

Aus der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Hepatologie und
Gastroenterologie, Campus Virchow-Klinikum
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Untersuchungen zum Einfluss eines erhöhten Omega-3 Fettsäure
Gehaltes auf das Lipidmediatorenprofil und zum anti-
inflammatorischen Potential der murinen 15-Lipoxygenase, 17-
Hydroxydocosapentaensäure und 10,17-
Dihydroxydocosapentaensäure

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Cheng-Ying Chiu

aus Hamburg

Datum der Promotion: 23.06.2019

Inhaltsverzeichnis

	Seite
Zusammenfassung	5
Abstract	6
1 Einleitung	
1.1 Omega-3 und Omega-6 Fettsäuren	7
1.2 Lipoxygenasen	7
1.3 Lipidmetabolite und Lipidmediatoren	7
1.4 Chronisch entzündliche Darmerkrankungen	8
2 Zielsetzung	9
3 Methoden	
3.1 Versuchstiere	10
3.2 Induktion des <i>fat-1</i> Phänotyps	10
3.3 Fütterungsstudie	10
3.4 Lipidomics-Analytik	
3.4.1 Gaschromatographie (GC)	10
3.4.2 Flüssigchromatographie-Tandem Massenspektrometrie (LC-MS/MS)	11
3.5 DSS-Kolitis und intraperitoneale Behandlung mit Lipidmediatoren	11
3.6 Kolonepithelzellen	
3.6.1 Inkubation mit DSS oder Lipidmediatoren und deren Einfluss auf den transepithelialen elektrischen Widerstand	11
3.7 Makrophagen	
3.7.1 Inkubation mit Lipidmediatoren und deren Einfluss auf den Makrophagen Phänotyp	12
3.7.2 Phagozytose Assay	12
3.8 Statistische Auswertung	12
4 Ergebnisse	
4.1 Manuskript 1: Quantitative profiling of hydroxy lipid metabolites in mouse organs reveals distinct lipidomic profiles and modifications due to elevated n-3 fatty acid levels	
4.1.1 Zusammenfassung	13
4.1.2 Publikation	13
4.2 Manuskript 2: Modulation of the endogenous Omega-3 Fatty Acid and oxylipin profile in vivo – A comparison of the fat-1 transgenic mouse with C57BL/6 wildtype mice on an Omega-3 Fatty Acid enriched diet	
4.2.1 Zusammenfassung	13
4.2.2 Publikation	14
4.3 Manuskript 3: Omega-6 docosapentaenoic acid-derived resolvins and 17-hydroxydocosahexaenoic acid modulate macrophage function and alleviate experimental colitis	
4.3.1 Zusammenfassung	14
4.3.2 Publikation	14
4.4 Manuskript 4: Female mice carrying a defective Alox15 gene are protected from experimental colitis via sustained maintenance of the intestinal epithelial barrier function	
4.4.1 Zusammenfassung	15
4.4.2 Publikation	15
5 Diskussion	16
6 Referenzen	19
7 Eidesstattliche Erklärung	22
8 Druckexemplare der ausgewählten Publikationen	

8.1	Publikation 1	24
8.2	Publikation 2	36
8.3	Publikation 3	55
8.4	Publikation 4	65
9	Lebenslauf	80
10	Komplette Publikationsliste	81
11	Danksagung	82

Zusammenfassung

Langkettige mehrfach ungesättigte Omega-3 und Omega-6 Fettsäuren stellen Vorläufer für bioaktive Lipidmediatoren und – metabolite dar, welche enzymatisch über Cyclooxygenasen, Lipoxygenasen (LOX), Cytochrome P450 (CYP-450) sowie Autooxidationsprozessen synthetisiert werden, und können in ihrer Bildung pharmakologisch beeinflusst werden. In den dieser Arbeit zugrundeliegenden Publikationen wurde der Einfluss von erhöhten Omega-3 Fettsäurespiegeln auf die Zusammensetzung des Lipidmediatorenprofils, insbesondere der einfach hydroxylierten Metabolite Hydroxyeicosatetraensäuren, Hydroxyeicosapentaensäuren (HEPE) sowie Hydroxydocosahexaensäuren, in verschiedenen Organen der Maus untersucht. Weiterhin wurde die Rolle der murinen 15-Lipoxygenase sowie der von Omega-6 Docosapentaensäure stämmigen Lipidmetabolite 17-Hydroxydocosapentaensäure (17-HDPA_n-6) und 10,17-Dihydroxydocosapentaensäure (10,17-HDPA_n-6) im Kontext eines experimentellen Kolitismodells untersucht.

In der ersten Studie wurde mittels Flüssigchromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung die Zusammensetzung von Monohydroxy-Lipidmetaboliten in Herz, Lunge, Leber, Kolon, Nieren, Milz und Skelettmuskel der Maus charakterisiert. Es fand sich eine organ- und gewebespezifische Verteilung der untersuchten Monohydroxy-Lipidmetabolite. Ein erhöhter Omega-3 Fettsäurespiegel in der transgenen *fat-1* Maus führte zu einem organ- und gewebespezifischen Anstieg der Omega-3 Fettsäure stämmigen Lipidmetabolite. Eicosapentaensäure wurde trotz geringer Mengen hocheffizient zu hauptsächlich 12-HEPE in der Lunge sowie Milz und 9-HEPE und 18-HEPE in den anderen Organen verstoffwechselt. In der zweiten Studie konnte gezeigt werden, dass durch diätetische Intervention mittels Omega-3 Fettsäure angereichertem Futter ein höherer Omega-3 Fettsäurespiegel im Vergleich zum transgenen *fat-1* Mausmodell erzielt wurde. Es fanden sich entsprechend erhöhte Spiegel der von Omega-3 Fettsäuren abgeleiteten Lipidmetabolite. Im Plasma von Mäusen auf Omega-3 Fettsäurereichem Futter wurde das Lipidmetabolitenprofil von LOX und CYP-450 Enzymen synthetisierten Lipidmetaboliten dominiert.

Der anti-inflammatorische Effekt von 17-HDPA_n-6 und 10,17-HDPA_n-6 wurde in der dritten Studie im Dextran Natriumsulfat (DSS)-induzierten Kolitismodell in wildtyp C57BL/6 Mäusen untersucht. Eine intraperitoneale Behandlung mit 17-HDPA_n-6 oder 10,17-HDPA_n-6 milderte die DSS-Kolitis, den epithelialen Schaden sowie die Makrophageninfiltration. Weiterhin erhöhte 17-HDPA_n-6 sowie 10,17-HDPA_n-6 in der Makrophagen-Zelllinie RAW 264.7 die Phagozytoseaktivität.

Die Rolle der murinen 15-Lipoxygenase (Alox15) wurde in der vierten Studie im DSS-Kolitismodell untersucht. Unsere Ergebnisse zeigen eine erhöhte Alox15 Expression in wildtyp Mäusen mit DSS-Kolitis. Eine systemische Inaktivierung des Alox15 Genes (Alox15^{-/-}) war mit einer signifikant milderen Kolitisaktivität und einer erhaltenen Funktion der intestinalen Barriere assoziiert. In Alox15^{-/-} Mäusen mit DSS-Kolitis wurden verminderte 12-Hydroxyeicosatetraensäure (12-HETE) Spiegel gemessen. *In vitro* Experimente konnten zeigen, dass 12-HETE die epitheliale Barriere in CaCo-2 Zellen stört.

Die Ergebnisse weisen auf einen protektiven Effekt der systemischen Alox15 Inaktivierung, möglicherweise bedingt durch eine verminderte Synthese von 12-HETE, sowie der Lipidmediatoren 17-HDPA_n-6 und 10,17-HDPA_n-6 im DSS-Kolitismodell hin.

Abstract

Long-chain polyunsaturated omega-3 (n-3 PUFA) and omega-6 fatty acids are precursors of highly potent lipid mediators and metabolites, which are synthesized via cyclooxygenases, lipoxygenases (LOX), cytochrome P450 (CYP-450) or via autooxidation processes, and their synthesis can be modulated. The lipid mediator profile, especially of monohydroxy lipid metabolites hydroxyeicosatetraenoic acids, hydroxyeicosapentaenoic acids (HEPE) and hydroxydocosahexaenoic acids, and their modifications due to elevated n-3 PUFA levels was characterized in different organs in healthy mice. Furthermore the role of murine 15-lipoxygenase as well as omega-6 docosapentaenoic acid-derived 17-hydroxydocosapentaenoic acid (17-HDPA_n-6) and 10,17-dihydroxydocosapentaenoic acid (10,17-HDPA_n-6) in experimental colitis was investigated.

