

Aus der Klinik für Anästhesiologie mit Schwerpunkt  
operative Intensivmedizin der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

## DISSERTATION

**Wirkung von Ethanol auf die neuronale Expression  
von Zytokinen und Neurotrophinen in einem murinen Pneumoniemodell**

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin  
von

Anna Wilczak-Wojtuściszyn,  
aus Zielona Góra, Polen

Datum der Promotion:

1.03.2019

# Inhaltsverzeichnis

1. Abkürzungsverzeichnis	4
2. Abstract	5
3. Zusammenfassung	6
4. Einleitung	7
4.1 Postoperative Sterblichkeit, Alkoholmissbrauch und nosokomiale Infektionen	7
4.2 Alkoholwirkung auf das Immunsystem	8
4.3 Interaktion von Immunsystem und Gehirn	10
4.4 Neurotrophine – Link zwischen Neuroinflammation und kognitiven Störungen	13
5. Fragestellung und Ziele	15
6. Material und Methoden	17
6.1 Material	17
6.1.1 Chemikalien	17
6.1.2 Puffer und Kits	17
6.1.3 Primer und Sonden	18
6.1.4 Antikörper	18
6.1.5 Molekulargewichtsmarker	18
6.1.6 Enzyme	18
6.1.7 Geräte, Instrumente	18
6.1.8 Verbrauchsmaterialien	19
6.1.9 Software	19
6.1.10 Lösungen	19
6.2 Methodenübersicht	20
6.3 Tiermodell	20
6.4 Genexpressionsanalyse	22
6.4.1 RNA-Isolierung	22
6.4.2 RNA-Integritätstest	22
6.4.3 Reverse Transkription	23
6.4.4 $\beta$ -Aktin Kontroll PCR	23
6.4.5 Quantitative Real Time PCR	24
6.4.6 Effizienzbestimmung	25
6.5 Analyse auf Proteinebene	25
6.5.1 Protein-Isolierung	25

6.5.2 Enzyme-linked immunosorbent Assay	25
6.5.3 Western Blot	26
6.6 Statistische Auswertung	27
7. Ergebnisse	28
7.1 RNA-Integritätstest und $\beta$ -Aktin Kontroll-PCR	28
7.2 Effizienzbestimmung für die Quantitative Real Time PCR	29
7.3 Expressionanalyse von Interleukin-1beta (IL-1beta)	31
7.3.1 Genexpression von <i>IL-1beta</i>	31
7.3.2 Proteinexpression von IL-1beta	33
7.4 Expressionanalyse von Tumornekrosefaktor-alpha (TNF-alpha)	34
7.4.1 Genexpression von <i>TNF-alpha</i>	34
7.4.2 Proteinexpression von TNF-alpha	36
7.5 Expressionanalyse von Brain-derived neurotrophic factor (BDNF)	38
7.5.1 Genexpression von <i>BDNF</i>	38
7.5.2 Proteinexpression von BDNF	40
7.6 Expressionanalyse von Neurotrophin-3 (NT-3)	42
7.6.1 Genexpression von <i>NT-3</i>	42
7.6.2 Proteinexpression von NT-3	43
7.7 Zusammenhang zwischen <i>BDNF</i> und <i>IL-1beta</i>	45
8. Diskussion	46
8.1 Hauptergebnisse	46
8.2 Expression der proinflammatorischen Zytokine IL-1beta und TNF-alpha	46
8.3 Expression der Neurotrophine BDNF und NT-3	52
8.4 Limitationen	56
8.4.1 Tiermodell	56
8.4.2 Methoden	57
8.5 Perspektiven	58
9. Literaturverzeichnis	61
Eidesstattliche Versicherung	70
Lebenslauf	71
Publikationsliste	73
Danksagung	74

# 1. Abkürzungsverzeichnis

ACTH	Adrenocorticotropin
BCA	Bicinchoninsäure
BDNF	<i>brain-derived neurotrophic factor</i>
BHS	Blut-Hirn-Schranke
BSA	Rinderserumalbumin
cDNA	komplementäre DNA
Ct	Zyklusschwellenwert
DAMPs	<i>damage associated molecular patterns</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
EtOH	Ethanol
GTC	Gaunidinisothiocyanatlösung
HPRT	Hypoxanthinphosphoribosyltransferase
i.p.	intraperitoneal
IL-1beta	Interleukin-1beta
KG	Körpergewicht
Kl	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
MAPK	<i>mitogen activated protein kinase</i>
LPS	Lipopolysaccharid
NaCl	Kochsalzlösung
NT-3	Neurotrophin-3
OP	Operation
p75NTR	<i>neurotrophin receptor p75</i>
PAMPs	<i>pathogen associated molecular patterns</i>
PBST	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung mit 0,05% Tween® 20
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PRRs	<i>intracellular pathogen recognition receptors</i>
qPCR	quantitative Echtzeit-PCR
RIPA	<i>radioimmunoprecipitation assay</i>
RNA	Ribonukleinsäure
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
SD	Standardabweichung
Sh	Sham
TLR	<i>Toll-like receptor</i>
TNF-alpha	Tumornekrosefaktor-alpha
TRK	<i>tyrosine kinase receptor</i>
tRNA	Transfer-RNA
ZNS	Zentrales Nerven System

## 2. Abstract

**Title:** The influence of alcohol on a neuronal cytokine and neurotrophine expression in a murine pneumonia model.

**Background:** A chronic alcohol administration causes an immune system dysfunction and increases the risk of postoperative mortality caused by nosocomial infection. Peripheral inflammation in response to surgery or infection can affect the function of the central nervous system (CNS), including memory and cognition. The purpose of this study was to analyze the influence of a chronic alcohol administration on the production of the proinflammatory cytokines IL-1beta and TNF-alpha as well as neurotrophines BDNF and NT-3 in the brain during a postoperative infection with *Klebsiella pneumoniae*.

**Methods:** 94 female 9 weeks old balb/c mice were treated for 14 days with ethanol (EtOH, 3.8 mg/kg body weight) or NaCl (i.p.). On the 14th day mice underwent a laparotomy and on the 16th day of the study they were treated with intranasal NaCl-solution or a solution containing *Klebsiella pneumoniae*. 24 h or 48 h later the animals were killed and their brains extracted. The expression of cytokines and neurotrophines were analyzed on a gene level using quantitative real-time PCR and on a protein level using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) or western blot.

**Results:** A postoperative infection with *Klebsiella pneumoniae* led after 24 h to a significant increase of a *IL1-beta* and *TNF-alpha* gene expression in brains of mice. A preoperative administration of ethanol for 2 weeks was significantly inhibiting expression of these genes. In all animals the expression of *BDNF* gene was inversely proportional to a *IL1-beta* gene expression ( $r_{xy}=-0,4147$ ,  $p<0,0001$ ). A chronic alcohol administration had no influence on expression of *BDNF* gene. The expression of *NT-3* gene was significantly reduced on a fourth postoperative day without and on the third postoperative day with pneumonia. The time analysis showed a significant increase of *IL-1beta* gene expression on 4th postoperative day in comparison to 3rd day in all operated animals without a pneumonia. In case of *TNF-alpha* this effect was observed only in the Sham-group.

**Conclusions:** An administration of alcohol for 2 weeks reduced the gene expression of proinflammatory cytokines *IL-1beta* and *TNF-alpha* during the postoperative infection with *Klebsiella pneumoniae* in the brain of balb/c-mice. The influence of proinflammatory cytokine inhibition on the brain could be clarified using cell death assays as well as behavioral tests.

### 3. Zusammenfassung

**Titel:** Wirkung von Ethanol auf die neuronale Expression von Zytokinen und Neurotrophinen in einem murinen Pneumoniemodell.

**Einleitung:** Chronischer Alkoholkonsum verursacht eine Funktionsstörung des Immunsystems und erhöht das Risiko postoperativer Sterblichkeit in Folge nosokominaler Infektionen. Periphere Entzündungen als Reaktion auf Operationen oder Infektionen können die Funktion des zentralen Nervensystems (ZNS) beeinträchtigen, einschließlich Gedächtnis und Kognition. Das Ziel dieser Arbeit war es, zu untersuchen, wie chronischer Alkoholkonsum die Biosynthese der proinflammatorischen Zytokine IL-1beta und TNF-alpha sowie der Neurotrophine BDNF und NT-3 während einer postoperativen Infektion mit *Klebsiella Pneumoniae* im Gehirn beeinflusst.

**Methodik:** 94 weibliche 9 Wochen alte Balb/c-Mäuse wurden über 14 Tage mit Ethanol (EtOH, 3,8 mg/kg/KG) bzw. NaCl vorbehandelt (i.p.) und am 14. Tag laparotomiert. Am 16. Tag des Versuches wurde den Tieren entweder NaCl-Lösung oder *Klebsiella pneumoniae* nasal appliziert. 24 h bzw. 48 h danach erfolgte die Tötung und die Präparation des Gehirns. Die Expression der Zytokine und Neurotrophine wurde auf Genebene mittels quantitativer Real Time PCR, auf Proteinebene mittels Enzyme-linked immunosorbent Assay (ELISA) oder Western Blot Analyse bestimmt.

**Ergebnisse:** Eine postoperative Infektion mit *Klebsiella pneumoniae* führte nach 24 h zu einer signifikant erhöhten Genexpression von *IL-1beta* und *TNF-alpha* im Gehirn der Mäuse, eine preoperative Ethanolgabe über 2 Wochen hemmt diese Genexpression signifikant. Bei allen Tieren ist die *BDNF*-Genexpression umgekehrt proportional zur *IL-1beta*-Genexpression ( $r_{xy} = -0,4147$ ,  $p < 0,0001$ ). Eine chronische Alkoholgabe hat keinen Einfluss auf die Genexpression von *BDNF*, die Genexpression von *NT-3* sinkt am vierten postoperativen Tag signifikant sowie am dritten postoperativen Tag während der Pneumonie. Ein zeitlicher Vergleich zeigte bei allen operierten Tieren ohne Pneumonie eine signifikante Zunahme der *IL-1beta* Genexpression am 4. postoperativen Tag im Vergleich zum 3. Tag, für *TNF-alpha* nur bei den Sham Tieren.

**Schlussfolgerung:** Eine Alkoholbehandlung über 2 Wochen senkt die Genexpression der proinflammatorischen Zytokine *IL-1beta* und *TNF-alpha* während einer postoperativen Infektion mit *Klebsiella Pneumoniae* im Gehirn von Balb/c-Mäusen. Welche Auswirkungen die Hemmung der proinflammatorischen Zytokine im Gehirn haben, könnten Zelltodmessungen sowie Verhaltenstests klären.

# 4. Einleitung

## 4.1 Postoperative Sterblichkeit, Alkoholmissbrauch und nosokomiale Infektionen

Die postoperative Sterblichkeit bei nichtkardiologischen Eingriffen liegt in Deutschland bei 2,5%. Dieser Wert variiert in verschiedenen europäischen Ländern, z.B. in Estland 1,2%, in Polen 17,9%, in Lettland 21,5% und für ganz Europa 4%. Bei abdominellen Eingriffen liegt er zwischen 5-7% (5% für hepatobiliäre Chirurgie, 6% für Operationen des unteren Magen-Darm-Trakts und 7% für Operationen des oberen Magen-Darm-Trakts)<sup>1</sup>. Eine deutsche epidemiologische Studie hat nachgewiesen, dass chronischer Alkoholkonsum *per se* die Mortalität um das 4,6 fache für Frauen und um das 1,9 fache für Männer im Vergleich zur allgemeinen Bevölkerung erhöht<sup>2</sup>. Diese Problematik stellt eine große Herausforderung dar, da der Drogen- und Suchtbericht der Bundesregierung von 2017 berichtet, dass in Deutschland 7,8 Millionen Personen zwischen 18 und 64 Jahren täglich hohe Mengen Alkohol konsumieren<sup>3</sup>.

Es ist bekannt, dass chronischer Alkoholkonsum das Risiko postoperativer Sterblichkeit nach großen abdominellen Eingriffen um das Dreifache erhöht<sup>4,5,6</sup>. Frühere Arbeiten von Spies *et al.* 1996, 2001 und 2004 haben gezeigt, dass zu den häufigen Komplikationen bei diesen Patienten eine Lungenentzündung zählt, die den Krankenhausaufenthalt verlängert, oft eine Behandlung auf der Intensivstation erfordert und mit einer schlechteren Prognose assoziiert ist<sup>4,5,7</sup>. Die postoperative Pneumonie kommt im klinischen Alltag oft vor, da etwa 20% der Klinikpatienten missbräuchlich Alkohol konsumieren<sup>7</sup>. Auf Intensivstationen ist sie die häufigste postoperative Komplikation dieser Patientengruppe<sup>4</sup>.

Das erhöhte Risiko einer postoperativen Infektion bei chronischem Alkoholkonsum wird durch eine Funktionsstörung des Immunsystems verursacht<sup>4,6,7,8</sup> und ist drei- bis vierfach höher im Vergleich zu Patienten ohne chronisch erhöhten Alkoholkonsum<sup>4</sup>. Weitere Infektionen, die postoperativ bei Alkoholmissbrauch öfter vorkommen, sind Wundinfektionen, Harnwegsinfektionen, Tracheobronchitis und Sepsis<sup>4</sup>.

Die Infektionen, die sich im Rahmen des Krankenhausaufenthaltes entwickeln (48 h nach der Aufnahme in das Krankenhaus), werden als nosokomiale Infektionen bezeichnet. Die gesamte Prävalenz aller nosokomialen Infektionen, unabhängig von der Alkoholanamnese, lag im Jahr 2016 in Deutschland bei 3,6% und zu den drei häufigsten Infektionen zählen hier untere Atemwegsinfektionen (24%, fast 90% davon waren die Pneumonien, in 35,3% beatmungsassoziiert), postoperative Wundinfektionen (22,4%) und Harnwegsinfektionen

(21,6%). Die höchste Prävalenz der nosokomialen Infektionen wurde auf Intensivstationen beobachtet<sup>9</sup>.

Die nosokomiale Pneumonie verdient hier besondere Beachtung, da sie durch erhöhte Mortalität gekennzeichnet ist. Nach den Daten verschiedener Studien liegt die Letalität nosokomialer Pneumonien bei bis zu 11,8%<sup>10</sup>, wobei bei einer Lungenentzündung mit *Klebsiella pneumoniae* die Sterblichkeitsrate 50% erreichen kann<sup>11</sup>. *Klebsiella pneumoniae* ist ein gram-negatives opportunistisches Stäbchen und wurde bei 9,1% der nosokomialen unteren Atemwegsinfektionen in Deutschland im Jahr 2016 nachgewiesen<sup>9</sup>. Beatmungsassoziierte Pneumonien bei Intensivpatienten werden hauptsächlich durch *Klebsiella*-Spezies hervorgerufen. Da diese Bakterien zunehmende Antibiotikaresistenzen nachweisen, stellt die Therapie der *Klebsiella*-Infektionen im klinischen Alltag eine große Herausforderung dar. Wie alle anderen gram-negativen Erreger besitzt *Klebsiella pneumoniae* den starken Virulenzfaktor Lipopolysaccharid (LPS) auf ihrer Oberfläche, der durch Aktivierung der *Toll-like Rezeptoren* (TLRs), hier im besonderen TLR4, eine Entzündungsreaktion startet<sup>11</sup>.

## **4.2 Alkoholwirkung auf das Immunsystem**

Die zwei wichtigsten Faktoren, die postoperativ das Immunsystem negativ beeinflussen, sind der chirurgische Eingriff *per se* und Ethanol, welcher verschiedene Ebenen der zellulären und humoralen Immunantwort verändert<sup>6,7,8,12,13,14</sup>. Es werden viele negative Wirkungen des Ethanols auf das Immunsystem beschrieben<sup>4,6,7,8</sup>. Zu den wichtigen Alkoholeffekten zählt hier die Expressionshemmung von Zytokinen, die eine Kommunikation zwischen den Immunzellen ermöglichen, sowie viele lokale und systemische Wirkungen aufweisen und daher auch als „Hormone des Immunsystems“ bezeichnet werden<sup>4,12,15</sup> (Abb. 1).



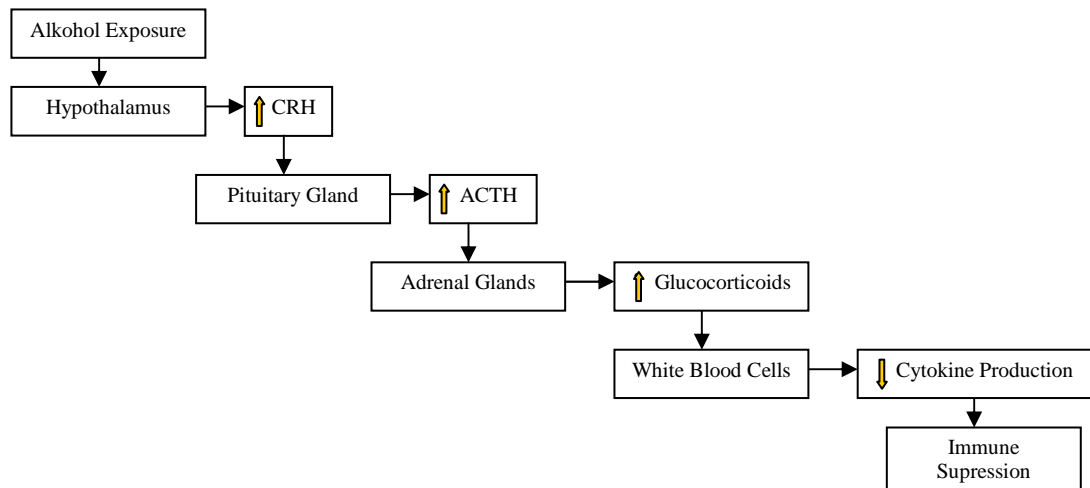


Abbildung 1: Chronischer Alkoholkonsum hemmt das Immunsystem durch Veränderungen der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinde-Achse. Ähnlich einer Stressreaktion kommt es zu einer erhöhten Sekretion von Glucocorticoiden, die Produktion von Zytokinen wird vermindert. CRH - *Corticotropin-releasing hormone*, ACTH – *Adrenocorticotropic hormone*<sup>12</sup>

Die alkoholinduzierte Modulation des Immunsystems ist sehr komplex. Einerseits wurde eine Immunsuppression und eine Inkompetenz in der Bekämpfung der Infektionen beschrieben<sup>4,8,12,16,17</sup>, andererseits verursacht eine chronische Ethanolgabe einen proinflammatorischen Zustand, der mehrere Organe betrifft (Abb. 2)<sup>15</sup>. Im zentralen Nervensystem (ZNS) kommt es zur Aktivierung und Vermehrung der immunkompetenten Mikroglia und Astrozyten. Ethanol schaltet TLR4 und TLR2 durch Interaktion mit *Lipid Rafts* in diesen Zellen an, wobei es zur Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen, unter anderem Interleukin (IL)-1beta und Tumornekrosefaktor-alpha (TNF-alpha) sowie zur Bildung des Inflammasoms kommt, ein Proteinkomplex, der die angeborene Immunantwort initiiert<sup>15,18,19</sup>. Der IL-1beta und TNF-alpha Anstieg im ZNS kann durch andere Mechanismen verstärkt werden. Ethanol zerstört die Barrierefunktion des Darms, wodurch es zur Passage der Residentflora oder ihren Bestandteilen, wie z.B. LPS, ins Blut kommt, was eine systemische Entzündungsreaktion auslöst, die zu einer Neuroinflammation führt<sup>15,16</sup>. Eine Hauptfunktion im Kampf gegen Pathogene im Gehirn haben Mikrogliazellen<sup>20</sup>, die durch LPS ebenso via TLR4 aktiviert werden und eine Immunreaktion auslösen<sup>15,21</sup>. Die Erkennung der Pathogene entsteht hauptsächlich in den zirkumventrikulären Organen, die keine Blut-Hirn-Schranke (BHS) besitzen: das Organum vasculosum laminae terminalis, das Organum subfornicale, die Area postrema und die Eminentia mediana<sup>20</sup>. Chronischer Alkoholkonsum verursacht zunächst einen

TNF-alpha Anstieg in der Leber. Proinflammatorische Zytokine spielen eine große Rolle in der Entwicklung der alkoholinduzierten Leberschädigung<sup>15,16</sup>.

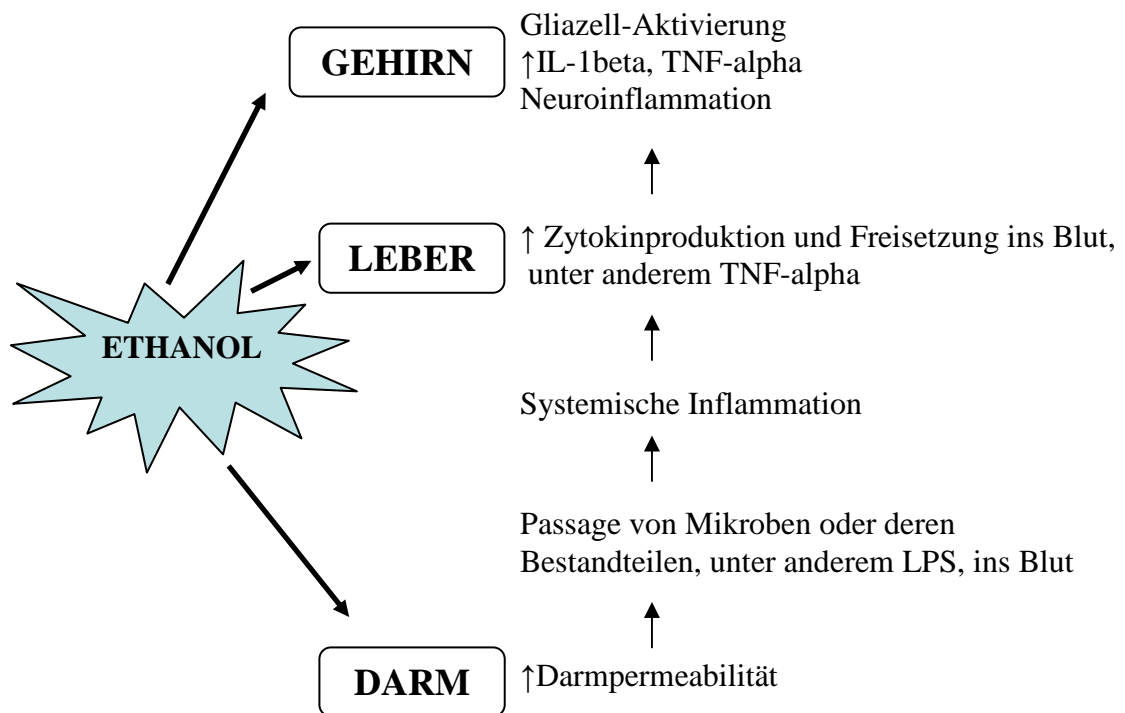


Abbildung 2: Chronische Ethanolgabe verursacht eine Inflammation, die mehrere Organe betrifft. Die Darmpermeabilität wird durch Ethanol erhöht und es kommt zur Passage der Residentflora oder ihren Bestandteilen, z.B. LPS, ins Blut. Infolgedessen wird eine systemische Inflammation gestartet und in der Leber die Zytokinproduktion, unter anderem von TNF-alpha, stark verstärkt. Im Gehirn kommt es zur Gliazell-Aktivierung und Neuroinflammation<sup>15,16</sup>.

#### 4.3 Interaktion von Immunsystem und Gehirn

Die angeborene Immunantwort auf periphere Traumata oder Infektionen induziert eine Neuroinflammation, welche ein Krankheitsverhalten produziert, um weitere Verletzungen einzudämmen und die Reparatur einzuleiten. Das Krankheitsverhalten (*Sickness behavior*) einschließlich der gestörten Wahrnehmung, wird durch neuronale und humorale Bahnen beendet, die die Entzündung gegenregulieren. In klinischen Situationen ist diese angeborene Immunantwort anfällig, da sie durch Alter und Lebensstil beeinflusst werden kann und es zu einer verstärkten oder länger anhaltenden Entzündung kommen kann. Wenn die Entzündung nicht angemessen reguliert wird, stört eine anhaltende Neuroinflammation die synaptische Plastizität, die den Lern- und Gedächtnisaspekten der Kognition zugrunde liegt. Zu den

Komplikationen, die sich daraus ergeben, gehören das postoperative Delirium (POD) und die postoperative kognitive Dysfunktion (POCD)<sup>22</sup>.

In Abbildung 3 ist dargestellt, wie es zum lokalen IL-1beta und TNF-alpha Anstieg im ZNS kommt sowie welche lokalen und systematischen Auswirkungen die Neuroinflammation hat. Zur Aktivierung der Entzündungsreaktion kommt es durch *pathogen associated molecular patterns* (PAMPs, z.B. LPS) und *damage associated molecular patterns* (DAMPs, z.B. zytosolische/nukleare Proteine, die durch belastete oder sterbende Zellen freigesetzt werden via zwei Rezeptorarten: *intracellular pathogen recognition receptors* (PRRs) oder TLRs). Resultierend erfolgt die Inflammasombildung, ein Zustrom von Neurotrophen und die Differenzierung von Lymphozyten. Es kommt zur Synthese von Prostaglandinen und weiteren Zytokinen<sup>21,23,24</sup>.

