TBE (Tris-Borat-EDTA) Gebrauchslösung kann für mehrere Monate bei 4 °C gelagert werden. Lediglich das Agarosegel wurde für jede Genotypisierung frisch hergestellt. Dazu wurden 50 ml der TBE Gebrauchslösung mit 1 g Agarose versetzt und in der Mikrowelle kurz aufgeköcht. Die Lösung wurde unter Rühren abgekühlt und anschließend mit 2,5 µl Ethidiumbromid ergänzt. Schließlich wurde die handwarme Lösung luftblasenfrei in eine Gelgießform überführt und ein 18er-Kamm für die Formung der Taschen eingesetzt. Nach einer 30-minütigen Aushärtung konnte der Kamm entfernt und das Gel in die Elektrophorese-Kammer eingesetzt werden. Anschließend wurden die Kammer und das Gel mit TBE Gebrauchslösung übergossen. Die erste Tasche des Gels erhielt 3 µl der verwendeten DNA-Leiter. In weitere Taschen wurden 9 µl der zu untersuchenden DNA pipettiert und zu Kontrollzwecken wurde in die letzte Tasche eine „Blank“ Probe gegeben. Die „Blank“ Probe diente dem Ausschluss von Verunreinigungen der Chemikalien, da sie genau wie die zu untersuchenden Proben behandelt wurde, jedoch anstelle der DNA-Probe lediglich *Aqua bidest.* enthielt. In der „Blank“ Probe durfte demnach kein Amplifikat nachzuweisen sein. Für die hier durchgeführte Auftrennung wurde für 45 Minuten eine Spannung von 100 Volt und 1 Ampere angelegt. Die Anfärbung der DNA erfolgte schließlich durch das im Gel befindliche Ethidiumbromid. Es wurde durch UV-Licht einer Wellenlänge von 254 nm sichtbar gemacht. Bei Fat-1 Mäusen war eine in etwa 120 Basenpaare schwere DNA-Bande zu detektieren, die WT Mäuse nicht aufwiesen. Das Ergebnis wurde fotografisch dokumentiert.

3 Sentineltiere

Für die Sicherstellung eines guten Gesundheitszustandes der im Versuch verwendeten Tiere erfolgte monatlich eine klinische Untersuchung. Außerdem fand vierteljährlich eine Untersuchung eines Sentineltieres nach den Richtlinien der FELASA-Working Group statt [418]. In der institutseigenen Tierhaltung war ich an der Gesundheitsüberwachung der Mäuse beteiligt. Da aber sowohl Mäuse als auch Ratten im Rahmen dieser Arbeit verwendet wurden, werden nachfolgend die Untersuchungskriterien beider Tierarten darstellen.

Als Sentineltiere dienten Mäuse bzw. Ratten beider Geschlechter, die mindestens 12 Wochen alt waren und nicht für die Remontierung der Zucht benötigt wurden. Damit die Sentineltiere einen guten Aufschluss über den Gesundheitszustand aller Mäuse bzw. Ratten erlaubten, wurde regelmäßig Einstreu zwischen den Käfigen der Tiere gleicher Tierart ausgetauscht.

Die Euthanasie der Sentineltiere erfolgte durch eine *intrapertoneale* (i.p.) Injektion von Pentobarbital in Überdosis. Das gewonnene Serum wurde zu mfd Diagnostics GmbH, in Wendelheim, geschickt. Außerdem untersuchten sie einmal jährlich eine Sammelkotprobe aus der Käfigeinstreu für die Helicobacter Diagnostik. Das Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere der JLU Gießen (I. Hyg.) führte eine mikrobiologische Untersuchung von Tracheal-, Caecal- und Vaginal- / Präputialtupfern durch. Für die Untersuchung auf Parasiten wurden Hautproben, das Caecum sowie Enddarmkot in das Institut für Parasitologie der JLU Gießen (I. Paras.) gegeben. Hier erfolgte eine mikroskopische Beurteilung der Proben nach einem vorangegangenen Sedimentations- oder Flotationsverfahren. Zusätzlich wurde zum Ausschluss von Parasitenstadien im eigenen Haus eine mikroskopische Untersuchung von einem Tesafilmabklatsch der Anogenitalregion durchgeführt. Der frische Tierkörper wurde am Institut für Veterinär-Pathologie der JLU Gießen (I. Path.) makroskopisch begutachtet. Außerdem erfolgte dort eine histopathologische Untersuchung der parenchymatösen Organe.

Tabelle 14: Übersicht der durchgeführten Untersuchungen der Mäuse

Erreger	Labor	Methode	Probenmaterial	Untersuchungsintervall
Viren				
Ectromelia virus	mfd	ELISA	Serum	jährlich
Lymphocytic choriomeningitis virus	mfd	ELISA	Serum	jährlich
Mammalian orthoreovirus type 3	mfd	ELISA	Serum	jährlich
Mouse norovirus	mfd	ELISA	Serum	vierteljährlich
Murine adenovirus (type A and B)	mfd	ELISA	Serum	jährlich
Murine coronavirus (Mouse hepatitis virus)	mfd	ELISA	Serum	vierteljährlich
Murine pneumonia virus (Pneumonia virus of mice)	mfd	ELISA	Serum	jährlich
Parvoviruses	mfd	ELISA	Serum	vierteljährlich
Mouse parvovirus1	mfd	ELISA	Serum	vierteljährlich
Minute virus of mice	mfd	ELISA	Serum	vierteljährlich
Rotavirus A (Mouse rotavirus)	mfd	ELISA	Serum	vierteljährlich
Sendai virus	mfd	ELISA	Serum	jährlich
Theilovirus (Theiler's murine encephalomyelitis virus)	mfd	ELISA	Serum	vierteljährlich
Bakterien und Pilze				
β-hemolytic Streptococcus spp. (not group D)	I. Hyg.	kulturell	Tupferproben	vierteljährlich
Bordetella bronchiseptica	I. Hyg	kulturell	Tupferproben	vierteljährlich
Bordetella hinzii	I. Hyg	kulturell	Tupferproben	vierteljährlich
Citrobacter rodentium	I. Hyg	kulturell	Tupferproben	vierteljährlich
Clostridium piliforme	mfd	ELISA	Serum	jährlich
Clostridium piliforme	I. Path.	klinisch	Tierkörper	vierteljährlich
Corynebacterium kutscheri	I. Hyg	kulturell	Tupferproben	vierteljährlich
Helicobacter spp.	mfd	PCR	Sammelkot	jährlich
H. bilis	mfd	PCR	Sammelkot	jährlich
H. hepaticus	mfd	PCR	Sammelkot	jährlich
H. muridarum	mfd	PCR	Sammelkot	jährlich
H. rodentium	mfd	PCR	Sammelkot	jährlich
H. typhlonius	mfd	PCR	Sammelkot	jährlich
Klebsiella oxytoca	I. Hyg	kulturell	Tupferproben	vierteljährlich
Klebsiella pneumoniae	I. Hyg	kulturell	Tupferproben	vierteljährlich
Mycoplasma pulmonis	mfd	ELISA	Serum	jährlich
Pasteurella pneumotropica	I. Hyg	kulturell	Tupferproben	vierteljährlich
Pseudomonas aeruginosa	I. Hyg	kulturell	Tupferproben	vierteljährlich
Salmonella spp.	I. Hyg	kulturell	Tupferproben	vierteljährlich
Staphylococcus aureus	I. Hyg	kulturell	Tupferproben	vierteljährlich
Streptobacillus moniliformis	I. Path.	klinisch	Tierkörper	vierteljährlich
Streptococcus pneumoniae	I. Hyg	kulturell	Tupferproben	vierteljährlich
Parasiten				
Myobia musculi	I. Paras.	mikroskopisch	Haut	vierteljährlich
Myocoptes musculinus	I. Paras.	mikroskopisch	Haut	vierteljährlich
Radfordia affinis	I. Paras.	mikroskopisch	Haut	vierteljährlich

Erreger	Labor	Methode	Probenmaterial	Untersuchungsintervall
Aspicularis tetraptera	I. Paras.	mikroskopisch	Kot, Caecum	vierteljährlich
Syphacia spp.	I. Paras.	mikroskopisch	Kot, Caecum	vierteljährlich
Flagellates	I. Paras.	mikroskopisch	Kot, Caecum	vierteljährlich
Entamoeba muris	I. Paras.	mikroskopisch	Kot, Caecum	vierteljährlich
Giardia muris	I. Paras.	mikroskopisch	Kot, Caecum	vierteljährlich
Spironucleus muris	I. Paras.	mikroskopisch	Kot, Caecum	vierteljährlich
Tritrichomonas muris	I. Paras.	mikroskopisch	Kot, Caecum	vierteljährlich
Tesafilmabklatsch der Anogenitalregion				
makroskopische und histopathologische Untersuchung des Tierkörpers				

Tabelle 15: Übersicht der durchgeführten Untersuchungen der Ratten

Erreger	Labor	Methode	Probenmaterial	Untersuchungsintervall
Viren				
Hantaviruses	mfd	ELISA	Serum	jährlich
Lymphocytic choriomeningitis virus	mfd	ELISA	Serum	jährlich
Reovirus type 3	mfd	ELISA	Serum	jährlich
Mouse adenovirus type 1 and 2	mfd	ELISA	Serum	jährlich
Rat coronavirus, SADV	mfd	ELISA	Serum	vierteljährlich
Murine pneumonia virus (Pneumonia virus of mice)	mfd	ELISA	Serum	jährlich
Rodent protoparvovirus 1 (Parvoviruses)	mfd	ELISA	Serum	vierteljährlich
H1	mfd	ELISA	Serum	vierteljährlich
Kilham rat virus	mfd	ELISA	Serum	vierteljährlich
Rat minute virus	mfd	ELISA	Serum	vierteljährlich
Rat parvovirus	mfd	ELISA	Serum	vierteljährlich
Sendai virus	mfd	ELISA	Serum	jährlich
Rat theilovirus	mfd	ELISA	Serum	vierteljährlich
Bakterien und Pilze				
Cilia-associated respiratory bacillus	mfd	ELISA	Serum	jährlich
Clostridium piliforme	mfd	ELISA	Serum	jährlich
Clostridium piliforme	I. Path.	klinisch	Tierkörper	vierteljährlich
Corynebacterium	I. Hyg	kulturell	Tupferproben	vierteljährlich
Helicobacter spp.	mfd	PCR	Sammelkot	jährlich
H. bilis	mfd	PCR	Sammelkot	jährlich
H. hepaticus	mfd	PCR	Sammelkot	jährlich
H. muridarum	mfd	PCR	Sammelkot	jährlich
H. rodentium	mfd	PCR	Sammelkot	jährlich
H. typhlonius	mfd	PCR	Sammelkot	jährlich
Mycoplasma pulmonis	mfd	ELISA	Serum	jährlich
Pasteurella pneumotropica	I. Hyg	kulturell	Tupferproben	vierteljährlich
Pneumocystis spp.	mfd	ELISA	Serum	jährlich
Streptobacillus moniliformis	I. Path.	klinisch	Tierkörper	vierteljährlich

Erreger	Labor	Methode	Probenmaterial	Untersuchungsintervall
Parasiten				
<i>Myobia musculi</i>	I. Paras.	mikroskopisch	Haut	vierteljährlich
<i>Myocoptes musculinus</i>	I. Paras.	mikroskopisch	Haut	vierteljährlich
<i>Radfordia affinis</i>	I. Paras.	mikroskopisch	Haut	vierteljährlich
<i>Aspicularis tetraptera</i>	I. Paras.	mikroskopisch	Kot, Caecum	vierteljährlich
<i>Syphacia</i> spp.	I. Paras.	mikroskopisch	Kot, Caecum	vierteljährlich
Flagellates	I. Paras.	mikroskopisch	Kot, Caecum	vierteljährlich
<i>Entamoeba muris</i>	I. Paras.	mikroskopisch	Kot, Caecum	vierteljährlich
<i>Giardia muris</i>	I. Paras.	mikroskopisch	Kot, Caecum	vierteljährlich
<i>Spironucleus muris</i>	I. Paras.	mikroskopisch	Kot, Caecum	vierteljährlich
<i>Tritrichomonas muris</i>	I. Paras.	mikroskopisch	Kot, Caecum	vierteljährlich
Tesafilmabklatsch der Anogenitalregion				
makroskopische und histopathologische Untersuchung des Tierkörpers				

Bei den untersuchten Mäusen lag einmalig ein geringer Keimnachweis von *Klebsiella oxytoca* und einmalig von *Bordetella hinzii* vor. Die Tiere wiesen allerdings keine klinischen Symptome auf und in darauffolgenden Untersuchungen wurden diese Keime nicht erneut nachgewiesen. Das gleiche gilt für den einmaligen Keimnachweis von Corynebakterium und *Pasteurella pneumotropica* bei den untersuchten Ratten. Sämtliche weitere Untersuchungen erbrachten keine pathologischen Befunde.

IIIC *In vivo* Modelle

Ge- und Verbrauchsmaterialien für die *in vivo* Modelle

Tabelle 16: Für die *in vivo* Versuche benötigte Ge- und Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Typ	Hersteller
Batterien für Sender	319 SR527 SW	Renata SA, Itingen, Schweiz
Einmal-OP-Hauben	Barettform	Henry Schein Vet GmbH, D-Hamburg
Einmal-Spritzen	1 ml / 10 ml / 60 ml	BD Plastipak, D-Heidelberg
Einstreu	H1 505 29	Ssniff Spezialdiäten GmbH, D-Soest
Filtertops		Ehret GmbH & Co. KG Labor- und Pharmatechnik, D-Emmendingen
Futter	M-Z Extrudat V1126	Ssniff Spezialdiäten GmbH, D-Soest
Futter für Messkäfig	M-Z Mehl V1126	Ssniff Spezialdiäten GmbH, D-Soest
Futterschalen (Klimakammer)		Campuswerkstatt FB10, JLU Gießen
Häuschen / Röhren	rot transparent	Ehert Labor- und Pharmatechnik, Emmendingen

Bezeichnung	Typ	Hersteller
HS Einmal-Hautklammergerät 35R	5, 9x3 ,9mm	Henry Schein Vet GmbH, D-Hamburg
Klammerentferner		Henry Schein Vet GmbH, D-Hamburg
Leukosilk	01022-00	BSN-medical GmbH, Hamburg
Messkäfig (Klimakammer, Mäuse / Ratten)		Campuswerkstatt FB10, JLU Gießen
Nagehölzer	ABEDD® Nagehölzer Größe S, NGS E-021	Lab & Vet Service GmbH, D-Köflach
Nestlets		Ssniff Spezialdiäten GmbH, D-Soest
nicht-resorbierbares Nahtmaterial	Polyester grün DS19 1,5 metr USP4/0 75 cm	SMI AG, St. Vith, Belgien
OP-Besteck		Aesculap, D-Tuttlingen
Paraffinmischung	Elvax Coating	DuPont, Wilmington, DE, USA
Polycarbonat-Käfig	Typ III	Ehret GmbH & Co. KG Labor- und Pharmatechnik, D-Emmendingen
resorbierbares Nahtmaterial	Surgicryl viol. DS19 1,5 metr USP4/0 75 cm	SMI AG, St. Vith, Belgien
Skalpellklingen	900-8946	Henry Schein Vet GmbH, D-Hamburg
sterile Einmalkanülen	26 G x ½“	B. Braun Melsungen AG, D-Melsungen
Tunnel für Futterschalen		Campuswerkstatt FB10, JLU Gießen
Tupfer	HS-EuroGauze Tupfer NS, 6 x 9 cm	Henry Schein Vet GmbH, D-Hamburg
Wasserflaschen mit Tränkenippel		Ehret GmbH & Co. KG Labor- und Pharmatechnik, D-Emmendingen
Wasserflaschen mit Tränkenippel für Messkäfige		Ehret GmbH & Co. KG Labor- und Pharmatechnik, D-Emmendingen
Zellstoff		MAGV GmbH, D-Rabenau
Zylinder für die Waage zum wiegen der Tiere		Campuswerkstatt FB10, JLU Gießen

Chemikalien für die in vivo Versuche**Tabelle 17: Für die in vivo Versuche benötigte Chemikalien**

Bezeichnung	Hersteller
<i>Aqua ad injectabilia (Aqua dest.)</i>	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
doppelt entionisiertes Wasser (<i>Aqua bidest.</i>)	Millipore Reinstwassersystem
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS)	PAA GmbH, A-Pasching
Korsolex AF	Bode Chemie, D-Hamburg
Lipopolysaccharid aus E. coli O111:B4 (LPS) Lot: 030M4114	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, D-München
normal sheep serum (NSS)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, D-München
Trockeneis	CLEANAS GmbH & Co.KG, D-Willingen
Virkon	Tetenal Europe GmbH, D-Norderstedt

Arzneimittel für die in vivo Versuche**Tabelle 18: Für die in vivo Versuche benötigte Arzneimittel**

Handelsname	Wirkstoff	Dosierung	Hersteller
Antisedan®	Atipamezolhydrochlorid	1 mg/kg	Pfizer Deutschland GmbH, D-Berlin
Braunol	Povidon-Iod		B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Cepetor®	Medetomidin	Ratten: 5mg/kg	Pfizer Deutschland GmbH, D-Berlin
Heparin-Natrium-25000-ratiopharm	Heparin-Natrium		Ratiopharm GmbH, D-Ulm
Isotone Natriumchlorid (NaCl)-Lösung 0,9 %	Natriumchlorid		B. Braun Melsungen AG, D-Melsungen
Ketamin 10 %	Ketamin	Mäuse: 100 mg/kg Ratten: 50 mg/kg	Cp-pharma, D-Burgdorf
Metacam Injektionslösung 5 mg/ml (Analgesie der Ratten)	Meloxicam	2 mg/kg s.c.	Boehringer Ingelheim Vetmedica GmbH, D-Ingelheim
Metacam oral 1,5 mg/ml (Analgesie der Mäuse)	Meloxicam	1 mg/kg oral	Boehringer Ingelheim Vetmedica GmbH, D-Ingelheim
Narcoren	Pentobarbital-Natrium	Mäuse / Ratten: 60 - 100 mg/kg	Merial, D-Halbermoos
ROBINUL® 0,2 mg/ml	Glycopyrroniumbromid	Mäuse: 0,01 mg/kg	RIEMSER pharma GmbH, D-Greifswald
Thilo-Tears Gel	Carbomer		Alcon Pharma GmbH, D-Freiburg
Vetranquil® 1 %	Acepromazin	Ratten: 0,5 mg/kg	Albrecht GmbH, D-Aulendorf
Xylavet 20 mg/ml	Xylazin	Mäuse: 8 mg/kg	Cp-pharma, D-Burgdorf

1 Versuchsaufbau

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurden zwei *in vivo* Versuche durchgeführt, die zu unterschiedlichen Teilprojekten der vorliegenden Arbeit gehörten (Fat-1 Projekt, HMGB1 Projekt). Der Zeitablauf beider *in vivo* Versuche war gleich. Unterschiede lagen bezüglich der verwendeten Versuchstierspezies und damit einhergehender Anpassungen, der Umgebungstemperatur, der verwendeten Dosis von Lipopolysaccharid (LPS) sowie der angewendeten Kontrollinjektion vor.

Die Versuchstiere wurden vor der Operation in Polycarbonat Typ III Käfige umgesetzt, die sich in der Klimakammer befanden. Dies diente der Gewöhnung an die neue Umgebung. Nach der Laparotomie für die Implantation des Radiotransmitters mussten die Tiere zur Rekonvaleszenz einzeln gehalten werden. Bei einer guten Abheilung wurden sie nach vier Tagen in die Messkäfige überführt. Dadurch wurde einen physiologisch erfassbarer „Novel Environment Stress“ (NES) ausgelöst. In den Messkäfigen erfolgt die Futter- und Wasseraufnahme über Futtertunnel bzw. Tränkenippel und kann telemetrisch erfasst werden. Für die weitere Abheilung und die Gewöhnung an die neuen Bedingungen der Futter- und Wasseraufnahme standen den Tieren weitere 5 - 6 Tage zur Verfügung. Erst dann erfolgte der eigentliche Versuch. Dieser beinhaltete eine Injektion mit LPS oder Phosphat gepufferter Saline („phosphate buffered saline“, PBS; HMGB1 Projekt) bzw. LPS oder Natriumchlorid (NaCl; Fat-1 Projekt) sowie eine Tötung durch eine *transcardiale* Perfusion in tiefer Narkose. Die Perfusion erfolgte zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Injektion. Bei dem Fat-1 Projekt wurden Versuchstiere fünf bzw. 24 Stunden *post injectionem* (p.i.) perfundiert und bei dem HMGB1 Projekt erfolgte die Perfusion sechs bzw. 24 Stunden *post injectionem*. Nach operativer Implantation des Senders wurden die Versuchstiere täglich zur selben Zeit kontrolliert. Dabei wurde das Spontanverhalten, die Wundheilung sowie die Gewichtszunahme bewertet und die Einschätzung des Gesundheitszustandes im Rahmen der rechtlich verpflichtenden Aufzeichnungen auf einem „Score Sheet“ dokumentiert. Diese tägliche Kontrolle diente zusätzlich einer Gewöhnung an die Hand und die Gegenwart des Menschen, um die Stressantwort am Injektionstag zu minimieren. Mit Hilfe eines telemetrischen Senders wurden Körperkerntemperatur sowie lokomotorische Aktivität erfasst und ebenfalls für die Gesundheitsbeurteilung heran gezogen. Sofern zuvor eine adäquate Gewichtszunahme zu verzeichnen war, wurde am sechsten Tag nach Implantation des Senders auf die Bestimmung der Körpermasse verzichtet. Dieser Tag diente der Ermittlung von Basalwerten bezüglich der Körperkerntemperatur und der lokomotorischen Aktivität. Sie wurden als Kontrollwerte für die Beurteilung des NES verwendet (Abbildung 7).

Fat-1 Projekt

Für die Durchführung der *in vivo* Versuche des Fat-1 Projektes wurde ich von meiner Kollegin Janne Bredehöft eingearbeitet. Es wurden männliche Fat-1- und WT Mäuse verwendet. Sie waren zu Versuchsbeginn 7 – 8 Wochen alt und wiesen ein Körpergewicht (KGW) von 20 – 25 g auf. Während des Versuches befanden sich die Tiere in der Klimakammer bei einer Luftfeuchtigkeit von 50 % und einer thermoneutralen Temperatur von 30 °C. Eine thermoneutrale Temperatur zeichnet sich durch eine minimale und konstante metabolische Rate aus, ohne dass thermoregulatorische Verhaltensweisen ausgeübt werden. So konnte gezeigt werden, dass Mäuse freiwillig einen für sie günstigen Temperaturbereich von 30 °C auswählen [419, 420]. Außerdem wurde die Beleuchtung über ein künstliches Regime, mit zwölfstündigem Tag / Nacht-Rhythmus, geregelt. Wasser und Futter stand den Mäusen *ad libitum* zur Verfügung. Die Stimulation erfolgte mit einer LPS-Dosis von 2,5 mg/kg KGW und als Kontrolle diente eine Injektion von NaCl. Vor Studienbeginn wurde dieser Tierversuch vom Regierungspräsidium Gießen genehmigt (GI 18/2 Nr.28/2013, Änderungsanzeige vom 05.08.2015).

HMGB1 Projekt

Die *in vivo* Versuche des HMGB1 Projektes wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Lois Harden (University of the Witwatersrand, Johannesburg) durch Dr. Christoph Rummel und Sandy Koenig (beide aus dem Institut für Veterinär-Physiologie und –Biochemie, JLU Gießen) durchgeführt und dokumentiert. Ich analysierte die gewonnenen Organe, Plasmaproben und Telemetriedaten in Hinblick auf die Bedeutung von HMGB1 während einer Sepsis. Diese *in vivo* generierten Ergebnisse bildeten die Grundlage für die *in vitro* Versuche an Primärkulturen.

Für die *in vivo* Versuche des HMGB1 Projektes wurden Wistar-Ratten aus der institutseigenen Zucht verwendet (IIIB1). Die Durchführung des Versuches erfolgte bei einer für Ratten thermoneutralen Raumtemperatur von 28 °C [421], einer Luftfeuchtigkeit von 50 % und einem künstlichen Lichtregime mit Licht von 07.00 Uhr bis 19.00 Uhr. Wasser und Futter stand den Tieren *ad libitum* zur Verfügung. Die für den Versuch verwendete LPS-Dosis lag bei 10 mg/kg KGW. Kontrolltiere erhielten hingegen eine Injektion von PBS. Für die „real-time“ RT-PCR aus Hypothalamus, Leber und Milz (siehe Kapitel III E3) sowie die Analyse der HMGB1- und Zytokin-Konzentration im Plasma (siehe Kapitel III E2, III E5), wurden Proben von perfundierten Ratten ausgewertet, die sechs und 24 Stunden p.i. entnommen worden waren. Bei einem Teil der Ratten (sechs Stunden p.i.) enthielt die Injektionslösung neben

LPS [10 mg/kg] oder PBS ein „normal sheep serum“ (NSS), das für ein Interleukin-10 (IL-10) Antiserum als Kontrolle diente (anderes Teilprojekt des Tierversuchsantrags, [218]). In früheren Studien konnte bereits gezeigt werden, dass NSS keinen Einfluss auf die Entzündungsreaktion nach LPS- oder PBS-Injektion hat [289]. Vor dem Beginn der Studie wurde der Tierversuch vom Regierungspräsidium Gießen (GI 18/2 Nr.1/2011) genehmigt.

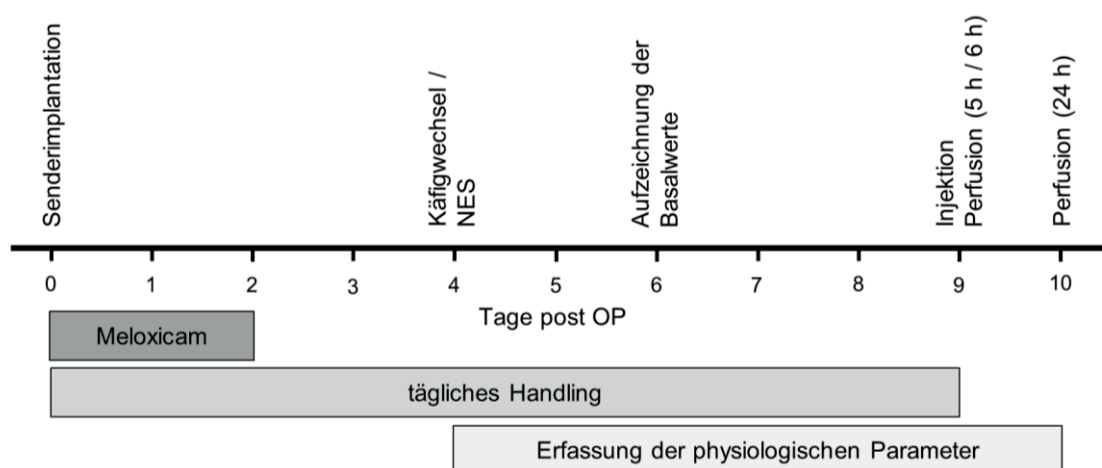


Abbildung 7: Schematische Darstellung des zeitlichen Ablaufes der *in vivo* Versuche

In den ersten zwei Tagen nach der Operation wurde Meloxicam verabreicht. Die Überführung in den Messkäfig erfolgte vier Tage nach der Senderimplantation und ging mit einer Aufzeichnung des „Novel Environment Stress“ (NES) einher. Neun Tage nach der Operation wurde die Injektion durchgeführt, bei der die Tiere entweder LPS (2,5 mg/kg KGW [Fat-1 Projekt] / 10 mg/kg KGW [HMGB1 Projekt]) oder NaCl (Fat-1 Projekt) bzw. PBS (HMGB1 Projekt) erhielten. Die Perfusion erfolgte entweder am gleichen Tag (fünf Stunden [Fat-1 Projekt] / sechs Stunden [HMGB1 Projekt] p.i.) oder am Folgetag (24 Stunden p.i.). Bis zum Injektionstag wurden die Tiere einem täglichen Handling unterzogen, das der Gesundheitskontrolle und der Gewöhnung an die Hand diente. Nach dem Umsetzen in die Messkäfige wurde mit der Aufzeichnung der lokomotorischen Aktivität, der Körperkerntemperatur sowie der Futter- und Wasseraufnahme begonnen.

2 Operation zur Senderimplantation

Bei der durchgeführten Operation handelte es sich um eine Laparotomie (Abbildung 8). Diese diente der Implantation des Telemetrie-Senders in die Bauchhöhle, da dieser für die Erfassung der Körperkerntemperatur und der lokomotorischen Aktivität benötigt wurde. *Präoperativ* erhielten die Versuchstiere eine analgetische Behandlung mit Meloxicam. Den Ratten wurde Meloxicam subcutan (s.c.) injiziert (2 mg/kg). Bei den Mäusen war hingegen eine orale Verabreichung möglich. Sie nahmen das süßliche Metacam oral (1 mg/kg) wohlwollend von einer stumpfen Kanüle auf. Die Narkose erfolgte in Form einer Injektionsnarkose. Die entsprechenden Narkoselösungen wurden in einer Mischspritze aufgezogen und anschließend i.p. injiziert. Mäuse erhielten dabei, abhängig vom Gewicht und Genotyp, 0,16 - 0,2 ml einer Narkoselösung, die aus 1 ml Ketamin (10 %), 0,25 ml Xylavet (20 mg/ml) und 5 ml isotoner NaCl-Lösung (0,9 %) bestand. Bei der i.p. verabreichten Narkose der Ratten handelte es sich um eine Mischspritze aus Ketamin

(50 mg/kg), Medetomidin (5 mg/kg) und Acepromazin (0,5 mg/kg), die frühestens nach 45 Minuten in Form einer i.p. Injektion von Atipamezol (1 mg/kg) teilantagonisiert wurde. Die Durchführung aller weiteren Schritte erfolgte auf Wärmematten, welche mit Zellstoff gepolstert waren. Zusätzlich wurde der Raum entsprechend vorgeheizt, was ebenfalls einem übermäßigen Auskühlen der Tiere vorbeugte. Eine Vorlagerung der Zunge diente der Freilegung der Atemwege, außerdem ließ sich die Oxygenisierung des Blutes so während der gesamten Narkose gut beurteilen. Der Bauch wurde geschoren und anschließend mehrmals mit Braunol desinfiziert. Das Austrocknen der Cornea wurde durch die Verwendung eines Augengels verhindert. Die Mäuse erhielten, nach Rücksprache mit den Tierschutzbeauftragten der JLU Gießen (Dr. Saskia Peters, Frau Katja Siegeler), fünf Minuten nach der Narkoseinjektion eine zusätzliche ROBINUL®-Injektion (0,01 mg/kg; s.c.). Das Glycopyrroniumbromid wirkt parasympholytisch und wurde genutzt, um mögliche senderbedingte vagale Stimulationen, die zu plötzlichem Atemstillstand führen können, zu vermeiden.

Eine ausreichende Narkosetiefe war etwa zehn Minuten nach Narkoseeinleitung erreicht und wurde durch das Ausbleiben des Flexor- und Cornealreflexes ermittelt. Es folgte die Eröffnung der Haut und eine stumpfe Trennung von der Bauchdecke. Anschließend wurde die Bauchdecke angehoben und die Bauchhöhle mit Hilfe einer Augenschere *cranial* des Nabels, *caudal* des Xyphoids eröffnet. Vorsichtig erfolgte entlang der *Linea alba* eine Erweiterung in *caudaler* Richtung. Anschließend wurde der Sender in die Bauchhöhle verbracht und vor die linke Kniefalte geschoben. Es erfolgte ein zweischichtiger Verschluss der Bauchhöhle durch Einzelhefte. Diese haben sich bei Mäusen bewährt, um bei *postoperativen* Manipulationen durch die Tiere den Verschluss der Bauchnaht bestmöglich zu sichern. Außerdem schützten zusätzliche Hautklammern die Naht. Während der Aufwachphase unterlagen die Tiere einer permanenten Überwachung und wurden mit Hilfe einer Rotlichtlampe kontrolliert mit Wärme versorgt. Die postoperative Analgesie erfolgte durch eine s.c. bzw. *orale* Verabreichung von Meloxicam über zwei Tage.

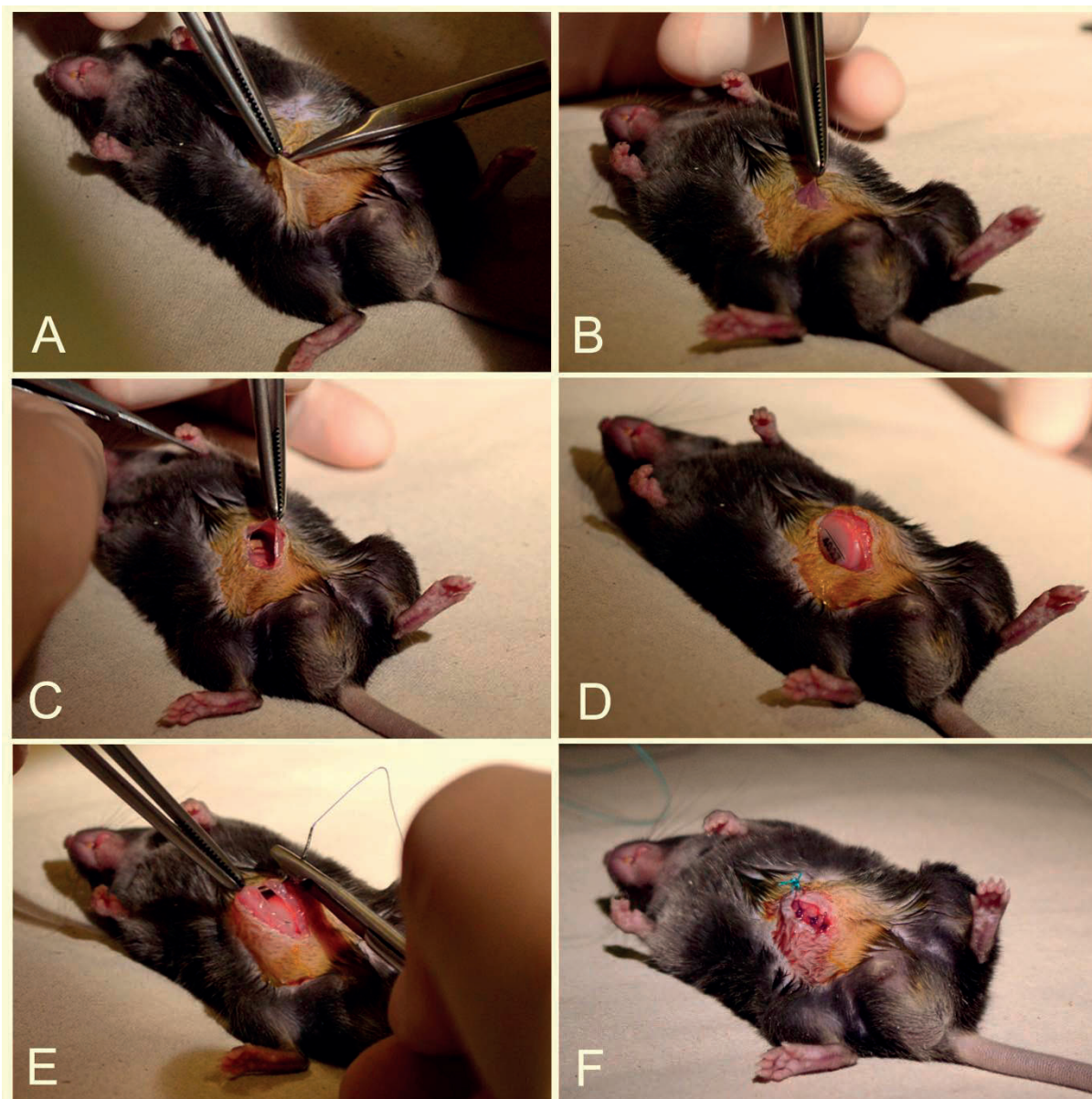


Abbildung 8: Fotografische Darstellung der Laparotomie für die Senderimplantation

Zunächst wurde die Haut eröffnet und stumpf von der Bauchmuskulatur getrennt (A). Unter Anhebung der Bauchdecke erfolgte eine Eröffnung der Bauchhöhle entlang der *Linea alba* (B, C). Der Sender wurde in die Bauchhöhle verbracht und vor die linke Kniefalte geschoben (D). Anschließend wurde die Bauchmuskulatur mit resorbierbarem Nahtmaterial in Form von Einzelheften adaptiert und schließlich die Haut durch nicht-resorbierbare Einzelhefte verschlossen (E, F). Das Tier liegt auf einer mit Zellstoff abgedeckten Wärmematte. Die dargestellten Fotos wurden von mir gemacht, während Janne Bredehöft eines ihrer Versuchstiere operierte.

3 „Novel Environment Stress“

Bei dem NES handelt es sich um eine physiologische Stressreaktion auf eine veränderte Umgebung, die mit einer vermehrten lokomotorischen Aktivität und einer erhöhten Körperkerntemperatur einhergeht. Man geht davon aus, dass es sich bei der erhöhten Körperkerntemperatur nicht ausschließlich um eine Hyperthermie durch die erhöhte lokomotorische Aktivität, sondern auch um Prostaglandin-induziertes Fieber handelt [422].

Die Reaktion der Tiere auf das erforderliche Umsetzen in den Messkäfig diente hier als Modell für die Induktion von Stress durch eine neue Umgebung. Hierfür wurden lokomotorische Aktivität sowie Körperkerntemperatur telemetrisch aufgezeichnet (Fat-1 Projekt). Dadurch konnten erste Erkenntnisse über die Bedeutung der ω -3-FS bei psychologischem Stress gewonnen werden. Als Vergleichswerte dienten Basalwerte derselben Uhrzeit, welche am sechsten Tag nach der Senderimplantation aufgezeichnet wurden (Abbildung 7).

Die Mäuse wurden um 9.00 Uhr in den neuen Käfig umgesetzt. Sie wurden zuvor nicht gewogen, um manipulationsbedingte Stressreaktionen bei der Beurteilung der Ergebnisse auszuschließen. Nach 2 - 3 Stunden war die Stressreaktion weitgehend abgeklungen. Entsprechend beschränkte sich die Auswertung dieser physiologischen Daten auf einen Zeitraum von vier Stunden.

4 Induktion einer systemischen Entzündung durch LPS-Injektion

Nach einer Rekonvaleszenzzeit von 9 - 10 Tagen wurde eine systemische Entzündung durch i.p. Injektion von LPS induziert. Für das Fat-1 Projekt wurde eine Dosis von 2,5 mg/kg KGW verwendet und für das HMGB1 Projekt eine Dosis von 10 mg/kg KGW. Im Fat-1 Projekt erhielten Kontrolltiere eine i.p. Injektion von NaCl, die Kontrollratten des HMGB1 Projektes wurden i.p. mit PBS behandelt. Behandlungsgruppen (Stimulation und Kontrolle) eines Teilprojektes erhielten bezogen auf das Körpergewicht eine Injektion gleichen Volumens, um volumenbedingte Effekte zu verhindern. Mäusen wurde beispielsweise stets ein Volumen von 5 μ l/g KGW appliziert. Die Injektion erfolgte zwischen 9.00 Uhr und 10.40 Uhr in 25-minütigen Abständen. Die Induktion der Entzündungsreaktion fand demnach während der Hellphase des Beleuchtungszyklus statt.

5 Erfassung physiologischer Daten

Zu den erfassten physiologischen Parametern zählten im Rahmen dieser Arbeit die Körperkerntemperatur, die lokomotorische Aktivität, die Futter- sowie Wasseraufnahme und die Erfassung der Körpermasse. Die beschriebenen Parameter stellen eine gute Grundlage für die Ermittlung zentral regulierter Krankheitssymptome bzw. des bereits beschriebenen „sickness behavior“ dar (siehe Kapitel IA1). Während der Erfassung physiologischer Daten befanden sich die Versuchstiere einzeln in Messkäfigen mit luftdurchlässigen Deckeln (Abbildung 9). Die Käfige waren auf entsprechenden Empfängerplatten platziert (RA-1010 und RTA-500 für die Telemetrie-Sender VM-FH TR-3000; ER-4000 für die Telemetrie-Sender PTD-4000 E-Mitter). Die Versuchstiere hatten permanenten Zugang zu Futter und Wasser. Der jeweilige Verbrauch wurde über Waagen telemetrisch erfasst.

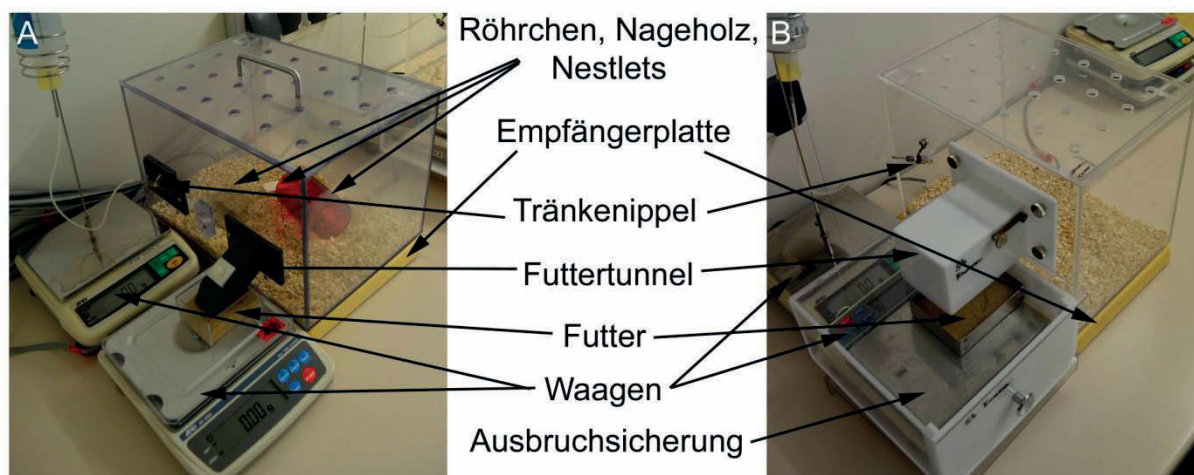


Abbildung 9: Fotografische Darstellung der verwendeten Messkäfige

Der Aufbau von Messkäfigen für Mäuse (A) und Ratten (B) war prinzipiell gleich. Die Messkäfige befanden sich auf einer Empfängerplatte. Die Wasserflasche und ein Behälter mit gemahlenem Futter wurden auf tarierten Waagen platziert. Die Wasseraufnahme erfolgte über einen Tränkenippel und der Zugang zum Futter war durch einen Futtertunnel gewährleistet. Da die Ratten einen größeren Tunnel und eine größere Zugangsöffnung benötigen, wurde die Waage mit dem Futter in eine ausbruchsichere Schublade gestellt.

5.1 Telemetrie

Die Telemetrie ist ein Verfahren, das sich hervorragend für die kontinuierliche und stressfreie Messung der Körperkerntemperatur sowie der lokomotorischen Aktivität in der gewohnten Umgebung von Tieren eignet.

5.1.1 Telemetrie-Sender

Mäusesender

Die für die telemetrische Datenerfassung bei den Mäusen verwendeten Sender (VM-FH TR-3000) bestehen aus zwei Polyethylenzylindern, die die Messelektronik umschließen. Die Energieversorgung dieser Sender erfolgt durch eine in den Sender eingebrachte Knopfzelle. Um den Sender vor eindringender Feuchtigkeit zu schützen, wurde er von einer Paraffinmischung überzogen. Diese diente zusätzlich einer Reduktion von Fremdkörperreaktionen im Versuchstierorganismus.

Das Prinzip der telemetrischen Temperaturerfassung beruht auf einem wärmeabhängigen Thermistor, der einen negativen Temperaturkoeffizienten aufweist. Das bedeutet, dass elektrischer Strom bei hohen Temperaturen besser geleitet wird als bei niedrigen. Dadurch entsteht in den Sendern eine proportionale Änderung der Radiosignalfrequenz, welche bei erhöhten Temperaturen mit einer erhöhten Signalfrequenz einhergeht. Die verwendeten Telemetrie-Sender wurden bei Temperaturen von $37 \pm 0,1$ °C und $41 \pm 0,1$ °C geeicht und ermöglichten damit eine sehr präzise Messung der Körperkerntemperatur. Zusätzlich zur Körperkerntemperatur wurde die lokomotorische Aktivität durch ein in den Sendern

befindliches Trägheitselement aufgezeichnet. Dessen Signalstärke variiert in Abhängigkeit von der Entfernung und der Position zur Empfängerplatte. Die dabei generierten Signale wurden als „activity counts“ in einem fünfminütigen Zeitintervall summiert und dienten somit als Maß für die lokomotorische Aktivität der Mäuse.

Rattensender

Der bei den Ratten verwendete Sender arbeitet prinzipiell nach demselben Prinzip. Auch hier wurden die Temperatur durch einen temperaturabhängigen Thermistor mit negativem Temperaturkoeffizienten und die Aktivität durch ein vorhandenes Trägheitselement erfasst. Jedoch erfolgt die Energieversorgung durch Induktion mit Hilfe einer im Sender befindlichen Kupferspirale. Batteriewechsel waren demnach nicht erforderlich.

5.1.2 Erfassung der Körperkerntemperatur und der lokomotorischen Aktivität

Die implantierten Sender übermittelten den entsprechenden Empfängerplatten die gewonnenen Daten, welche von diesen wiederum an einen Computer gesendet und mittels der Software VitalView aufgezeichnet wurden. Die Erfassung der Daten erfolgte in fünfminütigen Abständen.

5.2 Futter- und Wasseraufnahme

Die Ermittlung der Futter- und Wasseraufnahme erfolgte ebenfalls telemetrisch über Futter- und Wasserbehälter, die auf tarierten Waagen platziert waren. Über einen Dietscan Analyser wurde das auf den Waagen befindliche Gewicht an den PC übermittelt und über das Programm Accudiet aufgezeichnet. Die Futter- und Wasseraufnahme der Tiere äußerte sich als Reduktion des auf den Waagen befindlichen Gewichtes.

5.3 Entwicklung der Körpermasse

Die Messung der Körpermasse wurde manuell vorgenommen. Die Tiere wurden dazu in eine auf einer Waage befindliche Schale gesetzt. Dies erfolgte im Rahmen des täglichen Umgangs mit den Tieren. Die Ermittlung der Körpermasse fand in der postoperativen Phase als Indikator des Gesundheitszustandes Verwendung und diente während des Versuches als Hinweis für die Reaktion auf LPS (im Vergleich zur NaCl bzw. PBS Kontrolle).

6 Perfusion und Gewinnung von Organ- und Blutproben

Die Tiere wurden durch eine *transcardiale* Perfusion fünf, sechs oder 24 Stunden p.i. getötet. Dafür wurden die Versuchstiere durch eine i.p. Injektion von Pentobarbital (60 – 100 mg/kg KGW) zunächst in eine tiefe Narkose gelegt. Die narkotisierten Tiere wurden in Rückenlage

über einem Auffangbehälter auf einem darüber befindlichen Gitter befestigt. Die direkte Unterlage für die Tiere bildete auf das Gitter aufgebracht Leukosilk. Nach der Eröffnung der Bauch- und Brusthöhle erfolgte eine Entnahme des Blutes aus dem schlagenden Herzen. Eine auf eine zuvor mit Heparin gespülte Einwegspritze aufgesetzte Kanüle wurde in den rechten Ventrikel eingeführt und das Blut langsam und kontinuierlich entnommen. Bei Mäusen des Fat-1 Projektes konnten 0,6 – 0,8 ml Blut gewonnen werden, bei Ratten des HMGB1 Projektes war eine Entnahme von 4 – 5 ml Blut möglich. Für die Perfusion des Tieres wurde eine Kanüle in den linken Ventrikel eingeführt und über ein angeschlossenes Schlauchsystem physiologische Kochsalzlösung mit leichtem Druck durch den Tierkörper gepumpt. Bei Ratten des HMGB1 Projektes konnte nach Eröffnung des Herzens eine stumpfe Kanüle bis in die Aorta vorgeschoben werden. Nachdem das hervor gewölbte rechte Herzohr durch einen Scherenschlag eröffnet wurde, erfolgte ein vollständiger Austausch des Blutes mit kalter physiologischer Kochsalzlösung. Zur Beurteilung des Fortschrittes der Perfusion wurde insbesondere auf die blass werdende Färbung der Leber sowie auf den Austritt von Erythrozyten aus dem rechten Herzohr geachtet. Bei den Mäusen wurden für eine ausreichende Entblutung aller Organe zwischen 4 – 6 ml einer eiskalten physiologischen Kochsalzlösung durch den Tierkörper perfundiert, bei den Ratten 300 – 400 ml.

Schließlich wurde der Kopf des Versuchstieres vom Körper getrennt, um das Gehirn und die Hypophyse zu entnehmen. Außerdem erfolgte eine Entnahme der Milz, des *retroperitonealen* Fettgewebes sowie des *Lobus sinister lateralis* der Leber. Alle Organe wurden in pulverisiertem Trockeneis schockgefroren, anschließend mit Parafilm und Alufolie luft- sowie lichtdicht verpackt und bis zur weiteren Analyse bei -54 °C gelagert. Von dem gewonnenen Blut wurde zunächst ein Tropfen auf einem Objektträger ausgestrichen, anschließend wurde das restliche Blut für zehn Minuten bei 7.000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert. Das abpipettierte Plasma lagerte bis zur weiteren Analyse bei -20 °C.

Tabelle 19: Im Rahmen des Fat-1 Projektes entnommene Proben und deren Untersuchungen

entnommene Proben (Mäuse)	im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Untersuchungen
Blut	Blutausstriche → Leukozytendifferenzierung Plasma → Zytokinanalyse
Fettgewebe, <i>retroperitoneal</i>	-
Gehirn und Hypophyse	-
Haut	-
Leber, <i>Lobus sinister lateralis</i>	PCR
Milz	PCR

Tabelle 20: Im Rahmen des HMGB1 Projektes entnommene Proben und deren Untersuchungen
entnommene Proben (Ratten) im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Untersuchungen

Blut	Plasma → Zytokinanalyse, ELISA
Fettgewebe, <i>retroperitoneal</i>	-
Gehirn und Hypophyse	Immunhistochemie, PCR
Leber, <i>Lobus sinister lateralis</i>	PCR
Milz	PCR

7 Auswertung und Statistik

Im Rahmen der gesamten Arbeit handelte es sich um eine statistische Signifikanz, wenn eine Fehlerwahrscheinlichkeit ($p < 0,05$) vorlag. In den graphischen Darstellungen wurden unterschiedliche Symbole für die Kennzeichnung der statistischen Signifikanz verwendet. Die Anzahl der abgebildeten Symbole entspricht dabei jedoch immer der ermittelten Fehlerwahrscheinlichkeit (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

Körperkerntemperatur

Die in fünfminütigen Intervallen aufgezeichneten Temperaturdaten wurden aus VitalView exportiert und in Form einer Excel Tabelle gespeichert. Die Auswertung der Körperkerntemperatur erfolgte während des vierstündigen NES und während der induzierten Entzündungsreaktion. Die zwei Stunden vor dem zu untersuchenden Ereignis aufgezeichneten Werte wurden in die Abbildungen aufgenommen, jedoch nicht in die statistische Auswertung einbezogen. Für die graphische Darstellung und die statistische Analyse wurden die Temperaturdaten auf 15-minütige Intervalle reduziert und für jede Gruppe der Mittelwert mit Standardfehler abgebildet (GraphPad Prism).

Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe der Software Statistica durch eine zwei- oder drei-faktorielle Varianzanalyse („analysis of variance“, ANOVA) mit Messwiederholung. Dafür wurde der zu analysierende Zeitraum zunächst in kleinere Zeitintervalle unterteilt. Das vierstündige Untersuchungsintervall für den NES wurde in einstündige Intervalle gegliedert, das Untersuchungsintervall der LPS-induzierten Entzündungsreaktion in zweistündige Intervalle. Bei den Mäusen des Fat-1 Projektes wurde die Körperkerntemperatur der LPS-induzierten Entzündungsreaktion ab 75 Minuten p.i. statistisch ausgewertet. Der durch die Injektion hervorgerufene stressinduzierte Anstieg der Körpertemperatur sollte nicht analysiert werden – er fällt bei allen Mäusen gleich aus. Hingegen begann die statistische Auswertung der Temperaturdaten der Ratten des HMGB1 Projektes mit dem ersten Messwert *post injectionem*, da bei den Ratten schon sehr früh nach der Injektion behandlungsabhängige Effekte sichtbar waren.

Durch die statistische Auswertung der Datensätze über die zahlreichen Zeitintervalle hinweg („repeated measures“), erhöhte sich das Fehlerpotenzial. Dies wurde im Anschluss durch eine p-Wert Adjustierung nach Bonferroni korrigiert. Dafür wurde jeder p-Wert mit der Anzahl der Untersuchungsintervalle, in die der entsprechende Datensatz aufgeteilt wurde, multipliziert. Eine Fehlerwahrscheinlichkeit von < 5 % war dadurch gewährleistet, dass nur p-Werte, die nach der Adjustierung < 0,05 waren, als statistisch signifikant betrachtet wurden. Ergab sich bei der drei-faktoriellen ANOVA (NES) nach der Adjustierung eine statistisch signifikante Interaktion, wurde ein „Tukey’s Multiple Comparison Test“ angeschlossen.

Die während des NES aufgezeichneten Körperkerntemperaturen wurden als ΔT abdgewertet und als Mittelwert mit Standardfehler dargestellt. Dafür wurde die während des NES vorliegende Temperatur mit dem Mittelwert verglichen, der sich aus den zwei Stunden vor NES ermittelten Körperkerntemperaturen von Mäusen beider Genotypen ergab.

Bei Mäusen des Fat-1 Projektes wurde zusätzlich der Fieber- bzw. Temperaturindex ermittelt. Dieser diente einer besseren Beurteilung der Stärke der Fieberreaktion. Dazu wurde die Fläche zwischen der Fieberkurve und einer Basislinie integriert. Die Basislinie ergab sich aus den Körperkerntemperaturen, die zwei Stunden vor dem Ereignis detektiert wurden. Der Fieberindex kann auch negativ sein, was einer Hypothermie im Vergleich zur Basistemperatur entspricht. Die berechneten Werte des Fieberindex wurden als Mittelwert + Standardfehler graphisch dargestellt und durch eine zwei-faktorielle ANOVA mit anschließendem Bonferroni *post-hoc* Test statistisch ausgewertet. Es erfolgte zusätzlich eine Ausreißerberechnung. Durch diese wurden Messwerte ermittelt, die um mehr als das 1,5-fache „interquartile-range“ (IQR) unter dem 25 %-Perzentil oder über dem 75 %-Perzentil lagen und deshalb aus der statistischen Betrachtung ausgeschlossen wurden. Korrekterweise wird für den NES der Begriff des Temperaturindex verwendet.

Lokomotorische Aktivität

Die statistische Auswertung des Zeitverlaufes der lokomotorischen Aktivität erfolgte nach dem gleichen Prinzip wie die Auswertung des Temperaturverlaufes. Auch hier wurde eine zwei-faktorielle Varianzanalyse mit Messwiederholung vorgenommen, bei der der Untersuchungszeitraum in kürzere Zeitintervalle untergliedert wurde. Diese entsprachen den Intervallen der statistischen Auswertung der Körperkerntemperatur. Die graphische Darstellung erfolgte als Mittelwert + Standardfehler, beinhaltete aber keine Darstellung der vor dem dargestellten Ereignis gemessenen Werte.

Zusätzlich erfolgte eine Auswertung der kumulativen Aktivität. Dabei wurde die Summe der „activity counts“ über einen Zeitraum von fünf bzw. 24 Stunden p.i. berechnet. Auch hierbei

wurden die Messwerte der ersten 75 Minuten aufgrund des induzierten Stresspeaks nicht mit einbezogen. Die statistische Auswertung der kumulativen Aktivität erfolgte als zwei-faktorielle ANOVA mit anschließendem Bonferroni *post hoc* Test. Die bereits beschriebene Ausreißerberechnung wurde ebenfalls zuvor durchgeführt.

Futter- und Wasseraufnahme

Die statistische Auswertung der Futter- und Wasseraufnahme während der systemischen Entzündungsreaktion erfolgte anhand der über 24 Stunden erfassten Aufnahme. Sie wurde kumulativ berechnet und prozentual auf das Körpergewicht bezogen. Die statistische Auswertung und die graphische Darstellung (Mittelwerte + Standardfehler) erfolgte mit GraphPad Prism. Für die statistische Auswertung wurde zunächst die beschriebene Ausreißerberechnung durchgeführt. Es folgte eine zwei-faktorielle ANOVA, der bei positiver Interaktion ein Bonferroni *post-hoc* Test angeschlossen wurde.

Entwicklung der Körpermasse

Die Entwicklung der Körpermasse über 24 Stunden wurde ebenfalls prozentual zum Körpergewicht berechnet und als Mittelwert + Standardfehler mit GraphPad Prism dargestellt. Nach erfolgter Ausreißerberechnung wurde eine zwei-faktorielle ANOVA mit anschließendem Bonferroni *post-hoc* Test durchgeführt.

IIID *In vitro* Modelle

Im Rahmen dieser Dissertation wurden verschiedene *in vitro* Modelle verwendet, die weitgehend am Institut für Veterinär-Physiologie und –Biochemie der JLU Gießen etabliert sind. Im Verlauf der Beschreibung dieser Methoden werden Unterschiede zu ihrer früheren Verwendung hervorgehoben.

1 Primärkultur der *Area postrema*

Ge- und Verbrauchsmaterialien für die Arbeit mit Primärkulturen der AP

Tabelle 21: Für die Arbeit mit Primärkulturen benötigte Ge- und Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Typ	Hersteller
CELL-VU	25 x 25 mm Grid Coverslips DRM800	Millenium Sciences, New York, NY, USA
Deckgläschen	15 x 15 mm Stärke 1	Menzel GmbH, D-Braunschweig
Einmalkanülen	18 G und 22 G	B. Braun, D-Melsungen
Einmalskalpellklingen		Otto Rüttgers GmbH & Co. KG, D-Solingen

Bezeichnung	Typ	Hersteller
Einwegspritzen	5 / 20 ml	B. Braun, D-Melsungen
Einwegspritzen	1 ml	BD, D-Heidelberg
Filterpapier	Ø 10 cm	Macherey-Nagel, D-Düren
Hahnenbank	5-fach	Pub Medizintechnik, D-Kirchseen
Irisschere, fein	gerade	Fine Science Tools GmbH, D-Heidelberg
Multi-Dishplatten	8-fach	Nalge Nunc International, Pennfield, NY, USA
Multi-Wellplatten	12-fach	Greiner Bio-One, D-Frickenhausen
Nachstarschere	Vannas	Fine Science Tools GmbH, D-Heidelberg
Papierfilter	Hahnemühle, DF 604 240	MAGV GmbH, D-Rabenau
Pasteurpipetten	230 mm aus Glas	MAGV GmbH, D-Rabenau
Petrischale	Glas, Ø 11 cm	MAGV GmbH, D-Rabenau
Petrischalen	Plastik, 100 x 20 / 35 x 10 mm	Sarstedt AG und Co. KG, D-Nümbrecht
Pinzette	Dumont # 5, gerade	Fine Science Tools GmbH, D-Heidelberg
Spatel, fein	gebogen	Fine Science Tools GmbH, D-Heidelberg
Sterilfilter	FP 30/0,2 CA-S	Schleicher und Schuell GmbH, D-Dassel
Teflonschläuche	Innendurchmesser 0,75 / 1,98 mm	Kronlab, D-Sinsheim
Tygon Schläuche für Schlauchpumpe		Abimed Analysen Technik GmbH, D-Langenfeld
Zählkammer (Neubauer)	C-Chip	NanoEnTek, Inc., Seoul, Korea
Zellkulturkammern	flexiPERM micro 12, 0,35 ml Volumen / Kammer	Greiner-Bio One GmbH, D-Frickenhausen

Chemikalien für die Arbeit mit Primärkulturen

Tabelle 22: Für die Arbeit mit Primärkulturen benötigte Chemikalien

Bezeichnung	Hersteller
2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazinyl)-Ethansulfonsäure (HEPES)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, D-München
2,6-Di-tert-butyl-4-methyl-phenol (Butylhydroxytoluol)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, D-München
Butylhydroxytoluol Stocklösung [100 mM]	1000 µl Methanol 0,022 g Butylhydroxytoluol
Butylhydroxytoluol Stocklösung [1 mM]	Verdünnung der Stocklösung [100 µM] 1:100 mit Methanol
Arachidonic acid (AA), Lot: SLBH2583V	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, D-München
AA Stocklösung [100 mg/ml]	Lösen von DHA mit abs. Ethanol
AA Stocklösung [1 mg/ml]	Verdünnung der Stocklösung [100 mg/ml] 1:100 mit PBS (pyrogenfrei)

Bezeichnung	Hersteller
<i>Aqua ad injectabilia (Aqua dest.)</i>	B. Braun Melsungen AG, D-Melsungen
B27® Supplement	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
Calciumchlorid (CaCl ₂)	Merck KGaA, D-Darmstadt
Carbogen	Praxair GmbH, D-Düsseldorf
cis-4,7,10,13,16,19-Docosahexaenoic acid (DHA), Lot: SLBJ2083V	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, D-München
DHA Stocklösung [32,85 mg/ml]	Lösen von DHA mit abs. Ethanol
DHA Stocklösung [1 mg/ml]	Verdünnung der Stocklösung [32,85 mg/ml] 1:32 mit PBS (pyrogenfrei)
cis-5,8,11,14,17-Eicosapentaenoic acid (EPA), Lot: SLBC4839V	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, D-München
EPA Stocklösung [50 mg/ml]	Lösen von EPA mit abs. Ethanol
EPA Stocklösung [1 mg/ml]	Verdünnung der Stocklösung [50 mg/ml] 1:50 mit PBS (pyrogenfrei)
D-Glucose Monohydrat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, D-München
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, D-München
Dispase I	Roche Diagnostics GmbH, D-Mannheim
disulfide High-Mobility Group Box-1, LPS free (HMGB1), Lot: 170823, 18050P, 180720, 671121	HMGBiotech S.r.l., Mailand, Italien
HMGB1 Stocklösung [100 µg/ml]	Lösen von HMGB1 in sterilem <i>Aqua dest</i>
HMGB1 Stocklösung [10 µg/ml]	Verdünnung der Stocklösung [100 µg/ml] 1:10 mit sterilem <i>Aqua dest</i> .
doppelt entionisiertes Wasser (<i>Aqua bidest.</i>)	Millipore Reinstwassersystem
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS, pyrogenfrei)	PAA GmbH, A-Pasching
Ethanol absolut (abs. ETOH)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, D-München
Ethanol, vergällt (ETOH)	Stockmeier GmbH & Co. KG, D-Dillenburg
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, D-München
fetales Kälberserum (FKS)	PAA GmbH, A-Pasching
Fura-2-acetoxymethylester (Fura-2AM)	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
Gentamycin	Biochrom AG, D-Berlin
Gey's Balanced Salt Solution (GBSS)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, D-München
Hank's Balanced Salt Solution (HBSS), Ca ²⁺ - und Mg ²⁺ -frei	Biochrom AG, D-Berlin
Kalibrierlösung für pH-Meter: pH 4,01 / 7,00 / 10,01	WTW GmbH, D-Weilheim
Kaliumchlorid (KCl)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, D-München
L-Glutamin	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
Lipopolysaccharid (LPS) (E. coli, Serotyp 0111:B4), Lot: 043M4104	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, D-München
LPS Stocklösung [1000 µg/ml]	Lösen von LPS in PBS (pyrogenfrei)
LPS Stocklösung [100 µg/ml]	Verdünnung der Stocklösung [1000 µg/ml] 1:10 mit PBS (pyrogenfrei)
LPS Stocklösung [10 µg/ml]	Verdünnung der Stocklösung [100 µg/ml] 1:10 mit PBS (pyrogenfrei)
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, D-München
Methanol Rotisolv HPLC grade	Carl Roth GmbH & Co. KG, D-Karlsruhe

Bezeichnung	Hersteller
Natriumchlorid (NaCl)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, D-München
Natronlauge (NaOH)	Carl Roth GmbH & Co. KG, D-Karlsruhe
Neurobasal-A Medium (NBA)	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
Paraformaldehyd (PFA)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, D-München
Penicillin / Streptomycin	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
Phosphate Buffered Saline (PBS) Tablets	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, D-München Ansatz aus PBS tablets in Aqua bidest. (1 Tablette / 200 ml)
Poly-L-Lysin	Biochrom AG, D-Berlin
Salzsäure (HCl)	Carl Roth GmbH & Co. KG, D-Karlsruhe
Trypanblau	ICN Biomedicals Inc, Costa Mesa, CA, USA
Wasser, steril (<i>Aqua bidest.</i>)	Reinstwassersystem im Haus

Für die Durchführung einer experimentellen *in vitro* Charakterisierung der potenziellen Gehirnzellaktivierung durch verschiedene endogene- und exogene „toll-like“ Rezeptor (TLR)-Agonisten wurden primäre Zellkulturen der *Area postrema* (AP) hergestellt. Wie zuvor beschrieben (siehe Kapitel IA2.1.1) stellt die AP eines der sieben zirkumventrikulären Organe („circumventricular organs“, CVOs) dar, die sich in unmittelbarer Nähe zu den Gehirnvventrikeln befinden [423] (siehe Kapitel IA2.1.1). Sie zeichnen sich unter anderem durch eine unvollständige Blut-Hirn-Schranke (BHS) [30] aus. Bezüglich der Detektion peripherer Entzündungsreaktionen wird einer Untergruppe der CVOs eine besondere Bedeutung zugesprochen. Anders als die sekretorischen CVOs enthalten die sensorischen CVOs neuronale Zellkörper. Zu dieser Gruppe gehört auch die AP. Um zu untersuchen, ob Disulfid-HMGB1 direkt auf Zellen der AP wirkt und so zur Induktion von Neuroinflammation beitragen kann, wurden für weiterführende *in vitro* Analysen Primärkulturen der AP hergestellt. Während einer systemischen Entzündungsreaktion könnte sowohl zirkulierendes als auch lokal im Gehirn freigesetztes HMGB1 an solchen direkten Effekten von HMGB1 auf das Gehirn beteiligt sein. Ein Protokoll zur Etablierung von Primärkulturen der AP wurde durch vorangegangene Projekte am Institut für Veterinär-Physiologie und –Biochemie der JLU Gießen bereits etabliert [35, 38]. Frau Dr. Damm war an der Konzeption dieses Versuchsteils der hier vorliegenden Arbeit aktiv beteiligt.

Es ist zu beachten, dass bei der Präparation der AP eine Kontamination mit angrenzenden Gehirnstrukturen nicht mit hundertprozentiger Sicherheit ausgeschlossen werden kann. Deshalb handelte es sich bei den im Rahmen dieser Arbeit als Primärkulturen der AP bezeichneten Zellkultursystemen korrekterweise um AP-angereicherte Primärkulturen.

Die Tötung der 4 – 6 Tage alten neonatalen Ratten wurde vor Versuchsbeginn unter den Nummern 527-AZ und 580-M beim Regierungspräsidium Gießen angezeigt.

1.1 Präparation von Primärkulturen der Area postrema

Lösungen und Puffer

Tabelle 23: Lösungen und Puffer für die Präparation von Primärkulturen der AP

Bezeichnung	Zusammensetzung
Neurobasal-A (NBA) Zellkulturmedium	Neurobasal-A Medium B27® Supplement [Endkonzentration 2 %] Penicillin [100 U/ml] / Streptomycin [0,1 mg/ml] L-Glutamin [2 mM]
GBSS-Puffer	GBSS Glukose [0,5 %]
HBSS-Puffer für die Primärkultur	HBSS HEPES [20 mM]
Enzymlösung	HBSS-Puffer Dispase I [2,4 U/ml]
Inaktivierungslösung	HBSS-Puffer EDTA [1 mM]

1.1.1 Durchführung der Präparation

Am Vortag der Präparation wurden Neurobasal-A (NBA) Zellkulturmedium sowie „Gey's Balanced Salt Solution“ (GBSS)- und „Hank's Balanced Salt Solution“ (HBSS)-Puffer angesetzt (Tabelle 23). Außerdem wurden die Zellkulturkammern unter einer sterilen Arbeitsbank vorbereitet. Als Zellkulturkammern dienten mit 70 % Ethanol desinfizierte und zerschnittene flexiPerm micro 12 Wände mit einer Grundfläche von 28 mm². Ein Deckglaschen wurde an die glatte Unterseite der flexiPerm Wände angedrückt und bildete die Haftfläche für Zellen. Für die Kulturen zur Durchführung der Stimulationsversuche kamen dabei herkömmliche Deckglaschen zum Einsatz. Für die „Ca²⁺-Imaging“ Versuche wurden hingegen Zellkulturkammern mit CELL-VU Gläschen vorbereitet. Diese bieten den Vorteil eines lasergravierten Rasters, das das Auffinden der im „Ca²⁺-Imaging“ Versuch untersuchten Zellen während der anschließenden immunzytochemischen Differenzierung erleichterte (Abbildung 18). Alle Deckgläser wurden zuvor unter Zuhilfenahme von 1 N Salzsäure und 70 % Ethanol gereinigt, abgeflammt und bis zur Verwendung unter der Sterilbank gelagert. Zum besseren Anhaften und Wachsen der Zellen auf den Deckgläsern wurde Poly-L Lysin verwendet. Dazu wurden 50 µl Poly-L-Lysin für zwölf Stunden bei 4 °C auf den Deckgläsern der vorbereiteten Zellkulturkammern inkubiert. Die Poly-L-Lysin-Beschichtung verbessert die Adhäsion der Zellen an das Deckglaschen, da dessen Kationen mit der polyanionischen Zelloberfläche interagieren [424].

Am Präparationstag wurde das Poly-L-Lysin abgesaugt und es folgten zwei Waschschriffe der Zellkulturkammern mit autoklaviertem, doppelt entionisiertem Wasser. Außerdem wurde NBA in einem Wärmeblock auf 37 °C erwärmt, wohingegen die Puffer auf Eis gelagert und

für 20 Minuten mit Carbogen begast wurden. Die begasten Puffer dienten anschließend der Herstellung der Enzym- und Inaktivierungslösung (siehe Tabelle 23) sowie der Aufbewahrung des Gewebes.

Im Anschluss an die Vorbereitungen folgte die Präparation der AP. Dafür wurden 4 - 6 Tage alte neonatale Ratten mit einer scharfen Nabelschnurschere nach Schuhmacher dekapitiert. Danach wurden Kopfhaut sowie Schädeldecke entfernt und das Stammhirn mit anhaftendem *Cerebellum* vom *Cerebrum* getrennt. Die anschließende Präparation der AP erfolgte an einem Binokular. Mit Hilfe von Augenbesteck wurde das *Cerebellum* nach *rostral* geklappt und so die dorsal vom Stammhirn gelegene AP sichtbar. Nach dem vorsichtigen Entfernen anhaftender Hirnhäute wurde die AP mit Hilfe einer Augenschere frei präpariert und in eiskalten HBSS-Puffer überführt. Für die Auftrennung der Zell- und Gewebeverbände fand ein einstündiger enzymatischer Verdau bei 37 °C und einer Carbogenbegasung statt. Dieser wurde anschließend durch die Inaktivierungslösung mit EDTA gestoppt und nach vorsichtigem Austausch von EDTA mit NBA schließlich mechanisch unterstützt. Die mechanische Dissoziation erfolgte mit der Pipettenspitze einer 1000 µl Pipette. Mit deren Hilfe wurden die Gewebestücke zusammen mit NBA (1 ml) auf- und abpipettiert. Eine Neubauer-Zählkammer diente der Ermittlung der Zellzahl in der gewonnenen Suspension. Diese wurde anschließend durch eine Verdünnung mit NBA auf die gewünschte Zellzahl von ~50.000 Zellen/ml eingestellt. Für die Stimulationsversuche zur Messung von Lipidmediatoren mittels Flüssigchromatographie mit Massenspektrometrikopplung („liquid chromatography-mass spectrometry“, LC-MS/MS) erfolgte nach unbefriedigenden Vorversuchen mit 50.000 Zellen/ml entsprechend früherer Publikationen [425] eine Erhöhung der Zellzahl auf ~100.000 Zellen/ml (Abbildung 10).

Im letzten Schritt wurden 350 µl der Zellsuspension in jede vorgewärmte Zellkulturkammer überführt. Bis zur Versuchsdurchführung, die in Abhängigkeit des Versuches drei, vier oder sechs Tage nach der Präparation erfolgte, verblieben die Kulturen im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂. Ein Mediumwechsel fand in 48-stündigen Abständen statt.

Eine ausreichende Zellzahl wurde erreicht und individuelle Unterschiede einzelner Tiere bei der Versuchsdurchführung vermieden, indem die an jedem Präparationstag gewonnenen Primärkulturen der AP aus einer Zellsuspension von APs 3 – 6 neonataler Ratten hergestellt wurden.

1.2 Stimulation von Primärkulturen der Area postrema

Im Rahmen der vorliegenden Dissertation erfolgten Stimulationen von Primärkulturen mit endogenen und exogenen TLR-Agonisten. In den Überständen dieser Kulturen wurden

anschließend Zytokine mittels Bioassays oder Lipide sowie Lipidmediatoren mit Hilfe der LC-MS/MS gemessen. Außerdem dienten im Anschluss an die Stimulation durchgeführte immunzytochemische Untersuchungen der Charakterisierung des Aktivitätsstatus einzelner Zellen und ihrer Zelltypen.

Lösungen und Puffer

Stimulationen für Zytokinanalysen und immunzytochemische Untersuchungen

Tabelle 24: Verwendete Gebrauchslösungen für die Stimulation mit HMGB1

Bezeichnung	Zusammensetzung (pro Zellkulturkammer)
HMGB1 [1 µg/ml]	3,5 µl HMGB1 Stocklösung [100 µg/ml] 14 µl PBS 332,5 µl NBA
HMGB1 [5 µg/ml]	17,5 µl HMGB1 Stocklösung [100 µg/ml] 332,5 µl NBA
PBS Kontrolle	17,5 µl PBS 332,5 µl NBA

Tabelle 25: Verwendete Gebrauchslösungen für die Stimulation mit LPS

Bezeichnung	Zusammensetzung (pro Zellkulturkammer)
LPS [1 µg/ml]	35 µl LPS Stocklösung [10 µg/ml] 315 µl NBA
PBS Kontrolle	35 µl PBS 315 µl NBA

Stimulationen für die Analyse von Lipiden und Lipidmediatoren

Tabelle 26: Verwendete Stimulationslösungen für die Analyse von Lipiden und Lipidmediatoren

Bezeichnung	Zusammensetzung (pro Zellkulturkammer)	Zusatz nach 46 stündiger Stimulation
LPS [10 µg/ml]	35 µl LPS Stocklösung [100 µg/ml] 315 µl NBA	/
LPS [10 µg/ml] mit Zusatz von Fettsäuren	35 µl LPS Stocklösung [100 µg/ml] 315 µl NBA	3,5 µl AA [500 µg/ml] 3,5 µl DHA [500 µg/ml] 3,5 µl EPA [500 µg/ml]
HMGB1 [10 µg/ml]	35 µl HMGB1 Stocklösung [100 µg/ml] 315 µl NBA	/
HMGB1 [10 µg/ml] mit Zusatz von Fettsäuren	35 µl HMGB1 Stocklösung [100 µg/ml] 315 µl NBA	3,5 µl AA [500 µg/ml] 3,5 µl DHA [500 µg/ml] 3,5 µl EPA [500 µg/ml]
PBS Kontrolle	35 µl PBS 315 µl NBA	/
PBS Kontrolle mit Zusatz von Fettsäuren	35 µl PBS 315 µl NBA	3,5 µl AA [500 µg/ml] 3,5 µl DHA [500 µg/ml] 3,5 µl EPA [500 µg/ml]

1.2.1 Durchführung der Stimulation

Die Durchführung der unterschiedlichen Stimulationen fand unter der sterilen Arbeitsbank mit autoklavierten Pipetten statt. Die Stimulationen für die anschließenden Zytokinanalysen und immunzytochemischen Untersuchungen erfolgten am sechsten Tag nach der Präparation. Hingegen wurden die Stimulationen für die Messungen der Lipide und Lipidmediatoren in den Zellkulturüberständen am vierten Tag nach der Präparation begonnen, weil hierbei die Zellen für 48 Stunden stimuliert wurden. In Vorversuchen hatte eine 48-stündige Stimulation am sechsten Tag nach der Präparation zu einer reduzierten Vitalität am Endzeitpunkt geführt.

Am sechsten bzw. vierten Tag nach der Präparation wurde das alte Zellkulturmedium entfernt und ein zweimaliger Waschschrift mit NBA angeschlossen. Daraufhin wurden die vorbereiteten Stimulationenlösungen (siehe Tabelle 24, Tabelle 25, Tabelle 26) in die Zellkulturkammern überführt und diese nach Protokoll (siehe Tabelle 27) bei 37 °C und einer CO₂-Konzentration von 5 % inkubiert.

Tabelle 27: Durchgeführte Stimulationen, Zeiträume und kultivierte Zellzahlen sortiert anhand der Analysemethoden

TLR-Agonist	Analysemethode	Zellzahl	Zeiträume
HMGB1			
HMGB1 [5 µg/ml]	Immunzytochemie (IL-1β)	50.000 [Zellen/ml]	6 Stunden
HMGB1 [5 µg/ml]	Immunzytochemie (NF-IL6)	100.000 [Zellen/ml]	6 Stunden
HMGB1 [5 µg/ml]	Immunzytochemie (NFκB)	100.000 [Zellen/ml]	1 Stunde
HMGB1 [10 µg/ml]	LC-MS/MS	100.000 [Zellen/ml]	48 Stunden
HMGB1 [1 µg/ml] HMGB1 [5 µg/ml]	Zytokininanalyse	50.000 [Zellen/ml]	0,5 Stunden
			1 Stunde
			1,5 Stunden
			3 Stunden
			6 Stunden
LPS			
LPS [1 µg/ml]	Immunzytochemie (HMGB1)	50.000 [Zellen/ml]	8 Stunden
LPS [10 µg/ml]	LC-MS/MS	100.000 [Zellen/ml]	48 Stunden

Stimulationen für Zytokinanalysen und immunzytochemische Untersuchungen

Nach Ablauf des vorgesehenen Stimulationszeitraumes wurden die Zellkulturüberstände in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und für die anschließenden Zytokinanalysen bei -24 °C gelagert. Für eine anschließende Immunzytochemie wurden die Deckgläschen nach vorheriger Ablösung der flexiPERM Mikrozellkulturkammer samt der anhaftenden Zellen in Multi-Wellplatten gelegt. In diesen erfolgte eine 15-minütige Fixierung mit Paraformaldehyd (PFA) (4 %), welches anschließend durch zweimaliges Waschen mit PBS entfernt wurde. Bis

zur immunzytochemischen Bearbeitung wurden die Deckgläschen in PBS-gefüllten Multi-Wellplatten bei 4 °C aufbewahrt.

Stimulationen für die Analysen von Lipiden und Lipidmediatoren

Eine Besonderheit stellten die Stimulationen der primären Zellkulturen für die Analysen von Lipiden und Lipidmediatoren dar. Diese Analysen wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Sabine Schulz aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Spengler des Instituts für Anorganische und Analytische Chemie der JLU Gießen durchgeführt. Grundlage für die im Rahmen dieser Dissertation etablierte Methode stellte die Arbeit von Le Faouder *et. al.* dar, bei der mit Hilfe von LC-MS/MS Messungen eine Quantifizierung pro-entzündlicher- und pro-entzündungsauflösender Lipidmediatoren aus Zellkulturüberständen stimulierter epithelialer colorektaler Adenokarzinomzellen (Caco-2) sowie stimulierter Makrophagen gelang [425].

Die 48-stündige Stimulation erfolgte auch für die LC-MS/MS Messungen ursprünglich am sechsten Tag nach der Präparation. Anfänglich wurden die Überstände der einzelnen Primärkulturen abgenommen. Die Zellen wurden mit 200 µl Methanol und 5 µl Butylhydroxytoluol (BHT) (1 mM) gewaschen und die dabei entstandene Lösung wurde dem zuvor abgenommenen Zellüberstand zugesetzt. Methanol diente dabei einer Herauslösung möglichst vieler Lipide aus der Zellmembran. BHT verhinderte als Antioxidans eine nachträgliche Oxidation der hoch reaktiven Lipidmediatoren. Die Proben wurden bis zur LC-MS/MS Messung bei -80 °C gelagert. Bei den Analysen dieser kleinen Probenvolumina war trotz der Aufkonzentrierung durch eine Festphasenextraktion („solid phase extraction“, SPE) kein Nachweis gewünschter Lipidmediatoren möglich. Daraufhin wurden die nachfolgend beschriebenen Modifikationen des zuvor verwendeten Stimulationsprotokolls vorgenommen (Abbildung 10).

Die bei der Präparation hergestellte Zellsuspension wurde auf 100.000 Zellen/ml eingestellt. Außerdem wurde die Stimulation am vierten Tag nach der Präparation begonnen, anstelle vom sechsten Tag, um eine bestmögliche Vitalität der Zellen sicherzustellen. Im veränderten Versuchsprotokoll wurden Sammelproben von sechs Zellkulturkammern für die LC-MS/MS Messungen verwendet. Ein weiterer Punkt, dessen Änderung entscheidend zum Erfolg beitrug, war der Zusatz von ω-3- und ω-6-FS zwei Stunden vor Beendigung des Stimulationszeitraumes. Dieser Zusatz von Arachidonsäure („arachidonic acid“, AA), Docosahexaensäure („docosahexaenoic acid“, DHA) und Eicosapentaensäure („eicosapentaenoic acid“, EPA) wurde bei den Versuchen von Le Faouder *et. al.* ebenfalls durchgeführt [425]. Dadurch ergaben sich sechs Behandlungsgruppen, welche entweder mit LPS, HMGB1 oder PBS inkubiert wurden und entweder einen Zusatz von FS erhielten oder nicht (Tabelle 26). Nach Beendigung des 48-stündigen Stimulationszeitraumes wurde auch

hier jedes dieser Zellkulturgefäße mit 200 µl Methanol und 5 µl BHT (1 mM) gewaschen und diese Lösung der Sammelprobe aus allen 6 Zellkulturüberständen hinzugefügt.

Zur Kontrolle der biologischen Bedeutung wurde zusätzlich eine Blindprobe ohne Zellen für jede Behandlungsgruppe angefertigt und identisch behandelt.

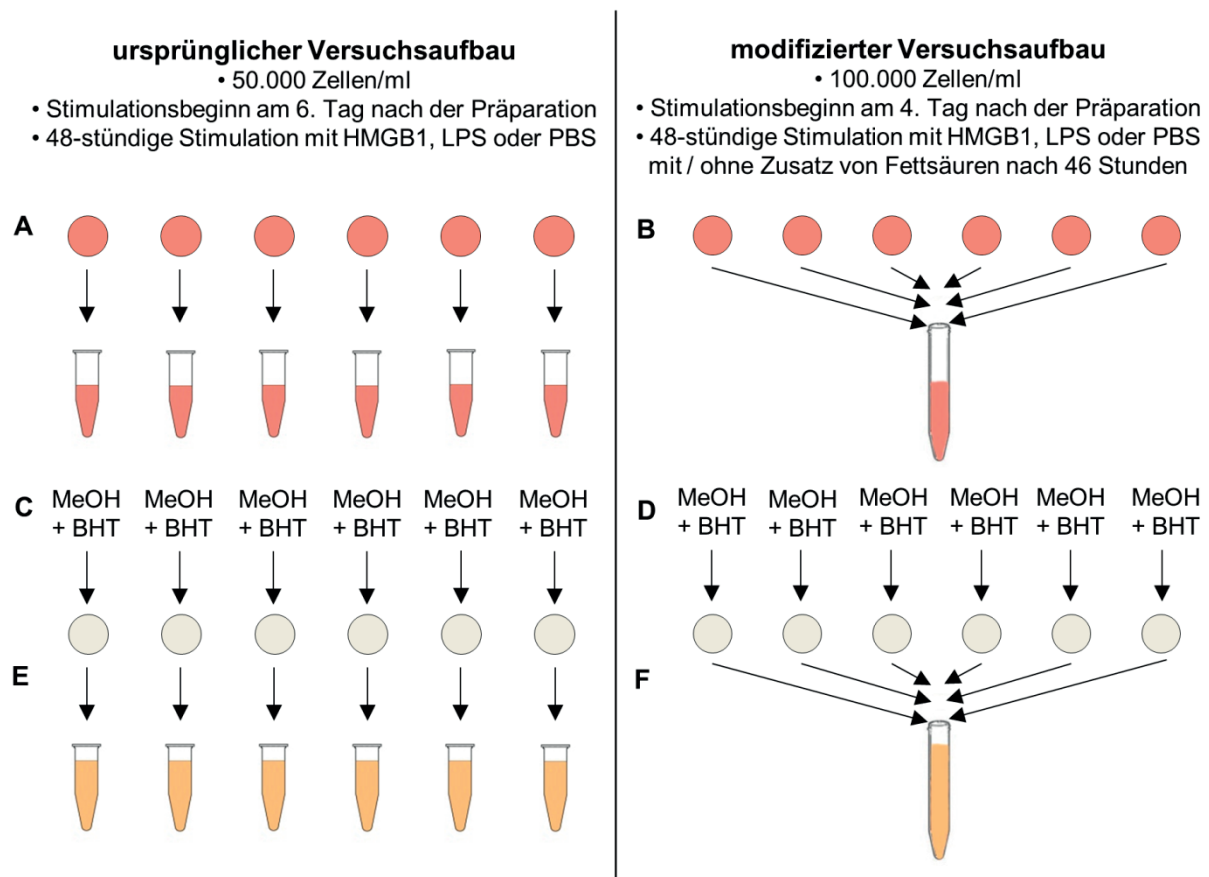


Abbildung 10: Darstellung des ursprünglichen und modifizierten Versuchsaufbaus der Stimulation für die Analyse von Lipiden und Lipidmediatoren mit Hilfe von LC-MS/MS Messungen

Der Zellkulturüberstand wurde nach der Stimulation ursprünglich einzeln in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt (**A**). Im modifizierten Versuchsprotokoll wurden die Zellkulturüberstände von sechs „Wells“ gemeinsam als Sammelprobe in ein 15 ml Röhrchen gegeben (**B**). Anschließend wurden 200 µl Methanol (MeOH) und 5 µl Butylhydroxytoluol (BHT) in jedes „Well“ pipettiert (**C, D**). Diese Waschlösung wurde im ursprünglichen Versuchsaufbau jeder einzelnen Probe zugesetzt (**E**), hingegen wurden nach der Modifikation die Waschlösungen aller sechs „Wells“ der Sammelprobe hinzugefügt (**F**). Außerdem wurde nach den Vorversuchen zusätzlich die Zellzahl auf 100.000 Zellen/ml erhöht und die Stimulation am vierten Tag nach der Präparation begonnen. Bei dem modifizierten Versuchsprotokoll wurden weitere Behandlungsgruppen erstellt, bei denen nach 46 Stunden eine Zugabe der ω -6- und ω -3-Fettsäuren (Arachidonsäure [AA], Docosahexaensäure [DHA], Eicosapentaensäure [EPA]) erfolgte.

1.3 Messung der intrazellulären Kalziumkonzentration („Ca²⁺-Imaging“)

Lösungen und Puffer

Tabelle 28: Für das „Ca²⁺-Imaging“ benötigte allgemeine Lösungen und Puffer

Bezeichnung	Zusammensetzung
Ca ²⁺ -Messpuffer, pH 7,4	Grundlage: <i>Aqua bidest.</i> Na-HEPES [5 mM], NaCl [130 mM], Glucose [10 mM], KCl [5 mM], MgCl ₂ [1 mM], CaCl ₂ [1,25 mM]
kaliumreicher Ca ²⁺ -Messpuffer, pH 7,4	Grundlage: <i>Aqua bidest.</i> Na-HEPES [5 mM], NaCl [85 mM], Glucose [10 mM], KCl [50 mM], MgCl ₂ [1 mM], CaCl ₂ [1,25 mM]
Fura-2AM Stocklösung	Grundlage: DMSO Fura-2AM [1 mM]
Fura-2AM Gebrauchslösung	Grundlage: NBA – Medium Fura-2AM [2 µM] (Verdünnung der Stocklösung 1 : 500)

1.3.1 Grundlagen der Methode

Kalzium ist in neuronalen Zellen als „second messenger“ von besonderer Bedeutung und stellt somit ein wichtiges Untersuchungsziel für die Beurteilung der Zellaktivierung dar. Es ist bekannt, dass in Neuronen im Ruhezustand eine intrazelluläre Kalziumkonzentration ([Ca²⁺]_i) von 50 – 100 nM vorliegt, welche bei einer elektrischen Aktivität bis auf 1000 nM ansteigt und damit intrazelluläre kalziumsensitive Prozesse auslösen kann [426]. Bei der Ratio „Imaging“ Technik macht man sich die Erkenntnis des Zusammenhangs zwischen Zellaktivierung und dem Anstieg freier intrazellulärer Ionen, wie beispielsweise dem Kalzium, zunutze. Es konnte in vorherigen Studien gezeigt werden, dass diese Technik zur Detektion induzierter intrazellulärer Signalübertragungen ebenfalls in kultivierten Zellen der AP verwendet werden kann [35, 427].

Grundsätzlich stehen unterschiedliche Ca²⁺ bindende Fluoreszenzfarbstoffe zur Verfügung. Dazu gehören klassische chemische Indikatoren, wie das im Rahmen dieser Arbeit genutzte Fura-2, aber auch genetisch kodierte Indikatoren. Bei den chemischen Indikatoren werden wellenlängenstabile und wellenlängenändernde Substanzen unterschieden [428]. Das hier verwendete Fura-2 gehört zur Gruppe der wellenlängenändernden Indikatoren. Das bedeutet, dass diese Indikatoren nach Bindung an Kalzium ihre maximalen Exzitations- und Emissionsspektren ändern. Bei den wellenlängenstabilen Indikatoren erfolgt lediglich eine proportionale Änderung der Emissionsintensität bei konstanten Exzitations- und Emissionsspektren. Fura-2 weist als freies Anion ein Exzitationsmaximum bei einer Wellenlänge von 362 nm auf. Demgegenüber liegt das Exzitationsmaximum des Kalzium-Fura-2 Komplexes bei einer Wellenlänge von 335 nm. Für die praktische Anwendung ist

ebenfalls der isoemissive Punkt von entscheidender Bedeutung. Dieser beschreibt die Wellenlänge, bei der sowohl das freie als auch das an Kalzium gebundene Fura-2 mit gleicher Intensität angeregt werden [429]. Der isoemissive Punkt liegt bei 358 nm, also in unmittelbarer Nähe zu dem Exzitationsmaximum der freien Fura-2 Anionen (362 nm). Dadurch ist eine Abweichung der experimentell gewählten Anregungswellenlängen von den eigentlichen Exzitationsmaxima erforderlich. Demnach wurde auch in dieser Arbeit für das kalziumgebundene Fura-2 eine Anregungswellenlänge von 340 nm gewählt; für das freie Fura-2 hingegen eine Anregungswellenlänge von 380 nm. Bei den Messungen erfolgte eine automatische Berechnung des Quotienten dieser Wellenlängen [340 nm / 380 nm] als Indikator für die intrazelluläre Kalziumkonzentration (Abbildung 11). Eine Stimulation, die Zellen Kalzium-abhängig aktiviert, geht mit einer Erhöhung von $[Ca^{2+}]_i$ einher und führt zu einer verstärkten Emission bei einer Anregung mit Licht einer Wellenlänge von 340 nm. Hingegen führt die Stimulation zu einer reduzierten Photoemission bei einer Anregung mit 380 nm Wellenlänge. Die Wellenlängen des Emissionsmaximums verändern sich durch die Bindung von Kalzium an Fura-2 nur geringfügig, nämlich von 512 nm zu 505 nm [429].

Fura-2 kann aufgrund seiner hydrophoben Eigenschaften nur schwer die Zellmembran passieren. Deshalb wird, wie auch im Rahmen dieser hier vorliegenden Arbeit, häufig das Acetoxymethylester (AM)- Derivat Fura-2AM verwendet. Durch diese Modifizierung entsteht ein amphiphiles Molekül, das die Zellmembran leichter permeieren kann. Intrazelluläre Esterasen spalten die AM-Gruppe ab, wodurch eine erneute Permeation von Fura-2 aus der Zelle hinaus verhindert wird [430].

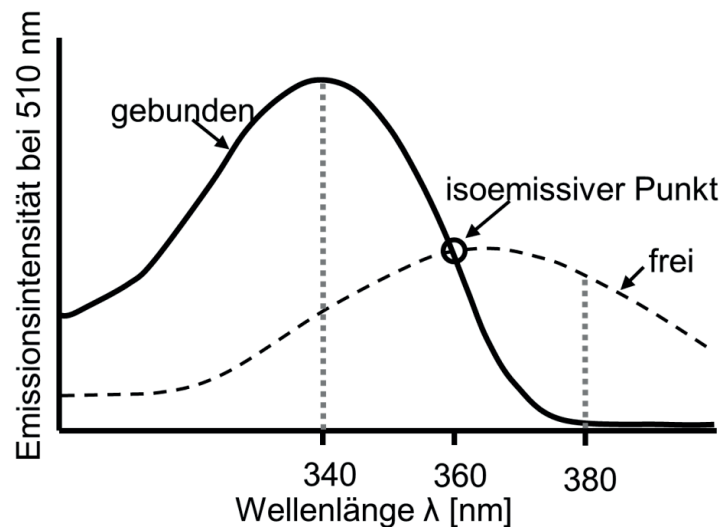


Abbildung 11: Exzitationsspektrum von Fura-2

Schematische Darstellung der bei 510 nm gemessenen Fluoreszenzintensitäten von Fura-2 in Abhängigkeit von der Anregungswellenlänge. Die durchgezogene Kurve zeigt die Emissionsintensität von an Kalzium gebundenem Fura-2 und die gestrichelte Kurve die Emissionsintensität der freien Fura-2 Anionen. Der isoemissive Punkt von gebundenem und freiem Fura-2 liegt bei einer Anregungswellenlänge von 358 nm. Für den experimentellen Aufbau wurden die Anregungswellenlängen 340 nm (gebundenes Fura-2) und 380 nm (freies Fura-2) ausgewählt. (Modifiziert nach [429]).

1.3.2 Messstand für die Durchführung des „Ca²⁺-Imagings“

Der Messstand für die Durchführung der „Ca²⁺-Imaging“ Versuche befand sich auf einem schwingungsfreien Tisch, um mögliche Bewegungsartefakte zu verhindern. Als Lichtquelle diente eine Quecksilberdampfampe, deren Licht durch ein mit Filtern für 340 und 380 nm bestücktes Filterrad geleitet wurde. Diese Filter wurden mit Hilfe eines elektronisch geregelten „shutters“ kontrolliert. Den Boden der Messkammer stellte ein mit Zellen bewachsenes CELL-VU Gläschen dar. Dieses wurde mit Hilfe eines Teflonrings auf einer Stahlscheibe mit kreisrunder Öffnung (Ø 1 cm) befestigt. So bildete der Teflonring die Wand und das CELL-VU Gläschen den Boden der eigentlichen Messkammer (Abbildung 12). Über einen an der Messkammer befindlichen Zu- und Ablauf erfolgte die Superfusion der Zellen mit Messpuffer.

In einem Inversmikroskop wurde zuvor gefiltertes monochromatisches Licht über einen dichromatischen Spiegel durch ein Fluoreszenzobjektiv von unten in die Messkammer geleitet. Das von den in der Messkammer befindlichen, mit Fura-2AM beladenen Zellen emittierte Licht wurde durch das Fluoreszenzobjektiv und einen 515 nm Sperrfilter zurück zu dem dichromatischen Spiegel geleitet. Der Sperrfilter ließ dabei nur das emittierte Licht passieren, das schließlich von einer 14-bit-CCD-Restlichtkamera erfasst wurde.

Mit Hilfe der Software Metafluor erfolgte die Einstellungen der verwendeten Wellenlängen, der Belichtungszeit und der Abstände zwischen den Messzeitpunkten. Außerdem diente diese Software der Dokumentation und der Ermittlung der Ratiowerte [340 nm / 380 nm].

CELL-VU Gläschen
auf kreisrunder Öffnung

Befestigungsschrauben
für Zu- und Ablauf

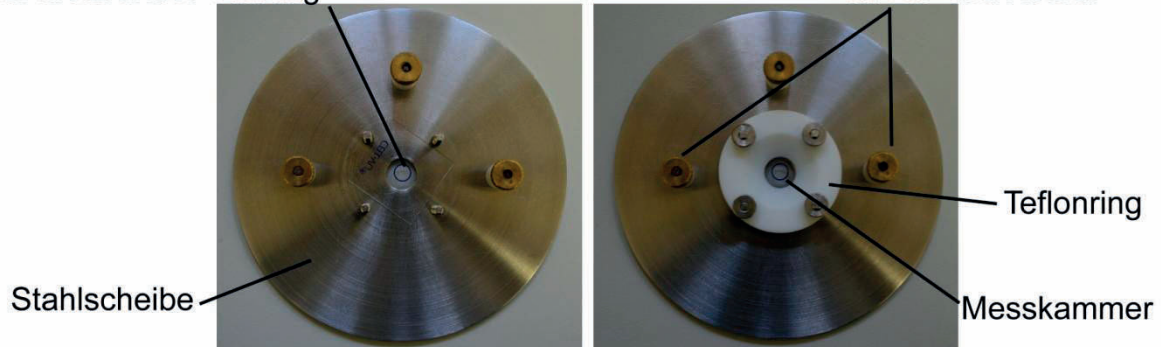


Abbildung 12: Fotografische Darstellung der für das „Ca²⁺-Imaging“ verwendeten Messkammer
Eine Stahlscheibe mit einer kreisrunden Öffnung stellte das Gestell dar, mit dem die Messkammer anschließend in das Inversmikroskop eingesetzt wurde. Das CELL-VU Gläschen bildete den Boden der Messkammer. Die mit Zellen bewachsene Seite war nach oben orientiert. Da die Zellen auf der rasterabgewandten Seite des Gläschens besser gewachsen sind, wurden sie auf der Unterseite der CELL-VU Gläschen kultiviert. Deshalb erfolgte ein spiegelverkehrtes Einspannen des Gläschens in die Messkammer. Die Wände der eigentlichen Messkammer wurden durch den befestigten Teflonring gebildet. Nach dem Einlegen der Stahlscheibe in das Inversmikroskop wurden Zu- und Ablaufschläuche mit Hilfe der Befestigungsschrauben angebracht.

1.3.3 Versuchsdurchführung

Um präparationsbedingte und individuelle Unterschiede zu minimieren, wurde jedes Messprotokoll mit Primärkulturen mindestens drei unterschiedlicher Präparationstage durchgeführt.

3 - 4 Tage nach der Präparation wurden die Primärkulturen jeweils unmittelbar vor ihrer Messung für das „Ca²⁺-Imaging“ vorbereitet. Dazu wurde zunächst das verbrauchte Zellkulturmedium entfernt und anschließend wurden die Zellen einmalig mit warmer Fura-2AM Gebrauchslösung gewaschen. Schließlich wurden 350 µl der Fura-2AM Gebrauchslösung für 40 Minuten in der Zellkulturkammer inkubiert. Die Beladung der Zellen mit Fura-2AM erfolgte lichtgeschützt im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂. Im Anschluss wurde die verwendete Fura-2AM Gebrauchslösung entfernt und das CELL-VU Gläschen vorsichtig von der flexiPERM Zellkulturkammer gelöst, um mit dem CELL-VU Gläschen samt anhaftenden Zellen die Messkammer zusammenzusetzen (Abbildung 12). Der aus einem Schlauchsystem mit jeweils gebogenen in die Kammer ragenden Kanülen bestehende Zu- sowie Ablauf wurde umgehend an der Messkammer befestigt, um die Superfusion mit warmem Ca²⁺-Messpuffer zu beginnen. Dadurch wurde ein Austrocknen der Zellen

verhindert und gleichzeitig nicht zellulär aufgenommenes Fura-2AM entfernt. Eine Schlauchpumpe gewährleistete eine Flussrate des Messpuffers von 2 ml/min.

Zunächst wurde am Inversmikroskop die Beladung der Zellen mit Fura-2AM beurteilt und gleichzeitig eine für die Messung geeignete Region der Mikrozellkultur aufgesucht. Dafür sollten zu differenzierende, vereinzelte Zellen vorliegen. Anschließend wurden mit der Software Metafluor zu messende Zellen als „regions of interest“ (ROIs) definiert und fortlaufend nummeriert, um somit die gewonnen Messwerte direkt spezifischen Zellen zuordnen zu können.

Mit dem eigentlichen Messprotokoll wurde erst begonnen, nachdem eine stabile Ratio [340 nm / 380 nm] für alle gewählten ROIs erreicht war. Das wurde nach Entfernung des nicht zellulär aufgenommenen Fura-2AM erreicht und dauerte in der Regel 5 – 10 Minuten. Während der Stimulation mit den TLR-Agonisten fand alle 3 Sekunden eine Messung der induzierten Photoemission statt. Während der Regenerationsphase erfolgte dies lediglich alle 8 Sekunden, um ein unnötiges Ausbleichen zu vermeiden. Die Belichtungszeit betrug bei 340 nm Anregungswellenlänge 70 Millisekunden (ms), hingegen erfolgte die Belichtung mit 380 nm für 35 ms.

Im Anschluss an die Messungen wurden die Zellen für die spätere immunzytochemische Zelltypenbestimmung vorbereitet (siehe Kapitel III E.1.3). Dafür wurden die Primärkulturen für 15 Minuten in Multi-Dishplatten mit gekühltem PFA (4 %) fixiert, dreimalig mit gekühltem PBS gewaschen und anschließend bis zu zwei Wochen bei 4 °C in PBS gelagert.

