

Beeinflussung (steriler) entzündlicher Prozesse in Makrophagen durch lysosomotrope Arzneistoffe

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

Anne Charlotte Lübow

aus Bremen

Bonn, November 2020

Angefertigt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. Günther Weindl
2. Gutachter: Prof. Dr. Alf Lamprecht

Tag der Promotion: 15.04.2021

Erscheinungsjahr: 2021

Die vorliegende Arbeit wurde unter Anregung und Anleitung von Prof. Dr. Günther Weindl von April 2016 bis Juni 2020 in der Pharmakologie und Toxikologie des Instituts für Pharmazie der Freien Universität Berlin sowie in der Abteilung Pharmakologie und Toxikologie des Pharmazeutischen Instituts der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn angefertigt.

Des Weiteren ist die vorliegende Arbeit an den nachstehenden Stellen auszugsweise veröffentlicht worden.

Veröffentlichung in Biochemical Pharmacology:

Charlotte Lübow, Judith Bockstiegel, Günther Weindl. *Lysosomotropic drugs enhance pro-inflammatory responses to IL-1beta in macrophages by inhibiting internalization of the IL-1 receptor*. Biochemical Pharmacology. 2020. **175**: p. 113864.

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2020.113864>

In diese Arbeit miteinbezogen: **Komplette Publikation mit Ausnahme von Fig. 2 A und Fig. 6 B und C**

Veröffentlichung in Biochimica et biophysica acta Molecular and cell biology of lipids:

Anja Pfalzgraff, Wilma Correa, Lena Heinbockel, Andra B.Schromm, **Charlotte Lübow**, Nicolas Gisch, Guillermo Martinez-de-Tejada, Klaus Brandenburg, Günther Weindl. *LPS-neutralizing peptides reduce outer membrane vesicle-induced inflammatory responses*. Biochimica et biophysica acta Molecular and cell biology of lipids. 2019. **1864**(10): p. 1503-1513.

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2019.05.018>

In diese Arbeit miteinbezogen: **Supplementary data, Supplementary Fig. 1**

Danksagung

Mein großer Dank geht zunächst an meinen Doktorvater Prof. Günther Weindl für die Vergabe dieses interessanten Themas und die ausgezeichnete Betreuung in den letzten 4 Jahren. Ich konnte stets auf deine außerordentlich hohe fachliche Kompetenz zurückgreifen und habe insbesondere den fairen Umgang mit allen Mitarbeiter*innen und dem gesamtem Kollegium immer sehr geschätzt. Danke für die zahlreichen interessanten Konferenzen, die ich mit deiner Unterstützung besuchen konnte, vor allem die in Brügge, São Paulo und Porto. Bei unserem Umzug nach Bonn habe ich besonders dein Vertrauen bei der Planung und Umsetzung des Laborumbaus sowie der Laboreinrichtung geschätzt. Du warst stets für meine Ideen und Anregungen offen, dafür danke ich dir sehr. Nie vergessen werde ich außerdem den Karaokeauftritt der AG Weindl bei der Instituts-Weihnachtsfeier 2019 sowie die gemeinsame rheinische Taufe beim spacigen Karneval 2020.

Ich möchte mich herzlich bei Herrn Prof. Lamprecht für die Erstellung des Zweitgutachtens bedanken. Ich danke Prof. Meinke aus der Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie der Charité Berlin für die Möglichkeit der ESR Spektroskopie Messungen im Frühjahr 2018 bei Ihnen im Arbeitskreis. Insbesondere möchte ich Dr. Silke Lohan für die tatkräftige Unterstützung bei den Versuchen bedanken!

Ich danke dem gesamten Arbeitskreis Weindl inklusive aller ehemaligen Mitarbeiter*innen der FU Berlin sowie der Universität Bonn für die angenehme Arbeitsatmosphäre und die Unterstützung in den letzten Jahren, sowohl auf der Arbeit, als auch privat. Dies gilt selbstverständlich auch für die gesamte ehemalige Pharmakologie und Toxikologie der FU Berlin inklusive dem AK Hedtrich und dem AK MSK.

Besonders hervorheben möchte ich an dieser Stelle folgende Personen:

- Judith Bockstiegel, was wäre das letzte Jahr nur ohne dich gewesen? Danke, dass wir gemeinsam das Abenteuer Bonn angetreten haben! Danke für die ausgesprochen gute Zeit sowohl in Berlin als auch in Bonn. Ohne dich hätte ich mir keinen Wechsel in die Bundesstadt vorstellen können! Danke für die geteilte Liebe zu Tuc-Schokolade, Mini-Cornetto und Käse! Mit dir wurde es nie langweilig und deine Unterstützung sowohl privat als auch innerhalb der Universität sowie beim Zwischenlesen meiner Dissertation hat einen wesentlichen Anteil zu dieser Arbeit beigetragen!

- Dr. Maria Grabowski, danke für die schöne Zeit in Berlin, als treue Kollegin und Büronachbarin. Ich habe deinen Rat und deine Einschätzung zu allen Lebenslagen immer sehr geschätzt, insbesondere, weil du es immer geschafft hast, einen neuen Blickwinkel auf die Dinge zu bringen und allem mit einer unglaublichen Fairness und Umsichtigkeit begegnet bist! Danke dafür, ich habe dadurch sehr viel gelernt!

- Anne Eichhorst, du warst mein großer Lichtblick während meiner Promotionszeit in Berlin. Deine unfassbare positive Energie hat mir immer zu neuem Schwung verholfen und du bist eine so so gute Freundin für mich geworden! Du warst oft wie eine Seelenverwandte, die mit mir immer wieder die

Gedanken von Menschlichkeit und Offenherzigkeit geteilt hat und vor allem die Idee, dass man sich nicht von dem, was andere tun oder sagen, leiten lassen soll.

- Patrick Graff, mein absoluter Lieblingskollege und #trettloverincrime. Nie werde ich vergessen, wie ich sowohl praktisch als auch psychisch fast am IL-23 ELISA für Gerrits Revision gescheitert bin und du einfach für mich da warst! Und nochmal 10 000 für die Hilfe beim Auffinden von Daten aus Berlin!
#sameoven #elisakannich #babyonboard #nohashtagwithoutpii #neverforget #frombtob

- Dr. Christian Zoschi Zoschke, danke, dass du immer mit Rat und Tat zur Seite standest und mir vor allem psychische Unterstützung in dieser verrückten Zeit in Berlin geleistet hast. Dein Zuspruch hat definitiv einen wesentlichen Teil dazu beigetragen, dass ich diese Arbeit überhaupt weitergeführt habe. Mein außerordentlicher Dank gilt außerdem dem Korrekturlesen dieser Arbeit!

- Petra Schmidti Heine, schade, dass du uns nicht nach Bonn begleitet hast! Die zahlreichen lieben Gespräche, deine herzliche Art und natürlich auch das Stückchen Schokoladen, dass bei jedem Besuch in deinem Büro auf mich wartete, war stets ein dicker Seelentröster!

- Dr. Ryan Guterman, the story how we both met at the coat check of an after-hour club in Toronto is still one of my favourites. Science and coincidence brought us together and I don't want to miss you in my life! You became such a great friend of mine and I miss our times in Berlin. Thanks for sharing your enthusiasm for science with me. It was a pleasure to discover Berlin with you and showing you some German traditions. And in the end, thank you so much for revision of my manuscript and other stuff I wrote in English.

- Thilo Faber, wenn du auch von allen zeitlich gesehen den kleinsten Anteil an dieser Arbeit hast, so warst du ein wahnsinnig starker Halt für mich im Endspurt meiner Promotion. Dein unfassbar gutes Herz und deine liebevolle Art haben mich besonders in der Schreibphase durchhalten und weitermachen lassen!

Zu guter Letzt möchte ich meiner Familie sowie meinen Freunden und insbesondere der Apotheker-Crew aus Kieler Zeiten für die Unterstützung und den Halt in den letzten 4,5 Jahren danken. Ein besonderer Dank geht dabei an meine zwei Besten Romi und Ninja, danke, dass ihr immer an mich geglaubt habt!

Schließlich möchte ich im besonderen Maß Oma Barbara erwähnen, die mit ihren inzwischen 90 Jahren ganz besonders dem Ende meiner Promotionszeit entgegengefeiert hat. Auch wenn du wahrscheinlich von allen hier genannten die geringste Idee davon hast, was ich so in den letzten Jahren überhaupt getrieben habe, so hast du immer am meisten Verständnis zeigen können, somit sei dir diese Arbeit gewidmet!

Für Oma Barbara

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	VI
Tabellenverzeichnis	IX
Abkürzungsverzeichnis	XII
1. Einleitung.....	1
1.1 Makrophagen.....	2
1.1.1 Ontogenese und Subtypen.....	3
1.1.1.1 Gewebsansässige Makrophagen.....	3
1.1.1.2 Rekrutierte Makrophagen.....	5
1.1.1.3 Das M1 und M2 Paradigma.....	6
1.1.2 Makrophagen und das angeborene Immunsystem.....	8
1.2 Autophagozytose, Endozytose und das Lysosom.....	9
1.2.1 Autophagozytose.....	10
1.2.1.1 Mechanismus, Induktion und Regulation der Autophagozytose.....	10
1.2.1.2 Autophagozytose, Immunsystem und Entzündungen.....	12
1.2.2 Endozytose.....	14
1.2.2.1 Clathrin-vermittelte und Clathrin-unabhängige Endozytose.....	15
1.2.3 Das Lysosom und Lysosomotropie.....	16
1.2.3.1 Funktion und Aufbau des Lysosoms.....	16
1.2.3.2 Lysosomotrope Dysfunktion.....	18
1.2.3.3 Lysosomotrope Stoffe.....	18
1.3 Interleukin-1 β	20
1.3.1 Aufbau, Funktion und Pathogenese.....	20
1.3.2 Generierung von Interleukin-1 β über das Inflammasom.....	21
1.3.3 Interleukin-1 Signalweg.....	23
1.3.4 Endozytose und Internalisierung des IL-1 Rezeptors.....	25
1.4 Zielsetzung.....	25
2. Material und Methoden.....	27
2.1 Material.....	28
2.1.1 Geräte.....	28
2.1.2 Reagenzien und Verbrauchsmaterialien.....	30

2.1.3	Verwendete Lösungen.....	36
2.1.3.1	Lösungen zur Zellkultivierung.....	36
2.1.3.2	Lösungen für den Mykoplasmen-Test.....	39
2.1.3.3	Stocklösungen für Stimulationsversuche.....	40
2.1.3.4	Lösungen für die Durchflusszytometrie.....	41
2.1.3.5	Lösungen für Zellviabilitäts-Tests.....	42
2.1.3.6	Lösungen für die ELISA-Analytik.....	43
2.1.3.7	Lösungen für die PCR-Analytik.....	45
2.1.3.8	Lösungen für die Western Blot Analytik.....	45
2.1.3.9	Lösungen für die ESR-Spektroskopie.....	50
2.1.3.10	Lösungen für den SEAP-Reporter-Test.....	51
2.1.4	Software.....	52
2.2	Zellkultur.....	52
2.2.1	Beschichtung der Zellkulturplatten mit Polylysin.....	53
2.2.2	THP-1 Monozyten und THP-1 Makrophagen.....	53
2.2.2.1	Kultivierung, Einfrieren und Auftauen von THP-1 Monozyten.....	54
2.2.2.2	Differenzierung von THP-1 Monozyten zu THP-1 Makrophagen.....	54
2.2.3	Primäre Makrophagen und Monozyten aus Humanblut.....	55
2.2.3.1	Isolation von peripheren, mononukleären Blutzellen aus Buffycoat-Blut.....	55
2.2.3.2	Isolierung der Monozyten mittels magnetischer CD14 Microbeads.....	57
2.2.3.3	Isolierung der Monozyten mittels Adhärenz.....	57
2.2.3.4	Polarisierung und Differenzierung der primären M1- und M2-ähnlichen Makrophagen.....	58
2.2.4	HEK293 Zellen.....	58
2.2.4.1	Kultivierung, Auftauen und Einfrieren der HEK293 Zellen.....	58
2.2.4.2	Einsäen der HEK293 Zellen für Stimulationsversuche.....	59
2.2.5	HEK blue IL-1 β Zellen.....	59
2.2.5.1	Kultivierung, Einfrieren und Auftauen von HEK blue IL-1 β Zellen.....	59
2.2.5.2	Einsäen der HEK blue IL-1 β Zellen für Stimulationsversuche.....	59
2.2.6	Mykoplasmen-Test.....	60
2.3	Zellstimulierung und Blockierung zellulärer Signalstoffe und -wege.....	61
2.3.1	Zellstimulierung und Einsatz von Inhibitoren.....	62
2.3.2	Ausschaltung von Genen mittels siRNA.....	62
2.3.2.1	Validierung der Transfektionseffizienz.....	63
2.3.2.2	Transfektion mit genspezifischer siRNA.....	64

2.4	Methoden zur phänotypischen und funktionellen Charakterisierung.....	65
2.4.1	Phasenkontrastmikroskopie.....	65
2.4.2	Fluoreszenzmikroskopie.....	65
2.4.3	Durchflusszytometrie.....	66
2.4.3.1	Probenvorbereitung für die Durchflusszytometrie.....	67
2.4.3.2	Oberflächenmarker-Expression.....	68
2.4.3.3	LysoTracker Red Färbung.....	69
2.4.3.4	MitoSox-Test.....	69
2.4.4	Zellviabilitäts-Tests.....	70
2.4.4.1	Trypan Blau Färbung.....	70
2.4.4.2	Annexin-V FITC/ Propidiumiodid (PI) Test.....	70
2.4.4.3	MTT-Test.....	71
2.4.4.4	LDH-Test.....	72
2.4.5	ELISA-Analytik.....	73
2.4.5.1	ELISA Test-Kits Invitrogen über Thermo Fisher, unbeschichtet.....	73
2.4.5.2	ELISA Test-Kits DuoSet von Bio-Techne.....	74
2.4.6	PCR-Analytik.....	75
2.4.6.1	RNA- Isolation.....	76
2.4.6.2	cDNA Synthese.....	76
2.4.6.3	qPCR.....	77
2.4.7	Western Blot Analytik.....	78
2.4.7.1	Probenvorbereitung.....	79
2.4.7.2	Bestimmung der Proteinmenge.....	79
2.4.7.3	SDS-PAGE (Gelelektrophorese).....	80
2.4.7.4	Protein-Transfer (Western Blot).....	80
2.4.8	ESR-Spektroskopie.....	82
2.4.9	SEAP-Reporter-Test.....	83
2.5	Statistik.....	84
3.	Ergebnisse.....	85
3.1	Charakterisierung und Differenzierung von Makrophagen und Monozyten.....	86
3.1.1	THP-1 Monozyten und THP-1 Makrophagen.....	86
3.1.2	Primären Makrophagen aus peripheren, mononukleären Blutzellen.....	90
3.2	Lysosomotrope Arzneistoffe regulieren inflammatorische Prozesse in Makrophagen.....	94

3.2.1	Chloroquin moduliert inflammatorische Prozesse auf unterschiedliche Weise in THP-1 Monozyten und THP-1 Makrophagen.....	94
3.2.2	Chloroquin zeigt ähnliche pro- und anti-inflammatorische Effekte in primären Makrophagen	97
3.2.3	Andere lysosomotrope Stoffe zeigen ähnliche pro-inflammatorische Effekte unter sterilen inflammatorischen Bedingungen im Vergleich zu Chloroquin	98
3.3	Einfluss lysosomotroper Stoffe auf zelluläre Prozesse	100
3.3.1	Der pro-inflammatorische Effekt von Chloroquin ist bedingt durch seinen Lysosomotropismus.....	100
3.3.2	Einfluss auf die Autophagozytose.....	103
3.3.3	Einfluss auf die Rezeptorendozytose und -internalisierung.....	113
3.4	IFN- γ erniedrigt den pro-inflammatorischen Effekt von Chloroquin.....	116
3.5	Einfluss von Chloroquin unter sterilen inflammatorischen Bedingungen in HEK293 Zellen.....	120
4.	Diskussion	125
4.1	<i>In vitro</i> Modelle für Studien in Makrophagen	126
4.1.1	THP-1 Zellen und THP-1 Makrophagen als Zelllinie	126
4.1.2	Primäre Makrophagen aus peripheren, mononukleären Blutzellen	127
4.1.3	Übertragbarkeit von <i>in vitro</i> auf <i>in vivo</i> Studien.....	129
4.2	Lysosomotrope Stoffe nehmen Einfluss auf die Zytokinsekretion unter sterilen pro-inflammatorischen Bedingungen in Makrophagen.....	130
4.2.1	Chloroquin moduliert die Immunantwort in Makrophagen auf unterschiedliche Weise	130
4.2.2	Der pro-inflammatorische Effekt lysosomotroper Stoffe hängt mit den chemischen Eigenschaften zusammen	132
4.3	Der Einfluss lysosomotroper Stoffe auf Autophagozytose und Endozytose steht im Zusammenhang mit dem pro-inflammatorischen Effekt unter sterilen entzündlichen Bedingungen.....	133
4.3.1	Chloroquin, Fluoxetin und Chlorpromazin modulieren die Autophagozytose auf unterschiedliche Weise.....	133
4.3.2	Der pro-inflammatorische Effekt von Chloroquin unter sterilen entzündlichen Bedingungen in Makrophagen steht in Zusammenhang mit der Autophagie-Inhibition.....	134
4.3.3	Einfluss auf ROS	135
4.3.4	Lysosomotrope Stoffe und Rezeptorendozytose	136
4.3.5	Einfluss von IFN- γ	137
4.4	Ist der Mechanismus zellspezifisch?	140

4.4.1 Studien in Langerhans Zellen und dermalen Dendritischen Zellen	141
4.4.2 Studien in Epithelzellen	142
4.5 Lysosomotrope Stoffe und Covid-19	143
5. Zusammenfassung/ Summary.....	147
5.1 Zusammenfassung	148
5.2 Summary	150
6. Literaturverzeichnis	153
7. Auflistung der Veröffentlichungen und Förderungen.....	175
7.1 Originalarbeiten.....	176
7.2 Vorträge.....	176
7.3 Posterbeiträge.....	176
7.4 Stipendien und Förderungen.....	177

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1-1: Übersicht der vermuteten Entwicklungswege von gewebsansässigen Makrophagen.	4
Abbildung 1-2: Das M1/M2-Modell.....	7
Abbildung 1-3: Überblick über den Prozess der Autophagozytose.	11
Abbildung 1-4: Bildung des SNARE-Komplexes bei der Fusion von Autophagosom und Lysosom.....	17
Abbildung 1-5: Mechanismus der Lysosomotropie.	19
Abbildung 1-6: <i>Priming</i> und Aktivierung des NLRP3 Inflammasoms.	22
Abbildung 1-7: IL-1 Signalweg.....	24
Abbildung 2-1: Isolierung von peripheren mononukleären Zellen aus Buffycoat-Blut und anschließende Differenzierung zu Makrophagen.....	56
Abbildung 2-2: Prinzip der RNA-Interferenz.....	63
Abbildung 3-1: Aus THP-1 Monozyten generierte Makrophagen exprimieren typische Differenzierungsmarker und reagieren auf pro-inflammatorische Stimuli.	88
Abbildung 3-2: Schematische Darstellung der Differenzierung von THP-1 Monozyten zu THP-1 Makrophagen.	88
Abbildung 3-3: Morphologische Unterschiede von THP-1 Monozyten und THP-1 Makrophagen.	89
Abbildung 3-4: Aus primären Monozyten differenzierte Makrophagen exprimieren typische Differenzierungsmarker.	91
Abbildung 3-5: Vergleich der Morphologie von GM-CSF und M-CSF generierten Makrophagen.	92
Abbildung 3-6: Die aus primären Monozyten differenzierte Makrophagen zeigen ein typisches Zytokinprofil.	93
Abbildung 3-7: GM-CSF M ϕ zeigen weder typische Morphologie, noch adhärenente Eigenschaften.....	93
Abbildung 3-8: Chloroquin erhöht die CXCL8-Sekretion unter sterilen entzündlichen Bedingungen in THP-1 Makrophagen.....	95
Abbildung 3-9: Chloroquin erhöht die CXCL2 Expression unter sterilen inflammatorischen Bedingungen in THP-1 Makrophagen.....	95
Abbildung 3-10: Chloroquin hat keinen Einfluss auf die CXCL8-Sekretion bei Stimulation des TLR4 oder des TLR2.	96
Abbildung 3-11: Chloroquin zeigt einen geringen anti-inflammatorischen Effekt bei LPS-Stimulation in THP-1 Makrophagen.....	97

Abbildung 3-12-: Chloroquin beeinflusst die Immunantwort in primären Makrophagen auf unterschiedliche Art.	98
Abbildung 3-13: Lysosomotrope Arzneistoffe erhöhen generell konzentrationsabhängig die CXCL-8-Sekretion in THP-1 Makrophagen.	99
Abbildung 3-14: Lysosomotrope Arzneistoffe verändern den pH-Wert in sauren Zellkompartimenten in THP-1 Makrophagen.	101
Abbildung 3-15: Der pro-inflammatorische Effekt von Chloroquin ist abhängig vom Lysosomotropismus.	103
Abbildung 3-16: Chloroquin und Fluoxetin inhibieren den autophagischen Flux in THP-1 Makrophagen.	104
Abbildung 3-17: Chloroquin erhöht die pro-inflammatorische Immunantwort auf IL-1 β in THP-1 Makrophagen in Abhängigkeit von der MAPK p38.	105
Abbildung 3-18: Der pro-inflammatorische Effekt von Chloroquin und IL-1 β kann durch verschiedene ROS Inhibitoren abgemildert werden.	107
Abbildung 3-19: Chloroquin induziert keine messbaren ROS.	108
Abbildung 3-20: Chloroquin hat keinen Einfluss auf den NOTCH Signalweg unter sterilen inflammatorischen Bedingungen in THP-1 Makrophagen.	110
Abbildung 3-21: siRNA-Transfektionseffizienz und Toxizität von verschiedenen THP-1 Makrophagen.	112
Abbildung 3-22: STX-17 hat keinen Einfluss auf die CXCL8 Sekretion in THP-1 Makrophagen.	113
Abbildung 3-23: Der Endozytose-Inhibitor Dynasore erhöht die pro-inflammatorische Immunantwort auf IL-1 β in THP-1 Makrophagen.	114
Abbildung 3-24: Lysosomotrope Arzneistoffe und Endozytoseinhibitoren verhindern die Internalisierung des IL-1R1.	115
Abbildung 3-25: IFN- γ erniedrigt die pro-inflammatorischen Effekte von Chloroquin unter sterilen inflammatorischen Bedingungen.	116
Abbildung 3-26: IFN- γ hat keinen Einfluss auf endogene Negativregulatoren des IL-1 Signalwegs.	117
Abbildung 3-27: IFN- γ hat keinen Einfluss auf die Rezeptor-Internalisierung des IL-1R1.	118
Abbildung 3-28: IFN- γ erhöht kurzfristig die <i>IL-1β</i> Genexpression.	119
Abbildung 3-29: Chloroquin erhöht die CXCL8 Sekretion in HEK293 Zellen.	120
Abbildung 3-30: HEK blue IL-1 β Zellen reagieren auf die Stimulation mit IL-1 β und zeigen eine angemessene Zellviabilität bei Behandlung mit Chloroquin.	121
Abbildung 3-31: Chloroquin zeigt unterschiedliche Effekte in HEK blue IL-1 β Zellen.	122

Abbildung 3-32: Chloroquin erhöht die Expression von durch IL-1 β induzierbaren Genen in HEK blue IL-1 β Zellen.	123
Abbildung 4-1: Lysosomotrope Arzneistoffe beeinflussen sterile entzündliche Prozesse in Makrophagen.	140

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1-1: Auflistung einiger Modulatoren der Autophagozytose	12
Tabelle 1-2: Ausgewählte Inhibitoren der Endozytose	16
Tabelle 1-3: Chemische Eigenschaften von ausgewählten lysosomotropen Arzneistoffen ...	18
Tabelle 2-1: Auflistung der verwendeten Geräte.....	28
Tabelle 2-2: Auflistung der verwendeten Reagenzien- und Verbrauchsmaterialien	30
Tabelle 2-3: Komplettiertes RPMI 1640 Medium.....	36
Tabelle 2-4: Differenzierungsmedium für THP-1 Makrophagen	36
Tabelle 2-5: Einfriermedium für THP-1 Monozyten	36
Tabelle 2-6: Antibiotikafreies, komplettiertes RPMI 1640 Medium	37
Tabelle 2-7: PBS mit EDTA	37
Tabelle 2- 8: Isolierungspuffer	37
Tabelle 2-9: Differenzierungsmedium für primäre M1-ähnliche Makrophagen	37
Tabelle 2-10: Differenzierungsmedium für primäre M2-ähnliche Makrophagen	38
Tabelle 2-11: Wachstums- und Stimulationsmedium von HEK293 Zellen.....	38
Tabelle 2-12: Selektionsmedium für HEK blue IL-1 β Zellen.....	38
Tabelle 2-13: Basalmedium für HEK blue IL-1 β Zellen	38
Tabelle 2-14: Einfriermedium für HEK293 und HEK blue IL-1 β Zellen.....	39
Tabelle 2-15 Polylysin-Lösung.....	39
Tabelle 2-16: 5x TBE-Puffer	40
Tabelle 2-17: 0,5 M Natrium-EDTA-Lösung (pH 8,0)	40
Tabelle 2-18: Agarosegel für Mykoplasmen-Test.....	40
Tabelle 2-19: Stocklösungen der Stimuli und Inhibitoren	41
Tabelle 2-20: FACS-Puffer	41
Tabelle 2-21: MitoSox FACS-Puffer.....	41
Tabelle 2-22: Trypan Blau Lösung, 0,4 %.....	42
Tabelle 2-23: Annexin-V Bindungspuffer	42
Tabelle 2-24: MTT-Lösung	42
Tabelle 2-25: LDH-Reaktionsmix	43
Tabelle 2-26: Standardreihen für die ELISA-Analytik.....	43
Tabelle 2-27: PBS für ELISA	43
Tabelle 2-28: ELISA-Waschpuffer	43
Tabelle 2-29: ELISA-Stopp-Lösung	44
Tabelle 2-30: Verdünnungs-/ Blockierungs-Puffer	44
Tabelle 2-31: Citrat-Puffer pH 3,95	44
Tabelle 2-32: TMB-Stocklösung	44

Tabelle 2-33: TMB-Substrat-Lösung.....	45
Tabelle 2-34: DEPC-Wasser	45
Tabelle 2-35: 70% Ethanol in DEPC-Wasser für die RNA-Isolation	45
Tabelle 2-36: RIPA-Puffer	45
Tabelle 2-37: RIPA-Basalpuffer	46
Tabelle 2-38: TRIS-HCl-Lösung (1 M, pH 7,4).....	46
Tabelle 2-39: Natriumdeoxycholat-Lösung (10 %)	46
Tabelle 2-40: Natriumchlorid-Lösung (5 M).....	46
Tabelle 2-41: EDTA-Lösung (50 mM)	46
Tabelle 2-42: Ladepuffer (3x), pH 6,8.....	46
Tabelle 2-43: DTT-Lösung (30x).....	47
Tabelle 2-44: DTT/Ladepuffer-Mix.....	47
Tabelle 2-45: Standardreihe für BCA-Test.....	47
Tabelle 2-46: Laufgel-Puffer pH 8,8.....	48
Tabelle 2-47: Sammelgel-Puffer pH 6,8.....	48
Tabelle 2-48: SDS-Lösung 10 %	48
Tabelle 2-49: APS-Lösung 10 %	48
Tabelle 2-50: Laufgel (10 % Polyacrylamid-Gel).....	48
Tabelle 2-51: Sammelgel (4 % Polyacrylamid-Gel).....	49
Tabelle 2-52: Laufpuffer für die Elektrophorese (10x).....	49
Tabelle 2-53: Transfer-Puffer (10x).....	49
Tabelle 2-54: TBS-Puffer (10x).....	50
Tabelle 2-55: TBS-T-Puffer, pH 8,0	50
Tabelle 2-56: Blockierungs-Puffer für den Western Blot	50
Tabelle 2-57: Auflistung der benutzen Antikörper für den Western Blot und die zugehörige Verdünnung.....	50
Tabelle 2-58: Glukose-PBS-Lösung	50
Tabelle 2-59: TEMPO-Stocklösung	51
Tabelle 2-60: TEMPO-Lösung, 100 µM	51
Tabelle 2-61: Auflistung der eingesetzten Software-Programme	52
Tabelle 2-62: Verwendete Volumina für die Beschichtung von Zellkulturplatten mit Polylysin- Lösung	53
Tabelle 2-63: Verwendete Volumina der Zellsuspension zum Einsäen von THP-1 Zellen	55
Tabelle 2-64: Master-Mix für den Mykoplasmen-Test	60
Tabelle 2-65: PCR Amplifikation für den Mykoplasmen-Test	61
Tabelle 2-66: Eingesetzte Zellzahlen für Stimulationsversuche	62

Tabelle 2-67: Basensequenzen der eingesetzten siRNA	64
Tabelle 2-68: Ausstattung des Fluoreszenz-Phasenkontrast-Mikroskop BZ-8000 der Firma Keyence	66
Tabelle 2-69: Ausstattung des Cytoflex Durchflusszytometers der Firma Beckman Coulter .	67
Tabelle 2-70: Ablösung der Zellen für die Durchflusszytometrie	68
Tabelle 2-71: Für die Untersuchung der Oberflächenmarkerexpression verwendete Antikörper.....	68
Tabelle 2-72: Master-Mix für die cDNA Synthese	77
Tabelle 2-73: Reaktionsprotokoll für die cDNA-Synthese	77
Tabelle 2-74: Master-Mix für die qPCR.....	77
Tabelle 2-75: Reaktionsprotokoll für die cDNA-Synthese	78
Tabelle 2-76: Verwendete Primer-Sequenzen	78
Tabelle 2-77: Einstellungen des X-Band ESR Spektrometer (MiniScope MS 400)	83

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
Abb.	Abbildung
ACE-2	<i>Angiotensin-converting-enzyme-2</i>
AMP	Adenosinmonophosphat
AMPK	AMP-aktivierte Kinase
AP-1	aktivierendes-Protein-1
AP-2	Adapterprotein 2
APS	Ammoniumpersulfat
ASC	<i>apoptosis-associated speck-like protein containing a caspase-recruitment domain</i>
Atg	zur Autophagie gehörendes Protein (<i>autophagy-related protein</i>)
ATP	Adenosintriphosphat
Baf.	Bafilomycin A ₁
BCA	Bicinchoninsäure
BP	Bandpass
BSA	bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
ca.	circa
CD	<i>cluster of differentiation</i>
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure (<i>complementary deoxyribonucleic acid</i>)
CIE	Clathrin-unabhängige Endozytose (<i>clathrin independent endocytosis</i>)
CLEAR	<i>coordinated lysosomal enhancement and regulation network</i>
clogP	<i>calculated clogP</i>
CLR	<i>C-type lectin receptors</i>
CME	Clathrin-vermittelte Endozytose (<i>clathrin mediated endocytosis</i>)
COVID-19	<i>Corona virus disease 2019</i>
CPZ	Chlorpromazin
CQ	Chloroquin
CXCL2	CXC-Motiv-Chemokin 2
CXCL8	CXC-Motiv-Chemokin 8
DAMP	<i>danger associated molecular pattern</i>
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DFCP1	<i>double FYVE-containing protein</i>
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium

DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>deoxyribonucleic acid</i>)
DPI	Diphenyleneiodium
DRK	Deutsches Rotes Kreuz
DSMZ	Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
dsRNA	doppelsträngige Ribonukleinsäure
DTT	DL-Dithiothreitol
Dyn.	Dynasore
ECL	erhöhte Chemiluminiszenz
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	epidermale Wachstumsfaktor (<i>epidermal growth factor</i>)
EGFR	epidermale Wachstumsfaktor Rezeptor
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
Em. Filter	Emissionsfilter
EMP	erythromyeloide Vorläuferzelle (<i>erythromyeloid precursors</i>)
ER	Endoplasmatischen Retikulum
ESR	Elektreonen-Spin-Resonanz
Ex. Filter	Anregungsfilter (<i>excitation filter</i>)
FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i>
FDA	US-Behörde für Lebens- und Arzneimittel (<i>food and drug administration</i>)
FIP200	<i>focal adhesion kinase family interacting protein of 200 kDa</i>
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FL- GSDMD	<i>full length-gasdermin D</i>
FLX	Fluoxetin
FSC	Seitwärtsstreulicht (<i>forward scatter</i>)
G	Guanin
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GC	Glukokortikoide (<i>glucocorticoids</i>)
gDNA	genomische Desoxyribonukleinsäure
GDP	Guanosindiphosphat
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-Stimulierender Faktor (<i>granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i>)
GM-CSF M ϕ	M1 ähnliche Makrophage (klassisch aktiviert)
GSDMD	Gasdermin D
GTP	Guanosintriphosphat

HCl	Hydrochlorid
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazinyl)-Ethansulfonsäure
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
HSC	hämatopoetische Stammzelle (<i>hematopoietic stem cell</i>)
IC	Immunkomplexe (<i>immune complexes</i>)
IFN- γ	Interferon- γ (<i>Interferon-γ</i>)
IKK	Inhibitor des Nuklearfaktor kappa B Kinase
IL	Interleukin (<i>interleukin</i>)
IL-1R1	IL-1 Rezeptor Typ 1 (<i>IL-1 receptor type 1</i>)
IL-1R2	IL-1 Rezeptor Typ 2
IL-1Ra	IL-1 Rezeptorantagonist
IL-1RAcP	IL-1 Rezeptor-akzessorischem Protein (<i>IL-1 receptor accessory protein</i>)
IL-36Ra	IL-36 Rezeptorantagonist
Interferin	INTERFERIn
IRAK4	Interleukin-1 Rezeptor-aktivierte Proteinkinase 4
IRGM	<i>immunity-related GTPase family M1 protein</i>
I κ B	Inhibitor des Nuklearfaktor kappa B
JAK	Januskinasen
JNK	c-Jun-N-terminale Kinase
Kap.	Kapitel
KEAP1	<i>Kelch-like ECH-associated protein 1</i>
LAMP	lysosomal-assoziiertes Membranprotein
LC3	<i>microtubule-associated protein 1 light chain 3</i>
LDH	L-Lactatdehydrogenase
Lipofect.	Lipofectamin 2000
LPS	Lipopolysaccharid (<i>lipopolysaccharide</i>)
LRR	<i>leucin rich repeats</i>
LSD	Lysosomale Speicherkrankheiten (<i>lysosomal storage disease</i>)
LTR	LysoTracker Red DND-99
MACS	magnetische Zellsortierung (<i>magnetic cell sorting</i>)
MAPK	Mitogen aktivierte Proteinkinase (<i>mitogen activated protein kinase</i>)
M-CSF	Monozyten-Kolonie-Stimulierender Faktor
M-CSF M ϕ	M2 ähnliche Makrophage (alternativ aktiviert)
MFI	mittlere Fluoreszenzintensität
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (<i>major histocompatibility complex</i>)

MiT/TFE	<i>microphthalmia/transcription factor E</i>
MKK	Mitogen-aktivierende Kinase Kinase
MoDC	aus Monozyten generierte Dendritische Zellen
MoLC	aus Monozyten generierte Langerhans Zellen
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i>
mTORC1	<i>target of rapamycin complex 1</i>
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
MyD88	<i>myeloid differentiation primary response 88</i>
NAC	N-Acetyl-L-Cystein
NADP(H)	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
NFκB	<i>nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i>
NICD	intrazellulären NOTCH Domäne
NK	natürliche Killerzellen
NLR	<i>nucleotide-binding oligomerization domain-leucine rich repeats-containing receptor</i>
NLRP3	<i>NOD-, LRR- and pyrin domain-containing protein 3</i>
NOD	<i>nucleotide-binding oligomerization domain</i>
NOTCH1	Notch Rezeptor 1
Nrf2	<i>nuclear factor erythroid 2-related factor 2</i>
ns	nicht signifikant
OD	optische Dichte
P2X ₇	P2X Purinrezeptor 7
p62	<i>ubiquitin-binding protein p62</i>
Pam2	Pam ₂ CSK ₄
Pam3	Pam ₃ CSK ₄
PAMP	<i>pathogen associated molecular pattern</i>
PBMC	peripheren, mononukleären Blutzelle (<i>peripheral blood mononuclear cells</i>)
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PE	Phosphatidylethanolamin
PE	Phycoerythrin
PerCP	Peridinin-Chlorophyll-Protein
PI	Propidiumiodid
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PI3P	Phosphatidylinositol-3-Phosphat
PICALM	<i>phosphatidylinositol binding clathrin assembly protein</i>

PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat (<i>phorbol 12-myristate 13-acetate</i>)
pos. Kontr.	positive Kontrolle
PRR	Mustererkennung-Rezeptor (<i>pattern recognition receptor</i>)
PVDF	Polyvinylidenfluor
Q	Quadrant
qPCR	quantitative PCR
Rab	Rab GTPasen
rh-IL-1 β	rekombinates-humanes IL-1 β
RIG-1	<i>retinoic acid-inducible gene 1</i>
RIPA	<i>radioimmunoprecipitation assay</i>
RISC	<i>ribonucleic acid -induced silencing complex</i>
RLR	<i>retinoic acid-inducible gene 1 (RIG-1) -like receptor</i>
RNA	Ribonukleinsäure (<i>ribonucleic acid</i>)
ROS	reaktive Oxidative Spezies (<i>reactive oxidative species</i>)
RPMI	Roswell Park Memorial Institut
RT	Raumtemperatur
SARS-CoV-2	<i>severe acute respiratory syndrome Coronavirus 2</i>
SB202190	p38 Inhibitor
SD	Standardabweichung (<i>standard deviation</i>)
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat - Polyacrylamidgelelektrophorese
SEAP	seznerierende Alkalinphosphatase
siRNA	<i>short interfering ribonucleic acid</i>
SNAP29	<i>synaptosomal-associated protein 29</i>
SNARE	<i>soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor-attachment protein receptors</i>
SP600125	JNK Inhibitor
SQSTM1	<i>sequestosome-1</i>
SSC	Vorwärtsstreulicht (<i>side scatter</i>)
STAT	<i>signal transducers and activators of transcription</i>
STX-17	Syntaxin 17
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TAB1	TAK-bindenden Protein 1
TAK1	TGF β -aktivierten Proteinkinase 1
TAM	tumorassoziierte Makrophagen

TBE	TRIS-Borat-EDTA
TBS	TRIS-gepufferte Kochsalzlösung
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethan-1,2-diamin
TEMPO	2,2,6,6-Tetramethylpiperidin 1-Oxyl
TGF β	<i>tumor growth factor β</i>
THP-1	THP-1 Monozyten
THP-1 M ϕ	THP-1 Makrophagen
T _H -Zelle	T-Helferzelle
TIR	Toll/IL-1-Rezeptor
TLR	<i>Toll like receptor</i>
TMB	Tetramethylbenzidin
TNF	Tumor Nekrose Faktor
TRAF6	<i>TNF receptor associated factor 6</i>
TRAM	<i>TRIF-related adaptor molecule</i>
T _{reg} -Zelle	regulatorische T-Zelle
TRIF	<i>TIR-domain-containing adaptor inducing interferon-β</i>
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethane
TRITC	Tetramethylrhodamineisothiocyanat
U0126	MKK 1/2 Inhibitor
ULK1	<i>unc-51-like kinase 1</i>
UV	ultraviolettes Licht
VAMP8	<i>vesicle-associated membrane protein 8</i>
vATPase	vakuoläre H ⁺ -ATPase
VD ₃	1,25-Dihydroxyvitamin D ₃
WHO	Weltgesundheits-Organisation
WIPI	<i>WD-repeat protein interacting with phosphoinositides</i>
YWHAZ	<i>tyrosine 3-monooxygenase/ tryptophan 5-monooxygenase activation protein zeta</i>
z. B.	zum Beispiel
ZNS	zentrales Nervensystem

1. Einleitung

Lysosomotrope Stoffe können zu Funktionsbeeinträchtigungen von Lysosomen führen [1]. Lysosomen sind unter anderem an der Autophagozytose beteiligt, ein Selbstverdauungsprozess, der einen entscheidenden Beitrag zur zellulären Homöostase leistet. Darüber hinaus können sich Veränderungen der Autophagozytoseaktivität in der Entstehung von Tumoren sowie neurodegenerativen Erkrankungen und Entzündungen widerspiegeln [2]. Die chronische Entzündung ist dabei eines der Hauptfaktoren für das Auftreten von Erkrankungen wie Psoriasis, rheumatoider Arthritis oder Morbus Crohn, wobei hierbei eine komplexe Interaktion aller Komponenten des Immunsystems beteiligt ist [3]. Während man mittlerweile verhältnismäßig viel über die erworbene, spezifische Immunantwort weiß, rückt insbesondere in den letzten Jahren der Fokus immer mehr auf die Erforschung der Funktionen und der Mechanismen der angeborenen, unspezifischen Immunität. Dabei spielen sowohl die Makrophagen als Teil der zellulären angeborenen Immunantwort eine tragende Rolle als auch der Entzündungsmediator Interleukin-(IL-)1 β ([4]. Bisher ist wenig darüber bekannt, wie lysosomotrope Stoffe entzündliche Prozesse in Makrophagen beeinflussen und in wie weit der IL-1 Signalweg hierbei moduliert wird. Somit besteht ein großes Interesse daran, diesen komplexen Sachverhalt genauer zu verstehen und so neue Behandlungsansätze für bestimmte Krankheiten zu finden und mögliche unerwünschte Arzneimittelwirkungen schneller zu erkennen.