In the first study, the profile of monohydroxy lipid metabolites in heart, lung, liver, colon, kidney, spleen and skeletal muscle of healthy wildtype mice were characterized using liquid chromatography–mass spectrometry. We found distinct characteristic lipid metabolite patterns in different organs. Elevated n-3 PUFA levels in transgenic *fat-1* mice lead to increased formation of n-3 PUFA derived metabolites. Eicosapentaenoic acid – even though levels were low - was strongly utilized for formation of 12-HEPE in the lung as well as spleen and 9-HEPE and 18-HEPE in the other organs. The second study showed that higher n-3 PUFA levels could be achieved through dietary intervention with a diet enriched with n-3 PUFA compared to the *fat-1* mouse model. This was reflected by increased levels of n-3 PUFA derived lipid metabolites. In plasma of mice fed with an enriched n-3 PUFA diet the lipid metabolite profile was dominated by metabolites derived from the LOX and CYP450 pathways.

The anti-inflammatory effect of 17-HDPA_n-6 and 10,17-HDPA_n-6 in dextran sodium sulfate (DSS)-induced colitis was examined in the third study. Intraperitoneal injection of 17-HDPA_n-6 or 10,17-HDPA_n-6 alleviated DSS-colitis, epithelial damage and macrophage infiltration. Furthermore 17-HDPA_n-6 and 10,17-HDPA_n-6 increased phagocytosis activity in macrophage cell line RAW 264.7.

The role of murine 15-lipoxygenase (Alox15) in DSS-colitis was explored in the fourth study. Alox 15 expression was augmented in wildtype C57BL/6 mice with DSS-colitis. Furthermore, systemic inactivation of the Alox15 gene (Alox15^{-/-}) was associated with less severe colitis signs and preserved function of the intestinal barrier. Lower 12-hydroxyeicosatetraenoic acid (12-HETE) levels were detected in Alox15^{-/-} mice with DSS-colitis. 12-HETE impaired intestinal epithelial barrier function *in vitro* in CaCo-2 cells.

The results indicate a protective effect of systemic Alox15 inactivation, which might be related to reduced formation of 12-HETE, as well as of the lipid mediators 17-HDPA_n-6 and 10,17-HDPA_n-6 in the context of DSS-colitis.

1 Einleitung

1.1 Omega-3 und Omega-6 Fettsäuren

Langkettige mehrfach ungesättigte Fettsäuren spielen eine wichtige Rolle in der Regulation von physiologischen und pathophysiologischen Prozessen (1). Die bedeutendsten Omega-6 Fettsäuren sind Linolsäure und Arachidonsäure (AA). α -Linolensäure, Eicosapentaensäure (EPA) und Docosahexaensäure (DHA) stellen die biologisch relevanten Omega-3 Fettsäuren dar. Linolsäure und α -Linolensäure, die Vorstufen von AA bzw. EPA und DHA, sind essentiell und können nicht von Säugetieren selbst synthetisiert werden, sodass für relevante Plasmakonzentrationen die Zufuhr durch Nahrung nötig ist. Omega-3 und Omega-6 Fettsäuren stellen Vorläufer für bioaktive Lipidmediatoren und Lipidmetabolite dar, welche über Cyclooxygenasen (COX), Lipoxygenasen (LOX), Cytochrom-P450 (CYP-450)-Enzymen sowie Autooxidationsprozessen synthetisiert werden.

1.2 Lipoxygenasen

Lipoxygenasen sind Dioxygenasen, welche die Peroxidation von freien mehrfach ungesättigten Fettsäuren katalysieren (2, 3). Aus der primären Lipoxygenasereaktion entstehen Hydroperoxyfettsäuren, welche in weiteren enzymatischen Reaktionen zu bioaktiven Lipidmediatoren umgewandelt werden. Für den Menschen sind sechs Lipoxygenase Isoformen beschrieben, wohingegen das Mausgenom sieben funktionelle Lipoxygenase Isoformen enthält (4).

Neben der Synthese von bioaktiven Botenstoffen ist die 15-Lipoxygenase (ALOX15) noch als intrazelluläres lipidperoxidierendes Enzym an der Regulation des zellulären Redoxgleichgewichtes sowie am Umbau von Zellorganellen und am lokalen Lipoproteinstoffwechsel beteiligt. Zur Rolle der 15-Lipoxygenase in der Pathogenese verschiedener Erkrankungen fanden sich in der Literatur teils gegenläufige Ergebnisse. Während eine erhöhte ALOX15-Expression die Zellproliferation und damit Tumorwachstum beim Kolonkarzinom verhindert (5), fanden sich in Prostatatumorzellen eine erhöhte ALOX15-Expression (6).

1.3 Lipidmetabolite und Lipidmediatoren

Den von AA abgeleiteten Lipidmediatoren wird überwiegend eine entzündungsfördernde Eigenschaft zugewiesen, während die von EPA und DHA abgeleiteten Lipidmediatoren eine entzündungshemmende Wirkung haben (7).

In den letzten Jahren wurde eine neue Klasse von Omega-3 und Omega-6 Fettsäure stämmigen Lipidmediatoren beschrieben. Über eine einfache Hydroxylierung entstehen Monohydroxy-Lipidmetabolite. Die einfach hydroxylierten Metabolite der AA sind Hydroxyeicosatetraensäuren (HETE). Die Monohydroxy-Produkte der EPA und DHA sind die Hydroxyeicosapentaensäuren (HEPE) beziehungsweise Hydroxydocosahexaensäuren (HDHA). Über weitere Hydroxylierungsschritte werden aus AA Lipoxine sowie aus EPA und DHA Resolvine, Protektine und Maresine metabolisiert, welche als *specialized pro-resolving mediators* (SPMs) zusammengefasst werden (8-12). Studien an unterschiedlichen Krankheitsmodellen haben gezeigt, dass diese Lipidmediatoren aktiv anti-inflammatorisch und resolutionsfördernd an der Beendigung von Entzündungsprozessen beteiligt sind (13). So haben Studien unter anderem eine immunmodulierende sowie eine schmerzlindernde Wirkung, eine Rolle in der Immunabwehr und in der Ischämie/Reperfusion bedingten Endorganschädigung nachgewiesen (14). Die Modulation der Makrophagenfunktion verbunden mit einer gesteigerten Phagozytoseaktivität stellt hierbei ein möglicher Wirkmechanismus dar (15-17).

Eine weitere Klasse von langkettigen mehrfach ungesättigten Fettsäuren stellen die bisher wenig untersuchten Omega-3 und Omega-6 Docosapentaensäure (n-3 und n-6 DPA) dar, welche in Kaltwasserfischen sowie in Algen enthalten sind. In Anbetracht umfangreicher Studien über die Bioaktivität von AA, EPA sowie DHA abgeleiteten Lipidmetaboliten, stellen von Docosapentaensäure abstammende Lipidmetabolite aktuell Gegenstand von Spekulationen dar. Die den Resolvinen strukturell ähnlichen Derivate 17-Hydroxydocosapentaensäure (17-HDPA_n-6) und 10,17-Dihydroxydocosapentaensäure (10,17-HDPA_n-6) leiten sich von Omega-6 Docosapentaensäure ab (18).

1.4 Chronisch entzündliche Darmerkrankungen

Die zwei wichtigen Vertreter der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (CED) sind Morbus Crohn und Colitis ulcerosa. Durch die dysfunktionelle Epithelbarriere in CED kommen immunkompetente Zellen der Lamina propria mucosae mit bakteriellen Antigenen in Kontakt und aktivieren das mukosale Immunsystem (19, 20). Genetische Prädisposition, Umweltfaktoren, das enterale Mikrobiom sowie der Immunstatus des Patienten scheinen zur Entstehung von CED beizutragen (21-24). Aufgrund des frühen Manifestationsalters in der 1. – 3. Dekade stellen CED für die betroffenen Patienten eine lebenslange Erkrankung dar (25). Die Therapie der CED erfolgt bis heute symptomatisch. Eine kausale Therapie ist bisher nicht bekannt, sodass dringend neue präventive Maßnahmen und Therapieansätze benötigt werden.

Dextran Natriumsulfat (DSS) wirkt direkt toxisch auf die Kolonepithelzellen mit resultierend erhöhter Permeabilität der Kolonmukosa und Entwicklung einer intestinalen Inflammation (26), was sich klinisch in blutigen Diarrhoen und Gewichtsverlust manifestiert. Die Resultate ähneln sich dem humane Entzündungsgeschehen, sodass das DSS-Kolitismodell wegen der einfachen Handhabung und der guten Reproduzierbarkeit ein häufig angewandtes und geeignetes Tiermodell der CED darstellt (27).

