

Aus der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Hepatologie und
Gastroenterologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

„Das anti-inflammatorische Potential von
17-Hydroxydocosahexaensäure“

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor rerum medicinalium (Dr. rer. medic.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Beate Gomolka

aus Leisnig

Datum der Promotion: 25.10.2013

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1 Einleitung	5
1.1 Lipidmediatoren	5
1.2 Flüssigchromatographie Tandem Massenspektrometrie	6
1.3 17-Hydroxydocosahexaensäure	6
2 Zielsetzung	7
3 Methodik	8
3.1 Lipidomix-Analytik	8
3.2 DSS-Kolitis und Lipidmediatorbehandlung	9
4 Ergebnisse	10
4.1 Manuskript I: Analysis of omega-3 and omega-6 fatty acid-derived lipid metabolite formation in human and mouse blood samples.	10
4.1.1 Zusammenfassung	10
4.1.2 Publikation	10
4.2 Manuskript II: Suppressed liver tumorigenesis in fat-1 mice with elevated omega-3 fatty acids is associated with increased omega-3 derived lipid mediators and reduced TNF- α	11
4.2.1 Zusammenfassung	11
4.2.2 Publikation	11
4.3 Manuskript III: Omega-6 Docosapentaenoic Acid derived Resolvins and 17-Hydroxydocosahexaenoic Acid modulate Macrophage Function and alleviate Experimental Colitis.	12
4.3.1 Zusammenfassung	12
4.3.2 Publikation	12
5 Diskussion	13
6 Literatur	16
7 Eidesstattliche Versicherung	19
8 Anteilserklärung	20
9 Druckexemplare der ausgewählten Publikationen	22
9.1 Publikation I	22
9.2 Publikation II	23
9.3 Publikation III	24
10 Lebenslauf	25
11 Komplette Publikationsliste	26
12 Danksagung	27

Zusammenfassung

Essentielle mehrfach ungesättigte Omega-3 (n-3) und Omega-6 (n-6) Fettsäuren (polyunsaturated fatty acids, PUFA) sind die Vorläufer einer großen Anzahl von bioaktiven Lipidmetaboliten und -mediatoren. Sie greifen in physiologische und pathologische Stoffwechselprozesse ein, können in ihrer Bildung pharmakologisch beeinflusst werden und grundsätzlich pro- und anti-inflammatorische Effekte hervorrufen. Die gleichzeitige Analyse von n-3 und n-6 Lipidmetaboliten eröffnet neue Ein-sichten, wie diese auf die Regulation inflammatorischer Prozesse einwirken können. In den dieser Arbeit zugrunde liegenden Publikationen wurde die Rolle insbesondere des Lipidmetaboliten 17-Hydroxydocosahexaensäure (17-HDHA) untersucht.

In der ersten Studie wurde zunächst eine LC(ESI)-MS/MS-Methode zur simultanen Bestimmung von insgesamt 29 Lipidmetaboliten entwickelt, welche aus der n-6 PUFA Arachidonsäure (AA) sowie den n-3 PUFA Docosahexaensäure (DHA) und Eicosapentaensäure (EPA) entstehen. Diese wurden in nativen und Calcium-Ionophor A23187 (A23187) aktivierten humanen und murinen Blutproben ge-messen. Dabei führte die *in vitro* Aktivierung mit A23187 zu einem signifikanten Anstieg der Lipidmetabolitenbildung. Die Messung im Blut von Wildtyp (WT)-Mäusen und *Fat-1*-Mäusen, die endogen hohe n-3 PUFA-Konzentrationen aufweisen, zeigte in *Fat-1*-Tieren im Vergleich zu den WT-Tieren signifikant erhöht 17-HDHA.

Die zweite Studie untersuchte chemisch induzierte Lebertumoren in der Maus. Diese zeigte eine ge-ringere Tumor-Bildung in Bezug auf Größe und Anzahl in *Fat-1*-Mäusen im Vergleich zu ihren WT-Geschwistertieren und signifikant erhöhte 17-HDHA-Konzentrationen im Lebergewebe der *Fat-1*-Mäuse. *In vitro* Experimente zeigten außerdem, dass 17-HDHA effektiv die Lipopolysaccharid (LPS)-getriggerte Tumornekrosefaktor alpha (TNF- α)-Bildung in der murinen Makrophagen-Zelllinie RAW 264.7 unterdrücken konnte.

Der anti-inflammatorische Effekt von 17-HDHA wurde dann in der dritten Studie in einem Dextran Natriumsulfat (Dextran sulfate sodium, DSS)-induzierten Kolitis-Modell *in vivo* in WT-Mäusen bestä-tigt. Es konnte gezeigt werden, dass die intraperitoneale Behandlung mit 17-HDHA die DSS-Kolitis abmildert und signifikant den Gewichtsverlust, den epithelialen Schaden des Kolongewebes und die Makrophageninfiltration lindert. Weitere *in vitro* Experimente konnten zeigen, dass 17-HDHA die Phagozytoseaktivität in der Makrophagen-Zelllinie RAW 264.7 erhöht.

Zusammengefasst etablieren die Ergebnisse dieser Arbeiten 17-HDHA als anti-inflammatorischen Lipidmediator.

Abstract

The essential polyunsaturated omega-3 (n-3) and omega-6 (n-6) fatty acids (PUFA) are precursors of a diverse group of bioactive lipid metabolites and lipid mediators. They influence a multitude of physiological and pathological processes, their synthesis can be modulated by pharmacological means and they can exert both pro-inflammatory and anti-inflammatory actions. The simultaneous analysis of n-3 and n-6 derived lipid metabolites gives insight into their regulatory potential within inflammatory processes. In the publications, which this dissertation is based on, the role of the n-3 PUFA derived lipid mediator 17-hydroxydocosahexaenoic acid (17-HDHA) has been examined.

In the first study, a method was established which is based on LC(ESI)-MS/MS analysis and allows the simultaneous measurement of 29 lipid metabolites, that are synthesized from the n-6 PUFA arachidonic acid (AA) and the n-3 PUFA docosahexaenoic acid (DHA) and eicosapentaenoic acid (EPA). Analysis of these 29 lipid metabolites was performed in native and calcium-ionophore A23187 (A23187)-stimulated human and murine blood samples respectively. Here, *in vitro* activation by A23187 led to a significant increase in lipid mediator synthesis. Analysis of blood samples of wild-type (WT) and *Fat-1*-mice, that feature endogenously enriched concentrations of n-3 PUFA in all tissues, showed significantly higher levels of 17-HDHA in the *Fat-1*-mice compared to the WT-mice.

The second study examined a model of chemically-induced liver tumorigenesis in mice. A decrease in tumor formation, in terms of size and number was found in *Fat-1*-mice compared with WT-littermates. Furthermore, concentrations of 17-HDHA in liver tissue of *Fat-1*-mice were significantly higher than in liver samples of WT-mice. *In vitro* experiments showed that 17-HDHA effectively inhibits the lipopolysaccharide (LPS)-triggered synthesis of tumor-necrosis-factor alpha (TNF- α) in the murine macrophage cell line RAW 264.7.

The anti-inflammatory effect of 17-HDHA was then confirmed in a third study employing a model of dextrane-sodium sulfate (DSS) induced colitis in WT-mice. The intraperitoneal treatment with 17-HDHA led to an ameliorated disease course and reduced body weight loss, decreased epithelial damage of the intestinal mucosa as well as macrophage infiltration in the lamina propria significantly. Further *in vitro* experiments showed that 17-HDHA increases phagocytic activity in the macrophage cell line RAW 264.7

Taken together the results of the presented work establish 17-HDHA as an anti-inflammatory lipid mediator.

