

Aus dem Institut für Anatomie II
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktorin: Univ.-Prof. Dr. Charlotte von Gall

Einfluss von Dauerlicht auf die Expression von Inflammasomen und
ihrer Bestandteile im Hippocampus

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin der Medizinischen
Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Vorgelegt von
Pikria Ketelauri

2022

Als Inauguraldissertation gedruckt mit der Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
gez.:

Dekan: Prof. Dr. Nikolaj Klöcker

Erstgutachterin: Univ.-Prof. Dr. Charlotte von Gall

Zweitgutachter: Prof. Dr. Philipp Lang

*Gewidmet ist diese Arbeit meinen Eltern, meinem Bruder und meinem
Verlobten, die all die Jahre an mich geglaubt haben*

Zusammenfassung

Viele rhythmische Körperfunktionen werden durch das zirkadiane System koordiniert. Eine Chronodisruption bezeichnet eine Störung des zirkadianen Systems, die schädliche Auswirkungen auf die Gesundheit haben kann. Es wird vermutet, dass Chronodisruption zu einer Dysregulation des Immunsystems führt und damit direkt zur Pathogenese der neurodegenerativen Veränderungen beiträgt. Gestörte zirkadiane Rhythmen im zentralen Nervensystem (ZNS) können u. a. zu einer Beeinträchtigung der Hippocampusfunktion führen. Die Rolle von Pattern-Recognition-Rezeptoren (PRR) in diesem Prozess wird intensiv diskutiert. Zu den bekanntesten PRRs gehören NOD-like-Rezeptore (NLRs), welche wichtige Bestandteile von Inflammasomen sind. Inflammasome stellen intrazelluläre Proteinkomplexe dar, die nach Aktivierung die Produktion und Freisetzung der pro-inflammatorischen Zytokine vermitteln. Sie wurden bereits bei einigen neurodegenerativen Erkrankungen beschrieben, die auch chronodisruptive Begleitsymptome aufweisen.

In unserer Studie wurde die Hypothese überprüft, dass eine akute Chronodisruption infolge von Dauerlicht (LL) für zwei Wochen, Komponenten des angeborenen Immunsystems im Hippocampus von C57BL/6J Mäusen aktiviert. Zunächst wurde der Allgemeinzustand und das Differentialblutbild untersucht. LL hatten keinen Einfluss auf den Allgemeinzustand inklusive Körpergewicht und auf das Differentialblutbild. Mittels Immunhistochemie wurden Astrozyten und Mikroglia gefärbt und analysiert, um die Auswirkung von LL auf Gliazellen zu untersuchen. Es konnte keine Astroglieose induziert werden, jedoch wurde signifikant erhöhte Fluoreszenzintensität von Mikroglia in LL-Gruppe beobachtet. Anschließend wurde mittels quantitativer real-time Polymerase-Kettenreaktion und Western Blot die Expression der folgenden Inflammasomen auf Messenger-RNA- und Proteinebene untersucht: NLRP1b, NLRP3, NLRC4, Absent in melanoma-2 (AIM2) und deren Komponenten - Apoptosis-associated speck-like Protein containing a CARD (ASC), Caspase-1 (Casp1) sowie Interleukine (IL) - IL-1 β , IL-18. Die Genexpression von aktiver *Casp1* und *AIM2* war in LL-Mäusen signifikant reduziert. Im Gegensatz dazu war die Proteinexpression von Casp1 in der LL-Gruppe signifikant erhöht.

Dauerlicht, welche 14 Tage lang anhielt, führte in unserer Studie zu keiner relevanten Inflammation im Maus-Hippocampus, dennoch zu nachweisbaren prä-inflammatorischen Veränderungen. Um weitere Erkenntnisse darüber zu gewinnen, wie eine chronische Chronodisruption auf die Komponenten des angeborenen Immunsystems auswirkt, sind Studien notwendig, in denen Versuchstiere über einen längeren Zeitraum dem Dauerlicht ausgesetzt werden.

Summary

Many rhythmic body functions are coordinated by the circadian system. Chronodisruption refers to a disruption of the circadian system that can have detrimental effects on health. Chronodisruption is thought to lead to dysregulation of the immune system, contributing directly to the pathogenesis of neurodegenerative changes. Disturbed circadian rhythms in the central nervous system (CNS) can lead, among other things, to impaired hippocampal function. The role of pattern recognition receptors (PRRs) in this process is intensively discussed. The best-known PRRs include NOD-like receptors (NLRs), which are important components of inflammasomes. Inflammasomes represent intracellular protein complexes that mediate the production and release of pro-inflammatory cytokines after activation. They have already been described in some neurodegenerative diseases, which also show chronodisruptive concomitant symptoms.

In our study, we tested the hypothesis that acute chronodisruption due to constant light (LL) for 14 days, activates components of the innate immune system in the hippocampus of C57BL/6J mice. First, general condition and differential blood count were examined. LL had no effect on the general condition including body weight and on the differential blood count. Astrocytes and microglia were stained and analysed by immunohistochemistry to investigate the effect of LL on glial cells. No astrogliosis could be induced, but significantly increased fluorescence intensity of microglia was observed in LL-group. Subsequently, quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR) and Western blot were used to investigate the expression of the following inflammasomes at messenger RNA and protein levels: NLRP1b, NLRP3, NLRC4, Absent in melanoma-2 (AIM2) and their components - Apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD (ASC), Caspase-1 (Casp1) and Interleukins (IL) - IL-1 β , IL-18. Gene expression of active *Casp1* and *AIM2* was significantly reduced in LL mice. In contrast, protein expression of Casp1 was significantly increased in the LL group.

Constant light, which lasted for 14 days, did not cause any relevant inflammation in the mouse hippocampus in our study, but nevertheless led to detectable pre-inflammatory changes. To gain further insights into how chronic chronodisruption affects the components of the innate immune system, studies are needed in which experimental animals are exposed to continuous light over a longer period of time.

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AD	Alzheimer's Disease
AIM2	Absent in melanoma-2
ALS	Amyotrophe Lateralsklerose
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ASC	Apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD
ATP	Adenosintriphosphat
Aβ	Amyloid- β
BCA	Bicinchoninsäure
BMAL	Brain and muscle ARNT-like
BSA	Bovine serum albumin
CARD	Caspase recruitment domain
Casp1	Caspase-1
CD	Chronodisruption
CDL	CARD-domain linker
cDNA	Complementary DNA
CLOCK	Circadian locomotor output cycles kaput
COP	CARD only protein
CRP	C-reaktives Protein
CRY	Cryptosome
d. h.	das heißt
DAMP	Damage-associated molecular pattern
DD	Beleuchtungsperiode mit 24 Stunden Dunkelheit
DNA	Deoxyribonucleic acid
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
etc.	et cetera
FCS	Fetal calf serum
FFT	Fast Fourier transform
FIIND	Function-to-Find-Domain

GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GFAP	Glial fibrillary acid protein
HD	Huntington's Disease
HPRT	Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase
HSP90	Hitzeschockprotein 90
IARC	International Agency for Research on Cancer
IBA1	Ionized calcium binding adaptor molecule-1
IDL	Interdomain linker
IF	Immunfluoreszenz
IGF-1	Insulin-like growth factor-1
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
IFNγ	Interferon- γ
kDa	Kilodalton
LANUV	Landesamts für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz
LD	Beleuchtungsperiode mit 12 Stunden Licht und 12 Stunden Dunkelheit
LL	Beleuchtungsperiode mit 24 Stunden Dauerlicht
LPS	Lipopolysaccharid
LRR	Leucin rich repeat
MFI	Mean fluorescence intensity
M-MLV-RT	Moloney Murine Leukämie Virus Reverse Transkriptase
mRNA	Messenger RNA
MS	Multiple Sklerose
NF-κB	Nuclear factor-kappa B
NK	Natural killer
NLR	Nod-like Rezeptor
NLRC	Nod-like receptor containing CARD
NLRP	Nod-like receptor containing PYD
NOD	Nucleotide-binding oligomerization
PAD	Protein-arginin-deiminase
PAMP	Pathogen-associated molecular patterns
PBS	Phosphate-buffered-saline
pCasp1	Pro-Caspase1
PCR	Real-Time polymerase chain reaction

PD	Parkinson's Disease
PER	Period
PFA	Paraformaldehyd
POP	PYD only protein
PRR	Pattern recognition receptor
PTM	Posttranslationale Modifikation
PVDF	Polyvinylidenfluorid
PYD	Pyrin domain
qRT-PCR	Quantitative real-time Polymerase-Kettenreaktion
RHT	Tractus retinohypothalamicus
RIPA	Radioimmunoprecipitation assay
RNA	Ribonucleicacid
ROS	Reactive oxygen species
rpm	Rounds per minute
RT	Raumtemperatur
SCN	Nucleus suprachiasmaticus
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SEM	Standardfehler
SNP	Single-Nukleotid-Polymorphismus
Tab.	Tabelle
TBS	Tris-buffered-saline
TBST	Tris-buffered-saline-tween20
TEB	Tris-EDTA-BSA
Temed	N, N, N', N'-Tetramethylethylenediamine
TierSchG	Tierschutzgesetzes
TLR	Toll-like receptor
TNF-α	Tumor necrosis factor
UV	Ultraviolett
v. a.	vor allem
WB	Western Blot
z. B.	zum Beispiel
ZETT	Zentralen Einrichtung für Tierforschung und Tierschutzaufgaben

SI-Einheiten

%	Prozent
°C	Grad Celsius
g	Gramm
h	Hora
lx	Lux
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
μl	Mikroliter
μg	Mikrogramm
μm	Mikrometer
rpm	Revolutions per minute
sec	Sekunde
V	Volt
W	Watt
xg	relative Zentrifugenkraft

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
1.1	ZIRKADIANES SYSTEM	1
1.2	CHRONODISRUPTION	3
1.2.1	<i>Definition.....</i>	3
1.2.2	<i>Künstliches Licht.....</i>	5
1.2.3	<i>Einfluss der Chronodisruption auf die Gesundheit.....</i>	6
1.2.4	<i>Einfluss von Chronodisruption auf das ZNS.....</i>	8
1.3	CHRONOIMMUNOLOGIE.....	10
1.3.1	<i>Das Immunsystem.....</i>	10
1.3.2	<i>Zirkadiane Rhythmen im Immunsystem.....</i>	11
1.3.3	<i>Chronodisruption und Immunsystem.....</i>	12
1.4	GLIAZELLEN	13
1.4.1	<i>Mikroglia.....</i>	13
1.4.2	<i>Astrozyten.....</i>	15
1.4.3	<i>Gliazellen und zirkadiane Rhythmik.....</i>	16
1.5	NEUROINFLAMMATION	17
1.5.1	<i>Neuroinflammation und Neurodegeneration.....</i>	19
1.5.2	<i>Pattern Recognition Rezeptoren.....</i>	19
1.5.3	<i>Inflammasome</i>	20
1.5.4	<i>Inflammasome und Neurodegeneration</i>	22
1.6	ZIELE DER ARBEIT	24
2	MATERIAL UND METHODEN	25
2.1	ALLGEMEINE LABORMATERIALIEN.....	25
2.2	CHEMIKALIEN UND LÖSUNGEN	26
	TABELLE 1: LISTE VERWENDETER CHEMIKALIEN.....	26
	TABELLE 2: LISTE VERWENDETER PRIMÄRANTIKÖRPER	28
	TABELLE 3: LISTE VERWENDETER SEKUNDÄRANTIKÖRPER.....	29
	TABELLE 4: LISTE VERWENDETER PRIMER	29
	TABELLE 5: LISTE VERWENDETER GERÄTE	30
2.3	SOFTWARE.....	31
2.3.1	<i>VWR® Image Capture Software</i>	31
2.3.2	<i>ImageJ.....</i>	31
2.3.3	<i>BZ-II-Viewer.....</i>	31
2.3.4	<i>GraphPad Prism 5.0</i>	31
2.4	ALLGEMEINE RICHTLINIEN	32
2.5	MAUSMODELL UND HALTUNGSBEDINGUNGEN.....	32
2.6	VERSUCHSAUFBAU.....	32
2.7	TIERVERSUCHE	34
2.7.1	<i>Infrarotdetektoren</i>	34
2.7.2	<i>Körpergewichtskontrollen.....</i>	34
2.7.3	<i>Blutentnahme und Anfertigung der Blutaussstriche</i>	34
2.7.4	<i>Transkardiale Perfusion.....</i>	35
2.7.5	<i>Native Probenentnahme</i>	35
2.7.6	<i>Paraffineinbettung.....</i>	35
2.7.7	<i>Anfertigung von Paraffinschnitten</i>	36
2.8	FÄRBUNGEN	36
2.8.1	<i>Färbung nach Pappenheim</i>	36
2.8.2	<i>Differenzierung des Blutbildes</i>	37
2.8.3	<i>Immunfluoreszenz (IF)-Färbung von Hippocampus</i>	38
2.8.4	<i>Mikroskopische Aufnahmen der IF-Färbungen</i>	38
2.8.5	<i>Quantifizierung der gefärbten Gewebeschnitte.....</i>	39
2.9	MOLEKULARBIOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN.....	39

2.9.1	RNA-Aufreinigung.....	39
2.9.2	cDNA-Synthese.....	40
2.9.3	Durchführung der qRT-PCR.....	40
2.10	IMMUNOLOGISCHE UND BIOCHEMISCHE UNTERSUCHUNGEN.....	41
2.10.1	Proteinaufreinigung.....	41
2.10.2	Western Blot und SDS-Page.....	42
2.10.3	Comassie Blau, Ponceau S-Färbung und Fotoentwicklung.....	43
2.10.4	Strippen.....	43
2.11	STATISTIK.....	43
3	ERGEBNISSE.....	45
3.1	RHYTHMEN DER BEWEGUNGSAKTIVITÄT.....	45
3.1.1	Aktogramme.....	45
3.1.2	Aktivitätsprofile.....	46
3.1.3	Periodogramme.....	47
3.1.4	Bewegungsaktivität und Rhythmusstabilität.....	48
3.2	KÖRPERGEWICHT.....	49
3.3	DIFFERENZIALBLUTBILD.....	50
3.4	IMMUNFLUORESCENZ-FÄRBUNG DER HIPPOCAMPUS-SCHNITTE.....	51
3.5	mRNA-EXPRESSION VON INFLAMMASOMEN IM HIPPOCAMPUS.....	53
3.6	PROTEIN-EXPRESSION VON INFLAMMASOMEN UND DEREN KOMPONENTEN IM HIPPOCAMPUS.....	55
3.6.1	Caspase-1.....	56
3.6.2	IL-1 β und IL-18.....	56
3.6.3	NLRP1 und NLRP3.....	58
3.6.4	NLRC4, AIM2, ASC und NF-kB.....	58
4	DISKUSSION.....	60
4.1	VERSUCHSAUFBAU UND RHYTHMISCHE BEWEGUNGSAKTIVITÄT.....	61
4.2	ALLGEMEINZUSTAND.....	64
4.2.1	Metabolismus der Versuchstiere.....	64
4.2.2	Differenzialblutbild.....	65
4.3	AKTIVIERUNG VON ASTROZYTEN UND MIKROGLIA IM HIPPOCAMPUS.....	67
4.4	EXPRESSION VON INFLAMMASOMEN UND IHRER KOMPONENTEN IM HIPPOCAMPUS.....	68
4.4.1	Inflammasom NLRP1.....	68
4.4.2	Inflammasom AIM2.....	70
4.4.3	Inflammasome NLRP3 und NLRC4.....	71
4.4.4	Enzym Caspase-1.....	73
4.4.5	Interleukine IL-1 β und IL-18.....	76
4.4.6	Zusammenfassung und Ausblick.....	78
5	LITERATURVERZEICHNIS.....	80
6	ANHANG.....	89
	TABELLE 10: PUFFER UND LÖSUNGEN.....	89

1 Einleitung

1.1 Zirkadianes System

Aufgrund der Rotation der Erde um ihre eigene Achse ändern sich die Umweltbedingungen, wie die Dauer der Lichteinwirkung und die Temperatur, rhythmisch in einer Periode von 24 Stunden. Diese zyklisch wiederkehrenden Veränderungen in der Umwelt beeinflussen fast alle physiologischen und biochemischen Prozesse aller Lebewesen auf unserem Planeten. Als optimale Anpassungsmechanismen, die evolutionär überlebensfördernd sind, haben pflanzliche und tierische Organismen Verhaltensmuster und physiologische Prozesse entwickelt, die einem 24-Stunden-Zyklus folgen und als zirkadiane Rhythmen bezeichnet werden. Zirkadiane Rhythmen (aus dem Lateinischen: *circa* = ungefähr, *dies* = Tag) sind autonome Schwingungen in biologischen Prozessen, die einem Organismus ermöglichen, die Homöostase aufrechtzuerhalten und biochemische, physiologische sowie verhaltensbezogene Prozesse entsprechend den veränderten Bedingungen zu regulieren (Pittendrigh, 1993; Tarquini, Carbone, Martinez, & Mazzoccoli, 2019).

Der zirkadiane Rhythmus, auch "innere Uhr" genannt, benötigt keine Signale von der Außenwelt (Sollars & Pickard, 2015), um seinem eigenen Rhythmus zu folgen und wird durch die Periodenlänge definiert. Die Periodenlänge misst die Dauer der Wiederholung eines Ereignisses. Sie ist jedoch nicht immer genau 24 Stunden lang, sondern beträgt für verschiedene Arten in der Regel 22 bis 25 Stunden (Pittendrigh, 1993). Die Anpassung (*Entrainment*) eines exakten 24-Stunden-Zyklus erfolgt mit Hilfe von äußeren Reizen, den so genannten Zeitgebern. Die Zeitgeber sind Signale aus der Umgebung, wie Licht, Temperatur und Luftfeuchtigkeit, wobei das Licht der mit Abstand stärkste und effektivste Hinweisreiz ist (Pittendrigh, 1993).

Das gute Beispiel für zirkadiane Rhythmik auf der Verhaltensebene ist der Schlaf-Wach-Rhythmus, bei dem sich Aktivitäts- und Ruhephasen zyklisch abwechseln. Zahlreiche andere physiologische Prozesse, wie die Regulation der Körpertemperatur, das Herz-Kreislauf-, Verdauungs- und endokrine System, sowie Stoffwechsel- und Immunfunktionen unterliegen dem zirkadianen Rhythmus (Curtis, Bellet, Sassone-Corsi, & O'Neill, 2014; Huang, Ramsey, Marcheiva, & Bass, 2011; Kolbe & Oster, 2019; Manfredini, Fabbian, Cappadona, & Modesti, 2018).

Bei Säugetieren werden die zirkadianen Rhythmen durch ein hierarchisch organisiertes System, innerhalb des zentralen Nervensystems gesteuert. Das zentrale Steuerungselement eine "Clock" oder Zentrale Uhr, ist der Nucleus suprachiasmaticus (SCN) (Stephan & Zucker,

1972), ein paarig angelegtes Kerngebiet im anterioren Hypothalamus, oberhalb des Chiasma opticum (Herzog, Hermansteyne, Smyllie, & Hastings, 2017). Der SCN erhält Hauptafferenzen von photosensitiven retinalen Ganglienzellen über den retinohypothalamischen Trakt (RHT). Der SCN sendet wiederum seine Efferenzen in verschiedenen Regionen des Gehirns – wie dem Septum und dem Nucleus paraventricularis verbunden. Informationen bezüglich der Tageszeit werden daraufhin über neuroendokrine, sympathische und parasymphatische Signalwege an die peripheren Organe weiterzuleiten (Moore, 2013).

Eine wichtige Rolle bei der Koordinierung des zirkadianen Systems spielt das Hormon Melatonin. Melatonin stellt ein Signal für die Schlafeinleitung dar und wird durch Epiphyse produziert (Touitou, Reinberg, & Touitou, 2017). Epiphyse ist durch synaptische Verschaltungen mit dem SCN verbunden. Die Produktion von Melatonin in Epiphyse wird durch den SCN tagesrhythmisch gesteuert. Die Regulierung von Hormonbildung erfolgt durch ein Lichtimpuls, welcher den SCN über den RHT erreicht und zur Hemmung der Melatoninproduktion führt. Bei Dunkelheit kommt es zur Aufhebung der Hemmung und Steigerung der Melatoninkonzentration. Durch Koordinierung der circadian-rhythmischen Vorgänge im Körper wirkt es als Zeitgeber (Arendt & Skene, 2005). Melatonin zählt zu den zentralen Impulsgebern des biologischen Rhythmus, dessen Hauptfunktion darin besteht, Informationen über Veränderungen der Tageslänge zu vermitteln (Arendt & Skene, 2005; Jones, Durrant, Michaelides, & Green, 2015).

Unabhängig von der zentralen Uhr gibt es auch so genannte periphere Uhren, die in sämtlichen Zellen und Gewebetypen vorkommen, weitgehend autonom funktionieren und so die Aufrechterhaltung der Homöostase auf zellulärer Ebene gewährleisten (Takahashi, Hong, Ko, & McDearmon, 2008; Yoo et al., 2004). Diese untergeordneten zirkadianen Oszillatoren sind jedoch auf den SCN als Taktgeber angewiesen. Der SCN ist verantwortlich für die Synchronisierung aller zirkadianen Uhren untereinander, in einem 24-Stunden-Tag Rhythmus (Morin & Allen, 2006; Welsh, Takahashi, & Kay, 2010).

In den letzten drei Jahrzehnten wurden sogenannten Uhren-Gene entdeckt und die molekulare zirkardiane Uhr beschrieben. Die Regulation der molekularen Uhr basiert auf einen präzisen transkriptionellen/translationalen Rückkopplungsmechanismen und ist vermutlich in jeder einzelnen Zelle eines Organismus vorhanden (Abbruzzese, 2011). Uhren-Gene und die von ihnen kodierten Proteine sind jedoch vermehrt im SCN zu finden (Moore, 2013). Folgende Uhrgene sind bislang bekannt: *Brain and Muscle Arnt-like (Bmal1)*, *Circadian Locomotor Output Cycles Kaput (Clock)*, *Period (Per)*, sowie *Cryptosome (Cry)* (Reppert & Weaver, 2002). Uhren-Gene beeinflussen sich gegenseitig in ihrer Expression (Honma et al., 2012). Die

Genexpression von *Clock* und *Bmal* induziert die Transkription der *Per*- und *Cry*-Gene und bildet eine positive Rückkopplungsschleife. *Per* und *Cry* wiederum haben eine hemmende Wirkung auf *Bmal* und *Clock* und bilden somit eine negative Rückkopplungsschleife (Abb. 1). Diese Transkriptions-Translationsschleife ist die molekularbiologische Grundlage für die zirkadiane Rhythmik des Organismus. Eine komplette Rückkopplungs-Schleife dauert ca. 24 Stunden und beruht sich auf die Oszillation der Transkriptionsprodukte der Uhren-Gene.

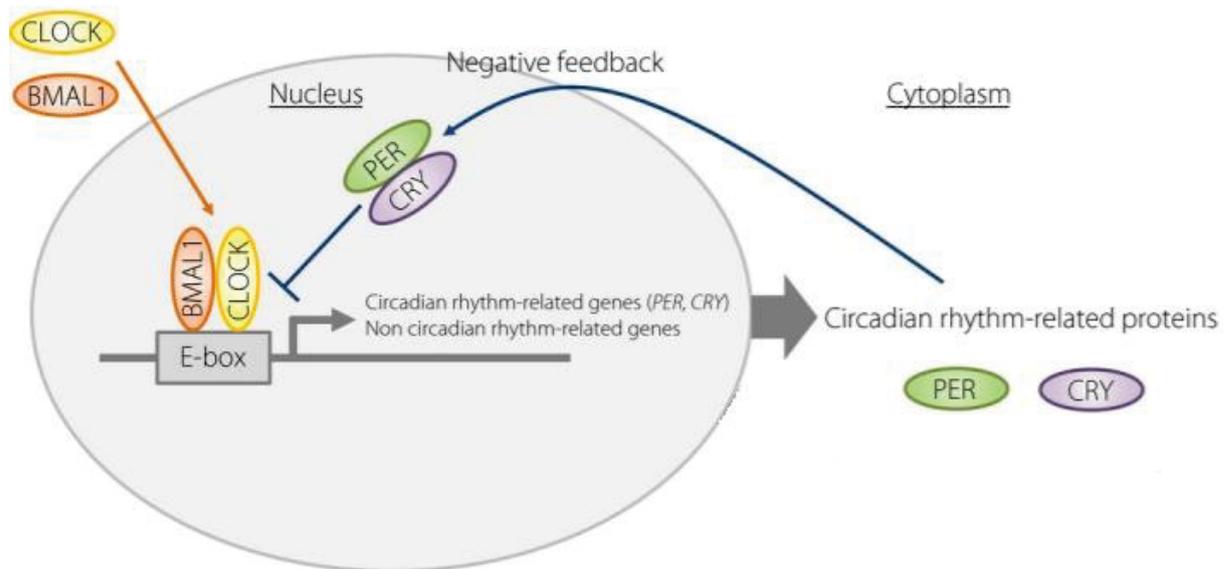


Abbildung 1: Molekularer Mechanismus des zirkadianen Rhythmus. Clock - und Bmal1-Proteine bilden im Zellkern ein Heterodimer und binden an Enhancer-Box (*E-Box*), was zur Induktion von *Per*- und *Cry*-Gentranskription führt. Gebildete *Per*- und *CRY*-Proteine werden zunächst im Zytoplasma akkumuliert. Anschließend erfolgt eine Dimerisierung und Translokation von *Per*- und *CRY*-Proteine im Zellkern, um mit dem Clock - und Bmal1-Komplex zu interagieren und ihre eigene Expression direkt zu inhibieren (negative Rückkopplung).

E-Box: spezifische DNA-Sequenz, die von Transkriptionsfaktoren erkannt und gebunden wird, um Gentranskription einzuleiten (Harada & Inagaki, 2016).

1.2 Chronodisruption

1.2.1 Definition

Unterbleibt die Koordination eines 24-Stunden-Rhythmus, bzw. desynchronisiert die zirkadiane Rhythmik, kann dies zu einer Chronodisruption (CD) führen. Erren et al. (2009) definierten CD als einen Zusammenbruch rhythmisch ablaufender, interner, biologischer

Prozesse in Zusammenhang mit externen oder internen Veränderungen (T. C. Erren & Reiter, 2009). Die Einflüsse, die zur Desynchronisation der Rhythmen führen, werden als Chronodisruptoren bezeichnet. Sie können exogenen oder endogenen Ursprung haben und sind chronobiologisch aktiv, d. h. Chronodisruptoren sind in der Lage die zeitliche Organisation physiologischer Funktionen und Hierarchien zu beeinträchtigen.

Garaulet et al. (2013) stellten einige dieser Chronodisruptoren in überschaubarer Form dar (Garaulet & Gómez-Abellán, 2013). Den Autoren zufolge handelt es sich am häufigsten um eine Beeinträchtigung der adäquaten Stimulation der zentralen Uhr. Dies seien Faktoren, denen der Organismus tagsüber und nachts gleichermaßen ausgesetzt ist. Dadurch werden Unterschiede zwischen Tag und Nacht ausgeglichen. Dazu gehören z. B. geringe körperliche Aktivität oder häufige Nahrungsaufnahme. Die Exposition von konstantem Licht stört die innere Uhr bei Säugetieren und anderen Spezies nachweislich (Ohta, Yamazaki, & McMahon, 2005; Tapia-Osorio, Salgado-Delgado, Angeles-Castellanos, & Escobar, 2013). Weitere Faktoren sind die gleichzeitige Exposition von Zeitgebern mit unterschiedlichen Perioden oder ungewöhnlichen Phasenlängen (z. B. Licht in der Nacht, nächtliche Nahrungsaufnahme, nächtliche körperliche Betätigung) oder häufige Verschiebungen des von dem Zeitgebern vorgegebenen Rhythmus (z. B. Jetlag, Schichtarbeit) (Garaulet & Gómez-Abellán, 2013; Vitale, Lombardi, Weydahl, & Banfi, 2018).

Zu den endogenen Ursachen, die einer CD zugrunde liegen können, gehören z. B. Alterung und dadurch induzierte Veränderungen in den Uhrengenen, die eine Entkopplung der zirkadianen Oszillatoren bewirken können. Diese Entkopplung kann zwischen verschiedenen Zellpopulationen innerhalb der zentralen Uhr auftreten, aber auch zu einer Desynchronisation der zentralen und peripheren Oszillatoren führen (Garaulet & Gómez-Abellán, 2013).

Durch Chronodisruptoren induzierte Desynchronisation der zirkadianen Rhythmik kann negativen Auswirkungen auf die Gesundheit in unterschiedlichem Ausmaß haben. Die Auswirkungen vieler externer Modulatoren werden jedoch physiologisch kompensiert und führen nicht unbedingt zu manifesten chronischen Prozessen. Im Gegensatz dazu werden biologisch relevante Störungen der Rhythmen beschrieben, die über Tage, Jahreszeiten und Jahre hinweg auftreten und zu den dauerhaften Funktionsstörungen führen. Zur Beschreibung solcher biologisch relevanten Beeinträchtigungen der physiologischen Vorgänge, die durch Chronodisruptoren induziert werden, verwendeten Erren et al. (2009) den Begriff „Chronodisruption“.

1.2.2 Künstliches Licht

In der modernen Welt nimmt die Bedeutung externer Zeitgeber und insbesondere die Bedeutung von Licht aufgrund der Lichtverschmutzung stetig ab. Als Lichtverschmutzung wird die Störung der natürlichen und nächtlichen Dunkelheit durch künstliche Lichtquellen bezeichnet, die negative Auswirkungen auf Flora und Fauna haben können. Die Beleuchtung an öffentlichen Plätzen, im Verkehr, sowie das Licht von Computerbildschirmen sind allgegenwärtig. Ein Leben ohne künstliche Beleuchtung ist in unserer Gesellschaft kaum mehr vorstellbar. Künstliche Beleuchtung ist eine Notwendigkeit, die dort für Licht sorgt, wo kein natürliches Licht zur Verfügung steht. Es verbessert die Sehleistung und Sichtbarkeit und erhöht damit die Sicherheit und den Komfort der Menschen. Die Entwicklung der künstlichen Beleuchtung hat dazu geführt, dass unsere tägliche Aktivitätsphase länger geworden ist. Es kann zur Verbesserung der Produktivität eingesetzt werden und sogar eine vollständige Umkehrung der Schlaf- und Wachphasen, z. B. bei Schichtarbeit, ermöglichen. Es gibt jedoch zunehmend Hinweise auf die negativen Auswirkungen von künstlichem Licht auf Menschen und Umwelt (Dominoni, Borniger, & Nelson, 2016; Irwin, 2018). Selbst die Exposition gegenüber nächtlicher Beleuchtung bei geringer Intensität kann eine erhebliche Störung von Verhaltens- und physiologischen Prozessen darstellen (Jones et al., 2015; Longcore & Rich, 2004). Auf der Populationsebene wird beobachtet, dass Tiere, die in gut beleuchteten städtischen Umgebungen leben, den Zeitpunkt und die Struktur ihrer Paarungsrufe und den Beginn der Fortpflanzung verschieben (Baker & Richardson, 2006; Kempnaers, Borgström, Loës, Schlicht, & Valcu, 2010).

Mehrere biomedizinische Studien haben künstliches Licht in der Nacht mit der Störung des zirkadianen Rhythmus in Verbindung gebracht. Als Ursache dafür scheint die unterdrückte nächtliche Produktion des Melatonins zu sein (Jones et al., 2015). Melatonin zählt nicht nur zu den wichtigsten Impulsgebern der zirkadianen Rhythmik. Von erheblicher physiologischer Bedeutung ist seine Rolle als Antioxidans. Aufgrund der antioxidativen Effekte von Melatonin sowie bereits identifizierten Melatoninrezeptoren auf Immunzellen wird von dessen immunmodulierender Funktion ausgegangen (Touitou et al., 2017). Eine gestörte Melatonin-Sekretion kann wichtige Folgen für die menschliche Gesundheit haben, wie z. B. die zunehmende Inzidenz von metabolischen Syndromen, Krebs und eine geschwächte Immunität (Dominoni et al., 2016).

1.2.3 Einfluss der Chronodisruption auf die Gesundheit

Störungen des zirkadianen Rhythmus können, auch wenn sie lediglich für eine kurze Zeit vorhanden sind, der Grund für gesundheitliche Probleme sein. Charakteristische Symptome sind Schlafstörungen, Müdigkeit, Stimmungsschwankungen, Appetitlosigkeit und ein allgemeiner Leistungsabfall (Thomas C. Erren, 2010; Touitou et al., 2017; Vitale et al., 2018). Der Zustand ist auch als „Jet-“ und „Shift-Lag“ bekannt. In diesen Fällen ist der Schlaf-Wach-Rhythmus der Betroffenen zu ungewöhnlichen Zeiten durch Licht- und Dunkelheitsexposition gestört. Dies führt in der Regel zu kurzfristigen und reversiblen Veränderungen der Aktivitäts- und Essenszeiten, sowie der Hormonproduktion und der Körpertemperatur (Tähkämö, Partonen, & Pesonen, 2019).

Die Frage, welchen langfristigen Einfluss eine chronische Störung der zirkadianen Rhythmen auf die Gesundheit hat, ist für unsere Gesellschaft von großer Relevanz.

Es gibt zunehmend Hinweise darauf, dass CD zu pathophysiologischen Mechanismen führt, die mehreren neurodegenerativen, Immun-, Stoffwechsel- und neoplastischen Krankheiten zugrunde liegen. Diese Mechanismen können äußerst vielschichtig sein und beziehen sich unter anderem auf gestörte Immunregulation und Hormonhaushalt. Immer mehr Studien belegen die Zusammenhänge insbesondere zwischen CD und Adipositas (Garaulet & Gómez-Abellán, 2013; Kolbe & Oster, 2019), kardiovaskulären Ereignissen (Thosar, Butler, & Shea, 2018), Nierenfunktionsstörungen (Bonny, Vinciguerra, Gumz, & Mazzoccoli, 2013), Brust- (Blask et al., 2005) und Prostatakrebs (T. C. Erren, Pape, Reiter, & Piekarski, 2008) sowie Neurodegeneration (Musiek & Holtzman, 2016).

Schichtarbeit, durch die eine zirkadiane Disruption induziert wird, wurde im Jahr 2007 vom *International Agency for Research on Cancer* (IARC) als wahrscheinliches Humankarzinogen eingestuft. Somit erhielten bestimmte Formen der Schichtarbeit die gleiche Risikoeinstufung, wie z. B. UV-Strahlung, Benzo(a)pyren und Acrylamid (Straif et al., 2007). Im Jahr 2008 formulierten Erren et. al die „Chronodisruptions-Krebs-Theorie“. Der Theorie zufolge kann eine durch Transmeridianflüge sowie durch Nacht- und Wechselschichtarbeit verursachte Störung der inneren Uhr mit signifikant erhöhten Risiken für Brust- und Prostatakrebs verbunden sein (T. C. Erren et al., 2008). Darüber hinaus wurden epidemiologische Studien zu Dickdarm- (Schernhammer et al., 2003) Gebärmutter- (Paridou et al., 2003) und Brustkrebs (Schernhammer, Kroenke, Laden, & Hankinson, 2006; Schernhammer et al., 2001) bei Schichtarbeitern durchgeführt. Dabei wurde festgestellt, dass Krankenschwestern, die

mindestens 15-20 Jahre im Wechselschichtbetrieb gearbeitet hatten, einem erhöhten Risiko für Kolorektal- und Endometriumkarzinome ausgesetzt waren (Schernhammer et al., 2006; Schernhammer et al., 2001).

Aktuelle Studien zeigen, dass Schichtarbeit nicht nur für bestimmten Krebserkrankungen, sondern auch für viele chronische Krankheiten ein unabhängiger Risikofaktor ist. Dazu gehören unter anderem Herz-Kreislauf-Erkrankungen (Gu et al., 2015; Manfredini et al., 2018). Es besteht Grund zur Annahme, dass die Ursache dafür in lang anhaltenden und wiederkehrenden Störungen der zirkadianen Uhr liegt, z. B. nächtliche Lichtexposition oder Diskrepanz zwischen der zirkadianen Uhr und Verhaltensweisen wie Schlafen und Fasten am Tag, sowie körperliche Aktivität und Nahrungsaufnahme in der Nacht (Thosar et al., 2018). Eine solche Diskrepanz zwischen dem täglichen Verhalten und der inneren Uhr führt nachweislich zu einer Beeinträchtigung der Blutzucker- und Blutdruckregulation (Garaulet & Gómez-Abellán, 2013; Leproult, Holmbäck, & Van Cauter, 2014). Die zirkadiane Kontrolle des Glukosestoffwechsels ist auch aus Studien bekannt, die Schwankungen in der Glukosetoleranz und Insulinwirkung im Tagesverlauf beschreiben (Garaulet & Gómez-Abellán, 2013). Es konnte nachgewiesen werden, dass die Glukosetoleranz in den Nachmittags- und Abendstunden im Vergleich zu den Morgenstunden vermindert ist. Diese Beobachtung wurde auf die verminderte Insulinsensitivität des peripheren Gewebes und auf eine relative Abnahme der Insulinsekretion in den Abendstunden zurückgeführt (Garaulet & Gómez-Abellán, 2013). Des Weiteren wurde beobachtet, dass durch eine gestörte zirkadiane Rhythmik es zur Erhöhung sowohl des systolischen als auch des diastolischen Blutdrucks kommen kann, sowie die Aufhebung der physiologischen nächtlichen Blutdrucksenkung induziert werden kann (Manfredini et al., 2018). Laborchemisch konnten signifikant erhöhte kardiovaskuläre Entzündungsparameter, einschließlich Interleukin-6 (IL-6), C-reaktivem Protein (CRP) und Tumornekrosefaktor- α (TNF- α), ebenfalls nachgewiesen werden (Morris, Purvis, Hu, & Scheer, 2016).