1.1 Makrophagen

Als professionelle Phagozyten sind Makrophagen Teil des unspezifischen, angeborenen Immunsystems [5]. Bereits Ende des 19. Jahrhunderts entdeckte der russische Wissenschaftler Elie Metchnikoff die Existenz von phagozytierenden Zellen in Fröschen, die neben exogenen Pathogenen auch in der Lage waren, endogene Zelltrümmer und tote Zellen zu eliminieren [6]. Somit war schon sehr früh bekannt, dass Makrophagen sowohl an der zellulären Immunabwehr als auch an der zellulären Homöostase beteiligt sind. Die Fähigkeit der Makrophagen, zwischen körpereigenen und körperfremd zu unterscheiden, ist für diese Aufgaben sehr entscheidend. 1908 erhielt Metchnikoff dafür, zusammen mit Paul Ehrlich, den Nobelpreis [7]. Makrophagen sind nahezu präsent in allen Geweben des menschlichen Körpers und können in gewebsansässige und rekrutierte Makrophagen unterteilt werden. Die Aufgaben dieser Zellpopulation sind vielfältig, neben ihrer phagozytischen Aktivität präsentieren Makrophagen Antigene, fungieren als Chemokin- und Zytokinproduzenten, nehmen Teil an der Wundheilung und dem Wiederaufbau von Gewebe und spielen bei der Tumorentstehung und -bekämpfung eine Rolle. Welche Funktionen sie jeweils übernehmen ist ein Zusammenspiel zahlreicher Faktoren. Zu diesen Faktoren zählen neben ihrer Ontogenese auch ihre lokale Umgebung sowie ein möglicher Kontakt mit endogenen Stimuli sowie exogenen Pathogene [8]. Eine Veränderung dieser Faktoren kann somit auch zu einem Funktionswechsel führen.

1.1.1 Ontogenese und Subtypen

Monozyten und Makrophagen zählen zu den Leukozyten und somit zu den weißen Blutzellen. Ihre Existenz hängt mit der Hämatopoese zusammen, wobei sie aus myeloischen Vorläuferzellen gebildet werden [9]. Generell findet die Hämatopoese im Knochenmark statt, dabei stammen Blutzellen fast ausschließlich aus einer gemeinsamen multipotenten hämatopoetischen Stammzelle (*hematopoietic stem cell*, HSC) ab [10]. Die Annahme, dass alle Makrophagentypen aus Monozyten generiert werden (*mononuclear phagocyte system*) [11], wurde durch das Konzept der fötalen Vorläuferzellen ersetzt. Man geht davon aus, dass insbesondere viele Typen der gewebsansässigen Makrophagen schon vor der Geburt vorhanden sind und bis ins Erwachsenenalter persistieren, wobei sie nicht durch rekrutierte Makrophagen ersetzt werden, sondern sich selbst regenerieren [12].

1.1.1.1 Gewebsansässige Makrophagen

Gewebsansässige Makrophagen kommen als erste Instanz in der Immunabwehr an Ort und Stelle sowie auf Grund ihrer Rolle in der Homöostase so gut wie in allen Gewebearten vor. Darüber hinaus interagieren sie mit den anderen Zelltypen des Gewebes, in dem sie sich befinden und besitzen dort gewebsspezifischen Aufgaben, was in einer extrem großen Heterogenität der Zellen resultiert. Sie haben somit einen großen Anteil an der Funktionalität der Gewebearten. Zu den gewebsansässigen Makrophagen zählen beispielsweise die Osteoklasten in den Knochen, die Mikrogliazellen im zentralen Nervensystem (ZNS) oder die Kupfferzellen in der Leber [13]. Die Erkenntnisse über die Entwicklung der gewebsansässigen Makrophagen stammen vor allem aus Studien an Mäusen, die zeigen, dass entsprechende embryonische Vorläuferzellen sich schon vor der Geburt in den jeweiligen Geweben ansiedeln [14]. Die murine Blutbildung wird zunächst vom Dottersack übernommen, was auch als primitive Hämatopoese bezeichnet wird. Ab Tag 7 der embryonalen Entwicklung, werden in der Maus kernhaltige Erythrozyten sowie Makrophagen aus erythromyeloiden Vorläuferzellen (*erythromyeloid precursors*, EMPs) gebildet, jedoch keine Lymphozyten. Diese können dann ab Tag 8,5-9,5 der murinen Schwangerschaft in die Gewebe infiltrieren, da ab diesem Zeitpunkt der Blutkreislauf ausgebildet ist, über den sich die Zellen im Embryo verteilen können [15]. Die primitive Hämatopoese wird ab Tag 10,5 von der definitiven Hämatopoese abgelöst, die in der fötalen Leber stattfindet. Zum einen wandern die im Dottersack gebildeten Zellen in die fötale Leber ein. Zum anderen findet ab diesem Zeitpunkt dort die Blutbildung aus HSCs statt, die in der Aorta, Gonaden und Mesonephros Region gebildet werden. Aus den HSCs können alle Typen hämatopoetischer Zellen gebildet werden, inklusive der Monozyten und der in einem weiteren Schritt daraus differenzierenden Makrophagen. Später wird die Hämatopoese dann vom Knochenmark übernommen (Abb. 1-1) [11].

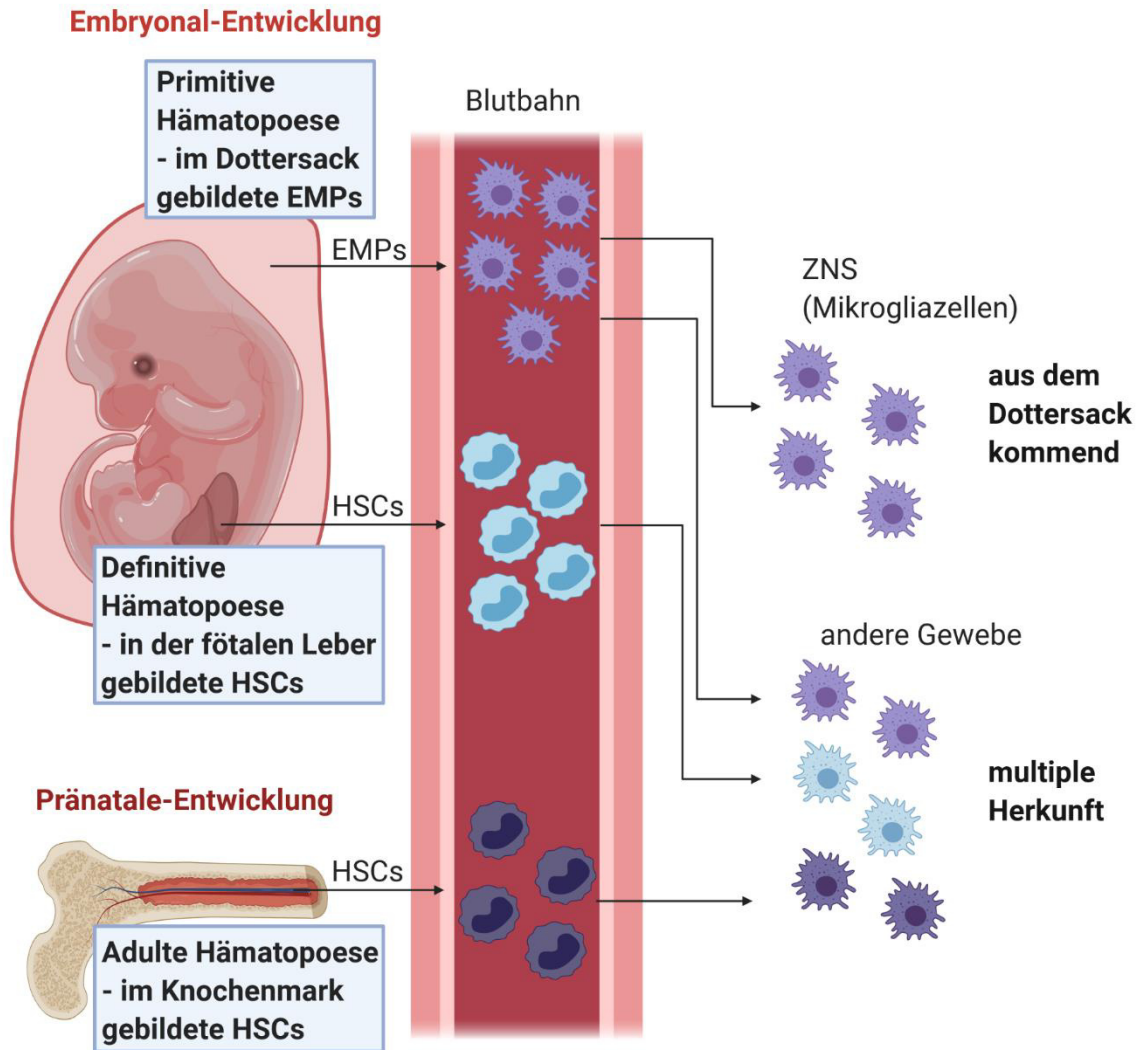


Abbildung 1-1: Übersicht der vermuteten Entwicklungswege von gewebsansässigen Makrophagen. Bei der primitive Hämatopoese, die in der embryonalen Entwicklung zunächst vom Dottersack übernommen wird, werden die so genannten erythromyeloiden Vorläuferzellen (EMPs) gebildet, aus denen die aus dem Dottersack kommenden Makrophagen generiert werden. Diese können schließlich über die Blutbahn in die Gewebe einwandern und machen dort die ersten vorkommenden gewebsansässigen Makrophagen aus. Ist die Leber weiter ausgebildet, so übernimmt diese schließlich die Hämatopoese, die jetzt als definitive Hämatopoese bezeichnet wird. Die dort gebildeten hämatopoetischen Stammzellen (HSCs) können sich zu Monozyten entwickeln, die über die Blutbahn in die Gewebe einwandern und dort weiter zu Makrophagen differenzieren. Später übernimmt dann schließlich das Knochenmark die Blutbildung. Mausstudien zeigen, dass insbesondere die Mikroglia Zellen im ZNS ausschließlich aus aus dem Dottersack kommenden Vorläuferzellen stammen, während andere Populationen der gewebsansässigen Makrophagen gemischten Ursprungs sind.

In einigen Geweben werden die Makrophagen konstant von zirkulierenden Monozyten ersetzt, dies ist insbesondere bei intestinalen Mausmakrophagen der Fall [16]. In anderen Geweben hingegen können die aus den fötalen Vorläuferzellen gebildeten Makrophagen neben den aus zirkulierenden Monozyten generierten Makrophagen vorkommen und sind somit gemischten Ursprungs [15]. Besonders von murinen Mikrogliazellen im ZNS weiß man, dass diese fast ausschließlich aus

Makrophagenvorläuferzellen stammen, die im Dottersack gebildet werden [17, 18]. Der Ursprungsort vieler gewebsansässiger Makrophagen im Menschen ist ebenfalls der Dottersack sowie die fötale Leber, welche analog zu den murinen Makrophagen unabhängig von den aus dem Knochenmark stammenden und im Blut zirkulierenden Monozyten gebildet werden können. So zeigt eine Studie in Patient*innen mit Monozytopenie, dass diese verhältnismäßig normale Mengen einiger gewebsansässiger Makrophagenpopulationen aufweisen [19]. Eine weitere Publikation vergleicht erstmals adulte humane Makrophagen mit fötalen Makrophagen, dessen Genetik zuvor mittels der so genannten *Single Cell* Sequenzierungsmethode erschlossen wurde. So wurde gezeigt, dass die Herkunft gewebsansässiger Makrophagen und der Verlauf der fötalen und adulten Hämatopoese im Menschen viele Ähnlichkeiten mit dem aufweist, was wir schon aus der Forschung an Mäusen wissen [20].

1.1.1.2 Rekrutierte Makrophagen

Rekrutierte Makrophagen stammen von in der Blutbahn zirkulierenden Monozyten ab, die aus dem Knochenmark kommen. Diese können in entzündetes Gewebe einwandern und dort zu Makrophagen differenzieren. Als eine ihrer Hauptaufgaben leisten sie einen wichtigen Beitrag zur Abwehr von Pathogenen als Teil der angeborenen Immunität. Zusätzlich reinigen sie den Organismus von toten Zellen und nehmen so, genau wie die gewebsansässigen Makrophagen, an der Zellhomöostase teil [21]. Die rekrutierten Makrophagen werden in der Regel auf Grund inflammatorischer Ereignisse aktiviert. Diese inflammatorischen Makrophagen können dann grob in klassisch aktivierte (M1) Makrophagen und in alternativ aktivierte (M2) Makrophagen unterteilt werden, wobei sich die M1/M2-Nomenklatur von der T-Helfer- (T_H -)Zell-Nomenklatur ableitet [22]. Ende der 80er Jahre wurde erstmals die Hypothese von T_H -1/ T_H -2 Zellen als zwei unterschiedlichen T_H -Zellsubpopulationen proklamiert, die nach Aktivierung unterschiedliche Zytokine sezernieren [23]. Mittlerweile sind auch weitere T_H -Zellpopulationen, wie die T_H -17 oder die regulatorischen T_{reg} -Zellen bekannt. T_H -Zellen sind im Allgemeinen Zellen des erworbenen Immunsystems, die von einer gemeinsamen lymphoiden Vorläuferzelle aus dem Knochenmark abstammen und im Thymus heranreifen. Herangereifte, naive T_H -Zellen sind positiv für den Oberflächenmarker CD4 (*cluster of differentiation 4*) und interagieren mit antigenpräsentierenden Zellen, um so eine adäquate Immunantwort auszulösen. Die T_H 1-Zellantwort wird in der Regel durch intrazelluläre Pathogene ausgelöst, wobei Interferon- γ (IFN- γ) eines der Leitzytokine ausmacht. IFN- γ sorgt vor allem für die Aktivierung mononukleärer phagozytischer Zellen wie Monozyten und Makrophagen. Die T_H 2-Zellen reagieren hingegen auf extrazelluläre Pathogene wie Parasiten und können darüber hinaus mit Asthma und allergischen Reaktionen in Verbindung stehen, wobei sie eine IgE vermittelte Immunantwort auslösen. Hierbei spielt vor allem IL-4 eine entscheidende Rolle [24]. Da man eine Interaktion der jeweiligen T_H -Zellen mit verschiedenen Makrophagenpopulationen beobachtete, legte dies den Grundstein für die M1/M2-Nomenklatur [22].

1.1.1.3 Das M1 und M2 Paradigma

Die Klassifizierung von M1 und M2 Makrophagen hilft insbesondere bei der mechanistischen Einordnung immunologischer Prozesse. Dabei werden allerdings *in vivo* vorkommende Mischformen nicht erfasst, sodass dieses System lediglich eine Annäherung an die tatsächlichen Gegebenheiten darstellt. Schon über 25 Jahre vor der erstmaligen Beschreibung der T_H1- und T_H2-Zellen, wurde das Konzept der klassischen Makrophagenaktivierung proklamiert und später mit der T_H1-Immunantwort und der IFN- γ -Ausschüttung durch antigen-aktivierte Immunzellen verknüpft wurde [25]. Als man erkannte, dass Maus-Makrophagen auf die Ausschüttung von IL-4 und IL-13 durch T_H2-Zellen mit einer reduzierten pro-inflammatorischen Immunantwort reagierten, war klar, dass es einen von IFN- γ unabhängigen Aktivierungsweg geben muss [26, 27].

Mills et al. etablierten im Jahr 2000 erstmals die Begriffe M1/M2 Makrophagen, die Entzündungen in zwei unterschiedliche Richtungen beeinflussen und mit T_H1- und T_H2-Zellen interagieren [22]. M1 Makrophagen können dabei neben IFN- γ auch durch Lipopolysaccharid (LPS) oder Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-Stimulierender Faktor (*granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*, GM-CSF) aktiviert werden, was eine pro-inflammatorische Immunantwort nach sich zieht, die mit T_H1-Zellen assoziiert ist und so zur Bekämpfung intrazellulärer Pathogene sowie zu einer Tumorresistenz führt [25]. Die Klassifizierung der M2 Makrophagen zeigte sich jedoch als etwas komplexer, als bis dato angenommen. Neben der anti-inflammatorischen und immunregulatorischen Eigenschaften sind sie in der Lage, die Wundheilung zu fördern, können aber auch das Tumorstadium vorantreiben sowie allergische Entzündungsreaktionen auslösen. Dabei führen unterschiedliche Stimuli zur Ausbildung verschiedener M2-Subtypen, was dafür sorgte, dass diese als M2a, M2b und M2c Makrophagen bezeichnet wurden, wobei mittlerweile auch ein weiteren M2d-Typ beschrieben ist [28]. Teilweise werden auch Tumorassoziierte Makrophagen (TAMs) als weitere Subgruppe der M2 Makrophagen eingeordnet (Abbildung 1-2) [29].

Das M1/M2-Modell ist nicht alleine auf die rekrutierten Makrophagen begrenzt, auch gewebsansässige Makrophagen können einen M1- oder M2-ähnlichen Phänotyp aufweisen oder annehmen [30]. In den meisten Fällen exprimieren gewebsansässige Makrophagen vor allem M2-Marker.

Das M1/M2-Modell hat jedoch auch viele Schwächen. Dies zeigt auch die komplexe Sub-Klassifizierung der M2-Makrophagen, die ständig erweitert wird [31]. Die Quelle und der Kontext der aktivierenden Stimuli werden jedoch oft bei der Eingruppierung ignoriert. Darüber hinaus existieren die einzelnen Subpopulationen nicht alleine im Gewebe, sondern in der Regel nebeneinander [25]. Zusätzlich können die klassisch und alternativ aktivierten Makrophagen ihren Phänotyp wechseln, was auch als Phänotypen-Switch bezeichnet wird [30]. Die bei einer Entzündung rekrutierten Makrophagen können zunächst pro-inflammatorisch sein, wobei sie nach einer Weile in den anti-inflammatorischen Phänotyp

wechseln, um so übermäßige Entzündungen zu verhindern und das durch die Entzündungsreaktion zerstörte Gewebe wieder aufzubauen [32].

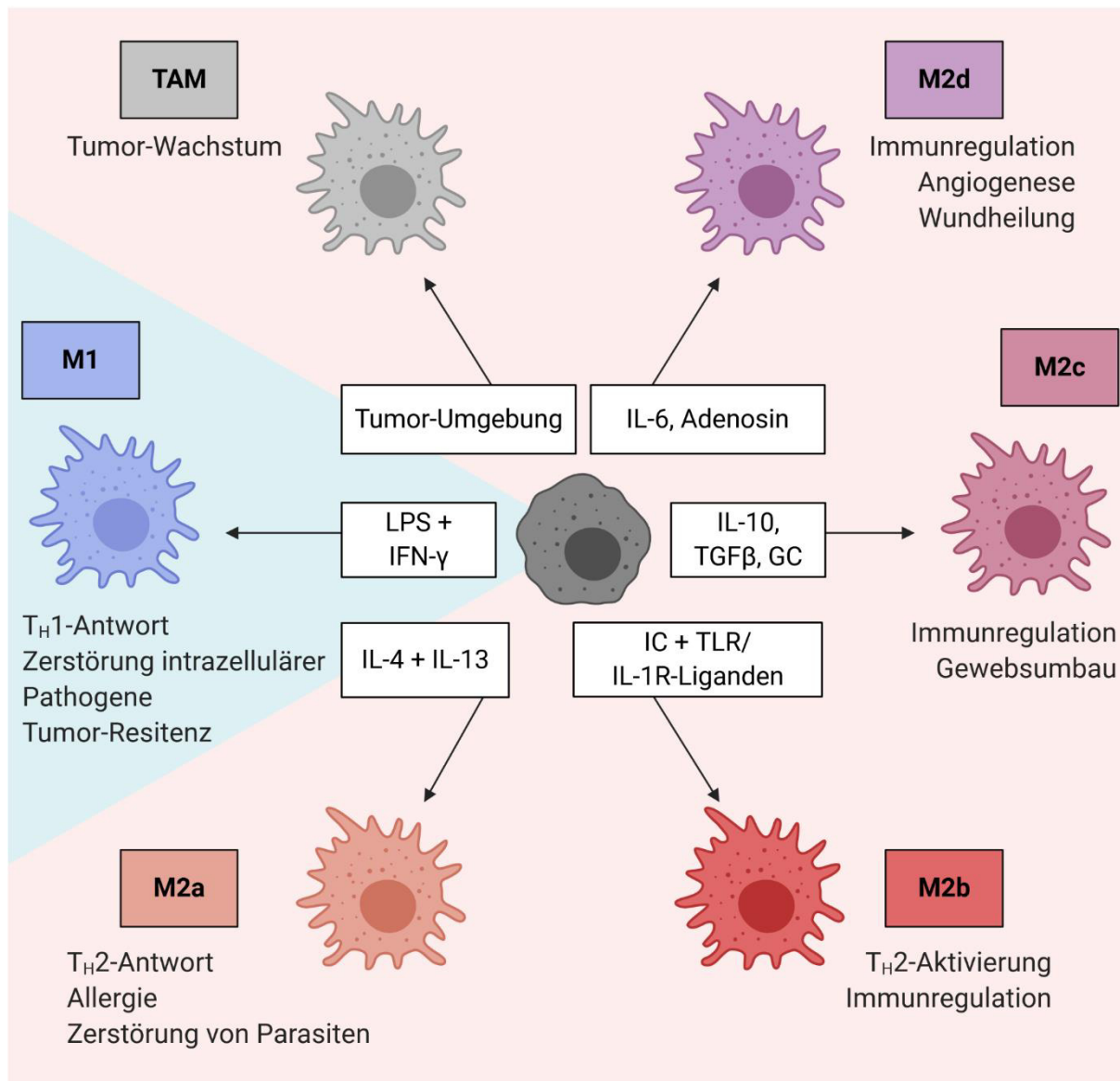


Abbildung 1-2: Das M1/M2-Modell. Gezeigt ist die Einteilung der verschiedenen Makrophagenpopulationen in klassisch aktivierte M1 Makrophagen (blau unterlegt) und alternativ aktivierte M2 Makrophagen (rosa unterlegt). Bei Stimulation mit LPS und IFN- γ kommt es zur Polarisierung von M1 Makrophagen, die mit einer T_{H1}-Antwort assoziiert sind und für die Zerstörung intrazellulärer Pathogene verantwortlich sind sowie zur Tumor-Resistenz beitragen. IL-4 und IL-13 fördern die Generierung vom M2a Subtyp, der mit der T_{H2}-Antwort in Verbindung steht und bei der Allergie sowie der Bekämpfung von Parasiten eine Rolle spielt. Immunkomplexe (*immune complexes*, IC) und TLR-(*toll like receptor*-) oder IL-1R-Liganden sorgen für eine Polarisierung in Richtung eines M2b Subtyps, der die T_{H2}-Zell-Aktivierung fördert sowie eine immunregulatorische Funktion hat. IL-10, TGF β (*tumor growth factor β*) und Glukokortikoide (*glucocorticoids*, GC) polarisieren in Richtung M2c Makrophagen. Diese sind neben ihrer immunregulatorischen Funktion am Gewebsumbau beteiligt. IL-6 und der Vasodilatator Adenosin sorgen für die Generierung des immunregulatorischen M2d-Subtyps, der an der Angiogenese und der Wundheilung beteiligt ist. Als weiterer Subtyp der alternativ aktiviertem M2 Makrophagen werden die Tumorassoziierten Makrophagen (TAM) gezählt, die im Tumorgewebe vorkommen und dort das Tumorwachstum fördern. Abbildung modifiziert nach [31] mit freundlicher Erlaubnis von Hindawi Limited.

1.1.2 Makrophagen und das angeborene Immunsystem

Makrophagen sind permanent dabei, ihr umliegendes Gewebe nach Fremdkörpern abzusuchen und gelten als einer der ersten Barrieren des Immunsystems [4]. Um ihren besonderen Aufgaben nachzukommen, besitzen Makrophagen eine Vielzahl unterschiedlicher Rezeptoren, wozu auch die so genannten Mustererkennungs-Rezeptoren (*pattern recognition receptors*, PRRs) gehören, welche in der Lage sind, pathogene Strukturen zu erkennen. Diese pathogenen Strukturen werden auch als *pathogen associated molecular patterns* (PAMPs) bezeichnet. Die PRRs können in 4 Gruppen unterteilt werden, TLRs (*toll like receptors*), NLRs (*nucleotide-binding oligomerization domain (NOD)- Leucin Rich Repeats (LRR)-containing receptors*), RLRs (*retinoic acid-inducible gene 1 (RIG-1) -like receptors*) und CLRs (*C-type lectin receptors*) [33]. Neben pathogenen Strukturen können auch nicht-infektiöse körpereigene Strukturen an PRRs binden, die bei Gewebsverletzungen oder dem Untergang von Zellen freiwerden. Diese endogenen Stimuli werden auch als *danger associated molecular patterns* (DAMPs) bezeichnet und können so zu sterilen, von exogenen Pathogenen unabhängigen Entzündungsreaktionen führen [34]. Über PRRs können pro-inflammatorische Signalwege ausgelöst werden, was zur Ausschüttung von zytotoxischen Substanzen wie reaktiven oxidativen Spezies (ROS) oder Zytokinen führen kann. Darüber hinaus können sie als ko-stimulatorische Signale bei der Aktivierung von Zellen des adaptiven Immunsystems mitwirken sowie die Phagozytose induzieren [35].

Die Phagozytose übernimmt eine der Hauptaufgaben der Makrophagen, wobei damit die Erkennung und Aufnahme von Partikeln mit einer Größe von mehr als 0,5 µm gemeint ist. Hierzu zählen neben exogene Pathogene wie Bakterien, Pilze und Viren auch infizierte und tote Zellen sowie Zelltrümmer [36]. Viele unterschiedliche Rezeptoren auf der Zellmembran ermöglichen die Unterscheidung zwischen körpereigenen und körperfremden sowie der Pathogenität, wobei diese in nicht-opsonische und opsonische Rezeptoren unterteilt werden können. Nicht-opsonische Rezeptoren können direkt an Liganden auf der Oberfläche von zu phagozytierenden Targets binden, während opsonische Rezeptoren an Strukturen binden, die zu phagozytierende Targets markieren. Diese Strukturen werden auch als Opsonine bezeichnet. Opsonine sind unter anderem Komplementfaktoren, als Teile der humoralen angeborenen Immunantwort oder Antikörper, als Vertreter der humoralen erworbenen Immunität [37]. Schließlich kann die Phagozytose dazu führen, dass Proteinfragmente der verdauten Strukturen über den Haupthistokompatibilitätskomplex (*major histocompatibility complex*, MHC) -Moleküle auf der Zelloberfläche präsentiert werden, um so weitere Immunzellen zu aktivieren und die Immunantwort zu verstärken [38].

Sowohl die Phagozytose als auch die Anwesenheit bestimmter Stimuli können zum oxidativen Burst führen, womit die Ausschüttung von ROS gemeint ist. Dabei wird die NADPH (Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat) Oxidase aktiviert, welche Superoxide und Wasserstoffperoxid bildet. Diese können dann direkt zur Zerstörung der phagozytierten Pathogene führen oder inflammatorische

Signalwege wie den NF κ B-(*nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells*)-Weg antriggern [39].

Die Kommunikation mit Zellen des umliegenden Gewebes oder weiterer Immunzellen wird auch durch ihre Fähigkeit zur Ausschüttung von Zytokinen und Chemokinen begünstigt. Hierdurch können andere Zellen sowohl direkt aktiviert, als auch angelockt werden, um eine effizientere Immunantwort zu erzielen. Typische pro-inflammatorische Zytokine sind IL-1 α und IL-1 β , IL-6, Tumor Nekrose Faktor (TNF) oder auch IFN- γ . Zu den anti-inflammatorischen Zytokinen zählt unter anderem IL-10 [40]. Besonders IL-1 β spielt eine wesentliche Rolle bei sterilen entzündlichen Prozessen [41]. Dabei sind myeloische Zellen, zu denen die Makrophagen zählen, eine der wenigen Zellarten, die in der Lage sind, selbst IL-1 β über einen besonderen Immunkomplex, der als Inflammasom bezeichnet wird, zu generieren. Neben der Generierung dieses pro-inflammatorischen Zytokins, besitzen Makrophagen vermehrt Rezeptoren, um auf IL-1 β zu reagieren und im weiteren Verlauf zu Entzündungen beizutragen [42]. Makrophagen spielen so auch in vielen chronischen Entzündungsreaktionen eine entscheidende Rolle bei der Entstehung von Erkrankungen wie Psoriasis, rheumatoider Arthritis oder Morbus Crohn führen können [3].

Die Kenntnis über die Ausbildung eines Immungedächtnisses als entscheidender Unterschied des angeborenen und erworbenen Immunsystems wurde in den letzten Jahren in Frage gestellt. So sind auch Monozyten und Makrophagen als Zellen der angeborenen Immunität in der Lage, bei einem Zweitkontakt mit einem Antigen mit einer verstärkten Immunreaktion zu reagieren. Dies wurde als *Trained Immunity* bezeichnet, was so viel wie Trainierte Immunität bedeutet. Neben einer verstärkten Immunreaktion gibt es auch in einigen Fällen eine abgeschwächte Immunantwort bei erneutem Antigenkontakt, was als Immun-Toleranz betitelt wurde. Die Mechanismen hinter diesem Phänomen sind noch nicht ausreichend geklärt, jedoch werden mögliche epigenetische und metabolische Veränderungen der Zellen als Reaktion auf den ersten Antigenkontakt vermutet [43].

1.2 Autophagozytose, Endozytose und das Lysosom

Sowohl die Autophagozytose als auch die Endozytose sind zwei wichtige Membranvesikel-basierte Wege innerhalb der Zelle, die zur Verdauung und dem Recycling intra- und extrazellulärer Bestandteile beitragen. Beide Wege enden schließlich damit, dass entweder das bei der Autophagozytose gebildete Autophagosom als auch das bei der Endozytose gebildete Endosom mit dem Lysosom verschmelzen und die jeweiligen aufgenommenen Inhalte degradiert werden [44].

1.2.1 Autophagozytose

Der Begriff Autophagozytose, auch als Autophagie bezeichnet, stammt aus dem Griechischen und bedeutet so viel wie „sich selbst verzehren“. Die Autophagozytose ist ein zellulärer Prozess, um das Überleben der Zelle bei Nahrungsmangel durch Recycling von Proteinen, Nucleinsäuren und Lipiden zu sichern. Darüber hinaus kann die Autophagozytose auch die Akkumulation zytotoxischer Bestandteile innerhalb der Zelle durch dessen gezielten Abbau verhindern [45]. Obwohl der Begriff schon vor über 50 Jahren von Christian de Duve das erste Mal in den Umlauf gebracht wurde, konnten die Mechanismen der Regulation erst in den 90er Jahren durch die Identifizierung der zur Autophagozytose gehörenden Gene (*autophagy-related proteins*, Atgs) in Hefen durch Yoshinori Ohsumi aufgeklärt werden [46]. Mittlerweile sind drei unterschiedliche Autophagie-Haupttypen definiert, die Makro-Autophagie, die Mikro-Autophagie und die Chaperon-vermittelte-Autophagie. Bei der Makro-Autophagie werden die zu verdauenden und zu recycelten zellulären Bestandteile in einem von einer Doppelmembran umgebenen Autophagosom aufgenommen, das schließlich mit dem Lysosom fusioniert, woraufhin die Degradierung und eine mögliche Sortierung zur Wiederverwendung folgt. Bei der Mikro-Autophagie wird die zelluläre Ladung direkt ins Lysosom aufgenommen. Bei beiden Formen der Autophagie können sowohl selektiv als auch unselektiv größere zelluläre Bestandteile aufgenommen werden. Bei der Chaperon-vermittelten-Autophagie werden durch spezielle Proteine, die als Chaperone bezeichnet werden, die zu verdauenden Proteine mit diesem an der lysosomalen Membran komplexiert und durch das lysosomal-assoziierte Membranprotein 2A (LAMP2A) erkannt und ins Lysosom aufgenommen. Eines dieser Chaperone kann z. B. das Hitzeschockprotein 70 sein, das in diesem Fall einen entscheidenden Teil zu der Entfaltung und Degradierung der Proteine beiträgt [45]. Wenn in dieser Arbeit die Begriffe Autophagie oder Autophagozytose verwendet werden, ist stets Makro-Autophagie gemeint.

1.2.1.1 Mechanismus, Induktion und Regulation der Autophagozytose

Die Autophagozytose ist ein Prozess, der sich in verschiedene Phasen aufteilt. Zunächst kommt es zur Initiierung durch bestimmte Auslöser wie z. B. zellulärer Nährstoffmangel (Abb. 1-3). Im nächsten Schritt startet die Bildung der Doppelmembran, die auch als Isolierungsmembran bezeichnet wird, und deren Formierung um die zelluläre Ladung. In einem weiteren Schritt kommt es zur Expansion des Phagophors und schließlich zur kompletten Schließung und somit zur Bildung des Autophagosoms. Das Autophagosom kann dann mit dem Lysosom fusionieren, sodass letztlich die Degradierung und das Recycling stattfinden kann. Als Initiator fungiert z. B. AMP-aktivierte Kinase (AMPK), ein typischer Inhibitor ist mTORC1 (*target of rapamycin complex 1*). Die Atgs regulieren die einzelnen Schritte, wobei sie jeweils verschiedene Proteinkomplexe bilden und zum Bildungsort des Phagophors rekrutiert werden [47]. Der Begriff autophagischer Flux (*autophagic flux*) beschreibt ein Maß für die Degradierung von Autophagosomen [48].

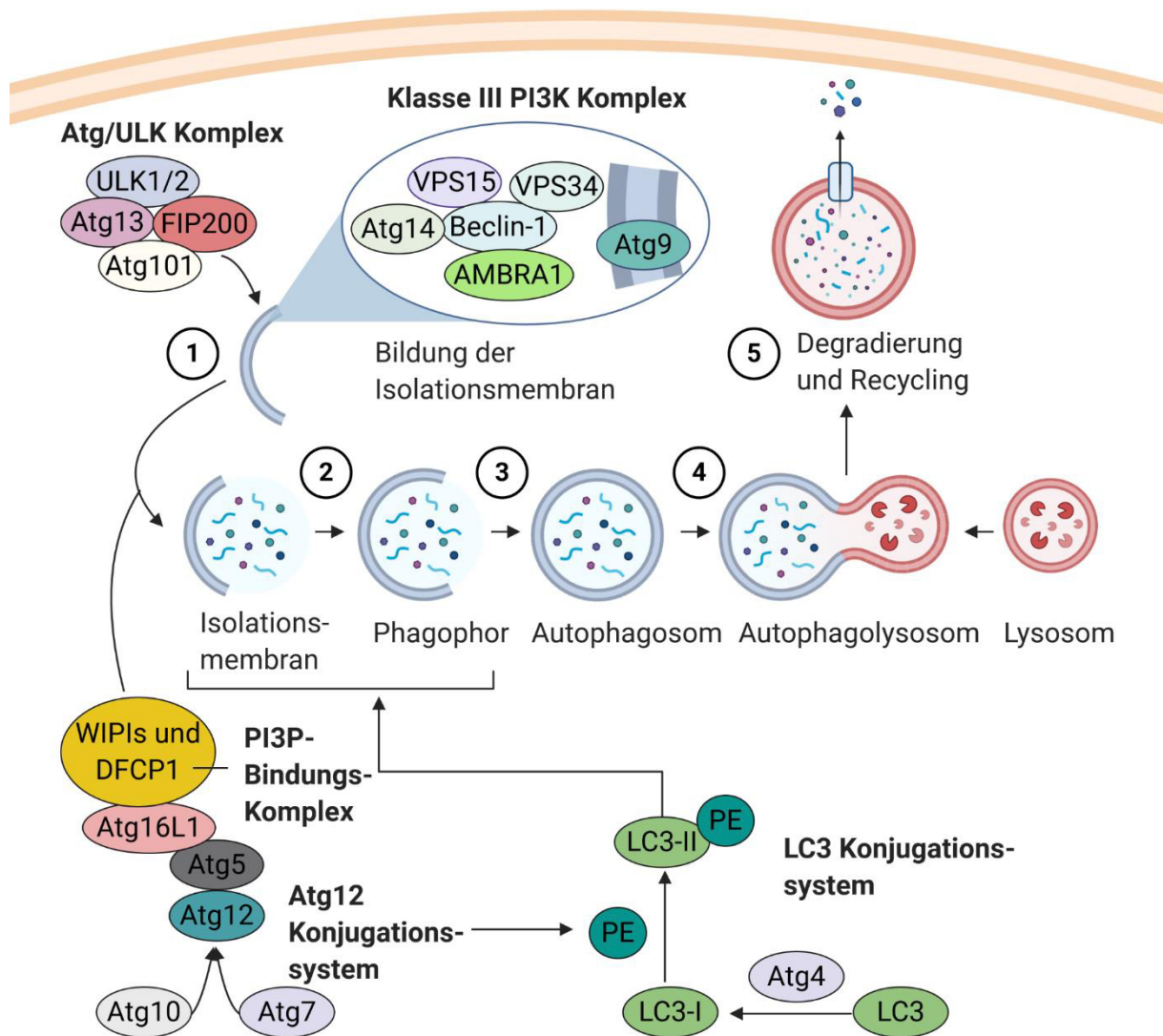


Abbildung 1-3: Überblick über den Prozess der Autophagozytose. Die Autophagozytose gliedert sich in 5 Schritte, die Initiierung (1), die Phagophor-Formation mit Bildung einer Isolationsmembran um die zu degradierenden, zellulären Bestandteile (2), die Expansion des Phagophors und somit die Bildung des Autophagosoms (3), die Fusion von Autophagosom und Lysosom zum Autophagolysosom (4) und schließlich die Degradation und das Recycling der autophagosomalen Bestandteile (5). Wird die Autophagozytose zum Beispiel durch Nährstoffmangel innerhalb der Zelle initiiert, so wird der Atg/ULK-Komplex bestehend aus zur Atg 13 und 101, sowie ULK1 (*unc-51-like kinase 1*) und FIP200 (*focal adhesion kinase family interacting protein of 200 kDa*) aktiviert. Dieser wird in Abhängigkeit des Nahrungsangebots durch mTORC1 negativ reguliert. Der Atg/ULK-Komplex aktiviert den Klasse III PI3K Komplex (Phosphatidylinositol-3-Kinase Komplex), der für die Produktion von PI3P (Phosphatidylinositol-3-Phosphat) am Endoplasmatischen Retikulum (ER) verantwortlich ist. Lipide werden außerdem durch Vesikel vom Golgiapparat transportiert, welche Atg9 enthalten. So startet die Bildung der Isolationsmembran. PI3P-Bindungsproteine wie WIPIs (*WD-repeat proteins interacting with phosphoinositides*) und DFPC1 (*double FYVE-containing protein*) werden ebenfalls zur Isolationsmembran rekrutiert. Für die Expansion des Phagophors und die eigentliche Bildung des Autophagosoms ist das Atg12 Konjugationssystem essentiell, das an der Außenseite der Membran präsent ist. Das Atg12 Konjugationssystem wird gebildet, indem Atg12 durch Atg7 und Atg10 aktiviert wird, sodass es an Atg5 konjugiert werden kann. Das Atg12-Atg5 Konjugat kann so mit Atg16 interagieren. Für das vollständige Verschließen des Phagophors und somit die Bildung des Autophagosoms ist das mit PE konjugierte LC3-II unabdingbar. LC3 wird hierbei durch Atg4 zu LC3-I umgewandelt, welches wiederum mit Hilfe des Atg12-Konjugationssystems mit PE konjugiert werden kann. LC3-II kann so beispielsweise bei der selektiven Autophagozytose mit zellulären Bestandteilen interagieren, die zuvor mit p62 markiert wurden.