1.3.4 Verwendete Messprotokolle

Tabelle 29: Für das „Ca²⁺-Imaging“ verwendete Stimulationslösungen

Bezeichnung	Zusammensetzung [Endkonzentration]
HMGB1 [0,01 µg/ml]	10 µl HMGB1 Stocklösung [1 µg/ml] 90 µl PBS
HMGB1 [0,1 µg/ml]	100 µl HMGB1 Stocklösung [100 µg/ml] oder 10 µl HMGB1 Stocklösung [10 µg/ml] 90 µl PBS
HMGB1 [1 µg/ml]	100 µl HMGB1 Stocklösung [10 µg/ml] oder 10 µl HMGB1 Stocklösung [100 µg/ml] 90 µl PBS
HMGB1 [5 µg/ml]	100 µl HMGB1 Stocklösung [50 µg/ml] oder 50 µl HMGB1 Stocklösung [100 µg/ml] 50 µl PBS
HMGB1 [1 µg/ml] / LPS [1 µg/ml]	10 µl HMGB1 Stocklösung [100 µg] 10 µl LPS Stocklösung [100 µg] 80 µl PBS

Bezeichnung	Zusammensetzung [Endkonzentration]
LPS [0,01 µg/ml]	10 µl LPS Stocklösung [1 µg/ml] 90 µl PBS
LPS [0,1 µg/ml]	100 µl LPS Stocklösung [1 µg/ml] 100 µl LPS Stocklösung [10 µg/ml]
LPS [1 µg/ml]	oder 10 µl LPS Stocklösung [100 µg/ml] 90 µl PBS
LPS [5 µg/ml]	50 µl LPS Stocklösung [100 µg/ml] 50 µl PBS
LPS [10 µg/ml]	100 µl LPS Stocklösung [100 µg/ml]
PBS	100 µl PBS

Die Stimulation der Zellen erfolgte durch eine Boluszugabe der zu untersuchenden Substanzen. Ein Bolus wies ein Volumen von 100 µl auf, sodass die Substanzen in der Zellkammer zusätzlich um den Faktor 1:10 verdünnt vorlagen. Als Kontrolle und zur Ermittlung mechanosensitiver Zellen erfolgte eine Bolusapplikation von 100 µl PBS (Lösungsmittel) vor jedem Versuch. Bei Auftreten einer Reaktion auf diese Bolusapplikation wurde die entsprechende Zelle von der Auswertung ausgeschlossen.

Unmittelbar vor jeder Bolusinjektion wurde die Superfusion mit Ca²⁺-Messpuffer gestoppt und während des einminütigen Stimulationszeitraumes ausgesetzt. Im Anschluss erfolgte eine sechsminütige Superfusion mit Ca²⁺-Messpuffer. Diese diente einer Regeneration der Zellen und einer Entfernung von möglicherweise sezernierten sekundären Botenstoffen (Abbildung 13). Im Anschluss an jeden Versuch erfolgte ein dreiminütiger Vitalitätstest durch eine Superfusion mit kaliumreichem Ca²⁺-Messpuffer. Aufgrund der spezifischen Wirkung auf Neurone diente diese Superfusion zusätzlich als weitere Differenzierungsmöglichkeit der unterschiedlichen Zelltypen. Kaliumchlorid (KCl) hat bei vitalen Neuronen eine Depolarisierung zur Folge, die unter anderem über eine Öffnung spannungsabhängiger Kationen-Kanäle zum Einstrom von Kalziumionen aus dem Extrazellularraum führt und dadurch mit einer charakteristischen Veränderung der Ratio [340 nm / 380 nm] einhergeht.

Die für den jeweiligen Versuchstag benötigte Menge der Stocklösungen (1 µM, 1 µg/ml, 50 µg/ml) wurde unmittelbar vor den „Ca²⁺-Imaging“ Versuchen durch eine Verdünnung von Stocklösungen höherer Konzentrationen mit PBS hergestellt.

Untersuchung der vergleichenden Dosis-Wirkungs-Beziehung zwischen endogenen und exogenen TLR-Agonisten

In vorangegangenen Studien konnte anhand von Primärkulturen der AP gezeigt werden, dass die AP als Sensor für im Blut zirkulierendes LPS dienen kann [35]. Bei den von Wuchert *et. al* (2008) durchgeführten Versuchen reagierten 10-12 % der untersuchten

Mikrogliazellen auf eine LPS-Applikation [100 µg/ml] mit einem Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$. Hingegen waren Neurone, Astrozyten und Oligodendrozyten weniger responsiv. Diese Ergebnisse zeigten erstmals, dass „pathogen-associated molecular patterns“ (PAMPs) eine direkte Wirkung auf Zellen eines sensorischen zirkumventrikulären Organs („sensory circumventricular organ“, sCVO) besitzen und damit eine mögliche direkte Ursache für Fieber und andere Symptome des „sickness behaviors“ darstellen. Ursprünglich ging man davon aus, dass Gehirnzellaktivierung in den CVOs ausschließlich durch peripher gebildete Zytokine zu erklären ist [431].

Um die physiologische Bedeutung der Befunde aus früheren Untersuchungen genauer zu untersuchen, wurde im Rahmen dieser hier vorliegenden Arbeit eine Dosis-Wirkungs-Studie vorgenommen. Hierfür wurden deutlich geringere LPS-Konzentrationen verwendet als bei Wuchert und Kollegen (2008). Außerdem erfolgte erstmals ein Vergleich der Dosis-Wirkung des PAMP LPS mit der des „danger / damage-associated molecular pattern“ (DAMP) HMGB1.

Die verwendeten TLR-Agonisten wurden in den in Tabelle 29 angegebenen Konzentrationen eingesetzt. Das hierfür verwendete Messprotokoll ist in Abbildung 13 dargestellt.

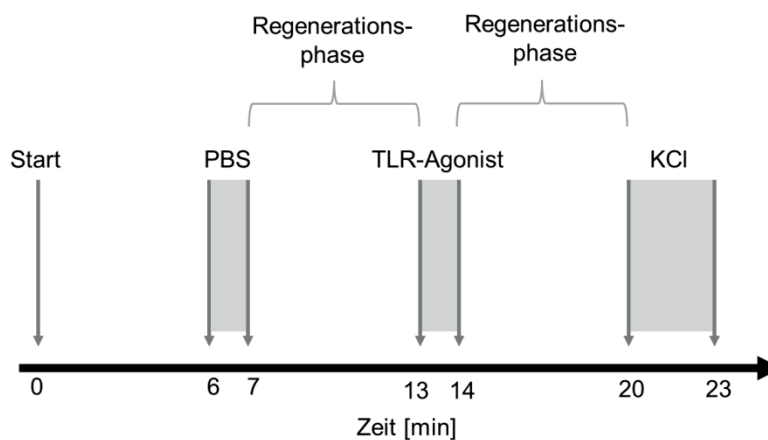


Abbildung 13: Schematische Darstellung der zeitlichen Abläufe des „Ca²⁺-Imaging“ Messprotokolls für die Untersuchung der Dosis-Wirkungs-Beziehung unterschiedlicher TLR-Agonisten

In allen durchgeführten „Ca²⁺-Imaging“ Versuchen ging der eigentlichen Stimulation mit einem TLR-Agonisten eine Bolusapplikation von PBS voraus, die als Negativkontrolle für mechanische Aktivierung verwendet wurde. Während der Regenerationsphase wurden die Zellen mit warmem Ca²⁺-Messpuffer superfundiert. Dies diente neben der Regeneration auch der Entfernung sekundärer Metaboliten. Am Ende der durchgeführten Messungen erfolgte eine Superfusion mit kaliumreichem Ca²⁺-Messpuffer als Vitalitätstest.

Untersuchung eines gegenseitig modulatorischen Effektes von LPS und HMGB1 auf induzierte Zellreaktionen

Nachdem in den durchgeführten *in vivo* Versuchen gezeigt werden konnten, dass eine i.p. Applikation von LPS [2,5 mg/kg KGW] eine HMGB1 Freisetzung im Gehirn bewirkt

(Abbildung 25), stellte sich die Frage, ob die HMGB1-bedingte zelluläre Aktivierung durch zuvor wirkendes LPS moduliert wird. Für die Beantwortung wurde ein Kombinationsprotokoll etabliert, bei dem, neben den Bolusapplikationen der beiden einzelnen TLR-Agonisten LPS und HMGB1, auch eine gemeinsame Applikation von LPS und HMGB1 vorgenommen wurde (Abbildung 14, Abbildung 15). Dafür wurde die Stimulationslösung aus LPS und HMGB1 unmittelbar vor der Bolusapplikation angesetzt (siehe Tabelle 29).

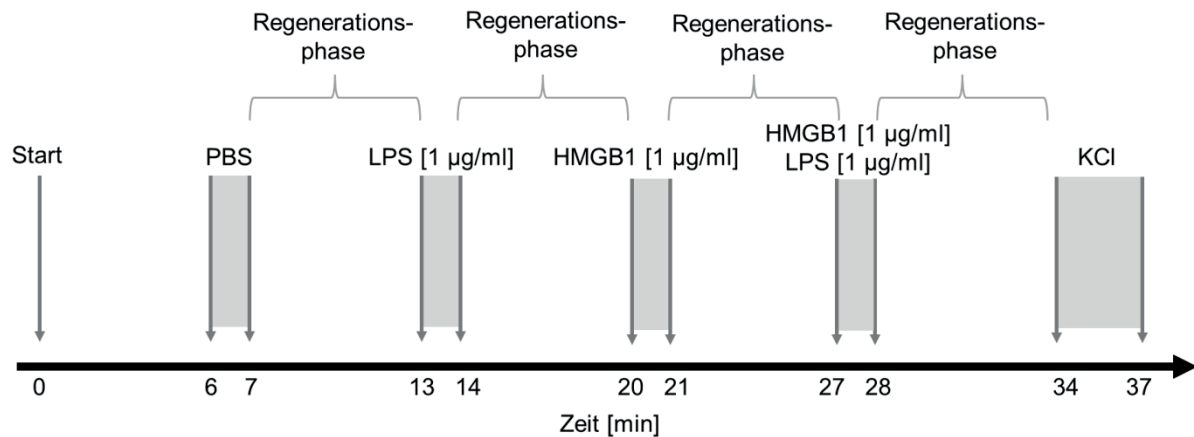


Abbildung 14: Schematische Darstellung der zeitlichen Abläufe des kombinierten „Ca²⁺-Imaging“ Messprotokolls zur Untersuchung eines modulatorischen Effektes von LPS auf HMGB1-induzierte Reaktionen

Die Bolusapplikation von PBS diente dabei dem Ausschluss mechanosensitiver Zellen. In den auf die Stimuli folgenden Regenerationsphasen fand eine Superfusion mit warmem Messpuffer statt. Als Vitalitätstest wurde eine Superfusion mit kaliumreichem Ca²⁺-Messpuffer durchgeführt.

Kürzlich wurde herausgefunden, dass HMGB1 die LPS-induzierten neuroinflammatorischen Prozesse verstärkt. Bei den von Frank *et al.* (2016) durchgeführten Versuchen konnte eine Potenzierung der LPS-induzierten Neuroinflammation durch eine 24 Stunden zuvor durchgeführte Injektion von Disulfid-HMGB1 in die *Cisterna magna* gezeigt werden [432]. Dieser Effekt war ebenfalls bei *in vitro* Versuchen an isolierten Mikrogliazellen nachweisbar [432]. Das in Abbildung 15 dargestellte Messprotokoll wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit verwendet, um die zuvor beschriebenen Sensibilisierungseffekte von HMGB1 auf LPS-induzierte Reaktionen in Bezug auf die schnelle, direkte Zellantwort zu untersuchen. Gleichzeitig diente dieses Messprotokoll als Kontrolle zum umgekehrten Messprotokoll, in welchem die Primärkulturen erst mit LPS und danach mit HMGB1 inkubiert wurden (Abbildung 14).

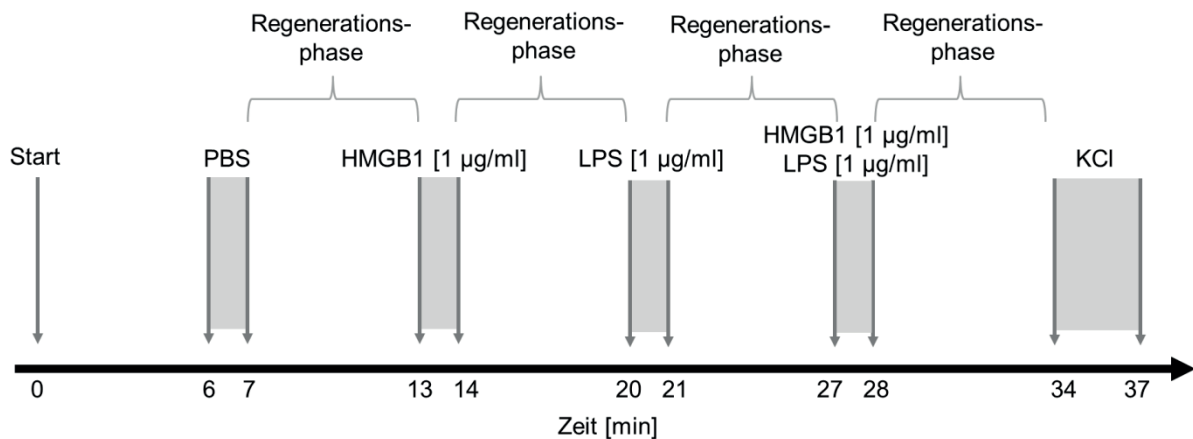


Abbildung 15: Schematische Darstellung der zeitlichen Abläufe des kombinierten „Ca²⁺-Imaging“ Messprotokolls zur Untersuchung eines modulatorischen Effektes von HMGB1 auf LPS-induzierte Reaktionen

Bei diesem Messprotokoll wurde ebenfalls eine Kontrolle der Mechanosensitivität durch PBS-Applikation sowie eine Vitalitätskontrolle durch eine Superfusion mit kaliumreichem Ca²⁺-Messpuffer durchgeführt. Während der Regenerationsphasen erfolgte eine Superfusion mit warmem Ca²⁺-Messpuffer.

1.3.5 Datenevaluierung

Während der Versuchsdurchführung erfasste die CCD-Kamera die zellspezifische Photoemission, die durch die jeweilige Anregungswellenlänge von 340 nm (an Kalzium gebundenes Fura-2AM) bzw. 380 nm (freies Fura-2AM) induziert wurde. Durch diese Intensitätswerte ermittelte das Programm Metafluor die automatisch an Microsoft Excel übertragene Ratio [340 nm / 380 nm].

Bei Excel erfolgte in einer anschließenden Auswertungsphase eine graphische Darstellung der zeitabhängigen Ratiowerte für jede Zelle. Für die Beurteilung einer Aktivierung dienten die Ratioänderungen während eines Stimulationszeitraumes und einer anschließenden Periode von 100 Sekunden. Dabei wurde die Differenz zwischen dem maximalen Ratiowert während der Stimulation und dem Mittelwert der vorangegangenen Regenerationsphase herangezogen. Im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit wurden als positive Stimulation nur Ratioänderungen (Δ Ratio) berücksichtigt, die $\geq 0,05$ betragen, um mögliche physiologische Schwankungen der Basislinie auszuschließen. Außerdem wurden Zellen, die positiv auf die Bolusapplikation von PBS reagierten sowie solche, die während des Versuchs keine stabile Basislinie aufwiesen oder nach einer Stimulation nicht zu dieser zurück kehrten, von der Auswertung ausgeschlossen.

Für jede der zu untersuchenden Substanzen und Messprotokolle wurde der prozentuale Anteil responsiver Zellen ermittelt sowie die Höhe der induzierten Ratioänderung berechnet.

2 Fat Explants

Ge- und Verbrauchsmaterialien für die Arbeit mit „Fat Explants“

Tabelle 30: Für die Arbeit mit „Fat Explants“ benötigte Ge- und Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Typ	Hersteller
Multi-Wellplatten	12-fach	Greiner Bio-One GmbH, D-Frickenhausen
Operationsbesteck		Aesculap, Tuttlingen
Petrischalen	Plastik, 100 x 20 / 35 x 10 mm	Sarstedt AG und Co. KG, D-Nümbrecht

Chemikalien für die Arbeit mit „Fat Explants“

Tabelle 31: Für die Arbeit mit „Fat Explants“ benötigte Chemikalien

Bezeichnung	Hersteller
2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazinyl)-Ethansulfonsäure (HEPES) <i>Aqua ad iniectabilia (Aqua dest.)</i>	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, D-München B. Braun Melsungen AG, D-Melsungen
Biglycan from bovine articular cartilage, Lot: 033M4046V	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, D-München
Biglykan Stocklösung (1000 µg/ml)	Lösen von Biglykan in PBS (pyrogenfrei)
Biglykan Stocklösung (100 µg/ml)	Verdünnung der Stocklösung [1000 µg/ml] 1:10 mit PBS (pyrogenfrei)
disulfide High-Mobility Group Box-1, LPS free (HMGB1), Lot: 170823, 18050P, 180720, 671121	HMGBiotech S.r.l., Mailand, Italien
HMGB1 Stocklösung [100 µg/ml]	Lösen von HMGB1 in sterilem <i>Aqua dest.</i>
Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12 (DMEM/F12)	Invitrogen, D-Darmstadt
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline	PAA GmbH, A-Pasching
Ethanol, vergällt (ETOH)	Stockmeier GmbH & Co. KG, D-Dillenburg
Fetales Kälberserum (FKS)	PAA GmbH, A-Pasching
Hank's Balanced Salt Solution (HBSS), Ca ²⁺ - und Mg ²⁺ -frei	Biochrom AG, D-Berlin
Lipopolysaccharid (LPS) (E. coli, Serotyp 0111:B4), Lot: 043M4104	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, D-München
LPS Stocklösung [1000 µg/ml]	Lösen von LPS in PBS (pyrogenfrei)
LPS Stocklösung [100 µg/ml]	Verdünnung der Stocklösung [1000 µg/ml] 1:10 mit PBS (pyrogenfrei)
LPS Stocklösung [10 µg/ml]	Verdünnung der Stocklösung [100 µg/ml] 1:10 mit PBS (pyrogenfrei)
Penicillin / Streptomycin	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA

Bei Fettgewebe handelt es sich um einen wichtigen Syntheseort für Zytokine und Adipokine. Allerdings konnte nachgewiesen werden, dass weniger die Adipozyten als die fettgewebsassoziierten Zellen für die Sekretion vieler der entzündungsfördernden Mediatoren verantwortlich sind. Die Sekretion von Adiponektin und Leptin erfolgt hingegen durch

Adipozyten [433]. Während systemischer Entzündungsreaktionen trägt Fettgewebe also zur Bildung zirkulierender Immunmediatoren bei. Damit beeinflusst es die Gesamtreaktion auf inflammatorische Stimuli [434]. Fettgewebekulturen stellen ein geeignetes und wichtiges Modell bei der Untersuchung der Bedeutung des Fettgewebes für den Verlauf systemischer Entzündungen dar. Sie bieten den Vorteil, dass die Sekretion aller im Fettgewebe enthaltenen Zelltypen bei einer Erhaltung des physiologischen „crosstalks“ der verschiedenen Zelltypen gemessen werden kann. Das hierfür verwendete Protokoll wurde von Pohl *et al.* (2009) etabliert und in vorherigen Studien im eigenen Haus bereits verwendet [287, 289]. Im Verlaufe dieser Arbeit werden diese *ex vivo* Fettgewebekulturen als „Fat Explants“ bezeichnet.

Bei den hier durchgeführten „Fat Explant“ Untersuchungen fand weißes- und braunes Fettgewebe Verwendung. Es wurde von jungen (2 Monate) und alten (2 Jahre) Ratten entnommen und vergleichend mit LPS, HMGB1, Biglykan oder PBS stimuliert. Anschließend erfolgte eine Analyse sezernierter Zytokine (Bioassay, siehe Kapitel III E2) und Adipokine („enzyme-linked immunosorbent assay“ (ELISA), siehe Kapitel III E5) sowie der relativen Expression verschiedener Rezeptoren im *subcutanen* Fettgewebe (RT-PCR, siehe Kapitel III E3).

Das für diesen Versuch verwendete Fettgewebe stammte von Ratten, deren Tötung für die Entnahme des Darmes durch die Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Martin Diener des Instituts für Veterinär-Physiologie und –Biochemie der JLU Gießen durchgeführt wurde. Diese Tötung zur Organentnahme wurde zuvor beim Regierungspräsidium Gießen angezeigt (485-M).

2.1 Präparation der Fat Explants

Lösungen und Puffer

Tabelle 32: Für die Präparation der „Fat Explants“ benötigte Lösungen und Puffer

Bezeichnung	Zusammensetzung
PBS Waschlösung	500 ml PBS 6 ml Penicillin / Streptomycin
HBSS-Puffer für die „Fat Explants“	500 ml HBSS 5 ml Penicillin / Streptomycin 7,5 ml HEPES
DMEM/F12 mit Serum	200 ml DMEM/F12 10 ml FKS 2 ml Penicillin / Streptomycin 3 ml HEPES
DMEM/F12 ohne Serum	300 ml DMEM/F12 3 ml Penicillin / Streptomycin 4,5 ml HEPES

2.1.1 Durchführung der Präparation

Aufgrund des unterschiedlichen Fettgehaltes der jungen und alten Ratten wurde pro Versuchstag Fettgewebe einer alten Ratte oder zwei junger Ratten, die gemeinsam genügend Fettgewebe für die Versuchsdurchführung aufwiesen, isoliert. Die Tötung der Tiere erfolgte durch Betäubungsschlag und Entbluten. Nach der sauberen Entnahme des Darmes wurde *subcutanes* Fettgewebe isoliert. Die Entnahme erfolgte beidseits in der Leistengegend, wo es sich *caudal* zwischen *Subcutis* und Muskulatur befand. Entlastungsschnitte entlang der Rippenbögen ermöglichten das Wegklappen der Muskulatur, was neben der Vermeidung von Kontaminationen auch der Raumgewinnung für die weitere Präparation diente. *Epididymales* Fettgewebe wurde beidseits dorsal der Hoden entlang der Samenleiter entnommen. Eine Entnahme von *retroperitonealem* Fettgewebe fand beidseits *retroperitoneal* des *caudalen* Nierenpols statt. Bei der Präparation junger Ratten wurde das Fettgewebe beidseits entnommen und zusammengetragen. Das Fettgewebe der gleichen Lokalisation der zweiten jungen Ratte stellte die zweite Gruppe für die Randomisierung dar, welche bei den alten Ratten entsprechend von dem entnommenen Fettgewebe der linken oder der rechten Seite gebildet wurden (Abbildung 16).

Anschließend wurde die Ratte umgelagert und auf den Bauch gelegt. Die Haut im Schulterbereich wurde großzügig mit Ethanol (70 %) übergossen und darauf folgend von der Muskulatur getrennt. Braunes Fettgewebe war sowohl bei jungen als auch bei alten Ratten in großen Mengen zu isolieren. Es befand sich als Kissen zwischen der Muskulatur der Schulterblätter und war makroskopisch deutlich als braunes Fettgewebe zu erkennen.

Alle Fettgewebe wurden unmittelbar nach der Entnahme entsprechend ihrer Lokalisation sowie der Seite ihrer Entnahme (links / rechts bzw. Ratte 1 / Ratte 2 [bei jungen Ratten]) getrennt und in zuvor beschriftete, mit kalter PBS Waschlösung gefüllte Röhrchen überführt. Dieser Waschschrift diente der Entfernung von eventuell anhaftenden Haaren und möglichen groben Kontaminationen. Deren Eintrag konnte zwar während der Präparation weitgehend verhindert werden, war aber nicht mit Sicherheit auszuschließen. Anschließend wurde das Fettgewebe in neue, mit kaltem HBSS-Puffer gefüllte Röhrchen gegeben und bis zur Beendigung der Präparation auf Eis gelagert.

Es schloss sich eine Überführung des Inhalts der Röhrchen in Petrischalen an, in denen die Fettgewebe in einen *cranialen*, *medialen* und *caudalen* Anteil separiert wurden. Anschließend erfolgte eine Zerkleinerung in etwa 60 mg schwere Fettgewebstücke. Die Durchführung aller weiteren Schritte fand unter einer sterilen Arbeitsbank statt. Damit möglicherweise lokal vorliegende Veränderungen keine Auswirkung auf die Untersuchungen hatten, wurden die Fettgewebstücke nach einem festgelegten Randomisierungsschema in

die „Wells“ der Multi-Wellplatten gegeben (Abbildung 16). Diese „Wells“ enthielten bereits 2 ml des HBSS-Puffers. Nachdem das Fettgewebe dreimalig mit HBSS-Puffer gewaschen wurde, erfolgte ein Befüllen der „Wells“ mit 2 ml des angewärmten Mediums (DMEM/F12 mit Serum). Anschließend wurden die „Fat Explants“ für 24 Stunden im Brutschrank bei 37 °C, 95 % Luftfeuchtigkeit und 5 % CO₂ mit dem serumhaltigen DMEM/F12 inkubiert.

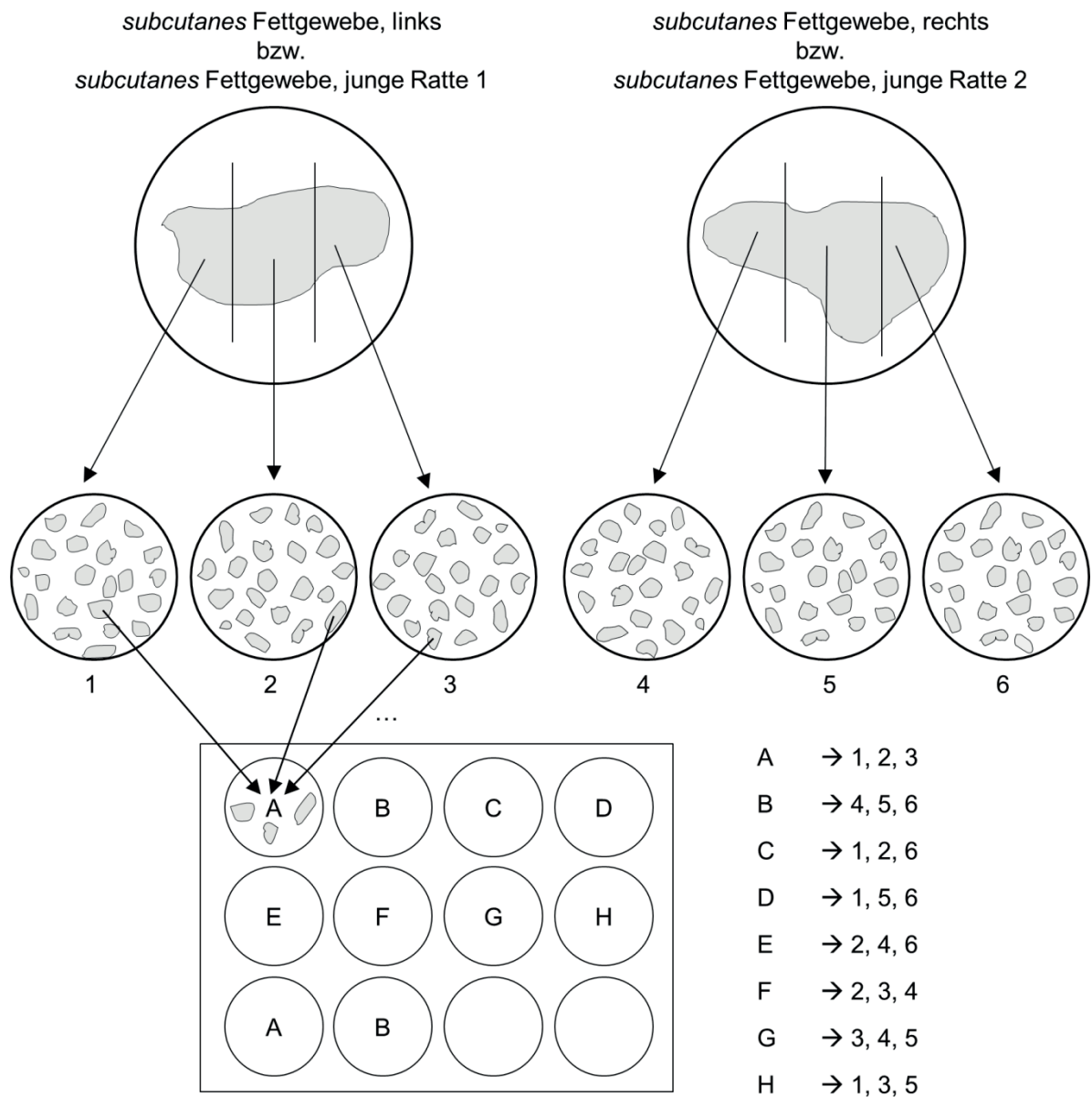


Abbildung 16: Darstellung der Randomisierung des gewonnenen Fettgewebes für die „Fat Explants“

Die Abbildung zeigt die Randomisierung am Beispiel des *subcutanen* Fettgewebes. Zunächst wurde das gewonnene Fettgewebe einer Körperseite (bzw. einer jungen Ratte) in einen *cranialen*, *medialen* und *caudalen* Anteil getrennt. Anschließend wurden die etwa 60 mg schweren Fettgewebestücke dieser Anteile separiert voneinander gesammelt (1-6). Jedes „Well“ erhielt drei Fettgewebestücke aus unterschiedlichen, zuvor definierten Gruppen, sodass acht verschiedene „Fettgewebemischungen“ entstanden (A-H), die letztendlich einer Vermeidung lokalitätsbedingter Artefakte dienen.

2.2 Stimulation der „Fat Explants“

Lösungen und Puffer

Tabelle 33: Für die Stimulation der „Fat Explants“ benötigte Lösungen und Puffer

Bezeichnung	Zusammensetzung (pro Multi-Wellplatte)
Biglykan [1 µg/ml]	5940 µl DMEM/F12 ohne Serum 60 µl Biglykan Stocklösung [100 µg/ml]
HMGB1 [1 µg/ml]	5940 µl DMEM/F12 ohne Serum 60 µl HMGB1 Stocklösung [100 µg/ml]
LPS [0,1 µg/ml]	2970 µl DMEM/F12 ohne Serum 30 µl LPS Stocklösung [10 µg/ml]
LPS [10 µg/ml]	5940 µl DMEM/F12 ohne Serum 60 µl LPS Stocklösung [1000 µg/ml]
PBS	5940 µl PBS 60 µl PBS

2.2.1 Durchführung der Stimulation

Nach der 24-stündigen Regenerationsphase begann der eigentliche Versuch. Dafür wurde serumfreies Medium verwendet (DMEM/F12 ohne Serum). Mit diesem wurden auch die Stimulationslösungen entsprechend der Tabelle 33 angesetzt. Zunächst wurde das Fettgewebe einmalig mit 2 ml des serumfreien DMEM/F12 Mediums gewaschen, um das Serum des Vortages zu entfernen. Anschließend wurden die „Wells“ mit 2 ml der Stimulationslösung befüllt.

Für jedes biologische Replikate wurden drei technische Replikate der Stimulation des *subcutanen*, *retroperitonealen* und *epididymalen* Fettgewebes mit Biglykan [1 µg/ml], HMGB1 [1 µg/ml] und PBS durchgeführt. Für die Stimulation mit LPS [0,1 µg/ml] wurde hingegen kein technisches Replikate angefertigt, da es sich bei der Stimulation des *subcutanen*, *retroperitonealen* und *epididymalen* Fettgewebes mit LPS um eine vergleichende Positivkontrolle handelte, die bereits in einer früheren Studie untersucht worden war [289]. Die Stimulation des braunen Fettgewebes erfolgte hingegen lediglich mit LPS [10 µg/ml] und PBS als Kontrolle, wobei hier ebenfalls drei technische Replikate beider Stimulationen durchgeführt wurden. Untersuchungen zum braunen Fettgewebe waren durch Koenig *et al.* (2014) nicht durchgeführt worden.

Die Multi-Wellplatten wurden für weitere 24 Stunden im Brutschrank bei 37 °C, 95 % Luftfeuchtigkeit und 5 % CO₂ inkubiert. Anschließend erfolgte eine portionierte Überführung der Überstände in 1,5 ml Reaktionsgefäße. Es wurde 1 ml des Überstandes für die Zytokinanalysen und 1 ml für die Adipokinanalysen zur Verfügung gestellt. Das Fettgewebe wurde in 2 ml Reaktionsgefäße gegeben und gegengewogen, um die Zytokin- und Adipokin-Synthese rechnerisch auf ein einheitliches Feuchtgewicht von 1 g normalisieren zu können.

Sowohl die abgenommenen Überstände als auch die Fettgewebstücke der einzelnen „Wells“ wurden bis zu ihrer weiteren Verarbeitung bei $-22\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

III E Erfassung biochemischer Parameter

1 Immunzytochemie / Immunhistochemie

Ge- und Verbrauchsmaterialien für die Immunzyto- und Immunhistochemie

Tabelle 34: Für die Immunzyto- bzw. Immunhistochemie benötigte Ge- und Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Typ	Hersteller
Alufolie		Carl Roth GmbH & Co. KG, D-Karlsruhe
Deckgläschen	24 x 60 mm, Nr. H878	Carl Roth GmbH & Co. KG, D-Karlsruhe
Faltenfilter	604	Schleicher und Schuell GmbH, D-Dassel
Fettstift	Pap-Pen 5 mm tip width	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, D-München
Frischhaltefolie	handelsüblich	diverse
Hellendahl-Färbekästen	Glas	Carl Roth GmbH & Co. KG, D-Karlsruhe
Immersionsöl	Type F	Olympus Corporation, Tokio, Japan
Inkubationskästen mit Deckel	20 x 30 x 5 cm	Bochem Instrumente GmbH, D-Weilburg
Lens Tissue	101 020	Dörr GmbH, D-Neu-Ulm
Mikrotom-Klinge	MX35 ULTRA	Thermo Scientific, D-Dreieich
Multi-Dishplatten	8-fach	Nalge Nunc International, Pennfield, NY, USA
Multi-Wellplatten	12-fach	Greiner Bio-One, D-Frickhausen
Nagellack	handelsüblich	diverse
Objektträger	76 x 26 mm	Menzel GmbH und Co. KG, Braunschweig
Objektträgermappen	für 20 Objektträger	LAT Labor- und Analysen-Technik GmbH, D-Garbsen
pH-Indikatorpapier		Merck KGaA, D-Darmstadt
Pinsel	Rotmarderhaar	Renensis, D-Flensburg
Schnittboxen		MAGV GmbH, D-Rabenau

Chemikalien

Tabelle 35: Für die Immunzyto- bzw. Immunhistochemie benötigte Chemikalien

Bezeichnung	Hersteller
4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)	MoBiTec, D-Göttingen
<i>Aqua ad injectabilia (Aqua dest.)</i>	B. Braun Melsungen AG, D-Melsungen
bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, D-München
Citifluor AF1 (Immunzytochemie)	Citifluor Ltd., GB-London
Di-Natriumhydrogenphosphat Monohydrat (Na ₂ HPO ₄)	Merck KGaA, D-Darmstadt
doppelt entionisiertes Wasser (<i>Aqua bidest.</i>)	Millipore Reinstwassersystem
Einbettmedium für Gefrierschnitte	Leica Biosystems Nussloch GmbH, D-Nussloch
fetales Kälberserum (FKS)	PAA GmbH, A-Pasching
Natriumhydrogenphosphat dibasisches Dihydrat (NaH ₂ PO ₄)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, D-München
normal donkey serum (NDS)	Biozol Diagnostica Vertrieb GmbH, D-Eching
Paraformaldehyd (PFA)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, D-München
Poly-L-Lysin	Biochrom AG, D-Berlin
Phosphate Buffered Saline (PBS) Tablets	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, D-München
Triton X-100 (t-Octylphenoxyethylpoly-Ethoxyethanol)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, D-München
Tween® 20	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, D-München

1.1 Grundlagen der Methode

Bei der Immunhistochemie bzw. der Immunzytochemie werden molekulare Strukturen durch eine Antikörperbindung visualisiert. Es findet vor allem die indirekte Immunhistochemie bzw. Immunzytochemie Anwendung. Dabei werden die Antigene durch selektive Primärantikörper detektiert und diese wiederum durch farbmarkierte sekundäre Antikörper sichtbar gemacht. Stammen die Primärantikörper aus unterschiedlichen Spezies, ist eine Doppelmarkierung verschiedener Antigene innerhalb einer Probe möglich, da sich die sekundären Antikörper gegen das Fc-Fragment („fragment crystalline“) der Wirtsspezies des Primärantikörpers richten. Außerdem erfolgt durch die indirekte Darstellung der Antigene eine Signalverstärkung, weil mehrere fluoreszenzmarkierte Sekundärantikörper an das Fc-Fragment des Primärantikörpers binden können. Da im Rahmen dieser Arbeit mit Fluorochrom markierte Sekundärantikörper verwendet wurden, kann auch von Immunfluoreszenz gesprochen werden.

Durch die Anregung der Fluoreszenzfarbstoffe mit einer geeigneten Wellenlänge emittieren sie längerwelliges Fluoreszenzlicht, das in einem Fluoreszenzmikroskop sichtbar wird. Dabei wird durch einen Sperrfilter im Fluoreszenzmikroskop sichergestellt, dass nur das emittierte Licht durch das Mikroskop wahrgenommen wird.

Neben den Antikörpern zur spezifischen Detektion von Antigenen wurde 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) verwendet. DAPI bindet unspezifisch an DNA und macht so bei Anwendung einer bestimmten Anregungswellenlänge unspezifisch alle Zellkerne sichtbar. Dies diente der Darstellung des Gewebes sowie nicht signaltragender Zellen und gleichzeitig der genauen Beurteilung der Lokalisation intra- oder extranukleärer Signale.

1.2 Antikörper

Primärantikörper

Tabelle 36: Die für die Immunfluoreszenz verwendeten Primärantikörper

Antigen	Spezies, Typ	Verdünnung	Katalog-Nr.; Lot-Nr.	Hersteller
CD68 (ED1)	mouse monoclonal IgG	1:1000	MCA341R; Lot: 050809	Bio-Rad Laboratories, D-Puchheim
GFAP	goat polyclonal IgG	1:1000	sc-6171; Lot: A2207	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA
GFAP	mouse monoclonal IgG	1:800	MAB3402; Lot: 2724317, 2669950	Merck Chemicals GmbH, D-Darmstadt
GFAP	rabbit polyclonal IgG	1:800	Z0334; Lot: 20028619	DakoCytomation, D-Eching
HMGB1	rabbit polyclonal IgG	1:100 (Gewebe), 1:4000 (Kultur)	ab18256; Lot: GR191720-4	abcam plc, Cambridge, UK
IL-1 β	goat polyclonal IgG		AF-501-NA; Lot: YR0811041	R&D Systems, Minneapolis, MN, USA
MAP (2a+2b)	mouse monoclonal IgG	1:600	M1406; Lot: 073M4774	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, D-München
NF κ B	rabbit polyclonal IgG	1:2000	sc-109; Lot: L274	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA
NF-IL6	rabbit polyclonal IgG	1:5000	sc-150; Lot: J2209	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA

Die Spezifität der verwendeten Primärantikörper wurde in vorherigen Studien bereits nachgewiesen [34, 35, 43, 45, 435]. Zusätzlich wurden bei der immunhistochemischen Detektion von HMGB1 in Gefrierschnitten der Rattengehirne Negativkontrollen durchgeführt. Dabei wurden die HMGB1 Antikörper vor ihrer Verwendung durch eine zweistündige Inkubation mit humanem rekombinanten HMGB1 abgesättigt. Diese Kontrolluntersuchungen wurden in Kooperation durch Dr. Ferial Aslani (Institut für Anatomie und Zellbiologie, JLU Gießen) durchgeführt.

Durch die unterschiedlichen Primärantikörper wurden die Transkriptionsfaktoren „nuclear factor interleukin-6“ (NF-IL6) und „nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells“ (NF κ B), das DAMP HMGB1 und das Zytokin IL-1 β dargestellt. Für eine gleichzeitige

Markierung spezifischer zellulärer Phänotypen erfolgte eine Doppelmarkierung mit den Zellmarkern für Neurone, Astrozyten und Mikrogliazellen. Neurone wurden mit Hilfe eines Antikörpers dargestellt, der gegen das „microtubule associated protein 2“ (MAP 2a+2b) gerichtet ist. Hingegen erfolgte die Markierung von Astrozyten durch die Bindung eines Antikörpers an das „glial fibrillary acidic protein“ (GFAP). Eine Antikörperbindung an das Oberflächenprotein „cluster of differentiation 68“ (CD68) wurde eingesetzt um Mikrogliazellen darzustellen. Bei den verwendeten Antikörpern handelt es sich um mono- oder polyklonale Gammaglobuline („immunoglobuline G“ IgG). Die monoklonalen Antikörper sind gegen eine einzige antigene Determinante (Epitop) des zu detektierenden Proteins gerichtet und werden in Zellkultur durch klonierte B-Lymphozyten gebildet. Die polyklonalen Antikörper stammen hingegen aus dem Serum immunisierter Tiere, wurden somit von unterschiedlichen B-Lymphozyten gebildet und sind gegen mehrere Epitope des Antigens gerichtet. Für die Doppelmarkierung wurde eine Primärantikörperlösung mit zwei Primärantikörpern angesetzt, die anschließend gemeinsam mit der Probe inkubierten. Die dabei verwendeten Primärantikörper stammten aus unterschiedlichen Tierspezies, um Kreuzreaktionen der Sekundärantikörper zu vermeiden.

Bei der immunzytochemischen Zelltypdifferenzierung der in den „Ca²⁺-Imaging“ Versuchen gemessenen Zellen, erfolgte eine gleichzeitige Inkubation mit drei Primärantikörpern (MAP 2a+2b [mouse], CD68 [mouse], GFAP [rabbit]). Dies war notwendig, da alle drei Zelltypen in einer Probe voneinander diskriminiert werden mussten, um eine genaue Zelltypbestimmung der zuvor mittels „Ca²⁺-Imaging“ gemessenen Zellen durchführen zu können (IIID1.3). Da die Primärantikörper MAP 2a+2b sowie CD68 beide aus der Maus stammten, wurden sie durch den gleichen sekundären Antikörper detektiert und deshalb mit derselben Lichtemission dargestellt. Aufgrund deutlicher phänotypischer Unterschiede ist bei diesem Verfahren eine eindeutige Differenzierung beider Zelltypen jedoch trotzdem möglich (Abbildung 18).

Sekundärantikörper**Tabelle 37: Für die Immunfluoreszenz verwendete Sekundärantikörper**

Fluorochrom	aus Spezies gegen Spezies	Verdünnung	Katalog-Nr., Lot-Nr.	Hersteller
Alexa488 (Fluoreszeinisothiocyanat Konjugat)	donkey anti-mouse	1:500	A21202, Lot: 1741782, 1423052	Thermo Fisher Scientific Inc., Walham, MA, USA
Alexa488	donkey anti-rabbit	1:500	A21206, Lot: 1723019, 1754421	Thermo Fisher Scientific Inc., Walham, MA, USA
Cy3™ (Carboxymethyl- indocyanin)	donkey anti-goat	1:500	705-165-147 Lot: 92919, 115611	Jackson Immuno Research Europe Ltd., Newmarket, UK
Cy3™	donkey anti-rabbit	1:500 (Gewebe), 1:800 (Kultur)	711-165-152 Lot: 125364	Jackson Immuno Research Europe Ltd., Newmarket, UK
Cy3™	goat anti-mouse	1:800	115-165-003 Lot: 117093	Jackson Immuno Research Europe Ltd., Newmarket, UK

Bei der Doppelbestimmung werden Sekundärantikörper verwendet, die an unterschiedliche Fluorochrome gekoppelt sind. In der hier vorliegenden Arbeit handelte es sich dabei um Alexa488 und Cy3™. Da sich diese Fluorochrome durch ein unterschiedliches Exzitationsmaximum auszeichnen, sind sie im Fluoreszenzmikroskop voneinander zu differenzieren (Alexa488, 460 – 490 nm; Cy3™, 530 – 550 nm). Zum Ausschluss einer unspezifischen Bindung der verwendeten Sekundärantikörper, wurden Kontrollproben ohne Gegenwart der Primärantikörper durchgeführt.

1.3 Durchführung der Immunzytochemie**Lösungen und Puffer****Tabelle 38: Für die Durchführung der Immunzytochemie benötigte Lösungen und Puffer**

Bezeichnung	Zusammensetzung
Blockungslösung	10 % FKS in PBS-T
DAPI Inkubationslösung	DAPI 1:1000 in PBS
PBS 0,01 M (pH 7,4)	Ansatz aus PBS tablets in <i>Aqua bidest.</i> (1 Tablette / 200 ml)
PBS-T	0,05 % Triton X-100 in PBS (0,01 M)
PFA Gebrauchslösung (4 %)	Unter ständigem Rühren wird PFA (Pulverform) bei 60-65 °C in PBS (0,01 M) angesetzt; anschließend durch einen Faltenfilter geben und abkühlen lassen

1.3.1 Versuchsprotokoll für die Durchführung der Immunzytochemie

Die Durchführung der Immunzytochemie erfolgte bis zu zwei Wochen nach Fixierung mit PFA (4 %), welche wiederum unmittelbar nach Beendigung der Stimulationsversuche (IIID1.2) oder der „Ca²⁺-Imaging“ Versuche (IIID1.3) vorgenommen wurde. Sämtliche Inkubations- und Waschschrte der Immunzytochemie wurden in Abhängigkeit der Größe der Gläschen in Multi-Well- oder Multi-Dishplatten durchgeführt.

Mit Ausnahme der DAPI Inkubationslösung enthielten die verwendeten Lösungen 0,05 % Triton X-100. Es dient der Permeabilisierung von Zellen und damit der besseren Antikörperbindung. Durch die zweistündige Inkubation mit der Blockungslösung wurden unspezifische Bindungsstellen abgesättigt.

Das vollständige Protokoll ist in Tabelle 39 dargestellt.

Tabelle 39: Versuchsprotokoll für die Durchführung der Immunzytochemie

Arbeitsschritt	verwendete Lösung und Vorgehen	Dauer	Temperatur
waschen	PBS , auf Schüttelapparat (schwenken)	3 x 5 min	Raumtemperatur (RT)
blocken	Blockungslösung , im Inkubationskasten	2 h	RT
1. Inkubation	Primärantikörper in Blockungslösung , im Inkubationskasten	24 h / 48 h	RT / 4 °C
waschen	PBS-T , auf Schüttelapparat (schwenken)	3 x 5 min	RT
2. Inkubation	Sekundärantikörper in Blockungslösung , im Inkubationskasten	2 h	RT
waschen	PBS-T , auf Schüttelapparat (schwenken)	3 x 5 min	RT
3. Inkubation	DAPI Inkubationslösung , im Inkubationskasten	10 min	RT
waschen	PBS-T , auf Schüttelapparat (schwenken)	3 x 5 min	RT
deckeln	zellbewachsenes Gläschen kurz in <i>Aqua bidest.</i> dippen, mit Citifluor auf Objektträger legen und mit Nagellack versiegeln		RT

1.4 Durchführung der Immunhistochemie

Lösungen und Puffer

Tabelle 40: Für die Durchführung der Immunhistochemie benötigte Lösungen und Puffer

Bezeichnung	Zusammensetzung
0,2 M Na ₂ HPO ₄ -Lösung (Stocklösung A)	27,6 g Na ₂ HPO ₄ in 1 l <i>Aqua bidest.</i>
0,2 M NaH ₂ PO ₄ -Lösung (Stocklösung B)	35,6 g NaH ₂ PO ₄ in 1 l <i>Aqua bidest.</i>
Blockungslösung	5 % NDS + 5 % BSA in PBS (0,1 M)
DAPI Inkubationslösung	DAPI 1:1000 in PBS
PBS 0,1 M (pH = 7,2-7,4)	14 % Stocklösung A + 36 % Stocklösung B + 50 % <i>Aqua bidest.</i>
Permeabilisierungslösung	0,5 % Triton X-100 in PBS

Bezeichnung	Zusammensetzung
Paraformaldehyd (PFA) Stocklösung (20 %)	Unter ständigem Rühren wird PFA (Pulverform) bei 60-65 °C in <i>Aqua bidest.</i> angesetzt; anschließend durch einen Faltenfilter geben und abkühlen lassen
PFA Gebrauchslösung (4 %)	Verdünnung der PFA Stocklösung mit PBS
Waschlösung	0,1 % Tween 20 in PBS

1.4.1 Anfertigung der Gefrierschnitte

Im Rahmen des HMGB1 Projektes wurden die Gehirne der von Dr. Christoph Rummel und Sandy Koenig in Zusammenarbeit mit Dr. Lois Harden perfundierten Ratten immunhistochemisch untersucht. Dafür fertigte ich zunächst Gefrierschnitte im Kryostaten an. Dieser wies eine Innentemperatur von -22 °C und eine Objekttemperatur von -17 °C auf. Das Gehirn wurde unter Verwendung des Einbettmediums auf dem Objekthalter befestigt und senkrecht zum Messer ausgerichtet. Anschließend wurden 20 µm dicke *coronale* Schnitte von *rostral* beginnend angefertigt und mit Hilfe von Poly-L-Lysin-beschichteten Objektträgern vom Messer aufgenommen.

Es wurden jeweils mindestens 15 Schnitte vom *Organum vasculosum laminae terminalis* (OVL), vom *Nucleus praeopticus medianus* („*median preoptic nucleus*“, MnPO), vom *Organum subformicale* („*subfornical organ*“, SFO), vom *Nucleus arcuatus* und von der *Eminentia mediana* („*median eminence*“, ME) gesammelt. Sie wurden mit Hilfe eines stereotaktischen Atlas differenziert [436]. Die zwischen den erwähnten Gehirnregionen angefallenen Schnitte wurden gesammelt, in *corticale* und hypothalamische Anteile getrennt und für die quantitative „real-time“ RT-PCR in sterile, vorgekühlte Reaktionsgefäße gegeben.

Die Schnitte von der AP wurden nach dem gleichen Prinzip gesammelt. Allerdings wurde das *Cerebellum* am Objekthalter befestigt. Anschließend wurden die Schnitte von *caudal* beginnend angefertigt.

Die gewonnenen Schnitte und PCR Proben lagerten bis zur weiteren Verwendung bei -54 °C. Es wurden jedoch nicht alle gesammelten Regionen im Rahmen dieser Arbeit untersucht.

1.4.2 Versuchsprotokoll für die Durchführung der Immunhistochemie

Es wurde eine Immunhistochemie zur Darstellung von HMGB1 im Rattengehirn durchgeführt. Das dafür verwendete Protokoll wurde von Dr. Ferial Aslani aus dem Institut für Anatomie und Zellbiologie der JLU Gießen etabliert [435] und für diese Arbeit zur Verfügung gestellt.

Die Fixierung diente dem Schutz der Antigene, eine Permeabilisierung erhöhte die Durchlässigkeit der Zellmembran und die Inkubation mit Blockungslösung wurde verwendet, um unspezifische Bindungen zu verhindern.

Die Durchführung der in Tabelle 41 beschriebenen Arbeitsschritte erfolgte entweder in Hellendahl-Färbekästen mit einem großen Lösungsvolumen, oder mit einem kleinen Lösungsvolumen auf dem Objektträger selber. Dafür wurde dieser plan in eine feuchte Kammer gelegt. Diese enthielt feuchte Papiertücher und wurde mit einer Frischhaltefolie umwickelt, um eine Austrocknung der Gewebeschnitte / Inkubationslösung zu verhindern.

Tabelle 41: Versuchsprotokoll für die Durchführung der Immunhistochemie

Arbeitsschritt	verwendete Lösung und Vorgehen	Dauer	Temperatur
aufwärmen	im Kryostaten	10 min	-20 °C
trocknen	an der Luft, währenddessen Schnitte mit Fettstift umranden	10 min	Raumtemperatur (RT)
Fixierung	PFA Gebrauchslösung , im Färbekasten, auf Schüttelapparat (schwenken)	10 min	RT
Permeabilisierung	Permeabilisierungslösung , im Färbekasten, auf Schüttelapparat (schwenken)	10 min	RT
waschen	Waschlösung , im Färbekasten, auf Schüttelapparat (schwenken)	3 x 5 min	RT
blocken	Blockungslösung , auf Objektträger, in feuchter Kammer	1 h	RT
1. Inkubation	Primärantikörper in 2,5 % BSA , auf Objektträger, in feuchter Kammer	24 h	4 °C
waschen	Waschlösung , im Färbekasten, auf Schüttelapparat (schwenken)	3 x 10 min	RT
2. Inkubation	Sekundärantikörper in PBS , auf Objektträger, in feuchter Kammer	1 h	RT
waschen	Waschlösung , im Färbekasten, auf Schüttelapparat (schwenken)	3 x 10 min	RT
3. Inkubation	DAPI Inkubationslösung , im Färbekasten, auf Schüttelapparat (schwenken)	10 min	RT
waschen	Waschlösung , im Färbekasten, auf Schüttelapparat (schwenken)	3 x 5 min	RT
deckeln	2 Tropfen Citifluor auf Objektträger, Deckgläschen darauf legen und mit Nagellack versiegeln		RT

1.5 Mikroskopie und Auswertung

Nach Durchführung der Immunzytochemie bzw. der Immunhistochemie erfolgte die Betrachtung mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskopes mit Objektiven für die 10-, 20-, 40- und 100-fache Vergrößerung. Eine Quecksilberdampf Lampe diente als Lichtquelle und unter der Verwendung verschiedener Filter konnten die spezifischen Anregungswellenlängen der Fluorochrome erzeugt werden. Dabei wurde Alexa488 mit einer Wellenlänge von 460 –

490 nm angeregt, worauf grünes Licht mit einer Wellenlänge von 510 – 540 nm emittiert wurde. Cy3™ emittierte rotes Licht einer Wellenlänge von 630 – 660 nm als Reaktion auf eine Anregung mit einer Wellenlänge von 530 – 550 nm. Durch eine Anregungswellenlänge von 330 – 385 nm wurde DAPI angeregt, woraufhin die Zellkerne blaues Licht mit einer Wellenlänge von 461 nm emittierten. Aufgrund des eingebauten Sperrfilters wurde nur das emittierte Licht von der digitalen schwarz/weiß Kamera erfasst und schließlich mit dem Programm Metamorph wieder zu einem mehrkanaligen RGB-Bild zusammengefügt. Zur besseren qualitativen Darstellung der Bilder wurden die Kontraste mit Hilfe von Adobe Photoshop angehoben. Dies erfolgte bei allen Proben auf die gleiche Weise, sodass die Vergleichbarkeit erhalten blieb.

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendete Immunfluoreszenz diente hauptsächlich der qualitativen Darstellung verschiedener stimulationsbedingter Effekte. Allerdings wurden die Effekte einiger *in vitro* durchgeführter Stimulationen teilweise auch quantitativ ausgewertet. Dabei wurden Fotos von fünf festgelegten Bereichen der Primärkultur in 20-facher Vergrößerung angefertigt (Abbildung 17). Aufgrund einer inhomogenen Verteilung der Zellen wurde innerhalb der festgelegten Bereiche jeweils eine Region annähernd gleicher Zelldichte ausgewählt. Dies geschah durch die Betrachtung der Zellen in dem für die Auswertung unerheblichen Farbkanal der Zellmarker (Alexa488, grün emittiertes Licht). Die von diesen fünf Regionen angefertigten Fotos dienten anschließend einer gegenüber der Behandlung blinden, manuellen Auszählung des prozentualen Anteils positiver Zellen. Eine getrennte Betrachtung der unterschiedlichen Farbkanäle mit Hilfe von Adobe Photoshop erleichterte dabei die Auswertung. Jede Zellkultur erhielt auf diese Weise 5 errechnete Zahlenwerte, die als Mittelwert zusammengefasst wurden. Nach dem Prinzip des „mean of the mean“ wurden die für jede Zellkultur berechneten Mittelwerte entsprechend ihrer Behandlungsgruppe zusammengetragen, als Mittelwert mit Standardfehler dargestellt und mit Hilfe eines t-Testes statistisch ausgewertet.

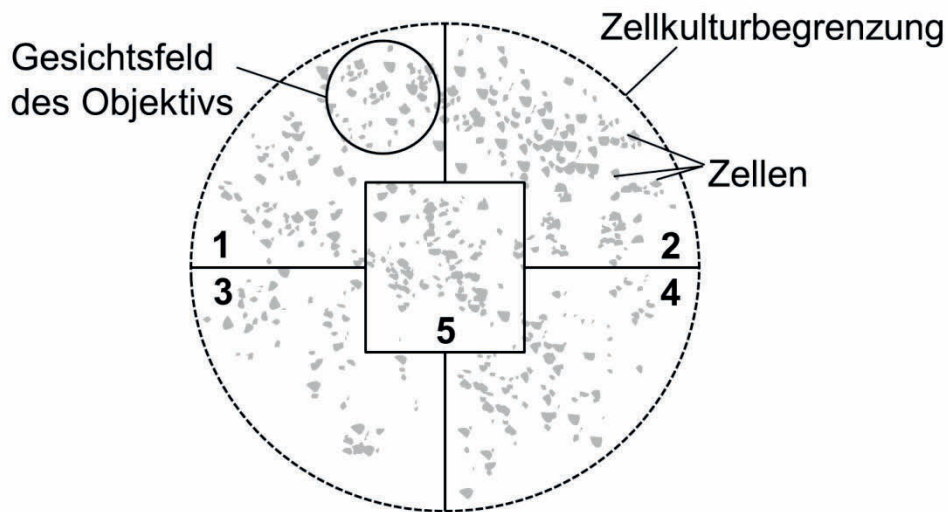


Abbildung 17: Schematische Darstellung der Auswahl geeigneter Regionen für die Auszählung
Die Fläche der Primärkultur wurde in 5 festgelegte Bereiche unterteilt. In jedem dieser Bereiche wurde ein Foto für die Auszählung der Zellen angefertigt (Gesichtsfeld des Objektivs). Um eine Region adäquater Zelldichte innerhalb des Bereiches auszuwählen, wurden die Zellen mit der Wellenlänge angeregt, die den zelltypspezifischen Marker sichtbar machte. Von jeder Zellkultur wurden nach diesem Schema 5 Fotos für die Auszählung angefertigt.

Die immunzytochemische Differenzierung der im „Ca²⁺-Imaging“ gemessenen Zellen (Abbildung 18) wurde durch das lasergravierte Raster der CELL-VU Gläschen und unter Zuhilfenahme eines Durchlichtbildes erleichtert. Für die Differenzierung der unterschiedlichen Zelltypen musste zusätzlich der Phänotyp der Zellen herangezogen werden, da die Detektion von Neuronen und Mikrogliazellen durch den gleichen Sekundärantikörper (Cy3™ goat anti-mouse) erfolgte.

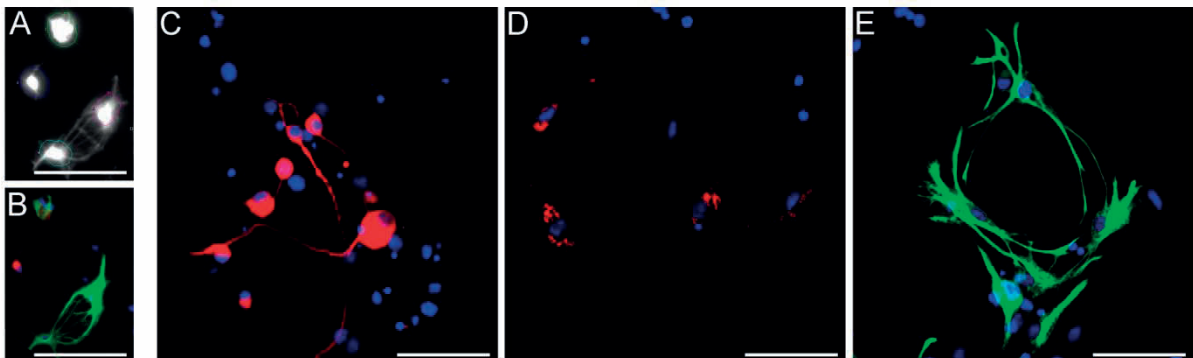


Abbildung 18: Darstellung der immunzytochemischen Differenzierung unterschiedlicher Zelltypen in Primärkulturen der Area postrema

Beim „Ca²⁺-Imaging“ wurden die Zellen mit dem kalziumsensitiven Fura2-AM beladen und ROIs festgelegt (A). Diese ROIs wurden anschließend immunzytochemisch differenziert (B).

Neurone (MAP 2a+2b, Cy3™) (C) und Mikrogliazellen (CD68, Cy3™) (D) wurden beide durch rot emittiertes Licht dargestellt, ließen sich phänotypisch aber differenzieren. Astrozyten (GFAP, Alexa488) emittierten grünes Licht (E). Die Größenmarker in A und B entsprechen 100 µm und die in C, D und E repräsentieren eine Größe von 50 µm.

2 Zytokin-Bioassays

Ge- und Verbrauchsmaterialien

Tabelle 42: Für die Zytokin-Bioassays benötigte Ge- und Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Typ	Hersteller
Gewebekulturflaschen	steril mit Filter, 50 / 75 / 250 / 550 ml	Sarstedt AG und Co. KG, D-Nümbrecht
Gewebekulturplatten	steril, mit Abdeckplatte, 96K	Sarstedt AG und Co. KG, D-Nümbrecht
Zählkammern	nach Neubauer	Biochrom AG, D-Berlin

Chemikalien

Tabelle 43: Für die Zytokin-Bioassays benötigte Chemikalien

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

Lösungen und Puffer

Tabelle 44: Für die Zytokin-Bioassays benötigte Lösungen und Puffer

Bezeichnung	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

Bezeichnung	Zusammensetzung
Wachstumsmedium (IL-6)	Assay-Medium (IL-6) 50 I.U. IL-6 Standard/ml
Isopropanol-HCL-Lösung	4 ml HCl (2 N) 196 ml Isopropanol
MTT-Lösung	0,1 g MTT 20 ml PBS

2.1 Grundlagen der Methode

Im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit wurden Zytokin-Bioassays verwendet, um die Konzentration bioaktiver Zytokine in den Überständen stimulierter Primärkulturen der AP, den Überständen stimulierter „Fat Explants“ und den *in vivo* gewonnenen Plasmaproben des HMGB1 sowie des Fat-1 Projektes zu bestimmen.

Bei den zytokinspezifischen, zellkulturabhängigen Bioassays kann durch Ermittlung spezifischer Effekte der Zytokine auf die Zellkulturlinien eine Quantifizierung erfolgen. IL-6 besitzt eine proliferative Wirkung auf B9-Hybridoma Zellen [437] und Tumornekrosefaktor- α (TNF α) wirkt zytotoxisch auf Zellen der murinen Fibrosarkoma-Zelllinie (WEHI 164 Subklon 13) [438]. Dadurch wird in beiden Fällen die Anzahl vitaler Zellen von der Zytokinmenge beeinflusst. In vitalen Zellen findet eine enzymatische Umwandlung des gelben MTT-Tetrazoliumsalzes zu dunkelblauen bis violetten MTT-Formazan-Kristallen statt. Die Menge der gebildeten MTT-Formazan-Kristalle ist dabei proportional zur Anzahl vitaler Zellen [439], kann durch eine Isopropanol-Salzsäure (HCl)-Lösung gelöst und anschließend photometrisch detektiert werden.

So erfassen die hier verwendeten Bioassays, im Gegensatz zu einem ELISA, lediglich die biologisch aktiven Zytokine der Proben. In Hinblick auf die Fragestellung nach dem pro-entzündlichen Potenzial einer Substanz ist dies von Vorteil. Bei einem Bioassay kann jedoch zunächst nicht ausgeschlossen werden, dass die verwendeten Zellkulturlinien zusätzlich durch andere in der Probe enthaltene Substanzen in ihrer Vitalität oder in ihrem Wachstum beeinflusst werden. Deshalb müssten die gewonnenen Ergebnisse korrekterweise als IL-6- bzw. TNF α -ähnliche Aktivität bezeichnet werden. Im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit betraf diese Einschränkung allerdings lediglich die Konzentrationsbestimmungen von IL-6 in den Überständen der „Fat Explants“. Eine Beeinflussung der zytokinspezifischen Zelllinien der Bioassays durch andere im Plasma und den Überständen der Primärkulturen enthaltene Substanzen konnte durch die Anwendung neutralisierender Antikörper und löslicher Rezeptoren bereits ausgeschlossen werden [427]. Ebenso erfolgte ein Ausschluss der Beeinflussung des TNF α -Bioassays durch andere in den Überständen der „Fat Explants“ enthaltene Faktoren. Auf die Beschreibung der Zytokin-Bioassays wird im Rahmen dieser

Arbeit nicht im Detail eingegangen, da es sich um eine am Institut für Veterinär-Physiologie und -Biochemie der JLU Gießen gut etablierte Methode handelt, die an anderen Stellen ausreichend beschrieben wurde [440, 441].

Die praktische Durchführung der Zytokin-Bioassays erfolgte durch Jolanta Murgott, die mir exemplarisch die Versuchsdurchführung zeigte.

2.2 Bestimmung der Konzentration von IL-6

Die IL-6-Konzentration der Proben, die im Falle der „Fat Explant“ Überstände eine IL-6-ähnliche Aktivität darstellte, wurde mit Hilfe von B9-Hybridoma Zellen ermittelt. Diese mussten zunächst im Wachstumsmedium (siehe Tabelle 44) kultiviert (37 °C, 5 % Co₂, 95 % Luftfeuchtigkeit) und alle drei Tage durch eine Zentrifugation mit anschließender Resuspension passagiert werden.

Die Durchführung des Bioassays fand nach erfolgreicher Kultivierung der Zelllinie in 96-Well Gewebekulturplatten mit 5.000 B9-Hybridoma Zellen in jedem „Well“ statt. In diesen „Wells“ wurden Verdünnungsreihen des IL-6-Standards, der Qualitätskontrollen und der zu untersuchenden Probe angelegt. Qualitätskontrollen enthielten definierte Konzentrationen von rekombinantem IL-6. Es folgte eine 72-stündige Inkubation im Brutschrank (37 °C, 5 % Co₂, 95 % Luftfeuchtigkeit), der eine Detektion vitaler Zellen mit Hilfe der MTT-Lösung angeschlossen wurde. Dafür wurden den „Wells“ 25 µl der MTT-Lösung hinzugefügt und diese für weitere vier Stunden im Brutschrank inkubiert. Die Reaktion wurde anschließend durch Zugabe der Isopropanol-HCl-Lösung gestoppt. Nach einer 12-stündigen Inkubation bei Raumtemperatur fand die photometrische Messung der optischen Dichte (OD) mit Hilfe eines ELISA-Readers bei einer Wellenlänge von 550 nm statt.

Die minimal zu detektierende Konzentration lag bei diesem Assay bei 3 I.U./ml.

2.3 Bestimmung der Konzentration von TNFa

Dieses Assay unterlag dem gleichen Prinzip der Durchführung wie das IL-6-Bioassay. Allerdings handelt es sich bei den Zellen der murinen Fibrosarkoma-Zelllinie (WEHI 164 Subklon 13) um adhärenz Zellen. Deshalb wurden die Zellen durch Dekantierung des Mediums passagiert, gefolgt von einer enzymatischen Ablösung vom Flaschenboden mittels Trypsin-Inkubation (25 %). Anschließend wurden die Zellen in neue Flaschen mit frischem Medium überführt. Das Wachstumsmedium enthielt fetales Kälberserum (siehe Tabelle 44). Dies führt unter anderem zur Inaktivierung von Trypsin.

Die Durchführung des Bioassays erfolgte in 96-Well Gewebekulturplatten. In jedes „Well“ wurde eine Suspension mit 50.000 Zellen und 4 µg Actinomycin D/ml gegeben. Actinomycin

Diente einer Sensibilisierung gegenüber TNF α und einer Wachstumshemmung der Zellen. Bei diesem Assay stellt nämlich der zytotoxische Effekt von TNF α die Grundlage des Nachweises seiner Bioaktivität dar. Die Zellen wurden für 24 Stunden mit den angelegten Verdünnungsreihen im Brutschrank (37 °C, 5 % CO₂, 95 % Luftfeuchtigkeit) inkubiert. Die photometrische Detektion vitaler Zellen wurde analog zum IL-6-Bioassay durchgeführt.

Bei diesem Bioassay lag die minimal zu detektierende TNF α -Konzentration bei 6 pg/ml.

2.4 Auswertung und Statistik

Für die Auswertung der Bioassays wurde zunächst eine Eichkurve mit Hilfe der Standardlösungen erstellt. Dafür wurden die logarithmierten Zytokin-Konzentrationen in der Standardlösung gegen die gemessenen OD-Werte (linear) aufgetragen. Dabei ergibt sich ein begrenzter linearer Bereich der Eichkurve, in dem die Menge des gemessenen bioaktiven Zytokins proportional (IL-6) bzw. antiproportional (TNF α) zur gemessenen OD ist. Nur Proben, deren OD innerhalb dieses linearen Bereiches lag, wurden in die Auswertung mit einbezogen. In diesem Bereich kann die Zytokin-Konzentration anhand der Regressionsgleichung der Eichkurve und dem Verdünnungsfaktor der Probe ermittelt werden. Die Bestimmung der Zytokin-Konzentration von Proben, deren OD außerhalb des linearen Bereiches lag, wurde gegebenenfalls mit einer angepassten Verdünnung erneut durchgeführt. Durch das Programm GraphPad Prism erfolgte die graphische Darstellung der Mittelwerte mit Standardfehlern und die statistische Auswertung. Allerdings wurden Werte, die mehr als die 1,5-fache IQR über dem 75 %-Perzentil oder unter dem 25 %-Perzentil lagen, nicht berücksichtigt.

Die statistische Auswertung der Zytokin-Konzentrationen in Zellüberständen der mit HMGB1 stimulierten Primärkulturen sowie in Plasmaproben der Ratten des HMGB1 Projektes erfolgte in Form einer ein-faktoriellen ANOVA, der beim Vorliegen einer Signifikanz ein „Tukey's Multiple Comparison Test“ angeschlossen wurde.

Für die statistische Auswertung der Zytokin-Konzentrationen in Überständen der „Fat Explants“ und der Plasmaproben des Fat-1 Projektes wurde hingegen eine zwei-faktorielle ANOVA verwendet, die beim Vorliegen einer signifikanten Interaktion durch einen Bonferroni *post hoc* Test ergänzt wurde.

3 Quantitative „real-time“ RT-PCR

Ge- und Verbrauchsmaterialien

Tabelle 45: Für die quantitative „real-time“ RT-PCR benötigte Ge- und Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Typ	Hersteller
Gehörschutz	1440	3M, Saint Paul, MN, USA
Micro Amp 8-Cap Strips	N8010535	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
Micro Amp 8-Tube Strips	N8010580	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
Micro Amp 96-Well Support Bases	N4379590	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
Micro Amp Fast Optical 96-Well Reaction Plates	N4346907	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
Micro Amp Optical Adhesive Films	N4311971	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
Präzisionsküvette aus Quarzglas Suprasil	105.202-QS	Hellma GmbH und Co. KG, D-Müllheim
Schutzbrille		Infield Safety GmbH, D-Solingen

Chemikalien

Tabelle 46: Für die quantitative „real-time“ RT-PCR benötigte Chemikalien

Bezeichnung	Hersteller
Chloroform	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, D-München
Deoxynucleotide Mix (dNTPs)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, D-München
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, D-München
doppelt entionisiertes Wasser (<i>Aqua bidest.</i>)	Millipore Reinstwassersystem
Dithiothreitol (DTT)	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
Ethanol absolut (abs. ETOH)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, D-München
Isopropanol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, D-München
M-MLV Reverse Transcriptase (RT-Enzym)	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
NucleoSpin RNA XS	Macherey-Nagel, D-Düren
Precision Master Mix with ROX	PrimerDesign Ltd., Southampton, UK
Random Hexamer	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
RNaseZap	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, D-München
RT-Puffer	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
Taqman Gene Expression Master Mix	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
Trizol Reagent	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA

Primer

Tabelle 47: Für die quantitative „real-time“ RT-PCR benötigte Primer

Gen	Assay ID	Hersteller
Ratten		
endogene Kontrollen / Referenzgene		
18S	Reference Gene Assay with double-dye probe	PrimerDesign Ltd., Southampton, UK
B2M	Reference Gene Assay with double-dye probe	PrimerDesign Ltd., Southampton, UK
β -Actin	Reference Gene Assay with double-dye probe	PrimerDesign Ltd., Southampton, UK

Gen	Assay ID	Hersteller
β -Actin	Rn00667869_m1	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
CANX	Reference Gene Assay with double-dye probe	PrimerDesign Ltd., Southampton, UK
GAPDH	Reference Gene Assay with double-dye probe	PrimerDesign Ltd., Southampton, UK
UBC	Reference Gene Assay with double-dye probe	PrimerDesign Ltd., Southampton, UK
Zielgene		
HMGB1	Rn00566331_m1	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
RAGE	Rn00584249_m1	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
TLR2	Rn02133647_s1	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
TLR4	Rn00569848_m1	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
Mäuse		
endogene Kontrollen / Referenzgene		
18S	Double-dye probe geNorm 12 gene kit	PrimerDesign Ltd., Southampton, UK
ATP5B	Double-dye probe geNorm 12 gene kit	PrimerDesign Ltd., Southampton, UK
B2M	Double-dye probe geNorm 12 gene kit	PrimerDesign Ltd., Southampton, UK
β -Actin	Double-dye probe geNorm 12 gene kit	PrimerDesign Ltd., Southampton, UK
CANX	Double-dye probe geNorm 12 gene kit	PrimerDesign Ltd., Southampton, UK
GAPDH	Double-dye probe geNorm 12 gene kit	PrimerDesign Ltd., Southampton, UK
Zielgene		
COX1	Mm04225243_g1	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
COX2	Mm00478374_m1	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
IL-6	Mm00446190_m1	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
I κ B α	Mm00477798_m1	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
mPGES	Mm00452105_m1	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
NF-IL6	Mm00843434_s1	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
SOCS3	Mm00545913_s1	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
TNF α	Mm00443258_m1	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA

3.1 Grundlagen der Methode

Als Vorbereitung für die „real-time“ reverse Transkriptase (RT)-PCR wurde aus den zu untersuchenden Proben die Ribonukleinsäure („ribonucleic acid“, RNA) isoliert und anschließend unter Verwendung einer reversen Transkriptase in „complementary deoxyribonucleic acid“ (cDNA) umgeschrieben [442]. So lieferte die hier angewendete Methode eine Aussage über die Genexpression des entsprechenden Gewebes auf Ebene der „messenger RNA“ (mRNA). Bei der mRNA handelt es sich um eine einsträngige Sequenz, die ein Transkript des Gens darstellt, das für das zu translatierende Protein kodiert. Somit liefert die mRNA einen Hinweis auf das Maß der Synthese des Proteins. Die quantitative „real-time“ RT-PCR fand bei der vorliegenden Arbeit Anwendung, um Aussagen über induzierte Protein-Synthesen und damit über den pro- oder anti-inflammatorischen Status eines Gewebes treffen zu können.

Die Grundlage der PCR wurde in dieser Arbeit bereits erläutert (siehe Kapitel IIIB2.3.2). Anders als bei der im Rahmen der Genotypisierung angewendeten Endpunktbestimmung, erfolgt bei der „real-time“ PCR eine Bestimmung der Amplifikatmenge in Echtzeit, indem Amplifizierung und Detektion gleichzeitig ablaufen. Dies ermöglicht aufgrund der genauen Analytik der Reaktionskinetik eine genaue Quantifizierung der Ausgangsmenge. Bei der PCR mit Endpunktbestimmung kann eine Quantifizierung lediglich durch eine näherungsweise in Vorversuchen ermittelte Reaktionskinetik erfolgen. Die Grundlage für die Durchführung der „real-time“ PCR bildet das Prinzip des Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfers [443]. Dies beschreibt die Kombination zweier Fluorochrome mit unterschiedlichen Anregungs- und Emissionswellenlängen. Dabei entspricht die Emissionswellenlänge des einen Fluorochroms der Anregungswellenlänge des anderen Fluorochroms, wodurch sich ein Energietransfer und eine Absorption der Emissionswellenlänge des ersten Fluorochroms ergeben. Das Fluorochrom, das die Anregungswellenlänge für das zweite Fluorochrom emittiert, wird als „Reporter“ bezeichnet. Für das absorbierende Fluorochrom wurde die Bezeichnung des „Quenchers“ geprägt. Bei den in dieser Arbeit durchgeführten Versuchen wurden TaqMan® Sonden verwendet. Dabei handelt es sich um kurze, einzelsträngige DNA Sequenzen, die komplementär zu einem Sequenzabschnitt des gesuchten Gens sind und mit beiden Fluorochromen hybridisiert wurden. Es wurden nur Sonden verwendet, die den „Reporter“ 6-Carboxyfluorescein (FAM) und einen nicht fluoreszierenden „Quencher“ trugen. FAM weist eine Anregungswellenlänge von 495 nm auf und emittiert Licht mit einer Wellenlänge von 517 nm. Bei der Amplifikation wird die TaqMan® Sonde durch die 5' – 3'- Exonuklease-Aktivität der Taq DNA-Polymerase abgebaut, wodurch sich „Reporter“ und „Quencher“ räumlich voneinander trennen und die emittierte Wellenlänge des „Reporters“ (517 nm) detektiert werden kann [444] (Abbildung 19). Die Menge des detektierten Lichtes ist somit proportional zur Menge der Amplifikate. Da bei der „real-time“ PCR die Detektion am Ende eines jeden Elongationszyklus erfolgt, kann von einer Detektion in Echtzeit gesprochen werden [445, 446].

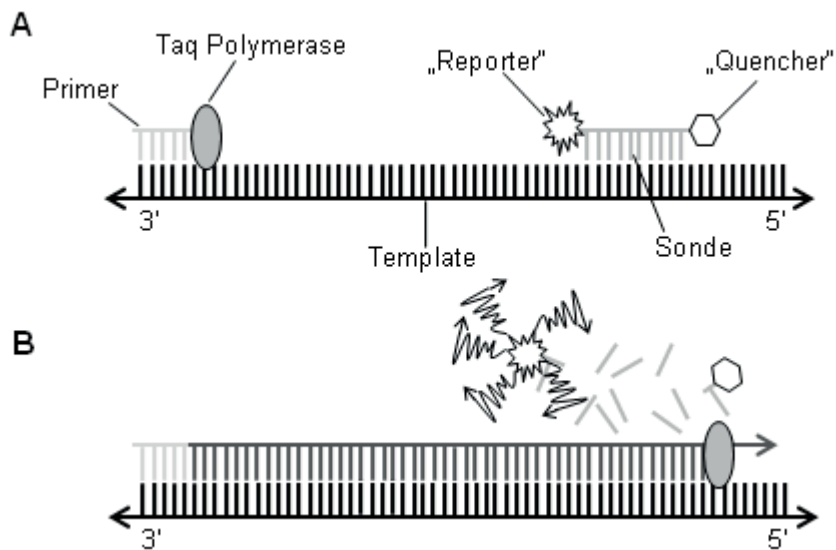


Abbildung 19: Schematische Darstellung des Prinzips der „real-time“ PCR

Bei der intakten Sonde wird die Fluoreszenz des „Reporters“ aufgrund des Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfers zwischen „Reporter“ und „Quencher“ unterdrückt (**A**). Während der Elongation des zu amplifizierenden Templates (im Rahmen dieser Arbeit cDNA) führt die 5' – 3'- Exonuklease-Aktivität der Taq DNA-Polymerase zu einem Abbau der Sonde. Dies erhöht die Entfernung zwischen „Reporter“ und „Quencher“, wodurch die Photoemission des „Reporters“ unter Verwendung der entsprechenden Anregungswellenlänge detektiert werden kann (**B**). (Modifiziert nach [446]).

3.2 Extraktion der RNA

Lösungen und Puffer

Tabelle 48: Für die RNA-Extraktion benötigte Lösungen und Puffer

Bezeichnung	Zusammensetzung
70 %-iges Ethanol	70 % Ethanol in DEPC Wasser
Diethylpyrocarbonat (DEPC) Wasser	0,1 % DEPC in <i>Aqua bidest.</i> 24 h bei RT gerührt, anschließend autolaviert
steriles Wasser	autoklaviertes <i>Aqua bidest.</i>

Im Rahmen dieser Arbeit wurde RNA aus dem *subcutanen* Fettgewebe der „Fat Explants“, aus Leber, Milz und Hypothalamus der Ratten des HMGB1 Projektes sowie aus Leber und Milz der Mäuse des Fat-1 Projektes extrahiert. Als Grundlage diente die „single step“ Methode [447]. Sie ist besonders für die Isolation geringer RNA-Mengen geeignet. Dabei wurde das Gewebe zunächst homogenisiert, Proteine denaturiert und schlussendlich reine RNA mit Hilfe von Isopropanol ausgefällt. Nach zwei Waschschritten wurde die gewonnene RNA für die weitere Bearbeitung in Diethylpyrocarbonat (DEPC) Wasser gelöst. Bei dem benötigten DEPC Wasser handelt es sich um RNase-freies Wasser. Bei der 24-stündigen Inkubation findet eine Bindung zwischen dem DEPC und primären sowie sekundären Aminen statt, was wiederum zu einer Inaktivierung der RNasen führt. Durch die anschließende Autoklavierung zerfällt DEPC in Ethanol und Kohlenstoffdioxid. Außerdem

wurde durch die Behandlung sämtlicher Oberflächen und Geräte mit 70 %-igem Ethanol und RNaseZap eine Kontamination mit RNAsen verhindert. Die Extraktion erfolgte für alle Gewebe nach dem in Tabelle 49 beschriebenen Protokoll.

Für die Homogenisierung des Fettgewebes wurde jedoch eine Modifikation vorgenommen. Da sich Fettgewebe schlechter homogenisieren lässt und dies mit einer starken Schaumbildung einhergeht, wurde der Ultraschall-Homogenisator zwei mal für 20 Sekunden (sek) verwendet und das Reaktionsgefäß zwischendurch für 20 Sekunden in ein mit Eis gefülltes Becherglas gestellt, um ein Erwärmen der Probe weitgehend zu verhindern. Trotz der verlängerten Ultraschallbehandlung konnte das Fettgewebe nicht vollständig homogenisiert werden. Aufgrund der großen Ausgangsmenge stellte das jedoch kein Problem dar. Außerdem wurde für die RNA-Extraktion aus Fettgewebe mit einem höheren Volumen an Trizol, Chloroform und Isopropanol gearbeitet. Alle beschriebenen Arbeitsschritte wurden, sofern in Tabelle 49 nicht anders erwähnt, auf Eis durchgeführt.

Tabelle 49: Versuchsprotokoll für die Durchführung der RNA-Extraktion

Arbeitsschritt	Funktion	Dauer
500 µl / 1000 µl (Fett) eiskaltes Trizol zur Probe hinzufügen, anschließend Ultraschallhomogenisierung	mechanische Auflösung der Zellverbände, Trizol lysiert Zellen und inaktiviert RNAsen sowie andere Enzyme	10 sek / 2 x 20 sek (Fett)
Ultraschallkopf in 100 %-iges Ethanol und dann in DEPC-Wasser eintauchen	Reinigung des Ultraschallkopfes nach jeder Probe	je 5 sek
zentrifugieren: 12.000 rpm, 4 °C	Polysaccharide, Bestandteile der extrazellulären Matrix und DNA lagern sich als Pellet ab	10 min
Überstand in neues, steriles 1,5 ml Reaktionsgefäß überführen		
Inkubation bei RT	Dissoziation der Nukleoproteinkomplexe	5 min
100 µl / 200 µl (Fett) Chloroform hinzufügen, anschließend schütteln	Chloroform löst denaturierte Proteine und DNA heraus	15 sek
Inkubation bei RT	Separation	3 min
zentrifugieren: 12.000 rpm, 4 °C	Trennung in organische (Proteine, DNA) und wässrige (RNA) Phase	20 min
250 µl / 500 µl (Fett) Isopropanol in neue, sterile Reaktionsgefäße vorlegen und wässrige Phase hinzufügen	verwerfen der organischen Phase	
vortexen, dann Inkubation bei -20 °C	Isopropanol verdrängt die Hydrathülle der Moleküle und führt so zur Ausfällung der RNA	20 h
zentrifugieren: 15.000 rpm, 4 °C	Gewinnung eines RNA-haltigen Pellets	15 min
Überstand abgießen, Pellet trocknen	Pellet sichern	15 sek
1 ml 70 %-iges Ethanol hinzugeben, dann vortexen	Entfernung von Isopropanol und anderen Rückständen	
zentrifugieren: 15.000 rpm, 4 °C	Festigung des RNA-haltigen Pellets	10 min
Überstand abgießen, Pellet trocknen	Pellet sichern	15 sek

Arbeitsschritt	Funktion	Dauer
1 ml 100 %-iges Ethanol hinzugeben, dann vortexen	Entfernung von Isopropanol und anderen Rückständen	
zentrifugieren: 15.000 rpm, 4 °C	Festigung des RNA-haltigen Pellets	10 min
Überstand abgießen, Pellet trocknen	Pellet sichern	20 min
je nach Pelletgröße 20 µl (klein) oder 50 µl (groß) DEPC H₂O hinzugeben, dann vortexen	RNA-haltige Pellet lösen	

3.3 Quantifizierung des RNA-Gehaltes

Zur Quantifizierung wurde eine spektralphotometrische Messung angewendet. Das Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren liegt bei 260 nm. Dadurch liefert die OD der Probe direkt Aufschluss über die Nukleinsäurekonzentration. Da am Ende der oben beschriebenen Extraktion (siehe Kapitel III E3.2) lediglich RNA in den Proben enthalten war, diente die OD₂₆₀, unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors, der Bestimmung der RNA-Konzentration ($OD_{260}=1 \triangleq 4 \mu\text{g RNA/ml}$). Durch zusätzliche Bestimmung der OD₂₈₀ konnten die Proben auf eine Verunreinigung mit Proteinen untersucht werden, da diese ein Absorptionsmaximum von 280 nm aufweisen. Reine RNA weist dabei ein Verhältnis zwischen OD₂₆₀ und OD₂₈₀ von 1,9 - 2,1 auf; niedrigere Werte sprechen für eine Verunreinigung. Im Anschluss an die Quantifizierung wurden alle Proben auf eine RNA-Konzentration von 250 ng/µl eingestellt und bis zur cDNA-Synthese am darauffolgenden Tag bei -54 °C gelagert.

3.4 Reverse Transkription der RNA

Lösungen und Puffer

Tabelle 50: Für die reverse Transkription pro Probe benötigte Lösungen und Puffer

Bezeichnung	Zusammensetzung (pro Probe)
Reverse Transkription (RT)-Mix 1	5 µl DEPC H ₂ O 1 µl Random Hexamer 1 µl dNTPs
RT-Mix 2	4 µl RT Puffer 2 µl steriles H ₂ O 2 µl DTT (0,1 M) 1 µl RT Enzym (M-MLV-RT)

Die reverse Transkription wurde für die Umschreibung der RNA in cDNA verwendet. Dieses Vorgehen ist erforderlich, weil die bei der „real-time“ PCR eingesetzte Taq-Polymerase DNA-abhängig ist.

Die kurzfristige Erhitzung auf 65 °C sowie die Zugabe des Reduktionsmittels Dithiothreitol (DTT) dient dem Aufbrechen von Sekundärstrukturen der RNA, wodurch diese für Primer und die Polymerase leichter zugänglich werden. Bei den verwendeten Random Hexamer Primern handelt es sich um kurze Oligonukleotide zufälliger Reihenfolge. Deshalb können sie an zufälligen komplementären Stellen der RNA binden und bieten somit vielfältige Startpunkte für die RNA-abhängige DNA-Polymerase. Die im Rahmen dieser Arbeit angewendete DNA-Polymerase wurde aus dem „moloney murine leukemia virus“ (M-MLV) gewonnen. Die M-MLV-Reverse Transkriptase synthetisiert bei 37 °C einen zur RNA komplementären DNA-Strang und wird bei 90 °C inaktiviert.

Die reverse Transkription wurde nach dem in Tabelle 51 beschriebenen Versuchsprotokoll durchgeführt. Zusätzlich zu den Proben wurden Negativkontrollen angefertigt, um eventuelle Verunreinigungen der verwendeten Lösungen nachzuweisen (Blank 1 und 2).

Tabelle 51: Versuchsprotokoll für die Durchführung der reversen Transkription

Ansatz (pro Probe)	Temperatur	Dauer
7 µl RT-Mix 1 + 4 µl RNA Probe Blank 1: 7 µl RT-Mix 1 + 4 µl DEPC H ₂ O	65 °C	10 min
anschließend Proben auf Eis stellen und 9 µl RT-Mix 2 hinzu geben Blank 2: 9 µl RT-Mix 2 + 11 µl DEPC H ₂ O	37 °C 90 °C 4 °C	1 h 5 min ~

Im Anschluss an die reverse Transkription wurden die Proben mit sterilem Wasser auf eine cDNA-Konzentration von 25 ng/ml verdünnt.

3.5 Durchführung der quantitativen „real-time“ PCR

Lösungen und Puffer

Tabelle 52: Für die „real-time“ PCR pro Probe benötigte Lösung

Bezeichnung	Zusammensetzung (pro Probe)
„real-time“ PCR-Mix	3,5 µl steriles H ₂ O 5 µl Taqman Gene Expression Master Mix 0,5 µl Primer

Die Durchführung der „real-time“ PCR erfolgte nach dem in Tabelle 53 beschriebenen Protokoll. Es wurden Doppelansätze (zwei technische Replikate) der zu untersuchenden cDNA Probe analysiert. Zusätzlich wurden die in der reversen Transkription hergestellten Negativkontrollen (Blank 1 und Blank 2) sowie eine weitere Kontrolle, die anstelle der cDNA lediglich steriles Wasser erhielt, analysiert. Bis auf die Primer enthält der verwendete Taqman Gene Expression Master Mix alles benötigte; also auch die DNA-Polymerase und dNTPs.

Tabelle 53: Versuchsprotokoll für die Durchführung der „real-time“ PCR

Schritt	Funktion	Temperatur	Dauer
	9 µl „real-time“ PCR-Mix + 1 µl cDNA Probe		
	Wasserkontrolle: 9 µl „real-time“ PCR-Mix + 1 µl steriles H ₂ O		
1	Aktivierung der DNA-Polymerase	50 °C	2 min
2	Denaturierung	95 °C	10 min
3	Denaturierung	95°C	15 sek
4	Annealing, Elongation	60 °C	60 sek
Die Schritte 3 und 4 werden 39-fach wiederholt (insgesamt 40 Zyklen)			

3.6 Ermittlung der optimalen endogenen Kontrollen

Bei der endogenen Kontrolle (Referenzgen, „housekeeping gene“) handelt es sich um ein ubiquitär vorkommendes Gen, das unabhängig von Behandlungen und Genotypen homogen exprimiert wird. Für die Ermittlung des idealen Referenzgens wurden sechs Primer der speziesspezifischen Referenzgen-Kits der Firma PrimerDesign verwendet. Die Expression dieser Gene wurde aus jeweils drei Proben der unterschiedlichen biologischen Gruppen in Doppelbestimmung ermittelt. Mit der Software NormFinder wurde die stabilste Expression über alle Proben hinweg, zwischen den biologischen Gruppen und auch innerhalb der biologischen Gruppen verglichen.

Aufgrund der hier gewonnenen Ergebnisse und aufgrund von Erfahrungen, die mit Leber, Milz sowie Hypothalamus der Ratten bereits am Institut für Veterinär Physiologie und -Biochemie der JLU Gießen gemacht wurden [45, 448], erfolgte die Durchführung der „real-time“ PCR mit den in Tabelle 54 dargestellten Referenzgenen.

Tabelle 54: Die für die unterschiedlichen Gewebe verwendeten Referenzgene

Projekt und dazugehöriges Gewebe	verwendetes Referenzgen
„Fat Explants“ Fettgewebe	β-Actin, CANX
HMGB1 Projekt (Ratten) Leber, Milz, Hypothalamus	β-Actin
Fat-1 Projekt (WT und Fat-1 Mäuse) Leber	CANX
Milz	β-Actin

Für das Fettgewebe der „Fat Explants“ wurden sowohl β-Actin als auch CANX als Referenzgen von der Software NormFinder vorgeschlagen und dementsprechend bei der „real-time“ PCR eingesetzt. Doch mit der steigenden Probenanzahl innerhalb der unterschiedlichen biologischen Gruppen erwies sich die Expression von β-Actin als stabiler. Deshalb wurde β-Actin für die Quantifizierung verwendet.

3.7 Auswertung und Statistik

Die Quantifizierung der relativen Expression erfolgte anhand der $\Delta\Delta C_T$ -Methode. Grundlage ist der C_T -Wert („cycle threshold“), der von dem Zyklus bestimmt wird, an dem die Photoemission von FAM (517 nm) erstmals stärker als das Hintergrundsignal ist. In diesem Zyklus kann von einer exponentiellen, also idealen Amplifikation ausgegangen werden. Da die Messung aller Proben im Doppelansatz erfolgte, wurden die C_T -Werte aus beiden Proben zunächst gemittelt und mit diesen gemittelten Ergebnissen weiter verfahren. Mit diesen gemittelten C_T -Werten erfolgte eine Bestimmung des ΔC_T -Wertes, der sich aus der Differenz zwischen dem C_T -Wert des Zielgens und dem C_T -Wert des Referenzgens ergibt. Diese Normalisierung dient dazu Differenzen auszugleichen. Derartige Differenzen können beispielsweise auf Unterschiede in der eingesetzten Gewebemenge bei der Extraktion bzw. der Verdünnung auf eine gleiche Ausgangskonzentration beruhen oder durch unterschiedliche Effektivität der mRNA-Extraktion bedingt sein. Beide Gene (Ziel- und Referenzgen) werden gleichermaßen von derartigen Gegebenheiten beeinflusst. Im Anschluss daran wurden die ΔC_T -Werte der Proben mit dem ΔC_T -Wert einer Kontrollprobe verglichen. Bei diesem Kalibrator handelte es sich um eine Probe, die zu einer biologischen Kontrollgruppe gehörte. Somit gibt der $\Delta\Delta C_T$ -Wert die relative Expressionsänderung eines Zielgens in Relation zur Referenzgruppe an. Geht man davon aus, dass eine optimale Effizienz (100 %) der PCR vorlag, also in jedem Zyklus eine Verdoppelung des Templates erfolgte, dann lässt sich die relative Menge („relative quantity“, RQ) als $2^{-\Delta\Delta C_T}$ berechnen. Da von ThermoFisher, bei Verwendung der Originalprodukte und entsprechender Primer, eine Effizienz von 100 ± 10 % garantiert wird, wurde die RQ derart berechnet.

Die ermittelten RQ-Werte wurden einer bereits beschriebenen Ausreißerberechnung unterzogen (siehe Kapitel III E2.4) und anschließend mit Hilfe von GraphPad Prism als Mittelwert + Standardfehler dargestellt. Dabei handelte es sich um eine Darstellung und Auswertung als „mean of the mean“. Abhängig von der Anzahl der zu betrachtenden Faktoren wurde die statistische Auswertung entweder durch eine ein-faktorielle ANOVA mit anschließendem „Tukey’s Multiple Comparison Test“ (HMGB1 Projekt) oder durch eine zwei-faktorielle ANOVA mit Bonferonni *post hoc* Test (Fat-1 Projekt, „Fat Explants“) durchgeführt.

4 Flüssigchromatographie mit Massenspektrometriekopplung (LC-MS/MS)

Ge- und Verbrauchsmaterialien

Tabelle 55: Für die LC-MS/MS verwendete Ge- und Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Typ	Hersteller
Festphasenextraktions-Kartuschen	Strata-X 33u Polymeric Reversed Phase (100 mg/3 ml)	Phenomenex LTD, D-Aschaffenburg
Festphasenextraktions-Apparatur		
HPLC-Gläschen		
Säule der Umkehrphasen HPLC	Kinetex® 2,6 µm C18 100 Å, LC Column 100 x 2,1 mm, Ea	Phenomenex LTD, D-Aschaffenburg

Chemikalien

Tabelle 56: Für die LC-MS/MS verwendete Chemikalien

Bezeichnung	Hersteller
7- <i>epi</i> Maresin 1, Lot: 0421383-47	Cayman CHEMICALS, Ann Arbor, MI, USA
10(S), 17 (S)-DiHDHA, (Neuroprotektin D ₁) Lot: 0455423-14	Cayman CHEMICALS, Ann Arbor, MI, USA
Acetonitril	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, D-München
Arachidonic acid (AA), Lot: SLBH2583V	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, D-München
Arachidonic Acid-d11, Lot: 0456733-1	Cayman CHEMICALS, Ann Arbor, MI, USA
cis-4,7,10,13,16,19-Docosahexaenoic acid (DHA), Lot: SLBJ2083V	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, D-München
cis-5,8,11,14,17-Eicosapentaenoic acid (EPA) Lot: SLBC4839V	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, D-München
Ethanol (absolt)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, D-München
Formic acid, Ameisensäure	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, D-München
Leukotriene B ₄ , Lot: 0452268-14	Cayman CHEMICALS, Ann Arbor, MI, USA
Leukotriene B ₄ -d ₄ , Lot: 0453927-4	Cayman CHEMICALS, Ann Arbor, MI, USA
Methanol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, D-München
Prostaglandin D ₂ , Lot: 0436713-34	Cayman CHEMICALS, Ann Arbor, MI, USA
Prostaglandin E ₂ , Lot: 0426679-65	Cayman CHEMICALS, Ann Arbor, MI, USA
Prostaglandin J ₂ , Lot: 0438415-22	Cayman CHEMICALS, Ann Arbor, MI, USA
Resolvin D ₁ , Lot: 0444872-29	Cayman CHEMICALS, Ann Arbor, MI, USA
Resolvin D ₁ -d ₅ , Lot: 0433746-4	Cayman CHEMICALS, Ann Arbor, MI, USA
Resolvin D ₂ , Lot: 0441024-28	Cayman CHEMICALS, Ann Arbor, MI, USA
Wasser (HPLC grade)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, D-München

Lösungen und Puffer**Tabelle 57: Für die LC-MS/MS benötigte Lösungen und Puffer**

Bezeichnung	Zusammensetzung
interne Standardlösung	Ethanol Arachidonic Acid-d11 [1 µg/ml] Resolvin D1-d5 [1 µg/ml] Leukotriene B4-d4 [1 µg/ml]
Lösungsmittel: Resuspension der getrockneten Analyte Ansetzen der Verdünnungsreihe	Wasser Acetonitril [25 %]
Methanol [10 %]	Wasser Methanol [10 %]
mobile Phase A	Wasser Formic acid [0,1 %]
mobile Phase B	Acetonitril Formic acid [0,1 %]
Standardlösung für die Kalibriergerade	Ethanol Arachidonic acid [100 µg/ml] Docosahexaenoic acid [100 µg/ml] Eicosapentaenoic acid [100 µg/ml] DiHDHA [1 µg/ml] Leukotriene B ₄ [1 µg/ml] Maresin 1 [1 µg/ml] Prostaglandin D ₂ [1 µg/ml] Prostaglandin E ₂ [1 µg/ml] Prostaglandin J ₂ [1 µg/ml] Resolvin D ₁ [1 µg/ml] Resolvin D ₂ [1 µg/ml]

Im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit wurde die Flüssigchromatographie mit Massenspektrometriekopplung angewendet, um verschiedene Lipide (AA, DHA, EPA) sowie Lipidmediatoren (Leukotrien B₄, Maresin 1, Neuroprotektin D₁, Prostaglandin D₂ (PGD₂), PGE₂, PGJ₂, Resolvin D₁, Resolvin D₂) in Zellüberständen von Primärkulturen der AP zu quantifizieren. Die Etablierung und Durchführung der Methode erfolgte in Kooperation mit Dr. Sabine Schulz aus dem Institut für Anorganische und Analytische Chemie der JLU Gießen.

In Abbildung 20 sind die Arbeitsabläufe zur Analyse der Lipide und Lipidmediatoren in Überständen von Primärkulturen der AP schematisch dargestellt.