Darüber hinaus stellten Kolbe et al. (2019) den aktuellen Wissensstand bezüglich der Aufrechterhaltung der metabolischen Homöostase in Abhängigkeit vom Tag-Nacht-Rhythmus vor (Kolbe & Oster, 2019). Die Autoren berichten, dass zirkadiane Rhythmusstörungen häufig mit Stoffwechselstörungen assoziiert sind, die sich klinisch von Adipositas und Typ-2-Diabetes bis zur Entwicklung des metabolischen Syndroms manifestieren können. Dabei scheinen geringgradige systemische Entzündungen eine wichtige Rolle zu spielen. Diese werden zuerst im Fettgewebe beobachtet und durch CD gefördert. Während dieser niedriggradigen Entzündungsprozesse kommt es zur Rekrutierung von Immunzellen, u. a. von Neutrophile und

Makrophagen im weißen Fettgewebe (Serhan & Savill, 2005). Makrophagen tragen mit rhythmischer Sekretion von TNF- α und IL-6 zur systemischen Entzündung bei (Keller et al., 2009). Dieser Sekretionsrhythmus ist abhängig von einer funktionellen inneren Uhr der Immunzellen (Keller et al., 2009). Bei Ratten, die einer zirkadianen Rhythmusstörung durch chronische Verschiebungen des Hell-Dunkel-Zyklus ausgesetzt waren, konnte ein Anstieg der Entzündungsreaktion nachgewiesen werden (Herrero et al., 2015). Auch bei Schichtarbeitern konnte eine erhöhte Anzahl von Leukozyten im Fettgewebe beobachtet werden (Sookoian et al., 2007).

1.2.4 Einfluss von Chronodisruption auf das ZNS

Besonders interessant sind die Zusammenhänge zwischen CD und Neurodegenerativen Erkrankungen. Als neurodegenerativ bezeichnet man pathologische Prozesse im ZNS, die durch die fortschreitende Zerstörung von Nervenzellen gekennzeichnet sind (Voet, Srinivasan, Lamkanfi, & van Loo, 2019). Die Ursachen der meisten neurodegenerativen Erkrankungen sind noch nicht vollständig geklärt. Häufig handelt es sich um eine Störung der Proteinhomöostase und der daraus resultierenden Aggregate fehlgefalteter Proteine. Z. B. werden Amyloid- β -Plaques (A β) bei Alzheimer's Disease (AD), α -Synukleinaggregate bei der Parkinson's Disease (PD) und Huntingtin-Ablagerungen bei der Huntington's Disease (HD) beobachtet (Erkkinen, Kim, & Geschwind, 2018). Verschiedene neurodegenerative Erkrankungen sind durch pathologische Veränderungen in bestimmten Regionen des Gehirns gekennzeichnet. Bei der AD wird zum Beispiel typischerweise der Hippocampus geschädigt; die PD ist durch die Zerstörung dopaminergischer Nervenzellen in der Substantia nigra gekennzeichnet und bei der HD ist das Putamen besonders betroffen (Erkkinen et al., 2018; Reith, 2018). Darüber hinaus sind viele neurodegenerative Erkrankungen wie AD, PD und HD mit zirkadianen Rhythmusstörungen assoziiert (Homolak, Mudrovčić, Vukić, & Toljan, 2018; Jiang et al., 2018; Ju et al., 2017; Lauretti, Di Meco, Merali, & Praticò, 2017; Leng, Musiek, Hu, Cappuccio, & Yaffe, 2019; Musiek et al., 2018; Pfeffer et al., 2012). Zwar kommen Störungen dieser Rhythmen im Allgemeinen häufig bei älteren Erwachsenen vor und sind teilweise auf die altersbedingte Degeneration des SCN zurückzuführen (Leng et al., 2019; Nakamura et al., 2011), aber sie werden auch als Symptome verschiedener neurodegenerativer Erkrankungen angesehen. Bei Patienten mit diesen neurologischen Erkrankungen treten zirkadiane Rhythmusstörungen jedoch häufig in einer wesentlich schwereren Form auf als die typischen

altersbedingten Schlaf-Wach-Rhythmusstörungen (Videnovic et al., 2014; Weissová, Bartoš, Sládek, Nováková, & Sumová, 2016). Zu den Rhythmusstörungen, die bei neurodegenerativen Erkrankungen auftreten, gehören Schlaflosigkeit, Einschlafschwierigkeiten, Schlaffragmentierung, frühmorgendliches Aufwachen oder exzessive Tagesschläfrigkeit. Einige dieser Schlafstörungen können im prodromalen Stadium der Erkrankung auftreten, also Jahre vor dem Auftreten der kardinalen Symptome, die die Diagnose der Erkrankung bestimmen (Iranzo, 2016).

Es gibt Studien, die vermuten lassen, dass zirkadiane und Schlafstörungen nicht nur ein Nebeneffekt der Erkrankung sind, sondern auch direkt zu ihrer Pathogenese beitragen können (Lucey & Bateman, 2014; Musiek & Holtzman, 2016; Pillai & Leverenz, 2017). Wie die Pathogenese der Neurodegeneration durch die CD gefördert wird oder welche molekularbiologischen Mechanismen diesen Prozessen zugrunde liegen, ist jedoch noch weitgehend unklar. Allerdings sind zirkadiane Rhythmusstörungen im Zusammenhang mit der A β -Dynamik bei AD-Patienten bereits gut erforscht. Die Konzentrationen von A β im extrazellulären Raum des Gehirns zeigen deutliche zirkadiane Oszillationen. Sie nehmen während des Schlafens ab und während der Wachheit zu (Dufort-Gervais, Mongrain, & Brouillette, 2019; Kang et al., 2009). Kommt es zu einem gestörten Schlafrhythmus, führt dies zu einer Zunahme der A β -Plaques in Mausmodellen (Song et al., 2015), sowie zu einer signifikanten Zunahme der Entzündungs- und neuronalen Verletzungsmarker im menschlichen Liquor (Benedict et al., 2014). Darüber hinaus konnten Cermakian et al. (2011) eine asynchrone Uhrengenenexpression zwischen verschiedenen Hirnregionen bei AD-Patienten nachweisen (Cermakian, Lamont, Boudreau, & Boivin, 2011). Mäuse, die A β überexprimieren und Amyloid-Ablagerungen in ihren Gehirnen haben, weisen ein gestörtes zirkadianes Verhalten auf, das mit der veränderten Expression von Molekülen der zirkadianen Uhr verbunden ist (Song et al., 2015). Song et al. (2015) konnten nachweisen, dass A β zur Degradation von BMAL1 in neuronalen Zellen führt, indem es den Abbau von BMAL1 fördert, was zu einer gestörten Expression von PER2 sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene führt (Song et al., 2015). Daher weisen die Autoren darauf hin, dass die Verhinderung des A β -induzierten BMAL1-Abbaus oder eine verbesserte A β -Clearance durch Wiederherstellung des Schlaf-Wach-Zyklus neuartige therapeutische Ziele für die AD-Pathogenese sein könnten.

Hippocampus-abhängiges Lernen und kognitive Funktionen werden stark durch Veränderungen in der zirkadianen Uhr beeinflusst (Dufort-Gervais et al., 2019; Krause et al., 2017; Shokri-Kojori et al., 2018; B. Zhu et al., 2012). Studien zeigen, dass die Neurogenese des

Hippocampus vermindert ist, wenn Mäuse einem Jetlag ausgesetzt sind (Gibson, Wang, Tjho, Khattar, & Kriegsfeld, 2010). Eine gestörte zirkadiane Rhythmik kann zu einer nachweisbaren Volumenreduktion des Hippocampus, sowie zu einer erheblichen Beeinträchtigung der synaptischen Plastizität, des Lernens und der Gedächtnisbildung führen (Havekes & Abel, 2017; Kreuzmann, Havekes, Abel, & Meerlo, 2015; Musiek & Holtzman, 2016). Der Hippocampus ist sehr anfällig für Schäden durch Neuroinflammation, Epilepsie, Hypoxie oder Ischämie (Knierim, 2015; Liraz-Zaltsman et al., 2011). Schlafstörungen erhöhen die Spiegel des proinflammatorischen Zytokins IL-6 und induzieren eine Aktivierung der Mikroglia im Hippocampus der Maus, was eine Neuroinflammation auslösen kann (B. Zhu et al., 2012). Der Hippocampus mit entorhinalen Kortex ist der erste vom AD betroffenen Hirnbereich. Diese Hirnregion ist typischerweise die erste, in der A β Plaques nachgewiesen werden (Knierim, 2015). Shokri-Kojori et al. (2018) konnten zeigen, dass bei gesunden Probanden ohne ein vorher bestehendes genetisches Alzheimer-Risiko eine signifikant erhöhte A β -Exposition nach nur einer Nacht Schlafmangel auftritt (Shokri-Kojori et al., 2018).

1.3 Chronoimmunologie

1.3.1 Das Immunsystem

Das Immunsystem ist das Abwehrsystem des Körpers und stellt eine komplexe Reihe physiologischer Mechanismen dar, deren allgemeines Ziel es ist, den Organismus gegen Krankheitserreger (Bakterien, Viren, Parasiten) und Krebszellen zu verteidigen (McComb, Thiriot, Akache, Krishnan, & Stark, 2019). Es gibt zwei verschiedene Mechanismen des Immunsystems: die angeborene und die adaptive Immunität. Die angeborene Immunität ermöglicht eine unspezifische, aber schnelle Reaktion auf eine Infektion. Diese erste Schutzlinie umfasst physikalische (z. B. Haut, Schleimhaut) und chemische (bestimmte Proteine und Immunzellen) Barrieren, die es ermöglichen, das unkontrollierte Eindringen von Antigenen in Körpergewebe zu verhindern (McComb et al., 2019; Müller, Di Benedetto, & Pawelec, 2019). Die angeborene Immunität führt auch zur Aktivierung des adaptiven Immunsystems, das dann eine langsamere, aber antigenspezifische Reaktion auslösen kann, sodass Krankheitserreger vollständig eliminiert oder inaktiviert werden können (McComb et al., 2019). Das adaptive Immunsystem vermittelt auch die Entwicklung eines

Immungedächtnisses, das für den spezifischen und langfristigen Schutz vor Infektionen verantwortlich ist (Parkin & Cohen, 2001).

1.3.2 Zirkadiane Rhythmen im Immunsystem

Die Kontrolle und Regulierung der Immunantwort von Säugetieren ist äußerst komplex und umfasst viele verschiedene Mechanismen. Es wurde berichtet, dass fast alle zellulären und humoralen Komponenten der angeborenen und adaptiven Immunantwort zirkadiane rhythmische Oszillationen aufweisen (Curtis et al., 2014; Labrecque & Cermakian, 2015; Man, Loudon, & Chawla, 2016). Zu den Immunprozessen, bei denen die rhythmische Oszillation bereits nachgewiesen wurde, gehören die Phagozytose (Curtis et al., 2014), die Expression von Pattern Recognition Rezeptoren (PRR) und ihrer nachgeschalteten Signalwege (Silver, Arjona, Walker, & Fikrig, 2012), die Sekretion von Komplement- und Gerinnungsfaktoren, die Produktion von Zytokinen und Chemokinen (Man et al., 2016), die Rekrutierung von Immunzellen, und die Interaktionen zwischen Wirt und Pathogen (Carter et al., 2016; Curtis et al., 2014; Scheiermann, Kunisaki, & Frenette, 2013). Es wurde auch berichtet, dass die Anfälligkeit für bakterielle Infektionen und einen Endotoxin-vermittelten septischen Schock je nach Tageszeit unterschiedlich stark ausgeprägt sein kann (Man et al., 2016).

Fluktuationen der zellulären und humoralen Komponenten des Immunsystems im Blut im Laufe des Tages sind seit längerem bekannt. Die Zahl der reifen Leukozyten erreicht in den ersten Stunden von Lichtphase ihren Höhepunkt und nimmt in tagsüber kontinuierlich ab (Abo, Kawate, Itoh, & Kumagai, 1981; Curtis et al., 2014; Haus, Lakatua, Swoyer, & Sackett-Lundeen, 1983). Im Gegensatz dazu erreichen die Blutplasmaspiegel von Glukokortikoiden, Adrenalin, Noradrenalin und den proinflammatorischen Zytokinen TNF und IL-1 β ihren Höhepunkt zu Beginn der aktiven Phase (Haus et al., 1983; Haus & Smolensky, 1999). Die tagesrhythmusabhängige Oszillation von IL-6 wurde bei gesunden Erwachsenen nicht nur im Plasma, sondern auch im Liquor beobachtet. Agorastos et al. (2014) konnten in ihrer Arbeit eine ausgeprägte zirkadiane Variation von IL-6 nachweisen (Agorastos et al., 2014). Hierbei lag die Spitzenkonzentration von IL-6 im Liquor um etwa 19 Uhr. Im Plasma hingegen wurde eine biphasische Konzentrationsspitze, etwa um 16 Uhr und um 4 Uhr morgens beobachtet (Agorastos et al., 2014). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass T-Zellen auch eine oszillatorische Funktionsweise haben (Fortier et al., 2011; Man et al., 2016). Fortier et al. (2011)

haben einen Rhythmus der T-Zell-Antwort auf die Immunisierung von Mäusen beobachtet. Die T-Zell-Antwort und die Produktion von Interferon- γ (IFN γ), welches über eine antivirale und immunstimulierende Funktion verfügt, waren stärker, wenn die Mäuse in der Mitte der Lichtphase immunisiert wurden als in der Nacht (Fortier et al., 2011).

1.3.3 Chronodisruption und Immunsystem

Der zirkadiane Rhythmus des Immunsystems gewährleistet bei Bedarf effektive und effiziente Entzündungsreaktionen zu koordinieren (Bell-Pedersen et al., 2005). Veränderungen im zirkadianen System können eine gestörte Immunantwort hervorrufen (Labrecque & Cermakian, 2015), die sich sowohl als verstärkte pro-inflammatorische, als auch als anti-inflammatorische Prozesse manifestieren kann (Carter et al., 2016). Molekularbiologische Vorgänge, die in diesem Prozess in Gang gesetzt werden, sind noch nicht vollständig geklärt. Es konnte jedoch bereits festgestellt werden, dass die Grundlage hierfür in der veränderten Expression der Uhren-Gene liegt und, dass die Manipulation dieser Gene sehr unterschiedliche Konsequenzen hinsichtlich der Immunantwort haben kann.

Unter physiologischen Bedingungen zeigen Immunzellen eine oszillatorische Expression der Uhrengene (Keller et al., 2009; Man et al., 2016). Diese rhythmische Genexpression kann durch Umweltfaktoren beeinflusst werden. Externe Faktoren können nicht nur Krankheitserreger, sondern auch Störungen des zirkadianen Rhythmus, wie z. B. veränderte Phase oder Periodenlänge sein (Man et al., 2016).

Den Einfluss von gestörter zirkadianer Rhythmik auf das Immunsystem untersuchten Logan et al. (2012) am Ratten-Modell (Logan et al., 2012). Die Autoren berichteten, dass eine chronische zirkadiane Störung das Tumorstadium durch Veränderung der zirkadianen Rhythmen der Natural Killer (NK) T-Zellen fördert. Um zu bestimmen, ob die NK-Zell-Funktion durch ein Modell menschlicher Schichtarbeit und Shift-Lag gestört wird, setzten sie Ratten entweder einem Standard 12:12 Hell-Dunkel-Zyklus oder einem Shift-Lag-Modell aus. Unter Shift-Lag-Bedingungen erfolgte insgesamt 10-mal wiederholte 6-stündige Verschiebungen der Lichtphasen, die alle 2 Tage aufgetreten waren. Anschließend waren die Versuchstiere für 5-7 Tage konstanter Dunkelheit ausgesetzt. Dieses Modell führte zu einer beträchtlichen zirkadianen Störung. Autoren untersuchten NK-Zellen von Kontroll- und Shift-Lag Tieren,

indem sie die Gen- und Proteinexpression sowie zytolytischen Aktivitätsmuster analysierten. Es konnte gezeigt werden, dass chronischer Shift-Lag die zirkadiane Expression von Uhrengenen, PER2 und BMAL1, veränderte und zu einer abgeschwächten zytolytischen Aktivität der NK-Zellen führte. Hierbei zeigten die Autoren eine veränderte Expression von zytolytischen Faktoren wie z.B. Perforin und Granzym B, sowie das Zytokin IFN- γ .

1.4 Gliazellen

1.4.1 Mikroglia

Mikroglia sind die ortsständige Makrophagen im zentralen Nervensystem (ZNS). Sie kontrollieren kontinuierlich den extrazellulären Raum im ZNS und sind an verschiedenen Immunreaktionen im ZNS beteiligt (Burda & Sofroniew, 2014). Sie machen etwa 10% der nicht-neuronalen Zellen im Hirnparenchym aus (Minghetti, Ajmone-Cat, De Berardinis, & De Simone, 2005).

In früheren Studien konnte gezeigt werden, dass das Gehirn des sich entwickelnden Mausembryos bereits bei 9,5 embryonalen Tage Mikroglia enthält (Alliot, Godin, & Pessac, 1999; Alliot, Lecain, Grima, & Pessac, 1991), mikrogliale Vorläufer möglicherweise aus dem Dottersack stammen und in das ZNS einwandern (Kanegawa et al., 2016). Im Gegensatz zu peripheren Makrophagen sind Mikroglia langlebig.

Ajami et al. (2007) und Mildner et al. (2007) veröffentlichten ihre Studien in *Nature Neuroscience*, welche wesentlich zu besserem Verständnis der Mikrogliaentstehung und -homöostase im Erwachsenenalter beitrugen (Ajami, Bennett, Krieger, Tetzlaff, & Rossi, 2007; Mildner et al., 2007). Die Autoren konnten zeigen, dass unter normalen Bedingungen sich die Mikroglia im erwachsenen Gehirn in einem stabilen Zustand halten, ohne dass zirkulierende Monozyten aus dem Blut einen Einfluss haben. Nach einer ZNS-Entzündung oder -Schädigung (wie z. B. mechanische Durchtrennung der Axone) wird eine Mikrogliose, d. h. eine Zunahme der Mikrogliazellzahl, beobachtet. Dieses Phänomen beruht auf der lokalen Expansion von Mikroglia und nicht auf der Rekrutierung von Monozyten und deutet darauf hin, dass adulte Mikroglia zur Selbsterneuerung fähig sind, oder aus einer potenziellen Vorläuferquelle im ZNS entstehen (Prinz & Priller, 2014). Der Begriff Selbsterneuerung bezeichnet den Prozess der

Entstehung von immer neuen Zellen desselben Zelltyps. Beispielsweise haben Stammzellen die Fähigkeit zur Selbsterneuerung durch Teilung.

Mikroglia reagieren schnell auf pathologische Veränderungen und werden in Gegenwart von Krankheitserregern, Gewebeschäden, Neurotoxinen, Infektionen oder Verletzungen aktiviert (Shabab, Khanabdali, Moghadamtousi, Kadir, & Mohan, 2017). Nach der Aktivierung proliferieren sie und initiieren eine Reihe von Entzündungsprozessen, einschließlich Phagozytose und Antigenpräsentation auf T-Zellen (Prinz & Priller, 2014). Darüber hinaus verändern sie ihr Transkriptionsprofil, produzieren proinflammatorische Zytokine wie IL-1 β , TNF- α , setzen reaktive Sauerstoffspezies (ROS), eine Vielzahl von Oxidationsmitteln und potenziell neurotoxische Botenstoffe frei, die neuronale Funktionsstörungen und Zelltod verursachen können (DiSabato, Quan, & Godbout, 2016; Prinz & Priller, 2014). Außerdem kommt es im aktiven Zustand zu einer Neugestaltung des Zytoskeletts in Mikroglia. Die normalerweise ruhende "verzweigte" Morphologie erscheint bei Aktivität kugelförmig und enthält zahlreiche phagozytäre Vakuolen (Boche, Perry, & Nicoll, 2013; DiSabato et al., 2016). Durch die Veränderungen wird die phagozytische Effizienz der Mikroglia erhöht, indem es ihnen ermöglicht wird, an Verletzungs- oder Infektionsstellen zu wandern (Russo & McGavern, 2015). Unter verschiedenen Bedingungen werden zwei Arten der Mikrogliaaktivierung unterschieden: die klassische (M1) und die alternative (M2). Die klassische Aktivierung umfasst pro-inflammatorische Prozesse. Die klassische Aktivierung (M1) ist definiert durch die Reaktion von Mikroglia auf eine Reizung durch Mikroorganismen, die zur Expression hoher Mengen an proinflammatorischen Zytokinen (z. B. TNF- α , INF- γ) führt (Mosser & Edwards, 2008). Die Hauptfunktion der M1-Aktivierung ist die Bekämpfung der Mikroorganismen und präsentiert sich in Phagozytose, Antigenpräsentierung an Lymphozyten sowie in Produktion der proinflammatorischen IL's (z. B. IL-1 β , TNF- α , IL-6, IL-23) (Boche et al., 2013; Mosser & Edwards, 2008). Diese Prozesse können Kollateralschäden an Wirtszellen verursachen (Mosser & Edwards, 2008). Im Gegensatz dazu sind die Effekte der alternativen Aktivierung Wundheilung, Gewebereparatur und Entzündungshemmung. Stimuli, die zu einer M2-Aktivierung führen können, sind z. B. antiinflammatorische Interleukine IL-10, IL-4 und IL-13 sowie Glucocortikoide (Boche et al., 2013; DiSabato et al., 2016).

Außer Immunprozessen sind Mikroglia an neuronalem Wachstum sowie Synaptogenese beteiligt. Ein wesentlicher Beitrag der Mikroglia zum umgebenden zellulären Milieu ist die Freisetzung von trophischen Faktoren, die die Bildung neuronaler Schaltkreise unterstützen und deren Überleben fördern (Nayak, Roth, & McGavern, 2014). Zum Beispiel fördert der von den

umgebenden Mikroglia freigesetzte Insulin-like growth factor-1 (IGF-1) das Überleben der kortikalen Neuronen während der postnatalen Entwicklung (Ueno et al., 2013). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass Mikroglia synaptische Aktivität und Plastizität modulieren können, indem sie die Synapsendichte, glutamaterge Rezeptoren und die Anzahl dendritischer Dornen regulieren (Ji, Akgul, Wollmuth, & Tsirka, 2013).

1.4.2 Astrozyten

Astrozyten sind die häufigste Form von Gliazellen im Gehirn. Obwohl sie keine klassische Immunzellen sind, erfüllen sie doch immunmodulierende Funktionen im ZNS (Ising & Heneka, 2018). Die Morphologie der Astrozyten kann sehr komplex und vielfältig sein. Sie bilden ein Netzwerk durch ihre verzweigten Zellfortsätze, die die Synapsen umhüllen (Ben Haim & Rowitch, 2017). Zu ihren Hauptaufgaben unter physiologischen Bedingungen gehören die Regulation der Ionenhomöostase, die Synapsenbildung und Modulation der synaptischen Übertragung, die Elimination von Neurotransmittern und die Beteiligung an antioxidativen Reaktionen (Ben Haim & Rowitch, 2017; Ising & Heneka, 2018). Unter pathologischen Bedingungen, wie akuter Schädigung oder chronisch fortschreitender ZNS-Erkrankung, kommt es zu einer Veränderung der Struktur und Funktion von Astrozyten, die als Reaktivierung von Astrozyten bekannt ist und sich histopathologisch als Astrogliose manifestiert (Ben Haim, Carrillo-de Sauvage, Ceyzériat, & Escartin, 2015; Ising & Heneka, 2018). Reaktive Astrozyten erscheinen phänotypisch hypertroph und zeigen eine Überexpression des Intermediärfilamentes Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP). Zusätzliche transkriptionelle, morphologische und funktionelle Veränderungen treten krankheitsspezifisch auf (Ben Haim et al., 2015). Reaktive Astrozytose wird in zwei verschiedenen Typen – A1 und A2 unterteilt (Liddel & Barres, 2017). Diese Begrifflichkeit entspricht der Nomenklatur der M1 und M2, die auf Mikroglia im ZNS angewendet wurde. Zu einer A1-Astrozytose kommt es bei neuroinflammatorischen Prozessen. Hier konnte gezeigt werden, dass dabei viele Gene hochreguliert sind (z. B. Gene der Komplementkaskade), die auf Synapsen destruktiv wirken. Das deutet darauf hin, dass A1-Astrozytose schädlichen Einfluss auf das umgebende Neuronalgewebe ausübt (Liddel & Barres, 2017). Im Gegensatz dazu wurden bei A2-Astrozytose, welche u. a. durch Ischämie induziert wird, neuroprotektive Prozesse beschrieben. Hier konnte man eine Hochregulation von neurotrophen Faktoren beobachten, die Überleben und Wachstum der Neuronen sowie Synapsenreparatur fördern (Liddel & Barres, 2017).

1.4.3 Gliazellen und zirkadiane Rhythmik

Es konnte bereits nachgewiesen werden, dass auch in den Gliazellen die so genannten peripheren Uhren vorkommen (Brancaccio et al., 2019; Chi-Castañeda & Ortega, 2016; Hayashi et al., 2013). Sie exprimieren Uhrengene rhythmisch, wobei diese Vorgänge durch SCN synchronisiert werden. Die rhythmische Expression von Uhrengenen wurde bereits in Astrozyten von Ratten beobachtet. In Zellkulturen zeigten Astrozyten die Fähigkeit, die Genexpression der Uhrengene auch in Abwesenheit von SCN in einem bestimmten Rhythmus aufrechtzuerhalten (Chi-Castañeda & Ortega, 2016). Darüber hinaus wurde eine molekulare Uhr in Mikroglia identifiziert. Es konnte gezeigt werden, dass die Funktion der Mikroglia zirkadian gesteuert wird und sich mit der Tageszeit ändert. Dies äußert sich z. B. in rhythmischen Fluktuationen der Genexpression proinflammatorischer Zytokine, darunter IL-1 β , TNF- α und IL-6 (Fonken et al., 2015). Dies lässt vermuten, dass sie je nach Tageszeit unterschiedliche Krankheitsreaktionen vermitteln können (Chi-Castañeda & Ortega, 2016).

Fonken et al. (2015) haben die rhythmischen Fluktuationen von Entzündungsfaktoren und die Uhrengenenexpression in Mikroglia im Hippocampus von Ratten untersucht (Fonken et al., 2015). In der Studie waren Versuchstiere einem 12:12h Hell-Dunkel-Zyklus ausgesetzt. Hierbei umfassten ZT0 bis ZT12 eine Lichtphase, ZT13 bis ZT24 eine Dunkelphase. Die Autoren berichteten, dass der Höhepunkt der Zytokin-Genexpression in der Mitte der Lichtphase, d. h. während ZT6 erreicht wird. Mikrogliazellen, die während der Lichtphase isoliert wurden, zeigten auch eine stärkere Reaktion auf eine Immunstimulation oder eine übermäßige Produktion von Zytokinen.

Griffin et al. (2019) berichteten über Korrelationen zwischen der zirkadianen Uhr, der Aktivierung von Gliazellen und resultierender Neuroinflammation (Griffin et al., 2019). Sie identifizierten Rev-erba, einen nukleären Rezeptor und Bestandteil der zirkadianen Uhr, als einen Mediator der Mikrogliaaktivierung und der Neuroinflammation. Die Deletion von Rev-erba führte zu einer spontanen Aktivierung der Mikroglia im Hippocampus, einer erhöhten Expression proinflammatorischer Transkripte und einer sekundären Astroglie. Im Gegensatz dazu wurde eine Reduktion der Neuroinflammation durch pharmakologische Aktivierung von Rev-erba beobachtet.

1.5 Neuroinflammation

Per Definition ist eine Inflammation ein biologischer Prozess als Reaktion auf Verletzung, Infektion und Trauma von Zellen oder Geweben. Eine Inflammation wird durch verschiedene zelluläre und humorale Komponenten des Immunsystems vermittelt und zielt darauf ab, eindringende Krankheitserreger zu eliminieren und die Wundheilung und Angiogenese einzuleiten (Carson, Thrash, & Walter, 2006). Ein erfolgreicher Mechanismus der Entzündungsreaktion eliminiert eingedrungene Krankheitserreger (Carson et al., 2006). Eine Entzündung innerhalb des ZNS wird als Neuroinflammation definiert. Neuroinflammation ist eine Reaktion, an der fast alle im ZNS vorhandenen Zellen, einschließlich Neuronen und Gliazellen - Astrozyten, Makroglia und Mikroglia - beteiligt sind (Shabab et al., 2017). Das Ausmaß der Neuroinflammation hängt in erster Linie von der Art, Dauer und Intensität des primären schädlichen Reizes ab. So kann das Ausmaß der Entzündung von maximal ausgeprägten Entzündungsprozessen mit Rekrutierung peripherer Immunzellen, Ödemen und Gewebeschäden, bis hin zu den chronisch persistierenden unterschweligen Entzündungsprozessen variieren (Schain & Kreisler, 2017). Die Entzündung im ZNS wird durch die Produktion von Zytokinen, Chemokinen, ROS und sekundären Botenstoffen vermittelt. Diese Mediatoren werden nicht nur von den Gliazellen des ZNS, die die zentrale Rolle bei der Entzündung spielen, sondern auch von Endothelzellen und peripheren Immunzellen freigesetzt (Shabab et al., 2017).

Die Auswirkungen der Neuroinflammation variieren im Kontext von Krankheit, Verletzung, Infektion oder Stress. Unter vielen Umständen, einschließlich ZNS-Verletzungen, gibt es ein Gleichgewicht von Entzündungs- und Reparaturprozessen. DiSabato et al. (2016) stellten in ihrer Arbeit verschiedene Formen der Neuroinflammation dar und verdeutlichten, dass die Aspekte von neuroinflammatorischen Prozessen sowohl positiv als auch negativ sein können (DiSabato et al., 2016). Als eine der wichtigsten Vorteile von Neuroinflammation definierten die Autoren eine bidirektionale Kommunikation zwischen dem Immunsystem und dem Gehirn. Zum Beispiel wird eine Aktivierung des peripheren Immunsystems durch das ZNS wahrgenommen. Diese erfolgt über verschiedene neurale und humorale Wege. Als Reaktion auf eine entsprechende periphere Immunaktivierung kommt es innerhalb des Gehirns zu einer mikroglialen Ausbreitung von Zytokinen und Chemokinen (Chen et al., 2012; Henry, Huang, Wynne, & Godbout, 2009). Die Konsequenz davon ist eine koordinierte Immunreaktion, welche der Bekämpfung von Krankheitserregern dient. Die neuroimmune Kommunikation und

die Signalausbreitung sind zytokinvermittelt und erfolgen z. B. durch die Freisetzung von IL-1 β , TNF- α und IL-6. Es ist wichtig anzumerken, dass die Dauer der Zytokin-Exposition kurz und die Wirkung vorübergehend ist, gekennzeichnet durch eine temporäre Aktivierung sowohl der Mikroglia als auch der Astrozyten (Norden, Trojanowski, Villanueva, Navarro, & Godbout, 2016). Diese Reaktion ist streng reguliert und wird schnell wieder aufgelöst (Norden & Godbout, 2013). Eine derartige Kommunikation zwischen Immunsystem und Gehirn erfolgt ohne einen Zusammenbruch der Blut-Hirn-Schranke, dem Eindringen von peripheren Immunzellen sowie erkennbare Neuropathologie (Dantzer, O'Connor, Freund, Johnson, & Kelley, 2008).

Schließlich dient eine akute neuroinflammatorische Antwort auf eine Verletzung einem bestimmten Zweck. Ein Beispiel dafür ist die Rekrutierung von Makrophagen zur Bekämpfung von Krankheitserregern. Die Rekrutierung von Immunzellen trägt dazu bei, den Wundheilungsprozess zu vervollständigen, da infiltrierende Makrophagen helfen, durch die Verletzung verursachte Debris zu beseitigen (DiSabato et al., 2016). Phagozytose der toten Zellen und des Myelins ist erforderlich, um eine Mikroumgebung zu schaffen, die der Reparatur förderlich ist (Barrette et al., 2008; Popovich et al., 1999). Somit induziert eine ZNS-Verletzung gleichzeitig Entzündungsreaktionen und Reparaturreaktionen (DiSabato et al., 2016).

Neuroinflammation wird zu einem schädigenden Prozess, wenn das Gleichgewicht zwischen Entzündungs- und Reparaturmechanismen unter bestimmten Umständen gestört wird. Als ein gutes Beispiel hierfür nannten DiSabato et al. (2016) die Reaktion auf chronische oder traumatische Ereignisse wie diffuse, penetrierende oder wiederholte Kopfverletzungen. Diese scheinen ein stärkeres neuroinflammatorisches Profil zu fördern, an dem sowohl Mikroglia als auch aus dem Knochenmark stammende Makrophagen beteiligt sind (Wohleb et al., 2014). Chronische, unkontrollierte Entzündungen sind durch eine erhöhte Produktion von Zytokinen (wie z. B. IL-1 β und TNF- α), ROS und anderen Entzündungsmediatoren gekennzeichnet. Diese Entzündungsmarker sind nach einem Trauma des ZNS stark ausgeprägt und werden von einer Rekrutierung sowie dem Einwandern von peripheren Makrophagen und Neutrophilen zum Ort der Verletzung begleitet. Folge von persistierenden niedriggradigen und chronischen Entzündungsreaktionen, die durch IL-1 β und IL-6 angetrieben werden, sind v. a. reduzierte neuronale Plastizität und kognitiven Beeinträchtigungen (DiSabato et al., 2016). Ein höheres Maß an chronischer Entzündung ist sehr schädlich für das Nervensystem und ist charakteristisch für neurodegenerative Erkrankungen (DiSabato et al., 2016).

Somit ist die präzise Regulation der Neuroinflammation äußerst wichtig und stellt ein komplexer Mechanismus dar, der sowohl vom angeborenen als auch vom adaptiven Immunsystem erreicht wird (González & Pacheco, 2014; Lyck & Engelhardt, 2012; Niranjan, 2018). Hierbei spielen Gliazellen entscheidende Rolle, denn sie bieten sowohl pro- als auch antiinflammatorische Funktionalität, was zur Aufrechterhaltung des Gleichgewicht zwischen Entzündungs- und Reparaturprozessen beiträgt (DiSabato et al., 2016).

1.5.1 Neuroinflammation und Neurodegeneration

Neuroinflammation ist an der Entwicklung und dem Fortschreiten vieler neurodegenerativer Erkrankungen beteiligt, darunter PD, AD, ALS und HD (Ising & Heneka, 2018; Niranjan, 2018). Die permanente Exposition gegenüber pro-inflammatorischen Botenstoffen, wie TNF- α und IL-1 β , die von chronisch aktiven Immun- und Gliazellen freigesetzt werden, scheint dabei eine wichtige Rolle zu spielen (Park et al., 2018). Mikroglia- und Astrozyten werden normalerweise durch verschiedene Schadstoffe, wie toxische Metaboliten, traumatische Ereignisse, Verletzungen, Viren, Mikroben etc. (Boche et al., 2013) über verschiedene Rezeptoren, darunter auch durch PRRs, aktiviert (Debye et al., 2018). Grundsätzlich zielt die Aktivierung der Gliazellen auf die Neuroprotektion ab, da sie Krankheitserreger abtöten und eliminieren. Dennoch kann eine gestörte Regulation pro- und antiinflammatorischer Prozesse oder eine erhöhte, exzessive oder chronische Aktivierung von Mikroglia zu einer sekundären Schädigung von Nervenzellen führen (DiSabato et al., 2016; Park et al., 2018; Schain & Kreisler, 2017). Dies äußert sich in Struktur- und Funktionsstörung gesunder Neuronen, synaptischer Dysfunktion und neuronalem Zelltod. Diese Prozesse manifestieren sich klinisch als chronische Progression der neurodegenerativen Erkrankung (Schain & Kreisler, 2017; Voet et al., 2019).

1.5.2 Pattern Recognition Rezeptoren

Die molekularen Mechanismen von Neuroinflammation und Neurodegeneration sind sehr komplex und vielfältig. In den letzten Jahren wurde die Rolle von PRRs und Inflammasomen mit besonderem Interesse untersucht. PRRs dienen als wichtige molekulare Verbindungen zwischen Gewebeschädigung und Entzündung, indem sie Pathogen-Associated Molecular

Patterns (PAMPs) und Damage- Associated Molecular Patterns (DAMPs) erkennen (Lamkanfi & Dixit, 2014). PAMPs sind strukturelle Motive von Krankheitserregern wie Bakterien, Viren und Pilzen und werden durch PRRs erkannt (Harris & Raucchi, 2006). DAMPs sind körpereigene Zellbestandteile, die freigesetzt werden, wenn Zellen geschädigt werden. Dazu gehören extrazelluläres Adenosintriphosphat (ATP), zytosolische Desoxyribonucleinsäure (DNA)-Materialien und Hyaluronfragmente, Harnsäuren, S100-Proteine, K⁺-Efflux, ROS und andere (Sangiuliano, Pérez, Moreira, & Belizário, 2014; Thundyil & Lim, 2015). Zu den bekanntesten PRRs gehören Toll-like-Rezeptoren (TLRs) und NOD-like-Rezeptor (NLRs) (Barbé, Douglas, & Saleh, 2014). TLRs erkennen extrazelluläre PAMPs oder DAMPs und lösen verschiedene intrazelluläre Signalkaskaden aus (F. Bauernfeind et al., 2011). Dazu gehört die Nuclear Factor-Kappa B (NF-κB)-vermittelte Transkription des *pro-IL-1β*-Gens (Lamkanfi & Dixit, 2014). NLRs sind intrazellulär lokalisiert und erkennen sowohl Zellschäden als auch Infektionen, die im Zytosol auftreten (F. Bauernfeind et al., 2011). NLRs sind Bestandteile von Multiproteinkomplexen, die als Inflammasome bezeichnet werden (Barbé et al., 2014; Lamkanfi & Dixit, 2009).

