

Aktivierung des angeborenen Immunsystems im Zentralnervensystem nach subchronischer Alkoholbehandlung im Mausmodell

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Hohen Medizinischen Fakultät

der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität

Bonn

Jule Marie Rath

aus Troisdorf

2020

Angefertigt mit der Genehmigung
der Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: PD Dr. rer. nat. Ildikó Rácz
2. Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Eicke Latz

Tag der Mündlichen Prüfung: 18.10.2019

Aus dem Institut für Molekulare Psychiatrie
Direktor: Prof. Dr. rer. nat. Andreas Zimmer

Gewidmet meinem Vater, der mir ein Mikroskop schenkte, als ich klein war und meiner Mutter, von der ich die Eigenschaft habe, mich im Krankenhaus heimisch zu fühlen.

Inhaltsverzeichnis

	Abkürzungsverzeichnis	7
1.	Einleitung	9
1.1	Alkoholkonsum	9
1.2	Das angeborene Immunsystem	11
1.3	Die Wirkung von Alkohol auf das angeborene Immunsystem	14
1.4	Zielsetzung	16
2.	Material und Methoden	17
2.1	Material	17
2.1.1	Laborgeräte	17
2.1.2	Chemikalien und Enzyme	18
2.1.3	Software	19
2.2	Versuchsaufbau	19
2.2.1	Tierversuche	19
2.2.2	Gewebeentnahme	24
2.3	Genexpressionsanalysen	24
2.3.1	Isolation von Genmaterial	24
2.3.2	quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion	26
2.4	quantitativer Proteinnachweis	29
2.4.1	Proteinisolierung	29
2.4.2	ELISA	30
3.	Ergebnisse	34
3.1	physische Toleranzentwicklung	34
3.1.1	Blutalkoholkonzentration	34
3.1.2	Änderung der Körpertemperatur	35
3.1.3	Ergebnisse des Rotarod-Tests	37
3.1.4	Ergebnisse des Y-Labyrinths	38
3.2	Ergebnisse der quantitativen Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion	39
3.3	Ergebnisse des Proteinnachweises	53

4.	Diskussion	59
4.1	Ethanolbehandlung	59
4.2	Toleranzentwicklung	60
4.3	Genexpressionsanalysen	61
4.4	quantitativer Proteinnachweis	62
4.5	Mediatoren des angeborenen Immunsystems im Überblick	63
4.6	Ausblick	64
5.	Zusammenfassung	65
6.	Abbildungsverzeichnis	67
7.	Literaturverzeichnis	69
8.	Danksagung	77

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ADH	Alkoholdehydrogenase
ALD	alkoholassoziierte Lebererkrankungen
AMP	Adenosin-Monophosphat
ANOVA	Analysis of Variance
BBB	Blut-Hirnschranke
BCA	Bicinchoninsäure-Assay
BCP	Bromo-Chloro-Propanol
BEC	Blutalkoholkonzentration
BSA	bovines Serum Albumin
cAMP	cyclisches Adenosin-Monophosphat
CB-1/2	Cannabinoid-Rezeptor 1/2
CCL-2	CC-Chemokin-Ligand-2
CD	Cluster of Differentiation
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
Ct	Schwellenzyklus
Cu	Kupfer
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent Assay
et al.	und Mitarbeiter
EtOH	Ethanol-Lösung
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
HCl	Chlorwasserstoff
i.g.	intra-gastrisch
IKK	I κ B Kinase Komplex
IL-10	Interleukin-10
IL-1β	Interleukin-1 β
LPS	Lipopolysaccharid

MMLV-RT	Moloney-Maus-Leukämie-Virus reverse Transkriptase
NaCl	Kochsalzlösung
NAD	Nikotinamidadenindinukleotid
NFκB	nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
NIAAA	National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism
PAMP	pathogen associated molecular pattern
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PFC	Präfrontalcortex
RIPA	Radioimmun-Präzipitationsassay
RNA	Ribonukleinsäure
RNAse	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute
RQ	relative Quantifizierung
RT	Raumtemperatur
RTD-PCR	Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion
SD	Standardabweichung
SEM	Standardfehler des Mittelwertes
Tab.	Tabelle
TLR	Toll-like-Rezeptor
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-Aminomethan
TNF-α	Tumornekrosefaktor α
UV	ultraviolettes Lichtspektrum
WHO	Weltgesundheitsorganisation
ZNS	Zentralnervensystem

1. Einleitung

1.1 Alkoholkonsum

Alkohol als in unserer Gesellschaft kulturell anerkanntes Rauschmittel wird in seinen Auswirkungen auf die Gesundheit oft unterschätzt. Rauschtaten, Unfälle durch Trunkenheit, Alkoholabhängigkeit und körperliche Folgeerkrankungen haben einen großen Einfluss auf die weltweite Gesundheit.

Laut Weltgesundheitsorganisation (WHO) starben im Jahr 2016 3 Millionen Menschen weltweit an Folgen des Alkoholkonsums. Dies macht 5,3 % der Todesfälle weltweit aus (WHO 2018). Zudem zählte die Liste der Erkrankungen und Symptome, die als Folge von Alkoholkonsum identifiziert werden können, im Jahr 2012 mehr als 200 Diagnosen (WHO 2014), im Jahr 2018 mehr als 230 (WHO 2018).

Hierdurch wird deutlich, welchen großen medizinischen und auch finanziellen Einfluss der Konsum von Alkohol auf die Gesellschaft hat.

Es werden verschiedene Arten des Alkoholkonsums unterschieden, die unterschiedliche Gesundheitsrisiken zur Folge haben, denn Studien suggerieren, dass der Zusammenhang zwischen Alkoholkonsummenge und Mortalität nicht linear ist (Gaziano et al. 2000). Mehrere Studienergebnisse suggerieren ein reduziertes kardiovaskuläres Risiko für die Kohorte der „moderaten Trinker“ im Vergleich zu Alkohol-abstinenten Menschen, bei Männern (Hoffmeister et al. 1999) und Frauen (Stampfer et al. 1988). Experimentelle Studien zeigten hier jedoch Hinweise auf gefäßprotektive Eigenschaften von alkoholischen Getränken wie Rotwein durch andere Inhaltsstoffe unabhängig von Ethanol (Karatzi et al. 2004), (Hashikawa-Hobara et al. 2018). Die zuletzt durchgeführte Studie für den Bericht des *Global Burden of Disease* (GBD) des *Institute for Health Metrics and Evaluation* (IHME) der University of Washington suggeriert zudem einen doch nahezu linearen Zusammenhang zwischen Alkoholkonsummenge und kardiovaskulären sowie metabolischen Gesundheitsrisiken, was ebenfalls gegen die protektiven Eigenschaften moderater Mengen Alkohol spricht (GBD 2018). Hiernach waren 2016 weltweit 2,8 Millionen Sterbefälle durch Alkoholkonsum verursacht, was in der Population zwischen 14 und 47 Jahren eine Mortalität durch Alkohol von 10% ausmacht.

Grundsätzlich sind gesundheitsschädliche Auswirkungen durch den Genuss von Alkohol

hinlänglich bekannt. Aufgrund der schleimhautschädigenden Eigenschaften von Alkohol (Lavö et al. 1992), kann es zu Ulzera im Bereich von Oesophagus und Magen und im Verlauf auch Karzinomen im Bereich des oberen Gastrointestinaltraktes kommen. Auch der Zusammenhang von Fibrosierung und Zirrhose und letztlich Karzinomen der Leber mit dem Konsum von Alkohol ist nachgewiesen und wird zusammengefasst als alkoholassoziierte Lebererkrankungen (ALD). Die Genese einer chronischen und akuten Pankreatitis ist in den westlichen Ländern zum Hauptanteil mit Alkoholmissbrauch assoziiert (Ammann et al. 1996). Alkohol kann im Knochenmark die Erythropoese beeinträchtigen (Lüllmann und Mohr 2006), was sich bei chronischem Alkoholabusus auf das Blutbild auswirkt. Zudem kann chronischer Alkoholkonsum neurodegenerative Erkrankungen wie das Korsakow-Syndrom, die Wernicke-Encephalopathie (Harper et al. 1995), Polyneuropathie oder eine Kleinhirnatrophie (Luo 2015) auslösen.

Binge Drinking

Als besonders gefährlich durch Zusammenhang mit Unfällen, Verletzungen und auch konsumbedingten Organschäden gilt das sogenannte *binge drinking*. Der Begriff bezeichnet eine besonders schwere Form des kurzzeitigen und akuten Alkoholkonsums und hat sich in der Biomedizin als Bezeichnung für ein eigenständiges Konsumverhalten bereits etabliert. Hierbei ist insbesondere die Motivation des Trinkers hervorzuheben, bewusst und aktiv einen starken Rauschzustand herbeiführen zu wollen.

Das *National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism* (NIAAA) in den U.S.A. definiert *binge drinking* offiziell als Konsum alkoholischer Getränke zu einer Blutalkoholkonzentration (BEC) von mindestens 0.08 g/dl (entspricht 0,8 Promille) innerhalb von 2 Stunden und als Konsum, der schwere gesundheitliche Risiken birgt und Folgeschäden verursacht (NIAAA 2004). Diese Definition ist angelehnt an Wechsler, Davenport et al. (1994), die amerikanische Studenten und ihr Trinkverhalten untersuchten.

Im Unterschied zu chronischem Alkoholmissbrauch, hat die schädliche Form des *binge drinking* nicht zwangsläufig eine physische Abhängigkeitserkrankung als Grundlage, was dazu führt, dass dieses Konsummuster so häufig unterschätzt wird. Gerade unter jungen Erwachsenen ist diese Form des Konsums häufig und sozial anerkannt (White et al. 2006), was wiederum das Risiko der Entwicklung einer Abhängigkeit im Folgenden erhöht (Be-

seler et al. 2010). Ein solches Trinkverhalten in der Adoleszenz gilt als Risikofaktor für Alkoholabhängigkeit und Lebererkrankungen im späteren Leben (Saha et al. 2007) und führt häufig und direkter als chronischer Alkoholkonsum zu schweren Folgekomplikationen (Wechsler und Isaac 1992). Durch die besondere Zielsetzung des Rauschzustandes ist vor allem das Risiko eine akute Alkoholintoxikation mit lebensbedrohlichen Zuständen zu erreichen wesentlich höher.

Insgesamt bleibt der Genuss von Rauschmitteln und insbesondere Alkohol als "legaler Droge" und dessen Abhängigkeitspotential aufgrund seiner enormen gesellschaftlichen und ökonomischen Relevanz dauerhaft Gegenstand der Wissenschaft in Soziologie, Psychologie und Biomedizin.

1.2 Das angeborene Immunsystem

Das Immunsystem von Säugetieren wird in ein angeborenes und ein erworbenes Immunsystem grob unterteilt. Im Gegensatz zum erworbenen Immunsystem, das über Antikörperbildung zwar verzögert aber hochspezialisiert funktioniert, ist die Grundlage der angeborenen Immunabwehr das Zusammenspiel von unspezifischen phagozytierenden Zellen und humoralen Signalkaskaden.

Die Identifizierung und Neutralisierung von Krankheitserregern beruht hierbei unter anderem auf der Erkennung sogenannter *pathogen associated molecular patterns* (PAMP). Dies sind Nukleinsäuren oder Strukturen auf der Oberfläche von exogenen Krankheitserregern, die unter anderem von *Toll-like-Rezeptoren* (TLR) auf Endothel-, Fibroblasten-dendritischen und vielen anderen Immunzellen erkannt und gebunden werden.

Lipopolysacharid (LPS) als ein solches PAMP exprimiert von Gram-negativen Bakterien, wird vornehmlich von TLR-4 erkannt (Park und Lee 2013). Dies stellt einen der bedeutendsten Makrophagen-Stimulatoren da und aktiviert auf genomischer Ebene über den *nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells* (NF κ B) zahlreiche Entzündungsmediatoren und -zellen (Shimazu et al. 1999).

Der TLR-4 ist ein zellwandständiges Protein, das mit Hilfe von CD14 (CD von *cluster of differentiation*), welches LPS-tragende Pathogene bindet, aktiviert wird. Das Adapterprotein MyD88 aktiviert daraufhin die Protein-Kinase IRAK und das Adapter-Protein TRAF6, welche die MAP-Kinase TAK-1 binden und phosphorylieren. Über mehrere Zwischenschrit-

te wird durch die I κ B-Kinase (IKK) der Transkriptionsfaktor NF κ B aktiviert (Alberts et al. 2002). Unter anderem werden Cytokine wie Interleukin-6 (IL-6), Interleukin-1 β (IL-1 β), Tumornekrosefaktor-alpha (TNF- α) und CC-Chemokin-Ligand-2 (CCL-2) als unspezifische proinflammatorische Cytokine exprimiert, die wiederum weitere Teile des Immunsystems stimulieren (Shimazu et al. 1999), (Turner et al. 2014). So bildet sich ein kommunizierendes System - eng verwoben mit dem erworbenen Anteil des Immunsystems -, das über diverse Zwischenschritte und Feedbackmechanismen ein hochkomplexes Gleichgewicht aufrecht erhält, dadurch jedoch auch Angriffspunkte für viele entzündliche Erkrankungen darstellt.

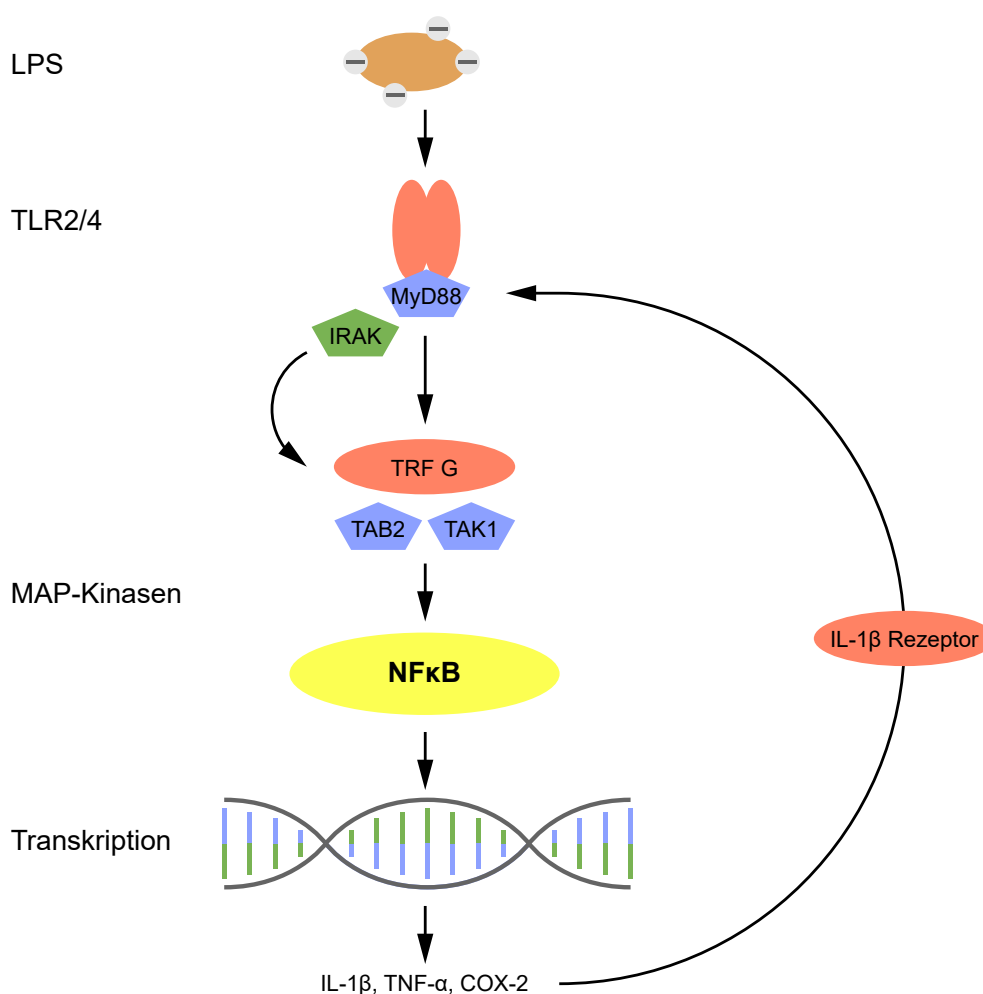


Abb. 1: Aktivierung von NF- κ B Durch LPS aktivierte TLR aktivieren den Transkriptionsfaktor NF- κ B durch den proinflammatorische Cytokine wie IL-1 β produziert werden.

Das Immunsystem des Zentralnervensystems

Das Zentralnervensystem (ZNS) als Verband aus vornehmlich nicht-regenerativen Zellen, nimmt durch seine Abgrenzung durch die Blut-Hirn-Schranke (BBB) und die fehlende

lymphatische Drainage immunologisch gesehen eine Sonderstellung ein (Medawar 1948). Durch ZNS-eigene Makrophagen (sogenannte Mikroglia) und die Veränderung der Homöostase durch Astrozyten (reaktive Astrozytose) ist das ZNS in der Lage, in erster Linie durch Ödembildung, Schwellung und Zelltod auf äußere Einflüsse wie Verletzung, Hypoxie oder Pathogene zu reagieren. Dies macht das Nervengewebe in seiner starren knöchernen Hülle sehr vulnerabel. Zudem wurde gezeigt, dass das ZNS dennoch in der Lage ist mit dem Immunsystem des Organismus zu kommunizieren, etwa durch die Spezialisierung von peripheren Monozyten zu Mikroglia (Oehmichen et al. 1973). Dies verstärkt die Möglichkeiten des ZNS auf äußere Einflüsse zu reagieren, stellt jedoch auch eine Ursache für zahlreiche entzündliche Erkrankungen des ZNS dar (Wekerle 2006). Hierdurch zeigt sich die große Bedeutung der Immunität des ZNS für die Forschung, nicht nur im Bereich der Neurowissenschaften, sondern auch bezogen auf viele andere Krankheitsbilder und Kreisläufe im Organismus.

Proinflammatorische Cytokine wie o.g. IL-6, IL-1 β oder TNF- α werden auch im ZNS im Rahmen einer Immunantwort gebildet. Zudem konnte jedoch auch gezeigt werden, dass beispielsweise TNF- α mittels Transporterproteinen die BBB überwinden und so eine Immunreaktion von peripher ins ZNS transportieren kann (Deli et al. 1995). Die so entstehende Neuroinflammation wird gesteuert durch das sog. Inflammasom, ein Proteinkomplex, welches die Aktivierung der Vorläuferproteine von beispielsweise IL-1 β vermittelt (Lippai et al. 2013).

Cannabinoid-Rezeptoren Typ 2 (CB-2) sind G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, die die Umwandlung von Adenosin-Monophosphat (AMP) in cyclisches AMP (cAMP) hemmen (Munro et al. 1993). Es konnte erst später gezeigt werden, dass diese Rezeptoren neben den ubiquitär vorkommenden CB-1-Rezeptoren ebenfalls im ZNS exprimiert werden, hier vor allen Dingen auf Zellen des Neuroepithels der BBB und Mikroglia (Turcotte et al. 2016). Ihre Hochregulation bei Entzündungsreaktionen im Organismus, legt eine Rolle in der Immunantwort des ZNS nahe (Molina-Holgado et al. 1997). Dies zeigt sich vor allem durch chronische Entzündungsprozesse (Zhang et al. 2003).

1.3 Die Wirkung von Alkohol auf das angeborene Immunsystem

Die zytotoxischen Eigenschaften von Ethanol sind seit Langem bekannt und gut verstanden. Dennoch sind die Auswirkungen von Ethanol auf den Gesamtorganismus wesentlich komplexer und weiterhin Gegenstand der Forschung.

Erst in den letzten Jahren jedoch konnte die Wirkung des Alkohols auf das Immunsystem genauer beschrieben werden. Zahr et al. (2010) zeigten einen Zusammenhang zwischen Alkoholkonsum und der Unterdrückung der angeborenen Immunantwort in der Lunge. Andererseits konnte die Aktivierung des Immunsystems in der Leber und dadurch der Zusammenhang von Alkoholkonsum und chronischen Lebererkrankungen gezeigt werden (McClain und Cohen 1989), (McClain, Barve et al. 1999).

Ethanol hat die molekulare Eigenschaft - im Gegensatz zu hydrophileren Substanzen oder großen Molekülen -, körpereigene Lipidmembranen durch Diffusion zu passieren und zusätzlich durch Veränderung der *tight junctions* die Stabilität der Darmwand zu beeinflussen (Rao et al. 2004). Zusätzlich führt Ethanol in kurzer Zeit zu Schleimhautläsionen und erhöhter Gefäßpermeabilität (Lavö et al. 1992). So kann der Genuss von Alkohol zu einer Durchlässigkeit der Darmwand führen, die zusätzlich Anteile der ständigen Darmflora in den Kreislauf übertreten lassen (C Bode und JC Bode 2003). Im Gegensatz zum Darmlumen werden sie hier vom angeborenen Immunsystem erkannt und können eine Entzündungskaskade auslösen (Parlesak et al. 2000), vornehmlich im portalen Kreislauf als arteriovenöse Drainage des gastroenteralen Systems (Szabo et al. 2011). Hierdurch zeigt also die enterale Aufnahme von Alkohol eine indirekt proinflammatorische Wirkung durch LPS aus dem Darmlumen (C Bode und JC Bode 2003) (Zuo et al. 2001), die das angeborene Immunsystem im portalen Kreislauf über TLR-4 aktiviert (Alfonso-Loeches et al. 2010). Dies kann zu immunvermittelten Erkrankungen der Leber führen, die TNF- α -abhängig sind (Yin et al. 1999) (Hanck et al. 1998). Qin et al. (2008) haben gezeigt, dass Ethanol selbst in einer Einzeldosis eine durch LPS vermittelte Immunreaktion in der Leber potenzieren kann.