1 Einleitung

1.1 Lipidmediatoren

Aus mehrfach ungesättigten Omega-3 (n-3) und Omega-6 (n-6) Fettsäuren (polyunsaturated fatty acids, PUFA) werden über Cyclooxygenasen (COX) und Lipoxygenasen (LOX) unterschiedliche Klassen von Lipidmediatoren gebildet. Eine weitere Möglichkeit der Metabolisierung zu bioaktiven Lipidmediatoren erfolgt durch Cytochrom-P450 (CYP-450)-Monooxygenasen (Zeldin, 2001) und Autoxidationsprozesse (Jump, 2002; Serhan et al, 2008; Weylandt & Kang, 2005). Lipidmediatoren sind funktionell an der intra- und interzellulären Signalübertragung beteiligt. Sie greifen in physiologische und pathologische Stoffwechselprozesse ein und können in ihrer Formation pharmakologisch beeinflusst werden.

Von der Arachidonsäure (AA) abgeleitete bioaktive Lipidmediatoren werden mit einer Vielzahl proinflammatorischer Aktivitäten in Verbindung gebracht (Samuelsson et al, 1987; Samuelsson et al, 1975). AA wird durch COX zu Prostaglandinen (PG) und Thromboxanen (TX) der 2-Serie verstoffwechselt (Bogatcheva et al, 2005). Über LOX kommt es zur Bildung von Leukotrienen (LT) der 4-Serie (Funk, 2001). Insbesondere Prostaglandin E₂ (PGE₂), Thromboxan A₂ (TXA₂) und Leukotrien B₄ (LTB₄) vermitteln die klassischen Zeichen einer Entzündungsreaktion. Eicosapentaensäure (EPA) und Docosahexaensäure (DHA) werden durch Hydroxylierung über die COX zu den Prostanoiden der 3-Serie und über die LOX (Radmark & Samuelsson, 2009; Samuelsson et al, 1987) zu den LT der 5-Serie verstoffwechselt. Die von EPA und DHA abstammenden Eicosanoide PGE₃, TXA₃ und LTB₅ führen zu weniger Thrombozytenaggregation, sind chemotaktisch weniger aktiv und wirken geringer vasokonstriktorisch als die n-6 PUFA Eicosanoide. Diese geringere Potenz in Verbindung mit einer möglichen direkten Antagonisierung der AA bzw. einer Suppression der COX und LOX-Aktivität wird u.a. als Begründung für die beobachtete antiinflammatorische Wirkung der n-3 PUFA angesehen (Simopoulos, 2002; Weylandt et al, 2005).

Aus n-3 und n-6 PUFA werden jedoch auch weitere Klassen von Lipidmediatoren gebildet. Über eine einfache Hydroxylierung der n-3 und n-6 PUFA werden z.B. entsprechende Monohydroxy-Lipidmetabolite gebildet. Die monohydroxylierten Lipidmetabolite der n-6 PUFA AA sind die Hydroxyeicosatetraensäuren (HETE). Die Monohydroxy-Produkte der n-3 PUFA DHA sind die Hydroxdocosahexaensäuren (HDHA), die einfach hydroxylierten Metabolite der n-3 PUFA EPA sind die Hydroxyeicosapentaensäuren (HEPE). Über weitere Hydroxylierungsschritte entstehen aus den monohydroxylierten Verbindungen die trihydroxylierten Lipoxine, E- und D-Resolvine sowie Protektin D1 (Weylandt et al, 2012).

Durch mehrfache Hydroxylierungen über Zellinteraktionen wird AA zu Lipoxinen verstoffwechselt. Lipoxine besitzen potente antiinflammatorische Effekte (Serhan, 2005). In der Kolonmukosa von Patienten mit Colitis Ulcerosa wurde eine defiziente Lipoxinbiosynthese festgestellt (Mangino et al, 2006). Lipoxin A₄ reduziert die Entstehung einer Dextran Natriumsulfat (Dextran sulfate sodium, DSS)-induzierten Kolitis (Gewirtz et al, 2002). EPA ist die Ausgangs-PUFA für die Bildung der antiinflammatorischen Resolvine der E-Serie. EPA wird durch die COX zu 18R-

Hydroxyeicosapentaensäure (18-HEPE) metabolisiert. 18-HEPE wird durch 5-LOX zur Zwischenstufe 5S-Hydroperoxy-18-HEPE konvertiert. 5S-Hydroperoxy-18-HEPE wird entweder zu Resolvin E2 reduziert oder weiter über die Zwischenstufe 5S,6-epoxy-18-HEPE zu Resolvin E1 umgewandelt (Oh et al, 2011). Resolvin E1 und Resolvin E2 zeigen in diversen experimentellen entzündlichen Krankheitsmodellen protektive Effekte (Oh et al, 2012; Weylandt et al, 2012). DHA stellt den Ursprung für die D-Serie der Resolvine und des Protektin D1 dar. Die Bildung erfolgt über die 15-LOX katalysierte Hydroxylierung von DHA am C-17-Atom (Sun et al, 2007). Diese Verbindungen werden zu den trihydroxylierten Verbindungen, dem Resolvin D1, D2, D3 und D4 und der dihydroxylierten Verbindung Protektin D1 weiter hydroxyliert. Die Resolvine sind Produkte einer 15-LOX und 5-LOX-Interaktion, die während der Auflösung von Entzündungen durch die 5-LOX-tragenden polynukleären Leukozyten (PMN) induziert wird. In unterschiedlichen Krankheitsmodellen zeigen Resolvin D1 und D2 protektive Effekte. Für Protektin D1 konnten ebenfalls anti-inflammatorische und protektive Effekte in einer Vielzahl pathophysiologischer Modelle gezeigt werden (Ji et al, 2011; Weylandt et al, 2012). Den Resolvinen strukturell ähnlich sind die Derivate 17-Hydroxydocosapentaensäure (17-HDPA) und 10,17-Di-Hydroxydocosapentaensäure (10,17-Di-HDPA). Sie leiten sich allerdings von der n-6 PUFA Docosapentaensäure (DPA n-6) (Dangi et al, 2011; Dangi et al, 2009) ab.

1.2 Flüssigchromatographie Tandem Massenspektrometrie (LC-MS/MS)

Mittels LC-MS/MS-Technik können n-3 und n-6 PUFA Lipidmetabolite in verschiedenen Geweben bestimmt werden (Kempen et al, 2001; Mas et al, 2010; Masoodi et al, 2008; Murphy et al, 2005; Willey et al, 2008; Yang et al, 2002). Die LC-MS/MS ist eine Kopplung von zwei verschiedenen Techniken. Sie besteht aus einer analytischen HPLC (Hochleistungsflüssigchromatographie)-Säule und einem sich direkt anschließenden Tandem-Massenspektrometer (MS/MS). Voraussetzung für die Detektion mit einem Massenspektrometer ist die Ionisation des Analyten. Erfolgt die Kopplung der Flüssigchromatographie mit einem Massenspektrometer, wird die Ionisation bei Atmosphärendruck (API) durchgeführt. Diese kann entweder über Elektronenspray (ESI) oder chemische Ionisation (APCI) stattfinden. In der vorliegenden Arbeit wurde mit einer Elektronenspray-Ionisationsquelle gearbeitet, da diese für die Ionisierung thermolabiler und mittelpolarer-polarer Substanzen, wie es die Lipidmediatoren sind, sehr gut geeignet ist.