Zu degradierende, zelluläre Bestandteile können bei der selektiven Autophagozytose ubiquitiniert und an Adapterproteine wie p62/SQSTM1 (*ubiquitin-binding protein p62/ sequestosome-1*) gebunden werden und so von LC3 (*microtubule-associated protein 1 light chain 3*), das in seine lipidierte Form von LC3-I zu LC3-II konjugiert wird, erkannt werden. Das LC3-II lagert sich wiederum in der autophagosomalen Membran ein und kann so mit der markierten Ladung interagieren [49]. Da p62 selbst ein Substrat der Autophagozytose ist, weist eine erhöhte Proteinmenge auf eine vermehrte Akkumulation von Autophagosomen hin, insbesondere in Kombination mit dem Autophagosomen-Marker LC3-II [50]. Die Autophagozytose von geschädigten Mitochondrien ist beispielsweise eine Form der selektiven Autophagie und wird auch als Mitophagie bezeichnet [51].

Für die Autophagie-Induktion können unter anderem Inhibitoren von mTORC1 wie Rapamycin zum Einsatz kommen [52]. Auf der anderen Seite verhindern PI3K-Inhibitoren wie 3-Methyladenin, Wortmannin oder LY294002 die Bildung der Isolationsmembran und schließlich die Autophagosomenformation [53-55]. Weitere Inhibitoren der Autophagozytose sind der vATPase (vakuoläre H⁺-ATPase) Inhibitor Bafilomycin A₁ [56] sowie lysosomotrope Arzneistoffe wie Chloroquin oder Hydroxychloroquin, die die Funktion des Lysosoms und somit die Fusion mit dem Autophagosom behindern (Tabelle 1-1) [1].

Tabelle 1-1: Auflistung einiger Modulatoren der Autophagozytose

Name	Effekt auf die Autophagozytose	Mechanismus
Rapamycin	Induktor	mTORC1 Inhibitor
3-Methyladenin	Inhibitor	PI3K Inhibitor
Wortmannin	Inhibitor	PI3K Inhibitor
LY294002	Inhibitor	PI3K Inhibitor
Bafilomycin A ₁	Inhibitor	vATPase Inhibitor
Chloroquin	Inhibitor	Lysosomotropie
Hydroxychloroquin	Inhibitor	Lysosomotropie

1.2.1.2 Autophagozytose, Immunsystem und Entzündungen

Neben seinem Einfluss auf die zelluläre Homöostase ist die Autophagozytose auch ein wichtiger Bestandteil der Abwehr gegen eindringende Pathogene wie Bakterien, Viren oder Protozoen. Diese können degradiert und somit unschädlich gemacht werden. Die Autophagozytose von exogenen Pathogenen wird auch als Xenophagie bezeichnet und stellt eine Form der selektiven Autophagie dar [57]. Auf der anderen Seite können bestimmte Pathogene auch die Autophagozytose ihres Wirts antagonisieren oder auch adaptieren, um diese für ihr eigenes Überleben zu nutzen [58]. Die Kontrolle von Autophagozytoseaktivität und Immunantwort verläuft dabei in beide Richtungen. Bestandteile von Pathogenen können als PAMPs an PRRs binden und so neben einer angeborenen Immunantwort auch die Autophagozytose induzieren [59]. LPS ist beispielsweise eines dieser PAMPs aus der Zellwand gramnegativer Bakterien, das an den PRR TLR4 bindet und so eine pro-inflammatorische Immunantwort

auslöst. Eine vermehrt auftretende Autophagozytose kommt unter anderem durch die Interaktion von TRAF6 (*TNF receptor associated factor 6*), welches ein Protein der Signalkaskade bei TLR4-Aktivierung ausmacht, und Beclin-1 zustande. Beclin-1 ist ein Protein, das im Klasse III PI3K Komplex vorkommt und somit wichtig für die Induktion der Autophagozytose und Bildung der Isolationsmembran ist (Abb. 1-3) [60]. Neben der Induktion der Autophagozytose durch TLR4 sind auch andere TLRs [61] genauso wie auch NLRs als weitere Vertreter der PRRs in der Lage, die Autophagozytoseaktivität positiv zu beeinflussen [62, 63]. Darüber hinaus können Entzündungsmediatoren, wie TNF, IL-1 β und IFN- γ die Autophagie direkt aktivieren, wie genau ist jedoch noch nicht im Detail geklärt [64]. Die meisten Arbeiten diesbezüglich existieren zu IFN- γ . IFN- γ ist ein pleiotropes Zytokin, dass der alleinige Vertreter der Typ-II Interferone ist. Es hat unter anderem immunmodulatorische, anti-virale und anti-bakterielle Eigenschaften und leistet damit einen wesentlichen Beitrag zur angeborenen und adaptiven Immunantwort. Es wird hauptsächlich von Natürlichen Killerzellen (NKs) und T-Zellen produziert, allerdings sind auch antigenpräsentierende Zellen wie Dendritische Zellen und Makrophagen in der Lage, IFN- γ zu sezernieren. IFN- γ verschiebt die Immunantwort in Richtung T_H1-Phänotyp und ist somit auch an der Polarisierung von M1 Makrophagen beteiligt [65]. Außerdem aktiviert IFN- γ bei Infektionen Makrophagen und unterstützt dabei die angeborene Immunantwort, indem es die Phagozytose und die erfolgreiche Abwehr von Pathogenen, z. B. durch vermehrte ROS Produktion, induziert [66]. Die Autophagie-induzierenden Eigenschaften wurden in zahlreichen unterschiedlichen Zellarten nachgewiesen. So sind viele mögliche Mechanismen beschrieben, die eine Involvierung verschiedener, durch IFN- γ beeinflusster Signalwege und Proteine wie die Januskinasen (JAK) 1/2, die p38 Mitogen aktivierte Proteinkinase (MAPK), IRGM (*immunity-related GTPase family M protein*) und die des PI3K-Signalwegs zeigen [64].

IL-1 β ist ein weiterer, wichtiger Vertreter der pro-inflammatorischen Zytokine. Abgesehen von der Tatsache, dass IL-1 β selbst die Autophagozytose induziert, wird dessen Bildung und Freisetzung durch die Autophagozytose kontrolliert. Die Bildung von IL-1 β erfolgt über einen zytosolischen Multiproteinkomplex, der auch als Inflammasom bezeichnet wird (Kap. 1.3.2). Am besten untersucht ist hierbei das NLRP3 (*NOD-, LRR- and pyrin domain-containing protein 3*) Inflammasom, welches durch Aktivierung des Enzyms Caspase-1 zur Spaltung von pro-IL-1 β in IL-1 β beiträgt [67]. Sowohl NLRP3 selbst als auch das pro-IL-1 β sind Autophagiesubstrate, wodurch eine Kontrolle der pro-inflammatorischen Immunantwort resultiert und überschießende Entzündungsreaktionen verhindert werden können [68]. Auf der anderen Seite können beschädigte Mitochondrien zu einer vermehrten Bildung von ROS und anderen Stimuli führen, die das NLRP3 Inflammasom aktivieren und so zu einer pro-inflammatorischen Immunantwort beitragen [69]. Die Mitophagie dieser geschädigten Organellen kann somit gleichermaßen das Entzündungsgeschehen kontrollieren [70]. Neben den pro-inflammatorischen Entzündungsmediatoren, gibt es die mit der T_H2-Antwort in Verbindung stehenden

Zytokine IL-4, IL-13, sowie das anti-inflammatorische IL-10. In welche Richtung diese Stoffe die Autophagozytose modulieren, ist abhängig vom zellulären und mechanistischen Kontext [71].

1.2.2 Endozytose

Bei der Endozytose kommt es zur Internalisierung der Plasmamembran inklusive der Membranproteine und Lipide. Dabei können extrazelluläre oder subzelluläre Bestandteile, die zuvor an Strukturen auf der Plasmamembran binden, in membranumgebene Vesikel in die Zelle eingebracht werden [72]. Die Formation der Membraneinstülpung kann mit Hilfe des Proteins Clathrin erfolgen. Es werden zwei Typen der Endozytose unterschieden, die Clathrin-vermittelte (*clathrin mediated endocytosis*, CME) und die Clathrin-unabhängige Endozytose (*clathrin independent endocytosis*, CIE) [73]. Dabei koordinieren die so genannten Rab GTPasen (Rab) den vesikulären Transport durch die Zelle. Sie machen mit über 60 Vertretern die größte Familie von kleinen GTPasen aus. Sie funktionieren wie molekulare Schalter, die zwischen der GTP-(Guanosintriphosphat-)gebundenen inaktiven-Form und der GDP-(Guanosindiphosphat-)gebundenen aktiven-Form wechseln. Dabei interagieren sie indirekt mit Membrankomponenten und SNARE (*soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor-attachment protein receptors*) Proteinen [74]. Die verschiedenen Rab GTPasen haben jeweils korrespondierende Organellen. Die endosomale Ladung wird über Rab5 zum so genannten frühen Endosom transferiert, welches entgegen dem neutralen pH-Wert des Zytosols einen leicht sauren pH-Wert von 6,5 aufweist. Dort erfolgt eine Sortierung. Die endozytierten Inhalte können auf der einen Seite mit Hilfe von Rab7 über das späte Endosom (pH-Wert: 5,5) zum Lysosom (pH-Wert: 4-5) transferiert werden, woraufhin eine Degradierung durch saure Hydrolasen erfolgt (Kap. 1.2.3). Auf der anderen Seite kann über Rab4 und Rab11 vermittelt, auch ein Rücktransport an die Plasmamembran über so genannte Recycling-Endosomen erfolgen [75]. Neben der direkten Degradierung über die Verschmelzung von Endosom und Lysosom kann auch die Fusion des Endosoms mit einem Autophagosom zum so genannten Amphisom erfolgen, das im letzten Schritt dann mit dem Lysosom fusioniert. Im Gegensatz zum Autophagosom besitzt das Endosom eine Einfach- und keine Doppel-Membran [76]. Über Proteinkomplexe, die als Retromer bezeichnet werden, kann die endosomale Ladung bei Bedarf auch zum Golgi-Apparat oder wieder aus der Zelle heraus transportiert werden [77]. Zusätzlich können Endosomen auch zu so genannten Signalplattformen werden, also intrazelluläre Plattformen, an denen die Signalweiterleitung vermittelt wird. Dies ist beispielsweise bei der MyD88 (*myeloid differentiation primary response 88*) unabhängigen TLR4-vermittelten Immunantwort der Fall. Hierbei erfolgt im Gegensatz zum MyD88-Signalweg eine intrazelluläre Aufnahme des TLR4 über die Endozytose. Es erfolgt die Rekrutierung von TRAM (*TRIF-related adaptor molecule*) und TRIF (*TIR-domain-containing adaptor inducing interferon- β*) am frühen Endosom, die über weitere Signalproteine schließlich zur Ausschüttung von Typ I Interferonen führt [78]. Weitere endosomale TLRs sind TLR3, TLR7, TLR8 oder TLR9 [79].

Die Phagozytose stellt einen Sonderfall der Endozytose dar, bei der besonders große Partikel wie exogene Pathogene, tote Zellen oder Zelltrümmer in die Zelle aufgenommen werden um verdaut und somit unschädlich gemacht zu werden. Die Aufnahme von flüssigen Bestandteilen durch Endozytose wird als Makropinozytose bezeichnet [72]. Somit dient die Endozytose unter anderem der zellulären Homöostase, der Signalweiterleitung als auch der Kommunikation von zwei benachbarten Zellen. Auch Viren wie das neuartige SARS-CoV-2 (*severe acute respiratory syndrome Coronavirus 2*) werden in die Zelle über Endozytose aufgenommen. Man vermutet hier, dass die Viren über ihre Spikeproteine an den ACE-2 (*Angiotensin-converting-enzyme-2*) Rezeptor binden, um in die Zelle zu gelangen [80, 81]. Somit werden in vielen klinischen Studien Inhibitoren der Endozytose untersucht, um ein Mittel für die durch SARS-CoV-2 ausgelöste respiratorische Erkrankung COVID-19 (*Corona virus disease 2019*) zu finden [82].

1.2.2.1 Clathrin-vermittelte und Clathrin-unabhängige Endozytose

Clathrin ist ein Protein, das an der Bildung der Einstülpung der Plasmamembran um die zu endozytierende Ladung beteiligt sein kann. Diese Einstülpungen werden in diesem Fall auch als Clathrin-umgebene Vertiefung (*clathrin-coated pit*) bezeichnet [83]. Jedoch ist zu beachten, dass über 50 weitere zytosolische Proteine, wie weitere Gerüstproteinen und Clathrin-Adaptor Proteine an der Entstehung der Membraneinstülpung beteiligt sind [84]. Kommt es zur Initiierung der Endozytose, so wird zunächst der Zusammenbau der Clathrin-Ummantelung induziert. Hierfür interagiert unter anderem der heterotetramere Adapterprotein 2 (AP-2) Komplex sowie monomere Adapterproteine wie die der PICALM (*phosphatidylinositol binding clathrin assembly protein*) Familie mit der zu endozytierenden Ladung und Lipiden der Plasmamembran. Gerüstproteine wie das Clathrin wechselwirken ebenfalls mit den Adaptorproteinen und sich selbst, sodass sich eine von Gerüstproteinen ummantelte Einschnürung bilden kann. Im nächsten Schritt trägt eine Polymerisierung von Aktinfilamenten zur Bildung der Einschnürung bei. Schließlich kommt es zu Abschnürung der Einstülpung, wobei bei der klassischen CME dies durch die GTPase Dynamin passiert [73].

Die CIE ist komplexer als die CME und weniger gut untersucht. Sie kann sowohl abhängig als auch unabhängig von Dynamin verlaufen. Oft sind so genannte *Lipid Rafts* an der CIE beteiligt. Dies sind spezifische Membrandomänen, die die Anreicherungen von sehr dynamischen Anteilen von Cholesterol, Sphingomyelinen und Glykosphingolipiden enthalten. Diese können stimuliert werden, mehrere Mikrometer große Einstülpungen zu bilden, die durch Protein-Protein-, Lipid-Protein- oder Lipid-Lipid-Interaktionen gestützt werden [85]. *Caveolae* machen eine Unterform der *Lipid Rafts* aus. *Caveolae* sind kleine Membraneinstülpungen in der Plasmamembran, wobei diese durch oligomerisiertes Caveolin und daran gebundene Lipide und Proteine entstehen [86]. Jedoch zeigen einige Zellarten wie Adipozyten, Endothelzellen oder Muskelzellen eine sehr viel höhere Dichte an *Caveolae* [87]. Andere Formen der CIE werden nach den zytosolischen Proteinen oder nach der zu endozytierenden Ladung benannt, wie

z. B. die IL-2R β -Endozytose [88]. Außerdem können bestimmte Formen der CIE nach der Teilnahme bestimmter Membranproteine an der Endozytose benannt werden, wie beispielsweise die Flotillin-abhängige Endozytose [89]. Die in dieser Arbeit verwendeten Endozytose-Inhibitoren sind in Tabelle 1-2 dargestellt.

Tabelle 1-2: Ausgewählte Inhibitoren der Endozytose

Endozytose Inhibitor	Mechanismus
Chlopromazin	Interagiert mit Clathrin und AP2 [90]
Chloroquin	Inhibiert die lysosomale und endosomale Azidifizierung [91]
Dynasore	Inhibiert Dynamin [92]

Ob die Endozytose mit oder ohne Clathrin abläuft, kann nicht nur vom Liganden selbst, sondern auch von seiner Konzentration abhängen. So wird beispielsweise der Epidermale Wachstumsfaktor (*epidermal growth factor*, EGF) inklusive des EGF Rezeptors (EGFR), an den er bindet, bei geringen Konzentrationen mittels CME endozytiert, während bei hohen EGF-Konzentrationen auch eine von Clathrin unabhängige zelluläre Aufnahme stattfinden kann [93].

1.2.3 Das Lysosom und Lysosomotropie

Das Lysosom ist eine Organelle in eukaryotischen Zellen und kann vereinfacht als zelluläres Verdauungsorgan bezeichnet werden. Ein niedriger pH-Wert im Inneren der Organelle sorgt dafür, dass intra- und extrazelluläre Bestandteile verdaut werden können [94]. Die Lysosomotropie bezeichnet dabei das Phänomen, dass sich bestimmte Stoffe auf Grund ihrer chemischen Eigenschaften besonders gut im Lysosom anreichern können und dort akkumulieren. Sie können so die Funktion des Lysosoms beeinflussen [95].

1.2.3.1 Funktion und Aufbau des Lysosoms

Lysosomen sind membranumgebene Organellen von tierischen Zellen, die saure Hydrolasen enthalten und Mitte der 50er Jahre von Christian de Duve das erste Mal beschrieben wurden [96]. Sie unterscheiden sich vor allem von Endosomen durch das Fehlen von Mannose-6-Phosphat Rezeptoren und besitzen eine spezielle vATPase, die als Protonenpumpe den sauren pH-Wert zwischen 4 und 5 aufrechterhält. Als zentrale Verdauungsorganelle können sie mit Phago-, Endo- oder Autophagosomen fusionieren und den jeweiligen Inhalt degradieren [97]. Mittlerweile ist bekannt, dass Lysosomen an vielen weiteren zellulären Prozessen teilnehmen. So sind sie sowohl an metabolischen Signalwegen, der Genregulation, der Reparatur von Membranen, der Zelladhäsion und Migration als auch der Immunität beteiligt [98]. Wenn die Nährstoffspeicher der Zelle erschöpft sind, wird die lysosomale Biogenese erhöht und auch die Autophagozytose ausgelöst, für letzteres wird mTORC1 inhibiert und so für eine erhöhte

Autophagozytose-Aktivität gesorgt. Außerdem werden durch die Inhibierung von mTORC1 verschiedene Transkriptionsfaktoren im Zellkern aktiviert, die die lysosomale Zusammensetzung und Funktion regulieren. Hierzu zählt die MiT/TFE (*microphthalmia/transcription factor E*) Familie, zu der TFEB, TFE3, TFEC und MiTF zählen [99]. TEFB und TEF3 liegen unter Normalbedingungen phosphoryliert im Zytoplasma vor. Die Phosphorylierung wird durch mTORC1 kontrolliert [100]. Im dephosphorylierten Zustand können TEFB und TEF3 in den Zellkern einwandern und dort wiederum zusammen mit MiTF und TFEC an CLEAR (*coordinated lysosomal enhancement and regulation network*) binden, dessen Promoterregion eine Reihe von Targetgenen kontrolliert, die wichtig für die lysosomale Biogenese und Funktion sind [101]. Die Vorstellung, dass Lysosomen statische Strukturen sind, wurde abgelöst von der Erkenntnis, dass diese in der Lage sind, sich innerhalb der Zelle fortzubewegen und mit anderen Organellen zu kommunizieren. Dabei zeigten Anfärbungen von LAMP1, einem typischen lysosomalen Marker, dass sich die Zellorganellen in ständiger Bewegung befinden und immer wieder mit sich selbst oder anderen Organellen inklusive Endosomen und Autophagosomen fusionieren [102, 103].

Die SNARE Proteine vermitteln im Allgemeinen die Fusion von Membranen. Dabei formen sie ein parallelen, vier-spiraligen Komplex, bestehend aus Qa-, Qb-, Qc- und R-SNAREs, um zwei Membranen miteinander zu verbinden. So wird beispielsweise das autophagosomale Qa-SNARE Syntaxin 17 (STX-17) zu geschlossenen Autophagosomen rekrutiert, wo es mit dem Qbc-SNARE SNAP29 (*synaptosomal-associated protein 29*) und dem lysosomalen R-SNARE VAMP8 (*vesicle-associated membrane protein 8*) interagieren kann (Abb. 1-4). Hierdurch wird eine Fusion der autophagosomalen und der lysosomalen Membran erreicht [104, 105].

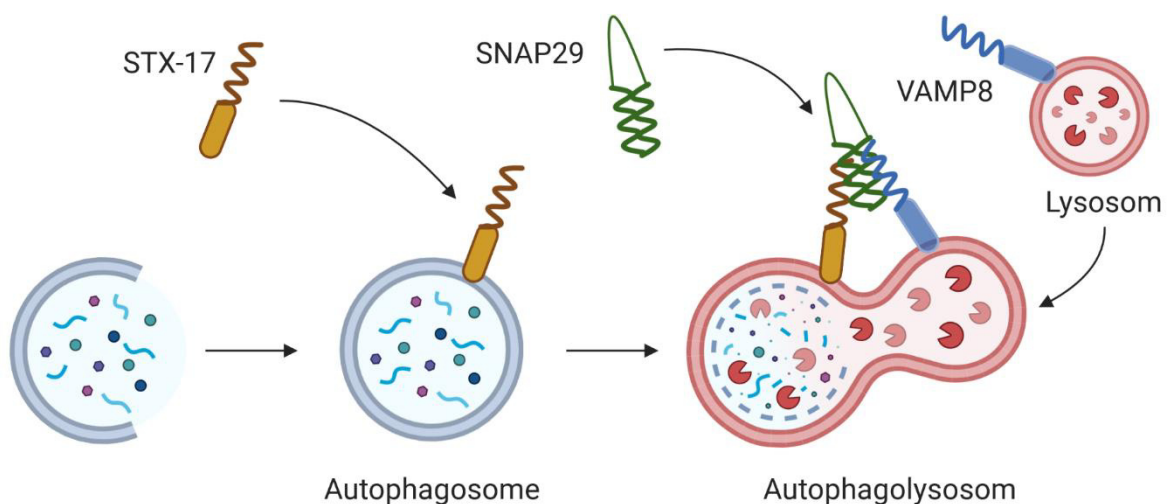


Abbildung 1-4: Bildung des SNARE-Komplexes bei der Fusion von Autophagosom und Lysosom. Das autophagosomale Qa-SNARE STX-17 wird zum geschlossenen Autophagosomen rekrutiert. Beim Zusammentreffen von Autophagosom und Lysosom kommt es zur Interaktion des Qbc-SNARE SNAP29 und des lysosomalen R-SNARE VAMP8, was schließlich zur Fusion der beiden vakuolären Organellen führt.

1.2.3.2 Lysosomotrope Dysfunktion

Als Folge der Akkumulation von zu verdauenden Aminosäuren, Lipiden und Proteinen im lysosomalen Lumen werden zelluläre Transferprozesse sowie die Fusion vom Lysosom mit Endo- und Autophagosomen beeinträchtigt. Dies begünstigt die Entstehung von Erkrankungen mit hoher Inzidenz wie Tumoren und Autoimmunerkrankungen sowie von 70 weiteren Erkrankungen mit geringer Inzidenz, die als Lysosomale Speicherkrankheiten (*Lysosomal Storage Diseases*, LSDs) zusammengefasst werden [106]. In der Regel sind Genmutationen von lysosomalen Enzymen, Membranproteinen, oder Lipiden der Auslöser von LSDs. Zwar steht nicht für jede Form der LSDs eine Behandlungsoption zur Verfügung, einige lassen sich jedoch mit rekombinanten Enzymen behandeln und mittlerweile sind einige Gentherapeutika in der klinischen Testung [107].

1.2.3.3 Lysosomotrope Stoffe

Lysosomotrope Stoffe sind in der Regel sehr lipophile, schwache Basen. Innerhalb des neutralen Zytoplasmas können sie auf Grund ihrer Lipophilie relativ einfach sämtliche biologische Membranen überwinden. In sauren Zellkompartimenten werden sie jedoch protoniert und können nicht mehr ungehindert die Membranen übertreten. Es resultiert eine Akkumulation in sauren Organellen [95].

Zu den lysosmotropen Stoffen zählen in der Regel Verbindungen, die einen clogP -(*calculated logP*-) Wert über 2 und einen pK_s -Wert zwischen 6,5 und 11 besitzen (Tab. 1-3) [108]. Die durch die lysosomotropen Arzneistoffe ausgelöste lysosomale Dysfunktion ist unter anderem gekennzeichnet durch Veränderungen des lysosomalen pH-Werts, eine erhöhte Akkumulation von Proteinen sowie eine durch den lysosomalen Stress ausgelöste, gesteigerte lysosomale Biogenese (Abb. 1-5) [1, 108, 109].

Tabelle 1-3: Chemische Eigenschaften von ausgewählten lysosomotropen Arzneistoffen [110]

Arzneistoffgruppe	Arzneistoff	clogP-Wert	pK _s -Wert
Antidepressivum (Selektiver Serotonin-Wiederaufnahme-Hemmer)	Fluoxetin	4,09	9,80
Antimalariamittel	Chloroquin	5,28	10,1
Antimalariamittel	Hydroxychloroquin	3,87	9,67
Antipsychotikum	Chlorpromazin	5,18	9,30
Beta-Adrenozeptor-Blocker	Propranolol	3,03	9,42
Beta-Adrenozeptor-Blocker	Penbutolol	3,84	9,76

Bafilomycin A₁ ist ein Inhibitor der vATPase, die als Protonenpumpe für das saure Milieu in den Lysosomen sorgt. Somit beeinträchtigt Bafilomycin A₁ die Funktion auf Grund eines anderen Mechanismus im Vergleich zu den lysosomalen Arzneistoffen [111].

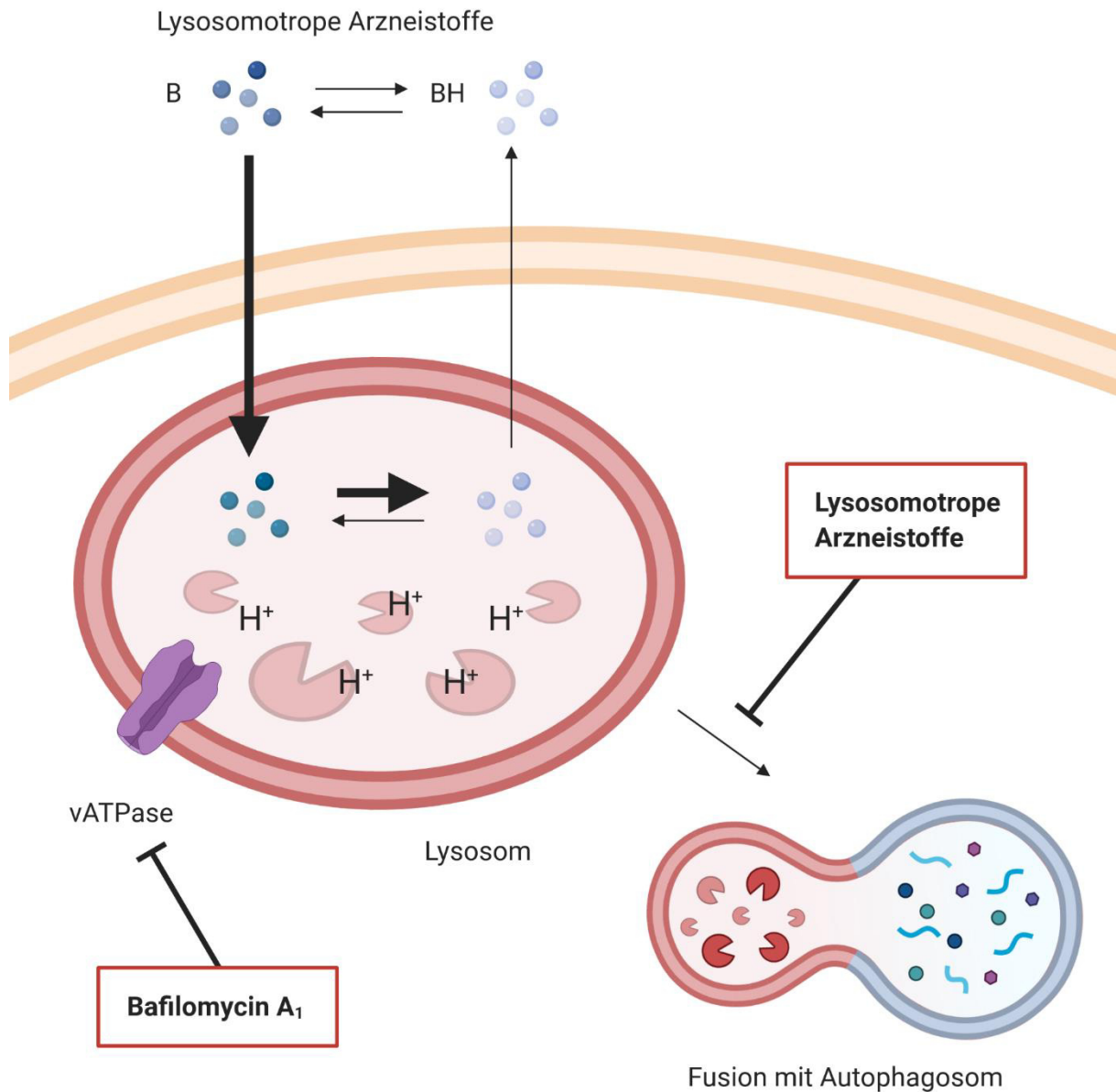


Abbildung 1-5: Mechanismus der Lysosomotropie. Lysosomotrope Arzneistoffe sind sehr lipophile, schwache Basen und liegen sowohl in unprotonierter (B) als auch protonierter Form (BH) vor und können unprotoniert sehr einfach biologische Membranen überwinden. Im sauren Lysosom angekommen verschiebt sich das Gleichgewicht auf Grund des niedrigeren pH-Werts in die Richtung der protonierten Form, die wiederum nicht mehr aus dem Lysosom diffundieren kann. Es kommt also zur Akkumulation. Hierdurch verhindern lysosomotrope Arzneistoffe unter anderem die Fusion des Lysosoms mit dem Autophagosom. Die vATPase ist eine Protonenpumpe, die den sauren pH-Wert des Lysosoms aufrechterhält und somit auch die Funktionsfähigkeit der sauren Hydrolasen sichert. Sie kann durch Bafilomycin A_1 inhibiert werden. Abbildung modifiziert nach [1] mit freundlicher Genehmigung von PLOS.

1.3 Interleukin-1 β

IL-1 ist eines der Schlüsselzytokine bei der Regulation entzündlicher Prozesse wobei der Begriff IL-1 die beiden Zytokine IL-1 α und IL-1 β miteinschließt. Beide Zytokine sind Teil der so genannten IL-1 Familie, die insgesamt 11 unterschiedliche Zytokine und 10 verschiedene Rezeptoren umfasst. IL-1 β ist dabei das am besten untersuchte Zytokin dieser Gruppe, besonders auf Grund seiner Beteiligung an vielen autoinflammatorischen Krankheiten [112, 113].

1.3.1 Aufbau, Funktion und Pathogenese

Die 11 verschiedenen Zytokine der IL-1 Familie werden anhand der Proteinsequenz und dem Rezeptor, an den sie primär binden vereinfacht in drei Untergruppen unterteilt. Die IL-1 Subfamilie besteht aus IL-1 α , IL-1 β und IL-33, die IL-18 Subfamilie aus IL-18 und IL-37 und die IL-36 Subfamilie aus IL-36 α , IL-36 β , IL-36 γ , dem IL-36Ra (IL-36 Rezeptorantagonist) und IL-38. Alle Vertreter der drei Unterfamilien liegen als Vorläuferpeptide im Zytosol vor und müssen zunächst gespalten und so aktiviert werden [113]. Der IL-1 Rezeptorantagonist (IL-1Ra) liegt als einziges Zytokin der IL-1 Familie als aktive Form vor, die keiner vorherigen Spaltung bedarf [114]. Aus diesem Grund wird er auch keiner der Subfamilien zugeordnet. Die stark pro-inflammatorischen Zytokine IL-1 α und IL-1 β werden von unterschiedlichen Genen kodiert und haben nur etwa 25 % der Aminosäuresequenz gemeinsam. Dennoch binden beide an denselben Rezeptor und lösen eine identische Signalkaskade aus mit daraus resultierenden ähnlichen biologischen Eigenschaften [115]. Das Gen für den IL-1 α -Vorläufer wird kontinuierlich sowohl in hämatopoetischen als auch nicht-hämatopoetischen Zellen exprimiert und Pro-IL-1 α wird vor allem von apoptotischen und nekrotischen Zellen durch die durchlässig werdende Zellmembran freigesetzt [116]. Somit wird es auch zu den so genannten Alarminen gezählt [117]. Im Gegensatz zu IL-1 β , das fast ausschließlich durch das Enzym Caspase-1 aus seiner Vorläuferform gespalten wird und dessen Vorläufer physiologisch inaktiv ist [118], kann die gespaltene Form von IL-1 α durch verschiedene Enzyme freigesetzt werden. Außerdem scheint auch die Pro-Form von IL-1 α pro-inflammatorische Eigenschaften zu besitzen [119]. Im Gegensatz zu IL-1 α wird IL-1 β vorwiegend von Monozyten, Makrophagen und Dendritischen Zellen ausgeschüttet. Hierfür bedarf es die Aktivierung eines Multiproteinkomplexes, das als Inflammasom bezeichnet wird [120].

IL-1 ist ein klassisches, endogenes Pyrogen, welches sterile Entzündungsreaktionen ohne das Vorhandensein einer Infektion auszulösen kann [121]. Es ist dabei um ein Vielfaches potenter als andere Pyrogene wie TNF oder IL-6 [122, 123]. Nach der Bindung an seinen Rezeptor und der daraus resultierenden Auslösung der Signalkaskade (Kap. 1.3.3), führt es zu einer vermehrten Ausschüttung anderer pro-inflammatorischer Mediatoren wie TNF, IL-6, Chemokinen oder Stickstoffmonoxid. Außerdem aktiviert es andere Immunzellen wie Makrophagen, die hierdurch vermehrt Phagozytose betreiben. Darüber hinaus werden auch T-Zellen, B-Zellen, Dendritische Zellen und NKs aktiviert [124].

Neben der entscheidenden Rolle in akuten Entzündungsreaktionen ist insbesondere IL-1 β an chronisch-entzündlichen als auch an auto-inflammatorischen Erkrankungen beteiligt [112].

Das Inflammasom ist Teil des angeborenen Immunsystems und wird durch PAMPs oder DAMPs aktiviert. Die PRRs, an die die PAMPs und DAMPs binden, sind anders als die transmembranären PRRs wie TLRs und CLR nicht in der Plasmamembran oder den Endosomen verankert, sondern kommen intrazellulär vor [125].

1.3.2 Generierung von Interleukin-1 β über das Inflammasom

Das NLRP3 Inflammasom ist das bisher am besten untersuchte Inflammasom und kann durch eine Vielzahl unterschiedlicher Stimuli aktiviert werden [126]. Es besteht aus dem Sensor NLRP3, dem Adaptorprotein ASC (*apoptosis-associated speck-like protein containing a caspase-recruitment domain*) und dem Effektorenzym Caspase-1 [120]. Zunächst erfolgt das so genannte *Priming* bzw. das 1. Signal. Hierbei können PAMPs wie LPS an den TLR4 oder pro-inflammatorische Zytokine wie TNF oder IL-1 β an ihre jeweiligen Rezeptoren binden und die Transkription der Vorläuferproteine von IL-1 β und IL-18 induzieren. Im zweiten Schritt bzw. dem 2. Signal, erfolgt dann die eigentliche, durch eine Vielzahl unterschiedlicher Stimuli induzierte Aktivierung von NLRP3 und die Formierung des NLRP3 Inflammasoms (Abb. 1-6). Zu den Induktoren zählen einige DAMPs, wie z. B. porenformende Toxine [127], als auch ATP (Adenosintriphosphat), das über die Aktivierung des P2X Purinrezeptor 7 (P2X₇) sowohl der Kalium-Efflux als auch den Calcium-Influx kontrolliert [128, 129]. Auch exogene oder endogene Partikel wie Harnsäure, Aluminium oder Asbest, die über Phago- oder Endozytose intrazellulär aufgenommen und lysosomal prozessiert und schließlich zur Disruption führen können, zählen hierzu [130]. Zusätzlich werden als Folge lysosomale Hydrolasen wie Cathepsine frei, die direkt oder indirekt über die Induktion von Kalium-Efflux oder Calcium-Influx zur Aktivierung des Inflammasoms führen [131]. Als weitere Organellen können defekte Mitochondrien und insbesondere die freigesetzten mitochondrialen ROS als 2. Signal für NLRP3 dienen [132], welche auch durch unterschiedliche PAMPs von Bakterien, Viren oder Pilzen beeinflusst werden [133, 134]. Die exakten Mechanismen der Inflammasom-Aktivierung durch PAMPs ist jedoch noch nicht vollständig geklärt [120].

Nach der NLRP3-Aktivierung kommt es zur Oligomerisierung von NLRP3 mit ASC und der inaktiven pro-Caspase-1, die gespalten und aktiviert wird. Die Caspase-1 kann dann die Vorläuferproteine von IL-1 β und IL-18 in ihre aktiven Formen spalten. Außerdem wird Gasdermin D (GSDMD) ebenfalls aktiviert, das Poren in die Zellmembran einbringen kann, was zur Pyroptose führt [135].