Die Zytokine, die peripher freigesetzt werden, aktivieren vagale Afferenzen und katecholaminerge Transmission des sympathischen Nervensystems. Es kommt zur Erregung der Mikroglia und IL-1beta / TNF-alpha Freisetzung im Gehirn<sup>25,26</sup>.

IL-1beta sowie TNF-alpha werden als wichtige proinflammatorische Zytokine betrachtet. Im Gehirn werden sie unter anderem von Oligodendrozyten, Mikroglia, Astrozyten und Makrophagen sezerniert. Sie besitzen eine regulatorische Rolle im ZNS und sind an Mechanismen für Lernen, Gedächtnis und Wahrnehmung beteiligt<sup>21,25</sup>. Als wichtiger Teil des Inflammasoms sind sie entscheidend, um die angeborene Immunantwort zu initiieren<sup>21</sup>, unter anderem während einer bakteriellen Pneumonie.

Durch den Übertritt von den im Blut zirkulierenden IL-1beta und TNF-alpha via BHS wird ihr Anstieg im ZNS zusätzlich verstärkt<sup>15,20,25</sup>. Die beiden Zytokine haben eine synergetische Funktion und stimulieren die eigene Sekretion<sup>21</sup>.

Aus der Literatur ist bekannt, dass eine aseptische Operation eine Neuroinflammation verursachen kann<sup>13,14,27</sup>. Su *et al.* 2012 zeigten ursächlich dafür die DAMPs Bildung in operiertem Gewebe mit folgender Aktivierung CCR2+ peripherer Monozyten via PRRs. Es kommt zur Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen in der Peripherie, Störungen der BHS durch TNF-alpha und der Migration von CCR2+ Knochenmarksmakrophagen durch die gestörte BHS ins Gehirn. Diese Zellen setzen weitere proinflammatorischen Zytokine im ZNS frei und verursachen eine Neuroinflammation<sup>13</sup>.

Der lokale Anstieg von IL-1beta und TNF-alpha im ZNS hat eine entscheidende Rolle in der Aktivierung der Akute-Phase-Reaktion, die auch febrile Reaktion genannt wird<sup>28,29</sup>. Sie besitzt eine physiologische Funktion im Kampf gegen systemische und lokale Pathogene, indem sie das autonome Nervensystem, das Hormonsystem und das Verhalten beeinflusst. Zu diesen

Änderungen zählen z.B. die Erhöhung der Körpertemperatur, die Aktivierung der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinde-Achse mit ACTH -Anstieg, *Sickness behavior*, die Anorexie, die Übelkeit und das Erbrechen<sup>20,23,25</sup>.

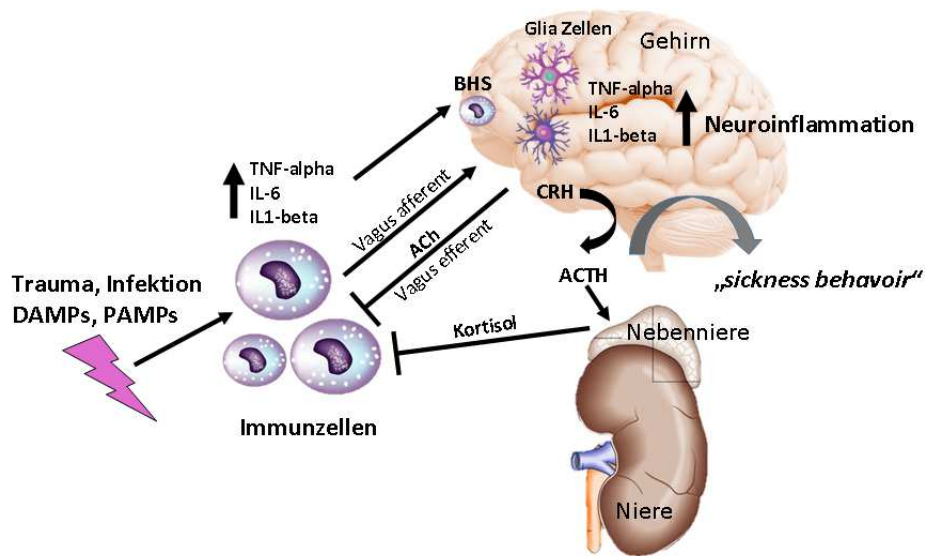


Abbildung 3: **Interaktion von Immunsystem und Gehirn.** *Pathogen-associated molecular pattern molecules* (PAMPs) und *damage-associated molecular pattern molecules* (DAMPs) initiieren eine Immunantwort als Reaktion auf Traumata, Infektion oder Gewebeschäden welche ein Krankheitsverhalten (*sickness behavior*) verursacht, um weitere Verletzungen einzudämmen und die Reparatur einzuleiten. Es existieren drei Wege für den Transport von pro-inflammatorischen Zytokinen zum Gehirn: neural, humoral und zellulär. Der neuronale Weg wird über den afferenten Vagusnerv vermittelt welcher durch Zytokine aktiviert wird. Im Gehirn werden daraufhin pro-inflammatorische Zytokine von Glia Zellen sezerniert. Die Gegenregulation der Entzündungsreaktion erfolgt über den efferenten Vagusnerv mittels Acetylcholin (ACh). Zytokine und andere Stressoren verstärken die hypothalamische Sekretion des Corticotropin-freisetzenden Hormons (CRH), welches eine adrenocorticotrope Hormon (ACTH) Freisetzung induziert und über die Nebenniere zu einer Glukokortikoid-vermittelten entzündungshemmenden Reaktion führt. Beim zellulären Weg infiltrieren Immunzellen über eine gestörte Blut-Hirn-Schranke (BHS) in das Gehirn und setzen dort pro-inflammatorische Zytokine frei. Eine verstärkte oder länger anhaltenden Neuroinflammation kann zu Neurodegeneration und kognitiven Störungen führen<sup>21,30</sup>.

Hohe Konzentrationen von IL-1beta und TNF-alpha haben einen negativen Einfluss auf Neuronen. Die Neuroinflammation verursacht die Entstehung von reaktiven Sauerstoffspezies (*reactive oxygen species*, ROS) und kann via Apoptose zum Zelltod von Neuronen führen. Diese Prozesse umfassen unter anderen Regionen im Gehirn, die für Aufmerksamkeit und Gedächtnis verantwortlich sind (z.B. Kortex und Hippocampus)<sup>13,14,15,21</sup>. Aus klinischer Sicht sind zwei Krankheitsbilder relevant: das postoperative Delirium (POD) und die postoperative kognitive Dysfunktion (POCD), wobei hier überwiegend ältere Patienten betroffen sind. Zu den anderen Risikofaktoren zählen unter anderem präoperativer Alkoholkonsum sowie eine postoperative

Infektion<sup>27,31,32</sup>. POD entwickelt sich akut Stunden bis Tage nach der Operation, beeinträchtigt Aufmerksamkeit und Bewusstsein des Patienten und bildet sich Tage bis Wochen nach dem Eingriff meistens wieder zurück<sup>32</sup>. Die Brain-ICU-Studie 2010 hat die POD Häufigkeit bei 821 Patienten mit Altersmedian 61 als 74% eingeschätzt<sup>33</sup>. Dieses Krankheitsbild ist lebensbedrohlich und erfordert eine Intensivbehandlung, führt zu erhöhter Sterblichkeit, steigenden Behandlungskosten sowie einem erhöhten Risiko, an einer Demenz zu erkranken. POCD unterscheidet sich von der POD durch eine längere Latenz und Dauer (zeigt sich Wochen/Monate nach der Operation und kann mehrere Monate nach dem Eingriff persistieren) sowie durch einen langsameren Beginn der Symptome, unter anderem Aufmerksamkeits- und Gedächtnisstörungen<sup>32</sup>. Sie tritt bei circa 40% der über 60-jährigen Patienten auf, wobei 3 Monate postoperativ immer noch 12% betroffen sind<sup>34</sup>. Zu den wichtigsten Komplikationen, die durch POCD verursacht werden, gehören eine erhöhte Mortalität sowie Funktionseinschränkungen des Patienten<sup>32</sup>.

Eine mögliche Erklärung, warum die Neuroinflammation zur Neurodegeneration führt, liefert die Tatsache, dass IL-1beta und TNF-alpha die Synthese und Wirkung von Neurotrophinen, unter anderem *brain-derived neurotrophic factor* (BDNF) und Neurotrophin (NT)-3, negativ beeinflussen<sup>25,35,36</sup>. Es ist bekannt, dass erhöhtes IL-1beta via Interaktion mit BDNF die Neuroplastizität (Langzeit-Potenzierung) im Hippocampus und dadurch vom Hippocampus abhängige Gedächtnisleistungen beeinträchtigt<sup>36</sup>. Die genaue POD/POCD Pathogenese ist jedoch nicht bekannt<sup>32</sup>.

#### **4.4 Neurotrophine – Link zwischen Neuroinflammation und kognitiven Störungen**

BDNF und NT-3 gehören zu den Wachstumsfaktoren und besitzen eine wesentliche Rolle in der Entwicklung und korrekten Funktion des Nervensystems, unter anderem auch beim Lernen und beim Gedächtnis. Sie werden als Neurotrophin-Präkursoren synthetisiert, die auch biologische Aktivität nachweisen, und in einem *rebounding* Prozess in die reifen Formen umgebaut werden. Nach der Freisetzung in die extrazelluläre Matrix binden sie an mehrere Membranrezeptoren (Abb. 4) und schalten Signalwege ein, die für die Neuroplastizität des Gehirns entscheidend sind. Die Aktivierung von *tyrosine kinase receptors* (TrkA, TrkB oder TrkC) durch BDNF und NT-3 unterstützt unter anderem die Neurogenese, die neuronale Migration, die Zelldifferenzierung, die Myelinisierung, das Zellüberleben, die Synapsenbildung sowie das axonale und dendritische Wachstum<sup>35,37</sup>. Zu den Neurotrophinrezeptoren zählt auch

der *neurotrophin receptor p75* (p75<sup>NTR</sup>), der mehrere Liganden und eine Doppelfunktion hat: seine Freischaltung kann entweder das Zellüberleben oder den apoptotischen Zelltod verursachen<sup>37,38</sup>.

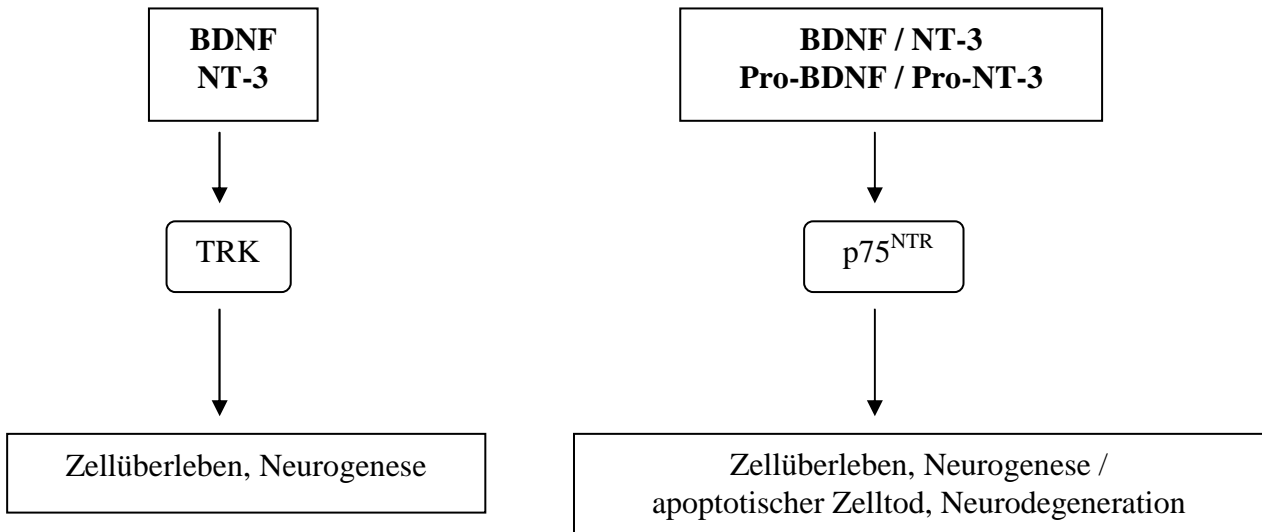


Abbildung 4: **Die intrazellulären Signalwege, die durch Neurotrophine aktiviert werden.** Tyrosinkinase Rezeptorproteine (TRK) werden durch die reifen Formen von BDNF und NT-3 aktiviert. Interessanterweise hat der p75<sup>NTR</sup>-Rezeptor (p75<sup>NTR</sup>) mehrere Liganden, unter anderem sogar die Präkursoren der Neurotrophine (Pro-BDNF, Pro-NT-3). Die komplexe Wirkung der neuronalen Wachstumsfaktoren kann Mechanismen für das Zellüberleben oder den Tod durch Apoptose auslösen<sup>35, 37, 38</sup>.

Mehrere Studien haben den Link zwischen Alkoholkonsum und BDNF-Expression im ZNS untersucht: die akute Ethanolgabe verursacht initial einen Anstieg von BDNF im Corpus striatum, der nach chronischer Intoxikation mit einem BDNF-Abfall im Kortex verbunden ist. Der initiale Anstieg könnte ein Abwehrmechanismus sein, der in der Anfangsphase des Alkoholkonsums schützt. Die spätere Senkung der BDNF-Expression im ZNS ist für die Entwicklung des Alkoholmissbrauchs verantwortlich<sup>19,39,40</sup>. Der Ethanolentzug, dem alkoholranke Patienten während des Krankenhausaufenthalts oft unterzogen werden (z.B. nach einer Operation), ist besonders für das BDNF-Niveau gefährlich. Die Abnahme von BDNF im Gehirn ist mit dem Eintritt des Delirium Tremens assoziiert, das die schwerste Verlaufsform des Entzugssyndroms ist<sup>41</sup> und von der bis zu 50% der Patienten, die Alkohol missbrauchen, postoperativ betroffen sein können<sup>8</sup>.

## 5. Fragestellung und Ziele

Die postoperative Lungenentzündung ist einer der häufigsten Komplikationen bei alkoholkranken Patienten, sie wird oft durch *Klebsiella pneumoniae* verursacht und durch einen schwierigen Verlauf und eine erhöhte Mortalität gekennzeichnet<sup>4,5,7,11,17</sup>. Das genaue Verstehen der Entzündungsreaktion gegen *Klebsiella pneumoniae* sowie Mechanismen, wie chronischer Alkoholkonsum diesen Prozess moduliert, ist wichtig für die Prävention der Pneumonie sowie die Verbesserung der vorhandenen Therapien. Primärziel dieser Arbeit war die Untersuchung, welchen Einfluss chronischer Alkoholkonsum auf die Biosynthese der pyrogenen Zytokine IL-1beta und TNF-alpha im Gehirn während einer postoperativen Infektion mit *Klebsiella pneumoniae* hat. Bisher gibt es keine Studien, die den Alkoholeinfluss auf die IL-1beta und TNF-alpha Produktion im ZNS während einer postoperativen Pneumonie untersucht haben. POD und POCD sind häufige, lebensbedrohliche und die Sterblichkeit erhöhende Komplikationen<sup>31</sup>. Präoperativer Alkoholkonsum sowie postoperative Infektion gehören zu den Risikofaktoren für eine POD oder POCD Entstehung<sup>27,31,32</sup>. Als potentielle Ursache dieser Krankheiten wird die Neuroinflammation und ihre negative Auswirkung auf Neurotrophine, unter anderem BDNF, benannt<sup>25,35,36</sup>. Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es daher zu untersuchen, welchen Einfluss chronischer Alkoholkonsum und eine postoperative Infektion mit *Klebsiella pneumoniae*, allein und in Kombination, auf die postoperative BDNF und NT-3 Synthese im ZNS haben. Bisher gibt es keine Studien, die das untersucht haben.

### Hypothese 1:

- Während einer postoperativen Lungenentzündung mit *Klebsiella pneumoniae* beeinflusst chronischer Alkoholkonsum die Biosynthese der pyrogenen Zytokine IL-1beta und TNF-alpha im Gehirn.

### Hypothese 2:

- Präoperativer chronischer Alkoholkonsum mindert die postoperative Biosynthese der Neurotrophine BDNF und NT-3 im Gehirn.

### Hypothese 3:

- Die postoperative Lungenentzündung mit *Klebsiella pneumoniae* mindert die postoperative Biosynthese der Neurotrophine BDNF und NT-3 im Gehirn.

**Hypothese 4:**

- Während einer postoperativen Lungenentzündung mit *Klebsiella pneumoniae* beeinflusst chronischer Alkoholkonsum die Biosynthese der Neurotrophine BDNF und NT-3 im Gehirn.

Die Forschungshypothesen sollten an einem Mausmodell mittels molekularbiologischer Methoden auf Gen- und Protein-Ebene untersucht werden.



## 6. Material und Methoden

### 6.1 Material

Bezeichnung	Produzent	Ort
-------------	-----------	-----

#### 6.1.1 Chemikalien

Acrylamid (40%)	Roth	Karlsruhe
Agarose	Peqlab	Erlangen
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma-Aldrich	Steinheim
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich	Steinheim
Bromphenolblau	Roth	Karlsruhe
Chloroform	Merck	Darmstadt
dNTPs	Promega	Mannheim
Ethanol (70%)	Merck	Darmstadt
Ethidiumbromid (10mg/ml)	Invitrogen	Paisley, UK
Glycerin	Sigma-Aldrich	Steinheim
Glycin	Roth	Karlsruhe
Isopropanol	Merck	Darmstadt
Milchpulver	Roth	Karlsruhe
PCR Wasser	Braun	Melsungen
Ponceau S	Roth	Karlsruhe
SDS	Roth	Karlsruhe
TEMED	Merck	Darmstadt
Tris-HCl	Roth	Karlsruhe
Tween® 20	Serva	Heidelberg
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich	Steinheim

#### 6.1.2 Puffer und Kits

10xDreamTaq™ Greenn Buffer	Thermo Scientific	Rockford, USA
50x TAE-Puffer	Roth	Karlsruhe
DPBS (10x)	Life Technologies	Kalifornien, USA
GoTaq® Probe qPCR Master Mix	Promega	Madison, USA
Mouse IL-1beta ELISA Ready-SET-Go! ®	Affymetrix eBioscience	San Diego, USA
Mouse TNF alpha ELISA Ready-SET-Go! ®	Affymetrix eBioscience	San Diego, USA
M-MLV RT 5xReaktionspuffer	Promega	Madison, USA
PeqGOLD RNAPure™	Peqlab Biotechnologie	Erlangen
Pierce®BCA Protein Assay Kit	Thermo Scientific	Rockford, USA
RIPA-Puffer	Sigma-Aldrich	Steinheim
SuperSignal® West Pico	Thermo Scientific	Rockford, USA
Trans-Blot® Turbo™ 5x Transfer Buffet	Bio-Rad	München

### 6.1.3 Primer und Sonden

BDNF (forward-/reverse-Primer, Sonde)	Metabion	München
HPRT (forward-/reverse-Primer, Sonde)	Metabion	München
IL-1beta (forward-/reverse-Primer, Sonde)	Metabion	München
NT-3 (forward-/reverse-Primer, Sonde)	Metabion	München
$\beta$ -Aktin (forward-/reverse-Primer)	Metabion	München
TNF-alpha (forward-/reverse-Primer, Sonde)	Metabion	München

### 6.1.4 Antikörper

Anti-goat	SouthernBiotech	Birmingham, USA
Anti-rabbit	SouthernBiotech	Birmingham, USA
BDNF (N-20): sc-546	Santa Cruz	Dallas, Texas, USA
NT-3 (E-14): sc-33907	Santa Cruz	Dallas, Texas, USA
$\beta$ -Aktin A5316	Sigma	Missouri, USA

### 6.1.5 Molekulargewichtsmarker

GeneRuler™ 100bp DNA Ladder	Fermentas	St. Leon-Rot
Precision Plus Protein™ Kaleidoskope™ Standard	Bio-Rad	München

### 6.1.6 Enzyme

Dnase (2U/ $\mu$ L)	Thermo Scietific	Rockford, USA
DreamTaq™ DNA Polymerase (5U/ $\mu$ L)	Thermo Scietific	Rockford, USA
M-MLV Reverse Transkriptase (200U/ $\mu$ L)	Promega	Madison, USA
Rnasin (R) Ribonuclease Inhibitors (40U/ $\mu$ L)	Promega	Madison, USA

### 6.1.7 Geräte, Instrumente

7500 Realtime PCR System	Applied Biosystem	Darmstadt
BioRad	Power Pac™ HC	München
FastPrep®-24	M.P. Biomedicals	Irvine, California, USA
Fusion solo S vilber lourmat	Peqlab Biotechnologie	Erlangen
Kern PKT 3000-2	KERN&Sohn GmbH	Balingen
Mikrowelle	Bosch	Gerlingen
Mini-Protean® Tetra Cell	Bio-Rad	München
Molecular Imager® ChemiDoc™ XRS+	Bio-Rad	München
NanoDrop ND-1000	Peqlab Biotechnologie	Erlangen
PCR Thermozykler vapo.protect	Eppendorf	Hamburg
Pipetten 10 $\mu$ l, 100 $\mu$ l, 1000 $\mu$ l	Eppendorf	Hamburg
Power Pac™ HC	Bio-Rad	München

Thermomixer compact	Eppendorf	Hamburg
Transfer-Blot® Turbo™ Transfer System	Bio-Rad	München
Vortex Genie 2	Scientific Industries	New York, USA
Vortex Mixer VF2	Janke&Kunkel	Staufen
Zentrifuge 5415R	Eppendorf	Hamburg
Zentrifuge 5424	Eppendorf	Hamburg
Zentrifuge 5804	Eppendorf	Hamburg
Mikrotiterplattenreader Ifinite M200	Tecan	Crailsheim

### 6.1.8 Verbrauchsmaterialien

96-Well Plate	Trevigen®	Maryland
Einmalhandschuhe	VWR International bvba	Malaysia
Extra Thioick Blot-Paper (15x20cm)	Bio-Rad	München
Glas- und Spacer-Platten (0,75mm)	Bio-Rad	München
MicroAmp® Optical Adhesive Film PCR Compatible	Applied Biosystem	Kalifornien, USA
Nitrocellulose Membran (0,2µm)	Bio-Rad	München
PCR 8er-SoftStrips 0,2ml Farblos	Biozym Biotech Trading GmbH	Wien, Österreich
PCR 96-Well TW-MT-Platte, farblos	Biozym Biotech Trading GmbH	Wien, Österreich
Pipettenspitzen 10µl, 100µl, 1000µl	Sarstedt	Nümbrecht
Reaktionsgefäße 0,5 und 1,5ml	Sarstedt	Nümbrecht
Serologische Pipetten 5 und 10ml	Falcon ®	Durham, USA

### 6.1.9 Software

7300 System Software	Applied Biosystem	Kalifornien, USA
Fusion	Peqlab Biotechnologie	Erlangen
GraphPad Prism 4	GraphPad Software	La Jolla, USA
Magellan TM Data Analysis Software	Tecan	Crailsheim
NanoDrop 2000	Peqlab Biotechnologie	Erlangen

### 6.1.10 Lösungen

Bezeichnung	Zusammensetzung
1% BSA-Lösung	1% BSA in PBST
5x Laemmli-Puffer	0,05% Bromphenolblau, 20% Glycerin, 10% β-Mercaptoethanol, 10% SDS, 2 mM Tris-HCl (pH 6,8)
10x Laufpuffer (SDS-PAGE)	1,92 M Glycin, 250mM Tris-HCl (pH 8,3), 1% SDS
5% Milchpulver-Lösung	5% Milchpulver in PBST
4x Sammelgelpuffer	0,4% SDS, 0,5 M Tris-HCl (pH 6,8)
4x Trenngelpuffer	0,4% SDS, 1,5 M Tris-HCl (pH 8,8)
PBST	1x PBS mit 0,05% Tween® 20

## 6.2 Methodenübersicht

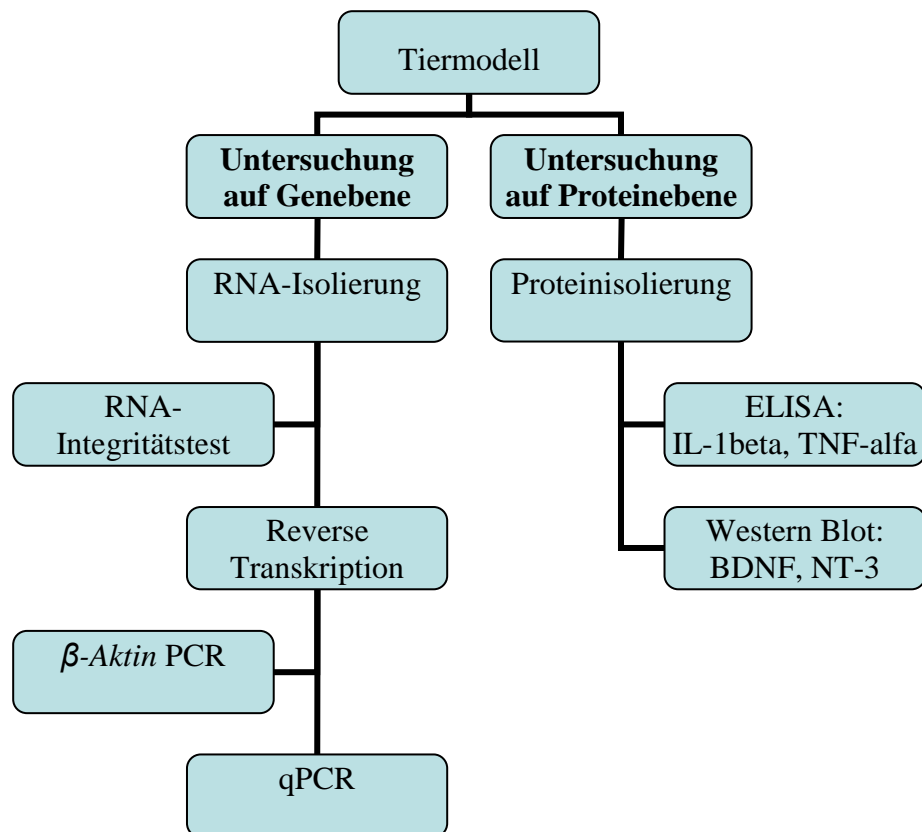


Abbildung 5: Die Darstellung der angewendeten Methoden für die Gen- und Proteinexpressionsmessung der Zytokine IL-1beta und TNF-alpha und der Neurotrophine BDNF und NT-3.