1.3 17-Hydroxydocosahexaensäure

17-HDHA ist die am C-17-Atom einfach hydroxylierte Vorläufersubstanz für die Bildung der anti-inflammatorischen D-Resolvine. Studien haben einen direkten protektiven Effekt von 17S-HDHA bei renalen Reperfusionsschäden (Duffield et al, 2006) und die Unterdrückung der Tumornekrosefaktor alpha (TNF- α)-Sekretion einer murinen Makrophagen-Zelllinie gezeigt (Gonzalez-Periz et al, 2006). Gleichzeitig konnte für 17R-HDHA ein anti-inflammatorischer Effekt bei einer experimentellen Kolitis und Arthritis gezeigt werden (Bento et al, 2011; Lima-Garcia et al, 2011).

2 Zielsetzung

Für n-3 PUFA konnte in einer Vielzahl von Entzündungsmodellen ein anti-inflammatorischer Effekt gezeigt werden. Das *Fat-1*-Mausmodell weist endogen erhöhte n-3 PUFA-Konzentrationen in allen Geweben auf. Durch Studien in diesem Modell zu DSS-induzierter Kolitis (Hudert et al, 2006), Hepatitis (Schmocker et al, 2007) und zur Bildung von Kolontumoren, die durch Inflammation ausgelöst wurden (Nowak et al, 2007), konnten diese Beobachtungen bestätigt werden. Von der n-6 PUFA AA abgeleitete Lipidmediatoren werden mit einer Vielzahl von (pro-inflammatorischen) Aktivitäten in Verbindung gebracht (Samuelsson et al, 1987; Samuelsson et al, 1975). In den letzten Jahren wurden jedoch neue Klassen anti-inflammatorischer und resolutionsfördernder Lipidmediatoren entdeckt (Serhan & Petasis, 2011). Die anti-inflammatorische Wirkung der von den n-3 PUFA DHA und EPA abgeleiteten mehrfach hydroxylierten D- und E-Resolvine wurde in diversen experimentellen Krankheitsmodellen beschrieben (Weylandt et al, 2012). Die biologischen Funktionen der Monohydroxy-Metaboliten der n-3 PUFA sind bisher jedoch weitgehend unbekannt.

Die ersten Ziele dieser Dissertationsschrift waren deshalb:

1. die Entwicklung einer sensitiven und robusten LC(ESI)-MS/MS-Methode zur simultanen *in vivo* Analyse von insbesondere Monohydroxy-Lipidmetaboliten, die von der n-6 PUFA AA und von den n-3 PUFA DHA und EPA abgeleitet werden sowie
2. die Bestimmung des Lipidmetabolitenprofils in humanen und murinen Blutproben.

Um den Einfluss unterschiedlicher n-3-Lipidmetabolitenkonzentrationen und insbesondere die Rolle des DHA-abgeleiteten Monohydroxy-Lipidmetaboliten 17-HDHA auf einen Entzündungsprozess besser zu verstehen, beschäftigt sich diese Dissertationsschrift außerdem mit:

3. der Analyse des Monohydroxy-Lipidmetaboliten 17-HDHA im chronisch entzündetem Lebergewebe von *Fat-1*- und WT-Mäusen mit chemisch induzierten Lebertumoren und
4. der Analyse des anti-inflammatorischen Effekts des Monohydroxy-Lipidmetaboliten 17-HDHA im DSS-induzierten Kolitis-Modell.

3 Methodik

3.1 Lipidomix-Analytik

Zentraler Bestandteil der experimentellen Arbeit dieser Dissertationsschrift war die Analyse des nach der Festphasenextraktion erhaltenen Rückstands mit einem Agilent 1200 HPLC-System. Zur chromatographischen Separation der Analyten von der Probenmatrix wurde ein Elutionsgradient verwendet. Die in Acetonitril (ACN) aufgenommenen Proben wurden in das Gerät injiziert und zunächst mit wässriger Ameisensäure und 10% ACN eluiert. Innerhalb von zehn Minuten stieg der Gradient auf 90% ACN an und wurde dann konstant gehalten. Das HPLC-System ist an ein Agilent 6460 Triplequad Massenspektrometer mit einer Elektronenspray-Ionisations-Quelle gekoppelt. Gemessen wurde immer im negativen Ionisierungs-Modus. Die Auswertung durch Integration der erhaltenen Peaks und Quantifizierung mit den entsprechenden Kalibrierkurven erfolgte mit der MassHunter Workstation Softwares Quantitative Analysis B.03.01 und Qualitative Analysis B.02.00 von Agilent Technologies.

Die Stammlösungen aller Eicosanoide und internen Standards wurden mit ACN hergestellt und bei -20°C in dunkel eingefärbten Gefäßen aufbewahrt. Die Wiederfindung des internen Standards wurde durch den Vergleich der Peakflächen des internen Standards ohne Extraktion und nach Extraktion in der Matrix für jede einzelne Probe ermittelt. Allen Proben wurde zu Beginn der Festphasenextraktion ein Gemisch der internen Standards bzw. des internen Standards LTB4-d₄ zugesetzt. Für die Kalibrierkurve wurde ein Gemisch aus den Standardlösungen und den internen Standards hergestellt. Dieses Gemisch wurde ohne vorhergehende Extraktion mit Stickstoff bei 40°C getrocknet und erneut in ACN aufgenommen. Für die Berechnung der Konzentration der Fettsäuremetaboliten wurde der Quotient der Peakfläche des Metaboliten zur Peakfläche des korrelierenden Standards berechnet, auf der Kalibrierkurve des jeweiligen Metaboliten aufgetragen und die entsprechende Konzentration abgelesen. Ausgehend von einem Signal-Rausch-Verhältnis von drei lässt sich der Peak ab einer Größe von 20 Flächeneinheiten quantifizieren. Die Grenze der Quantifizierung wurde auf ein Signal-Rausch-Verhältnis von neun festgelegt.

Die Analyse des Lipidmediatorprofils erfolgte für das erste Manuskript im Plasma und für das zweite Manuskript im Lebergewebe. Die Untersuchungen im Lebergewebe erfolgten an WT- und *Fat-1*-Mäusen. Die verwendete transgene *Fat-1*-Maus (Kang, 2007; Kang et al, 2004) besitzt das *Fat-1* Gen, welches für eine n-3 Desaturase kodiert. *Fat-1*-Mäuse weisen bei n-6 PUFA-reicher Ernährung, z.B. durch den Zusatz von 10% n-6 PUFA-reichem Distelöl zum Futter der Tiere, endogen erhöhte n-3 PUFA-Konzentrationen auf.

Bis zur Festphasenextraktion müssen Blut- und Gewebeproben unterschiedlich behandelt werden.

Das periphere murine und humane Blut musste vor der Plasmagewinnung mit 50 µM Calcium-Ionophor A23187 (A23187) bei 37°C stimuliert werden. Direkt nach der Plasmagewinnung wurden die drei internen Standards 15-HETE-d₈, Leukotrien B4-d₄ (LTB4-d₄), Prostaglandin E2-d₂ (PGE2-d₂) und eisgekühltes Methanol zugegeben. Mit einem Natriumacetat/Wasser/Methanol-Puffer wurde der pH-Wert der Probe auf sechs eingestellt.

Das in flüssigem Stickstoff aufbewahrte Lebergewebe wurde in gefrorenem Zustand gemörsert, anschließend mit Methanol und dem internen Standard LTB₄-d₄ versetzt, gevortext und mit Natriumhydroxid für 30 Minuten bei 60°C hydrolysiert. Die Probe wurde direkt nach der Hydrolyse mit Essigsäure neutralisiert und ebenfalls mit einem Natriumacetat/Wasser/Methanol-Puffer auf einen pH-Wert von sechs eingestellt.