So freigesetzte proinflammatorische Cytokine können über verschiedene Transportmechanismen die BBB überwinden und so im Zentralnervensystem immunmodulierend wirksam

werden (Banks 2005). Anhand von astrozytären Zellkulturen (Vallés et al. 2004) und auch in vivo (Ward et al. 1996) konnte bereits gezeigt werden, dass Ethanol im Zentralnervensystem NF κ B-gesteuert die Produktion von Sauerstoffradikalen und proinflammatorischen Mediatoren wie CCL-2 (He und Crews 2008) auslöst.

Auch Langzeitveränderungen in der Genexpression nach chronischem Alkoholkonsum und Alkoholabhängigkeit wurden bereits untersucht (Warden und Mayfield 2017) und es konnte unter anderem gezeigt werden, dass proinflammatorische Cytokine wie IL-1 β in Verbindung mit neurodegenerativen Prozessen stehen (Simi et al. 2007).

Durch Einfluss von Alkohol auf den Organismus und epigenetische Transkriptionsmechanismen zeigen sich Änderungen im Genexpressionsmuster (Contet 2012). So geriet der Transkriptionsfaktor NF κ B im Zusammenhang mit Alkohol immer spezifischer in den Fokus. Truitt et al. (2016) konnten die Untereinheit IKK β von NF κ B als mögliches therapeutisches Ziel zur Behandlung von Alkoholabhängigkeit identifizieren.

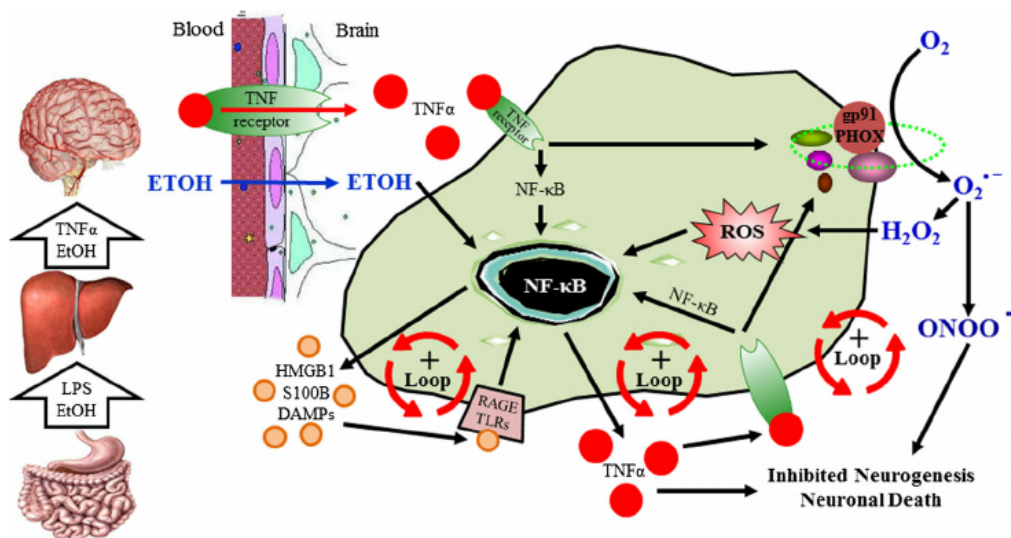


Abb. 2: NF- κ B-gesteuerte Immunantwort durch EtOH (Crews und Vetreno 2016) Durch die Immunreaktion in der Leber freigesetztes TNF- α kann über einen entsprechenden Transporter die BBB überwinden und in hirneigenen Zellen NF- κ B-abhängig Entzündungskaskaden auslösen, die durch Sauerstoffradikale zellschädigend sind und sich selbst verstärken.

Microglia im ZNS können - wie periphere Makrophagen - je nach Stimulus verschiedene Aktivierungsstadien einnehmen (Graeber 2010). Marshall et al. (2013) konnten zeigen,

dass im Rahmen von akutem, kurzzeitigem Alkoholkonsum bei Ratten, Mikroglia zunächst nicht vollständig aktiviert werden, sondern in einen halbaktiven Zustand übergehen, indem zunächst antiinflammatorische Cytokine wie Interleukin-10 (IL-10) exprimiert werden.

Die Expression von IL-1 β in Mikroglia im Rahmen von chronischem Alkoholkonsum (Pradier et al. 2018) und die Rolle von äußeren Faktoren auf die Immunantwort durch chronischen Alkoholkonsum bei Mäusen wurde in unserem Labor bereits untersucht (Pradier et al. 2015).

Wie in Abschnitt 1.1 bereits beschrieben, sind demnach unterschiedliche Konsumformen von Alkohol in ihren Folgen nicht unbedingt dieselben. Osterndorff-Kahanek et al. (2013) verglichen deshalb verschiedene Konsummuster, wie chronischen, chronisch-intermittierenden und akuten Konsum mit der Behandlung mit LPS. Sie untersuchten die Auswirkungen auf das Trinkverhalten und die Genexpression mittels Microarray, die ebenfalls deutliche Unterschiede zeigten. Die deutlichste Veränderung bezogen auf die allgemeine Genexpression zeigte sich hier bei der chronisch-intermittierenden Form des Alkoholkonsums bei Mäusen. Die meisten Gemeinsamkeiten zeigten sich bei der Genexpression im Lebergewebe.

Insgesamt bleibt der Zusammenhang von Alkohol und Neuroinflammation nicht gänzlich geklärt. Es zeigt sich, dass der Effekt nicht allein dosisabhängig ist, sondern verschiedene Punkte auf der Zeitachse und unterschiedliche Arten des Zuführungsmusters zu unterschiedlichen Ergebnissen führen, die es in einen größeren Zusammenhang zu bringen gilt.

1.4 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit war es, mit Hilfe eines adäquaten Tiermodells für kurzfristigen und schwergradigen Konsum von Alkohol - dem *binge drinking* entsprechend - einerseits frühzeitige Toleranzbildung nachzuweisen und vor allem die Initiierung eines Entzündungskreislaufes in einen zeitlichen Verlauf einzuordnen.

Hierfür sollte zunächst ein Paradigma entwickelt werden, das ein entsprechendes Konsummuster abbilden kann und der Definition für *binge drinking* nachprüfbar Rechnung trägt. Veränderungen auf die Gen- und Proteinexpression sollten untersucht, und so möglichst eine zeitliche Schwelle für das Auftreten neuroinflammatorischer Prozesse umrissen werden.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Laborgeräte

<i>5415 R</i> Zentrifuge	<i>Eppendorf</i> , Hamburg, Deutschland
<i>7500 Real-time PCR System</i> PCR-Maschine	<i>Thermo Fisher Scientific</i> , Waltham, U.S.A.
<i>Adult Mouse Brain Slicer Matrix</i> Hirnschnittmatrix für Mäuse	<i>Zivic Instruments</i> , Pittsburgh, U.S.A.
<i>Arex</i> Magnetrührer	<i>Velp Scientifica</i> , Usmate, Italien
<i>BAT-12</i> Thermometer	<i>Harvard Apparatus</i> , Holliston, U.S.A.
<i>Galaxy mini</i> Zentrifuge	<i>VWR international</i> , Radnor, U.S.A.
<i>iCycler</i> Thermozykler	<i>Bio-Rad</i> , Hercules, U.S.A.
<i>JANUS</i> Pipettierroboter	<i>Perkin Elmer</i> , Waltham, U.S.A.
Knopfkanüle	<i>Hartmann</i> , Heidenheim, Deutschland
<i>MRX Microplate Reader</i> ELISA-Lesegerät	<i>Dynatech Laboratories</i> , Chantilly, U.S.A.
<i>Multifuge 3S-R</i> Plattenzentrifuge	<i>Heraeus Instruments</i> , Hanau, Deutschland
<i>Nanodrop ND-1000</i> Spektrophotometer	<i>Thermo Fisher Scientific</i> , Waltham, U.S.A.
<i>inolab pH Level2</i> pH-Meter	<i>WTW</i> , Weilheim, Deutschland
<i>Light Cycler 480 II</i> PCR-Maschine	<i>Roche</i> , Basel, Schweiz
<i>Precellys24</i> Homogenisator	<i>Bertin Technologies</i> , Montigny le Bertonneux, Frankreich
<i>Rotarod</i>	<i>Ugo Basile</i> , Gemonio, Italien
<i>Sonopuls</i> Ultraschallhomogenisator	<i>Bandelin</i> , Berlin, Deutschland
<i>Thermomixer compact</i> Wärmeblock	<i>Eppendorf</i> , Hamburg, Deutschland
UV-Arbeitsstation	<i>Analytic Jena</i> , Upland, U.S.A.
<i>Ultrospec 2100 pro</i> Photometer	<i>GE Healthcare</i> , Buckinghamshire, Großbritannien
<i>Vortex Genie 2</i> Schüttler	<i>Scientific Industries</i> , Bohemia, U.S.A.

2.1.2 Chemikalien und Enzyme

BCP	<i>Sigma Aldrich Chemie</i> , München, Deutschland
<i>cDNA Superscript II</i> Transkriptionskit	<i>Thermo Fisher Scientific</i> , Waltham, U.S.A.
Chlorwasserstoff	<i>Sigma Aldrich Chemie</i> , München, Deutschland
<i>cOmplete mini</i> Protease-Inhibitor Tabletten	<i>Sigma Aldrich</i> , München, Deutschland
CP2201 Laborwaage	<i>Sartorius AG</i> , Göttingen, Deutschland
Desoxycholsäure	<i>Sigma Aldrich Chemie</i> , München, Deutschland
<i>dNTP-Mix</i> Nukleotidmix	<i>Thermo Fisher Scientific</i> , Waltham, U.S.A.
EDTA	<i>Sigma Aldrich Chemie</i> , München, Deutschland
<i>ELISA Ready-SET-Go!</i> ELISA-Kit	<i>Thermo Fisher Scientific</i> , Waltham, U.S.A.
Ethanol >99%	<i>Merck Millipore</i> , Darmstadt, Deutschland
Isopropanol	<i>VWR International</i> , Radnor, U.S.A.
Kochsalzlösung	<i>Carl Roth</i> , Karlsruhe, Deutschland
<i>MilliQ</i> entionisiertes Wasser	<i>B. Braun</i> , Melsungen, Deutschland
<i>NAD-ADH Reagent multiple testvial</i> Testreagenz	<i>Merck Millipore</i> , Darmstadt, Deutschland
<i>NONIDET P40</i> nicht-denaturierende Detergenz	<i>Sigma Aldrich Chemie</i> , München, Deutschland
Nuklease-freies Wasser	<i>Sigma Aldrich Chemie</i> , München, Deutschland
<i>OligoDT</i> Primer	<i>Thermo Fisher Scientific</i> , Waltham, U.S.A.
PBS-Tabletten	<i>Thermo Fisher Scientific</i> , Waltham, U.S.A.
SDS	<i>Santa Cruz Technology</i> , Dalles, U.S.A.
<i>TaqMan Gene Expression Assay</i> Primer/Sonden	<i>Carl Roth</i> , Karlsruhe, Deutschland
<i>TaqMan Universal PCR Master Mix No AmpErase UNG</i>	<i>Thermo Fisher Scientific</i> , Waltham, U.S.A.
TRIS-Puffer	<i>Thermo Fisher Scientific</i> , Waltham, U.S.A.
Trizol	<i>Carl Roth</i> , Karlsruhe, Deutschland
Tween-20 Emulgator	<i>Thermo Fisher Scientific</i> , Waltham, U.S.A.
	<i>Sigma Aldrich Chemie</i> , München, Deutschland

2.1.3 Software

<i>Prism 5</i> , statistische Auswertung, Grafiken	<i>Graphpad</i> La Jolla, U.S.A.
<i>Excel 2011</i> , Datenverarbeitung	<i>Microsoft</i> , Redmont, U.S.A.
<i>Light Cycler 480 Software</i> , PCR-Software	<i>Roche</i> , Basel, Schweiz
<i>SDS 2.2</i> , PCR-Software	<i>Thermo Fisher Scientific</i> , Waltham, U.S.A.
<i>Statistika</i> , statistische Auswertung	<i>StatSoft (Europe) GmbH</i> , Hamburg, Deutschland

2.2 Versuchsaufbau

2.2.1 Tierversuche

Alle experimentellen Verfahren wurden in Übereinstimmung mit den institutionellen Tierschutz-Richtlinien durchgeführt, von den zuständigen Behörden genehmigt (Tierversuchsantragsnummer: 84-02.04.2013.A183) und von autorisiertem Personal durchgeführt.

C57BL/6J-Mäuse im Alter von ca. 8 Wochen wurden in Gruppengehegen gehalten, mit vier bis sechs Individuen pro Käfig in umgekehrtem Tag-Nacht-Rhythmus (Helligkeit ab 19:00 Uhr und Dunkelheit ab 09:00 Uhr), mit freiem Zugriff auf Trinkwasser und Standardfutter in Pelletform.

Ethanolbehandlung

Zunächst wurden die Tiere in mehrere Gruppen von unterschiedlicher Behandlungsdauer geteilt. Die Behandlungen erfolgten in Blöcken jeweils an 4 aufeinander folgenden Tagen. Zwischen zwei Behandlungsblöcken lagen jeweils 3 Tage Behandlungspause. Bei den Tiergruppen wurde auf eine ausgeglichene Geschlechterverteilung geachtet.

Zur Behandlung (siehe Abbildung 3, Abbildung 4) wurden die Tiere zweimal täglich mit 3g/Kg Körpergewicht Ethanol beziehungsweise Kochsalzlösung zur Kontrolle behandelt. Dies geschah in Form von 25%iger Ethanol-Lösung (Ethanol in Kochsalzlösung; EtOH) oder äquivalentem Volumen reiner Kochsalzlösung (NaCl) als Kontrolle, per intragastrischer Injektion über eine ungebogene Knopfkanüle. Die Injektionen erfolgten jeweils morgens um 09:00 und nachmittags um 17:00 Uhr. Armstrong (1980) hat aufgezeigt, dass der Konsum von Flüssigkeiten und Futter zu Beginn und zum Ende der Nachtphase am größten ist. Die Behandlung konnte somit möglichst parallel zur zirkadianen Rhythmik der Tiere verlaufen. Die Tiere wurden vor jeder Injektion gewogen um die entsprechende Applikationsmenge zu ermitteln (das durchschnittliche Injektionsvolumen betrug $0,27 \text{ ml} \pm 0,01 \text{ ml}$). Unmittelbar

vor und dreißig Minuten nach der Behandlung wurde die Körpertemperatur der Tiere rektal gemessen.

Nach ein-, zwei- oder dreimaliger Behandlung mit EtOH oder NaCl über 4 Tage - mit jeweils 3 Tagen Entzug dazwischen - wurde den Tieren entweder am Folgetag eine letzte Dosis verabreicht, woraufhin die Tötung der Tiere und die Gewebeentnahme folgte, oder es folgten wiederum 3 Tage Entzug und im Anschluss daran die Tötung und Gewebeentnahme, da es Hinweise darauf gibt, dass ein intermittierendes Muster zumindest bei chronischem Alkoholkonsum einen größeren Einfluss auf das Trinkverhalten wie auch auf die Genexpression hat (Osterndorff-Kahanek et al. 2013). Widerum zeigten sich bei der Analyse von Neurodegeneration und Neurogenese nach Modellen mit subakutem Alkoholkonsum Hinweise auf den Wideranstieg der hippocampalen Neurogenese bei Entzug bereits kurz nach akutem Konsum (Crews und Nixon 2009).

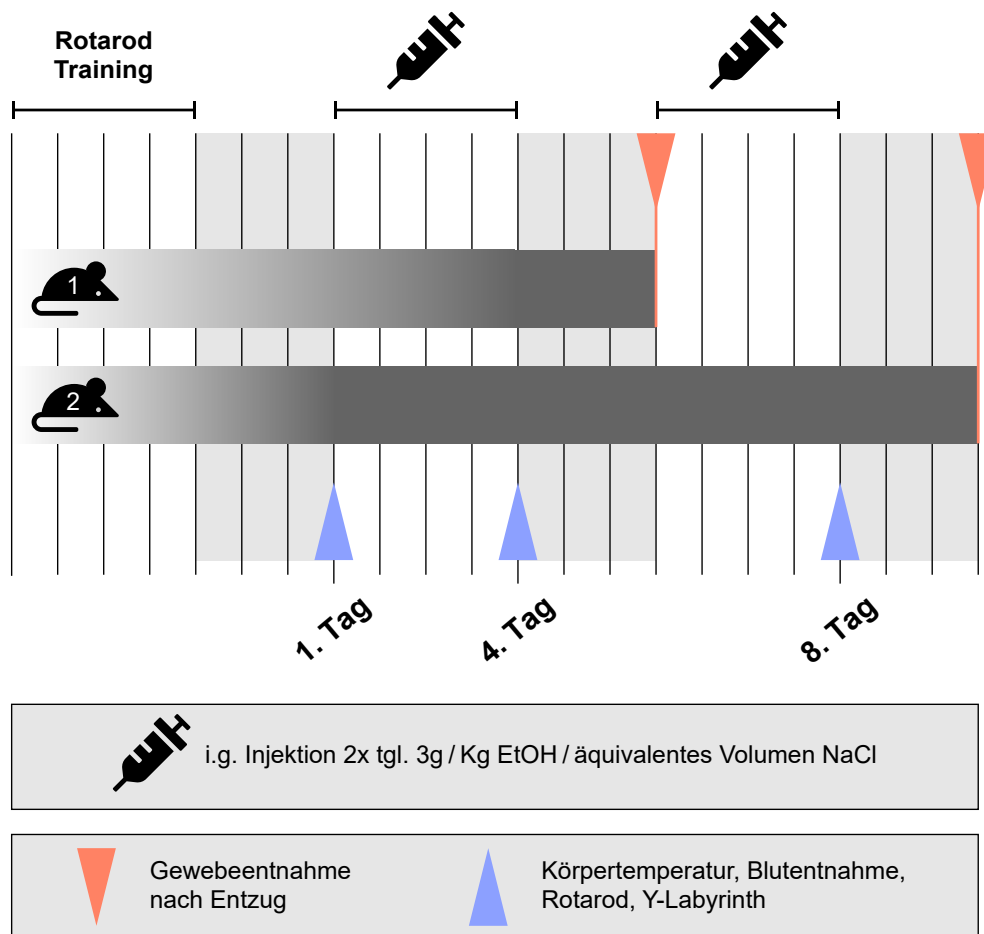


Abb. 3: Versuchsablauf mit 4 und 8 Tagen Behandlung, anschließend jeweils 3 Tage Entzug und Gewebeentnahme. 20 Tiere erhielten 2x täglich 3g/Kg Körpergewicht 25%ige EtOH-Lösung, 12 Tiere erhielten die äquivalente Menge NaCl für 4 Tage. Es folgten 3 Tage ohne Behandlung und im Anschluss wurde die Hälfte der Tiere getötet und Hirngewebe entnommen, die andere Hälfte erhielt die Behandlung für weitere 4 Tage, 3 Tage ohne Behandlung und anschließend erfolgte auch hier die Gewebeentnahme. $n = 2 \times (10 + 6)$

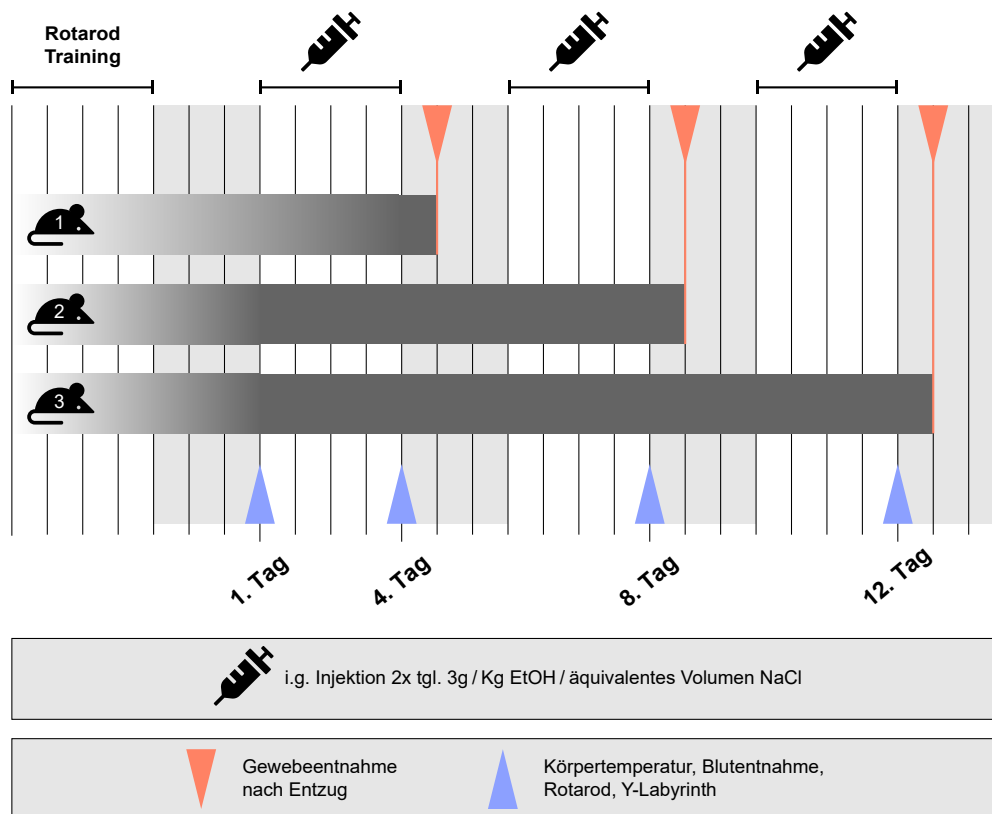
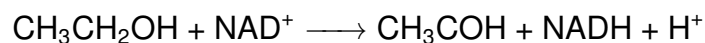


Abb. 4: Versuchsablauf mit 4, 8 und 12 Tagen Behandlung, am Folgetag jeweils eine letzte Injektion und Gewebeentnahme nach 1 Stunde. 30 Tiere erhielten 2x täglich 3g/Kg Körpergewicht 25%ige EtOH-Lösung, 18 Tiere erhielten die äquivalente Menge NaCl entweder für 4, 8 oder 12 Tage. Anstelle einer Entzugsphase erfolgte am Folgetag eine letzte Behandlung und nach Ablauf einer Stunde wurden die Tiere getötet und Leber- und Hirngewebe entnommen $n = 3 \times (10 + 6)$

Zur Kontrolle der Blutalkoholkonzentration (BEC) wurde an Tag 1 und am letzten Tag einer viertägigen Behandlung jeweils eine Stunde nach der EtOH-Gabe Blut aus dem Schwanz entnommen, da die BEC hier den Höchstwert erreicht (Carson und Pruett 1996). Die Blutproben wurden zwanzig Minuten bei 4000 Umdrehungen pro Minute und 4 Grad Celsius zentrifugiert und überstehendes Plasma entweder bei -20 Grad Celsius gelagert oder sofort photometrisch analysiert. Hierfür wurde eine Nikotinamidadenindinukleotid-Alkoholdehydrogenase-Testlösung (NAD-ADH-Testlösung) verwendet.