1.5.3 Inflammasome

Inflammasome stellen intrazelluläre Proteinkomplexe dar, sind Bestandteile des unspezifischen Immunsystems und vermitteln die Produktion und Freisetzung von pro-inflammatorischen Zytokinen (F. Bauernfeind et al., 2011). Im ZNS werden sie von Mikroglia, Astrozyten, Makrophagen und Neuronen exprimiert (Albornoz, Woodruff, & Gordon, 2018; Walsh, Muruve, & Power, 2014). Inflammasome bestehen aus dem NLR, einem Apoptosis-Associated Speck-Like Protein Containing a CARD (ASC) und der pro-Caspase1 (pCasp1) (Lamkanfi & Dixit, 2009; Lammerding, Slowik, Johann, Beyer, & Zendedel, 2016; Saresella et al., 2016) (Abb. 2). Die Gruppe der NLRs hat eine gemeinsame Grundstruktur: C-Terminus enthält eine Leucin-Rich-Repeat (LRR)-Domäne, zentral ist Nucleotide-Binding Oligomerization (NOD/NBD) -Domäne lokalisiert, die die Oligomerisierung des Rezeptors bewirkt und N-Terminus stellt die Effektor-Domäne dar, welche die Signaltransduktion vermittelt (Lamkanfi & Dixit, 2009; Walsh et al., 2014). Bei Säugetieren werden NLRs nach dem Typ ihrer N-Terminalen Domäne klassifiziert, wobei NLRPs mit einer Pyrin-Domäne (PYD) und NLRC mit einer Caspase-Recruitment-Domain (CARD) am besten untersucht sind (Barbé et al., 2014; Walsh et al., 2014). Neben der NLR-Gruppe gibt es auch das Absent-In-Melanoma-2 (AIM2) Inflammasom, das ebenfalls an der Produktion und Freisetzung der proinflammatorischen

Zytokine beteiligt ist (Lang et al., 2018). In dieser Arbeit wird den NLRP1-, NLRP3-, NLRC4- und AIM2-Inflammasomen besondere Aufmerksamkeit gewidmet. ASC fungiert als Adapterprotein, das die Proteine der NLR-Familie über seine N-terminale Pyrin- und C-Terminale CARD-Domäne mit pCasp1 verbindet (Lamkanfi & Dixit, 2009; Walsh et al., 2014). Eine inaktive Vorstufe von Caspase-1 (Casp1) ist pCasp1. Nach der Zusammenlagerung des Inflammasoms erfolgt die autokatalytische Spaltung von pCasp1, was zu der Bildung der

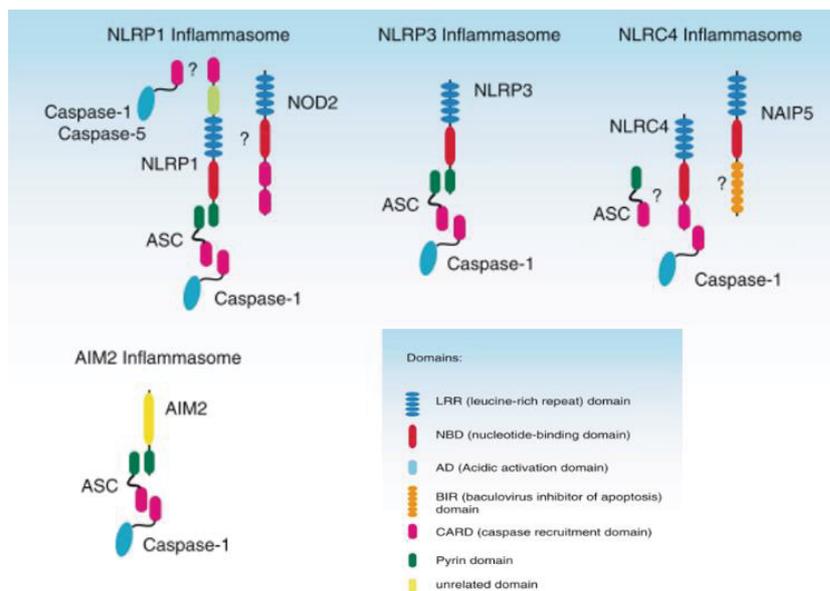


Abbildung 2: Struktur der Inflammasomen NLRP1, NLRP3, NLRC4, AIM2 (F. Bauernfeind et al., 2011)

aktivierten Caspase 1-Form (aCasp1), mit je einer p10- und einer p20-Untereinheit führt (Boucher et al., 2018). Aktive Casp1 führt zur proteolytischen Spaltung der inaktiven Vorstufen der IL-1-Familie (unter anderem pro-IL-1 β , pro-IL-18) und löst eine proinflammatorische Reaktion aus (Johann et al., 2015; Walsh et al., 2014). Die Bildung und Aktivierung der

Inflammasomen erfolgt nach der Erkennung von PAMPs oder DAMPs (Lang et al., 2018).

Die Aktivierung des NLRP3-Immunasoms ist besonders gut erforscht. Hier erfolgt die Produktion von pro-inflammatorischen IL-s über zwei unabhängige Wege (Abb. 3). Zunächst gibt es den *Priming step*, d. h. PAMPs aktivieren die membrangebundenen TLRs und induzieren intrazelluläre Signalkaskaden. In diesem Schritt kommt es zu einer NF-kB-vermittelten Transkription von pro-IL-1 β und NLRP-Protein. Die Zusammenlagerung und Aktivierung des Inflammasoms findet erst im nächsten Schritt, dem so genannten *Activation step*, statt (Van Opdenbosch & Lamkanfi, 2019). Die Aktivierung wird durch verschiedene Signale vermittelt, darunter Kaliumausfluss aus der Zelle, extrazelluläres ATP, ROS oder rupturierende Lysosomen. Beide Schritte sind für die vollständige Synthese und Sekretion von aktivem IL-1b und IL-18 nötig (F. Bauernfeind et al., 2011; Lamkanfi & Dixit, 2014).

NLRP3 und AIM2 aktivieren pCasp1 über ASC; andere Inflammasome wie NLRC4 und NLRP1 benötigen im Gegensatz dazu kein ASC und können pCasp1 direkt über ihre jeweiligen CARDs rekrutieren (Lehmann et al., 2018; Van Opdenbosch et al., 2014).

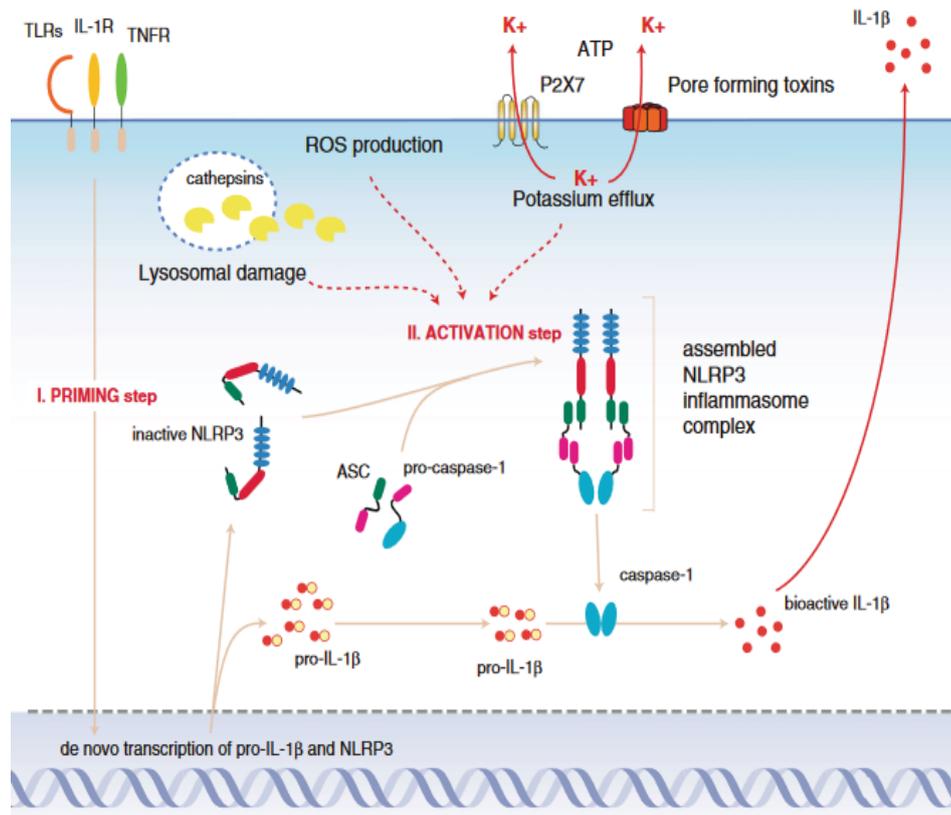


Abbildung 3: NLRP3-Inflammasom Aktivierung und IL-1β-Freisetzung. Im *Priming step* erfolgt die Aktivierung der TLRs und anschließend NF-κB-vermittelte Expressionserhöhung von *pro-Il-1β*- und Inflammasomgenen. Im nachfolgenden Schritt, dem so genannten *Activation step* kommt es zur Assemblierung und Aktivierung des Inflammasoms. Dies wird unter anderem durch Kaliumefflux, extrazelluläres ATP, ROS sowie rupturierende Lysosomen vermittelt (F. Bauernfeind et al., 2011)

1.5.4 Inflammasome und Neurodegeneration

Voet et al. (2019) stellten den aktuellen Wissensstand über die Rolle der Inflammasome bei verschiedenen neurodegenerativen Erkrankungen vor (Voet et al., 2019). Die Autoren berichteten, dass fehlgefaltete Proteinaggregate die Mikroglia stimulieren und die Produktion von Entzündungsmediatoren fördern. So hat beispielsweise die Genexpressionsanalyse von Alzheimer-Patienten eine höhere Expression von *Nlrp3*, *Asc*, *Casp1* und *Casp5* sowie der Zytokine IL-1β und IL-18 gezeigt (Saresella et al., 2016). Die Hemmung der NLRP3-

Intflammasomenaktivierung wurde mit der Unterdrückung der Neuroinflammation bei AD-Mäusen in Verbindung gebracht (Daniels et al., 2016).

Darüber hinaus wurde beobachtet, dass AIM2 die Ablagerung von A β erhöht und die Mikrogliaaktivierung und Zytokinproduktion fördert (Wu, Hung, Liu, & Hsueh, 2017). Eine starke Expression von *Aim2* wurde in Rückenmarksneuronen bei ischämischen Verletzungen beobachtet. In vivo und in vitro führte die Hemmung von *Aim2* zu einer verringerten neuronalen Schädigung und einer verminderten Expression von *Casp1* und *Il-1 β* (Li, Yu, Fang, Zhang, & Ma, 2019). Was NLRC4 angeht, so führt dies zu einem Anstieg der neuronalen Niveaus von A β durch aktivierte proinflammatorische Astrozyten (L. Liu & Chan, 2014).

In PD-Mausmodellen führen pathologische Proteinaggregate zur Aktivierung der Inflammasome (Voet et al., 2019). Die Bildung des NLRP3-Inflammasoms wird in Zellkulturen in menschlichen Monozyten und Mikrogliazellen durch α -Synuclein induziert (Codolo et al., 2013). Es wurde festgestellt, dass die Aktivität von Casp1 in diesem Prozess eine vielseitige Rolle spielt. In vitro spaltet aCasp1 α -Synuclein, dabei wird eine stark aggregationsanfällige Form erzeugt, die toxisch für Neuronen ist (Wang et al., 2016). Die Hemmung von aCasp1 führt zu einem verbesserten Überleben eines neuronalen PD-Zellmodells (Wang et al., 2016).

Die Expression von NLRP3, NLRC4, AIM2 und die Aktivierung von Casp1 in neuralem Gewebe wurde auch in einem Tiermodell für Amyotrophen Lateralsklerose (ALS) beobachtet (Johann et al., 2015). Die Analyse des postmortalen Rückenmarksgewebes von ALS-Patienten zeigte ebenfalls erhöhte Werte der NLRP3-, ASC-, Casp1- und IL-18-Expression, wobei vor allem Astrozyten vermehrt NLRP3 exprimierten (Johann et al., 2015).

1.6 Ziele der Arbeit

Gestörte zirkadiane Rhythmen im ZNS können zu einer Beeinträchtigung der Hippocampusfunktion führen (Gibson et al., 2010). Mögliche kausale Zusammenhänge zwischen Chronodisruption, Neuroinflammation und Neurodegeneration werden bereits intensiv diskutiert. Es wird vermutet, dass Chronodisruption zu einer Dysregulation des Immunsystems führt und damit direkt zur Pathogenese von neurodegenerativen Veränderungen beiträgt (Musiek & Holtzman, 2016). Komponente des angeborenen Immunsystems, wie z. B. Inflammasome, scheinen bei diesen Veränderungen eine bedeutsame Rolle zu spielen. Dennoch ist es bis jetzt noch unklar, über welchen molekularen Mechanismen eine Chronodisruption die Funktion des angeborenen Immunsystems im ZNS beeinflusst.

Ziel dieser Arbeit war die Überprüfung der Hypothese, dass eine Chronodisruption infolge von Dauerlicht (LL) für zwei Wochen, Komponenten des angeborenen Immunsystems im Hippocampus von C57BL/6J Mäusen aktiviert. Hierfür wurden die folgenden drei Kernfragen formuliert:

Führt eine Behandlung mit Dauerlicht bei Mäusen:

1. zu einer Veränderung des Allgemeinzustandes?
2. zu einer Gliose im Hippocampus?
3. zu einer veränderten Expression von Inflammasomkomponenten und Interleukinen?

Zum Beantworten der ersten Frage führten wir regelmäßige Kontrollen der Körpergewichte von Versuchstieren durch, analysierten lokomotorische Aktivitätsmuster und fertigten Blutausstriche an. Um die Auswirkung von LL auf Gliazellen zu untersuchen sowie Gliose im Hippocampus zu identifizieren, wurden mittels Immunhistochemie Astrozyten und Mikroglia gefärbt. Schließlich zum Beantworten der dritten Kernfrage nutzten wir methodisch qRT-PCR und Western Blot und untersuchten somit die Expression der folgenden Inflammasomen auf mRNA- und Proteinebene: NLRP1b, NLRP3, NLRC4, AIM2 und deren Komponenten - ASC, Casp1 sowie IL-1 β und IL-18.

Die Analyse des Zusammenhangs zwischen Chronodisruption und den oben erwähnten Entzündungsparametern ist von großer Bedeutung, insbesondere für Berufsgruppen, die permanent chronodisruptiven Arbeitsbedingungen ausgesetzt sind.

2 Material und Methoden

2.1 Allgemeine Labormaterialien

Blotting-Papier	580x600x1,5 mm, Carl Roth GmbH & Co. KG, Deutschland
Deckgläser	24x50 mm Engelbrecht Medizin- und Labortechnik GmbH
Einbettkassetten	Macro, weiß. Carl Roth GmbH & Co. KG, Deutschland
Falcon® 50 ml	Eppendorf AG, Deutschland
Glasküvetten	Carl Roth GmbH & Co. KG Deutschland
Glaswaren	VWR Internationals, Deutschland Eppendorf AG Deutschland
Objektträger	Star Frost 76 x 26 mm, advanced adhesive, geschliffen
Pipetten	VWR Internationals, Deutschland Eppendorf AG Deutschland
Pipettenspitzen	10 µl TipOne® Star Lab, 200 µl TipOne® Star Lab, 1000 µl Eppendorf AG Deutschland 5000 µl Eppendorf AG Deutschland
Polyvinylidenfluorid (PVDF) Blotting- Membran	Roche Diagnostics GmbH, Deutschland
Reaktionsgefäße	500 µl Eppendorf AG Deutschland 1500 µl Eppendorf AG Deutschland 5000 µl Eppendorf AG Deutschland

2.2 Chemikalien und Lösungen

Tabelle 1: Liste verwendeter Chemikalien

Chemikalie	Artikelnummer	Firma
100% Essigsäure	6755	Carl Roth GmbH & Co. KG, Deutschland
40% Acrylamid	3029.2	Carl Roth GmbH & Co. KG, Deutschland
4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)	R37606	Thermo Fischer Scientific
Agarose	SLA3607	Sciencelab.com
Aluminiumkaliumsulfat-Dedocahydrat (KAl(SO ₄) ₂)	A6435	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Ammoniumpersulfat (APS)	01-2119495973-19- 0004	RheinPerChemie GmbH
Bovine Serumalbumin (BSA)	0163.4	Carl Roth GmbH & Co. KG, Deutschland
Butanol	101990	Merck KGaA
Chemilumineszenz Substrat		Thermo Fischer Scientific
Zitronensäure	X863	Carl Roth GmbH & Co. KG, Deutschland
Comassie Brilliant Blau G 250	9598	Carl Roth GmbH & Co. KG, Deutschland
Desoxycholsäure (C ₂₄ H ₃₉ NaO ₄)	D6750	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
di-Natiumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	P030	Carl Roth GmbH & Co. KG, Deutschland
Entellan®	107961	Merck KGaA
Eosin	101424	Merck KGaA
Ethylendiamintetraessigsäure-Lösung (EDTA)	3690	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Fluoromount™	00-4958-02	Thermo Fischer Scientific
Formaldehydlösung	F8775	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Giemsa	109204	Merck KGaA
Glycin	3908.2	Carl Roth GmbH & Co. KG, Deutschland
Hämatoxylin	C107; C1071; C1075.	ProSciTech
Isofluran (Forene®)	B506	Abbvie GmbH
KH ₂ PO ₄	105101	Merck KGaA
May-Grünwald	101424	Merck KGaA
Methanol	67-56-1	Methanex Europe s.a.

Milchpulver	9999S	Cell Signaling Technology ®
Millipore-Wasser (H ₂ O)	MilliQ Reference A	Fischer Scientific
N, N, N', N'-Tetramethylethylenediamine (Temed)	411019 (T9281)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Natriumchlorid (NaCl)	S9888	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Natriumdodecyl-sulfat (SDS)	L3771	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Natriumhydrogenphosphat-Monohydrat (NaH ₂ PO ₄ xH ₂ O)	6346	Merck KGaA
Natriumhydroxid (NaOH)	106453	Merck KGaA
Natriumiodat (NaIO ₃)	HN17	Carl Roth GmbH & Co. KG, Deutschland
Paraformaldehyd (PFA)	104005	Merck KGaA
Peq-Gold TriFast	041218-15	Peqlab VWR company
Polyvinylidenfluorid (PVDF) Membran	3010040001	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Ponceau 2R pure	P7170	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Proteinstandard (für WB)	1610376	Precision Plus Protein™, Bio Rad Laboratores GmbH
Restore™ Western Blot Stripping Buffer	46439	Thermo Fischer Scientific
RNase freies Wasser	10977-035	Gibco®, Thermo Fischer Scientific
Sacharose	S9378	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Sudan Black B	593	AMRESCO, LLC
SYBR Green	330520	Promega
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris)	252859	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Triton™ X-100	X100	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Trizma® Base	T1503	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Trizma® Hydrochlorid C ₄ H ₁₁ NO ₃ (Tris-HCl)	T3253	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
TWEEN® 20	P2287	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂)	H1009	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Xylol ≥98,5%	CN80	Carl Roth GmbH & Co. KG, Deutschland

Tabelle 2: Liste verwendeter Primärantikörper

Primärantikörper	Spezies	Bestellnummer	Firma	Verdünnung WB	Verdünnung IF
AIM2	Polyklonaler Rabbit AK	bs-5986R	Bioss	1:1000	—
Aktin	Monoklonaler Mouse AK	sc-47778	Santa Cruz Biotechnology	1:8000	—
ASC	Polyklonaler Rabbit AK	AG-25B-0006- C100	Adipogen	1:1000	—
Caspase1	Monoklonaler Mouse AK	AG-20B-0042- C100	Adipogen	1:1000	—
GAPDH	Polyklonaler Rabbit AK	sc-25778	Santa Cruz Biotechnology	1:3000	—
GFAP	Polyklonaler Rabbit AK	Z0334	DakoCytomation	1:100 000	1:500
IBA1	Polyklonaler Rabbit AK	019-19741	FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation	—	1:2000
IL-18	Polyklonaler Rabbit AK	sc-7954	Santa Cruz Biotechnology	1:1000	—
IL-1 β	Polyklonaler Rabbit AK	bs-812R	Bioss	1:2000	—
NLRC4	Polyklonaler Rabbit AK	06-1125	Millipore	1:1000	—
NLRP1	Polyklonaler Rabbit AK	4990S	Cell Signaling	1:1000	—
NLRP3	Polyklonaler Rabbit AK	10021R	Bioss	1:1000	—
TLR4	Monoklonaler Mouse AK	sc-293072	Santa Cruz Biotechnology	1:1000	—

Tabelle 3: Liste verwendeter Sekundärantikörper

Sekundärantikörper	Konzentration	Spezies	Bestellnummer	Firma
Anti-Mouse IgG	1:50 000	Goat	Cat# 40320-200	Alpha Diagnostic
Anti-Rabbit IgG	1:50 000	Goat	Catalog AI-1000, Lot No. ZA0911	Vector Laboratories
Alexa Fluor Anti-Rabbit IgG 488	1:500	Goat	A11034	Thermo Fisher Scientific
Alexa Fluor Anti-mouse IgG 568	1:500	Goat	A11031	Thermo Fisher Scientific

Tabelle 4: Liste verwendeter Primer

Primer	Sequenz
AIM2 antisense	TTCAAGGAGCAGCATCAGGA
AIM2 sense	GCAAAACAAAGTGCGAGGAA
ASC antisense	GCCATACGACTCCAGATAGTAGC
ASC sense	CTTGTCAGGGGATGAACTCAAAA
Casp1 antisense	CCCCTGACAGGATGTCTCCA
Casp1 sense	CCGTGGAGAGAAACAAGGAGT
IL18 antisense	ACACAAACCCTCCCCACCTA
IL18 sense	TGCCAAAAGGAAGATGATGC
IL1B antisense	TCCACAGCCACAATGAGTGA
IL1B sense	GACGGACCCCAAAAGATGAA
IL33 antisense	ATCCACACCGTCGCCTGATT
IL33 sense	AAGACCAAGAGCAAGACCAGGT
NLRC4 antisense	GCCAGACTCGCCTTCAATCA
NLRC4 sense	ATCGTCATCACCGTGTGGAG
NLRP1a antisense	AGTGGGCGTGGCAGAACAAA
NLRP1a sense	ACCCATTTTCAGGCAGCTCACA
NLRP1b antisense	TTGTGTTCTCAGCCCGCACT
NLRP1b sense	AGCCCTCAAAGATGCCCTT
<i>NLRP3 antisense</i>	TGTGCAGACCTCCCCAATGT
<i>NLRP3 sense</i>	TGACCCAAACCACCAGTGT
TLR4 antisense	GAGGCCAATTTTGTCTCCACA
TLR4 sense	ATGGCATGGCTTACACCACC

Tabelle 5: Liste verwendeter Geräte

Gerät	Firma
Digitales pH-Messgerät	VWR International GmbH
Feinwaage	Kern KB
Fluoreszenz-Mikroskop BZ-900 BIOREVO	Keyence
Gefrierschrank	Liebherr Hausgeräte Ochsenhausen
Geldokumentation	Phase, Lübeck Deutschland
Gelelektrophorese Kammer	Bio-Rad
Homogenisator	Precellys® Evolution
Lichtmikroskop	Leitz Wetzlar
Magnetrührer	IKA-Combimag RCO
Mastercycler pro	Eppendorf
Mikroplatten-Reader	Fluostar Omega, BMG Labtech GmbH
Mikrotom	MICROM HM 360
Milli-Q	Merck
Nanodrop 2000	Thermo Scientific
Paraffin-Einbettssystem	MEDITE; TES Valida®
Paraffin-Streckbad	GFL 1052
PCR Maschine	Eppendorf
Power Pac	Bio-Rad, Peqlab
Schüttler	Star Lab
StepOnePlus™ Real-Time PCR System	Applied Biosystems
Tank Blot Gerät	Bio-Rad
Thermocycler	Eppendorf
Tierhaltungsschänke	Scantainer Classic, Scanbur
Tube Roller	Star Lab
Vortex	Neolab
VWR Gel Documentation System	VWR Chemi Only
Wärmeschrank	Memmert
Zentrifuge 5810R	Eppendorf, Neolab

2.3 Software

2.3.1 VWR® Image Capture Software

VWR® Image Capture Software ist ein Programm, das u. a. die Dokumentation der Proteinbanden auf Western Blot Membran ermöglicht. Die Software ist mit einem Chemilumineszenzgerät (*VWR® CHEMI only*) gekoppelt. Durch die VWR® Image Capture Software können die Kameraintegration, die Belichtungszeit, das Objektiv, die Aufnahmeoptionen sowie die Autofokus-Konfiguration automatisch gesteuert oder manuell eingestellt werden. Für diese Arbeit erfolgte die Aufnahme der Proteinbanden einheitlich bei automatischer Einstellung.

2.3.2 ImageJ

ImageJ ist ein *Open Source* Bildbearbeitungsprogramm, in dem digitale Bilder gespeichert, bearbeitet und analysiert werden können. Es eignet sich besonders für die mikroskopisch angefertigten Aufnahmen, beispielsweise zur Bestimmung der Fläche eines ausgewählten Gebiets oder der Zellzahl.

2.3.3 BZ-II-Viewer

BZ-II-Viewer ist eine Betrachtungssoftware, die von der Firma Keyence entwickelt wurde. An das Fluoreszenz-Mikroskop - *Keyence (BZ-9000 BIOREVO)* gekoppelt ermöglicht diese Software die Aufnahme, Bearbeitung und Analyse histologischer Präparate. Mithilfe dieses Programms können optimale Einstellungen vorgenommen werden. Es ermöglicht sowohl die Betrachtung einzelner Kanäle als auch beliebige Überlagerungen verschiedenen Kanäle. Für diese Promotionsarbeit wurden die Übersichtsbilder mit einem 10x –Objektiv und Detailaufnahmen mit einem 40x – Objektiv aufgenommen.

2.3.4 GraphPad Prism 5.0

Das Programm GraphPad Prism 7.05 der Firma *GraphPad Software* ist eine Statistiksoftware zur Analyse und Auswertung quantitativ erhobener Daten. Die Software ist ebenfalls zur Erfassung, Organisation, Verarbeitung und graphischen Darstellung von Daten geeignet.

2.4 Allgemeine Richtlinien

Alle Versuche im Rahmen dieser Promotionsarbeit wurden gemäß den aktuellen Richtlinien für Tierversuche des Landesamts für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz (LANUV) Nordrhein-Westfalen sowie des geltenden deutschen Tierschutzgesetzes (TierSchG) durchgeführt. Für die durchgeführten Experimente lag eine Tierversuchsgenehmigung mit dem Aktenzeichen 81-02.04.2018.A274 vor. Die Organentnahmen erfolgten in der Zentralen Einrichtung für Tierforschung und Tierschutzaufgaben (ZETT) der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.

2.5 Mausmodell und Haltungsbedingungen

In den vorliegenden Experimenten wurden insgesamt 20 acht bis zwölf Wochen alte männliche C57BL/6J – Mäuse (*Mus musculus*) eingeschlossen. Dieses Mausmodell wurde von der Firma Janvier Labs (Le Genest-Saint-Isle, Frankreich) bereitgestellt. Da *Mus musculus* genetische Homologie zum menschlichen Genom aufweist und laborexperimentelle Manipulationen mit dieser Spezies bereits etabliert sind, wurde dieses Mausmodell für das hiesige Versuchsvorhaben ausgewählt.

Die Tiere wurden in der Zentralen Einrichtung für Tierforschung und Tierschutzaufgaben der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf in einem Käfigkabinett von Tierhaltungsschränken (*Scantainer* von Firma *Scanbur Denmark*) mit freiem Zugang zu Futter und Wasser gehalten. Nutzung von *Scantainer*-Schrank in Tierversuche ist eine gut etablierte Methode, denn diese diversen Vorteile bietet. Eine der wichtigsten Aspekte ist hierbei die Möglichkeit, Tierversuche zu standardisieren. Diese wird aufgrund der konstanten sowie manuell einstellbaren Bedingungen innerhalb des Schrankes erreicht. Dazu gehören unter anderem konstante Temperatur (20°C) und Luftfeuchtigkeit sowie streng kontrollierte Belichtungszeiten.

2.6 Versuchsaufbau

Alle Tiere wurden nach ihrer Ankunft, zur Eingewöhnung, zuerst 10 Tage bei 12 h Licht (250-300 lx Beleuchtungsstärke) / 12 h Dunkelheit (2 lx Beleuchtungsstärke) (LD) gehalten. Die Mäuse wurden in zwei Gruppen, je 10 Tiere eingeteilt (Tab. 6). Um den Einfluss von Dauerlicht auf entzündliche Prozesse im Hippocampus zu untersuchen, wurden die

Beleuchtungsverhältnisse für die beiden Gruppen wie folgt angepasst: Gruppe 1 (Kontrollgruppe) wurde weitere 14 Tage bei 12 h Licht (250-300 lx Beleuchtungsstärke) / 12 h Dunkelheit (2 lx Beleuchtungsstärke) (LD) gehalten. Die zweite Gruppe (Dauerlichtgruppe) wurde nach der Eingewöhnungsphase für 14 Tage bei Dauerlicht gehalten (250-300 lx Beleuchtungsstärke) (LL).

Am Versuchsende wurden die Tiere zur Blut- und Gewebeprobenentnahme eliminiert. Jeweils 5 Tiere der Kontrollgruppe und 5 Tiere der Dauerlichtgruppe wurden für histologische Analysen perfundiert (n=10). Das nach der Perfusion entnommene Gewebe wurde in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert und für die Immunfluoreszenz-Färbung (IF) in Paraffin eingebettet. Bei den restlichen 5 Mäusen der Kontrollgruppe und 5 Mäusen der Dauerlichtgruppe (n=10) erfolgte eine native Probenentnahme. Das native Gewebe wurde sofort nach der Entnahme in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert. Diese Proben wurden im weiteren für molekularbiologische Untersuchungen (RNA- und Proteinanalysen) aufgearbeitet. In der nachfolgenden Tabelle sind die für die vorliegende Arbeit verwendeten Tiere und Untersuchungsmaterialien aufgelistet (Tab. 7).

Tabelle 6: Versuchsaufbau

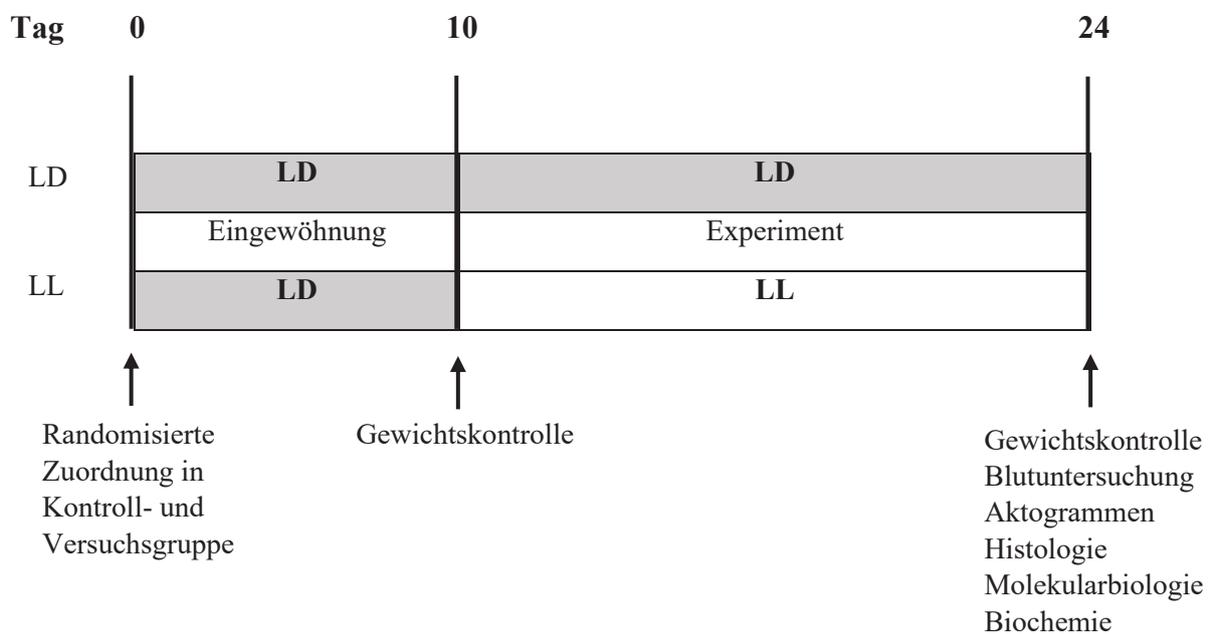


Tabelle 7: Untersuchungsmaterial

Bedingung	Anzahl der Tiere	Material	Konservierung
LD	n=5	Gehirn	Paraffineinbettung
LL	n=5	Gehirn	Paraffineinbettung
LD	n=5	Gehirn	Schockgefrieren
LL	n=5	Gehirn	Schockgefrieren

2.7 Tierversuche

2.7.1 Infrarotdetektoren

Die Bestimmung und kontinuierliche Erfassung der spontanen Bewegungsaktivitäten erfolgte mittels Infrarotdetektoren (*Mouse-e-motion, Hamburg*). Die Aktivität des Bewegungsapparates wurde kontinuierlich in 6-min-Intervallen aufgezeichnet. Aktogramm, Aktivitätsprofile, Aktivitätsbeginn und Chi-square-Periodogramme wurden mit der Clocklab-Software (*Actimetrics, Wilmette, IL*) berechnet.

2.7.2 Körpergewichtskontrollen

Um herauszufinden ob und welchen Einfluss Dauerlicht auf das Gewicht der Versuchstiere hat, wurden die Mäuse insgesamt drei Mal gewogen. Die erste Gewichtsmessung erfolgte an dem Tag als die Mäuse geliefert wurden, vor Einbringen der Mäuse in die Tierhaltungsschränke (*Scantainer, Scanbur Denmark*). Ein zweites Mal wurden die Tiere nach der 10-tägigen Eingewöhnung und vor Versuchsbeginn. Die letzte Gewichtsmessung fand am letzten Versuchstag statt, kurz bevor die Mäuse eliminiert wurden. Die erhobenen Daten wurden dokumentiert und statistisch ausgewertet.

2.7.3 Blutentnahme und Anfertigung der Blutaussstriche

Die Tötung der Mäuse erfolgte über eine Aufsättigung von Isofluran auf 5% der Umgebungsluft. Diese entsprach bei einem von uns verwendeten Exsikkator einer

Isofluranmenge von ca. 1 ml, was für Mäuse eine Überdosis darstellt und zum irreversiblen Herz- und Atemstillstand sowie Verlust der Schutzreflexe führt. Unter Narkose erfolgte die Eröffnung des Thorax und das Einbringen einer Kanülenspitze in den rechten Ventrikel. Um Koagulation und Verklumpung der Thrombozyten zu verhindern, wurde die Aufziehkanüle vor der Blutentnahme mit Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) beschichtet. Ausstreichen der Blutproben erfolgte auf den entfetteten Objektträgern von Firma *Starfrost®* (76 x 26 geschliffen). Die Blutausrichhe wurden zunächst bei Raumtemperatur (RT) luftgetrocknet und anschließend nach Pappenheim (May-Grünwald-Giemsa) gefärbt. Zählung und Auswertung der kernhaltigen Blutzellen erfolgten lichtmikroskopisch (*Leitz Wetzlar*) und mithilfe der Schilling-Methode.

2.7.4 Transkardiale Perfusion

Die transkardiale Perfusion erfolgte bei 10 Tieren – jeweils fünf aus der LD- und der LL-Gruppe. Nach der Eröffnung des Thorax und der Blutentnahme erfolgte eine Injektion von etwa 20 ml PBS-Lösung über den linken Ventrikel, gefolgt von ca. 200 ml Perfusionslösung (Zusammensetzung gemäß Tab. 10). Nach abgeschlossener Perfusion wurden die Mäuse dekapitiert und das Gewebe über Nacht bei 4°C in der Perfusionslösung nachfixiert. Danach wurde das Gehirn aus dem Schädel entnommen und für die Paraffineinbettung vorbereitet.

2.7.5 Native Probenentnahme

Zur Gewinnung nativer Gewebeproben erfolgte die Präparation der restlichen 10 Tiere aus der Kontroll- und Dauerlichtgruppe. Nach der Eröffnung des Thorax und der Blutentnahme erfolgte eine Injektion von etwa 20 ml PBS-Lösung über den linken Ventrikel, um das Gewebe größtenteils von Blut zu befreien. Danach wurden die beiden Hippocampi herauspräpariert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

2.7.6 Paraffineinbettung

Die fixierten Gehirne wurden in beschriftete Einbettkassetten überführt und für mehrere Stunden in Leitungswasser gespült. Durch das Einlegen in eine aufsteigende Alkoholreihe

(50%, 70%, 95%, 100% Ethanol) erfolgte die Dehydrierung des Gewebes. Zur Entfernung des Alkohols folgte die Spülung in Xylol. Anschließend wurden die Gehirne unter Verwendung eines Paraffin-Einbettungssystems (*MEDITE TES Valida®*) eingebettet, gehärtet und konserviert.

2.7.7 Anfertigung von Paraffinschnitten

Nach ausreichender Härtung des Paraffins wurde das Gehirngewebe getrimmt. Anschließend wurden mithilfe eines Mikrotoms (*MICROM HM 360*) 5 µm dünne Gewebeschnitte angefertigt. Diese wurden auf 75 x 26 mm große, mit destilliertem Wasser benetzte Objektträger der Marke *Star Frost® (Advanced Adhesive, geschliffen)* aufgezogen und bis zur vollständigen Streckung auf einer ca. 35°C heißen Wärmeplatte getrocknet. Die weitere Trocknung erfolgte über Nacht in einem 42°C warmen Inkubator.

2.8 Färbungen

2.8.1 Färbung nach Pappenheim

Für das differenziale Blutbild wurden die Blutausstriche nach Pappenheim (May-Grünwald-Giemsa) gefärbt. Die Pappenheim-Färbung ist die hämatologische Standardfärbung. Die verwendete Färbelösung setzt sich aus Eosin, Giemsa und Methylenblau zusammen, die in Methanol gelöst werden. Es entsteht eosinsaures Methylenblau. Bei der Pappenheim-Färbung färben sich Zellkerne blau-violett, die Granula der neutrophilen Granulozyten hell-violett, die der basophilen dunkelblau-violett und die der eosinophilen Granulozyten ziegelrot. Thrombozyten erscheinen violett. Das Zytoplasma der Lymphozyten und der Monozyten färbt sich blau. Die Erythrozyten stellen sich rot dar. Blutausstriche wurden nach intensiver Lufttrocknung direkt gefärbt.

Die Färbung wurde nach dem folgenden Protokoll (Tab. 8) durchgeführt:

Tabelle 8: Protokoll für die Färbung nach Pappenheim

Schritt	Lösung	Prozess	Dauer
1.	Methanol	Fixierung	10 min
2.	1 Teil May-Grünwald + 1 Teil Färbe-Puffer	Abtropfen lassen, keine Zwischenwässerung	7 min
3.		Abtropfen lassen, keine Zwischenwässerung	
4.	1 Teil Giemsa + 6 Teile Färbe-Puffer	“wässrige“ Färbung	20 min
5.	Färbe-Puffer	Differenzierung	10 sec
6.	Färbe-Puffer	Differenzierung	4 min
7.	Färbe-Puffer	Differenzierung	3 min

Nachbehandelnd wurden die noch feuchten Präparate von der Unterseite abgewischt und an der Luft bei RT getrocknet. Darauf folgte das Eindecken mit Entellan® unter Verwendung von Xylol als Lösungsmittel. Abschließend wurden die Präparate bei RT getrocknet und lichtmikroskopisch ausgewertet.