2 Zielsetzung

Die anti-inflammatorische Wirkung von mehrfach ungesättigten Fettsäuren wurde in diversen experimentellen Krankheitsmodellen unter anderem durch den anti-inflammatorischen und resolutionsfördernden Effekt der von den Fettsäuren abgeleiteten mehrfach hydroxylierten Resolvine, Protectine und Lipoxine erklärt. In den letzten Jahren wurde eine Vielzahl von Lipidmediatoren beschrieben, deren biologische Funktionen und Wirkungsweise weitgehend unbekannt sind. Im Wesentlichen gliedert sich die Arbeit in zwei Fragestellungen, die im Rahmen dieser Dissertationsschrift beantwortet werden sollten:

- 1) Die Charakterisierung des Lipidmetabolitenprofils bestimmter Organe der Maus und die Analyse der Veränderungen der Profile durch Modifikation des Omega-3 Fettsäure Gehaltes in den Organen sowie
- 2) Die Bedeutung von 15-Lipoxygenase und ausgewählten Lipidmetaboliten an einem entzündlichen murinen Krankheitsmodell. Hierfür wurde das akute DSS-induzierte Kolitismodell ausgewählt.

Die Ziele dieser Arbeit waren konkret wie folgt:

- a) Die Analyse der Zusammensetzung von Monohydroxy-Lipidmetaboliten in verschiedenen Organen der C57BL/6 und der transgenen *fat-1* Maus mit endogen erhöhten Omega-3 Fettsäure Spiegel.
- b) Die Analyse des Lipidmetabolitenprofils in verschiedenen Organen der C57BL/6 Maus auf einer Omega-3 Fettsäure angereicherten Diät und die Veränderungen des Profils über einen Fütterungszeitraum bis 45 Tagen. Weiterhin wurden die durch die Diät erzielte Veränderungen des Lipidmetabolitenprofils mit denen der transgenen *fat-1* Maus verglichen.
- c) Die Charakterisierung des anti-inflammatorischen und resolutionsfördernden Effektes von 17-HDPAn-6 und 10,17-HDPAn-6 *in vivo* in der akuten DSS-Kolitis sowie deren Einfluss *in vitro* auf die Phagozytoseaktivität und den Phänotyp von murinen Makrophagenzellen.
- d) Die Untersuchung des Effektes der murinen 15-Lipoxygenase *in vitro* und *in vivo* im DSS-induzierten Kolitis Mausmodell durch systemischen Knockout der murinen 15-Lipoxygenase.

3 Methoden

3.1 Versuchstiere

Für die Versuche der vorliegenden Arbeit wurden heterozygote *fat-1* Mäuse, homozygote *Alox15^{-/-}* Mäuse sowie deren C57BL/6 wildtyp Geschwister verwendet. Die transgene *fat-1* Maus wurde mittels Mikroinjektion des *fat-1* Gens aus *Caenorhabditis elegans* generiert (28). Männliche *fat-1* Mäuse wurden mit weiblichen Mäusen des Inzuchtstamms C57BL/6 rückgekreuzt, um eine genetische und phänotypische Uniformität zu gewährleisten. Die *Alox15^{-/-}* Mäuse wurden mittels konventionellem Knockout generiert und ebenfalls mit Mäusen des Inzuchtstamms C57BL/6 rückgekreuzt, um eine genetische und phänotypische Uniformität zu gewährleisten (29). Der Genotyp der Mäuse wurde mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) bestimmt.

3.2 Induktion des *fat-1* Phänotyps

Wildtyp und *fat-1* Mäuse erhielten für mindestens vier Wochen vor Beginn des Versuches eine Omega-6 Fettsäurereiche aber Omega-3 Fettsäurearme Spezialdiät (AIN-76A, zusätzlich angereichert mit 10% Distelöl; Ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest, Deutschland). Mittels Gaschromatographie wurde der Gehalt an AA, DHA und EPA im Schwanzgewebe der Mäuse bestimmt. Die *fat-1* Mäuse weisen phänotypisch ein kleineres Verhältnis von AA/(EPA+DHA) als bei wildtyp Mäusen auf. Gewebeproben wurden wie in den Publikationen beschrieben zur weiteren Analyse der Fettsäuren- und Lipidmetaboliten Zusammensetzung aufgearbeitet.

3.3 Fütterungsstudie

Weibliche wildtyp und *fat-1* Mäuse im Alter von 9-10 Wochen (n = 6 pro Gruppe) wurden für die Fütterungsstudie benutzt. Wildtyp Mäuse erhielten eine mit Omega-3 Fettsäure angereicherte Diät (1% EPA und 1% DHA in Form von Ethylestern; Ssniff Spezialdiäten GmbH). Wildtyp Mäuse der Kontrollgruppe sowie *fat-1* Mäuse erhielten eine Standarddiät mit einem 10% Fettanteil (E15051, Sonnenblumenöl angereichert mit 0,2 % (w/w) Tocopherol Mix; Ssniff Spezialdiäten GmbH). Die Tiere wurden an Tag 0, 7, 14, 30 und 45 des Fütterungsprotokolls getötet. Gewebeproben wurden wie in den Publikationen beschrieben zur weiteren Analyse der Fettsäuren- und Lipidmetaboliten Zusammensetzung aufgearbeitet.

3.4 Lipidomics-Analytik

Zentraler Bestandteil dieser Arbeit war die Analyse von Fettsäuren und Lipidmetaboliten.

3.4.1 Gaschromatographie (GC)

Der Gehalt von AA, EPA und DHA sowie die Bestimmung des Verhältnisses von AA/(EPA+DHA) wurden mittels GC durchgeführt. Frische Gewebeproben wurden in Flüssigstickstoff schockgefroren und gemörsert. Es erfolgte wie in den Publikationen beschrieben die Lipidextraktion und Fettsäurenmethylierung. Die Fettsäuremethylester wurden mit einem vollautomatischen Hewlett Packard 5890 Gaschromatographiesystem (Hewlett Packard Enterprise, Palo Alto, CA, USA), ausgestattet mit einem Flammenionisationsdetektor, analysiert.

Die erhaltenen Peaks wurden durch Retentionszeiten mit zuvor eingelesenen Fettsäurestandards identifiziert und die Konzentration über die Fläche unter der Kurve bestimmt.

3.4.2 Flüssigchromatographie-Tandem Massenspektrometrie (LC-MS/MS)

Der Lipidmetaboliten und Lipidmediatoren Gehalt in verschiedenen Geweben wurde mittels LC/(ESI)-MS/MS-Technik analysiert. Es erfolgte nach Zusatz eines internen Standards eine Festphasenextraktion an den Proben. Die Analyten wurden mittels eines Elutionsgradienten in einer High Performance Liquid Chromatographie (HPLC)-Säule (Agilent 1200 HPLC-System) von der Probenmatrix chromatographisch separiert. Anschließend wurden die Analyten mit einer Elektronenspray-Ionisationsquelle ionisiert und mittels eines Tandem-Massenspektrometers (MS/MS; Agilent 6460 Triplequad Massenspektrometer, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) detektiert. Die Messungen erfolgten im negativen Ionisierungs-Modus. Die Auswertung durch Integration der erhaltenen Peaks und Quantifizierung mit den entsprechenden Kalibrierkurven erfolgte mit MassHunter Workstation Softwares Quantitative Analysis B.03.01 und Qualitative Analysis B.02.00 von Agilent Technologies.

3.5 DSS-Kolitis und intraperitoneale Behandlung mit Lipidmediatoren

Eine akute Kolitis wurde in weiblichen C57BL/6 sowie Alox15^{-/-} Mäusen im Alter von 8-11 Wochen mittels oraler Gabe von 2% bzw. 2,5% 36-50 kDa Dextran Natriumsulfat (DSS; ICN Biomedicals, Irvine, CA, USA) in Trinkwasser je nach Versuchsprotokoll der vorliegenden Publikationen induziert.

Die Behandlung der Mäuse erfolgte von Tag 0 bis Tag 5 des Versuchsprotokolls mittels intraperitonealer Injektion von 50 µg/kg Körpergewicht 17-HDPA_n-6, 10,17-HDPA_n-6, 17-HDHA oder isotoner Kochsalzlösung.

Die Krankheitsaktivität der Mäuse wurde durch tägliche Dokumentation des Körpergewichts, der Stuhlkonsistenz, das Auftreten von rektaler Blutung sowie der allgemeinen Erscheinung beurteilt (30). Die Schwere der Kolitisaktivität wurde *in vivo* mittels Koloskopie und *ex vivo* durch die Kolonlänge, histologische Untersuchungen (Hämatoxylin-Eosin-Färbung, F4-80 Färbung, ZO-1 Färbung) sowie Genexpressionsanalysen wie dargestellt beurteilt.