Das körpereigene Enzym Alkoholdehydrogenase (ADH) katalysiert die Reaktion



wobei $\text{NADH} + \text{H}^+$ proportional zur enthaltenen EtOH-Konzentration anfällt, was UV-Photometrisch detektiert werden kann. Mit Hilfe einer Standardreihe inklusive Negativkontrolle, kann durch Extrapolieren eine Standardkurve ermittelt und die BEC der Versuchstiere bestimmt werden.

Rotarod

Das Versuchsprinzip des sogenannten Rotarod (Ugo Basile, Italien) ist die Objektivierung von Veränderungen in der physiologischen Motorik. Hierfür laufen die Tiere auf einer sich drehenden zylindrischen Halterung, die im Verlauf gleichmäßig auf eine Umdrehungsgeschwindigkeit von maximal 40 Umdrehungen pro Minute (rpm) beschleunigt und die Laufdauer der Tiere wird gemessen. Sobald die Kapazität der motorischen Funktion überschritten ist und die Tiere von der Halterung fallen, wird durch einen Kontakt die Laufzeit gestoppt.

Die ersten Durchläufe wurden an den drei Tagen vor Beginn der Ethanolbehandlung durchgeführt um die Tiere an das Gerät zu gewöhnen und um Basiswerte der Motorfunktion zu ermitteln, die mit den Testwerten verglichen werden können. Hierfür wurden pro Individuum und Trainingstag 10 Durchläufe gemessen.

Die eigentlichen Testungen wurden an Tag 1 und am letzten Tag eines jeden Behandlungsblocks jeweils eine Stunde nach Injektion mit 4 Durchläufen pro Individuum durchgeführt, die Ergebnisse wurden gemittelt.

Y-Labyrinth

Mit dem sogenannten Y-Labyrinth (siehe Abbildung 5) kann die Kapazität des räumlichen Gedächtnisses und somit ein Teil der kognitiven Funktion objektiviert werden.

Die Tiere wurden hierfür frei in einem dreiarmligen Gehege ausgesetzt und durften sich frei bewegen, während eine Kamera aufzeichnete, welche Arme des Geheges wie oft begangen werden. Um jegliche visuelle Beeinflussung ausschliessen zu können, wurden die Tests in abgeschlossener und gleichmäßig abgedunkelter Umgebung bei 50 Lux durchgeführt. Zum Ausschluss von olfaktorischer Beeinflussung wurde die Apparatur vor jedem Durchgang mit EtOH gereinigt.

Die Testungen fanden nach der Behandlung und 3 Tagen Entzug statt.

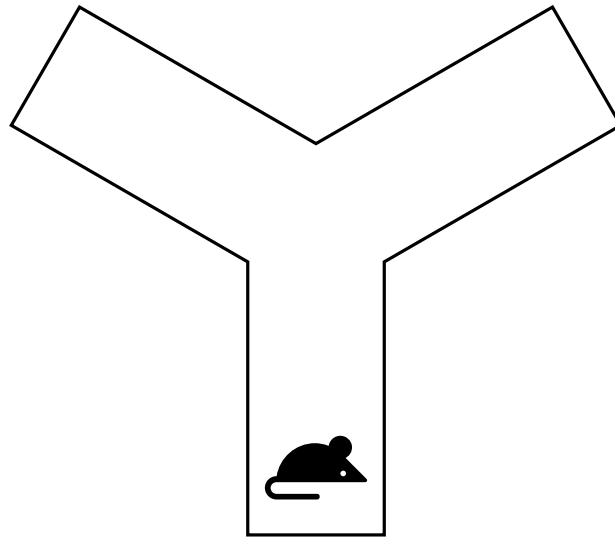


Abb. 5: schematische Darstellung des Y-Labyrinth

2.2.2 Gewebeentnahme

Die Tiere wurden nach 1, 2 oder 3 Behandlungsblöcken, entweder 1 Stunde nach einer letzten Injektion am Folgetag oder nach 3 Tagen Entzug jeweils durch zervikale Dislokation getötet (Abbildung 3, Abbildung 4). Unmittelbar danach erfolgte die Entnahme der Leber, das Freilegen des Gehirns aus dem Schädel und die Präparation von Zerebellum, Hippocampus, Striatum und Präfrontalkortex durch Anfertigen von 1 mm dicken Koronarschnitten mit Hilfe einer Matrix als Führungsschiene und Ausstechen der entsprechenden Areale per Skalpell oder Kanüle. Anschließend folgte die sofortige Schockgefrierung in Trockeneis und Lagerung der Gewebeproben bei -80 Grad Celsius.

2.3 Genexpressionsanalysen

2.3.1 Isolation von Genmaterial

Zur Extraktion von Ribonukleinsäure (RNA) aus dem Hirngewebe erfolgt zunächst das Aufbrechen der Zellstruktur mittels Homogenisator. Hierfür wurden die Gewebeproben im gefrorenen Zustand in 10µl Trizol pro mg Gewebe mit Keramikgranulat im Homogenisator zerkleinert, zentrifugiert und das gewonnene Material nachfolgend auf Eis weiterbehandelt. Die Phasenseparation erfolgte durch Zugabe von 0,1 ml Bromo-Chloro-Propanol (BCP) pro ml homogenisiertem Gewebe, Mischung im Vortex-Schüttler, dreiminütiger Inkubation,

Zentrifugation und Entnahme der oberen RNA-haltigen Phase. Anschließend folgte die Präzipitation mit 0,5 ml Isopropanol pro ml homogenisiertem Gewebe, Mischung im Vortex-Schüttler und zehnminütiger Inkubation. Nach Zentrifugation zeigt sich die präzipitierte RNA als Pellet am Boden des Reaktionsgefäßes und der Überstand kann verworfen werden. Anschließend wurde die gewonnene RNA mit 75%iger Ethanol-Lösung dreimal aufgereinigt, jeweils durch Mischung im Vortex-Rüttler, Zentrifugation und erneutes Verwerfen des Überstandes. Nach zehnminütiger Inkubation bei 50 Grad Celsius, Verdünnung mit 2 µl Nuklease-freiem Wasser und erneuter fünfzehnminütiger Inkubation bei 55 Grad Celsius, war die Isolation abgeschlossen. Um eine Veränderung oder Verminderung des Genmaterials zu verhindern, wurden alle Oberflächen der Versuchsbank mit RNase-Hemmer gereinigt und alle Versuchsgefäße und -bestecke mindestens eine Stunde vorher unter UV-Licht gereinigt. Zudem wurden nur solche Versuchsmaterialien verwendet, die dem notwendigen Qualitätsstandard für Arbeiten mit Genmaterial entsprechen.

Im Anschluss an die Isolation erfolgte die Konzentrations- und Reinheitsbestimmung mittels Spektralphotometer. Hier wurde auf eine Normalisierung des Gerätes mittels Nuklease-freiem Wasser und auf eine sorgfältige Reinigung des Gerätes zwischen den einzelnen Proben - ebenfalls mit Nuklease-freiem Wasser - geachtet. Das Gerät gibt die gemessene Konzentration an RNA und den Quotienten aus Absorption bei 260 nanometer (nm) und 280 nm an. Dieser Wert sollte sich im Bereich zwischen 1,8 und 2,2 befinden (siehe Abbildung 6). Liegt der Wert unter 1,8 ist dies ein Hinweis für eine Proteinverunreinigung, liegt er über 2,2 deutet das auf eine Verunreinigung mit Desoxyribonukleinsäure (DNA) hin. Es wurden nur Proben verwendet, die auf Grund dieser Angaben als nicht verunreinigt galten.

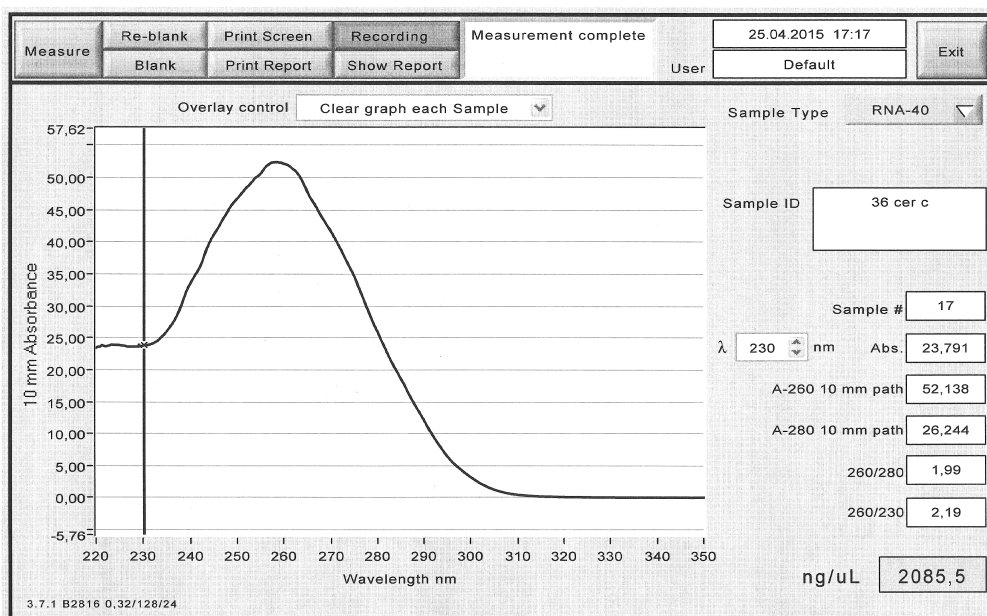


Abb. 6: Beispiel für eine photometrische Messung des gewonnenen Genmaterials mit Konzentrations- und Reinheitsbestimmung

2.3.2 quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion

Zur relativen quantitativen Bestimmung von Genmaterial wurde die Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (RTD-PCR) angewendet (Heid et al. 1996). Hierbei wird sich das Prinzip der Gen-Amplifikation durch PCR nach Mullis et al. (1986) zunutze gemacht, zusätzlich kann man jedoch die Amplifikation gesuchter Abschnitte des DNA-Materials in Echtzeit beobachten und so vor allem eine quantitative Analyse durchführen. Spezielle, zur gesuchten Sequenz komplementäre Sonden, können bei Anlagerung ein Fluoreszenzsignal abgeben, das detektiert werden kann und proportional zur amplifizierten DNA-Menge ist. Hierdurch kann in der Phase der exponentiellen Amplifikation in Relation zu einem konstitutionell exprimierten Gen (*house keeping gene*) eine Hoch- oder Herunterregulation gesuchter Genabschnitte quantifiziert werden.

Reverse Transkription

Für das Umschreiben von RNA in die zur RTD-PCR benötigte komplementäre Desoxyribonukleinsäure (cDNA) wurde eine Moloney-Maus-Leukämie-Virus Reverse Transkriptase (MMLV-RT) verwendet.

Für die Durchführung einer aussagekräftigen RTD-PCR ist eine absolute cDNA-Menge

zwischen 10 und 40 ng pro Reaktionsgefäß nötig, zudem muss die Konzentration aller Proben angeglichen sein, um eine Vergleichbarkeit zu gewährleisten. Hierfür wurde Nuklease-freies Wasser verwendet, entsprechend der erforderlichen cDNA-Menge, die am Ende des Versuchs vorliegen muss. Für jede Probe werden drei Versuchsreplikate angefertigt, zudem multipliziert sich die Menge der benötigten cDNA entsprechend der Anzahl der PCR-Versuche (Assays), die durchgeführt werden sollen.

Mit jeweils einem μl einer Oligo-Nukleotid-Lösung (als Primer für die MMLV-RT) wurden die Proben in einem Thermozykler 10 Minuten auf 70 Grad Celsius erhitzt, um eine Anlagerung der Primersequenzen an die RNA-Stränge zu erreichen. Im nächsten Schritt wurde ein Gemisch aus 1 μl 10 millimolaren Desoxyribonukleosidtriphosphaten (dNTPs) pro μl Probe, 2 μl 0,1 molares Dithiothreitol (DTT) pro μl Probe als Reduktionsmittel und 5 μl Puffer-Lösung (First strand buffer, Thermo Fisher Scientific) hinzugefügt und im Thermozykler für 2 Minuten bei 42 Grad Celsius inkubiert. Für die eigentliche Transkription wurde im Anschluss pro Probe 1 μl reverse Transkriptase zugegeben und zur Anlagerung der Nukleotide im Thermozykler 60 Minuten bei 42 Grad Celsius inkubiert. Zur Inaktivierung der Transkriptase wurde anschließend 15 Minuten bei 70 Grad Celsius inkubiert. Die gewonnene cDNA wurde erneut mit Nuklease-freiem Wasser verdünnt, um die Reaktionsmenge auf das benötigte Volumen aufzufüllen, und - falls nötig - bei -20 Grad Celsius aufbewahrt.

RTD-PCR

Zur relativen Quantifizierung mittels Echtzeit-PCR wurden sogenannte *Taqman*-Sonden von *Thermo Fisher Scientific* verwendet. Bei diesem Prinzip bestehen die Sonden neben dem Reporter, der das Fluoreszenzsignal abgeben kann, aus einem daran gebundenen sogenannten *Quencher*, der vor Amplifizierung das Fluoreszenzsignal unterdrückt. Durch die Polymerase-Aktivität der verwendeten Taqpolymerase werden Reporter und Quencher von einander getrennt und ein Signal kann entstehen.

cDNA-Proben aus Leber, Cerebellum, Hippocampus, Präfrontalcortex und Striatum wurden mittels RTD-PCR auf Hochregulation verschiedener Gene untersucht. Hier wurden Assays für TNF- α , IL-1 β , CCL-2, IL-6, CB-2 und IL-10 verwendet. Als konstitutionell exprimiertes Gen zum relativen Vergleich wurde Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) verwendet.

Die verwendeten PCR-Platten beinhalten als Reaktionsgefäße Vertiefungen für bis zu 384

Proben, die mittels Pipettierroboter (Perkin Elmer) mit jeweils 4µl cDNA-Lösung und 6 µl PCR-MasterMix befüllt werden. Der MasterMix wird vorbereitet aus Nuklease-freiem Wasser, dem TaqMan Universal PCR Mastermix No AmpErase UNG (Thermo Fisher Scientific), der die thermatisch stabile Taq-Polymerase zur Amplifikation und einen Farbstoff (ROX) zur passiven internen Referenz bei Fluoreszenzschwankungen beinhaltet, und den entsprechenden Primer-Mix (Vorwärts-/Rückwärtsprimer, Sonde) für die zu untersuchende Sequenz, beziehungsweise GAPDH als Relationsmaßstab. Zur internen negativ-Kontrolle wurde zu jedem Versuch zusätzlich ein Proben-Triplett aus reinem Nuklease-freiem Wasser gewählt. Für die Auswertung wurden die jeweiligen Werte der Proben-Triplets gemittelt.

Auswertung

Zur relativen Quantifizierung der Fluoreszenzsignale wurde die sogenannte $\Delta\Delta Ct$ -Methode verwendet (Winer et al. 1999).

Hat der Versuchsablauf eine Effizienz von 100% und somit eine exponentielle Vervielfältigungskurve erreicht, kann während der Amplifikation von dem Fluoreszenzsignal auf die relative Menge der gesuchten Gene geschlossen werden. Hier wird die Zykluszahl, bei der eine signifikante (über Hintergrundfluoreszenz liegende) Fluoreszenz detektierbar ist, Schwellenzyklus (Ct-Wert) genannt. Die Verschiebung des Ct-Wertes (ΔCt) kann nun durch Vergleich mit dem *house keeping gene* ermittelt werden:

$$\Delta Ct = Ct_{\text{Zielsequenz}} - Ct_{\text{konstitutionell exprimiertes Gen}}$$

Die Veränderung des Ct-Wertes der Proben kann nun untereinander verglichen werden. In diesem Fall wurden Proben EtOH-behandelter Tiere mit dem Mittelwert der Proben von Kontrolltieren verglichen. Das Ergebnis wird als $\Delta\Delta Ct$ bezeichnet:

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{Probe}} - \Delta Ct_{\text{Kontrolle}}$$

Da es sich um logarithmierte Daten handelt wird die relative Zielgenexpression jeder Probe

bezogen auf die Kontrolle somit dargestellt als:

$$\text{Relative Expression (RQ)} = (2^{-\Delta\Delta C_t})$$

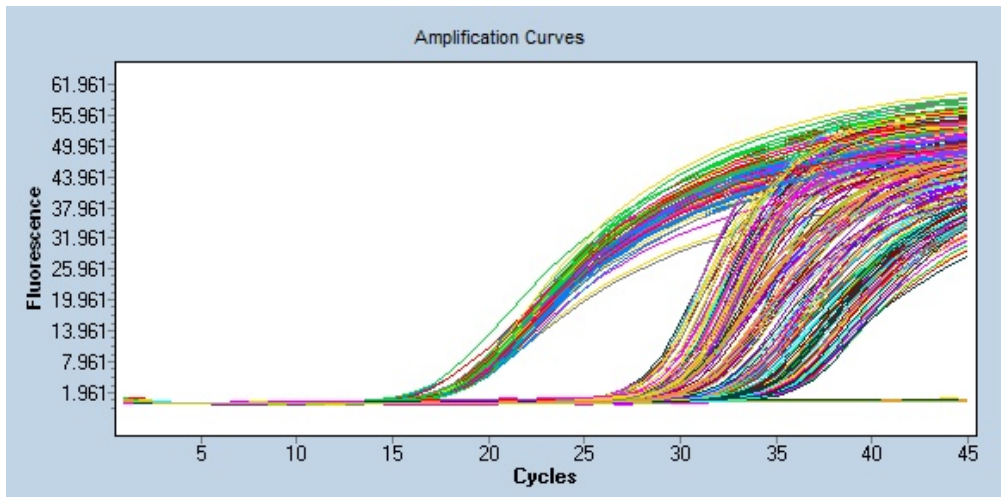


Abb. 7: rtPCR - Visualisierung der Fluoreszenzwerte im zeitlichen Verlauf der Amplifizierung

2.4 quantitativer Proteinnachweis

2.4.1 Proteinisolierung

Zur Proteinisolierung und Verarbeitung der Proben wurde ein sogenannter Radioimmunpräzipitationsassay-Puffer (RIPA-Puffer) hergestellt aus

0,5 mM	Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)
10 mM	Tris-(hydroxymethyl)-Aminomethan-Puffer (TRIS-Puffer)
150 mM	NaCl
0,10 %	Natriumlaurylsulfat (SDS)
0,50 %	Desoxycholsäure
1,00 %	NONIDET P40
500 ml	entionisiertes Wasser

mit Chlorwasserstoff (HCl) auf einen pH-Wert von 8 titriert und mit entionisiertem Wasser

auf 1 Liter aufgefüllt. Bei der Verwendung wurde die entsprechend benötigte Menge abgefüllt und mit einer Tablette Proteaseinhibitor pro 10 ml Puffer versetzt.

Die Gewebeproben wurden mit 750 µl RIPA-Puffer versetzt und auf Eis im Ultraschallhomogenisator jeweils für 5 Zyklen á 30 Sekunden (um Hitzeentwicklung zu vermeiden) zerkleinert. Hierbei wurde darauf geachtet, die Spitze des Homogenisators vor jeder neuen Probe erst mit EtOH und anschließend mit entionisiertem Wasser ebenfalls für einen Durchlauf von 5 Zyklen zu reinigen. Die zerkleinerten Proben wurden bei 4 Grad Celsius und 13.000 Umdrehungen pro Minute für 15 Minuten zentrifugiert. Der proteinhaltige Überstand wurde abpipettiert und 1:10 mit RIPA-Puffer verdünnt.

2.4.2 ELISA

Enzyme-linked immunosorbent Assay (ELISA) ist ein enzymatisches Immunadsorptionsverfahren basierend auf der Bindungskapazität von Antikörpern (Engvall und Perlmann 1971). Bei dem speziellen ELISA-Verfahren nach dem sogenannten *Sandwich-Prinzip* wird das gesuchte Protein zunächst von einem Antikörper (Fang-Antikörper) gebunden, und in einem weiteren Schritt von einem zweiten Antikörper (Detektions-Antikörper) in Verbindung mit einem gebundenen Signal-Enzym detektiert, das durch Umsetzung eines Substrats (Chromogen) eine Veränderung der photometrisch messbaren Lichtabsorption hervorruft, die äquivalent zur Menge des gesuchten Proteins ist. So können mit Hilfe einer Standardmessreihe Proteine nicht bloß nachgewiesen, sondern auch deren Konzentration bestimmt werden.

Bicinchoninsäure Assay

Mit dem Bicinchoninsäure Assay (BCA assay) nach Smith et al. (1985) kann im ersten Arbeitsschritt die Gesamtproteinmenge in einer Probe bestimmt werden. Das Prinzip beruht auf der Eigenschaft von Proteinen, in einem basischen Medium Kupfer (Cu) zu reduzieren ($\text{Cu}^{2+} \longrightarrow \text{Cu}^{1+}$). Das so entstandene Kation Cu^{1+} kann von Bicinchoninsäure gebunden und durch Farbumschlag detektiert werden. Die Absorptionsveränderung bei 562 nm ist linear äquivalent zur Proteinmenge der Probe (in einem Bereich zwischen 20 und 2000 µg/ml) und kann mit Hilfe einer Standardreihe (Bovines Serum Albumin, BSA) quantifiziert werden.