2.8.2 Differenzierung des Blutbildes

Die Auswertung der gefärbten Blutausrichre erfolgte manuell lichtmikroskopisch durch ein *Leitz Wetzler* Mikroskop. Die Differenzierung und Zählung der weißen Blutkörperchen wurde mithilfe der Shilling's Tabelle durchgeführt. Zunächst wurden die Objektträger mit einem Objektiv (10x Vergrößerung) mikroskopiert, da sich hiermit die optimale Ausstrichregion und die Zelldichte beurteilen lassen. Als optimal wurden die Ausstrichregionen definiert, die sich als Monolayer darstellten, d. h., die Erythrozyten liegen nah aneinander, sodass keine weiteren Erythrozyten in die Zwischenräume passen. Gleichzeitig durften sich die Erythrozyten nicht gegenseitig überlappen. Nach Identifizierung der optimalen Regionen erfolgten Mikroskopieren in 20x Vergrößerung und dabei Zählung der kernhaltigen Zellen. Pro Ausstrich wurden 200 kernhaltige Zellen ausgezählt und als Granulozyten (stabkernig, segmentkernig, neutrophil, eosonophil, basophil), Monozyten und Lymphozyten identifiziert.

2.8.3 Immunfluoreszenz (IF)-Färbung von Hippocampus

Die Methode der IF-Färbung nutzt Antikörper, an die ein fluoreszierender Farbstoff (Fluorochrom) gebunden ist, um spezifische Antigene zu detektieren. Für Vergleichbarkeit wurden vor IF-Färbung Hippocampus-Schnitte immer von einer bestimmten Region ausgewählt. Hierzu orientierten wir uns auf Commissura anterior. Zur Durchführung von IF-Färbung erfolgte zunächst die Entparaffinierung der Gewebeschnitte durch Inkubation in Xylol und anschließend Rehydrierung in einer absteigenden Alkoholreihe mit 100%, 96%, 70% Ethanol und abschließend Aqua dest. Nach mehrmaligem Waschen in PBS wurden die Objektträger zur Antigendemaskierung in Citrat-Puffer (Zusammensetzung gemäß Tab. 10) für 4 min bei 800 W in der Mikrowelle aufgeköcht und anschließend bei 180 W für weitere 20 min erhitzt. Nachdem sich die Schnitte 15 min abgekühlt hatten, wurden sie drei Mal im PBS gewaschen und in eine Feuchtkammer überführt. Zur Blockierung der unspezifischen Bindestellen erfolgte eine einstündige Inkubation mit 5% Goat-Serum (in PBS 1:20) bei RT. Danach wurde der erste, mit Blockierungslösung verdünnte, primäre Antikörper (Tab. 2) aufgetragen und bei 4°C über Nacht inkubiert. Auf eine Negativkontrolle wurde nur Serum ohne primären AK aufgetragen. Am nächsten Tag wurden die Schnitte mit PBS gewaschen und anschließend mit einem zweiten Fluoreszenz-gekoppelten Sekundärantikörper (Tab. 3) für eine Stunde bei RT inkubiert. Anschließend erfolgte die Behandlung mit 0,3% Sudan-Schwarz-Lösung für 5 min um unspezifische Hintergrundfluoreszenz zu minimieren. Anschließend erfolgte die Zellkernfärbung mit 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)-Lösung (2 Tropfen DAPI gelöst in 1 ml PBS). Nach mehrmaligem Waschen in PBS wurden die Objektträger mit *Fluoromount*TM eingedeckt.

2.8.4 Mikroskopische Aufnahmen der IF-Färbungen

Die mikroskopische Aufnahme erfolgte durch das Fluoreszenz-Mikroskop *BZ-9000 BIOREVO* von der Firma *Keyence*. Die Betrachtungssoftware war der *BZ-II-Viewer* (Fa. *Keyence*). Zunächst erfolgten Übersichtsaufnahmen des gesamten Gehirnschnittes mit einem 10x-Objektiv, und anschließend Detailaufnahmen von Hippocampus-Formation (Cornu ammonis und Gyrus dentatus) mit dem 40x Objektiv. Die Einstellung der Belichtungszeit (*exposure time*) wurde für alle Aufnahmen innerhalb eines Antigens einheitlich verwendet (Tab. 9).

Tabelle 9: Einstellungsparameter für mikroskopische Aufnahmen der IF-Färbungen von Hippocampus

	exposure time	Fluoreszenzfarbe	Gewebe
GFAP	+1/13	rot	Hippocampus
IBA1	+1/2,5	grün	Hippocampus

- GFAP - glial fibrillary acidic protein

- IBA1 - ionized calcium-binding adapter molecule 1

2.8.5 Quantifizierung der gefärbten Gewebeschnitte

Pro Maus wurden 2x2 Schnitte analysiert. Die ausgewerteten Schnitte hatten einen Mindestabstand von ca. 100 µm um eine Mehrfachauswertung von derselben Zelle zu vermeiden. Zur Analyse der relativen Proteinexpression im Hippocampus, wurde mithilfe der Software ImageJ die positiv gefärbte Fläche von GFAP bzw. IBA1 bestimmt. Zunächst erfolgte die Umwandlung der Rot-Grün-Blau (RGB)-Bilder in 8-Bit-Graustufen. Der Schwellenwert (*Threshold*) wurde innerhalb eines Antigens einheitlich mit einem Filter festgelegt (für GFAP: *Default*; für IBA1: *Li*). Zur Analyse der Gesamtfluoreszenz wurde in jedem Schnitt der Hippocampus ausgewählt und positiv gefärbte Fläche gemessen.

2.9 Molekularbiologische Untersuchungen

2.9.1 RNA-Aufreinigung

Ein Hippocampus pro Maus wurde mit jeweils 1 ml peqGOLD TriFast-Lösung in Homogenisierungsröhrchen der Firma *Precellys*® überführt. Die Homogenisation erfolgte 20 sec bei 5000 rpm mithilfe eines *Precellys*® *Evolution*. Anschließend wurden die Proben auf Eis inkubiert, bis der Schaum zerfiel und danach 5 min bei RT gelagert, um die vollständige Dissoziation der Nukleoproteinen-Komplexen sicherzustellen. Anschließend wurden die Proben in 1,5ml Eppendorf Reaktionsgefäße überführt und mit 200 µl Chloroform mittels Vortexens gut gemischt. Nach einer 10-minütigen Inkubation auf Eis inkubiert erfolgte ein Zentrifugationsschritt für 20 min bei 13.000rpm und 4°C. Dabei kommt es zu einer Phasentrennung. Zur Fällung der RNA wurde die mittlere wässrige Phase vorsichtig abgenommen, in ein 1,5 ml Eppendorf Reaktionsgefäß überführt und mit 500 µl Isopropanol

versetzt. Die Lösung wurde gut gemischt und für 15 min auf Eis inkubiert. Im Anschluss erfolgte eine Zentrifugation für 30 min bei 13.000rpm und 4°C Temperatur. Der Isopropanolüberstand wurde vorsichtig abgenommen und das entstandene RNA-Präzipitat zweimal mit 1 ml 75% eiskaltem Ethanol gewaschen. Die Waschschriffe erfolgten durch Zentrifugation für 10 min bei 13000rpm und 4°C. Der Überstand wurde verworfen und das RNA-Pellet für 10 min beim RT getrocknet. Nach Trocknung wurde das RNA-Pellet in 12µl RNase-freiem Wasser resuspendiert.

Zur Bestimmung der Konzentration und Reinheit der gewonnenen RNA, erfolgte eine photometrische Messung am *Nanodrop 2000*. Als BLANK wurde RNase-freies Wasser verwendet.

2.9.2 cDNA-Synthese

Die isolierte Messenger-RNA (mRNA) wurde zunächst in komplementäre DNA (complementary DNA (cDNA)) umgeschrieben. Zunächst wurde pro Probe je 1 µg mRNA mit 11 µl ultrareinem Wasser (*Gibco®*, *Thermo Fischer Scientific*) vermischt und für 5 min bei 70°C denaturiert. Der Mastermix setzte sich pro Probe wie folgt zusammen: 4 µl 5x First Strand Puffer, 2 µl 0,1 M Dithiothreitol (DTT), 1 µl eines 10 mM Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTP)-Mix, 0,1 µl des Primers sowie 1 µl Moloney Murine Leukämie Virus Reverse Transkriptase (M-MLV-RT). Nach kurzer Zentrifugation wurde jede Probe mit 8,1 µl Mastermix versetzt und für 50 min bei 37°C inkubiert. Nach Inaktivierung der M-MLV-RT bei 70°C für 15 min, wurden die Proben kurz zentrifugiert. Von jeder Probe wurden 3µl abgenommen und in einem Eppendorf-Gefäß vermischt. Aus diesem unverdünnten cDNA-Pool durchschrittweise Verdünnung mit ultrareinem Wasser (1:1) eine Standardreihe hergestellt (Standard 1: 50% cDNA-Standard 7: 0,75% cDNA). Die restlichen Proben wurden im Verhältnis von 1:10 mit ultrareinem Wasser verdünnt.

2.9.3 Durchführung der qRT-PCR

Die Genexpression der Inflammasombestandteile wurde unter der Verwendung von Sybr-Green (*KAPA® VWR Life Science Competence Centre*, Erlangen, Deutschland) und qRT-PCR-Methode untersucht (*Real-Time-Cycler StepOne Plus* von Firma *Applied Biosystems*).

Für den qRT-PCR Master-Mix wurden pro Probe je 0,5 µl Sense (s)- und Anti-Sense (as)-Primer (Tab. 4) sowie 2 µl ultrareines Wasser und 5 µl SYBR-Green in einem Eppendorf-Gefäß gemischt. In jedes Well einer 96-Well-Platte wurden jeweils 8 µl des Master-Mix vorgelegt. Danach erfolgt die Zugabe von jeweils 2 µl Standard, Probe oder ultrareinem Wasser (Negativkontrolle). Die Standards wurden im Dublett und die Proben im Triplet gemessen. Anschließend wurden die Platten einmalig bei 1.000 rpm zentrifugiert und in den *Real-Time-Cycler* gestellt.

Zur vergleichenden Quantifizierung wurde die Expression dreier Referenz-Gene Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH), Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase (HPRT) und Hitzeschockprotein 90 (HSP90) ermittelt und mithilfe der qBase Plus-Software (*qBase Biogazelle*, Belgien) analysiert. Die jeweilige Expression der Zielgene wurde als Verhältnis zur Referenzgen-cDNA angegeben. Die Reinheit des Genproduktes wurde mithilfe einer Schmelz-Kurve überprüft.

2.10 Immunologische und biochemische Untersuchungen

2.10.1 Proteinaufreinigung

Die Lysierung des Hippocampus erfolgte in eiskaltem Radioimmunpräzipitationsassaypuffer (RIPA), welcher einen Protease- und Phosphataseinhibitor beinhaltet (Zusammensetzung gemäß Tab. 10). Die Gewebstückchen wurde mit 400 µl Lyse-Puffer versetzt und anschließend in einem Homogenisator *Precellys® Evolution*, bei 5000 rpm für 60 sec, zerkleinert. Das entstandene homogenisierte Gewebe wurde für 20 min bei 4°C inkubiert. Nach dem Zerfall der oberflächlichen Schaumschicht erfolgte die Zentrifugation der Proben bei 15000 rpm und 4°C für 20 min. Anschließend wurde der Überstand in ein neues Eppendorf Gefäß überführt und die Proteinkonzentration bestimmt. Diese erfolgte in einer 96-well Platte unter Verwendung des Bicinchoninsäure(BCA)-Kit der Firma *Thermo Fisher Scientific*, nach dem Protokoll des Herstellers. Pro Well wurden entweder 10 µl Standard oder 10 µl der 1:5 verdünnten Probe aufgetragen. Die Standards und Proben wurden im Duplett gemessen. Die Messung der Proteinkonzentration erfolgte bei 562 nm mit dem *FLUOstar Omega (BMG LABTECH GmbH)* und der *Reader Control Software*.

2.10.2 Western Blot und SDS-Page

Zur Auftrennung, Detektion und Quantifizierung der gesuchten Proteine wurde die Methode des Western Blot durchgeführt. Die Auftrennung der Proteinbestandteile nach ihrem molekularen Gewicht erfolgte mittels Gelelektrophorese. Danach folgte der Transfer auf eine Trägermembran und anschließend die Detektion der Proteinbanden mithilfe des Gel Dokumentationssystems (*VWR® CHEMI only*). Die erfassten Banden wurden zur Auswertung mit dem Programm ImageJ densitometrisch ausgemessen. Zur Ladekontrolle wurde β -Aktin benutzt.

Durch eine Natriumdedocylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-Page) wurden die Proteine nach ihrem molekularen Gewicht aufgetrennt. Zunächst wurden die Glasscheiben, zur Herstellung von 1 mm dicken Polyacrylamidgelen, mit 70% Ethanol gereinigt und in eine Haltevorrichtung zur Herstellung der Gele gespannt. Anschließend wurde die Trenngellösung (8-14%) (Zusammensetzung gemäß Tabelle 9) hergestellt, in die Gel-Vorrichtung pipettiert und mit 500 μ l Butanol überschichtet. Nach 30 min Auspolymerisierung erfolgte die Herstellung des Sammelgels (Zusammensetzung gemäß Tab. 10). Im nächsten Schritt erfolgte das Einbringen der passenden Kämme, um die Taschen zur Probenaufnahme zu formieren. Nach weiteren 30 min Polymerisierung konnten die Kämme entfernt und die Gele in die Elektrophorese-Kammer übertragen werden. Jeweils 20 μ g Protein wurden mit 2x Laemmli-Puffer (Zusammensetzung gemäß Tab. 10) versetzt und für 5 min bei 95°C denaturiert. Zuerst wurde einmal 10 μ l Proteinstandard (*Precision Plus Protein™ WesternC™ Blotting Standards Bio Rad*) in die erste Geltasche pipettiert und im Anschluss wurden die Proben aufgetragen. Anschließend wurde eine Spannung von 80 V für 15 min angelegt, danach erfolgte die Erhöhung auf 140 V Spannung für 90 min.

Zum Transfer der Proteine vom Gel auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF) Membran wurde das Tankblot-Verfahren angewendet. Dabei erfolgte zunächst die Benetzung der Filterpapiere und Schaumstoffschwämme durch Tränkung in Transferpuffer (Zusammensetzung gemäß Tab. 10), sowie die Aktivierung der PVDF Membran durch das Einlegen in Methanol für 30 sec. Der Aufbau eines Tank-Blots erfolgte nach dem Sandwichverfahren: Auf Kunststoffgitter wurden Schaumstoffschwamm, Filterpapier und Membran, darauf das Gel und abschließend wieder Filterpapier und Schaumstoffschwamm aufgeschichtet. Der Blot lief zwei Stunden bei 4°C und 80 V Spannung.

2.10.3 Comassie Blau, Ponceau S-Färbung und Fotoentwicklung

Um zu kontrollieren, ob der Transfer stattgefunden hat, wurde die Membran nach dem Blotten für 30 sec mit Ponceau-S Lösung gefärbt. Auswaschung der Ponceau-S Färbung erfolgte erst mit destilliertem Wasser, anschließend mit 1 x Tris-buffered-saline-tween20 (TBST) (Zusammensetzung gemäß Tab. 10). Das Gel wurde über Nacht mit Comassie Blau angefärbt, um die Effizienz des Transfers der Proteine vom Gel auf die Membran zu beurteilen. Comassie Blau wurde durch das Waschen in einer Essigsäurelösung entfernt. Zur Blockierung der unspezifischen Bindungsstellen wurde die Membran für eine Stunde in einer 5% Milchpulverlösung bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Membran über Nacht bei 4°C mit dem primären Antikörper (Tab. 2), gelöst in 5% Milchpulverlösung, inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte nach dreimaligem Waschen der Membran für 10 min mit TBST und die Inkubation mit dem sekundären Antikörper (Tab. 3), der ebenfalls in einer 5% Milch gelöst war. Die Inkubationszeit betrug 2 Stunden gefolgt von dreimaligem Waschen mit TBST. Die Membranen wurden mit *Thermo Fisher Scientific ECL plus Western Blotting Substrat* ca. 1 min lang inkubiert und mithilfe von Chemilumineszenzsystem *VWR® CHEMI only* dokumentiert.

2.10.4 Strippen

Um mehrere Proteine auf ein und derselben Blotting-Membran zu untersuchen, wurde die Stripping-Methode angewendet. Beim Strippen werden unter Verwendung einer Strippinglösung (*Restore™ Western Blot Stripping Buffer* von Firma *Thermo Fisher Scientific*) primäre und sekundäre Antikörper von der Membran entfernt, ohne dabei die Proteine zu lösen.

2.11 Statistik

Alle gesammelten Daten wurden unter Verwendung des Programms *GraphPad Prism 7.05 5.0* und IBM SPSS Statistics 22 ausgewertet. Es wurden insgesamt n=20 Tiere (10 Kontrolltiere, 10 Dauerlichttiere) in der vorliegenden Studie untersucht. Jeweils n=10 Tiere wurden für die Gewichts-, Aktivitäts- und Blutbildanalysen verwendet. Nach Testung auf Normalverteilung (Shapiro-Wilk-Test) und Varianzgleichheit (Bartlett's-Test) wurde entweder ein parametrisches (Student's t-test) oder ein nicht-parametrisches (Mann-Whitney U Test) Testverfahren angewendet. Jeweils n=5 Tiere pro Behandlung wurden für die histologischen

und die molekularbiologischen Analysen verwendet. Aufgrund der kleinen Gruppengröße wurden der nicht-parametrische Mann-Whitney U Test durchgeführt. Ein p-Wert ≤ 0.05 wurde als statistisch signifikanter Unterschied gewertet und in den Abbildungen mit einem * markiert.

3 Ergebnisse

3.1 Rhythmen der Bewegungsaktivität

Aufzeichnung und Quantifizierung der lokomotorischen Aktivität wurde mithilfe der Infrarotsensoren durchgeführt. Die Auswertung der Aktivitäts- und Ruhephasen erfolgte in Form sogenannter *double plotted* Aktogrammen (Abb. 4). Weiterhin wurden für jedes Tier Gesamtzahl der Bewegungsdetektionen über 24 Stunden und Mittelwert der Bewegungsdetektionen pro Minute ermittelt (Abb. 5). Die Periodenlängen für LD- und LL-Tiere werden nachfolgend mittels Periodogrammen dargestellt (Abb. 6).

3.1.1 Aktogramme

Während der ersten zehn Tage wurden alle Versuchstiere einem 12:12-stündlichen Licht-Dunkel-Wechsel ausgesetzt. Die in Abbildung 4 dargestellten Aktogramme verdeutlichen, dass die spontane lokomotorische Aktivität während der ersten zehn Tage bei allen Versuchstieren synchron zu den Licht-Dunkel-Wechsel abläuft. Da Mäuse nachtaktive Tiere sind, zeigten sie den Aktivitätsbeginn erst nach Ausschalten des Lichts (um 18 Uhr).

Von Tag 11 bis Tag 24 wurden die LL-Mäuse mit Dauerlicht behandelt (Abb. 4 B). Unter dem Einfluss von Dauerlicht setzte der Beginn der lokomotorischen Aktivität in LL-Gruppe an jedem folgenden Tag später ein als am Vortag. Dieses Phänomen ist im Aktogramm als eine Verschiebung des gesamten Aktivitätsmusters nach rechts zu erkennen.

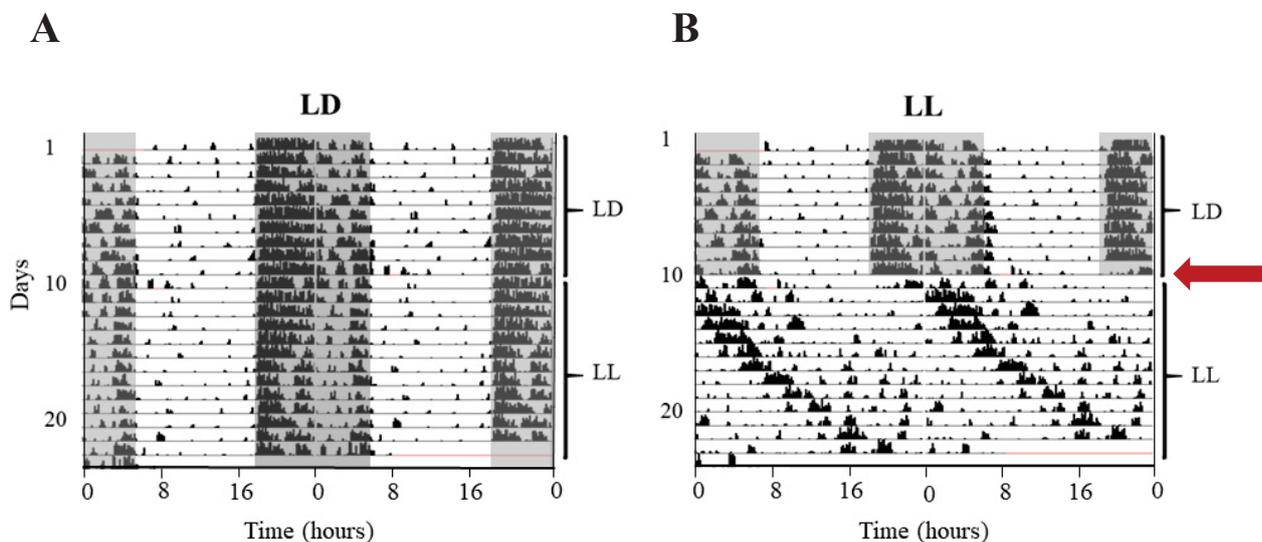


Abbildung 4: Exemplarische *Double plotted* Aktogrammen zeigen die Bewegungsaktivität von LD- (A) und LL-Mäusen (B). LL-Tiere wurden während der ersten zehn Tage, LD-Tiere während der gesamten 24 Tage einer Standard-Photoperiode (12:12-stündlicher Licht-Dunkel-Wechsel) ausgesetzt. Die spontane lokomotorische Aktivität der LD-Mäuse fand über den gesamten Zeitraum synchron zu den Licht-Dunkel-Wechsel statt (A). Die LL-Mäuse wurden von Tag 11 bis Tag 24 mit Dauerlicht behandelt. Unter Dauerlicht wurde das gesamte Aktivitätsmuster nach rechts verschoben (B). (Mittelwert \pm SEM)

3.1.2 Aktivitätsprofile

Die Gesamtzahl und der Mittelwert der Bewegungsdetektionen pro Minute lagen in LL-Gruppe hochsignifikant niedriger (Abb. 7 A; $***p < 0,0007$). Eine exemplarische graphische Darstellung der Anzahl der Aktivitätsdetektionen über 24 Stunden ist in Abbildung 5 wiedergegeben. Im Gegensatz zu LD-Mäusen lassen sich bei LL-Tieren keine klar abgrenzbare Aktivitäts- und Ruhephasen erkennen.

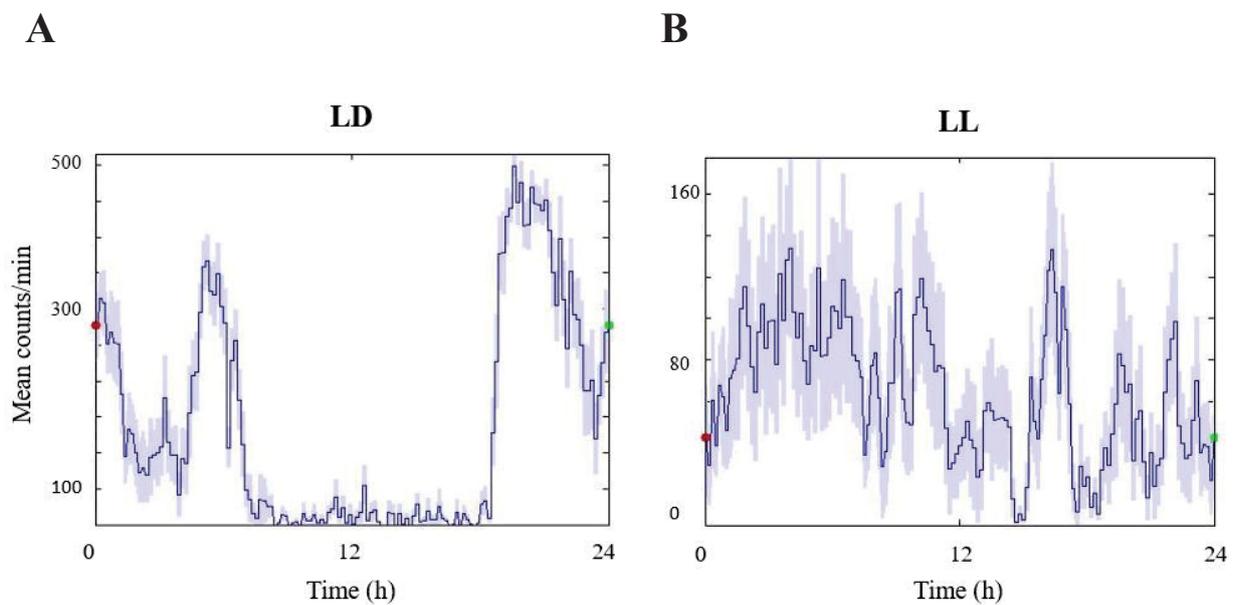


Abbildung 5: Aktivitätsprofil von LD- (A) und LL-Mäusen (B). Die LL-Gruppe zeigt reduzierten Mittelwert der Bewegungsdetektionen pro Minute im Vergleich zur LD-Gruppe. (Mittelwert \pm SEM)

3.1.3 Periodogramme

Mithilfe des Dauerlichts wurden bei LL-Tieren die vom Lichtimpuls-abhängigen zirkadianen Rhythmen in den Freilauf gebracht. Ein wichtiges Merkmal hierfür ist die Veränderung der Periodenlänge. Die zirkadiane Periode der Versuchstiere zeigte sich unter einem 12 :12-stündlichen Licht-Dunkel-Wechsel für 24 h lang stabil. Nach der Behandlung mit Dauerlicht erschien die Periodenlänge von LL-Mäusen (Abb. 6 B) länger als die Periodenlänge von LD-Mäusen (Abb. 6 A).

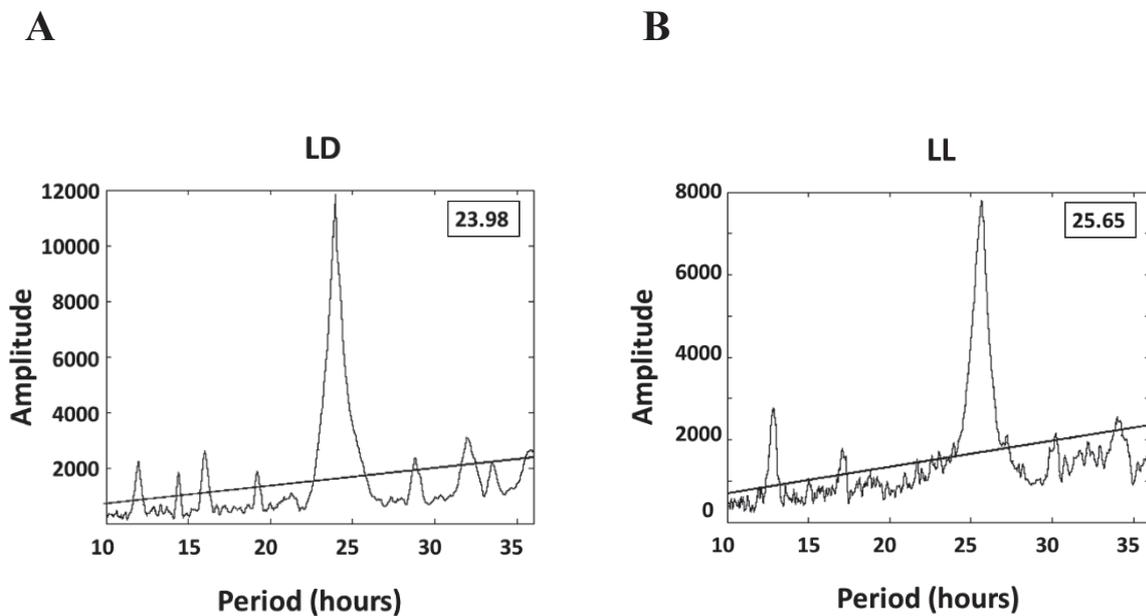


Abbildung 6: Periodogramme der LD- (A) und LL-Mäusen (B). Periodenlänge von LD-Mäusen beträgt ca. 24 h ($23,98 \pm 0,09$ h) (A) und von LL-Mäusen ca. 25 h ($25,21 \pm 0,18$ h) (B). Die gerade Linie zeigt die Chi-Square-Statistik als Indikator für die Signifikanz eines Periodogramm-Spitzenwertes. (Mittelwert \pm SEM)

3.1.4 Bewegungsaktivität und Rhythmusstabilität

In Abbildung 7 sind die Gesamtbewegungsaktivität (Abb. 7 A) und die zirkadiane *Power* als Maß für die Rhythmusstabilität (Abb. 7 B) graphisch dargestellt. Unter LL-Bedingungen war die Gesamtbewegungsaktivität im Vergleich zu LD stark reduziert. Das ist zu erwarten, da sich Licht hemmend auf die Aktivität von nachtaktiven Nagern auswirkt. Für die *Power* des zirkadianen Rhythmus werden 24-Stunden-Werte für eine schnelle Fourier-Transformation (*fast Fourier transform* FFT) verwendet. Eine Rhythmizität der lokomotorischen Aktivitäten waren in beiden Gruppen vorhanden. Bei den LL-Tieren war der FFT-Wert jedoch signifikant niedriger als in LD, was bedeutet, dass der Rhythmus hier deutlich instabiler ist.

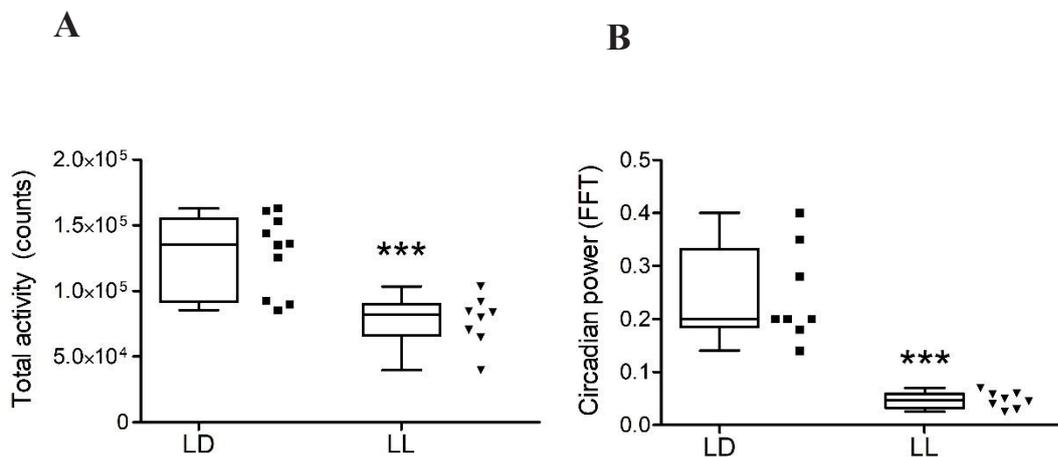


Abbildung 7: Statistische Analyse von Bewegungsaktivitäten (A) und zirkadianer *Power* (B) von LD- und LL-Mäusen. Gesamtzahl der täglichen Bewegungsaktivitäten sind bei LL-Tieren (77337 ± 6843) hochsignifikant niedriger als bei LD-Tieren (128554 ± 9352) (A; $***p < 0,0007$). Unter LD betrug der FFT-Wert $0,2438 \pm 0,032$ und in LL $0,04725 \pm 0,005$ (B; $***p < 0,0001$). (Mittelwert \pm SEM)

3.2 Körpergewicht

Um festzustellen, ob eine Behandlung mit Dauerlicht einen kurzfristigen Effekt auf die Gewichtszunahme hat, erfolgte bei allen Tieren eine Gewichtskontrolle. Die Endauswertung, die in Abbildung 8 graphisch dargestellt ist, zeigt die prozentuale Gewichtszunahme nach den 14 Tagen im Versuch. Hierbei konnte kein signifikanter Unterschied zwischen LD- und LL-Mäusen festgestellt werden.

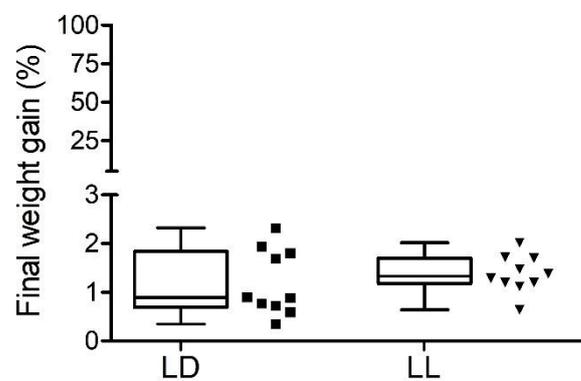


Abbildung 8: Prozentuale Gewichtszunahme bei LD- und LL-Mäusen. Graphische Darstellung der finalen Gewichtsanalysen. (Mittelwert \pm SEM)

3.3 Differenzialblutbild

Inwiefern Dauerlicht zu einer Veränderung in Zusammensetzung der Leukozyten führt, wurde anhand der mikroskopischen Auswertung der Blutausstriche ermittelt. Es wurden insgesamt 200 zellkernhaltige Zellen pro Tier (Monozyten, Lymphozyten, eosinophile Granulozyten, basophile Granulozyten, stabkernige sowie segmentkernige neutrophile Granulozyten) ausgezählt (Abb. 9 A-F). Die Ergebnisse wurden in Prozent angegeben. Die prozentualen Anteile der weißen Blutkörperchen zeigten keine signifikanten Unterschiede zwischen LD- und LL-Mäusen (Abb. 10).

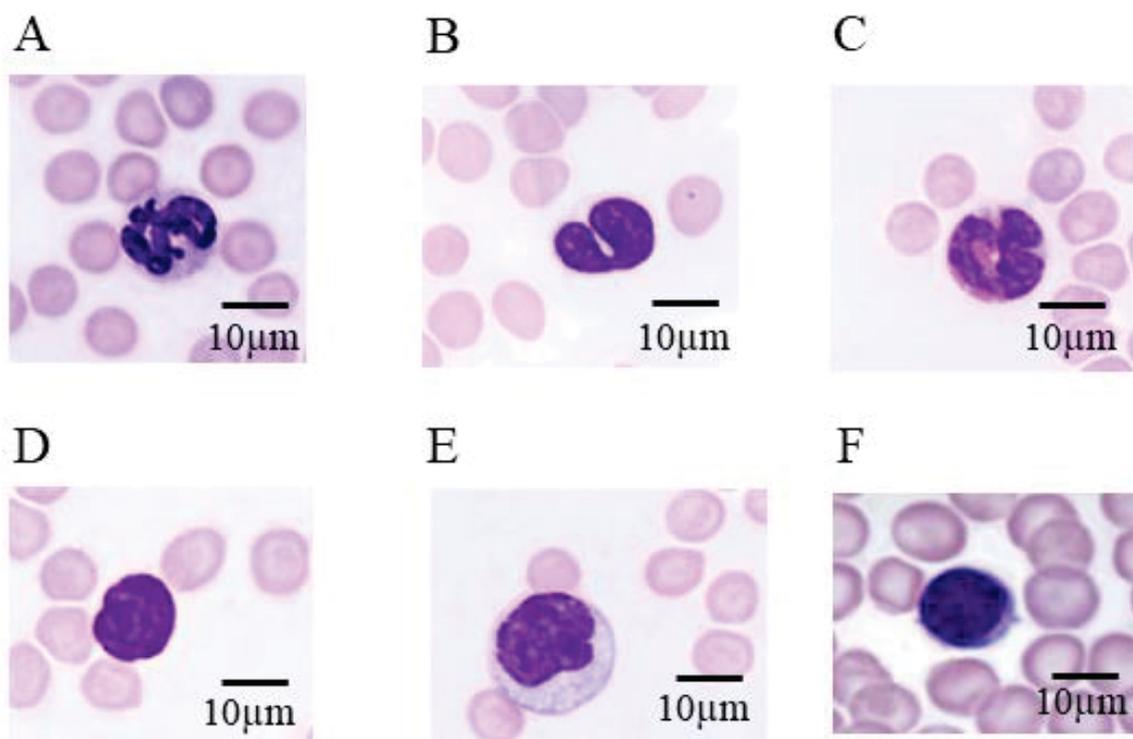


Abbildung 9: Exemplarische Bilder von weißen Blutkörperchen von Blutausstrichen (A-F). Färbung nach Pappenheim (May-Grünwald-Giemsa). (A) Segmentkerniger neutrophiler Granulozyt; (B) Stabkerniger neutrophiler Granulozyt; (C) Eosinophiler Granulozyt; (D) Basophiler Granulozyt; (E) Monozyt; (F) Lymphozyt.