## 6.3 Tiermodell

Alle Versuchsverfahren wurden durch das Landesamt für Gesundheit und Soziales (LaGeSo), Berlin genehmigt (Genehmigungsnummer: G-0213/05). Die verwendeten weiblichen neun Wochen alten Balb/c-Mäuse stammten aus der Zuchtstation Charles River (Sulzfeld, Deutschland) und wurden in der tierexperimentellen Einrichtung, Campus Virchow Klinikum, Berlin gehalten. Die Tiere hatten einen 12h/12h Licht-Dunkel-Wechsel, Wasser und Futter *ad libitum* sowie eine pathogenfreie und temperaturkontrollierte Umgebung.

Nach einer Woche Adaptationszeit (Abb. 6) erfolgte über 14 Tage 1x täglich eine Injektion mit Ethanol (i.p., 3,8 mg/kg/KG) bzw. physiologische Kochsalzlösung (jeweils um 8:30 Uhr). Am 14. Tag wurden die Mäuse einer medianen Laparotomie des Unterbauchs unterzogen, unter einer Inhalationsnarkose mit Sauerstoff (0,8 L/min) und Isofluran (1,5-2%). Die Operation umfasste das sterile Öffnen des Peritoneums auf 2 cm, das Schließen der Bauchhöhle mit Einzelknopfnähten (Vicryl 5/0) und das Einsetzen eines Sprühverbandes. Am 2. postoperativen Tag (Tag 16), während einer Narkose mit Midazolam (100 mg/kg/KG) und Ketamin

(4 mg/kg/KG), wurde den Tieren *Klebsiella pneumoniae*  $6 \times 10^4$  KBE in 50  $\mu$ L NaCl 0,9% bzw. 50  $\mu$ L NaCl 0,9% intranasal appliziert. 24 h bzw. 48 h danach wurden die Tiere unter Narkose (250 mg/kg/KG Ketamin und 100 mg/kg/KG Midazolam) mittels Genickbruch getötet, es erfolgte eine rasche Dekapitierung, die Gehirnentnahme und das Einfrieren des Materials bei -80 °C.

1. Woche	Tag 1-13	Tag 14	Tag 15	Tag 16	Tag 17	Tag 18
Adaptation						
	EtOH/NaCl Injektion (i.p.)			Infektion: Sham / <i>K. pneumoniae</i>		
		OP				
					Tötung der 24 h-Gruppen und Gehirnentnahme	Tötung der 48 h-Gruppen und Gehirnentnahme

Abbildung 6: Zeitlicher Versuchsablauf

Die Gruppeneinteilung der Tiere basierte auf der Vorbehandlungsart (NaCl oder Ethanol), dem Infektionstyp (Sham oder *K.pneumoniae*) sowie dem Tötungszeitpunkt (24 h oder 48 h)(Tab. 1).

Tabelle 1: Gruppeneinteilung

Nr.	Art der Vorbehandlung + OP + Art der Infektion	Tötungszeitpunkt in h (nach Tag 16)	Anzahl der Tiere	Name der Gruppe
1.	NaCl i.p. + OP	24	8	NaCl+OP-24h
2.	NaCl i.p. + OP	48	8	NaCl+OP-48h
3.	EtOH i.p. + OP	24	8	EtOH+OP-24h
4.	EtOH i.p. + OP	48	8	EtOH+OP-48h
5.	NaCl i.p. + OP + Sham	24	8	NaCl+OP+Sham-24h
6.	NaCl i.p. + OP + Sham	48	8	NaCl+OP+Sham-48h
7.	EtOH i.p. + OP + Sham	24	8	EtOH+OP+Sham-24h
8.	EtOH i.p. + OP + Sham	48	8	EtOH+OP+Sham-48h
9.	NaCl i.p. + OP + <i>K. pneumoniae</i>	24	8	NaCl+OP+Kleb.-24h
10.	NaCl i.p. + OP + <i>K. pneumoniae</i>	48	8	NaCl+OP+Kleb.-48h
11.	EtOH i.p. + OP + <i>K. pneumoniae</i>	24	7	EtOH+OP+Kleb.-24h
12.	EtOH i.p. + OP + <i>K. pneumoniae</i>	48	7	EtOH+OP+Kleb.-48h

## **6.4 Genexpressionsanalyse**

### **6.4.1 RNA-Isolierung**

Zur Untersuchung der Genexpression erfolgte die Isolierung der Gesamt-RNA gemäß der Guanidinisothiocyanat-Phenol-Chloroform Extraktionsmethode<sup>42</sup>.

Zuerst wurden ca. 100 mg des tiefgefrorenen Gehirngewebes abgeschnitten, so dass die Regionen Kortex, weiße Substanz, Basalganglien und limbisches System, möglichst eingeschlossen waren. Die Homogenisierung der Proben erfolgte in 800 µL peqGOLD RNAPure<sup>TM</sup> mittels Fast Prep®-24 (Stärke 6.0 über 40 s). Nach einer 5-minütigen Inkubation auf Eis wurde das entstandene Homogenat abpipettiert und in neue Reagenzgefäße überführt. Danach erfolgte eine Zugabe von 160 µL Chloroform, das Mischen der Proben über 10 s und eine erneute 5 minütige Inkubation auf Eis. Im nächsten Schritt erfolgte eine Phasentrennung durch Zentrifugation für 5 min bei 12.000 g und 4 °C. Die wässrige obere Phase enthielt die RNA und wurde in neue Reagenzgefäße für die weitere Verwendung überführt. Ein gleiches Volumen Isopropanol wurde hinzugegeben, die Proben für 10 s gemischt, 15 min auf Eis inkubiert und für 10 min bei 12.000 g und 4 °C zentrifugiert, so dass der Überstand abpipettiert und entsorgt werden konnte. Das verbliebene Pellet wurde in weiteren Zentrifugationsschritten (5 min, 12.000 g, 4 °C) zweimal mit 300 µL 70% Ethanol gewaschen, getrocknet und in 30 µL H<sub>2</sub>O gelöst (3 min Inkubation im Thermomixer bei 55 °C). Die Lagerung der Proben erfolgte bei -80 °C.

Die Konzentrationsbestimmung der Gesamt-RNA erfolgte mittels photometrischer Messung mit dem NanoDrop: es wurde jeweils 1 µL der hergestellten RNA-Lösung verwendet, um die Absorption bei einer Wellenlänge von 260 und 280 nm zu erfassen. Die Reinheit wurde über die Absorptionsverhältnisse 260/280 und 260/230 automatisch berechnet<sup>43</sup>.

### **6.4.2 RNA-Integritätstest**

Zuerst wurde 1,5 g Agarose in 100 mL 1x TAE-Puffer aufgelöst (durch kurzes Aufkochen in der Mikrowelle) und nach der Abkühlung 10 µL Ethidiumbromid zugegeben. Die fertige Mischung wurde in eine Gelkammer gegossen und nach 30 Minuten Wartezeit konnte der Probenauftrag erfolgen: jeweils 1 µg der RNA und 1 µL 10xDreamTaq<sup>TM</sup> Trenn Buffer aufgefüllt mit PCR Wasser bis zu einem Volumen von 10 µL. In die erste Geltasche wurde 10 µL eines DNA-Molekulargewichtsmarker aufgetragen. Der Gellauf erfolgte über 45 min bei 100 V in 1x TAE-Puffer, danach wurde die RNA und ggf. Kontaminationen (Proteine, DNA) mittels UV-Licht und Molecular Imager® detektiert.

### 6.4.3 Reverse Transkription

Für jede Probe wurde folgende Lösung vorbereitet: 4 µg RNA, PCR-H<sub>2</sub>O bis zum Volumen von 21,5 µL plus 2 µL Oligo(dt)Primer. Nach einer Inkubation von 10 min bei 75 °C wurde der Mastermix (Zusammensetzung s. Tab. 2) hinzugegeben und es erfolgte eine weitere Inkubation im PCR Thermozykler für 30 min bei 37 °C und 5 min bei 75 °C. Anschließend wurde für jeden Ansatz 1 µL M-MLV Reverse Transkriptase und 1 µL Rnasin® Ribonuclease Inhibitor hinzugegeben, 1 h bei 42 °C inkubiert und mit einem kurzen Temperaturanstieg (5 min, 95 °C) beendet.

Tabelle 2: Reverse Transkription – Bestandteile des Mastermix für eine Probe

Bestandteil	Volumen (µL)
M-MLV RT 5x Reaktionspuffer	8
dNTPs	4
DNase	2
Rnasin® Ribonuclease Inhibitors	0,5
Gesamtvolumen	14,5

### 6.4.4 $\beta$ -Aktin Kontroll PCR

1 µL der cDNA wurde mit jeweils 49 µL des Mastermix (Zusammensetzung s. Tab. 3) gemischt. Es erfolgten zwei Kontrollen: statt cDNA wurden einmal 1 µL Wasser (Negativkontrolle) und einmal 1 µL RNA(-RT Kontrolle) verwendet. Das Programm für  $\beta$ -Aktin wurde im PCR Thermozykler gestartet (Tab. 5), im Anschluss erfolgte eine horizontale Elektrophorese im Agarosegel (analog zu Schritt 6.4.2.).

Tabelle 3:  $\beta$ -Aktin-PCR - Bestandteile des Mastermix für eine Probe

Bestandteil	Volumen (µL)
DreamTaq™ green Buffer	5
F-Primer (0,5 µM)	4
R-Primer (0,5 µM)	4
dNTPs (2,5 mM)	4
DreamTaq™ DNA Polymerase	0,3
PCR-H <sub>2</sub> O	31,7
Gesamtvolumen	49

Tabelle 4:  $\beta$ -Aktin-PCR - Sequenzen der verwendeten Primer

F-Primer	GTACAACCTCCTTGCAG CTCCT
R-Primer	TTGTCGACGACGACGGC

Tabelle 5: Programm für  $\beta$ -Aktin Kontroll PCR

Temperatur (°C)	Zeit	Zyklenzahl
95	5 min	1
95	30 s	40
58	45 s	
72	45 s	
72	7 min	1

### 6.4.5 Quantitative Real Time PCR

Die quantitative Real Time PCR (qPCR) wurde mit den selektiven FAM-TAMRA-Sonden durchgeführt<sup>44</sup>. Die Genexpression wurde mittels relativer Quantifizierung, der delta-delta Ct Methode, berechnet<sup>45</sup>. Als Haushaltsgen wurde *HPRT* verwendet. Für jede untersuchte Probe erfolgte eine Dreifachbestimmung (die verwendeten Materialien und die Angaben für den Thermozykler sind in Tab. 6-8 dargestellt), die Werte mit einer  $SD > 0,3$  wurden in die Auswertung nicht mit eingeschlossen.

Tabelle 6: qPCR - Bestandteile des Mastermix für einen Ansatz (+3,25  $\mu$ L Probe).

Bestandteil	Volumen ( $\mu$ L)
GoTaq® Probe qPCR Master Mix inkl. CXR	7,5
Primermix	3,45
Sonde	0,6
Wasser	0,2
Gesamtvolumen	11,75

Tabelle 7: qPCR - Sequenzen der verwendeten Primer und Sonden

Gen	Sequenzen	
<i>HPRT</i>	F-Primer	ATC ATT ATG CCG AGG ATT TGG AA
	R-Primer	TTG AGC ACA CAG AGG GCC A
	Sonde	TGG ACA GGA CTG AAA GAC TTG CTC GAG ATG
<i>IL-Ibeta</i>	F-Primer	TGACGGACCCCAAAGATGA
	R-Primer	TGCTGCTGCGAGATTTGAAG
	Sonde	CTTCCAAACCTTTGACCTGGGCTGTCC
<i>TNF-alpha</i>	F-Primer	TGC AGT GAC AAG CCC GTA GC
	R-Primer	CTC AGC CAC TCC AGC TGC TC
	Sonde	CGT CGT AGC AAA CCA CCA AGC GGA
<i>BDNF</i>	F-Primer	GGGACTCTGGAGAGCGTGAAT
	R-Primer	TTCGATGACGTGCTCAAAGTG
	Sonde	AGGTTCGAGAGGTCTGACGA
<i>NT-3</i>	F-Primer	TGCAACGGACACAGAGCTAC
	R-Primer	TGCCACATAATCCTCCATT
	Sonde	CTGAGTGACAGCACCCCTTT



Tabelle 8: qPCR - Einstellungen des Thermozyklers

Temperatur (°C)	Zeit	Zyklenzahl
95	2 min	1
95	15 s	45
60	1 min	

### 6.4.6 Effizienzbestimmung

Die Effizienzbestimmung diente zur Überprüfung der Primer sowie der Bestimmung einer optimalen Menge von cDNA für die qPCR. Für jedes zu untersuchende Gen wurden Verdünnungen hergestellt die 12,5 ng, 25 ng, 50 ng und 100 ng cDNA enthielten und die qPCR gemäß dem Protokoll durchgeführt. Anschließend wurde eine lineare Funktion  $x=\log(\text{conc.})$ ,  $y=Ct$  und die Effizienz durch eine Formel:  $E=10^{-1/m}-1$  berechnet. Für jedes Gen wurden die optimalen cDNA-Mengen ausgesucht und weiter verwendet, für die die Effizienz von qPCR zwischen 90-100% lag<sup>46</sup>.

## 6.5 Analyse auf Proteinebene

### 6.5.1 Protein – Isolierung

Die Homogenisierung von 50 bis 100 mg tiefgefrorenen Mausgehirns erfolgte in 300 µL *Radioimmunoprecipitation assay*-Puffer (RIPA) mittels Fast Prep®-24. Nach einer 20 minütigen Inkubation auf Eis wurden die Proben für 10 min bei 3.000 g und 4 °C zentrifugiert. Die obere Phase wurde in neues Reaktionsgefäß überführt und eine zweite Zentrifugation (20 min bei 17.000 g und 4 °C) angeschlossen. Anschließend wurde der Überstand, der die zytosolischen Proteine enthielt, in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bei -80 °C gelagert.

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte mit der *bicinchoninic acid*-Methode (BCA) gemäß der Herstellerangaben<sup>47</sup> sowie mittels des Mikrotiterplattenreaders Ifinite M200 und der Magellan<sup>TM</sup> Data Analysis Software der Firma TECAN.

### 6.5.2 Enzyme-linked immunosorbent Assay

Der Enzyme-linked immunosorbent Assay (ELISA) wurde gemäß der Herstellerangaben durchgeführt<sup>48,49</sup>. Der Verdünnungsfaktor für die Proben lag zwischen 2,4 und 3,43 je nach Volumina, die Absorptionsmessung erfolgte mittels des TECAN Mikrotiterplattenreaders Ifinite M200. Die Konzentration der Zielproteine wurde mit Hilfe der Magellan<sup>TM</sup> Data Analysis Software ermittelt.

### 6.5.3 Western Blot

Die Sammel- und Trenngele für die Western Blot Analyse wurden gemäß Tab. 9 hergestellt. Für den Gelauftrag wurde eine Proteinmenge von 20 µg eingesetzt. Ein Ansatz bestand aus x µL Probe ad 8 µL ddH<sub>2</sub>O. Zusätzlich wurden jedem Ansatz 2 µL 5x Laemmli-Puffer zugesetzt. Anschließend erfolgte eine Protein-Denaturierung (5 min bei 95 °C). Danach wurden die Proben auf Eis gekühlt und zentrifugiert. Jeweils 10 µL Probe wurden dann mit Hilfe einer Pipette in die Geltaschen überführt. Als Molekulargewichtsmarker wurden 2,5 µL des Precisi-on Plus Protein™ Kaleidoscope™ Standards aufgetragen. Die Proteinauftrennung fand zu Beginn bei 100 V für 10 min statt, bis die Bromphenolblau-Front des Laemmli-Puffers das Trenngel erreicht hat, danach bei 150 V weitere 60 min. Nach insgesamt 70 min wurde der Gellauf beendet, die Glasplatten gelöst und die Sammelgelschicht entfernt. Die Trenngele wurden anschließend auf eine Nitrocellulosemembran mittels eines Trans-Blot®Turbo™ Transfer System übertragen (30 min bei 25 V). Um die Transfereffektivität zu prüfen, wurden die Membranen in Ponceau S (0,1%) gefärbt. Anschließend erfolgte ein einmaliges Waschen für 5 min in PBST, eine Inkubation in Milchpulverlösung (5%) für eine Stunde sowie dreimaliges Waschen für 10 min in PBST.

Tabelle 9: Mengenangabe für vier Sammel- und Trenngele

Bestandteilen	Trenngel 10%	Sammelgel 4,5%
4xSammelgelpuffer	-	760 µl
4xTrenngelpuffer	5,0 ml	-
40% Acrylamid	6,7 ml	750 µl
SDS 10%	200 µl	60 µl
Aqua	8 ml	4,4 ml
TEMED	15 µl	6 µl
25% APS	100 µl	60 µl

Die Primärantikörperlösung wurde laut der Tab. 10 mit 1% BSA in PBST vorbereitet und auf die Membranen gegeben.

Tabelle 10: Verdünnung der verwendeten Primärantikörper

Primärantikörper	Verdünnung
anti- BDNF	1:500
anti-NT3	1:200

Die Inkubation erfolgte über die Nacht unter leichtem Schütteln bei 4 °C. Nach dreimaligem Waschen mit PBST für 10 min bei RT wurden die Sekundärantikörper auf die Membranen gegeben (Verdünnung 1:25 000 in PBST) und für eine Stunde unter leichtem Schütteln inkubiert. Es erfolgte erneut das dreimalige Waschen mit PBST für 10 min bei RT. Zur Immundetektion mittels Chemilumineszenz wurden die Membranen in einer Plastikkammer mit Entwicklerreagenz inkubiert und die Chemilumineszenz am Fusion Solo S® gemessen. In Abhängigkeit der zu detektierenden Proteinbande variierte die Expositionszeit von 30 s bis 10 min. Die Intensität korreliert dabei mit der Konzentration des nachzuweisenden Proteins. Als internes Standard-Protein wurde  $\beta$ -Aktin mit einem Molekulargewicht von 42 kDa mitgeführt. Die entstandenen Banden wurden densitometrisch ausgewertet. Zur Normalisierung wurde das Dichteverhältnis vom jeweiligen Zielprotein zum endogenen Kontrollprotein  $\beta$ -Aktin ermittelt. Zum Erhalt der relativen Proteinexpression wurde der Mittelwert der normalisierten Dichtewerte der Kontrollgruppe gebildet und dieser auf den jeweiligen normalisierten Dichtewert eines Tieres bezogen, wobei der Mittelwert der Kontrollgruppe gleich 100% gesetzt wurde.

## **6.6 Statistische Auswertung**

Die statistische Auswertung wurde mit dem Programm GraphPad Prism 4 durchgeführt. Um die verschiedenen Effekte zu untersuchen, wurden die Gruppen miteinander verglichen. Folgende Tests wurden verwendet: Shapiro-Wilk ( $n=8$ ) und Kolmogorov-Smirnov ( $n<8$ ) (Tests auf Normalverteilung), t-test (wenn die beiden verglichenen Gruppen die Normalverteilung haben), Mann-Whitney-U-Test (wenn mindestens eine von den verglichenen Gruppen keine Gauß-Verteilung hat) und Spearman-Korrelation.

## 7. Ergebnisse

### 7.1 RNA-Integritätstest und $\beta$ -Aktin Kontroll-PCR

Die Kontrolle der RNA Integrität wurde mittels Agarosegel durchgeführt. Folgende Abbildung 7 zeigt beispielhaft einen Gellauf.

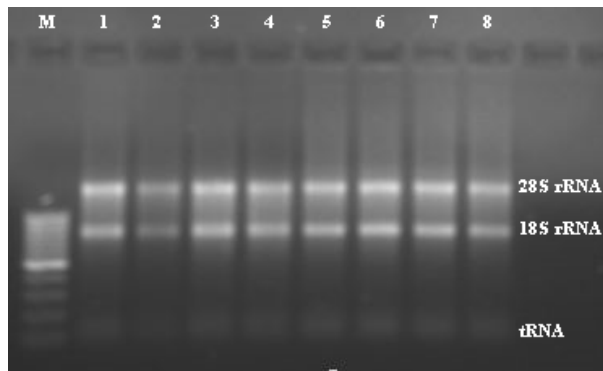


Abbildung 7: Darstellung eines 1,5%igen Agarosegels zur Visualisierung der RNA Integrität. M: Molekulargewichtsmarker GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder, 1-8: verschiedene RNAs.

Abbildung 7 zeigt beispielhaft das Ergebnis eines RNA Integritätstest. In Spur 1 bis 8 sind deutlich die Banden der 18S und 28S rRNA zu erkennen. Dies lässt auf eine intakte RNA schließen. Zusätzlich lässt sich die tRNA in allen Spuren erkennen. Kontaminationen mit genomischer DNA sind nicht sichtbar. Der mitgeführte DNA Marker dient lediglich zur Kontrolle des Gellaufes, Angaben über die Größe der RNA lassen sich mit ihm nicht bestimmen. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die isolierte RNA intakt und somit die Voraussetzungen für geplante Genexpressionsanalysen erfüllt.

Nach Umschreibung der RNA in cDNA mittels reverser Transkription fand eine Überprüfung der cDNA statt. Die dazu verwendete Methode wird als  $\beta$ -Aktin Kontroll PCR bezeichnet. Das Ergebnis des Gellaufes nach  $\beta$ -Aktin Kontroll PCR ist in der folgenden Abbildung 8 dargestellt.

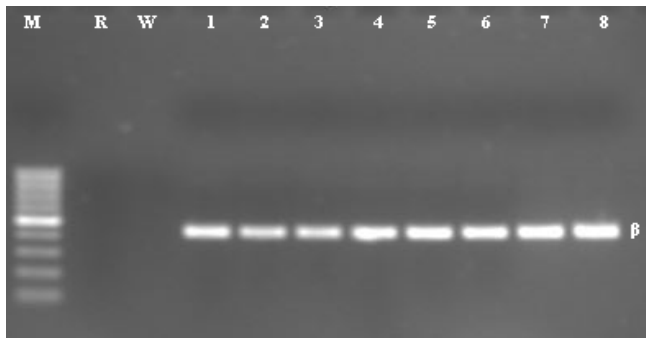


Abbildung 8: Darstellung eines 1,5%igen Agarosegels nach erfolgreicher  $\beta$ -Aktin Kontroll PCR. M: Molekulargewichtsmarker GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder; R: -RT Kontrolle; W: Wasserkontrolle; 1-8 verschiedene cDNAs.

Abbildung 8 ist zu entnehmen, dass alle eingesetzten cDNAs nur ein PCR Produkt zeigen. Dieses besitzt eine Größe von 433 bp und entspricht dem Genprodukt von  $\beta$ -Aktin der cDNA. Es ist keine Kontamination durch genomische DNA zu erkennen, diese wäre an einer zusätzlichen Bande bei 897 bp zu erkennen. Bei dieser Bande würde es sich um das PCR-Produkt des aktiven  $\beta$ -Aktin Gens mit Introns, welches seinen Ursprung in der genomischen DNA hat, handeln. Hierbei ist zu erwähnen, dass die  $\beta$ -Aktin Sequenz in der genomischen DNA mehrfach auftritt. Zum einen als aktives Gen inklusive Introns, welches für die Bande bei 897 bp verantwortlich ist, und zum anderen tritt die  $\beta$ -Aktin Sequenz siebenfach als Pseudogen in der genomischen DNA auf. Die Pseudogene ergeben nach der  $\beta$ -Aktin Kontroll-PCR, genau wie die cDNA eine Bande bei 433 bp. Es ist weiterhin zu erkennen, dass die Wasserkontrolle nicht kontaminiert ist. Auch bei der -RT-Kontrolle, bei der RNA als Matrize eingesetzt wurde, ist keine Bande zu sehen.

