

1	Einleitung	1
1.1	Die systemische Entzündungsreaktion	1
1.2	Zentralnervös kontrollierte Krankheitssymptome	4
1.3	Entzündungskaskade des humoralen angeborenen Immunsystems	4
1.3.1	Entzündungszellen	4
1.3.2	Signalwege und Zytokine in der Entzündungskaskade	5
1.3.2.1	NFκB-Signalweg	6
1.3.2.2	Tumornekrosefaktor-α	7
1.3.2.3	IL-1β	7
1.3.2.4	IL-6 und STAT3-Signalweg	7
1.3.2.5	Interleukin-10	8
1.3.2.6	Interferon-γ	8
1.3.2.7	NFIL-6	8
1.3.3	Lipidmediatorensynthese in der Entzündungskaskade	9
1.3.3.1	Ungesättigte Fettsäuren	11
1.3.3.2	Glycerophospholipide: Fettsäurespeicher in der Zellmembran	11
1.3.3.3	Eicosanoidsynthese in der Entzündungskaskade	12
1.4	Entzündungsauflösung – Lipidmediatoren als Wegbereiter	15
1.4.1	ω-6-Lipidmediatoren der Entzündungsauflösung	16
1.4.2	ω-3-Lipidmediatoren	17
1.5	Kommunikationswege zwischen Peripherie und Gehirn	19
1.5.1	Humorale „immune-to-brain“ Kommunikation	21
1.5.1.1	Das <i>Organum vasculosum laminae terminalis</i>	22
1.6	Fieber	23
1.6.1	Exogene und endogene Pyrogene	25
1.6.2	Transport von Prostaglandin E2 über die Bluthirnschranke	27
1.6.3	Das OVLT in der Fieberentstehung	27
1.6.4	<i>De novo</i> Synthese von PGE2 im Endothel der POA	28

1.7	Hypothermie	29
1.8	Stress und Thermoregulation.....	31
1.9	Einfluss von ω -3-Fettsäuren auf Inflammation und Neuroinflammation.....	32
1.10	Versuchsmodelle.....	34
1.10.1	Anreicherung mit ω -3-Fettsäuren: die fat-1-Maus als Tiermodell.....	34
1.10.2	ω -3-Fettsäure-defiziente Diät.....	36
1.10.3	Lipopolysaccharid-induzierte Entzündung	36
1.10.4	Stress-induzierte Thermoregulation „novel environment stress“	38
1.11	Fragestellung und Zielsetzung	39
2	Material und Methoden	43
2.1	Materialien.....	43
2.1.1	Versuchstiere.....	46
2.1.1.1	Mausstämme	46
2.1.1.2	Haltung und Zucht der Mäuse.....	47
2.1.1.3	Sentinel Mäuse und Gesundheitsmonitoring	48
2.1.1.4	Genotypisierung der fat-1-Mäuse	49
2.2	<i>In vivo</i> Modelle.....	51
2.2.1	Grundlagen	51
2.2.2	Haltung der Versuchstiere.....	53
2.2.3	Intraabdominale Senderimplantation mittels Laparotomie	54
2.2.3.1	Nachsorge und Rekonvaleszenz.....	57
2.2.4	Physiologische Daten	57
2.2.5	„Novel environment stress“ Versuch	58
2.2.6	Stimulation - Induktion einer systemischen Entzündung.....	58
2.2.7	Perfusion zur Gewebeprobengewinnung	59
2.3	Bio-molekulare Methoden.....	60
2.3.1	Leukozytendifferenzierung in Blutausstrichen	60
2.3.2	Bioassays	61