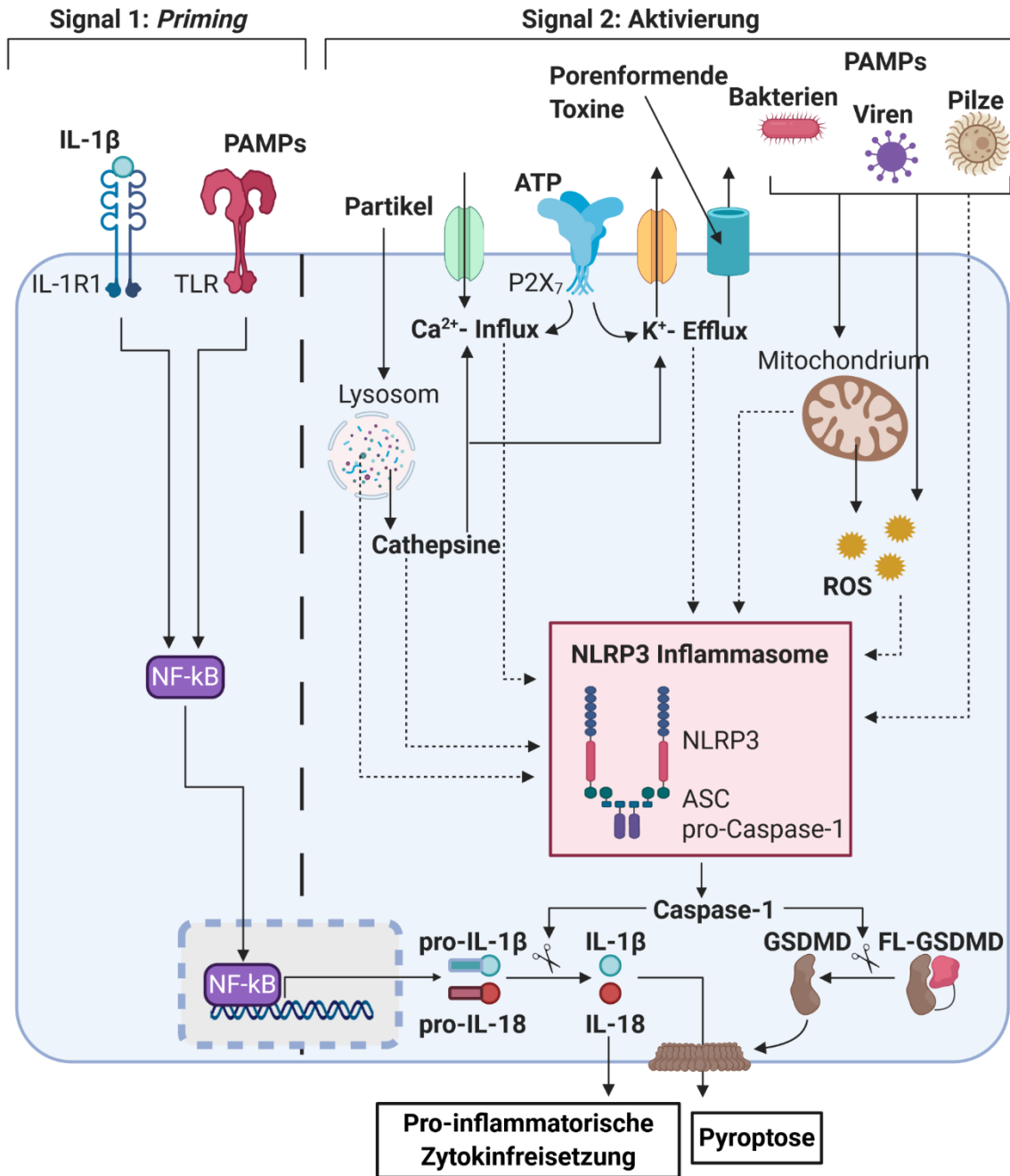


Abbildung 1-6: Priming und Aktivierung des NLRP3 Inflammasoms. Das 1. Signal, das auch als *Priming* bezeichnet wird, ist auf der linken Seite gezeigt. Hier können z. B. PAMPs wie LPS TLRs aktivieren oder Zytokine wie IL-1 β ihren jeweiligen Rezeptor. Es kommt über die Induktion des Transkriptionsfaktors NF κ B zur Expression der Vorläuferformen von IL-1 β und IL-18 (pro-IL-1 β und pro-IL-18). Beim 2. Signal bzw. der eigentlichen Aktivierung des NLRP3 Inflammasoms, die auf der rechten Seite gezeigt ist, können viele unterschiedliche Stimuli die Oligomerisierung des NLRP3 Inflammasoms induzieren, wobei der Sensor NLRP3 an das Adaptorprotein ASC bindet und dieser schließlich mit dem Effektorprotein pro-Caspase-1 interagiert, sodass dieses in seine aktive Form gespalten wird. Das Caspase-1 Enzym kann so IL-1 β und IL-18 aus seiner Vorläuferform generieren. Diese können schließlich von der Zelle sezerniert werden und rufen eine pro-inflammatorische Immunantwort hervor. Außerdem kann Caspase-1 GSDMD aus der inaktiven FL-(full length-)GSDMD-Form spalten, sodass dieses Poren in der Zellmembran formen kann. Hierdurch können zum einen IL-1 β und IL-18 freigesetzt werden, zum anderen induzieren die Poren den inflammatorischen Zelltod, der als Pyroptose bezeichnet wird. Abbildung modifiziert nach [135] mit freundlicher Genehmigung von MDPI.

1.3.3 Interleukin-1 Signalweg

Zur Auslösung einer Signalkaskade und der damit verbundenen pro-inflammatorischen Antwort binden IL-1 α und IL-1 β mit gleicher Affinität unabhängig voneinander an ihren Rezeptor. Dabei binden sie zunächst an den IL-1 Rezeptor Typ 1 (IL-1R1), der daraufhin mit seinem Ko-Rezeptor IL-1 Rezeptor-akzessorischem Protein (IL-1RAcP) dimerisiert. Hierdurch nähern sich die beiden intrazellulären TIR- (Toll/IL-1-Rezeptor) Domänen der beiden Rezeptorketten an, sodass MyD88 sowie die Interleukin-1 Rezeptor-aktivierte Proteinkinase 4 (IRAK4) binden können [136]. Parallel dazu werden IRAK1 und IRAK2 (auto)phosphoryliert, woraufhin die Rekrutierung und die Oligomerisierung von TRAF6 folgt. Der Proteinkomplex aus IRAK1/2 und TRAF6 kann so vom Rezeptorkomplex wegdiffundieren und die Verbindung der TGF β -aktivierten Proteinkinase 1 (TAK1) mit dem TAK-bindenden Protein 1 (TAB1) unterstützen [137]. Es folgt zum einen eine Aktivierung des MAPK-Signalwegs, wobei die MAPK p38 und die c-Jun-N-terminale Kinase (JNK) phosphoryliert werden und so den Transkriptionsfaktor AP-1 (Aktivierendes-Protein-1) aktivieren. Auf der anderen Seite kann auch der NF κ B-Signalweg angetriggert werden, wodurch der Transkriptionsfaktor NF κ B, ebenso wie AP-1, für die Expression pro-inflammatorischer Zytokine sorgt und eine entzündliche Immunreaktion ausgelöst wird (Abb. 1-7) [138]. Der endogen vorkommende Antagonist IL-1Ra bindet mit der gleichen Affinität wie IL-1 α und IL-1 β an den IL-1R1, jedoch wird durch seine Bindung keine Dimerisierung mit den Ko-Rezeptor IL-1RAcP ausgelöst und die Signalweiterleitung bleibt aus. Normalerweise sind IL-1 und IL-1Ra in einem ausgeglichenen Verhältnis vorhanden, bei bestimmten autoinflammatorischen Erkrankungen kann aber eine Überproduktion von IL-1 oder eine Unterproduktion von IL-1Ra vorliegen, sodass es zu pathologischen Zuständen kommt [139]. Anakinra ist ein rekombinanter IL-1 Rezeptor Antagonist und wird indikationsgerecht bei der rheumatoiden Arthritis [140] oder periodischen Fiebersyndromen wie Morbus Still oder dem Makrophagenaktivierungssyndrom eingesetzt [141, 142].

Ein weiterer endogener Regulator des IL-1 Signalwegs ist der IL-1 Rezeptor Typ 2 (IL-1R2). Der IL-1R2 agiert als so genannter „Lockvogel-Rezeptor“, an den zwar IL-1 α und IL-1 β binden können, jedoch auf Grund der fehlenden TIR-Domäne keine Signalweiterleitung möglich ist. IL-1R2 existiert als membrangebundene, als sezernierte sowie als abgespaltene Form und wird somit sowohl intra- als auch extrazellulär sowie an der Zellmembran exprimiert [143]. Dabei binden alle Formen IL-1 β mit einer höheren Affinität als IL-1 α [144].

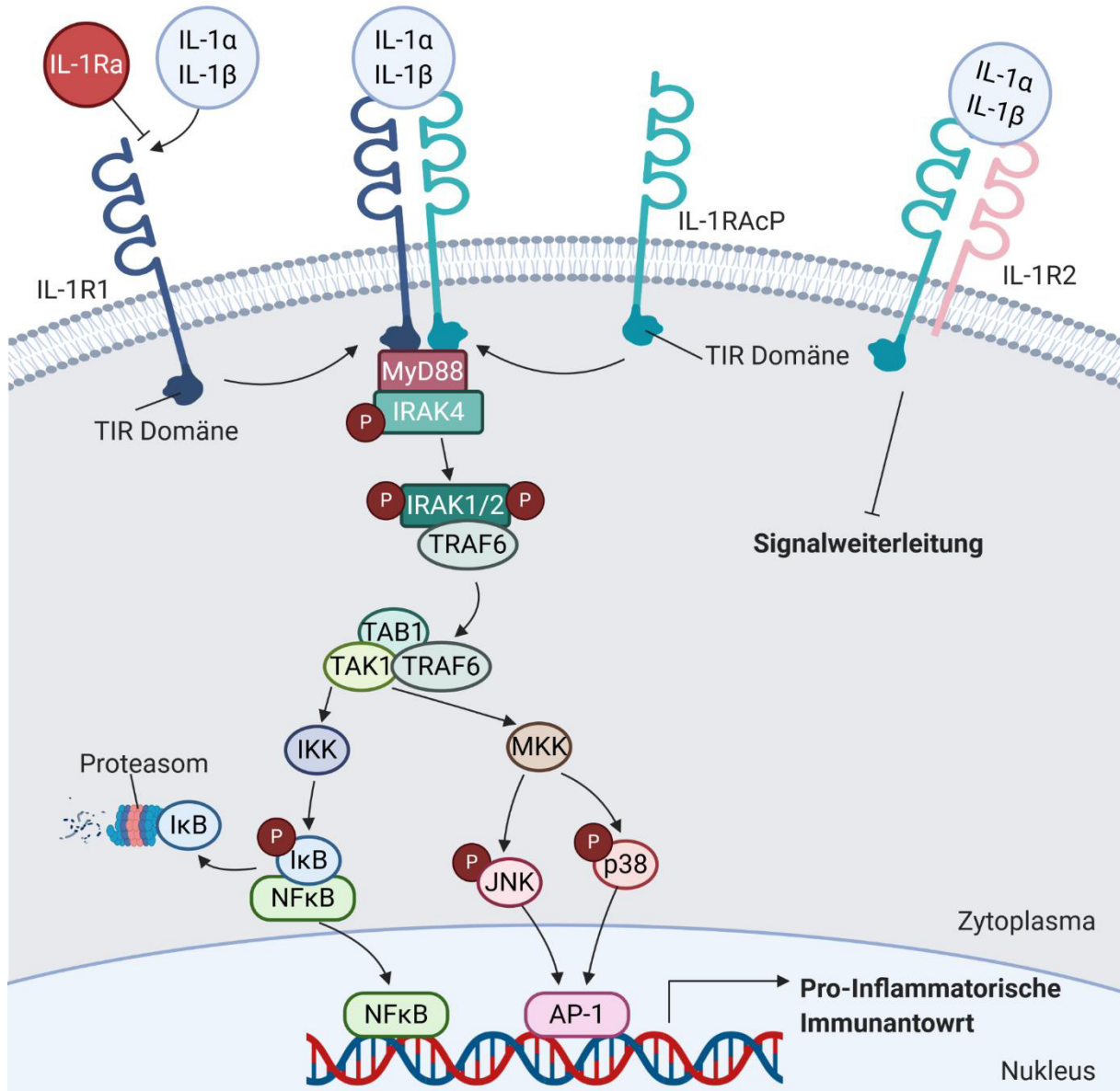


Abbildung 1-7: IL-1 Signalweg. IL-1 α und IL-1 β binden mit gleicher Affinität an IL-1R1, sodass dieser mit IL-1RAcP ein Dimer bildet. Wenn sich die beiden TIR-Domänen der beiden Rezeptorketten auf der intrazellulären Seite annähern, wird MyD88 und IRAK4 rekrutiert. IRAK4 (auto)phosphoryliert IRAK1 und IRAK2, sodass diese TRAF6 binden können. Der IRAK1/2-TRAF6 Proteinkomplex kann so vom Rezeptorkomplex wegdiffundieren und die Bindung von TAB1 und TAK1 an TRAF6 unterstützen. Hierdurch kann zum einen der NF κ B-Weg aktiviert werden, indem die IKK (Inhibitor des Nuklearfaktor kappa B Kinase) I κ B (Inhibitor des Nuklearfaktor kappa B) phosphoryliert, was dazu führt, dass dieser von NF κ B wegdiffundiert und selbst über das Proteasom degradiert wird. NF κ B kann so als Transkriptionsfaktor an die DNA im Zellkern binden und für eine pro-inflammatorische Immunantwort sorgen. Auf der anderen Seite kann der TAB1/TAK1/TRAF6-Proteinkomplex auch den MAPK-Weg aktivieren. Hierbei wird die Mitogen-aktivierende Kinase Kinase (MKK) aktiviert, die die MAPK JNK und p38 phosphoryliert, sodass diese den Transkriptionsfaktor AP-1 aktivieren können. Es erfolgt, genau wie beim NF κ B-Weg, eine vermehrte Expression pro-inflammatorischer Gene und somit eine positive Entzündungsreaktion. Der endogene, kompetitive Antagonist IL-1Ra kann ebenfalls an den IL-1R1 binden und so eine Auslösung der Signalkaskade verhindern. Der „Lockvogel-Rezeptor“ IL-1R2 vermag zwar IL-1 α und IL-1 β zu binden, auf Grund der fehlenden TIR Domäne erfolgt jedoch keine Signalweiterleitung bei Dimerisierung mit dem Ko-Rezeptor IL-1RAcP. Abbildung modifiziert nach [145] mit freundlicher Erlaubnis von Bio-Techne.

1.3.4 Endozytose und Internalisierung des IL-1 Rezeptors

Bindet ein Zytokin an seinen korrespondierenden Rezeptor, so kann die Signalweiterleitung wesentlich über die Rezeptorendozytose beeinflusst und reguliert werden. Nach Bindung des jeweiligen Liganden, kann der Rezeptor internalisiert werden und entweder degradiert oder recycelt werden. Darüber hinaus können, wie bereits für die TLRs beschrieben, Endosomen auch als Signalplattformen dienen [146]. IL-1 α und IL-1 β können ebenfalls nach ihrer Bindung an IL-1R1 und IL-1R2 dessen Aufnahme über die Endozytose induzieren, während IL-1Ra bei Bindung an IL-1R1 keine Rezeptorinternalisierung auslöst [147]. Die Annahme, dass der IL-1R1 über die CME internalisiert wird, beruht auf der Beobachtung, dass die als CME-Inhibitoren bekannten Stoffe wie Dynasore und Pitstop2 oder die Ausschaltung der Gene für Dynamamin 1 und 2 die zelluläre Aufnahme verhindern konnten [148, 149]. Jedoch kann auch die CIE in Abhängigkeit von Dynamamin verlaufen und es sind auch Arbeiten bekannt, die sowohl eine Inhibierung der CME als auch der CIE für Pitstop2 proklamieren [150]. Eine neuere Arbeit zeigt den Einfluss von *Lipid Rafts* auf die Internalisierung des IL-1R1 finden [151]. Somit ist der Mechanismus der Rezeptorendozytose des IL-1 Rezeptors noch nicht abschließend geklärt.

1.4 Zielsetzung

Der Einfluss des angeborenen Immunsystem auf zahlreichen Krankheitsbildern im Menschen zieht nach sich, dass immer intensiver an möglichen immunpharmakologischen Angriffspunkten geforscht wird und das Interesse an Arzneistoffen, die das Immunsystem beeinflussen, ungebrochen ist [152].

Lysosomotrope Arzneistoffe wie Chloroquin sind sowohl für ihre immunmodulierenden Eigenschaften als auch ihrem Einsatz als Inhibitoren der Autophagozytose und Endozytose bekannt [153]. Störungen der Autophagozytose führen zu teilweise lebensbedrohlichen Krankheiten wie Tumoren oder autoinflammatorischen Erkrankungen [58, 154]. Darüber hinaus können viele entzündliche Signalwege über die Rezeptorendozytose der jeweils beteiligten Strukturen beeinflusst werden [147]. Somit bürden lysosomotrope Arzneistoffe indikationsunabhängig das Risiko von entzündlichen unerwünschten Wirkungen. Während sich viele der Arbeiten unserer Arbeitsgruppe schon einschlägig mit dendritischen Zellen und Langerhans Zellen auseinandergesetzt haben [155-157], soll in dieser Arbeit ein besonderer Fokus auf Makrophagen als weitere wichtige Vertreter der myeloiden Immunzellen gelegt werden.

Das erste Ziel meiner Arbeit ist somit, geeignete *in vitro* Modellen humaner Makrophagen zu entwickeln und zu charakterisieren, um auf Grundlage dieser immunbiologischen Prozesse besser verstehen und Arzneistoffeffekte präzise vorhersagen zu können.

Zunächst sollen sowohl für eine Zelllinie als auch für primäre Makrophagen die optimalen Kulturbedingungen und Differenzierungsmethoden etabliert werden. Geplant ist dabei zum einen die Verwendung von THP-1 Zellen, die zu THP-1 Makrophagen differenziert werden. Zum anderen sollen

in Anlehnung an die bereits erfolgten Arbeiten mit primären humanen dendritischen Zellen und Langerhans Zellen mit aus humanen Blutspenden generierten Monozyten gearbeitet werden, die durch die Zugabe definierter Mengen an Zytokinen bzw. Stimuli zu primären Makrophagen polarisiert werden. Zur Charakterisierung soll systematisch der Einfluss der Kultur- und Differenzierungsbedingungen auf die Expression zellspezifischer Oberflächenmarker sowie die Immunantwort unter entzündlichen Bedingungen überprüft werden.

Der zweite Teil meiner Arbeit soll sich mit der Untersuchung der charakterisierten Zelltypen in Anwesenheit von lysosomotropen Stoffen, insbesondere unter sterilen entzündlichen Bedingungen, beschäftigen. Arbeiten unserer Arbeitsgruppe in dermalen dendritischen Zellen weisen darauf hin, dass lysosomotrope Arzneistoffe wie Chloroquin und Beta-Adrenozeptor-Blocker die Immunantwort auf IL-1 β verstärken können und dies in Zusammenhang mit den Autophagie-inhibierenden Eigenschaften dieser Stoffe steht [156, 157]. Somit soll Chloroquin als Leitsubstanz verwendet werden, darüber hinaus aber auch weitere lysosomotrope Arzneistoffe, die ähnliche chemische Eigenschaften aber unterschiedliche Indikationen besitzen. Die Beeinflussung der Immunantwort von Makrophagen unter verschiedenen inflammatorischen Bedingungen soll dabei mit gängigen immunologischen und molekularbiologischen Verfahren untersucht werden. Im weiteren Verlauf der Arbeit sollen die intrazellulären Vorgänge und die beteiligten Strukturen genauer erforscht werden. Dabei soll insbesondere überprüft werden, welchen Einfluss lysosomotrope Stoffe auf Autophagozytose und Endozytose haben und in wie weit dies im Zusammenhang mit möglichen immunmodulierenden Eigenschaften steht.

Im letzten Teil der Arbeit soll getestet werden, ob die zuvor identifizierten Vorgänge und Mechanismen lysosomotroper Arzneistoffe sich alleine auf Zellen des Immunsystems beziehen oder von der Zellart unabhängig sind.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Tabelle 2-1: Auflistung der verwendeten Geräte

Gerät	Hersteller
Absaugpumpe Vaccubrand	BRAND GmbH + CO KG, Wertheim am Main
Absaugvorrichtung	BRAND GmbH + CO KG, Wertheim am Main
Absaugvorrichtung	VWR International GmbH, Darmstadt
Analysenwaage AG204	Mettler-Toldeo GmbH, Gießen
Analysenwaage AG285	Mettler-Toldeo GmbH, Gießen
Analysenwaage XS205 DualRange	Mettler-Toldeo GmbH, Gießen
Autoklav Laboklav 135	SHP Steriltechnik AG, Detzel Schloss
Autoklav Systec V-95	Systec GmbH, Wettenberg
Brutschrank Binder C150	Binder GmbH, Tuttlingen
Brutschrank HeraCell 240i	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt
Digitale Spiegelreflexkamera Canon Eoas 2000D	Canon Europa N.V., Amstelveen, Niederlande
Durchflusszytometer CytoFLEX	Beckman Coulter, Brea, Kalifornien, Vereinigte Staaten
Elektrophoresenetzteil Power Pac Basic	Bio-Rad Laboratories GmbH, Feldkirchen
Elektrophoresenetzteil Power Pac HC	Bio-Rad Laboratories GmbH, Feldkirchen
Fluoreszenz-Phasenkontrast-Mikroskop BZ-8000	Keyence GmbH, Neu-Isenburg
Gefrierkombination (4 °C/ -20 °C)	Siemens AG, München
Gefrierkombination (4 °C/ -35 °C) ML300c	Electrolux Hausgeräte GmbH, Nürnberg
Gefrierschrank (-20 °C)	Liebherr-International Deutschland GmbH, Biberach an der Riß
Gefrierschrank (-80 °C)	Eppendorf AG, Hamburg
Gefrierschrank (-80°C) Hera freeze	Heraeus Holding GmbH, Hanau
Geldokumentationssystem BioDocAnalyse	Biometra GmbH, Göttingen
Geldokumentationssystem ChemiDoc MP	Bio-Rad Laboratories GmbH, Feldkirchen
Geldokumentationssystem PXi	Syngene, Cambridge, Vereinigtes Königreich
Gelelektrophoresesystem Mini-PROTEAN Tetra Cell	Bio-Rad Laboratories GmbH, Feldkirchen
Gelelektrophoresesystem Mini-Sub Cell GT Horizontal	Bio-Rad Laboratories GmbH, Feldkirchen
Kryoprobe Lagerungssystem LS4800	LabrepcO, Horsham, Pennsylvania, Vereinigte Staaten von Amerika
Lichtmikroskop Axiovert 135, invers mit Phasenkontrast	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena
Lichtmikroskop Axiovert 25, invers mit Phasenkontrast	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena
Magnethalter MACS Multistand	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach
Magnetrührer IKAMAG RH	IKA Werke GmbH & Co. KG, Staufen
Magnetrührer Variomag	VWR International GmbH, Darmstadt
Mikroplatten-Leser FLUOstar Optima	BMG Labtech GmbH, Offenburg
Mikroplatten-Leser Mitras ² LB 943	Berthold Technologies GmbH & Co. KG, Bad Wildbad
Neubauer Zählkammer (0,0025 mm ² /0,1 mm)	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena
Permanentmagnet Midi MACS Separator	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach

pH Meter 766 Calimatic	Knick Elektronische Messgeräte GmbH & Co. KG, Berlin
pH Meter EL-30	Phoenix Instrument GmbH, Garbsen
Pinzetten (anatomisch/chirurgisch)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Pipetten Eppendorf Research/ Research Plus	Eppendorf AG, Hamburg
Pipettierhilfe accu-jet pro	BRAND GmbH + CO KG, Wertheim am Main
Plattenwaschgerät Wellwash	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt
Plattformschüttler Titramax 100	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach
Plattformschüttler Titramax 1000 mit Hei-MIX Inkubator 1000	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach
Präzisionswaage AK160	Mettler-Toldeo GmbH, Gießen
Präzisionswaage PB1502-S	Mettler-Toldeo GmbH, Gießen
qPCR System LightCycler 480	Roche Applied Science GmbH, Mannheim
qPCR System qTOWER ³ G touch	Analytik Jena AG, Jena
Reinstwasseranlage LaboStar 2-DI/-UV	SG-Wasseraufbereitung und Regenerierstation GmbH, Barsbüttel
Reinstwasseranlage Milli-Q, Milipore Biocel A10	Merck KGaA, Darmstadt
Schüttler VIBRAX VXR basic	IKA Werke GmbH & Co. KG, Staufen
Sterilarbeitsbank Hera Safe HS12/ HSP15	Heraeus Holding GmbH, Hanau
Stickstofftank Arpege 70	Air Liquid Medical GmbH, Düsseldorf
Stickstofftank XL-100	Taylor-Wharton, Baytown, Texas, Vereinigte Staaten von Amerika
Thermocycler T Gradient	Biometra GmbH, Göttingen
Trans-Blot Turbo Transfersystem	Bio-Rad Laboratories GmbH, Feldkirchen
Trockenschrank Memmert UM500	Memmert GmbH + Co KG, Schwabach
Ultraschallbad, Sonorex Super	BANDELIN electronic GmbH & Co. KG, Berlin
Vortex-Gerät Genie 2	Bender & Hobein AG, Zürich, Schweiz
Vortex-Gerät MS1 Minishaker	IKA Werke GmbH & Co. KG, Staufen
Wasserbad	GFL Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel
Wasserbad TW12	Julabo GmbH, Seelbach
Wippschüttler WT16	Biometra GmbH, Göttingen
X-Band ESR Spektrometer (MiniScope MS 400) mit Temperiereinheit (BTC01)	Magnettech Gesellschaft für Mess- und Steuertechnik mbH, Berlin
Zellzählgerät Luna fl	Logos biosystems, Gyeonggi-do, Südkorea
Zentrifuge 5415C	Eppendorf AG, Hamburg
Zentrifuge 5417C	Eppendorf AG, Hamburg
Zentrifuge Avanti J-20 XP	Beckman Coulter, Brea, Kalifornien, Vereinigte Staaten
Zentrifuge Megafuge 1.0R	Heraeus Holding GmbH, Hanau

2.1.2 Reagenzien und Verbrauchsmaterialien

Tabelle 2-2: Auflistung der verwendeten Reagenzien- und Verbrauchsmaterialien

Reagenz/ Verbrauchsmaterial	Hersteller	Artikelnummer
3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen	M5655
50 Basenpaare DNA Leiter	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt	10416014
Abdeckfolie, hochtransparent und adhäsiv für die qPCR	Analytik Jena AG, Jena	844-70045-0
Abdeckfolie, hochtransparent und adhäsiv für die qPCR	Bio-Rad Laboratories GmbH, Feldkirchen	MSB1001
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen	A3678
Annexin-V-FITC	BioLegend, London, Vereinigtes Königreich	640906
Anti-Kaninchen Antikörper, HRP-konjugiert	Cell Signaling Technology, Leiden, Niederlande	7074
Antimycin A	Sigma-Aldrich, Taufkirchen	A8674
Bafilomycin A ₁	Tocris Bioscience, Bristol, Vereinigtes Königreich	1334
Bicinchoninsäure (BCA) Test Kit	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt	23227
BMS-906024	Sigma-Aldrich, Taufkirchen	BM0018
Bromphenol Blau, Natriumsalz	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe	A512.1
Buffy-Coat Blutkonserve	DRK Blutspendedienst Nord-Ost, Berlin	-
Calciumchlorid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen	793639
CD14 Microbeads	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach	130-050-201
cDNA Synthesekit iScript	Bio-Rad Laboratories GmbH, Feldkirchen	1708891
Chloroquin-Diphosphat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen	C6628
Chlorpromazin-Hydrochlorid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen	C8318
Cyan/ Orange Ladepuffer (TrackIt)	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt	10482028
CytoFLEX Daily QC Fluorespheres	Beckman Coulter, Brea, Kalifornien, Vereinigte Staaten	B53230
D-(+)-Glukose	Sigma-Aldrich, Taufkirchen	G8270
DAPT	Absource diagnostics GmbH, München	S2215
DEPC (Diethylpyrocarbonat)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen	159220
DEPC (Diethylpyrocarbonat)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen	9610
Wasser, steril		
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe	4720.1
Dimethylsulfoxid (DMSO), steril	Sigma-Aldrich, Taufkirchen	D4540
Dinatriumhydrogenphosphat	AppliChem GmbH, Darmstadt	A3567
Diphenyleneiodium (DPI)	Cayman Chemical, Ann Arbor, Michigan, Vereinigte Staaten	81050
DL-Dithiothreitol (DTT)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen	D-0632
DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium), hoher Glukoseanteil (4,5 g/l)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen	D6546
DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium), hoher Glukoseanteil (4,5 g/l)	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach	P04-03500
DNA Taq Polymerase	Minerva Biolabs GmbH, Berlin	530050

Dyanasore	Sigma-Aldrich, Taufkirchen	D7693
ECL-Reagenz Western-Ready Substrate Kit	BioLegend, London, Vereinigtes Königreich	426302
EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure) (Dinatriumsalz, Dihydrat)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe	8043.1
EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure) (Tetranatriumsalz, Dihydrat)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen	E6511
ELISA Kit CXCL8/ IL-8, unbeschichtet	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt	88-7066-88
ELISA Kit DuoSet IL-1Ra	Bio-Techne GmbH, Wiesbaden-Nordenstadt	DY280
ELISA Kit IL-10, unbeschichtet	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt	88-7106-88
ELISA Kit IL-6, unbeschichtet	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt	88-7066-88
ELISA Kit TNF, unbeschichtet	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt	88-7346-88
Ethanol, absolut	Sigma-Aldrich, Taufkirchen	32205
Falhtandtücher (Zellstoff)	Hildebrandt & Bartsch GmbH & Co. KG, Henstedt-Ultzburg	2054126
Filter für CO ₂ Inkubator	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt	50050737
Fluoxetin-Hydrochlorid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen	F132
Fötales Kälberserum	Biochrom, Berlin	S0615
Gel-Red Nukleinsäure Farbstoff	Sigma-Aldrich, Taufkirchen	SCT123
Gibco OptiMEM, serumreduziertes Medium, ohne Phenolrot	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt	11058-021
Glaskapillaren, 1,2/ 1 mm	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG, Eberstadt	9201012
Glycerol	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe	3783.1
Glycin	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe	5429.3
GM-CSF (Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-Stimulierender Faktor)	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach	130-093-866
HEK293 Zellen	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) GmbH, Braunschweig	ACC305
HEK blue IL-1 β Zellen	InvivoGen, Toulouse, Frankreich	Hkb.il1b
HEPES (2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazinyl)-Ethansulfonsäure)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen	RDD002
Hygromycin B Gold	InvivoGen, Toulouse, Frankreich	Ant-hg-1
IFN- γ (Interferon- γ)	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach	130-096-481
IGEPAL CA-630	Sigma-Aldrich, Taufkirchen	I3021
Immun-Blot PVDF- (Polyvinylidenfluor-)Membran	Bio-Rad Laboratories GmbH, Feldkirchen	1620177
innuPREP RNA Mini Kit 2.0	Analytik Jena AG, Jena	845-KS-2040250
INTERFERin Transfektionsreagenz	Polyplus-transfection SA, Illkirch-Graffenstaden, Frankreich	409-01
iTaq Universal SYBR Green Supermix	Bio-Rad Laboratories GmbH, Feldkirchen	172-5125
Kalibrierlösung pH-Meter	Merck KGaA, Darmstadt	1990050001
Kaliumchlorid	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe	6781.3

Kaliumdihydrogenphosphat	Merck KGaA, Darmstadt	104877
Kaliumhydroxid	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe	6751.1
Kosmetiktücher	Hildebrandt & Bartsch GmbH & Co. KG, Henstedt-Ultzburg	2054692
Kryoröhrchen	SARSTEDT AG & Co. KG, Nümbrecht	72.379
L-685,458	Absource diagnostics GmbH, München	S7673
LC3B Antikörper aus dem Kaninchen	Cell Signaling Technology, Leiden, Niederlande	2775
L-Glutamin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen	G7513
Lipofectamin 2000	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt	11668019
Transfektionsreagenz		
LPS (Salmonella enterica Minnesota R60)	[158]	-
LysoTracker Red DND-99 (LTR)	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt	L7528
Magermilchpulver	Sucofin, Zeven	12307
Magnetische Säule LS Columns	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach	130-042-401
Markierband, verschiedene Farben	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe	AK65.1
M-CSF (Monozyten-Kolonie-Stimulierender Faktor)	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach	130-096-492
Mission siRNA, Fluoreszenzmarkierte, universelle Negativkontrolle #1, Cyanin 3	Sigma-Aldrich, Taufkirchen	SIC003
mitoTEMPO	Sigma-Aldrich, Taufkirchen	SML0737
Monoklonaler Antikörper (Klon MOPC-21), PE-konjugiert, IgG1,k aus der Maus (Isotypenkontrolle)	BioLegend, London, Vereinigtes Königreich	400112
Monoklonaler Antikörper (Klon MPC-11), FITC-konjugiert, IgG1,k aus der Maus (Isotypenkontrolle)	BioLegend, London, Vereinigtes Königreich	400310
Monoklonaler Antikörper (Klon S43.10), PerCP-konjugiert, IgG2a aus der Maus (Isotypenkontrolle)	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach	130-094-967
Monoklonaler humaner CD11b Antikörper (Klon ICRF44), PE-konjugiert, IgG1,k aus der Maus	BioLegend, London, Vereinigtes Königreich	982606
Monoklonaler humaner CD14 Antikörper (Klon TüK4), PerCP-konjugiert, IgG2a aus der Maus	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach	130-113-150
Monoklonaler humaner CD163 Antikörper (Klon GH/61), PE-konjugiert, IgG1,k aus der Maus	BioLegend, London, Vereinigtes Königreich	333606
Monoklonaler humaner CD68 Antikörper (Klon Y1/82A), FITC-konjugiert, IgG1,k aus der Maus	BioLegend, London, Vereinigtes Königreich	333806
Mykoplasmendetektionskit Venor GeM Classic	Minerva Biolabs GmbH, Berlin	11-8100
N,N,N',N'-Tetramethylethan-1,2-diamin (TEMED)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe	2367
N-Acetyl-L-Cystein (NAC)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen	A9165
Natriumchlorid	VWR International GmbH, Darmstadt	27810.295
Natriumdeoxycholat Monohydrat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen	D5670

Natriumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe	0183
Natriumhydroxid-Plätzchen	Sigma-Aldrich, Taufkirchen	221465
Nitrilhandschuhe	DACH Schutzkleidung GmbH & Co. KG, Bietigheim	871
Normocin	InvivoGen, Toulouse, Frankreich	Ant-nr-1
Nunc MaxiSorp 96-Well ELISA-Platten	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt	44-2404-21
NycoPrep 1.077	AXIS-SHIELD PoC AS, Oslo, Norwegen	1114550
Pam ₂ CSK ₄	InvivoGen, Toulouse, Frankreich	tlrl-pm2s-1
Pam ₃ CSK ₄	InvivoGen, Toulouse, Frankreich	tlrl-pms
Parafilm	VWR International GmbH, Darmstadt	291-1213
Pasteurpipetten, ca.225 mm	BRAND GmbH + CO KG, Wertheim am Main	747720
PCR-Platte, 96-Well, weiß mit seitlichem Halbrand	Analytik Jena AG, Jena	844-70038-0
PCR-Platte, 96-Well, weiß/klar mit seitlichem Halbrand	Bio-Rad Laboratories GmbH, Feldkirchen	HSP9601
Penicillin-Streptomycin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen	P4333
Perm/Wash-Puffer	BD Bioscience, San Jose, CA, Vereinigte Staaten	554723
Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen	P1585
Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen	D8537
Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS)	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach	P04-36500
Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS) mit Magnesium und Calcium	Sigma-Aldrich, Taufkirchen	D8662
Pierce BCA Protein Assay Kit	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt	23225
Pierce LDH Zytotoxizitäts-Test-Kit	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt	88954
Pipettenspitzen 10/ 200/ 1000 µl	SARSTEDT AG & Co. KG, Nümbrecht	70.1115/ 70.760.002/ 70.762.010
Pipettenspitzen mit Filter, steril, pyrogenfrei, PCR-rein 20/ 100/ 300/ 1000 µl	SARSTEDT AG & Co. KG, Nümbrecht	70.1116.210/ 70.760.212/ 70765210/ 70.762.211
Pipettenspitzen TipOne 10/ 200/ 1000 µl	STARLAB INTERNATIONAL GmbH, Hamburg	S1110-3000-C/ S1111-1006-C/ S1111-6001-C
Pipettenspitzen TipOne mit Filter, steril, pyrogenfrei, PCR-rein 10/ 20/ 200/ 1000 µl	STARLAB INTERNATIONAL GmbH, Hamburg	S1121-2710-C/ S1120-1710-C/ S1120-8710-C/ S1126-7710-C
Polyklonaler Antikörper, PE-konjugiert, IgG aus der Ziege (Isotypenkontrolle)	Bio-Techne GmbH, Wiesbaden-Nordenstadt	IC108P
Polyklonaler humaner IL-1R1 Antikörper, PE-konjugiert, IgG aus der Ziege	Bio-Techne GmbH, Wiesbaden-Nordenstadt	FAB2698
Poly-L-Lysin Hydrobromid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen	P6282
Propidiumiodid (PI)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen	P4864

Protease/ Phosphatase Inhibitor Cocktail (100x)	Cell Signaling Technology, Leiden, Niederlande	5872
Proteinleiter, vorgefärbt (10-245)	AppliChem GmbH, Darmstadt	A8889
Pyrogenfreies Wasser für die Zellkultur	Biowest, über VWR International GmbH, Darmstadt	L0970
Pyrogenfreies Wasser für die Zellkultur	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe	3255.1
QUANTI-Blue	InvivoGen, Toulouse, Frankreich	Rep-qb
Quanti-Blue SEAP Detektionslösung	InvivoGen, Toulouse, Frankreich	Rep-qb1, rep-qb2
Reagenzröhre 15/ 50 ml	SARSTEDT AG & Co. KG, Nümbrecht	62.554.502/ 62.547.254
Reagenzröhre 15/ 50 ml	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen	188271/ 227261
Reagenzröhre 5 ml	SARSTEDT AG & Co. KG, Nümbrecht	551579
Durchflusszytometrie		
Reaktionsgefäß 1,5 ml, lichtundurchlässig (braun)	SARSTEDT AG & Co. KG, Nümbrecht	72706001
Reaktionsgefäße 0,5/ 1,5/ 2 ml	SARSTEDT AG & Co. KG, Nümbrecht	72.699/ 72.690.001/ 72.691
Reaktionsgefäße 1,5 ml	VWR International GmbH, Darmstadt	211-2161
Reaktionsgefäße PCR-rein, 1,5 ml	Eppendorf AG, Hamburg	0030.123.328
Reaktionsgefäße pyrogenfrei, 1,5 ml	Eppendorf AG, Hamburg	0030.121.589
Reaktionsgefäße, 0,2 ml, 8er Kette mit Deckel (PCR-Grad)	VWR International GmbH, Darmstadt	732-0546
Reinigungslösung	Beckman Coulter, Brea, Kalifornien, Vereinigte Staaten	A64669
Durchflusszytometer FlowClean Cleaning Agent		
Rekombinates-humanes IL-1 β (rh-IL-1 β)	BioLegend, London, Vereinigtes Königreich	579406
RNA Isolationskit innuPREP RNA Mini Kit 2.0	Analytik Jena AG, Jena	845-KS-2040050
RotiHistofix 4 % (4 % Formaldehyd, pH 7)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe	P087.1
Rotiphorese Gel 40	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe	T802
RPMI 1640	Sigma-Aldrich, Taufkirchen	R0883
RPMI 1640, supplimentiert mit L-Glutamin	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt	21875091
Salzsäure, konzentriert (37 %)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe	9277.2
SB202190	Sigma-Aldrich, Taufkirchen	S7067
Serologische Pipetten 5/ 10/ 25 ml	SARSTEDT AG & Co. KG, Nümbrecht	86.1253.001/ 86.1254.001/ 86.1685.001
siRNA gegen STX-17 und negative Kontrolle	Eurofins Genomics GmbH, Hamburg	-
siRNA Puffer 5x siMAX universal buffer	Eurofins Genomics GmbH, Ebersberg	-
SP600125	Sigma-Aldrich, Taufkirchen	S5567
Spritze 5/ 10/ 20 ml, steril	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe	0057.1/ 0058.1/ 0059.1
SQSTM1/ p62 Antikörper aus dem Kaninchen	Cell Signaling Technology, Leiden, Niederlande	8025

Sterilfilter 0,2 µm für DMSO	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe	KC72.1
Sterilfilter 0,2 µm für teilorganische Lösungen	SARSTEDT AG & Co. KG, Nümbrecht	83.1826.001
Sterilfilter 0,2 µm für wässrige Lösungen	SARSTEDT AG & Co. KG, Nümbrecht	83.1826.102
Sterilfilteraufsatz 0,2 µm	TPP Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Schweiz	99255
Sterilindikatorband	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe	XC20.1
SYBR Safe DNA Gelfarbstoff	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt	S33102
TEMPO (2,2,6,6-Tetramethylpiperidin 1-Oxyl)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen	214000
Tetramethylbenzidin (TMB)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen	860336
THP-1 Zellen	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) GmbH, Braunschweig	ACC16
Tiefenreinigungskonzentrat Durchflusszytometer CONTRAD 70	Beckman Coulter, Brea, Kalifornien, Vereinigte Staaten	81911
Trägerflüssigkeit Durchflusszytometrie CytoFLEX Sheath Fluid	Beckman Coulter, Brea, Kalifornien, Vereinigte Staaten	B51503
Tris(hydroxymethyl)aminomethane-(TRIS-) Hydrochlorid (HCl)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen	T3253
Tris(hydroxymethyl)aminomethane (TRIS)-Base	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe	5429
Trypan Blau	Sigma-Aldrich, Taufkirchen	T6146
TrypLE Express	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt	12604013
TWEEN 20	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe	9127.1
U0126	Tocris Bioscience, Bristol, Vereinigtes Königreich	1144
Vernichtungsbeutel, (Autoklavierbeutel) groß	SARSTEDT AG & Co. KG, Nümbrecht	86.1200
Vernichtungsbeutel, klein	SARSTEDT AG & Co. KG, Nümbrecht	86.1197
Wasser, PCR-Grad	VWR International GmbH, Darmstadt	733-2573
Wasserstoffperoxid-Lösung, 30 %	Sigma-Aldrich, Taufkirchen	216763
Zellkulturflasche 25/ 75/ 150 cm ²	TPP Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Schweiz	90025/ 90075/ 90150
Zellkulturflasche 25/ 75/ 175 cm ²	SARSTEDT AG & Co. KG, Nümbrecht	83.3910.002/ 83.3911.002/ 83.3912.002
Zellkulturplatte 24-well	SARSTEDT AG & Co. KG, Nümbrecht	83.3922.005
Zellkulturplatte 24-well	VWR International GmbH, Darmstadt	734-0056
Zellkulturplatte 6-well	TPP Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Schweiz	92406
Zellkulturplatte 96-well	SARSTEDT AG & Co. KG, Nümbrecht	83.3924.005
Zellkulturplatte 96-well	TPP Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Schweiz	92696
Zellschaber Größe S	TPP Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Schweiz	99002
Zeocin	InvivoGen, Toulouse, Frankreich	Ant-zn-1
Zitronensäure Monohydrat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen	C1909

β -Aktin Antikörper aus dem Kaninchen	Cell Signaling Technology, Leiden, Niederlande	4970
---	--	------

2.1.3 Verwendete Lösungen

2.1.3.1 Lösungen zur Zellkultivierung

Für die Kultivierung von THP-1 Monozyten und THP-1 Makrophagen sowie primären Monozyten und Makrophagen aus peripheren, mononukleären Blutzellen (PBMCs) wurde Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 Medium verwendet. Dieses wurde außerdem mit folgenden Zusätzen supplementiert, wobei in späteren Experimenten ein bereits mit 2 mM L-Glutamin versetztes RPMI 1640 Medium verwendet wurde:

Tabelle 2-3: Komplettiertes RPMI 1640 Medium

Zusatz zu RPMI 1640 Medium	Menge
Fötales Kälberserum, hitzeinaktiviert	10 %
(L-Glutamin	2 mM)
Penicillin	100 U/ml
Streptomycin	100 μ g/ml

Dieses Medium wurde vor allem für die THP-1 Zellen sowie die primären Monozyten verwendet und diente außerdem als Grundmedium für sämtliche Stimulationsversuche mit THP-1 Monozyten, THP-1 Makrophagen sowie primären Makrophagen. Für die Differenzierung von THP-1 Monozyten zu THP-1 Makrophagen wurde dem komplettierten RPMI 1640 Medium (Tab. 2-3) Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA) zugesetzt (5 oder 25 ng/ml).