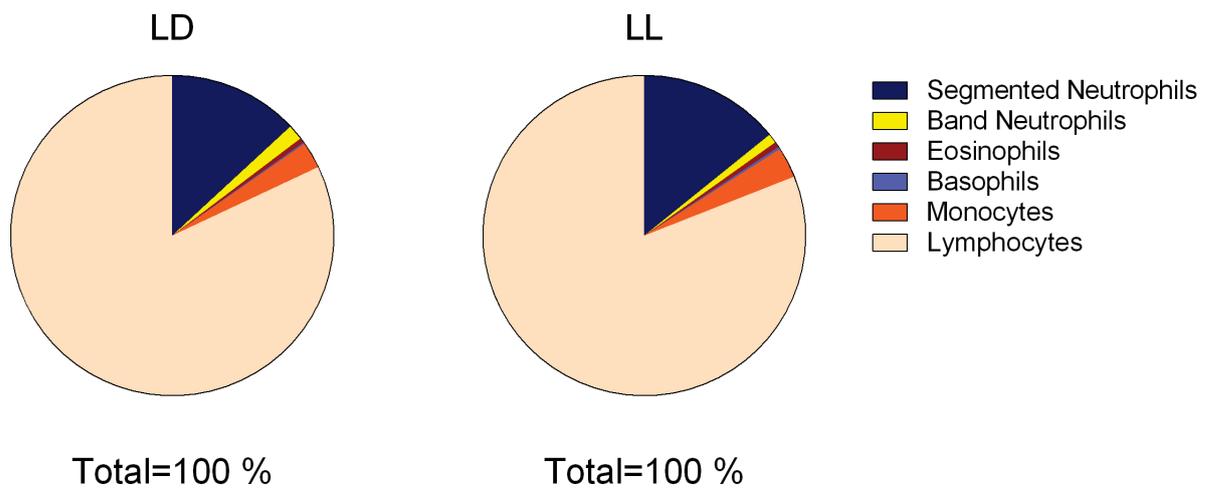
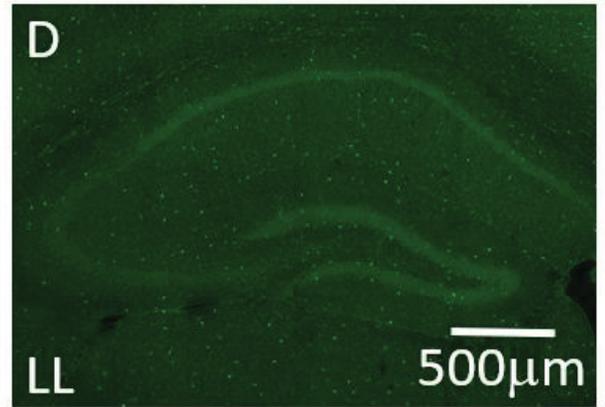
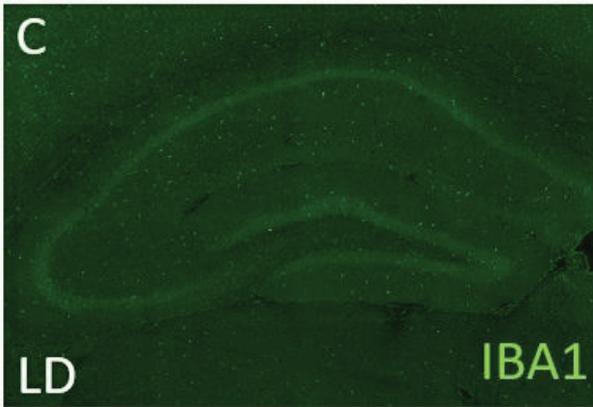
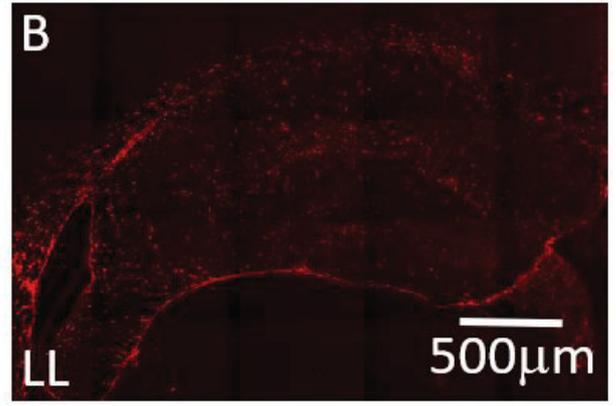
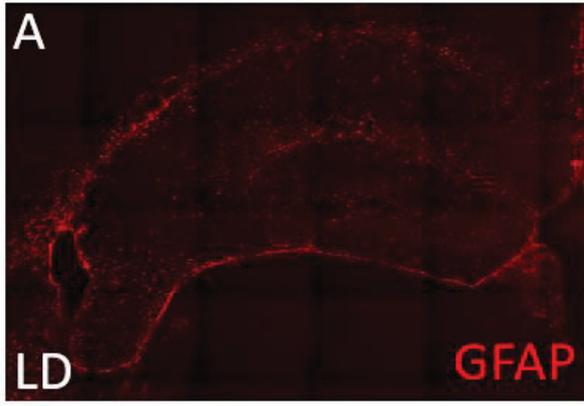


Abbildung 10: Zusammensetzung der im peripheren Blut zirkulierenden weißen Blutkörperchen bei LD- und LL-Mäusen. Repräsentative graphische Darstellung des differentiellen Blutbildes.

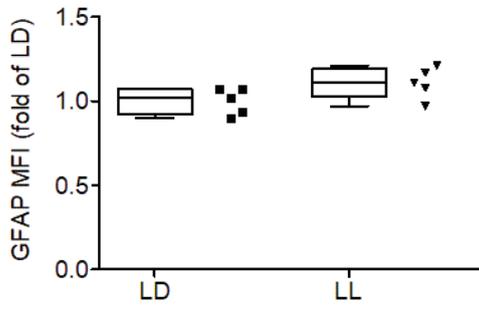
3.4 Immunfluoreszenz-Färbung der Hippocampus-Schnitte

Hauptziel der Arbeit war herauszufinden, ob die Behandlung mit Dauerlicht zu veränderten Entzündungsprozessen im Hippocampus führen kann. Daher wurde zuerst eine mögliche reaktive Veränderung der Gliazellen untersucht. Methodisch nutzten wir hierfür die IF-Färbung (Abb. 11 A-D). Die Färbung gegen GFAP diente zur Identifizierung von Astrozyten (Sofroniew & Vinters, 2010) und die Färbung gegen IBA1 als Mikroglia-spezifisches Protein (Ohsawa, Imai, Sasaki, & Kohsaka, 2004).

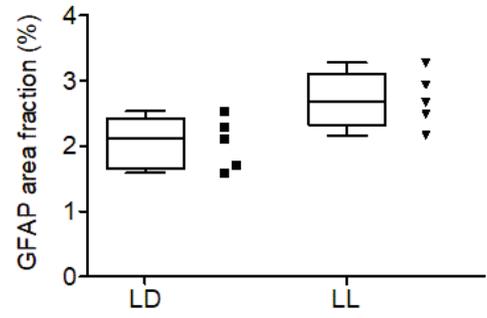
Ausgewertet wurden die Fluoreszenzintensität (*mean fluorescence intensity* – MFI) sowie positiv gefärbte Fläche (*area fraction*) der GFAP+ (Abb. 11 E, F) und IBA1+-Regionen (Abb. 11 G, H) im Hippocampus. Bis auf signifikant erhöhter MFI von IBA1 in LL-Gruppe (Abb. 11 G) konnte keine weiteren Unterschiede zwischen beiden Gruppen gezeigt werden.



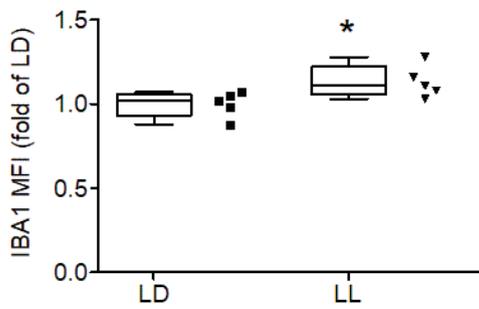
E



F



G



H

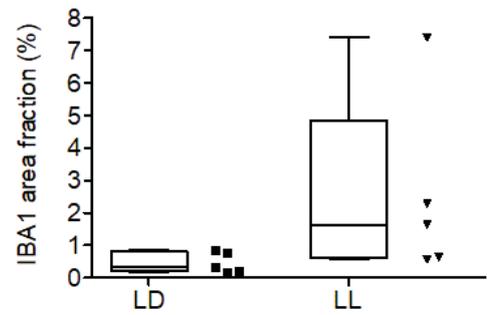


Abbildung 11: Immunfluoreszenzfärbung von Astrozyten und Mikroglia im Hippocampus von LD- und LL-Mäusen. Repräsentative Bilder zeigen GFAP- (Astrozyten) (A-B) und IBA1- (Mikroglia) (C-D) positive Zellen im Hippocampus. Die dargestellten Graphen zeigen quantitative Fluoreszenzintensitätsmessungen (MFI) sowie positiv gefärbte Fläche (area fraction) von GFAP- (E, F) und IBA1- (G, H) Färbungen im Hippocampus von LD- und LL-Mäusen.

MFI: *mean fluorescence intensity*

3.5 mRNA-Expression von Inflammasomen im Hippocampus

Mittels qRT-PCR wurde untersucht, ob eine Behandlung mit Dauerlicht einen Einfluss auf die Genexpression der Inflammasommarker und ihrer Bestandteile hat. Die mRNA-Expression von Inflammasomen – *Nlrp1b*, *Nlrp3*, *Nlrc4*, *Aim2* (Abb. 12 A-D) und sowie von *Asc*, *Casp1* und ILs - *Il-1 β* , *Il-18*, *Il-33* (Abb. 13 A-E) – wurde im Hippocampus von LD- und LL-Mäusen untersucht. Die mRNA-Expressionswerte von *Aim2* (Abb. 12 D; **p=0,0159) und *Casp1* 1 (Abb. 13 B; *p=0,0079) fielen bei LL-Mäusen im Vergleich zu LD-Mäusen signifikant niedriger aus. Die Transkriptionswerte der anderen Inflammasommarker zeigten keine signifikanten Unterschiede.

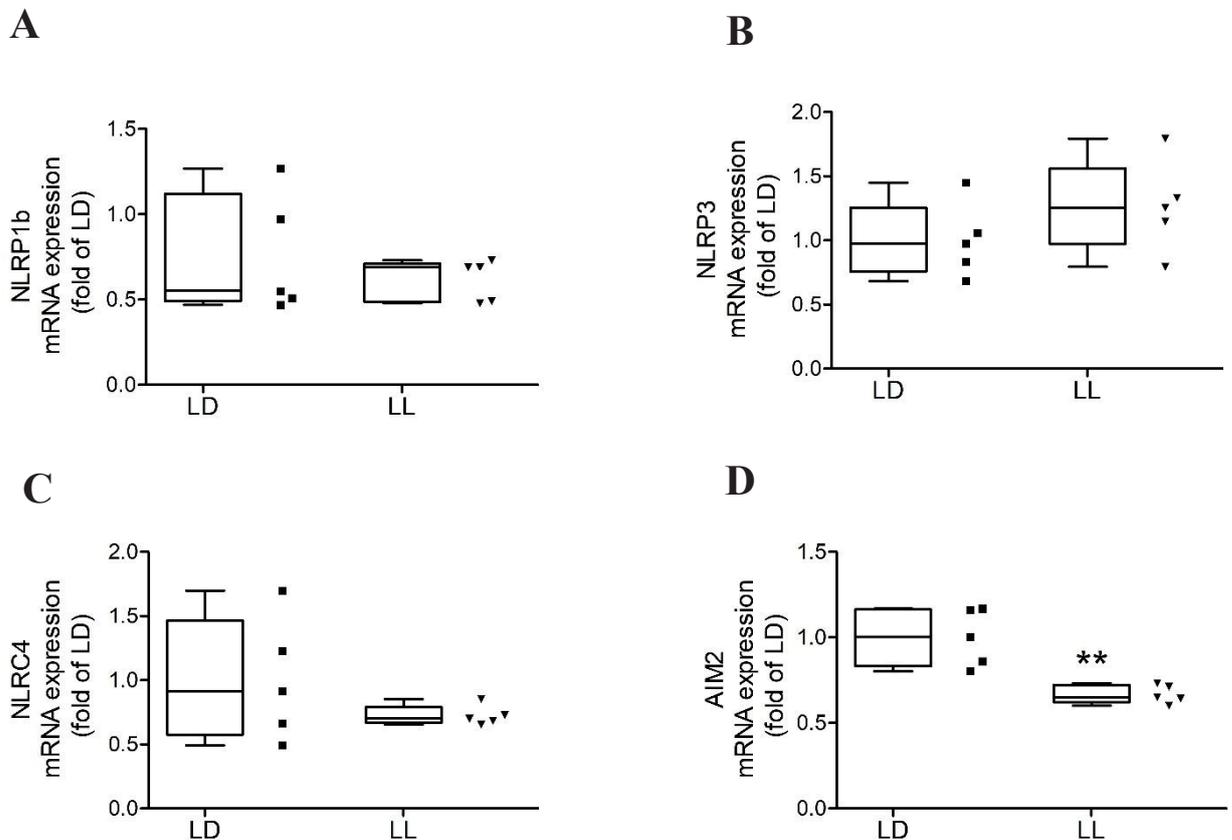


Abbildung 12: Analysen der mRNA-Expression von *Nlrp1b* (A), *Nlrp3* (B), *Nlrc4* (C) und *Aim2* (D) im Hippocampus der LD- (n=5) und LL-Mäuse (n=5). (Mann Whitney U Test, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$).

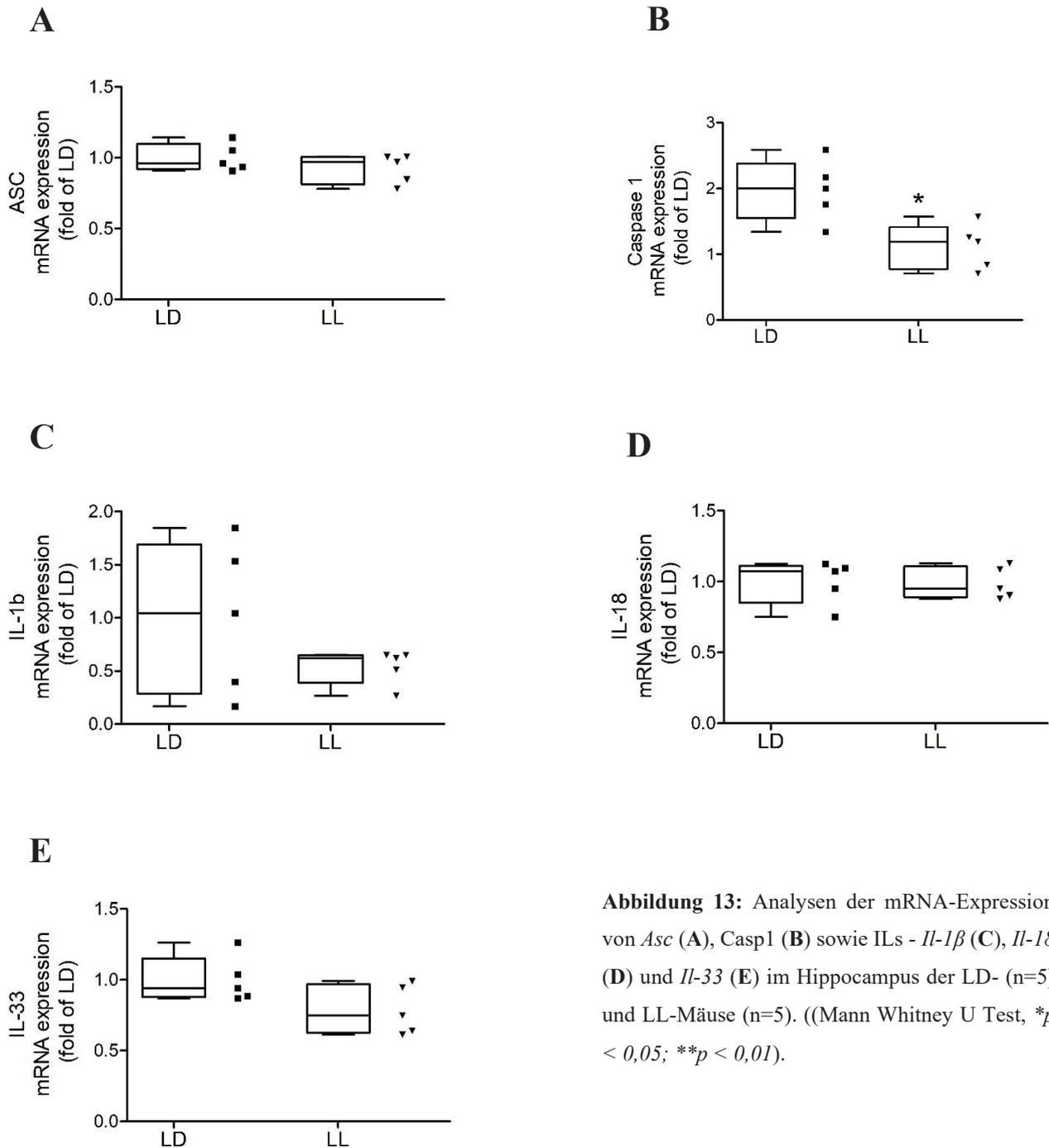


Abbildung 13: Analysen der mRNA-Expression von *Asc* (A), *Casp1* (B) sowie ILs - *Il-1 β* (C), *Il-18* (D) und *Il-33* (E) im Hippocampus der LD- (n=5) und LL-Mäuse (n=5). ((Mann Whitney U Test, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$).

3.6 Protein-Expression von Inflammasomen und deren Komponenten im Hippocampus

Um zu testen, ob die Behandlung mit Dauerlicht einen Einfluss auf die Expression der Inflammasomen und ihrer Komponenten auf Proteinebene hat, wurden WB-Analysen von Hippocampus-homogenaten durchgeführt. Abbildung 14 zeigt WB-Ergebnisse von NLRP1, NLRP3, NLRC4, AIM2, ASC, NF- κ B, Casp1, IL-1 β und IL-18 für LD- und LL-Gruppen. Zur Lade-Kontrolle wurde β -Actin verwendet. Semiquantitative densitometrische Auswertungen von Proteinexpressionen sind in den Abbildungen 15-18 dargestellt.

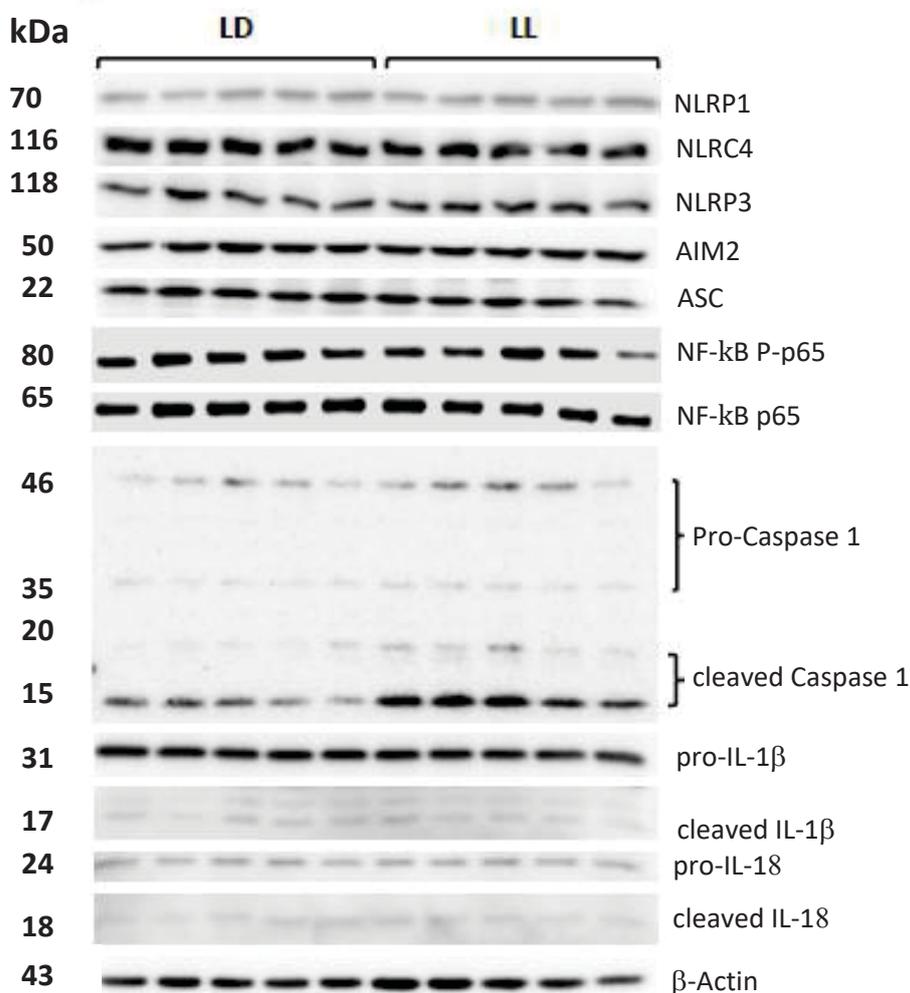


Abbildung 14: Western Blot Ergebnisse von NLRP1, NLRC4, NLRP3, AIM2, ASC, sowie Isoformen von NF- κ B, Caspase1, IL-1 β und IL-18 im Hippocampus für LD- (n=5) und LL-Mäuse (n=5). β -Actin dient zur Lade-Kontrolle.

3.6.1 Caspase-1

Insgesamt wurden bei allen Versuchstieren vier Banden von Casp1 nachgewiesen (Abb. 14). Produkte mit Molekulargewichten von ~ 46 kDa und ~ 35 kDa scheinen ein inaktives Proenzym bzw. intermediäre Form zu sein (Boucher et al., 2018). Kleinere Produkte mit Molekulargewichten von ~ 15 kDa und ~ 20 kDa wurden als aktive Isoformen (p15, p20) von Casp1 identifiziert (Boucher et al., 2018), die eine signifikant erhöhte Expression in der LL-Gruppe zeigten (Abb. 15 B; ** $p=0,0079$ für cleaved Casp1).

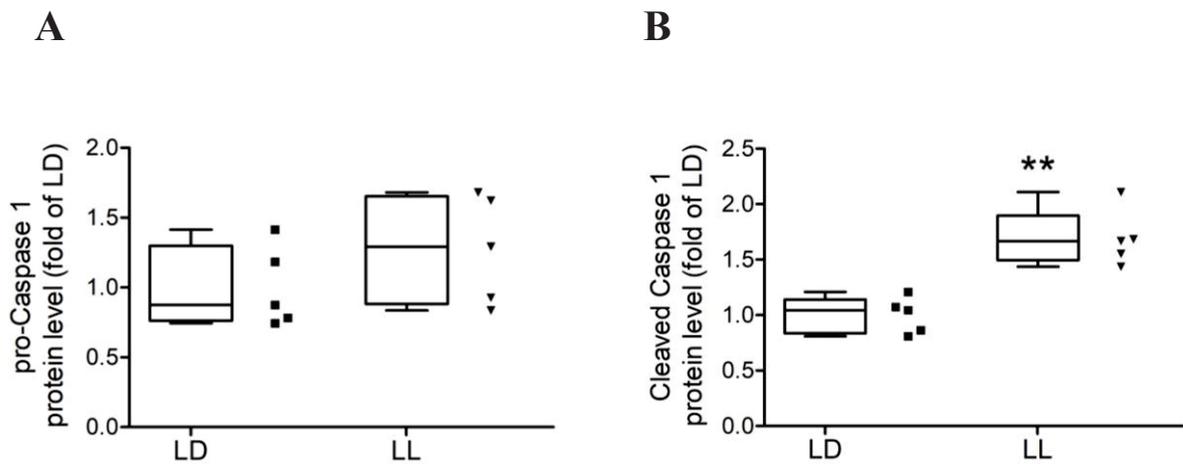


Abbildung 15: Semiquantitative densitometrische Auswertung von Proteinexpression der Caspase-1 in ihrer inaktiven (A) und aktiven Form (B) im Hippocampus von LD- (n=5) und LL-Mäuse (n=5). (Mann Whitney U Test, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$).

3.6.2 IL-1 β und IL-18

Sowohl die inaktiven Vorstufen als auch reife Peptide von IL-1 β und IL-18 wurden bei allen Tieren untersucht (Abb. 14). Spaltprodukte der enzymatischen Aktivität von Casp1 sind das aktive IL-1 β (~ 17 kDa) und aktive IL-18 (~ 18 kDa). Die statistische Auswertung beider Interleukine ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen Kontroll- und Versuchsgruppe (Abb. 16 A-D).

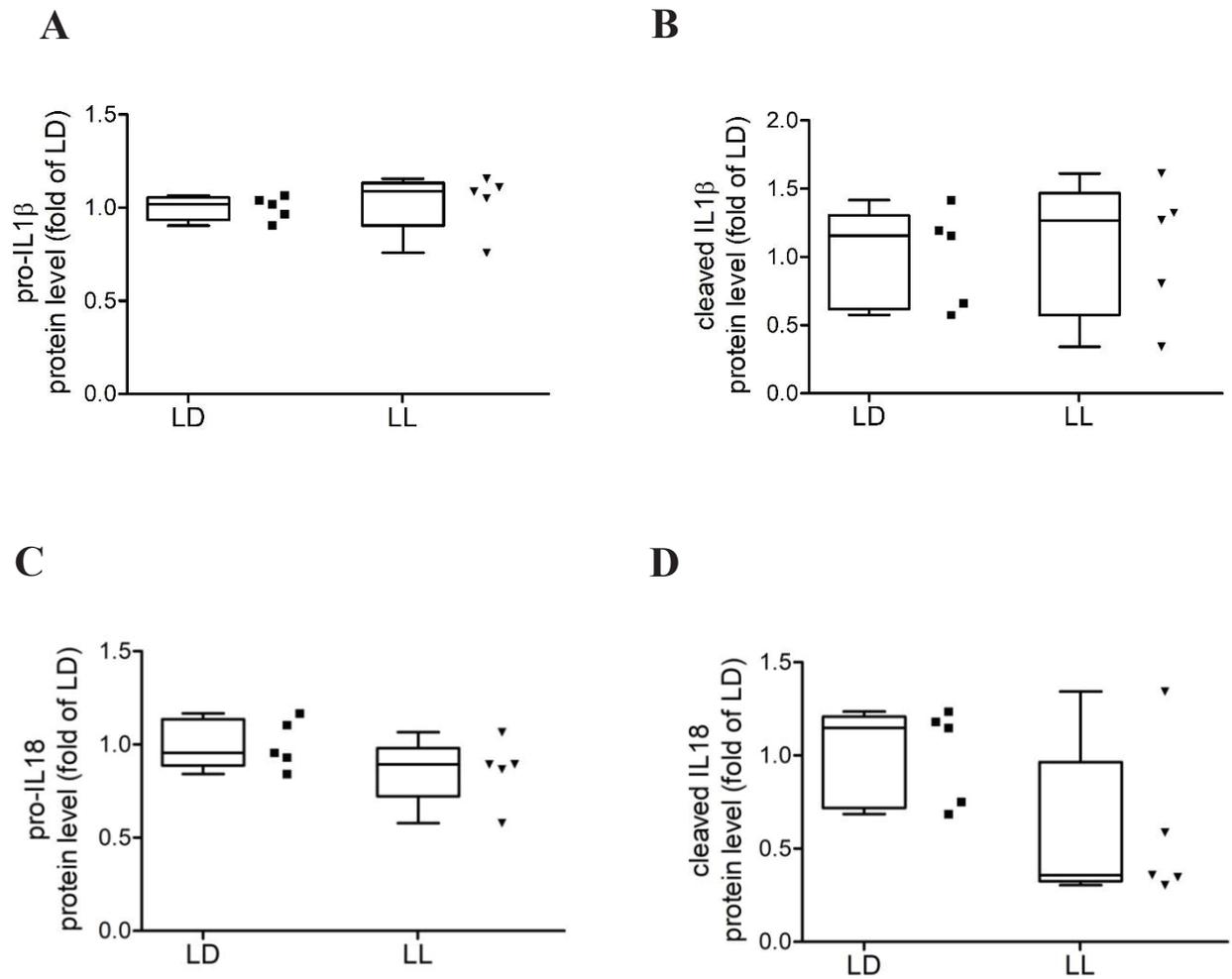


Abbildung 16: Semiquantitative densitometrische Auswertung der Protein Expression von IL-1 β (A-B) und IL-18 (C-D) in ihrer inaktiven und aktiven Form im Hippocampus der LD- (n=5) und LL-Mäuse (n=5). (Mann Whitney U Test, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$).

3.6.3 NLRP1 und NLRP3

Für NLRP1 konnten wir weder in LD- noch in LL-Gruppe die Expression der kanonischen Isoform von ~ 160 kDa nachweisen. Es wurde jedoch ein Produkt von ~ 70 kDa identifiziert (Abb. 14) dessen Expressionslevel zwar tendenziell erhöht, jedoch nicht signifikant unterschiedlich war (Abb. 17 A).

Wir konnten die Expression von NLRP3 (~ 118 kDa) im Hippocampus aller Tiere nachweisen (Abb. 14). Obwohl es tendenziell eine leichte Zunahme der NLRP3-Expression bei LL-Mäusen gab, wurde kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen festgestellt (Abb. 17 B).

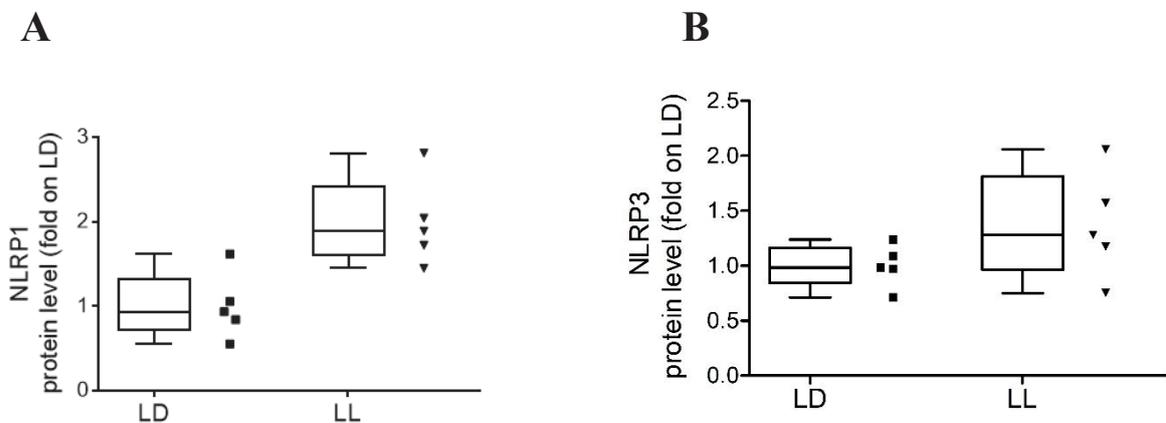


Abbildung 17: Semiquantitative densitometrische Auswertung der Protein Expression von NLRP1-Isoform (A) und NLRP3 (B) im Hippocampus der LD- (n=5) und LL-Mäuse (n=5). (Mann Whitney U Test, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$).

3.6.4 NLRC4, AIM2, ASC und NF- κ B

Die kanonischen Isoformen für NLRC4 (~ 116 kDa), AIM2 (~ 50 kDa), ASC (~ 22 kDa), NF- κ B P-p65 (~ 80 kDa) und NF- κ B p65 (~ 65 kDa) konnten bei allen Tiere nachgewiesen werden (Abb. 14), die densitometrische Auswertung ergab jedoch keinen Unterschied im Expressionslevel zwischen LD- und LL-Mäusen (Abb. 18 A-D).

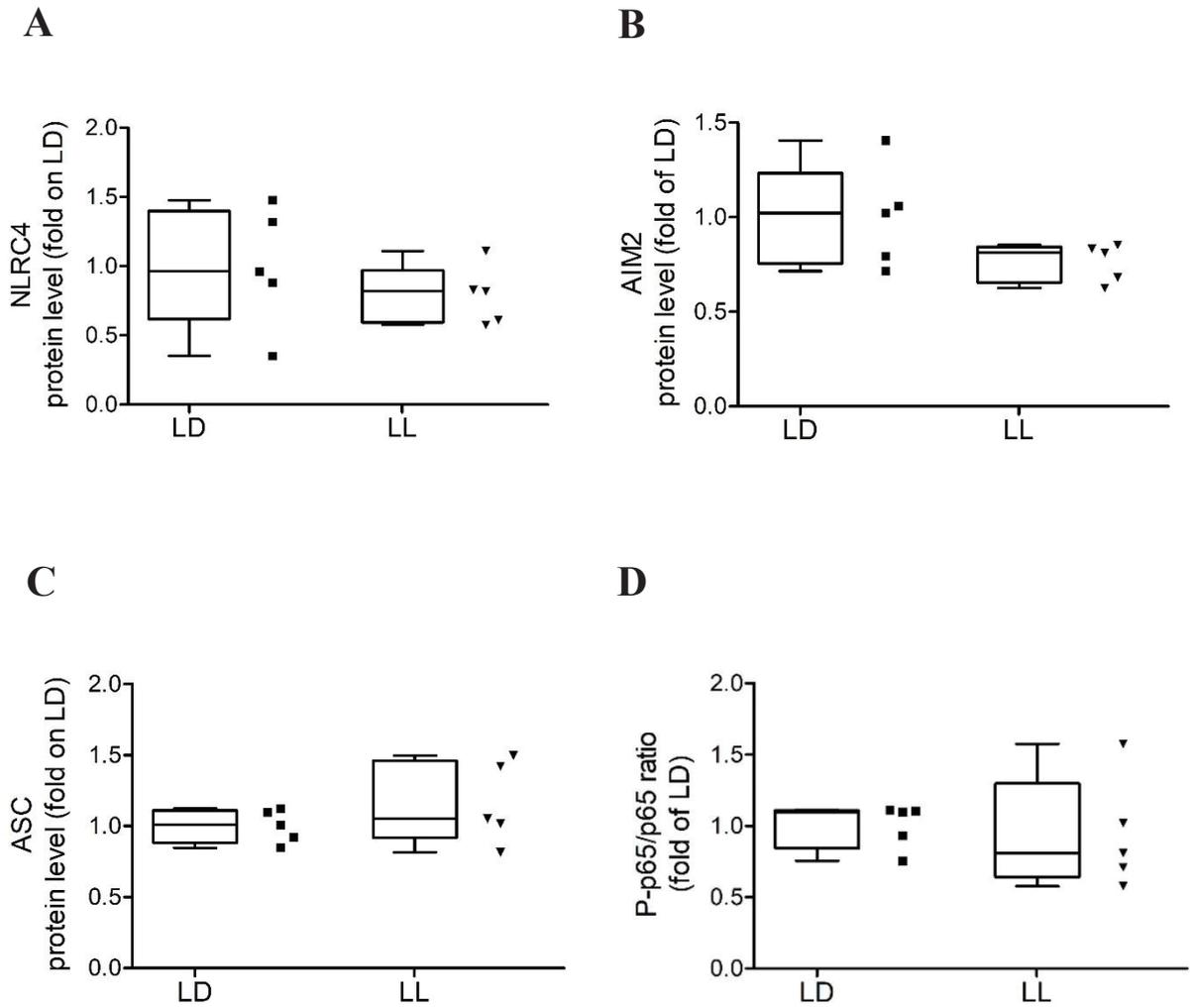


Abbildung 18: Semiquantitative densitometrische Auswertung der Protein Expression von NLRP4 (A), AIM2 (B), ASC (C) und Ratio P-p65/p65 von NF-kB (D) im Hippocampus der LD- (n=5) und LL-Mäuse (n=5). (Mann Whitney U Test, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$).

4 Diskussion

Epidemiologische Studien in Berufsgruppen, die einer permanenten chronodisruptiven Belastung ausgesetzt sind, konnten bereits einen Zusammenhang zwischen zirkadianen Rhythmusstörungen und gesundheitlichen Beeinträchtigungen nachweisen. Eindeutige kausale Zusammenhänge zwischen zirkadianen Rhythmusstörungen und Neuroinflammation werden von verschiedenen Forschungsgruppen aufgezeigt, die sich mit neurodegenerativen Erkrankungen wie AD, PD, ALS oder HD beschäftigen (Homolak et al., 2018; Jiang et al., 2018; Lauretti et al., 2017; Musiek et al., 2018; Musiek & Holtzman, 2016). Es wird vermutet, dass Chronodisruption zu einer Dysregulation des Immunsystems führt und damit direkt zur Pathogenese der neurodegenerativen Veränderungen beiträgt (Musiek & Holtzman, 2016). Die Rolle von PRR in diesem Prozess wird intensiv diskutiert. Zu den bekanntesten PRRs gehören NLRs, welche wichtige Bestandteile von Inflammasomen sind (Barbé et al., 2014). Inflammasome wurden bereits bei einigen neurodegenerativen Erkrankungen beschrieben, die auch chronodisruptive Begleitsymptome aufweisen (Homolak et al., 2018; Lauretti et al., 2017).

In unserer Studie wurde die Hypothese überprüft, ob eine Chronodisruption infolge von Dauerlicht für zwei Wochen, Komponenten des angeborenen Immunsystems im Hippocampus von C57BL/6J Mäusen aktiviert. Zunächst wurde der Allgemeinzustand und das Differentialblutbild untersucht. Dauerlicht hatte keinen Einfluss auf den Allgemeinzustand inklusive Körpergewicht und auf das Differentialblutbild. Mittels Immunhistochemie wurden Astrozyten und Mikroglia gefärbt und analysiert, um die Auswirkung von LL auf Gliazellen zu untersuchen. Die Färbung gegen GFAP diente zur Identifizierung von Astrozyten und die Färbung gegen IBA1 als Mikroglia-spezifisches Protein. Die prozentuale GFAP- und IBA1-positiv gefärbte Fläche war nicht signifikant verändert. Die Fluoreszenzintensität von IBA1, jedoch nicht von GFAP, war signifikant erhöht im Hippocampus von LL Tieren. Anschließend wurde mittels qRT-PCR und Western Blot die Expression der folgenden Inflammasome auf mRNA- und Proteinebene untersucht: NLRP1b, NLRP3, NLRC4, AIM2 und deren Komponenten - ASC, Casp1 sowie Interleukine - IL-1 β , IL-18. Die Genexpression von aktiver Casp1 und AIM2 war in LL-Mäusen signifikant reduziert. Im Gegensatz dazu war die Proteinexpression von aCasp1 in der LL-Gruppe signifikant erhöht.

Chronische Störungen der zirkadianen Rhythmen haben einen biologisch relevanten Einfluss auf die Homöostase und führen nach heutigem Stand der Forschung zu tiefgreifenden irreversiblen pathophysiologischen Veränderungen vieler Körperfunktionen. Diese Veränderungen wurden bereits im Herz-Kreislauf-System, im Stoffwechsel und in den endokrinen Funktionen sowie im Immunsystem beobachtet (Blask et al., 2005; Kolbe & Oster, 2019; Manfredini et al., 2018). Die Kausalität zwischen CD, Neuroinflammation und Neurodegeneration wird weiterhin diskutiert (Leng et al., 2018; Leng et al., 2019; Musiek & Holtzman, 2016). Es ist jedoch noch nicht klar, in welche Richtung sich diese Kausalität orientiert: Ist die CD lediglich ein Symptom einer fortschreitenden neurologischen Erkrankung oder führt sie unter bestimmten Umständen zu neurodegenerativen Veränderungen? Einige Autoren gehen davon aus, dass sich die pathologischen Prozesse gleichzeitig in beide Richtungen entwickeln können (Leng et al., 2019; Musiek & Holtzman, 2016).

Derzeitiger Wissensstand auf molekularer Ebene über die Beziehung zwischen CD und Immunaktivierung im ZNS ist jedoch noch unvollständig. Es ist wenig darüber bekannt, ob die Expression von Inflammasomen ein zirkadianes Muster aufweist und ob die Störung des zirkadianen Rhythmus einen Einfluss auf ihre Aktivierung hat.