2.3.3	Immunassays	64
2.3.4	Relative Quantifizierung mittels „real time“ Polymerase-Kettenreaktion	68
2.3.4.1	Das Prinzip der relativen Quantifizierung mittels "real time" Polymerase-Kettenreaktion	68
2.3.4.2	Extraktion der RNA aus Hypothalamusgewebeproben	69
2.3.4.3	Die "real time" Polymerase-Kettenreaktion	72
2.3.4.4	Ermittlung von endogenen Kontrollen: "housekeeping Gen"	73
2.3.4.5	Relative Quantifizierung mittels der 2 ^(-ΔΔCt) Methode	74
2.3.5	Immunfluoreszenzhistochemie von Gehirnschnitten	75
2.3.5.1	Prinzip der Immunfluoreszenzhistochemie	76
2.3.5.2	Einsatz der Immunfluoreszenzhistochemie für OVLT-Schnitte nach massenspektrometrischen Messungen	77
2.4	Massenspektrometrische Verfahren	80
2.4.1	Das Prinzip des Q Exactive Hybrid Quadrupole-Orbitrap Massenspektrometers	80
2.4.2	Umkehrphasen-ultra-Hochleistungs-Flüssigchromatographie mit Elektrospray-Ionisation und gekoppelter Tandem-Massenspektrometrie (UHPLC-ESI-MS/MS)	83
2.4.2.1	Probenaufbereitung für „untargeted“ –Omics	86
2.4.2.2	Probenaufbereitung und Festphasenextraktion der Eicosanoide	88
2.4.2.3	Das Prinzip der Ultra-Hochleistungs-Flüssigchromatographie	90
2.4.2.4	Das Prinzip der Elektrospray-Ionisation	91
2.4.2.5	Messung mit dem Q Exactive Hybrid Quadrupole-Orbitrap Massenspektrometers für LCMS/MS	92
2.4.2.6	Analyse von Lipiden in den „untargeted“ Lipidomics-Messungen	93
2.4.2.7	Analyse der „targeted“ Eicosanoidmessungen	96
2.4.3	„Matrix assisted laser desorption/ionization“ Massenspektrometrie-„imaging“ und Tandem-Massenspektrometrie – MALDI-MSI und MALDI-MS/MS	96
2.4.3.1	Probenaufbereitung der Gehirne für MALDI-MSI	98
2.4.3.2	Matrix assistierte Laser Desorption/Ionisation	101

2.4.3.3	Massenspektrometrische Messungen von Gehirnschnitten des OVLT mittels MALDI-MSI	102
2.4.3.4	MALDI-MS/MS: Tandem-Massenspektrometrie	103
2.5	Statistik und Auswertung	103
2.5.1	Studiendesign	104
2.5.2	Auswertung der Körperkerntemperatur und lokomotorischen Aktivität	105
2.5.3	Auswertung des Körpergewichts, der Futter- und Wasseraufnahme	106
2.5.4	Auswertung der Leukozytendifferenzierung in Blutaussstrichen	107
2.5.5	Auswertung der Plasmazytokine mit Bioassays und Immunassays sowie Auswertung der Immunassays aus Leberhomogenaten	107
2.5.6	Auswertung der qPCR Genexpression	107
2.5.7	Auswertung der Immunfluoreszenzhistochemie	108
2.5.8	Auswertung der „targeted“ LCMS/MS Eicosanoide	108
2.5.9	Auswertung der LCMS/MS „untargeted“ Lipidomics	108
2.5.10	Auswertung der MALDI-MSI-Messungen	109
3	Ergebnisse	110
3.1	Entwicklung von Analyseverfahren für MALDI-MSI-Daten	110
3.1.1	Vergleichbarkeit zwischen den Versuchen/einzelnen Messungen	110
3.1.2	Erste Peak-Identifizierung mit Metaspace	111
3.1.3	Normalisierungsverfahren zur direkten Vergleichbarkeit	112
3.1.3.1	Bewertung und Auswahl eines Normalisierungsverfahrens	114
3.1.4	Normalisierung gegen Phosphatidylcholin (34:1) [M+K] ⁺ - eine endogene Normalisierung	115
3.1.5	Spezifische Phospholipidprofile für neuroanatomische Regionen	118
3.1.6	„Region of interest“ (ROI) Analyse für das OVLT	119
3.1.7	Statistische Analyse der Lipide aus MALDI-MSI	124
3.2	<i>In vivo</i> Modelle systemischer Entzündung	126
3.2.1	Körperkerntemperatur	126