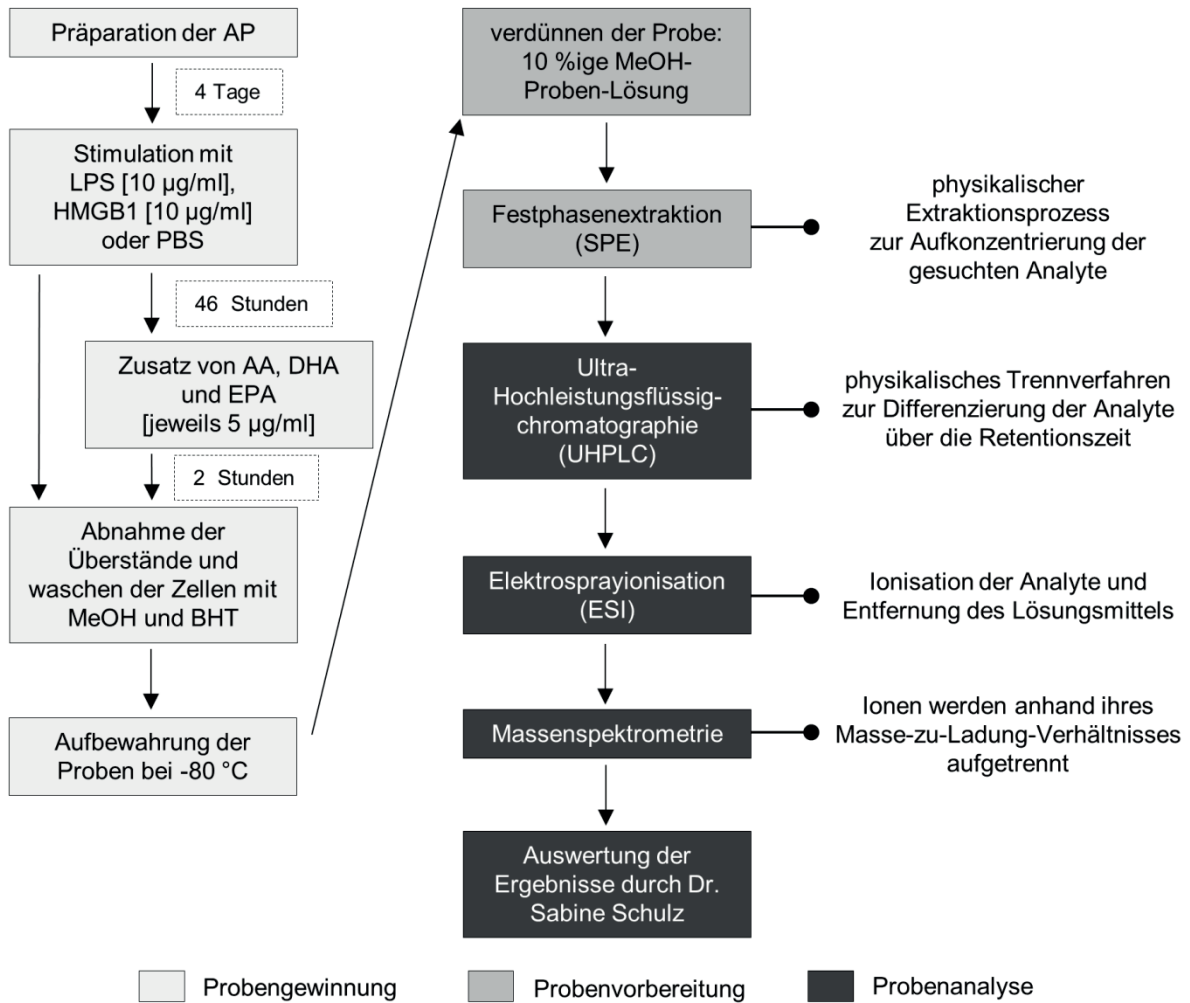


Abbildung 20: Schematische Darstellung der Arbeitsabläufe zur Analyse von Lipiden und Lipidmediatoren in Zellkulturüberständen von Primärkulturen der AP

Zunächst wurden die Primärkulturen der AP stimuliert und die gewonnenen Überstände bei -80°C aufbewahrt (Abbildung 10). Als Probenvorbereitung erfolgte eine Verdünnung der Probenlösung zur Reduktion des prozentualen Methanolgehaltes. In der anschließenden Festphasenextraktion wurden die gesuchten Analyte aufkonzentriert. Die Flüssigchromatographie mit Massenspektrometrikopplung setzte sich aus einer Ultra-Hochleistungsflüssigchromatographie, einer Ionisierung durch die Elektrosprayionisation und einer Massenspektrometrie zusammen. Die Auswertung der Ergebnisse bedarf Erfahrung und wurde von Dr. Sabine Schulz durchgeführt.

4.1 Grundlagen der Methode

LC-MS/MS stellt ein analytisches Trennverfahren zur qualitativen und quantitativen Bestimmung von Molekülen in einer Probe dar. Für die Aufkonzentrierung der Analyte wurden die Proben einer Festphasenextraktion unterzogen. Anschließend erfolgte die flüssigchromatographische und massenspektrometrische Auftrennung.

4.1.1 Festphasenextraktion

Bei der SPE handelt es sich um ein chromatographisches Trennverfahren, das für die Anreicherung der Analyte und die Entfernung von Störkomponenten aus der Probe

verwendet wird. Außerdem kann im Anschluss an die SPE ein Wechsel des Probenmediums hin zu einer für die Flüssigchromatographie besser geeigneten Lösung erfolgen. Das Funktionsprinzip beruht auf den Wechselwirkungen einer flüssigen (mobile Phase) mit einer festen Phase (stationäre Phase), dem Sorbens, und gleicht dem Funktionsprinzip der Hochleistungsflüssigchromatographie („high performance liquid chromatography“, HPLC). Eine nach oben offene Kartusche enthält das Sorbens, durch welches die Lösungsmittel sowie die Probe von oben hindurch befördert werden können. Am unteren Ende der Kartusche befindet sich ein Auslass für die durch das Sorbens gelaufene Flüssigkeit. Die Flüssigkeit wird in der Regel durch leichten Druck oder Vakuum transportiert. Während der SPE finden grundsätzlich die nachfolgend beschriebenen, aufeinander aufbauenden Schritte statt. Zunächst erfolgt eine Konditionierung der Säule. Die dabei stattfindende Benetzung des Sorbens ist für die Wechselwirkung mit den Analyten und deren Adsorption essentiell. Im Anschluss erfolgt eine Equilibrierung mit einer flüssigen, der Probe ähnelnden Phase. Dieser Schritt ist nicht in jedem Protokoll vorgesehen, wurde aber bei der hier vorliegenden Arbeit durchgeführt. Dann wird die Säule mit der zu analysierenden Probe beladen. In einem anschließenden Waschschrift werden Störkomponenten vom Sorbens gelöst und verworfen. Schließlich werden die Analyte mit einem geeigneten Eluenten von der Säule gelöst und in einem Reaktionsgefäß aufgefangen. In diesem letzten Schritt wird die Säule komplett trocken laufen gelassen, um eine Retention der Analyte durch das Sorbens zu verhindern.

Eine weitere Konzentrierung kann durch die Verdampfung des Eluenten und eine Resuspension mit einem geringen Volumen des Laufmittels der Flüssigchromatographie erfolgen.

4.1.2 Hochleistungsflüssigchromatographie

Bei der HPLC handelt es sich ebenfalls um ein chromatographisches Trennverfahren, das auf einer unterschiedlichen Polarität der Säule (stationäre Phase) und des Laufmittels (mobile Phase) beruht. Bei der häufig angewendeten Umkehrphasen HPLC wird mit einer unpolaren stationären Phase und einer polaren mobilen Phase gearbeitet. Das Prinzip der flüssigchromatographischen Trennung der Analyte beruht auf den Van-der-Waals Kräften. Die Analyte wechselwirken unterschiedlich stark mit der stationären Phase. Je mehr der Analyt der stationären Phase ähnelt, desto stärker sind die Wechselwirkungen mit der Säule und desto später wird dieser durch die mobile Phase von der Säule eluiert. Unpolare Analyte werden bei der Umkehrphasen HPLC demnach später eluiert als polare Analyte. Die bis zur Elution benötigte Zeit wird Elutions- oder Retentionszeit genannt [449].

Bei der HPLC handelt es sich um eine Flüssigchromatographie mit einer sehr guten Trennleistung aufgrund einer Oberflächenvergrößerung, die durch kleinere Korndurchmesser

der stationären Phase bedingt ist. Da die mobile Phase deshalb mit hohem Druck durch die Trennsäule bewegt werden muss, wird für die HPLC oft auch der Begriff der Hochdruckflüssigchromatographie verwendet. Bei der im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Ultra-Hochleistungsflüssigchromatographie („ultra high performance liquid chromatography“, UHPLC) kann die mobile Phase durch das Aufbringen eines noch höheren Druckes durch eine stationäre Phase mit noch geringeren Korndurchmessern befördert werden. Das führt zu einer ultraschnellen und hochauflösenden Trennung der Analyte.

Die aufgetrennten Analyte werden anschließend der Elektrosprayionisation (ESI) unterzogen und damit dem Massenspektrometer zugeführt.

4.1.3 Massenspektrometrie

Mit Hilfe der Massenspektrometrie wird das Masse-zu-Ladungs-Verhältnis (m/z) freier Ionen im Hochvakuum bestimmt. Aufgrund der Funktionsweise des Massenspektrometers besteht es grundsätzlich aus drei Komponenten: einer Ionenquelle, einem Analysator mit dem Ziel der Ionentrennung und einem Detektor. Die gewünschte Beschleunigung durch ein elektrisches und gegebenenfalls auch ein magnetisches Feld kann nur bei Ionen erfolgen. Eine Überführung der neutralen Moleküle in negativ oder positiv geladene Ionen mit Hilfe der Ionenquelle ist deshalb für die massenspektrometrische Detektion unerlässlich. Außerdem muss innerhalb des Massenspektrometers ein Hochvakuum vorliegen. Dieses verhindert Kollisionen der Ionen mit Luft- und Gasteilchen und erlaubt eine ungestörte Bewegung der Ionen entsprechend der vom Gerät erzeugten elektrischen bzw. magnetischen Felder. Bei den Detektoren handelt es sich üblicherweise um Sekundärelektronenverstärker, bei denen ein auftreffendes Ion zu einer Freisetzung vieler Elektronen führt. Die einzelnen Bestandteile (Ionenquelle, Analysator, Detektor) sind in unterschiedlicher technischer Ausführung erhältlich und arbeiten nach unterschiedlichen Funktionsprinzipien.

Elektrosprayionisation als Ionenquelle

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die ESI als Ionenquelle verwendet. Dabei handelt es sich um ein homogenes Ionisationsverfahren, bei dem die Analytmoleküle keinem Temperaturgradienten ausgesetzt sind und auch empfindliche Moleküle unzersetzt verdampft werden können. Es eignet sich gut für die Kopplung an die Flüssigchromatographie, da die Gewinnung der Ionen aus einer Lösung erfolgt.

Bei der ESI wird die Analytlösung durch eine Metallkapillare geleitet, an deren Spitze eine Spannung angelegt wird. Dadurch entsteht ein elektrisches Feld zwischen der Kapillare und der am Massenspektrometer befindlichen Gegenelektrode. Auf diese Weise bewegen sich die in der Analytlösung befindlichen Ionen auf den jeweiligen Gegenpol zu. An der Spitze der

Kapillare kommt es zu einem Überschuss gleichartig geladener Ionen, die sich gegenseitig abstoßen und dadurch den sogenannten Taylor-Konus bilden. Diese kegelförmige Deformation einer Flüssigkeitsoberfläche entsteht in einem elektrischen Feld und wird bei einem Überschreiten der kritischen Feldstärke instabil. Bei der ESI führt diese Überwindung der Oberflächenspannung zur kontinuierlichen Emission eines dünnen Flüssigkeitsfadens („Jet“) an der Spitze des Taylor-Konus. Dieser Flüssigkeitsfaden zerfällt unmittelbar nach seiner Emission in kleine, unipolar aufgeladene Tropfen. Durch die Verdampfung des Lösungsmittels wird der Radius der Tropfen kleiner und damit die Abstoßung gleicher Ionen innerhalb des Tropfens stärker [450, 451]. Es bestehen im Wesentlichen zwei Theorien, die die eigentliche Bildung der in der Gasphase befindlichen Analytionen aus diesen instabiler werdenden Tropfen beschreiben [452]. Eine der Theorien („Charge Residue Model“) geht von einem fortlaufenden Zerfall der größeren Tröpfchen in immer kleiner werdende Tröpfchen aus, bis diese schließlich nur noch aus einem Ion und dem Lösungsmittel bestehen (Abbildung 21). Die andere Theorie („Ion Evaporation Model“) geht hingegen von der Emission einzelner solvatisierter Ionen aus den größeren Tröpfchen aus. In beiden Fällen liegen durch eine Verdampfung des verbleibenden Lösungsmittels schließlich die freien Ionen vor.

Durch die Art der an der Kapillare angelegten Spannung wird die Ladung der erzeugten Ionen bestimmt. Positiv geladene Ionen werden beispielsweise durch eine positive Spannung produziert. Im Rahmen dieser Arbeit wurden negative Ionen gemessen, die durch eine negative Spannung an der Kapillare erzeugt wurden.

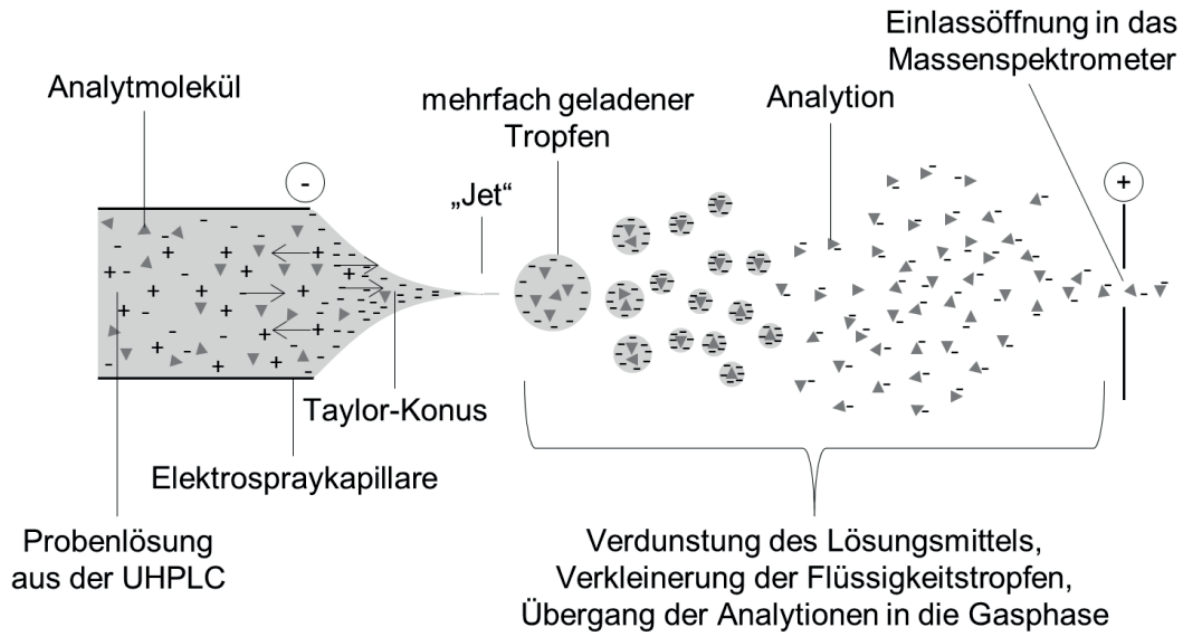


Abbildung 21: Schematische Darstellung der Entstehung von Analytionen bei der Elektrosprayionisation

Die Probenlösung wird durch eine Elektropraykapillare geleitet, an der eine Spannung angelegt wurde. Am Massenspektrometer befindet sich die Gegenelektrode. So werden in dem hier dargestellten Beispiel die negativ geladenen Ionen zum Massenspektrometer bewegt. Durch das Gegenspiel der Oberflächenspannung und der Stärke des elektrischen Feldes entsteht ein Taylor-Konus an der Kapillare. Aus diesem wird Flüssigkeit in Form eines „Jets“ entlassen. Die daraus resultierenden Tropfen reduzieren ihr Volumen durch Verdunstung. Schließlich werden Analytionen aus den Tropfen freigesetzt und in das Massenspektrometer überführt. (Modifiziert nach [452]).

Analysator und Detektor

Der Analysator des Massenspektrometers dient der Auftrennung von Ionen nach ihrem Masse-zu-Ladungs-Verhältnis. Es stehen Analysatoren unterschiedlicher Funktionsweisen zur Verfügung (zur Übersicht [451, 453]).

Im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit wurde ein Hybrid-Quadrupol-Orbitrap Massenspektrometer (Q Exactive, Thermo Scientific, Dreieich) verwendet. Dieses Massenspektrometer nutzt den Quadrupol zur Selektion von Vorläuferionen und die Orbitrap als Analysator sowie Detektor der vom Quadrupol durchgelassenen Ionen.

Der Quadrupol wird aufgrund seines Funktionsprinzips auch als Massenfilter bezeichnet. Er besteht aus vier parallel und senkrecht zueinander liegenden Stabelektroden. Die Selektion der Ionen erfolgt aufgrund ihrer m/z -spezifischen Flugbahn in den aus Gleich- und Wechselspannung aufgebauten elektrischen Feldern. Die gegenüberliegenden Elektrodenpaare weisen die gleiche Polarität der Gleichspannung und die gleiche Phase der Wechselspannung auf. In den benachbarten Stabelektroden liegt hingegen eine entgegengesetzte Polarität vor. Durch Gleichspannung werden die Ionen zwischen den Elektroden gehalten. Eine angelegte Wechselspannung führt mit einer Radiofrequenz zu

einer periodischen Anziehung und Abstoßung der Ionen. Durch die variable Stärke der angelegten Gleichspannung und durch die variable Frequenz sowie Amplitude der angelegten Wechselspannung verändert sich die Flugbahn der Ionen in Abhängigkeit ihres m/z . Je nach Stärke der anliegenden elektrischen Felder bewegen sich also Ionen bestimmter m/z in einer stabilen, oszillatorischen Flugbahn oder in einer instabilen Flugbahn. Nur die Ionen mit stabiler Flugbahn können den Quadrupol passieren. Eine Veränderung überführt Ionen eines anderen m/z auf die stabile, oszillatorische Flugbahn, wodurch ein Scan des gesamten Massenbereiches möglich wird.

Bei der Orbitrap handelt es sich um eine Ionenfalle. Sie setzt sich aus einer zentralen spindelförmigen Elektrode und umgebenden Detektorelektroden zusammen. Aufgrund der dezentralen Injektion von Ionen bewegen sich diese auf Kreisbahnen um die zentrale Elektrode herum. Zwei ringförmig um die Zentralelektrode lokalisierte Detektorplatten begrenzen die Orbitrap und erfassen die Bewegungsfrequenz der Ionen. Sie ist abhängig von ihrem m/z . Durch die Fourier-Transformation kann das erhaltene zeitabhängige Summensignal in ein kontinuierliches Frequenzspektrum und schließlich in ein Massenspektrum zerlegt werden. Die Orbitrap ist in der Lage m/z bis auf 1 ppm genau zu bestimmen und stellt somit ein sehr verlässliches System zur Identifizierung der Analyte dar. Ppm ist die Abkürzung von „parts per million“, steht somit für den millionsten Teil (10^{-6}) und wird zur Angabe der Massengenauigkeit verwendet.

Im Tandem-Massenspektrometrie (MS/MS)-Modus des Massenspektrometers werden die im Quadrupol ausgewählten Vorläufer in einer Kollisionszelle fragmentiert. Bei der „higher-energy collisional dissociation“ (HCD) findet die kollisionsinduzierte Dissoziation außerhalb der Orbitrap in einer HCD-Kollisionszelle statt. In dieser erfolgt eine Fragmentierung der beschleunigten Molekülionen durch eine Kollision mit neutralen Gasteilchen. Die dabei entstandenen Fragmentionen gelangen anschließend wieder zurück und werden in der Orbitrap anhand ihres m/z aufgetrennt. Da eine derartige Tandem-Massenspektrometrie auch bei dieser Arbeit zur Quantifizierung der Lipidmediatoren angewendet wurde, wird von LC-MS/MS gesprochen.

4.2 Durchführung

Die Analyse von Lipiden und Lipidmediatoren mit Hilfe der LC-MS/MS fand aus Überständen von stimulierten Primärkulturen der AP (Abbildung 20) statt. Die Probengewinnung erfolgte im Institut für Veterinär-Physiologie und -Biochemie der JLU Gießen und wurde im Abschnitt IIID1.2.1 bereits beschrieben.

Die weitere Bearbeitung der Proben führte ich im Institut für Anorganische und Analytische Chemie mit fachlicher Unterstützung von Dr. Sabine Schulz durch. Diese Arbeitsschritte werden nachfolgend genauer beschrieben.

Die in der hergestellten Standardlösung enthaltenen Lipide und Lipidmediatoren dienten zunächst der Ausarbeitung eines geeigneten Protokolls für ihre Analyse mit Hilfe der UHPLC und der Massenspektrometrie durch Dr. Sabine Schulz. Sie modifizierte beispielsweise die Zusammensetzung der Laufmittel und die Flussrate an der UHPLC sowie die Fragmentationsenergie des Massenspektrometers, um eine optimale Trennung der Peaks und einen adäquaten Nachweis für die gesuchten Lipide und Lipidmediatoren zu erhalten.

4.2.1 Verdünnung der Proben und Zusatz des internen Standards

Zunächst wurden die Proben mit Wasser verdünnt und mit der internen Standardlösung versetzt. Um eine 10 %-ige Methanol-Probenlösung zu erhalten, wurden 8700 µl Wasser hinzugefügt. Außerdem erfolgte die Zugabe von 6 µl der zuvor hergestellten internen Standardlösung (siehe Tabelle 57). Diese enthielt drei deuterierte Standards, die aufgrund des angelagerten Deuteriums von den intern in der Probe vorhandenen Analyten differenziert werden können und so eine Möglichkeit der Quantifizierung, über die Ermittlung ihrer Wiederfindungsrate, darstellen.

4.2.2 Durchführung der Festphasenextraktion

Mit Hilfe der SPE wurde aus den mit internen Standards versehenen Proben das Medium entfernt und eine Konzentrierung der Analyte durchgeführt. Dazu wurden „Strata-X Polymeric Reversed Phase“ Kartuschen (100 mg/3 ml) verwendet. Diese Kartuschen enthalten 100 mg eines polymerbasierten Umkehrphasensorbens und fassen ein Volumen von 3 ml. Da bei der Durchführung der SPE im Rahmen dieser Arbeit größere Volumina erforderlich waren, wurde die Kartusche mehrmals befüllt. Sofern nicht anders beschrieben, lief das Sorbens dabei allerdings nicht trocken.

An der für die Durchführung der SPE verwendeten Apparatur sind Steckplätze für die Kartuschen vorhanden. Diese befinden sich über einem Auffangbehälter, in dem mit Hilfe einer Pumpe ein leichtes Vakuum erzeugt werden kann. Außerdem besteht die Möglichkeit, eine in dem Auffangbehälter befindliche Auffangwanne gegen einen Reaktionsgefäßständer auszutauschen und so die schlussendlich eluierte Lösung in Reaktionsgefäße zu überführen. Ein zwischen jeder Kartusche und dem Übergang in den Auffangbehälter befindliches Hahnssystem ermöglichte eine Unterbrechung des Durchflusses, ohne das Vakuum im Auffangbehälter reduzieren zu müssen.

Die Durchführung der SPE erfolgte nach dem in Tabelle 58 dargestellten Protokoll. Die dort angegebenen Lösungen wurden in die Kartusche pipettiert. Durch Öffnung des Hahnsystems lief die Lösung aufgrund des angelegten Vakuums durch das Sorbens. Erreichte die Flüssigkeitssäule die Oberfläche des Sorbens, wurde durch den Verschluss des Hahnsystems ein Trockenlaufen der Säule verhindert.

Tabelle 58: Versuchsprotokoll für die Durchführung der Festphasenextraktion

Schritt	Durchführung	Funktion
1	3,5 ml Methanol [100 %]	Konditionierung der Säule
2	3,5 ml Wasser	Equilibrierung
3	12,3 ml Probe Reduktion des Vakuums sehr langsamer Durchlauf	Beladen der Säule mit Probenkomponenten
4	3,5 ml Methanol [10 %]	Entfernung von Störkomponenten
5	3 x 500 µl Methanol [100 %] Reduktion des Vakuums sehr langsamer Durchlauf Säule muss 3 mal trocken laufen	Elution der Analyte mit Überführung in Reaktionsgefäße

Im Anschluss an die Elution der Analyte wurde das Methanol mit Hilfe von Stickstoff verdampft.

Nachfolgend wurden 50 µl des Lösungsmittels (Acetonitril [25 %] in Wasser) in das Reaktionsgefäß überführt, um die getrockneten Analyte der Probe zu resuspendieren. Dafür wurden zunächst 30 µl des Lösungsmittels in das Reaktionsgefäß pipettiert, mit dem Vortexer gemischt und anschließend zentrifugiert. Schließlich wurden weitere 20 µl des Lösungsmittels in das Reaktionsgefäß gegeben und erneut nach dem gleichen Prinzip verfahren.

Die auf diese Weise aufkonzentrierte Probenlösung wurde in ein beschriftetes HPLC-Gläschen überführt und in die UHPLC eingesetzt.

4.2.3 Wichtige technische Parameter für die Durchführung der UHPLC

Die Durchführung der Ultra-Hochleistungsflüssigchromatographie erfolgte mit der Dionex UltiMate 3000 RSLC (Thermo Scientific, Germany). Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Prinzip der Umkehrphasen HPLC genutzt. Als stationäre Phase diente dabei eine C18 Säule mit Trimethylsilyl Endkappen mit einer Partikelgröße von 2,6 µm und einer Porengröße von 100 Å. Die verwendete Kinetex®Säule (Phenomenex LTD, Aschaffenburg) wies eine Länge von 100 mm und einen Innendurchmesser von 2,1 mm auf.

Für die Analyse wurden 10 µl der aufbereiteten Probe in das UHPLC-System injiziert. Die mobile Phase wurde mit einer Flussrate von 500 µl/min durch die stationäre Phase befördert.

Initial setzte sich die mobile Phase aus 73 % der mobilen Phase A (Wasser mit 0,1 % Ameisensäure) und 27 % der mobilen Phase B (Acetonitril mit 0,1 % Ameisensäure) zusammen. Innerhalb der ersten 15 Minuten wurde der Laufmittelgradient der mobilen Phase B kontinuierlich bis auf 35 % erhöht. In den darauffolgenden zwei Minuten wurde der Anteil der mobilen Phase B kontinuierlich bis auf 60 % erhöht und anschließend in weiteren zehn Minuten kontinuierlich bis auf 80 %. Der Gradient der mobilen Phase A unterlag jeweils einer dementsprechend kontinuierlichen Reduktion. Es lag eine Säulentemperatur von 40°C vor.

4.2.4 Wichtige technische Parameter der angewendeten Massenspektrometrie

Es wurde zunächst eine Vollscan-Massenspektrometrie durchgeführt. Im Anschluss erfolgte eine Fragmentierung definierter Vorläuferionen, also eine gezielte MS/MS. Die Isolationsbreite der Vorläuferionen im Quadrupol lag bei 1 u. Durch diese Angabe wird der Bereich von m/z beschrieben, die sich gleichzeitig auf einer stabilen Flugbahn befinden und das Quadrupol passieren können. Bei der Vollscan-Massenspektrometrie lag eine Massenauflösung von 70.000 vor und die MS/MS wurde mit einer Massenauflösung von 17.500 durchgeführt. Die Massenauflösung beschreibt den minimalen Massenunterschied, der zwischen zwei Ionen bestehen muss, um sie als getrennt detektieren zu können. In der hier vorliegenden Arbeit wurden die Moleküle im Negativ-Ionen-Modus gemessen und eine HCD Fragmentierung mit einer Fragmentierungsenergie von 35 durchgeführt. Die Messung erfolgte im Negativ-Ionen-Modus und ermittelt wurden Quasi-Molekülionen mit abgespaltem Proton ($[M-H]^-$). Der Tabelle 59 sind die Ionen mit ihrem m/z und des Zeitfensters ihrer Elution zu entnehmen. Im Falle der FS dienten diese m/z der Quantifizierung. Zur Quantifizierung der Lipidmediatoren dienten die Analytionen als Vorläuferion für die gezielte Fragmentierung. Auch die jeweilige Fragmentationsenergie und der Fragmentionen-Peak, der für die Quantifizierung des jeweiligen Lipidmediators verwendet wurde, sind in Tabelle 59 aufgelistet. Der Tabelle 60 ist die tatsächliche Retentionszeit der verschiedenen Substanzen bei unterschiedlichen Versuchsdurchläufen zu entnehmen.

Jede biologische Probe (siehe Tabelle 71) wurde einer zweimaligen massenspektrometrischen Detektion unterzogen. So ergaben sich die Ergebnisse jedes biologischen Replikats aus den zwei technischen Replikaten.

Tabelle 59: Auflistung des Zeitfensters der Elution, des m/z der Vorläuferionen und des m/z Fensters für die Peakflächenbestimmung der entsprechenden Substanz. Es wurde eine Fragmentierungsenergie von 35 verwendet.

Substanz	Zeitfenster	Vorläuferion für MS/M (m/z)	m/z Fenster für Peakflächenbestimmung
Prostaglandin E ₂	0 – 10 min	351,21770	271,19 – 271,23
Prostaglandin D ₂	0 – 10 min	351,21770	271,19 – 271,23
Resolvin D ₁	0 – 10 min	375,21770	121,0550 – 121,075
Resolvin D ₁ -d5	0 – 10 min	380,24908	121,05 – 121,08
Resolvin D ₂	0 – 10 min	375,21770	175,05 – 175,1
Prostaglandin J ₂	10 – 13 min	333,20710	189,1 – 189,16
Leukotrien B ₄	13 – 18 min	335,22280	59,01 – 59,015
Leukotriene B ₄ -d4	13 – 18 min	339,24789	197,09 – 197,14
Maresin 1	13 – 18 min	359,22280	93,025 – 93,04
Protektin D ₁	13 – 18 min	359,22280	93,025 – 93,04
Arachidonsäure	18 – 30 min		303,22 – 303,24
Arachidonsäure-d11	18 – 30 min		314,29 – 314,32
Eicosapentaensäure	18 – 30 min		301,21 – 301,23
Docosahexaensäure	18 – 30 min		327,22 – 327,24

Tabelle 60: Auflistung der tatsächlichen Retentionszeit der verschiedenen Substanzen bei unterschiedlichen Messdurchläufen.

Substanz	Retentionszeit (min)		
	Durchlauf 1	Durchlauf 2	Durchlauf 3
Prostaglandin E ₂	3,98	3,36	
Prostaglandin D ₂	4,52	3,81	
Resolvin D ₁			8,7
Resolvin D ₁ -d5	6,07	5,17	
Resolvin D ₂			7,2
Prostaglandin J ₂	8,65	7,52	
Leukotrien B ₄	12,7	11,33	
Leukotriene B ₄ -d4	12,57	11,2	
Maresin 1	12,55	11,19	
Protektin D ₁	11,95	10,57	
Arachidonsäure	22,5	22,34	
Arachidonsäure-d11	22,45	22,28	
Eicosapentaensäure	21,7	21,52	
Docosahexaensäure	22,35	22,18	

4.3 Auswertung und Statistik

Die Identifikation der Moleküle erfolgte mit Hilfe ihrer Retentionszeit (siehe Tabelle 60), ihres m/z sowie aufgrund ihres Fragmentationenspektrums. Die FS AA, DHA und EPA wurden anhand ihres m/z Peaks des Vorläuferions quantifiziert, da sie sich nicht gut fragmentieren ließen. Hingegen erfolgte die Quantifizierung der Lipidmediatoren anhand eines definierten Peaks des jeweiligen Fragmentationenspektrums (siehe Tabelle 59). Die Auswertung des

Massenspektrums und die Quantifizierung der gesuchten Lipide und Lipidmediatoren wurden von Dr. Sabine Schulz durchgeführt.

Bei der Auswertung musste berücksichtigt werden, dass typischerweise Quasi-Molekülionen bei der Ionisation mit ESI entstehen. Bei diesen unterscheidet sich die Molmasse des detektierten, ionisierten Moleküls von der Molmasse des Probenmoleküls. Grund dafür ist die nach angelegter negativer Spannung auftretende Abspaltung eines Protons ($[M-H]^-$). Dadurch ist die gemessene Molmasse des ionisierten Moleküls 1,007276 geringer als seine theoretische Masse.

Die Quantifizierung der gemessenen Analyte kann auf unterschiedliche Weise erfolgen. In der hier vorliegenden Arbeit diente eine mit Hilfe einer Standardlösung (siehe Tabelle 57, Tabelle 61) erstellte Kalibriergerade als Grundlage für die Quantifizierung.

Es wurde sowohl eine Quantifizierung ohne Berücksichtigung der deuterierten internen Standards durchgeführt als auch eine Quantifizierung, bei der die gemessenen Konzentrationen mit den detektierten Konzentrationen des internen Standards in Bezug gesetzt wurden. Die Quantifizierung ohne Berücksichtigung der internen Standards stellte sich bei den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Versuchen als geeigneter dar. Dazu wurde die Fläche unter den ausgewählten Peaks herangezogen, um mit Hilfe der Kalibriergerade die Konzentration des jeweiligen Moleküls zu errechnen. Die Zusammensetzung der Lösungen, die für die Erstellung der Kalibriergerade verwendet wurden, ist in Tabelle 61 ersichtlich.

In einem Gemisch aus dem in der Zellkultur verwendeten Medium und der Standardlösung wurde die Wiederfindungsrate der gesuchten Substanzen bestimmt. Diese Lösung enthielt definierte Mengen der zu detektierenden Lipidmediatoren und wurde sowohl der Probenvorbereitung mittels SPE als auch der LC-MS/MS Messung unterzogen. Eine Quantifizierung der Lipidmediatoren und der Lipide in dieser Lösung erbrachte ihre jeweilige Wiederfindungsrate, indem die gemessene Konzentration auf die bekannte Ausgangsmenge bezogen wurde. Die in unseren Proben detektierten Ergebnisse wurden nach ihrer Quantifizierung schließlich mit der jeweiligen Wiederfindungsrate korrigiert.

Da die biologischen Proben einer Doppelbestimmung unterlagen, wurden die dabei erhaltenen Ergebnisse zunächst gemittelt, dann mit ihrer Wiederfindungsrate korrigiert und schließlich mit GraphPad Prism als „mean of the mean“ dargestellt. Für die statistische Auswertung wurde eine ein-faktorielle ANOVA verwendet.

Tabelle 61: Konzentrationen und Zusammensetzung der Lösungen zur Erstellung der Kalibriergeraden

Konzentration der Lipidmediatoren	Zusammensetzung		
	interne Standardlösung	Standardlösung zur Herstellung der Kalibriergeraden	Lösungsmittel (Acetonitril [25 %] in Wasser)
1 ng/ml	120 µl	1 µl	879 µl
2 ng/ml	120 µl	2 µl	878 µl
4 ng/ml	120 µl	4 µl	876 µl
8 ng/ml	120 µl	8 µl	872 µl
16 ng/ml	120 µl	16 µl	864 µl
32 ng/ml	120 µl	32 µl	848 µl
64 ng/ml	120 µl	64 µl	816 µl
128 ng/ml	120 µl	128 µl	752 µl
256 ng/ml	120 µl	256 µl	624 µl

5 „Enzyme-linked immunosorbent assay“

Ge- und Verbrauchsmaterialien

Tabelle 62: Im Rahmen dieser Arbeit verwendete ELISAs

Bezeichnung	Typ	Hersteller
HMGB1 ELISA	ST51011	IBL International GmbH, D-Hamburg
Mouse / Rat Leptin Quantikine ELISA-Kit	MOB00	Bio-Techne GmbH, D-Wiesbaden
Rat Total Adiponectin / Acrp 30 Quantikine ELISA-Kit	RRP300	Bio-Techne GmbH, D-Wiesbaden
Visfatin (NAMPT) Mouse / Rat ELISA	RAG009R	BioVendor GmbH, D-Heidelberg

5.1 *Grundlagen der Methode*

Mit einem ELISA werden Antigene durch eine Antikörperbindung und einen enzymatischen Farbumschlag detektiert. Bei den im Rahmen dieser Arbeit angewendeten ELISAs handelte es sich um Sandwich ELISAs, die als ELISA-Kits zur Verfügung standen. Bei den Sandwich ELISAs wird das zu detektierende Antigen durch zwei unterschiedliche Antikörper gebunden, die gegen unterschiedliche Epitope des zu detektierenden Antigens gerichtet sind. Der Boden, beispielsweise der einer Mikrotiterplatte, wird zunächst mit einem Beschichtungsantikörper („coating antibody“) behandelt, an den das in der Probe befindliche Antigen binden kann. Durch einen folgenden Waschschrift werden alle Probenbestandteile entfernt, die nicht dem zu detektierenden Antigen entsprechen und somit nicht durch den Beschichtungsantikörper immobilisiert wurden. Im Anschluss wird ein Detektionsantikörper („detection antibody“) hinzugefügt, der an ein anderes Epitop des Antigens bindet. Bei den im Rahmen dieser Arbeit angewendeten ELISAs handelte es sich um enzymmarkierte Detektionsantikörper, die direkt mit einer Meerrettichperoxidase („horseraddish peroxidase“, HRP) konjugiert waren. Nach Durchführung weiterer Waschschriffe verbleiben lediglich die

Antikörper-Antigen-Antikörper-Komplexe auf der Mikrotiterplatte. Für die Detektion wird schließlich ein farbloses Substrat hinzugefügt, das durch die HRP enzymatisch zu einem farbigen Produkt umgewandelt wird. Die Stärke der Farbreaktion wird photometrisch ermittelt und spiegelt die Konzentration an in der Probe vorhandenem Antigen wider.

5.2 *Untersuchte Proben und Versuchsdurchführung*

Im Rahmen dieser Arbeit wurden ELISAs für die Bestimmung der Adipokine Adiponektin, Visfatin und Leptin aus Überständen der „Fat Explants“ sowie für die Bestimmung der HMGB1 Konzentration im Plasma der Ratten des HMGB1 Projektes durchgeführt.

Die Messungen der Adipokin-Konzentrationen erfolgten in Bad Nauheim durch die Arbeitsgruppe von PD Dr. Elena Neumann (Innere Medizin, Schwerpunkt Rheumatologie, Kerckhoff-Klinik /JLU Gießen).

Hingegen wurden die Messungen der HMGB1-Konzentrationen in den *in vivo* gewonnenen Plasmaproben am Institut für Veterinär-Physiologie und -Biochemie der JLU Gießen in Zusammenarbeit mit Frau Jolanta Murgott durchgeführt.

Auf die Beschreibung der Versuchsdurchführung wird im Rahmen dieser Arbeit verzichtet, da es sich bei allen angewendeten ELISAs um Kits handelte, die exakt nach Herstellerangaben in bereits mit Beschichtungsantikörpern versehenen Mikrotiterplatten durchgeführt wurden.

5.3 *Auswertung und Statistik*

Für jedes Assay wurde anhand der Verdünnungsreihe der Standards eine Standardkurve erstellt, die jeweils der Konzentrationsbestimmung diene. Dabei lagen spezifische Nachweisgrenzen vor. Diese sind in Tabelle 63 zusammengestellt.

Tabelle 63: Nachweisgrenzen der in dieser Arbeit verwendeten ELISAs

ELISA	Nachweisgrenze
HMGB1 ELISA	0,313 – 10 ng/ml
Mouse / Rat Leptin Quantikine ELISA Kit	62,5 – 4000 pg/ml
Rat Total Adiponectin / Acrp 30 Quantikine ELISA Kit	0,156 – 10 ng/ml
Visfatin (NAMPT) Mouse / Rat ELISA	0,5 –32 ng/ml

Im Falle der Adipokin-Konzentrationen wurden diese mit dem Fettgewebsgewicht der jeweiligen Probe verrechnet. Dadurch konnte eine Aussage über die pro Gramm Fett synthetisierte Adipokin-Konzentration getroffen werden, wodurch eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse gewährleistet wurde. Nach Durchführung der Ausreißerberechnung (siehe Kapitel III E.2.4) erfolgte die Darstellung der Adipokin-Konzentrationen mit Hilfe von GraphPad Prism als Mittelwert mit Standardfehler. Die Statistik wurde mittels einer zwei-faktoriellen

ANOVA für jedes Fettgewebe separat durchgeführt. Beim Vorliegen einer signifikanten Interaktion zwischen der Behandlung des Fettgewebes und dem Alter der Tiere, von denen es gewonnen wurde, schloss sich ein Bonferroni *post hoc* Test an.

Die statistische Auswertung der HMGB1-Konzentration in Plasmaproben von Ratten des HMGB1 Projektes erfolgte durch eine ein-faktorielle ANOVA. Dieser wurde bei einer statistischen Signifikanz ein „Tukey’s Multiple Comparison Test“ angeschlossen.

6 Färbung von Blutausstrichen

Chemikalien

Tabelle 64: Für die Färbung der Blutausstriche benötigte Chemikalien

Bezeichnung	Hersteller
Aceton	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, D-München
<i>Aqua bidest.</i>	Millipore Reinstwassersystem
Giemsa	Merck KGaA, D-Darmstadt
May-Grünwald-Lösung	Merck KGaA, D-Darmstadt

6.1 Grundlagen der Methode

Die Leukozytendifferenzierung der luftgetrockneten Blutausstriche von Mäusen des Fat-1 Projektes erfolgte nach Durchführung der Pappenheim-Färbung. Diese kombiniert die Färbeeigenschaften der May-Grünwald- und der Giemsa-Lösung, wodurch sie eine zuverlässige Differenzierung von Blutzellen ermöglicht.

Durch die May-Grünwald-Lösung werden Gewebestrukturen in Abhängigkeit ihres pH-Wertes angefärbt. Dadurch kann unter anderem eine Differenzierung der Granula unterschiedlicher Granulozyten erfolgen. Saure Granula binden das in der Lösung enthaltene Eosin und stellen sich dadurch rot dar; basophile Granula werden hingegen durch das Methyleneblau angefärbt und erscheinen dunkelblau; neutrophile Granula färben sich nicht an.

Die Bestandteile der Giemsa-Lösung führen hingegen zu einer Komplexbildung mit DNA. Zellkerne werden purpur rot angefärbt und das Zytoplasma stellt sich bläulich dar.

6.2 Durchführung der Pappenheim-Färbung

Die Blutausstriche wurden unmittelbar nach Gewinnung des Blutes hergestellt und luftgetrocknet (nach Perfusion der Mäuse des Fat-1 Projektes). Sie wurden bei Raumtemperatur gelagert, um sie nach vollständigem Abschluss des *in vivo* Versuches nach dem in Tabelle 65 beschriebenen Protokoll gleichzeitig anzufärben.

Tabelle 65: Versuchsprotokoll der angewendeten Pappenheim-Färbung

Lösung	Dauer der Inkubation
May-Grünwald-Lösung	3 min
<i>Aqua bidest.</i>	1 min
Giemsa Lösung (15 Tropfen Giemsa in 10 ml <i>Aqua bidest.</i>)	10 min
<i>Aqua bidest.</i>	1 min
anschließend wurden die Ausstriche luftgetrocknet und die Rückseite mit Aceton gereinigt	

6.3 Auswertung

Es erfolgte eine lichtmikroskopische Differenzierung der Leukozyten. Dabei wurden 100 Zellen differenziert. Allerdings wiesen einige Proben deutlich reduzierte Leukozytenzahlen im Blut auf, weshalb bei diesen Proben eine Hochrechnung notwendig war. Die auf diese Weise erhaltenen Prozentzahlen unterschiedlicher Leukozyten wurden mit den für Mäuse bekannten Referenzwerten verglichen [454] und tabellarisch dargestellt.

IV ERGEBNISSE

IVA Charakterisierung der Bedeutung des endogenen TLR-Agonisten HMGB1 während einer systemischen LPS-induzierten Sepsis

Das gut etablierte und reproduzierbare Modell der durch Lipopolysaccharid (LPS) induzierten systemischen Inflammation diente als Grundlage für die Charakterisierung der Bedeutung von „high-mobility group box 1“ (HMGB1) während einer Sepsis-ähnlichen Entzündung. Dazu wurden Ratten mit einer septischen Dosis LPS (10 mg/kg) *intrapitoneal* (i.p.) injiziert oder erhielten eine i.p. Injektion von Phosphat gepufferter Saline („phosphate buffered saline“, PBS) als Kontrolle. Die Vitalparameter wurden telemetrisch erfasst und nach sechs oder 24 Stunden erfolgte eine Perfusion der Ratten zur Blut- sowie Organentnahme. Die Anzahl der im Rahmen dieses Teilprojektes perfundierten Ratten ist in Tabelle 66 dargestellt.

Die *in vivo* Versuche des HMGB1 Projektes wurde in Zusammenarbeit mit Dr. Lois Harden (University of the Witwatersrand, Johannesburg) von Dr. Christoph Rummel und Sandy Koenig im Rahmen eines vorangegangenen Tierversuchsantrags (GI 18/2 Nr.1/2011) durchgeführt. Die Auswertung und Analyse der dabei gewonnenen Proben führte ich mit Unterstützung von Dr. Lois Harden durch.

Tabelle 66: Anzahl der Tiere, deren Daten und Organe für diese Arbeit ausgewertet und analysiert wurden

Perfusionszeitpunkt	Behandlung und Anzahl	Behandlung und Anzahl
6 Stunden p.i.	PBS + NSS	LPS (10 mg/kg KGW)+ NSS
	3	4
24 Stunden p.i.	PBS	LPS (10 mg/kg KGW)
	4	5

1 Veränderung der Körperkerntemperatur in Abhängigkeit der intraperitonealen Injektion einer septischen LPS-Dosis

Die mit LPS (10 mg/kg) behandelten Ratten zeigten nach einer anfänglichen Hypothermie ein bis zur Perfusion nach 24 Stunden anhaltendes Fieber (Abbildung 22). Die signifikante Hypothermie ($p = 0,024$) wies 1,25 Stunden nach LPS-Injektion ihren Tiefpunkt auf und ging 4,25 Stunden *post injectionem* (p.i.) in Fieber über. Die höchste Körperkerntemperatur (39,14 °C) lag bei den mit LPS injizierten Ratten 9,25 Stunden nach der Injektion vor. Nach einer geringgradigen Reduktion hielt sich die Körperkerntemperatur ab zwölf Stunden p.i. auf einem relativ konstanten Niveau (38,10 – 38,81 °C). PBS-injizierte Kontrollratten zeigten eine physiologische circadiane Rhythmik mit höherer Körperkerntemperatur in der Aktivphase, also der Nacht. In LPS-injizierten Ratten war der circadiane Rhythmus gestört. Im Vergleich zu den mit PBS behandelten Kontrollratten wiesen die mit LPS injizierten Ratten 4,25 –

6 Stunden ($p = 0,048$); 6,25 – 10 Stunden ($p < 0,0001$); 10,25 – 12 Stunden ($p = 0,024$) sowie 22,25 - 24 Stunden ($p < 0,0001$) p.i. eine signifikant höhere Körperkerntemperatur auf.

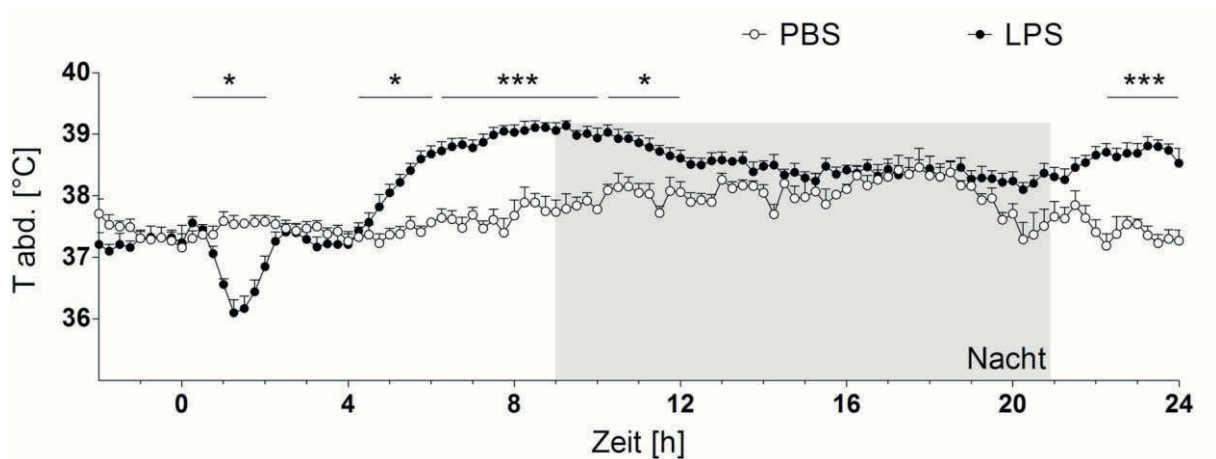


Abbildung 22: Darstellung der telemetrisch erfassten Körperkerntemperatur von PBS- und LPS-injizierten Ratten über die Zeit

Die abdominale Körperkerntemperatur (T abd.) wurde nach Injektion von Phosphat gepufferter Saline (PBS) oder Lipopolysaccharid (LPS) zum Zeitpunkt $t = 0$ über 24 Stunden erfasst. Sie wird als Mittelwert mit Standardfehler dargestellt. Der grau hinterlegte Kasten markiert die Dunkelphase. Nach anfänglicher Hypothermie zeigten die LPS-injizierten Ratten ein Fieber, das bis zum Zeitpunkt der Perfusion nach 24 Stunden anhielt. Bei der Auswertung wurden nur nach 24 Stunden perfundierte Tiere berücksichtigt (PBS $n = 4$, LPS $n = 5$). **0,25 – 2 h:** * $p = 0,024$; **4,25 – 6 h:** * $p = 0,048$; **6,25 – 10 h:** *** $p < 0,0001$; **10,25 – 12 h:** * $p = 0,024$; **22,25 – 24 h:** *** $p < 0,0001$.

2 Beeinflussung zirkulierender Mediatoren durch die intraperitoneale LPS-Injektion

Als Hinweis auf die Stärke der systemischen Entzündungsantwort wurde die Konzentration der zirkulierenden Zytokine Interleukin-6 (IL-6) und Tumornekrosefaktor-α (TNF α) in den Plasmaproben mit Hilfe der Bioassays (siehe Kapitel III E2) ermittelt. Wie bereits beschrieben stellen diese Zytokine während einer systemischen Entzündung wichtige Faktoren für die Entstehung von Fieber dar. Sie sind als Teil des humoralen Signalweges an der Informationsübertragung aus der Peripherie an das Gehirn beteiligt.

Die Plasmakonzentrationen der pro-inflammatorischen Zytokine IL-6 und TNF α waren sechs Stunden nach LPS-Injektion signifikant höher als im Plasma PBS-injizierter Ratten ($p < 0,001$). Allerdings lagen die Zytokin-Konzentrationen 24 Stunden nach LPS-Injektion annähernd im Bereich der Zytokin-Konzentrationen von Kontrollratten (Abbildung 23). 24 Stunden nach LPS-Injektion lag eine signifikant geringere Zytokin-Konzentration vor als sechs Stunden p.i. ($p < 0,001$).

Obwohl die zirkulierenden Zytokine bereits fast wieder auf Basalwerte reduziert waren, zeigten LPS-injizierte Ratten 24 Stunden p.i. weiterhin Fieber. Im Plasma LPS-injizierter Ratten war allerdings sowohl nach sechs als auch nach 24 Stunden eine signifikant erhöhte

HMGB1-Konzentration im Vergleich zur Konzentration im Plasma von PBS-injizierten Kontrollratten nachweisbar ($p < 0,05$).

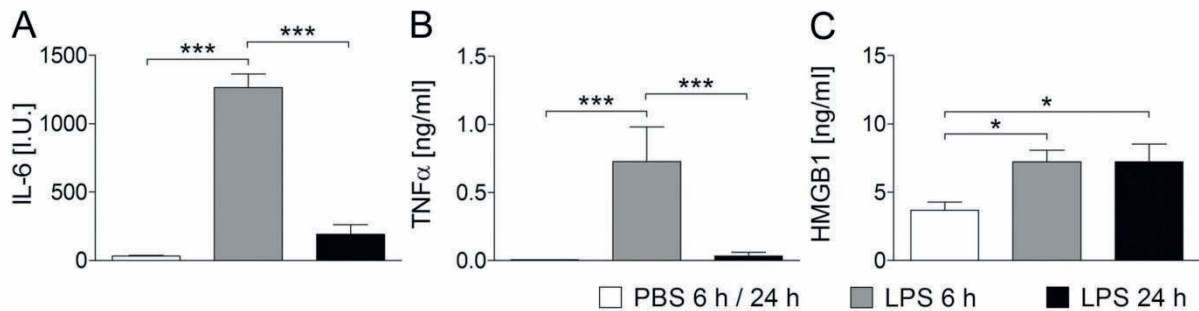


Abbildung 23: Vergleichende Darstellung der im Blut zirkulierenden Zytokine IL-6 (A) und TNFα (B) sowie von HMGB1 (C) in Abhängigkeit der Behandlung und der Zeit

Die Konzentration der Zytokine IL-6 (A) und TNFα (B) wurde mit Hilfe von Bioassays ermittelt. Die Bestimmung der HMGB1-Konzentration erfolgte durch „enzyme-linked immunosorbent assay“ (ELISA) (C). Alle Ergebnisse sind als Mittelwert und Standardfehler dargestellt. Zur Darstellung der jeweiligen Konzentration im Plasma von Kontrollratten erfolgte eine Zusammenfassung der zum sechs und 24 Stunden Zeitpunkt ermittelten Ergebnisse. Die LPS-Injektion bewirkte sechs Stunden p.i. eine signifikante Anhebung der Konzentrationen an Zytokinen (A, B) und HMGB1 (C). Jedoch lag 24 Stunden nach der LPS-Injektion lediglich eine erhöhte HMGB1-Plasmakonzentration vor; die der Zytokine IL-6 und TNFα war bereits auf Basalwerte gesunken. Die Tierzahlen sind der Tabelle 66 zu entnehmen. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$.

3 Beeinflussung der peripheren und zentralen relativen Expression von HMGB1 und seiner Rezeptoren durch die LPS-induzierte Sepsis

Vermeehrt zirkulierendes HMGB1 (Abbildung 23, C) ließ eine erhöhte „messenger RNA“ (mRNA)-Expression der Gene für HMGB1 sowie seiner Rezeptoren „receptor for advanced glycation end-products“ (RAGE) und „toll-like“ Rezeptor-4 (TLR4) erwarten. Diese Hypothese wurde durch die Untersuchung von Hypothalamus, Leber und Milz der perfundierten Ratten mittels „real-time“ reverse Transkriptase (RT)-PCR überprüft (siehe Kapitel III E3).

Die Behandlung mit LPS führte zu einer Reduktion der relativen Expression von HMGB1, RAGE und TLR4 (Abbildung 24). Für die meisten Gene lag 24 Stunden p.i. eine stärkere Abnahme der relativen Expression vor als sechs Stunden *post injectionem*. Dieser Trend konnte in Hypothalamus, Leber und Milz ermittelt werden, wies allerdings nur in der Leber eine statistische Signifikanz auf.

Die relative HMGB1-Expression war in Lebern, die 24 Stunden nach LPS-Injektion gewonnenen wurden, signifikant geringer als in Lebern der PBS-injizierten Ratten ($p < 0,01$).

Die Injektion von LPS führte zu einer signifikanten Reduktion der relativen RAGE-Expression in der Leber, sowohl nach sechs als auch nach 24 Stunden (6 h: $p < 0,05$; 24 h: $p < 0,01$).

In Lebern der LPS-injizierten Ratten lag sechs Stunden p.i. eine geringere relative Expression von TLR4 vor als bei Kontrolltieren ($p < 0,05$). 24 Stunden nach LPS-Injektion war die TLR4-Expression wieder geringgradig angestiegen, aber nicht statistisch signifikant.

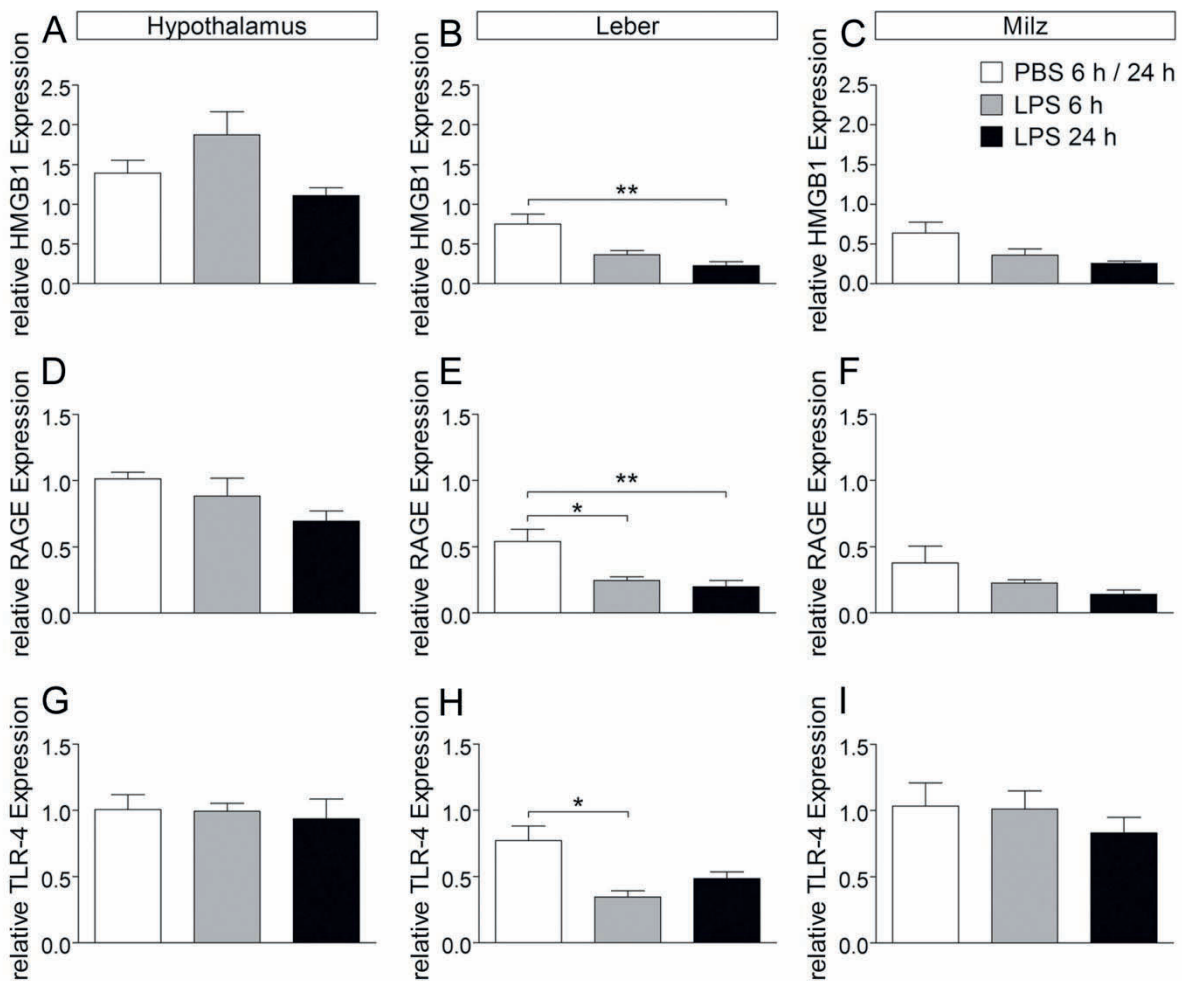


Abbildung 24: Darstellung der relativen Expression von HMGB1 (A,B,C) und seiner Rezeptoren RAGE (D, E, F) sowie TLR4 (G, H, I) in Hypothalamus, Leber und Milz der Ratten

Die relative Expression wird in Abhängigkeit der Behandlung und dem Zeitpunkt der Perfusion als Mittelwert und Standardfehler dargestellt. Die Ergebnisse aus Organen der PBS-behandelten Ratten wurden unabhängig von ihrem Perfusionszeitpunkt zusammengefasst. Die Behandlung mit LPS bewirkte eine signifikante Reduktion der relativen Expression von HMGB1 sowie seiner Rezeptoren RAGE und TLR4 in der Leber. Die Tierzahlen sind in Tabelle 66 aufgelistet. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

4 Charakterisierung eines Einflusses der peripheren LPS-Injektion auf die zentrale Lokalisation von HMGB1 auf Proteinebene

Die Immunhistochemie (siehe Kapitel III E1) diente einer Analyse der Lokalisation von HMGB1 im Gehirn in Abhängigkeit der Behandlung. Es wurden unterschiedliche Gehirnregionen untersucht, die im Hinblick auf die Fragestellung von besonderem Interesse sind. Der „median preoptic nucleus“ (MnPO) ist ebenso wie die Area postrema (AP) wesentlich an der Entstehung von Fieber beteiligt [2]. Allerdings weist der MnPO im Gegensatz zur AP eine dichte Blut-Hirn-Schranke (BHS) auf. So diente der Vergleich dieser beiden Gehirnregionen einer Einschätzung der Bedeutung von HMGB1 für die Entstehung von Fieber und Entzündung im Gehirn sowie einer gleichzeitigen Beurteilung der Relevanz unterschiedlicher Kommunikationswege von der Peripherie zum Gehirn. Die AP erhält

Informationen aus der Peripherie über zirkulierende Faktoren auf dem humoralen Weg. Hingegen gelangen Informationen zum MnPO über sekundäre Aktivierungen beispielsweise neuronaler Signalwege. Kontrolluntersuchungen zur Bestimmung der Spezifität verwendeter Antikörper, wurden durch die vorherige Absättigung des Primärantikörpers mit dem antikörperspezifischen Peptid (Abbildung 25, A, a) oder durch die Durchführung in Abwesenheit des Primärantikörpers (Abbildung 25, B, b) vorgenommen. In diesen Kontrollen war das rote HMGB1-Signal weitgehend verschwunden. Ein rot fluoreszierender Hintergrund war allerdings auch nach Absättigung mit dem HMGB1-Peptid teilweise nachweisbar. In der in Abbildung 25 A lässt sich dies am linken Bildrand erkennen. Weiterhin wurden teilweise kleine, klumpförmige, rot fluoreszierende Artefakte nachgewiesen.

HMGB1 (rot) lag 24 Stunden nach Injektion von PBS hauptsächlich intranukleär vor. Es bestand also eine Kolo-kalisation mit dem blauen 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)-Signal (Abbildung 25, C, c, D, d). Hingegen stellte sich das HMGB1-Signal 24 Stunden nach LPS-Injektion weniger kondensiert dar und war perinukleär und zytoplasmatisch zu detektieren (Abbildung 25, E – F, e – f). Sowohl in der AP (undichte BHS) als auch im MnPO (dichte BHS) kam es zu einer LPS-bedingten Translokation von HMGB1 aus dem Kern heraus. Bei semiquantitativer Betrachtung fiel eine LPS-induzierte geringere Intensität des roten HMGB1-Signals auf.

Aufgrund dieser Beobachtungen wurden zusätzlich immunhistochemische Untersuchungen der AP von Ratten durchgeführt, die 24 Stunden vor der Perfusion eine Injektion einer geringeren LPS-Dosis (1 mg/kg Körpergewicht [KGW]) erhielten. Diese Ratten wurden von Dr. Jelena Damm im Rahmen ihrer Versuche injiziert und 24 Stunden p.i. perfundiert (Tierversuchsantrag: GI 18/2 Nr. 51/2008). Sie stellte Gefrierschnitte der AP her, von denen einige im Rahmen dieser Arbeit für die immunhistochemische Analyse von HMGB1 verwendet werden konnten. Mit dieser Immunhistochemie sollte geklärt werden, ob eine geringere i.p. injizierte LPS-Dosis (1 mg/kg KGW) ebenfalls zu einer perinukleären Translokation von HMGB1 führt. Tatsächlich lagen 24 Stunden nach Injektion der geringeren LPS-Dosis ebenfalls vermehrte perinukleäre Signale sowie eine geringere Signalintensität von HMGB1 vor (Abbildung 25, G, g).

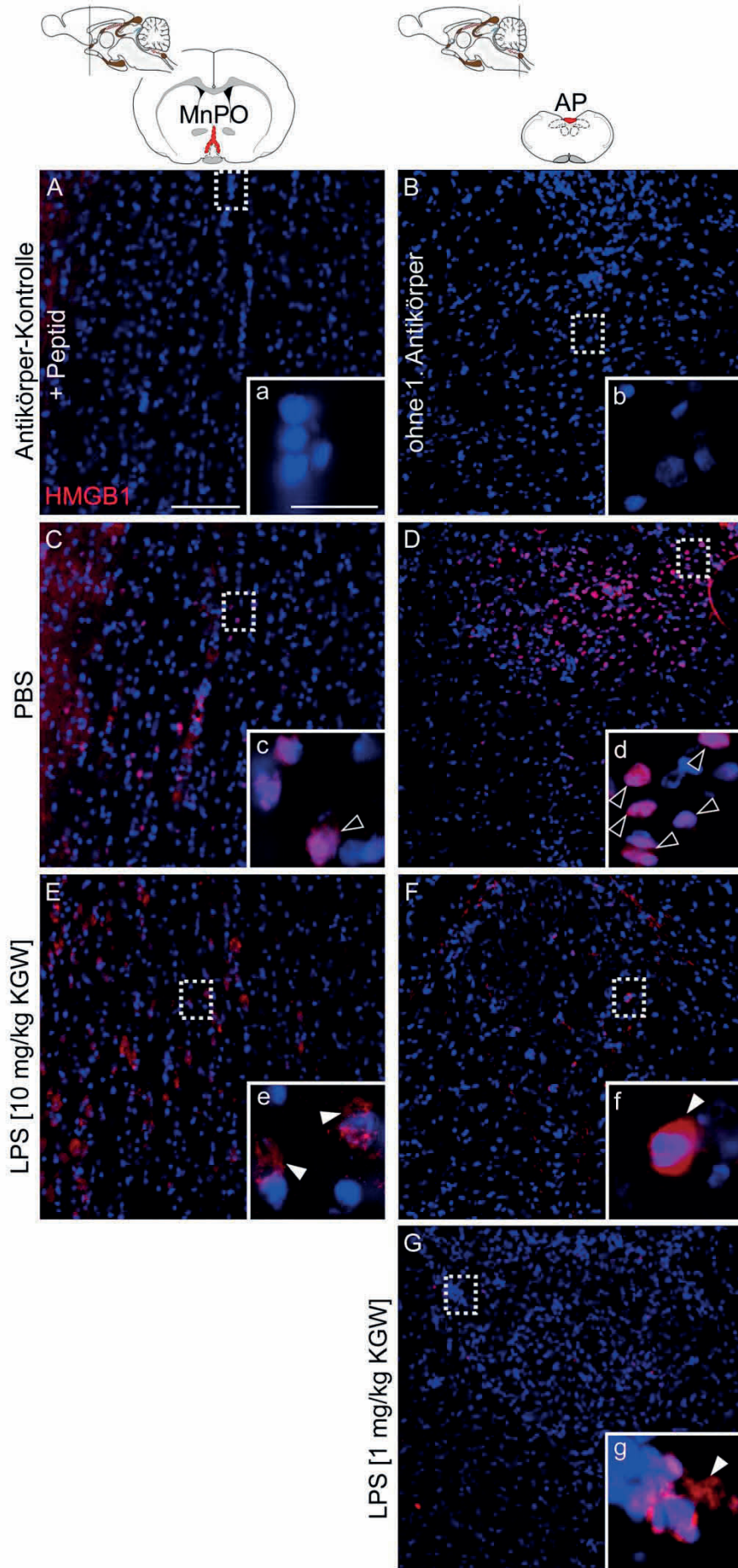


Abbildung 25: Immunhistochemische Detektion von HMGB1 (rot) in Gefrierschnitten der Rattengehirne, die 24 Stunden nach LPS- (10 mg/ml, 1 mg/ml) oder PBS-Injektion isoliert wurden

HMGB1 wurde indirekt durch Cy3™ Sekundärantikörper detektiert und in rot dargestellt. Die Zellkerne wiesen eine blaue Färbung auf (DAPI). Die linke Reihe der Bildtafel zeigt den MnPO (**A, C, E**) und auf der rechten Seite ist die AP dargestellt (**B, D, F, G**). Die weiß gestrichelten Kästchen repräsentieren den Bereich, von dem die eingeschobene Vergrößerung angefertigt wurde. Offene Pfeilspitzen markieren intranukleäre HMGB1-Signale. Durch weiß gefüllte Pfeilspitzen werden perinukleäre HMGB1-Signale verdeutlicht. In den angewendeten Negativkontrollen (**A, a, B, b**) blieb das rote HMGB1-Signal weitgehend aus. 24 Stunden nach PBS-Injektion lag HMGB1 intranukleär vor. Hingegen führte eine Injektion mit LPS beider Konzentrationen (10 mg/kg KGW [**E, e, F, f**], 1 mg/kg KGW [**G, g**]) zu einer perinukleären zytoplasmatischen Translokation von HMGB1. Der Eichbalken in **A** entspricht 100 µm und gilt ebenfalls für alle Fotos geringerer Vergrößerung (**B - G**). Der Eichbalken in **a** entspricht 25 µm. Die Maßstäbe der weiteren Einschübe entsprechen dem in **a**.

5 Nähere Untersuchungen zur Aktivierung von Gehirnzellen der Area postrema durch Disulfid-HMGB1

Das trotz basaler Zytokine über mindestens 24 Stunden andauernde Fieber könnte unter anderem auf verlängert zirkulierendes HMGB1 zurückzuführen sein (Abbildung 23). Frühere Studien haben bereits eine Bedeutung für HMGB1 als Auslöser einer Entzündung im Gehirn und als endogenes Pyrogen postuliert. So führte eine *intracerebroventrikuläre* (i.c.v.) Injektion von HMGB1 in Mäusen zu einer Anorexie mit Anstieg der TNFα- sowie IL-6-Expression im Gehirn [455] und in Ratten zu einem Fieber mit Anstieg der hypothalamischen IL-1-Konzentration. [456]. Das in der vorliegenden Arbeit ermittelte neue Ergebnis einer LPS-induzierten lokalen Translokation von HMGB1 im Gehirn (Abbildung 25), liefert einen weiteren Hinweis für die mögliche Beteiligung von HMGB1 an der späten Fieberphase und Entzündung im Gehirn bei Sepsis. Für eine direkte Kausalität muss HMGB1 allerdings im Gehirn pro-inflammatorische Aktivität auslösen können. Da die AP eine wichtige Zielstruktur bei der Kommunikation zwischen Immunsystem und Gehirn darstellt und sicher in direkten Kontakt mit zirkulierendem HMGB1 kommt, wurden die weiteren Untersuchungen an Primärkulturen der AP durchgeführt. Die Grundlage dieser Untersuchungen stellt die Stimulation mit Disulfid-HMGB1 für unterschiedliche Zeiträume dar (siehe Kapitel IIID1.2). Diese wurde von einer Erfassung indirekter und direkter Effekte gefolgt bzw. begleitet. Zum Ausschluss von präparationsbedingten Artefakten wurde jede Analyse mit Kulturen unterschiedlicher Präparationstage mehrfach wiederholt.

5.1 *Beurteilung der LPS-bedingten HMGB1-Freisetzung in vitro*

Zur besseren Beurteilung der Bedeutung der immunhistochemisch nachgewiesenen, LPS-induzierten Translokation von HMGB1 im Gehirn der Ratte, wurde dessen LPS-induzierte Freisetzung ebenfalls in Primärkulturen der AP untersucht. Dafür wurden die Primärkulturen für acht Stunden mit LPS (1 µg/ml) stimuliert oder wurden als Kontrolle mit PBS behandelt (siehe Tabelle 25). Anschließend wurde eine immunzytochemische Detektion von HMGB1

vorgenommen. Qiu *et al.* (2008) konnten zeigen, dass ein Verschluss der *A. cerebri media* und die dadurch induzierte ischämische Neuroinflammation mit einer frühzeitigen Freisetzung von HMGB1 einhergeht. Diese konnte hauptsächlich in Neuronen beobachtet werden [457]. Auch bei der experimentellen Induktion einer Subarachnoidalblutung durch Sun *et al.* (2014) fand die zytoplasmatische Translokation von HMGB1 vornehmlich in Neuronen statt [458]. Aufgrund dieser ersten Hinweise durch die Literatur wurde im Rahmen der vorliegenden Doktorarbeit für die *in vitro* Untersuchung der HMGB1-Freisetzung eine simultane Detektion des neuronalen Zellmarkers („microtubule associated protein 2“, MAP 2a+2b) durchgeführt.

Auch *in vitro* erfolgte durch die Inkubation mit LPS eine Reduktion intranukleärer HMGB1-Signale im Vergleich zu PBS-behandelten Kontrollkulturen (Abbildung 26). Dies betraf semiquantitativ neben der Anzahl der intranukleären Signale auch deren Intensität. Durch die Auszählung intranukleärer Signale wurde der entstandene Eindruck bestätigt. LPS führte zu einer signifikanten Reduktion des prozentualen Anteils der Zellen mit intranukleärem HMGB1 an der Gesamtzahl der detektierten Zellen (Abbildung 26, C). Eine Berücksichtigung des Zelltyps erfolgte bei dieser Auszählung nicht. Unter Kontrollbedingungen wiesen weitestgehend alle detektierten Neurone intranukleäre HMGB1-Signale auf. Nach einer achtstündigen Inkubation mit LPS lagen sowohl HMGB1-positive als auch HMGB1-negative Neurone vor. Zu diesem Untersuchungszeitpunkt konnte perinukleäres HMGB1 in den Primärkulturen nicht nachgewiesen werden.

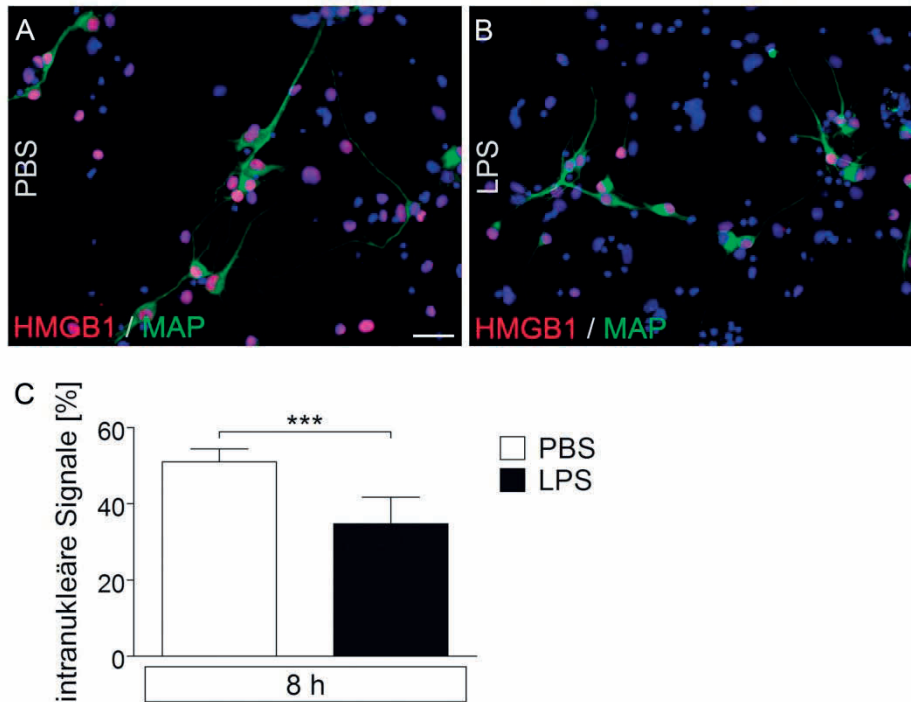


Abbildung 26: Immunzytochemische Detektion von HMGB1 (rot) und dem neuronalen Zellmarker MAP 2a+2b (grün) in Primärkulturen der AP nach einer achtstündigen Inkubation mit PBS oder LPS (1 µg/ml)

Primärkulturen der AP wurden für acht Stunden mit PBS oder LPS (1 µg/ml) inkubiert. Anschließend wurde HMGB1 (rot) immunzytochemisch dargestellt (**A**, **B**). Für die Detektion der Neurone wurde der Antikörper MAP 2a+2b (grün) verwendet und die Zellkerne stellten sich durch die Inkubation mit DAPI blau dar. Der Größenmarker in **A** entspricht 25 µm und gilt entsprechend für **B**. Die in **C** dargestellten Balken zeigen den prozentualen Anteil der Zellen, die intranukleäre Signale aufwiesen, als „mean of the mean“ mit Standardfehler. Subjektiv lag der Eindruck einer LPS-bedingten Reduktion der Anzahl intranukleärer Signale und ihrer Intensität vor. Durch eine Berechnung des prozentualen Anteils der Zellen mit intranukleären HMGB1-Signalen an der Gesamtzellzahl, konnte eine signifikante Reduktion der intranukleären Signale durch eine Stimulation mit LPS quantitativ bestätigt werden (**C**). Es wurden insgesamt 4890 PBS-inkubierte Zellen (neun „Wells“ aus vier Präparationen) und 4399 LPS-stimulierte Zellen (neun „Wells“ aus vier Präparationen) ausgezählt. *** $p < 0,0001$.

5.2 Untersuchung einer potenziellen HMGB1-induzierenden Aktivierung von Transkriptionsfaktoren *in vitro*

Eine Aktivierung von Transkriptionsfaktoren stellt den ersten Schritt der induzierten Zytokin-Synthese dar und ist demnach ein Maß für genomische Zellaktivierung. Die Bedeutung von HMGB1 für die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren wurde durch Stimulationen der Primärkulturen mit HMGB1 (siehe Kapitel IID1.2IID1.2, Tabelle 24) und anschließend durchgeführte immunzytochemische Untersuchungen analysiert.

5.2.1 Betrachtung der nukleären Translokation von NFκB

„Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells“ (NFκB) wird durch eine adäquate Stimulation der Zelle zu einer Translokation in den Zellkern angeregt, um dort die Gentranskription zu regulieren. NFκB ist zu einem frühen Zeitpunkt an der Entstehung des

„sickness behaviors“ beteiligt. Bei den Versuchen von Parnet *et al.* (2003) konnte 45 Minuten bis eine Stunde nach einer i.p. Injektion von LPS oder IL-1 β ein Peak der NF κ B-Aktivierung in der Hypophyse von Ratten immunhistochemisch festgestellt werden [459]. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde deshalb für die Untersuchung einer möglichen HMGB1-induzierten Translokation von NF κ B eine einstündige Stimulation mit HMGB1 gewählt.

In der immunzytochemischen Untersuchung konnte nach einstündiger Stimulation mit HMGB1 (5 μ g/ml) in vielen Zellen eine Akkumulation des roten NF κ B-Signals (Cy3TM) im blauen Zellkern (DAPI) festgestellt werden (Abbildung 27). In Kontrollkulturen, die für den gleichen Zeitraum mit PBS inkubiert wurden, lag das NF κ B-Signal hingegen vermehrt extranukleär vor. Bei der Immunzytochemie wurde außerdem untersucht, in welchen Zelltypen diese HMGB1-bedingte Zellaktivierung auftritt. Die Detektion von Astrozyten erfolgte über den Zellmarker „glial fibrillary acidic protein“ (GFAP), Neurone wurden über die Expression von MAP 2a+2b detektiert und Mikrogliazellen über CD68 (siehe Kapitel III E1).

Quantitativ zeigte sich am häufigsten und am deutlichsten eine durch HMGB1 induzierte Translokation von NF κ B in Astrozyten (Abbildung 27, B). Qualitativ konnte sowohl in Astrozyten (Abbildung 27, D, d) als auch in Neuronen (Abbildung 27, F, f) und Mikrogliazellen (Abbildung 27, H, h) eine HMGB1-bedingte intranukleäre Lokalisation von NF κ B nachgewiesen werden. In mit PBS stimulierten Kontrollkulturen fanden sich hingegen vermehrt extranukleäre NF κ B-Signale (Abbildung 27, A, C, c, E, e, G, g).

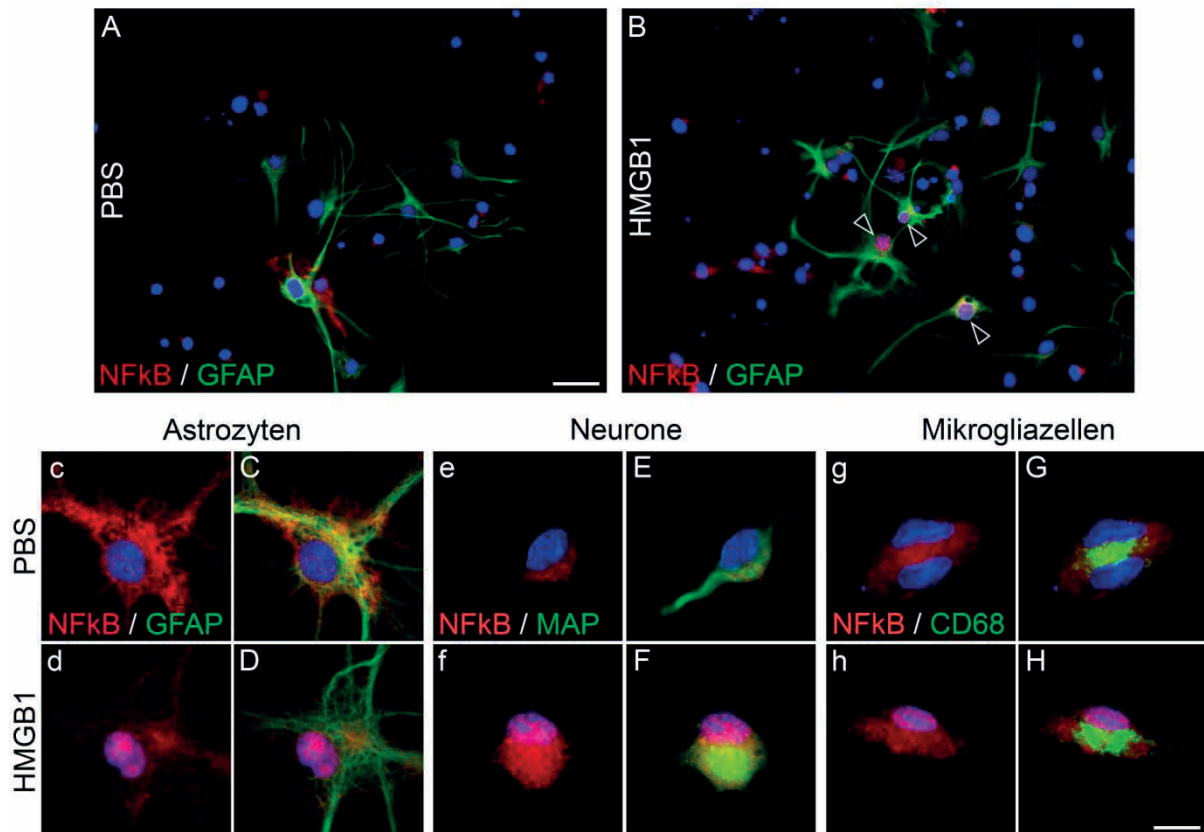


Abbildung 27: Immunzytochemie des Transkriptionsfaktors NFκB (rot) in Kombination mit verschiedenen zelltypspezifischen Primärantikörpern (grün) nach einer einstündigen Inkubation mit HMGB1 (5 µg/ml) oder PBS als Kontrolle

Offene Pfeilspitzen zeigen intranukleäre NFκB-Signale in Astrozyten (GFAP) nach Stimulation mit HMGB1. In den Abbildungen **C-G** wird der qualitative Nachweis der HMGB1-induzierten Translokation von NFκB in Astrozyten (GFAP), Neuronen (MAP 2a+2b) und Mikrogliazellen (CD68) dargestellt. Die mit Kleinbuchstaben gekennzeichneten Bilder zeigen lediglich das NFκB-Signal. Eine Überlagerung mit dem zelltypspezifischen Signal (Proteine als Zellmarker, grün) erfolgte in den mit Großbuchstaben markierten Bildern. Die einstündige Stimulation mit HMGB1 (5 µg/ml) bewirkte eine nukleäre Translokation von NFκB in Astrozyten (**D**), Neuronen (**F**) und Mikrogliazellen (**H**). In PBS-stimulierten Kulturen wies der Transkriptionsfaktor NFκB hauptsächlich eine extranukleäre Lokalisation auf (**A**, **C**, **E**, **G**). Der Größenmarker in **A** entspricht 25 µm und gilt ebenfalls für **B**. Für die Bilder **C – H** gilt der in **H** dargestellte Größenmarker. Er entspricht 10 µm.

5.2.2 Untersuchung der nukleären NF-IL6-Immunreaktivität

Durch die Untersuchung der Immunreaktivität von „nuclear factor interleukin-6“ (NF-IL6) in stimulierten Primärkulturen der AP wurde beurteilt, ob HMGB1 eine Induktion der NF-IL6-Expression bewirken kann. Durch vorherige *in vivo* Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass NF-IL6 immunhistochemisch 4 - 10 Stunden nach einer i.p. Injektion von LPS in zirkumventrikulären Organen („circumventricular organs“, CVOs) der Ratte nachweisbar ist. Dabei stieg die Immunreaktivität von 4 - 8 Stunden an und sank anschließend wieder [45]. Zur Beurteilung der NF-IL6-Aktivierung durch HMGB1 wurde daher ein Stimulationszeitraum von sechs Stunden gewählt.

In Kontrollen, die mit einer Mischung aus Neurobasal-A und PBS behandelt wurden, konnte nukleäre NF-IL6-Immunreaktivität nachgewiesen werden (Abbildung 28, A). Ein ähnliches Bild zeigte sich ebenfalls in Kulturen, die mit HMGB1 (5 µg/ml) stimuliert wurden (Abbildung 28, B). Semiquantitativ schien eine annähernd gleichwertige Induktion der NF-IL6-Expression unter Kontrollbedingungen und nach einer Stimulation mit HMGB1 vorzuliegen.

Bei einer quantitativen Auswertung wurde durch eine Auszählung intranukleärer Signale der prozentuale Anteil NF-IL6-positiver Zellen an der Gesamtzahl der Zellen ermittelt. Der semiquantitativ entstandene Eindruck konnte durch diese Quantifizierung bestätigt werden. Unter Kontrollbedingungen lagen demnach bereits in über 40 % der Zellen intranukleäre NF-IL6-Signale vor. Diese waren hauptsächlich in nicht neuronalen Zellen zu finden (Abbildung 28, a, b). Durch die Stimulation mit HMGB1 wurde dieser Anteil nicht signifikant gesteigert.

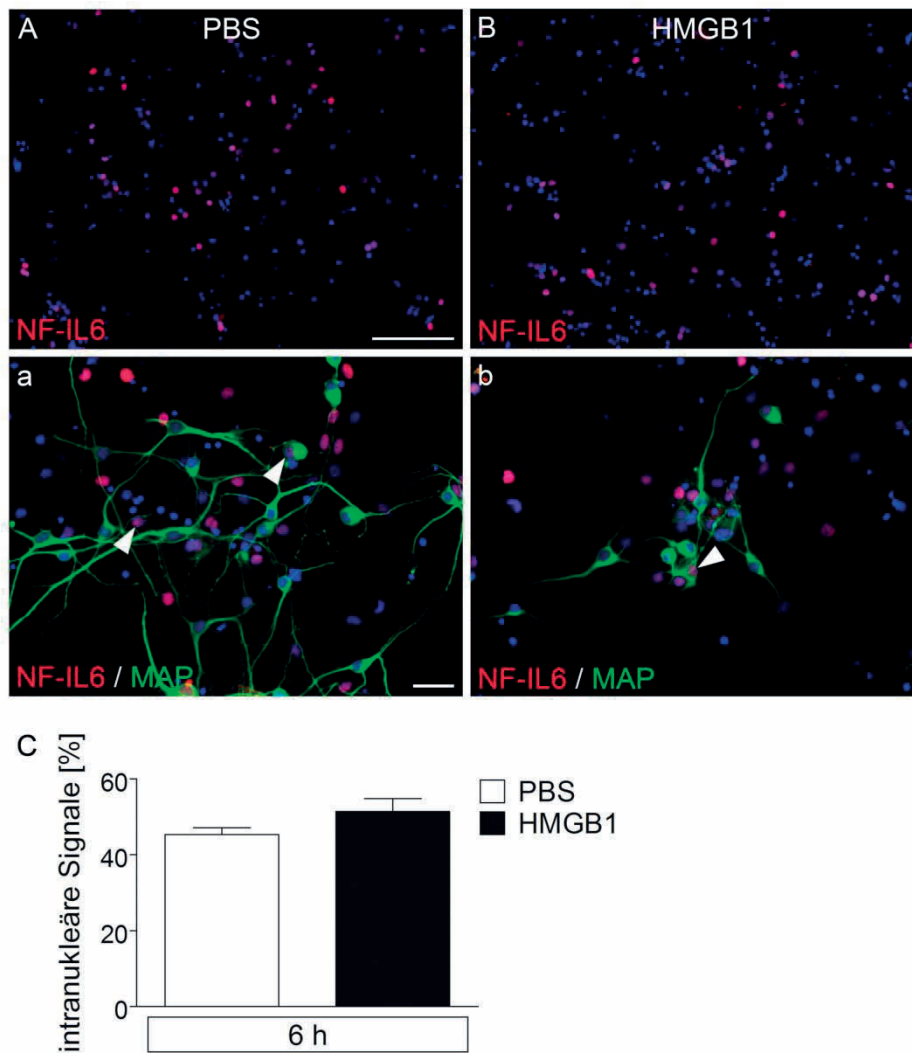


Abbildung 28: Immunzytochemische Detektion von NF-IL6 (rot) in Primärkulturen der AP in Abhängigkeit einer sechsständigen Inkubation mit PBS oder HMGB1 (5 µg/ml)

A und **B** zeigt die NF-IL6-Immunreaktivität (rot) in Primärkulturen. In **a** und **b** wird das NF-IL6-Signal mit gleichzeitiger Detektion des neuronalen Zellmarkers MAP 2a+2b (grün) dargestellt. Durch DAPI sind Zellkerne in blau markiert. Die weiß gefüllten Pfeilspitzen zeigen eine Kolokalisation intranukleärer NF-IL6-Signale mit Neuronen. Sowohl unter Kontrollbedingungen (**A**, **a**) als auch in HMGB1-stimulierten Kulturen (**B**, **b**) war intranukleäres NF-IL6 nachweisbar. Der Größenmarker in **A** entspricht 100 µm und gilt ebenso für **B**; der in **a** entspricht 25 µm und gilt ebenfalls für **b**. In **C** ist der prozentuale Anteil von NF-IL6-positiven Zellen an der Gesamtzellzahl als „mean of the mean“ mit Standardfehlern zu sehen. Es wurden insgesamt 1130 PBS-inkubierte Zellen (elf „Wells“ aus fünf Präparationen) und 920 HMGB1-behandelte Zellen (zehn „Wells“ aus fünf Präparationen) ausgezählt.

5.3 Untersuchung der HMGB1-induzierten Zytokin-Synthese in Zellen der AP

5.3.1 Untersuchung der HMGB1-bedingten Freisetzung von IL-6 und TNFα aus primären Zellkulturen der Area postrema

Mit Hilfe der Zytokin-Bioassays wurden die Konzentrationen von IL-6 und TNFα in Überständen der Primärkulturen ermittelt. Die Zellkulturen wurden zuvor für 0,5; 1; 1,5; 3 oder 6 Stunden mit HMGB1 unterschiedlicher Konzentrationen (1 µg/ml, 5 µg/ml) oder mit

PBS als Kontrolle inkubiert. Anschließend erfolgte die Bestimmung der Zytokin-Konzentrationen im Überstand, um eine Aussage über eine HMGB1-induzierte Freisetzung aus Zellen der AP sowie über eine mögliche Dosis- und Zeitabhängigkeit treffen zu können. Die Anzahl der pro Behandlung und Stimulationszeitraum inkubierten Kulturen sowie die Anzahl der Präparationen, aus denen die entsprechenden Primärkulturen der AP hergestellt wurden, sind in Tabelle 67 aufgelistet.

Tabelle 67: Anzahl der pro Behandlung und Stimulationsdauer inkubierten Zellkulturen sowie die Anzahl der Präparationen, aus denen die Zellkulturen stammten

Behandlung	Stimulationsdauer	Anzahl Kulturen	Anzahl Präparationen
PBS	0,5 h	7	5
	1 h	6	4
	1,5 h	6	5
	3 h	7	5
	6h	7	5
HMGB1 (1 µg/ml)	0,5 h	7	4
	1 h	8	4
	1,5 h	6	4
	3 h	7	4
	6h	7	4
HMGB1 (5 µg/ml)	0,5 h	5	2
	1 h	5	3
	1,5 h	6	3
	3 h	5	3
	6h	6	3

Die Stimulationen mit HMGB1 bewirkten im Vergleich zu PBS-stimulierten Kontrollkulturen einen signifikanten Anstieg der IL-6-Konzentration in den Zellkulturüberständen (Abbildung 29). Dies zeigte sich zu unterschiedlichen Zeitpunkten in unterschiedlicher Ausprägung. Es ließ sich allerdings keine Dosis- oder Zeitabhängigkeit erkennen. Nach Inkubation mit der geringeren Konzentration von HMGB1 (1 µg/ml) für 0,5 ($p < 0,05$); 1,5 ($p < 0,01$) und sechs ($p < 0,01$) Stunden war im Vergleich zu Kontrollkulturen signifikant mehr IL-6 in den Überständen nachweisbar. Die höhere Konzentration von HMGB1 (5 µg/ml) führte nach einer Inkubation für 30 Minuten bis zu drei Stunden ebenfalls zu signifikant höheren IL-6-Konzentrationen als im Überstand der mit PBS stimulierten Kontrollkulturen. Im Überstand der sechs Stunden mit HMGB1 (5 µg/ml) inkubierten Kulturen konnte kein signifikanter Anstieg von IL-6 gegenüber den Kontrollen nachgewiesen werden.

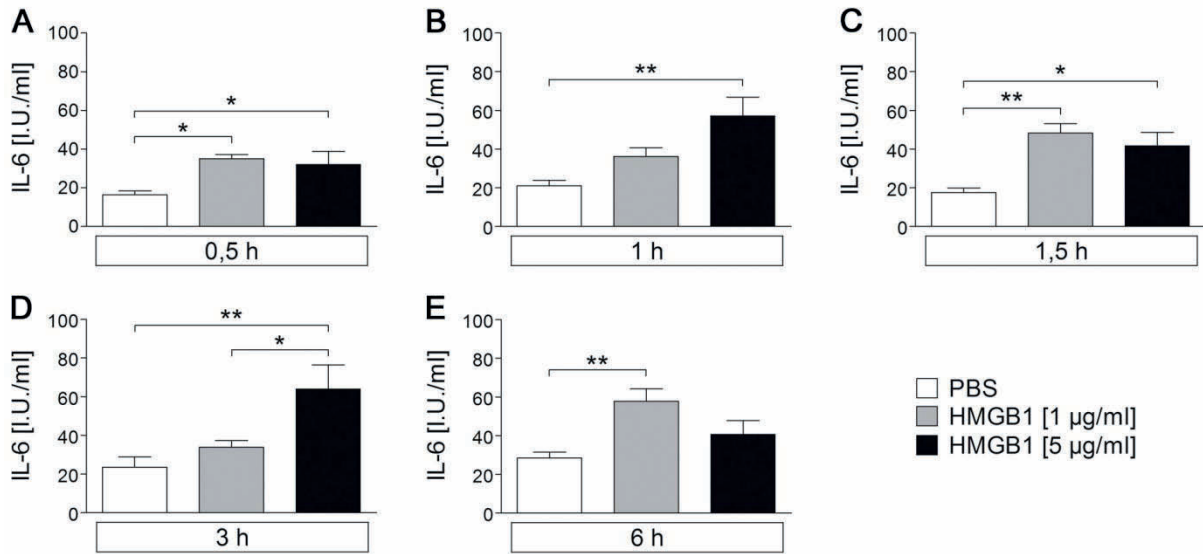


Abbildung 29: Darstellung der IL-6-Konzentrationen in Zellkulturüberständen von Primärkulturen der AP nach Inkubation mit PBS oder HMGB1 für unterschiedliche Zeiträume

Die mit Hilfe des Bioassays gemessenen IL-6-Konzentrationen werden als Mittelwert und Standardfehler in Abhängigkeit ihrer Behandlung (PBS, HMGB1 [1 µg/ml], HMGB1 [5 µg/ml]) dargestellt. Die unter den Balken befindlichen Zeitangaben beschreiben die jeweilige Inkubationsdauer. Die Inkubation mit HMGB1 bewirkte einen signifikanten Anstieg von IL-6 in den Zellkulturüberständen verglichen mit den Kontrollen. Es war keine eindeutige Dosis- oder Zeitabhängigkeit nachweisbar. * p < 0,05; ** p < 0,01.

Die TNFα-Konzentration in den Zellüberständen wurde, im Gegensatz zur angestiegenen IL-6-Konzentration, durch eine Inkubation mit HMGB1 (1 µg/ml, 5 µg/ml) nicht signifikant moduliert (Abbildung 30).

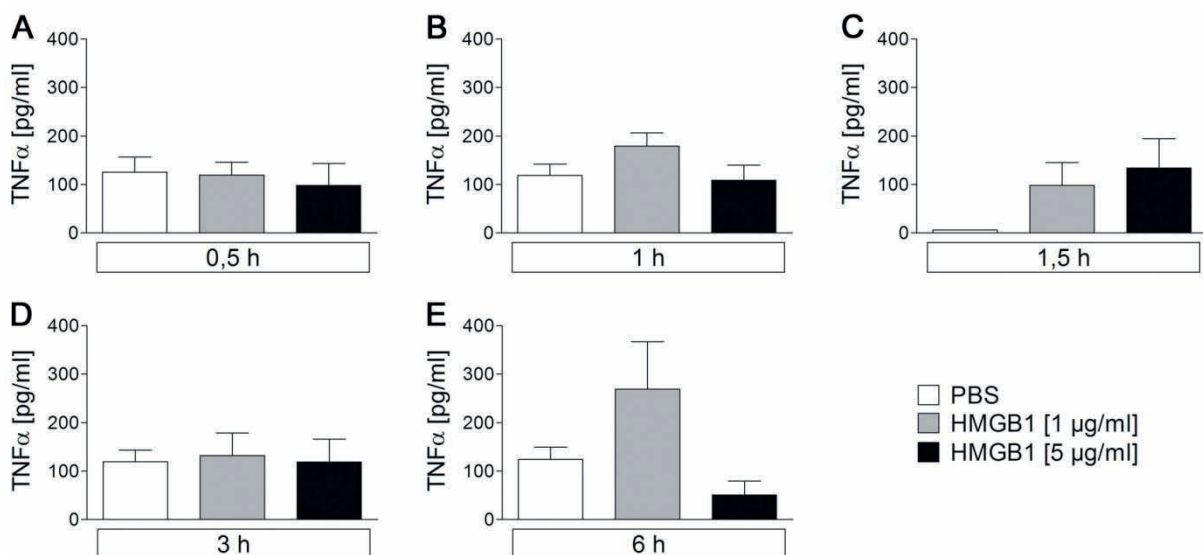


Abbildung 30: Darstellung der TNFα-Konzentrationen in Zellkulturüberständen der mit PBS oder HMGB1 inkubierten Primärkulturen

Die TNFα-Konzentrationen wurden mit Hilfe des TNFα-Bioassays ermittelt und werden als Mittelwert und Standardfehler in Abhängigkeit ihrer Behandlung sowie der Inkubationsdauer dargestellt. Eine Inkubation mit HMGB1 beider Konzentrationen (1 µg/ml, 5 µg/ml) bewirkte keinen signifikanten Anstieg der TNFα-Konzentration im Überstand von Primärkulturen der AP.

5.3.2 Untersuchung einer induzierten IL-1 β -Synthese auf Proteinebene

Für die qualitative Untersuchung einer Induktion der IL-1 β -Synthese durch HMGB1 wurden Primärkulturen der AP mit HMGB1 (5 μ g/ml) oder PBS für sechs Stunden inkubiert, anschließend fixiert und schließlich einer Immunzytochemie unterzogen (Abbildung 31). In vorherigen Studien konnte gezeigt werden, dass die LPS-induzierte TNF α -Synthese in der AP durch Mikrogliazellen erfolgt [35]. Deshalb wurde in der hier vorgenommenen immunzytochemischen Analyse, neben dem gegen das IL-1 β gerichteten Primärantikörper, der mikrogliale Zellmarker CD68 verwendet.

Die sechsstündige Stimulation mit HMGB1 (5 μ g/ml) führte in Mikrogliazellen der AP zu einer Induktion von IL-1 β -Immunreaktivität (Abbildung 31, B), welche in Mikrogliazellen der mit PBS inkubierten Kontrollkulturen nicht auftrat (Abbildung 31, A).

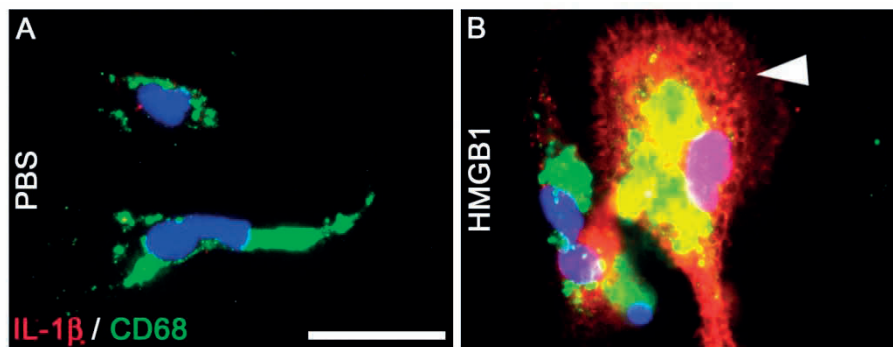


Abbildung 31: Immunzytochemische Detektion der IL-1 β -Synthese (rot) in Mikrogliazellen (grün) der AP

Die Synthese des Zytokins IL-1 β (rot) wurde qualitativ nach sechsstündiger Inkubation mit HMGB1 (5 μ g/ml) (**B**) immunzytochemisch detektiert und mit PBS-behandelten Kontrollkulturen (**A**) verglichen. Mikrogliazellen wurden durch eine Bindung des Primärantikörpers CD68 (grün) markiert. Nach Stimulation mit HMGB1 lag perinukleäre IL-1 β -Immunreaktivität vor (gefüllte Pfeilspitze, **B**). In PBS-stimulierten Kulturen konnte IL-1 β -Immunreaktivität kaum detektiert werden. Der Größenmarker in **A** entspricht 25 μ m und gilt ebenfalls für **B**.

5.4 Charakterisierung der schnellen, direkten Zellantwort auf Stimulation mit den TLR-Agonisten HMGB1 und LPS

Die Untersuchung der schnellen, direkten Zellantwort auf eine Applikation verschiedener TLR-Agonisten erfolgte durch die Analyse der intrazellulären Kalziumkonzentration ($[Ca^{2+}]_i$) mit Hilfe des „Ca²⁺-Imagings“ (siehe Kapitel IIID1.3). Eine erhöhte $[Ca^{2+}]_i$ bewirkt einen Anstieg der Ratio [340 nm / 380 nm] und wurde als Zellaktivierung (Δ Ratio $\geq 0,05$) bewertet. In die Auswertung wurden ausschließlich Zellen einbezogen, die auf die Bolusapplikation von PBS nicht mit einer Ratioänderung $\geq 0,05$ reagierten und deren Zelltyp eindeutig zuzuordnen war. Eine Reaktion auf die Applikation von PBS trat insgesamt selten auf. Die Superfusion mit Kaliumchlorid (KCl) diente als Vitalitätstest für Neurone und damit einer Vitalitätseinschätzung der gesamten Zellkultur.