3.6 Kolonepithelzellen

CaCo-2 Zellen (ATCC, Rockville, MD, USA) sind adhärenente Zellen, welche nach spontaner Ausdifferenzierung Eigenschaften wie das Dünndarmepithel des Menschen aufweisen. Die CaCo-2 Zellen wurden bei 5% CO₂ und 37° C in MEM (Minimum Essential Medium Eagle; Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) + EBSS (Earle's Balanced Salt Solution; Life Technologies) mit fetalem Kälberserum (FCS, 10%; Biochrom AG, Berlin, Germany), 5 ml/l 100x Natriumpyruvat, 5 ml/l 100x nicht essentielle Aminosäuren, 5 ml/l 100x Glutamin kultiviert.

3.6.1 Inkubation mit DSS oder Lipidmediatoren und deren Einfluss auf den transepithelialen elektrischen Widerstand

Die Zellen wurden in einer Konzentration von 2x10⁵ Zellen auf Transwell-Einsätzen mit einer Polycarbonatmembran in Filter-Kammer-Systemen (Porengröße 3 µm, No. 3402, Corning GmbH, Kaiserslautern, Deutschland) ausgesät und bis zur Ausbildung eines konfluenten Monolayers nach 5 Tagen kultiviert. Danach wurden die Zellen mit Lipidmediatoren (5S-, 12S-, 12R- oder 15S-HETE; Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA) in unterschiedlichen Konzentrationen oder DSS inkubiert. Der transepitheliale elektrische Widerstand wurde jeden zweiten Tag mit einem Millicell-ERS Voltohmmeter (Merck, Darmstadt, Deutschland) in einer Endohm 12 Messkammer gemessen.

3.7 Makrophagen

RAW 264.7 Zellen (ATCC) ist eine durch den Abelson Leukemiavirus transformierte murine Makrophagenzelllinie. Die Raw 264.7 Zellen wurden bei 5% CO₂ und 37° C in DMEM

(Dubecco's modified Eagle medium; Life Technologies) mit 10% FCS, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) kultiviert.

3.7.1 Inkubation mit Lipidmediatoren und deren Einfluss auf den Makrophagen Phänotyp

Die Zellen wurden in einer Konzentration von 5×10^6 Zellen/60 mm Zellkulturplatten ausplattiert und über Nacht in Serum-freiem DMEM kultiviert. Danach wurden die Zellen mit Lipidmediatoren-haltigem Serum-freiem DMEM (je 1 µM 17-HDPAn-6, 10,17-HDPAn-6 oder 17-HDHA) für 6 Stunden inkubiert. Zur Analyse des Makrophagen Phänotyps wurde RNA aus den Zellpellets mittels TRIzol Reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) laut Herstellerangaben isoliert und komplementäre DNA (cDNA) synthetisiert. Die Expression von TNF- α , induzierbarer Stickstoffmonoxid-Synthase (iNOS), IL1 Rezeptor Antagonist, Scavenger Rezeptor Typ A wurde mittels semiquantitativer Echtzeit-PCR wie beschrieben untersucht.

3.7.2 Phagozytose Assay

Die Raw 264.7 Zellen wurden in einer Konzentration von 1×10^5 Zellen/Well in 96-Well Platten ausgesät und über Nacht kultiviert. Nach einer 2-stündigen Prä-Inkubation mit 1 µM 17-HDPAn-6, 10,17-HDPAn-6 oder 17-HDHA wurde die Phagozytose Aktivität durch Inkubation der Zellen mit fluoreszenzgelabelten E. coli K-12 Biopartikeln (Vybrant Phagocytosis Assay, Invitrogen) in einer 1:2 Verdünnung quantifiziert. Die Menge der aufgenommenen Partikeln wurde nach 4 Stunden gemäß Herstellerangaben durch Messung der Fluoreszenz Emission bei 480 nm gemessen.

3.8 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte wie in den Publikationen näher erläutert mit GraphPad Prism (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA). Die Ergebnisse der Studien wurden als Mittelwert \pm SEM angegeben. Das Signifikanzniveau wurde bei $p < 0,05$ festgelegt.

4 Ergebnisse

4.1 Manuskript 1: **Quantitative profiling of hydroxy lipid metabolites in mouse organs reveals distinct lipidomic profiles and modifications due to elevated n-3 fatty acid levels**

4.1.1 Zusammenfassung

In dieser Studie erfolgte mittels LC-MS/MS-Analytik die systematische Quantifizierung der von Omega-3 Fettsäuren DHA und EPA sowie von Omega-6 Fettsäure AA abgeleiteten Monohydroxy-Lipidmetabolite in verschiedenen Organen der C57BL/6 Maus. Weiterhin wurden die Organe der transgenen *fat-1* Maus zur Untersuchung des Einflusses von endogen erhöhten Omega-3 Fettsäure Spiegeln auf das Lipidmetabolitenprofil der jeweiligen Organe analysiert. Die Ergebnisse der Studie weisen auf eine organ- und gewebespezifische Verteilung der untersuchten Monohydroxy-Lipidmetabolite hin.

Ein erhöhter Omega-3 Fettsäurespiegel führte zu einem organ- und gewebespezifischen Anstieg der entsprechenden Lipidmetabolite. 15-HETE dominierte das Lipidmetaboliten Profil in Kolon, Leber, Nieren, Herz und Skelettmuskel, während in der Lunge und Milz 12-HETE überwog. Besonders hervorzuheben ist eine trotz geringer Mengen hocheffiziente Verstoffwechselung der EPA zu hauptsächlich 12-HEPE in der Lunge sowie Milz und 9-HEPE und 18-HEPE in den anderen Organen.

4.1.2 Publikation

Chiu CY, Smyl C, Dogan I, Rothe M, Weylandt KH.

Quantitative Profiling of Hydroxy Lipid Metabolites in Mouse Organs Reveals Distinct Lipidomic Profiles and Modifications Due to Elevated n-3 Fatty Acid Levels. *Biology* (Basel). 2017 Feb 4;6(1).

pii: E9. doi: 10.3390/biology6010009.

4.2 Manuskript 2: **Modulation of the endogenous Omega-3 Fatty Acid and oxylipin profile in vivo – A comparison of the fat-1 transgenic mouse with C57BL/6 wildtype mice on an Omega-3 Fatty Acid enriched diet**

4.2.1 Zusammenfassung

In dieser Studie wurde der Einfluss einer diätätischen Intervention mittels Omega-3 Fettsäure angereichertem Futter auf die Fettsäurespiegel und deren abgeleiteten Lipidmetabolite in verschiedenen Organen der C57BL/6 Maus untersucht. Weiterhin wurden die durch diätätische Intervention erreichte Modulation der Fettsäure- und Lipidmetabolitespiegel mit dem der transgenen *fat-1* Maus verglichen. Fütterung mit einem 1% EPA und 1% DHA angereichertem Futter führte gewebespezifisch zu einem zeitabhängigen Anstieg der Omega-3 Fettsäuren, insbesondere EPA, DHA und n-3 DPA. In allen untersuchten Geweben (Gehirn, Leber, Kolon, Milz, Niere) sowie Blut wurde bereits nach 14 bis 30 Tagen auf dem Omega-3 Fettsäurereichen Futter die höchsten der in dieser Studie dokumentierten Omega-3 Fettsäurespiegel erreicht. Weiterhin konnte mittels Fütterung im Vergleich zum transgenen *fat-1* Mausmodell ein höherer Omega-3 Fettsäurespiegel, insbesondere von EPA, erzielt werden. Im Plasma, Kolon und Gehirn wurden die Oxylipinspiegel bestimmt. Ein erhöhter Omega-3 und erniedrigter Omega-6 Fettsäurespiegel in den Organen hat sich entsprechend in den Lipidmetabolitespiegeln dargestellt, wobei die Veränderungen durch diätätische Intervention ausgeprägter als im transgenen Mausmodell waren. Im Plasma von Mäusen auf

Omega-3 Fettsäure angereichertem Futter wurde das Lipidmetabolitenprofil von LOX und CYP-450 Enzymen synthetisierten Lipidmetaboliten dominiert.

4.2.2 Publikation

Ostermann AI, Waindok P, Schmidt MJ, Chiu CY, Smyl C, Rohwer N, Weylandt KH, Schebb NH.