Hierfür wurde BSA-Reagenz in den Konzentrationen:

2000 µg/ml
1500 µg/ml
1000 µg/ml
750 µg/ml
500 µg/ml
250 µg/ml
125 µg/ml
25 µg/ml
0 µg/ml

mit RIPA-Puffer verdünnt. Die BCA-Arbeitsreagenz wurde nach Vorgabe des Kits (Thermo Fisher Scientific) vorbereitet. Auf einer Versuchsplatte mit 96 Vertiefungen wurden die BSA-Standardreihe und die Proben jeweils in 25 µl und in Duplikaten vorgelegt und jeweils 200 µl Arbeitsreagenz hinzugefügt, wodurch ein Farbumschlag von grünlich zu lila sichtbar wurde. Die Platten wurden mit Parafilm (Pechiney Plastic Packaging, Chicago, U.S.A.) verschlossen und 30 Minuten bei 37 Grad Celsius inkubiert, bevor sie photometrisch analysiert wurden.

Sandwich-ELISA

Für die Durchführung des eigentlichen Sandwich-ELISA wurden entsprechend der nachzuweisenden Proteine die Anweisungen wie im Kit (Thermo Fisher Scientific) beschrieben befolgt und - soweit nicht anders beschrieben - darin enthaltene Lösungen verwendet. Die Proteinlysate wurden mit Hilfe der zuvor ermittelten Gesamtproteinmenge in der Konzentration angeglichen. Hierfür wurde der Assay Diluent (zu 20% in entionisiertem Wasser) verwendet und die Proben auf 2 µg/ml verdünnt. Die Versuchsplatten mit Vertiefungen für bis zu 96 Proben wurden zunächst mit dem entsprechenden Fang-Antikörper beschichtet. Hierfür wurde der Antikörper mit entionisiertem Wasser und Beschichtungspuffer im Verhältnis 0,04:8:1 angesetzt und mittels Multikanal-Pipette (*Research plus Multichannel, Eppendorf AG, Hamburg*) 100 µl in jede zu verwendende Vertiefung pipettiert. Mit Parafilm

(*Bemis, Neena, U.S.A.*) abgedeckt wurde die Platte über Nacht bei 4 Grad Celsius inkubiert. Im nächsten Schritt wurde die Platte mit Waschpuffer (1 Liter entionisiertes Wasser, 2 Tabletten Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS) und 0,5 ml Tween-Emulgator) gewaschen. Hierfür wurden sämtliche Vertiefungen insgesamt 5 mal mit 200 µl Waschpuffer befüllt und wieder entleert. Dieser Waschvorgang wurde vor jedem neuen Versuchsschritt wiederholt. Zum Blockieren wurden anschließend 200 µl Assay Diluent einpipettiert und für mindestens 1 Stunde bei Raumtemperatur (RT) inkubiert.

Für die Standardreihe wurde die entsprechend mitgelieferte Testreagenz verwendet und in einer Verdünnungsreihe

2000 µg/ml
1000 µg/ml
500 µg/ml
250 µg/ml
125 µg/ml
62,5 µg/ml
31,25 µg/ml
15,625 µg/ml
0 µg/ml

angesetzt. In die gewaschene Versuchsplatte wurden 50 µl Probe beziehungsweise Standard in Duplikaten vorgelegt und 2 Stunden bei RT inkubiert.

Nach erneutem Waschen der Platte wurde der entsprechende Detektionsantikörper (96 % in unverdünntem Assay Diluent) zu 100 µl in jede Vertiefung zupipettiert, bei RT 1 Stunde inkubiert und gewaschen.

Im letzten Versuchsschritt wurde als Detektionsenzym 100 µl Avidin-gebundene Meerrettich-Peroxidase (Avidin-HRP) (96% in unverdünntem Assay Diluent) zupipettiert und 30 Minuten bei RT inkubiert. Hierbei wurde auf Grund der Lichtempfindlichkeit der Avidin-HRP auf eine entsprechend abgedunkelte Umgebung geachtet.

Nach einem letzten Waschschritt, der Zugabe von 100 µl Substrat-Lösung, für 15 Minuten bei RT und 50 µl Stop-Lösung wurde die Platte photometrisch analysiert.

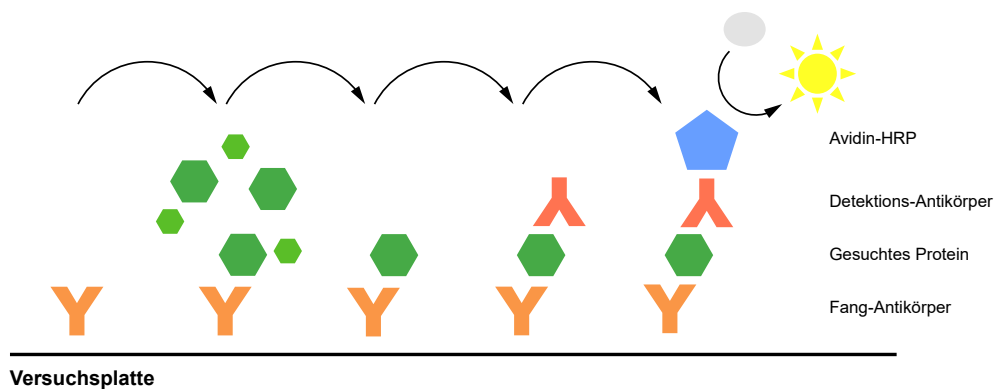


Abb. 8: schematische Darstellung des Sandwich-ELISA

Auswertung

Das ELISA-Lesegerät misst die Lichtabsorption der Proben bei 450 nm. Die Software kann mit Hilfe der bekannten Verdünnungsreihe eine lineare Regression berechnen und durch Extrapolieren, die Proteinkonzentration der Versuchsproben bestimmen. Da eine Vergleichbarkeit der absoluten Proteinmenge zwischen getrennten Versuchen durch systematische Schwankungen nicht möglich ist, wurden Kontrollwerte gleich 1 gesetzt und Versuchswerte daran normalisiert. Dargestellt wurden relative Proteinmengen im Vergleich zu einer unbehandelten Kontrolle.

3. Ergebnisse

3.1 physische Toleranzentwicklung

3.1.1 Blutalkoholkonzentration

Zur Kontrolle wurde den Tieren eine Stunde nach Injektion Blut aus dem Schwanz entnommen und wie in Abschnitt 2.2.1 beschrieben analysiert. Durchschnittlich erreichten die Tiere eine BEC von $0,291 \pm 0,009 \text{ g/dl}$ (Mittelwert \pm Standardabweichung (SD)), was der Definition der NIAAA des *binge drinking* (Siehe Abschnitt 1.1) entspricht und beim Menschen zu schweren Rauschzuständen oder Koma führen kann.

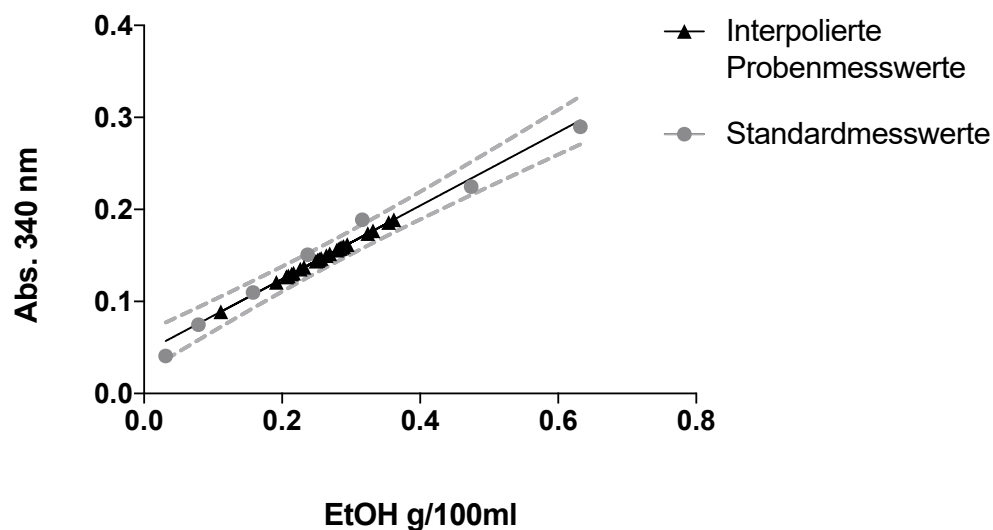


Abb. 9: Lineare Regression mit Hilfe der Standardmessreihe und Interpolieren der Probenreihe zur Ermittlung der BEC

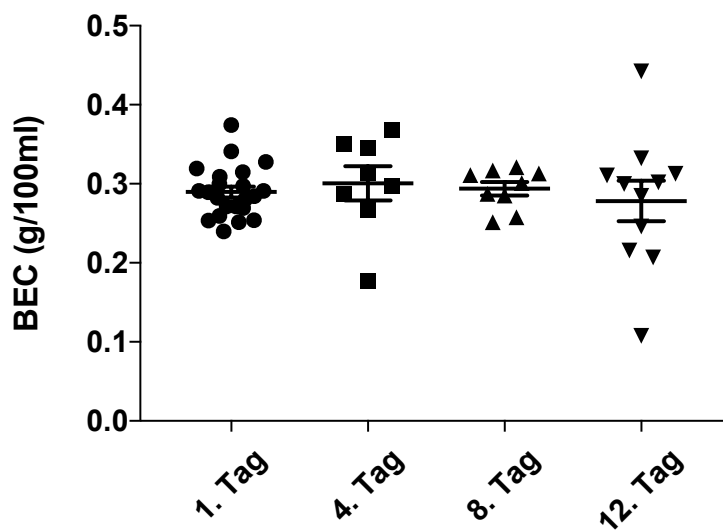


Abb. 10: Photometrisch bestimmte Blutalkoholwerte der Tiere in g/100ml ($0,1\text{g}/100\text{ml} \cong 1\%$) Einzelwerte mit Mittelwert und SD

3.1.2 Änderung der Körpertemperatur

Ethanol wirkt besonders in der Körperperipherie gefäßdilatierend (Lüllmann und Mohr 2006), weshalb Alkoholkonsum subjektiv das Kälteempfinden, objektiv jedoch die Körpertemperatur senkt.

Durch den Vergleich der Körpertemperatur der Versuchstiere vor und nach der ersten EtOH-Behandlung konnte dies reproduziert werden. Als Hinweis auf eine mögliche Toleranzbildung wurde die Körpertemperatur der Tiere nach 4, 8 und 12 Tagen Behandlung erneut vor und nach EtOH-Gabe gemessen und die Temperaturdifferenzen ($\text{Temp}_{\text{vor Injektion}} - \text{Temp}_{\text{nach Injektion}}$) der unterschiedlichen Gruppen wurden untereinander verglichen. Um einen etwaigen Effekt der Gavage-Behandlung alleine ausschließen zu können, wurden auch Kontrolltiere aus sämtlichen Gruppen untersucht und Behandlungseffekte der jeweiligen Gruppen verglichen.

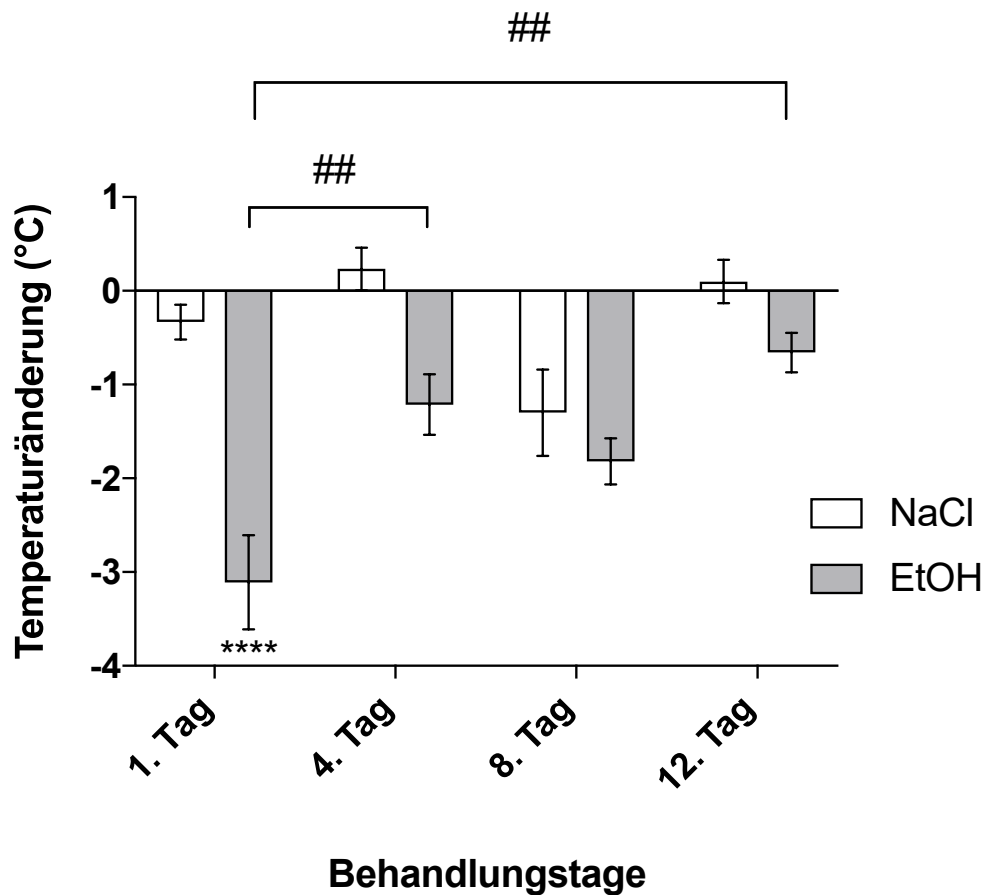


Abb. 11: Differenz der Körpertemperatur vor und 30 Minuten nach Behandlung mit EtOH oder NaCl ($\text{Temp}_{\text{vor Injektion}} - \text{Temp}_{\text{nach Injektion}}$), dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardfehler des Mittelwerts (SEM). *2-way Analysis of Variance (2-way-ANOVA)* und Tukey's multiple comparisons test mit Signifikanzniveau $p < 0,05$, Effekt der Behandlung: **** $p < 0,001$; Effekt der Behandlungsdauer: ## $p < 0,01$

Der Verlauf der NaCl-Behandlung zeigt, dass die erste Injektion keine große Auswirkung auf die Körpertemperatur hatte ($\text{Temp}_{\text{vor Injektion}} - \text{Temp}_{\text{nach Injektion}} = 0,333333 \pm 0,18379$ (Mittelwert \pm SEM in Grad Celsius)). Auch im Verlauf zeigte sich keine signifikante Änderung der Körpertemperatur durch die Behandlung mit NaCl.

Im Vergleich dazu zeigte sich nach der ersten Injektion von EtOH ein Abfall der Körpertemperatur von $3,11 \pm 0,50187$ (mean \pm SEM), was den gefäßerweiternden Effekt des Ethanol deutlich zeigt. Dieser Effekt verringerte sich über die Zeit signifikant. Die Temperaturdifferenzen sanken also über die Zeit, bis sich nach 12 Tagen Behandlung kein signifikanter Behandlungseffekt des Ethanol im Vergleich zur Kontrolle mehr zeigte. Dies konnte als Hinweis auf eine Toleranzentwicklung des Organismus gegenüber dem Alkohol gedeutet

werden.

3.1.3 Ergebnisse des Rotarod-Tests

Als weitere Testung der Entwicklung einer physischen Toleranz gegenüber Alkohol wurde außerdem die Veränderung der Motorfunktion mittels Rotarod untersucht.

Die Laufdauer der Tiere auf dem Rotarod wurde wie in 2.1.1 beschrieben erfasst. Als Beeinträchtigung der Motorfunktion durch die Alkoholbehandlung wurde eine signifikante Verringerung der Laufdauer gewertet. Als Hinweis auf eine Toleranzentwicklung im Laufe der Alkoholbehandlung wurde wiederum die signifikante Verlängerung der Laufdauer im Vergleich zu den Vorwerten, beziehungsweise die Annäherung an Kontrollwerte gewertet.

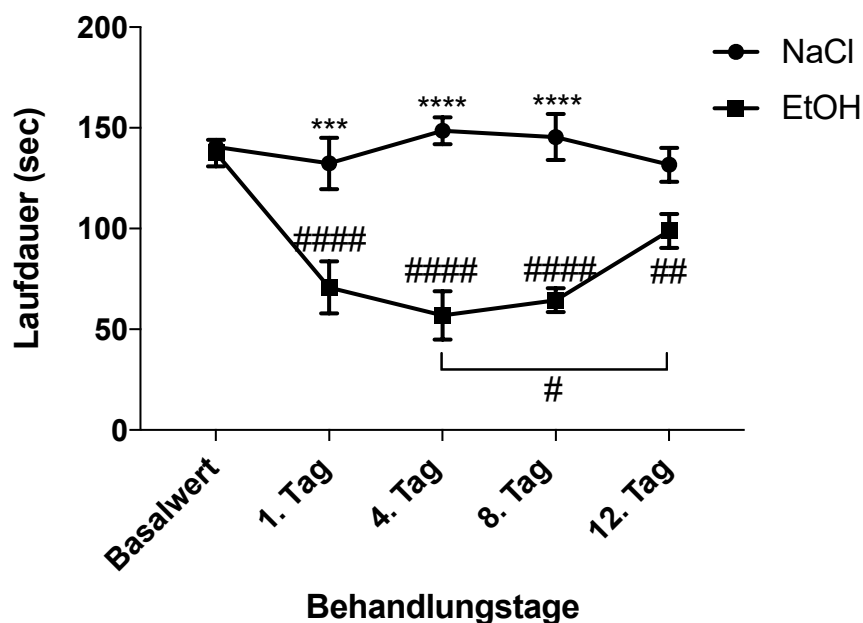


Abb. 12: Abschneiden der Tiere im Rotarod-Versuch. Dargestellt sind Mittelwerte mit SEM. 2-way-ANOVA und Tukey's multiple comparisons test mit Signifikanzniveau $p < 0,05$. Vergleich mit Basalwert: ## $p < 0,01$; #### $p < 0,001$. Vergleich zu Vorwerten: # $p < 0,05$. Vergleich der Behandlung: *** $p < 0,005$; **** $p < 0,001$

Hier zeigte sich nach der Ersten Behandlung an Tag 1 bei den mit EtOH behandelten Mäusen eine signifikante Verschlechterung der Laufleistung, dem durch EtOH hervorgerufenen Rauschzustand entsprechend. Die Kontrolltiere zeigten keine Reduktion der Laufleistung. Nach 4 Tagen Behandlung zeigte sich die Motorfunktion der Versuchstiere weiterhin signifikant schlechter verglichen mit den Trainingswerten und den Werten der

Kontrolltiere. Dieser Leistungsunterschied verringerte sich jedoch deutlich über die Behandlungszeit. Nach 12 Tagen EtOH-Behandlung zeigten die Versuchstiere keinen signifikanten Leistungsunterschied zu den Kontrolltieren mehr und hatten sich im Vergleich zu Vorwerten wieder signifikant verbessert.

3.1.4 Ergebnisse des Y-Labyrinths

Zur Untersuchung des räumlichen Gedächtnisses wurde das sogenannte Y-Labyrinth verwendet (siehe Abbildung 5). Aufgezeichnet wurde die Laufdistanz, die von den Tieren insgesamt zurückgelegt wurde, wobei sich durch EtOH-Behandlung ein signifikanter Effekt zeigte, der sich über die Zeit nicht zurückbildete. Beobachtet wurde zudem, wie oft die verschiedenen Arme des Labyrinthes begangen werden, ein häufiges Begehen desselben Armes wurde hierbei als eine Einschränkung des räumlichen Gedächtnisses gewertet, eine Verbesserung dieser Leistung wiederum als Toleranzbildung gegenüber dem EtOH.

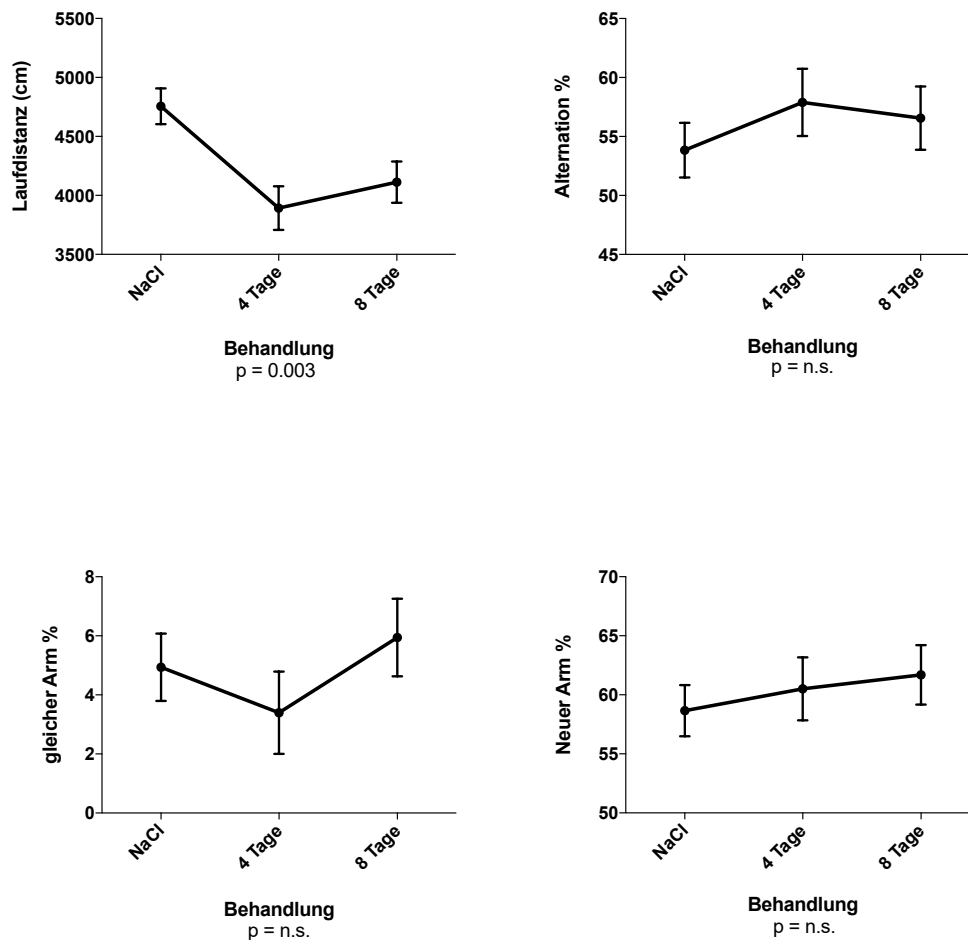


Abb. 13: Ergebnisse des Y-Labyrinth-Versuchs. Laufdistanz insgesamt, Alternation der begangenen Arme. One-way-ANOVA (Analysis of Variance) mit Signifikanzniveau $p < 0,05$ bezogen auf die Behandlung

Abgesehen von der deutlichen Reduktion der allgemeinen Motoraktivität, die nach EtOH-Gabe beobachtet werden konnte und sich auch im Y-Labyrinth-Versuch signifikant in der Reduktion der Laufdistanz zeigte, konnte die Behandlung keinen Effekt auf das räumliche Gedächtnis zeigen, aus diesem Grund wurde der Versuch nach 2 Behandlungen à 4 Tage nicht mehr weitergeführt.