Die verwendeten Messprotokolle wurden an Zellen verschiedener Zellkulturen unterschiedlicher Präparationstage durchgeführt.

5.4.1 Charakterisierung der Responsivität auf HMGB1

Tabelle 68: Anzahl der für die „Ca²⁺-Imaging“ Versuche mit HMGB1 verwendeten Zellkulturen und der Präparationen, aus denen diese Kulturen stammten

HMGB1 Konzentration	Anzahl Zellkulturen	Anzahl Präparationen
0,01 µg/ml	8	5
0,1 µg/ml	12	6
1 µg/ml	21	13
5 µg/ml	6	3

Für die Untersuchung einer direkten Zellantwort auf die Exposition mit HMGB1 wurden die Konzentrationen 0,01 µg/ml; 0,1 µg/ml; 1 µg/ml und 5 µg/ml verwendet. Die HMGB1-Applikation führte insgesamt lediglich bei 0,48 % der untersuchten Zellen zu einem Anstieg der [Ca²⁺]_i (Abbildung 32). Astrozyten und Mikrogliazellen waren bei keiner der ausgewählten Konzentrationen responsiv. Hingegen reagierten 1,54 % der mit einer HMGB1-Konzentration von 0,01 µg/ml exponierten Neurone auf diese Applikation. Auf die Bolusapplikation von HMGB1 mit den Konzentrationen 0,1 µg/ml und 1 µg/ml zeigten sich jeweils 0,83 % der untersuchten Neurone responsiv. Eine Dosiswirkung war hier demnach nicht nachweisbar (Abbildung 32, A).

Die Höhe der induzierten Ratioänderung der responsiven Neurone war relativ inhomogen und reichte von 0,05 – 0,14 (Abbildung 32, B).

Die in Abbildung 32 C beispielhaft dargestellte Messung eines Neurons zeigt das Ausbleiben einer Ratioänderung durch die Bolusapplikation von PBS und einen mit der Bolusapplikation von HMGB1 (0,1 µg/ml) verbundenen Anstieg der Ratio [340 nm / 380 nm]. Die Superfusion mit KCl führte zu einem für Neurone typischen Anstieg der [Ca²⁺]_i und damit der Ratio [340 nm / 380 nm].

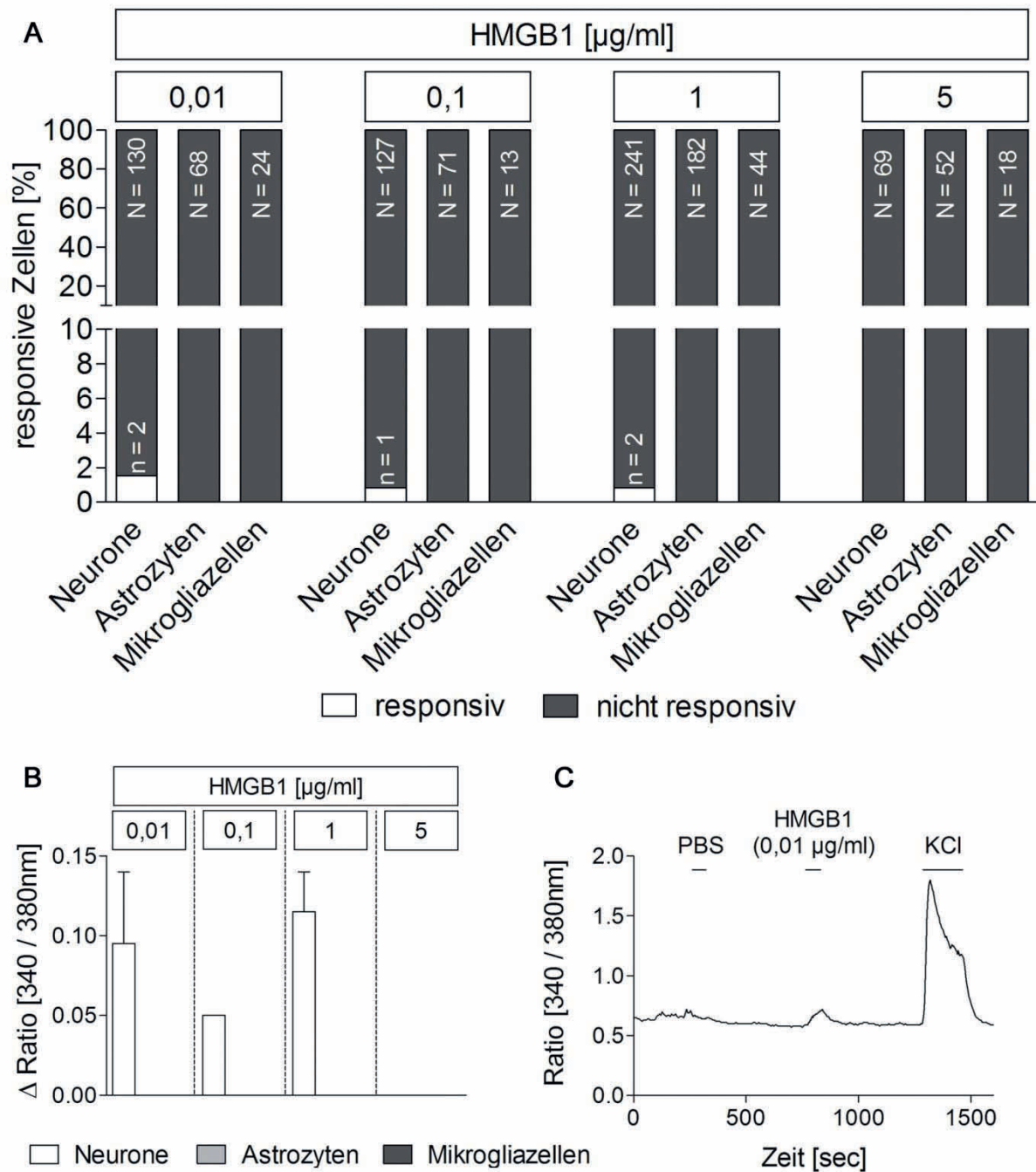


Abbildung 32: Darstellung des prozentualen Anteils HMGB1-responsiver Zellen (A), ihrer Ratioänderung (B) sowie einer beispielhaften Ratiomessung eines responsiven Neurons (C)

Responsive Zellen zeigten keine Reaktion auf die Applikation von PBS, reagierten jedoch auf die Bolusapplikation von HMGB1 mit einem Anstieg der Ratio [340 nm / 380 nm] $\geq 0,05$. In Abbildung A wird der prozentuale Anteil responsiver Zellen an den gemessenen Zellen jeder untersuchten Konzentration in weiß dargestellt. Die Absolutzahl der responsiven Zellen wird mit „n“ angegeben; die Absolutzahl der gemessenen Zellen mit „N“. Der Tabelle 68 ist die Anzahl der Zellkulturen und Präparationen zu entnehmen, aus denen die gemessenen Zellen stammten. Nur wenige Neurone reagierten auf die Bolusapplikation von HMGB1. Die Ratioänderung der responsiven Neurone wird in Abbildung B als Mittelwert mit Standardfehler dargestellt und reichte von 0,05 - 0,14. Abbildung C zeigt die Messwerte eines HMGB1-responsiven Neurons mit der für vitale Neurone spezifischen positiven Reaktion auf die Superfusion mit KCl.

5.4.2 Vergleichende Voruntersuchung der Responsivität auf LPS

Tabelle 69: Anzahl der für die „Ca²⁺-Imaging“ Versuche mit LPS verwendeten Zellkulturen und der Präparationen, aus denen diese Kulturen stammten

LPS Konzentration	Anzahl Zellkulturen	Anzahl Präparationen
0,01 µg/ml	4	2
0,1 µg/ml	4	2
1 µg/ml	19	10
5 µg/ml	4	3
10 µg/ml	5	2

Die LPS Konzentrationen 0,01 µg/ml; 0,1 µg/ml; 5 µg/ml und 10 µg/ml wurden zusätzlich zu 1 µg/ml verwendet, um Informationen über eine mögliche Dosiswirkung zu erhalten. Insgesamt waren 3,67 % der untersuchten Zellen responsiv (Abbildung 33). Alle drei untersuchten Zelltypen (Neurone, Astrozyten, Mikrogliazellen) reagierten bei unterschiedlichen Konzentrationen auf eine Bolusapplikation von LPS. Es ließ sich keine Dosisabhängigkeit der unterschiedlichen Zelltypen feststellen. 4,55 % der untersuchten Neurone und 3,85 % der untersuchten Astrozyten reagierten auf die Bolusapplikation von LPS mit der Konzentration von 0,01 µg/ml. Auf die Stimulation mit LPS der Konzentration 0,1 µg/ml waren lediglich Neurone responsiv, nämlich 1,96 % der untersuchten Neurone. Die Stimulation mit LPS einer Konzentration von 1 µg/ml bewirkte bei 6,09 % der Neurone und bei 2,68 % der Astrozyten einen Ratioanstieg $\geq 0,05$. Auf eine Applikation von LPS mit 5 µg/ml reagierten 10 % der Astrozyten sowie 7,69 % der Mikrogliazellen responsiv, auf die Applikation von LPS mit 10 µg/ml waren es 6,52 % der Neurone und 3,32 % der Astrozyten.

Die Höhe der Ratioänderung responsiver Zellen reichte von 0,05 – 0,56. Insgesamt lag eine inhomogene Ratioänderung vor, jedoch zeigten Astrozyten im Mittel den höchsten Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ und damit der Ratio $[340 \text{ nm} / 380 \text{ nm}]$ (Abbildung 33, B).

Die Ratiomessung des beispielhaft dargestellten Astrozyten zeigte einen LPS-bedingten Anstieg. Außerdem fand keine Ratioänderung bei der Applikation von PBS statt. Die nur moderate Erhöhung der Ratio $[340 \text{ nm} / 380 \text{ nm}]$ als Reaktion auf die Superfusion mit KCl entspricht dem typischen Verhalten von Astrozyten (Abbildung 33, C).

Bei den „Ca²⁺-Imaging“ Versuchen mit LPS lag für die weiteren Messprotokolle, entsprechend dieser Vorversuche zur Dosis-Wirkung, der Fokus auf einer Stimulation mit 1 µg/ml. Hierfür wurden Zellen von 19 Zellkulturen aus 10 Präparationen verwendet.

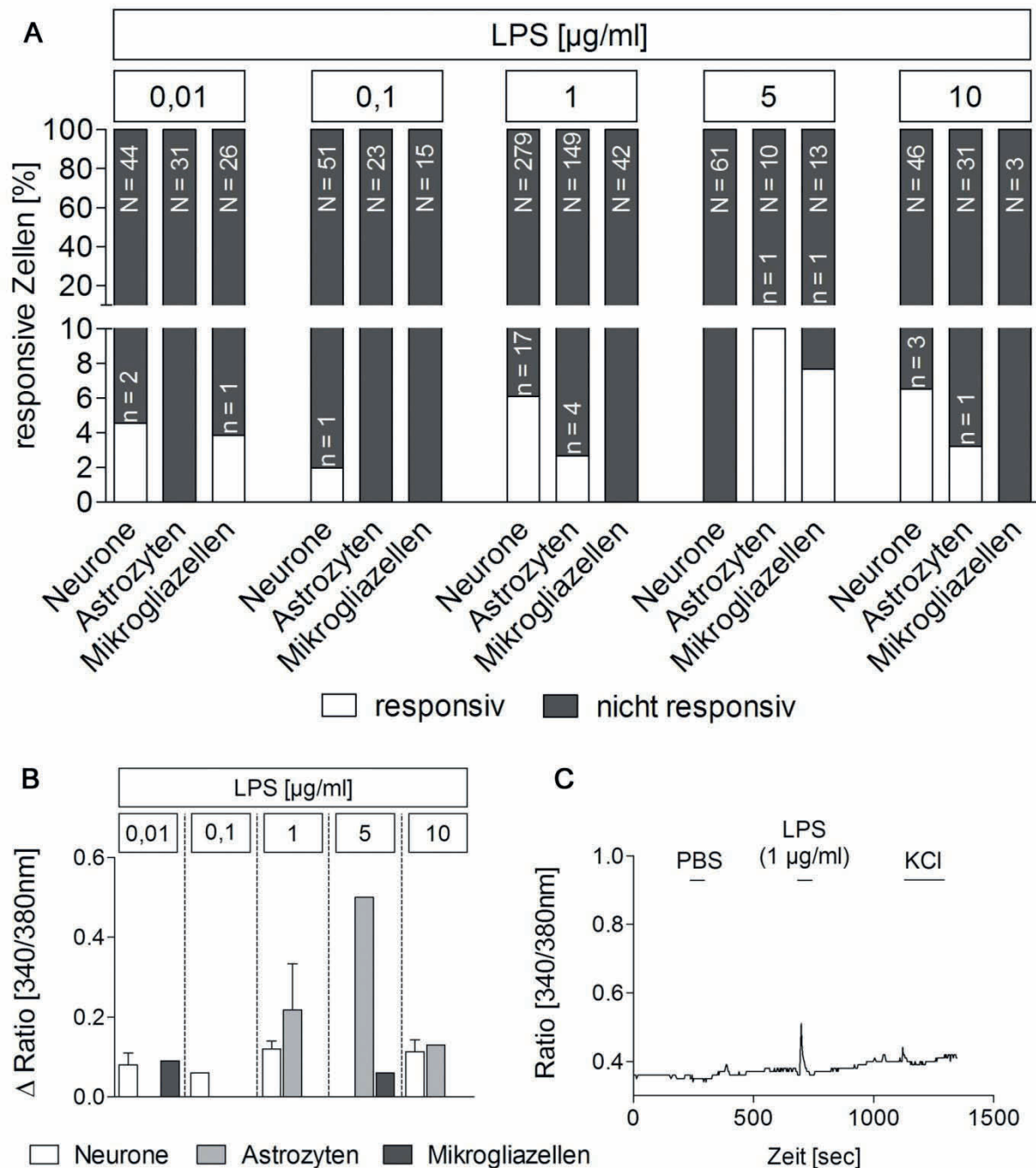


Abbildung 33: Darstellung des prozentualen Anteils LPS-responsiver Zellen (A), der Höhe der induzierten Ratioänderungen (B) und einer beispielhaften Ratiomessung eines responsiven Astrozyten (C)

Zellen, die nicht auf eine Bolusapplikation von PBS, aber auf eine LPS-Applikation mit einer Erhöhung der Ratio [340 nm / 380 nm] $\geq 0,05$ reagierten, wurden als responsiv bewertet. Ihr prozentualer Anteil an den gemessenen Zellen wird in Abbildung A weiß dargestellt und nach Zelltyp sowie LPS-Konzentration differenziert. Die Anzahl der responsiven Zellen wird durch „n“ angegeben; die Anzahl der gemessenen Zellen durch „N“. Die Anzahl verwendeter Zellkulturen und Präparationen ist Tabelle 69 zu entnehmen. Bei allen untersuchten Konzentrationen wurden unterschiedliche Zelltypen durch LPS stimuliert. Die Abbildung B zeigt die induzierten Ratioänderungen in Abhängigkeit der Konzentration von LPS und des Zelltyps als Mittelwert mit Standardfehler. Die Stimulation mit LPS führte zu einem inhomogenen Anstieg der Ratio. In Abbildung C wird beispielhaft die „Ca²⁺-Imaging“ Messung eines LPS-responsiven Astrozyten dargestellt. Die Superfusion mit KCl führte zu keinem nennenswerten Anstieg der Ratio [340 nm / 380 nm].

5.4.3 Untersuchung einer gegenseitigen Modulation von LPS und HMGB1 auf die Zellantworten

Tabelle 70: Anzahl der für die kombinierten Messprotokolle der „Ca²⁺-Imaging“ Versuche verwendeten Zellkulturen und der Präparationen, aus denen diese Kulturen stammten

Messprotokoll	Anzahl Zellkulturen	Anzahl Präparationen
LPS → HMGB1 → LPS + HMGB1	14	8
HMGB1 → LPS → LPS + HMGB1	15	9

Für die Untersuchung eines modulatorischen Effektes von LPS auf die HMGB1-induzierte Zellreaktion (Abbildung 34, A(I)) sowie von HMGB1 auf die LPS-bedingte Zellreaktion (Abbildung 34, A(II)), wurden zwei unterschiedliche Messprotokolle verwendet. Deren Ergebnisse sind in Abbildung 34 gegenübergestellt.

Bei den Dosis-Wirkungs-Untersuchungen lag lediglich eine geringe HMGB1-Responsivität vor. Es reagierten ausschließlich Neurone auf die Bolusapplikation von HMGB1 und bei einer Konzentration von 1 µg/ml waren lediglich 0,83 % der Neurone responsiv (Abbildung 32). Die zelltypunabhängige Berechnung ergab für 0,43 % der untersuchten Zellen eine Responsivität gegenüber HMGB1 (1 µg/ml). Bei dem hier angewendeten kombinierten Messprotokoll führte eine vorherige Bolusapplikation von LPS zu einem Anstieg des prozentualen Anteils responsiver Zellen. Es reagierten 3,4 % der Neurone und 3 % der Astrozyten responsiv auf die HMGB1-Applikation (Abbildung 34, A(I)). Dadurch ergab sich bezogen auf alle untersuchten Zellen und Zelltypen eine Responsivität von 3,03 % gegenüber HMGB1 (1 µg/ml). Verglichen mit dem prozentualen Anteil HMGB1-responsiver Zellen (1 µg/ml) der Dosis-Wirkungs-Untersuchungen (0,43 % der untersuchten Zellen responsiv) (Abbildung 32) stieg der prozentuale Anteil responsiver Zellen durch die vorherige Applikation von LPS um das 7,05-fache. Verglichen mit dem hier angewendeten Protokoll zur Untersuchung der Beeinflussung von HMGB1 auf die LPS-bedingte Reaktion, bei dem HMGB1 als erster, unbeeinflusster Stimulus eingesetzt wurde (Abbildung 34, A(II)), um das 9,2-fache (0,33 % der Zellen reagierten responsiv auf HMGB1). Außerdem ist besonders hervorzuheben, dass nach vorangegangener LPS-Applikation nun auch Astrozyten auf eine Bolusapplikation von HMGB1 (1 µg/ml) reagierten.

In Abbildung 34 C(I) werden die responsiven Zellen nach ihrem Reaktionsmuster aufgegliedert dargestellt. Unter den HMGB1-responsiven Zellen reagierten drei Zellen nur auf die Bolusapplikation von HMGB1. Eine Zelle reagierte auf alle drei Bolusapplikationen, nämlich LPS, HMGB1 sowie auf die kombinierte Applikation von LPS und HMGB1. Fünf Zellen reagierten sowohl auf LPS als auch auf HMGB1 und eine Zelle zeigte eine Reaktion auf HMGB1 sowie die kombinierte Bolusapplikation. Zusätzliche lag bei fünf Zellen ausschließlich eine Reaktion auf die kombinierte Applikation von LPS und HMGB1 vor. Der

prozentuale Anteil LPS-responsiver Zellen an den insgesamt untersuchten Zellen (5,5 %) entsprach bei diesem Versuchsprotokoll, bei dem die Applikation von LPS die erste Stimulation darstellte und damit unbeeinflusst war, weitgehend dem prozentualen Anteil der Zellen, die bei den Dosis-Wirkungs-Versuchen mit einer Erhöhung der Ratio auf die Bolusapplikation von LPS (1 µg/ml) reagierten (4,5 %).

Bei dem zweiten Messprotokoll zur Untersuchung einer gegenseitigen Modulation wurde eine HMGB1-Applikation vor einer LPS-Applikation vorgenommen. Dabei reagierte nur ein Neuron auf die Applikation von HMGB1. Das entspricht 0,7 % der gemessenen Neurone und 0,33 % der insgesamt gemessenen Zellen. Somit ergaben sich für die unbeeinflusste Responsivität auf HMGB1 in diesem Messprotokoll annähernd gleiche Ergebnisse wie für die ermittelte Responsivität bei den Dosis-Wirkungs-Untersuchungen. Jedoch kam es durch die vorherige Applikation von HMGB1 zu einer starken Reduktion des prozentualen Anteils LPS-responsiver Zellen. Es reagierten lediglich noch 0,68 % der Neurone und 0,8 % der Astrozyten auf eine Bolusapplikation von LPS einer Konzentration von 1 µg/ml. Insgesamt zeigten 0,67 % der untersuchten Zellen eine Reaktion auf die Applikation von LPS. Der prozentuale Anteil der LPS-responsiven Zellen wurde demnach durch die vorherige Stimulation mit HMGB1 6,7-fach gegenüber dem prozentualen Anteil responsiver Zellen der Dosis-Wirkungs-Untersuchung (1 µg/ml) reduziert. Gegenüber der unbeeinflussten Stimulation mit LPS im Rahmen dieser kombinierten Messprotokolle (Abbildung 34, A(I)) konnte sogar eine 8,1-fache Reduktion des prozentualen Anteils der responsiven Zellen nachgewiesen werden. In der differenzierten Darstellung der Reaktionsmuster responsiver Zellen (Abbildung 34, C(II)) ist zu erkennen, dass die HMGB1-responsive Zelle sowohl auf HMGB1 als auch auf LPS reagierte. Eine weitere Zelle reagierte ausschließlich auf LPS. Zusätzlich reagierten zwei Zellen auf die kombinierte Applikation von LPS und HMGB1. Auch der prozentuale Anteil dieser auf die kombinierte Applikation von LPS und HMGB1 reagierenden Zellen wurde durch die Anwendung der Bolusapplikation von HMGB1 als unbeeinflusstem Stimulus deutlich gegenüber der Anwendung von LPS als unbeeinflusstem Stimulus reduziert.

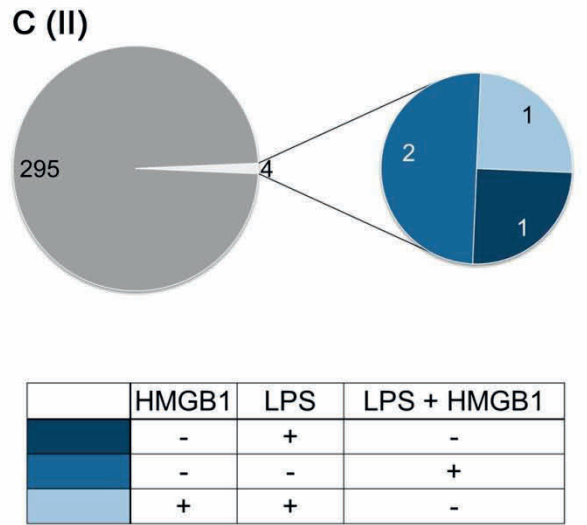
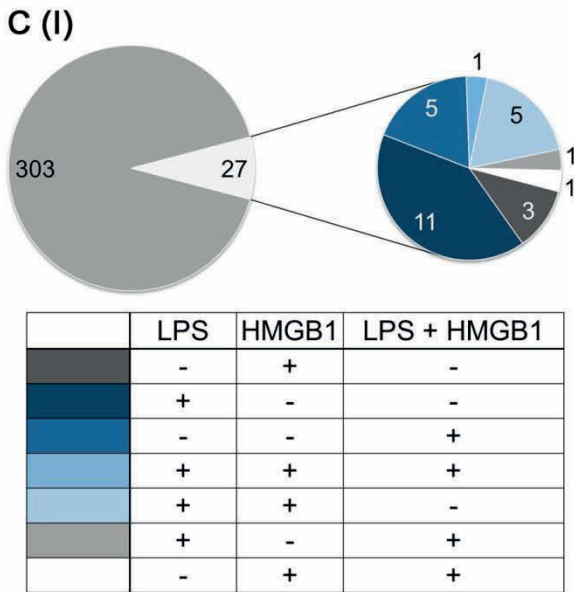
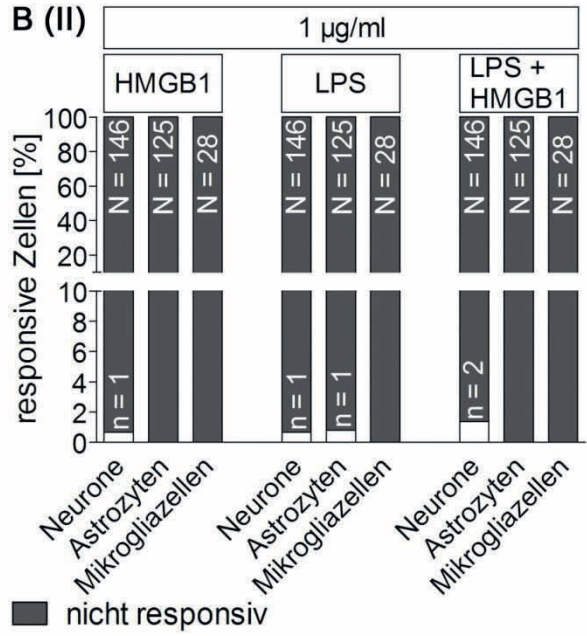
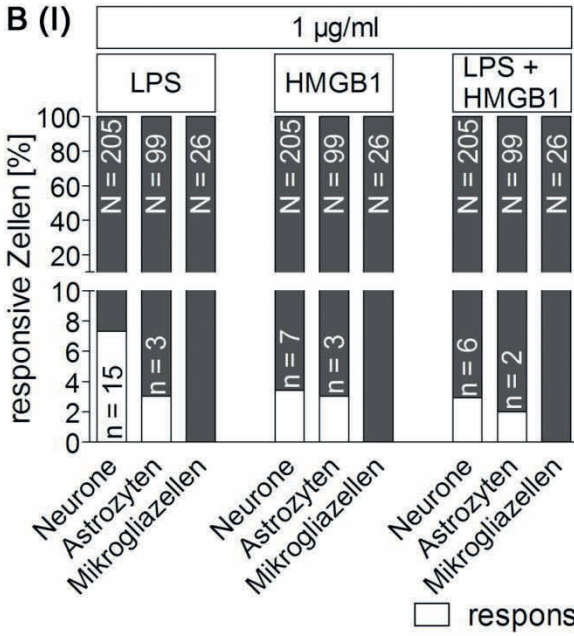
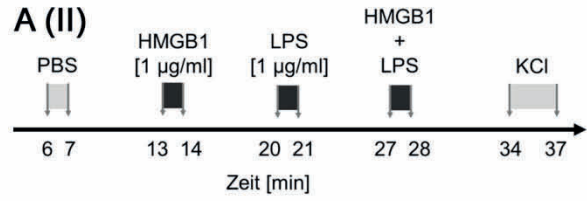
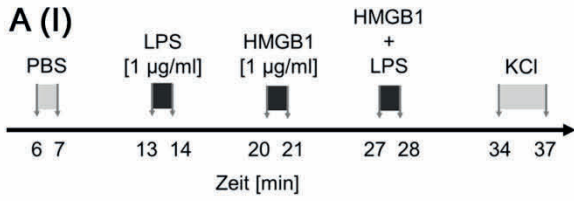


Abbildung 34: Darstellung der Ergebnisse zur Untersuchung einer gegenseitigen Beeinflussung von LPS und HMGB1 mit Hilfe der „Ca²⁺-Imaging“ Technik

Die verwendeten Messprotokolle werden in **A(I)** und **A(II)** dargestellt. Die Bolusapplikation von PBS diente zum Ausschluss mechanosensitiver Zellen und die Superfusion mit KCl stellte einen Vitalitätstest für Neurone dar, der der Vitalitätseinschätzung der gesamten Kultur diente. In **A(I)** wurde LPS als erster, unbeeinflusster Stimulus verwendet; in **A(II)** war es HMGB1. In **B(I)** bzw. **B(II)** wird der prozentuale Anteil der für den entsprechenden Stimulus responsiven Zellen weiß dargestellt. Die absolute Anzahl responsiver Zellen wird durch „n“ angegeben. „N“ zeigt die Gesamtzahl der gemessenen Zellen. Die Anzahl der untersuchten Zellkulturen und Präparationen ist der Tabelle 70 zu entnehmen. Durch die vorherige Applikation von LPS war der prozentuale Anteil HMGB1-responsiver Zellen deutlich höher (**B(I)**) als ohne vorherige LPS-Stimulation (**B(II)**). Hingegen wurde die Responsivität gegenüber LPS deutlich durch die vorherige Applikation von HMGB1 reduziert (**B(II)**). In **C(I)** und **C(II)** wird das Reaktionsmuster der responsiven Zellen dargestellt. Einige der responsiven Zellen reagierten auf mehrere der verwendeten Applikationen mit einem Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration.

6 Zusammenfassung der wichtigsten Ergebnisse zur Charakterisierung der Bedeutung von HMGB1 während einer Sepsis

- Ratten zeigten ein über 24 Stunden anhaltendes LPS-induziertes Fieber. Zu diesem Zeitpunkt erreichten die Plasmakonzentrationen von IL-6 und TNF α bereits wieder basale Werte
- LPS führte zu einer Erhöhung der HMGB1-Plasmakonzentration über 24 Stunden.
- Die relative Expression von HMGB1, RAGE und TLR4 wurde im Hypothalamus sowie in der Milz marginal und in der Leber signifikant durch die i.p. Injektion von LPS reduziert.
- 24 Stunden nach LPS-Injektion lag im Gehirn in der AP und dem MnPO eine perinukleäre Translokation von HMGB1 vor. In Kontrollen war hingegen nukleäre HMGB1-Immunreaktivität nachweisbar.
- *In vitro* führte LPS ebenfalls zu einer signifikanten Reduktion intranukleärer HMGB1-Signale in Primärkulturen der AP.
- Eine Stimulation mit HMGB1 bewirkte *in vitro* die Aktivierung von NF κ B (vor allem in Astrozyten), nicht jedoch von NF-IL6.
- Die Stimulation mit HMGB1 führte *in vitro* zu einem signifikanten Anstieg der IL-6-Konzentration in Überständen der Primärkulturen. Die TNF α -Konzentrationen wurden nicht signifikant erhöht. In Mikrogliazellen war eine HMGB1-induzierte Immunreaktivität von IL-1 β nachweisbar.
- Zellen der AP reagierten mit einer höheren Responsivität auf die Applikation von LPS unterschiedlicher Konzentrationen als auf die Applikation von HMGB1 unterschiedlicher Konzentrationen.
 - Nur wenige Neurone reagierten responsiv auf eine Applikation von HMGB1.
 - Eine vorherige Applikation von LPS erhöhte den prozentualen Anteil HMGB1-responsiver Zellen deutlich.

- Eine vorherige Applikation von HMGB1 führte zu einer deutlichen Reduktion des prozentualen Anteils LPS-responsiver Zellen.

IVB Untersuchung der Freisetzung von pro- und anti-inflammatorischen Lipidmediatoren aus Primärkulturen der AP

Die Metaboliten der Arachidonsäure („arachidonic acid“, AA), der Docosahexaensäure („docosahexaenoic acid“, DHA) und der Eicosapentaensäure („eicosapentaenoid acid“, EPA) sind für die Induktion und die Beendigung der Inflammation von großer Bedeutung und können auch im Gehirn nachgewiesen werden (siehe Kapitel IA2.1.2.3 und ID3).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde untersucht, ob die Flüssigchromatographie mit Massenspektrometrikopplung („liquid chromatography-mass spectrometry“, LC-MS/MS) eine geeignete Methode zur Quantifizierung der Lipide sowie der Lipidmediatoren in Überständen von Primärkulturen der AP darstellt und welchen modulatorischen Einfluss LPS und HMGB1 auf ihre Synthese haben.

Die Primärkulturen der AP wurden mit LPS (10 µg/ml) oder HMGB1 (10 µg/ml) stimuliert oder mit PBS als Kontrolle inkubiert. Es lagen zwei Behandlungsgruppen vor. In einer Gruppe erhielten die Kulturen nach 46 Stunden einen Zusatz von AA, DHA und EPA (jeweils 5 µg/ml), in der anderen nicht (siehe Kapitel IIID1.2.1). Die Überstände wurden nach 48 Stunden abgenommen und in Zusammenarbeit mit Dr. Sabine Schulz einer Messung mittels LC-MS/MS unterzogen (siehe Abbildung 20 und Kapitel IIIE4.2). Zur Kontrolle der biologischen Bedeutung von gemessenen Konzentrationen wurden zusätzliche Blindproben ohne Zellen angefertigt. Dafür wurden die Zellkulturgefäße ebenso behandelt und stimuliert wie die zu untersuchenden Primärkulturen, enthielten jedoch keine Zellen. Bei der Darstellung der Ergebnisse wurden die Konzentrationen der unterschiedlich behandelten Blindproben zusammengefasst. Die schwarz-weiß gestreiften und mit dem Begriff „ohne Zellen“ markierten Balken setzen sich demnach aus den Konzentrationen einer mit LPS, einer mit HMGB1 und einer mit PBS inkubierten Kultur zusammen und sind ebenfalls als „mean of the mean“ dargestellt.

Es wurde die Konzentration der jeweiligen Analyte in der Lösung bestimmt, die durch Resuspension der getrockneten Analyte mit 50 µl Lösungsmittel (Acetonitril [25 %] in Wasser) entstand. Diese wurde als ng/ml angegeben.

In Tabelle 71 ist die jeweilige Anzahl der Proben angegeben, die bei der Auswertung der Ergebnisse miteinander verglichen werden konnten.

Tabelle 71: Anzahl der Sammelproben, deren Ergebnisse miteinander verglichen wurden. Die in Klammern angegebene Anzahl entspricht den Blindproben

	ohne AA, DHA; EPA	+ AA; DHA, EPA nach 46 h
PBS	3 (1)	3 (1)
LPS (10 µg/ml)	3 (1)	3 (1)
HMGB1 (10 µg/ml)	3 (1)	3 (1)

1 Untersuchung einer induzierten Freisetzung von pro- und anti-inflammatorischen Lipidmediatoren aus den neuronalen sowie glialen Zellen von Primärkulturen der AP

Die Auswertung, der bei der LC-MS/MS Analyse ermittelten Peaks, erfolgte anhand der erstellten Kalibriergerade, ohne Berücksichtigung der deuterierten internen Standards. Zusätzlich wurden die Ergebnisse mit der jeweiligen Wiederfindungsrate des entsprechenden Lipidmediators korrigiert. Die Wiederfindungsrate wurde aus der gemessenen Konzentration in einer mit Medium angesetzten Standardlösung, die eine definierte Konzentration der Lipidmediatoren enthielt und wie die Proben der SPE unterzogen wurden, ermittelt.

Ohne den Zusatz der Fettsäuren (FS) nach 46 Stunden waren lediglich Prostaglandin D₂ (PGD₂) (3,74 ng/ml) und PGE₂ (8,29 ng/ml) in nur einem Überstand der mit LPS stimulierten Primärkulturen nachweisbar. In allen anderen Proben gelang der Nachweis der Lipidmediatoren ohne den Zusatz der FS, aus denen sie metabolisiert werden, nicht (Abbildung 35).

In den Überständen der Primärkulturen, denen die FS AA, DHA und EPA nach 46 Stunden hinzugefügt wurden, konnte hingegen ein zuverlässiger Nachweis von PGD₂, PGE₂, PGJ₂ und LTB₄ in allen untersuchten Proben erfolgen. Die anti-inflammatorischen bzw. pro-entzündungsauflösenden Lipidmediatoren Maresin 1 und Neuroprotektin D₁ waren hingegen nur in sehr geringen Konzentrationen und nur in wenigen Probenüberständen messbar. Die für Maresin 1 und Neuroprotektin D₁ dargestellten Konzentrationen repräsentieren lediglich die Ergebnisse der technischen Replikate einer biologischen Probe, da diese Metaboliten jeweils nur in einer der drei Proben nachweisbar waren. Es erfolgte demnach keine statistische Auswertung der Konzentrationen von Maresin 1 und Neuroprotektin D₁. Dennoch soll gezeigt werden, dass mit der hier etablierten Methode prinzipiell ein Nachweis dieser anti-inflammatorischen Mediatoren ebenfalls möglich war.

Ein behandlungsabhängiger Effekt war für keinen der Lipidmediatoren zu erkennen.

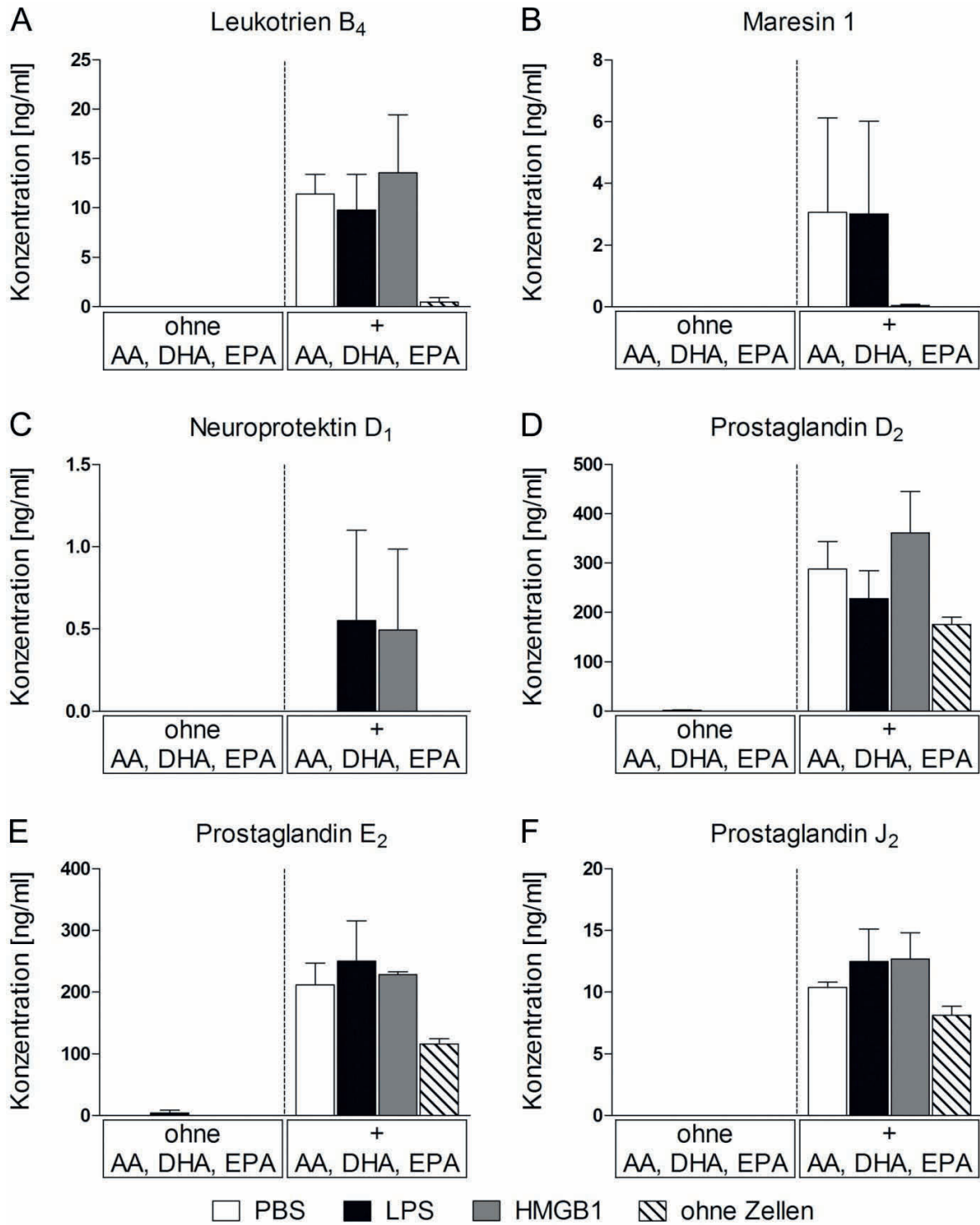


Abbildung 35: Darstellung der Konzentrationen von Lipidmediatoren in Überständen von Primärkulturen der AP in Abhängigkeit ihrer Behandlung

Die als „mean of the mean“ mit Standardfehlern dargestellten Konzentrationen wurden mittels LC-MS/MS bestimmt. Die Quantifizierung erfolgte ohne den internen Standard mit Hilfe der erstellten Kalibriergerade und einer Korrektur mit der jeweiligen Wiederfindungsrate. Die statistische Auswertung der Proben ohne und mit Zusatz der Fettsäuren Arachidonsäure (AA), Docosahexaensäure (DHA) und Eicosapentaensäure (EPA) wurde getrennt voneinander durchgeführt. Die Probenzahlen sind der Tabelle 71 zu entnehmen. Ein zuverlässiger Nachweis der Lipidmediatoren erfolgte nur in Proben, denen die Fettsäuren AA, DHA und EPA zugesetzt wurden. Die anti-inflammatorischen Mediatoren Maresin 1 und Neuroprotektin D₁ konnten jeweils nur in einer Probe detektiert werden und wurden statistisch nicht ausgewertet.

1.1 Darstellung des Nachweises der anti-inflammatorischen Lipidmediatoren Resolvin D₁ und Resolvin D₂

Die anti-inflammatorischen Lipidmediatoren Resolvin D₁ (RvD₁) und RvD₂ waren bei der Messung der biologischen Proben aus der Abbildung 35 nicht nachweisbar. In einer vorherigen Messung weiterer Proben konnte deren Sekretion allerdings detektiert werden (Abbildung 36). Bei diesem Probendurchlauf wurde die Wiederfindungsrate der Lipidmediatoren im Medium nicht bestimmt, weshalb er nicht mit den zuvor beschriebenen Ergebnissen verglichen werden konnte. Um zu zeigen, dass mit der hier etablierten Methode ein Nachweis von RvD₁ und RvD₂ aus den Überständen der Primärkulturen prinzipiell möglich war, wird deren ermittelte Konzentration in Abbildung 36 dargestellt.

In den Überständen der Kulturen, die keinen Zusatz von AA, DHA und EPA erhielten, waren RvD₁ und RvD₂ nicht zu detektieren. In den Überständen der mit den FS versetzten Kulturen lagen die RvD₁ und RvD₂ jedoch in geringen Konzentrationen vor. Eine statistische Auswertung war aufgrund der Probenzahl (eine Probe mit zwei technischen Replikaten) nicht möglich, allerdings zeigte sich eine höhere Konzentration der Resolvine in dem Überstand der LPS-stimulierten Kultur.

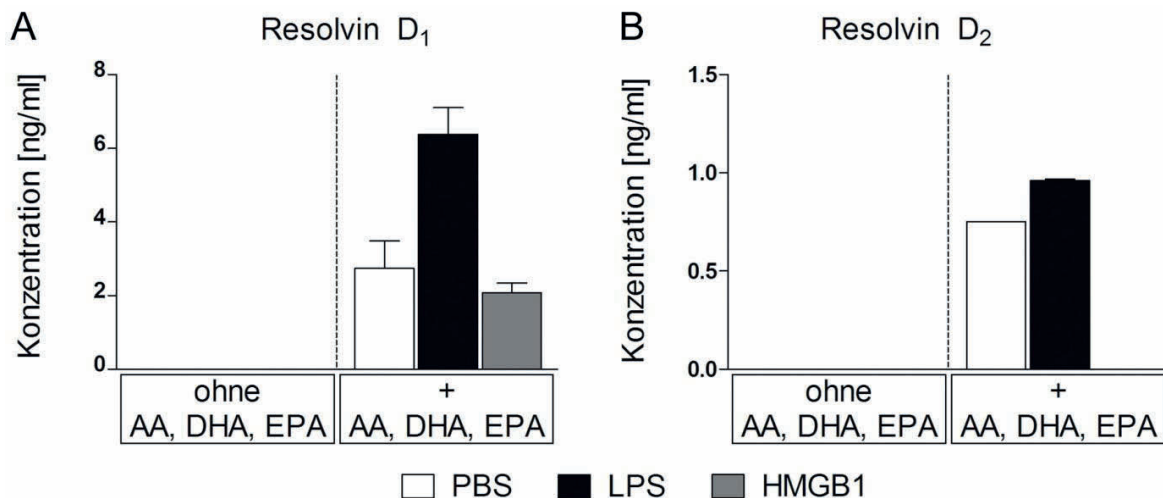


Abbildung 36: Beispielhafte Darstellung der Resolvin-Konzentrationen in Überständen der Primärkulturen als Beweis ihrer Nachweisbarkeit

Die hier dargestellten Konzentrationen konnten nicht mit den Ergebnissen der Proben aus Abbildung 35 verglichen werden, da die Wiederfindungsrate in diesen Messungen nicht bestimmt wurde und dadurch keine Korrektur der berechneten Ergebnisse erfolgen konnte. Es handelt sich um jeweils eine Probe mit zwei technischen Replikaten. Eine statistische Auswertung erfolgte nicht. Die Resolvine D₁ und D₂ waren in Überständen der Primärkulturen, die einen Zusatz der Fettsäuren Arachidonsäure (AA), Docosahexaensäure (DHA) und Eicosapentaensäure (EPA) erhielten, nachweisbar. Im Überstand der LPS-stimulierten Kultur lagen höhere Resolvin D₁ und Resolvin D₂ Konzentrationen vor als in den mit PBS oder HMGB1 inkubierten Kulturen.

1.2 Beispielhafte Darstellung einer Quantifizierung unter Einbeziehung interner Standards

Die deuterierten internen Standards wurden den Proben zugesetzt, um eine Quantifizierung unter Berücksichtigung ihrer Konzentration durchführen zu können. Es lag jedoch nicht für jeden zu quantifizierenden Lipidmediator ein deuterierter Standard vor, deshalb sollten die Konzentrationen der deuterierten Standards auf mehrere Lipidmediatoren ähnlicher Massen bezogen werden (siehe Tabelle 72). Aufgrund dieser Limitation wurde letztendlich die Entscheidung für eine Quantifizierung ohne Berücksichtigung der internen Standards getroffen.

Tabelle 72: Auflistung der verwendeten deuterierten internen Standards und der Lipidmediatoren, deren Konzentration mit den jeweiligen Standards berechnet werden sollte

für die Quantifizierung verwendeter, interner Standard	zu quantifizierende Substanz
Arachidonic Acid-d11	Arachidonsäure
	Docosahexaensäure
	Eicosapentaensäure
Leukotriene B ₄ -d4	Leukotrien B ₄
	Maresin 1
	Neuroprotektin D ₁
	Prostaglandin J ₂
	Prostaglandin D ₂
Resolvin D ₁ -d5	Prostaglandin E ₂
	Resolvin D ₁
	Resolvin D ₂

Beispielhaft wird in der Abbildung 37 anhand von LTB₄, dargestellt, dass eine Auswertung der Ergebnisse unter Berücksichtigung der deuterierten internen Standards durchgeführt werden konnte.

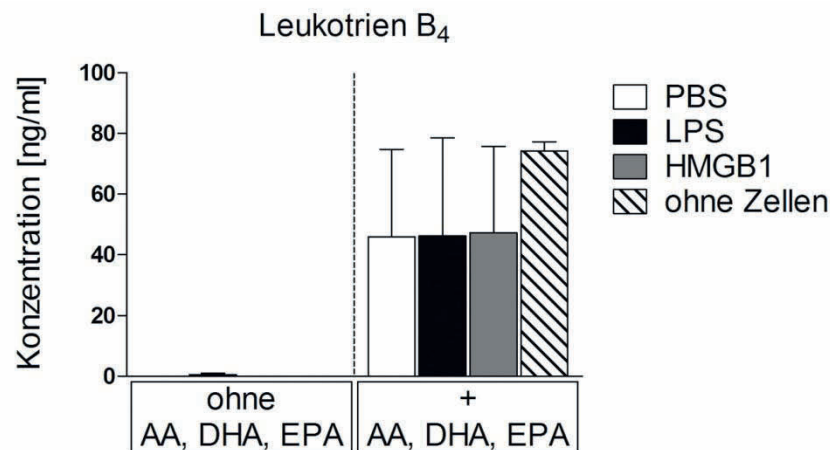


Abbildung 37: Darstellung der ermittelten Konzentration von Leukotrien B₄ in Überständen der Primärkulturen unter Berücksichtigung des internen Standards

Die Konzentration von Leukotrien B₄ wurde unter Berücksichtigung der Konzentration des internen Standards ermittelt und mit der Wiederfindungsrate im Medium korrigiert. Die Konzentration wird als „mean of the mean“ mit Standardfehler dargestellt. Die Überstände der Kulturen ohne und mit Zusatz der Fettsäuren Arachidonsäure (AA), Docosahexaensäure (DHA) und Eicosapentaensäure (EPA) wurden getrennt voneinander, statistisch ausgewertet. Die Anzahl der Proben steht in Tabelle 71.

2 Charakterisierung der Freisetzung der ω-6- und ω-3-Fettsäuren Arachidonsäure, Docosahexaensäure und Eicosapentaensäure aus Zellen von Primärkulturen der AP

Sowohl die ω-6-FS AA als auch die ω-3-FS DHA und EPA konnten mit und ohne ihren Zusatz in den Überständen der Primärkulturen nachgewiesen werden (Abbildung 38).

In den Überständen der Primärkulturen, die keinen Zusatz von AA, DHA und EPA erhielten, lagen signifikant höhere Konzentrationen vor als in den „Blank“ Proben ohne Zellen. In allen „Blank“ Proben ergab sich laut Berechnung eine negative Konzentration der FS in den Zellkulturüberständen. Die negativen Werte wurden mit „0“ gleichgesetzt. Zusätzlich war ein signifikanter behandlungsabhängiger Effekt für die Konzentration der Docosahexaensäure nachweisbar. So führte die Inkubation der Primärkulturen mit HMGB1 zu einem signifikanten Anstieg der DHA-Konzentration im Vergleich zu PBS-inkubierten Kontrollen ($p < 0,01$) und im Vergleich zu LPS-stimulierten Primärkulturen ($p < 0,05$).

In Überständen der Primärkulturen, denen nach 46 Stunden 5 µg/ml von AA, DHA und EPA hinzugefügt wurden, konnten diese ω-3- und ω-6-FS mit hoher Quantität nachgewiesen werden. Allerdings lagen große Standardfehler vor, weshalb sich keine statistische Signifikanz ergab. In den Kulturen ohne Zellen („Blank“) konnte hingegen trotz Zusatz von AA, DHA und EPA lediglich AA in allen Überständen nachgewiesen werden. DHA und EPA wiesen nur in den HMGB1-inkubierten „Blank“ Proben eine positive errechnete Konzentration auf. In den anderen „Blank“ Proben ergaben sich negativ berechnete Konzentrationen von EPA und DHA.

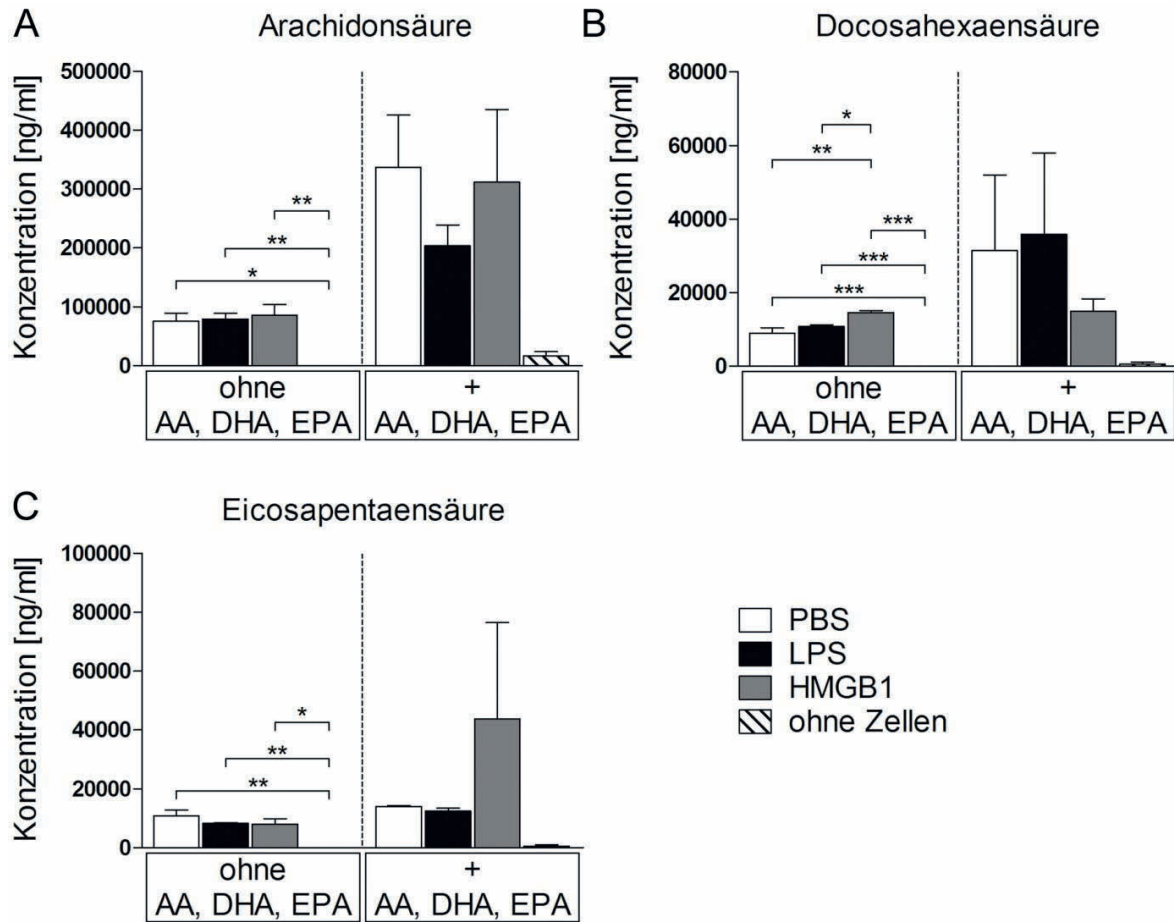


Abbildung 38: Darstellung der Konzentrationen von ω -6- und ω -3-Fettsäuren in Überständen von Primärkulturen der AP in Abhängigkeit ihrer Behandlung

Die Konzentrationen der Fettsäuren in den Überständen werden als „mean of the mean“ mit Standardfehlern dargestellt. Die statistische Auswertung der Konzentrationen in Überständen von Kulturen ohne und mit Zusatz von Arachidonsäure (AA), Docosahexaensäure (DHA) und Eicosapentaensäure (EPA) wurde getrennt voneinander durchgeführt. In den Proben, die keinen Zusatz der Fettsäuren erhielten, waren AA, DHA und EPA in signifikant höheren Konzentrationen nachweisbar als in den „Blank“ Proben ohne Zellen. Die Inkubation mit HMGB1 führte zu einem signifikanten Anstieg der DHA-Konzentration in Überständen der Kulturen ohne Zusatz von Fettsäuren (B). Die Anzahl der Proben ist der Tabelle 71 zu entnehmen. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

3 Zusammenfassung der für die Fragestellung nach einer induzierten Synthese von Lipidmediatoren wichtigsten Ergebnisse

- Durch die LC-MS/MS konnten die Lipidmediatoren LTB_4 , Maresin 1, Neuroprotektin D_1 , PGD_2 , PGE_2 , PGJ_2 , RvD_1 und RvD_2 sowie die FS AA, DHA und EPA grundsätzlich aus Überständen von Primärkulturen der AP nachgewiesen werden.
- Eine zuverlässige Ermittlung der Konzentration von Lipidmediatoren konnte nur in Überständen von Primärkulturen erfolgen, denen die FS AA; DHA und EPA nach 46 Stunden zugesetzt wurden.

- Die Inkubation mit HMGB1 führte zu einem signifikanten Anstieg der DHA-Konzentration in Überständen von Kulturen, die keinen Zusatz von AA, DHA und EPA erhielten im Vergleich zu PBS- und LPS-inkubierten Primärkulturen.

IVC Charakterisierung der Sekretion durch das Fettgewebe während Steriler und bakterieller Inflammation

Heute geht man davon aus, dass die mit der Adipositas einhergehenden Krankheitsbilder unter anderem auf eine durch das Fettgewebe induzierte chronische Entzündung zurückzuführen sind [285, 434]. Aber auch der Verlauf bakterieller Entzündungen wird durch Adipositas negativ beeinflusst. So konnten Pohl *et al.* (2009) bereits nachweisen, dass LPS-induzierte Entzündungen bei adipösen Ratten im Vergleich zu normalgewichtigen Ratten mit stärkerem und verlängertem Fieber sowie einer höheren Plasmakonzentration von IL-6 und TNF α einhergehen [287]. In Vorarbeiten aus der eigenen Arbeitsgruppe konnte außerdem bereits gezeigt werden, dass eine Inkubation der „Fat Explants“ mit LPS zu einem signifikanten Anstieg der Zytokin-Konzentration in den Fettgewebsüberständen führt [289]. Im Rahmen der vorliegenden Doktorarbeit wurde darauf aufbauend untersucht, ob Fettgewebe durch eine induzierte Zytokin- bzw. Adipokin-Synthese ebenfalls an sterilen Entzündungsreaktionen beteiligt sein kann. Außerdem wurden neue Erkenntnisse über die Bedeutung von LPS im Hinblick auf die Modulation der Adipokin-Synthese im Fettgewebe sowie über die durch LPS induzierte Zytokin- und Adipokin-Synthese im braunen Fettgewebe gewonnen.

Auch bei älteren Individuen wird eine chronische subklinische Inflammation, die mit einer höheren IL-6- und TNF α -Plasmakonzentration einhergeht, als Ursache für komplexe Krankheitsgeschehen diskutiert [268]. Eine Assoziation mit einem höheren Fettgewebsanteil im Körper älterer Individuen scheint hierbei auch eine Rolle zu spielen [268, 269]. Solche Hinweise auf altersabhängige Effekte wurden im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit ebenfalls berücksichtigt.

Dafür wurden Fettgewebe unterschiedlicher Lokalisationen (*epididymal*, *retroperitoneal*, *subcutan*, braun) von jungen und alten Ratten entnommen und für 24 Stunden mit LPS, HMGB1, Biglykan oder PBS inkubiert. Aus den Fettgewebsüberständen wurden die Adipokine Apiponektin, Leptin und Visfatin mit Hilfe von „enzyme-linked immunosorbent assays“ (ELISAs) gemessen. Die Bestimmungen der Zytokin-Konzentrationen in den Zellüberständen erfolgten durch Zytokin-Bioassays. Außerdem wurden die relativen Expressionen von HMGB1 sowie der für die verwendeten TLR-Agonisten relevanten Rezeptoren (TLR2, TLR4 und RAGE) mittels RT-PCR ermittelt. Die Ergebnisse wurden mit GraphPad Prism als Mittelwerte mit Standardfehler dargestellt und statistisch ausgewertet

(zwei-faktorielle ANOVA). Beim Vorliegen einer signifikanten Interaktion wurde der Bonferroni *post hoc* Test durchgeführt. Bei den behandlungsabhängigen und altersabhängigen Haupteffekten handelt es sich um den statistischen Vergleich der Gesamtheit des einen Faktors (z. B. junge Ratten) mit der Gesamtheit des anderen Faktors (z. B. alte Ratten). Der altersabhängige Haupteffekt vergleicht demnach beispielsweise die Konzentrationen in den Überständen der mit PBS und einem TLR-Agonisten behandelten „Fat Explants“ junger Ratten mit den derart stimulierten Fettgewebekulturen alter Ratten.

In Tabelle 73 ist die Anzahl der Proben angegeben, aus denen die Adipokine und Zytokine gemessen wurden sowie die Anzahl der Präparationen, aus denen die Proben stammten. Die Anzahl der Proben, in denen die mRNA-Expression analysiert wurde sowie die Anzahl der Präparationen, aus denen diese Proben stammen, kann der Tabelle 74 entnommen werden.

Tabelle 73: Anzahl der Proben, die den Adipokin- und Zytokinmessungen dienten sowie die Anzahl der Präparationen, aus denen diese gewonnen wurden

Stimulation	Proben	Präparationen	Stimulation	Proben	Präparationen
<i>epididymales</i> Fettgewebe junger Ratten			<i>epididymales</i> Fettgewebe alter Ratten		
PBS	9	3	PBS	9	3
LPS	9	3	LPS	6	3
HMGB1	9	3	HMGB1	9	3
Biglykan	9	3	Biglykan	9	3
<i>retroperitoneales</i> Fettgewebe junger Ratten			<i>retroperitoneales</i> Fettgewebe alter Ratten		
PBS	9	3	PBS	9	3
LPS	9	3	LPS	6	3
HMGB1	9	3	HMGB1	9	3
Biglykan	9	3	Biglykan	9	3
<i>subcutanes</i> Fettgewebe junger Ratten			<i>subcutanes</i> Fettgewebe alter Ratten		
PBS	9	3	PBS	12	4
LPS	6	3	LPS	8	4
HMGB1	9	3	HMGB1	12	4
Biglykan	9	3	Biglykan	12	4
braunes Fettgewebe junger Ratten			braunes Fettgewebe alter Ratten		
PBS	5	4	PBS	11	3
LPS	14	4	LPS	12	3

Tabelle 74: Anzahl der für die quantitative „real-time“ PCR verwendeten Proben sowie die Anzahl der Präparationen, aus denen diese Proben gewonnen wurden

Stimulation	Proben	Präparationen	Stimulation	Proben	Präparationen
<i>subcutanes</i> Fettgewebe junger Ratten			<i>subcutanes</i> Fettgewebe alter Ratten		
PBS	3	3	PBS	4	4
LPS	3	3	LPS	4	4
HMGB1	3	3	HMGB1	4	4
Biglykan	3	3	Biglykan	4	4

1 Modulation der Adipokin-Synthese

Die in den Überständen der LPS-stimulierten „Fat Explants“ gemessenen Adipokine wiesen insbesondere einen altersabhängigen Effekt auf, weniger einen behandlungsabhängigen Effekt.

In Überständen des *subcutanen* Fettgewebes alter Ratten lag eine signifikant höhere Adiponektin-Konzentration vor (Haupteffekt Alter: $p < 0,0001$) als in Überständen des *subcutanen* Fettgewebes junger Ratten (Abbildung 39). Leptin konnte in den Überständen aller Fettgewebslokalisationen der alten Ratten in signifikant höheren Konzentrationen nachgewiesen werden als in Überständen von „Fat Explants“ der jungen Ratten. Dies stellte sich statistisch durch einen signifikanten altersabhängigen Haupteffekt dar. Visfatin wurde hingegen in Überständen des Fettgewebes alter Ratten mit einer signifikant geringeren Konzentration nachgewiesen als in Überständen des Fettgewebes junger Ratten. Dieser altersabhängige Haupteffekt der Visfatin-Konzentration war im *subcutanen* Fettgewebe allerdings nicht signifikant.

Bedingt durch die Stimulation mit LPS kam es im *epididymalen* Fettgewebe zu einem signifikanten behandlungsabhängigen Haupteffekt mit einer Reduktion der Visfatin-Konzentration in Überständen der mit LPS inkubierten „Fat Explants“ ($p = 0,0265$).

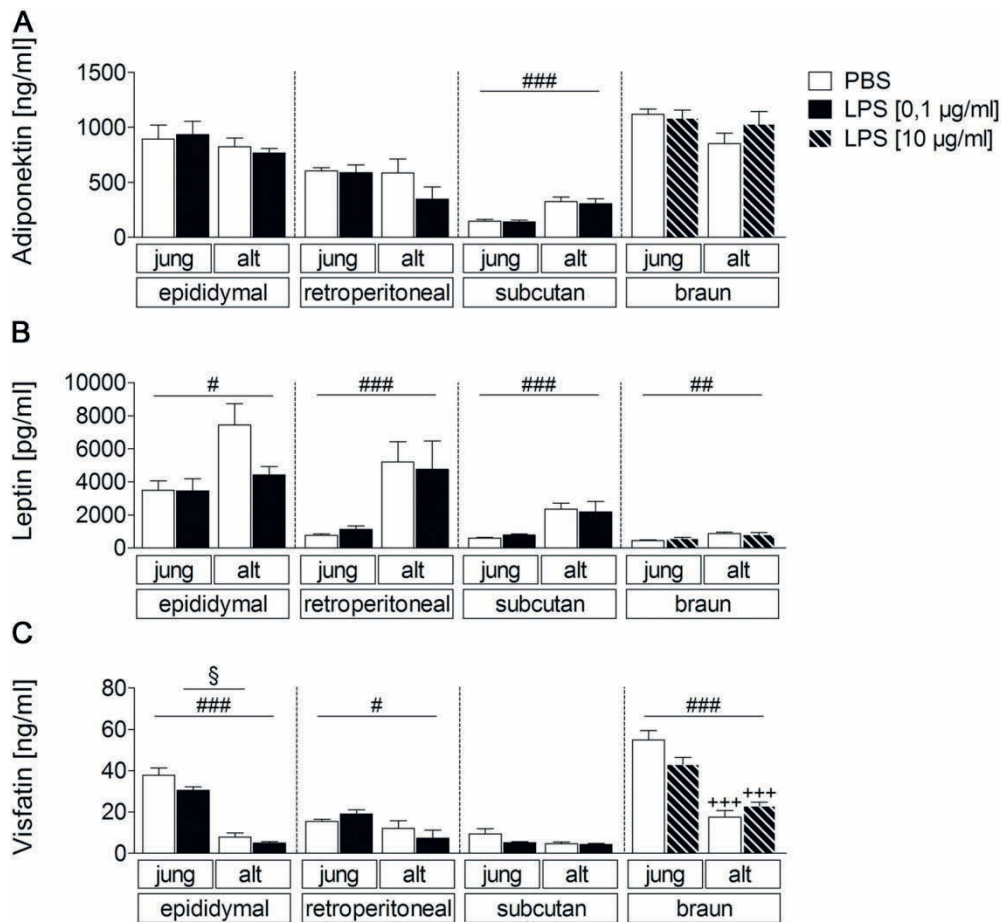


Abbildung 39: Darstellung der LPS-induzierten Adipokin-Synthese durch weißes und braunes Fettgewebe in Abhängigkeit des Alters

Die Konzentrationen der Adipokine Adiponektin (A), Leptin (B) und Visfatin (C) in Überständen der Fettgewebekulturen junger und alter Ratten werden als Mittelwert mit Standardfehler dargestellt. Es wurde eine Inkubation mit PBS (weiß) oder LPS durchgeführt. Weißes Fettgewebe wurde mit LPS einer Konzentration von 0,1 µg/ml (schwarz) inkubiert und braunes Fettgewebe wurde mit LPS einer Konzentration von 10 µg/ml (gestreift) stimuliert. Die statistische Auswertung der unterschiedlichen Fettgewebslokalisationen wurde getrennt voneinander durchgeführt. Ein altersabhängiger Effekt ist bei allen untersuchten Adipokinen statistisch signifikant. Leptin und Adiponektin (*subcutan*) wurden vom Fettgewebe alter Ratten in signifikant höheren Konzentrationen freigesetzt als vom Fettgewebe junger Ratten. Die Visfatin-Konzentration war hingegen in Fettgewebsüberständen der alten Ratten signifikant geringer als in Überständen des Fettgewebes junger Ratten. In Überständen des *epididymalen* Fettgewebes lag ein signifikanter behandlungsabhängiger Haupteffekt mit reduzierten Visfatin-Konzentrationen in Überständen von LPS-inkubierten Kulturen vor. Die Anzahl der analysierten Proben ist der Tabelle 73 zu entnehmen. § Haupteffekt Behandlung; # Haupteffekt Alter; + jung vs. alt; (A) ### p < 0,0001; (B) # p = 0,0112; ## p = 0,0047; *retroperitoneal*: ### p = 0,0002; *subcutan*: ### p < 0,0001; (C) § p = 0,0265; # p = 0,0119; ### < 0,0001; +++ p < 0,001.

Bei der Ermittlung der Adipokin-Konzentrationen in Abhängigkeit der Inkubation mit dem „danger / damage-associated molecular pattern“ (DAMP) HMGB1 zeichneten sich statistisch signifikante altersabhängige Haupteffekte ab, wie sie bei der Inkubation mit LPS bereits beschrieben wurden. Bezüglich der Visfatin-Konzentrationen in den Überständen der „Fat Explants“ waren zusätzlich behandlungsabhängige Interaktionseffekte nachweisbar (Abbildung 40).

Die Konzentrationen von Adiponektin und Leptin waren in Überständen der Fettgewebe alter Ratten signifikant höher als in Überständen der „Fat Explants“ junger Ratten. Allerdings beschränkte sich dieser altersabhängige Haupteffekt mit erhöhten Adiponektin-Konzentrationen in Überständen der „Fat Explants“ alter Ratten, wie schon bei der Inkubation mit LPS, auf das *subcutane* Fettgewebe. Visfatin wurde vom *epididymalen* (Haupteffekt Alter: $p < 0,0001$) und *retroperitonealen* (Haupteffekt Alter: $p = 0,0014$) Fettgewebe alter Ratten in signifikant geringeren Konzentrationen freigesetzt als vom Fettgewebe junger Ratten.

Die Inkubation mit HMGB1 führte im *epididymalen* Fettgewebe junger Ratten ($p < 0,01$) und im *retroperitonealen* Fettgewebe alter Ratten ($p < 0,05$) zu einer signifikanten Reduktion der Visfatin-Sekretion im Vergleich zu PBS-inkubierten Kontrollkulturen.

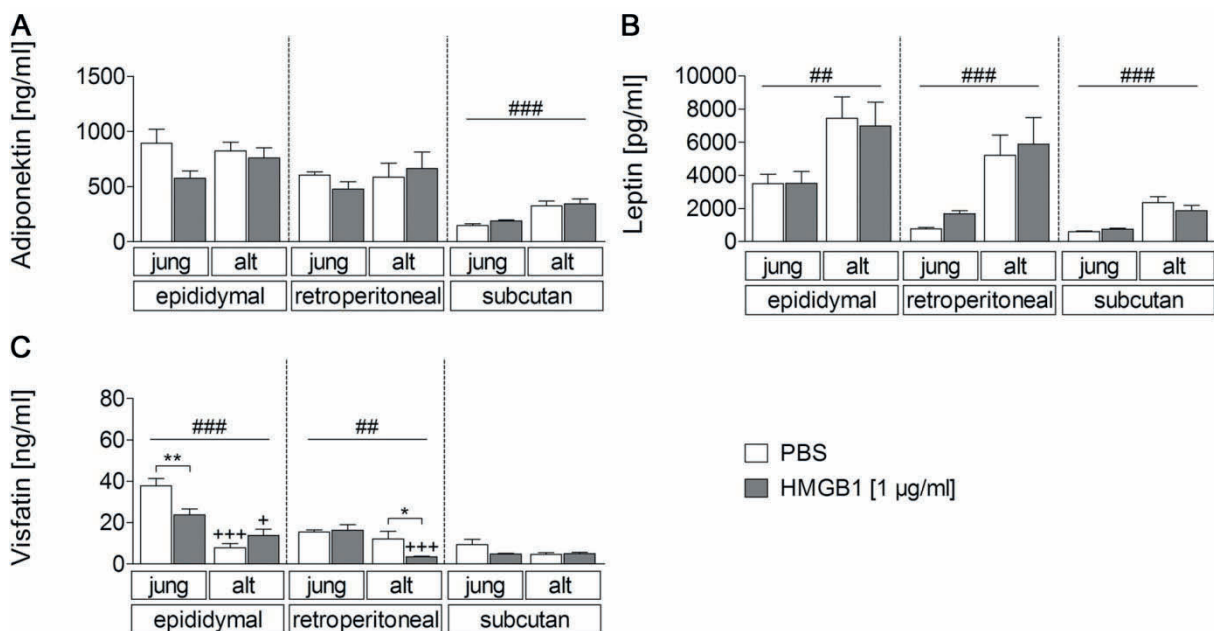


Abbildung 40: Darstellung der Adipokin-Konzentrationen in Überständen der „Fat Explants“ in Abhängigkeit der Behandlung mit HMGB1 und des Alters

Die Konzentrationen von Adiponektin (A), Visfatin (B) und Leptin (C) werden als Mittelwert mit Standardfehler dargestellt. Die Ergebnisse der unterschiedlichen Fettgewebslokalisationen wurden einzeln statistisch ausgewertet. Adiponektin (*subcutan*) und Leptin wurden vom Fettgewebe alter Ratten in signifikant höheren Konzentrationen freigesetzt als vom Fettgewebe junger Ratten. In Überständen des *epididymalen* und *retroperitonealen* Fettgewebes alter Ratten lag eine signifikant geringere Visfatin-Konzentration vor als in Überständen der Fettgewebe junger Ratten. Die Inkubation mit HMGB1 führte im *epididymalen* Fettgewebe der jungen und im *retroperitonealen* Fettgewebe der alten Ratten im Vergleich zu PBS-inkubierten Kontrollkulturen zu einer signifikanten Reduktion der Visfatin-Sekretion. Die Anzahl der verwendeten Proben ist in Tabelle 73 ersichtlich. # Haupteffekt Alter; * PBS vs. HMGB1; + jung vs. alt; (A) ### $p < 0,0001$; (B) ## $p = 0,0015$; *retroperitoneal*: ### $p = 0,0002$; *subcutan*: ### $p < 0,0001$; (C) ## $p = 0,0014$; ### $p < 0,0001$; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; + $p < 0,05$; +++ $p < 0,001$.

Auch bei der Inkubation mit Biglykan konnte der bereits beschriebene altersabhängige Haupteffekt bestätigt werden (Abbildung 41). Lediglich in den Überständen des

retroperitonealen Fettgewebes lag, anders als bei den zuvor beschriebenen altersabhängigen Haupteffekten, kein statistisch signifikanter altersabhängiger Haupteffekt mit reduzierter Visfatin-Konzentration in Überständen von „Fat Explants“ alter Ratten vor.

Die Inkubation mit Biglykan bewirkte eine signifikante Reduktion der Adiponektin- ($p < 0,01$) und Visfatin-Konzentration ($p < 0,05$) in Überständen des *epididymalen* Fettgewebes junger Ratten.

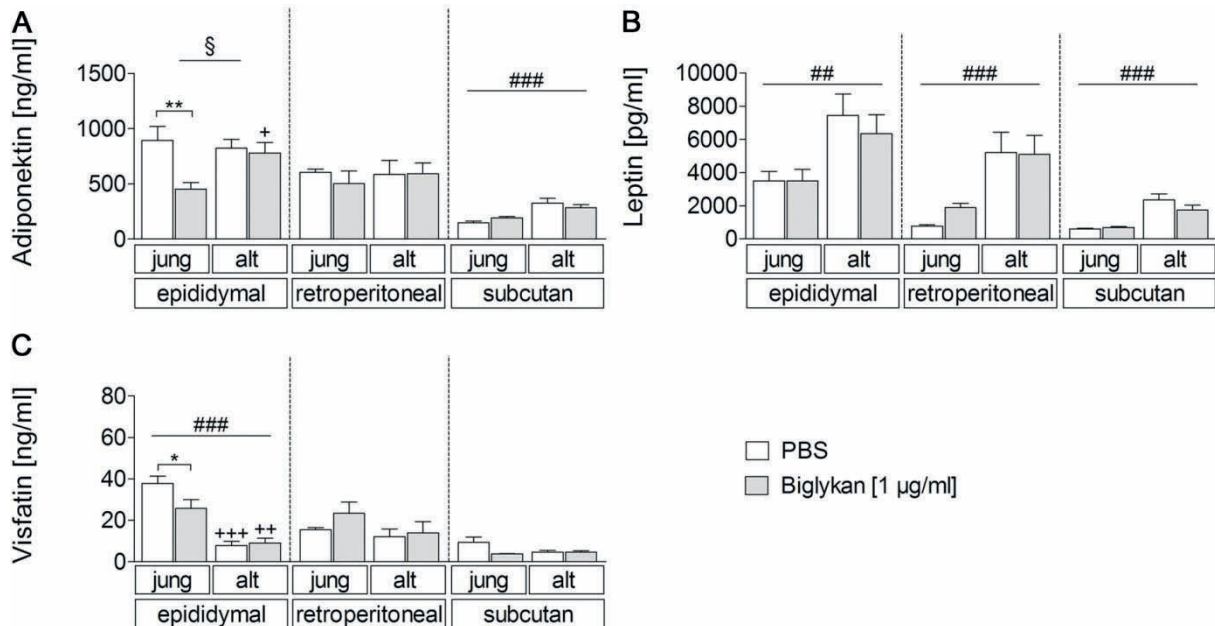


Abbildung 41: Darstellung der Adipokin-Konzentrationen in Überständen der mit Biglykan oder PBS inkubierten „Fat Explants“ in Abhängigkeit des Alters

Die Adiponektin- (A), Leptin- (B) und Visfatin-Konzentrationen (C) wurden mit Hilfe von ELISAs ermittelt und werden als Mittelwert und Standardfehler dargestellt. Die statistische Auswertung erfolgte für die einzelnen Fettgewebslokalisationen getrennt voneinander. Die Konzentrationen von Adiponektin (*subcutan*) und Leptin weisen einen signifikanten altersabhängigen Haupteffekt mit höheren Konzentrationen in Überständen des Fettgewebes alter Ratten auf. Visfatin lag in Überständen des *epididymalen* Fettgewebes alter Ratten mit signifikant geringeren Konzentrationen vor als in Überständen des *epididymalen* Fettgewebes junger Ratten. Die Inkubation mit Biglykan führte im *epididymalen* Fettgewebe junger Ratten zu einer signifikant reduzierten Freisetzung von Adiponektin und Visfatin im Vergleich zu PBS-inkubierten Kulturen. Die Anzahl der analysierten Proben ist in Tabelle 73 aufgelistet. § Haupteffekt Behandlung; # Haupteffekt Alter; * PBS vs. Biglykan; + jung vs. alt; (A) § $p = 0,0142$; ### $p < 0,0001$; ** $p < 0,01$; + $p < 0,05$; (B) ## $p = 0,0014$; ### $p < 0,0001$; (C) ### $p < 0,0001$; * $p < 0,05$; ++ $p < 0,01$; +++ $p < 0,001$.

2 Modulation der Zytokin-Synthese

Die Inkubation mit LPS führte in allen Fettgewebsüberständen zu einem sehr starken signifikanten Anstieg der Konzentrationen von IL-6 und TNF α (Abbildung 42).

Der LPS-induzierte Konzentrationsanstieg von IL-6 war in Überständen des *subcutanen* Fettgewebes alter Ratten signifikant höher als in Überständen des Fettgewebes junger Ratten ($p < 0,01$). In Überständen des braunen Fettgewebes alter Ratten war hingegen eine

signifikant geringere LPS-induzierte IL-6-Konzentration nachweisbar als in Überständen des braunen Fettgewebes junger Ratten ($p = 0,01$).

Ein signifikanter altersabhängiger Haupteffekt zeigte sich auch bezüglich der TNF α -Konzentrationen. Die Überstände der mit LPS inkubierten „Fat Explants“ des *epididymalen* und *retroperitonealen* Fettgewebes alter Ratten wiesen signifikant geringere TNF α -Konzentration auf als die Überstände der gleichermaßen behandelten Fettgewebe junger Ratten.

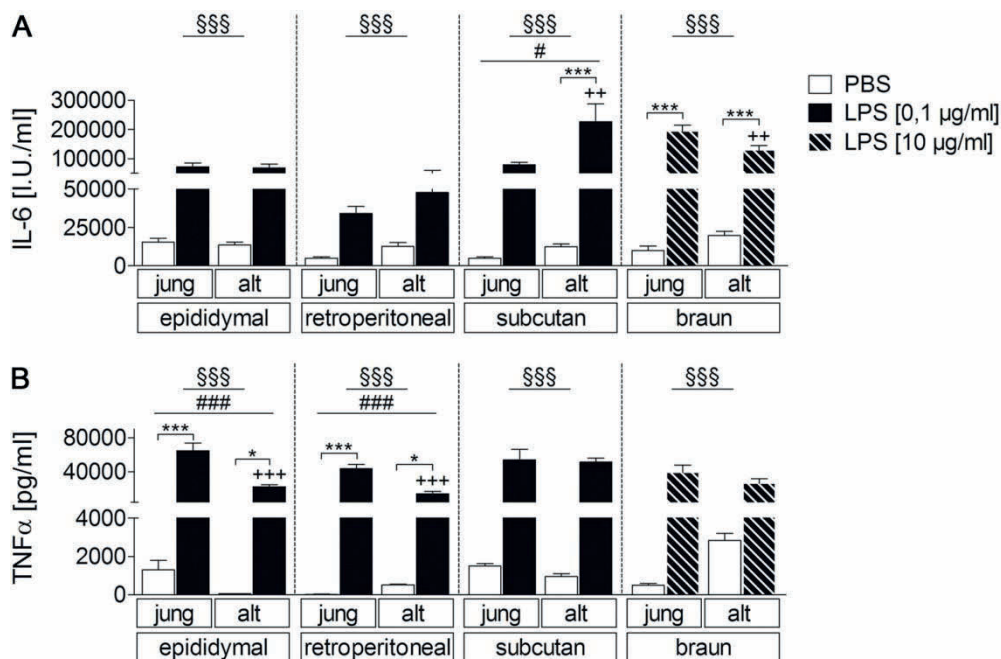


Abbildung 42: Darstellung der durch die Inkubation mit LPS veränderten Zytokin-Konzentrationen in Überständen der „Fat Explants“

Die Zytokin-Konzentrationen von IL-6 (**A**) und TNF α (**B**) werden als Mittelwert mit Standardfehler dargestellt. Die statistische Auswertung erfolgte einzeln für jede Fettgewebslokalisation. Eine Inkubation mit LPS führte in den Überständen aller Fettgewebe zu einem signifikanten Anstieg der IL-6- (**A**) und TNF α - (**B**) Konzentrationen. Aus dem *subcutanen* Fettgewebe alter Ratten wurde durch die Inkubation mit LPS signifikant mehr IL-6 freigesetzt als aus dem *subcutanen* LPS-behandelten Fettgewebe junger Ratten. Im braunen Fettgewebe alter Ratten fand hingegen eine geringere induzierte IL-6-Sekretion statt als im braunen Fettgewebe junger Ratten. Die LPS-induzierte TNF α -Konzentration war in Überständen des *epididymalen* und *retroperitonealen* Fettgewebes alter Ratten ebenfalls signifikant gegenüber der Konzentration in Überständen des LPS-inkubierten Fettgewebes junger Ratten reduziert. Die Tabelle 73 enthält die Anzahl der ausgewerteten Proben. § Haupteffekt Behandlung; # Haupteffekt Alter; * PBS vs. LPS; + jung vs. alt; (**A**) §§§ $p < 0,0001$; # $p = 0,0115$; *** $p < 0,001$; ++ $p < 0,01$; (**B**) *epididymal* / *retroperitoneal* / *subcutan*: §§§ $p < 0,0001$; braun: §§§ $p = 0,0002$; *epididymal*: ### $p = 0,0002$; *retroperitoneal*: ### $p = 0,0001$; * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$; +++ $p < 0,001$.

Die 24-stündige Inkubation mit HMGB1 bewirkte eine weniger deutliche Modulation der Zytokin-Freisetzung aus dem weißen Fettgewebe (Abbildung 43) als die Inkubation mit LPS.

Die Stimulation des *retroperitonealen* Fettgewebes mit HMGB1 führte zu einem signifikanten Anstieg der IL-6- und TNF α -Konzentration in den Fettgewebsüberständen im Vergleich zu den Überständen PBS-inkubierter „Fat Explants“. Statistisch stellte sich dies in einem

signifikanten behandlungsabhängigen Haupteffekt (IL-6: $p = 0,0423$; TNF α : $p < 0,0001$) dar. Zusätzlich lag dabei ein signifikanter altersabhängiger Haupteffekt vor. Dieser war in höheren basalen und induzierten IL-6- sowie TNF α -Konzentrationen in Überständen des *retroperitonealen* Fettgewebes alter Ratten im Vergleich zu den Konzentrationen in Überständen des *retroperitonealen* Fettgewebes junger Ratten begründet.

Neben den signifikanten Haupteffekten lag eine signifikante Interaktion für die IL-6-Konzentration in Überständen des *subcutanen* Fettgewebes vor ($p = 0,0207$). In dem angeschlossenen Bonferroni *post hoc* Test ergab sich ein signifikanter Anstieg der IL-6-Konzentration in Überständen der mit HMGB1 inkubierten „Fat Explants“ junger und alter Ratten im Vergleich zu PBS-inkubierten Kontrollen. Dabei war die Konzentration von IL-6 in den Überständen der mit HMGB1 stimulierten „Fat Explants“ alter Ratten signifikant höher als in den Überständen der mit HMGB1 stimulierten „Fat Explants“ junger Ratten.

In Überständen des *epididymalen* Fettgewebes alter Ratten war eine signifikant geringere TNF α -Konzentration nachweisbar als in den Überständen des *epididymalen* Fettgewebes junger Ratten (Haupteffekt Alter: $p = 0,0223$).

Die Modulation der Konzentration von TNF α in Überständen der „Fat Explants“ des *subcutanen* Fettgewebes erbrachte keine signifikanten Haupteffekte. Allerdings lag eine signifikante Interaktion ($p = 0,0458$) vor. Der angeschlossene *post hoc* Test ergab einen signifikanten Anstieg der induzierten TNF α -Konzentration in Überständen des *subcutanen* Fettgewebes alter Ratten ($p < 0,05$).

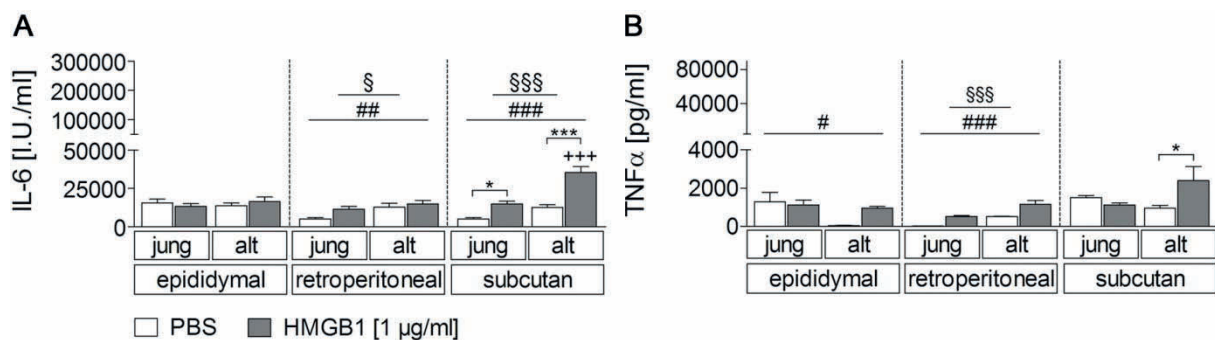


Abbildung 43: Darstellung der Zytokin-Konzentrationen in Überständen der Fettgewebe unterschiedlicher Lokalisationen in Abhängigkeit des Alters und der Stimulation mit HMGB1

Die durch die Anwendung der Bioassays ermittelten Konzentrationen von IL-6 (A) und TNF α (B) werden als Mittelwert mit Standardfehler dargestellt. Die Fettgewebslokalisationen wurden getrennt voneinander statistisch ausgewertet. Die Inkubation des *retroperitonealen* und *subcutanen* Fettgewebes mit HMGB1 führte zu einem signifikanten Anstieg der IL-6- und TNF α -Konzentrationen in den Überständen. Im *subcutanen* Fettgewebe alter Ratten war dieser behandlungsabhängige Effekt am deutlichsten ausgeprägt. Die Anzahl der analysierten Proben kann der Tabelle 73 entnommen werden. § Haupteffekt Behandlung; # Haupteffekt Alter; * PBS vs. HMGB1; + jung vs. alt; (A) § $p = 0,0423$; §§§ $p < 0,0001$; ## $p = 0,0087$; ### $p < 0,0001$; * $p < 0,05$; *** / +++ $p < 0,001$; (B) §§§ $p < 0,0001$; # $p = 0,0223$; ### $p < 0,0001$; * $p < 0,05$.

Die Biglykan-induzierte Modulation der IL-6- und TNF α -Freisetzung war im Vergleich zur LPS-induzierten Sekretion moderat (Abbildung 44).

Die Stimulation des *retroperitonealen* Fettgewebes mit Biglykan führte zu einer signifikanten Modulation der IL-6-Konzentration in den Überständen. Es lag sowohl ein statistisch signifikanter behandlungsabhängiger Haupteffekt ($p = 0,0482$) vor als auch eine statistisch signifikante Interaktion ($p = 0,0022$). Im Bonferroni *post hoc* Test zeigte sich ein signifikanter Anstieg der IL-6-Konzentrationen in Überständen der mit Biglykan stimulierten *retroperitonealen* „Fat Explants“ junger Ratten verglichen mit den PBS-stimulierten Kontrollkulturen. Im *retroperitonealen* Fettgewebe alter Ratten konnte diese Biglykan-abhängige Steigerung der IL-6-Freisetzung nicht nachgewiesen werden.

Ein statistisch signifikanter behandlungsabhängiger Haupteffekt mit einem durch Biglykan induzierten Anstieg der IL-6-Konzentrationen in den Überständen war ebenfalls in „Fat Explants“ des *subcutanen* Fettgewebes nachweisbar ($p = 0,0053$). Die Konzentration von IL-6 war in den Überständen des *subcutanen* Fettgewebes alter Ratten dabei geringgradig höher als in den Überständen des Fettgewebes junger Ratten. Der statistisch signifikante altersabhängige Haupteffekt ($p = 0,0418$) beruhte aber vor allem auf einer stärkeren Freisetzung von IL-6 aus dem PBS-inkubierten Fettgewebe alter Ratten als aus dem PBS-inkubierten Fettgewebe junger Ratten. Dieses Verhältnis einer stärkeren Freisetzung von IL-6 aus dem PBS-inkubierten Fettgewebe alter Ratten als aus dem PBS-inkubierten Fettgewebe junger Ratten zeigte sich im *retroperitonealen* Fettgewebe durch einen signifikanten Interaktionseffekt ($p < 0,05$).

Die Freisetzung von TNF α aus dem *retroperitonealen* Fettgewebe wurde durch Inkubation mit Biglykan signifikant gesteigert (Haupteffekt Behandlung: $p < 0,0001$). Zusätzlich lag in den Überständen des *retroperitonealen* Fettgewebes ein signifikanter altersabhängiger Haupteffekt ($p < 0,0001$) mit höheren basalen und induzierten TNF α -Konzentrationen in Überständen der „Fat Explants“ alter Ratten im Vergleich zu Überständen des *retroperitonealen* Fettgewebes junger Ratten vor.

Im *epididymalen* Fettgewebe war kein signifikanter behandlungsabhängiger Haupteffekt der TNF α -Konzentration in den Überständen nachweisbar. Es bestand jedoch ein signifikanter altersabhängiger Haupteffekt, der sich anders als im *retroperitonealen* Fettgewebe aus geringeren TNF α -Konzentrationen in den Überständen des *epididymalen* Fettgewebes alter Ratten ergab.

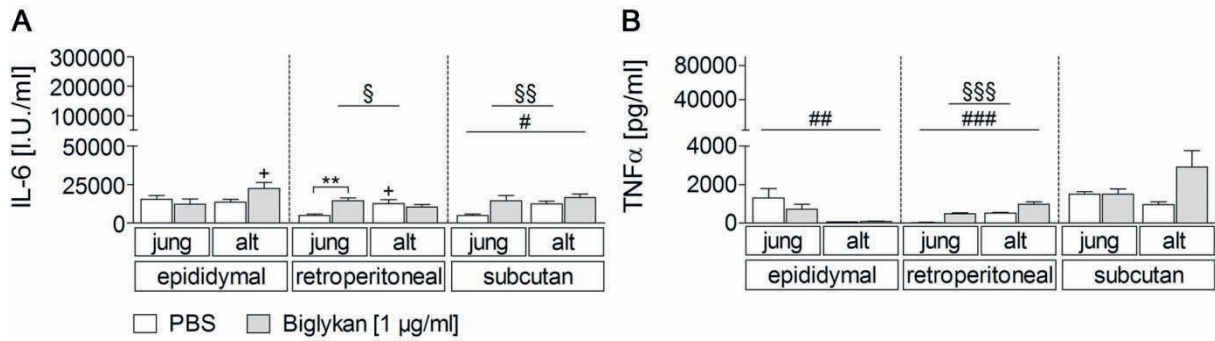


Abbildung 44: Darstellung der durch Inkubation mit Biglykan modulierten Freisetzung von IL-6 und TNFα aus dem Fettgewebe junger und alter Ratten

Die Konzentrationen von IL-6 (**A**) und TNFα (**B**) in Überständen der „Fat Explants“ werden als Mittelwert mit Standardfehler dargestellt und wurden für jede Fettgewebslokalisation getrennt voneinander statistisch ausgewertet. Die Inkubation mit Biglykan führte zu einem signifikanten behandlungsabhängigen Haupteffekt in Überständen des *retroperitonealen* und *subcutanen* Fettgewebes. Im *retroperitonealen* Fettgewebe junger Ratten bewirkte die Stimulation mit Biglykan einen signifikanten Anstieg der IL-6-Freisetzung im Vergleich zu PBS-inkubierten Kulturen. Für die TNFα-Konzentration lag in Überständen des *retroperitonealen* Fettgewebes ein signifikanter behandlungsabhängiger Haupteffekt vor. Die Tabelle 73 gibt die Anzahl der verwendeten Proben an. § Haupteffekt Behandlung; # Haupteffekt Alter; * PBS vs. Biglykan; + jung vs. alt; (**A**) § p = 0,0482; §§ p = 0,0053; # p = 0,0418; ** p < 0,01; + p < 0,05; (**B**) §§§ p < 0,0001; ## p = 0,0031; ### p < 0,0001.

3 Modulation auf Ebene der mRNA

Die Ergebnisse zur induzierten sowie altersabhängigen Freisetzung der untersuchten Adipokine / Zytokine aus dem Fettgewebe von jungen und alten Ratten führten zu einer erweiterten Fragestellung nach einem induzierten oder altersabhängigen Unterschied in der Rezeptorausstattung des Fettgewebes. Die Beantwortung erfolgte mit Hilfe der quantitativen „real-time“ RT-PCR auf Ebene der mRNA. Anhand der interessanten erbrachten Ergebnisse zur Freisetzung von Zytokinen wurde *subcutanes* Fettgewebe junger und alter Ratten für die Quantifizierung der relativen Expression ausgewählt. Die Stimulation mit den DAMPs HMGB1 und Biglykan führte insbesondere im *subcutanen* Fettgewebe zu einer behandlungsbedingten Induktion der Zytokin-Synthese mit höheren Konzentrationen in den Überständen der „Fat Explants“ alter Ratten. Neben der relativen Expression der für die Detektion von LPS, HMGB1 und Biglykan relevanten Rezeptoren RAGE, TLR2 und TLR4, wurde ebenfalls die relative Expression des DAMPs HMGB1 analysiert (Abbildung 45). Der Grund für die zusätzliche Analyse der HMGB1-Expression lag in Ergebnissen anderer Studien. Es konnte bereits nachgewiesen werden, dass adipöse Kinder höhere HMGB1-Konzentrationen im Blut aufweisen als normalgewichtige Kinder [460] und, dass gesunde ältere Menschen geringere HMGB1-Plasmakonzentrationen aufweisen als gesunde jüngere Menschen [461]. Mit der quantitativen Bestimmung der relativen Expression von HMGB1 im *subcutanen* Fettgewebe junger und alter Ratten sollte die Bedeutung des Fettgewebes für

diese körperkonditions- und altersabhängigen Plasmakonzentrationen weiter untersucht werden.

Bei dem statistischen Vergleich der mit PBS oder HMGB1 inkubierten „Fat Explants“ junger und alter Ratten, kam es zu einem statistisch signifikanten altersabhängigen Haupteffekt ($p = 0,0329$) mit einer Reduktion der basalen und induzierten HMGB1-Expression im Fettgewebe der alten Ratten (Abbildung 45, E).

Die relative Expression von RAGE wies ebenfalls einen statistisch signifikanten altersabhängigen Haupteffekt mit geringerer Expression im Fettgewebe alter Ratten auf (Abbildung 45, B, F, J). Lediglich die Inkubation mit LPS führte auch zu einem statistisch signifikanten behandlungsabhängigen Haupteffekt ($p = 0,0013$) der relativen Expression von RAGE. So lag im *subcutanen* Fettgewebe nach 24-stündiger Inkubation mit LPS eine geringere relative RAGE-Expression vor als nach Inkubation mit PBS (Abbildung 45, B).

Auch die relative Expression von TLR2 unterlag einem signifikanten altersabhängigen Haupteffekt. Allerdings war im Fettgewebe alter Ratten eine höhere TLR2-Expression nachweisbar als im Fettgewebe junger Ratten (Haupteffekt Alter; Abbildung 45, C, G, K). Eine Inkubation des Fettgewebes mit den DAMPs HMGB1 oder Biglykan führte zu einer signifikanten behandlungsabhängigen Reduktion der TLR2-Expression im Vergleich zur Expression im PBS-inkubierten Fettgewebe (Haupteffekt Behandlung; Abbildung 45, G, K). Im Fettgewebe alter Ratten führte die Inkubation mit Biglykan zusätzlich zu einem statistisch signifikanten Interaktionseffekt mit signifikanter Reduktion der TLR2-Expression im Vergleich zu PBS-inkubierten „Fat Explants“ ($p < 0,01$). Außerdem lag im Fettgewebe alter Ratten unter Kontrollbedingungen eine signifikant höhere TLR2-Expression vor als im Fettgewebe junger Ratten ($p < 0,05$).

Die relative TLR4-Expression verhielt sich wie die Expression von RAGE. Es lag ein statistisch signifikanter altersabhängiger Haupteffekt mit geringerer TLR4-Expression im Fettgewebe alter Ratten vor (Abbildung 45, D, H, L). Lediglich die LPS-Inkubation führte zu einem statistisch signifikanten behandlungsabhängigen Haupteffekt mit einer induzierten Reduktion der relativen TLR4-Expression (Abbildung 45, C: $p = 0,0024$).

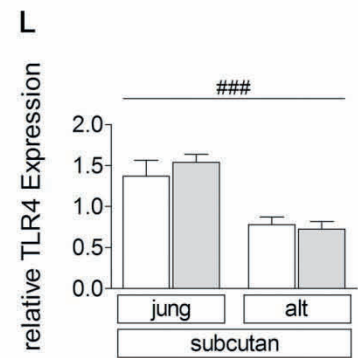
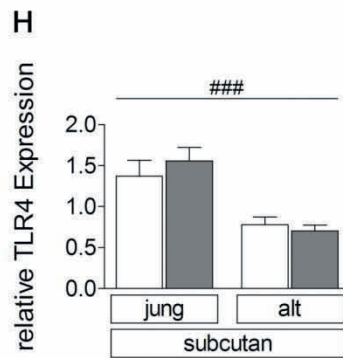
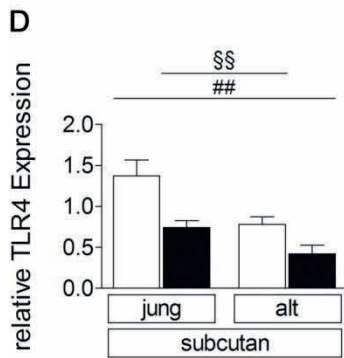
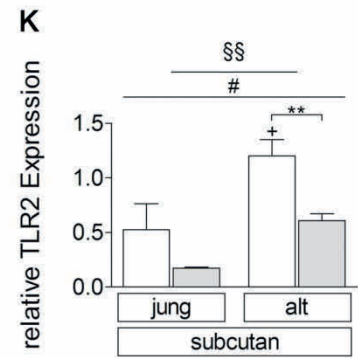
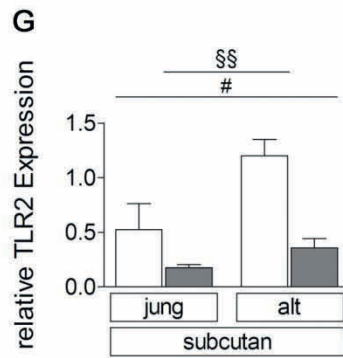
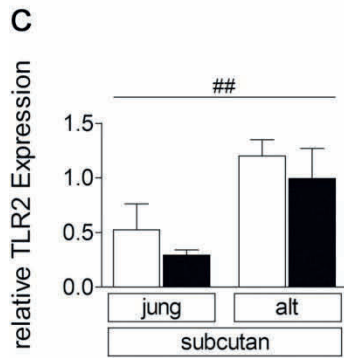
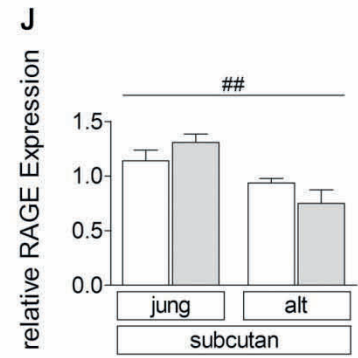
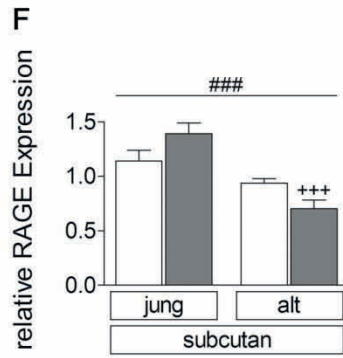
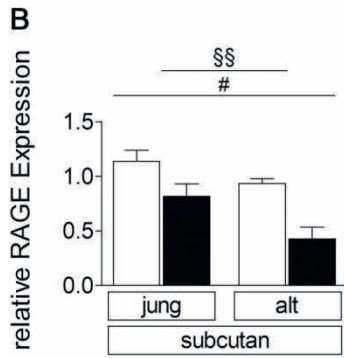
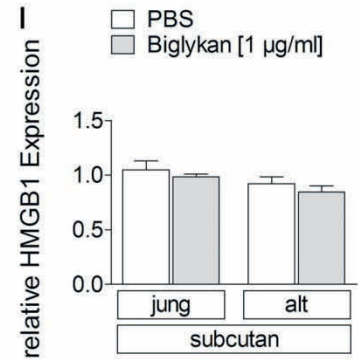
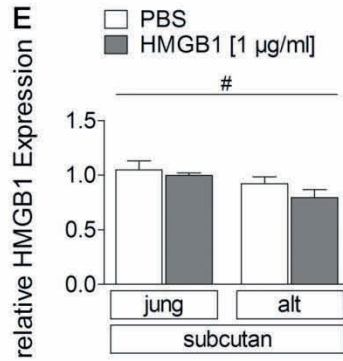
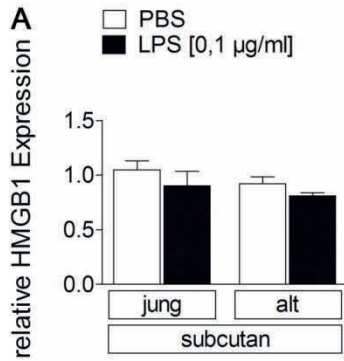


Abbildung 45: Darstellung der relativen Expression von HMGB1 (A, E, I), RAGE (B, F, J), TLR2 (C, G, K) und TLR4 (D, H, L) im *subcutanen* Fettgewebe junger und alter Ratten in Abhängigkeit der Inkubation mit LPS, HMGB1 oder Biglykan im Vergleich zu PBS-stimulierten Kontrollkulturen

Die relative Expression wird als Mittelwert mit Standardfehler dargestellt. Die weißen Balken zeigen die relative Expression nach einer 24-stündigen Inkubation mit PBS und die gefüllten Balken die relative Expression nach einer Inkubation mit LPS (schwarz), HMGB1 (dunkelgrau) oder Biglykan (hellgrau). Die relative Expression von HMGB1, RAGE und TLR4 zeigte einen statistisch signifikanten altersabhängigen Haupteffekt mit einer geringeren Expression im Fettgewebe alter Ratten im Vergleich zum Fettgewebe junger Ratten. Hingegen lag im Fettgewebe alter Ratten eine signifikant höhere Expression von TLR2 vor als im Fettgewebe junger Ratten. Die Inkubation mit LPS führte zu einer signifikanten Reduktion der Expression von RAGE und TLR4. Die Inkubation mit HMGB1 und Biglykan bewirkte eine signifikante Reduktion der Expression von TLR2. Die Anzahl der für die PCR verwendeten Proben ist in Tabelle 74 ersichtlich. § Haupteffekt Behandlung; # Haupteffekt Alter; * PBS vs. TLR-Agonist; + jung vs. alt; (B) §§ p = 0,0013; # p = 0,0102; (C) ## p = 0,0083; (D) §§ p = 0,0024; ## p = 0,0038; (E) # p = 0,0329; (F) ### p = 0,0002; +++ p < 0,001; (G) §§ p = 0,0037; # p = 0,0193; (H) ### p = 0,0002; (J) ## p = 0,0022; (K) §§ p = 0,0012; # p = 0,0426; ** p < 0,01; + p < 0,05.