4.1 Versuchsaufbau und rhythmische Bewegungsaktivität

Wie bereits erwähnt, ist Licht der wichtigste Zeitgeber (Pittendrigh, 1993). In unserem Tierexperiment befanden sich alle Mäuse zunächst in einem 12:12 h Hell/Dunkel-Rhythmus (LD). Anschließend wurde die Hälfte der Tiere zwei Wochen lang mit konstantem Licht (LL) behandelt. Coomans et al. (2013) verwendeten einen ähnlichen Versuchsaufbau, um die Wirkung von gestörten zirkadianen Rhythmen auf Metabolismus, Gewichtszunahme und Hormonhaushalt zu untersuchen (Coomans et al., 2013). Die Mäuse in ihrem Experiment waren jedoch vier Wochen lang unter LL-Bedingungen, und die Autoren analysierten zusätzlich den Effekt von konstanter Dunkelheit (DD). Legates et al. (2011) erläuterten Methoden zur Untersuchung der zirkadianen Uhr, sowie den direkten Einfluss von Licht auf die lokomotorische Aktivität (LeGates & Altimus, 2011). Die Autoren betonten, dass Versuchstiere eine Gewöhnungsphase durchlaufen sollten, bevor Zyklusstörungen induziert werden. Diese Phase sollte bei Mäusen 1-2 Wochen dauern und einen normalen LD-Rhythmus beinhalten.

Dementsprechend wurden in unserem Experiment alle Tiere in den ersten 10 Tagen einem LD-Rhythmus ausgesetzt.

Zirkadiane Rhythmen werden wie andere rhythmische Prozesse durch die Amplitude und die Periode der Oszillation charakterisiert. Zu den Hauptverfahren, die zur Analyse dieser Parameter verwendet werden, gehört die Berechnung der Amplitude durch deskriptive Standardstatistiken und die Berechnung der Periode durch Methoden der Zeitreihenanalyse (time series analysis) wie Fourier-Transformation (*fast Fourier transform* FFT), Autokorrelation oder Periodogramm (Refinetti, 2004). Die "Robustheit" eines zirkadianen Rhythmus dient als Index für die Stabilität des Rhythmus (Refinetti, 2004). Als Maß für die „Robustheit“ wurden 24-Stunden-Werte der FFT-Wert verwendet.

Die Analyse der Logger-Daten zeigten, dass alle Mäuse unter 12:12 Hell/Dunkel-Rhythmus ihr Aktivitätsmuster mit den externen Belichtungszeiten synchronisierten. Das bedeutet, dass sie die Fähigkeit zum *Entrainment* hatten, was somit auf eine intakte Funktion ihrer inneren Uhr hinwies. Da das Dauerlicht für LL-Tiere in der zweiten Hälfte des Experiments ständig vorhanden war, konnte das Licht nicht mehr als externer Zeitgeber dienen und die Mäuse zeigten einen Freilauf der Bewegungsaktivität, was sich als einer deutlich von 24 h abweichenden Periodenlänge des Rhythmus und der Phasenverschiebung äußert. Die Phasenverschiebung beschreibt eine Veränderung - entweder eine Vorwärtsverschiebung oder eine Verzögerung - in der Phase des freilaufenden zirkadianen Rhythmus. Es hängt davon ab, ob das Versuchstier tagsüber oder nachts aktiv ist und, ob es konstantem Licht oder Dunkelheit ausgesetzt ist. Wir konnten eine Phasenverschiebung nach rechts bzw. eine Verzögerung in der Phasenlage feststellen. Dieses Ergebnis war in unserem Experiment zu erwarten, da es sich bei Mäusen um nachtaktive Tiere handelt und sie unter Dauerlicht jeden Folgetag später anfangen aktiv zu werden. Unsere Ergebnisse stimmen daher mit der Asschoff's Regel überein. Sie wurde in den 1960er Jahren aufgestellt und beschreibt die Verhaltensänderung von Tieren in Abwesenheit von externen Zeitgebern, die die innere Uhr unter physiologischen Bedingungen synchronisieren (Carpenter & Grossberg, 1984). Die Regel besagt, dass die Periode des freien Laufens bei nachtaktiven Tieren unter konstantem Licht verlängert wird, weil Licht bei nachtaktiven Tieren die Aktivität unterdrückt. Die Freilaufperiode übersteigt den 24-Stunden-Rhythmus. Bei tagaktiven Tieren ist es umgekehrt (Carpenter & Grossberg, 1984). Passend dazu zeigte sich die Gesamtbewegungsaktivität der LL-Mäuse in unserer Studie hochsignifikant niedriger als bei LD-Mäusen.

Statistische Analysen von FFT-Werten unter LD- und LL-Bedingungen hat eine eindeutige Rhythmizität der lokomotorischen Aktivitäten in beiden Gruppen gezeigt. Bei den LL-Tieren zeigte sich der FFT-Wert jedoch signifikant niedriger. Dies ist ein Hinweis für verminderte „Robustheit“ bzw. reduzierter Stabilität des Rhythmus unter Dauerlicht-Bedingungen.

Es ist essenziell zwischen akuten und chronisch bestehenden Störungen von zirkadianer Rhythmik zu unterscheiden. In unserer Studie wurden die LL-Mäuse einer akuten Chronodisruption ausgesetzt, denn die Gesamtdauer der Dauerlichtexposition betrug kumulativ 14 Tage und wurde als eine einmalige Episode durchgeführt. Die negativen physischen und psychischen Auswirkungen einer Störung des zirkadianen Systems scheinen jedoch positiv mit der Dauer der Störung korreliert zu sein. Craig et al. (2008) untersuchten in ihrer Arbeit die Auswirkungen einer akuten und chronischen Störung des zirkadianen Rhythmus auf das Lernen und dem Gedächtnis. Sehr spannend ist durch die Autoren konzipierter Versuchsaufbau (Craig & McDonald, 2008).

Um einen Zustand der zirkadianen Störung zu erzeugen, wurde eine zweistufige Phasenverschiebung bei Ratten durchgeführt, die 16 Tage dauerte. Akut phasenverschobene Ratten wurden einer singulären Episode (16 Tage) unterzogen, während chronisch phasenverschobene Ratten vier aufeinanderfolgende Episoden (64 Tage) durchliefen. Die Kontrollratten erhielten für die Dauer des Versuchs einen konstanten 12:12 Hell/Dunkel-Rhythmus. Jede Phasenverschiebungsepisode bestand aus zwei verschiedenen Phasen: Phasenverschiebung und Erholung. Die Tiere wurden zunächst an 6 aufeinanderfolgenden Tagen um 3 Stunden pro Tag phasenverschoben. Anschließend folgte eine 10-tägige *Reentrainment*-Phase, um den Tieren eine teilweise Erholung zu ermöglichen. Solche insgesamt 16-Tage lang andauernden Episoden, welche bei einer Gruppe vier Mal wiederholt wurden, wurde als chronische Störung des zirkadianen Rhythmus gewertet. Im Gegensatz dazu wurde eine einmalig durchgeführte Episode bei der Vergleichsgruppe als eine akute Störung des zirkadianen Rhythmus definiert.

Sowohl nach einer akuten als auch nach einer chronischen Phasenverschiebung kam es zur Störung der zirkadianen Rhythmik; diese Störung hatte jedoch unterschiedliche Auswirkungen auf Lernen und Gedächtnis, je nachdem, wie lange das Tier der Phasenverschiebung ausgesetzt war. Die Autoren konnten nachweisen, dass die langfristige Störung des Tagesrhythmus zu einer Beeinträchtigung von Hippocampusfunktion führt, und somit das Lernen und räumliches Gedächtnis negativ beeinflusst (Craig & McDonald, 2008). Sie vermuteten, dass die

bedeutenden Ursachen für die kognitiven Beeinträchtigungen eine Stressreaktion in Zusammenhang mit chronischen Veränderungen der Schlafmuster und der neuronalen Aktivität im Hippocampus sowie ein Rückgang des neuroprotektiven Hormons Melatonin sein könnten.

4.2 Allgemeinzustand

4.2.1 Metabolismus der Versuchstiere

Auch Stoffwechselrhythmen unterliegen dem zirkadianen Rhythmus und sind auf den äußeren Tag-Nacht-Zyklus abgestimmt (Kolbe & Oster, 2019). Kolbe et al. (2019) legten in ihrer Arbeit den aktuellen Wissensstand über den Zusammenhang zwischen CD und metabolischer Homöostase dar. Sie berichteten, dass Störungen des zirkadianen Rhythmus, wie sie z.B. bei Schlafstörungen oder rotierender Schichtarbeit auftreten, häufig mit Stoffwechselstörungen, Förderung von Adipositas und sogar Typ-2-Diabetes assoziiert sind. Bei Mäusen führten bereits geringe Lichtmengen während der Nacht zu veränderten Verhaltens- und Stoffwechselrhythmen und zu einer deutlichen Gewichtszunahme (Borniger, Maurya, Periasamy, & Nelson, 2014).

Die Gewichtsmessungen in unserem Tierversuch wurden insgesamt dreimal durchgeführt, um zu ermitteln, ob das konstante Licht über zwei Wochen einen Einfluss auf die Gewichtszunahme hat. Die statistische Analyse zeigte zwar Gewichtszunahme von allen Tieren, dennoch keine finalen Unterschiede zwischen LD- und LL-Mäusen. Anders als wir, konnten Borniger et al. (2014) nachweisen, dass Gewichtszunahme bei Mäusen, die nachts schwachem Licht exponiert waren, bereits nach zwei Wochen detektierbar war (Borniger et al., 2014). Der Grund für die divergierenden Ergebnisse könnte im Versuchsdesign liegen. In der Metabolismusstudie von Borniger et al. (2014) waren Mäuse des Swiss-Webster-Stammes 14 h lang starkem (~150 lx) und 10 h lang schwachem Licht („dim light“ ~5 lx) ausgesetzt. Im Gegensatz dazu wurden die von uns untersuchten C57BL/6J-Mäuse 24 Stunden lang konstantem ~250-300 lx starkem Licht ausgesetzt. Des Weiteren waren alle im Experiment von Borniger et al. eingeschlossene Swiss-Webster Mäuse adult (>9 Wochen alt). Zudem war die Altersobergrenze von Versuchstieren nicht definiert. Im Gegensatz dazu wurden in unsere Studie lediglich Mäuse im Alter von 8-12 Wochen benutzt, d. h. diese befanden sich noch in

einer schnellen Wachstumsphase, denn von Adultheit bei C57BL/6J-Mäuse spricht man erst ab 12 bis 24 Wochen (Flurkey, 2007).

Zusammenfassend lässt sich berichten, dass grob betrachtet zwar Gemeinsamkeiten im Versuchsaufbau zwischen unserem und dem Experiment von Borniger et al. bestehen, dennoch sind die Unterschiede, wie Stamm und Alter der Versuchstiere sowie Belichtungszeit und Lichtintensität im Experiment, recht bedeutsam. Diese üben einen entscheidenden Einfluss auf die Ergebnisse aus, sodass zur adäquaten Beurteilung von Dauerlicht auf Stoffwechsel und Allgemeinzustand weitere Studien mit gezielter Versuchsaufbau benötigt sind.

4.2.2 Differenzialblutbild

Bereits im letzten Jahrhundert berichteten Haus et al. (1999) über eine tageszeitabhängige Exposition von Immunzellen im peripheren Blut (Haus & Smolensky, 1999). Um festzustellen, ob konstantes Licht einen Einfluss auf die Menge der peripheren Immunzellen hat, analysierten wir die Differenzialblutbilder aller Mäuse. Ausgewertet wurden Lymphozyten, Monozyten, neutrophile, eosinophile und basophile Granulozyten. Wir konnten keine Unterschiede zwischen LD- und LL-Gruppen beobachten. Wir vermuten, dass dabei einige Faktoren eine wichtige Rolle spielen. Die Lebensdauer von peripher zirkulierenden Immunzellen kann je nach Zelltyp stark variieren. Neutrophile Granulozyten verbleiben unter physiologischen Bedingungen nur für einige Stunden im peripheren Blut (Simon & Kim, 2010). Lymphozyten hingegen können je nach Typ mehrere Tage bis Wochen zirkulieren (Tough & Sprent, 1995). Das bedeutet, wenn das Immunsystem in LL-Mäusen unter Dauerlicht mit Lymphopenie assoziiert sein sollte, könnten wir es nach nur 14 Tagen nicht nachweisen. Andererseits kann die Leukozytose, je nach Pathologie, ein schleichend oder rapide verlaufender Prozess sein. Auslöser einer Lymphozytose oder Granulozytose in kurzer Zeit können beispielsweise akute Ereignisse, wie systemische Infektionen, Entzündungen, akute Traumata usw. sein (Riley & Rupert, 2015).

Wie bereits erwähnt, zeigen die Komponenten des Immunsystems einschließlich Immunzellen im Blut physiologischerweise im Laufe des Tages eine deutliche Fluktuation. Die Exposition der reifen Leukozyten im Blut ist in den ersten Stunden einer Lichtphase am höchsten und nimmt im Tagesverlauf tagsüber kontinuierlich ab (Curtis et al., 2014). Prendergast et al. (2013) konnten jedoch nachweisen, dass gestörte zirkadiane Rhythmik die physiologische Fluktuation von Leukozytenkonzentration stark beeinflusst (Prendergast et al., 2013). Die Autoren

untersuchten Hamster, die initial mindestens für vier Wochen lang einem 16 h Licht/8 h Dunkelheit-Rhythmus ausgesetzt waren. Die Versuchsgruppe erhielt nach vier Wochen regelmäßige 2-stündige Behandlung mit Lichtimpulse während der Dunkelphase. Blutentnahmen erfolgten um vier verschiedene Zeitpunkte, jeweils zweimal in Licht- und zweimal in Dunkelphase. Nach Auswertung der Ergebnisse konnte gezeigt werden, dass bei den Hamstern, die mit Lichtimpuls behandelt worden waren, zu einer Aufhebung der rhythmischen Variation der Anzahl der zirkulierenden Leukozyten gekommen war. Interessant ist noch die Tatsache, dass die Höchstwerte von Leukozytenkonzentrationen, welche in Versuchs- und Kontrollgruppen einige Stunden nach Eintritt in die Lichtphase identifiziert worden waren, in beiden Gruppen ungefähr gleich hoch lagen. Das bedeutet, gestörte zirkadiane Rhythmik führte zwar zu einer Unterdrückung der rhythmischen Exposition von Leukozyten Blut, aber nicht zu einer absoluten Leukozytose.

In unserer Studie wurden nach Auswertung des Differenzialblutes von LD- und LL-Gruppen keine signifikanten Unterschiede festgestellt. Dieses Ergebnis war auch zu erwarten und stimmt mit den Forschungsergebnissen von Prendergast et al. (2013) überein. Unser Resultat lässt sich, unter anderem, durch den Zeitpunkt von Blutentnahme erklären. In unserem Experiment waren LD-Mäuse bereits ab 6 Uhr morgens der Lichtphase ausgesetzt. Wenige Stunden nach Eintritt der Lichtphase wäre die maximale Konzentration von Leukozyten im peripheren Blut zu erwarten (Curtis et al., 2014). Aus diesem Grund erfolgte die Blutentnahme morgens zwischen 8 bis 9 Uhr. Kurz nach Eintritt der Dunkelphase, d. h. ab 18 Uhr, wäre mit dem Tiefpunkt von Leukozytenzahl in LD-Gruppe zu rechnen. In LL-Gruppe wäre, aufgrund der beeinträchtigte Fluktuation, im Vergleich zu der LD-Gruppe eine höhere Leukozytenzahl im peripheren Blut um den gleichen Zeitpunkt zu erwarten. Die Blutentnahme führten wir jedoch nur morgens und nicht abends durch. Denn unser primäres Ziel war zu prüfen, ob die Behandlung mit Dauerlicht für zwei Wochen zu einer dermaßen relevanten Aktivierung des zellulären Immunsystems führt, dass es bereits im peripheren Blut im Sinne von Leukozytose nachweisbar ist. Dies konnte nach Evaluierung des Differenzialblutes nicht erfasst werden. Bedeutsam ist noch zu erwähnen, dass wir keine absolute Leukozytenkonzentration untersucht hatten. Um eine exakte Auswertung zu ermöglichen, sollten beide Werte berücksichtigt werden, da das Differentialblutbild auch bei Veränderung der Gesamtkonzentration normal erscheinen kann (Blumenreich, 1990; O'Connell et al., 2015).

4.3 Aktivierung von Astrozyten und Mikroglia im Hippocampus

Gliose tritt als Reaktion auf die Schädigung des ZNS auf. Gliose ist eine unspezifisch reaktive Veränderung der Gliazellen, die oft mit einer Neuroinflammation einhergeht und je nach Art, Intensität und Dauer der auslösenden Faktoren mehrere Tage andauern kann (Lindsay, 1986). Die Faktoren, die zur Gliose führen, können sehr unterschiedlich sein. Zudem gibt es Hinweise auf kausale Zusammenhänge zwischen zirkadianen Rhythmusstörungen und Gliose. Griffin et al. (2019) konnten zeigen, dass die Aktivierung von Mikrogliazellen im Hippocampus und die sekundäre Astroglie durch die Deletion des Uhrgens *Rev-erba* (Griffin et al., 2019) verursacht werden. Musiek et al. (2013) zeigten, dass Mäuse mit *Bmal1*-Deletion mehrere Anzeichen von Neurodegeneration zeigen, darunter Astroglie und Mikroglie (Musiek et al., 2013).

Wir untersuchten die Fluoreszenzintensität der Astrozyten- und Mikroglia-Marker GFAP und IBA1 im Hippocampus als Maß für die jeweilige Aktivität (Günther et al., 2005; Hartig, 2013). Die Intensität des Fluoreszenz-Signales des Astrozyten-Markers GFAP war in LD- und LL-Mäusen nahezu gleich. Im Gegensatz dazu konnten wir eine signifikant erhöhte Intensität des Fluoreszenz-Signales des Mikroglia Markers IBA1 in der LL-Gruppe nachweisen. Das deutet auf eine Aktivierung von Mikroglia durch LL hin. Allerdings gibt es unterschiedliche Formen der Mikrogliaaktivierung – M1- und M2-Aktivierung. Die M1-Aktivierung wird durch Exposition von Mikroorganismen induziert. Bei einer M1-Aktivierung von Mikroglia, kommt es zu einer Hochregulation der Neuroinflammation, Produktion von proinflammatorischen Zytokinen (z. B. IL-1 β , TNF- α , IL-6, IL-23), Phagozytose sowie Antigenpräsentierung an Lymphozyten (Boche et al., 2013; Liddel & Barres, 2017; Mosser & Edwards, 2008). Im Gegensatz dazu sind die Effekte der alternativen - M2-Aktivierung Wundheilung, Gewebereparatur, Entzündungshemmung sowie Initiierung von neuroprotektiven Vorgänge (Boche et al., 2013; Liddel & Barres, 2017). Stimuli, die zu einer M2-Aktivierung führen können, sind z. B. antiinflammatorische Interleukine IL-10, IL-4 und IL-13 sowie Glucocortikoide (Boche et al., 2013; DiSabato et al., 2016). Anhand unserer Fluoreszenzintensitätsmessung ist nicht zu differenzieren, um welche der beiden Aktivierungsformen es sich handelt. Um dies besser zu differenzieren, könnte zusätzlich ein Marker für Neuroprotektion und die Morphologie der Mikroglia untersucht werden. Insgesamt deuten die Ergebnisse darauf hin, dass die 14-tägige Dauerlichtexposition keine deutliche Gliose auslöst.

Interessant sind in diesem Zusammenhang die Resultate der Studie von Taufique et al. (2019). In ihrer Studie evaluierten Autoren die Anzahl von hippocampalen Neuronen und Gliazellen von Krähen, welche LD- versus LL-Bedingungen ausgesetzt waren. Anders als wir, führten sie Nissl-Färbung durch und maßen zudem die Größe der Perikarya, sowie das Glia/Neuronen-Verhältnis (Taufique, Prabhat, & Kumar, 2019). Zudem untersuchten sie das lokomotorische Aktivitätsmuster, wobei unter Dauerlicht eine signifikant erhöhte Anzahl von Bewegungen identifiziert wurde. Die Autoren konnten zwar keine signifikanten Unterschiede in der Anzahl von Neuronen nachweisen, sie konnten jedoch eine deutlich erniedrigte Anzahl von Gliazellen sowie eine deutliche Abnahme der Größe der Perikarya in der LL-Gruppe im Vergleich zur LD-Gruppe belegen. Taufique et al. (2019) vermuteten, diese negativen Effekte könnten auf eine induzierte Störung des Tagesrhythmus zurückzuführen sein. Sie interpretierten die reduzierte Größe der Perikarya als herabgesetzten Ausmaß der neuronalen Aktivität und Plastizität. Des Weiteren sei eine verringerte neuronale Aktivität der Hippocampusregion bei Krähen auf LL-Bedingungen zurückzuführen. Da Krähen, im Gegensatz zu Mäusen, tagaktiv sind, kann vermutet werden, dass der Effekt von Dauerlicht bei Mäusen drastischer ist.

4.4 Expression von Inflammasomen und ihrer Komponenten im Hippocampus

In dieser Studie konnten wir zeigen, dass die Behandlung mit konstantem Licht zu einer veränderten Expression von Inflammasomen und deren Komponenten führt. Es wurde die Expression von NLRP1, NLRP3, NLRC4, AIM2, ASC und Casp1 nachgewiesen. Die nativen Gewebe des Hippocampus wurden auf mRNA- und Proteinebene mittels qRT-PCR und Western Blot analysiert.

4.4.1 Inflammasom NLRP1

Es sollte darauf hingewiesen werden, dass der Mensch nur ein *Nlrp1*-Gen besitzt, während in Mäusen drei Isoformen, also *Nlrp1a*, *Nlrp1b* und *Nlrp1c*, nachgewiesen wurden (Boyden & Dietrich, 2006). Hierbei ist *Nlrp1b* die am besten untersuchte Isoform. *Nlrp1b* mRNA konnte in allen Mäusen nachgewiesen werden, es zeigten sich jedoch keine Unterschiede in der

Expression zwischen den LD- und den LL-Mäusen. Das deutet darauf hin, dass LL keinen Einfluss auf die *Nlrp1b* Expression hat. Auch auf Proteinebene konnten wir NLRP1 in allen Mäusen nachweisen. Hierbei konnten wir zwar nicht die kanonische Isoform mit dem Molekulargewicht von 160 kDa, aber eine kleinere Form mit dem Molekulargewicht von 70 kDa detektieren. Hierfür gibt es einige mögliche Erklärungen. Interessant ist die Arbeit von Kummer et al. (2007), in der NLRP1 in mehreren verschiedenen Zellen und Gewebearten untersucht wurde (Kummer et al., 2007). Die Autoren konnten lange (160 kDa) und kurze (u. a. 70 kDa) Isoformen von NLRP1 z. B. in neuronalen, pulmonalen Geweben sowie in den Immunzellen – T- und B-Lymphozyten und NK-Zellen nachweisen. In Monozyten konnten sie jedoch nur die Expression der kleineren Isoform belegen. Dies deutet darauf hin, dass beide Isoformen biologische Aktivität vor allem bei der Immunabwehr besitzen (Kummer et al., 2007). Autoproteolyse ist eine weitere mögliche Erklärung dafür, wie es zur Produktion von kleinen NLRP1-Isoformen kommt. Es ist festgestellt worden, dass NLRP1 eine besondere Function-to-Find-Domäne (FIIND) enthält (Walsh et al., 2014). Eine Autoproteolyse an der FIIND-Region scheint für die Aktivierung von humanem NLRP1 erforderlich zu sein. Interessanterweise wird in den natürlich vorkommenden Spleißvarianten des menschlichen NLRP1 eine Autoproteolyse in der FIIND-Region gehemmt, was die anschließende Reifung von IL-1 β verhindert. Im Gegensatz dazu, ein Single-Nukleotid-Polymorphismus (SNP), welcher diese Region verändert, die Verarbeitung und Aktivierung von NLRP1 verstärkt (Finger et al., 2012). Ob es bei den nachgewiesenen 70 kDa-Banden sich um autoproteolytischen Spaltungsprodukte handelt, ist schwer nachzuweisen. Es ist jedoch nicht auszuschließen, da die Studienlage zum NLRP1-Inflammasom aktuell recht widersprüchlich ist. Grund dafür ist derzeit noch mangelndes Wissen über die spezifischen Aktivatoren, die Komplexität seiner Domänenstruktur und mögliche enzymatische Modifikationen.

Als nächstes stellt sich die Frage, welchen Grund der fehlende Nachweis von kanonischer NLRP1-Isoform haben kann. Am ehesten ist es denkbar, dass die Gesamtdauer des ausgesetzten Reizes doch nicht ausreichend war, um eine relevante Hochregulation von Produktion der kanonischen NLRP1-Isoform zu induzieren. Des Weiteren wurde über einen hochgradigen Polymorphismus der NLRP1 in Mausstämmen berichtet. Es wurde festgestellt, dass C57BL/6-Mäuse Mutationen in *NLRP1b* aufweisen, die das NLRP1-Protein funktionsunfähig schnell eliminierbar machen (Lamkanfi & Dixit, 2014).

In früheren Studien konnte es nachgewiesen werden, dass die Menge an NLRP1-immunpositiven Neuronen im Alzheimer-Gehirn stark erhöht ist (Kaushal et al., 2015) und,

dass *Nlrp1*-Knockout-Mäuse eine signifikant reduzierte neuronale Pyroptose sowie eine reduzierte kognitive Beeinträchtigung zeigten (Tan et al., 2014). In unserer Studie ließ sich nach 14 Tagen Behandlung mit Dauerlicht eine tendenziell erhöhte Expression des NLRP1-Proteins feststellen, die jedoch nicht statistisch signifikant war. Möglicherweise ist der Effekt sehr gering und die Gruppengröße müsste größer sein, um Signifikanz zu erreichen.

4.4.2 Inflammasom AIM2

In den LL-Mäusen war die *Aim2* mRNA Menge signifikant geringer als in den LD-Mäusen, was darauf hinweist, dass es durch die LL-Exposition zu Herabregulation der *Aim2* Genexpression kommt. Auch das AIM2-Proteinlevel war in der LL-Gruppe reduziert, aber nicht signifikant unterschiedlich zur LD-Gruppe. Möglicherweise ist auch hier der Effekt zu gering und die Gruppengröße müsste größer sein, um Signifikanz zu erreichen. Die Herabregulation der *Aim2* Expression war überraschend, denn wir hatten eine erhöhte Expression der Inflammasom-Marker durch den Aktivierungsreiz Dauerlicht erwartet. Allerdings könnten Struktur und Aktivierungsmechanismen einen Erklärungsansatz bieten. Eine Besonderheit der Struktur von AIM2 besteht darin, dass es aus einer N-terminalen PYD- und einer C-terminalen HIN-Domäne besteht, die in Abwesenheit eines Aktivierungssignals autoinhibitorische Interaktionen zeigen (Walsh et al., 2014). PYD interagiert mit ASC und die HIN-Domäne ist in der Lage intrazelluläre doppelsträngige DNA-Fragmente zu detektieren (Bürckstümmer et al., 2009). Es ist seit längerem bekannt, dass DNA, ob mikrobiellen Ursprungs oder Eigen-DNA aus absterbenden Zellen oder geschädigtem Gewebe, die aus Mitochondrien und dem Zellkern austreten, einen hochpotenten Immunstimulus darstellen (Bürckstümmer et al., 2009). Sie lösen eine starke angeborene Immunantwort aus (Hu & Shu, 2020). Nach der Bindung mit DNA wird die Autoinhibition aufgehoben und ein Komplex von AIM2-Molekülen gebildet. Funktionelle Aktivierung von AIM2 zielt zwar Bekämpfung von Krankheitserregern und Beseitigung von zellulären Debris (Sharma, Karki, & Kanneganti, 2019), es gibt jedoch Studien, welche die hochschädigende Wirkung von AIM2 auf gesunden Zellen nachweisen (Li et al., 2019). Li et al. (2019) konnten nachweisen, dass bei ischämischen RM-Verletzungen die AIM2-Expression besonders erhöht ist. Die Herunterregulierung des AIM2-Moleküls verhinderte teilweise die motorische Dysfunktion und neuronale Pyroptose, da es die Spaltung von Casp1 und IL-1 β verringerte (Li et al., 2019).

In Anbetracht dieser Erkenntnisse kann vermutet werden, dass in unserer Studie die Herunterregulierung der *Aim2*-Expression in der LL-Gruppe möglicherweise der Neuroprotektion dienen könnte. Darüber hinaus stellt das Dauerlicht über 14 Tage wahrscheinlich keinen so intensiven immunologischen Stimulus dar, wie z. B. doppelsträngige DNA, der eine starke und teilweise schädliche Immunantwort auslösen könnte.

Interessant sind die Erkenntnisse über Inflammasome in Zusammenhang von posttranslationalen Modifikationen (PTM). Es konnte gezeigt werden, dass PTM eine entscheidende Rolle bei der Aktivierung von Inflammasomen spielt (Yang, Liu, & Xiao, 2017). PTMs von Proteinen können Proteinfunktionen regulieren, indem sie Veränderungen der Proteinaktivität, ihrer zellulären Lokalisationen und dynamische Interaktionen mit anderen Proteinen induzieren (Seo & Lee, 2004). Diese Serien von Proteinmodifikationen sind transient und reversibel und werden unabhängig voneinander initiiert (Seo & Lee, 2004).

Eine weitere mögliche Erklärung für die signifikante Herunterregulierung von AIM2-Inflammasom bei LL-Mäusen wäre auch stattgefundenes PTM, denn es gibt Daten darüber, dass eine solche PTM die Aktivierung von AIM2 Inflammasomen regulieren kann. Liu et al. (2016) berichteten über das Tripartite Motif 11 (TRIM11) als einen wichtigen negativen Regulator des AIM2-Inflammasoms. Ubiquitiniertes TRIM11 erleichtert den Abbau des AIM2-Inflammasoms durch p62-abhängige selektive Autophagie. Die Modifikation anderer Inflammasom-Komponenten scheint für die Funktion von AIM2 ebenfalls eine wichtige Rolle zu spielen. Zum Beispiel identifizierten Hara et al. (2013) die Phosphorylierung von ASCs während der Inflammasomenaktivierung als eine wesentliche Voraussetzung für die Aktivierung von NLRP3- und AIM2-Immunasomen (Hara et al., 2013).

Im Rahmen unserer Studie erfolgten zwar keine Untersuchungen, welche Zusammenhänge zwischen PTM und Inflammasomen beweisen oder widerlegen würden, dennoch haben wir neue Erkenntnisse gewonnen, welche einen richtungsweisenden Einfluss für zukünftige Forschungsprojekte haben können.

4.4.3 Inflammasome NLRP3 und NLRC4

Die Expression von NLRP3, NLRC4 und Protein ASC konnten in allen Mäusen nachgewiesen werden, zeigte jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen LD- und LL-Mäusen.

Es wird angenommen, dass in peripheren Immunzellen, wie z. B. in Monozyten oder Makrophagen unter Ruhezustand eine gewisse Konzentration NLRP3-Protein vorhanden ist (Kelley, Jeltema, Duan, & He, 2019). Im ZNS ist die Expression von NLRP3-Inflammasom bereits umfangreich in Mikroglia und ZNS-Makrophagen untersucht worden. Zudem gibt es Studien, die die Funktion von NLRP3 in auch Neuronen belegt (Walsh et al., 2014). In unseren Untersuchungen konnten wir NLRP3 Expression in den Hippocampusgeweben von allen Mäusen sowohl auf Gen- als auch Proteinebene nachweisen. Durch unsere Ergebnisse konnten wir somit belegen, dass in dieser ausgewählten Hirnregion eine konstante basale Produktion von NLRP3-Inflammasom stattfindet. Unklar ist jedoch, welche funktionelle Bedeutung diese Tatsache haben kann. Eine schnellere Immunreaktion auf Exposition von Krankheitserreger wäre möglicherweise eine Erklärung dafür. Kürzlich ist eine beschleunigte NLRP3-Inflammasom-Aktivierung in peripheren Immunzellen beschrieben worden. Hierbei wurde von einer schnellen NLRP3-Aktivierung berichtet, welche ohne erhöhte Transkription von NLRP3 und IL-1 β bereits nach 10 Minuten nach LPS-Exposition zu detektieren war (Juliana et al., 2012; Schroder et al., 2012). Diese zielte auf eine zeitsparende und effektive Bekämpfung von Pathogenen. Effektive Immunreaktion im Hippocampus ist essenziell, denn diese Hirnregion gilt als einer der verwundbarsten und anfälligsten Hirnregionen für pathologischen Prozesse (Knierim, 2015; Liraz-Zaltsman et al., 2011).

Die Gründe für die fehlenden Unterschiede in den LD- und LL-Gruppen in Gen- und Proteinexpression von NLRP3-Inflammasom können ebenfalls mannigfaltig sein. Wie bereits in der Einleitung beschrieben wurde, folgt nach einem *Priming step* ein *Activation step*. Für die Initiierung des zweiten Schrittes sind bislang Stimuli, darunter ATP, K⁺-Efflux (Mariathasan et al., 2006), pathogen-assoziierte RNA (Gupta et al., 2014) sowie bakterielle und virale Toxine und Komponenten (Skeldon & Saleh, 2011) beschrieben worden. Es ist anzunehmen, dass durch Behandlung mit Dauerlicht von LL-Mäuse für insgesamt 14 Tage keiner der relevanten Stimuli aufgetreten ist, welcher den *Activation step* im detektierbaren Ausmaß induzieren konnten.

Was NLRC4 angeht, wird dieser auch im Gehirn exprimiert, vor allem in Astrozyten und Mikroglia (Freeman et al., 2017). Es wurde gezeigt, dass das NLRC4-Inflammasom in diesen beiden Zelltypen vor allem auf bakterielles Flagellin reagieren kann (Freeman et al., 2017). Neuere Studien berichten jedoch von Aktivierungspotenzial des NLRC4-Inflammasoms in Gliazellen, welche durch nicht-bakteriellen Liganden ausgelöst werden können. Bislang sind z. B. von ZNS-assoziierte DAMP Lysophosphatidylcholin (Freeman et al., 2017) berichtet

worden. Des Weiteren konnte NLRC4-Expression in den Mikroglia gezeigt werden, welche durch Ischämie aktiviert worden sind (Kay, Wang, Kirkby, & Man, 2020). In unserem Experiment konnten wir zeigen, dass NLRC4-Expression in Maus-Hippocampus auch unter physiologischen Bedingungen stattfindet. Sowohl in LD- als auch in LL-Gruppen war NLRC4-Inflammasom auf Gen- und Proteinebene nachweislich. Allerdings konnte die Behandlung mit Dauerlicht in LL-Gruppe keine signifikante Veränderung in NLRC4-Expressionsmuster induzieren.

4.4.4 Enzym Caspase-1

Caspasen bilden eine Gruppe von Proteasen, die an vielen verschiedenen Körperfunktionen beteiligt sind. Die Rolle der Caspasen bei der Zellproliferation und -differenzierung, der Tumorunterdrückung, der neuronalen Entwicklung und der Alterung wurde bereits identifiziert (Shalini, Dorstyn, Dawar, & Kumar, 2015). Die Regulation der Caspase-Aktivität ist von großer Bedeutung. Eine abgeschwächte Caspase-Funktion wurde als Ursache der Tumorentwicklung nachgewiesen (Kumar, 2008). Umgekehrt kann die Überaktivierung einiger Caspasen zu einem exzessiven programmierten Zelltod führen. Dies zeigt sich bei verschiedenen rheumatischen (Halaby, 2012) sowie neurodegenerativen Erkrankungen wie z.B. AD, ALS, MS, PD, altersbedingte kognitive Dysfunktion (Kumar, 2008; McKenzie et al., 2018). Die Rolle von Casp1 wurde auch bei Rückenmarksentzündungen, ischämischen und hypoxiebedingten Hirnverletzungen und akuter bakterieller Meningitis vermutet (Kumar, 2008).

Casp1 spielt als Initiator der Entzündungsantwort eine zentrale Rolle in der Zellimmunität. Es initiiert eine pro-inflammatorische Reaktion durch die Aktivierung der nicht reifen IL-1 β , IL-18 sowie Freisetzung des porenbildenden Proteins Gasdermin D (GSDMD) (Guey & Petrilli, 2016; Van Opdenbosch & Lamkanfi, 2019).

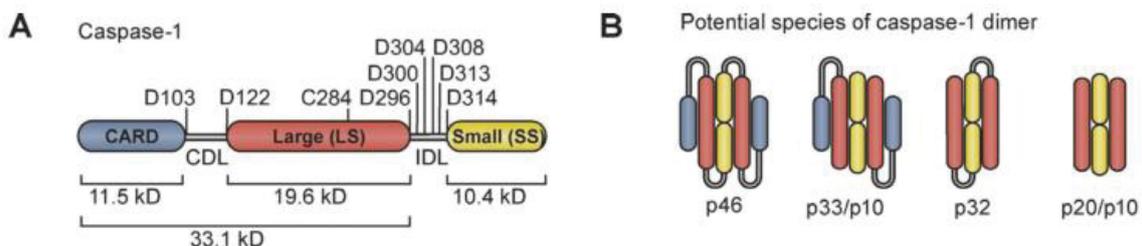
Um zu testen, ob die Behandlung mit konstantem Licht einen Einfluss auf die Expression von *Casp1* im Hippocampus der Maus hat, untersuchten wir die mRNA- und Proteinexpression.

Mittels RT-qPCR haben wir Expressionsmuster von *Casp1* auf der mRNA-Ebene untersucht. Es zeigte sich, dass die Genexpression in der LL-Gruppe signifikant herunterreguliert war (**p=0,0079). Entzündliche Prozesse müssen streng kontrolliert werden, denn eine unkontrollierte Entzündung ist für den Organismus ebenso schädlich, wie das Fehlen einer Entzündung. Welche regulatorischen Mechanismen unseren Ergebnissen zugrunde liegen, ist

schwer zu identifizieren. Die Modifikation des Expressionsmusters von *Casp1* kann sowohl auf der Gen- als auch auf der Proteinebene erfolgen.

Es gibt mehrere Faktoren, die die Expressionsmuster von *Casp1* auf der transkriptionellen und translatorischen Ebene regulieren. Die Expression des *Casp1*-Gens wird als Reaktion auf verschiedene Stimuli induziert. Dazu gehören mikrobielle Infektionen und bakterielles LPS, Zytokine (IFN- γ und TNF- α), Wachstumsfaktoren (TGF- β) und DNA-schädigende Agenzien, wie z.B. UV-Strahlung (Kumar, 2008). Die Konzentration von *Casp1*-mRNA ist in ischämischen Geweben besonders hoch. Die Transkription der *Casp1*-mRNA wird durch Tumorsuppressoren wie p53, p73, SP1, ETS-1, IFT57/HIPPI und IRF-1 durch Bindung an geeignete Stellen in der Promotorregion induziert (Kumar, 2008).