Die Extraktion sowohl für die Plasma- als auch für die Gewebeproben erfolgte mit Bond Elut™ Certify II Säulen und wurde mit einem SUPELCO Visiprep™ Vakuumentextraktionsgerät durchgeführt. Vor der Extraktion mussten die Festphasenextraktionssäulen mit Methanol und 0,1M Natriumacetat-Lösung konditioniert werden. Auf die so vorbereiteten Säulen wurde der Überstand der zentrifugierten Probenlösung gegeben und durch die Polymerstruktur gesaugt. Anschließend wurden die Säulen mit einem Methanol/Wasser-Gemisch gespült. Für die Elution wurde eine Mischung aus n-Hexan/Ethylacetat und Ameisensäure verwendet. Das Eluat wurde auf einem Heizblock bei 40°C unter Stickstoff-Begasung evaporiert und der Rückstand bis zur LC(ESI)-MS/MS-Analyse bei -80°C gelagert.

3.2 DSS-Kolitis und Lipidmediatorbehandlung

Die experimentelle Kolitis wurde bei acht bis elf Wochen alten Mäusen chemisch induziert, indem für fünf Tage 2% 30-50 kDa DSS im Trinkwasser gelöst verabreicht wurde. Die intraperitoneale Behandlung mit den Lipidmetaboliten erfolgte einen Tag vor und an den Tagen der DSS-Gabe. Nach fünf Tagen wurde das Trinkwasser mit DSS gegen normales Trinkwasser ersetzt. Während des gesamten Versuches wurden zur Bewertung des Schweregrades der Kolitis täglich das Körpergewicht, die Stuhlkonsistenz, das Auftreten rektalen Blutens und die allgemeine Erscheinung der Tiere dokumentiert.

Mittels Koloskopie wurden bei ausgesuchten lebenden Tieren an Tag acht die Dicke der Darmwand, Gefäßeinsprossungen, Fibrinbildung, die Granularität der Schleimhaut und die Kotkonsistenz beurteilt. Nach der Tötung der Tiere an Tag acht wurde das Kolon der Tiere entnommen. Anhand der Kolonlänge und histologischer Untersuchungen wurde eine weitere Klassifizierung des Schweregrades der experimentellen Kolitis vorgenommen. Dazu wurden Gefrierschnitte einer Hämatoxylin-Eosin-Färbung unterzogen und histopathologisch beurteilt. Das Protein F4-80 wurde an Gefrierschnitten mittels Immunperoxidase Technik der ABC Methode (Avidin-Biotin-Methode) nachgewiesen. Die F4-80 Färbung wurde mit einem primären Anti-Maus-F4-80 Antikörper durchgeführt und mit einem biotinylierten Sekundärantikörper detektiert. Die Behandlung mit dem ABC-Kit und die anschließende Visualisierung mit Hilfe des AEC Substrats erfolgte gemäß den Anweisungen des Herstellers. Die positiven Bereiche pro Gewebefläche wurden mittels ImageQuant Software analysiert.

4 Ergebnisse

4.1 Manuskript I: Analysis of omega-3 and omega-6 fatty acid-derived lipid metabolite formation in human and mouse blood samples.

4.1.1 Zusammenfassung

Massenspektrometrische Techniken haben die Identifikation verschiedener Lipidmetabolite und -mediatoren ermöglicht. Von n-3 und n-6 PUFA abgeleitete Lipidmetabolite und -mediatoren sind an verschiedenen biologischen Prozessen beteiligt. Ein Verfahren zur Bestimmung eines breiten Spektrums von physiologisch gebildeten Lipidmetaboliten und -mediatoren im Blut wurde bis jetzt noch nicht vorgestellt.

In dieser Studie wurden Lipidmetabolite und -mediatoren, die von der n-6 PUFA AA und von den n-3 PUFA DHA und EPA abgeleitet werden, in murinen und humanen Blutproben gemessen. In den humanen unbehandelten Plasmaproben konnten die Verbindungen meist nur in sehr geringen Konzentrationen gemessen werden. Eine *in vitro* Aktivierung mit A23187 führte zu einem signifikanten Anstieg der Metabolitenbildung, mit einer Dominanz für die 12-LOX-Produkte 12-Hydroxyeicosatetraensäure (12-HETE), 12-Hydroxyeicosapentaensäure (12-HEPE) und 14-Hydroxydocosahexaensäure (14-HDHA). A23187 führte außerdem zu einem signifikanten Anstieg der 5-LOX-Produkte LTB₄ und LTB₅. Die Konzentrationen waren nach Aktivierung im murinen Blut vergleichbar oder etwas höher. Der hier präsentierte Ansatz liefert ein Protokoll für eine vergleichende und gleichzeitige Bestimmung der Bildungskapazität von n-3 und n-6 Lipidmetaboliten in humanen und murinen Blutproben. Weitere Studien müssen nun die Lipidmetabolit-Bildungskapazität in verschiedenen physiologischen und pathophysiologischen Zuständen evaluieren.

4.1.2 Publikation

Gomolka B, Siegert E, Blossey K, Schunck WH, Rothe M, Weylandt KH.

Analysis of omega-3 and omega-6 fatty acid-derived lipid metabolite formation in human and mouse blood samples.

Prostaglandins Other Lipid Mediat. 2011 Jan 12

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1098882311000049>

4.2 Manuskript II: Suppressed liver tumorigenesis in fat-1 mice with elevated omega-3 fatty acids is associated with increased omega-3 derived lipid mediators and reduced TNF- α .

4.2.1 Zusammenfassung

Tumore der Leber, insbesondere hepatozelluläre Karzinome (HCC), sind weltweit eine entscheidende Ursache für Morbidität und Mortalität. Die Entstehung eines HCC ist hauptsächlich mit chronischen Entzündungen der Leber unterschiedlicher Genese assoziiert. Bisherige Studien konnten zeigen, dass n-3 PUFA Entzündungen in der Leber dämpfen und die Bildung von TNF- α verringern.

In dieser Studie wurde das *Fat-1*-Maus-Modell, das endogen erhöhte n-3 PUFA aufweist, verwendet, um den Effekt von erhöhten n-3 PUFA-Gewebekonzentrationen auf die Tumorbildung im Diethylnitrosamin (DEN)-induzierten Lebertumor-Modell zu untersuchen.

Die Ergebnisse zeigen eine geringere Tumorbildung in Bezug auf Größe und Anzahl in *Fat-1*-Mäusen im Vergleich mit ihren Wildtyp (WT)-Geschwister-Mäusen. Die TNF- α -Konzentration im Plasma und die COX-2-Expression waren in den *Fat-1*-Mäusen deutlich geringer. Des Weiteren konnte eine verringerte fibrotische Aktivität in der Leber der *Fat-1*-Mäuse gezeigt werden. Die Lipidmediatoranalyse zeigte signifikant erhöhte Konzentrationen der von n-3-PUFA abgeleiteten Monohydroxy-Lipidmediatoren 17-HDHA und 18-HEPE im Lebergewebe der *Fat-1*-Mäuse, die mit DEN behandelt wurden. *In vitro* Experimente zeigten, dass 17-HDHA und 18-HEPE effektiv die LPS-getriggerte TNF- α -Bildung in der murinen Makrophagen-Zelllinie RAW 264.7 unterdrücken konnten.

4.2.2 Publikation

Weylandt KH, Krause LF, Gomolka B, Chiu CY, Bilal S, Nadolny A, Waechter SF, Fischer A, Rothe M, Kang JX.