4 Zusammenfassung der wichtigsten Ergebnisse zur Charakterisierung der Sekretion durch Fettgewebe während steriler und bakterieller Inflammation

- Die Inkubation mit LPS hatte nur einen sehr geringen Einfluss auf die Freisetzung von Adipokinen.
 - Nur die Visfatin-Konzentration lag in Überständen des LPS-stimulierten *epididymalen* Fettgewebes in signifikant geringeren Konzentrationen vor als in Überständen der mit PBS-inkubierten Kontrollkulturen.
- Die DAMPs HMGB1 und Biglykan führten insbesondere im *epididymalen* Fettgewebe junger Ratten zu einer Modulation der Adipokin-Sekretion.
 - Visfatin wurde durch die Inkubation mit den DAMPs in signifikant geringeren Konzentrationen aus dem *epididymalen* Fettgewebe junger Ratten freigesetzt als aus PBS-behandelten „Fat Explants“ junger Ratten.
 - Die HMGB1-Inkubation der *retroperitonealen* „Fat Explants“ alter Ratten bewirkte eine signifikante Reduktion der Visfatin-Freisetzung im Vergleich zu Kontrollkulturen.
 - Die Konzentration von Adiponektin war in Überständen der mit Biglykan stimulierten *epididymalen* „Fat Explants“ signifikant geringer als in Überständen der mit PBS inkubierten Kontrollkulturen.
- Die Adipokin-Sekretion unterlag einer deutlichen Altersabhängigkeit.
 - Adiponektin (*subcutan*) und Leptin wurden vom Fettgewebe alter Ratten in signifikant höheren Konzentrationen freigesetzt als vom Fettgewebe junger Ratten.
 - Die Visfatinkonzentration war in Überständen der „Fat Explants“ alter Ratten hingegen signifikant geringer als in Überständen der „Fat Explants“ junger Ratten.

- LPS führte zu einer sehr starken signifikant erhöhten Freisetzung der Zytokine aus allen untersuchten Fettgeweben. Zum ersten Mal konnte dies auch vergleichend für braunes Fettgewebe nachgewiesen werden.
 - Es zeigte sich eine höhere LPS-induzierte Freisetzung von IL-6 aus dem *subcutanen* Fettgewebe alter Ratten als aus dem *subcutanen* Fettgewebe junger Ratten. Hingegen bestand eine signifikante Reduktion der induzierten IL-6-Freisetzung aus dem braunen Fettgewebe alter Ratten im Vergleich zur Freisetzung aus dem braunen Fettgewebe junger Ratten.
 - Die induzierte Freisetzung von TNF α war aus dem *epididymalen* und *retroperitonealen* Fettgewebe alter Ratten signifikant geringer als aus dem Fettgewebe junger Ratten.
- Durch die DAMPs HMGB1 und Biglykan wurde die Zytokin-Freisetzung ebenfalls moduliert, allerdings weniger stark als durch die Inkubation mit LPS.
 - Im *retroperitonealen* und *subcutanen* Fettgewebe lag eine induzierte Freisetzung der Zytokine durch die Stimulation mit den DAMPs vor.
- Die relative Expression von HMGB1, RAGE und TLR4 war im *subcutanen* Fettgewebe alter Ratten signifikant geringer als im *subcutanen* Fettgewebe junger Ratten.
- Im *subcutanen* Fettgewebe alter Ratten lag eine signifikant höhere TLR2-Expression vor als im *subcutanen* Fettgewebe junger Ratten.
- Durch die Inkubation mit LPS kam es zu einer signifikanten Reduktion der relativen Expression von RAGE und TLR4 im *subcutanen* Fettgewebe.
- Die Inkubation mit HMGB1 oder Biglykan bewirkte eine signifikante Reduktion der TLR2-Expression.

IVD Untersuchung des Einflusses von ω -3-Fettsäuren auf eine systemische LPS-induzierte Inflammation

Die Grundlage für die Beurteilung der Bedeutung von ω -3-FS im Verlauf einer systemischen LPS-induzierten Entzündungsreaktion bildete die endogene ω -3-Fettsäure-Synthese von Fat-1 Mäusen. Durch diese weisen Fat-1 Mäuse höhere Gehalte an ω -3-FS und geringere ω -6-Fettsäurekonzentrationen als vergleichbar aufgezogene WT Mäuse in verschiedenen Geweben, wie unter anderem dem Gehirn, auf [411]. Die i.p. Injektion von LPS (2,5 mg/kg KGW) stellt eine gut etablierte Methode zur Auslösung einer systemischen Entzündungsreaktion dar und wurde auch im Rahmen dieser Arbeit bei allen mit LPS gekennzeichneten Tiergruppen angewendet. Kontrollmäuse erhielten eine i.p. Injektion von Natriumchlorid (NaCl). Durch die telemetrische Erfassung der Körperkerntemperatur, der

lokomotorischen Aktivität, der Futter- und Wasseraufnahme sowie durch die manuelle Ermittlung des Körpergewichtes konnten neue Erkenntnisse über den Einfluss von ω -3-FS auf die physiologischen Parameter des „sickness behaviors“ gewonnen werden. Die *transcardiale* Perfusion wurde fünf bzw. 24 Stunden nach Injektion durchgeführt. Sie diente der Gewinnung von Blut- und Organproben und damit der Untersuchung weiterer pro-inflammatorischer Parameter in der Peripherie.

Tabelle 75: Anzahl der pro Genotyp und Versuchsgruppe verwendeten Mäuse

Maus Stamm	NaCl i.p.		LPS (2,5 mg/kg KGW) i.p.	
	5 Stunden	24 Stunden	5 Stunden	24 Stunden
WT	4	7	5	7
Fat-1	3	6	3	7

1 Beeinflussung der physiologischen Parameter des „sickness behaviors“

1.1 *Körperkerntemperatur*

In Abbildung 46 wird die Körperkerntemperatur über die Zeit in Abhängigkeit des Genotyps und der Behandlung dargestellt. Sowohl Wildtyp (WT)- als auch Fat-1 Mäuse zeigten unmittelbar nach i.p. Injektion einen gleichermaßen ausgeprägten Stresspeak, der eine Stunde nach der Injektion wieder das Basalniveau erreichte und nicht in die statistische Auswertung mit einbezogen wurde. Die während der Dunkelphase gesteigerte Körperkerntemperatur der mit NaCl injizierten Mäuse spiegelt den physiologischen circadianen Temperaturverlauf der Mäuse mit nächtlicher Aktivität wider. Dieser circadiane Rhythmus wurde sowohl bei WT- als auch bei Fat-1 Mäusen nach Injektion von LPS aufgehoben.

Die LPS-Injektion induzierte bei WT Mäusen im Vergleich zur NaCl-Injektion einen signifikanten Temperaturanstieg 3,25 - 5 Stunden *post injectionem* ($p = 0,012$). Anschließend sank die abdominale Körpertemperatur und ging in eine signifikant reduzierte Körperkerntemperatur während der Dunkelphase (13,15 – 15 Stunden p.i.) über ($p = 0,048$) (Abbildung 46, A).

Im Gegensatz dazu zeigten die mit LPS-injizierten Fat-1 Mäuse nach dem Abklingen des stressinduzierten Temperaturanstieges nur eine kurzfristige erneute Temperaturerhöhung, die 30 Minuten nach dem stressinduzierten Temperaturanstieg ihren Peak erreichte (nicht statistisch signifikant). Anschließend unterlag die Körpertemperatur der mit LPS injizierten Fat-1 Mäuse zunächst einer kontinuierlichen Reduktion, welche 6,25 Stunden nach der Injektion den Tiefstwert aufwies. Zu diesem Zeitpunkt begann die Temperatur bis zur Perfusion wieder langsam aber kontinuierlich zu steigen. Verglichen mit den NaCl-injizierten Fat-1 Mäusen lag bei den mit LPS injizierten Fat-1 Mäusen 9,25 – 15 Stunden p.i.

(Dunkelheit) eine statistisch signifikant reduzierte Körperkerntemperatur vor ($p < 0,0001$) (Abbildung 46, B). Durch den kontinuierlichen Temperaturanstieg der mit LPS behandelten Fat-1 Mäuse und den physiologischen Abfall der Körperkerntemperatur von NaCl-injizierten Fat-1 Mäusen, kam es schließlich nach der Dunkelphase zu einer signifikant höheren Körperkerntemperatur der mit LPS behandelten Fat-1 Mäuse (21,25 – 23 h: $p < 0,0001$; 23,25 – 24 h: $p = 0,024$).

Es ließen sich außerdem genotypabhängige Effekte zeigen. Zum einen wiesen WT Mäuse 17,25 – 23 Stunden nach der Injektion von NaCl signifikant höhere Körperkerntemperaturen (17,25 – 19 h: $p = 0,036$; 19,25 – 23 h: $p < 0,0001$) auf als die NaCl-injizierten Fat-1 Mäuse (Abbildung 46, C). Zum anderen zeigten WT Mäuse im Verlauf der LPS-induzierten Entzündungsreaktion ebenfalls höhere Körperkerntemperaturen im Vergleich zu Fat-1 Mäusen. Dabei lag 3,25 – 5 ($p < 0,0001$) sowie 5,25 – 7 Stunden ($p = 0,024$) nach LPS-Injektion ein statistisch signifikantes Niveau vor (Abbildung 46, D). Durch den kontinuierlichen Temperaturanstieg der Fat-1 Mäuse glichen sich die Körperkerntemperaturen von LPS-behandelten Mäusen beider Genotypen 21 Stunden p.i. einander an.

Fünf Stunden p.i. wiesen LPS-injizierten WT Mäuse verglichen mit den NaCl-behandelten WT Mäusen also ein Fieber auf. LPS-injizierte Fat-1 Mäuse zeigten kein Fieber. Die Körperkerntemperatur der LPS-injizierten Fat-1 Mäuse ging aber entsprechend der Körperkerntemperatur von LPS-injizierten WT Mäusen in eine nächtliche Hypothermie über. Um Hinweise über die ursächlichen regulatorischen Mechanismen in Blut- und Organproben erhalten zu können, wurde ein zweiter Perfusionszeitpunkt nach fünf Stunden ausgewählt.

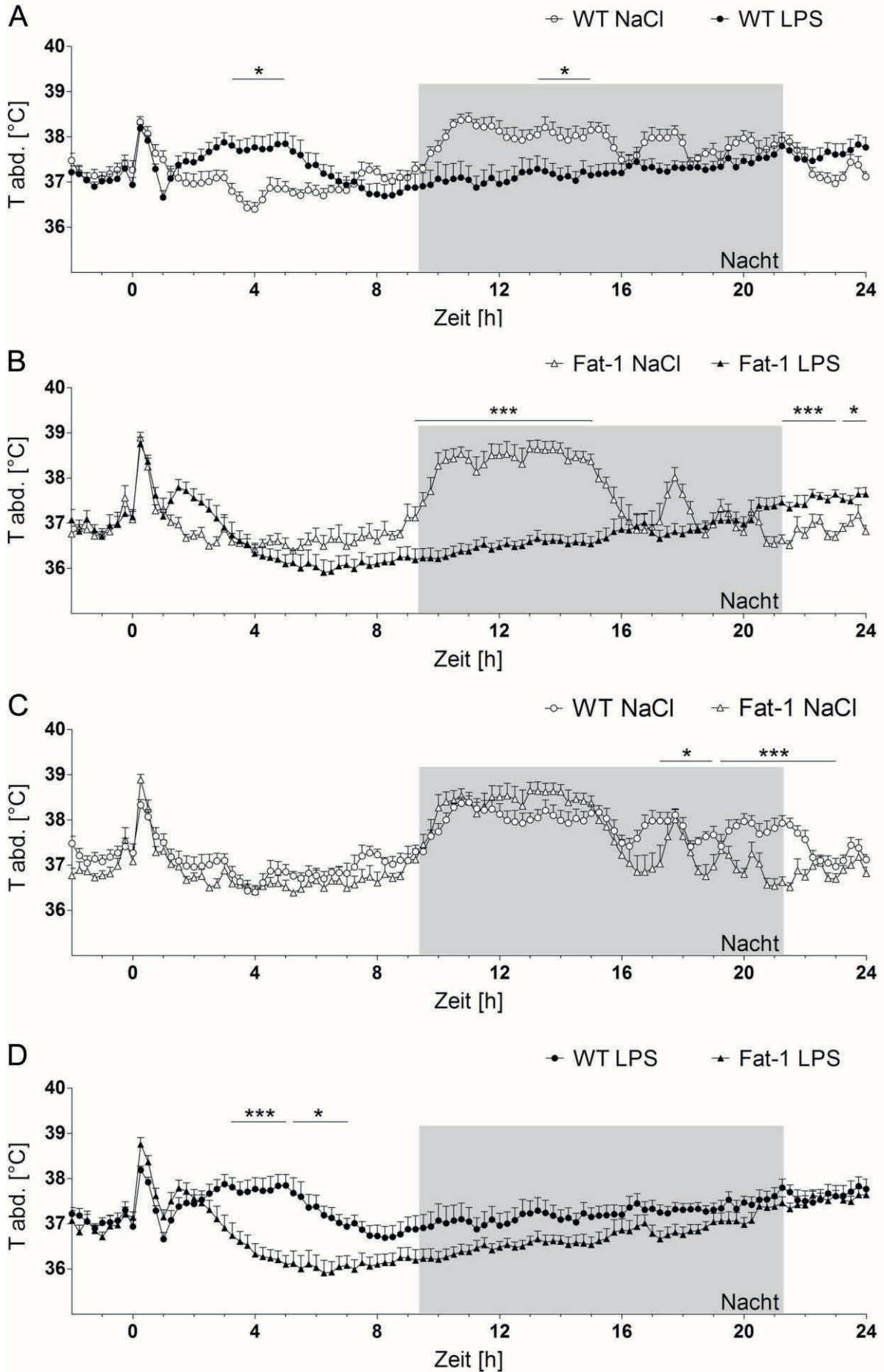


Abbildung 46: Darstellung der abdominal gemessenen Körperkerntemperatur über die Zeit in Abhängigkeit der Behandlung und des Genotyps

Die abdominale Körperkerntemperatur ($T_{abd.}$) wird in Abhängigkeit der verabreichten *intraperitonealen* Injektion (**A, B**) und des Genotyps (**C, D**) dargestellt. Die Injektion erfolgte zum Zeitpunkt $t = 0$. Bei den dargestellten Messwerten handelt es sich um Mittelwerte mit Standardfehlern. Die zwölfstündige Dunkelphase ist mit einem grau hinterlegten Kasten gekennzeichnet. WT Mäuse entwickelten 2,25 – 5 Stunden nach LPS-Injektion ein signifikantes Fieber, das bei Fat-1 Mäusen nicht auftrat. Diese reagierten hingegen mit einer im Vergleich zu LPS-injizierten WT Mäusen länger andauernden, statistisch signifikanten Hypothermie, die anschließend in eine signifikant höhere Temperatur im Vergleich zu den mit NaCl injizierten Fat-1 Mäuse überging. Ein genotypabhängiger Unterschied lag zum Ende des Beobachtungszeitraumes unter Kontrollbedingungen sowie zu Beginn der LPS-induzierten Inflammation vor. Die Tierzahlen sind der Tabelle 75 zu entnehmen. **A, B:** * Haupteffekt Behandlung; **C,D:** * Haupteffekt Genotyp; **(A) 3,25 – 5 h:** * $p = 0,012$; **13,25 – 15 h:** * $p = 0,048$; **(B)** * $p = 0,024$; *** $p < 0,0001$; **(C)** * $p = 0,036$; *** $p < 0,0001$; **(D)** * $p = 0,024$; *** $p < 0,0001$.

Für eine deutlichere Darstellung der beschriebenen Unterschiede des Temperaturverlaufes in Abhängigkeit der Behandlung und des Genotyps wurde zusätzlich der Fieberindex berechnet (Abbildung 47). Dabei beschreibt ein positiver Fieberindex eine höhere Temperatur im Vergleich zur Basislinie, welche während der zwei Stunden vor Injektion ermittelt wurde. Ein negativer Fieberindex beschreibt demnach eine erniedrigte Temperatur verglichen mit der Basislinie. Der einstündige stressinduzierte Temperaturanstieg wurde bei der Berechnung des Fieberindex nicht berücksichtigt. Die differenzierte Betrachtung der Zeiträume 1 - 5 Stunden p.i. und 1 - 24 Stunden p.i. wurde aufgrund der unterschiedlichen Reaktion von Mäusen beider Genotypen insbesondere zu Beginn der Inflammation durchgeführt.

Es bestand innerhalb des Zeitraumes 1 - 5 Stunden nach Injektion ein signifikanter behandlungsabhängiger Haupteffekt ($p = 0,0014$), der bei der Betrachtung des gesamten Zeitraumes von 1 - 24 Stunden p.i. ebenfalls vorlag ($p = 0,0156$). Infolge einer signifikanten Interaktion, die sowohl bei Betrachtung des Zeitraumes 1 – 5 Stunden p.i. ($p = 0,0459$) als auch 1 – 24 Stunden p.i. ($p = 0,0269$) vorlag, wurde in beiden Fällen ein Bonferroni *post hoc* Test durchgeführt. Dieser zeigte eine signifikante Erhöhung des Fieberindex bei WT Mäusen 1 – 5 Stunden nach LPS-Injektion ($p < 0,001$) sowie eine signifikante Reduktion des Fieberindex bei Fat-1 Mäusen über den gesamten Zeitverlauf von 1 – 24 Stunden nach LPS-Injektion ($p < 0,01$). Außerdem bestand ein signifikanter Unterschied der LPS-induzierten Fieberantwort zwischen WT- und Fat-1 Mäusen für beide betrachteten Zeiträume ($p < 0,05$), wobei WT Mäuse einen positiven und Fat-1 Mäuse einen negativen Fieberindex aufwiesen.

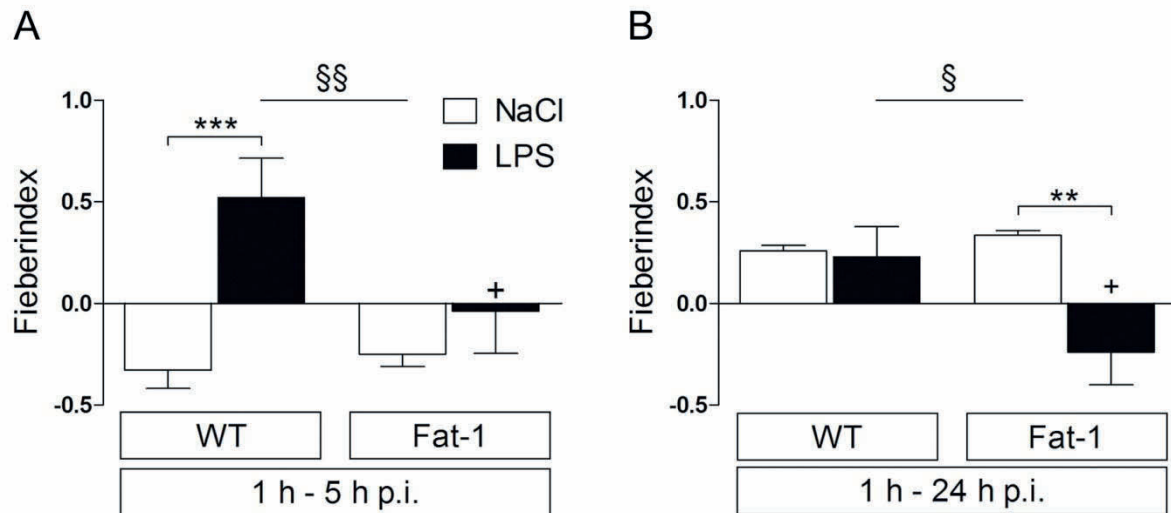


Abbildung 47: Darstellung des Fieberindex unterschiedlicher Zeiträume in Abhängigkeit der Behandlung und des Genotyps

Zur Berechnung des Fieberindex wurden die Zeiträume 1 – 5 (A) sowie 1 – 24 Stunden (B) *post injectionem* (p.i.) betrachtet. Die Darstellung erfolgte als Mittelwert mit Standardfehler. WT Mäuse reagierten im Gegensatz zu Fat-1 Mäusen auf die LPS-Injektion mit einem positiven Fieberindex, der 1 - 5 Stunden p.i. signifikant höher war als der der NaCl-injizierten WT Mäuse und ebenso signifikant höher ausfiel als der der LPS-injizierten Fat-1 Mäuse. Bei Betrachtung des gesamten Zeitraumes führte die LPS-Injektion zu einem signifikant reduzierten Fieberindex der Fat-1 Mäuse im Vergleich zu NaCl-injizierten Fat-1 Mäusen sowie im Vergleich zu LPS-injizierten WT Mäusen. Die Tierzahlen sind in Tabelle 75 ersichtlich. § Haupteffekt Behandlung; * NaCl vs. LPS; + WT vs. Fat-1; (A) §§ $p = 0,0014$; *** $p < 0,001$; + $p < 0,05$; (B) § $p = 0,0156$; ** $p < 0,01$; + $p < 0,05$.

1.2 Lokomotorische Aktivität

Auch die lokomotorische Aktivität der Mäuse beider Genotypen wurde während des Versuchszeitraumes telemetrisch erfasst und als Hinweis für das induzierte „sickness behavior“ sowohl im Zeitverlauf (Abbildung 48) als auch kumulativ (Abbildung 49) ausgewertet.

Beide Mausstämme zeigten einen einstündigen stressinduzierten Anstieg der lokomotorischen Aktivität, der mit der Injektion zum Zeitpunkt $t = 0$ begann und nicht in die statistische Auswertung einbezogen wurde. Der Aktivitätsanstieg der mit NaCl injizierten Mäuse während der Dunkelphase spiegelt den circadianen Rhythmus und die Nachtaktivität der Mäuse wider. Dabei zeigten Fat-1 Mäuse unter Kontrollbedingungen im Vergleich zu WT Mäusen eine höhere lokomotorische Aktivität, die 13,25 – 15 Stunden p.i. (Dunkelheit) statistische Signifikanz erreichte ($p < 0,0001$) (Abbildung 48, C). Die Injektion mit LPS bewirkte bei Mäusen beider Genotypen eine Reduktion der lokomotorischen Aktivität und eine Aufhebung der circadianen Rhythmik. Eine statistische Signifikanz lag hierbei bei WT Mäusen 1,25 – 3 Stunden p.i. ($p = 0,036$) sowie 9 – 19 Stunden p.i. (Dunkelphase) vor (Abbildung 48, A). Bei Fat-1 Mäusen zeigte sich ein sehr ähnlicher Aktivitätsverlauf der LPS-injizierten Tiere mit einer signifikanten Aktivitätsreduktion 9 – 19 Stunden nach der Injektion.

Allerdings lag bei Fat-1 Mäusen eine längere LPS-induzierte, statistisch signifikante Aktivitätsreduktion während der Hellphase vor, die sich über 1 – 5 Stunden p.i. erstreckte (Abbildung 48, B). Es war kein genotypabhängiger Effekt auf die LPS-induzierte Reduktion der lokomotorischen Aktivität nachweisbar (Abbildung 48, D).

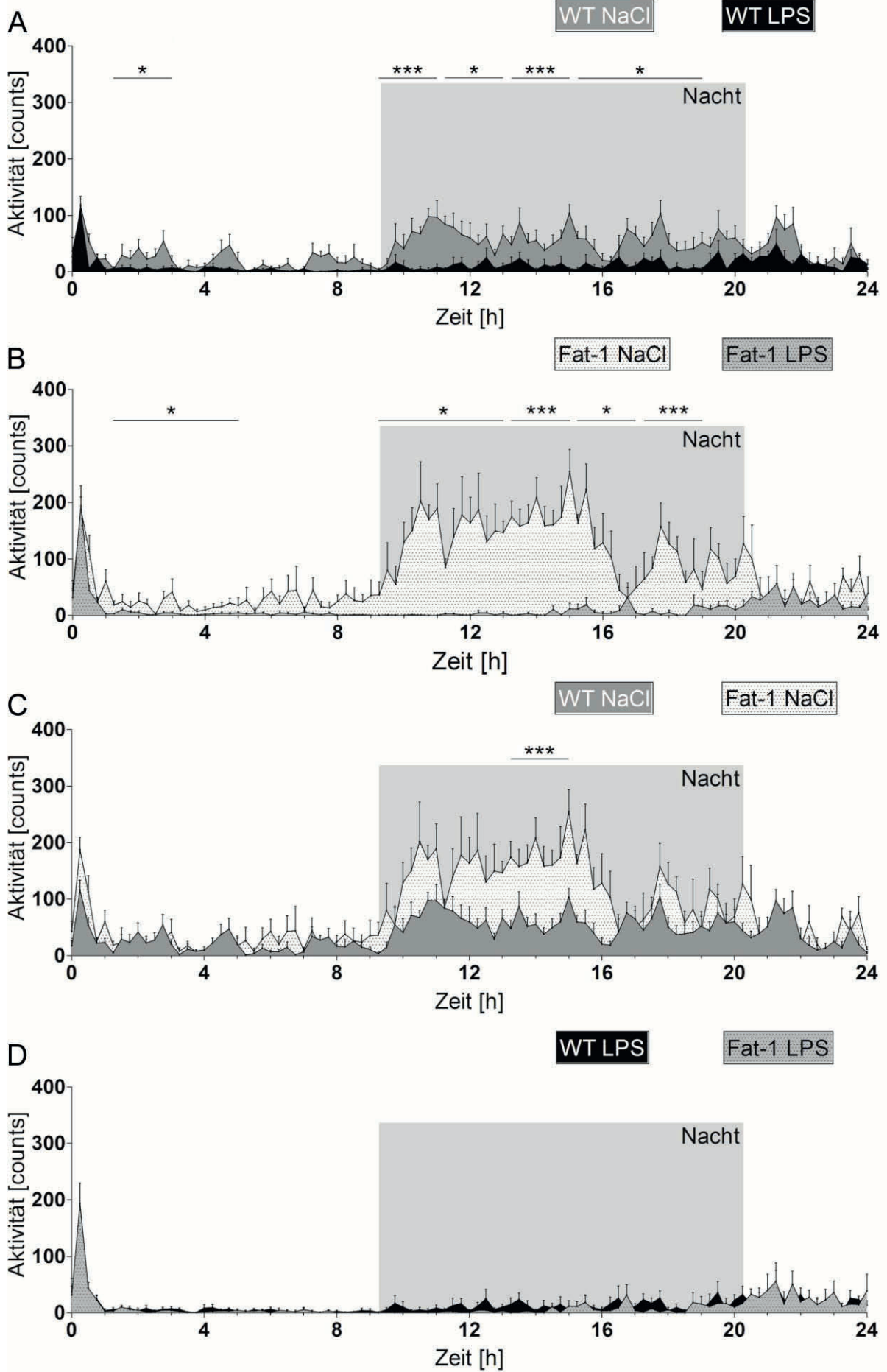


Abbildung 48: Darstellung des Zeitverlaufes der lokomotorischen Aktivität in Abhängigkeit der Behandlung und des Genotyps

Der Zeitverlauf der lokomotorischen Aktivität wird in Abhängigkeit der Behandlung (**A, B**) und des Genotyps (**C, D**) als Mittelwert mit Standardfehler dargestellt. Die Dunkelphase des Beleuchtungszyklus ist durch einen grau hinterlegten Kasten gekennzeichnet. Die Injektion erfolgte zum Zeitpunkt $t = 0$. LPS führte sowohl bei WT- als auch bei Fat-1 Mäusen zu einer Aufhebung der nächtlich gesteigerten lokomotorischen Aktivität. Unter Kontrollbedingungen zeigten Fat-1 Mäuse eine signifikant höhere lokomotorische Aktivität als WT Mäuse (**C**). Die Tierzahlen sind der Tabelle 75 zu entnehmen. **A, B:** * Haupteffekt Behandlung; **C, D:** * Haupteffekt Genotyp; **(A) 1,25 – 3 h:** * $p = 0,036$; **9,25 – 11 h:** *** $p < 0,0001$; **11,25 – 13 h:** * $p = 0,036$; **13,25 – 15 h:** *** $p < 0,0001$; **15,25 – 17 h:** * $p = 0,048$; **17,25 – 19 h:** * $p = 0,024$; **(B) 1,25 – 3 h:** * $p = 0,036$; **3,25 – 5 h:** * $p = 0,024$; **9,25 – 13 h:** * $p = 0,012$; **13,25 – 15 h:** *** $p < 0,0001$; **15,25 – 17 h:** * $p = 0,024$; **17,25 – 19 h:** *** $p < 0,0001$; **(C) 13,25 – 15 h:** *** $p < 0,0001$.

Durch die Betrachtung der kumulativen Aktivität konnte die insbesondere nächtlich gesteigerte Aktivität von Fat-1 Mäusen gegenüber der Aktivität von WT Mäusen noch deutlicher gezeigt werden. In den ersten 1 - 5 Stunden p.i. lag kein genotypabhängiger Effekt der kumulativen Aktivität vor. Jedoch war auch hier, entsprechend des in Abbildung 48 dargestellten Zeitverlaufes der lokomotorischen Aktivität, ein signifikanter behandlungsabhängiger Haupteffekt nachweisbar ($p < 0,0001$) (Abbildung 49, A). Bei der statistischen Auswertung der kumulativen Aktivität über 1 – 24 Stunden p.i. lag nicht nur ein signifikanter behandlungsabhängiger Haupteffekt ($p < 0,0001$), sondern ebenfalls ein signifikanter genotypabhängiger Haupteffekt vor ($p < 0,0001$) (Abbildung 49, B). Bei der Betrachtung der Interaktionseffekte ergab sich neben einer signifikanten LPS-bedingten Reduktion der kumulativen lokomotorischen Aktivität von Mäusen beider Genotypen ($p < 0,001$) ebenfalls eine signifikant höhere Aktivität der Fat-1 Mäuse unter Kontrollbedingungen ($p < 0,001$).

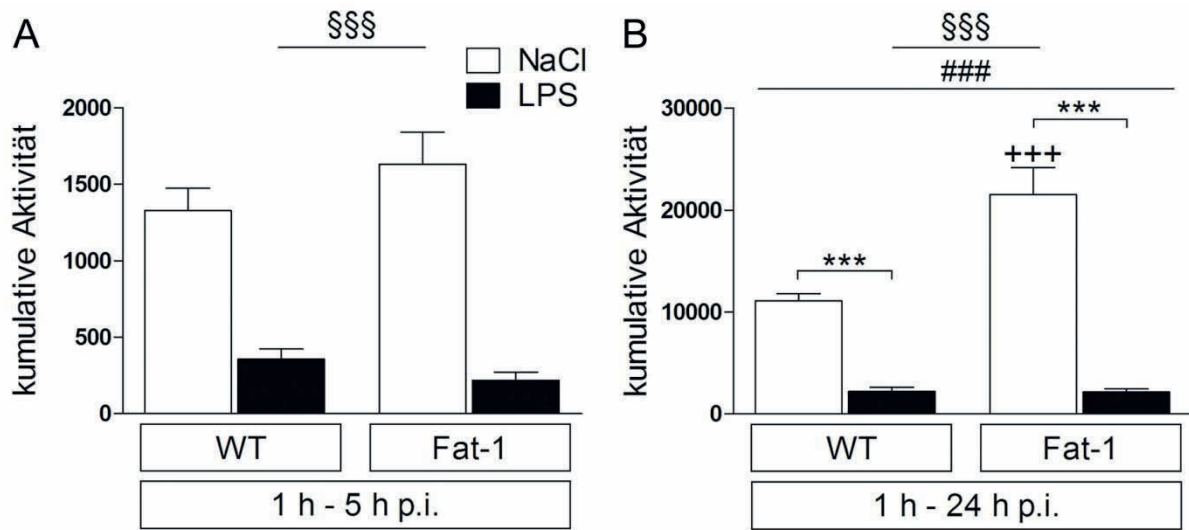


Abbildung 49: Darstellung der kumulativen Aktivität unterschiedlicher Zeiträume in Abhängigkeit der Behandlung und des Genotyps

Die kumulative Aktivität ist die Summe der Aktivitäts-„counts“, die für die Zeiträume 1 – 5 Stunden *post injectionem* (p.i.) (A) und 1 – 24 Stunden p.i. (B) berechnet wurde. Die dargestellten Balken zeigen den Mittelwert mit Standardfehler. Es ist zu beachten, dass die beiden Graphen unterschiedliche Skalierungen der y-Achse aufweisen. LPS bewirkte eine Reduktion der lokomotorischen Aktivität von Mäusen beider Genotypen. Unter Kontrollbedingungen zeigten Fat-1 gegenüber WT Mäusen eine signifikant höhere kumulative lokomotorische Aktivität. Die Anzahl der Tiere ergibt sich aus Tabelle 75. § Haupteffekt Behandlung; # Haupteffekt Genotyp; * NaCl vs. LPS; + WT vs. Fat-1; §§§ p < 0,0001; ### p = 0,0009; *** / +++ p < 0,001.

1.3 Futter- und Wasseraufnahme

Da Anorexie und Adipsie ebenfalls zum Symptomkomplex des „sickness behaviors“ gehören, wurden Futter- und Wasseraufnahme während des gesamten Versuches telemetrisch erfasst (Abbildung 50). Aufgrund der circadianen Rhythmik, die durch gesteigerte nächtliche Aktivität gekennzeichnet ist, nehmen Mäuse auch unter physiologischen Bedingungen hauptsächlich nachts Futter und Wasser auf. Deshalb wurden bei der hier vorliegenden statistischen Auswertung nur Mäuse berücksichtigt, deren *transcardiale* Perfusion 24 Stunden p.i. erfolgte.

Sowohl die Futter- als auch die Wasseraufnahme wurde aufgrund der LPS-Injektion bei Mäusen beider Genotypen gleichermaßen signifikant reduziert (Haupteffekt Behandlung: p < 0,0001). Ein genotypabhängiger Effekt war statistisch nicht nachweisbar.

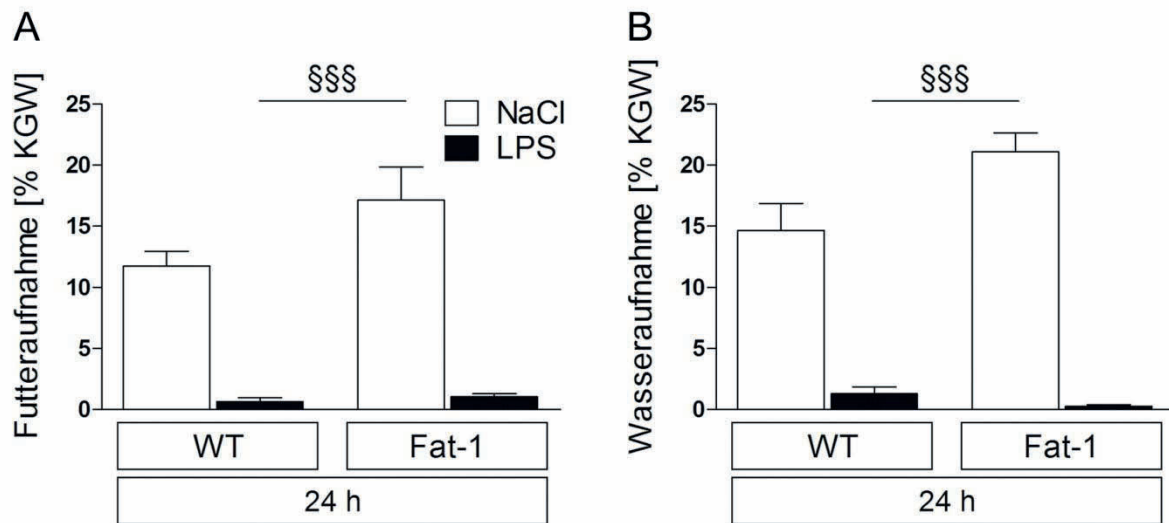


Abbildung 50: Darstellung der Futter- und Wasseraufnahme in Abhängigkeit der Behandlung und des Genotyps

Die kumulative Futter- (**A**) und Wasseraufnahme (**B**) über 24 Stunden *post injectionem* wird jeweils prozentual zum Körpergewicht als Mittelwert mit Standardfehler dargestellt. Durch die Behandlung mit LPS wurde die Futter- und Wasseraufnahme der Mäuse beider Genotypen signifikant reduziert. Es wurden lediglich Mäuse berücksichtigt, deren *transcardiale* Perfusion 24 Stunden nach Injektion erfolgte (siehe Tabelle 75). § Haupteffekt Behandlung; §§§ $p < 0,0001$.

1.4 Entwicklung der Körpermasse

Ebenso wie die Futter- und Wasseraufnahme wurde die Entwicklung der Körpermasse nur von Tieren ausgewertet, deren Perfusion 24 Stunden p.i. erfolgte. Unabhängig vom Genotyp führte die Injektion von LPS zu einer signifikanten Reduktion des Körpergewichtes (Haupteffekt Behandlung: $p < 0,0001$) (Abbildung 51).

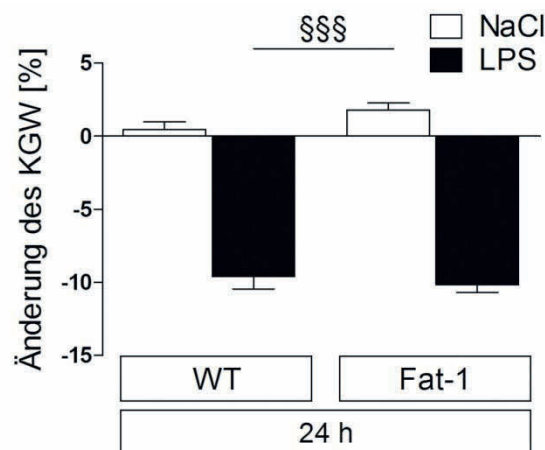


Abbildung 51: Darstellung der prozentualen Änderung des Körpergewichtes (KGW) in Abhängigkeit der Behandlung und des Genotyps

Die prozentuale Änderung des KGW über 24 Stunden *post injectionem* (p.i.) wird als Mittelwert und Standardfehler dargestellt. Mäuse beider Genotypen zeigten einen durch LPS-Injektion bedingten signifikanten Gewichtsverlust. Hingegen war unter Kontrollbedingungen eine leichte Gewichtszunahme zu verzeichnen. Es wurden nur Mäuse berücksichtigt, die 24 Stunden p.i. perfundiert wurden (siehe Tabelle 75). § Haupteffekt Behandlung; §§§ $p < 0,0001$.

2 Beeinflussung LPS-induzierter peripherer pro-inflammatorischer Parameter durch ω -3-Fettsäuren

2.1 *Zirkulierende Zytokine*

Die humorale Signalübertragung zum Gehirn geht mit einer peripheren Synthese endogener Pyrogene einher [24]. Die pro-inflammatorischen Zytokine TNF α und IL-6 sind bei Infektionen mit gram-negativen Bakterien von großer Bedeutung [2, 89]. Sie wurden auch in der vorliegenden Arbeit als Hinweis für mögliche genotypabhängige Unterschiede (WT vs. Fat-1) der LPS-induzierten Inflammation herangezogen und dafür unter Zuhilfenahme von Bioassays aus gewonnenen Plasmaproben bestimmt (Abbildung 52).

Die Injektion von LPS bewirkte in Mäusen beider Genotypen einen signifikanten Anstieg von IL-6 und TNF α im Plasma. Im Gegensatz zu IL-6 lag die Konzentration von TNF α 24 Stunden p.i. allerdings unterhalb des Detektionslimits von 6 pg/ml. Ein signifikanter genotypabhängiger Haupteffekt war 24 Stunden p.i. bezüglich der IL-6-Konzentration nachweisbar ($p = 0,0397$). So war der LPS-abhängige Konzentrationsanstieg von IL-6 in Fat-1 Mäusen signifikant geringer als in WT Mäusen ($p < 0,01$).

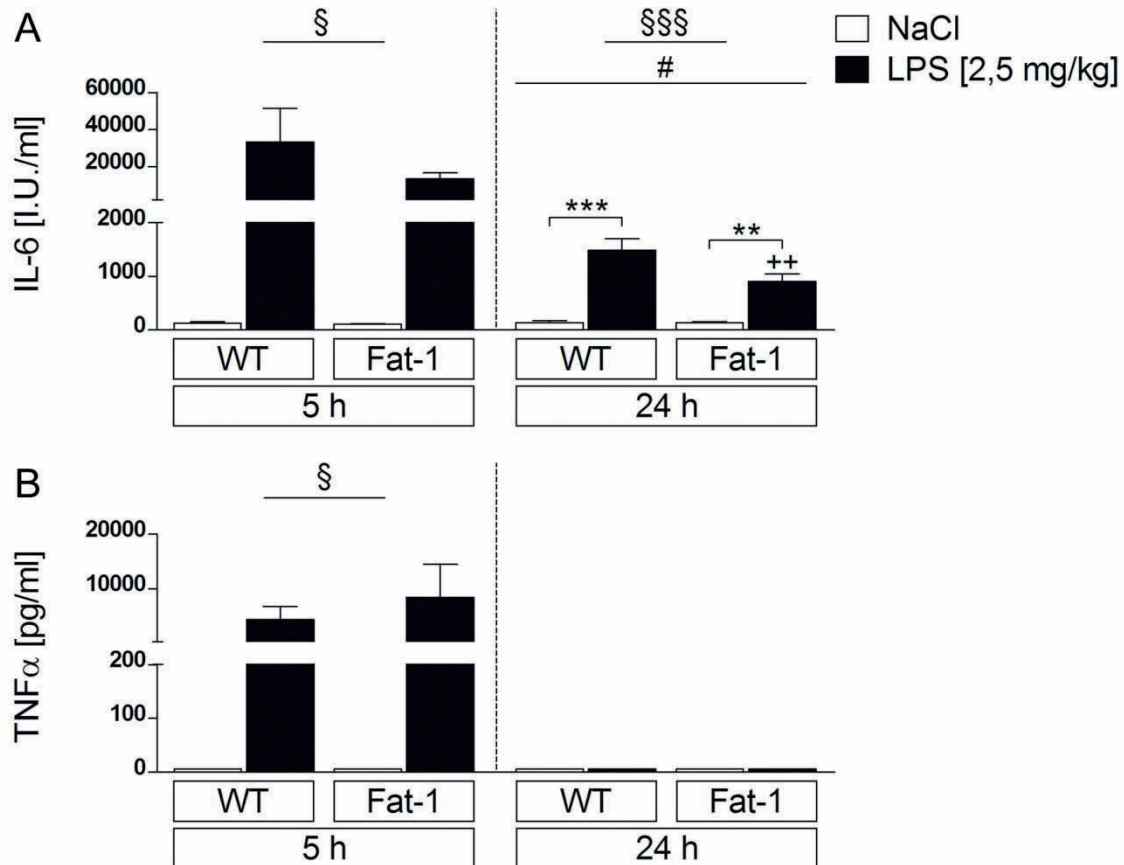


Abbildung 52: Einfluss des Genotyps auf die LPS-induzierten Konzentrationen von IL-6 und TNF α im Plasma

Darstellung der Plasmakonzentrationen von IL-6 (**A**) und TNF α (**B**) 5 sowie 24 Stunden nach Injektion von Natriumchlorid (NaCl) oder Lipopolysaccharid (LPS) in Abhängigkeit des Genotyps. Die Konzentrationen wurden mit Hilfe von Bioassays ermittelt und werden als Mittelwert mit Standardfehler dargestellt. Die LPS-Injektion bewirkte einen signifikanten Anstieg von IL-6 über 24 Stunden, hingegen lag TNF α lediglich zum Zeitpunkt fünf Stunden *post injectionem* (p.i.) in signifikant gesteigerten Konzentrationen vor. Im Plasma der Fat-1 Mäuse war 24 Stunden p.i. eine signifikant geringere IL-6-Konzentration nachweisbar als im Plasma der LPS-behandelten WT Mäusen. Die Tierzahlen sind der Tabelle 75 zu entnehmen. § Haupteffekt Behandlung; # Haupteffekt Genotyp; * NaCl vs. LPS; + WT vs. Fat-1; (**A**) § $p = 0,0423$; §§§ $p < 0,0001$; # $p = 0,0397$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; ++ $p = 0,01$; (**B**) § $p = 0,0375$.

2.2 Leukozyten im Blut

Für die lichtmikroskopische Differenzierung der zirkulierenden Leukozyten wurde ein Tropfen des bei der Perfusion gewonnenen Blutes auf einem Objektträger ausgestrichen und nach Pappenheim angefärbt (siehe Kapitel III E6).

Der im Blut von NaCl-injizierten Mäusen beider Genotypen ermittelte prozentuale Anteil der jeweiligen Leukozyten entsprach dem physiologischen lymphozytären Blutbild der Maus. Jedoch lagen im Vergleich zu den in dieser Arbeit verwendeten Referenzwerten [454] leicht erhöhte prozentuale Anteile eosinophiler Granulozyten vor. Mit Rücksicht auf schwankende Angaben der Referenzwerte in unterschiedlicher Literatur ist dies allerdings von geringer Bedeutung.

Hingegen führte die Injektion von LPS in Mäusen beider Genotypen zu einem deutlichen Anstieg des prozentualen Anteils neutrophiler Granulozyten mit gleichzeitiger Reduktion der im Blut zirkulierenden Lymphozyten (siehe Tabelle 76). Diese Neutrophilie war sowohl fünf als auch 24 Stunden p.i. nachweisbar.

Tabelle 76: Auflistung der prozentualen Anteile verschiedener Leukozyten im Blut in Abhängigkeit der Behandlung und des Genotyps

Die verschiedenen Leukozyten wurden lichtmikroskopisch differenziert und ihre prozentualen Anteile als Mittelwert \pm Standardfehler tabellarisch aufgelistet. Die angegebenen Referenzwerte entstammten der Literatur [454] und dienten als Vergleich. Eine Injektion von LPS führte sowohl bei WT als auch bei Fat-1 Mäusen zu einer Neutrophilie, die zu beiden betrachteten Zeitpunkten (5 h p.i.; 24 h p.i.) vorlag. Tierzahlen 5 Stunden p.i.: WT NaCl n = 5; WT LPS n = 4; Fat-1 NaCl n = 3; Fat-1 LPS n = 3; Tierzahlen 24 Stunden p.i.: WT NaCl n = 7; WT LPS n = 7; Fat-1 NaCl n = 5; Fat-1 LPS n = 7.

	Lymphozyten [%]	Monozyten [%]	Neutrophile Granulozyten [%]	Eosinophile Granulozyten [%]	Basophile Granulozyten [%]
Referenzwerte	55 - 95	0,1 – 3,5	10 - 40	0 - 4	0,1 – 3,5
5 Stunden post injectionem					
WT NaCl	63,4 \pm 2,99	0	31,4 \pm 9,45	6 \pm 4	0
WT LPS	24,5 \pm 3,88	1,5 \pm 0,96	71,25 \pm 5,22	2,75 \pm 1,11	0
Fat-1 NaCl	61,33 \pm 5,81	0	32,67 \pm 6,96	6 \pm 1,15	0
Fat-1 LPS	28,33 \pm 5,84	1,67 \pm 1,20	60,67 \pm 10,35	9,33 \pm 3,38	0
24 Stunden post injectionem					
WT NaCl	60,43 \pm 4,71	0	34,57 \pm 3,99	5 \pm 1,84	0
WT LPS	19,57 \pm 9,05	5,57 \pm 1,85	73,86 \pm 8,74	1 \pm 0,65	0
Fat-1 NaCl	63,60 \pm 4,71	0,4 \pm 0,4	27 \pm 5,06	9 \pm 2,57	0
Fat-1 LPS	20,57 \pm 6,21	8,86 \pm 3,32	70,57 \pm 8,08	0	0

2.3 Genexpression wichtiger inflammatorischer Marker in Leber und Milz

Mit der quantitativen „real-time“ RT-PCR wurde die mRNA-Expression wichtiger inflammatorischer Marker in Leber und Milz von perfundierten Mäusen analysiert (siehe Kapitel III E3). Dies diente insbesondere der Untersuchung auf eine mögliche Modulation der LPS-bedingten Induktion wichtiger Zielgene durch ω -3-FS. Die Anzahl der Tiere, deren Leber und Milz für die Analyse der relativen Expression verwendet wurden, ist der Tabelle 77 zu entnehmen.

Tabelle 77: Anzahl der Tiere, aus deren Leber und Milz eine RNA-Extraktion erfolgte, in Abhängigkeit des Genotyps, der Behandlung und des Perfusionszeitpunktes.

Maus Stamm	NaCl i.p.		LPS (2,5 mg/kg KGW) i.p.	
	5 Stunden	24 Stunden	5 Stunden	24 Stunden
WT	3	6	3	6
Fat-1	3	6	3	6

Expression der Gene von Transkriptionsfaktoren bzw. ihrer Regulatoren

Als weitere Indikatoren für die LPS-induzierte Aktivität verschiedener zellulärer Synthese- und Aktivierungswege diente die relative Expression des Transkriptionsfaktors NF-IL6

(Abbildung 53, C, D) sowie der regulierenden Moleküle „inhibitor of κ B α “ (I κ B α) (Abbildung 53, A, B) und „suppressor of cytokine signaling 3“ (SOCS3) (Abbildung 53, E, F).

Da es sich bei I κ B α um den Inhibitor des Transkriptionsfaktors NF κ B handelt und I κ B α bei einer Aktivierung von NF κ B vermehrt exprimiert wird, kann dessen Expression als Aktivitätsmarker von NF κ B herangezogen werden. Durch die LPS-Injektion kam es sowohl in der Leber als auch in der Milz von Mäusen beider Genotypen nach fünf Stunden zu einer signifikant erhöhten Expression von I κ B α (Haupteffekt Behandlung, Leber: $p = 0,0106$; Milz: $p < 0,0001$). Dieser signifikante LPS-induzierte Anstieg war in der Milz nach 24 Stunden ebenfalls nachweisbar (Haupteffekt Behandlung: $p = 0,0274$), jedoch mit einer deutlich geringeren Ausprägung.

Fünf Stunden nach LPS-Injektion war in der Leber eine signifikant höhere relative Expression von NF-IL6 nachweisbar als fünf Stunden nach Injektion von NaCl. Dabei war die LPS-induzierte NF-IL6-Expression in Lebern von Fat-1 Mäusen signifikant höher als in Lebern LPS-injizierter WT Mäuse ($p < 0,01$). In der Milz lag sowohl fünf als auch 24 Stunden p.i. eine LPS-induzierte Steigerung der NF-IL6-Expression vor. LPS-injizierte Fat-1 Mäuse wiesen in der Milz nach 24 Stunden eine signifikant höhere NF-IL6-Expression auf als LPS-behandelte WT Mäuse ($p < 0,05$).

SOCS3 liefert als endogener Regulator des Transkriptionsfaktors „signal transducer and activator of transcription 3“ (STAT3) Informationen über die Aktivität des Januskinase (JAK)-STAT Signalweges. In Leber und Milz von Mäusen beider Genotypen lagen sowohl fünf als auch 24 Stunden nach Injektion von LPS signifikant höhere relative SOCS3-Expressionen vor als in entsprechenden Organen der Kontrolltiere (Haupteffekt Behandlung: $p < 0,0001$). Fünf Stunden nach LPS-Injektion war dabei eine deutlich höhere Expression nachzuweisen als 24 Stunden nach der Behandlung mit LPS.

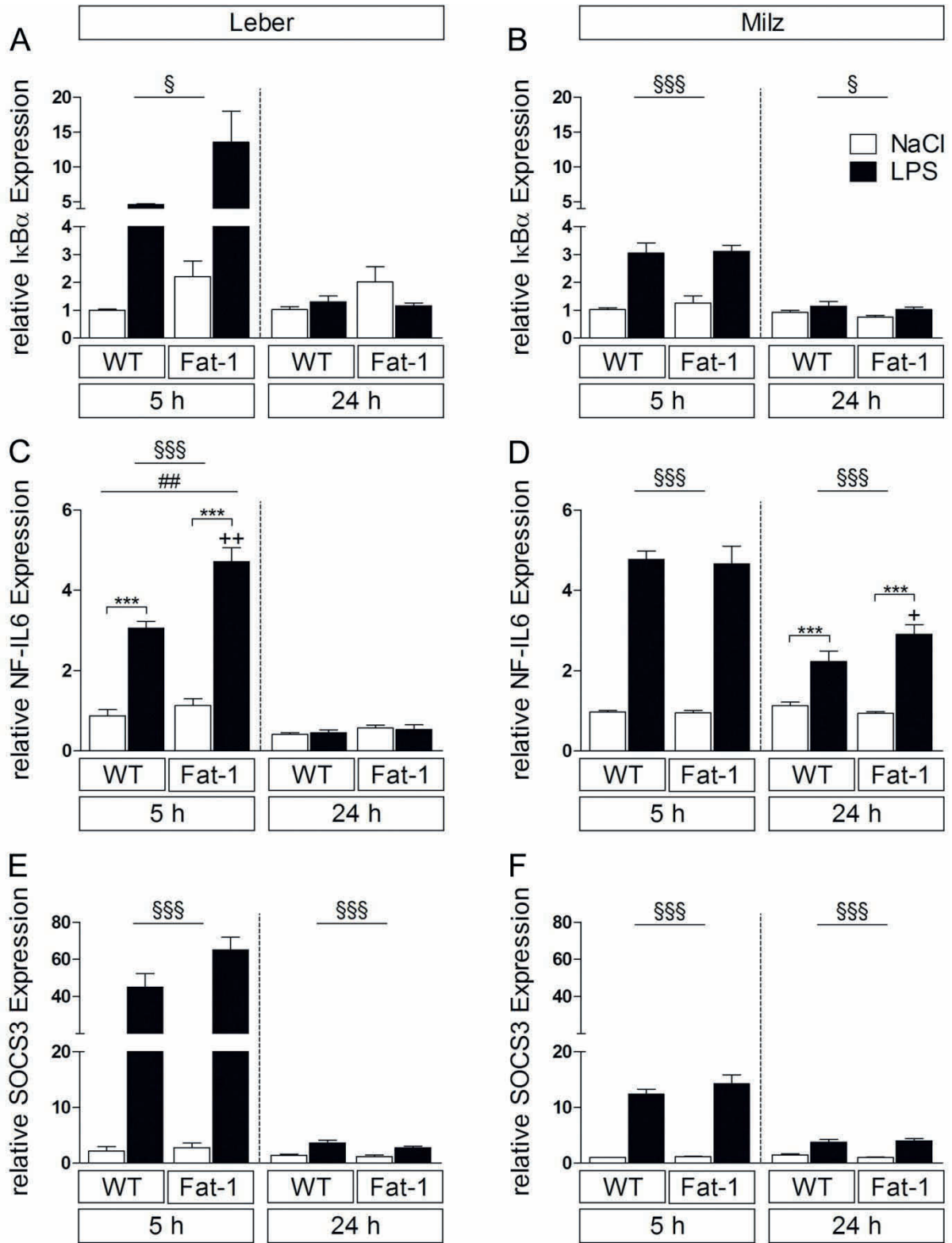


Abbildung 53: Darstellung der relativen Expression von Zielgenen, die Hinweise über die Aktivität verschiedener Transkriptionsfaktoren bzw. ihrer Signalwege liefern, in Leber und Milz von WT- und Fat-1 Mäusen in Abhängigkeit ihrer Behandlung und des Perfusionszeitpunktes

Es wird die relative Expression von I κ B α (A, B), NF-IL6 (C, D) und SOCS3 (E, F) als Mittelwert mit Standardfehler dargestellt. Die statistische Auswertung der beiden Zeitpunkte erfolgte getrennt voneinander. Eine Unterbrechung der y-Achse markiert eine Änderung der Skalierung. Durch eine Behandlung mit LPS kam es zu einem signifikanten Anstieg der relativen Expression von I κ B α , NF-IL6 und SOCS3. Die NF-IL6-Expression zeigte zusätzlich einen genotypabhängigen Effekt. So lag fünf Stunden nach LPS-Injektion in der Leber von Fat-1 Mäusen eine signifikant höhere NF-IL6-Expression vor als in der Leber von LPS-behandelten WT Mäusen. Das gleiche Bild zeigte sich 24 Stunden nach LPS-Injektion in der Milz. Die Anzahl der Proben ist in Tabelle 77 ersichtlich. § Haupteffekt Behandlung; # Haupteffekt Genotyp; * NaCl vs. LPS; + WT vs. Fat-1; (A) § p = 0,0106; (B) § p = 0,0274; §§§ p < 0,0001; (C) §§§ p < 0,0001; ## p = 0,0028; *** p < 0,001; ++ p < 0,01; (D) §§§ p < 0,0001; *** p < 0,001; + p < 0,05; (E, F) §§§ p < 0,0001.

Expression der Gene wichtiger Enzyme

Im Rahmen dieser Arbeit wurde unter anderem die relative Expression der geschwindigkeitsbestimmenden Enzyme für die PGE₂-Synthese untersucht, nämlich Cyclooxygenase-2 (COX-2) (Abbildung 54, C, D) und mikrosomale Prostaglandin E-Synthase (mPGES) (Abbildung 54, E, F). Dadurch konnten indirekt Informationen über die induzierte Synthese von PGE₂ und damit die LPS-abhängige Induktion des humoralen Signalweges für die Entstehung des „sickness behaviors“ gewonnen werden.

Sowohl in der Leber als auch in der Milz unterlag die relative COX-2-Expression fünf Stunden p.i. einem LPS-bedingten Anstieg. Aufgrund von hohen Standardfehlern der relativen COX-2-Expression in der Leber lag fünf Stunden p.i. allerdings nur in der Milz ein statistisch signifikanter behandlungsabhängiger Haupteffekt vor (p = 0,0023). Hingegen war 24 Stunden p.i. keine LPS-abhängige Veränderung der COX-2-Expression nachweisbar. Für einen genotypabhängigen Effekt der COX-2-Expression zeigten sich zu den untersuchten Zeitpunkten keine Hinweise.

Außerdem wurde in der Leber und der Milz die relative Expression der mPGES durch LPS-Injektion zu beiden Zeitpunkten signifikant moduliert (Haupteffekte Behandlung). Fünf Stunden nach LPS-Injektion lag dabei eine deutlich höhere induzierte mPGES-Expression vor als 24 Stunden *post injectionem*. Der signifikante behandlungsabhängige Haupteffekt beruhte in der Milz nach 24 Stunden sogar auf einer geringgradigen LPS-bedingten Reduktion der mPGES-Expression. Zusätzlich lag 24 Stunden p.i. in der Milz ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Mäusen beider Genotypen (Haupteffekt Genotyp: p = 0,0065) mit reduzierter mPGES-Expression in der Milz von Fat-1 Mäusen vor.

Aufgrund der LPS-bedingten Reduktion der Körperkerntemperatur von Fat-1 Mäusen im Vergleich zum Temperaturanstieg der LPS-injizierten WT Mäuse (Abbildung 46) in der frühen Phase nach LPS-Injektion, wurde ebenfalls die relative Expression von COX-1

untersucht (Abbildung 54, A, B). Eine Rolle für COX-1 bei der Entstehung von Hypothermie konnte nämlich in früheren Studien bereits gezeigt werden [140].

In der Leber war fünf Stunden p.i. lediglich ein signifikanter genotypabhängiger Haupteffekt ($p = 0,0065$) nachweisbar und zwar mit höherer COX-1-Expression in Lebern der Fat-1 Mäuse als in Lebern der WT Mäuse. Ein behandlungsabhängiger Effekt lag fünf Stunden p.i. in der Leber nicht vor, jedoch 24 Stunden nach der Injektion (Haupteffekt Behandlung: $p < 0,0001$). Dieser signifikante behandlungsabhängige Haupteffekt resultierte aus einer LPS-bedingten Reduktion der COX-1-Expression in Lebern der WT- und Fat-1 Mäuse verglichen mit der COX-1-Expression in Lebern der entsprechenden Kontrollmäuse. 24 Stunden p.i. lag in der Leber darüber hinaus eine signifikante Interaktion vor. Unter Kontrollbedingungen war in den Lebern von Fat-1 Mäusen eine signifikant höhere Expression von COX-1 detektierbar als in den Lebern der NaCl-injizierten WT Mäuse. Außerdem führte die Injektion von LPS in den Fat-1 Mäusen zu einer signifikant reduzierten COX-1-Expression im Vergleich zur COX-1-Expression in Lebern der mit NaCl injizierten Fat-1 Mäuse ($p < 0,001$).

Sowohl fünf als auch 24 Stunden nach der Injektion von LPS lag in der Milz von Mäusen beider Genotypen eine signifikant reduzierte relative Expression von COX-1 vor (Haupteffekt Behandlung, 5 h: $p = 0,0025$; 24 h: $p < 0,0001$).

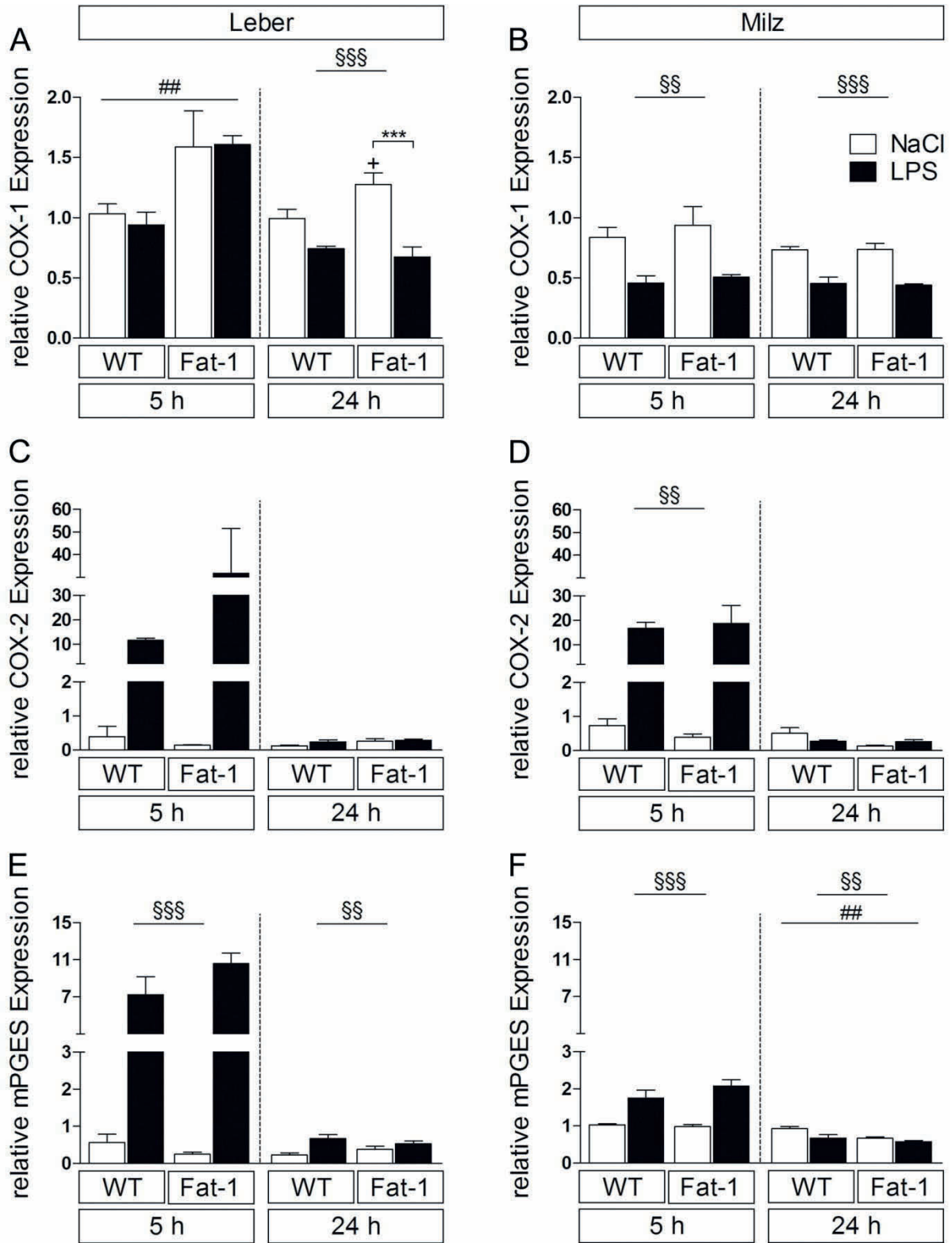


Abbildung 54: Darstellung der relativen Expression wichtiger Enzyme in Leber und Milz von WT- sowie Fat-1 Mäusen in Abhängigkeit der Behandlung

Die relative Expression der Cyclooxygenase (COX) -1 (**A, B**), der COX-2 (**C, D**) sowie der mikrosomalen Prostaglandin E Synthase (mPGES) (**E, F**) in Leber (**A, C, E**) und Milz (**B, D, F**) wird in Abhängigkeit der Behandlung und des Genotyps als Mittelwert und Standardfehler dargestellt. Die Auswertung wurde jeweils für die beiden Perfusionszeitpunkte getrennt voneinander durchgeführt. Eine Unterbrechung der y-Achse zeigt eine Änderung der Skala an. Die relative Expression von COX-1 wurde durch die LPS-Injektion signifikant reduziert. Fünf Stunden p.i. lag dieser Effekt in der Leber nicht vor, jedoch ein genotypabhängiger Haupteffekt mit einer höheren COX-1 Expression in NaCl- und LPS-injizierten Fat-1 Mäusen. Fünf Stunden nach Injektion von LPS war eine erhöhte relative COX-2-Expression in der Milz von Mäusen beider Genotypen nachzuweisen. Ebenfalls kam es zu einem LPS-induzierten Anstieg der mPGES-Expression in Leber und Milz von Mäusen beider Genotypen. 24 Stunden p.i. lag in der Milz eine geringere LPS-bedingte relative Expression der mPGES vor als in Kontrollmäusen. Zusätzlich war zu diesem Zeitpunkt ein genotypabhängiger Haupteffekt mit geringerer relativer mPGES-Expression in der Milz von Fat-1 Mäusen nachweisbar. Die Probenzahlen sind der Tabelle 77 zu entnehmen. § Haupteffekt Behandlung; # Haupteffekt Genotyp; * NaCl vs. LPS; + WT vs. Fat-1; (**A**) §§§ p < 0,0001; ## p = 0,0065; *** p < 0,001; + p < 0,05; (**B**) §§ p = 0,0025; §§§ p < 0,0001; (**D**) §§ p = 0,0023; (**E**) §§§ p < 0,0001; §§ p = 0,0028; (**F**) §§§ p = 0,0002; §§ p = 0,0078; ## p = 0,0065.

Expression der Gene wichtiger Zytokine

Da die Zytokine IL-6 und TNF α für die Entstehung von Fieber eine wichtige Bedeutung aufweisen, wurde die Expression ihrer Gene im Rahmen dieses Teilprojektes ebenfalls untersucht (Abbildung 55).

Die Injektion von LPS führte zu einem signifikanten Anstieg der IL-6- und TNF α -Expression in Leber und Milz von Mäusen beider Genotypen (Haupteffekte Behandlung). Es lag fünf Stunden nach der Behandlung mit LPS eine höhere Expression von IL-6 und TNF α vor als 24 Stunden *post injectionem*.

In der Leber LPS-behandelter Fat-1 Mäuse fand nach fünf Stunden im Vergleich zu LPS-behandelten WT Mäusen eine tendenziell höhere IL-6-Expression statt. Nach 24 Stunden war in der Leber der Fat-1 Mäuse eine signifikant geringere relative Expression von IL-6 nachweisbar als in der Leber von LPS-injizierten WT Mäusen (p < 0,05).

Der LPS-bedingte Anstieg der relativen TNF α -Expression war in der Leber von Fat-1 Mäusen fünf Stunden p.i. signifikant höher als in der Leber von WT Mäusen.

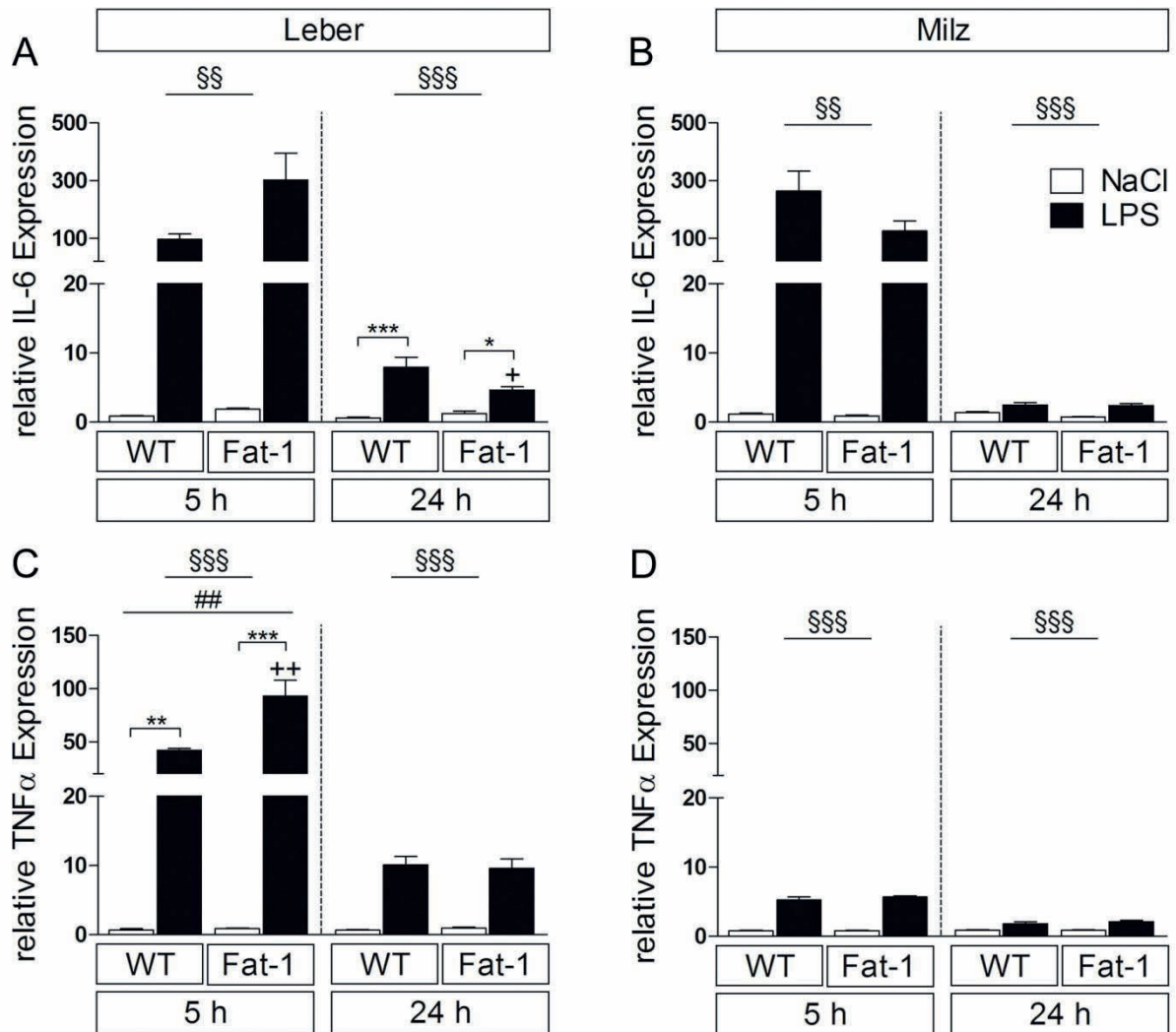


Abbildung 55: Darstellung der relativen Expression der Zytokine IL-6 und TNF α in Leber und Milz von WT- und Fat-1 Mäusen in Abhängigkeit der Behandlung und des Perfusionszeitpunktes

Die relative Expression der Zytokine IL-6 (A, B) und TNF α (C, D) wird als Mittelwert mit Standardfehler dargestellt. Beide Zeitpunkte wurden getrennt voneinander statistisch ausgewertet. Eine Unterbrechung der y-Achse zeigt eine veränderte Skalierung an. Die Expression der Zytokine IL-6 und TNF α wurde durch eine LPS-Injektion signifikant erhöht. Fat-1 Mäuse reagierten auf die LPS-Injektion nach fünf Stunden in der Leber mit einer signifikant höheren TNF α -Expression und nach 24 Stunden mit einer signifikant geringeren IL-6-Expression als LPS-injizierte WT Mäuse. In der Tabelle 77 ist die Anzahl der Proben angegeben. § Haupteffekt Behandlung; # Haupteffekt Genotyp; * NaCl vs. LPS; + WT vs. Fat-1; (A) §§ p = 0,0032; §§§ p < 0,0001; * p < 0,05; *** p < 0,001; + p < 0,05; (B) §§ p = 0,0011; §§§ p < 0,0001; (C) §§§ p < 0,0001; ## p = 0,0086; ** p < 0,01; *** p < 0,001; ++ p < 0,01; (D) §§§ p < 0,0001.

3 Zusammenfassung der wichtigsten Ergebnisse für die Fragestellung nach dem Einfluss von ω -3-Fettsäuren auf eine LPS-induzierte Inflammation

- WT Mäuse zeigten 3,25 – 5 Stunden p.i. ein LPS-induziertes Fieber, das bei Fat-1 Mäusen nicht ausgelöst wurde.
- Fat-1 Mäuse wiesen 3,25 – 7 Stunden nach LPS-Injektion signifikant niedrigere Körperkerntemperaturen auf als WT Mäuse.

- Der circadiane Rhythmus der lokomotorischen Aktivität wurde bei Mäusen beider Genotypen durch die LPS-Injektion gleichermaßen aufgehoben.
- Fat-1 Mäuse zeigten unter Kontrollbedingungen eine signifikant höhere lokomotorische Aktivität als WT Mäuse.
- Die LPS-bedingte Reduktion der Futter- und Wasseraufnahme sowie der Körpermasse wurden durch den Genotyp nicht beeinflusst.
- 24 Stunden p.i. lag im Plasma von LPS-injizierten Fat-1 Mäusen eine signifikant geringere IL-6-Konzentration vor als im Plasma von LPS-injizierten WT Mäusen.
- Im Blut von Mäusen beider Genotypen kam es durch die i.p. Injektion von LPS zu einer Neutrophilie.
- Bei Fat-1 Mäusen lag unter Kontrollbedingungen in der Leber eine signifikant höhere COX-1-Expression vor als bei WT Mäusen.
- 24 Stunden nach der Injektion war in der Milz der Fat-1 Mäuse unter Kontrollbedingungen und nach der Behandlung mit LPS eine signifikant geringere mPGES-Expression nachweisbar als in der Milz von WT Mäusen.
- Fat-1 Mäuse wiesen fünf Stunden nach LPS-Injektion in der Leber sowie 24 Stunden p.i. in der Milz eine signifikant höhere NF-IL6-Expression auf als LPS-injizierte WT Mäuse.
- Der durch LPS bedingte Anstieg der relativen TNF α -Expression war bei Fat-1 Mäusen fünf Stunden p.i. in der Leber signifikant höher als bei WT Mäusen.
- Die durch LPS induzierte erhöhte IL-6-Expression war in der Leber von Fat-1 Mäusen nach 24 Stunden signifikant geringer als in der Leber von WT Mäusen.

IVE Einfluss von ω -3-Fettsäuren auf die physiologischen Parameter des psychologischen Stresses

Der „Novel Environment Stress“ gilt als psychologischer Stress und entsteht durch die Überführung in eine neue Umgebung und deren Erkundung. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Mäuse am vierten Tag nach der Laparotomie in den Messkäfig umgesetzt, was den telemetrisch erfassten „Novel Environment Stress“ (NES) bewirkte (siehe Kapitel IIIC3). Da eine der WT Mäuse eine leicht verzögerte Wundheilung aufwies und deshalb erst später in den Messkäfig umgesetzt wurde, enthält die Auswertung Daten von 22 WT- und 19 Fat-1 Mäusen. Die Körperkerntemperatur und die lokomotorische Aktivität wurden über einen Zeitraum von vier Stunden ausgewertet und mit den zur gleichen Tageszeit ermittelten Basalwerten verglichen, um erste Erkenntnisse des Einflusses von ω -3-FS auf psychologischen Stress zu erhalten.

1 Körperkerntemperatur

Eine Überführung in die neue Umgebung ($t = 0$) führte bei Mäusen beider Genotypen zu einem signifikanten Anstieg der Körperkerntemperatur (Abbildung 56). Dieser war bei Fat-1 Mäusen signifikant höher als bei WT Mäusen.

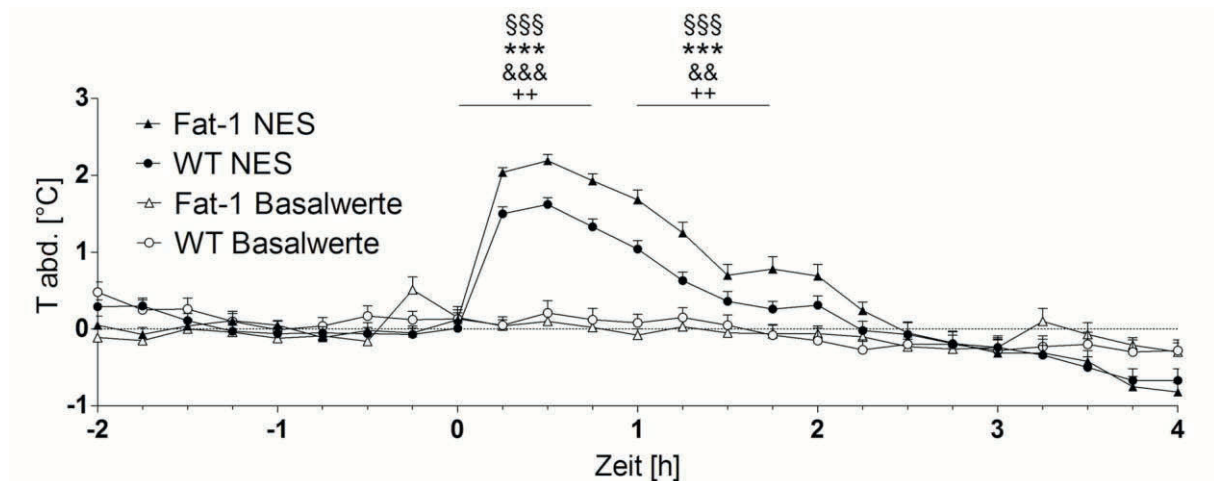


Abbildung 56: Darstellung der durch einen Käfigwechsel induzierten Änderung der Körperkerntemperatur im Vergleich zu ermittelten Basalwerten in Abhängigkeit des Genotyps

Es wurde die telemetrisch erfasste Körperkerntemperatur der ersten vier Stunden nach Induktion eines „Novel Environment Stress“ (NES) durch einen Käfigwechsel ($t = 0$) ausgewertet. Die Differenz der abdominalen Körpertemperatur und dem Mittelwert der über zwei Stunden vor Induktion des NES ermittelten Temperatur wird als Mittelwert mit Standardfehler dargestellt (ΔT abd.). Mäuse beider Genotypen reagierten auf den Käfigwechsel mit einer signifikant erhöhten Körperkerntemperatur im Vergleich zu Basalwerten. Fat-1 Mäuse zeigten eine signifikant höhere Änderung der Körperkerntemperatur als WT Mäuse. Die Daten stammten von 22 WT- und 19 Fat-1 Mäusen. § Haupteffekt Behandlung; * Fat-1 Basalwerte vs. Fat-1 NES; & WT Basalwerte vs. WT NES; + Fat-1 NES vs. WT NES; **0 – 0,75 h:** §§§ $p < 0,0001$; *** $p = 0,000147$; &&& $p = 0,000147$; ++ $p = 0,002572$; **1 – 1,75 h:** §§§ $p < 0,0001$; *** $p = 0,000147$; && $p = 0,001158$; ++ $p = 0,001658$.

Die Berechnung und statistischen Auswertung des Temperaturindex während des NES (Abbildung 57) ergab einen signifikanten behandlungsabhängigen Haupteffekt ($p < 0,0001$) sowie einen signifikanten genotypabhängigen Haupteffekt ($p = 0,0015$). Fat-1 Mäuse wiesen als Reaktion auf den NES einen höheren Temperaturindex auf als WT Mäuse.

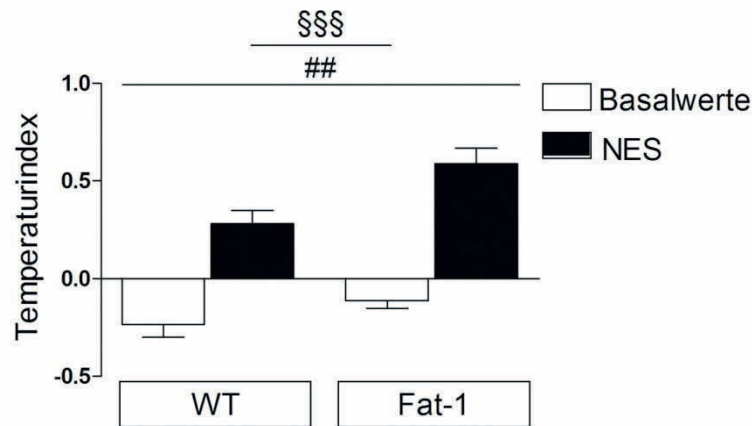


Abbildung 57: Darstellung des Temperaturindex während des „Novel Environment Stress“ (NES) im Vergleich zu ermittelten Basalwerten und in Abhängigkeit des Genotyps

Der Temperaturindex wird durch die Integration der Fläche zwischen der Temperaturkurve und einer Basislinie, die durch zuvor gemessene Werte ermittelt wurde, berechnet. Der Temperaturindex wird als Mittelwert mit Standardfehler dargestellt. Bei beiden Genotypen ergab sich ein Anstieg des Temperaturindex durch den Käfigwechsel. Dieser war bei Fat-1 Mäusen höher als bei WT Mäusen und spiegelt sich in einem signifikanten genotypabhängigen Haupteffekt wieder. Die Daten stammten von 22 WT- und 19 Fat-1 Mäusen. § Haupteffekt Behandlung; # Haupteffekt Genotyp; §§§ $p < 0,0001$; ## $p = 0,0015$.

2 Lokomotorische Aktivität

Die telemetrisch erfasste lokomotorische Aktivität wurde ebenfalls über einen vierstündigen Zeitraum nach Beginn des NES ausgewertet (Abbildung 58). Sowohl WT- als auch Fat-1 Mäuse reagierten auf den Käfigwechsel ($t = 0$) mit einem plötzlichen Anstieg der lokomotorischen Aktivität. Diese wies 15 Minuten nach dem Käfigwechsel entsprechende Höchstwerte auf und sank anschließend kontinuierlich. Allerdings zeigten die Mäuse beider Genotypen über einen Zeitraum von 2,75 Stunden nach Induktion des NES weiterhin eine signifikant höhere lokomotorische Aktivität als unter basalen Bedingungen (Abbildung 58, A, B). Fat-1 Mäuse reagierten auf den NES mit einer signifikant höheren lokomotorischen Aktivität als WT Mäuse (Abbildung 58, D).

Abbildung 58: Darstellung der lokomotorischen Aktivität während des „Novel Environment Stress“ (NES) im Vergleich zu Basalwerten (A, B) und in Abhängigkeit des Genotyps (C, D)

Die lokomotorische Aktivität wird als Mittelwert mit Standardfehler dargestellt. Der Käfigwechsel ($t = 0$) führte bei Mäusen beider Genotypen zu einer signifikant gesteigerten lokomotorischen Aktivität. Fat-1 Mäuse reagierten auf den NES mit einer signifikant höheren Aktivität als WT Mäuse. Die ausgewerteten Daten stammten von 22 WT- und 19 Fat-1 Mäusen. **A, B:** * = Haupteffekt Behandlung; **C, D:** * = Haupteffekt Genotyp; **(A)** * $p = 0,04$; **(B)** * $p = 0,048$; **(A, B, D)** *** $p < 0,0001$; **(A, D)** ** $p = 0,004$.

3 Zusammenfassung der wichtigsten Ergebnisse für die Fragestellung nach dem Einfluss von ω -3-Fettsäuren auf psychologischen Stress

- Der NES bewirkte unabhängig vom Genotyp einen Anstieg der Körperkerntemperatur über 1,75 Stunden.
 - Fat-1 Mäuse wiesen durch den NES einen signifikant höheren Anstieg der Körperkerntemperatur auf als WT Mäuse.
- Durch den NES kam es bei Mäusen beider Genotypen zu einer signifikant gesteigerten lokomotorischen Aktivität.
 - Fat-1 Mäuse reagierten auf den NES mit einer signifikant höheren lokomotorischen Aktivität als WT Mäuse.

V DISKUSSION

VA Untersuchungen zu endogenen TLR-Agonisten bei der Induktion bzw. Aufrechterhaltung systemischer Inflammation

1 **HMGB1 als später Mediator der Sepsis**

Intranukleär vorliegendes „high-mobility group box 1“ (HMGB1) besitzt unter anderem eine Bedeutung für die Reparatur von Schäden der Desoxyribonukleinsäure („deoxyribonucleic acid“, DNA) und die Regulation der Transkription [222, 223]. Durch verschiedene Stimuli kann es allerdings sowohl passiv als auch aktiv aus dem Zellkern freigesetzt werden und in den Extrazellularraum gelangen [229]. Dort entfaltet HMGB1 seine Funktion als „danger / damage-associated molecular pattern“ (DAMP) und weist abhängig von seiner Redox-Form eine pro- oder anti-inflammatorische Aktivität auf [227, 233]. Seine Bedeutung als später Mediator der Sepsis wurde bereits beschrieben [6, 226, 462]. So wird HMGB1 mit Endotoxin-Letalität in Verbindung gebracht, da eine Neutralisation von HMGB1 die Letalität einer durch Lipopolysaccharid (LPS) induzierten Sepsis in Mäusen reduziert [226, 463]. Es besteht auch eine Verbindung zwischen erhöhten Serumkonzentrationen von HMGB1 in CLP-überlebenden („cecal ligation and puncture“, CLP) Mäusen und kognitiven Einschränkungen, die solche Tiere zeigen [6]. CLP ist ein Modell für die polymikrobielle Sepsis und beschreibt eine caecale Ligatur mit anschließender Punktion.

Allerdings wurde noch nicht untersucht, ob HMGB1 eine Aktivierung neuronaler oder glialer Zellen in sensorischen zirkumventrikulären Organen („sensory circumventricular organs“, CVOs) induzieren kann und, ob vermehrt im Blut vorliegendes HMGB1 so möglicherweise an der humoralen Signalübertragung zwischen Peripherie und Gehirn beteiligt ist. In dieser Teilstudie der vorliegenden Arbeit wurde deshalb insbesondere das Potenzial von Disulfid-HMGB1 zur Aktivierung von neuronalen sowie glialen Zellen der Area postrema (AP) untersucht.

1.1 *Anhaltendes LPS-induziertes Fieber trotz basaler IL-6- und TNF α -Konzentrationen im Plasma*

Erwartungsgemäß reagierten Ratten der vorliegenden Arbeit auf die intrapitoneale (i.p.) Injektion von LPS (10 mg/kg) anfänglich mit einer signifikanten Hypothermie, welche bis zwei Stunden post injectionem (p.i.) anhielt ($p = 0,024$). Anschließend stieg die Körperkerntemperatur und ging in ein Fieber über. Dieses blieb bis zur Perfusion nach 24 Stunden bestehen (Abbildung 22). Unter identischen Bedingungen reagierten die mit LPS injizierten Ratten in den Versuchen von Harden *et al.* (2014) ebenfalls mit einer anfänglichen Hypothermie, die schließlich in ein Fieber überging [218]. Dieses Fieber dauerte bis zur

Perfusion nach sechs Stunden an [218]. In einem anderen Versuchsaufbau erhielten Ratten eine i.p. Injektion von LPS (5 mg/kg) und zeigten nach einer anfänglichen Hypothermie eine im Vergleich zu Kontrollratten gesteigerte Körperkerntemperatur während der Lichtperioden über drei Tage [109]. Da die Raumtemperatur bei den Versuchen von Töllner *et al.* (2000) lediglich 22 °C betrug und eine LPS-Dosis von 5 mg/kg verabreicht wurde, sind die dort gewonnenen Ergebnisse nicht uneingeschränkt mit denen der vorliegenden Arbeit (Raumtemperatur 28 °C, LPS [10 mg/kg]) vergleichbar. Dennoch lassen die vorgenannten Ergebnisse darauf schließen, dass auch bei dem Versuch der vorliegenden Doktorarbeit das von den LPS-injizierten Ratten gezeigte Fieber länger als bis zum Zeitpunkt der Perfusion (24 Stunden p.i.) angehalten hätte.

Bei dem klassischen humoralen Modell zur Fieberentstehung bindet i.p. injiziertes LPS an den „toll-like“ Rezeptor-4 (TLR4) verschiedener Zellen wie beispielsweise von Leukozyten. Diese werden über eine Aktivierung von „nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells“ (NFκB) zur Zytokin-Synthese stimuliert. Als erstes Zytokin wird Tumornekrosefaktor-α (TNFα) freigesetzt, darauf folgen Interleukin-1β (IL-1β) und IL-6 [89]. Die Zytokine gelangen mit dem Blut zum Gehirn, bewirken dort über verschiedene Wege eine Aktivierung von neuronalen sowie glialen Zellen und lösen durch eine induzierte Prostaglandin-Synthese schließlich Fieber aus [464]. TNFα und IL-1β werden Funktionen für die Aufrechterhaltung von Fieber zugesprochen, wohingegen insbesondere zentrales IL-6 an der Initiierung von LPS-induziertem Fieber beteiligt zu sein scheint [2]. In der hier vorliegenden Arbeit wurden die Ratten des HMGB1 Projektes nach 6 und nach 24 Stunden perfundiert. Im Plasma der mit LPS injizierten Ratten lagen erwartungsgemäß nach sechs Stunden signifikant höhere Konzentrationen von IL-6 und TNFα vor als im Plasma der mit Phosphat gepufferter Saline („phosphate buffered saline“, PBS) behandelten Kontrollratten (Abbildung 23, $p = <0,001$). Interessanterweise unterschieden sich die IL-6- und TNFα-Konzentrationen der LPS-behandelten Ratten 24 Stunden p.i. nicht mehr signifikant von den Konzentrationen im Plasma der Kontrollratten, obwohl die mit LPS behandelten Ratten weiterhin eine signifikant gesteigerte Körperkerntemperatur aufwiesen.

Wie bereits erwähnt ist HMGB1 als später Mediator der Sepsis bekannt [226]. So kann eine i.c.v. Applikation von HMGB1 unter anderem Fieber auslösen [456]. Demnach war die Konzentration von HMGB1 im Plasma ebenfalls im Rahmen der vorliegenden Dissertation von Interesse. Die LPS-abhängige Freisetzung von HMGB1 wurde bereits in verschiedenen Experimenten gezeigt. Wang *et al.* (1999) stimulierten eine Mausmakrophagen-ähnliche Zelllinie mit LPS (100 ng/ml) und konnten die Freisetzung von HMGB1 nachweisen [226]. Diese begann nach 6 – 8 Stunden und blieb über den Untersuchungszeitraum von 24

Stunden bestehen. Interessanterweise lag keine inverse Korrelation zwischen der gesteigerten HMGB1-Konzentration im Zellüberstand und der Anzahl vitaler Zellen vor [226], sodass die Freisetzung vornehmlich aktiv erfolgt sein musste. Auch bei Inkubation mit TNF α oder IL-1 β wurde HMGB1 dosis- und zeitabhängig von Makrophagen-ähnlichen Zellen freigesetzt [226]. Im Zellüberstand peritonealer Makrophagen von Wildtyp (WT) Mäuse (Balb/C und C3H/HeN) war 18 Stunden nach beginnender Inkubation mit LPS (1 μ g/ml) ebenfalls eine erhöhte HMGB1-Konzentration nachweisbar. Hingegen lag die HMGB1-Konzentration im Überstand stimulierter Makrophagen von LPS-resistenten Mäusen (C3H/HeJ) in einem nicht detektierbaren Bereich [226]. Aber auch *in vivo* konnte bereits eine mit Sepsis assoziierte, lang anhaltend gesteigerte Konzentration von HMGB1 in der Zirkulation festgestellt werden [6, 226, 463, 465]. So waren im Serum von LPS-injizierten Mäusen (10 mg/kg, i.p.) nach acht Stunden erhöhte HMGB1-Konzentrationen nachweisbar, die 16 - 32 Stunden p.i. ein Plateau aufwiesen [226]. Auch bei der CLP konnte eine verzögerte HMGB1-Freisetzung gezeigt werden [6, 463]. Bei Versuchen von Yang *et al.* (2004) lag im Serum der Mäuse in den ersten acht Stunden nach CLP keine signifikant gesteigerte HMGB1-Konzentration vor, innerhalb der folgenden zehn Stunden stieg die Konzentration allerdings bis zu einer statistischen Signifikanz im Vergleich zu Kontrollen an. Dieser signifikante Anstieg blieb mindestens bis zu 72 Stunden nach CLP bestehen [463]. Chavan *et al.* (2012) verfolgten die Serumkonzentrationen von HMGB1 sogar über zwölf Wochen nach CLP und konnten HMGB1 bis zur achten Woche nach CLP in signifikant höheren Konzentrationen nachweisen als bei Kontrollmäusen [6]. Im Einklang mit den beschriebenen Ergebnissen konnte bei den Versuchen der vorliegenden Arbeit ebenfalls eine anhaltende Steigerung der HMGB1-Plasmakonzentration festgestellt werden (Abbildung 23). In Plasmaproben der mit LPS injizierten Ratten lagen sowohl sechs als auch 24 Stunden p.i. signifikant höhere HMGB1-Konzentrationen vor als im Plasma der mit PBS injizierten Ratten ($p < 0,05$). Eine Aussage über die Zelltypen, aus denen das im Plasma zirkulierende HMGB1 stammte, und ob es aktiv oder passiv freigesetzt wurde, ist dabei nicht möglich. Anhand der bei den *in vitro* Versuchen von Wang *et al.* (1999) fehlenden inversen Korrelation zwischen der HMGB1-Konzentration im Überstand und der Anzahl vitaler Makrophagen, kann allerdings von einer vornehmlich aktiven Freisetzung durch Leukozyten ausgegangen werden [226]. Der nach 48 Stunden erbrachte Nachweis einer signifikant höheren HMGB1-Konzentration in der Peritonealflüssigkeit von CLP-behandelten Mäusen im Vergleich zu Kontrollmäusen, spricht ebenfalls für eine Freisetzung aus rekrutierten Leukozyten [463]. Die bei Mäusen nachgewiesene Reduktion der Endotoxin-Letalität durch eine Verabreichung von Escin liefert ebenfalls derartige Hinweise [466]. Escin ist ein Inhaltsstoff von Rosskastanien, dem anti-ödematöse und anti-inflammatorische Eigenschaften zugesprochen werden. Cheng *et al.* (2015) postulierten, dass die

letalitätshemmende Wirkung von Escin auf einer Reduktion der HMGB1-Freisetzung aus Makrophagen beruht [466]. Prinzipiell sind allerdings auch weitere Quellen als Ursache für die gesteigerte HMGB1-Konzentration im Blut in Betracht zu ziehen.

Die im Tierversuch mit verschiedenen Sepsismodellen generierten Ergebnisse sind mit der HMGB1-Kinetik humaner Sepsispatienten vergleichbar und stellen somit trotz ihrer Einschränkungen [467] geeignete Modellsysteme dar. Auch in humanen Sepsispatienten liegt eine im Vergleich zu gesunden Probanden anhaltend gesteigerte HMGB1-Konzentration im Plasma vor [226, 465].

1.2 Reduzierte mRNA-Expression von HMGB1, RAGE und TLR4 in der Leber von LPS-injizierten Ratten

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde außerdem untersucht, ob die i.p. Injektion von LPS eine Modulation der „messenger RNA“ (mRNA)-Expression von HMGB1 sowie seiner Rezeptoren „receptor for advanced glycation end-products“ (RAGE) und TLR4 in Hypothalamus, Leber oder Milz bewirkt. Ursprünglich wurde HMGB1 als „housekeeping gene“ diskutiert, doch mittlerweile ist eine gewebeabhängige und regulierbare Expression nachgewiesen worden [468]. Durch die Versuche von Wang *et al.* (1999) wurde gezeigt, dass die gesteigerte HMGB1-Konzentration im Plasma der mit LPS behandelten Ratten nach acht, zwölf und 16 Stunden nicht mit einer höheren Expression von HMGB1-mRNA in Makrophagen dieser Tiere einher geht [226]. Deshalb wurde postuliert, dass das verstärkt zirkulierende HMGB1 nicht aus einer *de novo* Synthese resultiert, sondern aus dem Zellkern freigesetzt wird. Dennoch war eine kompensatorisch gesteigerte HMGB1 mRNA-Expression bei den Versuchen der vorliegenden Doktorarbeit, aufgrund einer Erneuerung des intrazellulären HMGB1, denkbar. Interessanterweise lagen in Leber, Milz und Hypothalamus von LPS-injizierten Ratten der vorliegenden Arbeit jedoch geringere Expressionen von HMGB1, RAGE und TLR4 vor als bei Kontrollratten (Abbildung 24). In der Leber erreichte diese Reduktion ein statistisch signifikantes Niveau. Diese Ergebnisse erwecken den Eindruck eines negativen „Feedbacks“, allerdings sind in der Literatur in anderen Versuchsmodellen bisher gegensätzliche Ergebnisse beschrieben worden. So ist HMGB1 sechs Stunden nach einer experimentell induzierten, traumatischen Gehirnverletzung („traumatic brain injury“, TBI) sowohl mit einer Western Blot Analyse als auch immunhistochemisch in geringeren Mengen nachweisbar als im Gehirn von Kontrollratten; allerdings steigt HMGB1 auf Proteinebene anschließend kontinuierlich wieder an [469]. Auch für RAGE wurde auf Proteinebene eine höhere Expression im Gehirn der TBI-Ratten gezeigt [469]. Obwohl eine Bestimmung der Expression auf mRNA-Ebene bei den Versuchen von Gao *et al.* (2012) nicht erfolgte, könnte der angestiegenen Proteinmenge eine gesteigerte

mRNA-Expression zugrunde gelegen haben. Die i.p. Stimulation von Mäusen mit LPS (10 mg/kg) bewirkte in Versuchen von Sass *et al.* (2002) nach 1 - 2 Stunden ebenfalls einen Anstieg der HMGB1 mRNA-Expression in der Leber [470]. Interessanterweise waren allerdings sechs und 24 Stunden p.i. reduzierte HMGB1 mRNA-Expressionen in der Leber nachweisbar. Dies steht in Einklang mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit. In den von O'Connor *et al.* (2003) durchgeführten Versuchen lag nach i.p. Applikation von LPS eine unveränderte mRNA-Expression von HMGB1 im Hypothalamus vor [456].

Für RAGE ist in der Literatur, entgegen den in der vorliegenden Dissertation erbrachten Ergebnissen, ein positives „Feedback“ beschrieben worden. So führt eine NFκB-Aktivierung, die unter anderem durch eine Stimulation von RAGE induziert werden kann und beispielsweise während einer Inflammation vorliegt, zu einer gesteigerten mRNA-Expression von RAGE [471]. In eigenen Untersuchungen wurde in Lebern von LPS-injizierten Ratten hingegen eine signifikant geringere RAGE-Expression nachgewiesen als in Lebern von Kontrollratten.

Über den Zusammenhang zwischen LPS und einer gesteigerten bzw. reduzierten TLR4-Expression liegen kontroverse Ergebnisse vor [33, 472, 473].