3.2.1.1	Temperaturverlauf in Kontrollgruppen nach Saline-Injektion	126
3.2.1.2	Temperaturverlauf nach niedriger LPS-Dosis in ω -3-FS-defizienten Tieren.	127
3.2.1.3	Temperaturverlauf nach hoher LPS-Dosis in ω -3-FS-defizienten Tieren	128
3.2.1.4	Temperaturverlauf nach hoher LPS-Dosis in ω -3-FS-suffizienten Tieren	129
3.2.2	Lokomotorische Aktivität	132
3.2.2.1	Aktivitätsverlauf in Kontrollgruppen nach Saline-Injektion	132
3.2.2.2	Aktivitätsverlauf nach niedriger LPS-Dosis in ω -3-FS-defizienten Tieren....	132
3.2.2.3	Aktivitätsverlauf nach hoher LPS-Dosis in ω -3-FS-defizienten Tieren ...	133
3.2.2.4	Aktivitätsverlauf nach hoher LPS-Dosis in ω -3-FS-suffizienten Tieren..	133
3.2.3	Körpergewicht.....	133
3.2.3.1	Entwicklung der Körpergewichte unter LPS-Behandlung der ω -3-FS-defizienten Tiere.....	134
3.2.3.2	Entwicklung der Körpergewichte unter LPS-Behandlung der ω -3-FS-suffizienten Tiere.....	134
3.2.4	Futter- und Wasseraufnahme	134
3.2.4.1	Entwicklung der Futteraufnahme der ω -3-FS-defizienten Tiere unter LPS-Behandlung.....	135
3.2.4.2	Entwicklung der Futteraufnahme der ω -3-FS-suffizienten Tiere unter LPS-Behandlung.....	135
3.2.4.3	Entwicklung der Wasseraufnahme der ω -3-FS-defizienten Tiere unter LPS-Behandlung.....	135
3.2.4.4	Entwicklung der Wasseraufnahme der ω -3-FS-suffizienten Tiere unter LPS-Behandlung.....	136
3.2.5	Leukozytendifferenzierung in peripheren Blutaussstrichen	136
3.2.5.1	Veränderungen der Leukozytenzusammensetzung nach LPS-Behandlung in ω -3-FS-defizienten Tieren.....	136
3.2.5.2	Veränderungen der Leukozytenzusammensetzung nach LPS-Behandlung in ω -3-FS-suffizienten Tieren.....	137

3.2.6	Plasmazytokine aus Bioassays	138
3.2.6.1	Mit Bioassays gemessene Tumornekrosefaktor- α -Konzentrationen in ω -3-FS-suffizienten Mäusen.....	138
3.2.6.2	Mit Bioassays gemessene Interleukin-6-Konzentrationen in ω -3-FS-defizienten Mäusen	139
3.2.6.3	Mit Bioassays gemessene Interleukin-6-Konzentrationen in ω -3-FS-suffizienten Mäusen	139
3.2.7	Plasmazytokinmessungen mit Immunassays	139
3.2.7.1	Mit Immunassays gemessene Interleukin-6-Konzentrationen aus Plasmaproben	140
3.2.7.2	Mit Immunassays gemessene Tumornekrosefaktor- α -Konzentrationen aus Plasmaproben	140
3.2.7.3	Mit Immunassays gemessene Interleukin-1 β -Konzentrationen aus Plasmaproben	140
3.2.7.4	Mit Immunassays gemessene Interleukin-10-Konzentrationen aus Plasmaproben	141
3.2.7.5	Mit Immunassays gemessene Interferon- γ -Konzentrationen aus Plasmaproben	141
3.2.8	Quantifizierung der Zytokine aus Leberhomogenaten mit Immunassays.....	142
3.2.9	Genexpression wichtiger Marker im Hypothalamus: Semiquantitative Bestimmung der „messenger“ RNA	143
3.2.9.1	Genexpression von pro-inflammatorischen Zytokinen.....	144
3.2.9.2	Genexpression des Lipopolysaccharid-Rezeptors Toll-Like-Rezeptor-4.	145
3.2.9.3	Genexpression von Transkriptionsfaktoren für inflammatorische Signalwege	145
3.2.9.4	Genexpression von Zellmarkern	147
3.2.9.5	Genexpression von wichtigen Enzymen des Fettsäurestoffwechsels und der Fettsäurefreisetzung	147
3.2.9.6	Genexpression von wichtigen Enzymen des Arachidonsäurestoffwechsels und der Prostaglandinsynthese	148