Suppressed liver tumorigenesis in fat-1 mice with elevated omega-3 fatty acids is associated with increased omega-3 derived lipid mediators and reduced TNF- α .

Carcinogenesis, 2011 Mar 17

<http://carcin.oxfordjournals.org/content/32/6/897.long>

4.3 Manuskript III: Omega-6 Docosapentaenoic Acid derived Resolvins and 17-Hydroxydocosahexaenoic Acid modulate Macrophage Function and alleviate Experimental Colitis.

4.3.1 Zusammenfassung

Oxygenierte Lipidprodukte, die von n-3 und n-6 PUFA abgeleitet sind, spielen eine wichtige Rolle bei der Dämpfung von Entzündungen. Diese Studie untersucht den anti-inflammatorischen Effekt der von n-6 PUFA DPAn-6 abgeleiteten Lipidmetaboliten 17-HDPA und 10,17-DiHDPA sowie des von der n-3 PUFA DHA abgeleiteten Monohydroxy-Lipidmetaboliten 17R/S-HDHA.

Auswirkungen der 17-HDPA, 10,17-DiHDPA oder 17R/S-HDHA auf die Aktivität und die M1/M2 Polarisierung der murinen Makrophagen-Zelllinie RAW 264.7 wurden mit einem Phagozytose-Assay und real-time PCR untersucht. Um das anti-inflammatorische Potential *in vivo* zu beurteilen, wurde in Mäusen mittels DSS eine Kolitis induziert und diese mit 17-HDPA, 10,17-DiHDPA oder 17(R/S)-HDHA behandelt.

Unsere Ergebnisse zeigen, dass die intraperitoneale Behandlung mit 17-HDPA, 10,17-DiHDPA oder 17R/S-HDHA die DSS-Kolitis abmildert und signifikant den Gewichtsverlust, den epithelialen Schaden des Kolongewebes und die Makrophageninfiltration verbessert. Außerdem wird in *in vitro* Experimenten gezeigt, dass 17-HDPA, 10,17-DiHDPA und 17R/S-HDHA die Phagozytose in Makrophagen erhöhen und die Polarisation zum anti-inflammatorischen M2 Phänotyp mit verminderter TNF- α -Genexpression und induzierbarer Stickstoffmonoxid-Synthase begünstigen. Ebenso wird die Expression des Chemokin IL-1 Rezeptor Antagonisten und des Scavenger Rezeptors A durch Behandlung mit den Lipidmetaboliten erhöht.

Diese Ergebnisse weisen daraufhin, dass sowohl die von der n-6 PUFA DPAn-6 abgeleiteten Lipidmediatoren 17-HDPA und 10,17-DiHDPA als auch das von der n-3 PUFA DHA abgeleitete 17R/S-HDHA entzündungsdämpfende und resolutionsfördernde Effekte aufweisen. Aufgrund dessen könnten sie bei der Behandlung entzündlicher Erkrankungen, wie z.B. von entzündlichen Darmerkrankungen eine Rolle spielen.

4.3.2 Publikation

Chiu CY*, Gomolka B*, Dierkes C, Huang NH, Schroeder M, Purschke M, Manstein D; Dangi B, Weylandt KH.

Omega-6 Docosapentaenoic Acid derived Resolvins and 17-Hydroxydocosahexaenoic Acid modulate Macrophage Function and alleviate Experimental Colitis.

Inflammation Research. 2012 May 23

<http://dx.doi.org/10.1007/s00011-012-0489-8>

5 Diskussion

Die Arbeiten dieser kumulativen Dissertationsschrift fassen verschiedene Studien zur Untersuchung von Lipidmetaboliten und Lipidmediatoren, die aus n-3 PUFA und n-6 PUFA entstehen, zusammen. Dabei spannen sie den Bogen von der Entwicklung entsprechender Detektionsprotokolle in humanen und murinen Blutproben über die Analyse einzelner Metabolite (17-HDHA und 18-HEPE) im Kontext eines Krankheitsmodelles in der Maus hin zu *in vitro* und *in vivo* Analysen der Wirksamkeit eines dieser Metabolite 17-HDHA.

Die Entwicklung einer geeigneten Messmethode mit der gleichzeitig eine Vielzahl von physiologisch gebildeten n-3 und n-6 Lipidmetaboliten bestimmt werden kann, war die zentrale Voraussetzung für die weiteren Arbeiten dieser Dissertationsschrift. Die LC(ESI)-MS/MS-Technik ist eine gut etablierte Methode zur Bestimmung von Prostanoiden, Isoprostanen und Eicosanoiden in unterschiedlichen Geweben und Körperflüssigkeiten (Deems et al, 2007; Kempen et al, 2001; Masoodi et al, 2008; Murphy et al, 2005; Willey et al, 2008; Yang et al, 2002). Sie weist eine hohe Spezifität in geringen Konzentrationsbereichen, eine hohe Empfindlichkeit sowie eine gute Reproduzierbarkeit und gleichzeitig einen geringen Probenvorbereitungs- und Messzeitaufwand auf. Sie macht Derivatisierungen unnötig und ermöglicht so eine simultane Bestimmung mehrerer Metabolite in einer Probe. Für die LC(ESI)-MS/MS ist es wichtig, dass sich der interne Standard bezogen auf Chromatographie und Ionisierbarkeit ähnlich verhält wie die Substanz, die analysiert werden soll. Für die Messungen im Plasma wurden 15-HETE-d₈, LTB₄-d₄ und PGE₂-d₂ als interne Standards ausgewählt und verwendet. Sie weisen ähnliche Eigenschaften wie die zu untersuchenden Analyten auf, kommen aber im Untersuchungsmaterial nicht vor. Für die Bestimmung der jeweiligen Analyten wurde der interne Standard herangezogen, der der gesuchten Substanz strukturell am ähnlichsten ist.

Die Festphasenextraktion erfolgte sowohl für die Blut- als auch die Lebergewebeproben mit Bond Elut™ Certify II Säulen, die sowohl reversed phase als auch Anionenaustauscher-Eigenschaften aufweisen. Sie sind optimal geeignet für die Extraktion von Substanzen, die gleichzeitig einen unpolaren und anionischen Charakter besitzen. Die Proben wurden mit einem pH-Wert sechs Puffer versetzt, damit die Fettsäuren im neutral bis leicht basischen Bereich (pH 6-7) als Anionen vorlagen. Die Lipidmetabolite reicherten sich in der ebenfalls in diesem pH-Bereich konditionierten Festphasenextraktionssäule an und wurden anschließend aus dem Sorbens der Säule eluiert. Die Monohydroxy-Fettsäure-Metabolite allein wären mit einem lipophileren Lösungsmittel effizienter eluierbar gewesen. Die Elution der Trihydroxymetabolite sowie der PGs und LTs wären jedoch unter diesen Bedingungen nicht möglich gewesen. Unter der Prämisse ein umfangreiches Lipidmediatorprofil zu erhalten, wurde zur Aufbereitung der Proben für die Elution ein Gemisch aus n-Hexan/Ethylacetat (25/75) favorisiert. Es wurde eine Gradienten-Elution erarbeitet, die während der LC(ESI)-MS/MS zu kurzen chromatographischen Laufzeiten pro Probe und zu guter Peak Trennung führte und so einen hohen Probendurchlauf ermöglichte. Im Unterschied zur konventionellen HPLC zeichnet sich das in dieser

Arbeit verwendete Säulenmaterial durch seine sehr feine Körnung von 3,5 µm und den daraus resultierenden sehr hohen Druckwerten aus. Dies führt zu einer wesentlich verbesserten Trennleistung und schmalen Peaks.