Zu den Mechanismen eines möglichen negativen „Feedbacks“ lassen sich zum jetzigen Zeitpunkt lediglich vage Hypothesen aufstellen, die allerdings eher eine Verhinderung der gesteigerten mRNA-Expression erklären und weniger die gegenüber den Kontrollen reduzierte Expression. Nachfolgend wird auf mögliche Hypothesen kurz eingegangen. Wang *et al.* (2003) postulierten, dass die 6 – 48 Stunden nach CLP bei seinen Versuchen festgestellte gesteigerte mRNA-Expression von HMGB1 in der Leber zytokinabhängig sei und durch einen von der Januskinase (JAK) abhängigen Weg induziert werde [474]. Da die Konzentrationen von IL-6 und TNFα bei eigenen Versuchen 24 Stunden p.i. nicht mehr signifikant erhöht waren (Abbildung 23), könnte dies eine mögliche Ursache für die reduzierte HMGB1-Expression nach 24 Stunden darstellen. Auch mit den von Sass *et al.* (2002) gewonnenen Ergebnissen [470] lässt sich die Hypothese der zytokinabhängig gesteigerten mRNA-Expression von HMGB1 in Einklang bringen. So führte die i.p. Injektion von LPS (10 mg/kg) bei Mäusen zunächst zu einem signifikanten Anstieg der HMGB1-Expression in der Leber; 6 - 12 Stunden p.i. lag allerdings eine signifikant geringere HMGB1-Expression vor als bei Kontrolltieren. Dies korrelierte mit dem kontinuierlichen Abfall der TNFα-Expression in der Leber sowie dessen Plasmakonzentration ab eine Stunde p.i. [470]. Möglich ist ebenfalls, dass aus den untersuchten Organen (Leber, Milz, Hypothalamus) nur wenig HMGB1 freigesetzt wurde und deshalb keine kompensatorisch angehobene Expression erforderlich war. Es bleibt des Weiteren zu bedenken, dass die für die Bestimmung von HMGB1 zur Verfügung stehenden „enzyme-linked immunosorbent assays“

(ELISAs) nicht in der Lage sind, zwischen den verschiedenen Redox-Formen zu diskriminieren. Demnach könnte eine Oxidation von freigesetztem HMGB1 bis hin zum anti-inflammatorischen Sulfonyl-HMGB1 das negative „Feedback“ bewirkt haben. Sulfonyl-HMGB1 ist nicht in der Lage die Rezeptoren RAGE und TLR4 zu stimulieren, verhindert also die Aktivierung von NFκB und somit die Expression pro-inflammatorischer Zytokine und RAGE. Allerdings ist die geringere Expression von HMGB1, RAGE und TLR4 in den LPS-behandelten Ratten, gegenüber der Expression von PBS-injizierten Ratten, nicht zwangsläufig mit der verhinderten Expressionssteigerung durch Sulfonyl-HMGB1 zu erklären.

1.3 LPS-abhängige Freisetzung von HMGB1 aus Gehirnstrukturen, die für Fieber relevant sind

Immunhistochemisch konnte in der vorliegenden Arbeit zum ersten Mal eine extranukleäre Translokation von HMGB1 als Reaktion auf die i.p. Injektion von LPS in zwei verschiedenen Gehirnregionen nachgewiesen werden (Abbildung 25). Dabei lag HMGB1 in der AP und dem „median preoptic nucleus“ (MnPO) LPS-injizierter Ratten 24 Stunden p.i. vermehrt perinukleär im Zytoplasma vor, wohingegen bei den mit PBS injizierten Ratten ein höheres Aufkommen von intranukleärem HMGB1 zu detektieren war. Neben der perinukleären Translokation führte die periphere LPS-Injektion auch zu einer Reduktion der Signalintensität von HMGB1, was auf eine lokale Freisetzung von HMGB1 hindeutet. Obwohl dieser Zusammenhang in Versuchen der vorliegenden Dissertation nicht überprüft wurde, ist aus der Literatur eine Korrelation der verminderten HMGB1-Detektion im Gehirn und einer gesteigerten HMGB1-Konzentration in der Cerebrospinalflüssigkeit bereits gezeigt worden [457, 475]. Demnach kann auch im Rahmen der vorliegenden Arbeit die Reduktion von HMGB1-Signalen im Gehirn als Hinweis auf eine Freisetzung bewertet werden. *In vitro* führte die Inkubation von Primärkulturen der AP mit LPS auch zu einem reduzierten Anteil von Zellen mit intranukleärer HMGB1-Immunoreaktivität (Abbildung 26: $p < 0,0001$), was ebenfalls einen Hinweis auf LPS-induzierte Freisetzung darstellen kann. Perinukleäre Signale waren allerdings in den hier durchgeführten *in vitro* Versuchen nicht nachweisbar.

Die AP kann als sensorisches zirkumventrikuläres Organ („sensory circumventricular organ“, sCVO) mit zirkulierenden Zytokinen und „pathogen-associated molecular patterns“ (PAMPs) wie LPS direkt in Kontakt treten und über diese aktiviert werden [35, 38]. Ebenso können Zellen der AP über vagale Afferenzen, die in der AP enden [39-41], stimuliert werden. Durch diese Aktivierung der AP kann die Information über neuronale Efferenzen an hypothalamische Kerngebiete, wie beispielsweise den MnPO, gelangen [2, 41]. Dem MnPO kommt wiederum eine entscheidende Bedeutung für die Auslösung der Fieberreaktion über

eine induzierte Synthese von Prostaglandin E₂ (PGE₂) zu [476, 477]. Ob HMGB1 im MnPO sekundär aufgrund von Signalen aus der AP freigesetzt wurde oder beispielsweise PGE₂ von aktivierten Endothelzellen dazu geführt hat, ist bei den Versuchen der vorliegenden Dissertation nicht nachweisbar. Neben diesen beiden Kommunikationswegen ist die Beteiligung weiterer Faktoren denkbar (Abbildung 1).

Die immunhistochemische Detektion von HMGB1 ist im Gehirn aufgrund nachfolgender Gegebenheiten nicht trivial. Die starke HMGB1-Expression im perinatalen Gehirn nimmt mit dem Alter deutlich ab [478-480], ist aber induzierbar [481]. Im adulten Gehirn lässt sich HMGB1 nur noch in wenigen Zellen nachweisen. Diese befinden sich insbesondere in Regionen, die einer kontinuierlichen Neurogenese unterliegen [479]. Grundsätzlich kann HMGB1 dynamisch zwischen der intra- und extranukleären Lokalisation innerhalb der Zelle wechseln [482]. Das Problem der Interpretation von immunhistochemisch generierten Ergebnissen im Gehirn besteht in der von Mosevitsky *et al.* (1989) beschriebenen Verschiebung der Dynamik hin zu einer zytoplasmatischen Lokalisation schon unter basalen Bedingungen [483]. Dennoch waren in der vorliegenden Arbeit insbesondere bei der Immunhistochemie der AP deutliche behandlungsabhängige Unterschiede zu sehen. Diese Ergebnisse stehen in Einklang mit den Ergebnissen einer CLP-abhängigen Translokation von HMGB1 [484]. Auch ischämische [457, 485, 486], hämorrhagische [458] und traumatische [469] Gewebeschäden des Gehirns gingen im Vergleich zur jeweiligen Kontrollgruppe lokal mit einer vermehrten Translokation von HMGB1 in das Zytoplasma und einer reduzierten quantitativen Detektierbarkeit von HMGB1 einher. In den jeweiligen Kontrollgruppen lagen verstärkt intranukleäre HMGB1-Signale im Gehirn vor. Sun *et al.* (2014) zeigten dabei, dass die durch eine experimentell simulierte Subarachnoidalblutung induzierte Freisetzung von HMGB1 sowohl aktiven als auch passiven Mechanismen zu unterliegen scheint [458]. Sie führten in *corticalen* Gehirnschnitten einen gleichzeitigen Nachweis von HMGB1 und der DNA toter Zellen durch. Hierfür wurde Propidiumjodid (PI) verwendet, das nur die perforierte Zellmembran von toten Zellen passieren und deren Nukleinsäuren anfärben kann. Eine Kolo-kalisation von PI und zytoplasmatischem HMGB1 wurde als passive Translokation, zytoplasmatisches HMGB1 in PI-negativen Zellen als aktive Translokation gewertet [458]. Beide Freisetzungsmechanismen sind prinzipiell auch für die in den Versuchen der vorliegenden Arbeit beobachtete Translokation denkbar. Ein Absterben der Zellen ist allerdings eher unwahrscheinlich. Da das bei LPS-injizierten Ratten im perinukleären Bereich befindliche HMGB1 nicht homogen verteilt vorlag, ist in den eigenen Untersuchungen nicht sicher zu bestimmen, ob es noch intrazytoplasmatisch lokalisiert war oder sich bereits extrazellulär befand (Abbildung 25).

1.4 Untersuchung zum pro-inflammatorischen Potenzial von Disulfid-HMGB1 auf neuronale sowie gliale Zellen der AP

In der hier vorliegenden Arbeit wurde *in vitro* untersucht, ob Disulfid-HMGB1 ein pro-inflammatorisches Potenzial zur Aktivierung neuronaler und glialer Zellen der AP aufweist. Erst seit einigen Jahren ist bekannt, dass die Redox-Form von HMGB1 maßgeblich dessen Wirkungsweise bestimmt [227, 233]. Bei den vor dieser Erkenntnis generierten Ergebnissen wurde die jeweilige Redox-Form nicht berücksichtigt. Daher kann in solchen Studien die ermittelte Wirkung bzw. Wirkungslosigkeit nicht immer grundsätzlich auf HMGB1 zurückgeführt werden, sondern muss in Hinblick auf eine posttranslationale Modifikation kritisch hinterfragt und mit Vorsicht interpretiert werden.

Zur Bestimmung der Redox-Form von HMGB1 sind massenspektrometrische Methoden beschrieben, die mit einer 2D Gelelektrophorese gekoppelt werden können [233, 247, 482]. Welche Redox-Form von HMGB1 bei LPS-injizierten Ratten in der Peripherie und lokal im Gehirn freigesetzt wurde, ist bei den Versuchen der vorliegenden Dissertation allerdings nicht bestimmt worden. Ergebnisse aus der Literatur sprechen aber für zirkulierendes Disulfid-HMGB1. So fanden Lian *et al.* (2017) heraus, dass vollständig reduziertes HMGB1 nach einer i.c.v. Injektion *in vivo* zumindest teilweise zu Disulfid-HMGB1 oxidiert wird, so zu einer Synthese von TNF α im Gehirn führt und dadurch schließlich depressionsartiges Verhalten auslöst [487]. Eine synthetische Mutante von vollständig reduziertem HMGB1, die nicht oxidiert werden kann, induzierte weder eine TNF α -Synthese im Gehirn noch ein verändertes Verhalten [487]. Da auch bei der im Rahmen dieser Arbeit induzierten systemischen Entzündung ein oxidatives Milieu zu erwarten ist [488, 489], erscheint eine (teilweise) Oxidation zum Disulfid-HMGB1 als wahrscheinlich.

1.4.1 Die Bedeutung von HMGB1 für die genomische Aktivierung von neuronalen sowie glialen Zellen der Area postrema und die resultierende Zytokin-Synthese

HMGB1 ist dafür bekannt, eine NF κ B-Aktivierung unter anderem in Monozyten/Makrophagen [247], Endothelzellen [236], neutrophilen Granulozyten [490] und Fibroblasten [233] zu induzieren. Im Gehirn wird ebenfalls eine nukleäre Translokation von NF κ B durch HMGB1 bewirkt [458]. Bisher wurden allerdings weder die genomisch aktivierten Zelltypen differenziert, noch die Zellen der sCVOs in ihrer Sensibilität untersucht. In der vorliegenden Arbeit konnte erstmalig gezeigt werden, dass eine einstündige Inkubation mit HMGB1 (5 μ g/ml) *in vitro* zu einer intranukleären Translokation von NF κ B in Astrozyten, Neuronen und Mikrogliazellen der AP führt (Abbildung 27). Versuche von Ohnishi *et al.* (2014) konnten hingegen nach einer einstündigen Inkubation primärer Astrozyten-Kulturen mit HMGB1 keine nukleäre Translokation von NF κ B nachweisen [491]. Für das zu den Versuchen der

vorliegenden Arbeit abweichende Ergebnisse sind verschiedene Erklärungen denkbar. Zum einen handelte es sich bei dem von Ohnishi *et al.* (2014) verwendeten HMGB1 um natives HMGB1, das aus bovinem Thymus isoliert wurde. Dessen Redox-Form ist nicht definiert. Da intranukleäres HMGB1 aber in seiner vollständig reduzierten Form vorliegt [234], ist es wahrscheinlich, dass es sich bei aus dem Thymus isoliertem HMGB1 vermehrt um vollständig reduziertes HMGB1 handelte. Es wirkt chemotaktisch, aber nicht zytokininduzierend [233]. Die für die Chemotaxis relevante Aktivierung von RAGE kann sowohl mit einem NFκB-abhängigen als auch mit einem NFκB-unabhängigen Weg einhergehen [238, 245]. Zum anderen wurden die von Ohnishi *et al.* (2014) verwendeten Primärkulturen aus dem gesamten Großhirn hergestellt [491]. Eine Betrachtung funktioneller Einheiten erfolgte dabei nicht. Es ist möglich, dass Zellen der AP sensitiver auf eine Inkubation mit HMGB1 reagieren als Zellen anderer Gehirnregionen. Zusätzlich war in Primärkulturen von Ohnishi *et al.* (2014) kein „crosstalk“ zwischen unterschiedlichen Zelltypen möglich, da separierte Kulturen von Astrozyten hergestellt wurden.

LPS bewirkt eine gesteigerte Expression von „nuclear factor interleukin-6“ (NF-IL6) in verschiedenen Zelltypen. Dies konnte unter anderem auch in Astrozyten, Mikrogliazellen, Neuronen und perivaskulären Makrophagen nachgewiesen werden [45, 48]. Neben einer direkten Induktion durch LPS kann die NF-IL6-Expression auch durch IL-1β, TNFα oder IL-6 induziert werden [53, 492]. HMGB1 wurde bisher nicht in Hinblick auf eine gesteigerte NF-IL6-Expression untersucht. In den Versuchen der vorliegenden Arbeit konnte erstmalig gezeigt werden, dass nach einer sechsständigen Inkubation mit HMGB1 (5 µg/ml) immunzytochemisch keine gesteigerte NF-IL6-Expression in neuronalen oder glialen Zellen der AP nachweisbar ist (Abbildung 28). Unter Kontrollbedingungen wiesen bereits etwa 40 % der untersuchten Zellen ein immunzytochemisch detektierbares intranukleäres NF-IL6-Signal auf. Dies deutet auf eine Aktivierung der Zellen unter Kontrollbedingungen hin, die durch dynamische Wachstums- und Differenzierungsprozesse in der primären Zellkultur erklärbar sein könnte.

Die mit einer intranukleären Translokation von NFκB einhergehende genomische Zellaktivierung führt unter anderem zur Transkription pro-inflammatorischer Zytokine. Im Institut für Veterinär-Physiologie und –Biochemie der JLU Gießen konnte in den Primärkulturen der AP bereits eine durch LPS (100 µg/ml) induzierte Synthese von IL-6 und TNFα nachgewiesen werden [35]. In der hier vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob Disulfid-HMGB1 dosis- und zeitabhängig ebenfalls eine Freisetzung von IL-6 und TNFα in den Zellüberstand bewirkt. Tatsächlich war in den Überständen von HMGB1-stimulierten Primärkulturen der AP eine signifikant höhere IL-6-Konzentration im Vergleich zu PBS-inkubierten Kontrollkulturen nachweisbar (Abbildung 29). Hierbei lagen allerdings weder eine

Dosis- noch eine Zeitabhängigkeit vor. Hingegen wurde durch Inkubation mit Disulfid-HMGB1 interessanterweise die Synthese von TNF α nicht signifikant gesteigert (Abbildung 30). Bei Versuchen von Agnello *et al.* (2002) führte eine i.c.v. Injektion von rekombinantem HMGB1 (1 μ g/Maus) hingegen sowohl zu einem Anstieg von bioaktivem IL-6 als auch von bioaktivem TNF α in Gehirnhomogenaten [455]. Die höchsten Konzentrationen von TNF α lagen 1,5 Stunden p.i. vor; IL-6 stieg zeitverzögert an und wies nach sechs Stunden seine Maximalkonzentration auf [455]. Bei den genannten Versuchen von Agnello *et al.* (2002) wurde die Redox-Form von HMGB1 nicht beachtet. Aber auch eine i.c.v. Injektion von Disulfid-HMGB1 führte in den Versuchen von Lian *et al.* (2017) zu einem Anstieg der hippocampalen TNF α -Konzentration auf Proteinebene [487]; IL-6-Konzentrationen wurden bei diesen Versuchen nicht untersucht. Warum bei den Versuchen der vorliegenden Dissertation keine TNF α -Sekretion induziert wurde, bleibt unklar. Eine mögliche Ursache könnte in der Zusammensetzung der Primärkulturen bestehen, da diese keine Endothelzellen enthalten. Endotheliale Zellen der Blut-Hirn-Schranke (BHS) sind jedoch für die Sekretion verschiedener neuroimmuner Substanzen (z. B. Zytokine) bekannt [493] und könnten somit auch an der im Gehirn nachgewiesenen TNF α -Synthese [455, 487] beteiligt gewesen sein. In den Primärkulturen der AP war in früheren Versuchen allerdings trotz fehlender Endothelzellen, die durch LPS unter anderem zu einer Synthese von TNF α angeregt werden [493], eine LPS-induzierte TNF α -Freisetzung nachweisbar [35]. Dennoch könnten Endothelzellen maßgeblich an der HMGB1-abhängigen TNF α -Synthese beteiligt sein und ihre Abwesenheit somit die unveränderte Konzentration von TNF α im Zellüberstand erklären. Tatsächlich wurde eine HMGB1-abhängige TNF α -Synthese bereits in humanen, umbilicalen Endothelzellen gezeigt [494].

Zusätzlich erfolgte in eigenen Versuchen ein immunzytochemischer, qualitativer Nachweis der HMGB1-induzierten IL-1 β -Synthese durch Mikrogliazellen der AP (Abbildung 31). In primären mikroglialen Zellkulturen, die aus dem gesamten Gehirn neonataler Ratten hergestellt wurden, führte eine Inkubation mit nativem bovinen HMGB1 (1 μ g/ml) nach zwei Stunden zu einer gesteigerten mRNA-Expression von IL-1 β [491]. Nach sechs Stunden untersuchten Ohnishi *et al.* (2014) die Konzentration von IL-1 β im Zellüberstand auf Proteinebene und konnten einen HMGB1-abhängigen Anstieg feststellen [491]. Auch *in vivo* bewirkten die i.c.v. [456] sowie die *subarachnoidale* [458] Injektion von rekombinantem HMGB1 eine gesteigerte IL-1 β -Expression im Gehirn.

1.4.2 Direkte Aktivierung von neuronalen sowie glialen Zellen durch bei einer Sepsis zirkulierendes LPS und HMGB1

Sowohl die nukleäre Translokation von NF κ B als auch die induzierte Synthese von IL-6 und IL-1 β deuten lediglich indirekt auf eine Aktivierung von neuronalen sowie glialen Zellen der AP-Primärkultur durch Disulfid-HMGB1 hin. Zur Beurteilung einer direkten Zellaktivierung wurde die „Ca²⁺-Imaging“ Technik verwendet. Diese nutzt den Zusammenhang zwischen einer Zellaktivierung und dem schnellen Anstieg des intrazellulären Kalziums, das als „second messenger“ von großer Bedeutung ist [426]. Ein Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration ([Ca²⁺]_i) wird als Zellaktivierung bewertet und konnte in Primärkulturen der AP bereits als Reaktion auf die Superfusion mit verschiedenen immunologischen Stimuli wie LPS, IL-1 β und TNF α gezeigt werden [35, 38]. In dissoziierten Zellen von aus Ratten isolierten Spinalganglien waren HMGB1-abhängige Zellaktivierungen mit Hilfe des „Ca²⁺-Imagings“ bereits detektierbar [244, 495]. Die Bestimmung der [Ca²⁺]_i stellt also ein geeignetes Mittel für die Untersuchung auf eine direkte Aktivierung neuronaler sowie glialer AP-Zellen durch Disulfid-HMGB1 dar.

Interessanterweise reagierten in der vorliegenden Arbeit lediglich Neurone auf die Applikation von Disulfid-HMGB1 mit einer Δ Ratio (340 nm / 380 nm) $\geq 0,05$. Nur eine derartige Reaktion wurde als induzierte Stimulation bewertet. Astrozyten und Mikrogliazellen waren bei keiner der verwendeten HMGB1-Konzentrationen responsiv (Abbildung 32). Aber auch die Responsivität der Neurone war sehr gering und lag lediglich zwischen 0,83 % (HMGB1 [0,1 μ g/ml, 1 μ g/ml]) und 1,54 % (HMGB1 [0,01 μ g/ml]) der untersuchten Neurone. Die Bolusapplikation von HMGB1 mit einer Konzentration von 5 μ g/ml führte bei keiner der untersuchten Zellen zu einer Δ Ratio $\geq 0,05$. In sensorischen Neuronen aus Spinalganglien von Ratten wurde die Responsivität für HMGB1 ebenfalls bereits getestet. Zum einen reagierten deutlich mehr nozizeptive Neurone (70 %) auf die Bolusapplikation von HMGB1 (0,65 μ g/ml) mit einem Anstieg der [Ca²⁺]_i als nicht-nozizeptiven Neurone (19 %) [495]. Zum anderen wurde in einer Folgestudie ein Zusammenhang zwischen der Redox-Form von HMGB1 (27 μ M) und der Responsivität von sensorischen Neuronen festgestellt [244]. Dabei reagierten 14,58 % der sensorischen Neurone auf eine Applikation von vollständig reduziertem HMGB1, aber nur 7,55 % wurden durch die Inkubation mit Disulfid-HMGB1 stimuliert. In Primärkulturen hippocampaler Neurone von Mäusen konnten weder vollständig reduziertes HMGB1 noch Disulfid-HMGB1 einen Anstieg der [Ca²⁺]_i bewirken [496]. Disulfid-HMGB1 war allerdings in der Lage einen durch N-methyl-D-aspartat induzierten Kalziumanstieg zu verstärken [496]. Es ergeben sich keine Hinweise über die Mechanismen der differentiellen HMGB1-Responsivität unterschiedlicher Zelltypen und Gewebestrukturen. Da aber deutlich mehr Zellen der AP responsiv auf LPS reagierten als auf HMGB1 und für

die LPS-Responsivität keine Abhängigkeit vom Zelltyp vorlag (Abbildung 33) [35], scheint eine fehlende oder geringe Expression funktioneller TLR4s nicht als Grund für die geringe Responsivität gegenüber Disulfid-HMGB1 in Frage zu kommen.

HMGB1 kann Bindungen mit einer Vielzahl von Molekülen eingehen und über entsprechende Rezeptoren eine Wirkung entfalten [237-239]. Für LPS sind zwei Bindungsstellen am HMGB1 bekannt [497]. Über diese dient HMGB1, ebenso wie „lipopolysaccharide binding protein“ (LBP), dem LPS-Transport und der Vermittlung seiner pro-inflammatorischen Wirkung [498]. Dabei führt die Verbindung von HMGB1 und LPS sowohl *in vitro* als auch *in vivo* zu einem stärkeren pro-inflammatorischen Effekt als die Einzelkomponenten, welcher eine rechnerische Addition der Einzelwirkungen überschreitet [226, 498, 499]. Aufgrund dieser Erkenntnisse wurden in der vorliegenden Arbeit „Ca²⁺-Imaging“ Messprotokolle erarbeitet, bei denen unter anderem eine gemeinsame Applikation eines kombinierten Bolus aus HMGB1 und LPS erfolgte. Diese kombinierte Applikation diente der erstmaligen Untersuchung eines synergistischen Effektes von HMGB1 und LPS in Bezug auf die direkte, schnelle Aktivierung von Gehirnzellen. Die Zellen der AP könnten im Rahmen von systemischen Entzündungen sowohl mit zirkulierendem LPS als auch mit zirkulierendem (Abbildung 23) und lokal freigesetztem (Abbildung 25) HMGB1 in Kontakt treten. Demnach wurde ebenfalls eine mögliche gegenseitige Modulation der Responsivität, in Abhängigkeit der Applikationsreihenfolge, untersucht.

In Bezug auf die direkte, schnelle Zellantwort wurden Modulationseffekte erstmalig in der hier vorliegenden Arbeit untersucht. Nach der Anwendung von HMGB1 als ersten Stimulus, auf den nur 1 Neuron positiv reagierte, war die Responsivität für LPS deutlich reduziert. So reagierten nur noch 0,67 % der untersuchten Zellen nach einer vorherigen Applikation von HMGB1 auf LPS. Dies entspricht einer Reduktion der LPS-Responsivität um das 8,1-fache. Durch die Applikation von HMGB1 als ersten Stimulus wurde auch der prozentuale Anteil der auf die Kombination von LPS und HMGB1 reagierenden Zellen um das 3,6-fache reduziert (Abbildung 34). Über den Einfluss von extrazellulärem HMGB1 auf die LPS-Sensitivität liegen widersprüchliche Ergebnisse vor. Auf der einen Seite wird extrazelluläres HMGB1 für eine LPS-Toleranz verantwortlich gemacht [500, 501], auf der anderen Seite wurden verstärkte pro-inflammatorische Wirkungen von LPS nach einer Vorinkubation mit HMGB1 nachgewiesen [432]. So führte eine Injektion von Disulfid-HMGB1 in die *Cisterna magna* 24 Stunden vor einem LPS-Stimulus zu einer stärkeren LPS-induzierten Neuroinflammation [432]. *In vitro* bewirkte eine vierstündige Inkubation von Mikrogliazellen mit Disulfid-HMGB1 eine gesteigerte LPS-induzierte Expression von TNF α und IL-1 β [432]. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit stehen hingegen in Einklang mit der Entwicklung einer LPS-Toleranz

durch HMGB1. In Mäusen führte die Verabreichung von HMGB1 (1 mg/kg [500] bzw. 20 µg [501]) eine Stunde vor einem LPS-Stimulus (10 mg/kg) zu einer Reduktion der zirkulierenden TNF α -Konzentration. Die Versuche von Li *et al.* (2013) weisen sogar darauf hin, dass die durch eine geringe LPS-Dosis (0,2 mg/kg) induzierte Endotoxin-Toleranz ebenfalls auf das durch LPS freigesetzte HMGB1 zurückzuführen ist [500]. So verhinderte die Neutralisation von HMGB1 die durch vorherige Injektion einer geringen LPS-Konzentration entstandene LPS-Toleranz [500].

Interessanterweise führte die vorherige Stimulation mit LPS in der vorliegenden Arbeit zu einem Anstieg der Responsivität gegenüber HMGB1 um das 9,2-fache. Außerdem reagierten nach der Applikation von LPS neben den Neuronen auch 3 % der untersuchten Astrozyten auf die Inkubation mit HMGB1.

Weder die Steigerung der HMGB1-Responsivität durch LPS noch die durch HMGB1 ausgelöste Reduktion der LPS-Responsivität lassen sich zum jetzigen Zeitpunkt genau erklären. Dennoch sind diese Effekte für die Bedeutung von HMGB1 als später Mediator der Sepsis von großem Interesse. Es lässt sich vermuten, dass auch bei einer Sepsis die neuronalen sowie glialen Zellen der AP zunächst mit LPS in Kontakt kommen und erst später durch das verzögert zirkulierende [6, 226, 463, 465] (Abbildung 23) oder lokal freigesetzte HMGB1 (Abbildung 25) erreicht werden. Die Ergebnisse der hier vorliegenden Dissertation deuten darauf hin, dass diese Reihenfolge im Rahmen einer Sepsis in der AP zu einer verstärkten Stimulation durch HMGB1 führt und auf diesem Wege zentralnervös kontrollierte Krankheitssymptome aufrecht erhalten werden können. Die Abhängigkeit der Responsivität von einer vorherigen Kontaktaufnahme zu LPS könnte als eine Art Schutzmechanismus interpretiert werden. Dafür spricht, dass bei einer Vielzahl von Pathologien erhöhte Serumkonzentrationen von HMGB1 vorliegen [502-504], diese aber nicht immer mit den Symptomen des „sickness behaviors“ einher gehen.

1.4.3 Beurteilung des Potenzials von Zellen der AP-Primärkultur zur induzierten Synthese von Lipidmediatoren

Für Entzündungsreaktionen sind lokal synthetisierte Lipidmediatoren von entscheidender Bedeutung [505]. So besteht die Wirkung der nicht-steroidalen Entzündungshemmer („non-steroidal anti-inflammatory drugs“, NSAIDs) in einer Blockade der Cyclooxygenase (COX)-Aktivität und einer damit einhergehenden Verhinderung der Synthese pro-inflammatorischer Eicosanoide [139]. Heute sind aber auch eine Reihe von weniger wirksamen Lipidmediatoren, zu denen die Eicosanoide der Eicosapentaensäure („eicosapentaenoid acid“, EPA) gehören, sowie entzündungsauflösende Lipidmediatoren („specialized pro-resolving lipid mediators“, SPMs) bekannt [136]. Die SPMs werden hauptsächlich aus der

ω -3-Fettsäure (FS) Docosahexaensäure („docosahexaenoic acid“, DHA) synthetisiert, sind insbesondere während der Entzündungsaufösung nachweisbar und an dieser beteiligt [361]. Auch das Aspirin hat einen positiven Einfluss auf die Synthese sogenannter Aspirin-getriggelter SPMs [136, 367-369]. Im Gehirn konnte eine Synthese von Eicosanoiden [506, 507] und SPMs [390] bereits nachgewiesen werden. Jedoch wurde die Synthese derartiger Lipidmediatoren in der vorliegenden Arbeit erstmalig in Hinblick auf den inflammatorischen Status der AP untersucht. Außerdem wurden durch Flüssigchromatographie mit Massenspektrometriekopplung („liquid chromatography-mass spectrometry“, LC-MS/MS) von Zellkulturüberständen lediglich sezernierte Lipidmediatoren und FS detektiert. Dies ist im Vergleich zu der bisher üblichen Analyse aus Homogenaten [390, 506, 507] von sehr viel höherer biologischer Relevanz.

Für die Etablierung wurden verschiedene Versuchsprotokolle und Messbedingungen getestet. Nach wiederholten Modifikationen der Versuchs- und Messbedingungen konnte ein sicherer Nachweis wichtiger Lipidmediatoren und Vorläufer-Fettsäuren erzielt werden. Allerdings waren einige der pro- und anti-inflammatorischen Lipidmediatoren lediglich nach Zugabe der Ausgangssubstanzen Arachidonsäure („arachidonic acid“, AA), DHA und EPA nachweisbar (Abbildung 35). Überraschenderweise waren auch in den Blindproben der mit AA, DHA und EPA versetzten Zellkulturgefäße, die jedoch keine Zellen enthielten, relativ hohe Mengen von PGD₂, PGE₂ und PGJ₂ nachweisbar (Abbildung 35). Im Vergleich zu den Überständen zellhaltiger Primärkulturen der AP waren diese Konzentrationen zwar geringer, allerdings nicht signifikant reduziert. Es scheint also ein nicht-enzymatischer Abbau von AA, EPA und DHA zu den genannten Lipidmediatoren stattgefunden zu haben, welcher bisher allerdings noch nicht beschrieben wurde. Lediglich eine von Enzymen unabhängige Oxidation von PGD₂ zu PGJ₂ ist bereits bekannt [170]. Die biologische Bedeutung der nach Zusatz von AA, DHA und EPA erbrachten Ergebnisse lässt sich demnach nur mit geringer Aussagekraft interpretieren. Aufgrund von hohen Standardfehlern waren ohnehin keine signifikanten behandlungsabhängigen Unterschiede detektierbar. Interessant ist aber eine möglicherweise differenzielle Freisetzung von Lipidmediatoren aus Zellen der AP-Primärkulturen in Abhängigkeit der Stimulation mit LPS oder HMGB1. So war die Konzentration von PGD₂ in Überständen der mit LPS stimulierten Primärkulturen tendenziell gegenüber der Konzentration in Überständen von Kontrollkulturen reduziert. Hingegen lagen nach Stimulation mit HMGB1 tendenziell höhere PGD₂-Konzentrationen vor als in Überständen der Kontrollkulturen (Abbildung 35). PGD₂ stellt im Gehirn das am häufigsten vorliegende Prostaglandin dar [168] und wird unter anderem für die Regulation des Schlaf-Wach Rhythmus verantwortlich gemacht [160]. Welche Funktion es im Rahmen der Neuroinflammation, geschweige denn in der AP, aufweist ist bisher nicht bekannt.

Auch anti-inflammatorische Mediatoren (Maresin 1, Neuroprotektin D₁, Resolvin D₁ [RvD₁], RvD₂) waren grundsätzlich nach Zusatz der Vorläufer-Fettsäuren in den Überständen der Primärkulturen nachweisbar (Abbildung 35 und Abbildung 36). Allerdings nur in vereinzelt Proben, sodass keine Statistik durchgeführt werden konnte und auch hier nur eine rein hypothetische Interpretation der Ergebnisse erfolgen kann. RvD₁ und RvD₂ waren zwar lediglich in einem Probendurchlauf zu ermitteln, ihre Konzentrationen deuten aber auf interessante mögliche Ergebnisse hin (Abbildung 36). Diese SPMs waren in dem Überstand der mit LPS stimulierten Kultur in höheren Konzentrationen nachweisbar als in den Überständen der mit PBS oder HMGB1 inkubierten Primärkulturen. Rein spekulativ scheint also 48 Stunden nach dem Beginn der Stimulation mit LPS ein der Entzündungsauflösung dienendes Sekretionsprofil vorgelegen zu haben.

Die beschriebenen Ergebnisse sind aber zum jetzigen Zeitpunkt als vorläufig zu bewerten. Weiterführende Untersuchungen sind in Zukunft notwendig.

Dass der Nachweis von Lipidmediatoren ohne Zusatz der Vorläufer-Fettsäuren nicht möglich war, scheint an den Eigenschaften der verwendeten Primärkulturen zu liegen. Die in der vorliegenden Arbeit verwendete LC-MS/MS war an die von Le Faouder *et al.* (2013) angewendete Methodik angelehnt, mit der eine Quantifizierung von pro- und anti-inflammatorischen Lipidmediatoren unter anderem in Zellüberständen von stimulierten epithelialen colorektalen Adenokarzinomzellen sowie von stimulierten Makrophagen gelang [425]. Außerdem konnte eine andere Arbeitsgruppe mit dem von Dr. Sabine Schulz und mir erarbeiteten Protokoll einen Nachweis von LTB₄, PGD₂, PGE₂ und PGJ₂ erbringen [508]. Dabei handelte es sich allerdings um RAW264.7 Makrophagenkulturen. Makrophagen sind ein sehr wichtiger Syntheseort der Lipidmediatoren [509, 510]. Im zentralen Nervensystem entstammen die meisten Lipidmediatoren allerdings Astrozyten [511, 512]. Die Primärkulturen der AP enthalten aber sowohl Astrozyten und Mikrogliazellen als auch Neurone und scheinen in dieser gemischten Kultur keine ausreichende Quantität für die Detektion der Lipidmediatoren in den Überstand freizusetzen. Die 12/15-Lipoxygenase (LOX) ist ein wichtiges Enzym für die Synthese von Resolvinen der D-Reihe als auch für Maresin 1 und Neuroprotektin D₁ (Abbildung 4). In Homogenaten verschiedener Regionen des Rattengehirns wurde dessen Expression auf mRNA- und Proteinebene bereits untersucht [513]. Im *Cortex* lag dabei eine starke Expression vor. Wohingegen in Regionen des Hinterhirns, wie Hirnstamm und Rückenmark, interessanterweise keine signifikante Expression der 12/15-LOX nachweisbar war [513]. Leider ist der Bereich, aus dem die Homogenate des Hirnstammes hergestellt wurden, nicht exakt definiert. Die von Shalini *et al.* (2017) erbrachten Ergebnisse deuten dennoch auf eine mögliche verminderte Expression von 12/15-LOX in der AP hin und könnten somit die schlechte Nachweisbarkeit der SPMs

Maresin 1, Neuroprotektin D₁, RvD₁ und RvD₂ in den Überständen der AP-Primärkulturen erklären.

Im Gegensatz zu Lipidmediatoren wurden ihre Vorläufer-Fettsäuren auch ohne ihren Zusatz in den Überständen der AP-Primärkulturen detektiert (Abbildung 38). Dieser Nachweis konnte in den Blindproben nicht erbracht werden, was für eine gute Differenzierung von anderen Bestandteilen des Mediums spricht. Interessanterweise führte die Inkubation mit HMGB1 zu einem signifikanten Anstieg der DHA-Konzentration im Überstand verglichen mit PBS- oder LPS-inkubierten Kulturen (Abbildung 38). *In vivo* bewirkte eine sechstägige, kontinuierliche, i.c.v. Infusion von LPS (1 µg/ml) bei Ratten zwar einen gesteigerten „turnover“ von AA mit verstärkter Expression der damit zusammenhängenden Enzyme [514], der „turnover“ von DHA blieb aber unverändert [515]. Der unveränderte „turnover“ von DHA ist mit der unveränderten DHA-Freisetzung nach LPS-Stimulation in Einklang zu bringen. Über den möglichen Pathomechanismus und die biologische Bedeutung einer verstärkten HMGB1-abhängigen Freisetzung von DHA ist bisher keine eindeutige Aussage möglich. Die Freisetzung von DHA könnte aber möglicherweise auf ein gewisses anti-inflammatorisches Potenzial von HMGB1 hindeuten. Interessanterweise bewirkte die Stimulation mit LPS, entgegen der Ergebnisse von Rosenberger *et al.* (2004) [514], keinen Anstieg von AA in den Überständen von den Primärkulturen der AP.

Die hohen Standardfehler lassen sich durch die Tatsache erklären, dass es sich um biologische Proben handelt. Während der Präparation der AP wurde die Zellsuspension rechnerisch zwar bei allen Kulturen auf 100.000 Zellen eingestellt, allerdings kann die Zellzahl mit der Neubauer-Zählkammer lediglich näherungsweise bestimmt werden. Ebenfalls kann die Anzahl vitaler Zellen während der Kultivierung unterschiedlich stark beeinflusst werden. Eine Korrelation gemessener Konzentrationen mit der jeweiligen Anzahl vitaler Zellen wäre also zukünftig sinnvoll, um Standardfehler zu minimieren.

In Abbildung 59 werden die Ergebnisse des „HMGB1-Projektes“ schematisch zusammengefasst. Auch die nachfolgend in Kapitel VA2 diskutierten Wirkungen von LPS und HMGB1 auf das Fettgewebe sind in die Abbildung integriert.

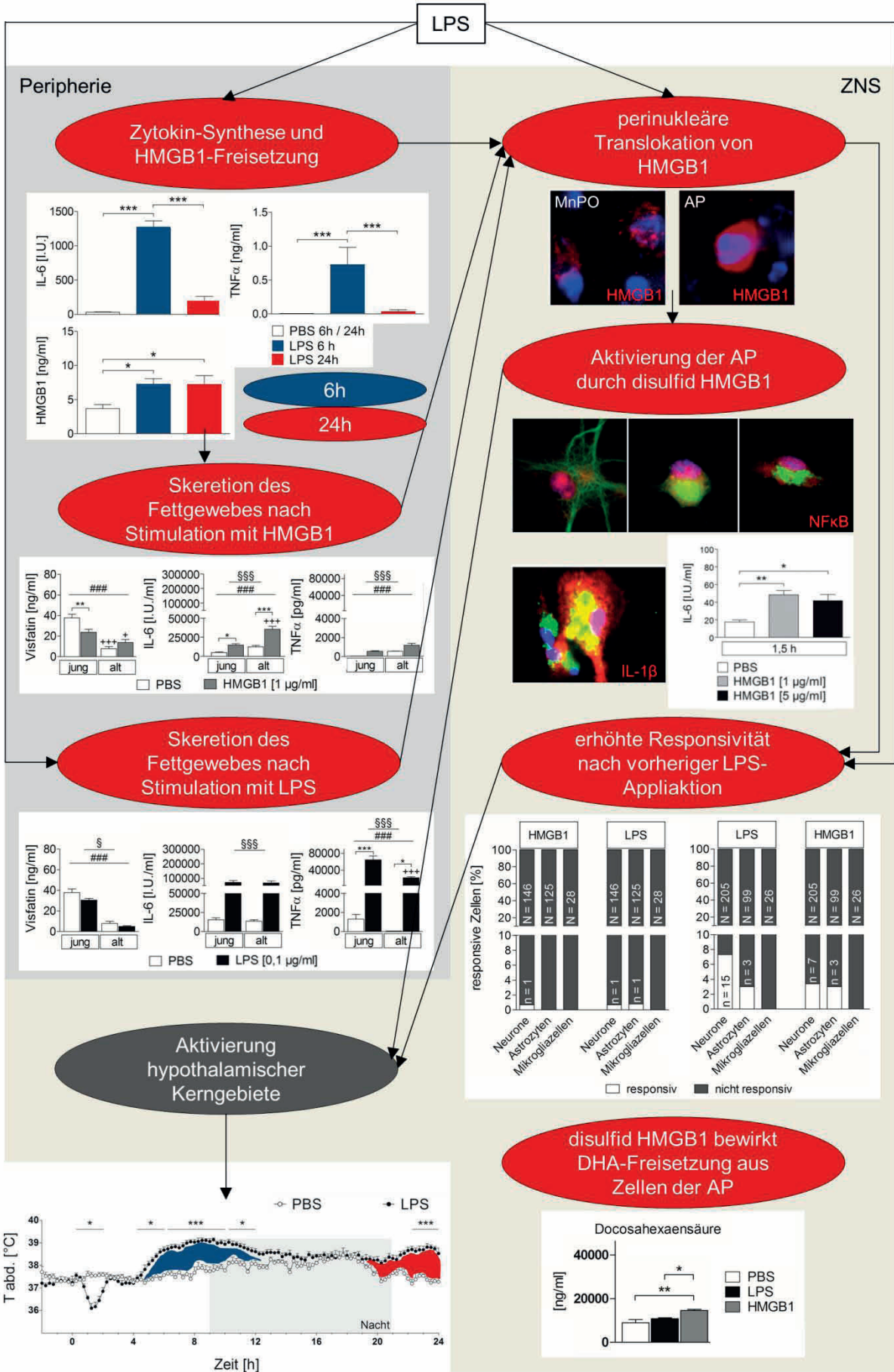


Abbildung 59: Zusammenfassende Darstellung der wichtigsten Ergebnisse des HMGB1 Projektes und der Diskussion eines möglichen Signalweges

LPS induziert in der Peripherie die Synthese der Zytokine IL-6 und TNF α . Deren Konzentrationen waren allerdings lediglich sechs Stunden p.i. signifikant höher als nach Injektion von PBS. Hingegen lag HMGB1 sowohl sechs als auch 24 Stunden p.i. im Plasma von LPS-injizierten Ratten in signifikant höheren Konzentrationen vor als im Plasma der mit PBS injizierten Ratten. LPS bewirkte also eine Freisetzung von HMGB1, wofür sowohl eine aktive als auch eine passive Freisetzung in Frage kommen könnte. Möglicherweise wird durch im Blut zirkulierendes HMGB1 eine Vielzahl von Effekten ausgelöst. So führte die Inkubation von „Fat Explant“ Kulturen mit Disulfid-HMGB1 zu einem signifikanten Anstieg der IL-6- und TNF α -Freisetzung sowie zu einer signifikanten Reduktion der Visfatin-Freisetzung aus dem Fettgewebe junger Ratten. Die Inkubation des Fettgewebes mit LPS bewirkte einen stärkeren Anstieg der induzierten Freisetzung von IL-6 und TNF α als die HMGB1-Inkubation. Außerdem führte die LPS-Inkubation ebenfalls zu einer signifikanten Reduktion der Visfatin-Freisetzung. Die im Fettgewebe nachgewiesenen Effekte können sowohl bei lokalen als auch bei systemischen Entzündungsreaktionen von Bedeutung sein und dabei die Anteile der im Blut zirkulierenden Mediatoren beeinflussen oder lokal auf Gewebe, die sich in unmittelbarer Nähe zum Fettgewebe befinden, Einfluss nehmen. Im Gehirn LPS-injizierter Ratten wurde eine vermehrt perinukleäre Lokalisation von HMGB1 sowie eine Reduktion dessen Signalintensität festgestellt. Diese Ergebnisse deuten also auf eine lokale HMGB1-Freisetzung in AP und MnPO hin. *In vitro* verminderte die Inkubation der AP-Primärkulturen mit LPS ebenfalls die Anzahl von Zellen, die intranukleäre HMGB1-Signale aufwiesen (nicht dargestellt). Somit könnte LPS möglicherweise direkt die Translokation von HMGB1 bewirken. Aber auch eine indirekte Wirkung über die induzierten Zytokine (in der Peripherie und in Primärkulturen) ist denkbar. Es bleibt auch unklar wie es genau zu der perinukleären Translokation von HMGB1 im MnPO kam. Auf der einen Seite könnten über spezifische Transporter oder perivaskuläre Makrophagen sowie Endothelzellen Informationen aus der Peripherie zum MnPO gelangt sein. Zum anderen ist eine Informationsübertragung aus sCVOs, wie der AP, an den MnPO möglich. In Primärkulturen der AP wurde anschließend das pro-inflammatorische Potenzial von Disulfid-HMGB1 untersucht. Die Inkubation mit HMGB1 bewirkte eine nukleäre Translokation von NF κ B in Astrozyten, Neuronen und Mikrogliazellen. Eine verstärkt intranukleär vorliegende Expression von NF-IL6 konnte hingegen nicht durch Inkubation mit Disulfid-HMGB1 induziert werden (nicht dargestellt). Des Weiteren war eine HMGB1-induzierte Synthese von IL-1 β und IL-6 nachweisbar. Da diese Effekte aber lediglich indirekt Informationen über eine Aktivierung von neuronalen sowie glialen Zellen durch Disulfid-HMGB1 liefern, wurden zusätzlich „Ca²⁺-Imaging“ Versuche durchgeführt. Dabei lag lediglich eine sehr geringe direkte Responsivität gegenüber HMGB1 vor. Eine derartige Zellaktivierung ist durch einen Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration gekennzeichnet. Es reagierten lediglich Neurone auf die Applikation von HMGB1. Wurde allerdings vor der Applikation von HMGB1 ein LPS-Bolus appliziert, erhöhte sich die Responsivität gegenüber HMGB1 um das 9,2-fache. Außerdem reagierten nach LPS-Applikation neben Neuronen auch Astrozyten auf die Applikation von HMGB1. Dies ist ein sehr interessanter Befund. Da es sich bei der AP um ein sCVO handelt, das direkt in Kontakt mit im Blut zirkulierendem LPS tritt, ist bei einer Sepsis nachfolgende Interaktion möglich. LPS zirkuliert im Blut, gelangt in die AP und bewirkt in der Peripherie eine verzögerte Freisetzung von HMGB1. Nachdem also LPS aus der Peripherie in die AP gelangen kann, kann auch verzögert freigesetztes HMGB1 die AP erreichen. Außerdem bewirkt LPS in der AP eine HMGB1-Freisetzung, sodass auch auf diesem Wege die Zellen zunächst in Kontakt mit LPS und anschließend mit extrazellulärem HMGB1 kommen. Dieses sogenannte „Priming“ durch LPS wurde in der vorliegenden Arbeit erstmalig nachgewiesen und könnte im Rahmen einer Sepsis mit einem biologischen Nutzen zusammenhängen.

Die LPS-injizierten Ratten reagierten mit einem über 24 Stunden anhaltenden Fieber, obwohl 24 Stunden p.i. basale Zytokin-Konzentrationen im Plasma vorlagen. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit machen deutlich, dass eine Aktivierung der AP durch verzögert zirkulierendes oder lokal freigesetztes HMGB1 erfolgen könnte, was wiederum eine Aktivierung hypothalamischer Kerngebiete bewirken könnte. Möglicherweise wäre hierdurch das anhaltende Fieber der LPS-injizierten Ratten anteilig zu erklären.

Außerdem bewirkte die Inkubation der Primärkulturen mit HMGB1 einen Anstieg von Docosahexaensäure in den Überständen mit potenziell anti-inflammatorischen Effekten. Um die Bedeutung dieser induzierten Freisetzung genauer interpretieren zu können, sind weiterführende Untersuchungen notwendig.

2 Bedeutung der induzierten Synthese von Adipokinen und Zytokinen durch das Fettgewebe im Rahmen von systemischen Entzündungen

Das bei einer Adipositas vermehrt vorliegende und durch eine Hypertrophie der Adipozyten hypoxisch gewordene Fettgewebe korreliert sowohl bei der diätinduzierten Adipositas [266, 267] als auch bei der altersassoziierten Adipositas [269] mit der Entwicklung einer chronisch subklinischen Inflammation. Aber auch eine durch inflammatorische Stimuli induzierte akute Entzündung kann durch Adipositas verstärkt werden. Ergebnisse von Gille-Johnson *et al.* (2012) deuten darauf hin, dass die im Blut zirkulierenden Zellen vermutlich nicht für die gesteigerte Plasmakonzentration von Zytokinen während einer Sepsis verantwortlich sind [516]. Hingegen ist Fettgewebe ein wichtiger Syntheseort für Zytokine und Adipokine [265] und kommt demnach auch bei systemischen Entzündungen als entscheidende Zytokin-Quelle in Frage [517]. So führte die i.p. Injektion von LPS sowohl beim Vorliegen einer diätinduzierten Adipositas [287] als auch bei einer altersassoziierten Adipositas [289] zu einem verlängerten Fieber, das mit einer höheren Konzentration von IL-6, TNF α und Leptin im Plasma adipöser Ratten einher ging [287, 289].

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob die Freisetzung von Zytokinen und Adipokinen aus Fettgewebe durch LPS oder die DAMPs HMGB1 oder Biglykan moduliert wird. Außerdem wurde die Sekretion in Abhängigkeit der Fettgewebslokalisation (*epididymal*, *retroperitoneal*, *subcutan* oder *braun*) und des Alters der Ratten analysiert.

2.1 *Behandlungsabhängige Modulation der Sekretion von Adipokinen und Zytokinen aus dem Fettgewebe*

2.1.1 *LPS-abhängige Freisetzung von Zytokinen und Adipokinen*

Eine Applikation von LPS geht mit einem starken Anstieg der Konzentration proinflammatorischer Zytokine im Plasma einher [2, 89, 91, 518]. Dabei ist die Sekretion dieser Zytokine aus dem Fettgewebe maßgeblich an der gesteigerten Plasmakonzentration beteiligt [517]. So führte die i.p. Injektion von LPS zu einem Anstieg der mRNA-Expression von IL-6 und TNF α im *epididymalen* Fettgewebe junger sowie alter Mäuse; die IL-1 β -Expression wurde hingegen nur im *epididymalen* Fettgewebe alter Mäuse signifikant gesteigert [518]. Im *retroperitonealen* und *subcutanen* Fettgewebe war unter diesen inflammatorischen Bedingungen ebenfalls eine gesteigerte IL-6-Expression nachweisbar. Sie lag allerdings unterhalb der IL-6-Expression des *epididymalen* Fettgewebes [517]. Vergleichbare Ergebnisse wurden ebenfalls von Leuwer *et al.* (2009) im Fettgewebe LPS-injizierter Mäuse nachgewiesen [519]. Im Fettgewebe von Schweinen lag sechs Stunden nach *intramuskulärer* Injektion von LPS unter anderem eine gesteigerte Expression von TNF α , IL-1 β sowie IL-6 vor [520].

„Fat Explant“ Kulturen stellen ein geeignetes Mittel zur Untersuchung der Expression sowie der Sekretion von Zytokinen und Adipokinen dar. Sie ermöglichen den *in vivo* auftretenden „cross-talk“ der verschiedenen Zelltypen untereinander und enthalten auch die im Fettgewebe vorliegenden Immunzellen [521]. Derartige Kulturen wurden beispielsweise bereits aus dem Fettgewebe von Milchkühen [522], Mäusen [523] oder Ratten [289] hergestellt und mit LPS inkubiert. Bei diesen Versuchen zeigte sich ein sehr starker LPS-abhängiger Anstieg der Expression sowie der Sekretion von IL-6 und TNF α . Die Stimulation einer Adipozyten-Makrophagen Co-Kultur mit LPS bewirkte ebenfalls unter anderem einen Anstieg der TNF α - sowie IL-6-Expression und der jeweiligen Proteinkonzentration im Überstand [524]. Die Inkubation der „Fat Explants“ junger und alter Ratten führte auch in der vorliegenden Arbeit zu einem signifikanten Anstieg der Konzentration von bioaktivem IL-6 und TNF α (Abbildung 42). In den Überständen des mit LPS inkubierten *subcutanen* Fettgewebes alter Ratten war eine signifikant höhere IL-6-Konzentration nachweisbar als in den Überständen des *subcutanen* Fettgewebes junger Ratten. Eine im Alter verstärkte LPS-abhängige Expression bzw. Sekretion von IL-6 wurde auch bereits in „Fat Explants“ aus *epididymalem* Fettgewebe von Mäusen festgestellt und mit einer auto- bzw. parakrinen Wirkung von IL-1 β im Fettgewebe älterer Individuen in Verbindung gebracht [523]. Dass diese im Alter gesteigerte LPS-abhängige Expression von IL-6 in der vorliegenden Arbeit hingegen lediglich im *subcutanen* Fettgewebe nachweisbar war, könnte an der Tierspezies (Ratte vs. Maus), dem verwendeten LPS (*E.coli* vs. *Pseudomonas aeruginosa*), dem Inkubationsbeginn (24 h vs. 30 min nach der Präparation) und der Nachweismethode (Bioassay vs. ELISA) liegen. Nach einer i.p. Injektion von LPS (*Pseudomonas aeruginosa*; 2,5 mg/kg) wiesen Starr *et al.* (2009) in vorangegangenen Untersuchungen nach sechs Stunden eine gesteigerte mRNA-Expression von IL-6 im Fettgewebe alter Mäuse nach [517]. Dabei lag im *epididymalen* Fettgewebe zwar die höchste relative mRNA-Expression von IL-6 vor, allerdings wies der Unterschied zwischen jungen und alten Mäusen im *subcutanen* Fettgewebe die höchste Signifikanz auf [517]. Eine Bedeutung von *subcutanem* Fettgewebe für die im Alter erhöhte LPS-bedingte IL-6-Konzentration im Plasma erscheint anhand dieser und der Ergebnisse aus der vorliegenden Arbeit als wahrscheinlich.

Auch die Sekretion von TNF α wurde durch Inkubation des Fettgewebes mit LPS stark gesteigert (Abbildung 42). Interessanterweise wurde die TNF α -Freisetzung im *epididymalen* und *retroperitonealen* Fettgewebe alter Ratten weniger stark durch die Inkubation mit LPS induziert als im entsprechenden Fettgewebe junger Ratten. Dies könnte beispielsweise mit einer reduzierten Funktionalität der residualen und eingewanderten Makrophagen in älteren Individuen zusammenhängen, da annähernd die gesamte TNF α -Expression des Fettgewebes auf Makrophagen zurückzuführen ist [277]. So war beispielsweise in

Überständen von primären Kulturen humaner mononukleärer Zellen, die aus dem Blut älterer Menschen gewonnen wurden, eine deutlich reduzierte LPS-bedingte TNF α -Konzentration nachweisbar als in entsprechenden Kulturen von jungen Erwachsenen [525]. Dennoch liegen auch bei einer altersassoziierten Adipositas vornehmlich pro-inflammatorische M1-Makrophagen im Fettgewebe vor [270], die eine Synthese von TNF α bewirken.

Eine Stimulation mit LPS führt außerdem zu einem Anstieg der Leptin-Konzentration im Plasma. Dies konnte bereits bei Nagern [289, 325, 327, 526, 527] und Menschen [528, 529] festgestellt werden. Hingegen war diese Korrelation bei Wiederkäuern nicht nachweisbar [530-532]. Leptin wird hauptsächlich durch das Fettgewebe freigesetzt und gelangt über das Blut zum Gehirn [533]. In der BHS findet sich ein sättigbarer Transportmechanismus für Leptin [534, 535]. Über diesen kann Leptin die BHS passieren und im Hypothalamus die Hemmung der Futteraufnahme bewirken [536, 537]. Zirkulierendes Leptin ist sowohl an der LPS-induzierten Anorexie als auch der Entstehung von LPS-abhängigem Fieber beteiligt [23, 131, 325, 326, 328, 329]. Es ist allerdings nicht alleinig für die Auslösung dieser Symptome des „sickness behaviors“ verantwortlich, da beispielsweise eine Neutralisierung von Leptin unter einigen Versuchsbedingungen lediglich eine Abschwächung der Symptome bewirkte [289, 329]. Für eine begrenzte Beteiligung von Leptin an der LPS-induzierten Anorexie spricht auch, dass in db/db (Leptin-defizient) sowie ob/ob (Leptin-resistent) Mäusen ebenfalls eine LPS-bedingte Anorexie bestehen bleibt oder diese lediglich teilweise reduziert wird [538]. Die Anorexie scheint beim Wiederkäuer außerdem vollständig unabhängig von Leptin vermittelt zu werden, da Schafe [532] und Kühe [531] auch ohne steigende Leptin-Konzentration mit Fieber und Anorexie auf die Applikation von LPS reagieren. Neuere Ergebnisse deuten darauf hin, dass die thermogene Wirkung von Leptin mit einer gesteigerten Vasokonstriktion und einer daraus resultierenden Reduktion des Wärmeverlustes über den Schwanz zusammenhängt [313]. Die durch LPS angehobene Plasmakonzentration von Leptin geht mit einer verstärkten Leptin-Expression im Fettgewebe einher [326, 539-541]. Die Inkubation des Fettgewebes junger und alter Ratten mit LPS führte allerdings in der vorliegenden Arbeit nicht zu einem Anstieg der Leptin-Konzentration in Überständen der „Fat Explants“ (Abbildung 39). Als plausible Erklärung für die fehlende Modulation in den „Fat Explants“ kommt die neuronale Regulation der LPS-abhängigen Leptin-Freisetzung in Frage [540]. Die „Fat Explants“ sind nicht innerviert und verhindern so eine Abbildung der *in vivo* neuronal-induzierten Freisetzung von Leptin. Allerdings waren in Adipozyten-Makrophagen Co-Kulturen, die aus Zelllinien-stammende differenzierte Adipozyten und Makrophagen (RAW 264.7) enthielten, nach einer 24-stündigen Stimulation mit LPS (100 ng/ml) trotz fehlender Innervation erhöhte Konzentrationen von Leptin im Überstand zu detektieren [524]. Die großen Unterschiede zwischen den Modellen (LPS-

Dosierung, Menge an Makrophagen im Gewebe / Kultur) könnten für diese Diskrepanz eine Rolle spielen.

Auch dem Adipokin Visfatin wird eine Bedeutung bei Sepsis zugesprochen. So lagen in den Versuchen von Iwasa *et al.* (2016) sechs Stunden nach Injektion von LPS (5 mg/kg; i.p.) signifikant höhere Visfatin-Konzentrationen im Blut vor als bei Kontrollratten [542]. Gesunde Männer reagierten auf die Applikation von LPS (3 ng/kg; *intravenös* [i.v.]) ebenfalls mit einem Anstieg der Visfatin-Konzentration im Blut, die ebenfalls sechs Stunden p.i. die höchsten Werte aufwies [543]. Auch Neugeborene, die auf natürlichem Wege an einer Sepsis erkrankten, wiesen im Vergleich zu gesunden Individuen erhöhte Visfatin-Konzentrationen im Blut auf [544]. Nach einer i.c.v. Injektion von Visfatin zeigten Ratten Anorexie, Hyperthermie und eine reduzierte lokomotorische Aktivität [340]. Hieraus ergeben sich Hinweise auf eine Beteiligung von Visfatin am „sickness behavior“ während systemischer Entzündungsreaktionen. Ein wichtiger Syntheseort für Visfatin ist das *viszerale* Fettgewebe. Allerdings lag in den „Fat Explants“ der vorliegenden Arbeit nach LPS-Inkubation in den Überständen des *epididymalen* Fettgewebes junger und alter Ratten ein signifikanter behandlungsabhängiger Haupteffekt vor, der mit einer reduzierten Visfatin-Konzentration in den Überständen der mit LPS inkubierten „Fat Explants“ einher ging (Abbildung 39). Obwohl die durch LPS gesteigerte Serumkonzentration von Visfatin bei den Versuchen von Iwasa *et al.* (2016) mit einer gesteigerten mRNA-Expression im *subcutanen* sowie *viszeralen* Fettgewebe korrelierte [542], ist eine weitere Quelle für die Bildung von Visfatin nicht auszuschließen. Die Freisetzung von Visfatin wurde von Iwasa *et al.* (2016) nicht untersucht und muss nicht zwangsweise der gesteigerten mRNA-Expression entsprechen. Es könnten beispielsweise auch Immunzellen des Blutes an erhöhten Serumkonzentrationen von Visfatin beteiligt sein. So weisen neutrophile Granulozyten von septischen Patienten eine stärkere Expression von „pre-B-cell colony-enhancing factor“ (PBEF) auf als neutrophile Granulozyten gesunder Menschen [341]. Außerdem könnte ebenso wie für Leptin eine neuronal getriggerte Visfatin-Freisetzung von Bedeutung sein.

Bezüglich der LPS-abhängigen Plasmakonzentration von dem vornehmlich anti-inflammatorisch wirkenden Adiponektin kontroverse Ergebnisse vor. Eine Applikation von LPS ging sowohl in Mäusen [545] als auch in Hunden [546] mit einer reduzierten Konzentration von Adiponektin im Blut einher. Unter den von Keller *et al.* (2003) gewählten Versuchsbedingungen blieb die Adiponektin-Konzentration im Plasma gesunder Menschen trotz Injektion von LPS allerdings unverändert [547]. Iwasa *et al.* (2014) konnten einen LPS-induzierten Anstieg der mRNA-Expression von Adiponektin im *viszeralen* und *subcutanen* Fettgewebe feststellen, jedoch zeigte sich dieser Anstieg der mRNA-Expression nicht auf Proteinebene in der Plasmakonzentration [548]. Im Gegensatz dazu war im Fettgewebe von

LPS-behandelten Mäusen eine reduzierte mRNA-Expression von Adiponektin nachweisbar, dennoch lag LPS-abhängig im *subcutanen* Fettgewebe eine gesteigerte Proteinkonzentration von Adiponektin vor [519]. In den Versuchen der vorliegenden Arbeit blieb die Adiponektin-Freisetzung aus dem Fettgewebe trotz der Inkubation mit LPS unverändert (Abbildung 39). Diese inhomogenen aus der Literatur zu entnehmenden Ergebnisse könnten auf unterschiedliche Dosierungen oder speziesspezifische Eigenschaften zurückzuführen sein, deuten auf eine komplexe Regulation hin und bedürfen weiterer Untersuchungen.

Im Gegensatz zu weißem Fettgewebe dient braunes Fettgewebe nicht als Energiespeicher, sondern der Energieverbrennung zur Wärmegewinnung [549]. Es ist also maßgeblich für die zitterfreie Thermogenese von Bedeutung und ist eines der Effektororgane für die bei Fieber vorliegende Thermogenese [2, 550]. Seine endokrine Funktion wurde allerdings lange Zeit nicht berücksichtigt. Da die Transplantation von braunem Fettgewebe in Mäusen mit diätinduzierter [551, 552] oder genetischer [553] Adipositas eine Reduktion des Körpergewichtes und des Körperfettanteils sowie eine Verbesserung der Glukosehomeostase bewirkte, wurde schließlich auch braunem Fettgewebe eine endokrine Funktion zugesprochen. Die Inkubation von Adipozyten des braunen Fettgewebes mit Noradrenalin führte *in vitro* zu einer verstärkten Sekretion von IL-1 α und IL-6; die Inkubation mit LPS bewirkte einen Anstieg der Thermogenin-Expression [554]. Dabei handelt es sich um ein gewebespezifisches Protein, das die zitterfreie Thermogenese erlaubt. Braunes Fettgewebe scheint also auch endokrine Kapazitäten aufzuweisen und direkt auf eine Inkubation mit LPS zu reagieren. Die LPS-induzierte Sekretion von Zytokinen und Adipokinen aus braunem Fettgewebe wurde in der hier vorliegenden Arbeit erstmalig untersucht. In den Überständen der „Fat Explants“ des braunen Fettgewebes konnten sowohl Adiponektin als auch Leptin und Visfatin nachgewiesen werden (Abbildung 39). Adiponektin und Visfatin lagen sogar tendenziell in höheren Konzentrationen vor als in den Überständen des *epididymalen*, *retroperitonealen* sowie *subcutanen* Fettgewebes. Dies ist allerdings vor allem damit zu erklären, dass im braunen Fettgewebe eine 100-fach höhere Konzentration von LPS für die Stimulation eingesetzt wurde. In Leptin-defizienten *ob/ob* Mäusen führte die Transplantation von braunem Fettgewebe gleichaltriger WT Mäuse neben den bereits erwähnten metabolischen Veränderungen auch zu einer erhöhten Adiponektin-Konzentration im Plasma [553]. Dies könnte anhand der in dieser Arbeit erbrachten Ergebnisse mit der starken Synthese von Adiponektin im braunen Fettgewebe zusammenhängen. Leptin wies hingegen in den Überständen des braunen Fettgewebes geringere Konzentrationen auf als in den Überständen des weißen Fettgewebes (Abbildung 39). Eine behandlungsabhängige Modulation der Adipokin-Freisetzung lag nicht vor. Demgegenüber wurde die Sekretion der Zytokine IL-6 und TNF α im braunen Fettgewebe

ebenso wie im weißen Fettgewebe durch die Inkubation mit LPS induziert (Abbildung 42). Die in Überständen des braunen Fettgewebes nachgewiesenen Zytokin-Konzentrationen waren sowohl unter Kontrollbedingungen als auch nach Stimulation mit LPS mit den Konzentrationen in Überständen des weißen Fettgewebes vergleichbar. Allerdings abermals mit der Einschränkung, dass braunes Fettgewebe mit einer 100-fach höheren LPS-Konzentration stimuliert wurde. Die Ergebnisse der vorliegenden Doktorarbeit deuten aber insgesamt darauf hin, dass auch das braune Fettgewebe als endokrines Organ zu bewerten ist und, dass es während einer Endotoxämie an den gesteigerten Zytokin-Konzentrationen im Blut in geringerem Maße beteiligt zu sein scheint.

2.1.2 HMGB1-abhängige Freisetzung von Zytokinen und Adipokinen

Intranukleäres HMGB1 weist nach seiner Freisetzung in den Extrazellularraum ein pro-inflammatorisches Potenzial auf [229]. Dies ist allerdings von dessen Redox-Form abhängig und wird durch Sulfonylgruppen an den reaktiven Cysteinen des HMGB1 aufgehoben [227, 233].

Es besteht eine Korrelation zwischen Adipositas und einer erhöhten HMGB1-Konzentration im Blut [460, 555, 556]. HMGB1 kommt außerdem eine Bedeutung für die Entstehung von Adipositas zu. So reduzierten wöchentliche Injektionen von anti-HMGB1 Antikörpern (400 µg/Injektion, 2/Woche, i.p.) eine Adipositas, die in Mäusen ohne Behandlung mit anti-HMGB1 Antikörpern durch die Verabreichung einer fettreichen Diät innerhalb von 16 Wochen induziert werden konnte [557]. Ebenso führte dabei die Behandlung mit anti-HMGB1 Antikörpern zu einem reduzierten Anstieg des prozentualen Körperfettanteils [557]. Die mit anti-HMGB1 Antikörpern behandelten Mäuse zeigten eine gesteigerte Aktivität, jedoch eine unveränderte Futteraufnahme sowie einen unveränderten Energieverbrauch [557]. Auch RAGE-defiziente Mäuse wiesen trotz einer fettreichen Diät eine geringere Gewichtszunahme auf als WT Mäuse [558, 559]. Außerdem wurde *in vitro* ebenfalls eine RAGE-Abhängigkeit für die Entwicklung einer Hypertrophie von Adipozyten festgestellt [559]. Ebenso wie die Ergebnisse von Montes *et al.* (2015) könnte auch die RAGE-abhängige Entwicklung der Adipositas auf eine Beteiligung von HMGB1 hindeuten.

Zudem wird postuliert, dass HMGB1 für die bei Adipositas entstehende Inflammation im Fettgewebe eine Rolle spielt [280]. So führte die Inkubation primärer humaner *subcutaner* Adipozyten mit rekombinantem HMGB1 zu einer TLR4-abhängigen Aktivierung des NFκB-Signalweges und einer damit einhergehenden, gesteigerten IL-6-Sekretion [560]. Eine HMGB1-abhängige Steigerung der Sekretion von IL-6 konnte auch in einer Zelllinie humaner Präadipozyten nachgewiesen werden [561]. In der vorliegenden Arbeit wurde in Überständen des *subcutanen* Fettgewebes ebenfalls ein signifikanter HMGB1-abhängiger Anstieg der

IL-6-Konzentration im Vergleich zu den Überständen der mit PBS inkubierten Kontrollkulturen festgestellt (Abbildung 43). Ebenso war die Konzentration von TNF α in den Überständen des *subcutanen* Fettgewebes alter Ratten signifikant gegenüber den Kontrollkulturen erhöht. Ein signifikanter behandlungsabhängiger Haupteffekt zeigte sich auch in den Überständen des *retroperitonealen* Fettgewebes. In diesen waren nach Inkubation mit HMGB1 signifikant gesteigerte Konzentrationen von IL-6 und TNF α nachweisbar. In der vorliegenden Arbeit wurde also eine durch HMGB1 induzierte Zytokin-Synthese nachgewiesen, die im *subcutanen* Fettgewebe größere Mengen TNF α und IL-6 freizusetzen vermochte als im *viszeralen* Fettgewebe. Bei den Versuchen von Montes *et al.* (2015) wurde die TNF α -Expression zwar in der Leber von Mäusen mit diätinduzierter Adipositas durch eine wöchentliche Applikation von anti-HMGB1 Antikörpern reduziert, nicht jedoch in deren *epididymalen* Fettgewebe [557]. Es wurde postuliert, dass diese Behandlung keinen Einfluss auf den inflammatorischen Status des Fettgewebes habe. Die Ergebnisse der vorliegenden Dissertation liefern jedoch einen Hinweis auf eine lokalisationsabhängige Modulation der Zytokin-Sekretion des Fettgewebes durch HMGB1 (Abbildung 43). Sie könnten also eine Erklärung für die bei den Versuchen von Montes *et al.* (2015) unbeeinflusste Inflammation im *epididymalen* Fettgewebe darstellen.

Das anti-inflammatorisch wirkende Adipokin Adiponektin hemmt die LPS-abhängige Freisetzung von HMGB1 aus Makrophagen [562]. Auch die bei einer CLP gesteigerte HMGB1-Konzentration im Serum konnte durch eine Behandlung der Mäuse mit Adiponektin reduziert werden [563]. Andererseits lag in den mit anti-HMGB1 Antikörpern behandelten Mäusen eine gesteigerte Adiponektin-Expression im Fettgewebe vor [557]. In der vorliegenden Arbeit wurde eine hieraus zu schlussfolgernde HMGB1-abhängige Reduktion der Adiponektin-Expression hingegen nicht bestätigt (Abbildung 40). Auch die Sekretion von Leptin blieb unbeeinflusst. Allerdings führte die Inkubation mit Disulfid-HMGB1 im *epididymalen* Fettgewebe junger Ratten und im *retroperitonealen* Fettgewebe alter Ratten zu einer signifikant reduzierten Freisetzung von Visfatin (Abbildung 40). Bisher ist unbekannt, wie pro-inflammatorisches Disulfid-HMGB1 eine Freisetzung von ebenfalls pro-inflammatorisch wirkendem Visfatin reduziert und welche physiologische Bedeutung dies haben könnte. Eine gewisse anti-inflammatorische Modulation durch HMGB1 wäre denkbar, bleibt aber weiter zu untersuchen.

2.1.3 Biglykan-abhängige Freisetzung von Zytokinen und Adipokinen

Biglykan ist Bestandteil der extrazellulären Matrix („extracellular matrix“, ECM) und an der Regulation dessen Zusammensetzung beteiligt [255, 256]. Im Rahmen der hier vorliegenden Doktorarbeit war Biglykan von Interesse, da es nach einer proteolytischen Freisetzung aus

der ECM als DAMP fungiert und eine pro-inflammatorische Aktivität aufweist [250]. Adulte Biglykan-defiziente Mäuse sind unter anderem durch eine verminderte Mineralisierung der Knochen [254], eine reduzierte Körperlänge sowie eine reduzierte Länge des Femurs [564] gekennzeichnet. Interessanterweise liegt bei diesen „knockout“ Mäusen neben einem reduzierten Körpergewicht auch ein geringerer prozentualer Körperfettanteil vor [564]. Außerdem wurde sowohl im Menschen [281] als auch in der Maus [565, 566] eine Korrelation zwischen einer Adipositas und einer gesteigerten mRNA-Expression von Biglykan im Fettgewebe nachgewiesen. Sowohl die basale als auch die bei einer Adipositas gesteigerte Biglykan-Expression finden allerdings vornehmlich in der stromalen Fraktion des Fettgewebes und weniger in den Adipozyten selber statt [281]. Die Biglykan-Expression bleibt in den Adipozyten auch bei einer Adipositas unverändert gering [281]. Im Fettgewebe wurde zudem eine Korrelation zwischen der Biglykan-Expression und der Expression von TNF α sowie IL-6 nachgewiesen [281, 565]. Der Zusammenhang zwischen der Expression von Biglykan und der Expression inflammatorischer Gene scheint allerdings komplex zu sein. Adapala *et al.* (2012) postulierten eine durch die Inflammation bedingte Steigerung der Biglykan-Expression. Die Ergebnisse der vorliegenden Dissertation deuten auf die Entwicklung einer Inflammation durch die Einwirkung von Biglykan hin (Abbildung 44). So konnte hier behandlungsabhängig ein Anstieg der IL-6- und TNF α -Konzentration in Überständen nachgewiesen werden. In Makrophagen bewirkte die Inkubation mit Biglykan eine gesteigerte TNF α -Expression [261]. Biglykan-defiziente Mäuse wiesen bei einer LPS-induzierten Sepsis geringere Plasmakonzentrationen von TNF α und damit einhergehend verbesserte Überlebensraten auf [261]. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit erbrachten Hinweise darauf, dass das Fettgewebe samt der residualen und eingewanderten Makrophagen als Reservoir für eine Biglykan-abhängige Steigerung der Konzentration von zirkulierendem TNF α in Betracht kommt. Damit könnte es an der erwähnten Freisetzung von TNF α bei Sepsis beteiligt sein. In den Überständen des mit Biglykan inkubierten *subcutanen* Fettgewebes alter Ratten konnte statistisch keine signifikant gesteigerte TNF α -Konzentration nachgewiesen werden. In den Überständen des *subcutanen* Fettgewebes junger und alter Ratten sowie des *retroperitonealen* Fettgewebes junger Ratten waren nach der Inkubation mit Biglykan signifikant höhere Konzentrationen von IL-6 nachweisbar als in Überständen der Kontrollkulturen (Abbildung 44). Hinweise aus der Literatur lassen eine gesteigerte Biglykan-Expression unter Entzündungsbedingungen vermuten, die schließlich zu einer weiteren Verstärkung der Inflammation durch Induktion der Zytokin-Synthese beitragen könnte. Tatsächlich ist die aktive Sekretion von Biglykan aus stimulierten Makrophagen (IL-6, IL-1 β) bereits beschrieben worden [261] und könnte bei diesem Prozess von Bedeutung sein.

Ein Zusammenhang zwischen Biglykan und Adipokinen wurde bisher lediglich für das Adiponektin untersucht [566]. Bei Biglykan-„knockout“ Mäusen war eine gesteigerte Expression von Adiponektin im *epididymalen* Fettgewebe nachweisbar; sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene [566]. Damit unterstützen die von Ward *et al.* (2012) *in vivo* gewonnenen Daten die im Rahmen dieser Arbeit nachgewiesene reduzierte Konzentration von Adiponektin in den Überständen des mit Biglykan inkubierten *epididymalen* Fettgewebes junger Ratten (Abbildung 41). Allerdings lag in Biglykan-defizienten Adipozytenkulturen eine reduzierte Expression und Sekretion von Adiponektin vor [566]. Die widersprüchlichen Ergebnisse könnten in einem „cross-talk“ der Zelltypen untereinander sowie in einer Beeinflussung durch die ECM begründet sein. In den „Fat Explants“ ist, vergleichbar mit den *in vivo* vorliegenden Gegebenheiten, ein „cross-talk“ möglich und ECM vorhanden. In den von Ward *et al.* (2012) verwendeten Adipozytenkulturen war dies jedoch nicht der Fall. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte darüber hinaus erstmalig auch eine durch Biglykan induzierte Modulation der Visfatin-Freisetzung aus Fettgewebe nachgewiesen werden. Die Konzentration von Visfatin in Überständen des *epididymalen* Fettgewebes junger Ratten wurde, ebenso wie die Konzentration von Adiponektin, durch die Inkubation mit Biglykan signifikant reduziert (Abbildung 41). Hingegen hatte Biglykan keinen Effekt auf die Freisetzung von Leptin aus dem Fettgewebe junger oder alter Ratten.

Zusammenfassend führten die Inkubationen mit den DAMPs HMGB1 oder Biglykan zu ähnlichen Modulationen von Zytokin- und Adipokin-Konzentrationen in den Überständen der „Fat Explants“. Ob diesen Gemeinsamkeiten ähnliche Mechanismen zugrunde liegen bleibt zu untersuchen.

2.2 Alters- und lokalitätsabhängige Modulation der Sekretion von Adipokinen

Aus der Literatur ist zu entnehmen, dass die Plasmakonzentrationen von Leptin [292, 314] und Visfatin [292, 337] positiv mit dem Körperfettanteil korrelieren, allerdings liegen für Visfatin auch gegensätzliche Ergebnisse vor [338]. Für die Adiponektin-Konzentration ist eine negative Korrelation zum Körperfettanteil bekannt [291, 292]. Bezüglich der Korrelation des Alters und der Adipokin-Konzentrationen liegen wiederum widersprüchliche Ergebnisse vor. Unter anderem könnte die Auswahl der Probanden ursächlich für diese Diskrepanzen sein, da ältere Individuen häufig eine altersassoziierte Adipositas aufweisen [264]. Solch eine altersassoziierte Adipositas beeinflusst die Plasmakonzentrationen der Adipokine und verhindert eine ausschließliche Abbildung altersabhängiger Effekte. Einige Studien wiesen reduzierte Leptin-Konzentrationen im Alter nach [567-569], andere stellten höhere Konzentrationen fest [289, 570, 571]. Gleiches gilt für Adiponektin [568, 569, 571, 572]. Es

ist außerdem zu beachten, dass auch die Kriterien zur Eingruppierung in verschiedene Altersgruppen eine entscheidende Rolle spielen. So konnte bereits ein Unterschied für Adipokin-Konzentrationen im Plasma von alten und sehr alten (>100 Jahre) Menschen nachgewiesen werden [567, 568]. Für die altersabhängige Visfatin-Plasmakonzentration gesunder Individuen liegen allerdings bislang keine Untersuchungen vor. Die deutliche Altersabhängigkeit der Adipokin-Sekretion aus dem Fettgewebe der Ratte wurde in der vorliegenden Arbeit für mehrere Adipokine erstmalig gezeigt. So waren in Überständen des Fettgewebes alter Ratten signifikant höhere Leptin-Konzentrationen nachweisbar als in Überständen des Fettgewebes junger Ratten (Abbildung 39). Dies war für *epididymales*, *retroperitoneales* und *subcutanes* Fettgewebe allerdings bereits in früheren Studien nachgewiesen worden [289]. Für braunes Fettgewebe konnte die altersabhängige Sekretion von Leptin in der vorliegenden Arbeit zum ersten Mal gezeigt werden. Ebenfalls lag eine signifikant höhere Adiponektin-Konzentration in Überständen des *subcutanen* Fettgewebes alter Ratten vor. Hingegen fand im *epididymalen*, *retroperitonealen* und braunen Fettgewebe alter Ratten eine geringere Sekretion von Visfatin statt als im entsprechenden Fettgewebe junger Ratten. Lediglich die gesteigerte Leptin-Sekretion lässt sich durch die vorhandene altersassoziierte Adipositas erklären. Die Ursachen für eine altersabhängige Sekretion der Adipokine wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht näher untersucht. Mechanismen könnten aber beispielsweise, wie bereits erwähnt, mit altersabhängigen Veränderungen der Immunzellen [573] im Fettgewebe zusammenhängen, die wiederum auch Adipozyten beeinflussen könnten.

Die Expression / Sekretion von Adipokinen ist von der Lokalisation des Fettgewebes im Körper abhängig [330, 574, 575]. Solche Unterschiede zwischen *subcutanem*, *epididymalem* und *retroperitonealem* Fettgewebe sind in der vorliegenden Arbeit ebenfalls ersichtlich, wurden aber nicht statistisch ausgewertet. Bezüglich des weißen Fettgewebes lag im *epididymalen* Fettgewebe die höchste Sekretion von Adiponektin, Leptin und Visfatin vor (Abbildung 39). Entgegen der im Rahmen dieser Arbeit erbrachten Ergebnisse wiesen van Harmelen *et al.* (1998) in *subcutanen* „Fat Explants“ von Frauen eine signifikant höhere Leptin-Sekretion nach als in „Fat Explants“ von deren *omentalem* Fettgewebe [574]. Diese unterschiedlichen Ergebnisse (Abbildung 39) könnten durch Spezies-spezifische Einflüsse (Ratte vs. Mensch), einen abweichenden Inkubationsbeginn (24 Stunden vs. unmittelbar nach der Präparation), Unterschiede im *omentalen* Fettgewebe im Vergleich zu *epididymalem* und *retroperitonealem* Fettgewebe sowie durch unterschiedliche Inkubationszeiten (24 Stunden vs. zwei Stunden) bedingt sein. Vermutlich liegt ein wesentlicher Grund aber auch darin, dass die Frauen über Nacht fasteten, was grundsätzlich zu einer reduzierten Konzentration von Leptin im Blut führt und somit nach dem Fasten ein

anderes Sekretionsprofil im Fettgewebe zugrunde liegen könnte. *Subcutanes* Fettgewebe von über Nacht gefasteten Frauen wies außerdem eine höhere mRNA-Expression von Adiponektin auf als deren *omentalen* Fettgewebe [575]. Dies widerspricht ebenfalls den Ergebnissen der vorliegenden Doktorarbeit (Abbildung 39), könnte aber wiederum durch Spezies-spezifische Unterschiede, die Lokalisation des Fettgewebes und das Fasten der Frauen begründet sein. Außerdem entspricht die mRNA-Expression nicht zwangsläufig dem tatsächlich freigesetzten Adiponektin. *Viszerales* Fettgewebe wies in den „Fat Explants“ von Ratten der vorliegenden Arbeit, entsprechend der Literatur [330], eine stärkere Visfatin-Freisetzung auf als *subcutanes* Fettgewebe. Interessanterweise konnte in der hier vorliegenden Arbeit erstmalig gezeigt werden, dass braunes Fettgewebe Adiponektin und Visfatin ebenfalls in größeren Konzentrationen freisetzt (Abbildung 39).

2.3 mRNA Expression von HMGB1 sowie von Rezeptoren im subcutanen Fettgewebe

Im *subcutanen* Fettgewebe alter Ratten lag eine signifikant geringere mRNA-Expression von HMGB1, RAGE und TLR4 vor als im *subcutanen* Fettgewebe junger Ratten (Abbildung 45). Hingegen konnte im *subcutanen* Fettgewebe alter Ratten eine signifikant höhere TLR2-Expression nachgewiesen werden als im *subcutanen* Fettgewebe junger Ratten.

Über die mRNA-Expression von HMGB1 im Fettgewebe ist sehr wenig aus der Literatur bekannt. Es ist bisher lediglich in einem Übersichtsartikel die Hypothese aufgestellt worden, dass HMGB1 bei Adipositas möglicherweise von absterbenden Adipozyten freigesetzt wird und so einen der Trigger darstellt, die im Fettgewebe zu Inflammation führen [280]. Bei alten Ratten der vorliegenden Studie bestand eine altersassoziierte Adipositas, die folglich möglicherweise mit einer vermehrten Sekretion bzw. Freisetzung von HMGB1 aus hypertrophen und absterbenden Adipozyten einher ging. Ähnlich wie in den Ratten, die im Rahmen der vorliegenden Arbeit mit einer septischen Dosis LPS stimuliert worden waren, könnte hier auch über einen „Feedback“ von HMGB1 auf seine eigene Produktion die reduzierte HMGB1-Expression erklärt werden. Sowohl in den „Fat Explants“ als auch *in vivo* könnten erhöhte HMGB1-Konzentrationen in den Überständen oder im Plasma dazu beigetragen haben. Diese Hypothese ist allerdings sehr spekulativ, da zwar in den „Fat Explants“ alter Ratten (Abbildung 45) und den Lebern der LPS-injizierten Ratten (Abbildung 24) eine reduzierte HMGB1-Expression vorlag, aber die „Fat Explants“ nicht auf eine HMGB1-Freisetzung untersucht wurden.

Die Rezeptoren RAGE, TLR2 und TLR4 sind unter anderem auf Makrophagen lokalisiert. Da bei Adipositas vermehrt Makrophagen im Fettgewebe vorliegen [274, 576], könnte eine gesteigerte Expression dieser Rezeptoren im Fettgewebe alter Ratten vorliegen. Dies konnte

in den „Fat Explants“ der vorliegenden Arbeit jedoch lediglich für TLR2 gezeigt werden (Abbildung 45). Diese Beobachtung wird durch andere Studien unterstützt. So konnte ebenso im Fettgewebe von 6 Wochen alten Broilern eine signifikant höhere TLR2-Expression nachgewiesen werden als im Fettgewebe von 4 Wochen alten Broilern [577]. Ob die Expression von TLR2 im *subcutanen* Fettgewebe tatsächlich durch vermehrt vorliegende Makrophagen gesteigert wurde, oder eine vermehrte Expression in anderen Zellen erfolgte, ist anhand der hier vorliegenden Ergebnisse allerdings nicht überprüfbar. Eine Immunhistologie würde Aufschluss über die Anzahl vorhandener Makrophagen und die Verteilung der Rezeptoren im Fettgewebe von jungen und alten Ratten liefern.

Die reduzierte Expression von RAGE und TLR4 im *subcutanen* Fettgewebe alter Ratten unterliegt vermutlich anderen Mechanismen. In der Literatur sind bisher keine Hinweise für eine reduzierte TLR4-Expression im Alter oder bei Adipositas bekannt. Vollständig reduziertes HMGB1 bindet mit hoher Affinität an RAGE [227]. RAGE scheint an einer Hypertrophie von Adipozyten beteiligt zu sein [559]; ebenso wie HMGB1 [557, 559]. Eine Aktivierung von RAGE durch HMGB1 kann also ursächlich für die Hypertrophie von Adipozyten in Frage kommen. Im *subcutanen* Fettgewebe alter Ratten war in der vorliegenden Arbeit eine signifikant geringere RAGE-Expression nachweisbar als im *subcutanen* Fettgewebe junger Ratten (Abbildung 45). Bei den alten Ratten könnten möglicherweise hypertrophe Adipozyten im *subcutanen* Fettgewebe vorliegen. Cartwright *et al.* (2007) postulieren allerdings für sehr alte Ratten (>24 Monate) lediglich eine Verschiebung des Fettgewebes von *subcutanen* zu *viszeralen* Depots [264]. Tatsächlich waren die Ratten aus der vorliegenden Arbeit 24 Monate alt. Um aber ein mögliches negatives „Feedback“ hypertropher Adipozyten vorerst ausschließen, oder als mögliche Ursache für die reduzierte RAGE-Expression in Betracht ziehen zu können, müsste ein Vergleich der Größe von Adipozyten im *subcutanen* Fettgewebe junger und alter Ratten erfolgen. Eine Untersuchung der RAGE-Expression im *viszeralen* Fettgewebe und immunhistologische Analysen könnten weitere Hinweise liefern. Es wurde bereits gezeigt, dass humane *subcutane* Adipozyten signifikant größer sind als humane *viszerale* Adipozyten [574, 578]. Demnach könnte bei Vorliegen einer gesteigerten RAGE-Expression in *viszeralen* Adipozyten die Hypothese eines negativen „Feedbacks“ bekräftigt werden. Zum jetzigen Zeitpunkt ist eine derartige Aussage noch nicht belegt. Eine zusätzliche molekularbiologische Untersuchung von *epididymalem* Fettgewebe der „Fat Explants“ mittels rreverse Transkriptase (RT)-PCR würde weitere Hinweise liefern. Derzeit wird eine immunhistochemische Untersuchung der Fettgewebe durch die Arbeitsgruppe von Dr. Elena Neumann (Innere Medizin, Schwerpunkt Rheumatologie, Kerckhoff-Klinik /JLU Gießen)

durchgeführt und bietet die Möglichkeit, zusätzliche Informationen über die Größe der Adipozyten in unterschiedlichen Fett-Depots zu gewinnen.

Durch Inkubation mit LPS wurde die mRNA-Expression von RAGE und TLR4 signifikant reduziert (Abbildung 45). Eine Aktivierung des TLR4-Signalweges durch Bindung von LPS ist seit langem bekannt [208]. Eine direkte Bindung von LPS an RAGE wurde ebenfalls bereits nachgewiesen [579]. LPS führt zu einer LPS-Toleranz [580], der unter anderem Veränderungen in der Signalkaskade und der Rezeptorregulation zugrunde liegen [581]. Diese sind allerdings noch nicht vollständig aufgeklärt. Eine Inkubation muriner peritonealer Makrophagen sowie der Makrophagen-ähnlichen Zelllinie RAW264.7 mit LPS führte nach 2,5 Stunden zu einer signifikanten Reduktion der mRNA-Expression von TLR4. Diese lag aber nach 24 Stunden wieder im Bereich der Kontrollkulturen [582]. *In vivo* wurden kontroverse Ergebnisse zur LPS-abhängigen TLR4-Expression im Fettgewebe von Schweinen beschrieben. Bei den Versuchen von Guo *et al.* (2015) war im weißen Fettgewebe aus dem Rücken der Schweine sechs Stunden nach LPS-Applikation (15 µg/kg, i.m.) eine gesteigerte mRNA-Expression von TLR2 sowie TLR4 nachweisbar [520]. Gabler *et al.* (2008) injizierten größere Schweine zweimalig mit LPS im Abstand von 23 Stunden (10 µg/kg / 2,5 µg/kg, i.m.), entnahmen 36 Stunden nach der ersten LPS-Injektion Fettgewebeproben aus dem Bereich des Rückens und konnten in diesen eine gegenüber Kontrollen reduzierte TLR4-Expression auf Proteinebene nachweisen [583]. Die Ergebnisse der beschriebenen Versuche sind weder uneingeschränkt miteinander noch mit der LPS-induzierten Reduktion der TLR4-Expression der vorliegenden Arbeit vergleichbar, deuten aber auf eine stark kontrollierte Expression dieser Rezeptoren im Fettgewebe hin.

Sowohl die Inkubation mit HMGB1 als auch die mit Biglykan führten zu einer signifikanten Reduktion der mRNA-Expression von TLR2 in den „Fat Explants“ des *subcutanen* Fettgewebes (Abbildung 45). Beide DAMPs können an TLR2 binden [261, 584]. Die molekularen Ursachen der reduzierten TLR2-Expression hängen wahrscheinlich mit seiner gesteigerten Aktivierung zusammen, wurden aber hier nicht näher untersucht.

VB Welchen Einfluss haben ω -3-Fettsäuren auf physiologische Vitalparameter und periphere Entzündungsanzeichen?

Langkettige ungesättigte ω -3-FS haben in verschiedenen Zellen und Geweben einen positiven Einfluss auf den sogenannten inflammatorischen Phänotyp [585]. Dieser positive Effekt kommt unter anderem durch eine reduzierte AA-Metabolisierung zu stark pro-inflammatorisch wirkenden Eicosanoiden zustande. Die ω -3-FS EPA und DHA konkurrieren nämlich mit AA um die gleichen Enzymsysteme. Dabei führen ω -3-FS zur Bildung von Eicosanoiden mit geringer pro-inflammatorischer Wirkung sowie zur Produktion von

entzündungsauflösenden SPMs [585]. Aber auch indirekte Effekte einer vermehrten ω -3-FS-Zufuhr sind an deren anti-inflammatorischen Wirkung beteiligt. Dazu gehören unter anderem eine veränderte Membranfluidität [585] sowie eine gestörte Oberflächenpräsentation verschiedener Rezeptoren [385]. In der vorliegenden Arbeit ist unter Zuhilfenahme transgener Fat-1 Mäuse untersucht worden, ob sich dieser veränderte inflammatorische Phänotyp auf die Symptome des „sickness behaviors“ bei einer LPS-induzierten systemischen Entzündung auswirkt. Solche Fat-1 Mäuse sind zur endogenen Konvertierung von ω -6- zu ω -3-FS befähigt [411].

1 Bedeutung von ω -3-Fettsäuren im Rahmen systemischer LPS-induzierter Entzündungen

1.1 Beeinflussung der Vitalparameter bei einer LPS-induzierten Entzündung durch gesteigerte Konzentrationen von ω -3-Fettsäuren

Beeinflussung LPS-induzierter Änderungen der Körperkerntemperatur

Die LPS-Injektion (2,5 mg/kg) führte in der vorliegenden Arbeit bei WT Mäusen 3,25 – 5 Stunden p.i. zu einem signifikanten Anstieg der Körperkerntemperatur. Dieser ging schließlich in eine reduzierte Körpertemperatur über (Abbildung 46, A). Die nächtlich reduzierte Körperkerntemperatur der mit LPS behandelten Mäuse im Vergleich zu Natriumchlorid (NaCl)-injizierten Mäusen gleichen Genotyps lag auch bei den Fat-1 Mäusen vor (Abbildung 46, B). Als Ursache kommt unter anderem eine verminderte Körperkerntemperatur aufgrund der fehlenden nächtlichen Aktivität LPS-behandelter Mäuse in Frage (Abbildung 48, B). Bei starken systemischen Entzündungsreaktionen kommt es außerdem zu einer Hypothermie, also einer reduzierten Körperkerntemperatur, die aktiv vom Körper gehalten wird. Dabei könnte eine Hypothermie möglicherweise ebenso wie Fieber eine adaptive Wirkung besitzen und sich positiv auf den Krankheitsverlauf auswirken [586]. Während es aus tierexperimentellen Studien einige Hinweise für eine derartige adaptive Hypothermie bei schwerer Inflammation gibt, fehlen derzeit Studien, die eine Überprüfung dieser Hypothese im Menschen ermöglichen [586].

Bezogen auf die Körperkerntemperatur waren in der frühen Phase nach LPS-Injektion sehr interessante genotypabhängige Effekte zu beobachten. So reagierten Fat-1 Mäuse auf die Injektion von LPS nicht mit der von WT Mäusen gezeigten frühen Fieberphase. Stattdessen wiesen LPS-behandelte Fat-1 Mäuse 9,25 - 15 Stunden p.i. signifikant geringere Körperkerntemperaturen auf als NaCl-injizierte Fat-1 Mäuse. Bei LPS-injizierten WT Mäusen war dieser Reduktion der Körperkerntemperatur lediglich 13,25 – 15 Stunden p.i. ersichtlich. Betrachtet man die genotypabhängigen Unterschiede der mit LPS behandelten Mäuse, so lagen in Fat-1 Mäusen 3,25 – 7 Stunden p.i. signifikant geringere Körperkerntemperaturen

vor als in WT Mäuse (Abbildung 46, D). Ein fiebersenkender Effekt von ω -3-FS wurde in verschiedenen Studien bereits bei Menschen [387-389], Meerschweinchen [587], Ratten [588] und Mäusen [589] nachgewiesen. Dabei führte eine sechswöchige Fütterung mit einer fischölangereicherten Diät bei Meerschweinchen nicht nur zur Aufhebung eines IL-1-induzierten Fiebers, sondern sogar zu dessen Reduktion bis hin zu einem negativen Fieberindex [587]. Dieser wurde über vier Stunden p.i. erfasst und ist mit dem negativen Fieberindex vergleichbar, der sich bei Fat-1 Mäusen der vorliegenden Arbeit als Reaktion auf die LPS-Injektion ergab (Abbildung 47). Kozak *et al.* führten bereits 1997 eine Studie durch, an der sich einige Parameter der vorliegenden Arbeit orientieren, mit dem Unterschied, dass bei Kozak *et al.* (1997) ω -3-FS mittels Diät angereichert wurden [589]. So wurden Swiss Webster Mäuse 6 Wochen lang mit einer fischölangereicherten Diät oder mit Kontrolldiäten gefüttert, die entweder mit Kokosnussöl angereichert waren oder aus normalem Nagerfutter bestanden. Anschließend wurden die Mäuse, ebenso wie bei den Versuchen der vorliegenden Arbeit, bei einer Raumtemperatur von 30 °C gehalten und i.p. mit der gleichen LPS-Dosis (2,5 mg/kg) oder Saline injiziert. Die Symptome des „sickness behaviors“ wurden dabei ebenfalls telemetrisch erfasst. Auch bei Kozak *et al.* (1997) reagierten die mit Fischöl-gefütterten Mäuse auf die LPS-Injektion mit einer Hypothermie, welche allerdings bis zum Ende des Versuchsablaufes bestehen blieb (72 Stunden p.i.). Obwohl die Versuche der vorliegenden Arbeit nach 24 Stunden beendet wurden, war die Körperkerntemperatur von Fat-1 Mäusen nicht über den gesamten Beobachtungszeitraum hypotherm. Stattdessen stieg die Körperkerntemperatur LPS-injizierter Fat-1 Mäuse ab 6,25 Stunden p.i. wieder kontinuierlich an und war 21,25 - 24 Stunden p.i. signifikant höher als die Körperkerntemperatur von NaCl-injizierten Fat-1 Mäusen (Abbildung 46, B). Da bei einer experimentellen Anreicherung von ω -3-FS mittels Diäten eine eingeschränkte Vergleichbarkeit der verschiedenen Versuchsgruppen besteht und es sich um ein stör anfälliges Modell handelt (siehe Kapitel ID4), könnten die Diskrepanzen zu den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit dadurch begründet sein. Es ist außerdem zu beachten, dass die von Kozak und Kollegen (1997) stimulierten Mäuse nicht nur älter waren, sondern zudem einem anderen Mausstamm angehörten (Swiss Webster vs. C57BL6/N) als die in der vorliegenden Arbeit injizierten Mäuse, was ebenfalls Erklärungen für die Unterschiede sein könnten.

Bei einer akuten experimentellen Pneumonie wurden ebenfalls bereits Untersuchungen mit Fat-1 Mäusen durchgeführt [415, 589]. Die Pneumonie wurde durch eine *intratracheale* Verabreichung von LPS induziert, auf die sowohl WT- als auch Fat-1 Mäuse mit einer Reduktion der Körperkerntemperatur reagierten [415]. Interessanterweise erholten sich Fat-1 Mäuse deutlich schneller von der septischen Hypothermie als WT Mäuse [415]. So wiesen

Fat-1 Mäuse nach 48 Stunden wieder physiologische Körperkerntemperaturen auf, während die Hypothermie bei WT Mäusen bis zum Ende des Versuches nach 72 Stunden bestehen blieb [415]. Sowohl die Ergebnisse von Kozak *et al.* (1997) als auch die von Mayer *et al.* (2009) deuten darauf hin, dass der diätetische oder genetische Anstieg von ω -3-FS auch im späteren Verlauf LPS-induzierter Inflammationen einen Effekt auf die Körperkerntemperatur aufweist [415, 589]. Dieser ist wiederum möglicherweise von der Art der LPS-Applikation abhängig. Demnach wäre ein länger anhaltender Beobachtungszeitraum in weiterführenden Studien von Interesse. Die Ergebnisse der vorliegenden Dissertation deuten darauf hin, dass sowohl bei WT- als auch Fat-1 Mäusen möglicherweise ein länger anhaltendes Fieber aufgetreten wäre, wahrscheinlich mit genotypabhängig unterschiedlichen Zeitverläufen (Abbildung 46). Bei Kozak *et al.* (1997) zeigten nur Mäuse unter Kontrolldiät nach kurzer Hypothermie ein Fieber, welches 24 Stunden p.i. seinen Höhepunkt erreichte.

Überraschenderweise lag bei den mit Fischöl supplementierten Mäusen von Kozak *et al.* (1997) zwischen 24 und 48 Stunden p.i. eine Letalität von 50 % vor. Von den Mäusen mit Kontrolldiäten verstarb hingegen keine [589]. Ursächlich dafür könnte die anhaltende Hypothermie gewesen sein. Wann es sich aber bei Fieber und / oder Hypothermie um adaptive oder maladaptive Prozesse handelt ist allerdings nicht leicht zu beantworten [13, 586].

Beeinflussung der LPS-induzierten Lethargie

Im Gegensatz zur Körperkerntemperatur scheint die LPS-bedingte Lethargie (reduzierte lokomotorische Aktivität) nur geringfügig durch die Versorgung mit ω -3-FS beeinflusst zu werden. Die Applikation von LPS (2,5 mg/kg, i.p.) bewirkte in der hier vorliegenden Arbeit bei Mäusen beider Genotypen eine signifikante Reduktion der lokomotorischen Aktivität über 24 Stunden. Davon war insbesondere die nächtliche Aktivität betroffen. Dies zeigte sich sowohl im Zeitverlauf (Abbildung 48) als auch bei Berechnung der kumulativen Aktivität (Abbildung 49). Auch die Fütterung von Fischöl hatte in den ersten 24 Stunden p.i. keinen positiven Einfluss auf die LPS-induzierte Lethargie [589]. Mit Fischöl supplementierte Mäuse wiesen sogar eine stärkere sowie länger anhaltende Lethargie auf als Mäuse, die eine Kontrolldiät erhielten [589]. Die *intratracheale* Applikation von LPS bewirkte in WT- und Fat-1 Mäusen gleichermaßen einen Abfall der lokomotorischen Aktivität über 24 Stunden nach der Instillation [415]. Allerdings erholten sich Fat-1 Mäuse schneller von der LPS-induzierten Lethargie und wiesen ab der zweiten Nacht nach der Instillation von LPS eine signifikant höhere Aktivität auf als WT Mäuse [415]. Es wäre also auch bezüglich der lokomotorischen Aktivität ein länger andauernder Untersuchungszeitraum von Interesse.