Modulation of the endogenous Omega-3 Fatty Acid and oxylipin profile in vivo – A comparison of the fat-1 transgenic mouse with C57BL/6 wildtype mice on an Omega-3 Fatty Acid enriched diet. PLoS One. 2017 Sep 8;12(9):e0184470.

doi: 10.1371/journal.pone.0184470. eCollection 2017

4.3 Manuskript 3: **Omega-6 docosapentaenoic acid-derived resolvins and 17-hydroxydocosahexaenoic acid modulate macrophage function and alleviate experimental colitis**

4.3.1 Zusammenfassung

In dieser Studie wurde der anti-inflammatorische und resolutionsfördernde Effekt von der Omega-3 Fettsäure DHA abgeleiteten 17R/S-HDHA und von Omega-6 Fettsäure DPAn-6 synthetisch abgeleiteten 17-HDPAn-6 und 10,17-HDPAn-6 untersucht. Unsere Ergebnisse zeigen eine erhöhte Phagozytose Aktivität von murinen Makrophagen Zellen nach Behandlung mit 17R/S-HDHA, 17-HDPAn-6 sowie 10,17-DHPAn-6. Eine Inkubation mit den Lipidmetaboliten begünstigte die Polarisierung der murinen Makrophagen Zellen in den anti-inflammatorischen M2 Phänotyp. Das anti-inflammatorische Potential der Lipidmetabolite *in vivo* wurde im DSS-induzierten akuten Kolitismodell in C57BL/6 Mäusen untersucht. Eine intraperitoneale Behandlung mit 17R/S-HDHA, 17-HDPAn-6 oder 10,17-HDPAn-6 milderte signifikant die Krankheitsaktivität der DSS-Kolitis ab, welche sich durch eine verminderte Gewichtsabnahme, epitheliale Schäden des Kolongewebes und Makrophageninfiltration zeigte.

Die Ergebnisse dieser Studie weisen auf einen anti-inflammatorischen und resolutionsfördernden Effekt von 17-HDHA, 17-HDPAn-6 und 10,17-HDPAn-6 hin, welche potentiell eine Rolle in der Behandlung von entzündlichen Erkrankungen, wie den entzündlichen Darmerkrankungen, spielen.

4.3.2 Publikation

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

Omega-6 Docosapentaenoic Acid derived Resolvins and 17-Hydroxydocosahexaenoic Acid modulate Macrophage Function and alleviate Experimental Kolitis. Inflammation Research. 2012 May 23

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

4.4 Manuskript 4: **Female mice carrying a defective Alox15 gene are protected from experimental colitis via sustained maintenance of the intestinal epithelial barrier function**

4.4.1 Zusammenfassung

In dieser Studie wurde die pathophysiologische Rolle des Alox15 Genes im DSS-induzierten akuten Kolitismodell untersucht. Unsere Ergebnisse zeigen eine erhöhte Alox15 Expression in wildtyp C57BL/6 Mäusen mit DSS-Kolitis. Eine systemische Inaktivierung des Alox15 Genes (Alox15^{-/-}) war mit einer signifikant milderer Kolitisaktivität und einer erhaltenen Funktion der intestinalen Barriere assoziiert. Dies war begleitet von einer reduzierten Genexpression von TNF- α und iNOS sowie einer erhaltenen Genexpression von Zonula occludens Protein 1 (ZO-1). Weiterhin wurden in Alox15^{-/-} Mäusen mit DSS-Kolitis verminderte 12-HETE Spiegel gemessen. Inkubation von CaCo-2 Zellen mit 12S-HETE induzierte eine Störung der epithelialen Barriere, welches sich durch einen Abfall des transepithelialen elektrischen Widerstandes darstellte.

Die Ergebnisse dieser Studie weisen auf einen protektiven Effekt der systemischen Alox15 Inaktivierung im DSS-Kolitismodell hin, welches durch eine verminderte Synthese von 12-HETE und somit erhaltener intestinaler Barrierefunktion bedingt sein kann.

4.4.2 Publikation

Kroschwald S*, Chiu CY*, Heydeck D, Rohwer N, Gehring T, Seifert U, Lux A, Rothe M, Weylandt KH, Kuhn H. * geteilte Erstautorenschaft

Female mice carrying a defective Alox15 gene are protected from experimental colitis via sustained maintenance of the intestinal epithelial barrier function. *Biochim Biophys Acta*. 2018 Aug;1863(8):866-880.

doi: 10.1016/j.bbaliip.2018.04.019.

5 Diskussion

In diversen experimentellen Krankheitsmodellen wurde ein positiver Effekt von Omega-3 Fettsäuren gezeigt (31-33). Jedoch bleibt die klinische Relevanz von Omega-3 Fettsäuren aufgrund von widersprüchlichen Ergebnissen aus epidemiologischen und Interventionsstudien umstritten (34-38). Weiterhin bleibt der molekulare Wirkmechanismus einzelner Fettsäuren sowie deren Dosis-Wirkungs-Beziehung ungeklärt. Ein möglicher Erklärungsansatz für die anti-inflammatorische Wirkung sind die von den Fettsäuren abgeleiteten hydroxylierten Lipidmetabolite. In der zugrundeliegenden Arbeit wurde der Einfluss eines erhöhten Omega-3 Fettsäure Gehalts auf den Fettsäure- und Lipidmetabolitenprofil untersucht. Weiterhin wurde die Wirksamkeit einzelner Metabolite 12-HETE, 17-HDHA, 17-HDPAn-6 und 10,17-HDPAn-6 sowie die Rolle der murinen 15-Lipoxygenase im Kontext der akuten DSS-Kolitis in der Maus *in vitro* und *in vivo* analysiert.

Zunächst wurde die Lipidmetaboliten Zusammensetzung in verschiedenen Organen der wildtyp Maus durch simultane Analyse einer Vielzahl von Omega-3 und Omega-6 stämmigen Lipidmetaboliten und Lipidmediatoren mittels LC-MS/MS-Technik charakterisiert. Die Messungen weisen auf eine organ- und gewebespezifische Verteilung der untersuchten Lipidmetabolite hin. Zwei unterschiedliche Modelle zur Untersuchung des Einflusses erhöhter Omega-3 Fettsäurespiegel auf das Lipidmediatorenprofil wurden benutzt: Hierbei wurden Organe von transgenen *fat-1* Mäusen sowie wildtyp Mäusen auf einer Omega-3 Fettsäuren angereicherten Diät analysiert. Die beobachteten Veränderungen in der Maus waren ähnlich jedoch ausgeprägter als im Menschen nach EPA und DHA Supplementierung, welches durch geringere Supplementationsdosen im Menschen erklärt werden kann (39-41).

Die Veränderungen in den Fettsäurespiegeln waren durch diätetische Intervention ausgeprägter als im transgenen *fat-1* Mausmodell und erreichten nach 14 bis 30 Tagen auf dem Omega-3 Fettsäurereichen Futter maximale Steady-State Konzentrationen. Die vorliegenden Daten deuten darauf hin, dass Mäuse zur Untersuchung von Krankheitsmodellen vorgefüttert werden müssen, um eine maximale Modulation des Fettsäureprofils zu erzeugen. Es fanden sich signifikant niedrigere EPA (2,7 bis 34-fach) und DHA (bis 3-fach) Konzentrationen in den Blut- und Gewebeproben der *fat-1* Maus als in wildtyp Mäusen auf einer Omega-3 Fettsäurereichen Diät, was durch den genetischen Hintergrund erklärt werden kann. Die transgenen *fat-1* Mäuse exprimieren das *fat-1* Gen des Fadenwurms *Caenorhabditis elegans*, das für eine Omega-3 Desaturase kodiert und die Biosynthese von Omega-3 Fettsäuren aus Omega-6 Fettsäuren ermöglicht (42). Weiterhin können Säugetiere in einem vielstufigen Konversionsprozess EPA in DHA umwandeln, welches die hohen DHA und niedrigen EPA Spiegel in der *fat-1* Maus begründet (43). Ein Vergleich der absoluten Fettsäure- und Lipidmetabolitenspiegel der transgenen *fat-1* Mäuse beider Studie ist aufgrund der unterschiedlichen Diäten eingeschränkt möglich. Im transgenen *fat-1* Mausmodell mit endogen erhöhten Omega-3 Fettsäure Konzentrationen konnte in beiden Studien ein organ- und gewebespezifischer Anstieg der aus den Omega-3 Fettsäuren gebildeten Lipidmetaboliten gezeigt werden. Mögliche Störfaktoren, wie Menge der Nahrungsaufnahme und Dauer der diätetischen Intervention, Beimengungen im Futter, Empfindlichkeit des Futters gegenüber Oxidation, werden im transgenen Mausmodell eliminiert, sodass das *fat-1* Mausmodell eine gute Alternative zur Fütterungsstudie darstellt. Jedoch erlaubt die *fat-1* Maus nicht die Unterscheidung von Effekten einzelner Fettsäuren oder die Untersuchung von konzentrationsabhängigen Effekten in Krankheitsmodellen.