Die entwickelte Analysenmethode eröffnet somit die Möglichkeit, ein sehr breites n-3 und n-6 Lipidmediatorprofil bestimmen zu können. Mit geringem Aufwand und kurzer Vorbereitungszeit kann ein physiologisches, pathologisches, durch pharmakologische Behandlung oder diätetische Maßnahmen verändertes, aktuelles n-3 und n-6-Lipidmediatorprofil aus einer einzigen Probe erstellt werden. Speziell Blut ist im klinischen Alltag einfach und fast schmerzfrei zu erhalten und stellt somit ein ideales Medium für die Untersuchung des Lipidmediatorprofils dar. Die Messung ist beliebig oft und zu unterschiedlichen Zeitpunkten wiederholbar. Der Einsatz als Routine-Messverfahren ist aufgrund der möglichen Unterbrechung der Aufarbeitung und Lagerung bei -80°C nach der Proteinfällung mit Methanol und vor der LC(ESI)-MS/MS-Messung möglich.

Die Voraussetzung für die Generierung ausreichend hoher Lipidmediatoren-Konzentrationen im Blut, die mittels LC(ESI)-MS/MS detektierbar sind, war auch hier, wie bereits vorbeschrieben (Pressman, 1976; Young et al, 1996) ,die Stimulation mit A23187. Die Untersuchungen zeigten eine potente Aktivierung der Lipidmetabolitenbildung im Plasma durch die Behandlung mit A23187. Sowohl im murinen als auch im humanen Blut gesunder Probanden waren durch die A23187-Aktivierung die 12-LOX, 5-LOX und 15-LOX-Metabolit-Konzentrationen erhöht. Sie führte jedoch nicht zur Bildung von detektierbaren Mengen der anti-inflammatorischen Lipidmediatoren Lipoxin A4 oder Resolvin D1 in menschlichen Proben. In den Mausproben konnten geringe Werte Lipoxin A4 ermittelt werden, wohingegen Resolvin D1-Konzentrationen ebenfalls nicht bestimmbar waren. Eine mögliche Ursache hierfür könnte sein, dass für die Analyse der Lipidmetabolite Blut gesunder Probanden und Mäuse verwendet wurde. Vorstellbar ist, dass bestimmbare Konzentrationen dieser anti-inflammatorischen Mediatoren erst im Blut von Patienten mit akuten oder chronischen Entzündungen gebildet werden.

Um den möglichen Einfluss der n-3 PUFA-Konzentration auf das Lipidmediatorprofil zu untersuchen, wurde auch das Blut von *Fat-1* und WT-Mäusen analysiert. *Fat-1*-Mäuse weisen endogen erhöhte n-3 PUFA-Konzentrationen auf (Kang, 2007; Kang et al, 2004). Diese Messungen bestätigten, dass die Konzentration der aus ihnen gebildeten Monohydroxy-Lipidmediatoren 17-HDHA und 18-HEPE in *Fat-1*-Mäusen gegenüber den WT-Tieren signifikant erhöht waren (Weylandt et al, 2012). Diese Metabolite sind die gemeinsamen Vorstufen für die zahlreichen bis jetzt identifizierten D- und E-Resolvine, für die potente anti-inflammatorische Effekte gezeigt wurden. Die Bestimmung dieser Monohydroxy-Vorstufen der E- und D-Resolvine 17-HDHA und 18-HEPE könnte perspektivisch ein wichtiger Indikator zur Bestimmung des anti-inflammatorischen Effekts der n-3 PUFA darstellen.

Die Lipidmetabolit-Analytik in der zweiten Studie konzentrierte sich daher auf den Nachweis von 17-HDHA und 18-HEPE im Lebergewebe. Die im Vergleich zu den WT-Mäusen signifikant höheren n-3 PUFA-Konzentrationen der *Fat-1*-Mäuse führten zu entsprechend signifikant höheren 17-HDHA und 18-HEPE Konzentrationen im Lebergewebe von Mäusen mit chemisch induzierten Lebertumoren.

Dies ging einher mit signifikant geringeren TNF- α -Konzentrationen und einer signifikant geringeren hepatischen Tumorentstehung in *Fat-1*-Mäusen. Um eine mögliche Rolle der n-3 PUFA-Metabolite bei diesem Effekt zu untersuchen, wurde als Teil dieser Studie der Effekt von 17-HDHA und 18-HEPE auf die Lipopolysaccharid induzierte TNF- α -Sekretion von murinen Makrophagen *in vitro* untersucht. Die Zugabe von (racemischem) 17-HDHA oder 18-HEPE konnte die TNF- α -Sekretion signifikant senken. Da TNF- α eine wichtige Rolle bei der Entstehung von Lebertumoren zugeschrieben wird (Liedtke & Trautwein, 2012; Xia et al, 2012), könnte eine durch 17-HDHA und 18-HEPE verminderte TNF- α -Konzentration einen wichtigen Mechanismus darstellen, der zu einer verminderten hepatischen Inflammation und Tumorentstehung führt. Dies steht im Einklang mit dem bereits beschriebenen anti-inflammatorischen Effekt von DHA und 17S-HDHA in einem murinen Leberentzündungsmodell (Gonzalez-Periz et al, 2006).

In der dritten Studie dieser Arbeit wurde der anti-inflammatorische Effekt des racemischen 17-HDHA schlussendlich in einem DSS-Kolitis-Modell *in vivo* bestätigt. Damit erweitern diese Daten den Kenntnisstand einer Vorstudie, in der 17R-HDHA als anti-inflammatorischer Lipidmediator im DSS-Kolitis-Modell etabliert wurde (Bento et al, 2011).

In den durchgeführten Studien wurden immer beide Enantiomere der 17-HDHA analysiert. Dies spiegelt eine technische Limitation des analytischen LC(ESI)-MS/MS Ansatzes wider, der eine Unterscheidung der Stereoisomere nicht erlaubt. Entsprechend wurden in den hier vorgestellten Studien auch 17R/S-HDHA für die Interventionsexperimente verwendet. Die anti-inflammatorischen Eigenschaften, die für 17R- bzw. 17S-HDHA (Bento et al, 2011; Gonzalez-Periz et al, 2006) gezeigt werden konnten, wurden in dieser Arbeit somit für racemisches 17-HDHA bestätigt. Die Erkenntnisse dieser Arbeit lassen deshalb vermuten, dass die Chiralität am C-Atom nur eine untergeordnete Rolle beim Einfluss auf den anti-entzündlichen Effekt spielt. Diese Arbeit zeigt racemisches 17-HDHA sowohl *in vitro* in einer Makrophagen-Zelllinie als auch *in vivo* im DSS-Kolitis-Maus-Modell als einen anti-inflammatorischen Lipidmediator. In den nächsten Schritten wird nun zu klären sein, inwiefern 17-HDHA (und auch 18-HEPE) direkt in der Zelle wirkt oder ob es zu mehrfach hydroxylierten D-Resolvinen (E-Resolvinen) weiter metabolisiert wird. Unabhängig davon könnte die Bestimmung der Monohydroxy-Lipidmediatoren 17-HDHA und 18-HEPE als Indikatorsubstanzen für die Bildung anti-inflammatorischer D- und E-Resolvine als eine sinnvolle und technisch robuste Messmethode in der klinischen n-3 PUFA-Forschung genutzt werden.