In der vorliegenden Arbeit wurde darüber hinaus ein interessanter Nebenbefund gemacht. Unter Kontrollbedingungen wiesen Fat-1 Mäuse eine signifikant höhere nächtliche Aktivität auf als WT Mäuse (Abbildung 48 und Abbildung 49). In einer Reihe unabhängiger Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen zeigten allerdings Nager, die ω -3-FS-defizient ernährt wurden, ebenfalls eine gesteigerte lokomotorische Aktivität [590-592]. Dies widerspricht der im Rahmen dieser Arbeit gemachten Beobachtungen einer gesteigerten lokomotorischen Aktivität von Fat-1 Mäusen. Tatsächlich haben bisher nur wenige Studien den Effekt einer Supplementierung von ω -3-FS auf die lokomotorische Aktivität untersucht. Die Supplementierung von ω -3-FS im grauen Mausmaki, einer Primatenart, bewirkte eine signifikante Reduktion der spontanen nächtlichen Aktivität [593]. Carrie *et al.* (2000) konnten zeigen, dass die Verabreichung einer fischöhlhaltigen Diät die exploratorische Aktivität junger Mäuse (7 – 11 Wochen) steigert [594]. Hingegen wiesen erwachsene Mäuse (9 – 10 Monate) keinen diätinduzierten Unterschied auf. Alte Mäuse (17 – 19 Monate) zeigten aufgrund der fischöhlhaltigen Diät sogar eine reduzierte exploratorische Aktivität gegenüber Kontrollen [594]. Diese Altersabhängigkeit könnte ein Grund für die gesteigerte Aktivität von Fat-1 Mäusen der vorliegenden Arbeit sein und die widersprüchlichen Ergebnisse erklären. In der vorliegenden Arbeit waren die Tiere zum Versuchszeitpunkt 7 - 8 Wochen alt und würden demnach in den von Carrie *et al.* (2000) untersuchten Gruppen zu den jungen Mäusen gehören [594]. Ein Zusammenhang zwischen der Versorgung mit ω -3-FS und dem Spiel- sowie Sozialverhalten wurde bereits bei Schweinen [595] und Mäusen [596] festgestellt. Zwar kann dieses Verhalten nicht mit der absoluten motorischen Aktivität gleichgesetzt werden, könnte aber einen Hinweis auf eine gesteigerte Motivation zur Bewegung liefern. Es ist denkbar, dass sowohl eine ω -3-FS-Defizienz als auch eine zusätzliche Versorgung mit ω -3-FS abhängig, vom Alter der Tiere, einen Anstieg der lokomotorischen Aktivität gegenüber Kontrolltieren bewirkt.

Beeinflussung der LPS-induzierten Adipsie, Anorexie und des Gewichtsverlustes

Die Injektion von LPS führte in den Versuchen der vorliegenden Arbeit erwartungsgemäß zu einer Anorexie und Adipsie (Abbildung 50) sowie zur Reduktion des Körpergewichtes (Abbildung 51). Dies war unabhängig vom Genotyp sowohl bei WT- als auch Fat-1 Mäusen zu beobachten. Eine vom Genotyp unabhängige Reduktion der Futterraufnahme und des Körpergewichtes wurde auch nach i.p. Injektion von LPS (125 μ g/kg) eines anderen Serotyps (0127:B5) in WT- und Fat-1 Mäusen gezeigt [416] und entspricht demnach den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit. Bei den Versuchen von Kozak *et al.* (1997) lag ebenfalls eine gleichermaßen ausgeprägte Anorexie der Mäuse mit unterschiedlichen Diäten vor. Allerdings kam es bei den mit fischöhlhaltiger Diät gefütterten

Mäusen nicht zur Reduktion des Körpergewichtes [589]. Da die fischöhlhaltige Diät bei diesem Versuch aber die höchste Energiedichte aufwies, liegt die fehlende Gewichtsabnahme möglicherweise darin begründet. Des Weiteren führt auch eine ω -3-FS-Defizienz nicht zur Veränderung der LPS-induzierten Anorexie sowie Gewichtsabnahme im Vergleich zu ausgewogen ernährten Kontrollmäusen [597, 598]. Zusammenfassend scheinen die LPS-bedingte Adipsie, die Anorexie und die Gewichtsabnahme nicht durch die Versorgung mit ω -3-FS beeinflusst zu werden.

1.2 Wirkung von ω -3-Fettsäuren auf basale und LPS-stimulierte periphere inflammatorische Parameter

1.2.1 Einfluss von ω -3-Fettsäuren auf zirkulierende Zytokine im Blutplasma

Bei Verwendung hoher Dosen LPS, wie sie in der vorliegenden Arbeit angewendet wurden, ist insbesondere die humorale Signalübertragung von Bedeutung und überdeckt die durch neuronale Signalübertragung entstehenden Effekte [599]. Die Zytokine TNF α und IL-6 sind im Rahmen der humoralen Signalübertragung bei Infektionen mit gram-negativen Bakterien sehr wichtig [2, 89] und maßgeblich an der Entstehung von Symptomen des „sickness behaviors“ beteiligt [2, 79, 110, 131, 132]. Die nach LPS-Injektion deutlich unterschiedliche Körperkerntemperatur von Mäusen beider Genotypen (Abbildung 46) ließ eine abweichende Zytokin-Konzentration im Plasma vermuten. Da sich der Temperaturunterschied insbesondere in der frühen Phase nach Injektion von LPS zeigte, wurde eine zweite Versuchsgruppe von Mäusen nach fünf Stunden perfundiert. Es ist bekannt, dass eine Fieberantwort direkt mit der Konzentration von IL-6 im Plasma korreliert [126, 127]. Demnach war in WT Mäusen eine höhere IL-6-Konzentration zu erwarten als in Fat-1 Mäusen. TNF α wird hingegen eher mit der Induktion einer Hypothermie in Verbindung gebracht [109, 120, 600, 601] und wurde demnach in Fat-1 Mäusen mit einer höheren Konzentration erwartet. Betrachtet man allerdings die tatsächlich fünf Stunden nach Injektion vorliegenden Plasmakonzentrationen von IL-6 und TNF α , so führte die Injektion von LPS sowohl zu einem signifikanten Anstieg der IL-6- als auch der TNF α -Konzentrationen in Mäusen beider Genotypen (Abbildung 52). Lediglich tendenziell konnte fünf Stunden p.i. eine höhere TNF α -Konzentration und eine geringere IL-6-Konzentration im Plasma der LPS-injizierten Fat-1 Mäuse im Vergleich zu LPS-injizierten WT Mäusen nachgewiesen werden. Dieser Effekt erreichte wahrscheinlich aufgrund der geringen Anzahl an Mäusen in den Versuchsgruppen zum Zeitpunkt fünf Stunden p.i. (Fat-1 n = 3; WT n = 4 / 5) sowie aufgrund der damit einhergehenden, höheren Standardabweichungen keine Signifikanz. Zur Veranschaulichung dieser Befunde, die durch eine Erhöhung der pro Gruppe eingesetzten Versuchstiere verifiziert werden sollten, können Quotienten aus den Konzentrationen von IL-6 und TNF α

herangezogen werden. In Abbildung 60 sind die Mittelwerte der Quotienten dargestellt. Sie zeigen deutlich, dass fünf Stunden nach Injektion von LPS in Fat-1 Mäusen erwartungsgemäß eine höhere TNF α - als IL-6-Konzentration vorlag. Hingegen war im Plasma von WT Mäusen zu diesem Zeitpunkt eine höhere IL-6- als TNF α -Konzentration nachweisbar. Diese Gegebenheiten könnten das Fieber der WT Mäuse und das fehlende Fieber der Fat-1 Mäuse erklären.

Die Perfusion nach fünf Stunden wurde gewählt, weil zu diesem Zeitpunkt die größten Temperaturunterschiede vorlagen (Abbildung 46, D). Außerdem sind im Gehirn zu diesem Zeitpunkt wichtige Signalwege der Kommunikation zwischen Immunsystem und Gehirn nachweisbar (z. B. COX-2, mikrosomale Prostaglandin E-Synthase [mPGES], NF-IL6 und „signal transducer and activator of transcription 3“ [STAT3]). Die Konzentration von TNF α steigt nach LPS-Applikation als erstes Zytokin an, erreicht einen Peak nach 60 Minuten und sinkt anschließend langsam wieder ab [89, 127]. Da die Konzentration von IL-6 verzögert zu TNF α ansteigt und erst nach 2 - 3 Stunden p.i. einen Peak erreicht [89, 127], wäre prinzipiell auch ein früherer Perfusionszeitpunkt (zwei Stunden p.i.) zur Ermittlung der genotypabhängigen Konzentrationsunterschiede denkbar. Allerdings lag zu diesem Zeitpunkt kein signifikanter genotypabhängiger Unterschied der Körperkerntemperatur vor. Außerdem bestünde die Gefahr hauptsächlich stressinduzierte Effekte der Injektion zu untersuchen.

Kozak und Kollegen (1997) konnten 90 Minuten nach LPS-Injektion, verglichen mit Mäusen unter Kontrolldiät, in den mit Fischöl gefütterten Mäusen eine überhöhte TNF α -Konzentration nachweisen [589]. Als Begründung wurde ein fehlender negativer „Feedback“ durch PGE₂ postuliert. PGE₂ wird unter Einbeziehung der geschwindigkeitsbestimmenden Enzyme COX-2 sowie mPGES aus AA metabolisiert [141]. PGE₂ ist maßgeblich an den Kardinalsymptomen der Entzündung sowie der Entstehung von Fieber beteiligt. Eine Supplementierung von ω -3-FS (Fütterung von Fischöl oder Fat-1 Mäuse) bewirkt durch verminderte AA-Konzentrationen eine reduzierte Veresterung von Phospholipiden mit AA und führt stattdessen zu einer gesteigerten Veresterung mit DHA [410, 413, 602]. Deshalb war aufgrund von erhöhten ω -3-FS-Konzentrationen in einigen Studien unter inflammatorischen Bedingungen eine reduzierte PGE₂-Synthese [410, 589, 603, 604] bzw. eine reduzierte Expression von COX-2 und mPGES [390] nachweisbar. Darüber hinaus wurde mit Hilfe von *in vitro* [605] und *in vivo* [150, 608] Versuchen ein hemmender Einfluss von PGE₂ auf die TNF α -Synthese nachgewiesen. So bewirkte die Inkubation muriner Makrophagen mit LPS erwartungsgemäß die Synthese von TNF α . Im Sinne eines negativen „Feedbacks“ wurde diese durch eine gleichzeitige Inkubation mit PGE₂ gehemmt, hingegen durch eine gleichzeitige Inkubation mit dem COX-Inhibitor Indomethacin gesteigert [606]. Auch der LPS-induzierte Anstieg von TNF α in Überständen primärer Zellkulturen von

Organum vasculosum laminae terminalis (OVLT) und MnPO wurde durch eine gleichzeitige Inkubation mit PGE₂ aufgehoben [607]. *In vivo* stieg die LPS-induzierte TNF α -Konzentration im Plasma nach einer Hemmung der PGE₂-Synthese durch COX-Inhibitoren stärker an [150, 608]. Die vermutlich reduzierte PGE₂-Synthese in LPS-injizierten Fat-1 Mäusen gegenüber WT Mäusen führte in der vorliegenden Arbeit hingegen nicht zu einer statistisch signifikanten Überhöhung der TNF α -Konzentration im Plasma. Da aber insbesondere bei Betrachtung des Quotienten aus TNF α und IL-6 eine gesteigerte TNF α -Konzentration in Fat-1 Mäusen sichtbar wird, ist es wahrscheinlich, dass es auch hier über verringerte PGE₂-Bildung zur Enthemmung der TNF α -Synthese kam. Allerdings konnte in der Peripherie lediglich 24 Stunden p.i. ein signifikanter genotypabhängiger Haupteffekt mit reduzierter mPGES-Expression in der Milz von Fat-1 Mäusen nachgewiesen werden (Abbildung 54). Es bleibt aber zu berücksichtigen, dass der Versuchsaufbau der vorliegenden Dissertation zwar in einigen Parametern sehr gut mit dem von Kozak und Kollegen (1997) durchgeführten Versuch vergleichbar ist, aber aus der Literatur auch Studien mit einer Reduktion von TNF α -Konzentrationen in ω -3-FS-supplementierten Individuen bekannt sind [387, 603]. Sicher spielen die unterschiedlichen Zeitpunkte der Untersuchung und die genauen Modellbedingungen eine wichtige Rolle.

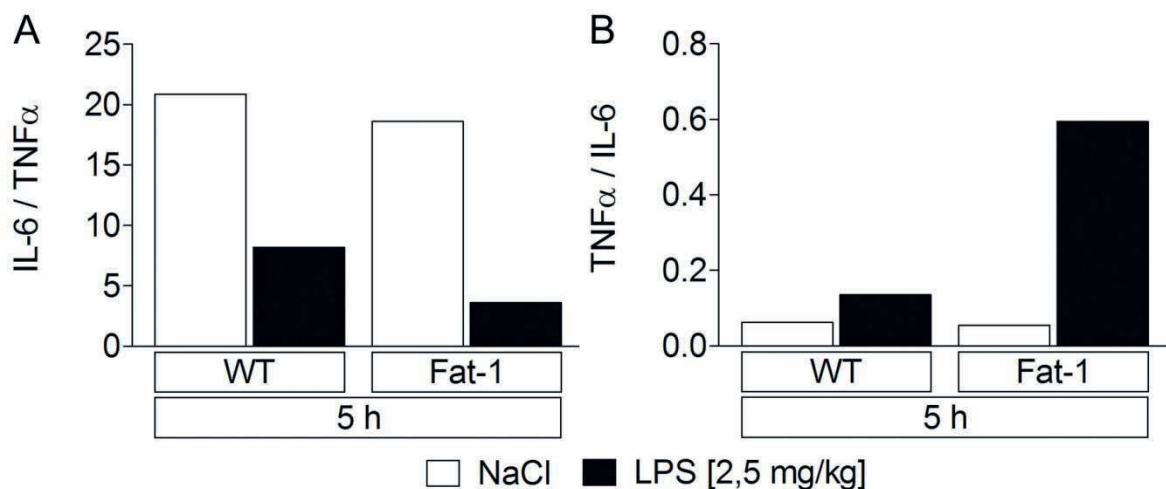


Abbildung 60: Darstellung der Quotienten aus den Plasmakonzentrationen von IL-6 und TNF α

Zur Verdeutlichung der genotypabhängigen Induktion von TNF α und IL-6 nach LPS-Injektion, wurden Quotienten aus deren Plasmakonzentrationen berechnet. Sie sind als Mittelwerte dargestellt. Die Quotienten verdeutlichen, dass in LPS-injizierten WT Mäusen eine höhere IL-6- als TNF α -Konzentration im Plasma vorlag; Fat-1 Mäuse hingegen mit einer höheren TNF α - als IL-6-Konzentration reagierten. Die Tierzahlen sind der Tabelle 75 zu entnehmen.

In Plasmaproben, die 24 Stunden nach LPS-Injektion gewonnenen wurden, konnte kein TNF α mehr nachgewiesen werden. Dies entspricht dem bekannten Verlauf der TNF α -Konzentration [89, 127] und war demnach zu erwarten. Hingegen lag IL-6 weiterhin in höheren Konzentrationen vor als im Plasma der mit NaCl injizierten Mäuse, jedoch in

geringeren Konzentrationen als fünf Stunden nach LPS-Injektion (Abbildung 52). Obwohl LPS-injizierte Mäuse beider Genotypen 24 Stunden p.i. eine annähernd identische Körperkerntemperatur aufwiesen (Abbildung 46), wurde im Plasma der Fat-1 Mäuse eine signifikant geringere IL-6-Konzentration detektiert als im Plasma der WT Mäuse. Auch dieser Befund spricht dafür, dass ein länger andauernder Untersuchungszeitraum für weiterführende Studien möglicher Effekte von ω -3-FS sinnvoll wäre. Interessanterweise kann PGE_2 die Synthese von IL-6 induzieren [609, 610]. Dieser Zusammenhang könnte die reduzierte IL-6-Konzentration in Fat-1 Mäusen zum Zeitpunkt 24 Stunden p.i. erklären. Außerdem ist mehrfach beschrieben worden, dass eine Verschiebung des Fettsäuremusters hin zu ω -3-FS unter verschiedenen inflammatorischen Bedingungen, aber auch im unstimulierten Zustand, eine Reduktion der IL-6-Konzentration bewirken kann [603, 611, 612].

1.2.2 Der prozentuale Anteil verschiedener Leukozyten im Blut wird durch ω -3-FS nicht beeinflusst

In der hier vorliegenden Arbeit wurden von gewonnenem Blut Ausstriche angefertigt und gefärbt, um den prozentualen Anteil der verschiedenen Leukozyten im Blut zu bestimmen und mögliche Einflüsse von ω -3-FS in Fat-1 Mäusen zu untersuchen. Die LPS-Injektion führte erwartungsgemäß zu einer Neutrophilie. Diese beinhaltet eine Reduktion von Lymphozyten und einen Anstieg neutrophiler Granulozyten im Blut [613]. Die Neutrophilie trat unabhängig vom Genotyp auf (siehe Tabelle 76). Zur Bedeutung von ω -3-FS für die Anzahl von Leukozyten und deren prozentuale Anteile liegen in der Literatur nur wenige Ergebnisse vor. Unter Kontrollbedingungen wiesen gesunde Menschen, deren Diät sechs Monate mit ω -3-FS angereichert wurde, eine reduzierte Anzahl weißer Blutkörperchen auf [614]. In der hier vorliegenden Arbeit konnte auch unter Kontrollbedingungen kein genotypabhängiger Unterschied festgestellt werden. In einer anderen Studie führten zweimal wöchentlich durchgeführte Injektionen von LPS über sechs Wochen zu einer chronischen Inflammation bei Schweinen [615]. Dabei wurde eine Gruppe der Schweine mit ω -3-FS supplementiert. Interessanterweise bewirkte diese Supplementierung eine signifikante Reduktion weißer Blutkörperchen und des Anteils von Lymphozyten [615]. Sowohl die Ergebnisse von Mukaro *et al.* (2008) als auch die von Upadhaya *et al.* (2015) wurden in der vorliegenden Arbeit nicht bestätigt. Diesen unterschiedlichen Ergebnissen aus Modellen verschiedener Spezies könnte eine Spezies-spezifische Regulation zugrunde liegen (Maus vs. Mensch / Schwein). Zudem könnte die Versorgung mit ω -3-FS während einer akuten Inflammation andere Effekte auf die im Blut zirkulierenden Leukozyten aufweisen als während einer chronischen Inflammation. Zum jetzigen Zeitpunkt bleibt weitgehend unklar,

wie ω -3-FS sich auf die prozentualen Anteile von Leukozyten auswirken. In dem von mir verwendeten Versuchsmodell konnten allerdings keine Einflüsse nachgewiesen werden.

1.3 Einfluss von ω -3-Fettsäuren auf die mRNA-Expression inflammatorischer Parameter

Die Expressionen wichtiger pro-inflammatorischer Gene wurden in Leber und Milz von WT- und Fat-1 Mäusen als weitere Marker für Einflüsse auf periphere Entzündung untersucht. Diese Untersuchung diente auch der Ermittlung einer möglichen Ursache für die deutlich voneinander abweichenden Körperkerntemperaturen beider Genotypen als Reaktion auf die Applikation von LPS (Abbildung 46, D).

Beeinflussung der Expression wichtiger Transkriptionsfaktoren in Leber und Milz

Die Transkriptionsfaktoren NF κ B, NF-IL6 und STAT3 sind im Rahmen von systemischen Entzündungen von großer Bedeutung [42]. Ihre Expression bzw. die Expression ihrer spezifischen Inhibitoren („inhibitor of κ B α “ [IkB α], „suppressor of cytokine signaling 3“ [SOCS3]) kann als Aktivitätsmarker dienen und wurde auch in der vorliegenden Arbeit untersucht. Erwartungsgemäß führte die LPS-Injektion zu einer gesteigerten Expression von IkB α , NF-IL6 und SOCS3 (Abbildung 53). Dies war sowohl 5 als auch 24 Stunden (exkl. IkB α in der Leber) nach LPS-Injektion nachweisbar und spiegelt die LPS-induzierte Aktivität dieser Transkriptionsfaktoren wieder. Eine genotypabhängige Beeinflussung der Expression war nur für NF-IL6 zu verzeichnen. Dessen Expression war in der Leber (fünf Stunden p.i.) sowie in der Milz (24 Stunden p.i.) von Fat-1 Mäusen signifikant höher als in LPS-injizierten WT Mäusen (Abbildung 53, C und D). Für den Zusammenhang zwischen der Versorgung mit ω -3-FS und der Aktivität von NF-IL6 sowie STAT3 liegt bisher lediglich eine Untersuchung vor. Dabei wurden Zellen einer humanen Leberzell-Linie mit IL-6 stimuliert und der Effekt einer gleichzeitigen Inkubation mit DHA oder EPA untersucht [616]. Sowohl DHA als auch EPA bewirkten eine Reduktion der IL-6-induzierten STAT3-Aktivierung; mit einer verminderten Phosphorylierung, einer reduzierten DNA-Bindungsaktivität und einer geringeren intranukleären Translokation. Entgegen dieser Ergebnisse war in LPS-injizierten Fat-1 Mäusen der vorliegenden Arbeit eine gleichermaßen induzierte SOCS3-Expression nachweisbar wie in Leber und Milz von WT Mäusen. Es scheint demnach keine Reduktion der STAT3-Aktivität in Fat-1 Mäusen vorgelegen zu haben. In den Versuchen von Wang *et al.* (2013) wurde weder die durch IL-6 induzierte Phosphorylierung von NF-IL6 noch dessen DNA-Bindungsaktivität durch gleichzeitige Inkubation der Leberzellen mit EPA oder DHA reduziert [616]. Interessanterweise deuten die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit sogar auf eine verstärkte LPS-induzierte NF-IL6-Aktivität in Fat-1 Mäusen hin. Dabei liegen jedoch keine Hinweise für mögliche Ursachen einer gesteigerten LPS-induzierten NF-IL6-

Expression in Fat-1 Mäusen vor. Die gesteigerte NF-IL6-Expression kommt aber als Grund für die in Fat-1 und WT Mäusen gleichermaßen induzierte SOCS3-Expression in Frage, da eine durch NF-IL6 induzierte Expression von SOCS3 bereits nachgewiesen wurde [60]. In der hier vorliegenden Arbeit könnte also der hemmende Effekt von ω -3-FS auf die STAT3-Aktivierung, der von Wang *et al.* (2013) beschrieben wurde [616], durch eine NF-IL6-induzierte SOCS3-Expression überdeckt worden sein. Außerdem führten Wang und Kollegen (2013) *in vitro* Untersuchungen durch [616], die eine Reduktion der IL-6-induzierten STAT3-Aktivität durch DHA und EPA zeigten. Bei einem Vergleich mit den *in vivo* Versuchen der vorliegenden Arbeit ist dies zu berücksichtigen.

In vielen verschiedenen Versuchsansätzen wurde eine Reduktion der induzierten NF κ B Aktivierung aufgrund von ω -3-FS nachgewiesen. So bewirkte beispielsweise die Inkubation von humanen cornealen Epithelzellen mit ALA, vor und während der Inkubation mit LPS, eine Inhibition der durch LPS induzierten Zytokin-Synthese. Dies ging mit einer signifikanten Reduktion der I κ B α -Expression einher [617]. Ebenso verhinderte die Vorinkubation mit EPA eine LPS-induzierte Aktivierung von NF κ B in einer Zelllinie ösophagealer Krebszellen [618]. Aber auch im Rahmen von systemischen LPS-induzierten Entzündungen wurden hemmende Effekte von ω -3-FS auf die NF κ B-Aktivierung festgestellt. Eine Supplementierung mit Fischöl verminderte die durch LPS (3,5 mg/kg, i.p.) induzierte NF κ B-Expression in Dünndarm und Muskulatur [619]. Fat-1 Mäuse wiesen sowohl basal als auch nach *intratrachealer* Applikation von LPS (10 μ g/Maus) ebenfalls eine geringere NF κ B-Expression auf als WT Mäuse [415]. In Fat-1 Mäusen der vorliegenden Arbeit war allerdings keine geringere Expression von I κ B α nachweisbar; weder basal noch nach LPS-Applikation (Abbildung 53, A und B). Eine mögliche Ursache dafür, dass die in anderen Studien unter Supplementierung von ω -3-FS beobachtete Reduktion der Aktivität des NF κ B-Signalweges in der vorliegenden Arbeit nicht bestätigt werden konnte, ist anhand der bisher gewonnenen Ergebnisse nicht eindeutig zu klären. Es könnte aber unter anderem mit Unterschieden der verwendeten Modelle zusammenhängen. Obwohl die Expression von I κ B α häufig als Aktivitätsmarker für NF κ B verwendet wird, haben Nadjar *et al.* (2003) eine zeitabhängige und zelltypspezifische Diskrepanz zwischen der I κ B α -Expression und der nukleären Translokation von NF κ B festgestellt [43]. Auch andere Faktoren, wie beispielsweise Noradrenalin, sind starke Induktoren der I κ B α -Expression [620]. Sie können somit fälschliche Hinweise auf eine NF κ B-Aktivierung liefern. Es sollte demnach eine gemeinsame Betrachtung der I κ B α -Expression und der NF κ B-Translokation erfolgen. Ein mögliches Missverhältnis (I κ B α -Expression vs. NF κ B-Translokation) ist demnach als Ursache für die fehlende Reduktion der NF κ B-Aktivierung in Fat-1 Mäusen der vorliegenden Arbeit zu berücksichtigen. Die unverändert

induzierte I κ B α -Expression ist nicht zwangsläufig mit einer unveränderten NF κ B-Aktivität gleichzusetzen.

Beeinflussung der Expression wichtiger Enzyme in Leber und Milz

Die COX-1-Expression war in der vorliegenden Arbeit aufgrund der bei Fat-1 Mäusen nachgewiesenen Hypothermie von besonderem Interesse. COX-1 wird mit der Entstehung einer Hypothermie in Verbindung gebracht [140], weshalb in den mit LPS-injizierten Fat-1 Mäusen eine angehobene COX-1-Expression erwartet wurde. Aus der Literatur ist eine durch ω -3-FS modifizierte Expression von COX-1 allerdings nicht bekannt. In der vorliegenden Arbeit führte die Injektion von LPS sowohl in Leber und Milz von WT- als auch von Fat-1 Mäusen zu einer signifikanten Reduktion der COX-1-Expression (Abbildung 54, A, B). In der Leber war fünf Stunden p.i. allerdings kein LPS-abhängiger Effekt nachweisbar. Stattdessen lag fünf Stunden p.i. in der Leber ein signifikanter genotypabhängiger Haupteffekt mit erhöhter COX-1-Expression in Fat-1 Mäusen vor. Außerdem war in der Leber von Fat-1 Mäusen unter Kontrollbedingungen 24 Stunden p.i. eine signifikant höhere Expression von COX-1 nachweisbar als in der Leber von WT Mäusen (Abbildung 54). Betrachtet man lediglich die COX-1-Expression der mit LPS-injizierten Mäuse beider Genotypen, so könnte die erhöhte Expression in der Leber von Fat-1 Mäusen (fünf Stunden p.i.) als mögliche Ursache für die reduzierte Körperkerntemperatur in Frage kommen. COX-1 scheint zu diesem Zeitpunkt allerdings lediglich nach LPS-Stimulation eine Rolle zu spielen. Dafür spricht, dass NaCl-injizierte Fat-1 Mäuse fünf Stunden p.i. eine signifikant höhere COX-1-Expression in der Leber aufwiesen als mit NaCl injizierte WT Mäuse. Dabei unterschied sich die Körperkerntemperatur NaCl-injizierter Mäuse beider Genotypen aber nicht voneinander. Allerdings zeigten NaCl-injizierte Fat-1 Mäuse 17,25 - 23 Stunden p.i. eine signifikant geringere Körperkerntemperatur als die entsprechend behandelten WT Mäuse (Abbildung 46, C). Dies war begleitet von einer signifikant höheren COX-1-Expression in der Leber NaCl-injizierter Fat-1 Mäuse (24 Stunden p.i.). Zusammenfassend kann also eine mögliche Beteiligung der gesteigerten COX-1-Expression an der reduzierten Körperkerntemperatur nur teilweise bestätigt werden.

COX-2 und mPGES sind die geschwindigkeitsbestimmenden Enzyme der PGE₂-Synthese. Deren Expression wird als Hinweis auf die PGE₂-Synthese herangezogen [143]. Verschiedene Studien konnten bereits zeigen, dass eine verbesserte Versorgung mit ω -3-FS unter inflammatorischen Bedingungen zu einer gegenüber Kontrolltieren reduzierten PGE₂-Synthese führt [589, 603, 604]. Als Grund dafür kommt die reduzierte Verfügbarkeit von AA, welche die Ausgangssubstanz der PGE₂-Synthese darstellt, in Frage. Im Hippocampus von Fat-1 Mäusen lag 24 Stunden nach Applikation von LPS (5 μ g, i.c.v.) eine geringere

Expression von COX-2 und mPGES vor als im Hippocampus von LPS-stimulierten WT Mäusen [390]. In den Versuchen der vorliegenden Arbeit war fünf Stunden nach LPS-Injektion in der Milz von Mäusen beider Genotypen eine gesteigerte COX-2-Expression nachweisbar (Abbildung 54, C und D). Auch die mPGES-Expression wurde durch Injektion von LPS in Mäusen beider Genotypen weitgehend gleichermaßen gesteigert (Abbildung 54, E und F). Ein signifikanter genotypabhängiger Haupteffekt mit reduzierter mPGES-Expression in Fat-1 Mäusen war 24 Stunden p.i. in der Milz zu detektieren. In der Leber von WT- und Fat-1 Mäusen wurde 24 Stunden nach LPS-Injektion eine signifikant gesteigerte mPGES-Expression nachgewiesen, wohingegen die COX-2-Expression zu diesem Zeitpunkt keinen LPS-induzierten Anstieg mehr aufwies. Dies wirkt paradox, aber ähnliche Ergebnisse wurden bereits von Ivanov *et al.* (2002) beschrieben [621]. Bei deren Versuchen wurden Ratten 34, 94 und 296 Minuten nach LPS-Applikation (50 µg/kg, i.v.) perfundiert und die mRNA-Expression verschiedener COX- und PGES-Enzyme bestimmt. Unter anderem war in der Leber über diesen Zeitraum hinweg eine fortwährend ansteigende mPGES-Expression nachweisbar, während die COX-2-Expression 296 Minuten p.i. wieder gesunken war [621]. Diese Ergebnisse sind zwar nicht uneingeschränkt mit denen der vorliegenden Arbeit zu vergleichen, deuten aber möglicherweise auf eine ähnliche Regulation hin. Ivanov und Kollegen (2002) postulierten eine COX-unabhängige Synthese von PGE₂ im späteren Verlauf einer Entzündung. *In vitro* setzten Makrophagen, die für 24 Stunden in EPA-haltigem Medium kultiviert wurden, nach LPS-Stimulus weniger PGE₂ frei als ohne EPA-Substitution [622]. Dies ging allerdings mit einer verstärkten Expression von COX-2 auf mRNA- und Proteinebene einher, was wiederum durch einen exogenen Zusatz von PGE₂ aufgehoben wurde [622]. Demnach konnte *in vitro* ein negativer „Feedback“ von PGE₂ auf die COX-2-Expression nachgewiesen werden. Dieser könnte auch die *in vivo* aufgetretene Reduktion der COX-2-Expression in der späten Entzündungsphase erklären. Dass in Leber und Milz der LPS-injizierten Fat-1 Mäuse die erwartete Reduktion der mPGES-Expression nicht nachgewiesen werden konnte, könnte möglicherweise mit der signifikant höheren NF-IL6-Expression in Fat-1 Mäusen im Vergleich zu WT Mäusen zusammenhängen. NF-IL6 ist an der Transkription von mPGES beteiligt [54, 55]. Eine Reduktion der mPGES-Expression, die aufgrund des höheren Gehaltes an ω-3-FS zu vermuten ist, könnte deshalb durch den Anstieg der NF-IL6-Expression überdeckt worden sein.

Beeinflussung der Expression wichtiger Zytokine in Leber und Milz

Die auf mRNA-Ebene nachgewiesene Expression von IL-6 und TNFα in Leber und Milz (Abbildung 55) entsprach weitgehend den Plasmakonzentrationen dieser Zytokine (Abbildung 52). Die LPS-Injektion bewirkte erwartungsgemäß einen Anstieg der Expression

von IL-6 und TNF α in beiden Organen. Dieser Effekt war nach fünf Stunden deutlich stärker ausgeprägt als nach 24 Stunden. Im Gegensatz zur TNF α -Konzentration im Plasma, war 24 Stunden nach LPS-Injektion weiterhin eine erhöhte TNF α -Expression detektierbar. Signifikante genotypabhängige Effekte waren lediglich in der Leber nachzuweisen. Entsprechend der Ergebnisse von Kozak *et al.* (1997), die eine überhöhte LPS-induzierte TNF α -Plasmakonzentration in mit Fischöl supplementierten Mäusen feststellten und dies auf eine reduzierte PGE₂-Konzentration zurückführten [589], lag bei Fat-1 Mäusen fünf Stunden nach LPS-Injektion eine signifikant höhere TNF α -Expression vor als bei WT Mäusen (Abbildung 55, C). Dies war in der Plasmakonzentration von Mäusen der vorliegenden Arbeit allerdings nicht zu sehen (Abbildung 52). Fat-1 Mäuse wiesen 24 Stunden nach LPS-Injektion eine signifikant geringere IL-6-Konzentration im Plasma auf als WT Mäuse. Auf mRNA-Ebene zeigte sich dies in der Leber ebenfalls. Da die nachgewiesenen mRNA-Expressionen mit den Plasmakonzentrationen vergleichbar sind, wird hier auf die diesbezüglich erfolgte Diskussion verwiesen (siehe Kapitel VB1.2.1).

Zusammenfassend muss allerdings festgehalten werden, dass die genotypabhängigen Unterschiede der Konzentration zirkulierender Zytokine sowie der Expression in Leber und Milz nicht sehr groß sind. Die zum Zeitpunkt fünf Stunden nach der Injektion verwendete geringe Tierzahl (Fat-1 n = 3; WT n = 4 / 5) ist hierbei zu berücksichtigen. Der stark genotypabhängige Temperaturverlauf nach LPS-Injektion (Abbildung 46, D) sollte insbesondere durch die Untersuchung zentraler inflammatorischer Marker ergänzt werden. Dr. Janne Bredehöft konnte mit Hilfe der „matrix-assisted laser desorption / ionisation mass spectrometry“ (MALDI-MS) erste Hinweise auf ein genotyp- sowie behandlungsabhängiges Verteilungsmuster verschiedener Lipide, beispielsweise Phospholipide, im OVLT gewinnen [623]. Das OVLT stellt ein sCVO dar, welches maßgeblich an der Entstehung von Fieber beteiligt ist [2]. Diese unterschiedlichen Verteilungsmuster könnten ursächlich an den genotypabhängigen Temperaturverläufen beteiligt sein und sollen weiterführend mit höheren Tierzahlen verifiziert werden.

Die Ergebnisse des „Fat-1 Projektes“ werden in Abbildung 61 schematisch dargestellt. Allerdings werden dabei lediglich die genotypabhängigen Effekte visualisiert, nicht die behandlungsabhängigen Effekte. LPS führte in Mäusen beider Genotypen zu einer pro-inflammatorischen Reaktion, die bekannt ist und deshalb nicht in die Abbildung mit einbezogen wurde. Die dargestellten Symbole verdeutlichen die genotypabhängigen Reaktionen von Fat-1 Mäusen auf LPS im Vergleich zu WT Mäusen.

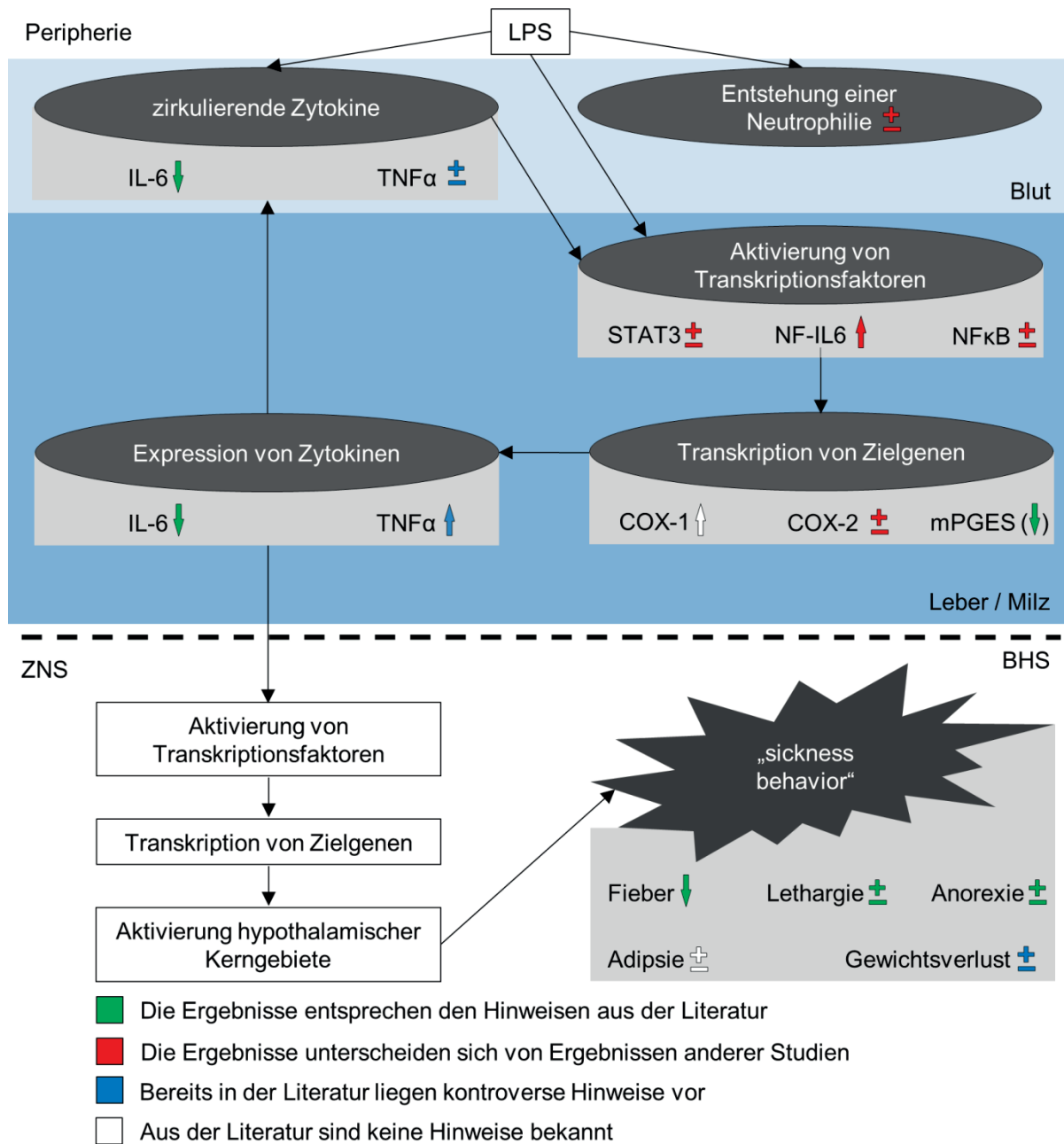


Abbildung 61: Schematische Darstellung der Modulation LPS-induzierter Effekte bei Fat-1 Mäusen im Vergleich zu WT Mäusen

Die *i.p.* Injektion von LPS führte in Mäusen beider Genotypen zu einer Neutrophilie, einer erhöhten Konzentration von IL-6 sowie TNF α im Plasma, einer gesteigerten Expression von SOCS3, NF-IL6 und I κ B α als Hinweise auf eine gesteigerte Aktivität dieser Transkriptionsfaktoren sowie zu einer gesteigerten Transkription pro-inflammatorischer Zielgene. Im Plasma von LPS-injizierten Fat-1 Mäusen waren signifikant geringere IL-6-Konzentrationen nachweisbar als im Plasma von WT Mäusen. Fat-1 Mäuse wiesen in der Peripherie eine signifikant höhere Expression von NF-IL6 (Leber und Milz) sowie von COX-1 (Leber) auf als WT Mäuse. In Fat-1 Mäusen war sowohl eine höhere LPS-induzierte TNF α -Expression als auch eine geringere IL-6-Expression nachweisbar als in WT Mäusen. Außerdem lag für die mPGES-Expression ein signifikanter genotypabhängiger Haupteffekt (Milz, 24 Stunden p.i.) mit geringerer Expression in Fat-1 Mäusen vor. Zentrale pro-inflammatorische Parameter wurden in der vorliegenden Arbeit nicht untersucht. Die nachgewiesenen Symptome des „sickness behaviors“ beruhen allerdings auf einer Aktivierung hypothalamischer Kerngebiete. Von diesen Krankheitssymptomen wurde lediglich die Körperkerntemperatur genotypabhängig kontrolliert. So zeigten Fat-1 Mäuse im Gegensatz zu WT Mäusen in der frühen Phase nach LPS-Injektion kein Fieber.

2 Charakterisierung des Einflusses von ω -3-Fettsäuren auf die durch psychologischen Stress ansteigenden Vitalparameter

Um neben der anti-inflammatorischen Wirkung von ω -3-FS auf den immunologischen Stress der LPS-Injektion auch Informationen über deren Bedeutung für die Modulation des psychologischen Stress zu erhalten, wurden Körperkerntemperatur und lokomotorische Aktivität über einen Zeitraum von vier Stunden nach einem Käfigwechsel (Umsetzen in Messkäfige) ausgewertet. Sowohl im Tiermodell [624-626] als auch im Menschen [627-629] ist ein Anstieg der Körperkerntemperatur nach psychologischem Stress bereits nachgewiesen worden. Es herrschen kontroverse Diskussionen darüber, ob es sich um ein Stress-induziertes Fieber oder eine Stress-induzierte Hyperthermie handelt. Für beide Theorien liegen Hinweise vor. So konnte in einigen Untersuchungen die Stress-induzierte Hyperthermie durch Salicylsäure verhindert werden, was eine Prostaglandinabhängigkeit vermuten lässt [422, 630]. Außerdem wurde ein Stress-bedingter Anstieg der IL-6-Konzentration im Blut festgestellt [631]. Hingegen konnten in anderen Versuchen weder die Hinweise auf eine Prostaglandinabhängigkeit [632] noch auf die signifikant gesteigerte IL-6-Konzentration im Blut [626] bestätigt werden. Oka *et al.* (2013) haben vermutet, dass solche Unterschiede zwischen den Studien von der Antizipierbarkeit des Stressors abhängen könnten [633]. Aufgrund der unklaren Sachlage wurde in der hier vorliegenden Arbeit der neutrale Begriff des Temperaturindex verwendet.

Die Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse („hypothalamic-pituitary-adrenal axis“, HPA-Achse) ist für die endokrine Stressantwort von essentieller Bedeutung. Es handelt sich dabei um ein neuroendokrines System, das für die Verarbeitung von Stress-Stimuli verantwortlich ist und außerdem die Reproduktion, das Wachstum sowie Stoffwechselvorgänge reguliert. Im Rahmen der Stressantwort wird „corticotropin-releasing hormone“ (CRH) aus dem im Hypothalamus lokalisierten *Nucleus paraventricularis* („paraventricular nucleus“, PVN) freigesetzt. Dies gelangt über das hypophysäre Pfortadersystem zum Hypophysenvorderlappen und induziert dort die Freisetzung des adrenocorticotropen Hormons (ACTH). Schließlich wird durch ACTH die Freisetzung von immunsuppressiven Glukokortikoiden aus der Nebennierenrinde induziert. Glukokortikoide hemmen im Rahmen eines negativen „Feedbacks“ die CRH- sowie ACTH-Produktion [634, 635].

In der vorliegenden Arbeit wurde das akute Stressmodell einer neuen Umgebung verwendet und durch einen Käfigwechsel induziert. Bei Mäusen beider Genotypen führte der Käfigwechsel zu einem signifikanten Anstieg der Körperkerntemperatur (ΔT *abd.*, Abbildung 56). Dabei reagierten Fat-1 Mäuse 0 – 1,75 Stunden nach Beginn des „Novel Environment

Stress“ (NES) mit einem signifikant höheren Anstieg der Körperkerntemperatur als WT Mäuse. Bei Betrachtung des Temperaturindex ergab sich ein statistisch signifikanter genotypabhängiger Unterschied mit einem höheren Temperaturindex bei Fat-1 Mäusen (Abbildung 57). Neben der bereits beschriebenen gesteigerten nächtlichen Aktivität der Fat-1 Mäuse (Abbildung 48, C), reagierten diese auch auf den NES mit einem signifikant höheren Anstieg der motorischen Aktivität als WT Mäuse (Abbildung 58, D). Entsprechend könnte also der höhere Anstieg der Körperkerntemperatur (ΔT abd.) in Fat-1 Mäusen mit dem höheren Anstieg der lokomotorischen Aktivität erklärt werden. Die von Carrie *et al.* (2000) nachgewiesene Steigerung der exploratorischen Aktivität junger Mäuse durch Fütterung einer fischöhlhaltigen Diät [594], könnte mit der gesteigerten lokomotorischen Aktivität der Fat-1 Mäuse bei NES in Einklang stehen.

Ein Zusammenhang zwischen der Supplementierung von ω -3-FS und einer Reduktion der LPS-induzierten Plasmakonzentration von Glukokortikoiden konnte beispielsweise bei Menschen [388] sowie Schweinen [636] festgestellt werden. Ebenso bewirkte die Supplementierung von ω -3-FS eine Reduktion der durch psychologischen Stress ansteigenden Glukokortikoid-Konzentration [637, 638]. Bei Stressreaktionen wird nicht nur die HPA-Achse aktiviert, sondern auch die Ausschüttung von Katecholaminen induziert. Eine erhöhte Katecholamin-Konzentration im Blut führt zur Erhöhung der Herzschlagfrequenz sowie dessen Kontraktionsfähigkeit und bewirkt durch die Oxidation von Glukose und Fett eine verstärkte Bereitstellung von Energie. Dieser erhöhte Grundumsatz ist eine mögliche Ursache für eine Erhöhung der Körperkerntemperatur. Michaeli *et al.* (2007) untersuchten die LPS-induzierten Konzentrationen von Adrenalin und Noradrenalin und stellten in gesunden Männern eine reduzierte LPS-induzierte Konzentration dieser Katecholamine nach drei- bis vierwöchiger Supplementierung von Fischöl fest [388]. Da die Fat-1 Mäuse ein anderes FS-Muster aufweisen als WT Mäuse, könnte eine gesteigerte β -Oxidation mehr Energie bereitgestellt werden. Diese könnte wiederum verstärkt für die nächtliche bzw. die durch den NES induzierte lokomotorische Aktivität zur Verfügung stehen. Die aus der Literatur bekannten Ergebnisse deuten allerdings vornehmlich auf eine reduzierte Stressanfälligkeit durch Supplementierung von ω -3-FS hin [637, 638]. Aufgrund dessen wäre im Versuchsaufbau der vorliegenden Arbeit bei Fat-1 Mäusen eine gegenüber WT Mäusen reduzierte lokomotorische Aktivität sowie Körperkerntemperatur als Reaktion auf den NES zu erwarten gewesen. Dies wurde allerdings nicht bestätigt.

Zur Aufklärung der Ursachen für die signifikant höhere Aktivität der Fat-1 Mäuse beim NES müssten weitere Untersuchungen durchgeführt werden. Dabei sind die Plasmakonzentrationen von Zytokinen wie TNF α und IL-6, aber auch von Glukokortikoiden sowie ACTH von besonderem Interesse. Da die Entnahme einer ausreichend großen Menge

Blut bei Mäusen nur im Rahmen der Tötung möglich ist und der Fokus dieser Arbeit auf der LPS-induzierten Entzündungsreaktion lag, waren derartige Untersuchungen des Blutes nicht möglich.

VI ZUSAMMENFASSUNG

Systemische Entzündungsreaktionen, die experimentell beispielsweise durch eine *intrapertoneale* Injektion von Lipopolysaccharid (LPS) ausgelöst werden können, führen zur Induktion einer Akute-Phase Reaktion. Es handelt sich dabei um eine multifaktorielle stereotype Reaktion des Körpers, die der Beseitigung des entzündungsauslösenden Agens sowie der Wiederherstellung einer unbeeinträchtigten Gewebefunktion dient. Dabei treten zentralnervös kontrollierte Krankheitssymptome auf. Diese werden als „sickness behavior“ zusammengefasst und beinhalten unter anderem Fieber, Lethargie, Adipsie sowie Anorexie. Sepsis ist eine schwere Form der systemischen Entzündung, die durch konstantes oder periodisches Eindringen pathogener belebter Keime in den Blutstrom ausgelöst wird. Sepsis tritt mit hoher Inzidenz in der Human- sowie Tiermedizin auf. Die Mortalität ist hoch, aber auch Sepsis-Überlebende weisen anhaltende kognitive Defizite auf. Das physiologischerweise intranukleär vorliegende Protein „high-mobility group box 1“ (HMGB1) besitzt nach Translokation in den Extrazellularraum ein pro-inflammatorisches Potenzial und wird als später Mediator der Sepsis postuliert. HMGB1 kann dabei sowohl zentralnervös wirken als auch Einfluss auf periphere Organe, wie beispielsweise das Fettgewebe, nehmen. Die Freisetzung von HMGB1 kann passiv aus nekrotischen Zellen oder durch eine aktive Sekretion aus stimulierten Immunzellen erfolgen. In Abhängigkeit der extrazellulären Redox-Form von HMGB1 weist es chemotaktische (vollständig reduziertes HMGB1), zytokininduzierende (Disulfid-HMGB1) oder keine (Sulfonyl-HMGB1) pro-inflammatorische Aktivität auf.

Heute ist bekannt, dass es sich bei der Entzündungsauflösung um keinen passiven, sondern um einen aktiven strikt programmierten Prozess handelt. Dabei stellen die hauptsächlich aus ω -3-Fettsäuren (FS) gebildeten Lipidmediatoren terminale Mediatoren der Kommunikation zwischen Immunsystem und Gehirn dar. Sie verhindern die weitere Infiltration von Leukozyten in das Gewebe und bewirken eine verstärkte Phagozytose von Zelltrümmern sowie von apoptotischen Zellen. Ein besseres Verständnis des pro-inflammatorischen Potenzials von endogenen „toll-like“ Rezeptor-Agonisten, den sogenannten „danger / damage-associated molecular patterns“ (DAMPs), sowie der entzündungsauflösenden Wirkung von „specialized pro-resolving lipid mediators“ (SPMs) ist für die Entwicklung anti-inflammatorischer Strategien zur Behandlung von Sepsis von essentieller Bedeutung.

Die Hauptziele der vorliegenden Arbeit bestanden in einer genaueren Charakterisierung **(I)** der Bedeutung von endogenen „toll-like“ Rezeptor-Agonisten wie HMGB1 während einer systemischen Entzündungsreaktion. Dabei wurde insbesondere das Potenzial zur Induktion einer Entzündung im Gehirn und im Fettgewebe analysiert. Außerdem wurde **(II)** die anti-

inflammatorische Wirkung von ω -3-FS während einer systemischen LPS-induzierten Entzündung sowie während eines psychologischen Stresses mit Hilfe von transgenen Fat-1 Mäusen untersucht. Fat-1 Mäuse sind zur endogenen Synthese von ω -3-FS befähigt.

(I) Ratten reagierten auf die *intraperitoneale* Injektion einer septischen LPS-Dosis (10 mg/kg) nach anfänglicher Hypothermie mit einem über mindestens 24 Stunden andauernden Fieber. Trotz anhaltendem Fieber lagen die Plasmakonzentrationen von Interleukin-6 (IL-6) und Tumornekrosefaktor- α (TNF α), die mit Hilfe von Bioassays ermittelt wurden, zu diesem Zeitpunkt bereits wieder in einem basalen Bereich. Hingegen führte die Injektion von LPS zu einem anhaltenden Anstieg der zirkulierenden HMGB1-Konzentration. Erstmals konnte in der vorliegenden Arbeit immunhistochemisch gezeigt werden, dass im Rahmen der systemischen LPS-induzierten Entzündung eine perinukleäre Translokation von HMGB1 im Gehirn vorliegt. Dies war sowohl in einem der sensorischen zirkumventrikulären Organe (sCVO), der *Area postrema* (AP), als auch in einem weiteren für die Entstehung von Fieber wichtigen Kerngebiet („median preoptic nucleus“) nachweisbar. Dadurch könnte sowohl systemisch im Blut zirkulierendes als auch lokal im Gehirn freigesetztes HMGB1 pro-inflammatorisch auf das Gehirn wirken und an der bei Sepsis vorliegenden Entzündung im Gehirn und den damit einhergehenden Krankheitssymptomen beteiligt sein. Als sCVO steht die AP direkt mit im Blut zirkulierendem oder aus der AP freigesetztem HMGB1 in Kontakt und kann bei einer Aktivierung über neuronale Verschaltungen Informationen an hypothalamische Kerngebiete weiterleiten. Primärkulturen der AP dienten in der vorliegenden Arbeit einer Analyse des pro-inflammatorischen Potenzials von Disulfid-HMGB1 im Gehirn.

In der vorliegenden Dissertation wurde erstmalig ein pro-inflammatorisches Potenzial von Disulfid-HMGB1 in Primärkulturen der AP nachgewiesen. So führte es zu einer immunzytochemisch nachgewiesenen nukleären Translokation von „nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells“ (NF κ B) in Neuronen, Astrozyten und Mikrogliazellen sowie zur Freisetzung von IL-6 in den Zellkulturüberstand. Ebenso wurde IL-1 β -Immunreaktivität durch Inkubation mit Disulfid-HMGB1 in Mikrogliazellen induziert. Außerdem konnte mit Hilfe der Flüssigchromatographie mit Massenspektrometrikopplung zum ersten Mal eine HMGB1-abhängige Freisetzung von Docosahexaensäure nachgewiesen werden. Diese stellt möglicherweise eine zusätzliche anti-inflammatorische Wirkung von HMGB1 im Gehirn dar. Mit Hilfe der „Ca²⁺-Imaging“ Technik konnte zusätzlich eine direkte Aktivierung von Neuronen durch Applikation von HMGB1 gezeigt werden. Allerdings reagierten nur 0,33 Prozent der untersuchten Zellen mit einem Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration. Erstmals wurde in der vorliegenden Arbeit ein 9,2-

facher Anstieg der Responsivität auf HMGB1 nach vorheriger Applikation von LPS nachgewiesen, während durch eine Vorbehandlung mit HMGB1 die LPS-induzierte Aktivierung von Zellen um das 8,1-fache verringert wurde. Außerdem reagierten nach vorangestellter Applikation von LPS neben Neuronen auch Astrozyten auf die HMGB1-Applikation. Diese Sensibilisierung entspricht möglicherweise den bei einer Sepsis vorliegenden Gegebenheiten. Zu Beginn einer Sepsis kann LPS mit Zellen der AP direkt in Kontakt treten. Verzögert wird HMGB1 in der Peripherie oder lokal im Gehirn freigesetzt und kann so nach vorherigem Kontakt mit LPS eine stärkere Stimulation der Zellen in der AP bewirken.

Ein großer Anteil der bei einer Entzündung zirkulierenden Zytokine entstammt bei Sepsis dem Fettgewebe. Altersassoziierte Adipositas korreliert mit vermehrt zirkulierenden Zytokinen und verstärkt eine durch LPS-induzierte Entzündung. In der hier vorliegenden Arbeit wurde mit Hilfe von *ex vivo* „Fat Explants“ untersucht, wie LPS oder die DAMPs Biglykan und HMGB1 die Freisetzung von Zytokinen (Bioassay) sowie fettgewebsspezifischen Adipokinen („enzyme-linked immunosorbent assay“ [ELISA]) modulieren und so die systemische Inflammation beeinflussen. Dabei wurde die Reaktion des Fettgewebes (*epididymal*, *retroperitoneal*, *subcutan* und braun) von jungen, schlanken mit dem von alten, adipösen Ratten verglichen. In der vorliegenden Arbeit konnte eine starke Induktion der Zytokin-Freisetzung durch LPS nachgewiesen werden. Zum ersten Mal wurde auch eine LPS-induzierte Freisetzung von IL-6 und TNF α aus dem braunen Fettgewebe von jungen und alten Ratten nachgewiesen. HMGB1 und Biglykan führten insbesondere im *subcutanen* und *retroperitonealen* Fettgewebe zu einem Anstieg der Sekretion von IL-6 und TNF α . Die Freisetzung von Adipokinen wurde insgesamt durch die angewendeten DAMPs stärker beeinflusst als durch LPS und beinhaltete insbesondere eine Reduktion der Freisetzung von Visfatin und Adiponektin (nur durch Biglykan) im *epididymalen* Fettgewebe junger Ratten. Die Inkubation mit HMGB1 führte außerdem zu einer reduzierten Freisetzung von Visfatin aus dem *retroperitonealen* Fettgewebe alter Ratten. Im Fettgewebe alter Ratten erfolgte eine signifikant höhere Sekretion von Adiponektin und Leptin als im Fettgewebe junger Ratten. Die Freisetzung von Visfatin war aus dem Fettgewebe junger Ratten signifikant höher als aus dem Fettgewebe alter Ratten.

Zusammenfassend lieferte die hier vorliegende Arbeit weitere Hinweise auf eine Beteiligung von HMGB1 an der bei Sepsis vorliegenden systemischen Entzündung mit Modulation der Zytokin- und Adipokin-Sekretion aus dem Fettgewebe sowie der mit Sepsis einhergehenden Entzündung im Gehirn.

(II) Mit Hilfe von transgenen Fat-1 Mäusen wurde die Bedeutung von ω -3-FS und deren Lipidmediatoren im Rahmen von systemischen Entzündungen und psychologischem Stress untersucht. In der frühen Phase nach *intraperitonealer* LPS-Injektion (2,5 mg/kg) wiesen Wildtyp (WT) Mäuse Fieber auf, das bei Fat-1 Mäusen nicht vorlag. Außerdem bestand bei LPS-injizierten Fat-1 Mäusen 9,25 – 15 Stunden *post injectionem* (p.i.) und bei LPS-injizierten WT Mäusen 13,25 – 15 Stunden p.i. eine signifikante Hypothermie im Vergleich zu ihren jeweiligen Kontrollen. Gleichzeitig wiesen LPS-injizierte Fat-1 Mäuse signifikant geringere IL-6-Konzentrationen im Plasma auf als LPS-injizierte WT Mäuse. Verringerte Plasmakonzentrationen von IL-6 bei erhöhten Konzentrationen von TNF α könnten in Fat-1 Mäusen ursächlich an der Unterdrückung von Fieber mit anschließender Hypothermie beteiligt sein. Außerdem konnte erstmalig eine stärkere LPS-induzierte Expression von TNF α (Leber) sowie „nuclear factor interleukin-6“ (Leber und Milz) in Fat-1 Mäusen festgestellt werden. Es waren allerdings keine Hinweise auf statistisch signifikante genotypabhängige Unterschiede der LPS-induzierten Expression von Enzymen der Prostaglandin-Synthese in Leber und Milz nachweisbar. Ebenso wurden die LPS-induzierte Lethargie, Anorexie, Adipsie und Neutrophilie sowie der Gewichtsverlust durch den erhöhten Anteil von ω -3-FS in Fat-1 Mäusen nicht beeinflusst. Interessanterweise konnte in der hier vorliegenden Arbeit eine signifikant höhere nächtliche lokomotorische Aktivität der Fat-1 Mäuse gegenüber WT Mäusen nachgewiesen werden. Die bei Fat-1 Mäusen stärker ausgeprägte Stress-induzierte Erhöhung der lokomotorischen Aktivität war begleitet von einer signifikant höheren Körperkerntemperatur der Fat-1 Mäuse im Vergleich zu WT Mäusen. Die höhere lokomotorische Aktivität könnte hierbei ursächlich an dem Stress-induzierten Anstieg der Körperkerntemperatur beteiligt sein.

Insgesamt scheint Sepsis durch ω -3-FS komplex reguliert zu werden. Insbesondere das fiebersenkende und das entzündungsmodulierende Potenzial von ω -3-FS, das auch in der vorliegenden Arbeit nachgewiesen wurde, stellt eine wichtige therapeutische Strategie dar. In weiterführenden Untersuchungen sollten zusätzlich zentralnervöse inflammatorische Parameter der LPS-injizierten Fat-1 Mäuse mit denen von WT Mäusen verglichen werden, um die in der vorliegenden Arbeit gewonnenen Ergebnisse zu ergänzen.

VII SUMMARY

Systemic inflammatory reactions can be experimentally triggered by an *intraperitoneal* injection of lipopolysaccharide (LPS) and lead to the induction of an acute phase response. It is a multifactorial stereotype reaction of the body, which serves to eliminate the inflammatory agent and restore tissue function. This response is accompanied by brain-controlled sickness symptoms like fever, anorexia, adipsia and lethargy. Sepsis is a severe form of systemic inflammation caused by constant and periodic entry of pathogens into the blood stream. Sepsis occurs with high incidence in humans as well as in animals. Mortality is high and even sepsis survivors suffer from learning impairments and other persistent cognitive deficits. High-mobility Group Box 1 (HMGB1) is a chromatin-associated protein with pro-inflammatory activities after its release into the extranuclear space. It can be passively released by necrotic cells or actively secreted by stimulated immune cells. Depending on its redox status it shows chemoattractant (fully reduced HMGB1), cytokine-inducing (disulfide HMGB1) or no pro-inflammatory (sulfonyl HMGB1) activity. Previous studies suggested a role for HMGB1 as a later mediator of sepsis in both central nervous system and peripheral organs, such as adipose tissue.

Resolution of inflammation is an active coordinated process in which lipid mediators seem to play a pivotal role. These are terminal mediators in communication between the immune system and the brain and help to resolve inflammation by reducing recruitment of leukocytes and enhancing phagocytosis of debris and apoptotic cells. Main precursors of these specialized pro-resolving lipid mediators are ω -3 fatty acids.

To establish further anti-inflammatory treatment strategies for sepsis, there is a need for more insights into underlying pro-inflammatory mechanisms of so called danger / damage-associated molecular patterns (DAMPs) like HMGB1 during systemic inflammation, and into anti-inflammatory activities of ω -3 fatty acids and their lipid mediators. Therefore, the main goal of the present study was **(I)** to further elucidate the role of HMGB1 during sepsis and especially of its ability to induce an inflammatory response in the brain and adipose tissue, and **(II)** to get deeper insights into the anti-inflammatory potential of ω -3 fatty acids during systemic inflammation and psychological stress. For this purpose transgenic fat-1 mice, which are able to endogenously produce ω -3 fatty acids, were used.

(I) Rats showed hypothermia followed by fever, which lasted at least 24 hours after *intraperitoneal* injection of LPS (10 mg/kg). LPS increased pro-inflammatory cytokine levels of interleukin-6 (IL-6) and tumor necrosis factor α (TNF α), which were measured by

bioassays. These plasma cytokines dropped again close to the concentration of phosphate buffered saline-controls 24 hours after stimulation. In contrast, HMGB1 plasma levels stayed elevated for 24 hours. Moreover, for the first time, we were able to show perinuclear translocation of HMGB1 in the brain after LPS-injection by immunohistochemistry suggesting potential local release of HMGB1. For this purpose, we stained HMGB1 in a sensory circumventricular organ (sCVO), namely the *area postrema* (AP). The AP can directly be reached by circulating and local released HMGB1, and relays information to hypothalamus via neural interconnections. In addition, another important nucleus for development of fever (median preoptic nucleus) was analysed. Overall, circulating or brain-released HMGB1 could contribute to brain inflammation and the induction of sickness symptoms during sepsis. To determine the effects of endogenous circulating and local brain-derived HMGB1 on the AP and their ability to induce inflammation in the brain during sepsis, primary cell cultures from the AP were prepared.

For the first time, here, we revealed pro-inflammatory potential of disulfide HMGB1 in the AP. We detected nuclear translocation of „nuclear factor κ -light-chain-enhancer of activated B-cells“ (NF κ B) in neurons, astrocytes and microglia (immunocytochemistry) as well as release of IL-6 into supernatants (bioassay) after stimulation with HMGB1. In addition, immunoreactivity of IL-1 β was induced by disulfide HMGB1 in microglia. We also measured HMGB1-dependent release of docosahexaenoic acid by using liquid chromatography-mass spectrometry possibly suggesting also some anti-inflammatory property of HMGB1 in the brain. Moreover, Ca²⁺-imaging experiments were performed to determine direct activation of brain cells by HMGB1. Only few neurons (0.33 % of measured cells) directly reacted to HMGB1 with an increase of intracellular calcium concentration. For the first time, we have shown that priming with LPS led to a 9.2 fold higher percentage of responsive cells and, in addition to neurons, also astrocytes were responsive after priming. Interestingly, pre-treatment with HMGB1 led to an 8.1 fold decrease of LPS-responsive cells. LPS is the first mediator circulating in the bloodstream during the course of sepsis. It reaches the AP, subsequently followed by circulating or locally released HMGB1 with some delay. Thus, the reported priming process by LPS might be linked to HMGB1-dependent prolonged symptoms during sepsis.

A large proportion of cytokines circulating in the blood originate from adipose tissue during sepsis. Age-associated obesity is accompanied by higher cytokine levels in the circulation and prolonged and elevated LPS-induced sickness symptoms. In the present study *ex vivo* fat explants were used to investigate how LPS or the DAMPs biglykan and HMGB1 modulate the release of cytokines (bioassay) as well as adipose tissue-specific adipokines („enzyme-linked immunosorbent assay“ [ELISA]) and, thus, influence systemic inflammation. The

response of adipose tissue (epididymal, retroperitoneal, subcutaneous and brown) was compared between young lean and old obese rats. LPS induced strong IL-6 and TNF α release into the supernatant. For the first time, an LPS-induced release of IL-6 and TNF α from the brown adipose tissue of young and old rats was also detected. HMGB1 and biglykan led to an increase in the secretion of IL-6 and TNF α , especially in the subcutaneous and retroperitoneal adipose tissue. In contrast to LPS, DAMPs were able to modulate adipokine secretion. HMGB1 and biglycan stimulation decreased visfatin and adiponectin (just biglycan) secretion in epididymal adipose tissue of young rats. Visfatin secretion was also reduced in HMGB1-stimulated retroperitoneal adipose tissue of old rats. We found significantly higher leptin and adiponectin levels in supernatants of adipose tissue from old compared to young rats whereas visfatin secretion was significantly higher in adipose tissue from young compared to old rats. Overall, the present work provided further evidence for the contribution of HMGB1 to systemic inflammation associated with sepsis. It modulates cytokine and adipokine secretion from adipose tissue as well as sepsis-associated inflammation in the brain.

(II) Transgenic fat-1 mice were used to further elucidate the role of ω -3 fatty acids for resolution of inflammation and brain-controlled sickness symptoms during systemic inflammation and psychological stress. *Intraperitoneal* (2,5 mg/kg) injection of LPS induced short lasting fever in wildtype (WT) mice while fever was absent in fat-1 mice. Moreover, fat-1 mice showed LPS-induced hypothermia 9.25 – 15 hours and WT mice 13.15 – 15 hours after injection. This response was accompanied by significantly lower circulating IL-6 levels in fat-1 mice compared to WT animals. Reduced plasma IL-6 combined with elevated plasma TNF α might have been involved in the suppression of fever and the subsequent induction of hypothermia in fat-1 mice. Moreover, we revealed significantly higher LPS-induced expression of TNF α (liver) and nuclear factor interleukin-6 (liver and spleen) in fat-1 mice compared to LPS-stimulated WT mice. However, there was no evidence for significant differences between fat-1 and WT mice in the expression of important enzymes for prostaglandin synthesis in the liver and spleen. LPS-induced anorexia, adipisia, lethargie, neutrophilia and loss of body weight were also not affected by increased amounts of ω -3 fatty acids in fat-1 mice. Interestingly, we showed significantly higher nocturnal locomotor activity of fat-1 mice compared to WT mice. In addition, stress-induced increase of locomotor activity was accompanied by a significantly higher body core temperature in fat-1 mice compared to WT mice suggesting that higher locomotor activity may have contributed to the increase in stress-induced body temperature.

Overall, the regulation of sepsis by ω -3 fatty acids seems to be complex. Especially the fever-lowering and the inflammation-modulating potential of ω -3 fatty acids as shown in the present study represent an important therapeutic strategy. Brain inflammatory parameters of fat-1 and WT mice remain to be analysed in future studies to complement the present results.

VIII ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Tabelle 78: In der vorliegenden Arbeit verwendete Abkürzungen

Abkürzung	Bedeutung
[Ca ²⁺] _i	intrazelluläre Kalziumkonzentration
12-HHT	12(S)-hydroxy-5Z,8E-10E-Heptadecatriensäure
15d-PGJ ₂	15-deoxy-Δ ^{12,14} -Prostaglandin J ₂
17(S)-HDHA	„17-(S) hydroxy docosahexaenoic acid“
AA	„arachidonic acid“
aCOX-2	acetylierte Cyclooxygenase-2
ACTH	adrenocorticotropes Hormon
ALX	„N-formyl peptide receptor 2“
ANOVA	„analysis of variance“
AP	<i>Area postrema</i>
APR	Akute-Phase-Reaktion
BHS	Blut-Hirn-Schranke
BHT	Butylhydroxytoluol
BLT1 / BLT2	„leukotriene B ₄ receptor 1“ / „leukotriene B ₄ receptor 2“
C/EBPβ	„CCAAT/enhancer binding protein“
C23 / C45 / C106	Cystein 23 / Cystein 45 / Cystein 106
CD14 / CD68	„cluster of differentiation 14“, „cluster of differentiation 68“
cDNA	„complementary deoxyribonucleic acid“
CLP	„cecal ligation and puncture“
CLS	„crown like structure“
COX-1 / COX-2	Cyclooxygenase-1 / Cyclooxygenase-2
cPGES	„cytoplasmatic prostaglandin E-synthase“
CRH	„corticotropin-releasing hormone“
CRP	C-reaktives Protein
C _T	„cycle threshold“
CVO	„circumventricular organ“
CXCL12	„C-X-C motif chemokine ligand 12“
CXCR4	„C-X-C motif chemokine receptor 4“
DAMP	„danger / damage-associated molecular pattern“
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DHA	„docosahexaenoic acid“
DNA	„deoxyribonucleic acid“
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat-Molekül
DP1 / DP2	Prostaglandin D ₂ receptor 1 / Prostaglandin D ₂ receptor 2
DTT	Dithiothreitol
ECM	„extracellular matrix“, extrazelluläre Matrix
ELISA	„enzyme-linked immunosorbent assay“
eNampT	extrazelluläre Nikotinamid Phosphoribosyltransferase
EPA	„eicosapentaenoic acid“
ESI	Elektrosprayionisation
FAM	6-Carboxyfluorescein
FATP	„fatty acid transporter protein“
FS	Fettsäure / Fettsäuren
Fc-Fragment	„fragment crystalline“
Fura-2AM	Fura-2-acetoxymethylester
GBSS	„Gey's Balanced Salt Solution“

Abkürzung	Bedeutung
GFAP	„glial fibrillary acidic protein“
GPR	G-Protein gekoppelter Rezeptor
HBSS	„Hank’s Balanced Salt Solution“
HCD	„higher-energy collisional dissociation“
HCl	Salzsäure
HMGB1	„high-mobility group box 1“
H-PGDS	„hematopoietic prostaglandin D-synthase“
HPLC	„high performance liquid chromatography“
HRP	„horseradish peroxidase“
i.c.v.	<i>intracerebroventrikulär</i>
i.p.	<i>intraperitoneal</i>
i.v.	<i>intravenös</i>
ICAM-1	„intracellular adhesion molecule-1“
IgG	„immunoglobuline G“
IL-1ra	Interleukin-1 Rezeptor Antagonist
IL-1RI / IL-1RII)	Interleukin-1 Rezeptor Typ II / Interleukin-1 Rezeptor Typ II
IL-1 β / IL-6 / IL-10	Interleukin-1 β / Interleukin-6 / Interleukin-10
iNamt	intrazelluläre Nikotinamid Phosphoribosyltransferase
IQR	„interquartile-range“
I κ B α	„inhibitor of κ B“
JAK	Januskinase
JLU	Justus-Liebig-Universität
KCl	Kaliumchlorid
KGW	Körpergewicht
LBP	„lipopolysaccharide binding protein“
LC-MS/MS	„liquid chromatography-mass spectrometry“
LOX	Lipoxygenase
L-PGDS	„lipocalin-type prostaglandin D-synthase“
LPS	Lipopolysaccharid
LTA ₄ / LTB ₄	Leukotrien A ₄ / Leukotrien B ₄
m/z	Masse-zu-Ladungs-Verhältnis
MALDI-MS	„matrix-assisted laser desorption / ionisation mass spectrometry“
MAP 2a+2b	„microtubule associated protein 2“
MD-2	„myeloid differentiation protein 2“
ME	„median eminence“
Mfsd2a	„major facilitator superfamily domain-containing protein 2“
M-MLV	„moloney murine leukemia virus“
MnPO	„median preoptic nucleus“
mPGES	mikrosomale Prostaglandin E-Synthase
mRNA	„messenger ribonucleic acid“
MS/MS	Tandem-Massenspektrometrie
NaCl	Natriumchlorid
Namt	Nikotinamid Phosphoribosyltransferase
NBA	Neurobasal-A
NES	Novel Environment Stress
NF-IL6	„nuclear factor interleukin-6“
NF κ B	„nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells“
NK	natürliche Killerzellen
Nod1 / Nod2	„nucleotide-binding oligomerization domain 1 / 2“
NSAID	„non-steroidal anti-inflammatory drugs“

Abkürzung	Bedeutung
NSS	„normal sheep serum“
NTS	<i>Nucleus tractus solitarius</i>
ob	„obese gene“
OD	optische Dichte
OVLT	<i>Organum vasculosum laminae terminalis</i>
p	<i>Fehlerwahrscheinlichkeit</i>
p.i.	<i>post injectionem</i>
PAMP	„pathogen-associated molecular pattern“
PBEF	„pre-B-cell colony-enhancing factor“
PBS	„phosphate buffered saline“
PCR	„polymerase chain reaction“
PFA	Paraformaldehyd
PG	Prostaglandin
PI	Propidiumiodid
PIN	„pineal gland“
PLA ₂	Phospholipase A ₂
PPAR γ	„peroxisome proliferator-activated receptor γ “
ppm	„parts per million“
PRR	„pattern-recognition-receptors“
PUFA	„polyunsaturated fatty acid“
PVN	„paraventricular nucleus“
RAGE	„receptor for advanced glycation end-products“
RNA	„ribonucleic acid“
ROI	„region of interest“
RQ	„relative quantity“
RT-PCR	„reverse transkription polymerase chain reaction“
RvD	Resolvin der D-Reihe
s.c.	<i>subcutan</i>
sCD14	„soluble cluster of differentiation 14“
SCO	„subcommissural organ“
sCVO	„sensory circumventricular organ“
SFO	„subfornical organ“
SOCS3	„suppressor of cytokine signaling 3“
SPE	„solid phase extraction“
SPM	„specialized pro-resolving lipid mediator“
STAT3	„signal transducer and activator of transcription 3“
TBE	TRIS-Borat-EDTA
TBI	„traumatic brain injury“
TLR	„toll-like“ Rezeptor
TNF α	Tumornekrosefaktor- α
UHPLC	„ultra high performance liquid chromatography“
VCAM-1	„vascular cell adhesion molecule-1“
WT	Wildtyp
ZNS	zentrales Nervensystem

IX LITERATURVERZEICHNIS

1. **Baumann, H. and J. Gauldie**, *The acute phase response*. Immunol Today, 1994. 15(2): p. 74-80.
2. **Roth, J. and C.M. Blatteis**, *Mechanisms of fever production and lysis: lessons from experimental LPS fever*. Compr Physiol, 2014. 4(4): p. 1563-604.
3. **H.-P. Schuster, U.M.-W.**, *Definition und Diagnose von Sepsis und Multiorganversagen 2005*: Springer Verlag, Heidelberg.
4. **Engel, C., et al.**, *Epidemiology of sepsis in Germany: results from a national prospective multicenter study*. Intensive Care Med, 2007. 33(4): p. 606-18.
5. **Donovan, G.A., et al.**, *Associations between passive immunity and morbidity and mortality in dairy heifers in Florida, USA*. Prev Vet Med, 1998. 34(1): p. 31-46.
6. **Chavan, S.S., et al.**, *HMGB1 mediates cognitive impairment in sepsis survivors*. Mol Med, 2012. 18: p. 930-7.
7. **Iwashyna, T.J., et al.**, *Long-term cognitive impairment and functional disability among survivors of severe sepsis*. JAMA, 2010. 304(16): p. 1787-94.
8. **Dantzer, R.**, *Cytokine-induced sickness behavior: mechanisms and implications*. Ann N Y Acad Sci, 2001. 933: p. 222-34.
9. **Romanovsky, A.A.**, *Thermoregulation: some concepts have changed. Functional architecture of the thermoregulatory system*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2007. 292(1): p. R37-46.
10. **Nahas, G.G., M.L. Tannieres, and J.F. Lennon**, *Direct measurement of leukocyte motility: effects of pH and temperature*. Proc Soc Exp Biol Med, 1971. 138(1): p. 350-2.
11. **van Oss, C.J., et al.**, *Effect of temperature on the chemotaxis, phagocytic engulfment, digestion and O₂ consumption of human polymorphonuclear leukocytes*. J Reticuloendothel Soc, 1980. 27(6): p. 561-5.
12. **Hart, B.L.**, *Biological basis of the behavior of sick animals*. Neurosci Biobehav Rev, 1988. 12(2): p. 123-37.
13. **Harden, L.M., et al.**, *Fever and sickness behavior: Friend or foe?* Brain Behav Immun, 2015. 50: p. 322-33.
14. **Kluger, M.J.**, *Fever in Ectotherms - Evolutionary Implications*. American Zoologist, 1979. 19(1): p. 295-304.
15. **Schulman, C.I., et al.**, *The effect of antipyretic therapy upon outcomes in critically ill patients: a randomized, prospective study*. Surg Infect (Larchmt), 2005. 6(4): p. 369-75.
16. **Kluger, M.J. and B.A. Rothenburg**, *Fever and reduced iron: their interaction as a host defense response to bacterial infection*. Science, 1979. 203(4378): p. 374-6.
17. **Ross, G., et al.**, *Afferent nerves are involved in the febrile response to injection of LPS into artificial subcutaneous chambers in guinea pigs*. Physiol Behav, 2000. 71(3-4): p. 305-13.
18. **Rummel, C., et al.**, *Nuclear translocation of the transcription factor STAT3 in the guinea pig brain during systemic or localised inflammation*. J Physiol, 2004. 557: p. 671-687.
19. **Romanovsky, A.A.**, *Signaling the brain in the early sickness syndrome: are sensory nerves involved?* Front Biosci, 2004. 9: p. 494-504.
20. **Campisi, J., et al.**, *Circulating cytokines and endotoxin are not necessary for the activation of the sickness or corticosterone response produced by peripheral E. coli challenge*. J Appl Physiol, 2003. 95(5): p. 1873-82.
21. **Aguliar-Valles, A., et al.**, *Role of brain transmigrating neutrophils in depression-like behavior during systemic infection*. Molecular psychiatry, 2013.
22. **Muller, W.A.**, *Getting leukocytes to the site of inflammation*. Vet Pathol, 2013. 50(1): p. 7-22.
23. **Rummel, C., et al.**, *Leptin regulates leukocyte recruitment into the brain following systemic LPS-induced inflammation*. Mol Psychiatry, 2010. 15(5): p. 523-34.
24. **Atkins, E.**, *Pathogenesis of fever*. Physiol Rev, 1960. 40: p. 580-646.
25. **Mogensen, T.H.**, *Pathogen recognition and inflammatory signaling in innate immune defenses*. Clin Microbiol Rev, 2009. 22(2): p. 240-73, Table of Contents.
26. **Roth, J., et al.**, *Signaling the brain in systemic inflammation: role of sensory circumventricular organs*. Front Biosci, 2004. 9: p. 290-300.
27. **Matsumura, K. and S. Kobayashi**, *Signaling the brain in inflammation: the role of endothelial cells*. Front Biosci, 2004. 9: p. 2819-26.
28. **Schiltz, J.C. and P.E. Sawchenko**, *Signaling the brain in systemic inflammation: the role of perivascular cells*. Front Biosci, 2003. 8: p. s1321-9.

29. **Banks, W.A.**, *Blood-brain barrier transport of cytokines: a mechanism for neuropathology*. *Curr Pharm Des*, 2005. 11(8): p. 973-84.
30. **McKinley, M.J., et al.**, *The sensory circumventricular organs of the mammalian brain*. *Adv Anat Embryol Cell Biol*, 2003. 172: p. III-XII, 1-122, back cover.
31. **Krisch, B., H. Leonhardt, and W. Buchheim**, *The functional and structural border between the CSF- and blood-milieu in the circumventricular organs (organum vasculosum laminae terminalis, subfornical organ, area postrema) of the rat*. *Cell Tissue Res*, 1978. 195(3): p. 485-97.
32. **Siso, S., M. Jeffrey, and L. Gonzalez**, *Sensory circumventricular organs in health and disease*. *Acta Neuropathol*, 2010. 120(6): p. 689-705.
33. **Laflamme, N. and S. Rivest**, *Toll-like receptor 4: the missing link of the cerebral innate immune response triggered by circulating gram-negative bacterial cell wall components*. *Faseb J*, 2001. 15(1): p. 155-163.
34. **Ott, D., et al.**, *Neurons and glial cells of the rat organum vasculosum laminae terminalis directly respond to lipopolysaccharide and pyrogenic cytokines*. *Brain Res*, 2010. 1363: p. 93-106.
35. **Wuchert, F., et al.**, *Rat area postrema microglial cells act as sensors for the toll-like receptor-4 agonist lipopolysaccharide*. *J Neuroimmunol*, 2008. 204(1-2): p. 66-74.
36. **Nakamori, T., et al.**, *Interleukin-1 beta production in the rabbit brain during endotoxin-induced fever*. *J Physiol*, 1994. 476(1): p. 177-86.
37. **Quan, N., et al.**, *Induction of pro-inflammatory cytokine mRNAs in the brain after peripheral injection of subseptic doses of lipopolysaccharide in the rat*. *J Neuroimmunol*, 1999. 93(1-2): p. 72-80.
38. **Wuchert, F., et al.**, *Tumor necrosis factor-alpha, interleukin-1beta and nitric oxide induce calcium transients in distinct populations of cells cultured from the rat area postrema*. *J Neuroimmunol*, 2009. 206(1-2): p. 44-51.
39. **Price, C.J., T.D. Hoyda, and A.V. Ferguson**, *The area postrema: a brain monitor and integrator of systemic autonomic state*. *Neuroscientist*, 2008. 14(2): p. 182-94.
40. **van der Kooy, D. and L.Y. Koda**, *Organization of the projections of a circumventricular organ: the area postrema in the rat*. *J Comp Neurol*, 1983. 219(3): p. 328-38.
41. **Shapiro, R.E. and R.R. Miselis**, *The central neural connections of the area postrema of the rat*. *J Comp Neurol*, 1985. 234(3): p. 344-64.
42. **Rummel, C.**, *Inflammatory transcription factors as activation markers and functional readouts in immune-to-brain communication*. *Brain Behav Immun*, 2016. 54: p. 1-14.
43. **Nadjar, A., et al.**, *Nuclear factor κ B 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*, 2003. 87(4): p. 1024-1036.
44. **Rummel, C., et al.**, *Nuclear STAT3 translocation in guinea pig and rat brain endothelium during systemic challenge with lipopolysaccharide and interleukin-6*. *J Comp Neurol*, 2005. 491(1): p. 1-14.
45. **Damm, J., et al.**, *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*, 2011. 519(3): p. 480-505.
46. **Akira, S., et al.**, *A nuclear factor for IL-6 expression (NF-IL6) is a member of a C/EBP family*. *EMBO J*, 1990. 9(6): p. 1897-906.
47. **Sterneck, E. and P.F. Johnson**, *CCAAT/enhancer binding protein beta is a neuronal transcriptional regulator activated by nerve growth factor receptor signaling*. *J Neurochem*, 1998. 70(6): p. 2424-33.
48. **Ejarque-Ortiz, A., et al.**, *Upregulation of CCAAT/enhancer binding protein beta in activated astrocytes and microglia*. *Glia*, 2007. 55(2): p. 178-88.
49. **Ramji, D.P. and P. Foka**, *CCAAT/enhancer-binding proteins: structure, function and regulation*. *Biochem J*, 2002. 365(Pt 3): p. 561-75.
50. **Taubenfeld, S.M., et al.**, *The consolidation of new but not reactivated memory requires hippocampal C/EBPbeta*. *Nat Neurosci*, 2001. 4(8): p. 813-8.
51. **Damm, J., et al.**, *Fever, sickness behavior, and expression of inflammatory genes in the hypothalamus after systemic and localized subcutaneous stimulation of rats with the Toll-like receptor 7 agonist imiquimod*. *Neuroscience*, 2012. 201: p. 166-83.
52. **Damm, J., et al.**, *Intraperitoneal and subcutaneous injections of the TLR9 agonist ODN 1668 in rats: brain inflammatory responses are related to peripheral IL-6 rather than interferons*. *J Neuroimmunol*, 2014. 277(1-2): p. 105-17.

53. **Cardinaux, J.R., I. Allaman, and P.J. Magistretti**, *Pro-inflammatory cytokines induce the transcription factors C/EBPbeta and C/EBPdelta in astrocytes*. *Glia*, 2000. 29(1): p. 91-7.
54. **Straccia, M., et al.**, *CCAAT/enhancer binding protein beta regulates prostaglandin E synthase expression and prostaglandin E2 production in activated microglial cells*. *Glia*, 2013. 61(10): p. 1607-19.
55. **Uematsu, S., et al.**, *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*, 2002. 168(11): p. 5811-6.
56. **Zhang, Y. and W.N. Rom**, *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*, 1993. 13(6): p. 3831-7.
57. **Pope, R.M., A. Leutz, and S.A. Ness**, *C/EBP beta regulation of the tumor necrosis factor alpha gene*. *J Clin Invest*, 1994. 94(4): p. 1449-55.
58. **Schneiders, J., et al.**, *The transcription factor nuclear factor interleukin 6 mediates pro- and anti-inflammatory responses during LPS-induced systemic inflammation in mice*. *Brain Behav Immun*, 2015. 48: p. 147-64.
59. **Kosaka, T., et al.**, *Characterization of the human gene (PTGS2) encoding prostaglandin-endoperoxide synthase 2*. *Eur J Biochem*, 1994. 221(3): p. 889-97.
60. **Yarwood, S.J., et al.**, *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*, 2008. 283(11): p. 6843-53.
61. **Cappello, C., et al.**, *C/EBPbeta enhances NF-kappaB-associated signalling by reducing the level of IkappaB-alpha*. *Cell Signal*, 2009. 21(12): p. 1918-24.
62. **Baeuerle, P.A. and D. Baltimore**, *I kappa B: a specific inhibitor of the NF-kappa B transcription factor*. *Science*, 1988. 242(4878): p. 540-6.
63. **Pahl, H.L.**, *Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors*. *Oncogene*, 1999. 18(49): p. 6853-66.
64. **Baeuerle, P.A. and D. Baltimore**, *NF-kappa B: ten years after*. *Cell*, 1996. 87(1): p. 13-20.
65. **Kozak, W., S. Wrotek, and A. Kozak**, *Pyrogenicity of CpG-DNA in mice: role of interleukin-6, cyclooxygenases, and nuclear factor-kappaB*. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2006. 290(4): p. R871-80.
66. **Lee, J.J., et al.**, *Blocking NF-kappaB activation may be an effective strategy in the fever therapy*. *Jpn J Physiol*, 2003. 53(5): p. 367-75.
67. **Nadjar, A., et al.**, *Inactivation of the cerebral NFkappaB pathway inhibits interleukin-1beta-induced sickness behavior and c-Fos expression in various brain nuclei*. *Neuropsychopharmacology*, 2005. 30(8): p. 1492-9.
68. **Nadjar, A., et al.**, *NFkappaB activates in vivo the synthesis of inducible Cox-2 in the brain*. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2005. 25(8): p. 1047-59.
69. **Lawrence, T., et al.**, *Possible new role for NF-kappaB in the resolution of inflammation*. *Nat Med*, 2001. 7(12): p. 1291-7.
70. **Le Bail, O., R. Schmidt-Ullrich, and A. Israel**, *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*, 1993. 12(13): p. 5043-9.
71. **Laflamme, N. and S. Rivest**, *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*, 1999. 73(1): p. 309-21.
72. **Bhattacharya, S. and C. Schindler**, *Regulation of Stat3 nuclear export*. *J Clin Invest*, 2003. 111(4): p. 553-9.
73. **Kisseleva, T., et al.**, *Signaling through the JAK/STAT pathway, recent advances and future challenges*. *Gene*, 2002. 285(1-2): p. 1-24.
74. **Zhong, Z., Z. Wen, and J.E. Darnell, Jr.**, *Stat3: a STAT family member activated by tyrosine phosphorylation in response to epidermal growth factor and interleukin-6*. *Science*, 1994. 264(5155): p. 95-8.
75. **Heinrich, P.C., et al.**, *Interleukin-6-type cytokine signalling through the gp130/Jak/STAT pathway*. *Biochem J*, 1998. 334 (Pt 2): p. 297-314.
76. **Carpenter, R.L. and H.W. Lo**, *STAT3 Target Genes Relevant to Human Cancers*. *Cancers (Basel)*, 2014. 6(2): p. 897-925.
77. **Wang, T., et al.**, *Regulation of the innate and adaptive immune responses by Stat-3 signaling in tumor cells*. *Nat Med*, 2004. 10(1): p. 48-54.

78. **Rummel, C., K. Matsumura, and G.N. Luheshi**, *Circulating IL-6 contributes to peripheral LPS-induced mPGES-1 expression in the rat brain*. Brain Res Bull, 2011. 86(5-6): p. 319-25.
79. **Rummel, C., et al.**, *Circulating interleukin-6 induces fever through a STAT3-linked activation of COX-2 in the brain*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2006. 291(5): p. R1316-26.
80. **Esilsson, A., et al.**, *Immune-induced fever is mediated by IL-6 receptors on brain endothelial cells coupled to STAT3-dependent induction of brain endothelial prostaglandin synthesis*. J Neurosci, 2014. 34(48): p. 15957-61.
81. **Krebs, D.L. and D.J. Hilton**, *SOCS proteins: negative regulators of cytokine signaling*. Stem Cells, 2001. 19(5): p. 378-87.
82. **Starr, R., et al.**, *A family of cytokine-inducible inhibitors of signalling*. Nature, 1997. 387(6636): p. 917-21.
83. **Lebel, E., L. Vallieres, and S. Rivest**, *Selective involvement of interleukin-6 in the transcriptional activation of the suppressor of cytokine signaling-3 in the brain during systemic immune challenges*. Endocrinology, 2000. 141(10): p. 3749-63.
84. **Rummel, C., et al.**, *Selective contribution of interleukin-6 and leptin to brain inflammatory signals induced by systemic LPS injection in mice*. J Comp Neurol, 2008. 511(3): p. 373-395.
85. **Dinarello, C.A.**, *Infection, fever, and exogenous and endogenous pyrogens: some concepts have changed*. J Endotoxin Res, 2004. 10(4): p. 201-22.
86. **Thomson, A.W.**, *The Cytokine Handbook, 2nd edn.* 1994, London: Academic Press.
87. **Conti, B., et al.**, *Cytokines and fever*. Front Biosci, 2004. 9: p. 1433-49.
88. **Liles, W.C. and W.C. Van Voorhis**, *Review: nomenclature and biologic significance of cytokines involved in inflammation and the host immune response*. J Infect Dis, 1995. 172(6): p. 1573-80.
89. **Givalois, L., et al.**, *Temporal cascade of plasma level surges in ACTH, corticosterone, and cytokines in endotoxin-challenged rats*. Am J Physiol, 1994. 267(1 Pt 2): p. R164-70.
90. **Opal, S.M. and V.A. DePalo**, *Anti-inflammatory cytokines*. Chest, 2000. 117(4): p. 1162-72.
91. **Li, Z., et al.**, *Kupffer cell-generated PGE2 triggers the febrile response of guinea pigs to intravenously injected LPS*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2006.
92. **Zetterström, M., et al.**, *Delineation of the proinflammatory cytokine cascade in fever induction*. Ann N Y Acad Sci, 1998. 856: p. 48-52.
93. **Zhang, Y.H., J.X. Lin, and J. Vilcek**, *Interleukin-6 induction by tumor necrosis factor and interleukin-1 in human fibroblasts involves activation of a nuclear factor binding to a kappa B-like sequence*. Mol Cell Biol, 1990. 10(7): p. 3818-23.
94. **Dinarello, C.A., et al.**, *Tumor necrosis factor (cachectin) is an endogenous pyrogen and induces production of interleukin 1*. J Exp Med, 1986. 163(6): p. 1433-50.
95. **Ikejima, T., et al.**, *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, 1990. 162(1): p. 215-23.
96. **Schindler, R., et al.**, *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, 1990. 75(1): p. 40-7.
97. **Paul, W.E.**, *Pleiotropy and redundancy: T cell-derived lymphokines in the immune response*. Cell, 1989. 57(4): p. 521-4.
98. **Wanebo, H.J.**, *Tumor necrosis factors*. Semin Surg Oncol, 1989. 5(6): p. 402-13.
99. **Conti, P., et al.**, *Activation of human natural killer cells by lipopolysaccharide and generation of interleukin-1 alpha, beta, tumour necrosis factor and interleukin-6. Effect of IL-1 receptor antagonist*. Immunology, 1991. 73(4): p. 450-6.
100. **Baumgartner, R.A., V.A. Deramo, and M.A. Beaven**, *Constitutive and inducible mechanisms for synthesis and release of cytokines in immune cell lines*. J Immunol, 1996. 157(9): p. 4087-93.
101. **Lewis, M., et al.**, *Cloning and expression of cDNAs for two distinct murine tumor necrosis factor receptors demonstrate one receptor is species specific*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. 88(7): p. 2830-4.
102. **Wajant, H., K. Pfizenmaier, and P. Scheurich**, *Tumor necrosis factor signaling*. Cell Death Differ, 2003. 10(1): p. 45-65.
103. **Wang, C., et al.**, *Tumor necrosis factor-alpha: a key contributor to intervertebral disc degeneration*. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai), 2017. 49(1): p. 1-13.
104. **Veroni, C., et al.**, *Activation of TNF receptor 2 in microglia promotes induction of anti-inflammatory pathways*. Mol Cell Neurosci, 2010. 45(3): p. 234-44.

105. **Roth, J. and E. Zeisberger**, *Endotoxin tolerance alters thermal response of guinea pigs to systemic infusions of tumor necrosis factor-alpha*. *Am J Physiol*, 1995. 268(2 Pt 2): p. R514-9.
106. **Roth, J., et al.**, *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*, 1998. 509 (Pt 1): p. 267-75.
107. **Nagai, M., et al.**, *Antibody to tumor necrosis factor (TNF) reduces endotoxin fever*. *Experientia*, 1988. 44(7): p. 606-7.
108. **Long, N.C., et al.**, *Antiserum against tumor necrosis factor enhances lipopolysaccharide fever in rats*. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 1990. 258(2): p. R332-337.
109. **Töllner, B., et al.**, *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*, 2000. 440(6): p. 925-32.
110. **Beutler, B., et al.**, *Identity of tumour necrosis factor and the macrophage-secreted factor cachectin*. *Nature*, 1985. 316(6028): p. 552-4.
111. **Dinarello, C.A.**, *Biologic basis for interleukin-1 in disease*. *Blood*, 1996. 87(6): p. 2095-147.
112. **Anforth, H.R., et al.**, *Biological activity and brain actions of recombinant rat interleukin-1alpha and interleukin-1beta*. *Eur Cytokine Netw*, 1998. 9(3): p. 279-88.
113. **Van Dam, A.M., et al.**, *Endotoxin-induced appearance of immunoreactive interleukin-1 beta in ramified microglia in rat brain: a light and electron microscopic study*. *Neuroscience*, 1995. 65(3): p. 815-26.
114. **Black, R.A., S.R. Kronheim, and P.R. Sleath**, *Activation of interleukin-1 beta by a co-induced protease*. *FEBS Lett*, 1989. 247(2): p. 386-90.
115. **Re, F., et al.**, *Inhibition of interleukin-1 responsiveness by type II receptor gene transfer: a surface "receptor" with anti-interleukin-1 function*. *J Exp Med*, 1996. 183(4): p. 1841-50.
116. **Mantovani, A., et al.**, *Decoy receptors: a strategy to regulate inflammatory cytokines and chemokines*. *Trends Immunol*, 2001. 22(6): p. 328-36.
117. **Zetterstrom, M., et al.**, *Interleukin-1-mediated febrile responses in mice and interleukin-1 beta activation of NFkappaB in mouse primary astrocytes, involves the interleukin-1 receptor accessory protein*. *Eur Cytokine Netw*, 1998. 9(2): p. 131-8.
118. **Penton-Rol, G., et al.**, *Bacterial lipopolysaccharide causes rapid shedding, followed by inhibition of mRNA expression, of the IL-1 type II receptor, with concomitant up-regulation of the type I receptor and induction of incompletely spliced transcripts*. *J Immunol*, 1999. 162(5): p. 2931-8.
119. **Qian, J., et al.**, *Interleukin-1R3 mediates interleukin-1-induced potassium current increase through fast activation of Akt kinase*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2012. 109(30): p. 12189-94.
120. **Long, N.C., et al.**, *Roles of interleukin 1 beta and tumor necrosis factor in lipopolysaccharide fever in rats*. *Am J Physiol*, 1990. 259(4 Pt 2): p. R724-8.
121. **Smith, B.K. and M.J. Kluger**, *Human IL-1 receptor antagonist partially suppresses LPS fever but not plasma levels of IL-6 in Fischer rats*. *Am J Physiol*, 1992. 263(3 Pt 2): p. R653-5.
122. **Luheshi, G., et al.**, *Interleukin-1 receptor antagonist inhibits endotoxin fever and systemic interleukin-6 induction in the rat*. *Am J Physiol*, 1996. 270(1 Pt 1): p. E91-5.
123. **Avanzi, G.C., et al.**, *Biological and molecular evidence for the production of IL-6 by human natural killer cells in culture*. *Life Sci*, 1989. 45(26): p. 2621-6.
124. **Frei, K., et al.**, *On the cellular source and function of interleukin 6 produced in the central nervous system in viral diseases*. *Eur J Immunol*, 1989. 19(4): p. 689-94.
125. **Taga, T. and T. Kishimoto**, *Gp130 and the interleukin-6 family of cytokines*. *Annu Rev Immunol*, 1997. 15: p. 797-819.
126. **LeMay, L.G., A.J. Vander, and M.J. Kluger**, *Role of interleukin 6 in fever in rats*. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 1990. 258(3): p. R798-803.
127. **Roth, J., et al.**, *Kinetics of systemic and intrahypothalamic IL-6 and tumor necrosis factor during endotoxin fever in guinea pigs*. *Am J Physiol*, 1993. 265(3 Pt 2): p. R653-8.
128. **Roth, J., Rummel, C., Harré, E. M., Voss, T., Mütze, J., Gerstberger, R., Hübschle, T., Is interleukin-6 the necessary pyrogenic cytokine?** *Journal of Thermal Biology*, 2004. 29(7-8): p. 383-389.
129. **Blatteis, C.M., et al.**, *Neuromodulation of acute-phase responses to interleukin-6 in guinea pigs*. *Brain Res Bull*, 1990. 25(6): p. 895-901.
130. **Harré, E.M., et al.**, *Selected contribution: role of IL-6 in LPS-induced nuclear STAT3 translocation in sensory circumventricular organs during fever in rats*. *J Appl Physiol*, 2002. 92(6): p. 2657-66.