Tabelle 2-4: Differenzierungsmedium für THP-1 Makrophagen

Zusatz zu komplettiertem RPMI 1640 Medium	Menge
Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA)	5 und 25 ng/ml

Zum Einfrieren der THP-1 Monozyten wurde das komplementierte RPMI 1640 Medium (Tab. 2-3) mit DMSO versetzt und unter Lichtausschluss bei 4°C bis zur Verwendung gelagert:

Tabelle 2-5: Einfriermedium für THP-1 Monozyten

Zusatz zu komplettiertem RPMI 1640 Medium	Menge
DMSO (Dimethylsulfoxid), steril	5 %

In ausgewählten Versuchen wurden THP-1 Makrophagen mit siRNA (*short interfering ribonucleic acid*) transfiziert (Kap. 2.3.2). Hierfür wurde antibiotikafreies, komplettiertes RPMI 1640 Medium verwendet, da Antibiotika im Medium die Transfektion mit siRNA stören können.

Tabelle 2-6: Antibiotikafreies, komplettiertes RPMI 1640 Medium

Zusatz zu RPMI 1640	Menge
Fötale Kälberserum, hitzeinaktiviert	10 %
L-Glutamin	2 mM

Für die Isolation von PBMCs aus Buffy-Coat Blutkonserven wurde phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) nach Dulbecco ohne Magnesium und Calciumionen verwendet, das bereits durch den Hersteller auf Endotoxinfreiheit getestet wurde. Dieses wurde für die Herstellung des Isolationspuffers mit Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) versetzt, um die Blutgerinnung zu verhindern. Hierbei wirkte EDTA als Komplexbildner für mehrwertige Ionen wie Calcium, die für die Blutgerinnungskaskade essentiell sind [159]. EDTA wurde zunächst in einem kleinen Teil PBS gelöst und anschließend wurde das gelöste EDTA mittels Sterilfiltration über einen 0,22 µm Filter der restlichen PBS-Menge zugeführt. Der Puffer wurde wie folgt hergestellt:

Tabelle 2-7: PBS mit EDTA

Zusatz zu PBS	Menge
Ethylentetraessigsäure, Natriumsalz (EDTA)	2 mM

In ausgewählten Experimenten wurden die Monozyten über magnetische Separation aus den zuvor isolierten PBMCs gewonnen. Hierfür wurde PBS mit EDTA zusätzlich mit bovinem Serumalbumin (BSA) versetzt, welches zunächst in PBS mit EDTA (Tab. 2-7) gelöst und anschließend sterilfiltriert wurde.

Tabelle 2- 8: Isolierungspuffer

Zusatz zu PBS mit EDTA	Menge
Bovines Serumalbumin (BSA)	0,5 %

Die Polarisierung von primären Monozyten zu M1- und M2-ähnlichen Makrophagen erfolgte ebenfalls mit komplettiertem RPMI 1640 Medium, dem GM-CSF und M-CSF (Monozyten-Kolonie-Stimulierender Faktor) zugesetzt wurden. Diese Zytokine können auch unter physiologischen Bedingungen von Immunzellen sezerniert werden und führen dort zur Differenzierung von Granulozyten, Dendritischen Zellen und Makrophagen [160].

Tabelle 2-9: Differenzierungsmedium für primäre M1-ähnliche Makrophagen

Zusatz zu komplettiertem RPMI 1640 Medium	Menge
GM-CSF (Granulozyten-Monozyten-Kolonie-stimulierender Faktor)	100 ng/ml

Tabelle 2-10: Differenzierungsmedium für primäre M2-ähnliche Makrophagen

Zusatz zu komplettiertem RPMI Medium	Menge
M-CSF (Makrophagen-Kolonie-Stimulierender Faktor)	50 ng/ml

Für die Kultivierung von HEK293 und HEK blue IL-1 β Zellen wurde Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) mit einem erhöhten Glukoseanteil (4,5 g/l) verwendet. Für die HEK293 Zellen wurde dieses Medium mit folgenden Zusätzen supplementiert:

Tabelle 2-11: Wachstums- und Stimulationsmedium von HEK293 Zellen

Zusatz zu DMEM (4,5 g/l Glukose)	Menge
Fötale Kälberserum, hitzeinaktiviert	10 %

HEK blue IL-1 β Zellen waren zusätzlich stabil mit dem IL-1 Rezeptor transfiziert. Somit mussten dem Wachstumsmedium verschiedene Selektionsantibiotika zugesetzt werden, sodass Zellen, die den IL-1 Rezeptor nicht mehr exprimieren, absterben und eine positive Selektion der HEK Zellen mit IL-1 Rezeptor stattfand. Folgendes Selektionsmedium wurde als Wachstumsmedium für die HEK blue IL-1 β Zellen verwendet, wobei auch hier DMEM mit hohem Glukoseanteil als Grundmedium verwendet wurde:

Tabelle 2-12: Selektionsmedium für HEK blue IL-1 β Zellen

Zusatz zu DMEM (4,5 g/l Glukose)	Menge
Fötale Kälberserum, hitzeinaktiviert	10 %
L-Glutamin	2 mM
Penicillin	50 U/ml
Streptomycin	50 μ g/ml
Normocin	100 μ g/ml
Hygromycin B Gold	200 μ g/ml
Zeocin	100 μ g/ml

Für Stimulationsversuche wurde Basalmedium verwendet, für das DMEM mit hohem Glukoseanteil wie folgt versetzt wurde:

Tabelle 2-13: Basalmedium für HEK blue IL-1 β Zellen

Zusatz zu DMEM (4,5 g/l Glukose)	Menge
Fötale Kälberserum, hitzeinaktiviert	10 %
L-Glutamin	2 mM
Penicillin	50 U/ml
Streptomycin	50 μ g/ml

Zum Einfrieren der HEK293 und der HEK blue IL-1 β Zellen wurde DMEM mit hohem Glukoseanteil mit hitzeinaktiviertem fötalem Kälberserum und DMSO versetzt.

Tabelle 2-14: Einfriermedium für HEK293 und HEK blue IL-1 β Zellen

Zusatz zu DMEM (4,5 g/l Glukose)	Menge
Fötale Kälberserum, hitzeinaktiviert	20 %
DMSO	10 %

Da die HEK blue IL-1 β Zellen sehr leicht ablösbar waren, wurden die für die Stimulationsversuche verwendeten 24- und 96-Well Platten im Vorfeld mit Polylysin-Lösung beschichtet, was eine verbesserte Zelladhäsion zur Folge hatte. Für die Polylysin-Lösung wurde Poly-L-Lysin Hydrobromid in pyrogenfreiem Wasser gelöst und in 15 ml Röhrengefäßen aliquotiert (Tab. 2-15). Die Aliquots wurden bis zur Verwendung bei 4 °C gelagert.

Tabelle 2-15 Polylysin-Lösung

Zusatz zu pyrogenfreiem Wasser	Menge
Poly-L-Lysin Hydrobromid, einsetzbar für die Zellkultur	0,1 mg/ml

Serum ist ein komplexer, nährstoffreicher Zusatz, der routinemäßig in der Zellkultur eingesetzt wird. Wie oben ersichtlich, wurde allen verwendeten Zellkulturmedien hitzeinaktiviertes fötales Kälberserum zugesetzt. Hierzu wurde die noch versiegelte aufgetaute Flasche fötales Kälberserum auf dem Wasserbad auf 56 °C erwärmt und für 30 Minuten inkubiert, wobei das Serum währenddessen zwei bis drei Mal aufgeschüttelt wurde, um eine gleichmäßige Erwärmung zu gewährleisten. Anschließend wurde das hitzeinaktivierte Serum in 50 ml Röhren aliquotiert, die Deckel der Röhren zusätzlich mit Parafilm verschlossen und bei -20 °C bis zur Benutzung weggefroren. Die Hitzeinaktivierung basierte auf der Annahme, dass so noch im Serum enthaltene Komplementfaktoren inaktiviert werden und eine dadurch ausgelöste Aktivierung der Immunzellen ausgeschlossen werden kann [161]. Dennoch ist umstritten, welchen Einfluss die Hitzeinaktivierung hat [162]. Da hitzeinaktiviertes Serum aber standardmäßig als Medienzusatz für Dendritische Zellen und HEK blue Zellen in unserem Labor angewendet wurde, wurde in dieser Arbeit ebenfalls so verfahren um eine gewisse Vergleichbarkeit zu gewährleisten [156, 157, 163-166].

2.1.3.2 Lösungen für den Mykoplasmen-Test

Der Mykoplasmen-Test ist ein in regelmäßigen Abständen durchgeführter Test zum Ausschluss einer Kontamination der Zellkulturen mit Mykoplasmen (Kap. 2.2.6). Nach erfolgreicher Amplifikation der möglicherweise in den Proben enthaltenden Mykoplasmen-DNA wurde diese mittels Gelelektrophorese aufgetrennt und anschließend analysiert. Hierfür wurde ein 5-fach konzentrierter TRIS-Borat-EDTA-(TBE-) Puffer hergestellt, der wie in Tabelle 2-16 zusammengesetzt war und bei Bedarf 1:5 verdünnt wurde. Die Lagerung des TBE-Puffers erfolgte bei Raumtemperatur.

Tabelle 2-16: 5x TBE-Puffer

Zusatz	Menge
TRIS-Base	108 g
Borsäure	55 g
0,5 M Natrium-EDTA-Lösung (pH 8,0)	40 ml
Destilliertes Wasser	1960 ml

Die im TBE-Puffer enthaltene Natrium-EDTA-Lösung wurde wie folgt hergestellt:

Tabelle 2-17: 0,5 M Natrium-EDTA-Lösung (pH 8,0)

Zusatz zu doppelt destilliertem Wasser	Menge
EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure) (Dinatriumsalz, Dihydrat)	0,5 M
Natriumhydroxid-Lösung (1 M)	nach Bedarf

Der pH-Wert wurde mit Natriumhydroxid-Lösung auf 8,0 eingestellt, wobei anzumerken ist, dass das Natrium-EDTA erst vollständig in Lösung ging, sobald der pH richtig eingestellt wurde. Die Lösung wurde anschließend autoklaviert und bei Raumtemperatur gelagert.

Für die Gelelektrophorese wurde ein 1,5 %iges Agarosegel gegossen. Hierfür wurde das Agarosegel wie in Tabelle 2-18 gezeigt hergestellt, wobei die Agarose unter ständigem Rühren mit Hilfe eines Glasstabs auf der Heizplatte erwärmt wurde, bis diese komplett gelöst und das Gel klar war. Dabei wurde darauf geachtet, dass möglichst wenig Luftblasen eingerührt wurden.

Tabelle 2-18: Agarosegel für Mykoplasmen-Test

Zusatz	Menge
Agarose	0,45 g
TBE-Puffer (1x)	30 ml
Gel-Red Nukleinsäure Farbstoff (später ersetzt durch SYBR Green Stain)	3 µl

Nach dem Erkalten wurde das Gel entweder direkt verwendet oder in feuchte Zellstofftücher eingeschlagen und bei 4 °C unter Lichtausschluss bis zur Verwendung gelagert, wobei die maximale Lagerzeit ein paar Tage nicht überschritt.

2.1.3.3 Stocklösungen für Stimulationsversuche

Für die Stimulationsversuche wurden, soweit möglich, 1000-fach konzentrierte Stocklösungen hergestellt. Die jeweiligen Lösungsmittel sind in der Tabelle 2-19 angegeben. Alle Stocklösungen wurden unter aseptischen Bedingungen hergestellt und gegebenenfalls in pyrogenfreien Reaktionsgefäßen (1,5 ml) aliquotiert. Nachdem die Stimuli vollständig gelöst vorlagen, wurden diese mittels eines 0,22 µm Filters filtriert und unter den jeweils angegebenen Lagerbedingungen gelagert.

Tabelle 2-19: Stocklösungen der Stimuli und Inhibitoren

Zusatz (mit jeweiligem Lösungsmittel)	Menge	Lagerung
Antimycin A (in Ethanol, absolut)	10 mM	-20 °C
Bafilomycin A ₁ (in sterilem DMSO)	1 mM	-20 °C
BMS-906024 (in sterilem DMSO)	10 mM	-20 °C
Chloroquin-Diphosphat (in pyrogenfreiem Wasser)	20 mM	4 °C (max. 4 Wochen)
Chlorpromazin (in pyrogenfreiem Wasser)	14 mM	frisch hergestellt
DAPT (in sterilem DMSO)	10 mM	-20 °C
DPI (in sterilem DMSO)	5 mM	-20 °C
Dynasore (in sterilem DMSO)	8 mM	-20 °C
Fluoxetin (in sterilem DMSO)	20 mM	-20 °C
GM-CSF (in pyrogenfreiem Wasser)	0,1 mg/ml	-20 °C
IFN- γ (in pyrogenfreiem Wasser)	0,1 mg/ml	-20 °C
L-685,458 (in sterilem DMSO)	5 mM	-20 °C
M-CSF (in pyrogenfreiem Wasser)	0,1 mg/ml	-20 °C
Mission siRNA Fluorescent Universal Negativ Control #1, Cyanine 3 (in sterilfiltriertem Wasser, PCR-Grad)	10 μ M	-20 °C
mitoTEMPO (in pyrogenfreiem Wasser)	10 mM	-20 °C
N-Acetyl-L-Cystein (in pyrogenfreiem Wasser)	1 M	frisch hergestellt
Pam ₂ CSK ₄ (in pyrogenfreiem Wasser)	0,1 mg/ml	-20 °C
Pam ₂ CSK ₄ (in pyrogenfreiem Wasser)	0,1 mg/ml	-20 °C
Phorbol-12-myristat-13-acetat (in sterilem DMSO)	0,1 mg/ml	-20 °C
SB202190 (in sterilem DMSO)	10 mM	-20 °C
SP600125 (in sterilem DMSO)	10 mM	-20 °C
U0126 (in sterilem DMSO)	10 mM	-20 °C

2.1.3.4 Lösungen für die Durchflusszytometrie

Die zu vermessenden Zellen wurden in FACS-Puffer aufgenommen, für dessen Herstellung bovines Serumalbumin in PBS mit EDTA (Tab. 2-7) gelöst wurde:

Tabelle 2-20: FACS-Puffer

Zusatz zu PBS mit EDTA	Menge
Bovines Serumalbumin (BSA)	0,5 %

Für den MitoSox-Test wurde ein spezieller MitoSox FACS-Puffer verwendet. Hierfür wurde bovines Serumalbumin in PBS gelöst und anschließend steril filtriert.

Tabelle 2-21: MitoSox FACS-Puffer

Zusatz zu PBS	Menge
Bovines Serumalbumin (BSA)	1 %

2.1.3.5 Lösungen für Zellviabilitäts-Tests

Für die Trypan Blau Färbung wurde Trypan Blau in PBS gelöst und anschließend steril filtriert. Die Lösung wurde in 1,5 ml Reaktionsgefäße aliquotiert und bis zur Verwendung bei Raumtemperatur gelagert.

Tabelle 2-22: Trypan Blau Lösung, 0,4 %

Zusatz zu PBS	Menge
Trypan Blau	0,4 %

Für den Annexin-V FITC/ Propidiumiodid-Test wurde ein Annexin-V Bindungspuffer hergestellt, da Calcium für die Bindung von Annexin-V an das Target Phosphatidylserin benötigt wird und somit der standardmäßig verwendete FACS-Puffer nicht angewendet werden konnte. Der Puffer wurde wie in Tabelle 2-23 beschrieben hergestellt, der pH-Wert auf 7,4 eingestellt, die Lösung sterilfiltriert und bis zur Anwendung im Kühlschrank unter Lichtausschluss gelagert.

Tabelle 2-23: Annexin-V Bindungspuffer

Zusatz zu doppelt demineralisiertem Wasser	Menge
HEPES (2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure)	10 mM
Natriumchlorid	140 mM
Calciumchlorid	2,5 mM
Natriumhydroxid-Lösung (1 M)	nach Bedarf

Für den MTT-Test wurde das 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) unter Lichtausschluss unter der Sterilwerkbank wie in Tabelle 2-24 beschrieben in PBS gelöst und sterilfiltriert. Die Lösung wurde in 1,5 ml Reaktionsgefäße aliquotiert und bei -20 °C bis zur Benutzung eingefroren. Dabei wurden die Reaktionsgefäße in Alufolie eingeschlagen, um den Kontakt mit Licht zu vermeiden. Da MTT giftig ist, wurden alle Plastikwaren und Lösungen, die damit in Berührung kamen, gesondert entsorgt.

Tabelle 2-24: MTT-Lösung

Zusatz zu PBS	Menge
3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT)	5 mg/ml

Für den LDH-(L-Lactatdehydrogenase-) Test wurde ein Kit der Firma Thermo Fisher verwendet und der LDH-Reaktionsmix nach Gebrauchsanweisung hergestellt. Hierfür wurde ein Gefäß des lyophilisierte Substrats aufgetaut und mit 11,4 ml doppelt demineralisiertem Wasser gemischt. Die Mischung wurde dann wie in Tabelle 2-25 beschrieben, in einem 15 ml Röhrchen mit dem Test-Puffer gemischt und direkt verwendet oder bei -20 °C unter Lichtausschluss weggefroren. Die Mischung konnte so bis zu 3 Mal aufgetaut und wiederverwendet werden.

Tabelle 2-25: LDH-Reaktionsmix

Reagenz	Menge
Rekonstituierter Substrat Mix	11,4 ml
Test-Puffer	0,6 ml

2.1.3.6 Lösungen für die ELISA-Analytik

Bei der ELISA-(*Enzyme-linked Immunosorbent Assay*-)Analytik wird die Konzentration eines bestimmten Antigens mittels eines antikörperbasierten Tests quantifiziert. Hierfür wurde eine Verdünnungsreihe mit dem jeweiligen Standard hergestellt, wobei 1:1 mit Blockierungspuffer verdünnt wurde und so insgesamt 8 Standardkonzentrationen inklusive eines Blindwerts hergestellt wurden (Tab. 2-26).

Tabelle 2-26: Standardreihen für die ELISA-Analytik

Standard	CXCL8	IL-6	IL-10	IL-1Ra	TNF
A	250 pg/ml	200 pg/ml	300 pg/ml	2500 pg/ml	500 pg/ml
B	125 pg/ml	100 pg/ml	150 pg/ml	1250 pg/ml	250 pg/ml
C	62,5 pg/ml	50 pg/ml	75 pg/ml	625 pg/ml	125 pg/ml
D	31,25 pg/ml	25 pg/ml	37,5 pg/ml	312,5 pg/ml	62,5 pg/ml
E	15,625 pg/ml	12,5 pg/ml	18,75 pg/ml	156,25 pg/ml	31,25 pg/ml
F	7,8125 pg/ml	6,25 pg/ml	9,375 pg/ml	78,125 pg/ml	15,625 pg/ml
G	3,90625 pg/ml	3,125 pg/ml	4,6875 pg/ml	39,0625 pg/ml	7,8125 pg/ml
H	0 pg/ml	0 pg/ml	0 pg/ml	0 pg/ml	0 pg/ml

Zwischen den einzelnen Schritten wurde die Platte mit ELISA-Waschpuffer gewaschen, für den zunächst unsteriles PBS hergestellt wurde. Hierfür wurden die in Tabelle 2-27 gezeigten Komponenten in 5 l demineralisiertem Wasser in einem Messkolben gelöst und der pH-Wert zwischen 7,2 und 7,4 eingestellt.

Tabelle 2-27: PBS für ELISA

Zusatz zu demineralisiertem Wasser	Menge
Natriumchlorid	137 mM
Kaliumchlorid	2,7 mM
Dinatriumhydrogenphosphat	8,1 mM
Kaliumdihydrogenphosphat	1,5 mM

Für den ELISA-Waschpuffer wurde TWEEN-20 in PBS für ELISA in 500 ml Flaschen gelöst und bis zur Verwendung kühl gelagert.

Tabelle 2-28: ELISA-Waschpuffer

Zusatz zu PBS für ELISA	Menge
TWEEN 20	0,05 %

Die enzymatische Reaktion des ELISA wurde kurz vor der Messung mit saurer ELISA-Stopp-Lösung beendet. Hierfür wurde eine verdünnte Salzsäure-Lösung hergestellt.

Tabelle 2-29: ELISA-Stopp-Lösung

Zusatz zu doppelt demineralisiertem Wasser	Menge
Salzsäure, konzentriert	1 N

Für die ELISA Test-Kits der Firma Invivogen (Thermo Fisher) waren bis auf den ELISA-Waschpuffer und die ELISA-Stopp-Lösung sämtliche benötigte Reagenzien im Kit selbst enthalten. Für die Test-Kits der Firma Bio-Techne (DuoSet) wurden die benötigten Lösungen selbst hergestellt. Für den Verdünnungs-/Blockierungs-Puffer wurde bovines Serumalbumin in PBS gelöst und sterilfiltriert (Tab. 2-30). Anschließend wurde der Verdünnungs-/Blockierungs-Puffer in 50 ml Röhren aliquotiert und bei 4 °C bis zur Verwendung gelagert.

Tabelle 2-30: Verdünnungs-/ Blockierungs-Puffer

Zusatz zu PBS	Menge
Bovines Serumalbumin (BSA)	1 %

Die lyophilisierten Reagenzien wurden wie auf dem jeweiligen Analysenzertifikat beschrieben, rekonstituiert, wobei der *Capture*-Antikörper in PBS und alle anderen Reagenzien in Verdünnungs-/Blockierungs-Puffer (Tab. 2-30) gelöst wurden. Die rekonstituierten Reagenzien wurden aliquotiert und bei -20 °C bis zur Benutzung weggefroren.

Für die Substratlösung wurde zunächst ein Citrat-Puffer (Tab. 2-31) hergestellt. Hierfür wurden alle Bestandteile in 475 ml doppelt demineralisiertem Wasser gelöst und der pH-Wert mit Kaliumhydroxid-Lösung auf 3,95 eingestellt. Die Lösung wurde sterilfiltriert, aliquotiert und bei 4 °C bis zur Verwendung gelagert.

Tabelle 2-31: Citrat-Puffer pH 3,95

Zusatz zu doppelt demineralisiertem Wasser	Menge
Zitronensäure Monohydrat	40 mM
Kaliumhydroxid-Lösung, 1 M	Nach Bedarf

Für die TMB-Stocklösung wurde Tetramethylbenzidin in DMSO und absolutem Ethanol in einem lichtundurchlässigen 1,5 ml Reaktionsgefäß gelöst (Tab. 2-32). Die Lösung wurde bei 4 °C unter Lichtausschluss gelagert und konnte bis zu 4 Wochen verwendet werden.

Tabelle 2-32: TMB-Stocklösung

Zusatz	Menge
Tetramethylbenzidin (TMB)	20 mg
Dimethylsulfoxid (DMSO)	500 µl
Ethanol, absolut	500 µl

Die TMB-Substrat-Lösung wurde jeweils frisch am Versuchstag hergestellt. Die in Tabelle 2-33 angegebenen Mengen reichten für eine ELISA-Platte (96-Well):

Tabelle 2-33: TMB-Substrat-Lösung

Zusatz	Menge
Citrat-Puffer pH 3,95	11 ml
TMB-Stocklösung	110 µl
Wasserstoffperoxid-Lösung, 30 %	3,3 µl

2.1.3.7 Lösungen für die PCR-Analytik

Enzyme wie DNasen und RNasen können in der PCR-Analytik stören, da diese das Ausgangs- und Zwischenmaterial zerstören. Somit wurde nur Verbrauchsmaterial verwendet, dass auf DNase und RNase-Freiheit getestet wurde oder benötigte Glasware wurde mit Hilfe von DEPC-Wasser DNase und RNase-frei gemacht. DEPC ist Diethylpyrocarbonat, das Histidinreste in Proteinen zu N-Carboxyhistidin umwandelt. DNasen und RNasen werden dadurch unschädlich gemacht. Auf Grund dieser Eigenschaft ist DEPC sehr giftig. Glasware wurde somit mit der in Tabelle 2-34 gezeigten Lösung behandelt und im Anschluss autoklaviert, wobei das DEPC zu Kohlenstoffdioxid und Wasser zerfiel und so ungiftig gemacht wurde. Das autoklavierte DEPC-Wasser wurde auch für die Herstellung aller Lösungen genutzt, die bei der PCR zum Einsatz kamen.

Tabelle 2-34: DEPC-Wasser

Zusatz zu doppelt demineralisiertem Wasser	Menge
DEPC (Diethylpyrocarbonat)	0,1 %

Für die RNA-Isolation wurde eine 70 %ige Ethanol-Lösung (m/m) benötigt. Für diese wurde entweder das selbst hergestellte oder das gekaufte DEPC-Wasser verwendet.

Tabelle 2-35: 70% Ethanol in DEPC-Wasser für die RNA-Isolation

Zusatz zu DEPC-Wasser	Menge
Ethanol, absolut	70 % (m/m)

2.1.3.8 Lösungen für die Western Blot Analytik

Für die Probenvorbereitung mussten die Zellen zunächst lysiert werden. Hierfür wurde RIPA- (*radioimmunoprecipitation assay*-)Puffer benötigt, der kurz vor der Verwendung frisch aus dem RIPA-Basalpuffer und dem Protease-/Phosphataseinhibitor hergestellt wurde.

Tabelle 2-36: RIPA-Puffer

Zusatz	Menge je Probe
RIPA-Basalpuffer	99 µl
Protease/ Phosphatase Inhibitor Cocktail (100x)	1 µl

Für den RIPA-Basalpuffer wurde dieser, wie in Tabelle 2-37 beschrieben, hergestellt und bei 4 °C gelagert.

Tabelle 2-37: RIPA-Basalpuffer

Zusatz	Menge
TRIS-HCl-Lösung (1 M, pH 7,4)	2,5 ml
IGEPAL CA-630	0,5 ml
Natriumdesoxycholat (10 %)	1,25 ml
Natriumchlorid-Lösung (5 M)	1,5 ml
EDTA-Lösung (50 mM)	1 ml
Doppelt demineralisiertes Wasser	42,75 ml

Die für den RIPA-Basalpuffer benötigten Ausgangslösungen wurden wie folgt in 50 ml Röhren hergestellt und bei 4 °C aufbewahrt.

Tabelle 2-38: TRIS-HCl-Lösung (1 M, pH 7,4)

Zusatz	Menge
TRIS-HCl	6,005 g
Doppelt demineralisiertes Wasser	50 ml
Natriumhydroxid-Lösung 1 M	Nach Bedarf

Tabelle 2-39: Natriumdeoxycholat-Lösung (10 %)

Zusatz	Menge
Natriumdeoxycholat	5 g
Doppelt demineralisiertes Wasser	50 ml

Tabelle 2-40: Natriumchlorid-Lösung (5 M)

Zusatz	Menge
Natriumchlorid	14,61 g
Doppelt demineralisiertes Wasser	50 ml

Tabelle 2-41: EDTA-Lösung (50 mM)

Zusatz	Menge
EDTA (Dinatriumsalz, Dihydrat)	930,6 g
Doppelt demineralisiertes Wasser	50 ml

Für den 3-fach konzentrierten Ladepuffer wurden die in Tabelle 2-42 aufgeführten Zusätze in demineralisiertem Wasser gemischt und der pH-Wert auf 6,8 eingestellt. Die Lösung wurde in 1,5 ml Reaktionsgefäße aliquotiert und bei Raumtemperatur bis zur Verwendung gelagert.

Tabelle 2-42: Ladepuffer (3x), pH 6,8

Zusatz	Menge
TRIS-HCl	187,5 mM
SDS (Natriumdodecylsulfat)	6 % (m/v)
Glycerol	30 % (m/v)
Bromphenol Blau, Natriumsalz	0,03 % (m/v)
Natriumhydroxid-Lösung	Nach Bedarf

DTT (DL-Dithiothreitol) spaltet als Reduktionsmittel die Disulfidbrücken der Proteine und wurde somit dem Ladepuffer zugesetzt, um die Proteine zu denaturieren. Hierfür wurde eine 30-fach konzentrierte DTT-Lösung hergestellt und in 50 µl Aliquotes bei -20 °C weggefroren.

Tabelle 2-43: DTT-Lösung (30x)

Zusatz zu demineralisiertem Wasser	Menge
DTT (DL-Dithiothreitol)	1,25 M

Die benötigte Menge DTT/Ladepuffer-Mix wurde wie in Tabelle 2-44 frisch hergestellt.

Tabelle 2-44: DTT/Ladepuffer-Mix

Zusatz	Menge
Ladepuffer (3x)	1 Teil
DTT-Lösung (30x)	9 Teile

Für die Proteinbestimmung mittels BCA (Bicinchoninsäure) Komplexierung wurde für die Standardgerade eine Verdünnungsreihe mit der im Test-Kit (Pierce BCA Protein Assay Kit) enthaltenen bovinem Serumalbumin (BSA)-Stocklösung (2000 µg/ml) hergestellt. Diese wurde hierfür wie in Tabelle 2-45 beschrieben mit RIPA-Basalpuffer verdünnt. Die Standards wurden in 1,5 ml Reaktionsgefäßen bei Raumtemperatur aufbewahrt und konnten so mehrfach verwendet werden.

Tabelle 2-45: Standardreihe für BCA-Test

Standard	Volumen des RIPA-Basalpuffers (µl)	Volumen und Quelle des BSA (µl)	Endkonzentration (µg/ml)
A	0	300 der Stocklösung	2000
B	125	375 der Stocklösung	1500
C	325	325 der Stocklösung	1000
D	175	175 des Standard B	750
E	325	325 des Standard C	500
F	325	325 des Standard E	250
G	325	325 des Standard F	125
H	400	100 des Standard G	25
I	400	0	0 (Blindwert)

Für die Gelelektrophorese wurden die Gele zunächst mit Hilfe der Mini Protean Tetra Cell Einheit der Firma Bio-Rad gegossen. Hierfür wurden die Glasplatten in die Halterungen eingespannt und so in die Gießvorrichtung geklemmt. Es wurde ca. 1 ml demineralisiertes Wasser in die Halterungen gefüllt, um die Dichtigkeit des Systems zu überprüfen. Das Wasser wurde anschließend wieder entfernt und die Lösungen für die Gele vorbereitet. Die Puffer sowie Lösungen für die Gele wurden wie in Tabelle 2-46 bis 2-51 beschrieben hergestellt. Dabei wurde für die Gele der Polymerisierungskatalysator TEMED (*N,N,N',N'*-Tetramethylethylendiamin) sowie der Radikalstarter APS (Ammoniumperoxidsulfat) erst kurz vor dem eigentlichen Gießen hinzugegeben. Zunächst wurden 5 ml des Laufgels pro Gel mit Hilfe einer serologischen Pipette zwischen die Glasplatten gegeben. Dabei wurde darauf geachtet, dass keine

Luftblasen entstanden. Die obere Kante des Laufgels wurde mit 1 ml Isopropanol beschichtet, um so das Gel vor dem Austrocknen zu schützen. Das Gel wurde für ca. 45 Minuten stehen gelassen, bis das Acrylamid vollständig auspolymerisiert war. Anschließend wurde das Isopropanol vorsichtig durch Ausgießen und mit Hilfe eines Zellstoffblattes entfernt und das Sammelgel auf das Laufgel gegossen, sodass die Glasplatten komplett gefüllt waren. Der Kamm wurde vorsichtig gerade von oben zwischen die Glasplatten gedrückt und das Gel erneut für ca. 30 Minuten stehen gelassen, bis es vollständig polymerisiert war. Das Gel konnte so direkt verwendet werden oder wurde in nasse Zellstofftücher eingewickelt und unter feuchter Atmosphäre für maximal eine Woche im Kühlschrank bis zur Verwendung gelagert.

Tabelle 2-46: Laufgel-Puffer pH 8,8

Zusatz	Menge
TRIS-Base	56,2 g
Demineralisiertes Wasser	250 ml

Tabelle 2-47: Sammelgel-Puffer pH 6,8

Zusatz	Menge
TRIS-HCl	15 g
Demineralisiertes Wasser	250 ml

Tabelle 2-48: SDS-Lösung 10 %

Zusatz zu doppelt demineralisiertem Wasser	Menge
SDS	10 % (m/V)

Der Radikalstarter APS wurde in demineralisiertem Wasser in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß unter Lichtausschluss gelöst und bei -20 °C weggefroren. Die Lösung konnte maximal 3x wieder aufgetaut und verwendet werden und musste dabei vor Licht geschützt werden.

Tabelle 2-49: APS-Lösung 10 %

Zusatz	Menge
APS (Ammoniumpersulfat)	50 mg
Demineralisiertes Wasser	500 µl

Tabelle 2-50: Laufgel (10 % Polyacrylamid-Gel)

Zusatz	Menge pro Gel
Demineralisiertes Wasser	2,05 ml
Rotiphorese Gel 40	1,65 ml
Laufgel-Puffer pH 8,8	1,25 ml
SDS-Lösung 10 %	0,05 ml
TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine)	2,5 µl
APS-Lösung 10 %	25 µl

Tabelle 2-51: Sammelgel (4 % Polyacrylamid-Gel)

Zusatz	Menge pro Gel
Demineralisiertes Wasser	3,05 ml
Rotiphorese Gel 40	0,65 ml
Sammelgel-Puffer pH 6,8	1,25 ml
SDS-Lösung 10 %	0,05 ml
TEMED (<i>N,N,N',N'</i> -Tetramethylethylenediamine)	5 µl
APS-Lösung 10 %	25 µl

Der Laufpuffer für die Elektrophorese wurde als 10-fach konzentrierte Stammlösung hergestellt und bei Bedarf 1:10 mit demineralisiertem Wasser verdünnt, wobei der pH-Wert nochmal überprüft wurde. Dieser sollte bei 8,3-8,6 liegen und wurde bei Bedarf nachjustiert. Der Puffer wurde bis zur Verwendung bei 4 °C gelagert.

Tabelle 2-52: Laufpuffer für die Elektrophorese (10x)

Zusatz	Menge
TRIS-Base	30,2 g
Glycin	144 g
SDS	10 g
Demineralisiertes Wasser	1000 ml

Der Transfer-Puffer wurde als 10-fach konzentrierte Lösung hergestellt und bei Bedarf 1:10 mit demineralisiertem Wasser verdünnt. Außerdem wurde der pH-Wert kontrolliert und wenn nötig mit verdünnter Natriumhydroxid-Lösung oder Salzsäure auf 8,3 eingestellt.