## 7.2 Effizienzbestimmung für die quantitative Real Time PCR

Es wurde für alle eingesetzten qPCR Primer eine Effizienzbestimmung durchgeführt. Im Folgenden ist diese beispielhaft für *IL-1beta* detailliert beschrieben. Um die Effizienz zu ermitteln, wurde eine qPCR mit unterschiedlichen cDNA Konzentrationen in einer Dreifachbestimmung durchgeführt. Die Ct Mittelwerte jeder Dreifachbestimmung wurden in einem Diagramm gegen den Logarithmus der Konzentration aufgetragen (Abb. 9).

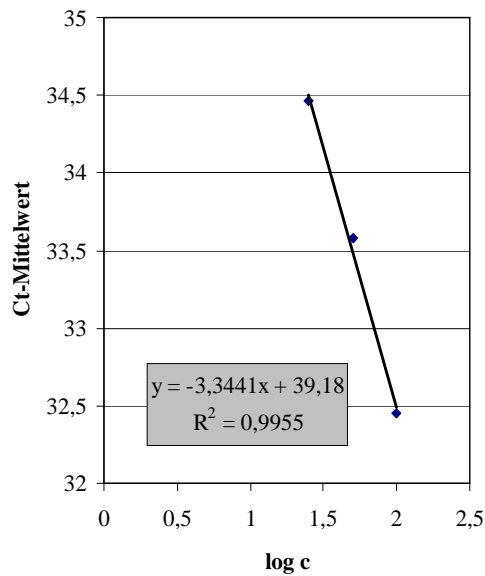


Abbildung 9: Darstellung des Diagramms zur Effizienzbestimmung von *IL-1beta*. Steigung  $m=-3,3441$ .

Die Effizienz lässt sich anhand des Anstiegs der Geradengleichung ablesen. Mit Hilfe der Formel  $E = (10^{-1/m} - 1) \cdot 100$  kann die Effizienz berechnet werden, diese beträgt 99,1%. In folgender Tabelle 11 sind die Effizienzen aller überprüften Primerpaare zusammengefasst.

Tabelle 11: Zusammenfassung der berechneten Effizienzen aller in der Arbeit benötigten Primer.

Gen	Effizienz [%]	optimale cDNA-Menge [ng]
<i>IL-1beta</i>	99,1	25-100
<i>TNF-alpha</i>	90,84	25-100
<i>BDNF</i>	93,43	50-100
<i>NT-3</i>	97,63	12,5-100
<i>HPRT</i>	91,25	12,5-100

Tabelle 11 ist zu entnehmen, dass alle Effizienzen zwischen 90 und 99% liegen. Demnach können sie für die geplanten Genexpressionsanalysen eingesetzt werden. Zudem ist zu erkennen, dass die optimale Einsatzmenge an cDNA, je nach Primerpaar, zwischen 12,5 und 100 ng liegt. Daher wurde für die Genexpressionsanalysen cDNA Mengen zwischen 12,5 und 100 ng eingesetzt.

### 7.3. Expressionsanalyse von IL-1beta

Die Expression von IL-1beta wurde sowohl auf Gen-, als auch auf Proteinebene bestimmt.

#### 7.3.1. Genexpression von IL-1beta

Die mittels qPCR erhaltenen Daten zur *IL-1beta* Genexpression sind in folgender Abbildung 10 dargestellt.

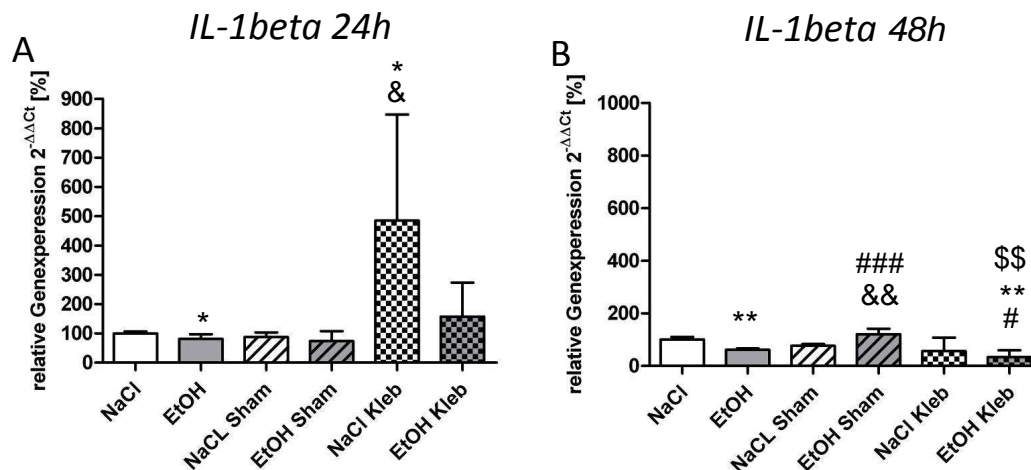


Abbildung 10: Darstellung der relativen Genexpression von *IL-1beta* im Gehirn. Dargestellt sind die Mittelwerte der relativen Genexpressionsänderungen und deren Standardabweichungen nach A: 24 h und B: 48 h. Die jeweiligen NaCl Gruppen wurden 100% gesetzt. Signifikante Unterschiede wurden mit dem *Student's t-Test* oder *Mann-Whitney test* berechnet. Dabei stellen \* $p < 0.01$ , \* $p < 0.05$  die Differenzen zwischen den behandelten Gruppen im Vergleich zur NaCl Kontrollgruppe dar. ### $p < 0.001$ , # $p < 0.05$  repräsentiert den Unterschied zwischen den behandelten Gruppen zur EtOH Gruppe, && $p < 0.01$ , & $p < 0.05$  repräsentiert den Unterschied zwischen den behandelten Gruppen zur NaCl+Sham Gruppe und \$\$ $p < 0.01$  den Unterschied im Vergleich zur EtOH+Sham Gruppe. Jede Gruppe enthielt 7-8 Tiere ( $n=7-8$ ), wobei pro Tier eine Dreifachbestimmung durchgeführt wurde.

Die Ergebnisse zeigen, dass eine Infektion mit *Klebsiella pneumoniae* 24 h nach nasaler Applikation zu einer signifikant erhöhten *IL-1beta* Genexpression im Gehirn der Mäuse im Vergleich zur Gruppe mit einer Sham Infektion ( $p=0.0129$ ) und im Vergleich zur NaCl Kontroll Gruppe ( $p= 0.0478$ ) führt. Eine Sham Infektion mit oder ohne Ethanol hat nach 24 h keinen Einfluss auf die Genexpression von *IL-1beta* im Gehirn der Mäuse. Ethanol alleine erniedrigt zu diesem Zeitpunkt die Genexpression von *IL-1beta* im Gehirn der Mäuse im Vergleich zur NaCl Kontroll Gruppe ( $p= 0.04$ ).

Nach 48 h war die Genexpression von *IL-1beta* durch Infektion mit *Klebsiella pneumoniae* nicht mehr erhöht. Eine *Klebsiella pneumoniae* Infektion, 48 h nach nasaler Applikation, in Kombination mit Ethanol führte zu einer signifikant erniedrigten *IL-1beta* Genexpression im Vergleich zu Ethanol alleine ( $p=0.014$ ). Ethanol führt hier jedoch zu einer tendenziellen

Abnahme der *IL-1beta* Genexpression im Vergleich zur alleinigen *Klebsiella pneumoniae* Infektion. Ethanol alleine zeigte eine leichte aber signifikanten Abnahme der Genexpression von *IL-1beta* ( $p=0.005$ ), ebenso Ethanol in Kombination mit *Klebsiella pneumoniae* ( $p=0.002$ ) im Vergleich zur NaCl Kontroll Gruppe. Im Vergleich zu Ethanol alleine erhöht eine Sham Infektion die *IL-1beta* Genexpression ( $p=0.0006$ ). Die Mäuse die mit Ethanol behandelt wurden und eine nasale Sham Infektion erhielten, wiesen eine signifikant höhere *IL-1beta* Genexpression im Vergleich zur NaCl Sham Gruppe auf ( $p=0.007$ ). Die Tiere der Ethanol *Klebsiella pneumoniae* Gruppe zeigten im Vergleich zur Ethanol Sham Gruppe eine erniedrigte *IL-1beta* Genexpression im Gehirn ( $p=0.0012$ ). Im Vergleich zu den Veränderungen nach 24 h sind alle detektierten Expressionsunterschiede nur sehr schwach.

Zusätzlich wurde der zeitliche Verlauf der *IL-1beta* Genexpression genauer untersucht. Dazu wurde die jeweilige 24 h Gruppe 100% gesetzt. Die dazugehörige Grafik ist in Abbildung 11 dargestellt.

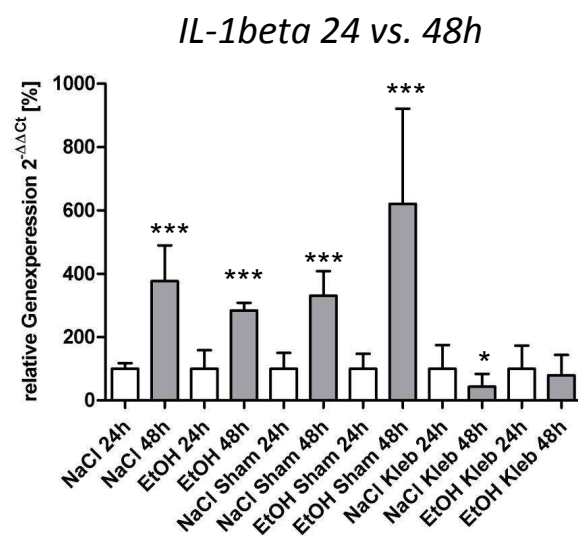


Abbildung 11: Darstellung der relativen Genexpression von *IL-1beta* im Gehirn. Dargestellt sind die Mittelwerte der relativen Genexpressionsänderungen und deren Standardabweichungen. Die jeweiligen 24 h Gruppen wurden 100% gesetzt um Unterschiede der zwei untersuchten Zeitstufen zu erkennen. Signifikante Unterschiede wurden mit dem *Student's t-Test* oder *Mann-Whitney test* berechnet und sind mit \*\*\*  $p<0,001$ , \*  $p<0,05$  (vs. jeweilige 24 h Gruppe) gekennzeichnet. Jede Gruppe enthielt 7-8 Tiere ( $n=7-8$ ), wobei pro Tier eine Dreifachbestimmung durchgeführt wurde.

Nachdem die Genexpressionsunterschiede von *IL-1beta* innerhalb der zwei Zeitstufen untersucht wurden, fand ein Vergleich der Expressionen zwischen den Zeitstufen statt. Die *IL-1beta* Genexpression ist bei den operierten Tieren die nur mit NaCl behandelt wurden nach 48 h im Vergleich zu 24 h signifikant erhöht ( $p= 0.001$ ). Ähnlich Ergebnisse zeigten sich bei den Tieren



die mit Ethanol, bzw. mit einer Sham Infektion behandelt wurden ( $p=0.001$ ). Die Infektion mit *Klebsiella pneumoniae* führte 48 h nach dem Infektionsbeginn zur Senkung von *IL-1beta* nur innerhalb den NaCl behandelten Tiere ( $p=0,0499$ ).

### 7.3.2. Proteinexpression von IL-1beta

Die Expression von IL-1beta wurde mit Hilfe eines ELISAs zusätzlich auf Proteinebene bestimmt. Die Nachfolgende Abbildung 12 zeigt die Ergebnisse der IL-1beta Proteinexpression graphisch.

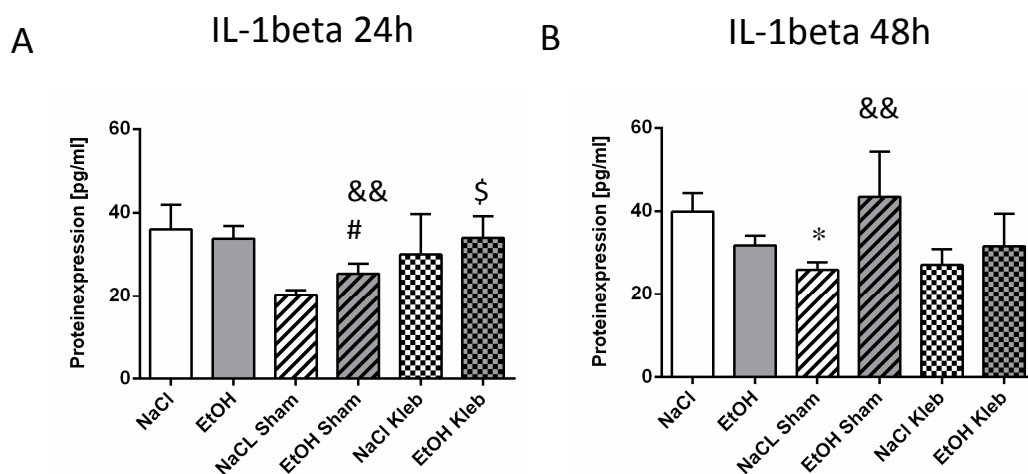


Abbildung 12: Darstellung der IL-1beta Proteinexpression im Gehirn. Dargestellt sind die Mittelwerte der Proteinexpression und deren Standardabweichungen nach A: 24 h und B: 48 h. Signifikante Unterschiede wurden mit dem *Student's t-Test* oder *Mann-Whitney test* berechnet. Dabei stellen \* $p<0.05$  die Differenzen zwischen den behandelten Gruppen im Vergleich zur NaCl Kontrollgruppe dar. # $p<0.05$  repräsentiert den Unterschied zur EtOH Gruppe, && $p<0.01$  den Unterschied zur NaCl+Sham Gruppe und \$ $p<0.05$  den Unterschied im Vergleich zur EtOH+Sham Gruppe. Jede Gruppe enthielt 7-8 Tiere ( $n=7-8$ ).

Auf Proteinebene konnte 24 h nach einer Infektion mit *Klebsiella pneumoniae* mit oder ohne Ethanol keine erhöhte Expression von IL-1beta im Gehirn der Mäuse im Vergleich zur NaCl Kontrollgruppe detektiert werden. Eine nasale Sham Applikation führte zu einer verminderten IL-1beta Expression im Vergleich zur NaCl Kontrollgruppe ( $p=0.0606$ ), bzw. zur Ethanol Gruppe ( $0.0414$ ). In der Ethanol Sham Gruppe sank die IL-1beta Expression weniger stark, was zu einem signifikanten Unterschied der IL-1beta Expression zwischen den Sham Gruppen führte ( $p=0.0028$ ). Eine Infektion mit *Klebsiella pneumoniae* führte in der Ethanol Gruppe im Vergleich zur Sham Infektion zu einer erhöhten Expression von IL-1beta ( $p=0.0283$ ).

Nach 48 h zeigte die Gruppe mit der Sham Infektion ( $p=0.0411$ ) eine verminderte IL-1beta Protein Expression im Vergleich zur NaCl Kontrollgruppe. Dagegen führte in der Ethanol

Gruppe eine Sham Infektion zu einer erhöhten IL-1beta Expression ( $p=0.0815$ ) im Vergleich zu Ethanol alleine. Der Vergleich einer Sham Infektion zwischen der Ethanol Gruppe und der NaCl Gruppe zeigte eine signifikant erhöhte IL-1beta Expression im Gehirn der Tiere, die Ethanol erhalten hatten ( $p=0.0043$ ).

Zusätzlich wurde der zeitliche Verlauf der IL-1beta Proteinexpression untersucht. Dazu wurde die jeweilige 24 h Gruppe 100% gesetzt. Abbildung 13 zeigt die graphische Darstellung der Ergebnisse.

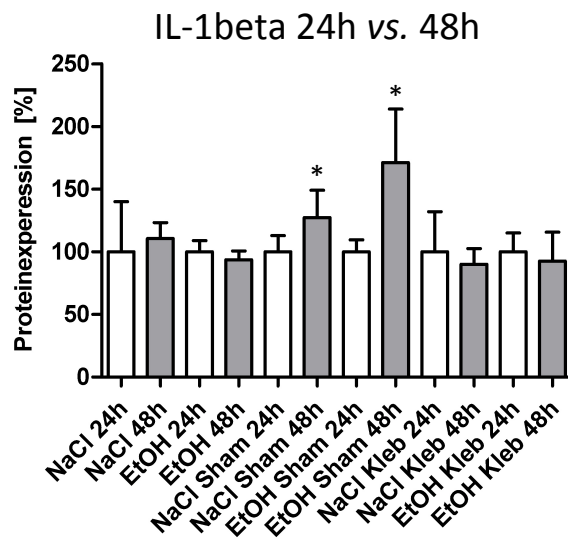


Abbildung 13: Darstellung der Ergebnisse der IL-1beta Proteinexpression im Gehirn. Dargestellt sind die Mittelwerte und deren Standardabweichungen. Die jeweiligen 24 h Gruppen wurden 100% gesetzt um Unterschiede der zwei untersuchten Zeitstufen zu erkennen. Signifikante Unterschiede wurden mit dem *Student's t-Test* oder *Mann-Whitney test* berechnet und sind mit \* $p<0,05$  (vs. jeweilige 24h Gruppe) gekennzeichnet. Jede Gruppe enthielt 7-8 Tiere ( $n=7-8$ ).

Die IL-1beta Proteinexpression ist in der NaCl Sham Gruppe 48h nach *Klebsiella pneumoniae* Infektion im Vergleich zu 24 h signifikant erhöht ( $p=0.0152$ ). Ähnlich Ergebnisse zeigten sich bei den Ethanol Tieren mit einer Sham Infektion. Nach 48 h ist die Proteinexpression von IL-1beta im Vergleich zu 24 h signifikant erhöht ( $p=0.0173$ ).

## 7.4. Expressionsanalyse von TNF-alpha

Die Expression von TNF-alpha wurde sowohl auf Gen-, als auch auf Proteinebene bestimmt.

### 7.4.1. Genexpression von TNF-alpha

Die mittels qPCR erhaltenen Daten zur *TNF-alpha* Expression sind in folgender Abbildung 14 dargestellt.

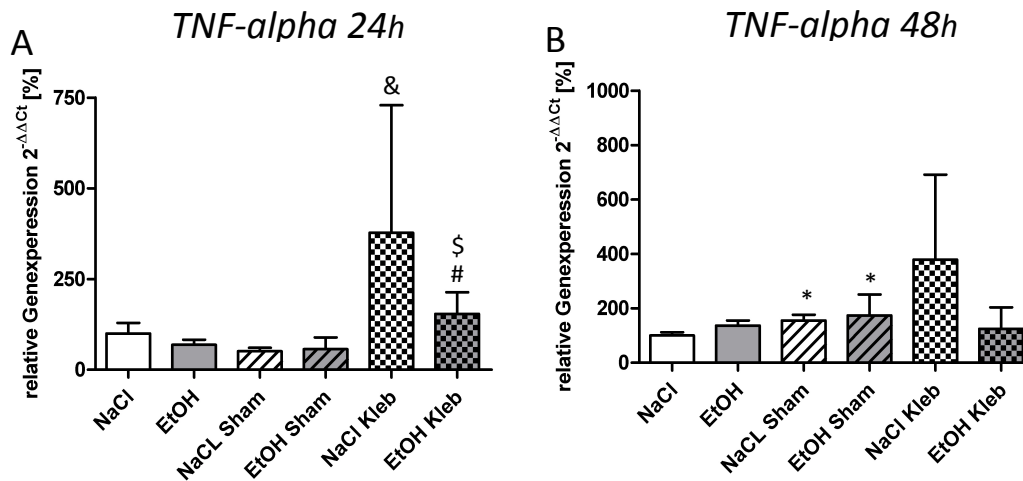


Abbildung 14: Darstellung der relativen Genexpression von *TNF-alpha* im Gehirn. Dargestellt sind die Mittelwerte der relativen Genexpressionsänderungen und deren Standardabweichungen nach A: 24 h und B: 48 h. Die jeweiligen NaCl Gruppen wurden 100% gesetzt. Signifikante Unterschiede wurden mit dem *Student's t-Test* oder *Mann-Whitney test* berechnet. Dabei stellen \* $p < 0.05$  die Differenzen zwischen den behandelten Gruppen im Vergleich zur NaCl Kontrollgruppe dar. # $p < 0.05$  repräsentiert den Unterschied zwischen den behandelten Gruppen zu der EtOH Gruppe, & $p < 0.05$  repräsentiert den Unterschied zwischen den behandelten Gruppen zu der NaCl+Sham Gruppe. § $p < 0.05$  repräsentiert den Unterschied im Vergleich zur EtOH+Sham Gruppe. Jede Gruppe enthielt 7-8 Tiere ( $n=7-8$ ), wobei pro Tier eine Dreifachbestimmung durchgeführt wurde.

Im Gehirn der operierten Mäuse war die *TNF-alpha* Genexpression 24 h nach einer *Klebsiella pneumoniae* Infektion signifikant erhöht im Vergleich zu den Tieren, die eine Sham Infektion erhielten ( $p=0.03$ ). Eine Infektion mit *Klebsiella pneumoniae* in Kombination mit Ethanol führte zu einer signifikanten Erhöhung der *TNF-alpha* Genexpression im Vergleich zur Ethanol Sham Gruppe ( $p=0.03$ ) und zu Ethanol alleine ( $p=0.0443$ ).

Nach 48 h zeigte sich eine erhöhte *TNF-alpha* Genexpression in der Gruppe, die eine *Klebsiella pneumoniae* Infektion in Kombination mit NaCl erhielten im Vergleich zu NaCl Kontrollgruppe ( $p= 0.083$ ). Ebenfalls eine erhöhte Genexpression von *TNF-alpha* im Vergleich zur NaCl Kontrollgruppe zeigte sich in der NaCl Sham Gruppe ( $p=0.0426$ ) sowie der Ethanol Sham Gruppe ( $p=0.0289$ ).

Zusätzlich wurde der zeitliche Verlauf der *TNF-alpha* Genexpression im Gehirn der Mäuse untersucht. Dazu wurde die jeweilige 24 h Gruppe 100% gesetzt. Die dazugehörige Grafik ist in Abbildung 15 dargestellt.

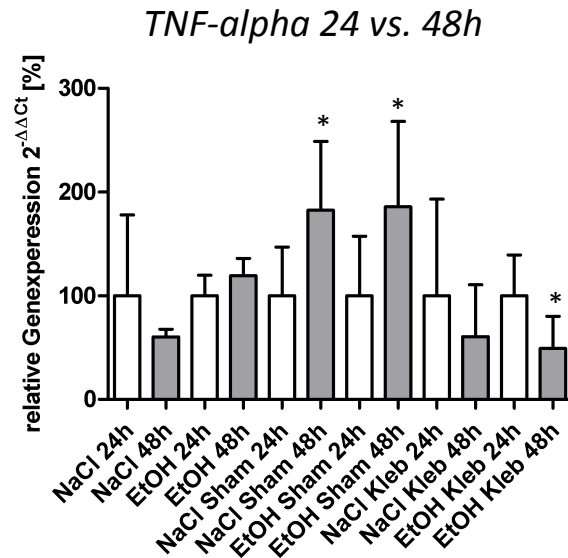


Abbildung 15: Darstellung der relativen Genexpression von *TNF-alpha* im Gehirn. Dargestellt sind die Mittelwerte der relativen Genexpressionsänderungen und deren Standardabweichungen. Die jeweiligen 24 h Gruppen wurden 100% gesetzt um Unterschiede beim Vergleich der zwei untersuchten Zeitstufen zu erkennen. Signifikante Unterschiede wurden mit dem *Student's t-Test* oder *Mann-Whitney test* berechnet und sind mit \* $p < 0,05$  (vs. jeweilige 24 h Gruppe) gekennzeichnet. Jede Gruppe enthielt 7-8 Tiere ( $n=7-8$ ), wobei pro Tier eine Dreifachbestimmung durchgeführt wurde.

Die *TNF-alpha* Genexpression ist bei den Tieren der NaCl Sham Gruppe nach 48 h im Vergleich zu 24 h signifikant erhöht ( $p= 0.0197$ ). Ähnlich Ergebnisse zeigten sich bei den Tieren der Ethanol Sham Gruppe ( $p=0.0296$ ). 48 h nach dem Kontakt mit *Klebsiella pneumoniae* kam es bei den alkoholexponierten Mäusen zu einer *TNF-alpha* Senkung im Vergleich zu 24 h ( $p= 0,0241$ ).

#### 7.4.2 Proteinexpression von *TNF-alpha*

Die Expression von *TNF-alpha* wurde mit Hilfe eines ELISAs zusätzlich auf Proteinebene bestimmt. Die nachfolgende Abbildung 16 zeigt die Ergebnisse der *TNF-alpha* Proteinexpression graphisch.