3.2.9.7	Genexpression wichtiger Enzyme des ω -3-Lipidmediatorenstoffwechsels....	149
3.2.10	Semiquantitativer Vergleich von Lipiden im Hypothalamus.....	152
3.2.10.1	Veränderungen der Fettsäurezusammensetzung von Lipiden in fat-1- vs. WT-Mäusen.....	152
3.2.10.2	Veränderungen der Lipide im Hypothalamus im Verlauf der systemischen Entzündung.....	154
3.2.10.2.1	Fünf Stunden <i>post</i> LPS-Injektion veränderte Lipide im Hypothalamus	154
3.2.10.2.2	24 Stunden <i>post</i> LPS-Stimulation veränderte Lipide im Hypothalamus.....	155
3.2.10.2.3	Diskriminanzanalyse der partiellen kleinsten Quadrate	159
3.2.10.3	Beeinflussung von Fettsäure- und Lipidmediatorenkonzentrationen in Hypothalamusproben durch LPS-Behandlung in fat-1- vs. WT-Mäusen	163
3.2.11	Immunfluoreszenzhistochemie von OVLT-Schnitten nach MALDI-MSI	165
3.2.11.1	Entzündungsmarker im OVLT und der präoptischen Region nach LPS-Behandlung.....	165
3.2.11.2	Zelltypendifferenzierung im OVLT.....	166
3.2.11.3	Kolokalisation von Fluoreszenzsignalen und MALDI-MSI Heatmaps	169
3.2.12	Semiquantitativer Vergleich von Lipiden im OVLT	171
3.2.12.1	Veränderungen der OVLT-Lipide fünf Stunden nach LPS-Injektion	171
3.2.12.2	Veränderungen der OVLT-Lipide 24 Stunden nach LPS-Stimulation.....	174
3.3	Einfluss von ω -3-Fettsäuren auf die Stressreaktion im "novel environment stress" Test	176
3.3.1	Stressinduzierte Veränderungen der Körperkerntemperatur.....	176
3.3.2	Stressinduzierte Veränderungen der lokomotorischen Aktivität.....	177
4	Diskussion.....	179
4.1	Einfluss der ω -3-FS-defizienten Diät auf den Verlauf systemischer Entzündungen	179
4.2	Evaluation der ω -3-FS-Anreicherung in ω -3-FS-suffizienten fat-1-Mäusen	180
4.3	Inflammation und Neuroinflammation unter dem Einfluss von ω -3-Fettsäuren in ω -3-suffizienten Mäusen	181

4.3.1	Veränderungen der peripheren/systemischen Entzündungsreaktion in fat-1-Mäusen	181
4.3.2	Bewertung der peripheren Entzündung in fat-1-Mäusen	184
4.3.3	Einfluss auf die Expression von inflammatorischen Markern im Hypothalamus..	185
4.3.4	Bewertung der Neuroinflammation in fat-1- vs. WT-Mäusen während LPS-induzierter systemischer Entzündung.....	188
4.3.5	Beeinflussung des Arachidonsäure- und Eicosanoidstoffwechsel in fat-1-vs. WT-Mäusen	190
4.3.6	Bewertung des Eicosanoidstoffwechsels in fat-1- vs. WT-Mäusen.....	194
4.3.7	ω -3-Fettsäuren, Eicosanoide und Docosanoide in fat-1-Mäusen vs. WT-Mäusen	195
4.3.8	Bewertung der Bildung von ω -3-FS-Metaboliten	198
4.3.9	TLR4 in fat-1-Mäusen.....	199
4.3.10	Veränderungen des Endocannabinoidsystems	200
4.3.11	Einfluss einzelner Lipide und Lipidklassen auf Neuroinflammation.....	202
4.3.11.1	Veränderte Glycerophospholipide in fat-1-Mäusen.....	202
4.3.11.2	Plasmalogene	204
4.3.11.3	Sphingolipide	205
4.3.11.4	Acylglycerine	206
4.3.11.5	Acylcarnitine	208
4.3.12	Lipide als Inflammationsmarker	209
4.3.13	Bewertung der Lipidomics während systemischer Entzündungen und in fat-1- vs. WT-Mäusen.....	212
4.4	„Sickness behaviour“	215
4.5	Veränderte Fieberantwort in fat-1-Mäusen	216
4.5.1	Tumornekrosefaktor- α als Pyrogen und Kryogen	219
4.5.2	Interleukin-1 β als Pyrogen	220
4.5.3	Interleukin-6 als Pyrogen	222

4.5.4	Prostaglandin E2 als terminales Pyrogen – Alteration der Synthese im Hypothalamus von fat-1- vs. WT-Mäusen	223
4.5.5	Bewertung der Hypothermie in fat-1-Mäusen.....	225
4.5.6	Endocannabinoide und Hypothermie	226
4.5.7	Transiente-Rezeptor-Potential-Kationenkanal-V1 als zentraler Modulator der LPS-induzierten Thermoregulation.....	228
4.5.8	Die Rolle des OVLT in der inflammatorischen Thermoregulation	230
4.5.9	TLR4, Thermoregulation und TLR4 im OVLT	232
4.5.10	Mit Hypothermie assoziierte Glycerophospholipide.....	234
4.6	Stress-induzierte Hyperthermie	235
4.7	Thesenartige Zusammenfassung der gewonnenen Erkenntnisse und daraus abgeleitete Perspektiven für weiterführende Untersuchungen	238
5	Zusammenfassung.....	244
6	Summary	250
7	Abkürzungsverzeichnis.....	255
8	Literaturverzeichnis	259
9	Anhang.....	280
9.1	Zusätzliche Informationen	280
9.2	Publikationsliste.....	293
9.3	Danksagung	294
9.4	Erklärung	295
9.5	Curriculum vitae	296