Tabelle 2-53: Transfer-Puffer (10x)

Zusatz	Menge
Glycin	144 g
TRIS-Base	30 g
Demineralisiertes Wasser	1000 ml

Der TBS-Puffer (Tris-gepufferte Kochsalzlösung) wurde 10-fach konzentriert als Ausgangslösung für den TBS-T-Puffer hergestellt. Der TBS-Puffer (Tab. 2-54) wurde 1:10 mit demineralisiertem Wasser verdünnt und das Detergens TWEEN-20 hinzugefügt. Außerdem wurde der pH-Wert mit 1 M Natriumhydroxid-Lösung auf 7,9-8,1 eingestellt. Der TBS-T-Puffer wurde zum Waschen der Membranen benutzt. Außerdem stellte dieser die Ausgangslösung für den Blockierungs-Puffer und die Antikörper-Lösungen dar.

Tabelle 2-54: TBS-Puffer (10x)

Zusatz	Menge
Zusatz	Menge
TRIS HCl	12,144 g
Natriumchlorid	87,66 g
Demineralisiertes Wasser	1000 ml

Tabelle 2-55: TBS-T-Puffer, pH 8,0

Zusatz	Menge
TBS-Puffer	100 ml
TWEEN-20	1 ml
Demineralisiertes Wasser	899 ml
Natriumhydroxid-Lösung 1 M	Nach Bedarf

Der Blockierungs-Puffer wurde frisch hergestellt, wobei Magermilchpulver in TBS-T-Puffer gelöst wurde.

Tabelle 2-56: Blockierungs-Puffer für den Western Blot

Zusatz zu TBS-T, pH 8,0	Menge
Magermilchpulver	5 %

Die Primär- und Sekundär-Antikörper wurden frisch hergestellt, wobei die Antikörper mit dem Blockierungs-Puffer (Tab. 2-56) verdünnt wurden. Nach jeder Inkubation der Membran wurde die Antikörper-Lösung aufgefangen und bei 4 °C für die kurzzeitige Lagerung (ca. 2 Wochen) oder bei -20 °C für die Langzeitlagerung aufgehoben. Die Antikörper-Lösungen konnten so insgesamt 3 Mal wiederverwendet werden.

Tabelle 2-57: Auflistung der benutzten Antikörper für den Western Blot und die zugehörige Verdünnung

Antikörper	Verdünnung	Inkubationsbedingungen
LC3B Antikörper aus dem Kaninchen	1:1000	4 °C, über Nacht
SQSTM1/ p62 Antikörper aus dem Kaninchen	1:1000	4 °C, über Nacht
β-Aktin Antikörper aus dem Kaninchen	1:2000	4 °C, über Nacht
Anti-Kaninchen Antikörper, HRP-konjugiert	1:2000	Raumtemperatur, 1 h

2.1.3.9 Lösungen für die ESR-Spektroskopie

Für die ESR-(Elektronen-Spin-Resonanz-)Spektroskopie wurden die Zellen in einer Glukose-PBS-Lösung vermessen. Hierfür wurde Glukose in PBS wie folgt gelöst:

Tabelle 2-58: Glukose-PBS-Lösung

Zusatz zu PBS	Menge
D-(+)-Glukose	1 mg/ml

Für den Spinmarker wurde 2,2,6,6,-Tetramethyl-1-piperidinyloxy (TEMPO) verwendet. Die Lösung wurde am Versuchstag frisch hergestellt und im Kühlschrank unter Lichtausschluss gelagert. Für die Stocklösung wurde TEMPO in PBS gelöst und für 5 Minuten auf ein Ultraschallbad gestellt.

Tabelle 2-59: TEMPO-Stocklösung

Zusatz zu PBS	Menge
TEMPO (2,2,6,6,-Tetramethyl-1-piperidinyloxy)	1 mM

Kurz vor der eigentlichen Messung wurde die TEMPO-Stocklösung in PBS auf 100 μ M herunter verdünnt und konnte so direkt für die Versuche verwendet werden.

Tabelle 2-60: TEMPO-Lösung, 100 μ M

Zusatz	Menge
TEMPO-Stocklösung	100 μ l
PBS	900 μ l

2.1.3.10 Lösungen für den SEAP-Reporter-Test

Beim SEAP-Reporter-Test wurde ein Substrat durch das Enzym SEAP (sezernierende Alkaliphosphatase) umgesetzt, wodurch es zu einem Farbumschlag von violett nach blau kam, der kolorimetrisch vermessen werden konnte. Hierfür wurde die Substratlösung QUANTI-blue hergestellt, indem entweder der Beutelinhalt des Substrates in Pulverform in 100 ml steril filtriertem Wasser gelöst wurde, 20 Minuten bei 37 °C auf dem Wasserbad erwärmt wurde und danach unter Lichtausschluss für bis zu 4 Wochen bei 4 °C bis zur Benutzung gelagert werden konnte. Auf der anderen Seite wurde auch das QUANTI-blue in flüssiger Form erworben, wobei in diesem Fall jeweils der Inhalt eines Gefäßes (1 ml) des QUANTI-Blue Reagenz mit dem Inhalt eines Gefäßes des QUANTI-Blue Puffers (1 ml) in 98 ml steril filtriertem Wasser gemischt wurde. Diese Lösung wurde ebenfalls bis zur Verwendung bei 4 °C gelagert und konnte so bis zu 4 Wochen benutzt werden.

2.1.4 Software

Tabelle 2-61: Auflistung der eingesetzten Software-Programme

Programm	Anbieter/ Herausgeber	Anwendung
BioRender	BioRender, Toronto, Ontario, Kanada	Erstellung von Abbildungen
BZ Observation Application und Analysis Application	Keyence GmbH, Neu-Isenburg	Auswertung der fluoreszenzmikroskopischen Bilder
CytExpert Software	Beckman Coulter, Brea, Kalifornien, Vereinigte Staaten	Auswertungen der durchflusszytometrischen Analysen
ESRStudio 1.53.5	Freiberg Instruments GmbH, Freiberg	Auswertungen der ESR Messungen
FlowJo 10.6.1	BD Bioscience, San Jose, CA, Vereinigte Staaten	Auswertungen der durchflusszytometrischen Analysen
GraphPad Prism 8	GraphPad Software, San Diego, Kalifornien, Vereinigte Staaten	allgemeine Auswertung, Statistik, Erstellung von Diagrammen
ImageJ 1.52a	Wayne Rasband (National Institutes of Health and the Laboratory for Optical and Computational Instrumentation, University of Wisconsin)	Densiometrische Analyse der Western Blot Banden
Inkscape 0.92	Inkscape Community	Bearbeitung von Diagrammen, Fotos und Abbildungen
LightCycler 480 1.5.0	QIAGEN GmbH, Hilden	Auswertungen der qPCR Analyse mit dem qPCR System LightCycler 480
Microsoft Excel 2016/ 2019	Microsoft Corporation, Redmond, Washington, Vereinigte Staaten	allgemeine Auswertung
MikroWin Lite 2010	Labsis Laborsysteme GmbH, Neunkirchen-Seelscheid	Auswertungen der Messungen mit dem Mikroplatten-Leser Mitras ² LB 943
Optima 2.20R2	BMG Labtech GmbH, Offenburg	Auswertungen der Messungen mit dem Mikroplatten-Leser FLUOstar Optima
qPCRsoft 4.0	Analytik Jena AG, Jena	Auswertungen der qPCR Analyse mit dem qPCR System qTOWER ³ G touch

2.2 Zellkultur

Die Zellkultur bildet als Methode den Grundstein für die vorliegende Arbeit. Alle Experimente mit lebenden Zellen wurden unter aseptischen Bedingungen unter einer sterilen Sicherheitswerkbank durchgeführt. Außerdem wurden bei allen verwendeten Einwegartikeln, die in Berührung mit lebenden

Zellen gekommen sind, darauf geachtet, dass diese nicht nur steril, sondern möglichst auch pyrogenfrei waren. Die Kultivierung und Inkubation aller eingesetzten Zellen erfolgten in einem Brutschrank bei 37 °C, 95 % Luftfeuchtigkeit und 5 % CO₂-Zufuhr, soweit dies nicht anders beschrieben wird. Die verwendeten Zellkulturmedien, Zusätze und Puffer wurden, soweit nicht anders angegeben und mit Ausnahme der Gefriermedien, im Wasserbad bei 37 °C temperiert, bevor diese zum Einsatz kamen. Während die eingesetzten Zelllinien (THP-1 Zellen, HEK293 Zellen und HEK blue IL-1 β Zellen) bei Bedarf aufgetaut wurden und anschließend, in Abhängigkeit von der Passage, wieder eingefroren wurden, wurden für die Experimente mit primären Makrophagen die monozytären Vorläuferzellen frisch isoliert, die Zellen ausdifferenziert und direkt für das jeweilige Experiment verwendet.

2.2.1 Beschichtung der Zellkulturplatten mit Polylysin

Für bestimmte Experimente wurden die für die Stimulation verwendeten Zellkulturplatten mit Polylysin-Lösung (Tab. 2-15) beschichtet. Die zusätzliche Beschichtung mit Polylysin sorgte dafür, dass die unter Normalbedingungen leicht ablösbare Zellen wie z. B. HEK293 Zellen, stärker adhäreren und beim Mediumwechsel nicht abgelöst und anschließend abgesaugt wurden. Hierfür wurde zunächst die Polylysin-Lösung unter aseptischen Bedingungen in die benötigten Wells pipettiert, die Platte verschlossen und auf einen Schüttler gestellt. Nach 5 Minuten wurde die Polylysin-Lösung abgesaugt und die Platte mit pyrogenfreiem Wasser gewaschen. Anschließend wurden die Platten mit geöffnetem Deckel für mindestens 2 Stunden unter der laufenden Sterilwerkbank stehen gelassen, sodass diese komplett trocken waren. Die Platten wurden wieder verschlossen und bis zur Benutzung im Kühlschrank aufbewahrt. Die verwendeten Volumina für die Beschichtung der Platten sind der Tabelle 2-62 zu entnehmen.

Tabelle 2-62: Verwendete Volumina für die Beschichtung von Zellkulturplatten mit Polylysin-Lösung

Plattenart	Volumen der Polylysin-Lösung in μ l	Volumen des pyrogenfreien Wassers in μ l
24-Well	100	500
96-Well	42	100

2.2.2 THP-1 Monozyten und THP-1 Makrophagen

THP-1 Zellen sind eine humane, monozytäre Zelllinie, die ursprünglich aus dem Blut eines einjährigen, männlichen Patienten gewonnen wurde, der an einer akuten, monozytären Leukämie litt [167]. Die Zelllinie wurde bei der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) GmbH erworben und für Experimente wurden die Passagen von 2 bis 25 verwendet. Die runden THP-1 Zellen, die als Suspensionszellen vorlagen, werden im weiteren Verlauf dieser Arbeit als THP-1 Monozyten

bezeichnet, um diese von den aus THP-1 Zellen differenzierten, adhärenen, makrophagenähnlichen Zellen zu unterscheiden, die in dieser Arbeit als THP-1 Makrophagen bezeichnet werden.

2.2.2.1 Kultivierung, Einfrieren und Auftauen von THP-1 Monozyten

Für die Kultivierung der THP-1 Monozyten wurde das komplettierte RPMI 1640 Medium verwendet (Tab. 2-3). Die Suspensionszellen wurden bei einer Zellzahl zwischen 0,5 bis 1 Millionen Zellen pro Milliliter gehalten und alle 3 bis 4 Tage passagiert. Hierfür wurde die Zellzahl mittels Neubauerzählkammer bestimmt und die jeweils benötigte Zellmenge in ein neues 50 ml Röhrengefäß überführt, für 5 Minuten bei 200 g bei Raumtemperatur zentrifugiert und das alte Medium abgesaugt. Das Zellpellet wurde im frischem komplettiertem RPMI 1640 Medium resuspendiert, sodass eine Zellkonzentration von 0,1 Millionen Zellen pro Milliliter erhalten wurde. Zum Einfrieren wurden jeweils 3 bis 4 Millionen Zellen in 1,8 beziehungsweise 1 ml Gefriermedium (Tab. 2-5) aufgenommen und in ein Kryoröhrchen überführt. Die Röhrchen wurden beschriftet und anschließend in ein spezielles Einfriergefäß für Zellen überführt, die zuvor mit 100 %igen Isopropanol gefüllt wurde. Die Zellen wurden mit der Box für mindestens 24 Stunden bei -80 °C gelagert, bevor sie in den Zelltank, gefüllt mit flüssigem Stickstoff, für die Langzeitlagerung überführt wurden. Dabei verhinderte das im Gefriermedium enthaltene DMSO die Kristallbildung an den Zellen. Außerdem sorgte das Isopropanol in den Einfriergefäßen dafür, dass die Zellen schonend eingefroren wurden, indem die Zellen pro Minute um ein Grad Celsius heruntergekühlt wurden. Die Einfriergefäße konnten so vier weitere Male verwendet werden, bevor das Isopropanol gewechselt werden musste. Zum Auftauen wurden die Zellen zügig auf dem Wasserbad bei 37 °C aufgetaut und in frisches komplettiertes RPMI 1640 Medium überführt. Nach der Zentrifugation wurde das alte Medium abgesaugt und das Zellpellet in frischem komplettiertem RPMI 1640 Medium resuspendiert. Dabei wurden 3 bis 4 Millionen Zellen in eine T75 Zellkulturflasche in 25 ml Medium überführt und wie oben beschrieben nach 3-4 Tagen passagiert. Nach dem Auftauen wurden die Zellen jeweils 2 Mal passagiert, bevor diese weiterverwendet wurden.

2.2.2.2 Differenzierung von THP-1 Monozyten zu THP-1 Makrophagen

Für die Differenzierung der THP-1 Monozyten zu THP-1 Makrophagen wurde die benötigte Zellmenge nach der Zentrifugation in frischem Differenzierungsmedium (Tab. 2-4) aufgenommen, sodass eine Zellkonzentration von 0,4 Millionen Zellen pro Milliliter erhalten wurde. Die Zellen wurden dann anschließend in 6-, 24- oder 96-Well Platten eingesät, wobei darauf geachtet wurde, dass die Zellen sich gleichmäßig verteilten. Nach 48 Stunden Inkubationszeit im Brutschrank wurden die nun adhärenen Zellen mit warmem PBS gewaschen und mit frischem, PMA-freiem komplettiertem RPMI 1640 Medium versetzt und für mindestens 24 Stunden inkubiert, bevor diese für weitere Experimente verwendet wurden.

Tabelle 2-63: Verwendete Volumina der Zellsuspension zum Einsäen von THP-1 Zellen

Plattenart	Volumen der Zellsuspension in ml
6-Well Platte	2
24-Well Platte	1
96-Well Platte	0,1

2.2.3 Primäre Makrophagen und Monozyten aus Humanblut

Als Grundlage für die Isolierung von primären Monozyten und die anschließende Differenzierung und Polarisierung zu primären Makrophagen, diente Buffycoat-Blut, welches von anonymen Spender*innen vom Deutschen Roten Kreuz Nord-Ost bezogen wurde. Dabei wurde den Spender*innen venöses Blut entnommen, das in einem weiteren Schritt mittels Zentrifugation weiter aufgetrennt wurde, sodass schließlich das plasma- und erythrozytenarme Buffycoat-Blut erhalten wurde. Dieses enthielt vor allem PBMCs, zu denen die Monozyten und Lymphozyten zählen, sowie einen geringen Restanteil an Plasma, Thrombozyten, Granulozyten sowie Erythrozyten.

2.2.3.1 Isolation von peripheren, mononukleären Blutzellen aus Buffycoat-Blut

PBMCs wurden mittels Dichtezentrifugation abgetrennt. Hierfür wurde zunächst das Buffycoat-Blut mit PBS mit EDTA (Tab. 2-7) bei Raumtemperatur in etwa einem Verhältnis von 1:3 verdünnt, bis eine erdbeerähnliche Farbe entstand. Ungefähr 35 ml verdünntes Buffycoat-Blut wurde langsam auf 15 ml Separationsmedium bei Raumtemperatur überschichtet, welches zuvor in einem 50 ml Röhrchen vorgelegt wurde. Dabei wurde darauf geachtet, dass sich die beiden Phasen bei der Überschichtung nicht mischten. Anschließend wurde das überschichtete Buffycoat-Blut für 45 Minuten bei 400 g bei Raumtemperatur ohne Bremse zentrifugiert. Nach der Zentrifugation bildeten sich die in Abbildung 2-1 gezeigten Grenzschichten aus.

Ein Großteil der Plasmaschicht wurde vorsichtig abgesaugt, anschließend wurde mit einer 1000 µl Eppendorfpipette vorsichtig die PBMC Schicht abgenommen, in ein frisches 50 ml Röhrchen überführt und auf 50 ml mit PBS mit EDTA (Raumtemperatur) aufgefüllt. Nach der Zentrifugation für 10 Minuten bei 300 g bei Raumtemperatur, wurde bis zum unteren Ring des Röhrchens abgesaugt und das Zellpellet in kaltem PBS mit EDTA aufgenommen und bis auf 50 ml aufgefüllt. Die Zellen wurden für 15 Minuten bei 200 g bei 4 °C zentrifugiert und der Überstand vorsichtig abgesaugt. Dieser Waschschrift wurde insgesamt 3 Mal wiederholt. Vor dem letzten Waschschrift wurden 10 µl Zellsuspension entnommen und mit 10 µl PBS mit EDTA verdünnt und diese Verdünnung für die Zellzählung mittels Neubauerzählkammer entnommen. Für die Isolation der Monozyten aus den gewaschenen PBMCs wurden zwei unterschiedliche Methoden verwendet, wobei zum einen die Monozyten auf Grund des Oberflächenmarkers CD14 [168] mit magnetischen Mikrokügelchen (Microbeads) entfernt wurden, zum anderen wurden die Monozyten auf Grund ihrer adhärierenden Eigenschaften an Plastik von den

schwimmenden Lymphozyten und restlichen Zellbestandteilen abgetrennt. Beide Methoden sind jeweils unter Kapitel 2.2.3.2 und 2.2.3.3 beschrieben.

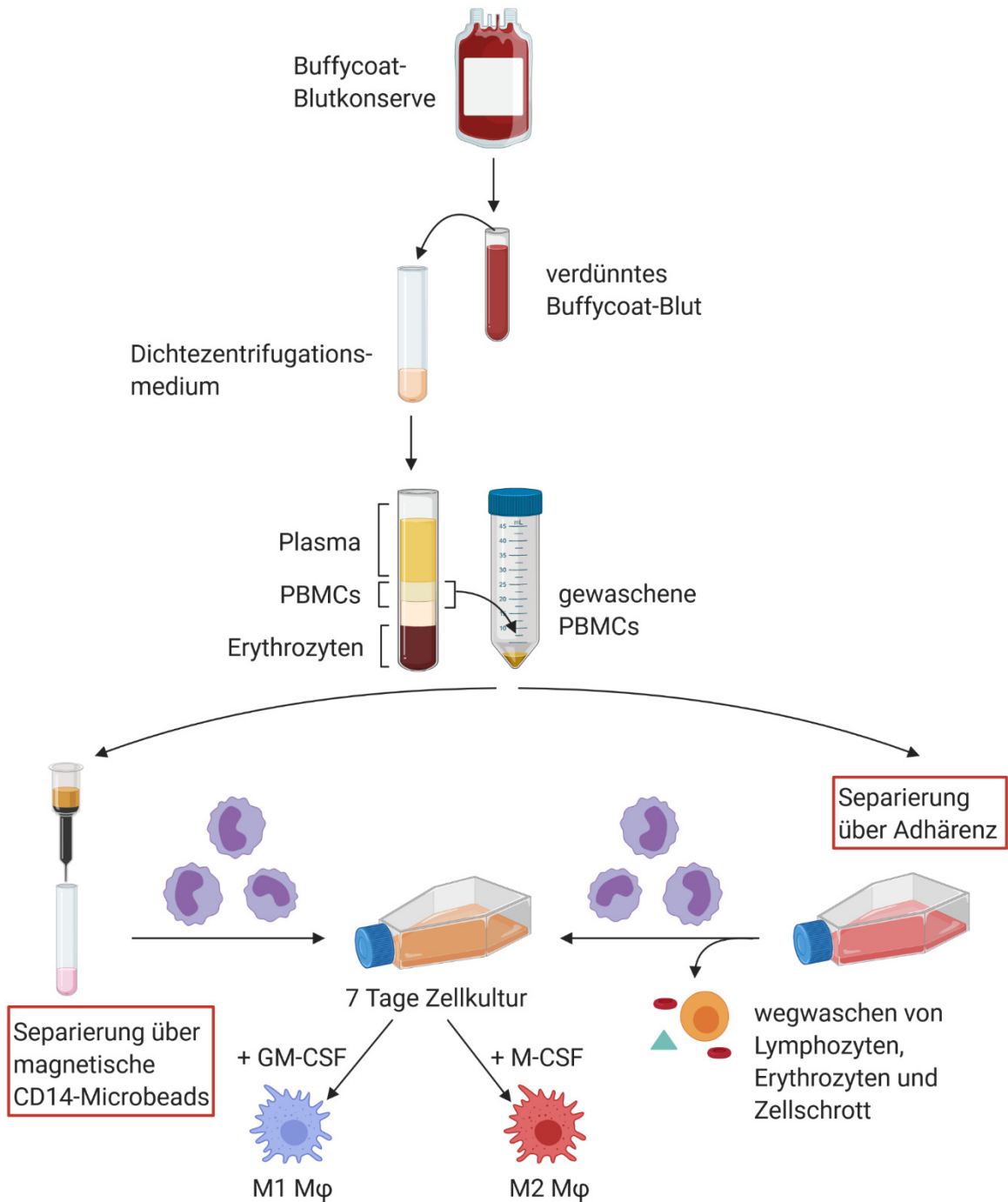


Abbildung 2-1: Isolierung von peripheren mononukleären Zellen aus Buffycoat-Blut und anschließende Differenzierung zu Makrophagen. Das Buffycoat-Blut wird zunächst verdünnt und anschließend mit Hilfe eines Dichtezentrifugationsmediums in verschiedene Schichten aufgetrennt. Die PBMC-Schicht wird abgenommen, gewaschen und die Monozyten werden entweder über magnetische CD14-Microbeads oder über die Adhärenz an Plastikoberflächen separiert. Schließlich erfolgt die Ausdifferenzierung der Monozyten über 7 Tage mit GM-CSF oder M-CSF.

2.2.3.2 Isolierung der Monozyten mittels magnetischer CD14 Microbeads

Da ein Großteil der im Blut zirkulierenden Monozyten und Makrophagen im Gegensatz zu den restlichen im Blut vorhandenen Zellpopulationen den Oberflächenmarker CD14 exprimieren, konnten die Zellen mit einem Antikörper inkubiert werden, der sich gegen CD14 richtete und an magnetische Kügelchen (Microbeads) gebunden war. Hierfür wurde das gewaschene Zellpellet mit den CD14 Microbeads gemischt, wobei pro 1 Millionen Zellen 0,4 µl der Microbeads benötigt wurden und diese mit 5 Teilen Isolierungs-Puffer (Tab. 2-8) verdünnt wurden. Das Zellpellet wurde in dieser Mischung resuspendiert und für 10 Minuten bei 4 °C im Dunkeln inkubiert. In der Zwischenzeit wurde eine magnetische Säule in den Permanentmagneten (Midi MACS Separator) gespannt und an den Magnethalter (MACS Multistand) angebracht. Die Säule wurde mit 5 ml kaltem Isolierungs-Puffer gespült und die Zellsuspension auf die Säule aufgebracht. Hierbei verblieben die CD14 positiven Zellen auf Grund der Markierung mit den magnetischen Microbeads auf der Säule, während die CD14 negativen Zellpopulationen aufgefangen und verworfen wurden. Die Säule wurde 3 Mal mit 5 ml kaltem Isolierungs-Puffer gewaschen. Die positive Zellfraktion wurde schließlich mit 5 ml kaltem Isolierungspuffer eluiert, wobei die Säule aus dem Permanentmagneten entfernt wurde und die Zellen mit Hilfe des mitgelieferten Stempels aus der Säule gedrückt wurden. Die Zellen wurden gezählt und 10-15 Millionen Zellen in 20 ml Differenzierungsmedium für primäre M1- ähnliche (Tab. 2-9) oder für primäre M2-ähnliche Makrophagen (Tab. 2-10) aufgenommen und in eine 75 cm² Zellkulturflasche überführt, wobei auf eine gleichmäßige Verteilung der Zellen geachtet wurde und weiter wie unter Kapitel 2.2.3.4 verfahren wurde.

2.2.3.3 Isolierung der Monozyten mittels Adhärenz

Für die Isolierung der Monozyten mittels Adhärenz an Plastik wurde ausgenutzt, dass die primären Monozyten die Eigenschaft besitzen, an Plastikoberflächen zu adhären, während die Lymphozyten, tote Zellen und sonstige Blutbestandteile weiterhin als Suspensionszellen vorliegen [169]. Hierfür wurde das gewaschene Zellpellet in warmem, komplettiertem RPMI 1640 Medium (Tab. 2-3) resuspendiert und 100-200 Millionen PBMCs in 10 ml Medium in eine 75 cm² Zellkulturflasche überführt und die Flasche zu allen Seiten geschwenkt, sodass sich die Zellen gleichmäßig verteilten. Die Zellen wurden in den Inkubator überführt, wobei alle 15 Minuten die Zellkulturflasche 5 Mal hin und her geschwenkt wurde. Nach 45-60 Minuten wurde der Überstand vorsichtig abgesaugt und die adhären Zellen mit 10 ml warmen PBS mit EDTA gewaschen. Anschließend wurde für die Kultivierung und Polarisierung von M1- und M2-ähnlichen Makrophagen jeweils 20 ml des jeweiligen erwärmten Differenzierungsmedium (Tab. 2-9 und 2-10) zugegeben und weiter wie unter Kapitel 2.2.3.4 verfahren.

2.2.3.4 Polarisierung und Differenzierung der primären M1- und M2-ähnlichen Makrophagen

Nach 2 Tagen waren, je nach Spender*in, bereits ein Großteil der Zellen adhärirt. Der Überstand wurde bei 300 g für 10 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert und in der Zwischenzeit 15 ml warmes Differenzierungsmedium zu den bereits adhärennten Zellen gegeben. Das Zellpellet wurde in 10 ml frischem Differenzierungsmedium aufgenommen und ebenfalls in die Zellkulturflasche gegeben. Nach weiteren 3 Tagen wurde der Überstand komplett abgesaugt und erneut 20 ml frisches Differenzierungsmedium hinzugegeben. Nach insgesamt 7 Tagen konnten die so erhaltenen, ausdifferenzierten Zellen für weitere Versuche verwendet werden.

2.2.4 HEK293 Zellen

HEK293 Zellen sind eine humane Zelllinie, die als Transformationsprodukt aus menschlichen embryonalen Nierenzellen sowie aus DNA-Fragmentstückchen des Adenovirus Typ 5 hervorgegangen sind [170]. Die Zelllinie wurde bei der DSMZ GmbH erworben.

2.2.4.1 Kultivierung, Auftauen und Einfrieren der HEK293 Zellen

HEK293 Zellen wurden analog zu den THP-1 Zellen aufgetaut (Kap. 2.2.2.1), wobei die Kultivierung in einem Wachstumsmedium auf der Basis von DMEM mit hohem Glukoseanteil erfolgte (Tab. 2-11) und für das Einfrieren das HEK Einfriermedium verwendet wurde (Tab. 2-14). Die Zellen wurden zwischen Passage 13 und 20 verwendet. Zum Auftauen wurde das Gefäß mit den Zellen auf dem Wasserbad aufgetaut und die Zellen in ein 50 ml Röhrchen überführt, in dem 15 ml vorgewärmtes Wachstums- und Stimulationsmedium (Tab. 2-11) vorgelegt war. Die Zellsuspension wurde bei 200 g für 5 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert, das alte Medium vorsichtig abgesaugt und das Zellpellet in 5 ml frischem Wachstums- und Stimulationsmedium aufgenommen. Die Zellen wurden in eine 75 cm² Zellkulturflasche überführt, in der zuvor 8 ml Wachstums- und Stimulationsmedium vorgelegt wurde. Die Zellkulturflasche wurde vorsichtig zu allen Seiten geschwenkt, sodass sich die Zellen gut verteilen konnten. Die Zellen wurden im Brutschrank aufbewahrt, bis 70-80 % Konfluenz erreicht war. Zum Passagieren wurde das alte Medium abgesaugt und 10 ml warmes PBS vorsichtig zugegeben. Die Zellen wurden anschließend durch kräftiges Klopfen vom Boden der Zellkulturflasche abgelöst. Die abgelösten Zellen wurden mit Hilfe einer serologischen Pipette ausreichend resuspendiert, sodass keine Zellagglomerate mehr vorhanden waren. 10 µl der Zellsuspension wurde im Verhältnis 1:1 mit Trypan Blau Lösung 0,4 % (Tab. 2-22) gemischt und die Zellen gezählt. Die restlichen Zellen wurden in der Zwischenzeit wie oben beschrieben zentrifugiert und in frischem Medium aufgenommen. Dabei wurden 2-3 Millionen Zellen in 16 ml Medium in einer 75 cm² Zellkulturflasche kultiviert.

2.2.4.2 Einsäen der HEK293 Zellen für Stimulationsversuche

Für Stimulationsversuche wurden die HEK293 Zellen wie zum Passagieren behandelt (Kap. 2.2.4.1), wobei 0,4 Mio Zellen/ml in Wachstums- und Stimulationsmedium (Tab. 2-11) in einer 24-Well Platten eingesät wurden. Hierbei handelte es sich um Zellkulturplatten, die zuvor mit Polylysin-Lösung beschichtet wurden (Kap. 2.2.1). Dabei wurden analog zu den THP-1 Zellen die in Tabelle 2-63 beschriebenen Volumina verwendet. Nach 24 Stunden wurden die Zellen für weitere Stimulationsversuche verwendet.

2.2.5 HEK blue IL-1 β Zellen

HEK blue IL-1 β Zellen sind HEK293 Zellen, die stabil mit dem IL-1 Rezeptor transfiziert sind. Außerdem sind sie mit einem SEAP- (sekretorische Alkalinphosphatase-) Reporter gen transfiziert, das vom Transkriptionsfaktor NF κ B und AP-1 kontrolliert wird. Beim Antriggern des IL-1 Signalwegs über den IL-1 Rezeptorkomplex wird über die Aktivierung der genannten Transkriptionsfaktoren SEAP transkribiert, translatiert und am Ende in das Zellkulturmedium sezerniert. Die Phosphatase kann schließlich ein Substrat (z. B. QUANTI-Blue) umsetzen, wodurch ein Farbumschlag von violett nach blau erreicht wird.

2.2.5.1 Kultivierung, Einfrieren und Auftauen von HEK blue IL-1 β Zellen

Die Zellen wurden bei der Firma InvivoGen bestellt. Direkt nach Erhalt wurde das Gefäß mit den Zellen auf dem Wasserbad aufgetaut und die Zellen in eine 50 ml Röhre überführt, in dem 15 ml vorgewärmtes Basalmedium (Tab. 2-13) vorgelegt war. Die Zellsuspension wurde bei 200 g für 5 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert, das alte Medium vorsichtig abgesaugt und das Zellpellet in 1 ml frischem Basalmedium aufgenommen. Die Zellen wurden in eine 25 cm² Zellkulturflasche überführt, in der zuvor 5 ml Basalmedium vorgelegt wurde. Die Zellkulturflasche wurde vorsichtig zu allen Seiten geschwenkt, sodass sich die Zellen gut verteilen konnten. Die Zellen wurden im Brutschrank aufbewahrt, bis 70-80 % Konfluenz erreicht war. Zum Passagieren wurden die Zellen analog zu den HEK293 Zellen (Kap. 2.2.4.1) behandelt und im frischen Basalmedium (Tab. 2-13) in eine 75 cm² Zellkulturflasche eingesät. Ab der Passage 2 wurden die Zellen in Selektionsmedium kultiviert (Tab. 2-12) und konnten bei Bedarf analog zu den THP-1 Zellen (Kap. 2.2.2.1) in Gefriermedium (Tab. 2-14) eingefroren und wieder aufgetaut werden. Die Zellen wurden bis Passage 20 verwendet.

2.2.5.2 Einsäen der HEK blue IL-1 β Zellen für Stimulationsversuche

Für Stimulationsversuche wurden die HEK blue IL-1 β Zellen wie zum Passagieren behandelt (Kap. 2.2.5.1), wobei 0,4 Mio Zellen/ml in Selektionsmedium in 24- oder 96-Well Platten eingesät wurden. Hierbei handelte es sich um Zellkulturplatten, die zuvor mit Polylysin-Lösung beschichtet wurden (Kap.

2.2.1). Dabei wurden analog zu den THP-1 Zellen die in Tabelle 2-63 beschriebenen Volumina verwendet. Nach 24 Stunden wurden die Zellen für weitere Stimulationsversuche verwendet.

2.2.6 Mykoplasmen-Test

Alle Zelllinien wurden in regelmäßigen Abständen auf Kontamination mit Mykoplasmen getestet. Auf Grund ihrer geringen Größe und ihrer Resistenz gegenüber den herkömmlich eingesetzten Antibiotika bleiben Mykoplasmen häufig unentdeckt und können sogar Sterilfilter mit einer Porengröße von 0,22 µm passieren. Neben der Tatsache, dass sich Mykoplasmen mit den Zellen um Nährstoffe konkurrieren, können diese auch so die Versuchsergebnisse beeinflussen [171].

Für die Testung der eingesetzten Zelllinien wurde in regelmäßigen Abständen ca. 1 ml Probe aus dem Überstand der Zellkulturen entnommen, wenn diese in etwa eine Konfluenz von 80-90 % erreicht hatten. Die entnommenen Proben wurden kurz bei 4000 g zentrifugiert und 500 µl des Überstandes in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß (PCR-rein) überführt und für 5-10 Minuten auf dem Heizblock auf 95 °C erhitzt und anschließend kurz bei 11 000 g herunterzentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Zellpellet verworfen. An diesem Punkt wurden entweder direkt 2 µl der Probe für den Mykoplasmen-Test verwendet, alternativ wurden die Proben bei 4 °C für bis zu 6 Tage oder für eine längere Lagerzeit bei -20 °C weggefroren. Für das weitere Vorgehen wurden die Proben auf Eis gelagert und Filterspitzen und andere Verbrauchsmaterialien verwendet, die die benötigte Reinheit für die PCR-Analytik aufwiesen (Kap. 2.4.6).

Für den Test wurden zunächst die benötigten Reagenzien nach Herstelleranweisung aufgetaut und wenn nötig rekonstituiert. Hierfür wurden alle lyophilisierten Reagenzien kurz herunterzentrifugiert und in dem mitgelieferten PCR-Wasser gelöst, wobei für den Primer/ Nukleotid Mix 65 µl und sowohl für die interne als auch die positive Kontrolle 500 µl zugegeben wurden. Die Reagenzien wurden für 5 Minuten inkubiert, kurz auf dem Vortexer gemischt und herunterzentrifugiert. Für den Master-Mix wurde das PCR-Wasser mit dem 10x Reaktionspuffer, dem Primer/ Nukleotid Mix sowie der internen Kontrolle gemischt (Tab. 2-64). Für jeden Test wurde sowohl eine Positiv- als auch eine Negativkontrolle inkludiert.

Tabelle 2-64: Master-Mix für den Mykoplasmen-Test

Reagenzname	Volumen in µl/ Probe
Wasser (PCR-Grad)	14,5
Reaktionspuffer (10x)	2,5
Primer/ Nukleotid Mix	1,25
Interne Kontrolle	2,5
Taq DNA Polymerase (1 Unit)	1 µl

Nach kurzem Vortexen und Zentrifugieren des Master-Mixes wurde dieser zu je 21,25 µl in 0,2 ml Reaktionsgefäße (8er Streifen) aliquotiert. Jeweils 2 µl der Proben beziehungsweise der Negativ-

(Wasser, PCR-Grad) und der Positivkontrolle wurden hinzu pipettiert und kurz zentrifugiert. Die Proben wurden in ein PCR-Gerät (Thermocycler T Gradient oder qPCR System qTOWER³G touch) überführt und, wie in Tabelle 2-65 gezeigt, amplifiziert.

Tabelle 2-65: PCR Amplifikation für den Mykoplasmen-Test

Anzahl der Zyklen	Temperatur und Zeit
1 Zyklus	94 °C für 2 Min
39 Zyklen	94 °C für 30 sec 55 °C für 30 sec 72 °C für 30 sec
Halten	4-10 °C

Nach Beendigung der Amplifikation wurden die Proben auf Eis gelagert. Für die Gelelektrophorese wurde 250 ml 1x TBE-Puffer hergestellt, indem 50 ml 5x TBE-Puffer (Tab. 2-16) mit 200 ml doppelt demineralisiertem Wasser gemischt wurden. Außerdem wurde ein 1,5 %iges Agarosegel mit Hilfe des Gelelektrophoresesystems Mini-Sub Cell GT Horizontal gegossen, dass wie in Tabelle 2-18 beschrieben zusammen gesetzt war.

Das Gel wurde in die Elektrophoresekammer gelegt und die Kammer mit 1x TBE-Puffer aufgefüllt. Der Kamm wurde entfernt und die Proben aufgetragen, wobei zuvor 10 µl pro Probe mit 2 µl Cyan/ Orange Ladepuffer auf einem Streifen Parafilm gemischt wurden und anschließend 10 µl dieser Mischung in die jeweilige Tasche des Gels pipettiert wurden. Zusätzlich wurden für die DNA-Leiter 2 µl des 50 Basenpaar DNA-Leiters mit 2 µl Cyan/ Orange und 8 µl Wasser (PCR-Grad) auf einem Parafilmstreifen gemischt und ebenfalls 10 µl dieser Mischung in eine weitere freie Tasche pipettiert. Die Elektrophorese wurde bei 150 V gestartet und nach ca. 90 bis 120 Minuten beendet, sobald die Cyan/ Orange Bande 7-8 cm Laufhöhe erreichte. Das Gel wurde aus der Elektrophorese-Kammer genommen und mit Hilfe eines Geldokumentationsgerätes (Geldokumentationssystem BioDocAnalyze oder Geldokumentationssystem ChemiDoc MP) begutachtet. Dabei sollte bei der Negativkontrolle eine Bande bei 190 Basenpaaren (interne Kontrolle) und bei der Positivkontrolle eine zusätzliche Bande bei 265-278 Basenpaaren zu sehen sein. Die eigentlichen Proben sollte nur eine einzige Bande bei 190 Basenpaaren zeigen. Keine Bande wies darauf hin, dass in der Probe enthaltene Verunreinigungen die Reaktion unterbunden hatten, sodass dies als falsch-negatives Ergebnis gewertet werden konnte. Bei dem Auftreten von zwei Banden bei 190 und 265-278 Basenpaaren konnte von einer Mykoplasmenkontamination ausgegangen werden, die glücklicherweise in den von mir ausgeführten Tests nicht vorkam.

2.3 Zellstimulierung und Blockierung zellulärer Signalstoffe und -wege

Grundlage meiner Arbeit war neben der Charakterisierung der eingesetzten Zelltypen auch die Untersuchung der zellulären Signalwege und deren Beeinflussung durch lysosomotrope Stoffe. Hierfür

wurden die Zellen auf unterschiedliche Weise unter aseptischen Bedingungen stimuliert, wobei in ausgewählten Experimenten bestimmte Inhibitoren eingesetzt wurden sowie die Untersuchung bestimmter Signalwege durch das Ausschalten von Genen mittels siRNA erfolgte.

2.3.1 Zellstimulierung und Einsatz von Inhibitoren

Die Zellen wurden für die Stimulierungen je nach Fragestellung in 6-, 24- oder 96-Well Platten ausgesät. Hierbei wurden, wenn nicht anders beschrieben, die in der Tabelle 2-66 gezeigten Zellzahlen verwendet, wobei die THP-1 Makrophagen zunächst, wie unter Kapitel 2.2.2.2 beschrieben, ausdifferenziert wurden.