3.2 Ergebnisse der quantitativen Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion

Zum Nachweis der Aktivierung proinflammatorischer Prozesse in der Leber und vor allem im ZNS, wurde die Hochregulation von Genen mittels RT-PCR untersucht (Abschnitt 2.3.2).

Hierfür wurden Gewebeproben der Leber, des Cerebellum, Hippocampus, Striatum und Präfrontalcortex (PFC) präpariert und Genmaterial in Form von RNA isoliert. Als Ziel wurden vor allem proinflammatorische Gene des TLR-4-Pfades ausgewählt (Abschnitt 1.3).

Die relative Hoch- oder Herunterregulation von Genen wurde als

$$\text{Relative Expression} = (2^{-\Delta\Delta C_t})$$

dargestellt, wie in Abschnitt 2.3.2 beschrieben und kann somit als x-fache Expression im Vergleich zur Expression der Kontrolltiere beschrieben werden.

Cerebellum

Chronischer Alkoholkonsum sowie auch akute Alkoholintoxikation zeigen ihre Wirkung besonders im Cerebellum, was sich in Defiziten der Feinmotorik und Koordination äußert. Um die Verbindung zu neuroinflammatorischen Prozessen zu ziehen, wurden zunächst Proben des Cerebellum untersucht. IL-1 β als unspezifischer Entzündungsmediator des TLR-4-Pfades sollte einen ersten Hinweis auf die Hochregulation inflammatorischer Prozesse auf Genebene geben.

TNF- α und IL-1 β als unspezifische Entzündungsmarker spielen in der TLR-4-abhängigen Entzündungsreaktion eine wichtige Rolle, insbesondere TNF- α , das mittels Transporter die Blut-Hirnschranke überwinden und intrazerebral weitere Entzündungskaskaden aktivieren kann. Aus diesem Grund sind diese Zytokine gut geeignet als Nachweis für inflammatorische Prozesse (Turner et al. 2014).

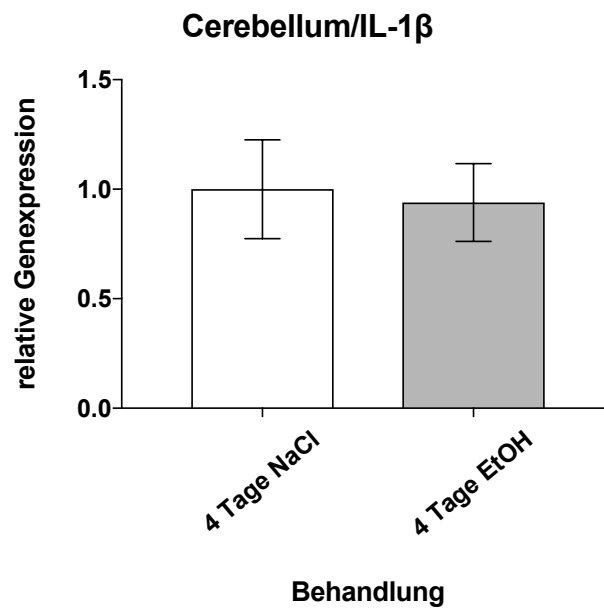


Abb. 14: RT-PCR von IL-1 β mit Gewebeproben des Cerebellum. Tiere erhielten vier Tage Behandlung, die Gewebeentnahme erfolgte nach drei Tagen Entzug. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM. Studentischer T-Test mit Signifikanzniveau $p < 0,05$

Zunächst wurden PCR-Analysen der Tiere durchgeführt, die nach jeder viertägigen Behandlung jeweils 3 Tage Entzug erhielten (siehe Abbildung 3).

Hier zeigte sich nach 4 Tagen Alkoholbehandlung keine signifikante Änderung der Genexpression von IL-1 β im Vergleich zu den Kontrolltieren. Auch nach 2 Behandlungen von jeweils vier Tagen konnte keine Hochregulation von IL-1 β gezeigt werden (nicht dargestellt), sodass im Folgenden Gewebeproben aus dem Versuchsteil 2 untersucht wurden. Hier erfolgte die Gewebeentnahme eine Stunde nach einer letzten Gabe EtOH um eine eventuell frühe und kurzfristige Hochregulation nicht zu verpassen.

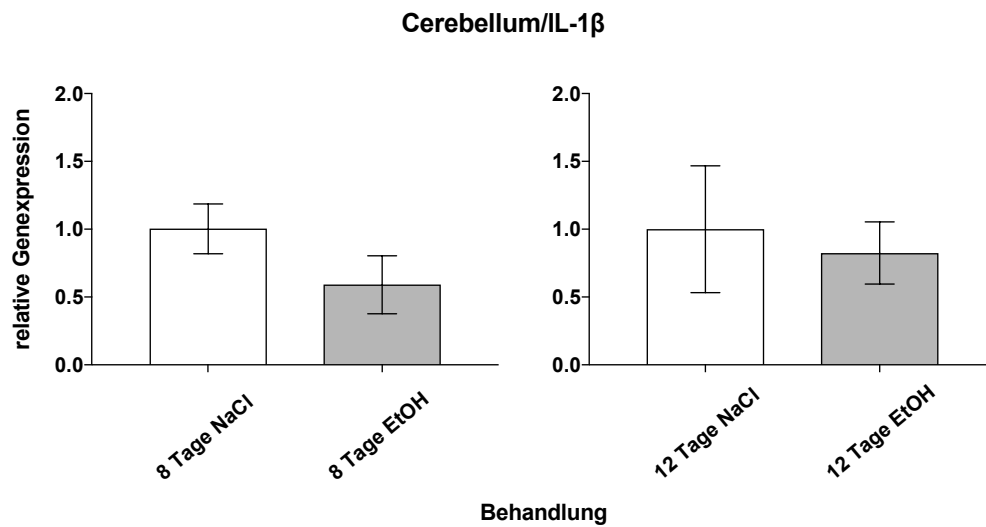


Abb. 15: RT-PCR von IL-1 β mit Gewebeproben des Cerebellum. Tiere erhielten zwei- bzw. dreimal vier Tage Behandlung, die Gewebeentnahme erfolgte am Folgetag, eine Stunde nach einer letzten Dosis. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM. Studentischer T-Test mit Signifikanzniveau $p < 0,05$

Nach 8 Tagen Behandlung mit Alkohol zeigte sich eine Tendenz zur Herabregulation von IL-1 β , die kein Signifikanzniveau erreichte und sich nach 12 Tagen Behandlung nicht mehr darstellt.

Im Folgenden wurden die Proben auf das proinflammatorische Cytokin TNF- α untersucht. TNF- α kann über spezifische Transporterproteine die BBB überwinden und im ZNS inflammatorische Reaktionen vermitteln (Deli et al. 1995).

Hier zeigte sich nach verschiedenen Behandlungszeiten tendenziell eine Herabregulation, ohne Signifikanzniveau zu erreichen.

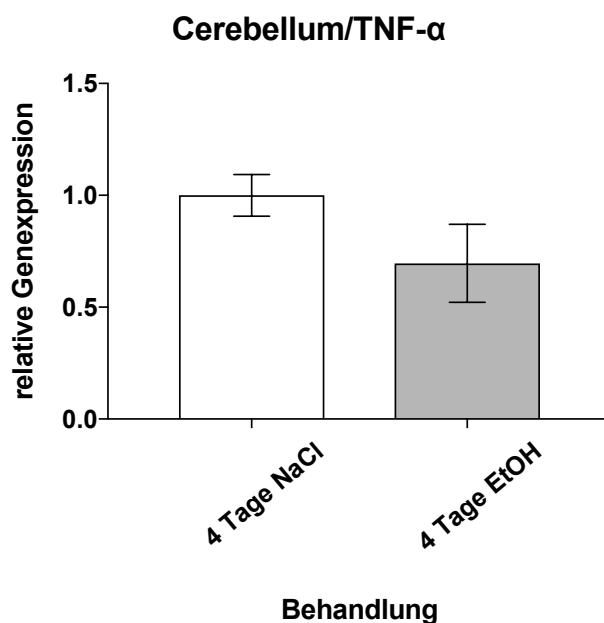


Abb. 16: RT-PCR von TNF- α mit Gewebeproben des Cerebellum. Tiere erhielten vier Tage Behandlung, die Gewebeentnahme erfolgte nach drei Tagen Entzug. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM. Studentischer T-Test mit Signifikanzniveau $p < 0,05$

Auch hier wurden im Folgenden Proben aus Versuchsteil 2 untersucht, die keine Entzugsperiode zwischen Alkoholbehandlung und Gewebeentnahme erhielten, sondern am Folgetag der Behandlung vor der Gewebeentnahme eine letzte Gabe EtOH oder NaCl erhielten.

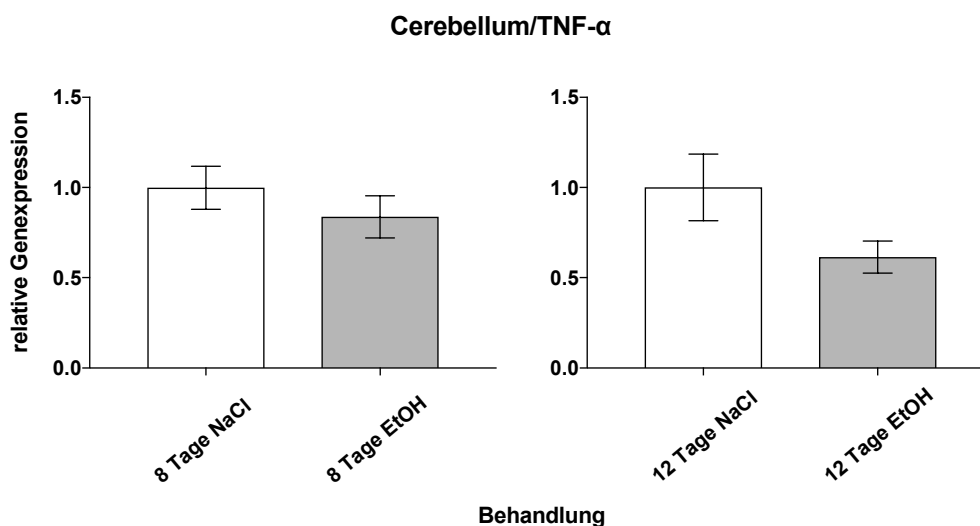


Abb. 17: RT-PCR von TNF- α mit Gewebeproben des Cerebellum. Tiere erhielten zwei- bzw. dreimal vier Tage Behandlung, die Gewebeentnahme erfolgte am Folgetag, eine Stunde nach einer letzten Dosis. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM. Studentischer T-Test mit Signifikanzniveau $p < 0,05$

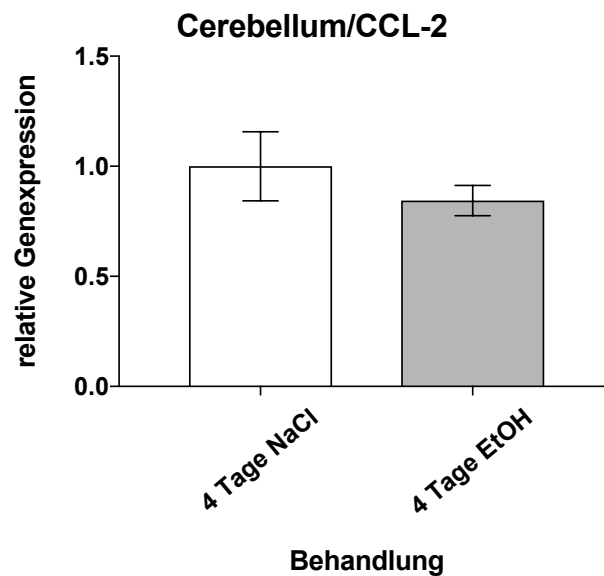


Abb. 18: RT-PCR von CCL-2 mit Gewebeproben des Cerebellum. Tiere erhielten vier Tage Behandlung, die Gewebeentnahme erfolgte am Folgetag, eine Stunde nach einer letzten Dosis. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM. Studentischer T-Test mit Signifikanzniveau $p < 0,05$

Untersuchungen der Gewebeproben auf Regulation von CCL-2 zeigten eine steigende Tendenz über den Behandlungszeitraum, jedoch deutliche Standardabweichungen. Aus diesem Grund wurde zusätzlich die Genexpression der Kontrolltiere an den am wenigsten behandelten Kontrolltieren (4 Tage NaCl) normalisiert, um einen möglichen Effekt der Behandlung selbst besser einschätzen zu können.

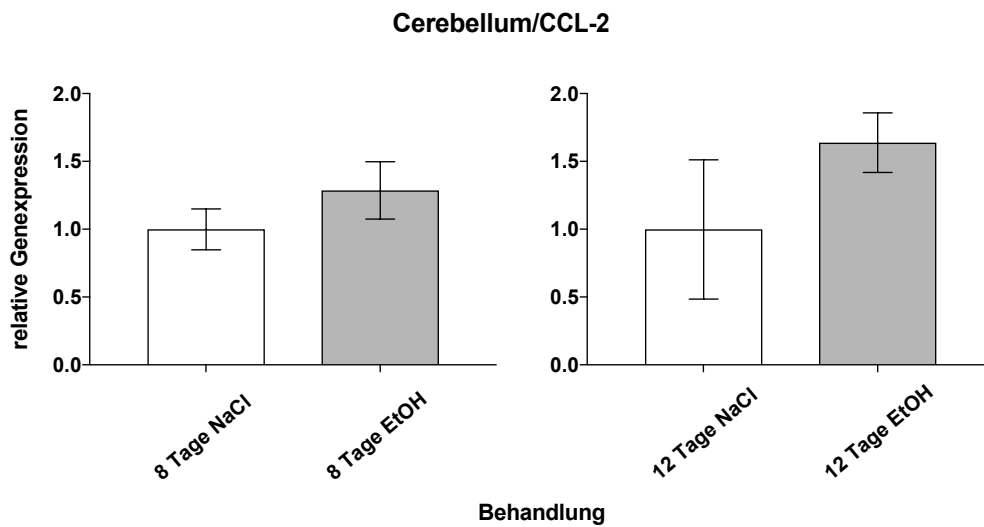


Abb. 19: RT-PCR von CCL-2 mit Gewebeproben des Cerebellum. Tiere erhielten zwei- bzw. dreimal vier Tage Behandlung, die Gewebeentnahme erfolgte am Folgetag, eine Stunde nach einer letzten Dosis. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM. Studentischer T-Test mit Signifikanzniveau $p < 0,05$

Als weiteres Gen wurde CB-2 untersucht. Es wird ebenfalls als Rezeptor im ZNS exprimiert, hier vor allen Dingen auf Zellen des Neuroepithels der BBB und Mikroglia (Turcotte et al. 2016). Ihre Hochregulation bei Entzündungsreaktionen im Organismus, legt eine Rolle in der Immunantwort des ZNS nahe (Molina-Holgado et al. 1997). Dies zeigt sich jedoch vor allem durch chronische Entzündungsprozesse (Zhang et al. 2003).

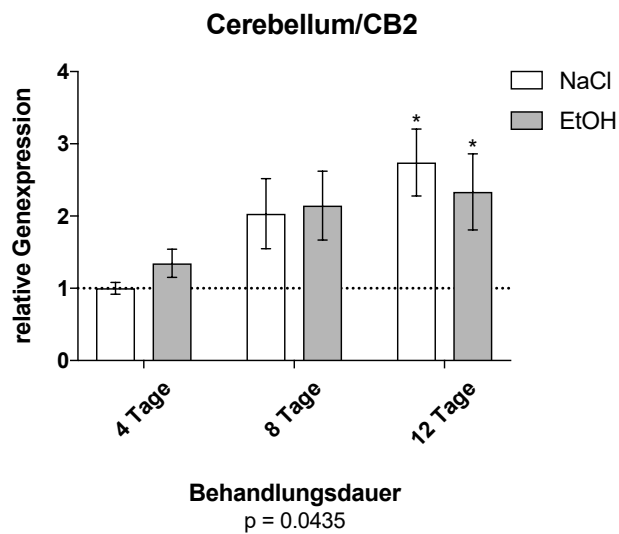


Abb. 20: RT-PCR von CB-2 mit Gewebeproben des Cerebellum. Tiere erhielten ein-, zwei- oder dreimal vier Tage Behandlung, die Gewebeentnahme erfolgte am Folgetag, eine Stunde nach einer letzten Dosis. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM. RQ relativ zur am wenigsten behandelten Kontrolle. 2-Way-ANOVA und Fisher's LSD-Test mit Signifikanzniveau $p < 0,05$

Am Beispiel von CB-2 zeigt sich, normiert an der ersten Kontrollgruppe, eine Veränderung über die Behandlungszeit auch unter den Kontrolltieren. Bei der Behandlung der Tiere mit EtOH und NaCl mittels Gavage wurde auf ein geübtes und züliges Handling geachtet, trotzdem könnte jedoch im Vergleich zu den durch EtOH sedierten Tieren ein Unterschied im Komfort-Level einen Einfluss auf die Genexpression gezeigt haben. Dies zeigt jedoch, dass eine Zusammenfassung der Kontrolltiere und ein direkter Vergleich der Behandlungsdauer, normiert an einer Kontrolle, mathematisch nicht vertretbar gewesen wäre. Das hier verwendete Paradigma mit Kontrolltieren in jeder Behandlungsgruppe konnte somit beibehalten werden.

Präfrontalcortex

Der Präfrontalcortex ist als Großhirnareal verantwortlich für höhere kognitive Prozesse und emotionale Verarbeitung (Leichnetz 1989) und zeigte in Postmortem- und Bildgebungsstudien eine zentrale Bedeutung im Zusammenhang mit Substanzabusus und Abhängigkeit (Huhn et al. 2018), (Liu et al. 2006).

Beginnend mit dem Versuchsteil 1, wurden zunächst erneut Gewebeproben jener Tiere

untersucht, bei welchen die Entnahme nach 3 Tagen Entzug erfolgte.

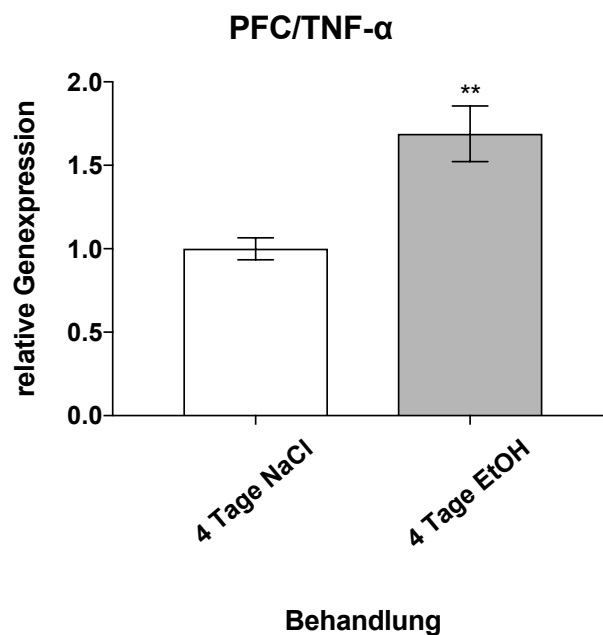


Abb. 21: RT-PCR von TNF- α mit Gewebeproben des Präfrontalkortex. Tiere erhielten vier Tage Behandlung, die Gewebeentnahme erfolgte nach drei Tagen Entzug. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM. Studentischer T-Test mit Signifikanzniveau $p < 0,05$. Effekt der Behandlung: * * $p < 0,01$

Nach 4 Tagen EtOH-Behandlung zeigte sich im Präfrontalkortex bereits eine signifikante Hochregulation von TNF- α , die einige Tage später bereits nicht mehr detektierbar war. Für andere Cytokine konnte im Präfrontalcortex keine Expressionsveränderung über die Zeit der Behandlung nach 4, 8 oder 12 Tagen gezeigt werden.

Hippocampus

Als Teil des limbischen Systems wurden Proben des Hippocampusgewebes präpariert und auf Genexpressionsveränderungen untersucht. Hier zeigten sich zu keinem Zeitpunkt Veränderungen in der Regulation von inflammatorischen Genen. Bei der PCR-Untersuchung von CB-2 und CCL-2 zeigte sich jeweils eine starke Streuung der Versuchstierwerte.