Wir konnten die Proteinexpression von Casp1 in allen Mäusen nachweisen. Wir identifizierten Banden in Größen von 46, 35, 20 und 15 kDa. Dies deutet darauf hin, dass sowohl LD- als auch LL-Tiere Casp1 in seiner aktiven und inaktiven Form exprimieren und es stimmt mit der Annahme überein, dass das Pro-Enzym unter physiologischen Bedingungen in seiner inaktiven Form vorhanden ist (Van Opdenbosch & Lamkanfi, 2019). Die Auswertung der Proteinanalysen zeigte keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Expression von pro-Casp1. Im Gegensatz dazu konnten wir zeigen, dass LL-Mäuse eine signifikant erhöhte



Expression von aktivem Casp1 aufweisen (**p=0,0079 für Casp1 p15; *p=0,0159 für Casp1 p20).

Es gibt zahlreiche Studien, die die Struktur von Casp1 sowie Veränderungen dieser Struktur unter verschiedenen physiologischen Bedingungen beschreiben. Boucher et al. (2018) haben die Struktur von Casp1 umfassend und anschaulich dargestellt (Boucher et al., 2018). Casp1

Abbildung 19: Struktur der Maus-Caspase-1. (A) Darstellung der potenziellen Selbstverarbeitungsstellen innerhalb der CDL und IDL Caspase-1. (B) Mögliche Arten von dimerer Caspase-1, die durch CDL- und/oder IDL-Spaltung erzeugt werden (Boucher et al., 2018).

wird als Zymogen, also eine inaktive Enzym-Vorstufe pCasp1 produziert. In ihrem inaktiven Zustand beträgt ihr Molekulargewicht 46 kDa und liegt als Heterodimer vor (Abb. 19).

pCasp1 enthält eine p20 (20 kDa) und p10 (10 kDa) Untereinheit, die durch ein Interdomain linker (IDL) miteinander verbunden sind und nach Aktivierung eine katalytische Funktion übernehmen. Eine nicht-katalytische Domäne von pCasp1 ist CARD, die durch einen CARD-Domain linker (CDL) mit p20 verbunden ist. Die Funktion von CARD ist die Interaktion mit anderen CARD-haltigen Proteinen wie ASC und NLR-Familie (z.B. NLRC4, NLRP1 (Van Opdenbosch et al., 2014)) und damit die Beteiligung an der Bildung von Inflammasomen. Inflammasome dienen somit als Aktivierungsplattform für pCasp1. Wie bereits in Kapitel 1.5.3 beschrieben, erfolgt die Inflammasombildung als Reaktion auf verschiedene Stressfaktoren oder Infektionen. Inflammasome rekrutieren pCasp1, indem sie mit ihrer CARD-Domäne mit der CARD von pCasp1 interagieren. Darauf folgen die Dimerisierung und Aktivierung des Pro-Enzyms. Datta et al. (2013) nahmen an, dass die Dimerisierung durch die Nähe und lokal erhöhte Konzentration von pCasp1-Monomeren erleichtert wird (Datta, McClendon, Jacobson, & Wells, 2013). Anschließend kommt es zu einer autoproteolytischen Spaltung. Boucher et al. (2018) stellen die Hypothese auf, dass diese Spaltung von p46-Dimeren in der IDL-Region stattfindet, was zu einer transienten Form - p33/p10 Casp1 – führt (Boucher et al., 2018). Diese Form bleibt an das Inflammasom gebunden, bis eine zweite autoproteolytische Spaltung des Enzyms in der CDL-Region stattgefunden hat. Dies führt zur Entfernung der CARD-Domäne, sodass aktives Casp1 (p20/p10) aus dem Inflammasom freigesetzt wird. Das aktive Casp1 liegt dann als Heterotetramer vor und besteht aus zwei großen (20 kDa) und kleinen (10 kDa) Untereinheiten. Aktiviertes Casp1 spaltet proteolytisch pro-IL-1 β und pro-IL-18 sowie Gasdermin D in ihre aktiven Formen. Die aktiven Zytokine führen zu einer nachgeschalteten Entzündungsreaktion und Gasdermin D induziert eine Pyroptose (Van Opdenbosch & Lamkanfi, 2019).

Über die Faktoren, die die Transkription von *Casp1* hemmen, ist wenig bekannt. Boucher et al. (2018) konnten zeigen, dass die Spaltung in der CDL-Region, d. h. die Kappung der CARD-Domäne zur Bildung des p20/p10-Fragments, zu einer Destabilisierung der Casp1-Struktur und damit zu einer Signal-Terminierung führt (Boucher et al., 2018). Darüber hinaus berichteten sie, dass die Dauer der Casp1-Aktivität auch vom Zelltyp und der Größe des Inflammasoms beeinflusst wird, wobei große Inflammasome die Protease-Aktivität schneller umschalten, was zum Teil auf ihre höhere Anzahl verfügbarer Casp1-Bindungsstellen zurückzuführen ist.

Die Bedeutung einer rechtzeitigen Eindämmung der Entzündung ist hoch. McKenzie et al. (2018) konnten zeigen, dass die pharmakologische Hemmung der Casp1-Aktivität zu einer verminderten Demyelinisierung und Neurodegeneration in MS-Mausmodellen führt (McKenzie et al., 2018). Über die Faktoren, die zur Deaktivierung der Caspase1-Reaktion führen, ist jedoch sehr wenig bekannt. Boucher et al. (2015) untersuchten molekulare Mechanismen der Aktivierung und Deaktivierung von Casp1 durch Inflammasome und diskutierten die mögliche Existenz der negativen Regulationsmechanismen (Boucher et al., 2018). Sie nahmen an, dass es sich um ein universelles Prinzip der Signaltransduktion handelt, bei dem die Signalinitiierung gleichzeitig negative Rückkopplungsmechanismen auslöst, um die zellschädigende Entzündung rechtzeitig zu begrenzen. Dieser Ansatz wäre eine plausible Erklärung für unsere *Casp1*-Ergebnisse auf der Ebene der mRNA. Obwohl die ursächlichen Mechanismen nicht bekannt sind, gab es eine signifikante Herunterregulierung der Genexpression *Casp1* in der LL-Gruppe.

4.4.5 Interleukine IL-1 β und IL-18

Die IL-1-Familie besteht aus mehreren Interleukinen, wobei IL-1 β und IL-18 Substrate von Casp1 sind (Yazdi & Ghoreschi, 2016). Aktiviertes Casp1 spaltet Pro-IL-1 β und Pro-IL-18 in ihre biologisch aktiven Formen, die dann sezerniert werden (Johann et al., 2015).

In unserer Studie konnten wir die Expression von IL-1 β und IL-18 in beiden Gruppen sowohl auf mRNA als auch auf Proteinebene im Hippocampus nachweisen.

Die qRT-PCR-Analysen beider Gruppen zeigten in unserer Studie keine signifikanten Unterschiede in der mRNA-Expression von *Il-1 β* und *Il-18*. Entsprechend konnten wir durch Western Blot-Untersuchungen ebenfalls keine veränderte Expressionsmuster auf Proteinebene der beiden ILs nachweisen.

NF-kB wurde als wichtigster Transkriptionsfaktor identifiziert, der zur Genexpression von *Il-1 β* und entzündlichen Komponenten führt (F. G. Bauernfeind et al., 2009; Yang et al., 2017). Wir untersuchten die Expression von NF-kB auf Proteinebene und konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen LD- und LL-Gruppen feststellen. Somit stimmt dieses Ergebnis mit unseren bereits erwähnten *Il-1 β* mRNA-Ergebnissen überein.

Die Tatsache, dass IL-18 sowohl in LD- als auch in LL-Gruppen exprimiert waren, war nicht verwunderlich, denn dieses IL wird nachweislich konsekutiv basal produziert (Gritsenko et al., 2021). Untersucht sind hierfür bislang bereits mehrere unterschiedlichen Zelltypen, wie z. B. Makrophagen, Monozyten, dendritische Zellen sowie im ZNS Astrozyten und Mikrogliazellen (T. Liu, Zhang, Joo, & Sun, 2017). Durch unsere Experimente konnten wir also bereits vorhandene Daten bereichern und nachweisen, dass im Maushippocampus Expression von IL-18 unter physiologischen Bedingungen konsekutiv stattfindet.

Interessant sind unsere IL-1 β -Ergebnisse, denn nach dem aktuellen Wissenstand wird IL-1 β nicht basal exprimiert (Gritsenko et al., 2021). Dennoch konnten wir IL-1 β sowohl in inaktiver als auch in aktiver Form in allen Mäusen auf Gen- und Proteinebene nachweisen. Zwischen LD- und LL-Gruppen konnten wir jedoch keine signifikanten Unterschiede von diesem IL-1 β detektieren.

Die biologische Wirksamkeit und Leistungsfähigkeit von IL-1 β ist hoch und kann von einer lokalisierten Entzündungsreaktion bis hin zu systemischen Entzündungen und Fieber reichen. Aufgrund dieser Potenz sind die Transkription, Synthese und Sekretion von IL-1 β und IL-18 streng reguliert. Wie die Expression von ILs durch verschiedene Entzündungssignale reguliert wird, ist jedoch noch wenig verstanden. Zhu et al. (2017) fanden heraus, dass sich die Regulationsmechanismen von IL-18 und IL-1 β signifikant unterscheiden (Q. Zhu & Kanneganti, 2017). IL-1 β wird nur als Reaktion auf Entzündungsstimuli induziert, IL-18 wird jedoch konstitutiv exprimiert. Es wurde beobachtet, dass die Expression von IL-1 β durch chronische Stimulation induziert werden kann, und dass das nicht aufrechterhalten bleibt, sondern es zu einer prompten Herunterregulation kommt (Q. Zhu & Kanneganti, 2017). Die Synthese der Zytokine in myeloischen Zellen wie Makrophagen, Monozyten und dendritischen Zellen wird transkriptionell induziert (Fenton, 1992).

Bezüglich des Expressionsmusters von IL-1 β und IL-18 kann keine generelle Aussage getroffen werden. Denn die Expression von beiden ILs sind in verschiedenen Zelltypen Geweben sehr unterschiedlich. Beispielsweise wird IL-18 im Dickdarm in hohem Maße exprimiert und bietet Schutz vor Entzündungen, indem es die Proliferation von Epithelzellen und die Gewebereparatur fördert (Zaki, Lamkanfi, & Kanneganti, 2011). Unter physiologischen Bedingungen wird IL-1 β in geringeren Mengen dennoch trotzdem auf einem Basislevel exprimiert, ist aber bei akuten Entzündungen verstärkt vorhanden (Zaki et al., 2011). Ähnliches wurde auch bei Keratinozyten beobachtet. Diese gehören auch zu den Zellen, die IL-1 β sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene physiologischerweise exprimieren (Yazdi & Ghoreschi,

2016). Im Gegensatz dazu muss IL-1 β in myeloischen Zellen wie Makrophagen, Monozyten und dendritischen Zellen transkriptionell induziert werden (Yazdi & Ghoreschi, 2016).

In Bezug auf unsere Ergebnisse lässt sich zusammenfassen, dass im Hippocampus ebenfalls eine basale Expression unter physiologischen Bedingungen sowohl von IL-18 als auch von IL-1 β stattfindet. Es ist jedoch nicht zu differenzieren welche Zellarten – ob Gliazellen oder Neuronen hierbei die entscheidende Rolle spielen, da wir Untersuchungen von Gewebeproben von Hippocampi durchgeführt haben und nicht gezielt von spezifischen Zellarten.

Bei LL-Mäuse kam es zu keiner signifikanten Erhöhung weder von IL-18 noch von IL-1 β . Dies ist eine interessante Erkenntnis, weil in der LL-Gruppe sich Casp1-Enzym auf Proteinebene signifikant hochreguliert zeigte. Es ist unklar, welche molekulare Mechanismen hier zugrunde liegen. In der aktuellen Literatur gibt es umfangreiche Information über die möglichen Regulationsmechanismen von IL-1 β . Hierbei werden zwischen Stimuli unterschieden, die zur Induktion oder Hemmung von IL-1 β führen können. Am besten erforscht ist die IL-1 β -Produktion als Antwort auf verschiedene PAMPs und DAMPs. Dieser Prozess setzt, nach aktuellem Wissensstand, eine Bildung von Inflammasomen und Aktivierung von Casp1 voraus. Hemmende Einflüsse sind bislang wenig erforscht. Beschrieben sind Faktoren, die durch indirekte Einflüsse, z. B. durch Hemmung von Casp1 zur Suppression von IL-1 β -Produktion führt. Diese sind jedoch sehr komplex und wenig erforscht.

4.4.6 Zusammenfassung und Ausblick

Die 14-tägige Dauerlichtexposition löste eine deutliche Chronodisruption der Mäuse aus, die sich in einer veränderten Periodenlänge, Phasenverschiebung und reduzierter Rhythmusstabilität äußert. Auf systemischer Ebene konnte kein Einfluss auf die Gewichtszunahme oder auf die Anzahl der Leukozyten festgestellt werden. Im Hippocampus konnte keine Aktivierung der Astrozyten und somit keine Astrogliose festgestellt werden. Allerdings deutet die erhöhte IBA1-Immunreaktion auf eine Aktivierung der Mikroglia durch Dauerlicht hin. In weiterführenden Untersuchungen sollten Neuroprotektionsmarker sowie die Morphologie der IBA1-positiven Zellen untersucht werden, um zu differenzieren, ob es sich dabei um eine M1- oder M2-Aktivierung handelt.

Um Pro-Inflammatorische Veränderungen im Hippocampus nachzuweisen, wurden verschiedene Entzündungsmarker untersucht. Die mRNA Level von *Casp1* und *Aim2* waren in

LL-Mäusen im Vergleich zu LD-Mäusen deutlich reduziert. Das deutet möglicherweise auf eine kompensatorische transkriptionelle Herabregulation im Rahmen einer Proinflammatorischen Reaktion hin. Auf Proteinebene war die gespaltene Form von Casp1 in LL-Mäusen im Vergleich zu LD-Mäusen deutlich erhöht. Da Casp1 eine wichtige Rolle sowohl bei der Kontrolle des programmierten Zelltods sowie als Initiator der Entzündungsantwort spielt, ist dies ein sehr bedeutsames Ergebnis. Einige andere Entzündungsmarker wie NLRP1, NLRP3 und NLRC4 waren in der LL-Gruppe tendenziell gegenüber der LD-Gruppe erhöht, möglicherweise ist der Effekt hier zu gering, um mit der kleinen Gruppengröße signifikante Unterschiede zu erreichen.

Zusammenfassend weisen die Ergebnisse unserer Studie darauf hin, dass akute Chronodisruption zu einer pro-Inflammatorischen Reaktion im Hippocampus der Mäuse führt.

Diese Ergebnisse sind auch für den Menschen hoch relevant, da wir in der modernen 24/7 Gesellschaft zunehmend unphysiologischen Lichtreizen während der Nacht ausgesetzt sind, die eine Chronodisruption auslösen können. Weiterführende Studien sollten den komplexen Zusammenhang zwischen Chronodisruption und der Aktivierung des Immunsystems im ZNS aufklären und untersuchen, inwieweit die in der Maus gewonnenen Erkenntnisse auch auf den Menschen übertragen werden können.

5 Literaturverzeichnis

- Abbruzzese, E. (2011). Chronobiologie des Hormon- und des Immunsystems. In U. Ehlert & R. von Känel (Eds.), *Psychoendokrinologie und Psychoimmunologie* (pp. 129-149). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- Abo, T., Kawate, T., Itoh, K., & Kumagai, K. (1981). Studies on the bioperiodicity of the immune response. I. Circadian rhythms of human T, B, and K cell traffic in the peripheral blood. *J Immunol*, *126*(4), 1360-1363.
- Agorastos, A., Hauger, R. L., Barkauskas, D. A., Moeller-Bertram, T., Clopton, P. L., Haji, U., . . . Baker, D. G. (2014). Circadian rhythmicity, variability and correlation of interleukin-6 levels in plasma and cerebrospinal fluid of healthy men. *Psychoneuroendocrinology*, *44*, 71-82. doi:10.1016/j.psyneuen.2014.02.020
- Ajami, B., Bennett, J. L., Krieger, C., Tetzlaff, W., & Rossi, F. M. (2007). Local self-renewal can sustain CNS microglia maintenance and function throughout adult life. *Nat Neurosci*, *10*(12), 1538-1543. doi:10.1038/nn2014
- Albornoz, E. A., Woodruff, T. M., & Gordon, R. (2018). Inflammasomes in CNS Diseases. *Exp Suppl*, *108*, 41-60. doi:10.1007/978-3-319-89390-7_3
- Alliot, F., Godin, I., & Pessac, B. (1999). Microglia derive from progenitors, originating from the yolk sac, and which proliferate in the brain. *Brain Res Dev Brain Res*, *117*(2), 145-152. doi:10.1016/s0165-3806(99)00113-3
- Alliot, F., Lecain, E., Grima, B., & Pessac, B. (1991). Microglial progenitors with a high proliferative potential in the embryonic and adult mouse brain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *88*(4), 1541-1545. doi:10.1073/pnas.88.4.1541
- Arendt, J., & Skene, D. J. (2005). Melatonin as a chronobiotic. *Sleep Med Rev*, *9*(1), 25-39. doi:10.1016/j.smrv.2004.05.002
- Baker, B. J., & Richardson, J. M. L. (2006). The effect of artificial light on male breeding-season behaviour in green frogs, *Rana clamitans melanota*. *Canadian Journal of Zoology*, *84*(10), 1528-1532. doi:10.1139/z06-142
- Barbé, F., Douglas, T., & Saleh, M. (2014). Advances in Nod-like receptors (NLR) biology. *Cytokine Growth Factor Rev*, *25*(6), 681-697. doi:10.1016/j.cytogfr.2014.07.001
- Barrette, B., Hébert, M. A., Filali, M., Lafortune, K., Vallières, N., Gowing, G., . . . Lacroix, S. (2008). Requirement of myeloid cells for axon regeneration. *J Neurosci*, *28*(38), 9363-9376. doi:10.1523/jneurosci.1447-08.2008
- Bauernfeind, F., Ablasser, A., Bartok, E., Kim, S., Schmid-Burgk, J., Cavlar, T., & Hornung, V. (2011). Inflammasomes: current understanding and open questions. *Cell Mol Life Sci*, *68*(5), 765-783. doi:10.1007/s00018-010-0567-4
- Bauernfeind, F. G., Horvath, G., Stutz, A., Alnemri, E. S., MacDonald, K., Speert, D., . . . Latz, E. (2009). Cutting edge: NF-kappaB activating pattern recognition and cytokine receptors license NLRP3 inflammasome activation by regulating NLRP3 expression. *J Immunol*, *183*(2), 787-791. doi:10.4049/jimmunol.0901363
- Bell-Pedersen, D., Cassone, V. M., Earnest, D. J., Golden, S. S., Hardin, P. E., Thomas, T. L., & Zoran, M. J. (2005). Circadian rhythms from multiple oscillators: lessons from diverse organisms. *Nat Rev Genet*, *6*(7), 544-556. doi:10.1038/nrg1633
- Ben Haim, L., Carrillo-de Sauvage, M. A., Ceyzériat, K., & Escartin, C. (2015). Elusive roles for reactive astrocytes in neurodegenerative diseases. *Front Cell Neurosci*, *9*, 278. doi:10.3389/fncel.2015.00278
- Ben Haim, L., & Rowitch, D. H. (2017). Functional diversity of astrocytes in neural circuit regulation. *Nat Rev Neurosci*, *18*(1), 31-41. doi:10.1038/nrn.2016.159
- Benedict, C., Cedernaes, J., Giedraitis, V., Nilsson, E. K., Hogenkamp, P. S., Vågesjö, E., . . . Schiöth, H. B. (2014). Acute sleep deprivation increases serum levels of neuron-specific enolase (NSE) and S100 calcium binding protein B (S-100B) in healthy young men. *Sleep*, *37*(1), 195-198. doi:10.5665/sleep.3336
- Blask, D. E., Brainard, G. C., Dauchy, R. T., Hanifin, J. P., Davidson, L. K., Krause, J. A., . . . Zalatan, F. (2005). Melatonin-depleted blood from premenopausal women exposed to light at night stimulates growth of human breast cancer xenografts in nude rats. *Cancer Res*, *65*(23), 11174-11184. doi:10.1158/0008-5472.can-05-1945
- Blumenreich, M. S. (1990). The White Blood Cell and Differential Count. In H. K. Walker, W. D. Hall, & J. W. Hurst (Eds.), *Clinical Methods: The History, Physical, and Laboratory Examinations*. Boston: Butterworths

Copyright © 1990, Butterworth Publishers, a division of Reed Publishing.

Boche, D., Perry, V. H., & Nicoll, J. A. (2013). Review: activation patterns of microglia and their identification in the human brain. *Neuropathol Appl Neurobiol*, *39*(1), 3-18. doi:10.1111/nan.12011

- Bonny, O., Vinciguerra, M., Gumz, M. L., & Mazzocchi, G. (2013). Molecular bases of circadian rhythmicity in renal physiology and pathology. *Nephrol Dial Transplant*, *28*(10), 2421-2431. doi:10.1093/ndt/gft319
- Borniger, J. C., Maurya, S. K., Periasamy, M., & Nelson, R. J. (2014). Acute dim light at night increases body mass, alters metabolism, and shifts core body temperature circadian rhythms. *Chronobiol Int*, *31*(8), 917-925. doi:10.3109/07420528.2014.926911
- Boucher, D., Monteleone, M., Coll, R. C., Chen, K. W., Ross, C. M., Teo, J. L., . . . Schroder, K. (2018). Caspase-1 self-cleavage is an intrinsic mechanism to terminate inflammasome activity. *J Exp Med*, *215*(3), 827-840. doi:10.1084/jem.20172222
- Boyden, E. D., & Dietrich, W. F. (2006). Nalp1b controls mouse macrophage susceptibility to anthrax lethal toxin. *Nat Genet*, *38*(2), 240-244. doi:10.1038/ng1724
- Brancaccio, M., Edwards, M. D., Patton, A. P., Smyllie, N. J., Chesham, J. E., Maywood, E. S., & Hastings, M. H. (2019). Cell-autonomous clock of astrocytes drives circadian behavior in mammals. *Science*, *363*(6423), 187-192. doi:10.1126/science.aat4104
- Bürkstümmer, T., Baumann, C., Blüml, S., Dixit, E., Dürnberger, G., Jahn, H., . . . Superti-Furga, G. (2009). An orthogonal proteomic-genomic screen identifies AIM2 as a cytoplasmic DNA sensor for the inflammasome. *Nat Immunol*, *10*(3), 266-272. doi:10.1038/ni.1702
- Burda, J. E., & Sofroniew, M. V. (2014). Reactive gliosis and the multicellular response to CNS damage and disease. *Neuron*, *81*(2), 229-248. doi:10.1016/j.neuron.2013.12.034
- Carpenter, G. A., & Grossberg, S. (1984). A neural theory of circadian rhythms: Aschoff's rule in diurnal and nocturnal mammals. *Am J Physiol*, *247*(6 Pt 2), R1067-1082. doi:10.1152/ajpregu.1984.247.6.R1067
- Carson, M. J., Thrash, J. C., & Walter, B. (2006). The cellular response in neuroinflammation: The role of leukocytes, microglia and astrocytes in neuronal death and survival. *Clin Neurosci Res*, *6*(5), 237-245. doi:10.1016/j.cnr.2006.09.004
- Carter, S. J., Durrington, H. J., Gibbs, J. E., Blaikley, J., Loudon, A. S., Ray, D. W., & Sabroe, I. (2016). A matter of time: study of circadian clocks and their role in inflammation. *Journal of Leukocyte Biology*, *99*(4), 549-560. doi:10.1189/jlb.3RU1015-451R
- Cermakian, N., Lamont, E. W., Boudreau, P., & Boivin, D. B. (2011). Circadian clock gene expression in brain regions of Alzheimer's disease patients and control subjects. *J Biol Rhythms*, *26*(2), 160-170. doi:10.1177/0748730410395732
- Chen, Z., Jalabi, W., Shpargel, K. B., Farabaugh, K. T., Dutta, R., Yin, X., . . . Trapp, B. D. (2012). Lipopolysaccharide-induced microglial activation and neuroprotection against experimental brain injury is independent of hematogenous TLR4. *J Neurosci*, *32*(34), 11706-11715. doi:10.1523/jneurosci.0730-12.2012
- Chi-Castañeda, D., & Ortega, A. (2016). Clock Genes in Glia Cells: A Rhythmic History. *ASN Neuro*, *8*(5). doi:10.1177/1759091416670766
- Codolo, G., Plotegher, N., Pozzobon, T., Brucale, M., Tessari, I., Bubacco, L., & de Bernard, M. (2013). Triggering of inflammasome by aggregated α -synuclein, an inflammatory response in synucleinopathies. *PLoS One*, *8*(1), e55375. doi:10.1371/journal.pone.0055375
- Coomans, C. P., van den Berg, S. A., Houben, T., van Klinken, J. B., van den Berg, R., Pronk, A. C., . . . Meijer, J. H. (2013). Detrimental effects of constant light exposure and high-fat diet on circadian energy metabolism and insulin sensitivity. *Faseb j*, *27*(4), 1721-1732. doi:10.1096/fj.12-210898
- Craig, L. A., & McDonald, R. J. (2008). Chronic disruption of circadian rhythms impairs hippocampal memory in the rat. *Brain Res Bull*, *76*(1-2), 141-151. doi:10.1016/j.brainresbull.2008.02.013
- Curtis, A. M., Bellet, M. M., Sassone-Corsi, P., & O'Neill, L. A. (2014). Circadian clock proteins and immunity. *Immunity*, *40*(2), 178-186. doi:10.1016/j.immuni.2014.02.002
- Daniels, M. J., Rivers-Auty, J., Schilling, T., Spencer, N. G., Watremez, W., Fasolino, V., . . . Brough, D. (2016). Fenamate NSAIDs inhibit the NLRP3 inflammasome and protect against Alzheimer's disease in rodent models. *Nat Commun*, *7*, 12504. doi:10.1038/ncomms12504
- Dantzer, R., O'Connor, J. C., Freund, G. G., Johnson, R. W., & Kelley, K. W. (2008). From inflammation to sickness and depression: when the immune system subjugates the brain. *Nat Rev Neurosci*, *9*(1), 46-56. doi:10.1038/nrn2297
- Datta, D., McClendon, C. L., Jacobson, M. P., & Wells, J. A. (2013). Substrate and inhibitor-induced dimerization and cooperativity in caspase-1 but not caspase-3. *J Biol Chem*, *288*(14), 9971-9981. doi:10.1074/jbc.M112.426460
- Debye, B., Schmulling, L., Zhou, L., Rune, G., Beyer, C., & Johann, S. (2018). Neurodegeneration and NLRP3 inflammasome expression in the anterior thalamus of SOD1(G93A) ALS mice. *Brain Pathol*, *28*(1), 14-27. doi:10.1111/bpa.12467
- DiSabato, D. J., Quan, N., & Godbout, J. P. (2016). Neuroinflammation: the devil is in the details. *J Neurochem*, *139* Suppl 2(Suppl 2), 136-153. doi:10.1111/jnc.13607
- Dominoni, D. M., Borniger, J. C., & Nelson, R. J. (2016). Light at night, clocks and health: from humans to wild organisms. *Biol Lett*, *12*(2), 20160015. doi:10.1098/rsbl.2016.0015

- Dufort-Gervais, J., Mongrain, V., & Brouillette, J. (2019). Bidirectional relationships between sleep and amyloid-beta in the hippocampus. *Neurobiol Learn Mem*, *160*, 108-117. doi:10.1016/j.nlm.2018.06.009
- Erkkinen, M. G., Kim, M. O., & Geschwind, M. D. (2018). Clinical Neurology and Epidemiology of the Major Neurodegenerative Diseases. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, *10*(4). doi:10.1101/cshperspect.a033118
- Erren, T. C. (2010). Schichtarbeit und Krebs. *Deutsches Ärzteblatt*, 657-662. doi:DOI: 10.3238/arztebl.2010.0657
- Erren, T. C., Pape, H. G., Reiter, R. J., & Piekarski, C. (2008). Chronodisruption and cancer. *Naturwissenschaften*, *95*(5), 367-382. doi:10.1007/s00114-007-0335-y
- Erren, T. C., & Reiter, R. J. (2009). Defining chronodisruption. *J Pineal Res*, *46*(3), 245-247. doi:10.1111/j.1600-079X.2009.00665.x
- Fenton, M. J. (1992). Review: transcriptional and post-transcriptional regulation of interleukin 1 gene expression. *Int J Immunopharmacol*, *14*(3), 401-411. doi:10.1016/0192-0561(92)90170-p
- Finger, J. N., Lich, J. D., Dare, L. C., Cook, M. N., Brown, K. K., Duraiswami, C., . . . Gough, P. J. (2012). Autolytic proteolysis within the function to find domain (FIIND) is required for NLRP1 inflammasome activity. *J Biol Chem*, *287*(30), 25030-25037. doi:10.1074/jbc.M112.378323
- Flurkey, K. C., J M.; and Harrison, D E. (2007). "Mouse models in aging research." *American College Laboratory Animal Medicine (Elsevier)*, Burlington, MA. pp. 637-672. Retrieved from <https://www.jax.org/research-and-faculty/research-labs/the-harrison-lab/gerontology/life-span-as-a-biomarker>
- Fonken, L. K., Frank, M. G., Kitt, M. M., Barrientos, R. M., Watkins, L. R., & Maier, S. F. (2015). Microglia inflammatory responses are controlled by an intrinsic circadian clock. *Brain Behav Immun*, *45*, 171-179. doi:10.1016/j.bbi.2014.11.009
- Fortier, E. E., Rooney, J., Dardente, H., Hardy, M. P., Labrecque, N., & Cermakian, N. (2011). Circadian variation of the response of T cells to antigen. *J Immunol*, *187*(12), 6291-6300. doi:10.4049/jimmunol.1004030
- Freeman, L., Guo, H., David, C. N., Brickey, W. J., Jha, S., & Ting, J. P. (2017). NLR members NLRC4 and NLRP3 mediate sterile inflammasome activation in microglia and astrocytes. *J Exp Med*, *214*(5), 1351-1370. doi:10.1084/jem.20150237
- Garaulet, M., & Gómez-Abellán, P. (2013). Chronobiology and obesity. *Nutr Hosp*, *28 Suppl 5*, 114-120. doi:10.3305/nh.2013.28.sup5.6926
- Gibson, E. M., Wang, C., Tjho, S., Khattar, N., & Kriegsfeld, L. J. (2010). Experimental 'jet lag' inhibits adult neurogenesis and produces long-term cognitive deficits in female hamsters. *PLoS One*, *5*(12), e15267. doi:10.1371/journal.pone.0015267
- González, H., & Pacheco, R. (2014). T-cell-mediated regulation of neuroinflammation involved in neurodegenerative diseases. *J Neuroinflammation*, *11*, 201. doi:10.1186/s12974-014-0201-8
- Griffin, P., Dimitry, J. M., Sheehan, P. W., Lananna, B. V., Guo, C., Robinette, M. L., . . . Musiek, E. S. (2019). Circadian clock protein Rev-erba regulates neuroinflammation. *Proc Natl Acad Sci USA*, *116*(11), 5102-5107. doi:10.1073/pnas.1812405116
- Gritsenko, A., Yu, S., Martin-Sanchez, F., Diaz-Del-Olmo, I., Nichols, E. M., Davis, D. M., . . . Lopez-Castejon, G. (2021). Corrigendum: Priming Is Dispensable for NLRP3 Inflammasome Activation in Human Monocytes In Vitro. *Front Immunol*, *12*, 763899. doi:10.3389/fimmu.2021.763899
- Gu, F., Han, J., Laden, F., Pan, A., Caporaso, N. E., Stampfer, M. J., . . . Schernhammer, E. S. (2015). Total and cause-specific mortality of U.S. nurses working rotating night shifts. *Am J Prev Med*, *48*(3), 241-252. doi:10.1016/j.amepre.2014.10.018
- Guey, B., & Petrilli, V. (2016). Assessing Caspase-1 Activation. *Methods Mol Biol*, *1417*, 197-206. doi:10.1007/978-1-4939-3566-6_13
- Günther, A., Küppers-Tiedt, L., Schneider, P. M., Kunert, I., Berrouschot, J., Schneider, D., & Rossner, S. (2005). Reduced infarct volume and differential effects on glial cell activation after hyperbaric oxygen treatment in rat permanent focal cerebral ischaemia. *Eur J Neurosci*, *21*(11), 3189-3194. doi:10.1111/j.1460-9568.2005.04151.x
- Gupta, R., Ghosh, S., Monks, B., DeOliveira, R. B., Tzeng, T. C., Kalantari, P., . . . Golenbock, D. T. (2014). RNA and β -hemolysin of group B Streptococcus induce interleukin-1 β (IL-1 β) by activating NLRP3 inflammasomes in mouse macrophages. *J Biol Chem*, *289*(20), 13701-13705. doi:10.1074/jbc.C114.548982
- Halaby, R. (2012). Apoptosis and autoimmune disorders. *Autoimmune Diseases: Contributing Factors, Specific Cases of Autoimmune Diseases, and Stem Cell and Other Therapies*, 99.
- Hara, H., Tsuchiya, K., Kawamura, I., Fang, R., Hernandez-Cuellar, E., Shen, Y., . . . Mitsuyama, M. (2013). Phosphorylation of the adaptor ASC acts as a molecular switch that controls the formation of speck-like aggregates and inflammasome activity. *Nat Immunol*, *14*(12), 1247-1255. doi:10.1038/ni.2749
- Harada, N., & Inagaki, N. (2016). Role of clock genes in insulin secretion. *J Diabetes Invest*, *7*(6), 822-823. doi:10.1111/jdi.12517
- Harris, H. E., & Rucci, A. (2006). Alarmin(g) news about danger: workshop on innate danger signals and HMGB1. *EMBO Rep*, *7*(8), 774-778. doi:10.1038/sj.embor.7400759

- Hartig, S. M. (2013). Basic image analysis and manipulation in ImageJ. *Curr Protoc Mol Biol, Chapter 14, Unit 14.15*. doi:10.1002/0471142727.mb1415s102
- Haus, E., Lakatua, D. J., Swoyer, J., & Sackett-Lundeen, L. (1983). Chronobiology in hematology and immunology. *Am J Anat, 168*(4), 467-517. doi:10.1002/aja.1001680406
- Haus, E., & Smolensky, M. H. (1999). Biologic rhythms in the immune system. *Chronobiol Int, 16*(5), 581-622. doi:10.3109/07420529908998730
- Havekes, R., & Abel, T. (2017). The tired hippocampus: the molecular impact of sleep deprivation on hippocampal function. *Curr Opin Neurobiol, 44*, 13-19. doi:10.1016/j.conb.2017.02.005
- Hayashi, Y., Koyanagi, S., Kusunose, N., Okada, R., Wu, Z., Tozaki-Saitoh, H., . . . Nakanishi, H. (2013). The intrinsic microglial molecular clock controls synaptic strength via the circadian expression of cathepsin S. *Sci Rep, 3*, 2744. doi:10.1038/srep02744
- Henry, C. J., Huang, Y., Wynne, A. M., & Godbout, J. P. (2009). Peripheral lipopolysaccharide (LPS) challenge promotes microglial hyperactivity in aged mice that is associated with exaggerated induction of both pro-inflammatory IL-1beta and anti-inflammatory IL-10 cytokines. *Brain Behav Immun, 23*(3), 309-317. doi:10.1016/j.bbi.2008.09.002
- Herrero, L., Valcarcel, L., da Silva, C. A., Albert, N., Diez-Noguera, A., Cambras, T., & Serra, D. (2015). Altered circadian rhythm and metabolic gene profile in rats subjected to advanced light phase shifts. *PLoS One, 10*(4), e0122570. doi:10.1371/journal.pone.0122570
- Herzog, E. D., Hermansteyne, T., Smyllie, N. J., & Hastings, M. H. (2017). Regulating the Suprachiasmatic Nucleus (SCN) Circadian Clockwork: Interplay between Cell-Autonomous and Circuit-Level Mechanisms. *Cold Spring Harb Perspect Biol, 9*(1). doi:10.1101/cshperspect.a027706
- Homolak, J., Mudrović, M., Vukić, B., & Toljan, K. (2018). Circadian Rhythm and Alzheimer's Disease. *Med Sci (Basel), 6*(3). doi:10.3390/medsci6030052
- Honma, S., Ono, D., Suzuki, Y., Inagaki, N., Yoshikawa, T., Nakamura, W., & Honma, K. I. (2012). Suprachiasmatic nucleus: cellular clocks and networks. *Prog Brain Res, 199*, 129-141. doi:10.1016/b978-0-444-59427-3.00029-0
- Hu, M. M., & Shu, H. B. (2020). Innate Immune Response to Cytoplasmic DNA: Mechanisms and Diseases. *Annu Rev Immunol, 38*, 79-98. doi:10.1146/annurev-immunol-070119-115052
- Huang, W., Ramsey, K. M., Marcheva, B., & Bass, J. (2011). Circadian rhythms, sleep, and metabolism. *J Clin Invest, 121*(6), 2133-2141. doi:10.1172/jci46043
- Iranzo, A. (2016). Sleep in Neurodegenerative Diseases. *Sleep Med Clin, 11*(1), 1-18. doi:10.1016/j.jsmc.2015.10.011
- Irwin, A. (2018). The dark side of light: how artificial lighting is harming the natural world. *Nature, 553*(7688), 268-270. doi:10.1038/d41586-018-00665-7
- Ising, C., & Heneka, M. T. (2018). Functional and structural damage of neurons by innate immune mechanisms during neurodegeneration. *Cell Death Dis, 9*(2), 120. doi:10.1038/s41419-017-0153-x
- Ji, K., Akgul, G., Wollmuth, L. P., & Tsirka, S. E. (2013). Microglia actively regulate the number of functional synapses. *PLoS One, 8*(2), e56293. doi:10.1371/journal.pone.0056293
- Jiang, X., Zhang, T., Wang, H., Wang, T., Qin, M., Bao, P., . . . Xu, J. (2018). Neurodegeneration-associated FUS is a novel regulator of circadian gene expression. *Transl Neurodegener, 7*, 24. doi:10.1186/s40035-018-0131-y
- Johann, S., Heitzer, M., Kanagaratnam, M., Goswami, A., Rizo, T., Weis, J., . . . Beyer, C. (2015). NLRP3 inflammasome is expressed by astrocytes in the SOD1 mouse model of ALS and in human sporadic ALS patients. *Glia, 63*(12), 2260-2273. doi:10.1002/glia.22891
- Jones, T. M., Durrant, J., Michaelides, E. B., & Green, M. P. (2015). Melatonin: a possible link between the presence of artificial light at night and reductions in biological fitness. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 370*(1667). doi:10.1098/rstb.2014.0122
- Ju, Y. S., Ooms, S. J., Sutphen, C., Macauley, S. L., Zangrilli, M. A., Jerome, G., . . . Holtzman, D. M. (2017). Slow wave sleep disruption increases cerebrospinal fluid amyloid-β levels. *Brain, 140*(8), 2104-2111. doi:10.1093/brain/awx148
- Juliana, C., Fernandes-Alnemri, T., Kang, S., Farias, A., Qin, F., & Alnemri, E. S. (2012). Non-transcriptional priming and deubiquitination regulate NLRP3 inflammasome activation. *J Biol Chem, 287*(43), 36617-36622. doi:10.1074/jbc.M112.407130
- Kanegawa, N., Collste, K., Forsberg, A., Schain, M., Arakawa, R., Jucaite, A., . . . Cervenka, S. (2016). In vivo evidence of a functional association between immune cells in blood and brain in healthy human subjects. *Brain Behav Immun, 54*, 149-157. doi:10.1016/j.bbi.2016.01.019
- Kang, J. E., Lim, M. M., Bateman, R. J., Lee, J. J., Smyth, L. P., Cirrito, J. R., . . . Holtzman, D. M. (2009). Amyloid-beta dynamics are regulated by orexin and the sleep-wake cycle. *Science, 326*(5955), 1005-1007. doi:10.1126/science.1180962
- Kaushal, V., Dye, R., Pakavathkumar, P., Foveau, B., Flores, J., Hyman, B., . . . LeBlanc, A. C. (2015). Neuronal NLRP1 inflammasome activation of Caspase-1 coordinately regulates inflammatory interleukin-1-beta