6 Literatur

Bento AF, Claudino RF, Dutra RC, Marcon R, Calixto JB (2011) Omega-3 fatty acid-derived mediators 17(R)-hydroxy docosahexaenoic acid, aspirin-triggered resolvin D1 and resolvin D2 prevent experimental colitis in mice. *J Immunol* **187**(4): 1957-1969

Dangi B, Obeng M, Nauroth JM, Chung G, Bailey-Hall E, Hallenbeck T, Arterburn LM (2011) Metabolism and biological production of resolvins derived from docosapentaenoic acid (DPAn-6). *Biochem Pharmacol* **79**(2): 251-260

Dangi B, Obeng M, Nauroth JM, Teymourlouei M, Needham M, Raman K, Arterburn LM (2009) Biogenic synthesis, purification, and chemical characterization of anti-inflammatory resolvins derived from docosapentaenoic acid (DPAn-6). *J Biol Chem* **284**(22): 14744-14759

Deems R, Buczynski MW, Bowers-Gentry R, Harkewicz R, Dennis EA (2007) Detection and quantitation of eicosanoids via high performance liquid chromatography-electrospray ionization-mass spectrometry. *Methods Enzymol* **432**: 59-82

Duffield JS, Hong S, Vaidya VS, Lu Y, Fredman G, Serhan CN, Bonventre JV (2006) Resolvin D series and protectin D1 mitigate acute kidney injury. *J Immunol* **177**(9): 5902-5911

Gewirtz AT, Neish AS, Madara JL (2002) Mechanisms of active intestinal inflammation and potential down-regulation via lipoxins. *Adv Exp Med Biol* **507**: 229-236

Gonzalez-Periz A, Planaguma A, Gronert K, Miquel R, Lopez-Parra M, Titos E, Horrillo R, Ferre N, Deulofeu R, Arroyo V, Rodes J, Claria J (2006) Docosahexaenoic acid (DHA) blunts liver injury by conversion to protective lipid mediators: protectin D1 and 17S-hydroxy-DHA. *Faseb J* **20**(14): 2537-2539

Hudert CA, Weylandt KH, Lu Y, Wang J, Hong S, Dignass A, Serhan CN, Kang JX (2006) Transgenic mice rich in endogenous omega-3 fatty acids are protected from colitis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(30): 11276-11281

Ji RR, Xu ZZ, Strichartz G, Serhan CN (2011) Emerging roles of resolvins in the resolution of inflammation and pain. *Trends Neurosci* **34**(11): 599-609

Jump DB (2002) The biochemistry of n-3 polyunsaturated fatty acids. *J Biol Chem* **277**(11): 8755-8758

Kang JX (2007) Fat-1 transgenic mice: a new model for omega-3 research. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* **77**(5-6): 263-267

Kang JX, Wang J, Wu L, Kang ZB (2004) Transgenic mice: fat-1 mice convert n-6 to n-3 fatty acids. *Nature* **427**(6974): 504

Kempen EC, Yang P, Felix E, Madden T, Newman RA (2001) Simultaneous quantification of arachidonic acid metabolites in cultured tumor cells using high-performance liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Anal Biochem* **297**(2): 183-190

- Liedtke C, Trautwein C (2012) The role of TNF and Fas dependent signaling in animal models of inflammatory liver injury and liver cancer. *Eur J Cell Biol* **91**(6-7): 582-589
- Lima-Garcia J, Dutra R, da Silva K, Motta E, Campos M, Calixto J (2011) The precursor of resolvin D series and aspirin-triggered resolvin D1 display anti-hyperalgesic properties in adjuvant-induced arthritis in rats. *Br J Pharmacol* **164**(2):278-93.
- Mangino MJ, Brounts L, Harms B, Heise C (2006) Lipoxin biosynthesis in inflammatory bowel disease. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* **79**(1-2): 84-92
- Mas E, Croft KD, Zahra P, Barden A, Mori TA (2010) Resolvins D1, D2, and Other Mediators of Self-Limited Resolution of Inflammation in Human Blood following n-3 Fatty Acid Supplementation. *Clin Chem* **44**(2):191-8.
- Masoodi M, Mir AA, Petasis NA, Serhan CN, Nicolaou A (2008) Simultaneous lipidomic analysis of three families of bioactive lipid mediators leukotrienes, resolvins, protectins and related hydroxy-fatty acids by liquid chromatography/electrospray ionisation tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* **22**(2): 75-83
- Murphy RC, Barkley RM, Zemski Berry K, Hankin J, Harrison K, Johnson C, Krank J, McAnoy A, Uhlson C, Zarini S (2005) Electrospray ionization and tandem mass spectrometry of eicosanoids. *Anal Biochem* **346**(1): 1-42
- Nowak J, Weylandt KH, Habel P, Wang J, Dignass A, Glickman JN, Kang JX (2007) Colitis-associated colon tumorigenesis is suppressed in transgenic mice rich in endogenous n-3 fatty acids. *Carcinogenesis* **28**(9): 1991-1995
- Oh SF, Dona M, Fredman G, Krishnamoorthy S, Irimia D, Serhan CN (2012) Resolvin E2 formation and impact in inflammation resolution. *J Immunol* **188**(9): 4527-4534
- Oh SF, Pillai PS, Recchiuti A, Yang R, Serhan CN (2011) Pro-resolving actions and stereoselective biosynthesis of 18S E-series resolvins in human leukocytes and murine inflammation. *J Clin Invest* **121**(2): 569-581
- Pressman BC (1976) Biological applications of ionophores. *Annu Rev Biochem* **45**: 501-530
- Samuelsson B, Dahlen SE, Lindgren JA, Rouzer CA, Serhan CN (1987) Leukotrienes and lipoxins: structures, biosynthesis, and biological effects. *Science* **237**(4819): 1171-1176
- Samuelsson B, Granstrom E, Green K, Hamberg M, Hammarstrom S (1975) Prostaglandins. *Annu Rev Biochem* **44**: 669-695
- Schmocker C, Weylandt KH, Kahlke L, Wang J, Lobeck H, Tiegs G, Berg T, Kang JX (2007) Omega-3 fatty acids alleviate chemically induced acute hepatitis by suppression of cytokines. *Hepatology* **45**(4): 864-869
- Serhan CN (2005) Lipoxins and aspirin-triggered 15-epi-lipoxins are the first lipid mediators of endogenous anti-inflammation and resolution. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* **73**(3-4): 141-162

Serhan CN, Petasis NA (2011) Resolvins and protectins in inflammation resolution. *Chem Rev* **111**(10): 5922-5943

Serhan CN, Yacoubian S, Yang R (2008) Anti-inflammatory and proresolving lipid mediators. *Annu Rev Pathol* **3**: 279-312

Simopoulos AP (2002) Omega-3 fatty acids in inflammation and autoimmune diseases. *J Am Coll Nutr* **21**(6): 495-505

Weylandt KH, Chiu CY, Gomolka B, Waechter SF, Wiedenmann B (2012) Omega-3 fatty acids and their lipid mediators: towards an understanding of resolvin and protectin formation. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* **97**(3-4): 73-82

Weylandt KH, Kang JX (2005) Rethinking lipid mediators. *Lancet* **366**(9486): 618-620

Willey MB, Alborn WE, Lutzke BS, Lelacheur RM, White RJ, Stavrakis G, Konrad RJ, Ackermann BL (2008) The development of methodology for clinical measurement of 5-lipoxygenase pathway intermediates from human peripheral blood mononuclear cells. *J Pharm Biomed Anal* **48**(5): 1397-1403

Xia L, Mo P, Huang W, Zhang L, Wang Y, Zhu H, Tian D, Liu J, Chen Z, Zhang Y, Hu H, Fan D, Nie Y, Wu K (2012) The TNF-alpha/ROS/HIF-1-induced upregulation of FoxM1 expression promotes HCC proliferation and resistance to apoptosis. *Carcinogenesis* [Epub ahead of print]

Yang P, Felix E, Madden T, Fischer SM, Newman RA (2002) Quantitative high-performance liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometric analysis of 2- and 3-series prostaglandins in cultured tumor cells. *Anal Biochem* **308**(1): 168-177

Young JM, Panah S, Satchawatcharaphong C, Cheung PS (1996) Human whole blood assays for inhibition of prostaglandin G/H synthases-1 and -2 using A23187 and lipopolysaccharide stimulation of thromboxane B2 production. *Inflamm Res* **45**(5): 246-253

Zeldin DC (2001) Epoxygenase pathways of arachidonic acid metabolism. *J Biol Chem* **276**(39): 36059-36062

7 Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Beate Gomolka, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Das anti-inflammatorische Potential von 17-Hydroxydocosahexaensäure“ 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) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o.) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an den ausgewählten Publikationen entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o.) und werden von mir verantwortet.