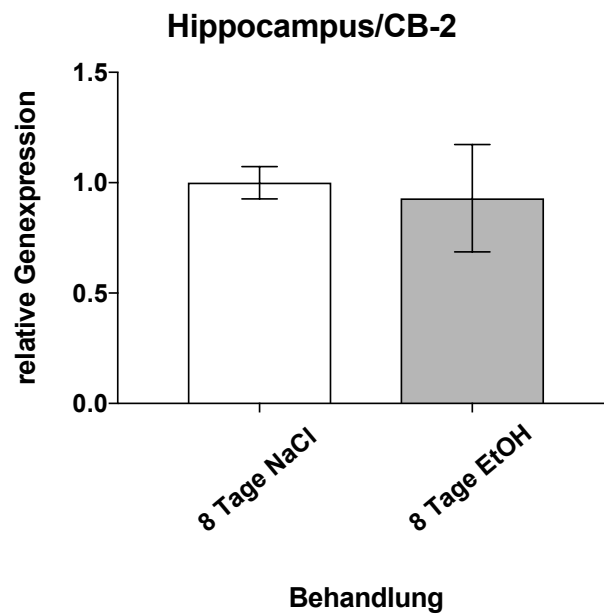


Abb. 22: RT-PCR von CB-2 mit Gewebeproben des Hippocampus. Tiere erhielten zweimal vier Tage Behandlung, die Gewebeentnahme erfolgte nach drei Tagen Entzug. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM. Studentischer T-Test mit Signifikanzniveau $p < 0,05$

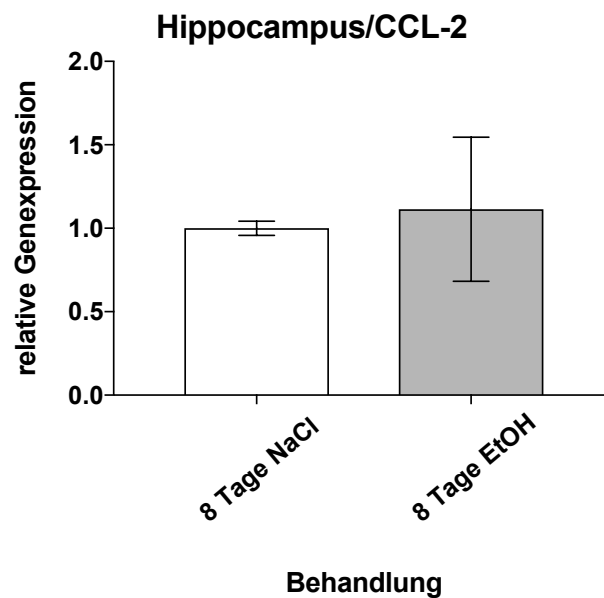


Abb. 23: RT-PCR von CCL-2 mit Gewebeproben des Hippocampus. Tiere erhielten zweimal vier Tage Behandlung, die Gewebeentnahme erfolgte nach drei Tagen Entzug. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM. Studentischer T-Test mit Signifikanzniveau $p < 0,05$

Striatum

Das Striatum ist als Teil der Basalganglien ein wichtiger Aspekt in der Koordination von Bewegung, und durch seinen überwiegend hemmenden Einfluss zur Feinabstimmung von Bewegungen Teil des sogenannten extrapyramidalmotorischen Systems. Es spielt jedoch ebenso eine Rolle im dopaminergen Belohnungs- und Entscheidungssystem (Balleine et al. 2007). Auch der Einfluss von Alkohol auf neuronale Transmission im Striatum und dessen Projektion auf den PFC und umgekehrt die Rolle des Striatum bei der Alkoholabhängigkeit konnte gezeigt werden (Chen et al. 2011).

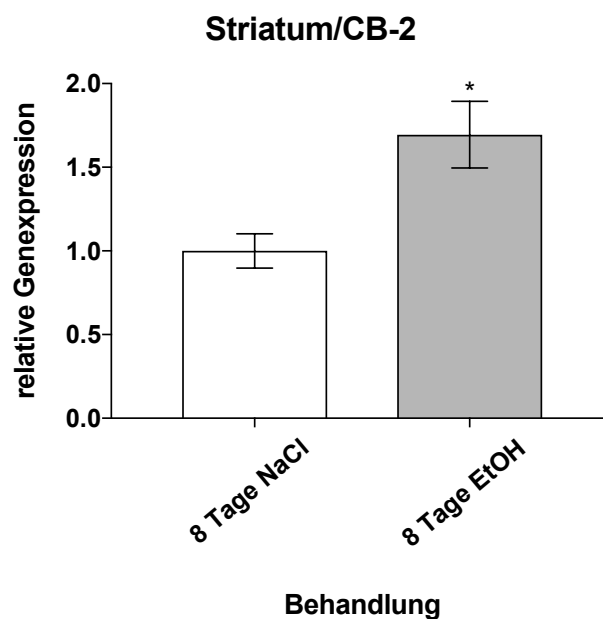


Abb. 24: RT-PCR von CB-2 mit Gewebeproben des Striatum. Tiere erhielten zweimal vier Tage Behandlung, die Gewebeentnahme erfolgte nach drei Tagen Entzug. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM. Studentischer T-Test mit Signifikanzniveau $p < 0,05$. Effekt der Behandlung: $*p < 0,05$

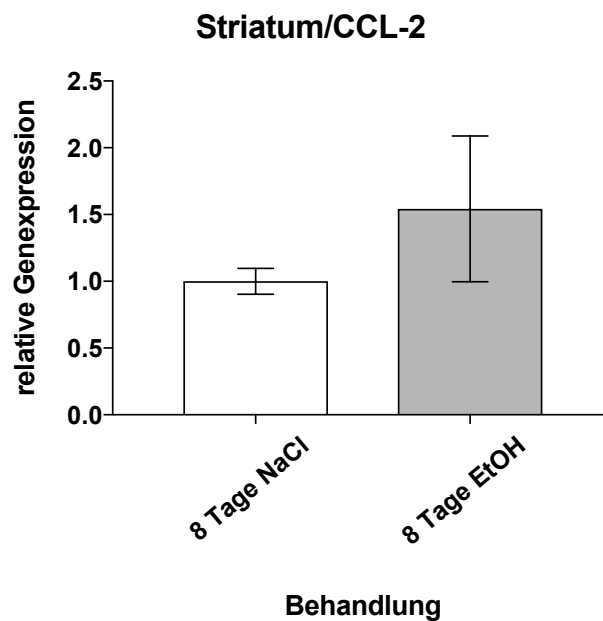


Abb. 25: RT-PCR von CCL-2 mit Gewebeproben des Striatum. Tiere erhielten zweimal vier Tage Behandlung, die Gewebeentnahme erfolgte nach drei Tagen Entzug. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM. Studentischer T-Test mit Signifikanzniveau $p < 0,05$

Nach acht Tagen Behandlung mit EtOH zeigte sich im Gewebe des Striatum eine signifikante Hochregulation der Expression von CB2. CCL-2 hingegen konnte bei hohem Standardfehler kein Signifikanzniveau erreichen, zeigte jedoch eine steigende Tendenz bereits nach einer Behandlung von 8 Tagen. Die Gewebeentnahme war jeweils nach drei Tagen Entzug erfolgt. Im zweiten Versuchsteil wurde keine Veränderung der Genexpression nachgewiesen.

Leber

Nachdem im ersten Versuchsteil im ZNS TNF- α und der Cannabinoidrezeptor CB-2 in signifikanter Veränderung detektiert werden konnten, was Hinweise auf Prozesse der Neuroinflammation gibt, wurden im zweiten Versuchsteil zusätzlich Leberproben entnommen. Dies sollte in der zeitlichen Verlaufsachse der durch Ethanol ausgelösten Entzündungsreaktion einen sehr frühen Zeitpunkt abdecken (siehe Abschnitt 1.3).

Gewebeproben wurden gemeinsam ausgewertet und im zeitlichen Verlauf gegenübergestellt. Hier konnte erneut eine Veränderung der Genexpression auch bei den Kontrolltieren gezeigt werden, wie die Normierung an der ersten Kontrollgruppe zeigte.

Für IL-1 β zeigte sich jedoch eine signifikante Hochregulation bei den mit EtOH behandelten Tieren über die Zeit, ohne anschließenden Abfall. Im Gegensatz zum ZNS zeigt sich für das proinflammatorische Cytokin IL-1 β also in der Leber eine frühe Reaktion bereits bei subchronischem Konsummuster.

LEBER/IL-1 β

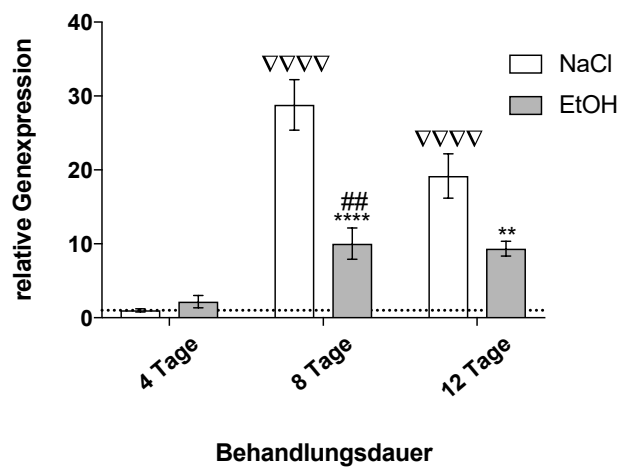


Abb. 26: RT-PCR von IL-1 β mit Gewebeproben der Leber. Tiere erhielten ein, zwei-, oder dreimal vier Tage Behandlung, die Gewebeentnahme erfolgte am Folgetag, eine Stunde nach einer letzten Dosis. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM. Relative Quantifizierung (RQ) relativ zur am wenigsten behandelten Kontrolle. 2-Way-ANOVA und Fisher's LSD-Test mit Signifikanzniveau $p < 0,05$. Effekt der Behandlung: * $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, Effekt der Behandlungsdauer: ∇∇∇∇ $p < 0,001$, ## $p < 0,01$

Für den Makrophagenstimulator CCL-2 hingegen zeigte sich bei den Versuchstieren eine Herunterregulation über die Dauer der Behandlung.

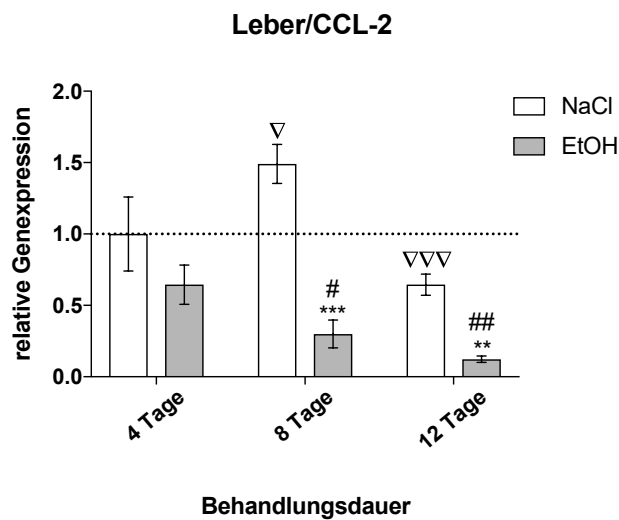


Abb. 27: RT-PCR von CCL-2 mit Gewebeproben der Leber. Tiere erhielten ein-, zwei-, oder dreimal vier Tage Behandlung, die Gewebeentnahme erfolgte am Folgetag, eine Stunde nach einer letzten Dosis. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM. RQ relativ zur am wenigsten behandelten Kontrolle. 2-Way-ANOVA und Fisher's LSD-Test mit Signifikanzniveau $p < 0,05$. Effekt der Behandlung: $**p < 0,01$, $***p < 0,005$, Effekt der Behandlungsdauer: $\nabla p < 0,05$, $\nabla\nabla p < 0,01$ $\#p < 0,05$, $\#\#p < 0,01$,

Für CB-2 zeigte sich nach 4 Tagen Behandlung eine deutliche und signifikante Hochregulation in der Leber durch EtOH, die nach 8 und 12 Tagen Behandlung wieder zurückgebildet war.

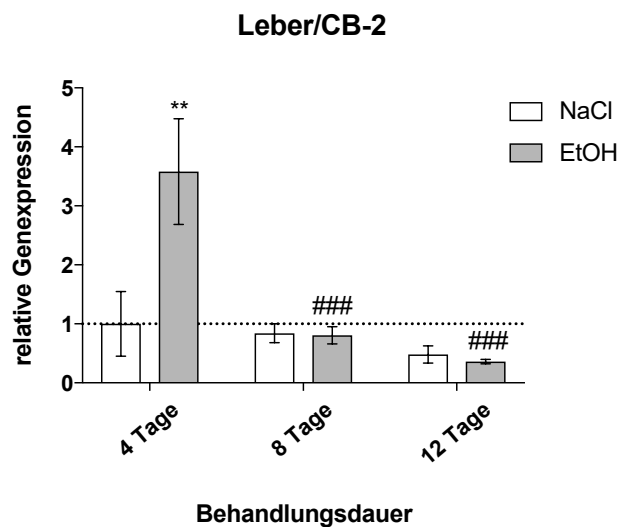


Abb. 28: RT-PCR von CB-2 mit Gewebeproben der Leber. Tiere erhielten ein-, zwei-, oder dreimal vier Tage Behandlung, die Gewebeentnahme erfolgte am Folgetag, eine Stunde nach einer letzten Dosis. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM. RQ relativ zur am wenigsten behandelten Kontrolle. 2-Way-ANOVA und Fisher's LSD-Test mit Signifikanzniveau $p < 0,05$. Effekt der Behandlung: ** $p < 0,01$ im Vergleich zur Kontrolle; Effekt der Behandlungsdauer: ### $p < 0,005$ im Vergleich zu am wenigsten behandelten Tieren

Antiinflammatorisches IL-10 zeigte sich über die Versuchsdauer nicht in veränderlicher Expression detektierbar.

3.3 Ergebnisse des Proteinnachweises

Um einen späteren Zeitpunkt der möglichen Entzündungsreaktion zu analysieren und nachzuprüfen, ob eine veränderte Genexpression auch zu einer veränderten Proteinbiosynthese führte, wurden mittels Sandwich-ELISA Proteinanalysen gemacht (siehe Abbildung 8). Hierfür wurden Proteinkonzentrationen aus Leberproben unbehandelte Kontrolltiere als Maßstab genutzt und etwaige Hoch- oder Herunterregulation der mit EtOH behandelten Tiere in Relation dargestellt.

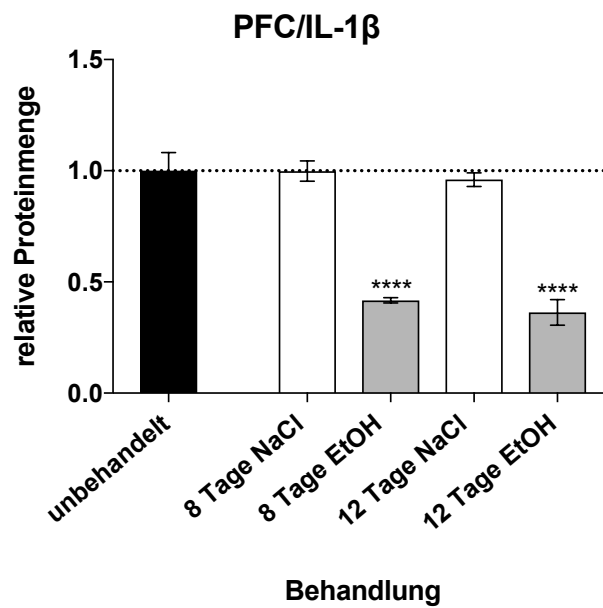


Abb. 29: Proteinanalyse von IL-1 β mit Gewebeproben des Präfrontalkortex. Tiere erhielten zwei-, oder dreimal vier Tage Behandlung, die Gewebeentnahme erfolgte am Folgetag, 1 Stunde nach einer letzten Dosis. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardfehler. Dargestellte Daten wurden mittels 2-way-ANOVA mit Tukey's multicomparisons Test Signifikanzniveau $p < 0,05$ auf Behandlungseffekt und Effekt der Behandlungsdauer analysiert. * * $p < 0,01$; ## $p < 0,01$

Präfrontalkortex

Hier zeigte sich eine signifikante Herunterregulation von IL-1 β im zeitlichen Verlauf. Normiert an der unbehandelten Kontrolle zeigten sich hier konstante Werte für die Proteinexpression der Kontrolltiere über die Zeit. Es zeigte sich also kein Hinweis auf einen Behandlungseffekt bei den Kontrolltieren.

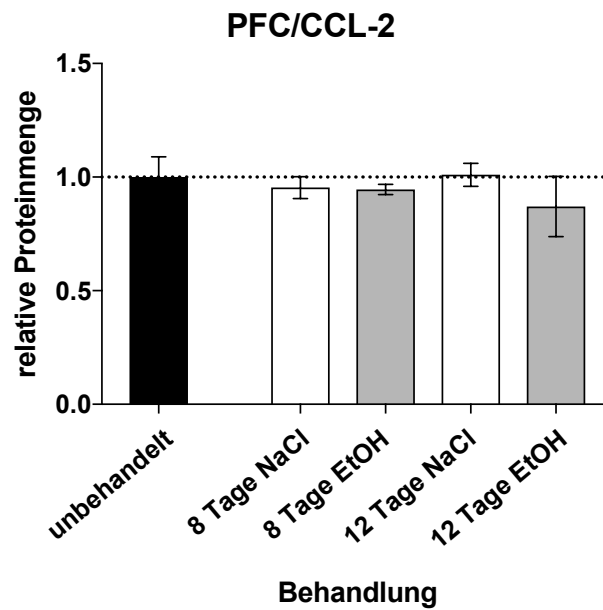


Abb. 30: Proteinanalyse von CCL-2 mit Gewebeproben des Präfrontalkortex. Tiere erhielten zwei- oder dreimal vier Tage Behandlung, die Gewebeentnahme erfolgte am Folgetag, 1 Stunde nach einer letzten Dosis. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardfehler. Dargestellte Daten wurden mittels 2-way-ANOVA mit Tukey's multicomparisons Test Signifikanzniveau $p < 0,05$ auf Behandlungseffekt und Effekt der Behandlungsdauer analysiert.

Für CCL-2 konnte keine quantitative Veränderung der Proteinexpression durch die EtOH-Behandlung über die Zeit gezeigt werden. Die Werte der Kontrolltiere sprechen ebenfalls gegen eine Veränderung der Proteinexpression durch äußere Einflüsse über die Zeit.

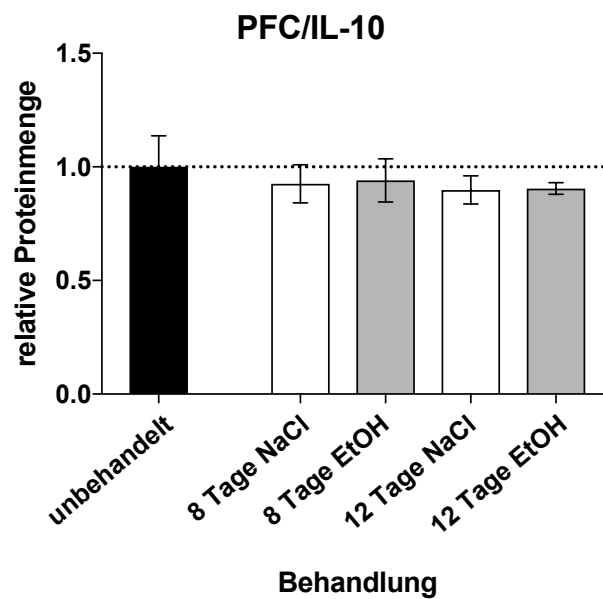


Abb. 31: Proteinanalyse von IL-10 mit Gewebeproben des Präfrontalkortex. Tiere erhielten zwei- oder dreimal vier Tage Behandlung, die Gewebeentnahme erfolgte am Folgetag, 1 Stunde nach einer letzten Dosis. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardfehler. Dargestellte Daten wurden mittels 2-way-ANOVA mit Tukey's multicomparisons Test Signifikanzniveau $p < 0,05$ auf Behandlungseffekt und Effekt der Behandlungsdauer analysiert.

Antiinflammatorisches IL-10 konnte im Präfrontalcortex mittels Proteinanalyse nachgewiesen werden. Hier zeigte sich keine quantitative Veränderung über die Zeit der Behandlung.

Leber

Analog zur Genexpressionsanalyse, sollte die Untersuchung von Leberproben auf Veränderungen in der Proteinexpression mittels ELISA innerhalb der Entzündungskaskade einen früheren Ablaufzeitpunkt darstellen.

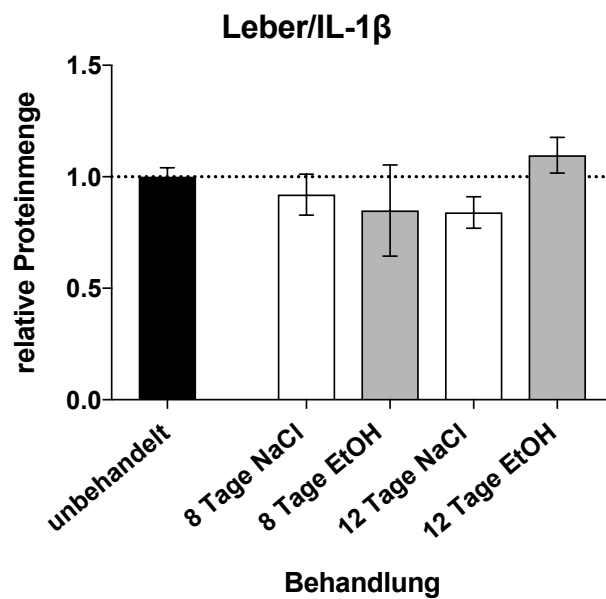


Abb. 32: Proteinanalyse von IL-1 β mit Gewebeproben der Leber. Tiere erhielten zwei- oder dreimal vier Tage Behandlung, die Gewebeentnahme erfolgte am Folgetag, 1 Stunde nach einer letzten Dosis. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardfehler. Dargestellte Daten wurden mittels 2-way-ANOVA mit Tukey's multicomparisons Test Signifikanzniveau $p < 0,05$ auf Behandlungseffekt und Effekt der Behandlungsdauer analysiert.