Tabelle 2-66: Eingesetzte Zellzahlen für Stimulationsversuche

Zellart	Zellzahl
THP-1 Monozyten	0,4 Mio/ ml
THP-1 Makrophagen	0,4 Mio/ ml
Primäre Makrophagen (M1- und M2-ähnlich)	0,2 Mio/ ml
HEK293 Zellen	0,4 Mio/ ml
HEK blue IL-1 β Zellen	0,4 Mio/ ml

Generell wurden alle Stimuli in den jeweiligen, für die Zellart beschriebenen Stimulationsmedien (Kap. 2.1.3.1) verdünnt und mit warmen Lösungen stimuliert. Eine Übersicht der verwendeten Stocklösungen findet sich in Tabelle 2-29. Wenn nicht anders beschrieben, wurden die Zellen mit den jeweiligen lysosomotropen Stoffen (Chloroquin, Chlorpromazin, Fluoxetin) für eine Stunde vorinkubiert, sodass sichergestellt wurde, dass diese zunächst in die Zelle diffundieren können, bevor zusätzlich mit den jeweiligen inflammatorischen Stimuli behandelt wurde. Bei den Experimenten, bei denen der Autophagieinduktor IFN- γ eingesetzt wurde, wurde auf die Präinkubation verzichtet und mit allen Stimuli gleichzeitig inkubiert. Beim Einsatz der Inhibitoren der MAPK wurden die Zellen zunächst mit diesen für eine Stunde vorinkubiert, anschließend wurden dann die lysosomotropen Stoffe und die jeweiligen Stimuli hinzugegeben. Der Endozytoseinhibitor Dynasore wurde für 2 Stunden vorinkubiert, anschließend wurde dieser entfernt und die Zellen mit weiteren Stimuli behandelt.

2.3.2 Ausschaltung von Genen mittels siRNA

siRNA ist eine kurze Ribonukleinsäure-Sequenz, die in der Zellkultur seit vielen Jahren zum gezielten Ausschalten von bestimmten Genen verwendet wird. Statt Inhibitoren kann siRNA also eingesetzt werden, um bestimmte, für den jeweiligen Signalweg wichtige Gene auszuschalten und deren Funktion und Einfluss zu untersuchen. Dabei bedient sich diese Methode der RNA Interferenz (RNAi), einem biologischen Prozess, bei dem doppelsträngige RNA (dsRNA) in eukaryotischen Zellen in der Lage ist, genspezifisch die Degradierung von mRNA (*messenger RNA*) zu bewirken und somit dessen

Übersetzung in ein bestimmtes Protein zu unterbinden. Man vermutet, dass dieser Prozess sowohl zur endogenen Genregulation, als auch zur Abwehr gegen Viren dient.

Bei der Einbringung von dsRNA wird diese zunächst erkannt und in siRNA gespalten, die meist eine Länge von 20-30 Basenpaaren aufweist. Die siRNA kann so an den RISC (*RNA-induced silencing complex*) binden, einem Proteinkomplex, der zum einen die doppelsträngige RNA spalten kann, zum anderen korrespondierende mRNA Stränge findet und schließlich für dessen Abbau sorgt. Das entsprechende Gen kann somit nicht mehr an den Ribosomen in ein Protein umgeschrieben werden und die Translation bleibt aus (Abb. 2-2).

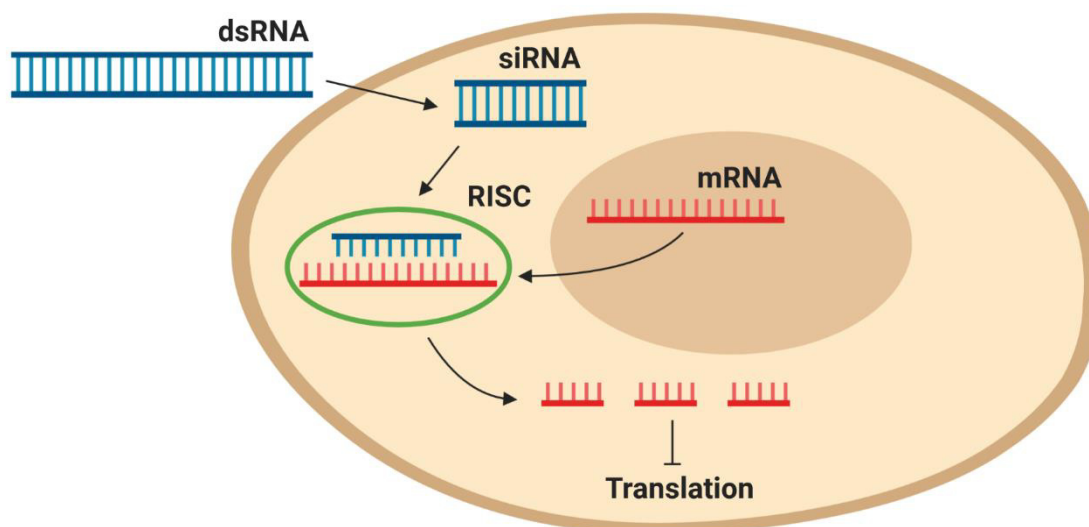


Abbildung 2-2: Prinzip der RNA-Interferenz. Doppelsträngige RNA (dsRNA) wird intrazellulär in eine kürzere siRNA (short interfering RNA) gespalten. Diese bindet an den RNA-induced silencing complex (RISC). Dieser baut zum einen die doppelsträngige siRNA in einsträngige siRNA um und rekrutiert den korrespondierenden mRNA-(*messenger RNA*-)Strang. Schließlich sorgt der RISC für die Zersetzung der mRNA und somit das Ausbleiben der Translation. Das jeweilige Gen kann nicht in ein Protein umgeschrieben werden.

Die in der Zellkultur eingesetzte siRNA korrespondiert dabei mit dem jeweiligen Gen, das man ausschalten möchte und kann doppel- oder einzelsträngig sein. Bei Kenntnis der benötigten Basensequenz ist die siRNA dabei leicht zu synthetisieren. Das Einbringen in die Zelle kann zum einen über lipid-basierte Transfektionsreagenzien als auch durch die Elektroporation der Zellen geschehen [172].

2.3.2.1 Validierung der Transfektionseffizienz

Für die Validierung der Transfektionseffizienz wurde fluoreszenzmarkierte siRNA mit Hilfe von zwei unterschiedliche Transfektionsreagenzien in die Zellen eingebracht, wobei zwei verschiedene Konzentrationen eingesetzt wurden. 0,1 Millionen THP-1 Zellen/ ml wurden in eine 24-Well Platte eingesät und die Zellen analog zu Kapitel 2.2.2.2 mit PMA zu THP-1 Makrophagen ausdifferenziert.

Jedoch wurde nach 48 Stunden nicht auf das normale komplettierte RPMI 1640 Medium (Tab. 2-3) gewechselt, stattdessen wurde mit antibiotikafreiem, komplettiertem RPMI 1640 Medium (Tab. 2-6) gearbeitet. Hierfür wurde nach dem Waschen der Zellen mit 1 ml PBS mit 500 µl Medium pro Well inkubiert. Nach 20 Stunden wurde für die restlichen 4 Stunden mit 50 nM fluoreszenzmarkierter siRNA transfiziert. Pro Well wurden insgesamt 100 µl der siRNA/ Transfektionsreagenz-Mischung in OptiMEM, welches ein serumfreies Spezialmedium darstellt, zu den Zellen gegeben. Für die Transfektion mit Lipofectamin 2000 wurden pro Well 3 µl der fluoreszenzmarkierten siRNA mit 50 µl OptiMEM in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß (PCR-rein) gemischt (Mischung A). Außerdem wurde 50 µl OptiMEM mit 1 oder 2 µl Lipofectamin 2000 in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß (PCR-rein) versetzt, gemischt und für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert (Mischung B). Im Anschluss an die Inkubationszeit wurden Mischung A und Mischung B miteinander vereint, gemischt und für weitere 20 Minuten inkubiert. Schließlich wurde dann die komplette Mischung zu den Zellen pipettiert. Für die Transfektion mit Interferin wurden je Well zunächst 3 µl der fluoreszenzmarkierten siRNA mit 100 µl OptiMEM in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß (PCR-rein) gemischt und im Anschluss 2 oder 3 µl Interferin zugegeben. Nach 10 Minuten Inkubationszeit wurde im Anschluss die Mischung zu den Zellen pipettiert. Für die Kontrolle wurde 3 µl fluoreszenzmarkierte siRNA mit 100 µl OptiMEM gemischt und zu den Zellen gegeben. Nach 4 Stunden Transfektionszeit wurde der Zellüberstand inklusive siRNA und Transfektionsreagenzien entfernt und für einen später erfolgten Zellviabilitäts-Test (Kap. 2.4.4.4) bei -20 °C weggefroren. Die Zellen wurden mit 1 ml PBS gewaschen und 1 ml komplettiertes RPMI 1640 Medium hinzugefügt. Für die Beurteilung der Transfektionseffizienz wurden die Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet. Da die siRNA mit dem Farbstoff Cyanin 3 gekoppelt war, der bei 550 nm angeregt wird und Licht einer Wellenlänge von 570 nm emittiert, wurde der TRITC Filter verwendet. Rote Fluoreszenz innerhalb der Zellen wies auf eine erfolgreiche Transfektion hin.

2.3.2.2 Transfektion mit genspezifischer siRNA

Für die Transfektion mit genspezifischer siRNA wurde siRNA gegen STX-17 sowie die hierzu korrespondierende Kontroll-siRNA verwendet, die zwar transfiziert wird, jedoch nicht spezifisch an ein Gen bindet. Die zugehörige Basensequenzen sind in Tabelle 2- 67 aufgeführt.

Tabelle 2-67: Basensequenzen der eingesetzten siRNA

Targetgen	Basensequenz
STX-17	5'-GGAAACCUUAGAAGCGGACUAAUU-3'
Negativ Kontrolle	5'-UUCUCCGAACGUGUCACGU-3'

Für die Transfektion wurden die THP-1 Zellen zunächst mit PMA zu THP-1 Makrophagen ausdifferenziert (Kap. 2.3.2.1) und mit der siRNA transfiziert. Hierfür wurde zunächst der mitgelieferte 5x siMAX Puffer mit sterilfiltriertem PCR-Wasser 1:5 verdünnt. 20 nmol der lyophilisierten siRNA wurde in 1 ml 1x siMAX Puffer rekonstituiert, um eine 20 µM Lösung zu erhalten. Pro Well wurden 0,6

und 6 μ l siRNA mit 50 μ l OptiMEM gemischt (Mischung A). Außerdem wurden 2 μ l Lipofectamin 2000 mit 50 μ l OptiMEM gemischt (Mischung B) und nach 5 Minuten Inkubationszeit mit der Mischung A vereinigt. Die Mischung A+B wurde anschließend für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und zu den Zellen gegeben. Nach einer Transfektionszeit von 4 Stunden wurde die siRNA-Transfektionsreagenz-Mischung abgesaugt und die Zellen mit 1 ml PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit den jeweiligen Stimuli behandelt. Die Effizienz der Genausschaltung wurde mittels qPCR quantifiziert (Kap. 2.4.6).

2.4 Methoden zur phänotypischen und funktionellen Charakterisierung

2.4.1 Phasenkontrastmikroskopie

Die Phasenkontrastmikroskopie ist eine Unterform der Lichtmikroskopie und eine Grundlagenmethode in der Zellkultur, die es erlaubt, starke Vergrößerung von kleinen Strukturen und Objekten zu erzeugen. Sie wird routinemäßig bei allen Arbeiten mit Zellen eingesetzt, um Sicherzustellen, dass diese in angemessener Weise wachsen, die erwartete Morphologie besitzen sowie keine sichtbare Kontamination auftritt. Im Allgemeinen bedient sich die optische Mikroskopie den physikalischen Gesetzen der Optik über die Interaktion von Licht mit der Materie und dem Zusammenspiel von Lichtbeugung und Lichtbrechung.

Da Zellen normalerweise durch ihre transparente Erscheinung nur einen geringen Eigenkontrast mitbringen, sind sie in der Regel ohne Anfärbung nur schwer erkennbar. Hierfür kommt das Phasenkontrastverfahren zum Einsatz, bei dem die Unterschiede in der Dicke eines Objekt und der Lichtbrechungsindices in einen Hell-Dunkel-Kontrast umwandelt werden [173].

Die phasenkontrastmikroskopischen Aufnahmen wurden von lebenden Zellen in Zellkulturflaschen oder Zellkulturplatten gemacht, wobei die Aufnahmen mit Hilfe einer extern angeschlossenen Kamera bei einer 100-fachen Gesamtvergrößerung gemacht wurden.

2.4.2 Fluoreszenzmikroskopie

Die Fluoreszenzmikroskopie ist eine Weiterentwicklung der Lichtmikroskopie, bei der bestimmte Zielstrukturen mit Fluoreszenzfarbstoffen oder fluoreszenzmarkierten Antikörpern markiert werden können. Diese Fluorochrome werden dann mit Licht einer bestimmten Wellenlänge bestrahlt, wobei nach dem Jablonski Thermeschema Elektronen angeregt werden, auf ein höheres Energieniveau zu wechseln. Beim Rücktritt in den Grundzustand können diese dabei die absorbierte Energie in Form von Licht einer längeren Wellenlänge emittieren. So können die markierten Strukturen unter dem Mikroskop wahrgenommen werden [174].

In dieser Arbeit wurde das Fluoreszenz-Phasenkontrast-Mikroskop BZ-8000 der Firma Keyence verwendet. Dabei wurden Aufnahmen von lebenden Zellen gemacht, die wie weiter unten beschrieben mit den jeweiligen Fluorochromen behandelt wurden. Die Ausstattung und die verwendeten Filter sind der Tabelle 2-68 zu entnehmen.

Tabelle 2-68: Ausstattung des Fluoreszenz-Phasenkontrast-Mikroskop BZ-8000 der Firma Keyence

Fluoreszenzkanal	Ex. Filter	Dichroischer Spiegel	Em. Filter	Gemessene Farbstoffe
DAPI-B	360/40 BP	400	460/50 BP	
GFP-B	470/40 BP	495	535/50 BP	
TRITC	540/25 BP	565	605/55 BP	Cy3, LTR
TxRed	560/40 BP	595	630/60 BP	
Hellfeld	-	-	-	-

2.4.3 Durchflusszytometrie

Bei der Durchflusszytometrie strömen Zellen oder Partikel einzeln durch einen Kanal und werden dabei von einem bzw. mehreren Lasern bestrahlt. Dabei gibt es verschiedene Detektoren, die an unterschiedlichen Positionen das von der Zelle oder dem Partikel ausgehende Streulicht messen. Das Vorwärtsstreulicht sagt etwas über die Zell- bzw. Partikelgröße aus, während man über das Seitwärtsstreulicht eine Aussage zur Granularität treffen kann. Außerdem kann das Durchflusszytometer auch eine von den Zellen oder Partikeln ausgehende Fluoreszenz messen und erfassen. Hierfür sind unterschiedliche Filter verbaut, die das emittierte Licht einer bestimmten Wellenlänge durchlassen, wenn die Zellen oder Partikel zuvor mit einem der Laser angeregt werden. Bestimmte Proteinstrukturen der Zellen können hierbei beispielsweise mit fluoreszenzgekoppelten Antikörpern markiert werden [175]. In der vorliegenden Arbeit wurde die Durchflusszytometrie für die LysoTracker Red Färbung, die Messung der Oberflächenmarker-Expression, den MitoSox-Test sowie den Annexin-V FITC/Propidiumiodid (PI) Test.

Für die Messungen wurde das Durchflusszytometer CytoFlex der Firma Beckman Coulter verwendet, das mit den in Tabelle 2-69 aufgeführten Lasern und Fluoreszenzkanälen ausgestattet war.

Nach Anschalten des Gerätes wurde zunächst der Abfallbehälter geleert und der Behälter für die Trägerflüssigkeit bis zur Markierung mit CytoFLEX Sheath Fluid aufgefüllt. Außerdem wurde der Behälter für die Tiefenreinigung des Systems, wenn nötig, mit CONTRAD 70 Lösung, die zuvor 1:1 mit doppelt demineralisiertem Wasser verdünnt wurde, aufgefüllt. Das System wurde mit doppelt demineralisiertem Wasser gespült und die einzelnen Laser und Kanäle mit den von der Firma gelieferten Beads (CytoFLEX Daily CQ Fluorosperes) vermessen. Hierfür wurden 3 Tropfen der Beads in 1 ml doppelt demineralisiertem Wasser gelöst. Diese Mischung konnte anschließend bei 4 °C unter Lichtausschluss aufbewahrt und weiter benutzt werden. Anschließend erfolgte die Vermessung der Proben, wobei 10 000 Ereignisse pro Probe bei mittlerer Flussrate gemessen wurde. Hierfür wurde

zunächst jeweils die ungefärbte Kontrollprobe vermessen und die Signalintensität bei vorhandener Eigenfluoreszenz der Zellen entsprechend heruntergeregelt. Nach Messung aller Proben wurde das System zunächst mit 1 ml der Reinigungsflüssigkeit (FlowClean Cleaning Agent) für 5 Minuten und anschließend mit 1 ml doppelt demineralisiertem Wasser für weitere 5 Minuten gespült. Bei Messungen mit Propidiumiodid wurde vor der Endreinigung zunächst eine Tiefenreinigung des Systems für mindestens 30 Minuten durchgeführt.

Tabelle 2-69: Ausstattung des Cytotflex Durchflusszytometers der Firma Beckman Coulter

Lasere	Fluoreszenzkanal	Gemessene Farbstoffe
488 nm (blau)	488/8 BP	FITC-gekoppelte Antikörper Propidiumiodid (PI), PE-gekoppelte Antikörper, LysotrackerRed, MitoSox Red
	525/40 BP	
	585/42 BP	
	610/20 BP	
	690/50 BP	
638 nm (rot)	780/60 BP	PerCP-gekoppelte Antikörper
	638/6 BP	
	660/10 BP	
	712/25 BP	
405 nm (violett)	780/60 BP	
	405/10 BP	
	450/45 BP	
	525/40 BP	
	610/20 BP	
	660/10 BP	
	780/60 BP	

2.4.3.1 Probenvorbereitung für die Durchflusszytometrie

Für die Vermessung der Zellen mittels Durchflusszytometrie mussten diese als Suspensionszellen vorliegen. Dafür wurden die THP-1 Monozyten in der gewünschten Anzahl entnommen, herunterzentrifugiert (200 g, 5 min) und mit 1 ml PBS gewaschen. Da die THP-1 Makrophagen und primären Makrophagen jedoch nicht als Suspensionszellen vorlagen, mussten diese zunächst von den Zellkulturflaschen und Zellkulturplatten abgelöst werden. Hierfür wurde das alte Medium abgesaugt und die Zellen mit PBS gewaschen. Anschließend wurden mit den in Tabelle 2-70 aufgeführten Volumina TrypLE Express für 5 Minuten im Brutschrank bei 37 °C inkubiert und währenddessen sowie im Anschluss an die Inkubationszeit kräftig auf den Boden der Zellkulturflaschen und -platten geklopft, um die Zellen abzulösen. Anschließend wurde die Reaktion mit warmem komplettiertem RPMI 1640 Medium gestoppt und die Zellen zentrifugiert und mit kaltem PBS gewaschen. Die Zellen wurden auf Eis gelagert und standen so für weitere Färbeschritte und die anschließende Messung mit dem Durchflusszytometer zur Verfügung.

Tabelle 2-70: Ablösung der Zellen für die Durchflusszytometrie

Art und Größe der Zellkulturflasche/ -platte	Volumen TrypLE Express	Volumen komplettiertes RPMI 1640 Medium
Zellkulturflasche (25 cm ²)	2 ml	6 ml
Zellkulturflasche (75 cm ²)	5 ml	15 ml
24-Well Platte (je Well)	250 µl	750 µl

2.4.3.2 Oberflächenmarker-Expression

Für die Charakterisierung der THP-1 Monozyten und Makrophagen sowie der primären Makrophagen wurde die Expression verschiedener, zellspezifischer Oberflächenmarker mittel Durchflusszytometrie bestimmt. Hierfür wurden die Zellen wie unter Kapitel 2.4.3.1 beschrieben vorbereitet. Die Zellen wurden in kaltem FACS-Puffer (Tab. 2-20) resuspendiert und ca. 0,4 - 0,5 Mio. Zellen je Probe wurden in eine 5 ml Röhre für die Durchflusszytometrie überführt und ab hier auf Eis gestellt. Danach wurde mit 1 ml kaltem FACS- Puffer gewaschen, bei 4 °C zentrifugiert und die Zellen in 200 µl FACS-Puffer aufgenommen. Anschließend wurden die Zellen mit den jeweiligen fluoreszenzmarkierten Antikörpern sowie den korrespondierenden Isotypenkontrollen (Tab. 2-71) versetzt und für 10 Minuten oder 30 Minuten bei 4 °C bzw. bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert.

Tabelle 2-71: Für die Untersuchung der Oberflächenmarkerexpression verwendete Antikörper

Target	Volumen	Inkubationsbedingungen
Monoklonaler Antikörper (Klon MOPC-21), PE-konjugiert, IgG1,k aus der Maus (Isotypenkontrolle)	5 µl	10 min, 4 °C
Monoklonaler Antikörper (Klon MPC-11), FITC-konjugiert, IgG1,k aus der Maus (Isotypenkontrolle)	5 µl	10 min, 4 °C
Monoklonaler Antikörper (Klon S43.10), PerCP-konjugiert, IgG2a aus der Maus (Isotypenkontrolle)	10 µl	10 min, 4 °C
Monoklonaler humaner CD11b Antikörper (Klon ICRF44), PE-konjugiert, IgG1,k aus der Maus	5µl	10 min, 4 °C
Monoklonaler humaner CD14 Antikörper (Klon Tük4), PerCP-konjugiert, IgG2a aus der Maus	10 µl	10 min, 4 °C
Monoklonaler humaner CD163 Antikörper (Klon GH/61), PE-konjugiert, IgG1,k aus der Maus	5 µl	10 min, 4 °C
Monoklonaler humaner CD68 Antikörper (Klon Y1/82A), FITC-konjugiert, IgG1,k aus der Maus	5 µl	30 min, 4 °C nach Permeabilisierung
Polyklonaler Antikörper, PE-konjugiert, IgG aus der Ziege (Isotypenkontrolle)	10 µl	30 min, RT
Polyklonaler humaner IL-1R1 Antikörper, PE-konjugiert, IgG aus der Ziege	10 µl	30 min, RT

Am Ende der Inkubationszeit wurden die Reaktion mit 1 ml kaltem PBS gestoppt und bei 4 °C zentrifugiert. Die Zellen wurden mit 500 µl kaltem FACS-Puffer gewaschen und anschließend in 200 µl kaltem FACS-Puffer aufgenommen und vermessen. Für die Färbung des Antigens CD68 wurde eine intrazelluläre Färbung durchgeführt. Hierfür wurden die Zellen in 200 µl FACS-Puffer in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß herunter zentrifugiert (300 g, 5 min, 4 °C) und in 100 µl 4 %iger Formaldehydlösung

(RotiHistofix 4 %) für 15 Minuten bei 4 °C fixiert. Nach der Zentrifugation wurden die Zellen 2 Mal mit 100 µl PermWash-Puffer gewaschen und im Anschluss in 50 µl PermWash-Puffer aufgenommen. Es wurde 5 µl des Antikörpers hinzugegeben und für 30 Minuten bei 4 °C unter Lichtausschluss inkubiert. Dabei handelte es sich bei dem PermWash-Puffer um eine Detergenzienlösung, der die Zellen so kurzzeitig permeabilisierte, dass die Antikörper die Zellmembran überwinden konnten und auch intrazellulär an ihr Target binden konnten. Anschließend wurden die Zellen noch 2 Mal mit 1000 µl PermWash-Puffer gewaschen und schließlich in 200 µl FACS-Puffer aufgenommen und ebenfalls vermessen.

2.4.3.3 LysoTracker Red Färbung

LysoTracker Red ist ein Farbstoff der Firma Thermo Fisher, der als schwache lipophile Base sehr leicht biologische Membranen überwinden kann und in sauren Zellkompartimenten akkumuliert. Der genaue Mechanismus ist nicht eindeutig geklärt, er wird vermutet, dass der Farbstoff in sauren Organellen protoniert vorliegt und so eine Fluoreszenz aufweist, die zum Beispiel mit dem Fluoreszenzmikroskop (Kap. 2.4.2) oder dem Durchflusszytometer detektiert werden kann [176].

Für die LysoTracker Red (LTR) Färbung wurden die in einer 24-Well Platte ausdifferenzierten THP-1 Makrophagen zunächst mit 100 nM LTR in komplettiertem RPMI 1640 Medium bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen kurz mit warmen PBS gewaschen und mit den jeweiligen Stimuli für 30 Minuten oder 4 Stunden behandelt (Kap. 2.3.1). Für die Fluoreszenzmikroskopie wurden die Zellen mit 1 ml PBS mit Magnesium und Calcium gewaschen und sofort in 1 ml PBS mit Magnesium und Calcium unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet. Für die Quantifizierung der Färbung mittels Durchflusszytometrie wurden die Zellen analog zu Kapitel 2.4.3.1 abgelöst, gewaschen und in 200 µl kaltem FACS-Puffer aufgenommen und vermessen.

2.4.3.4 MitoSox-Test

MitoSox Red ist ein Farbstoff, der spezifisch intrazellulär mitochondriale reaktive oxidative Spezies (ROS) anfärbt. Hierfür wurde zunächst ein Fläschchen lyophilisierter Farbstoff in 13 µl sterilem DMSO gelöst, um eine Stocklösung von 5 mM zu erhalten. Die in einer 24-Well Platte ausdifferenzierten THP-1 Makrophagen wurden mit den jeweiligen Stimuli für 2 und 4 Stunden inklusiver 1 Stunde Präinkubation mit Chloroquin (20 µM) behandelt. Das Medium wurde anschließend abgesaugt und die Zellen mit 1 ml warmen PBS gewaschen. Die MitoSox Red Stocklösung wurde 1:1000 mit komplettiertem RPMI 1640 Medium (Tab. 2-3) verdünnt, sodass eine 5 µM Lösung erhalten wurde und die Zellen pro Well mit 500 µl dieser Lösung bei 37 °C für 30 Minuten im Brutschrank inkubiert wurden. Anschließend wurde das Medium abgesaugt, die Zellen zwei Mal mit warmem PBS gewaschen und die Zellen wie unter Kapitel 2.4.3.1 beschrieben abgelöst, mit dem Unterschied, dass die abgelösten Zellen mit 1 ml MitoSox FACS-Puffer (Tab. 2-21) gewaschen wurden. Nach dem Herunterzentrifugieren (200

g, 5 min bei 4 °C) wurden die Zellen in 200 µl MitoSox FACS-Puffer aufgenommen und mit dem Durchflusszytometer vermessen. Mit der Positivkontrolle wurde analog verfahren, jedoch wurden hier die Zellen für 30 Minuten mit 10 µM Antimycin A behandelt, ehe die Zellen abgelöst, gefärbt und vermessen wurden.

2.4.4 Zellviabilitäts-Tests

Die Viabilität der Zellkulturen und die Zytotoxizität eingesetzter Substanzen und Stimuli kann einen entscheidenden Einfluss auf den Ausgang und die Auswertung unterschiedlicher *in vitro* Experimente haben. Die Konzentration von Stimuli und Inhibitoren im Zellkulturexperiment sollte im Idealfall so ausgewählt werden, dass der zu erwartende Effekt erzielt wird, die Zellviabilität jedoch nicht negativ beeinflusst wird. Um eine Aussage über letzteres zu treffen, können zahlreiche Zellviabilitäts- und Zytotoxizitäts-Tests im Labor zum Einsatz kommen, wobei die einzelnen Testmethoden auf unterschiedliche Weise ausgewertet werden können und verschiedenen Testmechanismen zu Grunde liegen. Somit kann man sich vorstellen, dass die Auswahl eines geeigneten Tests sowohl von der Praktikabilität, der Durchführbarkeit in den jeweiligen Laboren, von den Kosten als auch von der eigentlichen Aussage und der jeweiligen zu testenden Substanz abhängen kann [177].

2.4.4.1 Trypan Blau Färbung

Bei der Trypan Blau Färbung handelt es sich um eine sehr einfach durchzuführende Methode, um die Viabilität der Zellen zu überprüfen. Hierfür wurden die als Suspension vorliegenden Zellen im Verhältnis 1:1 mit Trypan Blau Lösung (Tab. 2-22) gemischt, wobei in der Regel 10 µl Zellsuspension mit 10 µl Trypan Blau Lösung in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß gemischt wurden. 10 µl dieser Zellsuspension wurden in eine Neubauer Zählkammer pipettiert und die lebenden und toten Zellen unter dem Mikroskop ausgezählt. Dabei erschienen die lebenden Zellen hell auf dunklem Grund, während der blaue Farbstoff durch die perforierten Zellmembran von toten und nicht mehr intakte Zellen diffundieren konnte, sodass diese als dunkle Flecken sichtbar waren [177]. Die Zellviabilität ergab sich dann aus dem Anteil der lebenden Zellen an der Gesamtsumme aus lebenden und toten Zellen.

2.4.4.2 Annexin-V FITC/ Propidiumiodid (PI) Test

Beim Annexin-V FITC/ Propidiumiodid (PI) Test handelt es sich um eine doppelte Färbung, mit der sowohl die in Apoptose gehenden Zellen als auch die bereits nekrotisch gewordenen Zellen erfasst werden. Annexin-V bindet dabei mit Hilfe von Calcium-Ionen an Phosphatidylserin, einem Lipid, das extrazellulär exprimiert wird, wenn Zellen in Apoptose gehen. PI hingegen ist ein mit der DNA interkallierender Farbstoff, der nur in Zellen eindringen kann, deren Zellmembran auf Grund von nekrotischen Vorgängen nicht mehr intakt ist. Annexin-V FITC und PI können auf Grund ihrer unterschiedlichen Emissionmaxima bei 517 und 617 nm nebeneinander für die Färbung apoptotischer

und nekrotischer Zellen eingesetzt werden. Dabei erfolgt die Messung mit Hilfe eines Durchflusszytometers [178].

Für die Färbung wurden THP-1 Monozyten und ausdifferenzierte THP-1 Makrophagen mit den jeweiligen Stimuli versetzt, wie unter Kapitel 2.4.3.1 beschrieben vorbereitet, und in 15 ml Röhren überführt. Wichtig war hierbei, dass sämtliche Zellkultur- und Waschüberstände je Probe zusammen mit den abgelösten Zellen gesammelt wurden, um bei adhärenen Zellen auch bereits abgelöste und schwimmende apoptotische und/ oder nekrotische Zellen miteinzubeziehen. Nach der Zentrifugation (200 g, 5 min, RT) wurde der Überstand entfernt und die Zellen mit 1 ml kaltem Annexin-V Bindungspuffer (Tab. 2-23) gewaschen. Als Positivkontrolle für Annexin-V als auch PI diente 10 % DMSO in komplettiertem RPMI 1640 Medium, das 24 Stunden inkubiert wurde. Die Zellen wurden anschließend wie oben beschrieben behandelt. Die Zellen wurden erneut in 1 ml kaltem Bindungspuffer aufgenommen, in 5 ml Röhren für die Durchflusszytometrie überführt und erneut zentrifugiert. Zur ungefärbten Kontrolle wurde direkt 200 µl des kalten Annexin-V Bindungspuffers pipettiert und die Probe auf Eis gelagert. Für die PI Kontrolle wurde 190 µl des kalten Bindungspuffers hinzugegeben und die Probe ebenfalls auf Eis gestellt. Die Annexin-V Kontrolle sowie sämtliche Proben wurden in 195 µl des kalten Bindungspuffers resuspendiert und 5 µl des Annexin-V FITC je Probe hinzupipettiert. Die Proben wurden kurz gemischt und für 10 Minuten bei 4 °C im Dunkeln inkubiert. Die Reaktion wurde anschließend mit 1 ml kaltem PBS gestoppt, die Zellen zentrifugiert und die Annexin-V Positivprobe in 200 µl kaltem Bindungspuffer resuspendiert, während die restlichen Proben in 190 µl des kalten Bindungspuffers aufgenommen wurden. Alle Proben wurden bis zur Vermessung auf Eis gestellt. Die fertige PI-Lösung mit einer Konzentration von 1 mg/ml wurde mit pyrogenfreiem Wasser auf eine PI-Konzentration von 20 µg/ml verdünnt. Die ungefärbte Kontrolle sowie die Annexin-V Positivkontrolle wurden ohne den Zusatz von PI direkt mit dem CytoFLEX Durchflusszytometer vermessen (Kap. 2.4.3). Zu allen anderen Proben wurde kurz vor jeder Messung 10 µl der verdünnten PI-Lösung pipettiert. Auf Grund der überlappenden Emissionsspektren von Annexin-V FITC und PI musste mit den beiden Positivkontrollen von Annexin-V FITC und PI eine Kompensation durchgeführt werden.

2.4.4.3 MTT-Test

Der MTT-Test ist ein kolorimetrischer Test und einer der am meisten genutzten Zellviabilitäts-Tests. Er ist mit geringem zeitlichem und apparativem Aufwand durchzuführen. MTT steht dabei für den gelben, wasserlöslichen Farbstoff 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid, der zu einem wasserunlöslichen, violetten Formazan reduziert wird. Während lebendige Zellen in der Lage sind, das MTT zu metabolisieren, bleibt bei toten Zellen diese Reaktion aus und die Lösung bleibt gelb. Der genaue Mechanismus der Umsetzung des MTTs ist nicht genau bekannt, es wird jedoch vermutet, dass über NADH oder andere reduzierende Moleküle die Elektronenübertragung auf MTT stattfindet. Der MTT-

Test sagt somit etwas über die metabolische Aktivität der Zellen aus und nimmt dies als Marker, um zwischen lebendig und tot zu unterscheiden [179].

Die Zellen wurden in einer 96-Well Platte in Triplikaten wie gewohnt stimuliert und behandelt, dabei wurde jedoch darauf geachtet, dass jeweils die äußeren Wells der Platte leer blieben, diese dienten bei der Auswertung für den Blindwert. Außerdem diente als Positivkontrolle eine Stimulation mit 10 % DMSO in dem jeweiligen verwendeten Stimulationsmedium für 24 Stunden. 4 Stunden vor Ende der eigentlichen Stimulation wurde 25 µl der gelben MTT-Lösung (Tab. 2-24) hinzu pipettiert und unter Lichtausschluss für weitere 4 Stunden bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurde der Überstand abpipettiert und im MTT-Abfall entsorgt. Die blauen Formazankristalle wurden in 125 µl DMSO gelöst und auch die äußeren leeren Wells mit jeweils 125 µl DMSO gefüllt. Die Platte wurde schließlich mit Hilfe eines Mikro-Plattenlesers (FLUOstar Optima: Ex. Filter 540/10 BP bzw. Mitras² LB 943: 540/10 BP) vermessen. Der Blindwert wurde von allen Proben abgezogen und alle Werte wurden auf die unbehandelte Kontrolle bezogen (Wert von 100 %).

2.4.4.4 LDH-Test

Der LDH-Test ist ein weiterer Zellviabilitäts-Test, der analog zum MTT-Test (Kap. 2.4.4.3) ein kolorimetrischer Test ist. Dabei steht LDH für die Laktatdehydrogenase, ein Enzym, das intrazellulär vorkommt. Bei geschädigten Zellen kann das Enzym in das Zellkulturmedium abgegeben werden und ist somit ein Marker für die Zellviabilität. Der Test lässt sich also sehr gut anwenden, wenn nur die Zellkulturüberstände zur Verfügung stehen. Die LDH-Menge in den Zellkulturüberständen wird dabei über eine gekoppelte Enzymreaktion erfasst, wobei am Ende ein farbiges Substrat umgesetzt wird, dessen Menge mit der LDH Konzentration korreliert [177].

Die Zellen wurden wie gewohnt in eine 24-Well Platte eingesät und stimuliert. Außerdem wurden drei Kontrollen verwendet, für die Negativkontrolle wurden die Zellen nur mit Medium behandelt, für die Messung der spontanen LDH-Ausschüttung wurden die Zellen 45 Minuten vor Ende der Inkubationszeit mit 100 µl pyrogenfreiem Wasser behandelt und für die Positivkontrolle wurden 100 µl des im Test-Kit enthaltenen Zelllyse-Puffer verwendet und ebenfalls 45 Minuten inkubiert. Im Anschluss an das Experiment wurde der Zellkulturüberstand in 1,5 ml Reaktionsgefäße pipettiert und entweder direkt vermessen oder bis zur Vermessung bei -20 °C weggefroren. Für den eigentlichen Test wurde in einer 96-Well Zellkulturplatte zunächst in Duplikaten 50 µl der Proben pipettiert. Anschließend wurde 50 µl des LDH-Test Reaktionsmix (Tab. 2-25) zu jedem Well hinzugegeben und für 30 Minuten bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss inkubiert. Im Anschluss wurden per Well 50 µl der im Kit enthaltenen Stopp-Lösung zugegeben und die Absorption mit einem Mikroplattenlese (FLUOstar Optima: Ex. Filter 492 BP bzw. Mitras² LB 943: 492/10 BP) vermessen. Die Zytotoxizität wurde anschließend berechnet, indem die spontane LDH-Ausschüttung von den jeweiligen Proben abgezogen

wurde und die Absorptionswerte der Proben durch die Absorptionswerte der Positivkontrolle dividiert wurden.

2.4.5 ELISA-Analytik

Die ELISA-Analytik ist eine sehr weit verbreitete antikörperbasierte Analytikmethode, mit der die Konzentration bestimmter Antigene in biologischen Proben untersucht werden kann. Diese Antigene können beispielsweise Proteine, Hormone oder Peptide sein, auf Grund dessen die ELISA-Analytik ein wichtiges Werkzeug in der Immunologie ausmacht. ELISA steht dabei für Enzyme-Linkend Immunosorbent Assay, wobei ein Enzym an einen Antikörper gekoppelt ist, der spezifisch an ein bestimmtes Antigen bindet. Im Anschluss wird ein Substrat verwendet, welches dann von dem Enzym umgesetzt werden kann und einen Farbumschlag ausmacht. Dieser kann dann kolorimetrisch vermessen werden und die Intensität der Färbung korreliert im Endeffekt mit der Menge an Antigen und kann mit Hilfe einer Standardgerade des Antigens berechnet werden [180].

In dieser Arbeit wurden Zytokin- und Chemokinkonzentrationen mittels ELISA-Analytik bestimmt. Hierfür wurden die Test-Kits von zwei unterschiedlichen Firmen genutzt, für die Chemo- bzw. Zytokine CXCL8, IL-6, IL-10 und TNF wurden die ELISA Test-Kits der Firma Invitrogen (über Thermo Fisher) verwendet, für IL-1Ra wurde das Test-Kit der Firma Bio-Techne (DuoSet) verwendet. Für beide Kits wurden spezielle 96-Well Platten verwendet, die eine besonders beschichtete Oberfläche besitzen, sodass die Antikörper gut an die Plattenoberfläche binden können (Nunc MaxiSorb 96-Well Platten). Die Platten wurden mit einem Mikroplatten-Leser (FLUOstar Optima: Ex. Filter ABS 450 BP, 550/10 BP bzw. Mitras² LB 943: 450/10 BP, 560/10 BP) vermessen, wobei die Absorptionswerte der Messungen mit den beiden Filter voneinander subtrahiert wurden. Es wurden die Mittelwerte der Duplikate gebildet und der Blindwert abgezogen. Die Konzentration der Proben wurde anhand der Geradengleichung ermittelt, die sich aus der Messung Standardverdünnungsreihe ergab.