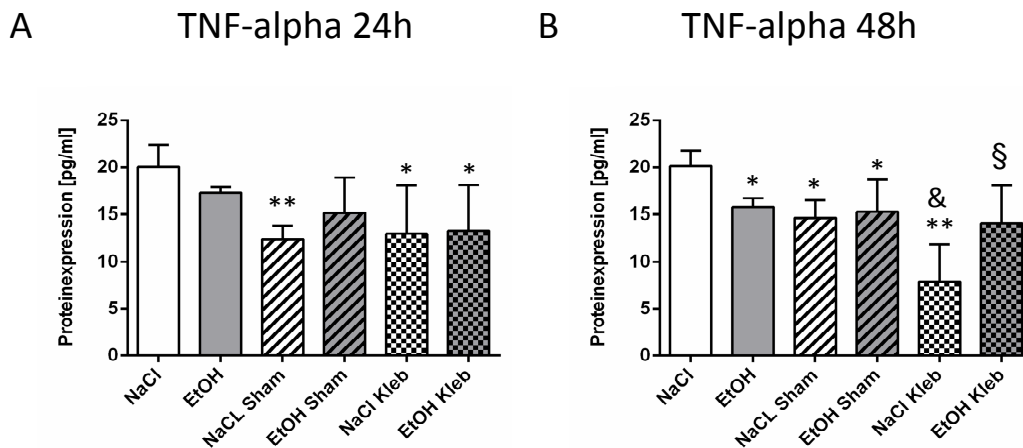


Abbildung 16: Darstellung der TNF-alpha Proteinexpression im Gehirn. Dargestellt sind die Mittelwerte der Proteinexpression und deren Standardabweichung nach A: 24 h und B: 48 h. Die jeweiligen NaCl Gruppen wurden 100% gesetzt. Signifikante Unterschiede wurden mit dem *Student's t-Test* oder *Mann-Whitney test* berechnet. Dabei stellen \*\*  $p < 0.01$ , \*  $p < 0.05$  die Differenzen zwischen den behandelten Gruppen im Vergleich zur NaCl Kontrollgruppe dar, &  $p < 0.05$  den Unterschied zu der NaCl+Sham Gruppe, §  $p < 0.05$  den Unterschied im Vergleich zur NaCl *Klebsiella pneumoniae* Gruppe. Jede Gruppe enthielt 7-8 Tiere ( $n=7-8$ ).

Eine Sham Infektion führte nach 24 h zu einer signifikant verminderten TNF-alpha Proteinexpression im Vergleich zur NaCl Kontrollgruppe ( $p=0.0087$ ), ebenso eine Infektion mit *Klebsiella pneumoniae* ( $p=0.0411$ ) sowie eine Infektion mit *Klebsiella pneumoniae* in Kombination mit Ethanol ( $p=0.0411$ ).

Nach 48 h führte die Behandlung mit Ethanol ( $p=0.0404$ ), eine Shaminfektion in der NaCl Gruppe ( $p=0.0474$ ), eine Shaminfektion in der Ethanolgruppe ( $p=0.0314$ ), als auch eine Klebsielleninfektion in der NaCl Gruppe ( $p=0.0022$ ) und in der Ethanol Gruppe ( $p=0.0572$ ) zu einer verminderten TNF-alpha Proteinexpression im Vergleich zur NaCl Kontrollgruppe. Die TNF-alpha Expression in der NaCl Gruppe mit einer *Klebsiella pneumoniae* Infektion war im Vergleich zu Sham Infektion signifikant vermindert ( $p=0.0307$ ). Dagegen führte die Behandlung mit Ethanol und *Klebsiella pneumoniae* zu einer signifikant erhöhten TNF-alpha Expression in Vergleich zur Klebsiellen Gruppe ohne Ethanol ( $p=0.0309$ ).

Zusätzlich wurde der zeitliche Verlauf der TNF-alpha Proteinexpression untersucht. Dazu wurde die jeweilige 24 h Gruppe 100% gesetzt. Abbildung 17 zeigt die graphische Darstellung der Ergebnisse.

## TNF-alpha 24 vs. 48h

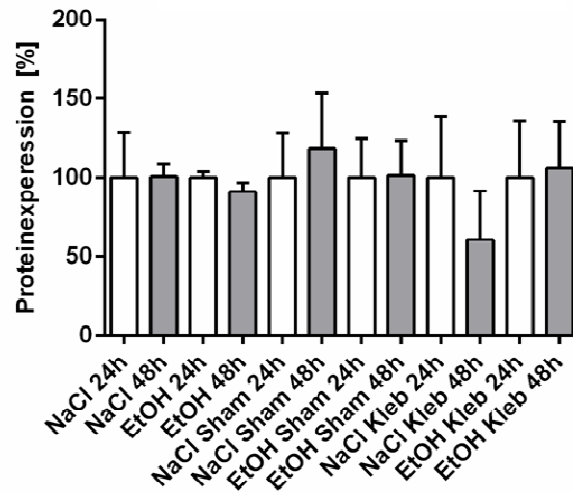


Abbildung 17: Darstellung der Ergebnisse der TNF-alpha Proteinexpression im Gehirn. Dargestellt sind die Mittelwerte und deren Standardabweichungen. Die jeweiligen 24 h Gruppen wurden 100% gesetzt um Unterschiede beim Vergleich der zwei untersuchten Zeitstufen zu erkennen. Jede Gruppe enthielt 7-8 Tiere (n=7-8). Unterschiede wurden mit dem *Student's t-Test* oder *Mann-Whitney test* berechnet.

Die Ergebnisse zeigen in den Gruppen keine signifikanten Unterschiede in der TNF-alpha Proteinexpression zwischen 24 und 48 h im Gehirn der Mäuse.

### 7.5. Expressionsanalyse von BDNF

Die Expression von BDNF wurde sowohl auf Gen-, als auch auf Proteinebene bestimmt.

#### 7.5.1. Genexpression von BDNF

Die mittels qPCR erhaltenen Daten zur *BDNF* Expression sind in folgender Abbildung 18 dargestellt.

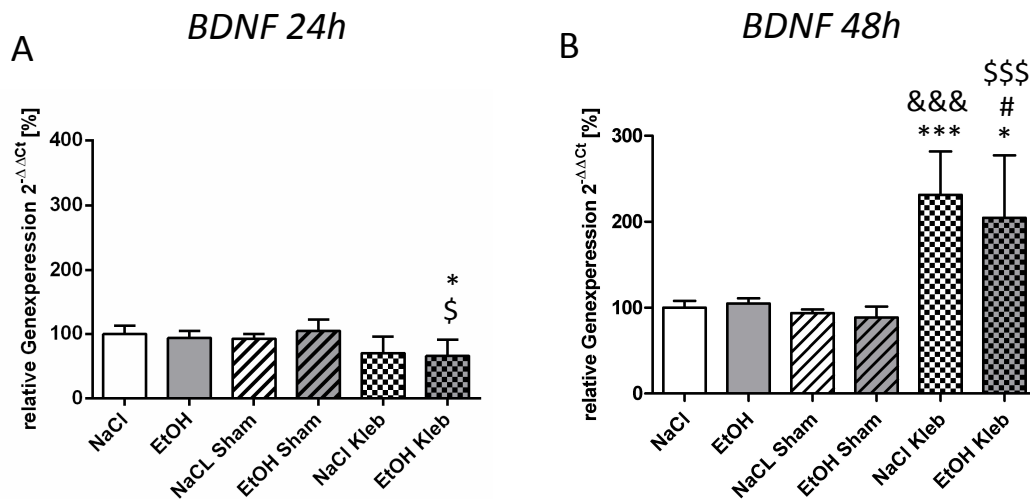


Abbildung 18: Darstellung der relativen Genexpression von *BDNF* im Gehirn. Dargestellt sind die Mittelwerte der relativen Genexpressionsänderungen und deren Standardabweichungen nach A: 24 h und B: 48 h. Die jeweiligen NaCl Gruppen wurden 100% gesetzt. Signifikante Unterschiede wurden mit dem *Student's t-Test* oder *Mann-Whitney test* berechnet. Dabei stellen \*\*\* $p < 0.001$ , \* $p < 0.05$  die Differenzen zwischen den behandelten Gruppen im Vergleich zur NaCl Kontrollgruppe dar. # $p < 0.05$  repräsentiert den Unterschied zwischen den behandelten Gruppen zu der EtOH Gruppe, &&& $p < 0.001$  repräsentiert den Unterschied zwischen den behandelten Gruppen zu der NaCl+Sham Gruppe. \$\$\$ $p < 0.001$ , \$ $p < 0.05$  repräsentiert den Unterschied im Vergleich zur EtOH+Sham Gruppe. Jede Gruppe enthielt 7-8 Tiere ( $n=7-8$ ), wobei pro Tier eine Dreifachbestimmung durchgeführt wurde.

Die Ergebnisse zeigen, dass die Behandlung mit Ethanol in Kombination mit einer nasalen *Klebsiella pneumoniae* Infektion nach 24 h zu einer signifikanten Erniedrigung der *BDNF* Genexpression führte ( $p = 0.0297$ ) im Vergleich zur Gruppe die Ethanol und eine Sham Infektion erhielt. Eine Infektion mit *Klebsiella pneumoniae* in Kombination mit Ethanol führt zu einer Erniedrigung der *BDNF* Genexpression im Vergleich zur NaCl Kontrollgruppe ( $p=0,048$ ). Eine alleinige Gabe von Ethanol sowie eine Sham Infektion mit oder ohne Ethanol hatte keinen Einfluss auf die Genexpression von *BDNF* im Vergleich zur NaCl Kontrollgruppe.

Nach 48 h führte eine Infektion mit *Klebsiella pneumoniae* in der NaCl Gruppe zu einer signifikant erhöhten *BDNF* Genexpression im Vergleich zu einer Sham Infektion ( $p < 0.0001$ ), sowie zur NaCl Gruppe ( $p=0.0007$ ). In der Ethanol Gruppe mit *Klebsiella pneumoniae* Infektion stieg die *BDNF* Genexpression ebenfalls signifikant an im Vergleich zur Sham Infektion ( $p=0.0006$ ), sowie im Vergleich zur Ethanol Gruppe ( $p=0.01$ ) und zur NaCl Gruppe ( $p=0.022$ ).

Zusätzlich wurde der zeitliche Verlauf der *BDNF* Genexpression im Gehirn der Mäuse untersucht. Dazu wurde die jeweilige 24 h Gruppe 100% gesetzt. Die dazugehörige Grafik ist in Abbildung 19 dargestellt.

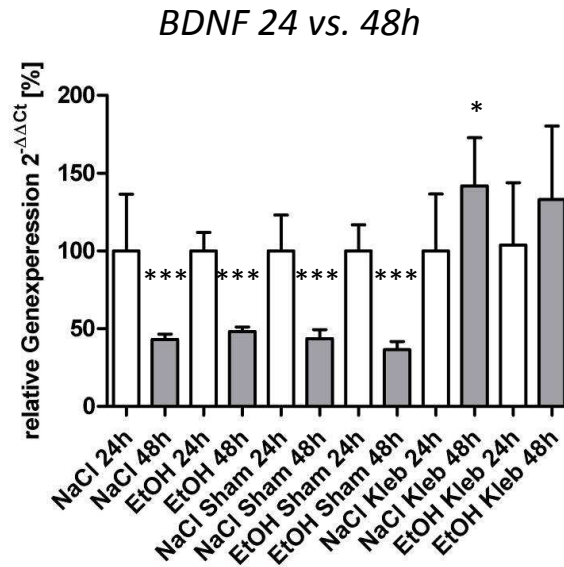


Abbildung 19: Darstellung der relativen Genexpression von *BDNF* im Gehirn. Dargestellt sind die Mittelwerte der relativen Genexpressionsänderungen und deren Standardabweichungen. Die jeweiligen 24 h Gruppen wurden 100% gesetzt um Unterschiede beim Vergleich der zwei untersuchten Zeitstufen zu erkennen. Signifikante Unterschiede wurden mit dem *Student's t-Test* oder *Mann-Whitney test* berechnet und sind mit \*\*\*  $p < 0,001$  sowie \*  $p < 0,05$  (vs. jeweilige 24 h Gruppe) gekennzeichnet. Jede Gruppe enthielt 7-8 Tiere ( $n=7-8$ ), wobei pro Tier eine Dreifachbestimmung durchgeführt wurde.

Bei der *BDNF* Genexpression fand ebenfalls ein Vergleich zwischen den Zeitstufen statt. Die *BDNF* Genexpression im Gehirn ist bei den operierten Tieren, die nur mit NaCl behandelt wurden, 48 h nach *Klebsiella pneumoniae* Infektion im Vergleich zu 24 h signifikant erniedrigt ( $p = 0.0008$ ). Ähnlich Ergebnisse zeigten sich bei den Tieren die mit Ethanol, bzw. mit NaCl und einer Sham Infektion oder Ethanol und einer Sham Infektion behandelt wurden, nach 48 h ist die Genexpression von *BDNF* im Vergleich zu 24 h in allen Gruppen signifikant erniedrigt ( $p < 0.001$ ). Dahingegen ist in der Gruppe die mit NaCl und *Klebsiella pneumoniae* behandelt wurden die Genexpression von *BDNF* 48 h im Vergleich zu 24 h signifikant erhöht ( $p = 0.0274$ ).

### 7.5.2. Proteinexpression von BDNF

Die Expression von BDNF wurde mittels Western Blot Analyse zusätzlich auf Proteinebene bestimmt. Die nachfolgende Abbildung 20 zeigt die Ergebnisse der BDNF Proteinexpression graphisch.



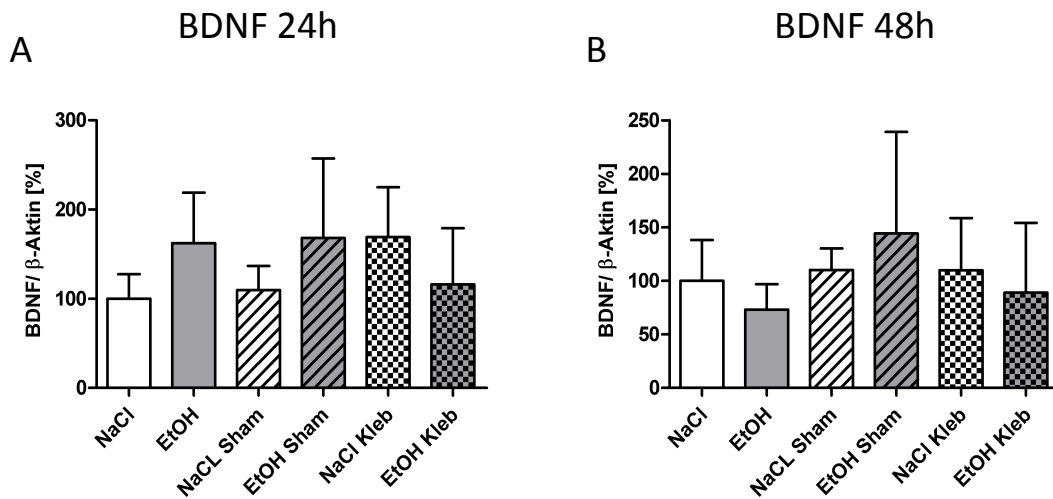


Abbildung 20: Darstellung der BDNF Proteinexpression im Gehirn. Dargestellt sind die Mittelwerte der Proteinexpression und deren Standardabweichung nach A: 24 h und B: 48 h. Jede Gruppe enthielt 7-8 Tiere (n=7-8). Die jeweiligen NaCl Gruppen wurden 100% gesetzt. Unterschiede wurden mit dem *Student's t-Test* oder *Mann-Whitney test* berechnet.

Auf der Proteinebene ergab sich keine signifikante Differenz in der BDNF-Expression in den behandelten Gruppen.

Zusätzlich wurde der zeitliche Verlauf der BDNF Proteinexpression im Gehirn der Mäuse untersucht. Dazu wurde die jeweilige 24 h Gruppe 100% gesetzt. Die dazugehörige Grafik ist in Abbildung 21 dargestellt

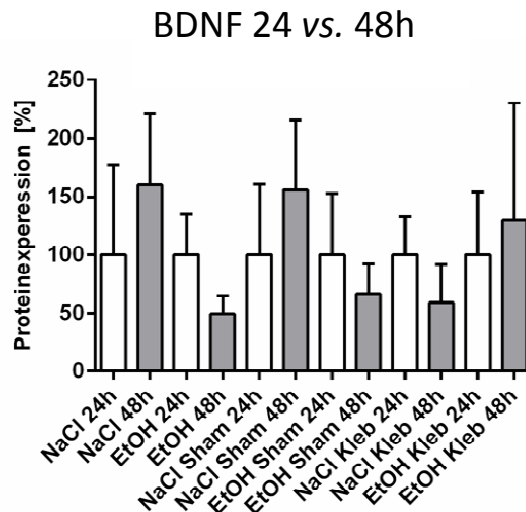


Abbildung 21: Darstellung der Proteinexpression von BDNF im Gehirn. Die jeweiligen 24 h Gruppen wurden 100% gesetzt um Unterschiede bei Vergleich der zwei untersuchten Zeitstufen zu erkennen. Jede Gruppe enthielt 7-8 Tiere (n=7-8). Unterschiede wurden mit dem *Student's t-Test* oder *Mann-Whitney test* berechnet.

Auch der zeitliche Vergleich der Gruppen ergab keine signifikanten Unterschiede in der BDNF Proteinexpression zwischen 24 und 48 h.

## 7.6. Expressionsanalyse von NT-3

Die Expression von NT-3 wurde sowohl auf Gen-, als auch auf Proteinebene bestimmt.

### 7.6.1. Genexpression von NT-3

Die mittels qPCR erhaltenen Daten zur NT-3 Expression sind in folgender Abbildung 22 dargestellt.

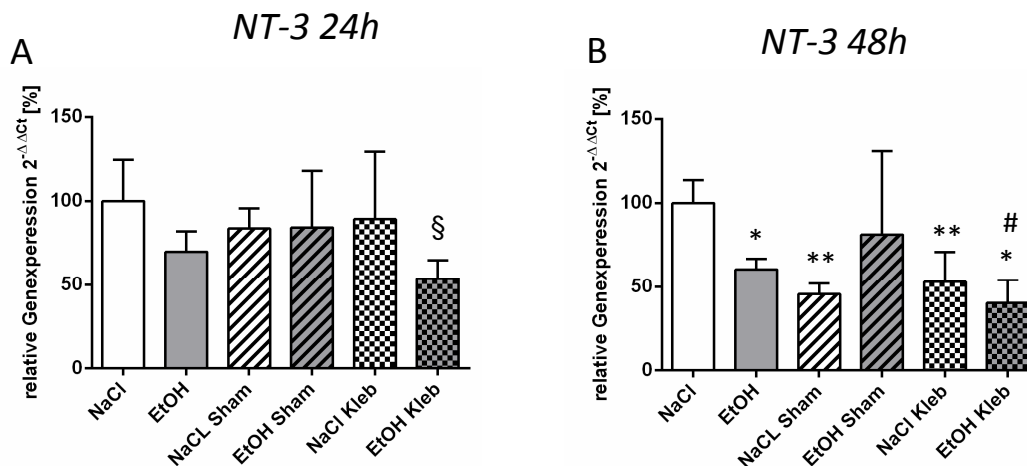


Abbildung 22: Darstellung der relativen Genexpression von NT-3 im Gehirn. Dargestellt sind die Mittelwerte der relativen Genexpressionsänderungen und deren Standardabweichungen nach A: 24 h und B: 48 h. Die jeweiligen NaCl Gruppen wurden 100% gesetzt. Signifikante Unterschiede wurden mit dem *Student's t-Test* oder *Mann-Whitney test* berechnet. Dabei stellen \*  $p < 0.01$ , \*  $p < 0.05$  die Differenzen zwischen den behandelten Gruppen im Vergleich zur NaCl Kontrollgruppe dar. #  $p < 0.05$  repräsentiert den Unterschied zwischen den behandelten Gruppen zu der ETOH Gruppe, §  $p < 0.05$  den Unterschied im Vergleich zur NaCl *Klebsiella pneumoniae* Gruppe. Jede Gruppe enthielt 7-8 Tiere ( $n=7-8$ ), wobei pro Tier eine Dreifachbestimmung durchgeführt wurde.

Für die Genexpression von NT-3 war nach 24 h ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen detektierbar. Die Behandlung mit Ethanol und Klebsiellen führte zu einer signifikant verminderten NT-3 Expression im Vergleich zur *Klebsiella pneumoniae* Gruppe ohne Ethanol ( $p=0.0429$ ).

Nach 48 h sinkt die Genexpression von NT-3 nach alleiniger Gabe von Ethanol ( $p= 0.0197$ ), durch eine Sham Infektion ( $p= 0.0044$ ), sowie durch *Klebsiella pneumoniae* Infektion ohne ( $p= 0.0091$ ) und mit Ethanol ( $p= 0.0106$ ) im Vergleich zur NaCl Kontrollgruppe. Die NT-3 Genexpression in der Etnanol Gruppe mit *Klebsiella pneumoniae* Infektion ist signifikant niedriger als in der Ethanol Gruppe allein ( $p= 0.0312$ ).

Zusätzlich wurde der zeitliche Verlauf der *NT-3* Genexpression im Gehirn der Mäuse untersucht. Dazu wurde die jeweilige 24 h Gruppe 100% gesetzt. Die dazugehörige Grafik ist in Abbildung 23 dargestellt.

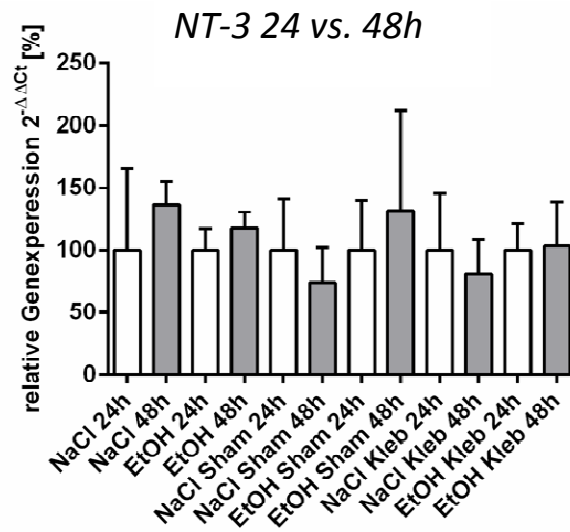


Abbildung 23: Darstellung der relativen Genexpression von *NT-3* im Gehirn. Dargestellt sind die Mittelwerte der relativen Genexpressionsänderungen und deren Standardabweichungen. Die jeweiligen 24h Gruppen wurden 100% gesetzt um Unterschiede beim Vergleich der zwei untersuchten Zeitstufen zu erkennen. Jede Gruppe enthielt 7-8 Tiere (n=7-8), wobei pro Tier eine Dreifachbestimmung durchgeführt wurde. Unterschiede wurden mit dem *Student's t-Test* oder *Mann-Whitney test* berechnet.

Bei der *NT-3* Genexpression fand ebenfalls ein Vergleich zwischen den Zeitstufen statt. Die *NT-3* Genexpression im Gehirn zeigte im Vergleich zwischen 24 h und 48 h keine signifikanten Unterschiede.

### 7.6.2. Proteinexpression von NT-3

Die Expression von *NT-3* wurde mittels Western Blot Analyse zusätzlich auf Proteinebene bestimmt. Die nachfolgende Abbildung 24 zeigt die Ergebnisse der *NT-3* Proteinexpression graphisch.

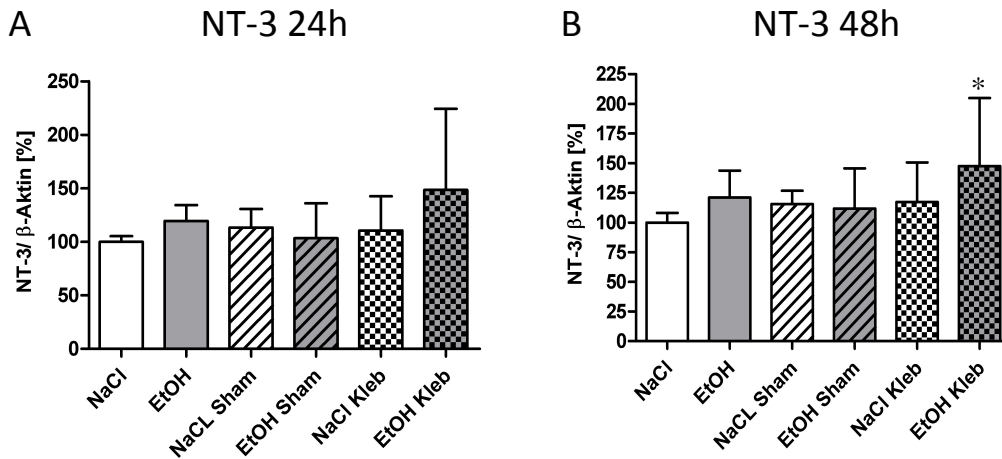


Abbildung 24: Darstellung der NT-3 Proteinexpression im Gehirn. Dargestellt sind die Mittelwerte der Proteinexpression und deren Standardabweichung nach A: 24 h und B: 48 h. Signifikante Unterschiede wurden mit dem *Student's t-Test* berechnet. Dabei stellt \* $p < 0.05$  die Differenz zwischen den behandelten Gruppen im Vergleich zur NaCl Kontrollgruppe dar. Jede Gruppe enthielt 7-8 Tiere ( $n=7-8$ ).