Für das Cytokin IL-1 β konnte - analog zur Genexpression - keine signifikante Veränderung der Ausprägung über die Zeit der Behandlung dargestellt werden.

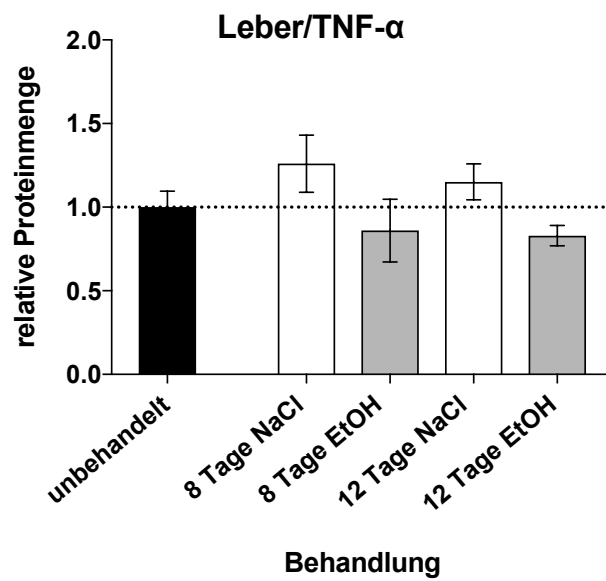


Abb. 33: Proteinanalyse von TNF- α mit Gewebeproben der Leber. Tiere erhielten zwei- oder dreimal vier Tage Behandlung, die Gewebeentnahme erfolgte am Folgetag, 1 Stunde nach einer letzten Dosis. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardfehler. Dargestellte Daten wurden mittels 2-way-ANOVA mit Tukey's multicomparisons Test Signifikanzniveau $p < 0,05$ auf Behandlungseffekt und Effekt der Behandlungsdauer analysiert.

Für TNF- α zeigt sich eine diskret fallende Tendenz, bei jedoch wiederum hohem Standardfehler auch bei den Kontrolltieren.

4. Diskussion

4.1 Ethanolbehandlung

Zur Untersuchung der Auswirkungen von Alkohol auf das angeborene Immunsystem wurde ein Versuchsparadigma mit Mäusen entwickelt. Für ein Modell über akuten beziehungsweise subchronischen Alkoholkonsum musste das Erreichen einer entsprechend hohen BEC in kurzer Zeit sichergestellt sein.

Ziel sollte hierbei nicht sein, den menschlichen Konsum an sich nachzuahmen. Wichtig für dieses Modell war es vor allem die entsprechende Höhe der BEC zu erreichen und das zeitliche Verteilungsmuster nachzustellen, um eine realistische physiologische Reaktion auszulösen, die akuten Formen des Alkoholkonsums gleichkommt.

In Modellen für zirrhotische Leberveränderungen durch Alkohol zeigte sich, dass eine zusätzliche Behandlung nach *binge*-Kriterien notwendig war um nach Alkoholbehandlung ad libitum durch Futterpallets eine entzündliche Reaktion auszulösen (Bertola et al. 2013). Versuchsprotokolle, die den Anspruch haben, die verhaltenspsychologischen und soziologischen, also menschlichen Aspekte von Alkoholkonsum zu immitieren (zum Beispiel das sogenannte "*Sucrose-Fading*" (Samson et al. 1996) oder "*Drinking in the Dark*" (Rhodes et al. 2005)) müssen wichtige Teilaspekte wie die freiwillige Selbstzuführung von Alkohol beinhalten, können jedoch keine angemessen hohe BEC in kurzer Zeit erreichen (Doremus et al. 2005) und sollten nicht das Ziel dieser Arbeit sein.

C57 Bl6/J-Mäuse wurden in kurzen Behandlungsblöcken zu je vier Tagen zweimal täglich mit EtOH (verdünnt in Kochsalzlösung) per intragastrischer Gavage behandelt. Die Mäuse hatten ein Alter von ca. 8 Wochen, um zu gewährleisten, dass sie sich physiologisch, wie neurologisch weder in der Adoleszenz noch im Senium befinden. Die konsumierte Menge betrug 3 Gramm EtOH pro Kilogramm Körpergewicht. Kontrolltiere erhielten reine Kochsalzlösung in äquivalentem Volumen unter gleichen Versuchsbedingungen. Die durchschnittliche Blutalkoholkonzentration der Versuchstiere betrug nach einer einzelnen Behandlung $0,27 \text{ ml} \pm 0,01 \text{ ml}$. Das Versuchsparadigma gewährleistet somit die Immitation von Konsummengen, die den geläufigen Definitionen des *binge drinking* entsprechen (Vgl. 1.1).

In diesem Modell muss der Unterschied zwischen dem Metabolismus der Maus und dem des Menschen natürlich beachtet werden (Cederbaum 2012). Mäuse wurden hier BEC

ausgesetzt, die für den Menschen bereits lebensbedrohliche Folgen haben können und bauen diese in deutlich kürzerer Zeit wieder ab (Carson und Pruet 1996). Nicht zuletzt deshalb ist das Mausmodell jedoch gut geeignet für einfach durchzuführende Studien über akuten beziehungsweise subchronischen Alkoholkonsum. Zudem sind Paradigmen mit Kleintieren weiterhin unabdingbar für die experimentelle neurowissenschaftliche Forschung wenn es um In-vivo-Studien geht.

4.2 Toleranzentwicklung

Zur Untersuchung der physischen Toleranzbildung wurde die Änderung der Körpertemperatur nach Behandlung im Verlauf beobachtet. Tiere, die Ethanol bekamen zeigten zu Beginn ein deutliches Absinken der Körpertemperatur als Folge der gefäßdilatierenden Eigenschaften des Ethanols. Im Verlauf bildete sich dieser Effekt jedoch deutlich zurück, bis nach drei Behandlungsblöcken mit Ethanol keine Senkung der Körpertemperatur mehr nachzuweisen war. Dies wurde als Aufbau einer Toleranz des Organismus gegenüber den physiologischen Eigenschaften des Ethanols gewertet. Physiologische Toleranzentwicklung wird zu den Schlüsselsymptomen der Entwicklung körperlicher Abhängigkeit gezählt (DIMDI 2019).

Wie in Abschnitt 1.1 bereits beschrieben, zeigen sich auch im Kleinhirn als System der Feinmotorik und Koordination (Romano et al. 1940), die Auswirkungen von Ethanol auf den Organismus (Luo 2015).

Diese Beeinträchtigung der motorischen Funktion durch Alkohol wurde mit Hilfe des *Rotarod* beobachtet. Hier war es vor allem wichtig, dass die Tiere ohne Stressreaktion mit dem Rotarod interagierten. Aus diesem Grund wurden die Tiere vor Beginn der Versuche, jeweils für die Dauer von drei Tagen an den Versuchsaufbau gewöhnt. Für einen ausreichenden Trainingseffekt und einen geringen Einfluss der NaCl-Behandlung auf die Motorfunktion sprechen die im Vergleich zu den Basalwerten unveränderten Ergebnisse der Kontrolltiere (Vgl. 12). Bei den mit EtOH behandelten Versuchstieren hingegen zeigten sich nach den ersten Behandlungen signifikante Verschlechterungen der Motorfunktion im Vergleich zu Basalwert und gleichbehandelten Kontrolltieren. Dieser Effekt der EtOH-Behandlung verringerte sich deutlich im Verlauf der Zeit. Nach drei Behandlungsblöcken zeigten die Versuchstiere keine signifikanten Beeinträchtigungen mehr. Diese Ergebnisse

können ebenfalls als Hinweis auf Toleranzbildung gewertet werden.

Somit konnte durch den ersten Teil des Versuchsaufbaus gezeigt werden, dass sich das hier verwendete Versuchsparadigma als Modell für subchronischen Alkoholkonsum und die Erforschung dessen Auswirkungen eignet. Es zeigt außerdem, dass sich die Toleranzbildung als eine klassische Suchtmittel-definierende Eigenschaft bereits nach kurzzeitigem, akutem Konsum von Alkohol entwickelt. Dies unterstreicht das Gefahrenpotential der Konsumform des *binge drinking*. Zudem bestätigt es einen Effekt auf den Organismus bereits nach dieser kurzen Behandlungsdauer, sodass im Folgenden mit den molekularbiologischen Methoden fortgefahren werden konnte.

4.3 Genexpressionsanalysen

Nach Abschluss der Ethanolbehandlung wurden Gewebeproben der Versuchstiere entnommen. Mittels Echtzeit-Polymerasekettenreaktion wurden relative quantitative Veränderungen der Genexpression bestimmt. Die Fragestellung bezog sich hier vor allem auf Gene in Verbindung mit dem angeborenen Immunsystem. Stellvertretend hierfür wurden Gene für Zytokine des TLR-4-Pfades untersucht, die bereits in Zusammenhang mit chronischem Alkoholkonsum gebracht wurden (Alfonso-Loeches et al. 2010).

Bei der Auswertung zeigten sich zunächst signifikante Veränderungen im Gewebe des ZNS in Form einer Hochregulation von $TNF\alpha$ im PFC. Diese Veränderung zeigte sich bereits nach einer Behandlungsdauer von 4 Tagen. Da $TNF-\alpha$ die BBB bereits ohne Disruption durch spezielle Transportmechanismen überwinden kann (Pan und Kastin 2002), (Banks 2005), lässt sich eine frühe Hochregulation hier gut nachvollziehen.

Nach 2 Behandlungsblöcken mit EtOH oder NaCl zeigte sich eine signifikante Hochregulation von CB-2 im Striatum, was bisher zunächst mit chronischem Konsum in Verbindung gebracht wurde (Zhang et al. 2003). CCL-2 zeigte im Striatum ebenfalls eine Tendenz nach oben. Aufgrund großer Streuung der Einzelwerte - vor allem unter den Kontrolltieren - wurde das Signifikanzlevel jedoch nicht erreicht. Ebenso verhielt es sich im Gewebe des Hippocampus.

Nach 3 Behandlungsblöcken zeigte sich im Cerebellum eine fallende Tendenz für $TNF-\alpha$. CCL-2 hingegen verhielt sich gegenläufig und tendenziell eher herunterreguliert.

Qin et al. (2008) untersuchten die Potenzierung der Wirkung von LPS durch Alkohol. Auch hier zeigte sich nach zehn täglichen Gaben Alkohol allein keine signifikante Änderung der Genexpression von IL-1 β 24 Stunden nach der letzten Injektion. Diese Befunde decken sich ebenfalls mit den Ergebnissen von Pradier et al. (2018), wonach IL-1 β erst nach Langzeitbehandlung stabil hochreguliert ist. TNF- α und CCL-2 zeigten sich bei Qin et al. (2008) im ZNS und in der Leber erhöht, was auch in hiesigem Versuchsaufbau nach 8 Tagen Alkoholbehandlung gezeigt werden konnte.

Aufgrund der teils beobachteten Streuung der Kontrolltiere wurde die NaCl-Behandlung selbst über die Behandlungsdauer verglichen ausgewertet (Siehe Abbildung 20ff.). Normiert an der ersten Kontrollgruppe zeigte sich eine teils deutliche Veränderung der Genexpression der Kontrolltiere über die Zeit und auch im Vergleich zur EtOH-Behandlung, wodurch es wissenschaftlich nicht vertretbar gewesen wäre, die Kontrolltiere aller Gruppen zusammenzufassen. Hier muss auch ein weiterer Effekt des Alkohols diskutiert werden, beispielsweise im Sinne einer Sedation die zur Stressreduktion führte.

In einem Tiermodell für subchronischen Alkoholkonsum sollte also auf jeden Fall auf einen direkten jeweiligen Vergleich mit Kontrolltieren in allen Behandlungsgruppen geachtet werden, wie in hiesigem Modell angewendet.

4.4 quantitativer Proteinnachweis

Um im zeitlichen Verlauf der Reaktion des Organismus auf Ethanol einen noch späteren Zeitpunkt abbilden zu können, wurden daraufhin Proteinanalysen entsprechender Cytokine mittels Sandwich-ELISA durchgeführt.

Hier zeigte sich im Gewebe des PFC eine Veränderung der Expression in Form einer signifikanten Herunterregulation von IL-1 β nach 8 und auch nach 12 Tagen Alkoholbehandlung im Vergleich zu Kontrollen (siehe Abbildung 29).

Antiinflammatorisches IL-10 als Zeichen für eine Beendigung der Immunantwort wurde hingegen nicht detektiert.

In der Analyse der Proteine mittels ELISA zeigte sich eine stabile Proteinexpression unter den Kontrolltieren über die Behandlungsdauer (siehe Abbildung 29 ff.).

4.5 Mediatoren des angeborenen Immunsystems im Überblick

Das proinflammatorische Zytokin IL-1 β zeigt in der Leber nach 2 Behandlungseinheiten steigende Tendenz, fällt dann jedoch ebenso wieder ab und wird daraufhin im ZNS in Geweben von Cerebellum und PFC tendenziell herunterreguliert. Dies zeigt sich dann ebenso in der Proteinexpression, die in der Leber keine signifikante Veränderung zeigt. Im ZNS - genauer im PFC - fällt IL-1 β im Vergleich zu Kontrollwerten ab. IL-1 β wird über ein Vorläufer-Protein gebildet und nicht immer vollständig auf Proteinebene exprimiert (Dinarello 2009). Das in diesem Fall verwendete ELISA-Kit sollte eine Mitdetektion des unsekretierten Vorläuferproteins sicherstellen, jedoch könnte die Sensitivität trotzdem reduziert sein. Zudem konnten Pradier et al. (2018) zeigen, dass die Expression von IL-1 β in Mikroglia im Rahmen von chronischem Alkoholkonsum erst nach einer Behandlungsdauer von mindestens zwölf Monaten nachweisbar und stabil hochreguliert war.

TNF- α konnte auf RNA-Ebene zu keinem Zeitpunkt in der Leber in veränderlicher Expression gezeigt werden, analog hierzu die Proteinexpression, die eher fallende Tendenz zeigte. Im PFC jedoch zeigte TNF- α bereits nach einem Behandlungsblock signifikante Hochregulation der Genexpression, im Cerebellum zu einem späteren Zeitpunkt nach 12 Tagen Behandlung ein tendenzieller Abfall. CB-2 steigt unmittelbar nach 4 Tagen Behandlung deutlich in der Leber, ist kurz darauf nach 8 Tagen Behandlung jedoch nicht mehr von Kontrollwerten zu unterscheiden. Zu diesem etwas späteren Zeitpunkt zeigt sich dann eine erhöhte Tendenz im Striatum, nach 12 Tagen Behandlung im Cerebellum. CB-2 als endogener Cannabinoidrezeptor wird vor allem unter chronisch entzündlichen Bedingungen vor allem in Makrophagen beziehungsweise Mikroglia im ZNS hochreguliert und vermittelt die Hemmung weiterer Inflammatorischer Pfade (Mukhopadhyay et al. 2006), (Molina-Holgado et al. 1997), was vereinbar ist mit der Herabregulation von TNF- α und IL1- β im ZNS. CCL-2 als Makrophagenstimulator konnte erst zu Versuchsende und auch nur in steigender Tendenz im ZNS gezeigt werden, was zu Versuchsergebnissen passt, die eine Aktivierung von Makrophagen über den *homing state* hinaus erst in Modellen für chronischem Alkoholkonsum zeigen konnten (Marshall et al. 2013), (Pradier et al. 2018). Studien mit humanen und murinen Makrophagen zeigten ebenfalls Hinweise auf eine zunächst eintretende Hemmung nach einmaliger akuter Alkoholbehandlung (Hu et al. 2017),

(Muralidharan et al. 2018) in vitro. Die hier gezeigten Ergebnisse deuten ebenfalls auf eine Entzündungsreaktion hin, die sich nach subchronischem Alkoholkonsum auf humoraler Ebene zeigen, nicht jedoch auf der zellulären Ebene der Makrophagen.

IL-10 als antiinflammatorisches Zytokin nimmt in diesem Kreislauf die Rolle des Gegengewichtes ein und kann auf die Begrenzung und das Abklingen einer akuten Entzündungsreaktion hindeuten. In diesem Versuch konnte antiinflammatorisches IL-10 zu keinem Zeitpunkt und in keinem Gewebe in veränderlicher Expression nachgewiesen werden. Qin et al. (2008) konnten ebenfalls IL-10 im Alkoholversuch erst zu einem verspäteten Zeitpunkt - mit einigen Tagen Entzug nach Beendigung der Alkoholbehandlung - in der Leber detektieren, hier wurde jedoch zur Verstärkung der Immunantwort durch Alkohol LPS zusätzlich gegeben.

Insgesamt entsteht in der hier durchgeführten Studie das Bild von frühzeitigen und kurzen Veränderungen in der Expression von proinflammatorischen Cytokinen nach subchronischem Alkoholkonsum. Diese Befunde konnten in deutlicher und stabiler Weise zuvor nur in Versuchen mit chronischem Konsummuster gezeigt werden.

4.6 Ausblick

Aufbauend auf den Ergebnissen dieser Studie könnte eine zusätzliche Untersuchung der Proteinexpression im ersten Versuchsteil (kurzzeitige Behandlung und Gewebeentnahme nach 3 Tagen Entzug) zusätzliche Erkenntnisse erbringen.

Ebenso könnte die längere Behandlung im zweiten Versuchsteil in Verbindung mit einer Gewebeentnahme nach einem Entzug von 3 Tagen Aussagen über entzündliche Prozesse in späterer Folge einer subchronischen Alkoholbehandlung machen.

Insgesamt kann hier verwendetes Modell für subchronischen Alkoholkonsum auch in Zukunft wertvolle Aussagen über den zeitlichen Verlauf der Immunantwort auf Alkohol machen und indirekt hilfreich sein zur Entwicklung diagnostischer und therapeutischer Werkzeuge im Rahmen von Alkohol- und anderen psychiatrischen Erkrankungen des Menschen.

5. Zusammenfassung

Nicht zuletzt aufgrund seiner weitläufig kulturellen Akzeptanz gehört Alkohol zu den gefährlichsten Rauschmitteln der modernen Welt und hat einen großen Einfluss auf die weltweite Gesundheit und weitere soziologische Aspekte. Die Toxizität von Ethanol ist weithin bekannt, seine Auswirkungen auf den Organismus sind allerdings nicht vollständig verstanden. Zahlreiche Studien zeigen Hinweise darauf, dass das angeborene Immunsystem eine große Rolle spielt bei der Entwicklung von Leberschäden und der Veränderung der Neurobiologie durch Alkohol. Durch Erhöhung der Permeabilität der Darmwand führt Alkoholingestion zu einer Lipopolysaccharid-vermittelten Immunreaktion in der Leber und durch die Freisetzung von Zentralnervensystem-gängigen proinflammatorischen Zytokinen zur Aktivierung des angeborenen Immunsystems im Zentralnervensystem (siehe Abschnitt 1.3).

Ziel dieser Arbeit war es, ebendiese Immunreaktion in einem Mausmodell für akuten, kurzzeitigen Alkoholkonsum - *binge drinking* genannt - nachzuweisen. Hierfür sollte ein Mausmodell entwickelt werden, das dieses Konsummuster entsprechend abbilden kann.

Es konnte zunächst gezeigt werden, dass bereits in frühen Stadien des akuten Alkoholkonsums eine physische Toleranz als eine Reaktion des Organismus auf den schädigenden Effekt des Alkohols entsteht. Zudem sollte die Verbindung von Alkohol im Körper mit der Hochregulation inflammatorischer Systeme auch im Zentralnervensystem in einem frühen Stadium gezeigt werden. Ziel war es, eine zeitliche Verlaufsübersicht zu generieren, die die inflammatorische Reaktion vom portalvenösen System der Leber bis hin zum Zentralnervensystem mit ihren Auswirkungen auf Gen- und Proteinebene darstellt.

Hierfür wurden die Tiere in kurzen Behandlungsblöcken mit hohen Mengen Ethanol behandelt, um den episodischen Charakter des subchronischen Konsums mit hohen Blutalkoholkonzentrationen und zwischenzeitigen Entzugsperioden zu imitieren. Mittels Temperaturmessung, Rotarod und Y-Labyrinth wurden physiologische, motorische und kognitive Veränderungen beziehungsweise Toleranzbildung untersucht. Im Anschluss an die Behandlung wurden Gewebeproben von Leber und Gehirn entnommen, Material isoliert und mittels Echtzeit-Polymerasekettenreaktion und ELISA auf Gen- und Proteinexpressionsveränderungen hin analysiert.

Die Ergebnisse deuten auf eine schnelle Toleranzentwicklung des Organismus auf die pharmakologischen Eigenschaften des Ethanols hin, die sich auch ohne chronischen Konsum und Substanzabhängigkeit entwickeln kann.

Bereits nach einigen Tagen Behandlung und einer kurzen Phase der Abstinenz zeigt sich eine signifikante Hochregulation des proinflammatorischen Tumornekrosefaktor- α im Zentralnervensystem, was zu diesem Zeitpunkt im hepatischen Gewebe bereits nicht mehr nachgewiesen werden konnte. Proinflammatorisches Interleukin- 1β konnte deutlich hochreguliert im Leber- jedoch nicht im neuronalen Gewebe nachgewiesen werden. Der Cannabinoid-Rezeptor 2, dessen Rolle im Immunsystem noch weiterhin untersucht werden muss, zeigt sich ebenfalls beeinflusst in Form von sehr deutlichen und kurzzeitigen Peaks in der Genexpression.

Im Ergebnis zeigt sich, dass das hier verwendete Modell zur Darstellung von subchronischem Alkoholkonsum im Vergleich zu anderen Modellen (mit Schwerpunkt auf der Selbstadministration) entsprechende Blutalkoholkonzentrationen erreichen und in kurzer Zeit zu nachweisbar physiologischen Veränderungen führen kann. Gegebenenfalls entstehende Stressreaktionen durch die Behandlung mittels Gavage sollten dadurch ausgeglichen werden, dass in jedem einzelnen Versuchsteil entsprechende Kontrollen zur Anwendung kommen.