131. **Harden, L.M., et al.**, *Interleukin-6 and leptin mediate lipopolysaccharide-induced fever and sickness behavior*. *Physiol Behav*, 2006. 89(2): p. 146-55.
132. **Cartmell, T., et al.**, *Circulating interleukin-6 mediates the febrile response to localised inflammation in rats*. *J Physiol*, 2000. 526 Pt 3: p. 653-61.
133. **Chai, Z., et al.**, *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*, 1996. 183(1): p. 311-6.
134. **Hamzic, N., et al.**, *Interleukin-6 primarily produced by non-hematopoietic cells mediates the lipopolysaccharide-induced febrile response*. *Brain Behav Immun*, 2013. 33: p. 123-30.
135. **Serhan, C.N.**, *Pro-resolving lipid mediators are leads for resolution physiology*. *Nature*, 2014. 510(7503): p. 92-101.
136. **Yates, C.M., P.C. Calder, and G. Ed Rainger**, *Pharmacology and therapeutics of omega-3 polyunsaturated fatty acids in chronic inflammatory disease*. *Pharmacol Ther*, 2014. 141(3): p. 272-82.
137. **Nomura, D.K., et al.**, *Endocannabinoid hydrolysis generates brain prostaglandins that promote neuroinflammation*. *Science*, 2011. 334(6057): p. 809-13.
138. **Das, U.N. and L.G. Puskas**, *Transgenic fat-1 mouse as a model to study the pathophysiology of cardiovascular, neurological and psychiatric disorders*. *Lipids Health Dis*, 2009. 8: p. 61.
139. **Khanapure, S.P., et al.**, *Eicosanoids in inflammation: biosynthesis, pharmacology, and therapeutic frontiers*. *Curr Top Med Chem*, 2007. 7(3): p. 311-40.
140. **Steiner, A.A., et al.**, *Cyclooxygenase-1 or -2--which one mediates lipopolysaccharide-induced hypothermia?* *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2009. 297(2): p. R485-94.
141. **Smith, W.L., L.J. Marnett, and D.L. DeWitt**, *Prostaglandin and thromboxane biosynthesis*. *Pharmacol Ther*, 1991. 49(3): p. 153-79.
142. **Murakami, M. and I. Kudo**, *Recent advances in molecular biology and physiology of the prostaglandin E2-biosynthetic pathway*. *Prog Lipid Res*, 2004. 43(1): p. 3-35.
143. **Ivanov, A.I. and A.A. Romanovsky**, *Prostaglandin E2 as a mediator of fever: synthesis and catabolism*. *Front Biosci*, 2004. 9: p. 1977-93.
144. **Tanioka, T., et al.**, *Molecular identification of cytosolic prostaglandin E2 synthase that is functionally coupled with cyclooxygenase-1 in immediate prostaglandin E2 biosynthesis*. *J Biol Chem*, 2000. 275(42): p. 32775-82.
145. **Breyer, R.M., et al.**, *Prostanoid receptors: subtypes and signaling*. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2001. 41: p. 661-90.
146. **Milton, A.S. and S. Wendlandt**, *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*, 1971. 218(2): p. 325-36.
147. **Nakamura, K., et al.**, *The rostral raphe pallidus nucleus mediates pyrogenic transmission from the preoptic area*. *J Neurosci*, 2002. 22(11): p. 4600-10.
148. **Williams, J.W., et al.**, *An extensive exploration of the rat brain for sites mediating prostaglandin-induced hyperthermia*. *Brain Res*, 1977. 120(2): p. 251-62.
149. **Scammell, T.E., et al.**, *Ventromedial preoptic prostaglandin E2 activates fever-producing autonomic pathways*. *J Neurosci*, 1996. 16(19): p. 6246-54.
150. **Roth, J., et al.**, *Influence of systemic treatment with cyclooxygenase inhibitors on lipopolysaccharide-induced fever and circulating levels of cytokines and cortisol in guinea-pigs*. *Pflugers Arch*, 2002. 443(3): p. 411-7.
151. **Rotondo, D., et al.**, *Pyrogenic immunomodulators increase the level of prostaglandin E2 in the blood simultaneously with the onset of fever*. *Eur J Pharmacol*, 1988. 154(2): p. 145-52.
152. **Scammell, T.E., et al.**, *Microinjection of a cyclooxygenase inhibitor into the anteroventral preoptic region attenuates LPS fever*. *Am. J. Physiol.*, 1998. 274: p. R783-R789.
153. **Li, S., et al.**, *The febrile response to lipopolysaccharide is blocked in cyclooxygenase-2(-/-), but not in cyclooxygenase-1(-/-) mice*. *Brain Res*, 1999. 825(1-2): p. 86-94.
154. **Steiner, A.A., et al.**, *Expanding the febrigenic role of cyclooxygenase-2 to the previously overlooked responses*. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2005. 289(5): p. R1253-7.
155. **Engblom, D., et al.**, *Microsomal prostaglandin E synthase-1 is the central switch during immune-induced pyresis*. *Nat Neurosci*, 2003. 6(11): p. 1137-8.
156. **Engström, L., et al.**, *Lipopolysaccharide-induced Fever depends on prostaglandin e2 production specifically in brain endothelial cells*. *Endocrinology*, 2012. 153(10): p. 4849-61.
157. **Schiltz, J.C. and P.E. Sawchenko**, *Distinct brain vascular cell types manifest inducible cyclooxygenase expression as a function of the strength and nature of immune insults*. *J Neurosci*, 2002. 22(13): p. 5606-18.

158. **Wilhelms, D.B., et al.**, *Deletion of prostaglandin E2 synthesizing enzymes in brain endothelial cells attenuates inflammatory fever*. J Neurosci, 2014. 34(35): p. 11684-90.
159. **Urade, Y. and O. Hayaishi**, *Prostaglandin D synthase: structure and function*. Vitam Horm, 2000. 58: p. 89-120.
160. **Joo, M. and R.T. Sadikot**, *PGD synthase and PGD2 in immune response*. Mediators Inflamm, 2012. 2012: p. 503128.
161. **Urade, Y., et al.**, *The major source of endogenous prostaglandin D2 production is likely antigen-presenting cells. Localization of glutathione-requiring prostaglandin D synthetase in histiocytes, dendritic, and Kupffer cells in various rat tissues*. J Immunol, 1989. 143(9): p. 2982-9.
162. **Urade, Y., K. Watanabe, and O. Hayaishi**, *Prostaglandin D, E, and F synthases*. J Lipid Mediat Cell Signal, 1995. 12(2-3): p. 257-73.
163. **Tokudome, S., et al.**, *Glucocorticoid protects rodent hearts from ischemia/reperfusion injury by activating lipocalin-type prostaglandin D synthase-derived PGD2 biosynthesis*. J Clin Invest, 2009. 119(6): p. 1477-88.
164. **Joo, M., et al.**, *Induction and function of lipocalin prostaglandin D synthase in host immunity*. J Immunol, 2007. 179(4): p. 2565-75.
165. **Bos, C.L., et al.**, *Prostanoids and prostanoid receptors in signal transduction*. Int J Biochem Cell Biol, 2004. 36(7): p. 1187-205.
166. **Hirai, H., et al.**, *Prostaglandin D2 selectively induces chemotaxis in T helper type 2 cells, eosinophils, and basophils via seven-transmembrane receptor CRTH2*. J Exp Med, 2001. 193(2): p. 255-61.
167. **Sawyer, N., et al.**, *Molecular pharmacology of the human prostaglandin D2 receptor, CRTH2*. Br J Pharmacol, 2002. 137(8): p. 1163-72.
168. **Abdel-Halim, M.S., et al.**, *Identification of prostaglandin D2 as a major prostaglandin in homogenates of rat brain*. Prostaglandins, 1977. 14(4): p. 633-43.
169. **Lewis, R.A., et al.**, *Prostaglandin D2 generation after activation of rat and human mast cells with anti-IgE*. J Immunol, 1982. 129(4): p. 1627-31.
170. **Shibata, T., et al.**, *15-deoxy-delta 12,14-prostaglandin J2. A prostaglandin D2 metabolite generated during inflammatory processes*. J Biol Chem, 2002. 277(12): p. 10459-66.
171. **Scher, J.U. and M.H. Pillinger**, *15d-PGJ2: the anti-inflammatory prostaglandin? Clin Immunol*, 2005. 114(2): p. 100-9.
172. **Haworth, O. and C.D. Buckley**, *Resolving the problem of persistence in the switch from acute to chronic inflammation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. 104(52): p. 20647-8.
173. **Gilroy, D.W., et al.**, *Inducible cyclooxygenase may have anti-inflammatory properties*. Nat Med, 1999. 5(6): p. 698-701.
174. **Wright, D.H., et al.**, *Characterization of the recombinant human prostanoid DP receptor and identification of L-644,698, a novel selective DP agonist*. Br J Pharmacol, 1998. 123(7): p. 1317-24.
175. **Forman, B.M., et al.**, *15-Deoxy-delta 12, 14-prostaglandin J2 is a ligand for the adipocyte determination factor PPAR gamma*. Cell, 1995. 83(5): p. 803-12.
176. **Kliwer, S.A., et al.**, *A prostaglandin J2 metabolite binds peroxisome proliferator-activated receptor gamma and promotes adipocyte differentiation*. Cell, 1995. 83(5): p. 813-9.
177. **Su, C.G., et al.**, *A novel therapy for colitis utilizing PPAR-gamma ligands to inhibit the epithelial inflammatory response*. J Clin Invest, 1999. 104(4): p. 383-9.
178. **Straus, D.S., et al.**, *15-deoxy-delta 12,14-prostaglandin J2 inhibits multiple steps in the NF-kappa B signaling pathway*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. 97(9): p. 4844-9.
179. **Castrillo, A., et al.**, *Inhibition of I kappa B kinase and I kappa B phosphorylation by 15-deoxy-Delta(12,14)-prostaglandin J(2) in activated murine macrophages*. Mol Cell Biol, 2000. 20(5): p. 1692-8.
180. **Seeger, W., et al.**, *Noncytolytic terminal complement complexes may serve as calcium gates to elicit leukotriene B4 generation in human polymorphonuclear leukocytes*. J Immunol, 1986. 137(4): p. 1286-93.
181. **Claesson, H.E., J.A. Lindgren, and B. Gustafsson**, *Opsonized bacteria stimulate leukotriene synthesis in human leukocytes*. Biochim Biophys Acta, 1985. 836(3): p. 361-7.
182. **Le Bel, M., A. Brunet, and J. Gosselin**, *Leukotriene B4, an endogenous stimulator of the innate immune response against pathogens*. J Innate Immun, 2014. 6(2): p. 159-68.
183. **Shimizu, T., et al.**, *Enzymic synthesis of leukotriene B4 in guinea pig brain*. J Neurochem, 1987. 48(5): p. 1541-6.

184. **Lammers, C.H., et al.**, *Arachidonate 5-lipoxygenase and its activating protein: prominent hippocampal expression and role in somatostatin signaling*. J Neurochem, 1996. 66(1): p. 147-52.
185. **Chen, N. and C.S. Reis**, *Distinct roles of eicosanoids in the immune response to viral encephalitis: or why you should take NSAIDS*. Viral Immunol, 2002. 15(1): p. 133-46.
186. **Yokomizo, T.**, *Two distinct leukotriene B4 receptors, BLT1 and BLT2*. J Biochem, 2015. 157(2): p. 65-71.
187. **Wei, J.D., J.Y. Kim, and J.H. Kim**, *BLT2 phosphorylation at Thr355 by Akt is necessary for BLT2-mediated chemotaxis*. FEBS Lett, 2011. 585(22): p. 3501-6.
188. **Iizuka, Y., et al.**, *Protective role of the leukotriene B4 receptor BLT2 in murine inflammatory colitis*. FASEB J, 2010. 24(12): p. 4678-90.
189. **Ishii, Y., et al.**, *Leukotriene B4 receptor type 2 (BLT2) enhances skin barrier function by regulating tight junction proteins*. FASEB J, 2016. 30(2): p. 933-47.
190. **Bray, M.A., A.W. Ford-Hutchinson, and M.J. Smith**, *Leukotriene B4: an inflammatory mediator in vivo*. Prostaglandins, 1981. 22(2): p. 213-22.
191. **Shin, E.H., H.Y. Lee, and Y.S. Bae**, *Leukotriene B4 stimulates human monocyte-derived dendritic cell chemotaxis*. Biochem Biophys Res Commun, 2006. 348(2): p. 606-11.
192. **Bray, M.A., et al.**, *Leukotriene B4: a mediator of vascular permeability*. Br J Pharmacol, 1981. 72(3): p. 483-6.
193. **Black, K.L. and J.T. Hoff**, *Leukotrienes increase blood-brain barrier permeability following intraparenchymal injections in rats*. Ann Neurol, 1985. 18(3): p. 349-51.
194. **Stenson, W.F., K. Chang, and J.R. Williamson**, *Tissue differences in vascular permeability induced by leukotriene B4 and prostaglandin E2 in the rat*. Prostaglandins, 1986. 32(1): p. 5-17.
195. **Achek, A., D. Yesudhas, and S. Choi**, *Toll-like receptors: promising therapeutic targets for inflammatory diseases*. Arch Pharm Res, 2016. 39(8): p. 1032-49.
196. **Bianchi, M.E.**, *DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger*. J Leukoc Biol, 2007. 81(1): p. 1-5.
197. **Takeda, K., T. Kaisho, and S. Akira**, *Toll-like receptors*. Annu Rev Immunol, 2003. 21: p. 335-76.
198. **Rivest, S.**, *Regulation of innate immune responses in the brain*. Nat Rev Immunol, 2009. 9(6): p. 429-39.
199. **Freudenberg, M.A. and C. Galanos**, *Bacterial lipopolysaccharides: structure, metabolism and mechanisms of action*. Int Rev Immunol, 1990. 6(4): p. 207-21.
200. **Erridge, C., E. Bennett-Guerrero, and I.R. Poxton**, *Structure and function of lipopolysaccharides*. Microbes Infect, 2002. 4(8): p. 837-51.
201. **Galanos, C., et al.**, *Synthetic and natural Escherichia coli free lipid A express identical endotoxic activities*. Eur J Biochem, 1985. 148(1): p. 1-5.
202. **Kotani, S., et al.**, *Synthetic lipid A with endotoxic and related biological activities comparable to those of a natural lipid A from an Escherichia coli re-mutant*. Infect Immun, 1985. 49(1): p. 225-37.
203. **Holst, O., et al.**, *Biochemistry and cell biology of bacterial endotoxins*. FEMS Immunol Med Microbiol, 1996. 16(2): p. 83-104.
204. **Schumann, R.R., et al.**, *Structure and function of lipopolysaccharide binding protein*. Science, 1990. 249(4975): p. 1429-31.
205. **Schletter, J., et al.**, *Molecular mechanisms of endotoxin activity*. Arch Microbiol, 1995. 164(6): p. 383-9.
206. **Hailman, E., et al.**, *Lipopolysaccharide (LPS)-binding protein accelerates the binding of LPS to CD14*. J Exp Med, 1994. 179(1): p. 269-77.
207. **Frey, E.A., et al.**, *Soluble CD14 participates in the response of cells to lipopolysaccharide*. J Exp Med, 1992. 176(6): p. 1665-71.
208. **Chow, J.C., et al.**, *Toll-like receptor-4 mediates lipopolysaccharide-induced signal transduction*. J Biol Chem, 1999. 274(16): p. 10689-92.
209. **Rivest, S.**, *Molecular insights on the cerebral innate immune system*. Brain Behav Immun, 2003. 17(1): p. 13-9.
210. **Poltorak, A., et al.**, *Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene*. Science, 1998. 282(5396): p. 2085-8.
211. **Shimazu, R., et al.**, *MD-2, a molecule that confers lipopolysaccharide responsiveness on Toll-like receptor 4*. J Exp Med, 1999. 189(11): p. 1777-82.
212. **Inohara, N., et al.**, *Human Nod1 confers responsiveness to bacterial lipopolysaccharides*. J Biol Chem, 2001. 276(4): p. 2551-4.

213. **Farzi, A., et al.**, *Synergistic effects of NOD1 or NOD2 and TLR4 activation on mouse sickness behavior in relation to immune and brain activity markers*. *Brain Behav Immun*, 2015. 44: p. 106-20.
214. **Kozak, W. and V. Fraifeld**, *Non-prostaglandin eicosanoids in fever and anapyrexia*. *Front Biosci*, 2004. 9: p. 3339-55.
215. **Fraifeld, V., L. Paul, and J. Kaplanski**, *The relationship between hypothalamic prostaglandin E2 or leukotrienes and the body temperature response to lipopolysaccharide in different murine strains*. *Journal of Thermal Biology*, 2000. 25(1-2): p. 17-20.
216. **Rudaya, A.Y., et al.**, *Thermoregulatory responses to lipopolysaccharide in the mouse: dependence on the dose and ambient temperature*. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2005. 289(5): p. R1244-52.
217. **Kozak, W., C.A. Conn, and M.J. Kluger**, *Lipopolysaccharide induces fever and depresses locomotor activity in unrestrained mice*. *Am J Physiol*, 1994. 266(1 Pt 2): p. R125-35.
218. **Harden, L.M., et al.**, *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*, 2014. 466(7): p. 1451-66.
219. **Mollen, K.P., et al.**, *Emerging paradigm: toll-like receptor 4-sentinel for the detection of tissue damage*. *Shock*, 2006. 26(5): p. 430-7.
220. **Goodwin, G.H., C. Sanders, and E.W. Johns**, *A new group of chromatin-associated proteins with a high content of acidic and basic amino acids*. *Eur J Biochem*, 1973. 38(1): p. 14-9.
221. **Catez, F., et al.**, *Network of dynamic interactions between histone H1 and high-mobility-group proteins in chromatin*. *Mol Cell Biol*, 2004. 24(10): p. 4321-8.
222. **Lange, S.S. and K.M. Vasquez**, *HMGB1: the jack-of-all-trades protein is a master DNA repair mechanic*. *Mol Carcinog*, 2009. 48(7): p. 571-80.
223. **Ueda, T., et al.**, *Acidic C-tail of HMGB1 is required for its target binding to nucleosome linker DNA and transcription stimulation*. *Biochemistry*, 2004. 43(30): p. 9901-8.
224. **Calogero, S., et al.**, *The lack of chromosomal protein Hmg1 does not disrupt cell growth but causes lethal hypoglycaemia in newborn mice*. *Nat Genet*, 1999. 22(3): p. 276-80.
225. **Yotov, W.V. and R. St-Arnaud**, *Nucleotide sequence of a mouse cDNA encoding the nonhistone chromosomal high mobility group protein-1 (HMG1)*. *Nucleic Acids Res*, 1992. 20(13): p. 3516.
226. **Wang, H., et al.**, *HMG-1 as a late mediator of endotoxin lethality in mice*. *Science*, 1999. 285(5425): p. 248-51.
227. **Janko, C., et al.**, *Redox modulation of HMGB1-related signaling*. *Antioxid Redox Signal*, 2014. 20(7): p. 1075-85.
228. **Hoppe, G., et al.**, *Molecular basis for the redox control of nuclear transport of the structural chromatin protein Hmg1*. *Exp Cell Res*, 2006. 312(18): p. 3526-38.
229. **Lotze, M.T. and K.J. Tracey**, *High-mobility group box 1 protein (HMGB1): nuclear weapon in the immune arsenal*. *Nat Rev Immunol*, 2005. 5(4): p. 331-42.
230. **Falciola, L., et al.**, *High mobility group 1 protein is not stably associated with the chromosomes of somatic cells*. *J Cell Biol*, 1997. 137(1): p. 19-26.
231. **Scaffidi, P., T. Misteli, and M.E. Bianchi**, *Release of chromatin protein HMGB1 by necrotic cells triggers inflammation*. *Nature*, 2002. 418(6894): p. 191-5.
232. **Qin, S., et al.**, *Role of HMGB1 in apoptosis-mediated sepsis lethality*. *J Exp Med*, 2006. 203(7): p. 1637-42.
233. **Venereau, E., et al.**, *Mutually exclusive redox forms of HMGB1 promote cell recruitment or proinflammatory cytokine release*. *J Exp Med*, 2012. 209(9): p. 1519-28.
234. **Antoine, D.J., et al.**, *A systematic nomenclature for the redox states of high mobility group box (HMGB) proteins*. *Mol Med*, 2014. 20: p. 135-7.
235. **Hori, O., et al.**, *The receptor for advanced glycation end products (RAGE) is a cellular binding site for amphoterin. Mediation of neurite outgrowth and co-expression of rage and amphoterin in the developing nervous system*. *J Biol Chem*, 1995. 270(43): p. 25752-61.
236. **Fiuza, C., et al.**, *Inflammation-promoting activity of HMGB1 on human microvascular endothelial cells*. *Blood*, 2003. 101(7): p. 2652-60.
237. **Sims, G.P., et al.**, *HMGB1 and RAGE in inflammation and cancer*. *Annu Rev Immunol*, 2010. 28: p. 367-88.
238. **Tsung, A., S. Tohme, and T.R. Billiar**, *High-mobility group box-1 in sterile inflammation*. *J Intern Med*, 2014. 276(5): p. 425-43.
239. **Bianchi, M.E.**, *HMGB1 loves company*. *J Leukoc Biol*, 2009. 86(3): p. 573-6.

240. **Schiraldi, M., et al.**, *HMGB1 promotes recruitment of inflammatory cells to damaged tissues by forming a complex with CXCL12 and signaling via CXCR4*. *J Exp Med*, 2012. 209(3): p. 551-63.
241. **Campana, L., et al.**, *Requirement of HMGB1 for stromal cell-derived factor-1/CXCL12-dependent migration of macrophages and dendritic cells*. *J Leukoc Biol*, 2009. 86(3): p. 609-15.
242. **Kew, R.R., et al.**, *The IKKalpha-dependent NF-kappaB p52/RelB noncanonical pathway is essential to sustain a CXCL12 autocrine loop in cells migrating in response to HMGB1*. *J Immunol*, 2012. 188(5): p. 2380-6.
243. **Yamasoba, D., et al.**, *Peripheral HMGB1-induced hyperalgesia in mice: Redox state-dependent distinct roles of RAGE and TLR4*. *J Pharmacol Sci*, 2016. 130(2): p. 139-42.
244. **Allette, Y.M., et al.**, *Identification of a functional interaction of HMGB1 with Receptor for Advanced Glycation End-products in a model of neuropathic pain*. *Brain Behav Immun*, 2014. 42: p. 169-77.
245. **Yang, H., et al.**, *The cytokine activity of HMGB1*. *J Leukoc Biol*, 2005. 78(1): p. 1-8.
246. **Yang, H., et al.**, *MD-2 is required for disulfide HMGB1-dependent TLR4 signaling*. *J Exp Med*, 2015. 212(1): p. 5-14.
247. **Yang, H., et al.**, *Redox modification of cysteine residues regulates the cytokine activity of high mobility group box-1 (HMGB1)*. *Mol Med*, 2012. 18: p. 250-9.
248. **Fan, J., et al.**, *Hemorrhagic shock induces NAD(P)H oxidase activation in neutrophils: role of HMGB1-TLR4 signaling*. *J Immunol*, 2007. 178(10): p. 6573-80.
249. **Schaefer, L. and R.M. Schaefer**, *Proteoglycans: from structural compounds to signaling molecules*. *Cell Tissue Res*, 2010. 339(1): p. 237-46.
250. **Nastase, M.V., M.F. Young, and L. Schaefer**, *Biglycan: a multivalent proteoglycan providing structure and signals*. *J Histochem Cytochem*, 2012. 60(12): p. 963-75.
251. **Schönherr, E., et al.**, *Interaction of biglycan with type I collagen*. *J Biol Chem*, 1995. 270(6): p. 2776-83.
252. **Reinboth, B., et al.**, *Molecular interactions of biglycan and decorin with elastic fiber components: biglycan forms a ternary complex with tropoelastin and microfibril-associated glycoprotein 1*. *J Biol Chem*, 2002. 277(6): p. 3950-7.
253. **Douglas, T., et al.**, *Fibrillogenesis of collagen types I, II, and III with small leucine-rich proteoglycans decorin and biglycan*. *Biomacromolecules*, 2006. 7(8): p. 2388-93.
254. **Xu, T., et al.**, *Targeted disruption of the biglycan gene leads to an osteoporosis-like phenotype in mice*. *Nat Genet*, 1998. 20(1): p. 78-82.
255. **Corsi, A., et al.**, *Phenotypic effects of biglycan deficiency are linked to collagen fibril abnormalities, are synergized by decorin deficiency, and mimic Ehlers-Danlos-like changes in bone and other connective tissues*. *J Bone Miner Res*, 2002. 17(7): p. 1180-9.
256. **Chen, X.D., et al.**, *Age-related osteoporosis in biglycan-deficient mice is related to defects in bone marrow stromal cells*. *J Bone Miner Res*, 2002. 17(2): p. 331-40.
257. **Berendsen, A.D., et al.**, *Modulation of canonical Wnt signaling by the extracellular matrix component biglycan*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011. 108(41): p. 17022-7.
258. **Hildebrand, A., et al.**, *Interaction of the small interstitial proteoglycans biglycan, decorin and fibromodulin with transforming growth factor beta*. *Biochem J*, 1994. 302 (Pt 2): p. 527-34.
259. **Tufvesson, E. and G. Westergren-Thorsson**, *Tumour necrosis factor-alpha interacts with biglycan and decorin*. *FEBS Lett*, 2002. 530(1-3): p. 124-8.
260. **Schaefer, L.**, *Complexity of danger: the diverse nature of damage-associated molecular patterns*. *J Biol Chem*, 2014. 289(51): p. 35237-45.
261. **Schaefer, L., et al.**, *The matrix component biglycan is proinflammatory and signals through Toll-like receptors 4 and 2 in macrophages*. *J Clin Invest*, 2005. 115(8): p. 2223-33.
262. **Babelova, A., et al.**, *Biglycan, a danger signal that activates the NLRP3 inflammasome via toll-like and P2X receptors*. *J Biol Chem*, 2009. 284(36): p. 24035-48.
263. **WHO**, *Obesity and overweight. Fact sheet number 311*, Updated June 2016.
264. **Cartwright, M.J., T. Tchkonja, and J.L. Kirkland**, *Aging in adipocytes: potential impact of inherent, depot-specific mechanisms*. *Exp Gerontol*, 2007. 42(6): p. 463-71.
265. **Trayhurn, P. and I.S. Wood**, *Adipokines: inflammation and the pleiotropic role of white adipose tissue*. *Br J Nutr*, 2004. 92(3): p. 347-55.
266. **Festa, A., et al.**, *The relation of body fat mass and distribution to markers of chronic inflammation*. *Int J Obes Relat Metab Disord*, 2001. 25(10): p. 1407-15.
267. **Park, H.S., J.Y. Park, and R. Yu**, *Relationship of obesity and visceral adiposity with serum concentrations of CRP, TNF-alpha and IL-6*. *Diabetes Res Clin Pract*, 2005. 69(1): p. 29-35.
268. **Krabbe, K.S., M. Pedersen, and H. Bruunsgaard**, *Inflammatory mediators in the elderly*. *Exp Gerontol*, 2004. 39(5): p. 687-99.

269. **Pedersen, M., et al.**, *Circulating levels of TNF-alpha and IL-6-relation to truncal fat mass and muscle mass in healthy elderly individuals and in patients with type-2 diabetes*. Mech Ageing Dev, 2003. 124(4): p. 495-502.
270. **Garg, S.K., et al.**, *Changes in adipose tissue macrophages and T cells during aging*. Crit Rev Immunol, 2014. 34(1): p. 1-14.
271. **Meier, C.A., et al.**, *IL-1 receptor antagonist serum levels are increased in human obesity: a possible link to the resistance to leptin?* J Clin Endocrinol Metab, 2002. 87(3): p. 1184-8.
272. **Spalding, K.L., et al.**, *Dynamics of fat cell turnover in humans*. Nature, 2008. 453(7196): p. 783-7.
273. **Hosogai, N., et al.**, *Adipose tissue hypoxia in obesity and its impact on adipocytokine dysregulation*. Diabetes, 2007. 56(4): p. 901-11.
274. **Cinti, S., et al.**, *Adipocyte death defines macrophage localization and function in adipose tissue of obese mice and humans*. J Lipid Res, 2005. 46(11): p. 2347-55.
275. **Wang, B., I.S. Wood, and P. Trayhurn**, *Dysregulation of the expression and secretion of inflammation-related adipokines by hypoxia in human adipocytes*. Pflugers Arch, 2007. 455(3): p. 479-92.
276. **Ye, J., et al.**, *Hypoxia is a potential risk factor for chronic inflammation and adiponectin reduction in adipose tissue of ob/ob and dietary obese mice*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2007. 293(4): p. E1118-28.
277. **Weisberg, S.P., et al.**, *Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue*. J Clin Invest, 2003. 112(12): p. 1796-808.
278. **Lumeng, C.N., et al.**, *Increased inflammatory properties of adipose tissue macrophages recruited during diet-induced obesity*. Diabetes, 2007. 56(1): p. 16-23.
279. **Lumeng, C.N., J.L. Bodzin, and A.R. Saltiel**, *Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization*. J Clin Invest, 2007. 117(1): p. 175-84.
280. **Wagner, M.**, *A dangerous duo in adipose tissue: high-mobility group box 1 protein and macrophages*. Yale J Biol Med, 2014. 87(2): p. 127-33.
281. **Kim, J., et al.**, *Enhanced biglycan gene expression in the adipose tissues of obese women and its association with obesity-related genes and metabolic parameters*. Sci Rep, 2016. 6: p. 30609.
282. **Shi, H., et al.**, *TLR4 links innate immunity and fatty acid-induced insulin resistance*. J Clin Invest, 2006. 116(11): p. 3015-25.
283. **Nguyen, M.T., et al.**, *A subpopulation of macrophages infiltrates hypertrophic adipose tissue and is activated by free fatty acids via Toll-like receptors 2 and 4 and JNK-dependent pathways*. J Biol Chem, 2007. 282(48): p. 35279-92.
284. **Suganami, T., et al.**, *Role of the Toll-like receptor 4/NF-kappaB pathway in saturated fatty acid-induced inflammatory changes in the interaction between adipocytes and macrophages*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2007. 27(1): p. 84-91.
285. **Aguiar-Valles, A., et al.**, *Obesity, adipokines and neuroinflammation*. Neuropharmacology, 2015. 96(Pt A): p. 124-34.
286. **Cani, P.D., et al.**, *Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance*. Diabetes, 2007. 56(7): p. 1761-72.
287. **Pohl, J., B. Woodside, and G.N. Luheshi**, *Changes in hypothalamically mediated acute-phase inflammatory responses to lipopolysaccharide in diet-induced obese rats*. Endocrinology, 2009. 150(11): p. 4901-10.
288. **Pohl, J., B. Woodside, and G.N. Luheshi**, *Leptin modulates the late fever response to LPS in diet-induced obese animals*. Brain Behav Immun, 2014. 42: p. 41-7.
289. **Koenig, S., et al.**, *Leptin is involved in age-dependent changes in response to systemic inflammation in the rat*. Brain Behav Immun, 2014. 36: p. 128-38.
290. **Maeda, K., et al.**, *cDNA cloning and expression of a novel adipose specific collagen-like factor, apM1 (AdiPose Most abundant Gene transcript 1)*. Biochem Biophys Res Commun, 1996. 221(2): p. 286-9.
291. **Arita, Y., et al.**, *Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity*. Biochem Biophys Res Commun, 1999. 257(1): p. 79-83.
292. **Jin, H., et al.**, *Serum visfatin concentrations in obese adolescents and its correlation with age and high-density lipoprotein cholesterol*. Diabetes Res Clin Pract, 2008. 79(3): p. 412-8.
293. **Schraw, T., et al.**, *Plasma adiponectin complexes have distinct biochemical characteristics*. Endocrinology, 2008. 149(5): p. 2270-82.
294. **Berg, A.H., T.P. Combs, and P.E. Scherer**, *ACRP30/adiponectin: an adipokine regulating glucose and lipid metabolism*. Trends Endocrinol Metab, 2002. 13(2): p. 84-9.

295. **Yamauchi, T., et al.**, *The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipoatrophy and obesity*. *Nat Med*, 2001. 7(8): p. 941-6.
296. **Fantuzzi, G.**, *Adiponectin in inflammatory and immune-mediated diseases*. *Cytokine*, 2013. 64(1): p. 1-10.
297. **Hotta, K., et al.**, *Circulating concentrations of the adipocyte protein adiponectin are decreased in parallel with reduced insulin sensitivity during the progression to type 2 diabetes in rhesus monkeys*. *Diabetes*, 2001. 50(5): p. 1126-33.
298. **Iwashima, Y., et al.**, *Hypoadiponectinemia is an independent risk factor for hypertension*. *Hypertension*, 2004. 43(6): p. 1318-23.
299. **Kumada, M., et al.**, *Association of hypoadiponectinemia with coronary artery disease in men*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2003. 23(1): p. 85-9.
300. **Ouchi, N., et al.**, *Reciprocal association of C-reactive protein with adiponectin in blood stream and adipose tissue*. *Circulation*, 2003. 107(5): p. 671-4.
301. **Ohashi, K., et al.**, *Adiponectin promotes macrophage polarization toward an anti-inflammatory phenotype*. *J Biol Chem*, 2010. 285(9): p. 6153-60.
302. **Takemura, Y., et al.**, *Adiponectin modulates inflammatory reactions via calreticulin receptor-dependent clearance of early apoptotic bodies*. *J Clin Invest*, 2007. 117(2): p. 375-86.
303. **Yokota, T., et al.**, *Adiponectin, a new member of the family of soluble defense collagens, negatively regulates the growth of myelomonocytic progenitors and the functions of macrophages*. *Blood*, 2000. 96(5): p. 1723-32.
304. **Shore, S.A., et al.**, *Adiponectin attenuates allergen-induced airway inflammation and hyperresponsiveness in mice*. *J Allergy Clin Immunol*, 2006. 118(2): p. 389-95.
305. **Ebina, K., et al.**, *Adenovirus-mediated gene transfer of adiponectin reduces the severity of collagen-induced arthritis in mice*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2009. 378(2): p. 186-91.
306. **Masaki, T., et al.**, *Adiponectin protects LPS-induced liver injury through modulation of TNF-alpha in KK-Ay obese mice*. *Hepatology*, 2004. 40(1): p. 177-84.
307. **Komura, N., et al.**, *Adiponectin protein exists in aortic endothelial cells*. *PLoS One*, 2013. 8(8): p. e71271.
308. **Ouedraogo, R., et al.**, *Adiponectin deficiency increases leukocyte-endothelium interactions via upregulation of endothelial cell adhesion molecules in vivo*. *J Clin Invest*, 2007. 117(6): p. 1718-26.
309. **Zhang, Y., et al.**, *Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue*. *Nature*, 1994. 372(6505): p. 425-32.
310. **Halaas, J.L., et al.**, *Weight-reducing effects of the plasma protein encoded by the obese gene*. *Science*, 1995. 269(5223): p. 543-6.
311. **Ingalls, A.M., M.M. Dickie, and G.D. Snell**, *Obese, a new mutation in the house mouse*. *J Hered*, 1950. 41(12): p. 317-8.
312. **Campfield, L.A., et al.**, *Recombinant mouse OB protein: evidence for a peripheral signal linking adiposity and central neural networks*. *Science*, 1995. 269(5223): p. 546-9.
313. **Fischer, A.W., et al.**, *Leptin Raises Defended Body Temperature without Activating Thermogenesis*. *Cell Rep*, 2016. 14(7): p. 1621-31.
314. **Maffei, M., et al.**, *Leptin levels in human and rodent: measurement of plasma leptin and ob RNA in obese and weight-reduced subjects*. *Nat Med*, 1995. 1(11): p. 1155-61.
315. **Howard, J.K., et al.**, *Leptin protects mice from starvation-induced lymphoid atrophy and increases thymic cellularity in ob/ob mice*. *J Clin Invest*, 1999. 104(8): p. 1051-9.
316. **Mancuso, P., et al.**, *Leptin-deficient mice exhibit impaired host defense in Gram-negative pneumonia*. *J Immunol*, 2002. 168(8): p. 4018-24.
317. **Ikejima, S., et al.**, *Impairment of host resistance to *Listeria monocytogenes* infection in liver of db/db and ob/ob mice*. *Diabetes*, 2005. 54(1): p. 182-9.
318. **Lord, G.M., et al.**, *Leptin modulates the T-cell immune response and reverses starvation-induced immunosuppression*. *Nature*, 1998. 394(6696): p. 897-901.
319. **Tartaglia, L.A.**, *The leptin receptor*. *J Biol Chem*, 1997. 272(10): p. 6093-6.
320. **Gainsford, T., et al.**, *Leptin can induce proliferation, differentiation, and functional activation of hemopoietic cells*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996. 93(25): p. 14564-8.
321. **Bruno, A., et al.**, *Apoptotic pathways are inhibited by leptin receptor activation in neutrophils*. *J Immunol*, 2005. 174(12): p. 8090-6.
322. **Zhao, Y., et al.**, *Expression of leptin receptors and response to leptin stimulation of human natural killer cell lines*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003. 300(2): p. 247-52.
323. **Busso, N., et al.**, *Leptin signaling deficiency impairs humoral and cellular immune responses and attenuates experimental arthritis*. *J Immunol*, 2002. 168(2): p. 875-82.

324. **La Cava, A. and G. Matarese**, *The weight of leptin in immunity*. Nat Rev Immunol, 2004. 4(5): p. 371-9.
325. **Sarraf, P., et al.**, *Multiple cytokines and acute inflammation raise mouse leptin levels: potential role in inflammatory anorexia*. J Exp Med, 1997. 185(1): p. 171-5.
326. **Grunfeld, C., et al.**, *Endotoxin and cytokines induce expression of leptin, the ob gene product, in hamsters*. J Clin Invest, 1996. 97(9): p. 2152-7.
327. **Finck, B.N., et al.**, *In vivo and in vitro evidence for the involvement of tumor necrosis factor- α in the induction of leptin by lipopolysaccharide*. Endocrinology, 1998. 139(5): p. 2278-83.
328. **Luheshi, G.N., et al.**, *Leptin actions on food intake and body temperature are mediated by IL-1*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. 96(12): p. 7047-52.
329. **Sachot, C., S. Poole, and G.N. Luheshi**, *Circulating leptin mediates lipopolysaccharide-induced anorexia and fever in rats*. J Physiol, 2004. 561(Pt 1): p. 263-72.
330. **Fukuhara, A., et al.**, *Visfatin: a protein secreted by visceral fat that mimics the effects of insulin*. Science, 2005. 307(5708): p. 426-30.
331. **Samal, B., et al.**, *Cloning and characterization of the cDNA encoding a novel human pre-B-cell colony-enhancing factor*. Mol Cell Biol, 1994. 14(2): p. 1431-7.
332. **Rongvaux, A., et al.**, *Pre-B-cell colony-enhancing factor, whose expression is up-regulated in activated lymphocytes, is a nicotinamide phosphoribosyltransferase, a cytosolic enzyme involved in NAD biosynthesis*. Eur J Immunol, 2002. 32(11): p. 3225-34.
333. **Kitani, T., S. Okuno, and H. Fujisawa**, *Growth phase-dependent changes in the subcellular localization of pre-B-cell colony-enhancing factor*. FEBS Lett, 2003. 544(1-3): p. 74-8.
334. **Garten, A., et al.**, *Nicotinamide phosphoribosyltransferase (NAMPT/PBEF/visfatin) is constitutively released from human hepatocytes*. Biochem Biophys Res Commun, 2010. 391(1): p. 376-81.
335. **Revollo, J.R., et al.**, *Nampt/PBEF/Visfatin regulates insulin secretion in beta cells as a systemic NAD biosynthetic enzyme*. Cell Metab, 2007. 6(5): p. 363-75.
336. **Imai, S.**, *Nicotinamide phosphoribosyltransferase (Nampt): a link between NAD biology, metabolism, and diseases*. Curr Pharm Des, 2009. 15(1): p. 20-8.
337. **Haider, D.G., et al.**, *The adipokine visfatin is markedly elevated in obese children*. J Pediatr Gastroenterol Nutr, 2006. 43(4): p. 548-9.
338. **Pagano, C., et al.**, *Reduced plasma visfatin/pre-B cell colony-enhancing factor in obesity is not related to insulin resistance in humans*. J Clin Endocrinol Metab, 2006. 91(8): p. 3165-70.
339. **Moschen, A.R., et al.**, *Visfatin, an adipocytokine with proinflammatory and immunomodulating properties*. J Immunol, 2007. 178(3): p. 1748-58.
340. **Park, B.S., et al.**, *Visfatin induces sickness responses in the brain*. PLoS One, 2011. 6(1): p. e15981.
341. **Jia, S.H., et al.**, *Pre-B cell colony-enhancing factor inhibits neutrophil apoptosis in experimental inflammation and clinical sepsis*. J Clin Invest, 2004. 113(9): p. 1318-27.
342. **Kim, S.R., et al.**, *Visfatin enhances ICAM-1 and VCAM-1 expression through ROS-dependent NF- κ B activation in endothelial cells*. Biochim Biophys Acta, 2008. 1783(5): p. 886-95.
343. **Dyerberg, J. and H.O. Bang**, *Dietary fat and thrombosis*. Lancet, 1978. 1(8056): p. 152.
344. **Kromann, N. and A. Green**, *Epidemiological studies in the Upernavik district, Greenland. Incidence of some chronic diseases 1950-1974*. Acta Med Scand, 1980. 208(5): p. 401-6.
345. **Laposata, M.**, *Fatty acids. Biochemistry to clinical significance*. Am J Clin Pathol, 1995. 104(2): p. 172-9.
346. **Marion-Letellier, R., G. Savoye, and S. Ghosh**, *Polyunsaturated fatty acids and inflammation*. IUBMB Life, 2015. 67(9): p. 659-67.
347. **Dyall, S.C. and A.T. Michael-Titus**, *Neurological benefits of omega-3 fatty acids*. Neuromolecular Med, 2008. 10(4): p. 219-35.
348. **Simopoulos, A.P.**, *Evolutionary aspects of the dietary omega-6:omega-3 fatty acid ratio: medical implications*. World Rev Nutr Diet, 2009. 100: p. 1-21.
349. **Kaur, N., V. Chugh, and A.K. Gupta**, *Essential fatty acids as functional components of foods-a review*. J Food Sci Technol, 2014. 51(10): p. 2289-303.
350. **Hussein, N., et al.**, *Long-chain conversion of [13 C]linoleic acid and alpha-linolenic acid in response to marked changes in their dietary intake in men*. J Lipid Res, 2005. 46(2): p. 269-80.
351. **Goyens, P.L., et al.**, *Compartmental modeling to quantify alpha-linolenic acid conversion after longer term intake of multiple tracer boluses*. J Lipid Res, 2005. 46(7): p. 1474-83.
352. **Bazan, N.G., M.F. Molina, and W.C. Gordon**, *Docosahexaenoic acid signalolipidomics in nutrition: significance in aging, neuroinflammation, macular degeneration, Alzheimer's, and other neurodegenerative diseases*. Annu Rev Nutr, 2011. 31: p. 321-51.

353. **Laye, S.**, *What do you eat? Dietary omega 3 can help to slow the aging process.* Brain Behav Immun, 2013. 28: p. 14-5.
354. **Needleman, P., M. Minkes, and A. Raz**, *Thromboxanes: selective biosynthesis and distinct biological properties.* Science, 1976. 193(4248): p. 163-5.
355. **Whitaker, M.O., et al.**, *Triene prostaglandins: prostaglandin D3 and icosapentaenoic acid as potential antithrombotic substances.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1979. 76(11): p. 5919-23.
356. **Sinclair, H.M.**, *The relative importance of essential fatty acids of the linoleic and linolenic families: studies with an Eskimo diet.* Prog Lipid Res, 1981. 20: p. 897-9.
357. **Goldman, D.W., W.C. Pickett, and E.J. Goetzl**, *Human neutrophil chemotactic and degranulating activities of leukotriene B5 (LTB5) derived from eicosapentaenoic acid.* Biochem Biophys Res Commun, 1983. 117(1): p. 282-8.
358. **Lee, T.H., et al.**, *Characterization and biologic properties of 5,12-dihydroxy derivatives of eicosapentaenoic acid, including leukotriene B5 and the double lipoxygenase product.* J Biol Chem, 1984. 259(4): p. 2383-9.
359. **Bagga, D., et al.**, *Differential effects of prostaglandin derived from omega-6 and omega-3 polyunsaturated fatty acids on COX-2 expression and IL-6 secretion.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. 100(4): p. 1751-6.
360. **Hawkes, J.S., M.J. James, and L.G. Cleland**, *Biological activity of prostaglandin E3 with regard to oedema formation in mice.* Agents Actions, 1992. 35(1-2): p. 85-7.
361. **Serhan, C.N. and N. Chiang**, *Resolution phase lipid mediators of inflammation: agonists of resolution.* Curr Opin Pharmacol, 2013. 13(4): p. 632-40.
362. **Mozurkewich, E.L., et al.**, *Pathway Markers for Pro-resolving Lipid Mediators in Maternal and Umbilical Cord Blood: A Secondary Analysis of the Mothers, Omega-3, and Mental Health Study.* Front Pharmacol, 2016. 7: p. 274.
363. **Deng, B., et al.**, *Maresin biosynthesis and identification of maresin 2, a new anti-inflammatory and pro-resolving mediator from human macrophages.* PLoS One, 2014. 9(7): p. e102362.
364. **Isobe, Y., et al.**, *Identification and structure determination of novel anti-inflammatory mediator resolvin E3, 17,18-dihydroxyeicosapentaenoic acid.* J Biol Chem, 2012. 287(13): p. 10525-34.
365. **Levy, B.D., et al.**, *Lipid mediator class switching during acute inflammation: signals in resolution.* Nat Immunol, 2001. 2(7): p. 612-9.
366. **Mulugeta, S., et al.**, *Identification and absolute configuration of dihydroxy-arachidonic acids formed by oxygenation of 5S-HETE by native and aspirin-acetylated COX-2.* J Lipid Res, 2010. 51(3): p. 575-85.
367. **Serhan, C.N., et al.**, *Resolvins: a family of bioactive products of omega-3 fatty acid transformation circuits initiated by aspirin treatment that counter proinflammation signals.* J Exp Med, 2002. 196(8): p. 1025-37.
368. **Serhan, C.N., et al.**, *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, 2000. 192(8): p. 1197-204.
369. **Serhan, C.N., et al.**, *Novel proresolving aspirin-triggered DHA pathway.* Chem Biol, 2011. 18(8): p. 976-87.
370. **Horn, T., et al.**, *Evolutionary aspects of lipoxygenases and genetic diversity of human leukotriene signaling.* Prog Lipid Res, 2015. 57: p. 13-39.
371. **Funk, C.D., et al.**, *Lipoxygenase genes and their targeted disruption.* Prostaglandins Other Lipid Mediat, 2002. 68-69: p. 303-12.
372. **Calder, P.C.**, *Marine omega-3 fatty acids and inflammatory processes: Effects, mechanisms and clinical relevance.* Biochim Biophys Acta, 2015. 1851(4): p. 469-84.
373. **Dyall, S.C.**, *Long-chain omega-3 fatty acids and the brain: a review of the independent and shared effects of EPA, DPA and DHA.* Front Aging Neurosci, 2015. 7: p. 52.
374. **Bourre, J.M., et al.**, *Function of Dietary Polyunsaturated Fatty-Acids in the Nervous-System.* Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids, 1993. 48(1): p. 5-15.
375. **Heras-Sandoval, D., J. Pedraza-Chaverri, and J.M. Perez-Rojas**, *Role of docosahexaenoic acid in the modulation of glial cells in Alzheimer's disease.* J Neuroinflammation, 2016. 13(1): p. 61.
376. **Ouellet, M., et al.**, *Diffusion of docosahexaenoic and eicosapentaenoic acids through the blood-brain barrier: An in situ cerebral perfusion study.* Neurochem Int, 2009. 55(7): p. 476-82.
377. **Nguyen, L.N., et al.**, *Mfsd2a is a transporter for the essential omega-3 fatty acid docosahexaenoic acid.* Nature, 2014. 509(7501): p. 503-6.

378. **Kim, H.Y., M. Akbar, and Y.S. Kim**, *Phosphatidylserine-dependent neuroprotective signaling promoted by docosahexaenoic acid*. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids, 2010. 82(4-6): p. 165-72.
379. **Kawakita, E., M. Hashimoto, and O. Shido**, *Docosahexaenoic acid promotes neurogenesis in vitro and in vivo*. Neuroscience, 2006. 139(3): p. 991-7.
380. **Cao, D., et al.**, *Docosahexaenoic acid promotes hippocampal neuronal development and synaptic function*. J Neurochem, 2009. 111(2): p. 510-21.
381. **Yuki, D., et al.**, *DHA-PC and PSD-95 decrease after loss of synaptophysin and before neuronal loss in patients with Alzheimer's disease*. Sci Rep, 2014. 4: p. 7130.
382. **Orr, S.K., M.O. Trepanier, and R.P. Bazinet**, *n-3 Polyunsaturated fatty acids in animal models with neuroinflammation*. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids, 2013. 88(1): p. 97-103.
383. **Pettit, L.K., et al.**, *Modulating the inflammatory properties of activated microglia with Docosahexaenoic acid and Aspirin*. Lipids Health Dis, 2013. 12: p. 16.
384. **Manzhulo, I.V., et al.**, *Analgetic effect of docosahexaenoic acid is mediated by modulating the microglia activity in the dorsal root ganglia in a rat model of neuropathic pain*. Acta Histochem, 2015. 117(7): p. 659-66.
385. **De Smedt-Peyrusse, V., et al.**, *Docosahexaenoic acid prevents lipopolysaccharide-induced cytokine production in microglial cells by inhibiting lipopolysaccharide receptor presentation but not its membrane subdomain localization*. J Neurochem, 2008. 105(2): p. 296-307.
386. **Pan, H.C., et al.**, *Protective effect of docosahexaenoic acid against brain injury in ischemic rats*. J Nutr Biochem, 2009. 20(9): p. 715-25.
387. **Pluess, T.T., et al.**, *Intravenous fish oil blunts the physiological response to endotoxin in healthy subjects*. Intensive Care Med, 2007. 33(5): p. 789-97.
388. **Michaeli, B., et al.**, *Effects of fish oil on the neuro-endocrine responses to an endotoxin challenge in healthy volunteers*. Clin Nutr, 2007. 26(1): p. 70-7.
389. **Ferguson, J.F., et al.**, *Omega-3 PUFA supplementation and the response to evoked endotoxemia in healthy volunteers*. Mol Nutr Food Res, 2014. 58(3): p. 601-13.
390. **Orr, S.K., et al.**, *Unesterified docosahexaenoic acid is protective in neuroinflammation*. J Neurochem, 2013. 127(3): p. 378-93.
391. **Bhattacharya, A., et al.**, *Inhibition of inflammatory response in transgenic fat-1 mice on a calorie-restricted diet*. Biochem Biophys Res Commun, 2006. 349(3): p. 925-30.
392. **Rey, C., et al.**, *Resolvin D1 and E1 promote resolution of inflammation in microglial cells in vitro*. Brain Behav Immun, 2016. 55: p. 249-59.
393. **Xian, W., et al.**, *The pro-resolving lipid mediator Maresin 1 protects against cerebral ischemia/reperfusion injury by attenuating the pro-inflammatory response*. Biochem Biophys Res Commun, 2016. 472(1): p. 175-81.
394. **Psychogios, N., et al.**, *The human serum metabolome*. PLoS One, 2011. 6(2): p. e16957.
395. **Oh, S.F., et al.**, *Resolvin E2 formation and impact in inflammation resolution*. J Immunol, 2012. 188(9): p. 4527-34.
396. **Mas, E., et al.**, *Resolvins D1, D2, and other mediators of self-limited resolution of inflammation in human blood following n-3 fatty acid supplementation*. Clin Chem, 2012. 58(10): p. 1476-84.
397. **Dalli, J., et al.**, *Resolvin D3 and aspirin-triggered resolvin D3 are potent immunoresolvents*. Chem Biol, 2013. 20(2): p. 188-201.
398. **Krishnamoorthy, S., et al.**, *Resolvin D1 binds human phagocytes with evidence for proresolving receptors*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. 107(4): p. 1660-5.
399. **Chiang, N., et al.**, *Infection regulates pro-resolving mediators that lower antibiotic requirements*. Nature, 2012. 484(7395): p. 524-8.
400. **Pei, L., et al.**, *Annexin 1 exerts anti-nociceptive effects after peripheral inflammatory pain through formyl-peptide-receptor-like 1 in rat dorsal root ganglion*. Br J Anaesth, 2011. 107(6): p. 948-58.
401. **Marcheselli, V.L., et al.**, *Neuroprotectin D1/protectin D1 stereoselective and specific binding with human retinal pigment epithelial cells and neutrophils*. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids, 2010. 82(1): p. 27-34.
402. **Dalli, J., et al.**, *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, 2013. 27(7): p. 2573-83.
403. **Titos, E., et al.**, *Resolvin D1 and its precursor docosahexaenoic acid promote resolution of adipose tissue inflammation by eliciting macrophage polarization toward an M2-like phenotype*. J Immunol, 2011. 187(10): p. 5408-18.

404. **Navarro-Xavier, R.A., et al.**, *A new strategy for the identification of novel molecules with targeted proresolution of inflammation properties*. *J Immunol*, 2010. 184(3): p. 1516-25.
405. **Harrison, J.L., et al.**, *Resolvins AT-D1 and E1 differentially impact functional outcome, post-traumatic sleep, and microglial activation following diffuse brain injury in the mouse*. *Brain Behav Immun*, 2015. 47: p. 131-40.
406. **Xu, Z.Z., et al.**, *Resolvins RvE1 and RvD1 attenuate inflammatory pain via central and peripheral actions*. *Nature medicine*, 2010. 16(5): p. 592-7, 1p following 597.
407. **Huang, L., et al.**, *Enduring prevention and transient reduction of postoperative pain by intrathecal resolvin D1*. *Pain*, 2011. 152(3): p. 557-65.
408. **Shen, Y., et al.**, *Fish Oil and Olive Oil Supplementation in Late Pregnancy and Lactation Differentially Affect Oxidative Stress and Inflammation in Sows and Piglets*. *Lipids*, 2015. 50(7): p. 647-58.
409. **Gribble, M.O., et al.**, *Mercury, selenium and fish oils in marine food webs and implications for human health*. *J Mar Biol Assoc U.K.*, 2016. 96(1): p. 43-59.
410. **Kang, J.X.**, *Fat-1 transgenic mice: a new model for omega-3 research*. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 2007. 77(5-6): p. 263-7.
411. **Kang, J.X., et al.**, *Transgenic mice: fat-1 mice convert n-6 to n-3 fatty acids*. *Nature*, 2004. 427(6974): p. 504.
412. **Spychalla, J.P., A.J. Kinney, and J. Browse**, *Identification of an animal omega-3 fatty acid desaturase by heterologous expression in Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997. 94(4): p. 1142-7.
413. **Orr, S.K., et al.**, *The fat-1 mouse has brain docosahexaenoic acid levels achievable through fish oil feeding*. *Neurochem Res*, 2010. 35(5): p. 811-9.
414. **Boudrault, C., et al.**, *Cyclooxygenase-2 and n-6 PUFA are lower and DHA is higher in the cortex of fat-1 mice*. *Neurochem Int*, 2010. 56(4): p. 585-9.
415. **Mayer, K., et al.**, *Acute lung injury is reduced in fat-1 mice endogenously synthesizing n-3 fatty acids*. *Am J Respir Crit Care Med*, 2009. 179(6): p. 474-83.
416. **Delpech, J.C., et al.**, *Transgenic increase in n-3/n-6 fatty acid ratio protects against cognitive deficits induced by an immune challenge through decrease of neuroinflammation*. *Neuropsychopharmacology*, 2015. 40(3): p. 525-36.
417. **Capuron, L., et al.**, *Relationship between adiposity, emotional status and eating behaviour in obese women: role of inflammation*. *Psychol Med*, 2011. 41(7): p. 1517-28.
418. **Mahler Convenor, M., et al.**, *FELASA recommendations for the health monitoring of mouse, rat, hamster, guinea pig and rabbit colonies in breeding and experimental units*. *Lab Anim*, 2014. 48(3): p. 178-192.
419. **Gordon, C.J.**, *Relationship between Autonomic and Behavioral Thermoregulation in the Mouse*. *Physiology & Behavior*, 1985. 34(5): p. 687-690.
420. **Gordon, C.J.**, *Thermal physiology of laboratory mice: Defining thermoneutrality*. *Journal of Thermal Biology*, 2012. 37(8): p. 654-685.
421. **Herrington, L.P.**, *The heat regulation of small laboratory animals at various environmental temperatures*. *Am. J. Physiol.*, 1940.
422. **Kluger, M.J., et al.**, *Further evidence that stress hyperthermia is a fever*. *Physiol Behav*, 1987. 39(6): p. 763-6.
423. **Hofer, H.**, *Zur Morphologie der circumventriculären Organe des Zwischenhirns der Säugetiere*. *Zool Anz (Suppl)*, 1958. 22: p. 203-251.
424. **Mazia, D., G. Schatten, and W. Sale**, *Adhesion of cells to surfaces coated with polylysine. Applications to electron microscopy*. *J Cell Biol*, 1975. 66(1): p. 198-200.
425. **Le Faouder, P., et al.**, *LC-MS/MS method for rapid and concomitant quantification of pro-inflammatory and pro-resolving polyunsaturated fatty acid metabolites*. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2013. 932: p. 123-33.
426. **Berridge, M.J., P. Lipp, and M.D. Bootman**, *The versatility and universality of calcium signalling*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2000. 1(1): p. 11-21.
427. **Ott, D., et al.**, *The viral mimetic polyinosinic:polycytidylic acid (poly I:C) induces cellular responses in primary cultures from rat brain sites with an incomplete blood-brain barrier*. *Neurosci Lett*, 2012. 530(1): p. 64-8.
428. **Paredes, R.M., et al.**, *Chemical calcium indicators*. *Methods*, 2008. 46(3): p. 143-51.
429. **Grynkiewicz, G., M. Poenie, and R.Y. Tsien**, *A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties*. *J Biol Chem*, 1985. 260(6): p. 3440-50.

430. **Tsien, R.Y., T.J. Rink, and M. Poenie**, *Measurement of cytosolic free Ca²⁺ in individual small cells using fluorescence microscopy with dual excitation wavelengths*. *Cell Calcium*, 1985. 6(1-2): p. 145-57.
431. **Blatteis, C.M.**, *Endotoxic fever: new concepts of its regulation suggest new approaches to its management*. *Pharmacol Ther*, 2006. 111(1): p. 194-223.
432. **Frank, M.G., et al.**, *The redox state of the alarmin HMGB1 is a pivotal factor in neuroinflammatory and microglial priming: A role for the NLRP3 inflammasome*. *Brain Behav Immun*, 2016. 55: p. 215-24.
433. **Fain, J.N., et al.**, *Comparison of the release of adipokines by adipose tissue, adipose tissue matrix, and adipocytes from visceral and subcutaneous abdominal adipose tissues of obese humans*. *Endocrinology*, 2004. 145(5): p. 2273-82.
434. **Rummel, C., et al.**, *Obesity Impacts Fever and Sickness Behavior During Acute Systemic Inflammation*. *Physiology (Bethesda)*, 2016. 31(2): p. 117-30.
435. **Aslani, F., et al.**, *Targeting high mobility group box protein 1 ameliorates testicular inflammation in experimental autoimmune orchitis*. *Hum Reprod*, 2015. 30(2): p. 417-31.
436. **Paxinos, G. and C. Watson**, *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates, 4th edn*. 4th ed 1998, San Diego: Academic Press.
437. **Lansdorp, P.M., et al.**, *A growth-factor dependent B-cell hybridoma*. *Curr Top Microbiol Immunol*, 1986. 132: p. 105-13.
438. **Espevik, T. and J. Nissen-Meyer**, *A highly sensitive cell line, WEHI 164 clone 13, for measuring cytotoxic factor/tumor necrosis factor from human monocytes*. *J Immunol Methods*, 1986. 95(1): p. 99-105.
439. **Mosmann, T.**, *Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays*. *J Immunol Methods*, 1983. 65(1-2): p. 55-63.
440. **Welsch, J., et al.**, *Fever induction by systemic stimulation with macrophage-activating lipopeptide-2 depends upon TLR2 but not CD36*. *Innate Immun*, 2012. 18(3): p. 541-59.
441. **Harden, L.M., et al.**, *Critical role for peripherally-derived interleukin-10 in mediating the thermoregulatory manifestations of fever and hypothermia in severe forms of lipopolysaccharide-induced inflammation*. *Pflügers Archiv : European journal of physiology*, 2013. in press.
442. **Efstratiadis, A., et al.**, *Enzymatic in vitro synthesis of globin genes*. *Cell*, 1976. 7(2): p. 279-88.
443. **Cardullo, R.A., et al.**, *Detection of nucleic acid hybridization by nonradiative fluorescence resonance energy transfer*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1988. 85(23): p. 8790-4.
444. **Holland, P.M., et al.**, *Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'--3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1991. 88(16): p. 7276-80.
445. **Heid, C.A., et al.**, *Real time quantitative PCR*. *Genome Res*, 1996. 6(10): p. 986-94.
446. **Lee, L.G., C.R. Connell, and W. Bloch**, *Allelic discrimination by nick-translation PCR with fluorogenic probes*. *Nucleic Acids Res*, 1993. 21(16): p. 3761-6.
447. **Chomczynski, P. and N. Sacchi**, *Single-Step Method of Rna Isolation by Acid Guanidinium Thiocyanate Phenol Chloroform Extraction*. *Analytical Biochemistry*, 1987. 162(1): p. 156-159.
448. **Rummel, C., et al.**, *Parthenolide attenuates LPS-induced fever, circulating cytokines and markers of brain inflammation in rats*. *Cytokine*, 2011. 56(3): p. 739-48.
449. **Meyer, V.R.**, *Praxis der Hochleistungs-Flüssigchromatographie*. Vol. 6. 2004: WILEY-VCH Verlag GmbH & Co KGaA.
450. **Gaskell, S.J.**, *Electrospray: Principles and practice*. *Journal of Mass Spectrometry*, 1997. 32(7): p. 677-688.
451. **Herbert Budzikiewicz, M.S.**, *Massenspektrometrie: Eine Einführung*. Vol. 6. 2013: John Wiley & Sons.
452. **Kebarle, P.**, *A brief overview of the present status of the mechanisms involved in electrospray mass spectrometry*. *Journal of Mass Spectrometry*, 2000. 35(7): p. 804-817.
453. **Gross, J.H.**, *Massenspektrometrie: Ein Lehrbuch* 2013: Springer-Verlag.
454. **Wolfensohn, L.**, *Handbook of Laboratory Animal - Management and Welfare*. Vol. 3. 2003.
455. **Agnello, D., et al.**, *HMGB-1, a DNA-binding protein with cytokine activity, induces brain TNF and IL-6 production, and mediates anorexia and taste aversion*. *Cytokine*, 2002. 18(4): p. 231-6.
456. **O'Connor, K.A., et al.**, *Further characterization of high mobility group box 1 (HMGB1) as a proinflammatory cytokine: central nervous system effects*. *Cytokine*, 2003. 24(6): p. 254-65.
457. **Qiu, J., et al.**, *Early release of HMGB-1 from neurons after the onset of brain ischemia*. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2008. 28(5): p. 927-38.

458. **Sun, Q., et al.**, *Early release of high-mobility group box 1 (HMGB1) from neurons in experimental subarachnoid hemorrhage in vivo and in vitro*. *J Neuroinflammation*, 2014. 11: p. 106.
459. **Parnet, P., F. Pousset, and S. Laye**, *NF kappa B activation in mouse pituitary: comparison of response to interleukin-1 beta and lipopolysaccharide*. *J Neuroendocrinol*, 2003. 15(3): p. 304-14.
460. **Arrigo, T., et al.**, *High-mobility group protein B1: a new biomarker of metabolic syndrome in obese children*. *Eur J Endocrinol*, 2013. 168(4): p. 631-8.
461. **Fu, G.X., et al.**, *Decreased serum level of HMGB1 and MyD88 during human aging progress in healthy individuals*. *Aging Clin Exp Res*, 2016. 28(2): p. 175-80.
462. **Wang, H., H. Yang, and K.J. Tracey**, *Extracellular role of HMGB1 in inflammation and sepsis*. *J Intern Med*, 2004. 255(3): p. 320-31.
463. **Yang, H., et al.**, *Reversing established sepsis with antagonists of endogenous high-mobility group box 1*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004. 101(1): p. 296-301.
464. **Netea, M.G., B.J. Kullberg, and J.W. Van der Meer**, *Circulating cytokines as mediators of fever*. *Clin Infect Dis*, 2000. 31 Suppl 5: p. S178-84.
465. **Sunden-Cullberg, J., et al.**, *Persistent elevation of high mobility group box-1 protein (HMGB1) in patients with severe sepsis and septic shock*. *Crit Care Med*, 2005. 33(3): p. 564-73.
466. **Cheng, Y., et al.**, *Escin Increases the Survival Rate of LPS-Induced Septic Mice Through Inhibition of HMGB1 Release from Macrophages*. *Cell Physiol Biochem*, 2015. 36(4): p. 1577-86.
467. **Fink, M.P. and S.O. Heard**, *Laboratory models of sepsis and septic shock*. *J Surg Res*, 1990. 49(2): p. 186-96.
468. **Müller, S., L. Ronfani, and M.E. Bianchi**, *Regulated expression and subcellular localization of HMGB1, a chromatin protein with a cytokine function*. *J Intern Med*, 2004. 255(3): p. 332-43.
469. **Gao, T.L., et al.**, *Expression of HMGB1 and RAGE in rat and human brains after traumatic brain injury*. *J Trauma Acute Care Surg*, 2012. 72(3): p. 643-9.
470. **Sass, G., et al.**, *Cytokine expression in three mouse models of experimental hepatitis*. *Cytokine*, 2002. 19(3): p. 115-20.
471. **Huttunen, H.J. and H. Rauvala**, *Amphoterin as an extracellular regulator of cell motility: from discovery to disease*. *J Intern Med*, 2004. 255(3): p. 351-66.
472. **Ren, W.Y., et al.**, *[The effect of lipopolysaccharide on gene expression of TLR4 and MD-2 in rat alveolar macrophage and its secretion of inflammation cytokines]*. *Zhonghua Jie He He Hu Xi Za Zhi*, 2010. 33(5): p. 367-71.
473. **Olson, J.K. and S.D. Miller**, *Microglia initiate central nervous system innate and adaptive immune responses through multiple TLRs*. *J Immunol*, 2004. 173(6): p. 3916-24.
474. **Wang, S.B., et al.**, *[Role of Janus kinase/signal transducer and activator of transcription pathway in mediating mRNA expression of high mobility group box1 protein in the liver in septic rats]*. *Zhongguo Wei Zhong Bing Ji Jiu Yi Xue*, 2003. 15(3): p. 147-9.
475. **Parker, T.M., et al.**, *The danger zone: Systematic review of the role of HMGB1 danger signalling in traumatic brain injury*. *Brain Inj*, 2017. 31(1): p. 2-8.
476. **Lazarus, M., et al.**, *EP3 prostaglandin receptors in the median preoptic nucleus are critical for fever responses*. *Nat Neurosci*, 2007. 10(9): p. 1131-3.
477. **Saper, C.B., A.A. Romanovsky, and T.E. Scammell**, *Neural circuitry engaged by prostaglandins during the sickness syndrome*. *Nat Neurosci*, 2012. 15(8): p. 1088-95.
478. **Merenmies, J., et al.**, *30-kDa heparin-binding protein of brain (amphoterin) involved in neurite outgrowth. Amino acid sequence and localization in the filopodia of the advancing plasma membrane*. *J Biol Chem*, 1991. 266(25): p. 16722-9.
479. **Guazzi, S., et al.**, *HMGB1, an architectural chromatin protein and extracellular signalling factor, has a spatially and temporally restricted expression pattern in mouse brain*. *Gene Expr Patterns*, 2003. 3(1): p. 29-33.
480. **Rauvala, H. and R. Pihlaskari**, *Isolation and some characteristics of an adhesive factor of brain that enhances neurite outgrowth in central neurons*. *J Biol Chem*, 1987. 262(34): p. 16625-35.
481. **Kobori, N., G.L. Clifton, and P. Dash**, *Altered expression of novel genes in the cerebral cortex following experimental brain injury*. *Brain Res Mol Brain Res*, 2002. 104(2): p. 148-58.
482. **Bonaldi, T., et al.**, *Monocytic cells hyperacetylate chromatin protein HMGB1 to redirect it towards secretion*. *EMBO J*, 2003. 22(20): p. 5551-60.
483. **Mosevitsky, M.I., et al.**, *Tissue specificity of nucleo-cytoplasmic distribution of HMG1 and HMG2 proteins and their probable functions*. *Eur J Biochem*, 1989. 185(2): p. 303-10.

484. Li, Y., et al., *Role of HMGB1 translocation to neuronal nucleus in rat model with septic brain injury*. *Neurosci Lett*, 2016.
485. Kim, J.B., et al., *Induction and subcellular localization of high-mobility group box-1 (HMGB1) in the postischemic rat brain*. *J Neurosci Res*, 2008. 86(5): p. 1125-31.
486. Zhang, J., et al., *HMGB1 Translocation After Ischemia in the Ovine Fetal Brain*. *J Neuropathol Exp Neurol*, 2016. 75(6): p. 527-38.
487. Lian, Y.J., et al., *Ds-HMGB1 and fr-HMGB induce depressive behavior through neuroinflammation in contrast to nonoxid-HMGB1*. *Brain Behav Immun*, 2017. 59: p. 322-332.
488. Wu, K.L., S.H. Chan, and J.Y. Chan, *Neuroinflammation and oxidative stress in rostral ventrolateral medulla contribute to neurogenic hypertension induced by systemic inflammation*. *J Neuroinflammation*, 2012. 9: p. 212.
489. Sakaguchi, S. and S. Furusawa, *Oxidative stress and septic shock: metabolic aspects of oxygen-derived free radicals generated in the liver during endotoxemia*. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 2006. 47(2): p. 167-77.
490. Park, J.S., et al., *Activation of gene expression in human neutrophils by high mobility group box 1 protein*. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2003. 284(4): p. C870-9.
491. Ohnishi, M., et al., *High-mobility group box 1 up-regulates aquaporin 4 expression via microglia-astrocyte interaction*. *Neurochem Int*, 2014. 75: p. 32-8.
492. Tengku-Muhammad, T.S., et al., *Differential regulation of macrophage CCAAT-enhancer binding protein isoforms by lipopolysaccharide and cytokines*. *Cytokine*, 2000. 12(9): p. 1430-6.
493. Verma, S., et al., *Release of cytokines by brain endothelial cells: A polarized response to lipopolysaccharide*. *Brain Behav Immun*, 2006. 20(5): p. 449-55.
494. Luan, Z.G., et al., *HMGB1 activates nuclear factor-kappaB signaling by RAGE and increases the production of TNF-alpha in human umbilical vein endothelial cells*. *Immunobiology*, 2010. 215(12): p. 956-62.
495. Feldman, P., et al., *The persistent release of HMGB1 contributes to tactile hyperalgesia in a rodent model of neuropathic pain*. *J Neuroinflammation*, 2012. 9: p. 180.
496. Balosso, S., et al., *Disulfide-containing high mobility group box-1 promotes N-methyl-D-aspartate receptor function and excitotoxicity by activating Toll-like receptor 4-dependent signaling in hippocampal neurons*. *Antioxid Redox Signal*, 2014. 21(12): p. 1726-40.
497. Youn, J.H., et al., *Identification of lipopolysaccharide-binding peptide regions within HMGB1 and their effects on subclinical endotoxemia in a mouse model*. *Eur J Immunol*, 2011. 41(9): p. 2753-62.
498. Youn, J.H., et al., *High mobility group box 1 protein binding to lipopolysaccharide facilitates transfer of lipopolysaccharide to CD14 and enhances lipopolysaccharide-mediated TNF-alpha production in human monocytes*. *J Immunol*, 2008. 180(7): p. 5067-74.
499. Qin, Y.H., et al., *HMGB1 enhances the proinflammatory activity of lipopolysaccharide by promoting the phosphorylation of MAPK p38 through receptor for advanced glycation end products*. *J Immunol*, 2009. 183(10): p. 6244-50.
500. Li, S., et al., *Endogenous HMGB1 is required in endotoxin tolerance*. *J Surg Res*, 2013. 185(1): p. 319-28.
501. Aneja, R.K., et al., *Preconditioning with high mobility group box 1 (HMGB1) induces lipopolysaccharide (LPS) tolerance*. *J Leukoc Biol*, 2008. 84(5): p. 1326-34.
502. Huang, Y.-y., et al., *Elevated serum HMGB1 in pulmonary arterial hypertension secondary to congenital heart disease*. *Vascular Pharmacology*, 2016. 85: p. 66-72.
503. Wang, C., et al., *Serum HMGB1 Serves as a Novel Laboratory Indicator Reflecting Disease Activity and Treatment Response in Ankylosing Spondylitis Patients*. *J Immunol Res*, 2016. 2016: p. 6537248.
504. Laursen, T.L., et al., *The damage-associated molecular pattern HMGB1 is elevated in human alcoholic hepatitis, but does not seem to be a primary driver of inflammation*. *APMIS*, 2016. 124(9): p. 741-7.
505. Davies, P., et al., *The role of arachidonic acid oxygenation products in pain and inflammation*. *Annu Rev Immunol*, 1984. 2: p. 335-57.
506. Golovko, M.Y. and E.J. Murphy, *An improved LC-MS/MS procedure for brain prostanoid analysis using brain fixation with head-focused microwave irradiation and liquid-liquid extraction*. *J Lipid Res*, 2008. 49(4): p. 893-902.
507. Yue, H., et al., *A liquid chromatography/mass spectrometric method for simultaneous analysis of arachidonic acid and its endogenous eicosanoid metabolites prostaglandins, dihydroxyeicosatrienoic acids, hydroxyeicosatetraenoic acids, and epoxyeicosatrienoic acids in rat brain tissue*. *J Pharm Biomed Anal*, 2007. 43(3): p. 1122-34.

508. **Vijayan, V., et al.**, *A New Immunomodulatory Role for Peroxisomes in Macrophages Activated by the TLR4 Ligand Lipopolysaccharide*. J Immunol, 2017.
509. **Lee, J.W., et al.**, *UPLC-MS/MS-Based Profiling of Eicosanoids in RAW264.7 Cells Treated with Lipopolysaccharide*. Int J Mol Sci, 2016. 17(4): p. 508.
510. **Dalli, J. and C.N. Serhan**, *Specific lipid mediator signatures of human phagocytes: microparticles stimulate macrophage efferocytosis and pro-resolving mediators*. Blood, 2012. 120(15): p. e60-72.
511. **Murphy, S., et al.**, *Astrocytes as eicosanoid-producing cells*. Glia, 1988. 1(4): p. 241-5.
512. **Keller, M., et al.**, *Comparison of prostanoid forming capacity of neuronal and astroglial cells in primary cultures*. Neurochem Int, 1985. 7(4): p. 655-65.
513. **Shalini, S.M., et al.**, *Distribution of Alox15 in the Rat Brain and Its Role in Prefrontal Cortical Resolvin D1 Formation and Spatial Working Memory*. Mol Neurobiol, 2017.
514. **Rosenberger, T.A., et al.**, *Rat brain arachidonic acid metabolism is increased by a 6-day intracerebral ventricular infusion of bacterial lipopolysaccharide*. J Neurochem, 2004. 88(5): p. 1168-78.
515. **Rosenberger, T.A., et al.**, *Rat brain docosahexaenoic acid metabolism is not altered by a 6-day intracerebral ventricular infusion of bacterial lipopolysaccharide*. Neurochem Int, 2010. 56(3): p. 501-7.
516. **Gille-Johnson, P., et al.**, *Circulating monocytes are not the major source of plasma cytokines in patients with sepsis*. Shock, 2012. 38(6): p. 577-83.
517. **Starr, M.E., B.M. Evers, and H. Saito**, *Age-associated increase in cytokine production during systemic inflammation: adipose tissue as a major source of IL-6*. J Gerontol A Biol Sci Med Sci, 2009. 64(7): p. 723-30.
518. **Starr, M.E., et al.**, *Gene expression profile of mouse white adipose tissue during inflammatory stress: age-dependent upregulation of major procoagulant factors*. Aging Cell, 2013. 12(2): p. 194-206.
519. **Leuwer, M., et al.**, *Endotoxaemia leads to major increases in inflammatory adipokine gene expression in white adipose tissue of mice*. Pflugers Arch, 2009. 457(4): p. 731-41.
520. **Guo, J., et al.**, *Lipopolysaccharide challenge significantly influences lipid metabolism and proteome of white adipose tissue in growing pigs*. Lipids Health Dis, 2015. 14: p. 68.
521. **Thalmann, S., C.E. Juge-Aubry, and C.A. Meier**, *Explant cultures of white adipose tissue*. Methods Mol Biol, 2008. 456: p. 195-9.
522. **Mukesh, M., et al.**, *Adipose tissue depots of Holstein cows are immune responsive: inflammatory gene expression in vitro*. Domest Anim Endocrinol, 2010. 38(3): p. 168-78.
523. **Starr, M.E., et al.**, *Age-Associated Increase in Cytokine Production During Systemic Inflammation-II: The Role of IL-1beta in Age-Dependent IL-6 Upregulation in Adipose Tissue*. J Gerontol A Biol Sci Med Sci, 2015. 70(12): p. 1508-15.
524. **Mazur-Bialy, A.I. and E. Pochec**, *Riboflavin Reduces Pro-Inflammatory Activation of Adipocyte-Macrophage Co-culture. Potential Application of Vitamin B2 Enrichment for Attenuation of Insulin Resistance and Metabolic Syndrome Development*. Molecules, 2016. 21(12).
525. **Valero, N., et al.**, *Differential induction of cytokines by human neonatal, adult, and elderly monocyte/macrophages infected with dengue virus*. Viral Immunol, 2014. 27(4): p. 151-9.
526. **Mastronardi, C.A., et al.**, *Lipopolysaccharide-induced leptin release is not mediated by nitric oxide, but is blocked by dexamethasone*. Neuroimmunomodulation, 2000. 8(2): p. 91-7.
527. **Francis, J., et al.**, *Systemic administration of lipopolysaccharide increases plasma leptin levels: blockade by soluble interleukin-1 receptor*. Endocrine, 1999. 10(3): p. 291-5.
528. **Landman, R.E., et al.**, *Endotoxin stimulates leptin in the human and nonhuman primate*. J Clin Endocrinol Metab, 2003. 88(3): p. 1285-91.
529. **Anderson, P.D., et al.**, *Innate immunity modulates adipokines in humans*. J Clin Endocrinol Metab, 2007. 92(6): p. 2272-9.
530. **Daniel, J.A., et al.**, *Leptin, tumor necrosis factor-alpha (TNF), and CD14 in ovine adipose tissue and changes in circulating TNF in lean and fat sheep*. J Anim Sci, 2003. 81(10): p. 2590-9.
531. **Soliman, M., et al.**, *Plasma leptin responses to lipopolysaccharide and tumor necrosis factor alpha in cows*. Jpn J Vet Res, 2002. 50(2-3): p. 107-14.
532. **Soliman, M., et al.**, *No alteration in serum leptin levels during acute endotoxemia in sheep*. J Vet Med Sci, 2001. 63(10): p. 1143-5.
533. **Perez-Perez, A., et al.**, *Role of leptin as a link between metabolism and the immune system*. Cytokine Growth Factor Rev, 2017.

534. **Banks, W.A., et al.**, *Leptin enters the brain by a saturable system independent of insulin*. *Peptides*, 1996. 17(2): p. 305-11.
535. **Nonaka, N., et al.**, *Effects of lipopolysaccharide on leptin transport across the blood-brain barrier*. *Brain Res*, 2004. 1016(1): p. 58-65.
536. **Schwartz, M.W., et al.**, *Identification of targets of leptin action in rat hypothalamus*. *J Clin Invest*, 1996. 98(5): p. 1101-6.
537. **Hakansson, M.L., et al.**, *Leptin receptor immunoreactivity in chemically defined target neurons of the hypothalamus*. *J Neurosci*, 1998. 18(1): p. 559-572.
538. **Faggioni, R., et al.**, *LPS-induced anorexia in leptin-deficient (ob/ob) and leptin receptor-deficient (db/db) mice*. *Am J Physiol*, 1997. 273(1 Pt 2): p. R181-6.
539. **Mastronardi, C.A., et al.**, *Lipopolysaccharide-induced leptin synthesis and release are differentially controlled by alpha-melanocyte-stimulating hormone*. *Neuroimmunomodulation*, 2005. 12(3): p. 182-8.
540. **Mastronardi, C.A., et al.**, *Lipopolysaccharide-induced leptin release is neurally controlled*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001. 98(25): p. 14720-5.
541. **Berkowitz, D.E., et al.**, *Endotoxin-induced alteration in the expression of leptin and beta3-adrenergic receptor in adipose tissue*. *Am J Physiol*, 1998. 274(6 Pt 1): p. E992-7.
542. **Iwasa, T., et al.**, *The sensitivity of adipose tissue visfatin mRNA expression to lipopolysaccharide-induced endotoxemia is increased by ovariectomy in female rats*. *Int Immunopharmacol*, 2016. 35: p. 243-7.
543. **Prabhakar, U., et al.**, *Correlation of protein and gene expression profiles of inflammatory proteins after endotoxin challenge in human subjects*. *DNA Cell Biol*, 2005. 24(7): p. 410-31.
544. **Cekmez, F., et al.**, *Diagnostic value of resistin and visfatin, in comparison with C-reactive protein, procalcitonin and interleukin-6 in neonatal sepsis*. *Eur Cytokine Netw*, 2011. 22(2): p. 113-7.
545. **Pini, M., et al.**, *Obesity and IL-6 interact in modulating the response to endotoxemia in mice*. *Cytokine*, 2013. 61(1): p. 71-7.
546. **Tvarijonaviciute, A., et al.**, *Adiponectin and IGF-1 are negative acute phase proteins in a dog model of acute endotoxaemia*. *Vet Immunol Immunopathol*, 2011. 140(1-2): p. 147-51.
547. **Keller, P., et al.**, *Circulating adiponectin levels during human endotoxaemia*. *Clin Exp Immunol*, 2003. 134(1): p. 107-10.
548. **Iwasa, T., et al.**, *The effects of LPS-induced endotoxemia on the expression of adiponectin and its receptors in female rats*. *Endocr J*, 2014. 61(9): p. 891-900.
549. **Villarroya, J., R. Cereijo, and F. Villarroya**, *An endocrine role for brown adipose tissue?* *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2013. 305(5): p. E567-72.
550. **Nakamura, K.**, *Central circuitries for body temperature regulation and fever*. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2011. 301(5): p. R1207-28.
551. **Liu, X., et al.**, *Brown adipose tissue transplantation improves whole-body energy metabolism*. *Cell Res*, 2013. 23(6): p. 851-4.
552. **Stanford, K.I., et al.**, *Brown adipose tissue regulates glucose homeostasis and insulin sensitivity*. *J Clin Invest*, 2013. 123(1): p. 215-23.
553. **Liu, X., et al.**, *Brown Adipose Tissue Transplantation Reverses Obesity in Ob/Ob Mice*. *Endocrinology*, 2015. 156(7): p. 2461-9.
554. **Cannon, B., J. Houstek, and J. Nedergaard**, *Brown adipose tissue. More than an effector of thermogenesis?* *Ann N Y Acad Sci*, 1998. 856: p. 171-87.
555. **Wang, H., H. Qu, and H. Deng**, *Plasma HMGB-1 Levels in Subjects with Obesity and Type 2 Diabetes: A Cross-Sectional Study in China*. *PLoS One*, 2015. 10(8): p. e0136564.
556. **Giacobbe, A., et al.**, *High mobility group protein B1: a new biomarker of obesity in pregnant women?* *Gynecol Endocrinol*, 2015. 31(2): p. 113-5.
557. **Montes, V.N., et al.**, *Anti-HMGB1 antibody reduces weight gain in mice fed a high-fat diet*. *Nutr Diabetes*, 2015. 5: p. e161.
558. **Song, F., et al.**, *RAGE regulates the metabolic and inflammatory response to high-fat feeding in mice*. *Diabetes*, 2014. 63(6): p. 1948-65.
559. **Monden, M., et al.**, *Receptor for advanced glycation end products regulates adipocyte hypertrophy and insulin sensitivity in mice: involvement of Toll-like receptor 2*. *Diabetes*, 2013. 62(2): p. 478-89.
560. **Gunasekaran, M.K., et al.**, *TLR4-dependant pro-inflammatory effects of HMGB1 on human adipocyte*. *Adipocyte*, 2016. 5(4): p. 384-388.

561. **Nativel, B., et al.**, *Soluble HMGB1 is a novel adipokine stimulating IL-6 secretion through RAGE receptor in SW872 preadipocyte cell line: contribution to chronic inflammation in fat tissue*. PLoS One, 2013. 8(9): p. e76039.
562. **Elfeky, M., et al.**, *Adiponectin Inhibits LPS-Induced HMGB1 Release through an AMP Kinase and Heme Oxygenase-1-Dependent Pathway in RAW 264 Macrophage Cells*. Mediators Inflamm, 2016. 2016: p. 5701959.
563. **Li, S., et al.**, *Effects of adiponectin on mortality and its mechanism in a sepsis mouse model*. J Invest Surg, 2012. 25(4): p. 214-9.
564. **Tang, T., et al.**, *Decreased body fat, elevated plasma transforming growth factor-beta levels, and impaired BMP4-like signaling in biglycan-deficient mice*. Connect Tissue Res, 2013. 54(1): p. 5-13.
565. **Adapala, V.J., M. Ward, and K.M. Ajuwon**, *Adipose tissue biglycan as a potential anti-inflammatory target of sodium salicylate in mice fed a high fat diet*. J Inflamm (Lond), 2012. 9(1): p. 15.
566. **Ward, M.G. and K.M. Ajuwon**, *Biglycan deletion alters adiponectin expression in murine adipose tissue and 3T3-L1 adipocytes*. PLoS One, 2012. 7(11): p. e50554.
567. **Baranowska, B., et al.**, *Evaluation of neuroendocrine status in longevity*. Neurobiol Aging, 2007. 28(5): p. 774-83.
568. **Baranowska, B., et al.**, *Neuroendocrine control of metabolic homeostasis in Polish centenarians*. J Physiol Pharmacol, 2006. 57 Suppl 6: p. 55-61.
569. **Schautz, B., et al.**, *Impact of age on leptin and adiponectin independent of adiposity*. Br J Nutr, 2012. 108(2): p. 363-70.
570. **Roszkowska-Gancarz, M., et al.**, *Age-related changes of leptin and leptin receptor variants in healthy elderly and long-lived adults*. Geriatr Gerontol Int, 2015. 15(3): p. 365-71.
571. **Coimbra, S., et al.**, *Adiponectin, leptin, and chemerin in elderly patients with type 2 diabetes mellitus: a close linkage with obesity and length of the disease*. Biomed Res Int, 2014. 2014: p. 701915.
572. **Obata, Y., et al.**, *Relationship between serum adiponectin levels and age in healthy subjects and patients with type 2 diabetes*. Clin Endocrinol (Oxf), 2013. 79(2): p. 204-10.
573. **Pfister, G. and W. Savino**, *Can the immune system still be efficient in the elderly? An immunological and immunoendocrine therapeutic perspective*. Neuroimmunomodulation, 2008. 15(4-6): p. 351-64.
574. **Van Harmelen, V., et al.**, *Leptin secretion from subcutaneous and visceral adipose tissue in women*. Diabetes, 1998. 47(6): p. 913-7.
575. **Lihn, A.S., et al.**, *Lower expression of adiponectin mRNA in visceral adipose tissue in lean and obese subjects*. Mol Cell Endocrinol, 2004. 219(1-2): p. 9-15.
576. **Zamboni, M., et al.**, *Adipose tissue, diet and aging*. Mech Ageing Dev, 2014. 136-137: p. 129-37.
577. **Hausman, G.J., et al.**, *Gene expression profiling in adipose tissue from growing broiler chickens*. Adipocyte, 2014. 3(4): p. 297-303.
578. **Reynisdottir, S., et al.**, *Comparison of hormone-sensitive lipase activity in visceral and subcutaneous human adipose tissue*. J Clin Endocrinol Metab, 1997. 82(12): p. 4162-6.
579. **Yamamoto, Y., et al.**, *Septic shock is associated with receptor for advanced glycation end products ligation of LPS*. J Immunol, 2011. 186(5): p. 3248-57.
580. **Seeley, J.J. and S. Ghosh**, *Tolerization of inflammatory gene expression*. Cold Spring Harb Symp Quant Biol, 2013. 78: p. 69-79.
581. **Zeisberger, E. and J. Roth**, *Tolerance to pyrogens*. Ann N Y Acad Sci, 1998. 856: p. 116-31.
582. **Nomura, F., et al.**, *Cutting edge: endotoxin tolerance in mouse peritoneal macrophages correlates with down-regulation of surface toll-like receptor 4 expression*. J Immunol, 2000. 164(7): p. 3476-9.
583. **Gabler, N.K., et al.**, *n-3 PUFA attenuate lipopolysaccharide-induced down-regulation of toll-like receptor 4 expression in porcine adipose tissue but does not alter the expression of other immune modulators*. J Nutr Biochem, 2008. 19(1): p. 8-15.
584. **Yu, M., et al.**, *HMGB1 signals through toll-like receptor (TLR) 4 and TLR2*. Shock, 2006. 26(2): p. 174-9.
585. **Calder, P.C.**, *Polyunsaturated fatty acids and inflammation*. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids, 2006. 75(3): p. 197-202.
586. **Steiner, A.A., M.T. Fonseca, and F.G. Soriano**, *Should we assume that hypothermia is a dysfunction in sepsis?* Crit Care, 2017. 21(1): p. 8.

587. **Pomposelli, J.J., et al.**, *Attenuation of the febrile response in guinea pigs by fish oil enriched diets*. JPEN J Parenter Enteral Nutr, 1989. 13(2): p. 136-40.
588. **Cooper, A.L. and N.J. Rothwell**, *Inhibition of the thermogenic and pyrogenic responses to interleukin-1 beta in the rat by dietary N-3 fatty acid supplementation*. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids, 1993. 49(2): p. 615-26.
589. **Kozak, W., et al.**, *Dietary n-3 fatty acids differentially affect sickness behavior in mice during local and systemic inflammation*. Am J Physiol, 1997. 272(4 Pt 2): p. R1298-307.
590. **Lavialle, M., et al.**, *Involvement of omega-3 fatty acids in emotional responses and hyperactive symptoms*. J Nutr Biochem, 2010. 21(10): p. 899-905.
591. **Fedorova, I. and N. Salem, Jr.**, *Omega-3 fatty acids and rodent behavior*. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids, 2006. 75(4-5): p. 271-89.
592. **Umezawa, M., et al.**, *High-linoleate and high-alpha-linolenate diets affect learning ability and natural behavior in SAMR1 mice*. J Nutr, 1999. 129(2): p. 431-7.
593. **Vinot, N., et al.**, *Omega-3 fatty acids from fish oil lower anxiety, improve cognitive functions and reduce spontaneous locomotor activity in a non-human primate*. PLoS One, 2011. 6(6): p. e20491.
594. **Carrie, I., et al.**, *Diets containing long-chain n-3 polyunsaturated fatty acids affect behaviour differently during development than ageing in mice*. Br J Nutr, 2000. 83(4): p. 439-47.
595. **Clouard, C., et al.**, *Maternal Fish Oil Supplementation Affects the Social Behavior, Brain Fatty Acid Profile, and Sickness Response of Piglets*. J Nutr, 2015. 145(9): p. 2176-84.
596. **Lafourcade, M., et al.**, *Nutritional omega-3 deficiency abolishes endocannabinoid-mediated neuronal functions*. Nat Neurosci, 2011. 14(3): p. 345-50.
597. **Delpech, J.C., et al.**, *Dietary n-3 PUFAs Deficiency Increases Vulnerability to Inflammation-Induced Spatial Memory Impairment*. Neuropsychopharmacology, 2015. 40(12): p. 2774-87.
598. **Mingam, R., et al.**, *Uncoupling of interleukin-6 from its signalling pathway by dietary n-3-polyunsaturated fatty acid deprivation alters sickness behaviour in mice*. Eur J Neurosci, 2008. 28(9): p. 1877-86.
599. **Romanovsky, A.A., et al.**, *The vagus nerve in the thermoregulatory response to systemic inflammation*. Am J Physiol, 1997. 273(1 Pt 2): p. R407-13.
600. **Holt, S.J., R.F. Grimble, and D.A. York**, *Tumour necrosis factor-alpha and lymphotoxin have opposite effects on sympathetic efferent nerves to brown adipose tissue by direct action in the central nervous system*. Brain Res, 1989. 497(1): p. 183-6.
601. **Derijk, R.H. and F. Berkenbosch**, *Hypothermia to endotoxin involves the cytokine tumor necrosis factor and the neuropeptide vasopressin in rats*. Am J Physiol, 1994. 266(1 Pt 2): p. R9-14.
602. **Sjövall, P., et al.**, *Dietary uptake of omega-3 fatty acids in mouse tissue studied by time-of-flight secondary ion mass spectrometry (TOF-SIMS)*. Anal Bioanal Chem, 2015. 407(17): p. 5101-11.
603. **Gravaghi, C., et al.**, *Cox-2 expression, PGE(2) and cytokines production are inhibited by endogenously synthesized n-3 PUFAs in inflamed colon of fat-1 mice*. J Nutr Biochem, 2011. 22(4): p. 360-5.
604. **Sargi, S.C., et al.**, *Role of omega-3 polyunsaturated fatty acids in the production of prostaglandin E2 and nitric oxide during experimental murine paracoccidiodomycosis*. Biomed Res Int, 2013. 2013: p. 947687.
605. **Baud, L., et al.**, *Production of tumor necrosis factor by rat mesangial cells in response to bacterial lipopolysaccharide*. Kidney Int, 1989. 35(5): p. 1111-8.
606. **Kunkel, S.L., et al.**, *Regulation of macrophage tumor necrosis factor production by prostaglandin E2*. Biochem Biophys Res Commun, 1986. 137(1): p. 404-10.
607. **Simm, B., et al.**, *Effects of prostaglandin E2 on cells cultured from the rat organum vasculosum laminae terminalis and median preoptic nucleus*. Neuroscience, 2016. 313: p. 23-35.
608. **Martich, G.D., et al.**, *Detection of interleukin 8 and tumor necrosis factor in normal humans after intravenous endotoxin: the effect of antiinflammatory agents*. J Exp Med, 1991. 173(4): p. 1021-4.
609. **Portanova, J.P., et al.**, *Selective neutralization of prostaglandin E2 blocks inflammation, hyperalgesia, and interleukin 6 production in vivo*. J Exp Med, 1996. 184(3): p. 883-91.
610. **Wang, P., F. Zhu, and K. Konstantopoulos**, *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, 2010. 298(6): p. C1445-56.

611. **Greco, L.F., et al.**, *Effects of altering the ratio of dietary n-6 to n-3 fatty acids on performance and inflammatory responses to a lipopolysaccharide challenge in lactating Holstein cows*. J Dairy Sci, 2015. 98(1): p. 602-17.
612. **Rahman, M., et al.**, *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, 2009. 2(5): p. 307-16.
613. **Hallbach, J.**, *Klinische Chemie und Hämatologie für den Einstieg*. Vol. 2. 2001: Georg Thieme Verlag.
614. **Mukaro, V.R., et al.**, *Leukocyte numbers and function in subjects eating n-3 enriched foods: selective depression of natural killer cell levels*. Arthritis Res Ther, 2008. 10(3): p. R57.
615. **Upadhya, S.D., et al.**, *Vitamin E and omega-3 fatty acids independently attenuate plasma concentrations of proinflammatory cytokines and prostaglandin E3 in Escherichia coli lipopolysaccharide-challenged growing-finishing pigs*. J Anim Sci, 2015. 93(6): p. 2926-34.
616. **Wang, T.M., et al.**, *Docosahexaenoic acid and eicosapentaenoic acid reduce C-reactive protein expression and STAT3 activation in IL-6-treated HepG2 cells*. Mol Cell Biochem, 2013. 377(1-2): p. 97-106.
617. **Erdinest, N., et al.**, *Anti-inflammatory effects of alpha linolenic acid on human corneal epithelial cells*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2012. 53(8): p. 4396-406.
618. **Kubota, H., et al.**, *Eicosapentaenoic acid modifies cytokine activity and inhibits cell proliferation in an oesophageal cancer cell line*. Anticancer Res, 2013. 33(10): p. 4319-24.
619. **Liu, Y.H., et al.**, *Omega-3 fatty acid intervention suppresses lipopolysaccharide-induced inflammation and weight loss in mice*. Mar Drugs, 2015. 13(2): p. 1026-36.
620. **Gavrilyuk, V., et al.**, *Norepinephrine increases I kappa B alpha expression in astrocytes*. J Biol Chem, 2002. 277(33): p. 29662-8.
621. **Ivanov, A.I., et al.**, *Prostaglandin E(2)-synthesizing enzymes in fever: differential transcriptional regulation*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2002. 283(5): p. R1104-17.
622. **Lo, C.J., et al.**, *Fish oil augments macrophage cyclooxygenase II (COX-2) gene expression induced by endotoxin*. J Surg Res, 1999. 86(1): p. 103-7.
623. **Bredehöft, J.**, *Untersuchungen zur Wirkung anti-inflammatorischer Strategien auf zentralnervös induzierte Krankheitssymptome im Gehirn bei systemischen Entzündungsreaktionen*. 2017: Laufersweiler, Gießen.
624. **Blasig, J., et al.**, *Involvement of endorphins in emotional hyperthermia of rats*. Life Sci, 1978. 23(25): p. 2525-31.
625. **Watanabe, S.**, *Social factors modulate restraint stress induced hyperthermia in mice*. Brain Res, 2015. 1624: p. 134-9.
626. **Fuchs, F., et al.**, *Activation of the inflammatory transcription factor nuclear factor interleukin-6 during inflammatory and psychological stress in the brain*. J Neuroinflammation, 2013. 10: p. 140.
627. **Briese, E.**, *Emotional hyperthermia and performance in humans*. Physiol Behav, 1995. 58(3): p. 615-8.
628. **Oka, T., et al.**, *Psychological stress contributed to the development of low-grade fever in a patient with chronic fatigue syndrome: a case report*. Biopsychosoc Med, 2013. 7(1): p. 7.
629. **Hiramoto, T., et al.**, *Pyrogenic cytokines did not mediate a stress interview-induced hyperthermic response in a patient with psychogenic fever: a case report*. Psychosom Med, 2009. 71(9): p. 932-6.
630. **Singer, R., et al.**, *Hyperthermia induced by open-field stress is blocked by salicylate*. Physiol Behav, 1986. 36(6): p. 1179-82.
631. **LeMay, L.G., A.J. Vander, and M.J. Kluger**, *The effects of psychological stress on plasma interleukin-6 activity in rats*. Physiol Behav, 1990. 47(5): p. 957-61.
632. **Vinkers, C.H., et al.**, *Stress-induced hyperthermia and infection-induced fever: two of a kind?* Physiol Behav, 2009. 98(1-2): p. 37-43.
633. **Oka, T., K. Oka, and T. Hori**, *Mechanisms and mediators of psychological stress-induced rise in core temperature*. Psychosom Med, 2001. 63(3): p. 476-86.
634. **Herman, J.P., et al.**, *Neural regulation of the stress response: glucocorticoid feedback mechanisms*. Braz J Med Biol Res, 2012. 45(4): p. 292-8.
635. **Keller-Wood, M.E. and M.F. Dallman**, *Corticosteroid inhibition of ACTH secretion*. Endocr Rev, 1984. 5(1): p. 1-24.
636. **Liu, Y., et al.**, *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*. J Nutr, 2013. 143(11): p. 1799-807.

637. **Ferraz, A.C., et al.**, *Chronic omega-3 fatty acids supplementation promotes beneficial effects on anxiety, cognitive and depressive-like behaviors in rats subjected to a restraint stress protocol.* Behav Brain Res, 2011. 219(1): p. 116-22.
638. **Hennebelle, M., et al.**, *Influence of omega-3 fatty acid status on the way rats adapt to chronic restraint stress.* PLoS One, 2012. 7(7): p. e42142.

X ANHANG

XA Publikationsliste

1 Originalarbeiten in Fachzeitschriften

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.

2 Akzeptiertes Abstract, dessen Veröffentlichung im Oktober 2017 erfolgt

Bredehöft J, Bhandari DR, Peek V, Spengler B, Schulz S, Mayer M, Roth J, Rummel C (2017)

Phospholipid species distribution patterns in the mouse vascular organ of the lamina terminalis during systemic inflammation. *Brain, Behavior, and Immunity*

XB Danksagung

Ich möchte mich an dieser Stelle bei allen bedanken, die maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Dabei gilt ein ganz besonderer Dank PD Dr. Christoph Rummel, der mir stets mit großem Engagement unterstützend zur Seite stand. Die Betreuung meiner Doktorarbeit hat er vorbildlich übernommen. Er hatte immer ein offenes Ohr für Fragen sowie Probleme und stand mir konstruktiv zur Seite.

Bei Prof. Rüdiger Gerstberger möchte ich mich für die Möglichkeit bedanken, meine Dissertation am Institut für Veterinär-Physiologie und –Biochemie anfertigen zu können. Außerdem möchte ich ihm für seine Hilfsbereitschaft danken. Prof. Joachim Roth danke ich für die hilfreichen oder manchmal einfach nur lustigen Kommentare und für die konstruktive Zusammenarbeit.

Der JLU Gießen gilt mein Dank für die finanzielle Unterstützung im Rahmen des Graduiertenstipendiums.

Den technischen Mitarbeiterinnen Doreen Marks, Jolanta Murgott und Daniela Ott danke ich für die Einarbeitung in die verschiedenen Methoden und die Unterstützung in sämtlichen Arbeits- und Lebenslagen. Für die Versorgung und Pflege der Versuchstiere gilt mein Dank Michael Haas, Jan Rodrigues-Fonseca und Ralf Matheisl. Alexander Heinrich und Gerd Herber möchte ich für die schnelle Behebung sämtlicher technischer Probleme und die erstaunlich gute Umsetzung von „Hirngespinsten“ danken. Bei Dr. Sabine Schulz bedanke ich mich für die geduldige sowie verständnisvolle Einarbeitung in die fremde Welt der analytischen Chemie.

Am Institut bestand ein sehr offenes und herzliches Miteinander, das auch abseits des Arbeitsalltags für viel Spaß und Ablenkung sorgte. Es herrscht ein vorbildliches Arbeitsklima, das die Zeit für mich unvergesslich machte. So gilt ein außerordentlich großer Dank der Frühstücksrunde und allen Doktoranden, mit denen ich gemeinsam die Zeit in der Physio genießen durfte. Ich werde mich auch in Zukunft immer wieder gerne an die vielen gemeinsamen Stunden im Aufenthaltsraum, vor dem Grill oder auf Campus-Festen erinnern und hoffe auf regelmäßige Wiederholungen!

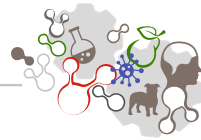
Ich danke auch allen Freuden, die nicht permanent vor Ort waren und dennoch einen sehr wichtigen Teil zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Sie haben mich abgelenkt, zum lachen gebracht und an mich geglaubt. Danke!

Nicht zuletzt bedanke ich mich bei meiner Familie, die mir stets zur Seite steht und mir hilft meinen Weg zu gehen.

XC 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.“

Verena Peek



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

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

ISBN: 978-3-8359-6603-1



9 783835 196603 1