Die Synthese von den Resolvinen strukturell ähnlichen Derivaten 17S-HDPAn-6 und 10,17S-HDPAn-6 aus Omega-6 Docosapentaensäure via Sojabohnen-15-Lipoxygenase wurde zuletzt beschrieben (44). Die anti-inflammatorische Wirkung dieser Lipidmetabolite, die im Carrageenan-induzierten Pfotenödemmodell bei der Ratte gezeigt wurde, konnte in dieser Arbeit in dem akuten DSS-Kolitismodell in der Maus bestätigt werden (18). Ein möglicher Wirkmechanismus ist die erhöhte Phagozytoseaktivität sowie die Polarisierung von Makrophagen in den anti-inflammatorischen M2 Phänotyp nach Inkubation mit den Lipidmetaboliten 17R/S-HDHA, 17-HDPAn-6 und 10,17-HDPAn-6. 17S-HDHA und 17R-HDHA wurden als anti-inflammatorische Lipidmediatoren im Modell des Tetrachlorkohlenstoff-induzierten Leberschadens bzw. DSS-Kolitismodells gezeigt (45, 46). Die Daten der dritten Studie, in welcher der anti-inflammatorische Effekt von 17R/S-HDHA im DSS-Kolitis gezeigt wurde, erweitern den aktuellen Kenntnisstand. Es bleibt der genaue molekulare Wirkmechanismus zu klären.

Lipoxygenasen entfalten ihre biologische Funktion durch die Synthese von bioaktiven Lipidmediatoren wie Prostaglandine, Leukotriene und Lipoxine (2, 3). In der Literatur haben sich zur Rolle der 15-Lipoxygenase teils gegenläufige Wirkungen gefunden. In der vorliegenden Arbeit wiesen Mäuse mit einem systemischen 15-Lipoxygenase Knockout eine signifikant geringere Krankheitsaktivität im akuten DSS-Kolitismodell auf, womit eine pro-inflammatorische Wirkung der 15-Lipoxygenase in diesem Krankheitsmodell gezeigt werden konnte. Ein systemischer 15-Lipoxygenase Knockout war begleitet von einer geringeren Expression von dem pro-inflammatorischen Zytokin TNF- α und iNOS sowie einer erhaltenen intestinalen Barriere. Diese Beobachtung steht im Gegensatz zu dem zuvor beschriebenen stabilisierenden Effekt von 15-HETE, dem Hauptprodukt der humanen 15-Lipoxygenase, auf die intestinale Barriere. Die Expression von Tight Junction Proteinen wird durch 15-HETE im gesunden menschlichen Darm hochreguliert und wirkt in Darmentzündungen einem Verlust der intestinalen Barrierefunktion entgegen (47). Der gegensätzliche Effekt kann möglicherweise durch die unterschiedliche Reaktionsspezifität dieser orthologen Enzyme erklärt werden. Während die humane 15-Lipoxygenase hauptsächlich Arachidonsäure zu 15-H(p)ETE verstoffwechselt, wird Arachidonsäure durch die 15-Lipoxygenase der Maus, ein 12-lipoxygenierendes Enzym, vorrangig zu 12-H(p)ETE verstoffwechselt (29). Inkubation von CaCo-2 Zellen mit 12S-HETE induzierte eine dosisabhängige Undichtigkeit der epithelialen Barriere *in vitro*. Diese Beobachtung steht im Einklang mit erhöhten 12-HETE Spiegeln in wildtyp Mäusen mit akuter DSS-Kolitis sowie dem beschriebenen protektiven Effekt der systemischen Alox15 Inaktivierung. Jedoch konnte hier im *in vitro* Modell in den untersuchten Konzentrationen für 15S-HETE kein Effekt auf den transepithelialen elektrischen Widerstand nachgewiesen werden.

Die von uns angewandte Analysemethode weist eine hohe Spezifität in geringen Konzentrationsbereichen, eine hohe Empfindlichkeit sowie eine gute Reproduzierbarkeit bei gleichzeitig geringen Probenvorbereitungs- sowie Messzeitaufwand auf, sodass diese als Routine-Messverfahren im klinischen Alltag eingesetzt werden kann. In den hier untersuchten Proben von gesunden Mäusen sowie Mäusen mit akuter DSS-Kolitis waren Resolvine sowie Lipoxine unterhalb der Nachweisbarkeitsgrenze. Die Vorstufen für die Resolvine 17-HDHA und 18-HEPE konnten jedoch detektiert werden und könnten perspektivisch als Indikatorsubstanzen für die Bildung anti-inflammatorischer Resolvine genutzt werden. Eine weitere Limitation des hier angewandten Messprotokolls in LC-MS/MS-Technik ist die Analyse beider Enantiomere des jeweiligen Lipidmetabolits, welches eine Unterscheidung der Stereoisomere nicht erlaubt. Die durchgeführten Messungen aus Gewebehomogenaten erlauben die Analyse der totalen Menge der Fettsäure bzw. des Lipidmetaboliten. In den nächsten Schritten wird nun zu klären sein, inwiefern die Fettsäuren und Lipidmetabolite in

den verschiedenen Lipid- und Proteinklassen aufgeteilt sind. Weiterhin bleibt der zugrundeliegende Mechanismus der Lipidmetaboliten Entstehung, d.h. enzymatische oder autooxidative De-novo Synthese bzw. die Freisetzung von vorgeformten Metaboliten aus Phospholipiden, zu klären. Unabhängig davon konnte die LC-MS/MS-Technik als sinnvolle und technisch robuste Messmethode im Feld der Lipidforschung bestätigt werden.

6 Referenzen

1. Calder PC. Functional Roles of Fatty Acids and Their Effects on Human Health. *JPEN J Parenter Enteral Nutr.* 2015;39(1 Suppl):18S-32S.
2. Serhan CN, Chiang N. Resolution phase lipid mediators of inflammation: agonists of resolution. *Curr Opin Pharmacol.* 2013;13(4):632-40.
3. Rådmark O, Werz O, Steinhilber D, Samuelsson B. 5-Lipoxygenase, a key enzyme for leukotriene biosynthesis in health and disease. *Biochim Biophys Acta.* 2015;1851(4):331-9.
4. Funk CD, Chen XS, Johnson EN, Zhao L. Lipoxygenase genes and their targeted disruption. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 2002;68-69:303-12.
5. Wu Y, Fang B, Yang XQ, Wang L, Chen D, Krasnykh V, Carter BZ, Morris JS, Shureiqi I. Therapeutic Molecular Targeting of 15-Lipoxygenase-1 in Colon Cancer. *Mol Ther.* 2008;16(5):886-92.
6. Shappell SB, Olson SJ, Hannah SE, Manning S, Roberts RL, Masumori N, Jisaka M, Boeglin WE, Vader V, Dave DS, Shook MF, Thomas TZ, Funk CD, Brash AR, Matusik RJ. Elevated expression of 12/15-lipoxygenase and cyclooxygenase-2 in a transgenic mouse model of prostate carcinoma. *Cancer Res.* 2003;63(9):2256-67.
7. Weylandt KH, Kang JX. Rethinking lipid mediators. *Lancet.* 2005;366(9486):618-20.
8. Serhan CN, Hong S, Gronert K, Colgan SP, Devchand PR, Mirick G, Moussignac RL. Resolvins: a family of bioactive products of omega-3 fatty acid transformation circuits initiated by aspirin treatment that counter proinflammation signals. *J Exp Med.* 2002;196(8):1025-37.
9. Serhan CN, Hamberg M, Samuelsson B. Lipoxins: novel series of biologically active compounds formed from arachidonic acid in human leukocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1984;81(17):5335-9.
10. Serhan CN, Clish CB, Brannon J, Colgan SP, Chiang N, Gronert K. Novel functional sets of lipid-derived mediators with antiinflammatory actions generated from omega-3 fatty acids via cyclooxygenase 2-nonsteroidal antiinflammatory drugs and transcellular processing. *J Exp Med.* 2000;192(8):1197-204.
11. Mukherjee PK, Marcheselli VL, Serhan CN, Bazan NG. Neuroprotectin D1: a docosahexaenoic acid-derived docosatriene protects human retinal pigment epithelial cells from oxidative stress. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101(22):8491-6.
12. Serhan CN, Yang R, Martinod K, Kasuga K, Pillai PS, Porter TF, Oh SF, Spite M. Maresins: novel macrophage mediators with potent antiinflammatory and proresolving actions. *J Exp Med.* 2009;206(1):15-23.
13. Schwab JM, Chiang N, Arita M, Serhan CN. Resolvin E1 and protectin D1 activate inflammation-resolution programmes. *Nature.* 2007;447(7146):869-74.
14. Serhan CN. Pro-resolving lipid mediators are leads for resolution physiology. *Nature.* 2014;510(7503):92-101.
15. Chiang N, Dalli J, Colas RA, Serhan CN. Identification of resolvin D2 receptor mediating resolution of infections and organ protection. *J Exp Med.* 2015;212(8):1203-17.
16. Titos E, Rius B, González-Pérez A, López-Vicario C, Morán-Salvador E, Martínez-Clemente M, Arroyo V, Clària J. Resolvin D1 and its precursor docosahexaenoic acid promote resolution of adipose tissue inflammation by eliciting macrophage polarization toward an M2-like phenotype. *J Immunol.* 2011;187(10):5408-18.
17. Schif-Zuck S, Gross N, Assi S, Rostoker R, Serhan CN, Ariel A. Saturated-efferocytosis generates pro-resolving CD11b low macrophages: modulation by resolvins and glucocorticoids. *Eur J Immunol.* 2011;41(2):366-79.
18. Dangi B, Obeng M, Nauroth JM, Teymourlouei M, Needham M, Raman K, Arterburn LM. Biogenic synthesis, purification, and chemical characterization of anti-inflammatory