Da der Alkoholkonsum in seinen unterschiedlichen Ausprägungen deutlichen Einfluss auf die Gesellschaft weltweit hat, haben bereits viele Studien versucht, die zugrundeliegenden neurobiologischen Mechanismen zu umreißen. Dies hat nicht nur klinisch relevante Erkenntnisse über die Wirkung von Alkohol auf den Organismus und die Biologie der Substanzabhängigkeit erbracht, sondern auch über die molekulare Ebene der Neuroinflammation an sich.

Der hier dargestellte Versuchsaufbau zeigt, dass auch ein Konsummuster wie das sogenannte *binge drinking*, das eine physische Abhängigkeit nicht voraussetzt, bereits nach kurzer Zeit eine Toleranzbildung und Auswirkungen auf das angeborene Immunsystem und das Zentralnervensystem haben kann und bereits in frühen Stadien ein distinktes Muster von immunologischer Aktivität in Leber- und Hirngewebe aktiviert, das sich von den bereits gut untersuchten chronischen Konsummodellen unterscheidet.

6. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	Aktivierung von NF- κ B	12
Abb. 2:	NF- κ B-gesteuerte Immunkaskade durch EtOH	15
Abb. 3:	Versuchsablauf mit 4 und 8 Tagen Behandlung, anschließend jeweils 3 Tage Entzug und Gewebeentnahme	21
Abb. 4:	Versuchsablauf mit 4, 8 und 12 Tagen Behandlung, am Folgetag jeweils eine letzte Injektion und Gewebeentnahme nach 1 Stunde	22
Abb. 5:	schematische Darstellung des Y-Labyrinth	24
Abb. 6:	Photometrische Messung des gewonnenen Genmaterials	26
Abb. 7:	rtPCR - Visualisierung der Fluoreszenzwerte im zeitlichen Verlauf der Amplifizierung	29
Abb. 8:	schematische Darstellung des Sandwich-ELISA	33
Abb. 9:	Lineare Regression mit Hilfe der Standardmessreihe und Interpolieren der Probenreihe zur Ermittlung der BEC	34
Abb. 10:	Photometrisch bestimmte Blutalkoholwerte	35
Abb. 11:	Differenz der Körpertemperatur vor und 30 Minuten nach Behandlung mit EtOH oder NaCl	36
Abb. 12:	Abschneiden der Tiere im Rotarod-Versuch	37
Abb. 13:	Ergebnisse des Y-Labyrinth-Versuchs	39
Abb. 14:	RT-PCR von IL-1 β mit Gewebeproben des Cerebellum	41
Abb. 15:	RT-PCR von IL-1 β mit Gewebeproben des Cerebellum	42
Abb. 16:	RT-PCR von TNF- α mit Gewebeproben des Cerebellum	43
Abb. 17:	RT-PCR von TNF- α mit Gewebeproben des Cerebellum	43
Abb. 18:	RT-PCR von CCL-2 mit Gewebeproben des Cerebellum	44
Abb. 19:	RT-PCR von CCL-2 mit Gewebeproben des Cerebellum	45
Abb. 20:	RT-PCR von CB-2 mit Gewebeproben des Cerebellum	46
Abb. 21:	RT-PCR von TNF- α mit Gewebeproben des Präfrontalkortex	47
Abb. 22:	RT-PCR von CB-2 mit Gewebeproben des Hippocampus	48
Abb. 23:	RT-PCR von CCL-2 mit Gewebeproben des Hippocampus	48
Abb. 24:	RT-PCR von CB-2 mit Gewebeproben des Striatum	49
Abb. 25:	RT-PCR von CCL-2 mit Gewebeproben des Striatum	50

Abb. 26: RT-PCR von IL-1 β mit Gewebeproben der Leber	51
Abb. 27: RT-PCR von CCL-2 mit Gewebeproben der Leber	52
Abb. 28: RT-PCR von CB-2 mit Gewebeproben der Leber	53
Abb. 29: Proteinanalyse von IL-1 β mit Gewebeproben des Präfrontalkortex . .	54
Abb. 30: Proteinanalyse von CCL-2 mit Gewebeproben des Präfrontalkortex .	55
Abb. 31: Proteinanalyse von IL-10 mit Gewebeproben des Präfrontalkortex . .	56
Abb. 32: Proteinanalyse von IL-1 β mit Gewebeproben der Leber	57
Abb. 33: Proteinanalyse von TNF- α mit Gewebeproben der Leber	58

7. Literaturverzeichnis

Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K und Walter P. *Molecular Biology of the Cell*. New York: Garland Science, 2002

Alfonso-Loeches S, Pascual-Lucas M, Blanco AM, Sanchez-Vera I und Guerri C. Pivotal Role of TLR4 Receptors in Alcohol-Induced Neuroinflammation and Brain Damage. *J Neurosci* 2010; 30: 8285–95

Ammann RW, Heitz PU und Klöppel G. Course of Alcoholic Chronic Pancreatitis: A Prospective Clinicomorphological Long-term Study. *Gastroenterology* 1996; 111: 224–31

Armstrong S. A chronometric approach to the study of feeding behavior. *Neurosci Biobehav Rev* 1980; 4: 27–53

Balleine BW, Delgado MR und Hikosaka O. The Role of the Dorsal Striatum in Reward and Decision-Making. *J Neurosci* 2007; 27: 8161–5

Banks WA. Blood-brain barrier transport of cytokines: a mechanism for neuropathology. *Curr Pharm Des* 2005; 11: 973–84

Bertola A, Mathews S, Ki SH, Wang H und Gao B. Mouse model of chronic and binge ethanol feeding (The NIAAA model). *Nat Protoc* 2013; 8: 627–37

Beseler CL, Taylor LA und Leeman RF. An Item-Response Theory Analysis of DSM-IV Alcohol-Use Disorder Criteria and “Binge” Drinking in Undergraduates. *J Stud Alcohol Drugs* 2010; 71: 418–23

Bode C und Bode JC. Effect of alcohol consumption on the gut. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2003; 17: 575–92

Carson EJ und Pruett SB. Development and characterization of a binge drinking model in mice for evaluation of the immunological effects of ethanol. *Alcohol Clin Exp Res* 1996; 20: 132–8

Cederbaum AI. Alcohol metabolism. *Clin Liver Dis* 2012; 16: 667–85

Chen G, Cuzon Carlson VC, Wang J, Beck A, Heinz A, Ron D, Lovinger DM und Buck KJ. Striatal Involvement in Human Alcoholism and Alcohol Consumption, and Withdrawal in Animal Models. *Alcohol Clin Exp Res* 2011; 35: 1739–48

- Contet C. Gene Expression under the Influence: Transcriptional Profiling of Ethanol in the Brain. *Psychopharmacology* 2012; 1: 301–14
- Crews FT und Vetreno RP. Mechanisms of neuroimmune gene induction in alcoholism. *Psychopharmacology* 2016; 233: 1543–57
- Crews FT und Nixon K. Mechanisms of Neurodegeneration and Regeneration in Alcoholism. *Alcohol Alcohol* 2009; 44: 115–27
- Deli MA, Descamps L, Dehouck MP, Cecchelli R, Joo F, Abraham CS und Torpier G. Exposure of tumor necrosis factor-alpha to luminal membrane of bovine brain capillary endothelial cells cocultured with astrocytes induces a delayed increase of permeability and cytoplasmic stress fiber formation of actin. *J Neurosci Res* 1995; 41: 717–26
- DIMDI. ICD-10-GM Version 2019. 2019. URL: <https://www.dimdi.de/static/de/klassifikationen/icd/icd-10-gm/kode-suche/htmlgm2019/chapter-v.htm> (besucht am 15.01.2019)
- Dinarello CA. Immunological and Inflammatory Functions of the Interleukin-1 Family. *Annual Review of Immunology* 2009; 27: 519–50
- Doremus TL, Brunell SC, Rajendran P und Spear LP. Factors Influencing Elevated Ethanol Consumption in Adolescent Relative to Adult Rats. *Alcohol Clin Exp Res* 2005; 29: 1796–808
- Engvall E und Perlmann P. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry* 1971; 8: 871–4
- Gaziano JM, Gaziano TA, Glynn RJ, Sesso HD, Ajani UA, Stampfer MJ, Manson JE, Buring JE und Hennekens CH. Light-to-moderate alcohol consumption and mortality in the Physicians' Health Study enrollment cohort. *J Am Coll Cardiol* 2000; 35: 96–105
- GBD. Alcohol use and burden for 195 countries and territories, 1990–2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *Lancet* 2018: 1015–135
- Graeber MB. Changing face of microglia. *Science* 2010; 330: 783–8
- Hanck C, Rossol S, Böcker U, Tokus M und Singer MV. Presence of plasma endotoxin is correlated with tumour necrosis factor receptor levels and disease activity in alcoholic cirrhosis. *Alcohol Alcohol* 1998; 33: 606–8

Harper C, Fornes P, Duyckaerts C, Lecomte D und Hauw JJ. An international Perspective on the Prevalence of the Wernicke-Korsakoff Syndrome. *Metab Brain Dis* 1995; 10: 17–24

Hashikawa-Hobara N, Mishima S, Nagase S, Morita K, Otsuka A und Hashikawa N. Effects of alcoholic beverage treatment on spatial learning and fear memory in mice. *Biosci Biotechnol Biochem* 2018: 1–8

He J und Crews FT. Increased MCP-1 and microglia in various regions of the human alcoholic brain. *Exp Neurol* 2008; 210: 349–58

Heid CA, Stevens J, Livak KJ und Williams PM. Real time quantitative PCR. *Genome research* 1996; 6: 986–94

Hoffmeister H, Schelp FP, Mensink GB, Dietz E und Böhning D. The relationship between alcohol consumption, health indicators and mortality in the German population. *Int J Epidemiol* 1999; 28: 1066–72

Hu C, Meng X, Huang C, Shen C und Li J. Frontline Science: ATF3 is responsible for the inhibition of TNF- α release and the impaired migration of acute ethanol-exposed monocytes and macrophages. *J Leukoc Biol* 2017; 101: 633–42

Huhn A, Sweeny M, Brooner K, Kidorf M, D T, Ayaz H und Dunn K. Prefrontal Cortex Response to Drug Cues, Craving, and Current depressive Symptoms are associated with Treatment Outcomes in Methadone-maintained Patients. *Neuropsychopharmacology* 2018; 44: 826–33

Karatzis K, Papamichael C, Aznaouridis K, Karatzis E, Lekakis J, Matsouka C, Boskou G, Chiou A, Sitara M, Feliou G, Kontoyiannis D, Zampelas A und Mavrikakis M. Constituents of red wine other than alcohol improve endothelial function in patients with coronary artery disease. *Coron Artery Dis* 2004; 15: 485–90

Lavö B, Colombel JF, Knutsson L und Hällgren R. Acute exposure of small intestine to ethanol induces mucosal leakage and prostaglandin E₂ synthesis. *Gastroenterology* 1992; 102: 468–73

Leichnetz GR. The prefrontal cortex: Anatomy, physiology, and neuropsychology of the frontal lobe. *Synapse* 1989; 4: 96–7

Lippai D, Bala S, Petrasek J, Csak T, Levin I, Kurt-Jones EA und Szabo G. Alcohol-induced IL-1beta in the brain is mediated by NLRP3/ASC inflammasome activation that amplifies neuroinflammation. *J Leukoc Biol* 2013;94: 171–82

Liu J, Lewohl JM, Harris RA, Iyer VR, Dodd PR, Randall PK und Mayfield RD. Patterns of Gene Expression in the Frontal Cortex Discriminate Alcoholic from Nonalcoholic Individuals. *Neuropsychopharmacology* 2006;31

Lüllmann H und Mohr K. *Pharmakologie und Toxikologie*. Stuttgart: Thieme, 2006

Luo J. Effects of Ethanol on the Cerebellum: Advances and Prospects. *Cerebellum* 2015; 14: 383–5

Marshall SA, McClain JA, Kelso ML, Hopkins DM, Pauly JR und Nixon K. Microglial activation is not equivalent to neuroinflammation in alcohol-induced neurodegeneration: The importance of microglia phenotype. *Neurobiol Dis* 2013;54: 239–51

McClain CJ, Barve S, Deaciuc I, Kugelmas M und Hill D. Cytokines in alcoholic liver disease. *Semin Liver Dis* 1999; 19: 205–19

McClain CJ und Cohen DA. Increased tumor necrosis factor production by monocytes in alcoholic hepatitis. *Hepatology* 1989;9: 349–51

Medawar PB. Immunity to homologous grafted skin. III. The fate of skin homografts transplanted to the brain, to subcutaneous tissue, and to the anterior chamber of the eye. *Br J Exp Pathol* 1948;29: 58

Molina-Holgado F, Lledo A und Guaza C. Anandamide suppresses nitric oxide and TNF-alpha responses to Theiler's virus or endotoxin in astrocytes. *Neuroreport* 1997;8: 1929–33

Mukhopadhyay S, Das S, Williams EA, Moore D, Jones JD, Zahm DS, Ndengele MM, Lechner AJ und Howlett AC. Lipopolysaccharide and cyclic AMP regulation of CB(2) cannabinoid receptor levels in rat brain and mouse RAW 264.7 macrophages. *J Neuroimmunol* 2006; 181: 82–92

Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G und Erlich H. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. In: *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology*. Cold Spring Harbor, U.S.A.: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1986: 263–73

Munro S, Thomas KL und Abu-Shaar M. Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature* 1993; 365: 61–5

Muralidharan S, Lim A, Catalano D und Mandrekar P. Human Binge Alcohol Intake Inhibits TLR4-MyD88 and TLR4-TRIF Responses but Not the TLR3-TRIF Pathway: HspA1A and PP1 Play Selective Regulatory Roles. *The Journal of Immunology* 2018; 200: 2291–303

NIAAA. NIAAA Newsletter Summer 2004. 2004. URL: https://pubs.niaaa.nih.gov/publications/Newsletter/winter2004/Newsletter_Number3.pdf (besucht am 15.08.2016)

Oehmichen M, Grüninger H, Saebisch R und Narita Y. Mikroglia und Pericyten als Transformationsformen der Blut-Monocyten mit erhaltener Proliferationsfähigkeit. *Acta Neuropathologica* 1973; 23: 200–18

Osterndorff-Kahanek E, Ponomarev I, Blednov YA und Harris RA. Gene Expression in Brain and Liver Produced by Three Different Regimens of Alcohol Consumption in Mice: Comparison with Immune Activation. *PLOS ONE* 2013; 8: 1–10

Pan W und Kastin AJ. TNFalpha transport across the blood-brain barrier is abolished in receptor knockout mice. *Exp Neurol* 2002; 174: 193–200

Park BS und Lee JO. Recognition of lipopolysaccharide pattern by TLR4 complexes. *Experimental & Molecular Medicine* 2013; 45: e66

Parlesak A, Schäfer C, Schütz T, Bode J und Bode C. Increased intestinal permeability to macromolecules and endotoxemia in patients with chronic alcohol abuse in different stages of alcohol-induced liver disease. *J Hepatol* 2000; 32: 742–7

Pradier B, Erxlebe E, Markert A und Racz I. Interaction of cannabinoid receptor 2 and social environment modulates chronic alcohol consumption. *Behav Brain Res* 2015; 287: 163–71

Pradier B, Erxlebe E, Markert A und Racz I. Microglial IL-1beta progressively increases with duration of alcohol consumption. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2018; 391: 455–61

Qin L, He J, Hanes RN, Pluzarev O, Hong JS und Crews FT. Increased systemic and brain cytokine production and neuroinflammation by endotoxin following ethanol treatment. *J Neuroinflammation* 2008; 5: 10

- Rao R, Seth A und Sheth P. Recent advances in alcoholic liver disease I. Role of intestinal permeability and endotoxemia in alcoholic liver disease. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2004; 286: G881–G884
- Rhodes JS, Best K, Belknap JK, Finn DA und Crabbe JC. Evaluation of a simple model of ethanol drinking to intoxication in C57BL/6J mice. *Physiol Behav* 2005: 53–63
- Romano J, Michael MJ und Merritt H. Alcoholic cerebellar degeneration. *Arch NeurPsych* 1940; 44: 1230–6
- Saha TD, Stinson FS und Grant BF. The role of alcohol consumption in future classifications of alcohol use disorders. *Drug Alcohol Depend* 2007; 89: 82–92
- Samson H, Files F und Brice G. Patterns of Ethanol Consumption in a Continuous Access Situation: The Effect of Adding a Sweetener to the Ethanol Solution. *Alcohol Clin Exp Res* 1996; 20: 101–9
- Shimazu R, Akashi S, Ogata H, Nagai Y, Fukudome K, Miyake K und Kimoto M. MD-2, a molecule that confers lipopolysaccharide responsiveness on Toll-like receptor 4. *J Exp Med* 1999; 189: 1777–82
- Simi A, Tsakiri N, Wang P und Rothwell NJ. Interleukin-1 and inflammatory neurodegeneration. *Biochem Soc Trans* 2007; 35: 1122–6
- Smith P, Krohn R, Hermanson G, Mallia A, Gartner F, Provenzano M, Fujimoto E, Goeke N, Olson B und Klenk D. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* 1985; 150: 76–85
- Stampfer MJ, Colditz GA, Willett WC, Speizer FE und Hennekens CH. A prospective study of moderate alcohol consumption and the risk of coronary disease and stroke in women. *N Engl J Med* 1988; 319: 267–73
- Szabo G, Bala S, Petrasek J und Gattu A. Gut-liver axis and sensing microbes. *Dig Dis* 2011; 28: 737–44
- Truitt JM, Blednov YA, Benavidez JM, Black M, Ponomareva O, Law J, Merriman M, Horani S, Jameson K, Lasek AW, Harris RA und Mayfield RD. Inhibition of IKKbeta Reduces Ethanol Consumption in C57BL/6J Mice. 2016. URL: <http://www.eneuro.org/content/3/5/ENEURO.0256-16.2016> (besucht am 08.07.2018)

- Turcotte C, Blanchet MR, Laviolette M und Flamand N. The CB2 receptor and its role as a regulator of inflammation. *Cell Mol Life Sci* 2016; 73: 4449–70
- Turner MD, Nedjai B, Hurst T und Pennington DJ. Cytokines and chemokines: At the crossroads of cell signalling and inflammatory disease. *Biochim Biophys Acta* 2014; 1843: 2563–82
- Vallés SL, Blanco AM, Pascual M und Guerri C. Chronic Ethanol Treatment Enhances Inflammatory Mediators and Cell Death in the Brain and in Astrocytes. *Brain Pathol* 2004; 14: 365–71
- Ward RJ, Zhang Y, Crichton RR, Piret B, Piette J und Witte P de. Identification of the nuclear transcription factor NF κ B in rat brain after in vivo ethanol administration. *FEBS Letters* 1996; 389: 119–22
- Warden AS und Mayfield RD. Gene expression profiling in the human alcoholic brain. *Neuropharmacology* 2017; 122: 161–74
- Wechsler H, Davenport A, Dowdall G, Moeykens B und Castillo S. Health and Behavioural Consequences of Binge Drinking in College. *JAMA* 1994; 272: 1672–7
- Wechsler H und Isaac N. Binge Drinkers at Massachusetts Colleges: Prevalence, Drinking style, Time Trends, and associated Problems. *JAMA* 1992; 267: 2929–31
- Wekerle H. Breaking ignorance: the case of the brain. *Curr Top Microbiol Immunol* 2006: 25–50
- White AM, Kraus CL und Swartzwelder H. Many college freshmen drink at levels far beyond the binge threshold. *Alcohol Clin Exp Res* 2006; 30: 1006–10
- WHO. Global status report on alcohol and health 2014. Genf, Schweiz: WHO Press, 2014
- WHO. Global status report on alcohol and health 2018. Genf, Schweiz: WHO Press, 2018
- Winer J, Jung CKS, Shackel I und Williams PM. Development and validation of real-time quantitative reverse transcriptase–polymerase chain reaction for monitoring gene expression in cardiac myocytes in vitro. *Anal Biochem* 1999; 270: 41–9

Yin M, Wheeler MD, Kono H, Bradford BU, Gallucci RM, Luster MI und Thurman RG. Essential role of tumor necrosis factor α in alcohol-induced liver injury in mice. *Gastroenterology* 1999; 117: 942–52

Zahr NM, Luong R, Sullivan EV und Pfefferbaum A. Measurement of Serum, Liver, and Brain Cytokine Induction, Thiamine Levels, and Hepatopathology in Rats Exposed to a 4-Day Alcohol Binge Protocol. *Alcohol Clin Exp Res* 2010; 34: 1858–70

Zhang J, Hoffert C, Vu HK, Groblewski T, Ahmad S und O'Donnell D. Induction of CB2 receptor expression in the rat spinal cord of neuropathic but not inflammatory chronic pain models. *Eur J Neurosci* 2003; 17: 2750–4

Zuo GQ, Gong JP, Liu CA, Li SW, Wu XC, Yang K und Li Y. Expression of lipopolysaccharide binding protein and its receptor CD14 in experimental alcoholic liver disease. *World J Gastroenterol* 2001; 7: 836–40

8. Danksagung

Ich danke an erster Stelle Dr. rer. nat. Ildikó Rácz für ihr Mentoring und die stets zuverlässige und geduldige Begleitung über die gesamte Zeit. Ich habe viel von Dir gelernt.

Ich möchte mich außerdem bei Prof. Dr. rer. nat. Zimmer bedanken, in dessen Arbeitsgemeinschaft ich mich schnell einfinden und jederzeit gut betreut fühlen konnte.

Ich danke auch den Kollegen aus der AG Zimmer, allen voran Astrid Markert, Kerstin Nicolai und Kirsten Krenkel, die mich im Labor jederzeit unterstützt haben wo sie konnten.

Ich bedanke mich ebenso bei meiner Familie und bei meinen Freunden, die mit stoischer Ruhe und Unterstützung hinter mir standen und nicht locker gelassen haben.

Ich danke Albert, Chris und Silvan, die mir mit fachfremder Expertise über Informatik oder Grafikdesign unermüdlich und zu jeder Zeit zur Seite standen.