Auf der Proteinebene ergab sich eine signifikante Differenz nach 48 h in der NT-3 Proteinexpression zwischen den behandelten Gruppen. Bei einer *Klebsiella pneumoniae* Infektion mit Gabe von Ethanol steigt die Expression von NT-3 im Vergleich zur NaCl Kontrollgruppe ( $p=0,0453$ ).

Zusätzlich wurde der zeitliche Verlauf der NT-3 Proteinexpression im Gehirn der Mäuse untersucht. Dazu wurde die jeweilige 24 h Gruppe 100% gesetzt. Die dazugehörige Grafik ist in Abbildung 25 dargestellt.

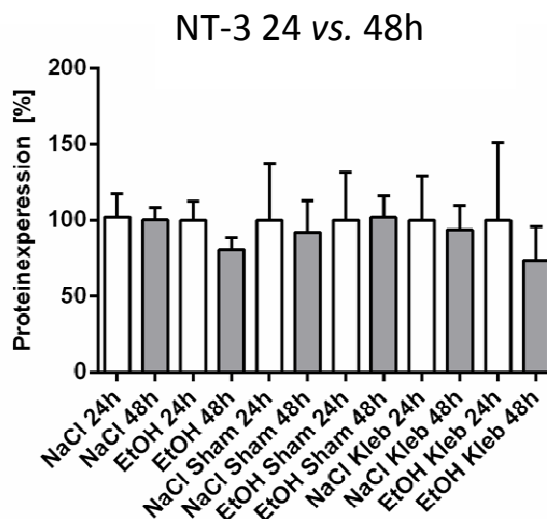


Abbildung 25: Darstellung der Proteinexpression von NT-3 im Gehirn. Dargestellt sind die Mittelwerte der relativen Proteinexpressionsänderungen und deren Standardabweichungen. Die jeweiligen 24h Gruppen wurden 100% gesetzt um Unterschiede beim Vergleich der zwei untersuchten Zeitstufen zu erkennen. Jede Gruppe enthielt 7-8 Tiere ( $n=7-8$ ). Unterschiede wurden mit dem *Student's t-Test* oder *Mann-Whitney test* berechnet.

Bei der NT-3 Proteinexpression fand ebenfalls ein Vergleich zwischen den Zeitstufen statt. Die NT-Proteinexpression im Gehirn zeigt im Vergleich zwischen 24 h und 48 h keine signifikanten Unterschiede.

### 7.7. Zusammenhang zwischen *BDNF* und *IL-1beta* Genexpression

Um einen Zusammenhang zwischen der Expression von *BDNF* und *IL-1beta* zu erkennen, wurde eine Spearman-Korrelation für beide Gene durchgeführt. Die nachfolgende Abbildung 26 zeigt die Ergebnisse graphisch.

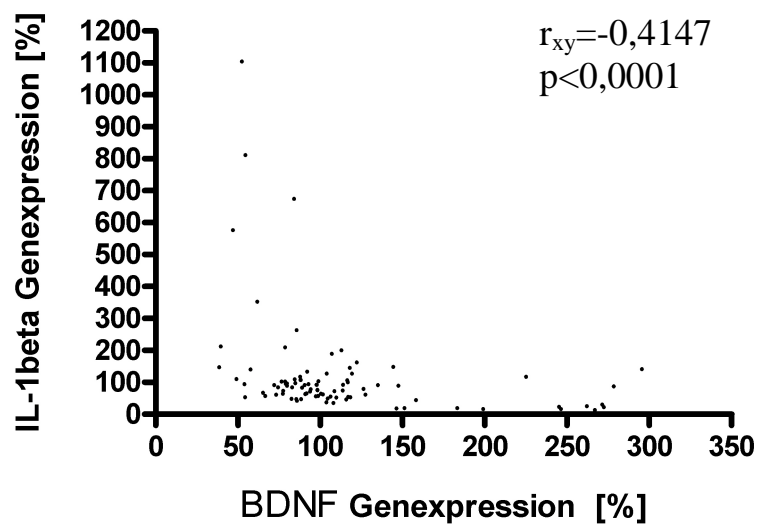


Abbildung 26: Die Spearman-Korrelation für die *BDNF*- und *IL-1beta*-Genexpression.

Die Korrelationsanalyse für alle untersuchten Tiere hat einen starken Zusammenhang zwischen *BDNF*- und *IL-1beta*-Genexpression bewiesen. Niedrige *BDNF* Genexpression korrelierten mit erhöhten *IL-1beta* Genexpressionen ( $r_{xy} = -0,4147$ ,  $p < 0,0001$ ).

## 8. Diskussion

Patienten, die chronisch Alkohol konsumieren, sind für die Entwicklung einer postoperativen Pneumonie sowie für kognitive Störungen besonders gefährdet. Die postoperative Pneumonie hat in dieser Patientengruppe einen schwierigen Verlauf, eine höhere Mortalität und erfordert oft eine Intensivbehandlung<sup>4,5,7,31</sup>. In diesem murinen Modell wurde nach zweiwöchiger Alkoholbehandlung vor einer Operation mit und ohne Infektion mit *Klebsiella pneumoniae* in der Lunge die postoperative neuronale Expression der Zytokine IL-1beta und TNF-alpha sowie der Neurotrophine BDNF und NT-3 im Gehirn untersucht.

### 8.1 Hauptergebnisse

1. Eine Alkoholbehandlung über 2 Wochen senkt die Genexpression der proinflammatorischen Zytokine *IL-1beta* und *TNF-alpha* während einer postoperativen Infektion mit *Klebsiella pneumoniae* im Gehirn von Balb/c-Mäusen.
2. Im untersuchten Mausmodell hatte die Alkoholbehandlung über 2 Wochen keinen Einfluss auf die Genexpression von *BDNF*. Am 3. (als Trend) und 4. (signifikant) postoperativen Tag verursachte sie eine Senkung der *NT-3* Genexpression innerhalb der nicht infizierten Tiere.
3. Es kam zur *BDNF* Senkung 24 h postinfektiös innerhalb der Mäuse, die mit NaCl (als Trend) sowie EtOH (signifikant) vorbehandelt wurden. Die Infektion mit *Klebsiella pneumoniae* verursachte alleine keine Änderungen in der *NT-3* Expression, zusammen mit Ethanolvorbehandlung kam es jedoch zur *NT-3* Senkung 24 h nach dem Erregerkontakt.
4. Es wurde in dieser Arbeit ein Zusammenhang zwischen der *IL-beta* Genexpression und der *BDNF* Genexpression gefunden: höhere *IL-beta* Werte korrelierten mit niedrigeren *BDNF* Werten.

### 8.2 Expression der proinflammatorischen Zytokine IL-1beta und TNF-alpha

Das für die Arbeit verwendete murine Pneumoniemodell wurde in der eigenen Arbeitsgruppe etabliert, um chronischen Alkoholkonsum auf die postoperative Zytokinproduktion sowie die Funktion von T-Zellen ( $T_{H1}$ ,  $T_{H2}$ ,  $T_{H17}$ ,  $T_{reg}$ ) mit und ohne

Infektion mit *Klebsiella pneumoniae* in der Lunge und der Milz zu untersuchen<sup>17,50</sup>. Lanzke *et al.* 2017 zeigten, dass 2 Wochen Ethanolbehandlung zu signifikanten Unterschieden in der T-Zell-Differenzierung der Lunge führt. Die mit Alkohol vorbehandelten Tiere hatten ein schlechteres postoperatives Outcome, 48 h postinfektiös höhere KBE im Blut und in der Lunge sowie einen schwierigeren Verlauf der Lungenentzündung<sup>50</sup>. In der vorliegenden Studie wurde in diesem murinen Modell erstmalig untersucht, wie chronischer Alkoholkonsum die postoperative Biosynthese von IL-1beta und TNF-alpha mit und ohne Infektion im Gehirn beeinflusst, da IL-1beta und TNF-alpha die febrile Reaktion im ZNS starten. Die febrile Reaktion, die auch Akute-Phase-Reaktion genannt wird, hat eine entscheidende Rolle für das Überleben während einer Infektion<sup>23,28</sup>. Während einer postoperativen Lungenentzündung kam es 24 h nach dem Erregerkontakt zu einem Anstieg der *IL-1beta*- und *TNF-alpha* Genexpression im Gehirn der Mäuse, die präoperativ mit einer NaCl-Lösung behandelt wurden, eine Behandlung mit Ethanol senkte diesen Anstieg. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass chronischer Alkoholkonsum die IL-1beta- und TNF-alpha-Produktion während einer postoperativen Infektion im ZNS hemmt.

Die Hemmung proinflammatorischer Zytokine im Gehirn durch Alkohol konnte bereits in mehreren Studien nachgewiesen werden. Taylor *et al.* 2002 zeigten mittels ELISA in einem Rattenmodell, dass nach einer 14 tägigen Ethanolbehandlung die Expression von IL-1beta im Hypothalamus nach einer LPS-Injektion vermindert war. Wie erwartet, haben diese Tiere mit einem geringeren Temperaturanstieg im Vergleich zur Kontrollgruppe reagiert<sup>28</sup>. Topper *et al.* konnten 2014 einen ähnlichen Effekt von Alkohol auf die *IL-1beta* Genexpression im Kortex bei Ratten nachweisen<sup>51</sup>. In einem *in-vitro*-Modell konnte Loureiro *et al.* 2012 zeigen, dass nach der Alkoholbehandlung über 4 Tage (die Autoren betrachten diese Zeit als chronischen Ethanoleffekt) und einer LPS-Exposition C6-Glioma Zellen weniger TNF-alpha produzieren. TNF-alpha wurde hier ebenso auf Proteinebene mittels ELISA bestimmt<sup>52</sup>.

Auf Proteinebene konnte 24 h nach dem Infektionsbeginn mit *Klebsiella pneumoniae* ein Anstieg von IL-1beta bei den Ethanol-exponierten Tieren im Vergleich zur Sham-Infektion gefunden werden. Auf der Genebene ist diese IL-1beta Zunahme nicht signifikant ( $p=0,14$ ). 48 h nach dem Infektionsbeginn mit *Klebsiella pneumoniae* zeigten die Tiere nach der Ethanolvorbehandlung höhere TNF-alpha Protein Werte im Vergleich zu den NaCl-Mäusen mit Pneumonie.

Die detektierten unterschiedlichen Ergebnisse auf der Gen- und Proteinebene sind bisher nicht beschrieben und waren unerwartet<sup>27,53,54</sup>. Auffällig ist, dass die Mehrheit der Arbeitsgruppen, die eine Neuroinflammation untersuchen, den Tieren das Endotoxin LPS

injizieren, welches eine stärkere inflammatorische Reaktion induziert als lebende Bakterien<sup>55</sup>. Kalb und Kollegen konnten bei Ratten nach einer LPS-Injektion eine 10-fach erhöhte *IL-1beta* Genexpression im Gehirn der Tiere detektieren und diese auf der Proteinebene mit Western Blot Analysen bestätigen<sup>27</sup>. In dem vorliegenden Modell ist der maximale Wert um das 5-fache im Vergleich zu den Kontrolltieren angestiegen. Andererseits konnten Wan *et al.* 2007 einen 4-fachen Aufstieg der *IL-1beta* Genexpression nach einer Splenektomie im Hippocampus auch auf Proteinebene mit Western Blot Analysen bestätigen<sup>54</sup>. Es ist möglich, dass in unserer Studie die festgestellten Unterschiede auf der Genebene zu gering waren, um sie auch auf der Proteinebene detektieren zu können.

Die festgestellten Unterschiede zwischen den Ergebnissen auf der Gen- und Proteinebene können zusätzlich dadurch erklärt werden, dass mittels Real Time PCR die spezifischen mRNAs für das Gehirn untersucht werden, während im ELISA alle Proteine, die auch peripher synthetisiert werden und die Blut-Hirn-Schranke überwunden haben, detektiert werden können<sup>15,20,25</sup>. Es ist bekannt, dass eine chronische Alkoholbehandlung via zirkulierendes LPS im Blut die Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke erhöht und die TNF-alpha Produktion in der Leber steigert<sup>15</sup>. Es ist möglich, dass aus diesen Gründen zusätzliche Anstiege von IL-1beta und TNF-alpha auf Proteinebene detektiert werden konnten.

Trotz der Unterschiede zwischen den Resultaten auf der Gen- und Proteinebene sind die Ergebnisse der Real Time PCR reproduzierbar und gehen mit anderen Studien konform. Die Alkoholwirkung, die postoperativ und während einer Infektion zur Senkung der Genexpression proinflammatorischer Zytokine im ZNS beiträgt, ist vielfältig. Es ist unter anderem bekannt, dass die akute und chronische Ethanolgabe die Struktur der Aktinfilamente in immunkompetenten Zellen verändert. Wahrscheinlich ist das betroffene Zytoskelett nicht in der Lage, die Aktivierung von TLRs durch LPS zu vermitteln. Zusätzlich bewirkt der Alkohol eine Abnahme der *mitogen activated protein kinases* (MAPKs)-Phosphorylierung, die für die Signalübertragung und Induktion der Inflammation verantwortlich ist<sup>52</sup>. Weitere Studien sind notwendig, um diese molekularen Mechanismen besser zu verstehen.

Lanzke *et al.* 2017 hat die klinische Evaluation der Mäuse vom ersten bis vierten postoperativen Tag erfasst und es wurde beobachtet, dass im Vergleich zu den anderen Gruppen, die Ethanol-exponierten Tiere, die eine *Klebsiella pneumoniae* Infektion erhielten, sich nach der Operation nicht erholt haben<sup>50</sup>. Die febrile Reaktion ist für die Bekämpfung einer bakteriellen Infektion notwendig<sup>23,28</sup> und in dieser Studie wurde nachgewiesen, dass eine Alkoholbehandlung über 14 Tage die Produktion der pyrogenen Zytokine IL-1beta- und TNF-alpha während postoperativer *Klebsiella pneumoniae* Infektion im ZNS hemmt. Es ist vorstellbar, dass diese



IL-1beta / TNF-alpha Minderung durch Ethanol für den schlechteren postoperativen Outcome der mit Alkohol vorbehandelten Tiere in Zusammenhang steht. Klinische Studien sind notwendig um zu prüfen, in wie weit die Ergebnisse dieser Arbeit einer klinischer Situation entsprechen. Die Verstärkung der febrilen Reaktion könnte theoretisch eine neue Therapie der postoperativen Pneumonie bei Patienten mit chronisch hohem Alkoholkonsum sein.

Die aseptische Operation verursacht eine durch IL-1beta / TNF-alpha vermittelte Neuroinflammation und ist mit einer Entstehung postoperativer kognitiver Dysfunktionen assoziiert<sup>13,14,27,32</sup>. In unserem Tiermodell sind alle Tiere einer medianen Laparotomie unterzogen worden, sodass es bei ihnen durch den chirurgischen Eingriff zur Immunmodulation kam<sup>13,14,17</sup>. Um sie darzustellen, wurde eine zeitliche Analyse der IL-1beta / TNF-alpha Expression im ZNS in allen Gruppen durchgeführt.

Die aktuelle Datenlage gibt mehrere Beispiele dafür, dass der chirurgische Eingriff zur IL-1beta / TNF-alpha Anstieg im ZNS führt. In der Arbeit von Wan *et al.* 2007 konnte gezeigt werden, dass nach einer Splenektomie bei Ratten kognitive Störungen am ersten und dritten postoperativem Tag auftraten<sup>54</sup>. Cibelli und Kollegen zeigten in einem operativen Mausmodell einen Anstieg der IL-1beta Gen- und Proteinexpression (mit ELISA) im Hippocampus 6 h nach der Operation. 24 h postoperativ lag sie wieder im Normbereich<sup>56</sup>.

Die Genanalysen unserer Studie ergaben eine erhöhte IL-1beta Expression bei allen operierten Tieren zum Tötungszeitpunkt nach 48 h (vierter postoperativer Tag) im Vergleich zu 24 h (dritter postoperativer Tag). Dieser Anstieg konnte für die Sham-Mäuse ebenso auf Proteinebene erfasst werden. Für *TNF-alpha* ist ein ähnlicher Anstieg der Genexpression innerhalb der Sham-Mäuse zu sehen, der sich jedoch auf Proteinebene nicht zeigte. In unserer Studie gab es keine Kontrollgruppe im Sinne von nicht operierten Tieren. Unter Berücksichtigung der Daten aus der Literatur, ist es wahrscheinlich, dass die Operation *per se* die Ausschüttung der proinflammatorischen Zytokine im ZNS innerhalb dieser Gruppen ausgelöst hat. Dagegen spricht, dass die anderen Arbeitsgruppen den postoperativen IL-1beta / TNF-alpha Anstieg im kürzeren Zeitabstand nach dem Eingriff detektiert haben (24 h Wan *et al.* 2007, 6 h Cibelli *et al.* 2010)<sup>13,14,54,56</sup>. Die eigene Arbeitsgruppe konnte bei Ratten zeigen, dass 1 h, 24 h und 3 Tage nach medianer Laparotomie keine Änderung der IL-1beta-Expression (mittels Western Blot gemessen) im Kortex und Hippocampus vorhanden ist<sup>27</sup>. Möglicherweise wäre ein Tag später der IL-1beta-Anstieg nachweisbar. Die mediane Laparotomie, die in dieser Studie verwendet wurde, unterscheidet sich aber sehr vom realen Eingriff, da dort nicht nur die Bauchdecke geöffnet wird, sondern auch die inneren Organen operiert werden und das

chirurgische Trauma größer ist. Es ist auch möglich, dass der IL-1beta / TNF-alpha Anstieg, der am vierten im Vergleich zum dritten postoperativen Tag in unserer Studie gemessen wurde, eine andere Ursache als die Operation hatte oder dass es sich um einen kumulativen Einfluss allen Stressfaktoren handelt, mit denen die Tiere während des Tierversuchs konfrontiert wurden. Es ist bekannt, dass neben der Operation auch chronischer milder Stress zur Neuroinflammation führen kann<sup>21</sup>.

Interessanterweise ist der hemmende Effekt der chronischen Ethanolbehandlung auf die postoperative IL-1beta-Produktion in unserer Studie zwischen den Mäusen ohne *Klebsiella pneumoniae* / Sham-Infektion sichtbar: die alkoholexponierten Tiere hatten weniger *IL-1beta* im Vergleich zu den NaCl-Mäuse sowohl am dritten als auch am vierten postoperativen Tag. Auf der Proteinebene ist ebenso eine erniedrigte IL-1beta Expression bei diesen Tieren zu sehen, jedoch nicht signifikant. Am vierten postoperativen Tag hatten die alkoholexponierten Tiere eine geringere TNF-alpha Proteinexpression im Vergleich zu der NaCl Kontrollgruppe. Diese Ergebnisse gehen mit den Daten aus Literatur konform<sup>28,51,52</sup>.

Es lässt sich nicht genau erklären, warum die operierten Tiere ohne *Klebsiella pneumoniae* Infektion am vierten postoperativen Tag einen IL-1beta / TNF-alpha Anstieg im Vergleich zum dritten postoperativen Tag aufweisen. Dieses Ergebnis unterstreicht aber, dass das ZNS empfindlich auf äußeren Faktoren ist und darauf mit einer Neuroinflammation reagieren kann. Die Alkoholvorbehandlung scheint die Neuroinflammation zu hemmen. Weitere Studien sind notwendig, um die Übertragbarkeit dieses Ergebnisses auf den klinischen Alltag zu prüfen.

In murinen *Klebsiella pneumoniae* Pneumoniemodellen wurde oft eine intratracheale Applikation der Bakterien verwendet<sup>57,58</sup>. In dieser Studie wurde der nasale Weg gewählt, da er weniger invasiv ist und mehr dem natürlichen Übertragungsweg ähnelt. Der Vergleich NaCl / EtOH-Gruppen vs. NaCl / EtOH-Sham-Mäusen sollte prüfen, ob die Sham-Behandlung neutral für die Tiere war. Es ist bekannt, dass nach einer Sham-Behandlung negativen Auswirkungen auftreten können. Sie sind in der Medizin als *nocebo phenomenon* bekannt, das Gegenteil von *placebo*<sup>59</sup>. Beide Phänomene, *placebo* und *nocebo*, entstehen nach pawlowscher Konditionierung oder als kognitiver Erwartungseffekt<sup>60</sup>.

Die Analyse auf Genebene hat gezeigt, dass 48 h nach der Sham-Infektion die Ethanol-exponierten Tiere mit einem *IL-1beta*-Anstieg im Vergleich zu EtOH alleine und NaCl-Sham reagiert haben. Zu diesem Zeitpunkt ist auch eine leichte Zunahme von *TNF-alpha* bei den NaCl- sowie EtOH-Sham-Mäusen vs. NaCl Kontrollgruppe vorhanden. Die Ergebnisse der

Proteinanalysen stimmen mit den Genanalysen nicht vollständig überein. 48 h nach der Sham-Infektion hatten die Tiere, die mit dem Alkohol vorbehandelt waren, eine höhere IL-1beta Expression im Vergleich zu den Mäusen ohne den Sham-Infekt ( $p=0,08$ ). Zu beiden Tötungszeitpunkten präsentierten die Ethanol-exponierten Sham-Tiere höhere IL-1beta Proteinexpressionen im Vergleich zu den NaCl-Sham-Mäusen. Die Ergebnisse für IL-1beta, die mit der Genebene nicht übereinstimmen, zeigen, dass es sowohl bei den NaCl-Tieren als auch bei den mit Ethanol vorbehandelten Mäusen die Sham-Infektion eine Abnahme der IL-1beta Expression verursachte (NaCl-48 h vs. NaCl-Sham-48 h, EtOH-24 h vs. EtOH-Sham-24 h). Für TNF-alpha konnten die Ergebnisse auf der Genebene nicht auf der Proteinebene bestätigt werden. Mittels ELISA wurde hier unter anderem gefunden, dass es zu beiden Tötungszeitpunkten zur einer Abnahme der TNF-alpha Proteinexpression nach der Sham-Infektion im Gehirn der NaCl-Tiere kam. Die NaCl Sham Gruppe hatte nach 48 h eine höhere TNF-alpha Proteinexpression im Vergleich zur NaCl Klebsiellen Gruppe, dieser Wert war jedoch niedriger als bei den Kontrolltieren.

Zusammenfassend, verursachte die Sham-Infektion mit oder ohne Ethanolvorbehandlung in manchen Gruppen eine Zunahme von proinflammatorischen Zytokinen auf Genebene, auf Proteinebene ist dagegen eher eine Senkung der IL-1beta / TNF-alpha zu sehen. Die Sham-Behandlung scheint unterschiedliche Effekte auf die Produktion von IL-1beta und TNF-alpha zu haben. Die nasale Applikation der NaCl-Lösung erfolgte in unserem Experiment unter Narkose, es ist aber möglich, dass die entstandene Schleimhautreizung für die Tiere als stressiges Verfahren empfunden wurde und die Ausschüttung von proinflammatorischen Zytokinen im ZNS provozierte, die mittels Real Time PCR erfasst wurden. Das zweite Modell, kognitiver Erwartungseffekt, könnte diese Reaktion erklären, die bei den Ethanol-exponierten Mäusen größer zu sein scheint. Für die detektierten Unterschiede auf Gen- und Proteinebene können schon im früheren Absatz beschriebene Effekte verantwortlich sein, z.B. der Übertritt der IL-1beta und TNF-alpha aus dem Blut ins Gehirn durch die Blut-Hirn-Schranke<sup>15,20,25</sup>, der die Unterschiede zwischen den behandelten Gruppen verwischen konnte. Die genauen Mechanismen, die nach der Sham-Behandlung zum IL-1beta- und TNF-alpha Anstieg oder Senkung geführt haben, bleiben jedoch unbekannt.

### 8.3. Expression der Neurotrophine BDNF und NT-3

Zu den POD/POCD Risikofaktoren gehören unter anderem Alkoholkonsum und eine postoperative Infektion<sup>27,31,32</sup>. Anhand unseres Tiermodells, der präoperativen Ethanolbehandlung über 14 Tage, mit oder ohne postoperative Infektion mit *Klebsiella pneumoniae* konnte die BDNF / NT-3 Expression im ZNS nach einer medianer Laparotomie erstmalig untersucht werden. Es wurde bereits publiziert, dass Neurotrophine im ZNS in der POD/POCD Entstehung involviert sind<sup>36,61,62</sup>.