- production and axonal degeneration-associated Caspase-6 activation. *Cell Death Differ*, 22(10), 1676-1686. doi:10.1038/cdd.2015.16
- Kay, C., Wang, R., Kirkby, M., & Man, S. M. (2020). Molecular mechanisms activating the NAIP-NLRC4 inflammasome: Implications in infectious disease, autoinflammation, and cancer. *Immunol Rev*, 297(1), 67-82. doi:10.1111/imr.12906
- Keller, M., Mazuch, J., Abraham, U., Eom, G. D., Herzog, E. D., Volk, H. D., . . . Maier, B. (2009). A circadian clock in macrophages controls inflammatory immune responses. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106(50), 21407-21412. doi:10.1073/pnas.0906361106
- Kelley, N., Jeltama, D., Duan, Y., & He, Y. (2019). The NLRP3 Inflammasome: An Overview of Mechanisms of Activation and Regulation. *Int J Mol Sci*, 20(13). doi:10.3390/ijms20133328
- Kempnaers, B., Borgström, P., Loës, P., Schlicht, E., & Valcu, M. (2010). Artificial night lighting affects dawn song, extra-pair siring success, and lay date in songbirds. *Curr Biol*, 20(19), 1735-1739. doi:10.1016/j.cub.2010.08.028
- Knierim, J. J. (2015). The hippocampus. *Curr Biol*, 25(23), R1116-1121. doi:10.1016/j.cub.2015.10.049
- Kolbe, I., & Oster, H. (2019). Chronodisruption, Metabolic Homeostasis, and the Regulation of Inflammation in Adipose Tissues. *Yale J Biol Med*, 92(2), 317-325.
- Krause, A. J., Simon, E. B., Mander, B. A., Greer, S. M., Saletin, J. M., Goldstein-Piekarski, A. N., & Walker, M. P. (2017). The sleep-deprived human brain. *Nat Rev Neurosci*, 18(7), 404-418. doi:10.1038/nrn.2017.55
- Kreutzmann, J. C., Havekes, R., Abel, T., & Meerlo, P. (2015). Sleep deprivation and hippocampal vulnerability: changes in neuronal plasticity, neurogenesis and cognitive function. *Neuroscience*, 309, 173-190. doi:10.1016/j.neuroscience.2015.04.053
- Kumar, Y. R., V ; Swarup, G. (2008). CASP1 (caspase 1, apoptosis-related cysteine peptidase (interleukin 1, beta, convertase)). *Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol*. 2008;12(4):269-275., 269-275. doi:<https://doi.org/10.4267/2042/38540>
- Kummer, J. A., Broekhuizen, R., Everett, H., Agostini, L., Kuijk, L., Martinon, F., . . . Tschopp, J. (2007). Inflammasome components NALP 1 and 3 show distinct but separate expression profiles in human tissues suggesting a site-specific role in the inflammatory response. *J Histochem Cytochem*, 55(5), 443-452. doi:10.1369/jhc.6A7101.2006
- Labrecque, N., & Cermakian, N. (2015). Circadian Clocks in the Immune System. *J Biol Rhythms*, 30(4), 277-290. doi:10.1177/0748730415577723
- Lamkanfi, M., & Dixit, V. M. (2009). The inflammasomes. *PLoS Pathog*, 5(12), e1000510. doi:10.1371/journal.ppat.1000510
- Lamkanfi, M., & Dixit, V. M. (2014). Mechanisms and functions of inflammasomes. *Cell*, 157(5), 1013-1022. doi:10.1016/j.cell.2014.04.007
- Lammerding, L., Slowik, A., Johann, S., Beyer, C., & Zendedel, A. (2016). Poststroke Inflammasome Expression and Regulation in the Peri-Infarct Area by Gonadal Steroids after Transient Focal Ischemia in the Rat Brain. *Neuroendocrinology*, 103(5), 460-475. doi:10.1159/000439435
- Lang, Y., Chu, F., Shen, D., Zhang, W., Zheng, C., Zhu, J., & Cui, L. (2018). Role of Inflammasomes in Neuroimmune and Neurodegenerative Diseases: A Systematic Review. *Mediators Inflamm*, 2018, 1549549. doi:10.1155/2018/1549549
- Lauretti, E., Di Meco, A., Merali, S., & Praticò, D. (2017). Circadian rhythm dysfunction: a novel environmental risk factor for Parkinson's disease. *Mol Psychiatry*, 22(2), 280-286. doi:10.1038/mp.2016.47
- LeGates, T. A., & Altimus, C. M. (2011). Measuring circadian and acute light responses in mice using wheel running activity. *J Vis Exp*(48). doi:10.3791/2463
- Lehmann, S., Esch, E., Hartmann, P., Goswami, A., Nikolin, S., Weis, J., . . . Johann, S. (2018). Expression profile of pattern recognition receptors in skeletal muscle of SOD1(G93A) amyotrophic lateral sclerosis (ALS) mice and sporadic ALS patients. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 44(6), 606-627. doi:10.1111/nan.12483
- Leng, Y., Goldman, S. M., Cawthon, P. M., Stone, K. L., Ancoli-Israel, S., & Yaffe, K. (2018). Excessive daytime sleepiness, objective napping and 11-year risk of Parkinson's disease in older men. *Int J Epidemiol*, 47(5), 1679-1686. doi:10.1093/ije/dyy098
- Leng, Y., Musiek, E. S., Hu, K., Cappuccio, F. P., & Yaffe, K. (2019). Association between circadian rhythms and neurodegenerative diseases. *Lancet Neurol*, 18(3), 307-318. doi:10.1016/s1474-4422(18)30461-7
- Leproult, R., Holmbäck, U., & Van Cauter, E. (2014). Circadian misalignment augments markers of insulin resistance and inflammation, independently of sleep loss. *Diabetes*, 63(6), 1860-1869. doi:10.2337/db13-1546
- Li, X. Q., Yu, Q., Fang, B., Zhang, Z. L., & Ma, H. (2019). Knockdown of the AIM2 molecule attenuates ischemia-reperfusion-induced spinal neuronal pyroptosis by inhibiting AIM2 inflammasome activation and subsequent release of cleaved caspase-1 and IL-1 β . *Neuropharmacology*, 160, 107661. doi:10.1016/j.neuropharm.2019.05.038

- Liddelw, S. A., & Barres, B. A. (2017). Reactive Astrocytes: Production, Function, and Therapeutic Potential. *Immunity*, 46(6), 957-967. doi:10.1016/j.immuni.2017.06.006
- Lindsay, R. M. (1986). Reactive gliosis. *Astrocytes: cell biology and pathology of astrocytes*, 3, 231-262.
- Liraz-Zaltsman, S., Alexandrovich, A. G., Trembovler, V., Fishbein, I., Yaka, R., Shohami, E., & Biegon, A. (2011). Regional sensitivity to neuroinflammation: in vivo and in vitro studies. *Synapse*, 65(7), 634-642. doi:10.1002/syn.20889
- Liu, L., & Chan, C. (2014). IPAF inflammasome is involved in interleukin-1 β production from astrocytes, induced by palmitate; implications for Alzheimer's Disease. *Neurobiol Aging*, 35(2), 309-321. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2013.08.016
- Liu, T., Zhang, L., Joo, D., & Sun, S. C. (2017). NF- κ B signaling in inflammation. *Signal Transduct Target Ther*, 2, 17023-. doi:10.1038/sigtrans.2017.23
- Logan, R. W., Zhang, C., Murugan, S., O'Connell, S., Levitt, D., Rosenwasser, A. M., & Sarkar, D. K. (2012). Chronic shift-lag alters the circadian clock of NK cells and promotes lung cancer growth in rats. *J Immunol*, 188(6), 2583-2591. doi:10.4049/jimmunol.1102715
- Longcore, T., & Rich, C. (2004). Ecological light pollution. *Frontiers in Ecology and the Environment*, 2(4), 191-198. doi:[https://doi.org/10.1890/1540-9295\(2004\)002\[0191:ELP\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1890/1540-9295(2004)002[0191:ELP]2.0.CO;2)
- Lucey, B. P., & Bateman, R. J. (2014). Amyloid- β diurnal pattern: possible role of sleep in Alzheimer's disease pathogenesis. *Neurobiol Aging*, 35 Suppl 2, S29-34. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2014.03.035
- Lyck, R., & Engelhardt, B. (2012). Going against the tide--how encephalitogenic T cells breach the blood-brain barrier. *J Vasc Res*, 49(6), 497-509. doi:10.1159/000341232
- Man, K., Loudon, A., & Chawla, A. (2016). Immunity around the clock. *Science*, 354(6315), 999-1003. doi:10.1126/science.aah4966
- Manfredini, R., Fabbian, F., Cappadona, R., & Modesti, P. A. (2018). Daylight saving time, circadian rhythms, and cardiovascular health. *Intern Emerg Med*, 13(5), 641-646. doi:10.1007/s11739-018-1900-4
- Mariathasan, S., Weiss, D. S., Newton, K., McBride, J., O'Rourke, K., Roose-Girma, M., . . . Dixit, V. M. (2006). Cryopyrin activates the inflammasome in response to toxins and ATP. *Nature*, 440(7081), 228-232. doi:10.1038/nature04515
- McComb, S., Thiriout, A., Akache, B., Krishnan, L., & Stark, F. (2019). Introduction to the Immune System. *Methods Mol Biol*, 2024, 1-24. doi:10.1007/978-1-4939-9597-4_1
- McKenzie, B. A., Mamik, M. K., Saito, L. B., Boghazian, R., Monaco, M. C., Major, E. O., . . . Power, C. (2018). Caspase-1 inhibition prevents glial inflammasome activation and pyroptosis in models of multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 115(26), E6065-e6074. doi:10.1073/pnas.1722041115
- Mildner, A., Schmidt, H., Nitsche, M., Merkler, D., Hanisch, U. K., Mack, M., . . . Prinz, M. (2007). Microglia in the adult brain arise from Ly-6ChiCCR2+ monocytes only under defined host conditions. *Nat Neurosci*, 10(12), 1544-1553. doi:10.1038/nn2015
- Minghetti, L., Ajmone-Cat, M. A., De Berardinis, M. A., & De Simone, R. (2005). Microglial activation in chronic neurodegenerative diseases: roles of apoptotic neurons and chronic stimulation. *Brain Res Brain Res Rev*, 48(2), 251-256. doi:10.1016/j.brainresrev.2004.12.015
- Moore, R. Y. (2013). The suprachiasmatic nucleus and the circadian timing system. *Prog Mol Biol Transl Sci*, 119, 1-28. doi:10.1016/b978-0-12-396971-2.00001-4
- Morin, L. P., & Allen, C. N. (2006). The circadian visual system, 2005. *Brain Res Rev*, 51(1), 1-60. doi:10.1016/j.brainresrev.2005.08.003
- Morris, C. J., Purvis, T. E., Hu, K., & Scheer, F. A. (2016). Circadian misalignment increases cardiovascular disease risk factors in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 113(10), E1402-1411. doi:10.1073/pnas.1516953113
- Mosser, D. M., & Edwards, J. P. (2008). Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol*, 8(12), 958-969. doi:10.1038/nri2448
- Müller, L., Di Benedetto, S., & Pawelec, G. (2019). The Immune System and Its Dysregulation with Aging. *Subcell Biochem*, 91, 21-43. doi:10.1007/978-981-13-3681-2_2
- Musiek, E. S., Bhimasani, M., Zangrilli, M. A., Morris, J. C., Holtzman, D. M., & Ju, Y. S. (2018). Circadian Rest-Activity Pattern Changes in Aging and Preclinical Alzheimer Disease. *JAMA Neurol*, 75(5), 582-590. doi:10.1001/jamaneurol.2017.4719
- Musiek, E. S., & Holtzman, D. M. (2016). Mechanisms linking circadian clocks, sleep, and neurodegeneration. *Science*, 354(6315), 1004-1008. doi:10.1126/science.aah4968
- Musiek, E. S., Lim, M. M., Yang, G., Bauer, A. Q., Qi, L., Lee, Y., . . . Fitzgerald, G. A. (2013). Circadian clock proteins regulate neuronal redox homeostasis and neurodegeneration. *J Clin Invest*, 123(12), 5389-5400. doi:10.1172/jci70317
- Nakamura, T. J., Nakamura, W., Yamazaki, S., Kudo, T., Cutler, T., Colwell, C. S., & Block, G. D. (2011). Age-related decline in circadian output. *J Neurosci*, 31(28), 10201-10205. doi:10.1523/jneurosci.0451-11.2011

- Nayak, D., Roth, T. L., & McGavern, D. B. (2014). Microglia development and function. *Annu Rev Immunol*, *32*, 367-402. doi:10.1146/annurev-immunol-032713-120240
- Niranjan, R. (2018). Recent advances in the mechanisms of neuroinflammation and their roles in neurodegeneration. *Neurochem Int*, *120*, 13-20. doi:10.1016/j.neuint.2018.07.003
- Norden, D. M., & Godbout, J. P. (2013). Review: microglia of the aged brain: primed to be activated and resistant to regulation. *Neuropathol Appl Neurobiol*, *39*(1), 19-34. doi:10.1111/j.1365-2990.2012.01306.x
- Norden, D. M., Trojanowski, P. J., Villanueva, E., Navarro, E., & Godbout, J. P. (2016). Sequential activation of microglia and astrocyte cytokine expression precedes increased Iba-1 or GFAP immunoreactivity following systemic immune challenge. *Glia*, *64*(2), 300-316. doi:10.1002/glia.22930
- O'Connell, K. E., Mikkola, A. M., Stepanek, A. M., Vernet, A., Hall, C. D., Sun, C. C., . . . Brown, D. E. (2015). Practical murine hematopathology: a comparative review and implications for research. *Comp Med*, *65*(2), 96-113.
- Ohsawa, K., Imai, Y., Sasaki, Y., & Kohsaka, S. (2004). Microglia/macrophage-specific protein Iba1 binds to fimbriin and enhances its actin-bundling activity. *J Neurochem*, *88*(4), 844-856. doi:10.1046/j.1471-4159.2003.02213.x
- Ohta, H., Yamazaki, S., & McMahon, D. G. (2005). Constant light desynchronizes mammalian clock neurons. *Nat Neurosci*, *8*(3), 267-269. doi:10.1038/nn1395
- Paridou, A., Velonakis, E., Langner, I., Zeeb, H., Blettner, M., & Tzonou, A. (2003). Mortality among pilots and cabin crew in Greece, 1960-1997. *Int J Epidemiol*, *32*(2), 244-247. doi:10.1093/ije/dyg056
- Park, J., Wetzel, I., Marriott, I., Dréau, D., D'Avanzo, C., Kim, D. Y., . . . Cho, H. (2018). A 3D human triculture system modeling neurodegeneration and neuroinflammation in Alzheimer's disease. *Nat Neurosci*, *21*(7), 941-951. doi:10.1038/s41593-018-0175-4
- Parkin, J., & Cohen, B. (2001). An overview of the immune system. *Lancet*, *357*(9270), 1777-1789. doi:10.1016/s0140-6736(00)04904-7
- Pfeffer, M., Plenzig, S., Gispert, S., Wada, K., Korf, H. W., & Von Gall, C. (2012). Disturbed sleep/wake rhythms and neuronal cell loss in lateral hypothalamus and retina of mice with a spontaneous deletion in the ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase L1 gene. *Neurobiol Aging*, *33*(2), 393-403. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2010.02.019
- Pillai, J. A., & Leverenz, J. B. (2017). Sleep and Neurodegeneration: A Critical Appraisal. *Chest*, *151*(6), 1375-1386. doi:10.1016/j.chest.2017.01.002
- Pittendrigh, C. S. (1993). Temporal organization: reflections of a Darwinian clock-watcher. *Annu Rev Physiol*, *55*, 16-54. doi:10.1146/annurev.ph.55.030193.000313
- Popovich, P. G., Guan, Z., Wei, P., Huitinga, I., van Rooijen, N., & Stokes, B. T. (1999). Depletion of hematogenous macrophages promotes partial hindlimb recovery and neuroanatomical repair after experimental spinal cord injury. *Exp Neurol*, *158*(2), 351-365. doi:10.1006/exnr.1999.7118
- Prendergast, B. J., Cable, E. J., Patel, P. N., Pyter, L. M., Onishi, K. G., Stevenson, T. J., . . . Bradley, S. P. (2013). Impaired leukocyte trafficking and skin inflammatory responses in hamsters lacking a functional circadian system. *Brain Behav Immun*, *32*, 94-104. doi:10.1016/j.bbi.2013.02.007
- Prinz, M., & Priller, J. (2014). Microglia and brain macrophages in the molecular age: from origin to neuropsychiatric disease. *Nat Rev Neurosci*, *15*(5), 300-312. doi:10.1038/nrn3722
- Refinetti, R. (2004). Non-stationary time series and the robustness of circadian rhythms. *J Theor Biol*, *227*(4), 571-581. doi:10.1016/j.jtbi.2003.11.032
- Reith, W. (2018). [Neurodegenerative diseases]. *Radiologe*, *58*(3), 241-258. doi:10.1007/s00117-018-0363-y
- Reppert, S. M., & Weaver, D. R. (2002). Coordination of circadian timing in mammals. *Nature*, *418*(6901), 935-941. doi:10.1038/nature00965
- Riley, L. K., & Rupert, J. (2015). Evaluation of Patients with Leukocytosis. *Am Fam Physician*, *92*(11), 1004-1011.
- Russo, M. V., & McGavern, D. B. (2015). Immune Surveillance of the CNS following Infection and Injury. *Trends Immunol*, *36*(10), 637-650. doi:10.1016/j.it.2015.08.002
- Sangiuliano, B., Pérez, N. M., Moreira, D. F., & Belizário, J. E. (2014). Cell death-associated molecular-pattern molecules: inflammatory signaling and control. *Mediators Inflamm*, *2014*, 821043. doi:10.1155/2014/821043
- Saresella, M., La Rosa, F., Piancone, F., Zoppis, M., Marventano, I., Calabrese, E., . . . Clerici, M. (2016). The NLRP3 and NLRP1 inflammasomes are activated in Alzheimer's disease. *Mol Neurodegener*, *11*, 23. doi:10.1186/s13024-016-0088-1
- Schain, M., & Kreisl, W. C. (2017). Neuroinflammation in Neurodegenerative Disorders-a Review. *Curr Neurol Neurosci Rep*, *17*(3), 25. doi:10.1007/s11910-017-0733-2
- Scheiermann, C., Kunisaki, Y., & Frenette, P. S. (2013). Circadian control of the immune system. *Nat Rev Immunol*, *13*(3), 190-198. doi:10.1038/nri3386
- Schernhammer, E. S., Kroenke, C. H., Laden, F., & Hankinson, S. E. (2006). Night work and risk of breast cancer. *Epidemiology*, *17*(1), 108-111. doi:10.1097/01.ede.0000190539.03500.c1

- Schernhammer, E. S., Laden, F., Speizer, F. E., Willett, W. C., Hunter, D. J., Kawachi, I., & Colditz, G. A. (2001). Rotating night shifts and risk of breast cancer in women participating in the nurses' health study. *J Natl Cancer Inst*, *93*(20), 1563-1568. doi:10.1093/jnci/93.20.1563
- Schernhammer, E. S., Laden, F., Speizer, F. E., Willett, W. C., Hunter, D. J., Kawachi, I., . . . Colditz, G. A. (2003). Night-shift work and risk of colorectal cancer in the nurses' health study. *J Natl Cancer Inst*, *95*(11), 825-828. doi:10.1093/jnci/95.11.825
- Schroder, K., Sagulenko, V., Zamoshnikova, A., Richards, A. A., Cridland, J. A., Irvine, K. M., . . . Sweet, M. J. (2012). Acute lipopolysaccharide priming boosts inflammasome activation independently of inflammasome sensor induction. *Immunobiology*, *217*(12), 1325-1329. doi:10.1016/j.imbio.2012.07.020
- Seo, J., & Lee, K.-J. (2004). Post-translational modifications and their biological functions: proteomic analysis and systematic approaches. *Journal of biochemistry and molecular biology*, *37*(1), 35-44.
- Serhan, C. N., & Savill, J. (2005). Resolution of inflammation: the beginning programs the end. *Nat Immunol*, *6*(12), 1191-1197. doi:10.1038/ni1276
- Shabab, T., Khanabdali, R., Moghadamtousi, S. Z., Kadir, H. A., & Mohan, G. (2017). Neuroinflammation pathways: a general review. *Int J Neurosci*, *127*(7), 624-633. doi:10.1080/00207454.2016.1212854
- Shalini, S., Dorstyn, L., Dawar, S., & Kumar, S. (2015). Old, new and emerging functions of caspases. *Cell Death Differ*, *22*(4), 526-539. doi:10.1038/cdd.2014.216
- Sharma, B. R., Karki, R., & Kanneganti, T. D. (2019). Role of AIM2 inflammasome in inflammatory diseases, cancer and infection. *Eur J Immunol*, *49*(11), 1998-2011. doi:10.1002/eji.201848070
- Shokri-Kojori, E., Wang, G. J., Wiers, C. E., Demiral, S. B., Guo, M., Kim, S. W., . . . Volkow, N. D. (2018). β -Amyloid accumulation in the human brain after one night of sleep deprivation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *115*(17), 4483-4488. doi:10.1073/pnas.1721694115
- Silver, A. C., Arjona, A., Walker, W. E., & Fikrig, E. (2012). The circadian clock controls toll-like receptor 9-mediated innate and adaptive immunity. *Immunity*, *36*(2), 251-261. doi:10.1016/j.immuni.2011.12.017
- Simon, S. I., & Kim, M.-H. (2010). A day (or 5) in a neutrophil's life. *Blood*, *116*(4), 511-512. doi:10.1182/blood-2010-05-283184
- Skeldon, A., & Saleh, M. (2011). The inflammasomes: molecular effectors of host resistance against bacterial, viral, parasitic, and fungal infections. *Front Microbiol*, *2*, 15. doi:10.3389/fmicb.2011.00015
- Sofroniew, M. V., & Vinters, H. V. (2010). Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathol*, *119*(1), 7-35.
- Sollars, P. J., & Pickard, G. E. (2015). The Neurobiology of Circadian Rhythms. *Psychiatr Clin North Am*, *38*(4), 645-665. doi:10.1016/j.psc.2015.07.003
- Song, H., Moon, M., Choe, H. K., Han, D. H., Jang, C., Kim, A., . . . Mook-Jung, I. (2015). β -induced degradation of BMAL1 and CBP leads to circadian rhythm disruption in Alzheimer's disease. *Mol Neurodegener*, *10*, 13. doi:10.1186/s13024-015-0007-x
- Sookoian, S., Gemma, C., Fernández Gianotti, T., Burgueño, A., Alvarez, A., González, C. D., & Pirola, C. J. (2007). Effects of rotating shift work on biomarkers of metabolic syndrome and inflammation. *J Intern Med*, *261*(3), 285-292. doi:10.1111/j.1365-2796.2007.01766.x
- Stephan, F. K., & Zucker, I. (1972). Circadian rhythms in drinking behavior and locomotor activity of rats are eliminated by hypothalamic lesions. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *69*(6), 1583-1586. doi:10.1073/pnas.69.6.1583
- Straif, K., Baan, R., Grosse, Y., Secretan, B., El Ghissassi, F., Bouvard, V., . . . Coglianò, V. (2007). Carcinogenicity of shift-work, painting, and fire-fighting. *Lancet Oncol*, *8*(12), 1065-1066. doi:10.1016/s1470-2045(07)70373-x
- Tähkämö, L., Partonen, T., & Pesonen, A. K. (2019). Systematic review of light exposure impact on human circadian rhythm. *Chronobiol Int*, *36*(2), 151-170. doi:10.1080/07420528.2018.1527773
- Takahashi, J. S., Hong, H. K., Ko, C. H., & McDearmon, E. L. (2008). The genetics of mammalian circadian order and disorder: implications for physiology and disease. *Nat Rev Genet*, *9*(10), 764-775. doi:10.1038/nrg2430
- Tan, M. S., Tan, L., Jiang, T., Zhu, X. C., Wang, H. F., Jia, C. D., & Yu, J. T. (2014). Amyloid- β induces NLRP1-dependent neuronal pyroptosis in models of Alzheimer's disease. *Cell Death Dis*, *5*(8), e1382. doi:10.1038/cddis.2014.348
- Tapia-Osorio, A., Salgado-Delgado, R., Angeles-Castellanos, M., & Escobar, C. (2013). Disruption of circadian rhythms due to chronic constant light leads to depressive and anxiety-like behaviors in the rat. *Behav Brain Res*, *252*, 1-9. doi:10.1016/j.bbr.2013.05.028
- Tarquini, R., Carbone, A., Martinez, M., & Mazzoccoli, G. (2019). Daylight saving time and circadian rhythms in the neuro-endocrine-immune system: impact on cardiovascular health. *Intern Emerg Med*, *14*(1), 17-19. doi:10.1007/s11739-018-1984-x
- Taufique, S. T., Prabhat, A., & Kumar, V. (2019). Light at night affects hippocampal and nidopallial cytoarchitecture: Implication for impairment of brain function in diurnal corvids. *J Exp Zool A Ecol Integr Physiol*, *331*(2), 149-156. doi:10.1002/jez.2238

- Thosar, S. S., Butler, M. P., & Shea, S. A. (2018). Role of the circadian system in cardiovascular disease. *J Clin Invest*, *128*(6), 2157-2167. doi:10.1172/jci80590
- Thundiyil, J., & Lim, K. L. (2015). DAMPs and neurodegeneration. *Ageing Res Rev*, *24*(Pt A), 17-28. doi:10.1016/j.arr.2014.11.003
- Tough, D. F., & Sprent, J. (1995). Lifespan of lymphocytes. *Immunologic Research*, *14*(1), 1-12. doi:10.1007/BF02918494
- Toutou, Y., Reinberg, A., & Toutou, D. (2017). Association between light at night, melatonin secretion, sleep deprivation, and the internal clock: Health impacts and mechanisms of circadian disruption. *Life Sci*, *173*, 94-106. doi:10.1016/j.lfs.2017.02.008
- Ueno, M., Fujita, Y., Tanaka, T., Nakamura, Y., Kikuta, J., Ishii, M., & Yamashita, T. (2013). Layer V cortical neurons require microglial support for survival during postnatal development. *Nat Neurosci*, *16*(5), 543-551. doi:10.1038/nn.3358
- Van Oudenbosch, N., Gurung, P., Vande Walle, L., Fossoul, A., Kanneganti, T. D., & Lamkanfi, M. (2014). Activation of the NLRP1b inflammasome independently of ASC-mediated caspase-1 autoproteolysis and speck formation. *Nat Commun*, *5*, 3209. doi:10.1038/ncomms4209
- Van Oudenbosch, N., & Lamkanfi, M. (2019). Caspases in Cell Death, Inflammation, and Disease. *Immunity*, *50*(6), 1352-1364. doi:10.1016/j.immuni.2019.05.020
- Videnovic, A., Noble, C., Reid, K. J., Peng, J., Turek, F. W., Marconi, A., . . . Zee, P. C. (2014). Circadian melatonin rhythm and excessive daytime sleepiness in Parkinson disease. *JAMA Neurol*, *71*(4), 463-469. doi:10.1001/jamaneurol.2013.6239
- Vitale, J. A., Lombardi, G., Weydahl, A., & Banfi, G. (2018). Biological rhythms, chronodisruption and chronoenhancement: The role of physical activity as synchronizer in correcting steroids circadian rhythm in metabolic dysfunctions and cancer. *Chronobiol Int*, *35*(9), 1185-1197. doi:10.1080/07420528.2018.1475395
- Voet, S., Srinivasan, S., Lamkanfi, M., & van Loo, G. (2019). Inflammasomes in neuroinflammatory and neurodegenerative diseases. *EMBO Mol Med*, *11*(6). doi:10.15252/emmm.201810248
- Walsh, J. G., Muruve, D. A., & Power, C. (2014). Inflammasomes in the CNS. *Nat Rev Neurosci*, *15*(2), 84-97. doi:10.1038/nrn3638
- Wang, W., Nguyen, L. T., Burlak, C., Chegini, F., Guo, F., Chataway, T., . . . Hoang, Q. Q. (2016). Caspase-1 causes truncation and aggregation of the Parkinson's disease-associated protein α -synuclein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *113*(34), 9587-9592. doi:10.1073/pnas.1610099113
- Weissová, K., Bartoš, A., Sládek, M., Nováková, M., & Sumová, A. (2016). Moderate Changes in the Circadian System of Alzheimer's Disease Patients Detected in Their Home Environment. *PLoS One*, *11*(1), e0146200. doi:10.1371/journal.pone.0146200
- Welsh, D. K., Takahashi, J. S., & Kay, S. A. (2010). Suprachiasmatic nucleus: cell autonomy and network properties. *Annu Rev Physiol*, *72*, 551-577. doi:10.1146/annurev-physiol-021909-135919
- Wohleb, E. S., McKim, D. B., Shea, D. T., Powell, N. D., Tarr, A. J., Sheridan, J. F., & Godbout, J. P. (2014). Re-establishment of anxiety in stress-sensitized mice is caused by monocyte trafficking from the spleen to the brain. *Biol Psychiatry*, *75*(12), 970-981. doi:10.1016/j.biopsych.2013.11.029
- Wu, P. J., Hung, Y. F., Liu, H. Y., & Hsueh, Y. P. (2017). Deletion of the Inflammasome Sensor Aim2 Mitigates A β Deposition and Microglial Activation but Increases Inflammatory Cytokine Expression in an Alzheimer Disease Mouse Model. *Neuroimmunomodulation*, *24*(1), 29-39. doi:10.1159/000477092
- Yang, J., Liu, Z., & Xiao, T. S. (2017). Post-translational regulation of inflammasomes. *Cell Mol Immunol*, *14*(1), 65-79. doi:10.1038/cmi.2016.29
- Yazdi, A. S., & Ghoreschi, K. (2016). The Interleukin-1 Family. *Adv Exp Med Biol*, *941*, 21-29. doi:10.1007/978-94-024-0921-5_2
- Yoo, S. H., Yamazaki, S., Lowrey, P. L., Shimomura, K., Ko, C. H., Buhr, E. D., . . . Takahashi, J. S. (2004). PERIOD2::LUCIFERASE real-time reporting of circadian dynamics reveals persistent circadian oscillations in mouse peripheral tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *101*(15), 5339-5346. doi:10.1073/pnas.0308709101
- Zaki, M. H., Lamkanfi, M., & Kanneganti, T. D. (2011). The Nlrp3 inflammasome: contributions to intestinal homeostasis. *Trends Immunol*, *32*(4), 171-179. doi:10.1016/j.it.2011.02.002
- Zhu, B., Dong, Y., Xu, Z., Gompf, H. S., Ward, S. A., Xue, Z., . . . Xie, Z. (2012). Sleep disturbance induces neuroinflammation and impairment of learning and memory. *Neurobiol Dis*, *48*(3), 348-355. doi:10.1016/j.nbd.2012.06.022
- Zhu, Q., & Kanneganti, T. D. (2017). Cutting Edge: Distinct Regulatory Mechanisms Control Proinflammatory Cytokines IL-18 and IL-1 β . *J Immunol*, *198*(11), 4210-4215. doi:10.4049/jimmunol.1700352

6 Anhang

Tabelle 10: Puffer und Lösungen

Lösung	Ansatz
0,3% Sudan-Schwarz-Lösung	300 mg Sudan Schwarz 100 ml 70% Ethanol
10% Ammoniumperoxodisulfat (APS)	0,1 g APS 1 ml bidestilliertes H ₂ O
10x Sodium-dodecyl-sulfat (SDS)	30,8 g Tris 10 g SDS 144,1 g Glycin 1 l destilliertes H ₂ O
10x Tris-buffered-saline (TBS)	pH 8-8,9 24,23 g Tris Pufferan 87,7 g NaCl 1 l destilliertes H ₂ O
10x Tris-buffered-saline-tween20 (TBST)	pH 7,4 48,44 g Tris Pufferan 175,4 g NaCl 20 ml Tweenâ 20 2 l destilliertes H ₂ O
2x Laemmlipuffer	pH 7,4 Bio-Rad Laboratories Inc., USA
5% Milch	500 ml TBS 25 g Milchpulver
50% Ethanol	50 ml Ethanol 100% 50 ml destilliertes H ₂ O
70% Ethanol	70 ml Ethanol 100% 30 ml destilliertes H ₂ O
96% Ethanol	96 ml Ethanol 100% 4 ml destilliertes H ₂ O
Citratpuffer	2,1 g Citronensäure 1000 ml destilliertes H ₂ O
Comassie-Blau-Lösung	pH 6,0 0,5 g Brillant Blau R 250 500 ml bidestilliertes Wasser
Eosin Färbe-Stock-Lösung	2 g Eosin 100 ml Ethanol 50%
Eosin-Färbelösung	150 µl Essigsäure 25 ml Eosin Färbe-Stock-Lösung 225 ml Ethanol 50%
Immunfluoreszenz Puffer	500 mg BSA 49 ml PBS 1 ml FSA
Mayer Hämatoxylin-Lösung	1 g Hämatoxylin 0,2 g Natriumiodat 50 g Aluminiumkaliumsulfat 1 g Essigsäure 50 g Chloralhydrat 800 ml Leitungswasser zu 1000 ml Leitungswasser

PBS	9,55 g PBS Dulbecco 10 l destilliertes H ₂ O pH 7,4
Perfusionslösung	4,6 g NaH ₂ PO ₄ 8 g Na ₂ HPO ₄ 100 ml 37%iges Formaldehyd 900 ml destilliertes H ₂ O
Ponceau-S-Lösung	0,5 g Ponceau 500 ml 5% Essigsäure
Puffer für Pappenheim-Färbung	10 l destilliertes H ₂ O 0,2 mol : 125 ml NaOH 0,2 mol : 290 ml KH ₂ PO ₄ pH 6,8
Radioimmunoprecipitation- assay (RIPA)-Puffer	5 ml Tris-HCl 1 ml Tritonâ X 100 0,8766 g NaCl 0,5 g Desoxycholsäure 0,1 g SDS 100 ml destilliertes H ₂ O pH 8
Sammelgel (2x1 mm Gel)	1,6 ml destilliertes H ₂ O 313 µl 40% Acryl 625 µl Sammelgel-Puffer 2,5 µl Temed 25 µl 10% APS
Sammelgel-Puffer	18,91 g 0,6 M Tris-Cl 0,8 g 0,4% SDS 200 ml destilliertes H ₂ O pH 6,8
Tankblot-Puffer	100 ml Methanol 3,03 g Tris Pufferan 14,41 g Glycin 10XSDS 1-2 ml
Trenngel (14%)	1,5 ml destilliertes H ₂ O 1,4 ml 40% Acrylamid 1 ml Trenngel-Puffer 4 µl Temed 40 µl 10% APS
Trenngel (8%)	2,2 ml destilliertes H ₂ O 800 µl 40% Acrylamid 1 ml Trenngel-Puffer 4 µl Temed 40 µl 10% APS
Trenngel-Puffer	2 l destilliertes H ₂ O pH 8-8,9 36,94 g 1,5 M Tris 0,8 g 0,4% SDS 200 ml destilliertes H ₂ O
Tris-EDTA	pH 8,8 1,21 g TRIS 0,37 g EDTA 1000 ml destilliertes H ₂ O pH 9,0

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich herzlich bei allen bedanken, die mir während meiner Promotion zur Seite standen.

Zunächst bedanke ich mich bei meiner Doktormutter Frau Prof. Dr. Charlotte von Gall für die Aufnahme in ihrer Abteilung sowie die ausgezeichnete wissenschaftliche Betreuung. Danke für Ihr Vertrauen und die lehrreiche Zeit im Institut für Anatomie II!

Ein weiteres großes Dankeschön geht an Frau Dr. Sonja Johann für das spannende Forschungsthema sowie die exzellente Betreuung im Labor. Danke für Deine unermüdliche Unterstützung und Stärkung meiner Selbstständigkeit. Ich habe von Dir sehr viel gelernt.

Auch Angelika Hallenberger, Ralf Fassbender, Ursula Lammersen und Hanna Bellert bin ich zutiefst dankbar. Ohne Eure Hilfsbereitschaft hätte ich es nie allein zu Ende gebracht.

Zuletzt möchte ich mich bei meiner Familie bedanken. Meine Dankbarkeit an Euch lässt sich mit Worten nicht ausdrücken.