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

Beate Gomolka
Berlin, den 18. Dezember 2012

8 Anteilserklärung an den erfolgten Publikationen

Beate Gomolka hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

Publikation I:

Autoren: **Gomolka B**, Siegert E, Blossey K, Schunck WH, Rothe M, Weylandt KH.

Titel: Analysis of omega-3 and omega-6 fatty acid-derived lipid metabolite formation in human and mouse blood samples.

Zeitschrift: Prostaglandins & Other Lipid Mediators

Jahr: 2011

Beitrag im Einzelnen:

- Beteiligung an Idee und Konzept der Versuche
- Gewinnung und Bearbeitung, statistische Auswertung und graphische Darstellung der humanen und murinen Blutproben
- Verfassen von wesentlichen Teilen des Manuskripts

Publikation II:

Autoren: Weylandt KH, Krause LF, **Gomolka B**, Chiu CY, Bilal S, Nadolny A, Waechter SF, Fischer A, Rothe M, Kang JX.

Titel: Suppressed liver tumorigenesis in fat-1 mice with elevated omega-3 fatty acids is associated with increased omega-3 derived lipid mediators and reduced TNF-alpha.

Zeitschrift: Carcinogenesis

Jahr: 2011

Beitrag im Einzelnen:

- Planung, Durchführung, statistische Auswertung und graphische Darstellung der Lipidmediatoranalyse des Lebergewebes
- Überarbeitung des Manuskripts

Publikation III:

Autoren: Chiu CY*, **Gomolka B***, Dierkes C, Huang NH, Schroeder M, Purschke M, Manstein D; Dangi B, Weylandt KH. * geteilte Autorenschaft

Titel: Omega-6 Docosapentaenoic Acid derived Resolvins and 17-Hydroxy-docosahexaenoic Acid modulate Macrophage Function and alleviate Experimental Colitis.

Zeitschrift: Inflammation Research.

Jahr: 2012

Beitrag im Einzelnen:

- Beteiligung an Idee und Konzept der Versuche
- Planung, Durchführung, Analyse, statistische Auswertung und graphische Darstellung der tierexperimentellen und immunohistochemischen Versuche
- Verfassen von wesentlichen Teilen des Manuskripts

PD Dr. med. Karsten Weylandt
Berlin, den 18. Dezember 2012

Beate Gomolka
Berlin, den 18. Dezember 2012

9 Druckexemplare der ausgewählten Publikationen

Die ausgewählten Publikationen sind aus rechtlichen Gründen in der elektronischen Version der Dissertation nicht enthalten.

9.1 Publikation I

Titel: Analysis of omega-3 and omega-6 fatty acid-derived lipid metabolite formation in human and mouse blood samples.

Autoren: **Gomolka B**, Siegert E, Blossey K, Schunck WH, Rothe M, Weylandt KH.

Zeitschrift: Prostaglandins & Other Lipid Mediators

Jahr: 2011

9.2 Publikation II

Titel: Suppressed liver tumorigenesis in fat-1 mice with elevated omega-3 fatty acids is associated with increased omega-3 derived lipid mediators and reduced TNF-alpha.

Autoren: Weylandt KH, Krause LF, **Gomolka B**, Chiu CY, Bilal S, Nadolny A, Waechter SF, Fischer A, Rothe M, Kang JX.

Zeitschrift: Carcinogenesis

Jahr: 2011

9.3 Publikation III

Titel: Omega-6 Docosapentaenoic Acid derived Resolvins and 17-Hydroxydocosahexaenoic Acid modulate Macrophage Function and alleviate Experimental Colitis.

Autoren: Chiu CY*, **Gomolka B***, Dierkes C, Huang NH, Schroeder M, Purschke M, Manstein D; Dangi B, Weylandt * geteilte Autorenschaft

Zeitschrift: Inflammation Research.

Jahr: 2012

10 Lebenslauf

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

11 Komplette Publikationsliste

Analysis of omega-3 and omega-6 fatty acid-derived lipid metabolite formation in human and mouse blood samples.

Gomolka B, Siegert E, Blossey K, Schunck WH, Rothe M, Weylandt KH.

Prostaglandins Other Lipid Mediat. 2011 Apr;94(3-4):81-7

Suppressed liver tumorigenesis in fat-1 mice with elevated omega-3 fatty acids is associated with increased omega-3 derived lipid mediators and reduced TNF-alpha.

Weylandt KH, Krause LF, **Gomolka B**, Chiu CY, Bilal S, Nadolny A, Waechter SF, Fischer A, Rothe M, Kang JX.

Carcinogenesis. 2011 Jun;32(6):897-903

Omega-3 fatty acids and their lipid mediators: Towards an understanding of resolvin and protectin formation: Omega-3 fatty acids and their resolvin/protectin mediators.

Weylandt KH, Chiu CY, **Gomolka B**, Waechter SF, Wiedenmann B.

Prostaglandins Other Lipid Mediat. 2012 Mar;97(3-4):73-82

Omega-6 Docosapentaenoic Acid derived Resolvins and 17-Hydroxydocosahexaenoic Acid modulate Macrophage Function and alleviate Experimental Colitis.

Chiu CY*, **Gomolka B***, Dierkes C, Huang NH, Schroeder M, Purschke M, Manstein D, Dangi B, Weylandt KH. * geteilte Autorenschaft

Inflamm Res. 2012 Sep;61(9):967-76

12 Danksagung

Sehr herzlich bedanke ich mich bei Herrn PD Dr. med. Karsten Weylandt für die Überlassung des interessanten Themas, seine intensive wissenschaftliche Betreuung, seine vielen zielführenden Ideen und engagierten Diskussionen sowie die nette Zusammenarbeit.

Herrn Prof. Dr. med. Bertram Wiedenmann danke ich für die Möglichkeit, in seiner Forschungsabteilung der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Hepatologie und Gastroenterologie der Charité Universitätsmedizin, Campus Virchow Klinikum, wissenschaftlich arbeiten zu können.

Herrn Dr. rer. nat. Michael Rothe danke ich für die jederzeit überaus kompetente und umfassende Unterstützung bei der Etablierung und Durchführung der LC(ESI)-MS/MS-Analytik im Labor der Lipidomix GmbH.

Bei Katja, Maik, Peter und Petra bedanke ich mich für ihre sehr große und stetige Hilfs- und Diskussionsbereitschaft im und um das Labor. Ein großes Dankeschön fürs konstruktive Mitdenken geht außerdem an Cheng, Christian, Kathrin, Mirko und Tobias.

Ganz besonders jedoch danke ich Hermine, Andreas und Matthias!