- resolvins derived from docosapentaenoic acid (DPA_n-6). *J Biol Chem*. 2009;284(22):14744-59.
19. Suzuki T. Regulation of intestinal epithelial permeability by tight junctions. *Cell Mol Life Sci*. 2013;70(4):631-59.
 20. Chiodini RJ, Dowd SE, Galandiuk S, Davis B, Glassing A. The predominant site of bacterial translocation across the intestinal mucosal barrier occurs at the advancing disease margin in Crohn's disease. *Microbiology*. 2016;162(9):1608-19.
 21. Bonen DK, Cho JH. The genetics of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*. 2003;124(2):521-36.
 22. Xavier RJ, Podolsky DK. Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature*. 2007;448(7152):427-34.
 23. Goto Y, Kurashima Y, Kiyono H. The gut microbiota and inflammatory bowel disease. *Curr Opin Rheumatol*. 2015;27(4):388-96.
 24. Baumgart DC, Carding SR. Inflammatory bowel disease: cause and immunobiology. *Lancet*. 2007;369(9573):1627-40.
 25. Kaplan GG. The global burden of IBD: from 2015 to 2025. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2015;12(12):720-7.
 26. Poritz LS, Garver KI, Green C, Fitzpatrick L, Ruggiero F, Koltun WA. Loss of the tight junction protein ZO-1 in dextran sulfate sodium induced colitis. *J Surg Res*. 2007;140(1):12-9.
 27. Hoffmann JC, Pawlowski NN, Kühl AA, Höhne W, Zeitz M. Animal models of inflammatory bowel disease: an overview. *Pathobiology*. 2002;70(3):121-30.
 28. Kang JX, Wang J, Wu L, Kang ZB. Transgenic mice: fat-1 mice convert n-6 to n-3 fatty acids. *Nature*. 2004;427(6974):504.
 29. Sun D, Funk CD. Disruption of 12/15-lipoxygenase expression in peritoneal macrophages. Enhanced utilization of the 5-lipoxygenase pathway and diminished oxidation of low density lipoprotein. *J Biol Chem*. 1996;271(39):24055-62.
 30. Friedman DJ, Künzli BM, A-Rahim YI, Sevigny J, Berberat PO, Enyoji K, Csizmadia E, Friess H, Robson SC. From the Cover: CD39 deletion exacerbates experimental murine colitis and human polymorphisms increase susceptibility to inflammatory bowel disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(39):16788-93.
 31. Hudert CA, Weylandt KH, Lu Y, Wang J, Hong S, Dignass A, Serhan CN, Kang JX. Transgenic mice rich in endogenous omega-3 fatty acids are protected from colitis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(30):11276-81.
 32. Li J, Li FR, Wei D, Jia W, Kang JX, Stefanovic-Racic M, Dai Y, Zhao AZ. Endogenous ω -3 polyunsaturated fatty acid production confers resistance to obesity, dyslipidemia, and diabetes in mice. *Mol Endocrinol*. 2014;28(8):1316-28.
 33. González-Pérez A, Horrillo R, Ferré N, Gronert K, Dong B, Morán-Salvador E, Titos E, Martínez-Clemente M, López-Parra M, Arroyo V, Clària J. Obesity-induced insulin resistance and hepatic steatosis are alleviated by omega-3 fatty acids: a role for resolvins and protectins. *FASEB J*. 2009;23(6):1946-57.
 34. Aung T, Halsey J, Kromhout D, Gerstein HC, Marchioli R, Tavazzi L, Geleijnse JM, Rauch B, Ness A, Galan P, Chew EY, Bosch J, Collins R, Lewington S, Armitage J, Clarke R, Collaboration O-TT. Associations of Omega-3 Fatty Acid Supplement Use With Cardiovascular Disease Risks: Meta-analysis of 10 Trials Involving 77 917 Individuals. *JAMA Cardiol*. 2018;3(3):225-34.
 35. Park Y, Lee A, Shim SC, Lee JH, Choe JY, Ahn H, Choi CB, Sung YK, Bae SC. Effect of n-3 polyunsaturated fatty acid supplementation in patients with rheumatoid arthritis: a 16-week randomized, double-blind, placebo-controlled, parallel-design multicenter study in Korea. *J Nutr Biochem*. 2013;24(7):1367-72.

36. Mozaffarian D, Wu JH, de Oliveira Otto MC, Sandesara CM, Metcalf RG, Latini R, Libby P, Lombardi F, O'Gara PT, Page RL, Silletta MG, Tavazzi L, Marchioli R. Fish oil and post-operative atrial fibrillation: a meta-analysis of randomized controlled trials. *J Am Coll Cardiol*. 2013;61(21):2194-6.
37. Feagan BG, Sandborn WJ, Mittmann U, Bar-Meir S, D'Haens G, Bradette M, Cohen A, Dallaire C, Ponich TP, McDonald JW, Hébuterne X, Paré P, Klvana P, Niv Y, Ardizzone S, Alexeeva O, Rostom A, Kiudelis G, Spleiss J, Gilgen D, Vandervoort MK, Wong CJ, Zou GY, Donner A, Rutgeerts P. Omega-3 free fatty acids for the maintenance of remission in Crohn disease: the EPIC Randomized Controlled Trials. *JAMA*. 2008;299(14):1690-7.
38. Brasky TM, Darke AK, Song X, Tangen CM, Goodman PJ, Thompson IM, Meyskens FL, Goodman GE, Minasian LM, Parnes HL, Klein EA, Kristal AR. Plasma phospholipid fatty acids and prostate cancer risk in the SELECT trial. *J Natl Cancer Inst*. 2013;105(15):1132-41.
39. Schuchardt JP, Schmidt S, Kressel G, Willenberg I, Hammock BD, Hahn A, Schebb NH. Modulation of blood oxylipin levels by long-chain omega-3 fatty acid supplementation in hyper- and normolipidemic men. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 2014;90(2-3):27-37.
40. Schebb NH, Ostermann AI, Yang J, Hammock BD, Hahn A, Schuchardt JP. Comparison of the effects of long-chain omega-3 fatty acid supplementation on plasma levels of free and esterified oxylipins. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*. 2014;113-115:21-9.
41. Keenan AH, Pedersen TL, Fillaus K, Larson MK, Shearer GC, Newman JW. Basal omega-3 fatty acid status affects fatty acid and oxylipin responses to high-dose n3-HUFA in healthy volunteers. *J Lipid Res*. 2012;53(8):1662-9.
42. Watts JL, Browse J. Genetic dissection of polyunsaturated fatty acid synthesis in *Caenorhabditis elegans*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(9):5854-9.
43. Burdge GC, Calder PC. Conversion of alpha-linolenic acid to longer-chain polyunsaturated fatty acids in human adults. *Reprod Nutr Dev*. 2005;45(5):581-97.
44. Dangi B, Obeng M, Nauroth JM, Chung G, Bailey-Hall E, Hallenbeck T, Arterburn LM. Metabolism and biological production of resolvins derived from docosapentaenoic acid (DPA_n-6). *Biochem Pharmacol*. 2010;79(2):251-60.
45. González-Pérez A, Planagumà A, Gronert K, Miquel R, López-Parra M, Titos E, Horrillo R, Ferré N, Deulofeu R, Arroyo V, Rodés J, Clària J. Docosahexaenoic acid (DHA) blunts liver injury by conversion to protective lipid mediators: protectin D1 and 17S-hydroxy-DHA. *FASEB J*. 2006;20(14):2537-9.
46. Bento AF, Claudino RF, Dutra RC, Marcon R, Calixto JB. Omega-3 fatty acid-derived mediators 17(R)-hydroxy docosahexaenoic acid, aspirin-triggered resolvin D1 and resolvin D2 prevent experimental colitis in mice. *J Immunol*. 2011;187(4):1957-69.
47. Pochard C, Coquenlorge S, Jaulin J, Cenac N, Vergnolle N, Meurette G, Freyssinet M, Neunlist M, Rolli-Derkinderen M. Defects in 15-HETE Production and Control of Epithelial Permeability by Human Enteric Glial Cells From Patients With Crohn's Disease. *Gastroenterology*. 2016;150(1):168-80.