Es ist bekannt, dass die Konzentration der Neurotrophine in unterschiedlichen Gehirnregionen variiert<sup>63</sup> und dass sie durch Alkohol moduliert werden<sup>40,63,64</sup>. Logrip *et al.* 2009, die den Einfluss des Ethanols auf die BDNF Genexpression bei Mäusen untersuchten, unterschieden 6 spezifische Areale und ihre Ergebnisse zeigen, dass die durch Ethanol verursachten Änderungen der BDNF Produktion regionspezifisch sind. 6 Wochen Ethanoleinnahme *per os* minderte die BDNF Genexpression im ventralen präfrontalen, frontalen und posterioren Kortex (im dorsalen präfrontalen Teil war die BDNF Senkung nicht signifikant); im Corpus striatum und Nucleus accumbens war dagegen eine nicht signifikante Zunahme der BDNF Genexpression zu sehen<sup>40</sup>.

In einer anderen Untersuchung konnte zusätzlich bei Ratten gezeigt werden, dass eine chronische Ethanoleinnahme *per os* über 8 Wochen die BDNF Proteinkonzentration (mittels ELISA gemessen) im Hippocampus senkt. Die NT-3 Proteinexpression nahm dagegen im entorhinalen Kortex, Hippocampus und basalen Vorderhirns signifikant zu<sup>64</sup>.

In unserer Studie, anders als erwartet, wurde kein Effekt der chronischen Ethanolbehandlung auf die BDNF Genexpression sowie die Proteinexpression gefunden. Für die Diskrepanz zwischen unseren Ergebnissen und deren aus der Literatur könnte die kürzere Expositionszeit des Ethanols (14 Tage vs. 6 Wochen Logrip *et al.* 2009, 8 Wochen Miller *et al.* 2004 ) verantwortlich sein<sup>40,64</sup>. Andererseits verursacht eine akute Alkoholeinnahme (über 1 Tag) die Zunahme der BDNF Genexpression bei Ratten im Corpus striatum<sup>40</sup>. Es ist möglich, dass in unserem Versuch keine Unterschiede zwischen den Gruppen detektiert werden konnten, weil die untersuchten Proben mehrere Gehirnareale umfassten. In unserer Studie wurden, anders als bei den Kollegen, alle Tiere operiert und es ist bekannt, dass eine Laparotomie die BDNF Proteinexpression bei Mäusen im ZNS senkt (die Autoren verwendeten in dieser Studie Western Blot)<sup>61</sup>. Es ist vorstellbar, dass die Operation einen negativen Effekt auf die BDNF Synthese in unserer Studie hatte und deswegen zeigte sich der zusätzliche Ethanoleffekt nicht.

Die weitere Analyse auf der Genebene im Rahmen unserer Studie zeigte, anders als in der Literatur berichtet, dass die chronische Alkoholbehandlung einen negativen Einfluss auf die NT-3-Expression innerhalb der nicht infizierten Mäuse hatte (am 3. postoperativen Tag als Trend, am vierten postoperativen Tag signifikant). Diese Effekte haben sich auf der Proteinebene nicht bestätigt. Die von Miller *et al.* 2004 verwendeten Tiermodelle charakterisieren sich aber durch viel längere Expositionszeiten (8 Wochen vs. 2 Wochen in unserem Versuch)<sup>64</sup>. Es ist möglich, dass Alkoholkonsum zu Beginn die NT-3-Synthese senkt und erst später eine gesteigerte Expression induziert wird (anders als für BDNF<sup>19,39,40</sup>), in der Literatur konnten jedoch keine Daten gefunden werden, um diese Hypothese zu prüfen. In unserem Tiermodell bleibt jedoch der Operationseffekt auf die NT-3 Expression unbekannt. Weitere Studien sind notwendig um zu prüfen, in wie weit unsere Ergebnisse mit denen aus der Literatur vergleichbar sind.

Die Wirkung einer postoperativen Infektion mit *Klebsiella pneumoniae* auf die BDNF- und NT-3-Expression im ZNS wurde bisher nicht untersucht. Es ist aber bekannt, dass proinflammatorische Zytokine die Funktion der Neurotrophine beeinträchtigen<sup>25,35,36</sup>. Schon im Jahr 1993 haben Lapchak *et al.* nachgewiesen, dass nach einer systemischen IL-1beta Injektion die BDNF Genexpression im Hippocampus der Ratten abnimmt<sup>65</sup>. Song *et al.* haben 2013 ähnliche Resultate publiziert, eine intracerebroventriculäre IL-1beta Injektion über 8 Tage verursachte die Hemmung der BDNF Synthese um 20% auf der Gen- und um 40% auf der Proteinebene (mit Western Blot Analyse bestimmt) im Hippocampus bei n=10 Ratten<sup>66</sup>.

Andere Forschungsgruppen zeigten ebenfalls, dass eine systemische LPS Injektion die Expression von Neurotrophinen im ZNS senkt. Guan und Fang 2006 untersuchten mittels ELISA die BDNF- und NT-3 Expression nach einer LPS-Injektion bei Ratten und haben nachgewiesen, dass ihre Konzentration durch die Inflammation negativ beeinflusst wird. Die festgestellten Unterschiede waren aber nicht in allen Gehirnarealen zu sehen: nach der LPS-Behandlung kam es zu einer Abnahme der BDNF Expression innerhalb des frontoparietalen Kortex und im Hippocampus, NT-3 war nur im frontalen Kortex reduziert<sup>62</sup>. Wei *et al.* haben 2015 eine BDNF Senkung um 40% nach einer LPS-Injektion (i.p.) sowohl auf der Genebene als auch auf der Proteinebene im Hippocampus der Ratten gefunden. Sie verwendeten einen ELISA und testeten in Gruppen von 24 Tieren<sup>53</sup>.

In unserer Studie, wurde, wie erwartet, ein Effekt der *Klebsiella pneumoniae* Infektion auf die BDNF Genexpression gefunden. Bei EtOH-Mäusen, die mit *Klebsiella pneumoniae* infiziert waren, sank 24 h nach dem Erregerkontakt

die *BDNF* Genexpression vs. Sham-Tiere (am dritten postoperativen Tag). Ein ähnlicher Trend ist innerhalb der NaCl-Gruppe zu sehen. Zum Tötungszeitpunkt 48 h (am vierten postoperativen Tag) ist eine Zunahme der *BDNF*-Genexpression vs. Sham-Tiere sowohl bei den NaCl- als auch bei EtOH-Mäusen signifikant. Die weiteren Analysen zeigte jedoch, dass es am vierten postoperativen Tag zu einer Abnahme der *BDNF*-Expression vs. dem dritten Tag innerhalb der vier untersuchten Gruppen: NaCl, EtOH, NaCl+Sham und EtOH+Sham kam. Innerhalb der mit *Klebsiella pneumoniae* infizierten NaCl-Mäusen ist eine umgekehrte Beziehung zu sehen: am vierten postoperativen Tag ist die *BDNF*-Genexpression höher als am dritten Tag. Bei den Tieren, die mit Ethanol behandelt wurden, zeigt sich ein ähnlicher Trend. Die *BDNF* Senkung, die 24 h postinfektiös detektiert wurde, geht mit der Literatur konform<sup>53,62</sup>. Anders als erwartet<sup>53</sup>, haben sich die Ergebnisse der Genexpressionsanalyse auf der Proteinebene nicht bestätigt. In unserer Studie konnte kein Alkoholeffekt während einer postoperativen Infektion mit *Klebsiella pneumoniae* auf die *BDNF* Biosynthese im Gehirn gefunden werden.

Die *NT-3* Genexpression bei den NaCl-Tieren wurde, anders als die *BDNF* Genexpression, durch die Infektion mit *Klebsiella pneumoniae* sowohl am dritten als auch am vierten postoperativen Tag vs. Sham-Gruppen nicht geändert. Diese Ergebnisse sind mit Arbeiten, die eine LPS Stimulation verwendeten, nicht konform<sup>62</sup>, da lebende Bakterien eine geringere immunologische Antwort im Gehirn im Vergleich zur LPS Injektion verursachen<sup>55</sup>. Am dritten postoperativen Tag innerhalb der Ethanol-exponierten Tiere kam es zur *NT-3* Senkung postinfektiös vs. der NaCl *Klebsiella pneumoniae* Gruppe (am vierten postoperativen Tag ist ein ähnlicher Trend zu sehen). Die Pneumonie zusammen mit der Ethanolvorbehandlung verursachte eine *NT-3* Senkung, wobei Ethanol alleine auch solche Effekte hatte. Die beschriebenen Ergebnisse der *NT-3* Genexpression konnten auf der Proteinebene nicht bestätigt werden.

48 h nach der Sham-Infektion wurde ein negativer Effekt dieser Behandlung auf die *NT-3*-Genexpression bei den NaCl-Mäusen festgestellt. Es lässt sich nicht erklären, warum nur diese Gruppe auf die nasale Applikation der NaCl-Lösung mit einer *NT-3*-Abnahme reagiert hat.

Zunächst korreliert eine niedrigere *BDNF* Genexpression mit einer erhöhten *IL-1beta* Expression bei allen untersuchten Mäusen ( $r_{xy}=-0,4147$ ,  $p<0,0001$ ). In unserer Studie lässt sich nicht nachweisen, dass eine erhöhte *IL-1beta* Expression für die *BDNF* Minderung verantwortlich ist. Dieser Effekt wurde aber in Literatur beschrieben<sup>25,35,36,65,66</sup>. Interessanterweise suggerieren Guan und Fang 2006, dass *IL-1beta* indirekt *BDNF* runterreguliert, indem es unter anderem die Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinde-Achse aktiviert. Die erhöhten Glukokortikoide können die Transkription von *BDNF* reduzieren.

Es ist auch bekannt, dass die parasympatische Gehirnaktivität die Synthese von Neurotrophinen positiv beeinflusst und proinflammatorisches IL-1beta diese cholinerge Transfusion im ZNS mindert<sup>62</sup>. Es ist vorstellbar, dass diese beiden Mechanismen für die BDNF-Senkung in unserer Studie verantwortlich sind. Weitere Studien sind notwendig, um diese Hypothese zu prüfen.

Western Blot Analysen der Neurotrophine konnten die Effekte, die auf Genebene gefunden wurden, auf Proteinebene nicht bestätigen. Diese Ergebnisse waren unerwartet<sup>53,66</sup>. Andere Arbeitsgruppen untersuchten jedoch, anders als in unserer Studie, die Synthese der Neurotrophine im ZNS regionspezifisch. Möglicherweise ist die Verwendung aller Gehirnareale dafür verantwortlich, dass nur wenige Differenzen in der Expression der Neurotrophine auf der Proteinebene in unserem Tiermodell gefunden wurden. Andererseits ist die BDNF-Hemmung auf der Genebene in vielen Gruppen sehr deutlich (circa 50%) und die anderen Autoren haben geringere BDNF-Senkung auf Proteinebene bestätigt<sup>53,66</sup>. Es ist möglich, dass es eine sensitivere Methode als die Western Blot Analyse und größeren Gruppen von Tieren für die korrekte Messung der Neurotrophine im ZNS notwendig wären.

Die in unserer Studie feststellte Senkung der Genexpression von Neurotrophinen, postoperativ durch Alkohol (NT-3) sowie durch eine Infektion mit *Klebsiella pneumoniae* (BDNF), kann theoretisch zur POD/POCD Entwicklung beitragen<sup>36,61,62</sup>. Möglicherweise ist die erhöhte IL-1beta für die BDNF Abnahme im unserem Tiermodell zuständig<sup>25,35,36,65,66</sup>. Eine Unterbrechung dieses Zusammenhangs könnte einen neuen Therapieweg der POD/POCD öffnen. Es muss weiter untersucht werden, ob unsere Ergebnisse auch auf das menschliche Gehirn sowie auf die klinische Situation zutreffen. Vorstellbar ist, dass längere Expositionszeiten sowie der postoperative Alkoholentzug bei der POD/POCD Entstehung eine Rolle spielen. Der Ethanolentzug beeinträchtigt die BDNF Expression im ZNS<sup>41</sup> und war wegen der kurzen Expositionszeit in unserem Tiermodell nicht zu erwarten<sup>50,67</sup>.

Zusammenfassend konnte in dieser Studie auf Genebene gezeigt werden, dass während einer postoperativen Pneumonie mit *Klebsiella pneumoniae* die präoperative Alkoholbehandlung über 14 Tage die Expression der pyrogenen Zytokine *IL-1beta* / *TNF-alpha* im ZNS von Mäusen hemmt. Da die febrile Reaktion für das Überleben während einer Infektion entscheidend ist, ist es vorstellbar, dass dieser Mechanismus für den schwierigen Verlauf sowie die erhöhte Mortalität der postoperativen Lungenentzündung bei Alkoholkranken beiträgt. Zunächst hat diese Arbeit gezeigt, dass eine erhöhte *IL-1beta* Expression mit niedrigerem BDNF Expressionen bei allen operierten Tieren korreliert. In der Literatur wurde der hemmende Effekt

von IL-1beta auf die BDNF Synthese beschrieben, deswegen scheint es wahrscheinlich, dass in unserem Tiermodell ebenso die erhöhte *IL-1beta* Expression die *BDNF* Abnahme verursacht, die 24 h nach dem Erregerkontakt bei infizierten Tieren zu sehen ist. Eine Unterbrechung dieses Zusammenhangs könnte einen neuen Therapieweg der POD/POCD sein. Berücksichtigend, dass BDNF eine neuroprotektive Wirkung hat und eine Alkoholbehandlung die IL-1beta Produktion im ZNS hemmt scheint es möglich zu sein, dass Alkohol während postoperativer *Klebsiella pneumoniae* Pneumonie vor Neurodegeneration schützt. Trotzdem ist für das Überleben der Patienten während einer Infektion ein IL-1beta / TNF-alpha Anstieg im ZNS notwendig. Die Verstärkung dieser Reaktion bei den Alkohol trinkenden Patienten könnte eine neue Therapie der postoperativen Pneumonie sein. In wie weit unsere Ergebnisse den klinischen Alltag betreffen, muss weiter untersucht werden.

## 8.4 Limitationen

### 8.4.1 Tiermodell

Es gibt keine universale Definition vom „akutem“ und „chronischem“ Alkoholkonsum. Üblicherweise wird die Alkoholgabe über mehr als 24 h als „chronisch“ bezeichnet, manche Autoren betrachten jedoch die Expositionszeiten über 2 Wochen immer noch als ein akutes Ereignis. Die langjährige Alkoholkrankheit verursacht eine Abhängigkeit, sekundäre Organschäden sowie einen Entzugssymptom nach dem Absetzen. Diese Symptome waren in verwendetem Tiermodell nach 14 Tage der Alkoholbehandlung nicht zu erwarten<sup>50,67</sup>. In wie weit unsere Ergebnisse der klinischen Situation entsprechen muss weiter klinisch untersucht werden.

Die Gruppengröße der untersuchten Tiere führte zum Teil zu hohen Standardabweichungen. Da Zytokine die BHS überwinden können<sup>15,20,25</sup>, wäre es ebenfalls interessant, den Plasmaspiegel des zirkulierenden IL-1beta zu kennen. Aus der Arbeit von Lanze *et al.* 2017 ist der Plasmaspiegel vom TNF-alpha bekannt und niedrig bei allen Tieren<sup>50</sup>. Eine Leberschädigung war in dieser Studie nicht zu erwarten<sup>50,67</sup>, trotzdem wäre es interessant, neben Lunge, Milz (Lanzke *et al.* 2017<sup>50</sup>) und Gehirn auch dieses Organ im verwendeten Tiermodell zu untersuchen.

Eine Entzugssymptomatik war in unserer Studie nicht zu erwarten<sup>50</sup>. Es lässt sich aber nicht ausschließen, dass das Absetzen des Ethanol nach 14 Tage täglicher Einnahme ebenfalls Effekte auf die Expression von Zytokinen und Neurotrophine im Gehirn in unserem murinen Pneumoniemodell hatte.



Die nächste Limitation im verwendeten Tiermodell ist der Infektionsübertragungsweg, der theoretisch keinen Einfluss auf die Produktion von den Zytokinen und Neurotrophen im ZNS haben sollte. In dieser Arbeit wurde aber gezeigt, dass die nasale Applikation einer NaCl-Lösung einen *placebo* oder *nocebo* Effekt auslösen kann.

#### 8.4.2 Methoden

Eine Limitation dieser Arbeit stellt die Isolation von RNA und Protein aus dem gesamten Gehirn dar, hier sollten die einzelnen Areale wie der Kortex und der Hippocampus isoliert werden.

Die Real Time PCR liefert Aussagen über die Transkriptionsaktivität eines Genes. Die Translationsaktivität wurde in dieser Studie mittels Western Blot und ELISA bestimmt. Die beiden Methoden gehören zu Immunoassays und verwenden eine Bindung zwischen einem Antikörper und einem Antigen. Im Western Blot werden vorher die Proteine im SDS-Gel nach ihrem Molekulargewicht getrennt, sodass eine Membran mit den geblotteten Proteinbanden für die Detektion von mehreren Antigenen dienen kann. Einen wesentlichen Nachteil dieser Methode stellt der große Zeitaufwand dar. In dieser Studie wurde auch ein „sandwich“ ELISA verwendet, der wegen der hohen Sensibilität für die Messung der Zytokine, deren Konzentration im Gewebe niedrig ist, vorteilhaft ist<sup>68</sup>. Zu den weiteren Vorteilen des ELISA gehört ein geringerer Zeitaufwand, ein Nachteil sind höhere Materialmengen und Kosten.

Die Messung von Zytokinen auf der Proteinebene könnte durch mehrere Faktoren beeinflusst werden, unter anderem: die niedrige Konzentration im Gewebe, das Vorkommen in den verschiedenen molekularen Formen und die Abhängigkeit der Sekretion vom circadianen Rhythmus. In dieser Studie wurden Organe verwendet die im Jahr 2009 entnommen wurden, da die Halbwertszeit von Zytokinen gering ist, besteht das Risiko, dass während der Lagerung ein Abbau stattgefunden hat<sup>68</sup>.

Anschließend ist es wichtig zu erwähnen, dass die Genexpression in den Zellen durch ständige Fluktuationen in der Transkription und Translation charakterisiert ist<sup>69</sup>. Die zum Teil sehr geringen Unterschiede, die in dieser Arbeit gefunden wurden, können zu diesem physiologischen Phänomen gehören.

## 8.5 Perspektiven

Unsere Ergebnisse zeigen, dass während einer postoperativen Infektion mit *Klebsiella pneumoniae* eine Alkoholbehandlung über 14 Tage die Minderung der Expression der pyrogenen Zytokine *IL-1beta* / *TNF-alpha* im ZNS verursacht. Die Arbeit von Taylor *et al.* 2002 wies nach, dass die intraventrikuläre Injektion von *IL-1beta* (20 ng in 10 µg NaCl 0,9%) eine normale febrile Reaktion bei Ratten verursacht, die durch vorherige 14 Tage Ethanoleinnahme (*per os*) beeinträchtigt wurde<sup>28</sup>. Es wäre interessant, in unserem Tiermodell zu untersuchen, ob eine ähnliche Maßnahme das klinische Outcome bei den Ethanol-exponierten Tieren verbessert. Dazu müsste erst die notwendige Dosierung der *IL-1beta* experimentell bestimmt werden. Im zweiten Schritt könnte man unser Tiermodell um die intraventrikuläre Injektion von *IL-1beta* vs. NaCl 0,9% erweitern. Wissend, dass in unserem Tiermodell die *IL-1beta* Expression 24 h nach der Infektion stieg und 48 h danach wieder sank, wäre es sinnvoll diese beide Zeitpunkte weiter zu untersuchen. Um den Tierzahl zu minimieren, könnte man auf die NaCl- und EtOH-Tiere verzichten<sup>50</sup>. Die intranasale Applikation hat in unserer Studie die *placebo* und *nocebo* Effekte ergeben, sie ist jedoch vs. den anderen Methoden (intratracheal) weniger invasiv und kann weiter verwendet werden, um die Ethanoleffekte auf das Immunsystem zu untersuchen.

Nicht invasive Parameter, die während des Tierversuchs bestimmt werden, könnten neben den Clinical Score und Körpergewicht<sup>50</sup> um die Messung der Körpertemperatur erweitert werden. Unter Berücksichtigung von anderen Studien<sup>27,40,53,62,63,64,66</sup> wäre es in Zukunft sinnvoll die Messung der Zytokine sowie Neurotrophine regionspezifisch (z.B. Hippocampus und Kortex) durchzuführen. In unserer Studie haben Western Blot und ELISA nicht alle Ergebnisse der Real Time PCR bestätigt. Die anderen Autoren haben jedoch gute Erfahrungen mit Western Blot bei der Bestimmung der Neurotrophine<sup>66</sup> sowie ELISA bei der Zytokinmessung<sup>28,52</sup> gemacht. Es ist vorstellbar, dass regionspezifische Analysen der Proteinexpression mit Western Blot und ELISA vergleichbarere Ergebnisse mit der Literatur erbracht hätten. Man könnte aber, um Zeit zu sparen, alle Analysen mittels ELISA durchzuführen. Hier könnte jedoch die Materialmenge eine Einschränkung darstellen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass nach dem Eingriff und während einer sich entwickelnden Pneumonie eine präoperative Ethanolgabe die Neuroinflammation hemmt, was theoretisch auf die Neuronen protektiv wirken kann. Die Antwort auf diese Frage könnte eine Analyse des Zelltods im Gehirn ergeben, z.B. die Messung von pro-apoptischen Proteinen, wie z.B. gesplante Caspase-3<sup>15,70</sup>.

Zunächst hat diese Studie ergeben, dass *IL-1beta* mit *BDNF* bei allen Tieren korreliert ( $r_{xy}=-0,4147$ ,  $p<0,0001$ ) und die Daten aus der Literatur suggerieren, dass es in unserem Tierversuch zur *BDNF* Senkung durch *IL-1beta* Erhöhung kommen konnte<sup>25,35,36,65,66</sup>. *IL-1beta* erhöht unter anderem die Produktion von Glukokortikoiden, die hemmende Wirkung auf die *BDNF* Expression im ZNS nachweisen<sup>61,62</sup>. Die experimentelle Therapie der POCD, die von Tian *et al.* 2014 bei Mäusen nach einer Lapartotomie verwendet wurde, blockierte medikamentös die Aktivierung und Phosphorylierung den Glukokortikoid-Rezeptoren und verursachte eine Verbesserung der kognitiven Funktionen (mittels Morris-Wasserlabyrinths gemessen) sowie eine Erhöhung des verminderten *BDNF* Niveaus im präfrontalen Kortex<sup>61</sup>. Ob eine *BDNF* Minderung im ZNS für eine Entstehung von POD/POCD entscheidend ist, muss weiter untersucht werden. Eine Erhöhung von *BDNF* korreliert mit einer verminderten *IL-1beta* Expression und scheint daher ein mögliches Ziel für die POD/POCD Behandlung zu sein.

Der andere potenzielle Mechanismus, der zur Minderung der *BDNF* Expression bei erhöhter *IL-1beta* Expression in unserer Studie führen konnte, ist die ROS Produktion während der Neuroinflammation. Interessanterweise kann Acetaminophen, bekannt als Paracetamol, neben seinen antiinflammatorischen und antioxidativen Eigenschaften die *Glycogen Synthase Kinase 3β* (*GSK3β*) blockieren und kognitiven Einschränkungen entgegenwirken (mittels Morris-Wasserlabyrinth gemessen). Des Weiteren erhöht das Medikament eine verminderte *BDNF* Expression im Hippocampus, die nach einer intracerebroventriculären LPS Injektion bei Mäusen detektiert werden konnte. *GSK3β* wird durch oxidativen Stress aktiviert und reguliert die Transkription von zahlreichen Genen, möglicherweise auch vom *BDNF*<sup>71</sup>.

Dem oxidativen Stress wird neben der Neuroinflammation eine wichtige Rolle in der POD/POCD Pathogenese zugeschrieben. Er kann z. B. durch die Messung der Konzentration von Malondialdehyd (MDA, Abbauprodukt von zerstörten Zellmembranen), sowie der Superoxid-Dismutase-Aktivität (SOD, wichtiger Antioxidant) in Neuronen bestimmt werden<sup>71,72</sup>. In unserer Studie führte die Vorbehandlung mit Ethanol zur Minderung der postoperativen Neuroinflammation mit und ohne Pneumonie. Der Anteil von oxidativem Stress bleibt jedoch unbekannt und es ist möglich, dass er durch die Ethanolvorbehandlung verstärkt wird, da chronischer Alkoholkonsum die NADPH-Oxidase aktiviert und die ROS Bildung fördert<sup>15</sup>.

*BDNF*, neben seinen neurotropischen Eigenschaften, verstärkt die NMDA- und mindert die GABA-Transmission im ZNS durch den TrkB Rezeptor-Signalweg<sup>73,74,75</sup>. Manche Formen der Langzeit-Potenzierung im Hippocampus sind von den NMDA Rezeptoren und *BDNF*-TrkB Signalkaskaden abhängig<sup>73</sup>. Zunächst ist bekannt, dass die Verstärkung der GABA-Transmission im präfrontalen Kortex bei älteren Menschen die kognitiven Fähigkeiten (*working memory*)

beeinträchtigt<sup>76</sup>. Ethanol, im Gegensatz zu BDNF, hemmt die NMDA- und verstärkt die GABA-Transmission im ZNS<sup>77</sup>. Interessanterweise wurde *in vitro* bei Mäusen nachgewiesen, dass Ethanol die von BDNF abhängige NMDA-Transmission blockt, auch wenn BDNF anwesend ist<sup>74</sup>. Es ist vorstellbar, dass diese Eigenschaften des Ethanols ebenso in der POCD/POD Pathogenese bei alkoholkranken Patienten eine Rolle spielen.