7 Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Cheng-Ying Chiu, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „**Untersuchungen zum Einfluss eines erhöhten Omega-3 Fettsäure Gehaltes auf das Lipidmediatorenprofil und zum anti-inflammatorischen Potential der murinen 15-Lipoxygenase, 17-Hydroxydocosapentaensäure und 10,17-Dihydroxydocosapentaensäure**“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

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

Meine Anteile an den ausgewählten Publikationen entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet. Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

Anteilerklärung an den erfolgten Publikationen

Cheng-Ying Chiu hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

Publikation 1:

Autoren: Chiu CY, Smyl C, Dogan I, Rothe M, Weylandt KH.

Titel: Quantitative profiling of hydroxylated lipid metabolites in mouse organs reveals distinct lipidomic profiles and modifications due to elevated n-3 fatty acid levels

Zeitschrift: Biology

Jahr: 2017

Beitrag im Einzelnen:

Beteiligung an Konzeptionierung und Planung der Versuche, Gewinnung und Bearbeitung der Proben, statistische Auswertung und Anfertigung aller Abbildungen, Verfassen von wesentlichen Teilen des Manuskripts

Publikation 2:

Autoren: Ostermann AI, Waindok P, Schmidt MJ, Chiu CY, Smyl C, Rohwer N, Weylandt KH, Schebb NH.

Titel: Modulation of the endogenous Omega-3 Fatty Acid and oxylipin profile in vivo – A comparison of the fat-1 transgenic mouse with C57BL/6 wildtype mice on an Omega-3 Fatty Acid enriched diet

Zeitschrift: PLoS One

Jahr: 2017

Beitrag im Einzelnen: Beteiligung an Planung der Versuche, Gewinnung und Bearbeitung der Proben, Korrektur des Manuskripts

Publikation 3:

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

*geteilte Erstautorenschaft

Titel: Omega-6 docosapentaenoic acid-derived resolvins and 17-hydroxydocosahexaenoic acid modulate macrophage function and alleviate experimental colitis

Zeitschrift: Inflammation Research

Jahr: 2012

Beitrag im Einzelnen: Beteiligung an Konzeptionierung und Planung der Versuche, Durchführung der zellexperimentellen Versuche (Abbildung 1), Analyse und statistische Auswertung aller Versuche, Anfertigung von Abbildung 1-5, Verfassen von wesentlichen Teilen des Manuskripts

Publikation 4:

Autoren: Kroschwald S*, Chiu CY*, Heydeck D, Rohwer N, Gehring T, Seifert U, Lux A, Rothe M, Weylandt KH, Kuhn H. * geteilte Erstautorenschaft

Titel: Female mice carrying a defective Alox15 gene are protected from experimental colitis via sustained maintenance of the intestinal epithelial barrier function

Zeitschrift: Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids

Jahr: 2018

Beitrag im Einzelnen: Beteiligung an Konzeptionierung und Planung der Versuche, Durchführung der tierexperimentellen Versuche für Abbildung 1, 2, 4-7, statistische Auswertung und Anfertigung der Abbildungen 1, 2, 4-8, Verfassen von wesentlichen Teilen des Manuskripts

Unterschrift, Datum und Stempel des betreuenden Hochschullehrers

Unterschrift der Doktorandin

8 Druckexemplare der ausgewählten Publikationen

8.1 Publikation 1

Quantitative profiling of hydroxylated lipid metabolites in mouse organs reveals distinct lipidomic profiles and modifications due to elevated n-3 fatty acid levels

Chiu CY, Smyl C, Dogan I, Rothe M, Weylandt KH.

Biology (Basel). 2017 Feb 4;6(1). pii: E9. doi:

<https://doi.org/10.3390/biology6010009>

8.2 Publikation 2

Modulation of the endogenous Omega-3 Fatty Acid and oxylipin profile in vivo – A comparison of the fat-1 transgenic mouse with C57BL/6 wildtype mice on an Omega-3 Fatty Acid enriched diet

Ostermann AI, Waindok P, Schmidt MJ, Chiu CY, Smyl C, Rohwer N, Weylandt KH, Schebb NH.

PLoS One. 2017 Sep 8;12(9):e0184470. eCollection 2017. doi:

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0184470>

8.3 Publikation 3

Omega-6 docosapentaenoic acid-derived resolvins and 17-hydroxydocosahexaenoic acid modulate macrophage function and alleviate experimental colitis

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

Inflamm Res. 2012 Sep;61(9):967-76. Epub 2012 May 23. Erratum in: Inflamm Res. 2012 Nov;61(11):1293. doi:

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

8.4 Publikation 4

Female mice carrying a defective Alox15 gene are protected from experimental colitis via sustained maintenance of the intestinal epithelial barrier function

Kroschwald S*, Chiu CY*, Heydeck D, Rohwer N, Gehring T, Seifert U, Lux A, Rothe M, Weylandt KH, Kuhn H. * geteilte Erstautorenschaft

Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids. 2018 Aug;1863(8):866-880. Epub 2018 Apr 24.
doi:

<https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2018.04.019>

9 Lebenslauf

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

10 Komplette Publikationsliste

Female mice carrying a defective *Alox15* gene are protected from experimental colitis via sustained maintenance of the intestinal epithelial barrier function

Kroschwald S*, Chiu CY*, Heydeck D, Rohwer N, Gehring T, Seifert U, Lux A, Rothe M, Weylandt KH, Kuhn H. * geteilte Erstautorenschaft
Biochim Biophys Acta. 2018 Apr 24. pii: S1388-1981(18)30084-2. doi: 10.1016/j.bbaliip.2018.04.019.
Impact Factor: 4,966

Modulation of the endogenous Omega-3 Fatty Acid and oxylipin profile in vivo – A comparison of the fat-1 transgenic mouse with C57BL/6 wildtype mice on an Omega-3 Fatty Acid enriched diet

Ostermann AI, Waindok P, Schmidt MJ, Chiu CY, Smyl C, Rohwer N, Weylandt KH, Schebb NH.
PLoS One. 2017 Sep 8;12(9):e0184470. doi: 10.1371/journal.pone.0184470. eCollection 2017
Impact Factor: 2,766

Quantitative profiling of hydroxylated lipid metabolites in mouse organs reveals distinct lipidomic profiles and modifications due to elevated n-3 fatty acid levels

Chiu CY, Smyl C, Dogan I, Rothe M, Weylandt KH.
Biology (Basel). 2017 Feb 4;6(1).

Omega-6 docosapentaenoic acid-derived resolvins and 17-hydroxydocosaheptaenoic acid modulate macrophage function and alleviate experimental colitis

Chiu CY*, Gomolka B*, Dierkes C, Huang NR, Schroeder M, Purschke M, Manstein D, Dangi B, Weylandt KH. * geteilte Erstautorenschaft
Inflammation Research 2012 Sep;61(9):967-76.
Impact Factor: 1,964

Omega-3 fatty acids and their lipid mediators: towards an understanding of resolvins and protectin formation

Weylandt KH, Chiu CY, Gomolka B, Waechter SF, Wiedenmann B.
Prostaglandins & Other Lipid Mediators 2012 Mar;97(3-4):73-82.
Impact Factor: 2,422

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

Weylandt KH*, Krause LF*, Gomolka B, Chiu CY, Bilal S, Nadolny A, Waechter SF, Fischer A, Rothe M, Kang JX. * geteilte Erstautorenschaft
Carcinogenesis 2011 Jun;32(6):897-903.
Impact Factor: 5,702

11 Danksagung

Die vorliegende Dissertation wurde in der Klinik mit Schwerpunkt Hepatologie und Gastroenterologie Campus Virchow-Klinikum bei Herrn PD Dr. Dr. Karsten-Henrich Weylandt erstellt. Vielen Dank, Karsten, für die stetige Begleitung und Unterstützung. Dein mir entgegen gebrachtes Vertrauen sowie dein stetes Fordern und Fördern hat diese Arbeit ermöglicht.

Ferner danke ich Ines Eichhorn, Dr. Nadine Rohwer, Dr. Kathrin Keeren, Dr. Beate Gommelka, Saskia Kroschwald und Dr. Vanessa Lembke als meine langjährigen Weggefährten im Labor und im Studium. Ohne euch wäre der Laboralltag nur halb so schön gewesen.

Herrn Dr. Michael Rothe und Frau Inci Dogan danke ich für die unermüdliche Unterstützung bei der Durchführung der LC(ESI)MS/MS-Analytik. Herrn Dr. Andreas Fischer danke ich für die Geduld bei der Einarbeitung und die aufmunternden Worte.

Für die unkomplizierte Aufnahme in Boston und regen wissenschaftlichen Austausch danke ich Prof. Dr. Jing X. Kang und Dr. Martin Purschke.

Zuletzt möchte ich meiner Familie, insbesondere meinen Eltern, für den Rückhalt danken.