In unserer Studie wurde kein Effekt der chronischen Ethanolbehandlung auf die BDNF Expression gefunden. Andere Autoren berichten, dass chronischer Alkoholkonsum die BDNF Synthese in manchen Gehirnregionen reduziert (Kortex, Hippocampus) und in anderen steigert (Corpus striatum, Nucleus accumbens)<sup>40,64</sup>. Der Anteil von pro-BDNF, der gegenteilige Eigenschaften zu BDNF aufweist und durch den p75NTR Rezeptor den apoptotischen Zelltod aktiviert, bleibt jedoch unbekannt. In unserer Studie wurde ebenso mittels Western Blot nur die reife Form von BDNF gemessen. Yang *et al.* 2017 konnten nachweisen, dass chronischer Alkoholkonsum die *p75NTR* Genexpression im Dorsalem Striatum bei Mäusen mindert<sup>78</sup>. Um die neurotoxischen Eigenschaften des Ethanols besser zu verstehen, wäre es sinnvoll, in der Zukunft sowohl BDNF als auch den pro-BDNF Anteil zu bestimmen.

Patienten mit kritischem Alkoholkonsum zeigen eine erhöhte postoperative Sterblichkeit, sind anfällig für Infektionen und Tumore, entwickeln häufiger POD/POCD, haben eine längere Hospitalisierung, häufigere und verlängerte Behandlung auf der Intensiv Station sowie höhere Behandlungskosten<sup>5,6,7,31,32</sup>. Andererseits zeigt Ethanol auch neuroprotektive Eigenschaften, z.B. mindert es die Sterblichkeitsrate nach einem Schädel-Hirn-Trauma<sup>79</sup>. In unserer Studie führte die Vorbehandlung mit Ethanol zur Minderung der Immunantwort im ZNS während einer postoperativen Infektion. Welche Konsequenzen diese Hemmung hat, sollte durch weitere Studien überprüft werden.

## 9. Literaturverzeichnis

- 1) Pearse RM, Moreno RP, Bauer P, Pelosi P, Metnitz P, Spies C, Vallet B, Vincent JL, Hoeft A, Rhodes A. Mortality after surgery in Europe: a 7 day cohort study. *Lancet* 2012;380:1059-65.
- 2) John U, Rumpf HJ, Bischof G, Hapke U, Hanke M, Meyer C. Excess mortality of alcohol-dependent individuals after 14 years and mortality predictors based on treatment participation and severity of alcohol dependence. *Alcohol Clin Exp Res* 2013;37:156-63.
- 3) Drogen und Suchtbericht. Berlin: Die Drogenbeauftragte der Bundesregierung, 2017. (letzter Zugriff: 24.06.2018, 21:00Uhr unter [https://www.drogenbeauftragte.de/fileadmin/dateien-dba/Drogenbeauftragte/Drogen\\_und\\_Suchtbericht/flipbook/DuS\\_2017/index.html#p=37](https://www.drogenbeauftragte.de/fileadmin/dateien-dba/Drogenbeauftragte/Drogen_und_Suchtbericht/flipbook/DuS_2017/index.html#p=37).)
- 4) Spies C, Tønnesen H, Andreasson S, Helander A, Conigrave K. Perioperative morbidity and mortality in chronic alcoholic patients. *Alcohol Clin Exp Res* 2001;25:164-70.
- 5) Spies CD, Nordmann A, Brummer G, Marks C, Conrad C, Berger G, Runkel N, Neumann T, Müller C, Rommelspacher H, Specht M, Hannemann L, Striebel HW, Schaffartzik W. Intensive care unit stay is prolonged in chronic alcoholic men following tumor resection of the upper digestive tract. *Acta Anaesthesiol Scand* 1996;40:649-56.
- 6) Tonnesen H, Kehlet H. Preoperative alcoholism and postoperative morbidity. *Br J Surg* 1999;86:869-74.
- 7) Spies CD, von Dossow V, Eggers V, Jetschmann G, El-Hilali R, Egert J, Fischer M, Schröder T, Höflich C, Sinha P, Paschen C, Mirsalim P, Brunsch R, Hopf J, Marks C, Wernecke KD, Pragst F, Ehrenreich H, Müller C, Tonnesen H, Oelkers W, Rohde W, Stein C, Kox WJ. Altered cell-mediated immunity and increased postoperative infection rate in long-term alcoholic patients. *Anesthesiology* 2004;100:1088-100.

- 8) Lau A, von Dossow V, Sander M, MacGuill M, Lanzke N, Spies C. Alcohol use disorder and perioperative immune dysfunction. *Anesth Analg* 2009;108:916-20.
- 9) Deutsche nationale Punkt-Prävalenzerhebung zu nosokomialen Infektionen und Antibiotika-Anwendung 2016 Abschlussbericht. Berlin: Nationales Referenzzentrum für Surveillance von nosokomialen Infektionen, 2016. (letzter Zugriff: 24.06.2018, 21:00Uhr unter [http://www.nrz-hygiene.de/fileadmin/nrz/download/pps2016/PPS\\_2016\\_Abschlussbericht\\_20.07.2017.pdf](http://www.nrz-hygiene.de/fileadmin/nrz/download/pps2016/PPS_2016_Abschlussbericht_20.07.2017.pdf).)
- 10) Gesundheitsberichterstattung des Bundes Heft 8 Nosokomiale Infektionen. Berlin: Robert Koch Institut Statistisches Bundesamt, 2002. (letzter Zugriff: 24.06.2018, 21:00Uhr unter [http://www.rki.de/DE/Content/Gesundheitsmonitoring/Gesundheitsberichterstattung/GBEDownloadsT/nosokomiale\\_infektionen.pdf%3Fblob%3DpublicationFile](http://www.rki.de/DE/Content/Gesundheitsmonitoring/Gesundheitsberichterstattung/GBEDownloadsT/nosokomiale_infektionen.pdf%3Fblob%3DpublicationFile).)
- 11) Martin RM, Bachman MA. Colonization, Infection, and the Accessory Genome of *Klebsiella pneumoniae*. *Front Cell Infect Microbiol* 2018;8: doi:10.3389/fcimb.2018.00004.
- 12) Kovacs EJ, Messingham KA. Influence of alcohol and gender on immune response. *Alcohol Res Health* 2002;26:257-63.
- 13) Su X, Feng X, Terrando N, Yan Y, Chawla A, Koch LG, Britton SL, Matthay MA, Maze M. Dysfunction of inflammation-resolving pathways is associated with exaggerated postoperative cognitive decline in a rat model of the metabolic syndrome. *Mol Med* 2012;18:1481-90.
- 14) Terrando N, Eriksson LI, Ryu JK, Yang T, Monaco C, Feldmann M, Jonsson Fagerlund M, Charo IF, Akassoglou K, Maze M. Resolving postoperative neuroinflammation and cognitive decline. *Ann Neurol* 2011;70:986-95.
- 15) Szabo G, Lippai D. Converging actions of alcohol on liver and brain immune signaling. *Int Rev Neurobiol* 2014;118:359-80.
- 16) Crews FT, Bechara R, Brown LA, Guidot DM, Mandrekar P, Oak S, Qin L, Szabo G, Wheeler M, Zou J. Cytokines and Alcohol. *Alcohol Clin Exp Res* 2006;30:720-30.

- 17) Spies CD, Lanzke N, Schlichting U, Muehlbauer S, Pipolo C, von Mettenheim M, Lehmann A, Morawietz L, Nattermann H, Sander M. Effects of ethanol on cytokine production after surgery in a murine model of gram-negative pneumonia. *Alcohol Clin Exp Res* 2008;32:331-8.
- 18) Fernandez-Lizarbe S, Montesinos J, Guerri C. Ethanol induces TLR4/TLR2 association, triggering an inflammatory response in microglial cells. *J Neurochem* 2013;126:261-73.
- 19) Montesinos J, Pascual M, Rodríguez-Arias M, Miñarro J, Guerri C. Involvement of TLR4 in the long-term epigenetic changes, rewarding and anxiety effects induced by intermittent ethanol treatment in adolescence. *Brain Behav Immun* 2016;53:159-71.
- 20) Rivest S. Regulation of innate immune responses in the brain. *Nat Rev Immunol* 2009;9:429-39.
- 21) Singhal G, Jaehne EJ, Corrigan F, Toben C, Baune BT. Inflammasomes in neuroinflammation and changes in brain function: a focused review. *Front Neurosci* 2014;8: doi:10.3389/fnins.2014.00315.
- 22) Saxena S, Maze M. Impact on the brain of the inflammatory response to surgery. *Presse Med* 2018;47:73–81.
- 23) Elmquist J, Scammell TE, Saper CB. Mechanismus of CNS response to systemic immune challenge: the febrile response. *Trends Neurosci* 1997;20:565-70.
- 24) Keyel PA. How is inflammation initiated? Individual influences of IL-1, IL-18 and HMGB1. *Cytokine* 2014;69:136-45.
- 25) Patterson S. Immune dysregulation and cognitive vulnerability in the aging brain: Interactions of microglia, IL-1 $\beta$ , BDNF and synaptic plasticity. *Neuropharmacology* 2015;96:11-8.
- 26) Pavlov VA, Tracey KA. The vagus nerve and the inflammatory reflex-linking immunity and metabolism. *Nat Rev Endocrinol* 2012;8:743-54.
- 27) Kalb A, von Haefen C, Sifringer M, Tegethoff A, Paeschke N, Kostova M, Feldheiser A, Spies CD. Acetylcholinesterase inhibitors reduce neuroinflammation and -

- degeneration in the cortex and hippocampus of a surgery stress rat model. *PLoS One* 2013;8: doi:10.1371/journal.pone.0062679.
- 28) Taylor AN, Tio DL, Heng NS, Yirmiya R. Alcohol consumption attenuates febrile responses to lipopolysaccharide and interleukin-1 beta in male rats. *Alcohol Clin Exp Res* 2002;26:44-52.
- 29) Bastos-Pereira AL, Fraga D, Ott D, Simm B, Murgott J, Roth J, Zampronio AR. Involvement of brain cytokines in zymosan-induced febrile response. *J Appl Physiol* 2014;116:1220-9.
- 30) Tracey KJ. The inflammatory reflex. *Nature* 2002; 420:853-9.
- 31) Winterer G, Androsova G, Bender O, Boraschi D, Borchers F, Dschietzig TB, Feinkohl I, Fletcher P, Gallinat J, Hadzidiakos D, Haynes JD, Heppner F, Hetzer S, Hendrikse J, Ittermann B, Kant IMJ, Kraft A, Krannich A, Krause R, Kühn S, Lachmann G, van Montfort SJT, Müller A, Nürnberg P, Ofosu K, Pietsch M, Pischon T, Preller J, Renzulli E, Scheurer K, Schneider R, Slooter AJC, Spies C, Stamatakis E, Volk HD, Weber S, Wolf A, Yürek F, Zacharias N. Personalized risk prediction of postoperative cognitive impairment - rationale for the EU-funded BioCog project. *Eur Psychiatry* 2018;50:34-9.
- 32) Kratz T, Diefenbacher A. Acute and long-term cognitive consequences of treatment on intensive care units. *Nervenarzt* 2016;87:246-52.
- 33) Pandharipande PP, Girard TD, Jackson JC, Morandi A, Thompson JL, Pun BT, Brummel NE, Hughes CG, Vasilevskis EE, Shintani AK, Moons KG, Geevarghese SK, Canonico A, Hopkins RO, Bernard GR, Dittus RS, Ely EW. Long-term cognitive impairment after critical illness. *N Engl J Med* 2013;369:1306-16
- 34) Monk TG, Weldon BC, Garvan CW, Dede DE, van der Aa MT, Heilman KM, Gravenstein JS. Predictors of cognitive dysfunction after major noncardiac surgery. *Anesthesiology*. 2008;108:18-30.
- 35) Calabrese F, Rossetti AC, Racagni G, Gass P, Riva MA, Molteni R. Brain-derived neurotrophic factor: a bridge between inflammation and neuroplasticity. *Front Cell Neurosci* 2014;8: doi:10.3389/fncel.2014.00430.



- 36) Tong L, Prieto GA, Kramár EA, Smith ED, Cribbs DH, Lynch G, Cotman CW. BDNF-dependent synaptic plasticity is suppressed by IL-1 $\beta$  via p38 MAPK. *J Neurosci* 2012;32:17714-24.
- 37) Bucci C, Alifano P, Cogli L. The role of rab proteins in neuronal cells and in the trafficking of neurotrophin receptors. *Membranes* 2014;4:642-77.
- 38) Longo FM, Massa SM. Small-molecule modulation of neurotrophin receptors: a strategy for the treatment of neurological disease. *Nat Rev Drug Discov* 2013;12:507-25.
- 39) Jeanblanc J, Logrip ML, Janak PH, Ron D. BDNF-mediated regulation of ethanol consumption requires the activation of the MAP kinase pathway and protein synthesis. *Eur J Neurosci* 2013;37:607-12.
- 40) Logrip ML, Janak PH, Ron D. Escalating ethanol intake is associated with altered corticostriatal BDNF expression. *J Neurochem* 2009;109:1459-68.
- 41) Huang MC, Chen CH, Liu HC, Chen CC, Ho CC, Leu SJ. Differential patterns of serum brain-derived neurotrophic factor levels in alcoholic patients with and without delirium tremens during acute withdrawal. *Alcohol Clin Exp Res* 2011;35:126-31.
- 42) Mülhard C. 5.2 Methoden der RNA-Isolierung. In: *Der Experimentator Molekularbiologie/Genomic*. 7th ed. Berlin, Heidelberg: Springer, 2013:117.
- 43) Desjardins PR, Conklin DS. Microvolume quantitation of nucleic acids. *Curr Protoc Mol Biol* 2011;93: doi: 10.1002/0471142727.mba03js93.
- 44) Mülhard C. 4.4.5 Real-time quantitative PCR. In: *Der Experimentator Molekularbiologie/Genomic*. 7th ed. Berlin, Heidelberg: Springer, 2013:103-8.
- 45) Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-Delta Delta C(T)</sup> Method. *Methods* 2001;25:402-8.
- 46) Thornton B, Basu C. Real-time PCR (qPCR) primer design using free online software. *Biochem Mol Biol Educ* 2011;39:145-54.

- 47) [https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/MAN0011430\\_Pierce\\_BCA\\_Protein\\_Asy\\_UG.pdf](https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/MAN0011430_Pierce_BCA_Protein_Asy_UG.pdf) (letzter Zugriff: 21.11.2017, 16:42Uhr).
- 48) <http://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/88-7013.pdf> (letzter Zugriff: 21.11.2017, 16:42Uhr).
- 49) <http://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/88-7324.pdf> (letzter Zugriff: 21.11.2017, 16:42Uhr).
- 50) Lanzke N, Menk M, von Haefen C, Sargsyan L, Scharf B, Wernecke KD, Spies CD. Ethanol-Induced Alterations of T Cells and Cytokines after Surgery in a Murine Infection Model. *Int J Inflam* 2017;2017: doi:10.1155/2017/1067598.
- 51) Topper LA, Valenzuela CF. Effect of repeated alcohol exposure during the third trimester-equivalent on messenger RNA levels for interleukin-1 $\beta$ , chemokine (C-C motif) ligand 2, and interleukin 10 in the developing rat brain after injection of lipopolysaccharide. *Alcohol* 2014;48:773-80.
- 52) Loureiro SO, Heimfarth L, de Lima BO, Leite MC, Guerra MC, Gonçalves CA, Pessoa-Pureur R. Dual action of chronic ethanol treatment on LPS-induced response in C6 glioma cells. *J Neuroimmunol* 2012;249:8-15.
- 53) Wei P, Liu Q, Li D, Zheng Q, Zhou J, Li J. Acute nicotine treatment attenuates lipopolysaccharide-induced cognitive dysfunction by increasing BDNF expression and inhibiting neuroinflammation in the rat hippocampus. *Neurosci Lett* 2015;604:161-6.
- 54) Wan Y, Xu J, Ma D, Zeng Y, Cibelli M, Maze M. Postoperative impairment of cognitive function in rats: a possible role for cytokine-mediated inflammation in the hippocampus. *Anesthesiology* 2007;106:436-43.
- 55) Hoogland IC, Houbolt C, van Westerloo DJ, van Gool WA, van de Beek D. Systemic inflammation and microglial activation: systematic review of animal experiments. *J Neuroinflammation* 2015;12: doi:10.1186/s12974-015-0332-6.

- 56) Cibelli M, Fidalgo AR, Terrando N, Ma D, Monaco C, Feldmann M, Takata M, Lever IJ, Nanchahal J, Fanselow MS, Maze M. Role of interleukin-1beta in postoperative cognitive dysfunction. *Ann Neurol* 2010;68:360-8.
- 57) Greenberger MJ, Strieter RM, Kunkel SL, Danforth JM, Goodman RE, Standiford TJ. Neutralization of IL-10 increases survival in a murine model of *Klebsiella pneumoniae*. *J Immunol* 1995;155:722-9.
- 58) Zisman DA, Strieter RM, Kunkel SL, Tsai WC, Wilkowski JM, Bucknell KA, Standiford TJ. Ethanol feeding impairs innate immunity and alters the expression of Th1- and Th2-phenotype cytokines in murine *Klebsiella pneumoniae*. *Alcohol Clin Exp Res* 1998;22:621-7.
- 59) Häuser W, Hansen W, Enck P. Nocebo phenomena in medicine: their relevance in everyday clinical practice. *Dtsch Arztebl Int* 2012;109:459-65.
- 60) Enck P, Benedetti F, Schedlowski M. New insights into the placebo and nocebo responses. *Neuron* 2008;59:195-206.
- 61) Tian XS, Tong YW, Li ZQ, Li LX, Zhang T, Ren TY, Zhou T, Wang HC, Zhan R, Sun Y, Yan Z, Wang QD, Fan DS, Kong FJ, Guo XY, Xiao WZ, Chui DH. Surgical stress induces brain-derived neurotrophic factor reduction and postoperative cognitive dysfunction via glucocorticoid receptor phosphorylation in aged mice. *CNS Neurosci Ther* 2015;21:398-409.
- 62) Guan Z, Fang J. Peripheral immune activation by lipopolysaccharide decreases neurotrophins in the cortex and hippocampus in rats. *Brain Behav Immun* 2006;20:64-71.
- 63) Miller MW. Repeated episodic exposure to ethanol affects neurotrophin content in the forebrain of the mature rat. *Exp Neurol* 2004;189:173-81.
- 64) Miller MW, Mooney SM. Chronic exposure to ethanol alters neurotrophin content in the basal forebrain-cortex system in the mature rat: effects on autocrine-paracrine mechanisms. *J Neurobiol* 2004;60:490-8.

- 65) Lapchak PA, Araujo DM, Hefti F. Systemic interleukin-1 beta decreases brain-derived neurotrophic factor messenger RNA expression in the rat hippocampal formation. *Neuroscience* 1993;53:297-301.
- 66) Song C, Zhang Y, Dong Y. Acute and subacute IL-1 $\beta$  administrations differentially modulate neuroimmune and neurotrophic systems: possible implications for neuroprotection and neurodegeneration. *J Neuroinflammation* 2013;10: doi: 10.1186/1742-2094-10-59.
- 67) D'Souza El-Guindy NB, Kovacs EJ, De Witte P, Spies C, Littleton JM, de Villiers WJ, Lott AJ, Plackett TP, Lanzke N, Meadows GG. Laboratory models available to study alcohol-induced organ damage and immune variations: choosing the appropriate model. *Alcohol Clin Exp Res* 2010;34:1489-511.
- 68) Bienvenu JA, Monneret G, Gutowski MC, Fabien N. Cytokine assays in human sera and tissues. *Toxicology* 1998;129:55-61.
- 69) Kaern M, Elston TC, Blake WJ, Collins JJ. Stochasticity in gene expression: from theories to phenotypes. *Nat Rev Genet* 2005;6:451-464.
- 70) Friedlander RM. Apoptosis and caspases in neurodegenerative diseases. *N Engl J Med* 2003;348:1365-75.
- 71) Zhao WX, Zhang JH, Cao JB, Wang W, Wang DX, Zhang XY, Yu J, Zhang YY, Zhang YZ, Mi WD. Acetaminophen attenuates lipopolysaccharide-induced cognitive impairment through antioxidant activity. *J Neuroinflammation* 2017;14: doi: 10.1186/s12974-016-0781-6.
- 72) Netto MB, de Oliveira Junior AN, Goldim M, Mathias K, Fileti ME, da Rosa N, Laurentino AO, de Farias BX, Costa AB, Rezin GT, Fortunato JJ, Giustina AD, Barichello T, Dal-Pizzol F, Petronilho F. Oxidative stress and mitochondrial dysfunction contributes to postoperative cognitive dysfunction in elderly rats. *Brain Behav Immun* 2018; doi: 10.1016/j.bbi.2018.07.016.
- 73) Madara JC, Levine ES. Presynaptic and postsynaptic NMDA receptors mediate distinct effects of brain-derived neurotrophic factor on synaptic transmission. *J Neurophysiol* 2008;100:3175-84.

- 74) Kolb JE, Trettel J, Levine ES. BDNF enhancement of postsynaptic NMDA receptors is blocked by ethanol. *Synapse* 2005;55:52-7.
- 75) Cheng Q, Yeh HH. Brain-derived neurotrophic factor attenuates mouse cerebellar granule cell GABA(A) receptor-mediated responses via postsynaptic mechanisms. *J Physiol* 2003;548:711-21.
- 76) McQuail JA, Frazier CJ, Bizon JL. Molecular aspects of age-related cognitive decline: the role of GABA signaling. *Trends Mol Med* 2015;21:450-60.
- 77) Criswell HE, Ming Z, Griffith BL, Breese GR. Comparison of effect of ethanol on N-methyl-D-aspartate- and GABA-gated currents from acutely dissociated neurons: absence of regional differences in sensitivity to ethanol. *J Pharmacol Exp Ther* 2003;304:192-9.
- 78) Yang JW, Ma W, Yang YL, Wang XB, Li XT, Wang TT, Wang XP, Gao W, Li JY, Zhou XF, Guo JH, Li LY. Region-specific expression of precursor and mature brain-derived neurotrophic factors after chronic alcohol exposure. *Am J Drug Alcohol Abuse* 2017;43:602-8.
- 79) Brennan JH, Bernard S, Cameron PA, Rosenfeld JV, Mitra B. Ethanol and isolated traumatic brain injury. *J Clin Neurosci* 2015;22:1375-81.

# Eidesstattliche Versicherung

Ich, Anna Wilczak-Wojtuszciszyn, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema „Wirkung von Ethanol auf die neuronale Expression von Zytokinen und Neurotrophinen in einem murinen Pneumoniemodell“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -[www.icmje.org](http://www.icmje.org)) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultate (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o.) und werden von mir verantwortet.

Bisher ist keine Publikation zu dieser Disseration erfolgt. Daher folgt hier keine weitere Erklärung hinsichtlich meiner Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Disseration.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.

Datum

Unterschrift

"Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht."





## Publikationsliste

- Wilczak A, Marciniak K, Klapcinski M., et al. *Relation between combined oral contraceptives therapy and indices of autonomic balance (baroreflex sensitivity and heart rate variability) in young healthy women.* Ginekol Pol 2013; 84(11) : 915-921.
- Zdrojewicz Z, Kożuch, K, Marciniak K, Skuza M, Świerczyńska E, Wilczak A. *Environmental assessment people of different sexual orientation.* Sexological Review. 2010; 23: 4-12.

# Danksagung

In erster Linie möchte ich mich ganz besonders bei meiner Mentorin Frau Univ. Prof. Dr. med. Claudia Spies bedanken, die mich in Ihre Arbeitsgruppe aufgenommen und bei der Themawahl unterstützt hat. Ich danke ihr für die fachliche Beantwortung meiner Fragen, die konstruktive Kritik sowie die persönliche Unterstützung, die ich während ihrer Betreuung empfangen habe.

Mein herzlicher Dank gilt zunächst Frau Dr. rer. medic. Clarissa von Haefen für die Überlassung des interessanten Themas und die Einführung in die experimentelle Arbeit. Ohne ihre ausgezeichnete Betreuung im Labor wäre diese Dissertation nicht zustande gekommen.

Des Weiteren danke ich allen anderen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe, besonders Frau Nadine Lanzke, Herrn Dr. Marco Sifringer, Herrn Dr. Adrián González-López, Frau Nadine Paeschke und Frau Birgit Brandt für ihre Beratung, gemeinsame Diskussionen und angenehme Zusammenarbeit.

Abschließend gilt mein ganz besonderen Dank meinem Mann für seine kontinuierliche mentale Unterstützung und große Hilfe bei Korrekturen dieses Manuskriptes.