2.4.5.1 ELISA Test-Kits Invitrogen über Thermo Fisher, unbeschichtet

Die 96-Well Platten wurden am Abend zuvor mit dem Capture-Antikörper beschichtet. Hierfür wurde der jeweilige Capture-Antikörper im Verhältnis 1:250 mit dem Beschichtungspuffer, der zuvor im Verhältnis 1:10 mit doppelt demineralisiertem Wasser gemischt wurde, verdünnt. Es wurden 100 µl mit Hilfe einer Multikanalplatte in jedes Well pipettiert, die Platte mit Parafilm abgedeckt und über Nacht im Kühlschrank bei 4 °C gelagert. Am folgenden Tag wurde die Antikörperlösung entfernt und die Platte mit dem ELISA-Waschpuffer (Tab. 2-28) 3 Mal gewaschen. Dies erfolgte händisch oder mittels eines Plattenwaschgeräts. Beim manuellen Waschen wurde der Waschpuffer vorsichtig über die Platte gegossen, die Platte kurz angeklopft und der Puffer wieder ausgekippt. Dann wurde die Platte auf Zellstofftüchern trocken geklopft und der Waschschrift für weitere 2 Male wiederholt. Beim

automatischen Waschen wurde für den Waschschrift ein Plattenwaschgerät verwendet (WellWash), welches automatisch den Puffer in die Wells füllte, die Platte schüttelte und den Puffer wieder absaugte. Anschließend wurde die Platte ebenfalls kurz trocken geklopft. Der Blockierungs-Puffer (5x ELISA/ELISPOT Diulent) wurde 1:5 mit doppelt demineralisiertem Wasser verdünnt und jeweils 200 µl mit einer Multikanalpipette in die einzelnen Wells pipettiert. Nach einer Inkubationszeit von mindestens einer Stunde bei Raumtemperatur wurde der Blockierungs-Puffer entfernt. In der Zwischenzeit wurde der lyophilisierte Standard wie auf dem jeweiligen Gefäß bzw. im Analysenzertifikat angegeben in doppelt demineralisiertem Wasser rekonstituiert und für 15 - 30 Minuten auf dem Schüttler geschüttelt. Anschließend wurde mit dem Blockierungs-Puffer eine Standardreihe (Tab. 2-26) hergestellt. Die Proben wurden ebenfalls, soweit nötig, mit Blockierungs-Puffer verdünnt. Die Platte wurde, wie oben beschrieben gewaschen, trocken geklopft und jeweils 100 µl des Standards bzw. der Proben in Duplikaten auf die Platte pipettiert. Nach zwei-stündiger Inkubationszeit bei Raumtemperatur wurde die Platte erneut wie beschrieben gewaschen und trocken geklopft und der biotinylierte Detektions-Antikörper 1:250 in Blockierungs-Puffer verdünnt. 100 µl des verdünnten biotinylierten Detektions-Antikörpers wurden mit einer Multikanalpipette in jedes Well gegeben und erneut für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneutem Waschen und trocknen der Platte wurde das Avidin-HRP Konzentrat 1:250 in Blockierungs-Puffer verdünnt und 100 µl je Well pipettiert. Nach 30 Minuten Inkubationszeit bei Raumtemperatur wurde die Platte abermals gewaschen und getrocknet und 100 µl der TMB-Substratlösung hinzugegeben und unter Lichtausschluss für 5-15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, bis eine deutliche Abstufung der Färbung des Standards erkennbar war. Die Reaktion wurde mit 50 µl je Well ELISA-Stopp-Lösung (Tab. 2-29) gestoppt und die Platte vermessen.

2.4.5.2 ELISA Test-Kits DuoSet von Bio-Techne

Für die ELISA-Kits der Firma Bio-Techne (DuoSet) wurden die zuvor rekonstituierten Reagenzien und Antikörper aufgetaut. Die Platten wurden am Abend zuvor mit dem *Capture*-Antikörper beschichtet. Hierfür wurde der *Capture*-Antikörper, wie im Analysenzertifikat angegeben, mit PBS verdünnt und je Well 100 µl pipettiert. Am nächsten Tag wurde die Platte, wie unter Kapitel 2.4.5.1 beschrieben, gewaschen, getrocknet und mit 300 µl/ Well des Verdünnungs-/Blockierungs-Puffers (Tab. 2-30) für eine Stunde bei Raumtemperatur geblockt. Der Standard wurde, wie in Tabelle 2-26 beschrieben, verdünnt und die Proben, wenn nötig, mit dem Verdünnungs-/Blockierungs-Puffer verdünnt. Nach dem Waschen und Trocknen der Platte wurden jeweils 100 µl des Standards bzw. der Proben als Duplikate pro Well pipettiert und 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. In der Zwischenzeit wurde der Detektions-Antikörper wie im Analysenzertifikat angegeben in Verdünnungs-/Blockierungs-Puffer verdünnt und nach dem Waschen und Trocknen der Platte jeweils 100 µl je Well auf die Platte gegeben. Nach einer Inkubationszeit von 2 Stunden bei Raumtemperatur wurde die Platte erneut gewaschen, trocken geklopft, das Streptavidin-HRP Enzym 1:40 in Verdünnungs-/Blockierungs-Puffer verdünnt und

100 µl/ Well hinzu pipettiert. Nach einer Inkubationszeit von 20 Minuten bei Raumtemperatur und anschließendem Waschen und Trocken klopfen wurde die TMB-Substrat-Lösung (Tab. 2-33) hinzugegeben, wobei wieder 100 µl/ Well verwendet wurden. Unter Lichtausschluss wurde für 5-15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, bis eine deutliche Abstufung der Färbung des Standards erkennbar war. Die Reaktion wurde mit 50 µl je Well ELISA-Stopp-Lösung (Tab. 2-29) gestoppt und die Platte vermessen.

2.4.6 PCR-Analytik

Die PCR-(Polymerase-Ketten-Reaktion-)Analytik ist eine sehr sensitive Methode, um spezifische DNA-Fragmente eines großen DNA-Pools zu vervielfältigen und zu identifizieren. Die Reaktion läuft dabei in 4 Schritten ab: Im ersten Schritt werden die Proben soweit hochgeheizt, dass der Schmelzpunkt der DNA-Vorlage erreicht wird und die beiden komplementären DNA-Stränge sich voneinander trennen. Dieser Schritt wird auch als Denaturierung bezeichnet. Im zweiten Schritt, der Hybridisierung oder dem *Annealing*, wird die Temperatur soweit heruntergekühlt, dass die Primer, die als kurze DNA Fragmente den Startpunkt markieren, an die einsträngige DNA-Vorlage binden können. Die Temperatur wird wieder erhöht, sodass die DNA-Polymerase die einzelnen Nukleotide an die Primer anbauen kann, es entsteht schließlich ein komplementärer DNA-Strang. Dieser Schritt wird auch als Extension bezeichnet. Eine Wiederholung aller Schritte wird als Zyklus bezeichnet. Bei jedem Zyklus wird die Anzahl der kopierten DNA-Moleküle jeweils verdoppelt.

Zur Qualifizierung der PCR können die amplifizierten Proben durch Gelelektrophorese aufgetrennt werden und mit Hilfe eines interkalierenden Farbstoffes wie Ethidiumbromid oder auch SYBR Green auf dem Gel angefärbt werden. Die Anwesenheit und die Intensität der einzelnen Banden im Vergleich zu einem DNA-Leiter lassen auf die (vermehrte) Expression bestimmter Gene schließen. Diese Methode wurde in dieser Arbeit für die Feststellung von Mykoplasmen-Kontaminationen der eingesetzten Zellkulturen verwendet (Kap. 2.2.6). Zur Qualifizierung und Quantifizierung kann statt der herkömmlichen PCR eine quantitative (qPCR) durchgeführt werden, die die Amplifizierung in Echtzeit misst und quantifiziert [181].

Da Enzyme, die RNA und DNA abbauen (RNasen und DNasen) per se überall vorkommen können, ist bei allen im Folgenden beschriebenen Schritten darauf zu achten, Verbrauchsmaterialien zu benutzen, die DNase und RNase frei sind und für die PCR geeignet sind. Dies betrifft insbesondere die 1,5 ml Reaktionsgefäße als auch die Pipettenspitzen, wobei nur Filterspitzen eingesetzt werden sollten. Wasser für die Reaktionen sollte PCR-rein sein oder zuvor mit DEPC (Diethylpyrocarbonat)-Lösung behandelt werden (Tab. 2-34), um mögliche vorkommende DNasen und RNasen zu zerstören. Mit Ausnahme des Mykoplasmen-Tests, wurde die Hoch- und Runterregulation sowie das Vorhandensein bestimmter Gene mittels qPCR untersucht. Es wurden cDNA (komplementäre Desoxyribunukleinsäure, *complementary*

deoxyribonucleic acid) Proben als DNA-Vorlage verwendet, wobei die hierfür benötigte RNA zunächst isoliert und in einem weiteren Schritt in cDNA umgeschrieben wurde.

2.4.6.1 RNA- Isolation

Die RNA-Isolation erfolgte mit dem innuPREP RNA Mini Kit 2.0 der Firma Analytik Jena. Für die Probengenerierung wurden die Zellen wie oben beschrieben in 24-Well Platten einsät und je nach Zellart ausdifferenziert. Nach der Inkubation mit bestimmten Stimuli wurde der Überstand entfernt und 400 µl der im Kit enthaltenen Lysis Solution RL hinzugegeben und für 2 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde mit Hilfe einer 1000 µl Pipette das Lysat hoch und runter pipettiert und hierdurch homogenisiert. Nach weiteren 3 Minuten Inkubationszeit wurde das Lysat in 1,5 ml Reaktionsgefäßen (PCR-rein) gesammelt und entweder bei -20 °C weggefroren oder gleich weiterverwendet. Hierfür wurde das Lysat auf den blauen Filter (Spin Filter D) gegeben und dieser samt eines Auffanggefäßes bei 11 000 g für 2 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert. Die Filter mit der aufgefangenen genomischen DNA (gDNA) wurde verworfen und das Eluat mit 400 µl 70 %igen Ethanol in DEPC-Wasser (Tab. 2-35) hinzu pipettiert, gemischt und anschließend auf einen pinken Filter (Spin Filter R) gegeben, unter dem sich ein neues Reaktionsgefäß befand. Filter und Reaktionsgefäß wurden erneut bei 11 000 g für 2 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert und das Filtrat verworfen. Die Washing Solution HS wurde wie auf der Flasche beschrieben mit absolutem Ethanol gemischt und 500 µl dieser Mischung auf den Filter pipettiert, unter dem sich ein neues Reaktionsgefäß befand. Es wurde erneut bei 11 000 g für 1 Minute bei Raumtemperatur zentrifugiert und das Filtrat verworfen. Die Wasching Solution LS wurde wie auf der Verpackung angegeben mit absolutem Ethanol gemischt und 700 µl dieser Mischung auf den Filter pipettiert, unter dem sich ein neues Reaktionsgefäß befand. Nach der Zentrifugation bei 11 000 g für 1 Minute bei Raumtemperatur wurde das Filtrat verworfen und der Filter auf einem neues Reaktionsgefäß platziert. Zur Entfernung des Ethanols wurde der Filter erneut bei 11 000 g für 3 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert. Das Filtrat wurde verworfen und ein Eluierungs-Reaktionsgefäß unter dem Filter platziert. Es wurde 60 µl RNase-freies Wasser auf den Filter pipettiert, für 1 Minute bei Raumtemperatur inkubiert und die reine RNA bei 11 000 g für 1 Minute bei Raumtemperatur eluiert. Die RNA wurde auf Eis gelagert und entweder direkt für die cDNA-Synthese verwendet oder bei -80 °C weggefroren.

2.4.6.2 cDNA Synthese

Die cDNA-Synthese schließt sich an die RNA-Isolation an, wobei cDNA die komplementäre DNA zur isolierten RNA ausmacht. Sie wird mithilfe des Enzyms Reverse Transkriptase in einer PCR gebildet und amplifiziert. Hierfür wurde das iScript cDNA Synthese Kit der Firma Bio-Rad verwendet, welches alle notwendigen Komponenten enthält. Zunächst wurden alle Kit Bestandteile aufgetaut und pro

Reaktion/ Probe wie in Tabelle 2-72 beschrieben zu einem so genannten Master-Mix in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß (PCR-rein) auf Eis zusammen gemischt.

Tabelle 2-72: Master-Mix für die cDNA Synthese

Komponente	Volumen pro Reaktion/ Probe in µl
5x iScrip Reaktions Mix	4
iScript Reverse Transkriptase	1
Nuklease-freies Wasser	7

12 µl des Master-Mixes wurden je Probe auf Eis in ein 0,2 ml Reaktionsgefäße (8er Streifen) pipettiert und jeweils 8 µl der RNA-Probe hinzugegeben. Die Reaktionsgefäße wurden kurz zentrifugiert und auf den Heizblocks eine Thermo-Cyclers (Thermocycler T Gradient) oder eines qPCR Gerätes ohne Fluoreszenzmessung (qTower³ G) gestellt und nach dem folgenden Protokoll amplifiziert:

Tabelle 2-73: Reaktionsprotokoll für die cDNA-Synthese

Schritt	Reaktionszeit und -temperatur
Initialschritt (Priming)	5 min bei 25 °C
Reverse Transkription	20 min bei 46 °C
Reverse Transkriptase Inaktivierung	1 min bei 95 °C
Optionaler Schritt	Halten bei 4 °C

Die Proben wurden anschließend mit 60 µl Wasser (PCR-Grad) gemischt und erneut kurz zentrifugiert. Danach wurden die Proben in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß (PCR-rein) pipettiert und bei -20 °C weggefroren oder direkt für die qPCR verwendet.

2.4.6.3 qPCR

Für die qPCR wurde der Farbstoff SYBR Green I verwendet, der an doppelsträngige DNA bindet und ein so ein messbares Fluoreszenzsignal aussendet. Für qPCR wurde der iTaq Universal SYBR Green Supermix der Firma Bio-Rad verwendet. Dieser ist ein fertiger, 2x konzentrierter Reaktionsmix, der neben dem interkalierenden Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green I eine DNA-Polymerase, Nukleotide und Magnesiumionen enthielt [182]. Zunächst wurde der Master-Mix hergestellt, indem der iTaq Universal SYBR Green Supermix, die Primer (die jeweiligen Primersequenzen sind in Tabelle 2-80 aufgeführt) sowie Wasser (PCR-Grad) auf Eis in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß (PCR-rein) gemischt wurden (Tab.2-74).

Tabelle 2-74: Master-Mix für die qPCR

Komponente	Volumen pro Probe in µl
iTaq SYB Green Supermix	5
Spezifischer Primer, vorwärts	0,5
Spezifischer Primer, rückwärts	0,5
Wasser (PCR-Grad)	2

In einer 96-Well Platte (PCR-rein) wurden je Probe 8 μ l des Master-Mixes und mit 2 μ l der jeweiligen Probe in Duplikaten auf Eis pipettiert. Die Platte wurde mit einer speziellen Abdeckfolie luftdicht verschlossen und für 2 Minuten bei 400 g bei Raumtemperatur zentrifugiert. Die Platte wurde in das qPCR System (LightCycler 480 oder qTOWER³G touch) gestellt und nach dem folgendem Protokoll amplifiziert:

Tabelle 2-75: Reaktionsprotokoll für die cDNA-Synthese

Schritt	Reaktionszeit und -temperatur sowie Heizrate
Vorheizen des Deckels	100 °C
Initialschritt (<i>Priming</i>)	5 min bei 95 °C, 4,4 °C/s
Denaturierung	10 s bei 95 °C, 4,4 °C/s
Annealing	10 s bei 60 °C, 2,2 °C/s
Extension	10 s bei 72 °C, 4,4 °C/s
Schmelzkurve	15 s bei 60 – 95 °C, 1 °C/s

} 45 Zyklen

Die Auswertung erfolgte anschließend mit Hilfe des jeweiligen Auswertungsprogramms des qPCR Systems nach der $\Delta\Delta$ Ct-Methode. Hierfür wurden zunächst die beiden Ct-Werte des Target- und des jeweilige Haushaltgens voneinander subtrahiert (Δ Ct) und anschließend noch die Differenz des Δ Ct-Wertes der behandelten Probe zum Δ Ct-Wert der unbehandelten Kontrolle gebildet ($\Delta\Delta$ Ct). Der erhaltene Wert wurde dann in die Gleichung der n-fachen Expression eingesetzt ($2^{-\Delta\Delta$ Ct}).

Tabelle 2-76: Verwendete Primer-Sequenzen

Primer	Sequenz
CXCL8, rückwärts	5'-GTCCACTCTCAATCACTCTCAG-3'
CXCL8, vorwärts	5'-CAAGAGCCAGGAAGAAACCA-3'
GAPDH, rückwärts	5'-TGAGCGATGTGGCTCGGCT-3'
GAPDH, vorwärts	5'-CTCTCTGCTCCTCCTGTTCCGAC-3'
IL-1R2, rückwärts	5'-TAGTGCAGACGTAGGTGCCA-3'
IL-1R2, vorwärts	5'-CATTACAAGCGGGAGTTCAG-3'
IL-1Ra, rückwärts	5'-AAGGTCTTCTGGTTAACATCCC-3'
IL-1Ra, vorwärts	5'-CTCCTCTTCCTGTTCCATTCAG-3'
YWHAZ, rückwärts	5'-GAAGCATTGGGGATCAAGAA-3'
YWHAZ, vorwärts	5'-AGACGGAAGGTGCTGAGAAA-3'

2.4.7 Western Blot Analytik

Die Western Blot Analytik dient dem qualitativem und semi-quantitivem Nachweis von bestimmten Proteinen aus einer komplexen Proteinmischung. Für die Durchführung in der Zellkultur müssen im Rahmen der Probenvorbereitung die Zellen zunächst lysiert werden, die Proteinmenge bestimmt werden und die Proteine denaturiert werden. In einem weiteren Schritt werden die Proteine der Größe nach mittels Gelelektrophorese aufgetrennt und die so enthaltenen Proteinbanden des Gels schließlich auf eine Membran transferiert. Dieser Schritt wird als eigentliches *Blotting* bezeichnet. Die Membran kann anschließend mit Antikörpern inkubiert werden, die spezifisch an das gesuchte Protein binden. Mit Hilfe

eines Sekundärantikörpers, der entweder mit einem Enzym gekoppelt ist (meist ist dies ähnlich wie bei der ELISA-Analytik HRP) oder mit einem Fluoreszenzfarbstoff. Das Substrat ECL (erhöhte Chemiluminiszenz), welches ein Luminolderivat ist, das im basischen durch Oxidation des HRP zu einem chemiluminiszierenden Produkt umgesetzt werden kann, kann am Ende mit Hilfe eines Geldokumentationssystems detektiert werden [183].

2.4.7.1 Probenvorbereitung

Die jeweiligen Zellen wurden wie bereits beschrieben in 6-Well Platten eingesät, ausdifferenziert und stimuliert. Nach Ende der Inkubationszeit wurde das Medium abgesaugt und die Zellen pro Well mit 2 ml kaltem PBS gewaschen. Anschließend wurde jeweils 100 µl des frisch hergestellten RIPA-Puffers (Tab. 2-36) auf die Zellen gegeben, die Platte auf Eis gestellt und für 30 Minuten auf dem Schüttler lysiert. Der Erfolg der Lyse wurde mit dem Phasenkontrastmikroskop kontrolliert und die noch adhärenen Zellüberreste mit Hilfe eines Zellschabers abgelöst. Der komplette Inhalt des Wells wurde in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und die Proben auf Eis gestellt. Anschließend wurde das Zelllysate für 30 Minuten bei 18 500 g bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde anschließend vorsichtig in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und das Pellet verworfen. Die Proben wurden entweder auf Eis gelagert oder bei -20 bis -80 °C eingefroren. 12 µl der Proben wurden direkt für die Bestimmung der Proteinmenge (Kap. 2.4.7.2) verwendet. Von der verbleibenden Probe wurde das Volumen bestimmt und im Verhältnis 1:3 mit dem DTT/Ladepuffer-Mix (Tab. 2-44) gemischt, der zuvor ausgehend vom benötigten Volumen frisch hergestellt wurde. Die Proben wurden bei 95-100 °C für 5 Minuten denaturiert und anschließend auf Eis gekühlt. Dabei konnte das im DTT/Ladepuffer enthaltene SDS (Natrium Dodecylsulfat) an die hydrophoben Regionen der Proteine binden und so dafür sorgen, dass am Ende alle Proteine gleich stark negativ geladen sind. Unter Erhitzen sorgt es, zusammen mit dem Reduktionsmittel DTT, für die vollständige Denaturierung der Proteine [184]. Nach dem Zentrifugieren (18 500 g, 5 Minuten bei 4 °C) wurden die Proben entweder direkt für die Gelelektrophorese verwendet (Kap. 2.4.7.3) oder bei -20 bis -80 °C bis zur Verwendung weggefroren.

2.4.7.2 Bestimmung der Proteinmenge

Da bei der anschließenden Gelelektrophorese in jede Tasche des Gels die gleiche Menge an Protein geladen werden soll, musste zunächst die Gesamtproteinmenge der Proben bestimmt werden. Hierfür wurden die bei der Probenvorbereitung (Kap. 2.4.7.1) entnommenen 12 µl mit 48 µl RIPA-Basalpuffer (Tab. 2-37) gemischt und so im Verhältnis 1:5 verdünnt. Die Proteinbestimmung erfolgte mit einem BCA (Bicinchoninsäure) Kit der Firma Thermo Fisher (Pierce BCA Protein Assay). BCA bildet mit Proteinen einen wasserlöslichen Chelat-Komplex, der Licht einer Wellenlänge von 562 nm absorbiert. Die Proteingehalt korreliert dabei mit der Menge des entstehenden BCA-Komplexes und lässt sich mit Hilfe einer Standardgerade berechnen [185]. Die Standards A-I wurden dabei wie in Tabelle 2-45 beschrieben

hergestellt. Für die Reaktionslösung wurde Lösung A (Reagent A) und Lösung B (Reagent B) im Verhältnis 50:1 gemischt. In eine 96-Well Platte wurde jeweils 25 µl der Standards bzw. der verdünnten Proben in Duplikaten pipettiert. Anschließend wurde mit Hilfe einer Multikanal-Pipette in jedes Well 200 µl der Reaktionslösung gegeben und für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurde die Platte für 30 Minuten auf Raumtemperatur gekühlt und mit Hilfe eines Mikroplatten-Lesers (FLUOstar Optima: Ex. Filter 550/10 BP bzw. Mitras² LB 943: 560/10 BP) vermessen. Der Blindwert wurde von allen Proben abgezogen und die Konzentrationen mit Hilfe der Geradengleichung der Standardreihe ermittelt.

2.4.7.3 SDS-PAGE (Gelelektrophorese)

Die SDS-PAGE beschreibt eine SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese. Durch die Aufhebung der Ladungsunterschiede der Proteine können diese der Größe nach im elektrischen Feld in einem Polyacrylamidgel aufgetrennt werden. Es erfolgt also eine Größentrennung der Proteine von groß nach klein [186].

Das Gel wurde wie in Tabelle 2-50 und 2-51 beschrieben gegossen, in die Elektrophoresekammer (Gelelektrophoresesystem Mini-PROTEAN Tetra Cell) eingespannt und die Kammer mit ausreichend Laufpuffer gefüllt, wobei dieser zuvor 1:10 aus der Stocklösung (Tab. 2-52) verdünnt wurde und der pH-Wert auf 8,3-8,6 eingestellt wurde. Der Kamm wurde entfernt und jede einzelne Tasche kurz mit Hilfe einer 100 µl Pipette mit Laufpuffer gespült. Je Tasche wurden 20 µg Protein sowie 3 µl des vorgefärbten Proteinleiters aufgetragen. Die leeren Taschen wurden mit ca. 10 µl des Ladepuffers (Tab. 2-42) gefüllt, sodass möglichst ein gerades Laufen der Proben erzielt wurde. Es wurde zunächst eine konstante Spannung von 100 V angelegt. Nach ca. 15 Minuten sammelten sich die Proteine an der Grenzfläche von Sammel- und Laufgel, sodass die Spannung auf 150-200 V erhöht wurde. Die Elektrophorese wurde beendet, sobald die Bromphenolblau-Bande des Ladepuffers das Ende des Gels erreicht hatte. Dies war in der Regel nach ungefähr einer Stunde der Fall. Die Glasplatten wurden vorsichtig aus der Apparatur genommen und mit Hilfe eines Schiebers geöffnet. Das Sammelgel wurde entfernt und das verbelibende Laufgel in Transfer-Puffer, der zuvor 1:10 verdünnt wurde (Tab. 2-53) bis zum Transfer-Schritt (Kap. 2.4.7.4) eingelegt.

2.4.7.4 Protein-Transfer (Western Blot)

Beim eigentlichen Transfer-Schritt erfolgte schließlich die Übertragung der aufgetrennten Proteine auf eine Membran im elektrischen Feld (Elektrotransfer), die schließlich mit den jeweiligen Antikörpern detektiert werden konnten. Hierfür wurde eine PVDF-(Polyvinylidenfluorid-)Membran verwendet. PVDF ist ein sehr hydrophobes, lineares Polymer mit sich wiederholenden Einheiten von (-CF₂-CH₂-). Durch die Kombination von polaren- und hydrophoben Wechselwirkungen können Proteine sehr gut an die PVDF-Membran binden [187]. Jedoch mussten die PVDF-Membranen auf Grund der starken

hydrophoben Eigenschaften zunächst äquilibriert werden, damit diese überhaupt von den hydrophilem Transferpuffer und den folgenden Antikörperlösungen benetzt werden konnte. Hierfür wurden die Membranen zunächst auf die Größe der Gele zurechtgeschnitten, wobei darauf geachtet wurde, die Membran nicht direkt zu berühren und stattdessen eine Pinzette zu benutzen. Die Membran wurde erst für 20 Sekunden in Methanol (100 %) getaucht, gefolgt von 2 Minuten in doppelt demineralisiertem Wasser und anschließend 5 bis 15 Minuten in Transferpuffer. Außerdem wurde pro Gel zwei passende Filterpapiere (*Blotting Pads*) vollständig mit Transferpuffer getränkt. Der Transfer erfolgte schließlich mit einem Halb-Trockenen-Verfahren (*Semi-Dry Blot*), wobei das Trans-Blot Turbo Transfersystem der Firma Bio-Rad zum Einsatz kam.

Für den *Semi-Dry-Blot* wurde die Kassette aus dem Gerät entnommen und geöffnet. Auf das Unterteil, die Anode, wurde zunächst ein getränktes Filterpapier, dann die Membran, das Gel und ein weiteres getränktes Filterpapier geschichtet. Mit Hilfe einer Rolle wurden mögliche Luftblasen zwischen Gel und Membran vorsichtig entfernt, um eine möglichst vollständige Proteinübertragung zu gewährleisten. Der Deckel wurde aufgelegt und geschlossen und die Kassette in das Gerät geschoben. Für den Transfer wurde das Standardprogramm der Firma Bio-Rad benutzt (25 V, 1 A, 30 Min).

Nach erfolgtem Transfer wurde die Kassette aus dem Gerät entnommen und vorsichtig geöffnet. Die Membran wurde mit Hilfe einer Pinzette in einen Behälter mit ca. 10 ml TBS-T-Puffer (Tab. 2-55) gelegt und so 3 Mal für 5 Minuten auf dem Orbitalschüttler gewaschen. In der Zwischenzeit wurde die Blockierungslösung frisch hergestellt (Tab. 2-56) und die Membranen am Ende der Waschschriffe mit jeweils 10 ml Blockierungslösung für eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Der Blockierungsschritt sorgte dabei dafür, die unspezifischen Bindungen der Antikörper bei der anschließenden Inkubation mit den Primärantikörpern zu minimieren. Nach erneutem 3-maligen Waschen der Membran wie oben beschrieben, wurde diese mit 10 ml der jeweiligen Primärantikörper-Lösung (Tab. 2-57) über Nacht bei 4 °C auf dem Orbitalschüttler inkubiert. Am nächsten Tag wurde der Primärantikörper entfernt und die Membran erneut wie oben beschrieben gewaschen. Im Anschluss wurde die Membran mit 10 ml des HRP-gebundenen Sekundär-Antikörpers für eine Stunde bei Raumtemperatur auf dem Orbitalschüttler inkubiert. Anschließend wurde die Membran, wie bereits beschrieben, gewaschen und mit der ECL-Lösung inkubiert, wobei diese kurz zuvor 1:1 verdünnt wurde. Nach 30 Sekunden wurde die Membran in das Geldokumentationsgerät gelegt und alle 30 Sekunden ein Chemilumineszenz-Bild bis zur Sättigung der Banden aufgenommen. Die Membran wurde im Anschluss daran wieder 3 Mal für 5 Minuten in TBS-T-Puffer gewaschen und eventuell wie oben beschrieben mit einem weiteren Primärantikörper behandelt, wobei als letzter Schritt die Inkubation mit der Ladekontrolle Beta-Aktin erfolgte, einem Haushaltsprotein, das soweit nicht von der Stimulation beeinflusst wurde. Die Auswertung erfolgte über die densitometrische Bestimmung der Banden mit Hilfe der Software ImageJ, wobei dabei zunächst die Banden der einzelnen Proben auf die Ladekontrolle Beta-Aktin bezogen und im Anschluss daran auf die Kontrolle relativiert wurden.

2.4.8 ESR-Spektroskopie

Die ESR(Elektronen-Spin-Resonanz-)Spektroskopie ist ein Verfahren, mit der die Bildung reaktiver Oxidativer Spezies (ROS) in Zellen untersucht werden kann. Dabei wird bei der ESR-Spektroskopie eine Probe in ein äußeres Magnetfeld gebracht und gleichzeitig mit einer Mikrowelle bestrahlt und die resonante Absorption dieser Energie gemessen. Proben, die ein permanentes magnetisches Moment, also ungepaarte Elektronen besitzen, können so vermessen werden. Der so genannte Spin eines ungepaarten Elektrons ist für das permanente magnetische Moment verantwortlich und kann sich, wenn es in ein äußeres Magnetfeld eingebracht wird, parallel oder antiparallel zu diesem ausrichten. Die parallele Ausrichtung besitzt dabei eine höhere Energie als die antiparallele Ausrichtung. Die Energieunterschiede sind dabei proportional zum äußeren Magnetfeld. Die Absorption der Strahlung sorgt so für das Umklappen des Spins, was auch als Resonanz bezeichnet wird, wobei die Frequenz der elektromagnetischen Strahlung genauso groß sein muss, wie der Unterschied der beiden Energiezustände. Das Umklappen des Spins in den parallelen Zustand kann dann detektiert werden. Dabei wird mit einem variablen äußeren Magnetfeld und einer konstanten Frequenz der elektromagnetischen Strahlung gearbeitet. Je mehr ungepaarte Elektronen in der Probe vorhanden sind, desto mehr Strahlung kann absorbiert werden, was zu einem stärkeren Signal führt [188]. Auch Radikale enthalten ungepaarte Elektronen, sodass theoretisch auch ROS direkt detektiert werden können. Da diese aber sehr kurzlebig sind und somit in der Praxis schwer zu messen, werden diese mit so genannten Spinmarkern erfasst. Dies kann z. B. das 2,2,6,6,-Tetramethyl-1-piperidinyloxy (TEMPO) sein. Es besitzt ein freies Elektron und ist sehr lipophil. So kann es von den Zellen gut aufgenommen werden und direkt mit freien Radikalen reagieren und wirkt als Antioxidans. Schon TEMPO alleine gibt somit ein Signal in der ESR-Spektroskopie. Eine Abnahme des TEMPO-Signals korreliert mit der Anwesenheit von ROS in der Zelle [189].

Die Durchführung der Experimente für die ESR-Spektroskopie erfolgte in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Martina Meinke in den Laboren der Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie der Charité Berlin. Für den Versuch wurden die THP-1 Zellen wie bereits beschrieben in 6-Well Platten eingesät und ausdifferenziert. Die Zellen wurden in der Platte mit oder ohne Chloroquin für eine Stunde vorinkubiert und anschließend abgelöst. Hierfür wurde das alte Medium abgesaugt, die Zellen mit 2 ml warmem PBS gewaschen und mit 500 µl TripLE Express für 5 Minuten bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Dabei wurde die Unterseite der Platte geklopft, damit die Zellen sich möglichst vollständig ablösen. Die Reaktion wurde mit 1,5 ml komplettiertem RPMI 1640 Medium gestoppt und die Zellen bei 200 g für 5 Minuten bei Raumtemperatur herunterzentrifugiert und mit 1 ml PBS gewaschen. Die Zellen wurden mit Hilfe einer Neubauerzählkammer gezählt und 1 Millionen Zellen pro Probe in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß gegeben. Die Zellen wurden in 950 µl Glukose-PBS-Lösung (Tab. 2-58) aufgenommen und 50 µl TEMPO-Lösung (Tab. 2-60) und die jeweiligen Stimuli hinzugefügt.

Jeweils 50 µl der Zellsuspension wurden mit Hilfe einer Kapillare aufgenommen und sofort vermessen (Zeitpunkt 0). Die restlichen Zellen wurden auf einem Wasserbad bei 37 °C temperiert. Zunächst wurde alle 6 Minuten sowie nach 30 Minuten alle 15 Minuten 50 µl Zellsuspension mit Hilfe einer Glaskapillare entnommen und vermessen. Die Messung wurde nach 60 Minuten beendet. Als Negativkontrolle wurde die reine TEMPO-Lösung vermessen (950 µl Glukose-PBS-Lösung mit 50 µl TEMPO-Lösung). Für die Positivkontrolle wurden 1 Millionen Zellen nach dem Ablösen und Waschen in 950 µl Glukose-PBS-Lösung aufgenommen, 50 µl TEMPO-Lösung hinzugefügt und für 46,2 Sekunden mit UV-Licht bestrahlt. Als Blindwert wurde vor der Messung die Kapillare ohne Inhalt vermessen. Für die Messung wurde ein X-Band ESR Spektrometer (MiniScope MS 400) mit einer Temperiereinheit (BTC01) der Firma Magnetech verwendet. Dabei wurden die in Tabelle 2-77 beschriebenen Einstellungen verwendet.

Tabelle 2-77: Einstellungen des X-Band ESR Spektrometer (MiniScope MS 400)

Parameter	Wert
Frequenz	9,5 GHz
Mikrowellenstärke	10 mW
Magnetische Feldstärke	336 mT
Bandbreite des Magnetisches Feldes	6 mT
Modulationsamplitude	0,2 mT
Signalverarbeitung	20 s

Nach der Untersuchung wurde die Zellviabilität der Zellen mittels Trypan Blau ermittelt (Kap. 2.4.4.1). Die Signalintensität der einzelnen Proben wurde schließlich für die Auswertung auf die Signalintensität der Kontrolle bezogen.

2.4.9 SEAP-Reporter-Test

Der SEAP-Reporter-Test ist eine Methode, um die transkriptionelle Aktivität in eukaryotischen Zellen in Abhängigkeit bestimmter Stimuli zu untersuchen. Das SEAP- (sekretierte Alkalinphosphatase-) Gen translatiert dabei für ein Enzym, das im alkalischen eine große Anzahl an Substraten umsetzen kann. Das SEAP-Reporter-gen wird dabei in die Zelle transfiziert und ist an eine bestimmte Promoterregion des Genoms gebunden. Eine Aktivierung der jeweiligen Genabschnitte durch die korrespondierenden Transkriptionsfaktoren führt zur Freisetzung von SEAP, das schließlich ein zugegebenes Substrates kolorimetrisch umsetzt, das dann wiederum vermessen werden kann [190].

Die in dieser Arbeit verwendeten HEK blue IL-1β Zellen waren neben dem IL-1 Rezeptor ebenfalls mit einem SEAP-Reporter-Gen transfiziert, dass durch antriggern des IL-1 Signalwegs zur Freisetzung des Enzyms ins Zellkulturmedium führte. HEK blue IL-1β Zellen wurden wie unter Kapitel 2.2.5.2 in mit Polylysin beschichtete 96-Well Platten eingesät und als Duplikate mit den jeweiligen Stimuli inkubiert. Das SEAP-Substrat Quanti-Blue (Kap. 2.1.3.10) wurde entsprechend hergestellt und je 200 µl pro Well in einer 96-Well Platte mit Hilfe einer Multikanalpipette vorgelegt. Jeweils 20 µl des

Zellkulturüberstandes wurde am Ende der Inkubationszeit hinzu pipettiert, wobei reine Quanti-Blue-Lösung als Blindwert genommen wurde. Als Positivkontrolle wurden die Zellen mit 10 ng/ml rh-IL-1 β stimuliert. Die Proben wurden im Brutschrank bei 37 °C inkubiert, wobei alle 5 Minuten mit dem Mikroplatten-Leser (FLUOstar Optima: Ex. Filter 640/10 BP bzw. Mitras² LB 943: 620/10 BP) gemessen wurde, bis für die Positivkontrolle eine Absorption von 0,8-1,2 gemessen wurde.

2.5 Statistik

Im Ergebnisteil wurde, bis auf wenige Ausnahmen, die Ergebnisse von mindestens 3 unabhängigen Experimenten zusammengefasst, wobei die Mittelwerte + oder \pm der Standardabweichung (SD, *standard deviation*) dargestellt sind.

Die statistische Auswertung erfolgte mittels GraphPad Prism 8. Unter der Annahme einer Normalverteilung wurden beim Vergleich von zwei Gruppen der Einstichproben-t-Test (ungepaart) angewendet. Beim Vergleich von mehr als zwei Gruppen wurde in Abhängigkeit von der Anzahl der unabhängigen Variablen mittels Ein- bzw. Zweifaktorieller Varianzanalyse, gefolgt vom Bonferoni-Test, auf signifikante Unterschiede geprüft.

Die Signifikanzniveaus in den Abbildungen sind folgendermaßen zu verstehen: * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$ und *** $p \leq 0,001$, jeweils zwischen zwei verglichenen Proben.

3. Ergebnisse

3.1 Charakterisierung und Differenzierung von Makrophagen und Monozyten

Aktuelle Untersuchungen der Arbeitsgruppe beschäftigen sich mit der Beteiligung von Langerhans-Zellen sowie dermalen Dendritischen Zellen am Entzündungsgeschehen. Für beide Zelltypen konnte bereits gezeigt werden, dass diese *in vitro* sehr unterschiedlich auf virale und bakterielle Antigene sowie entzündliche Reize reagieren [155]. Außerdem sind sie im unterschiedlichen Ausmaß an der Immunantwort auf lysosomotrope Stoffe beteiligt [156, 157]. Da sich die folgende Arbeit mit Makrophagen als einen weiteren wichtigen Zelltyp des angeborenen Immunsystems beschäftigt [11], mussten zunächst geeignete *in vitro* Modelle gefunden und etabliert werden. Hierfür wurde zum einen THP-1 Zellen als eine weit verbreitete humane Monozytenzelllinie, die in einem weiteren Schritt zu makrophagenähnlichen Zellen ausdifferenziert wurden, eingesetzt. Zum anderen konnten primäre humane Makrophagen aus peripheren mononukleären Blutzellen (PBMCs) generiert werden. Für die Charakterisierung dienten spezifische Oberflächenmarker, die die gewünschten Zellpopulationen an ihrer Oberfläche exprimierten sowie die Feststellung einer adäquaten Immunantwort auf inflammatorische Stimuli [191].

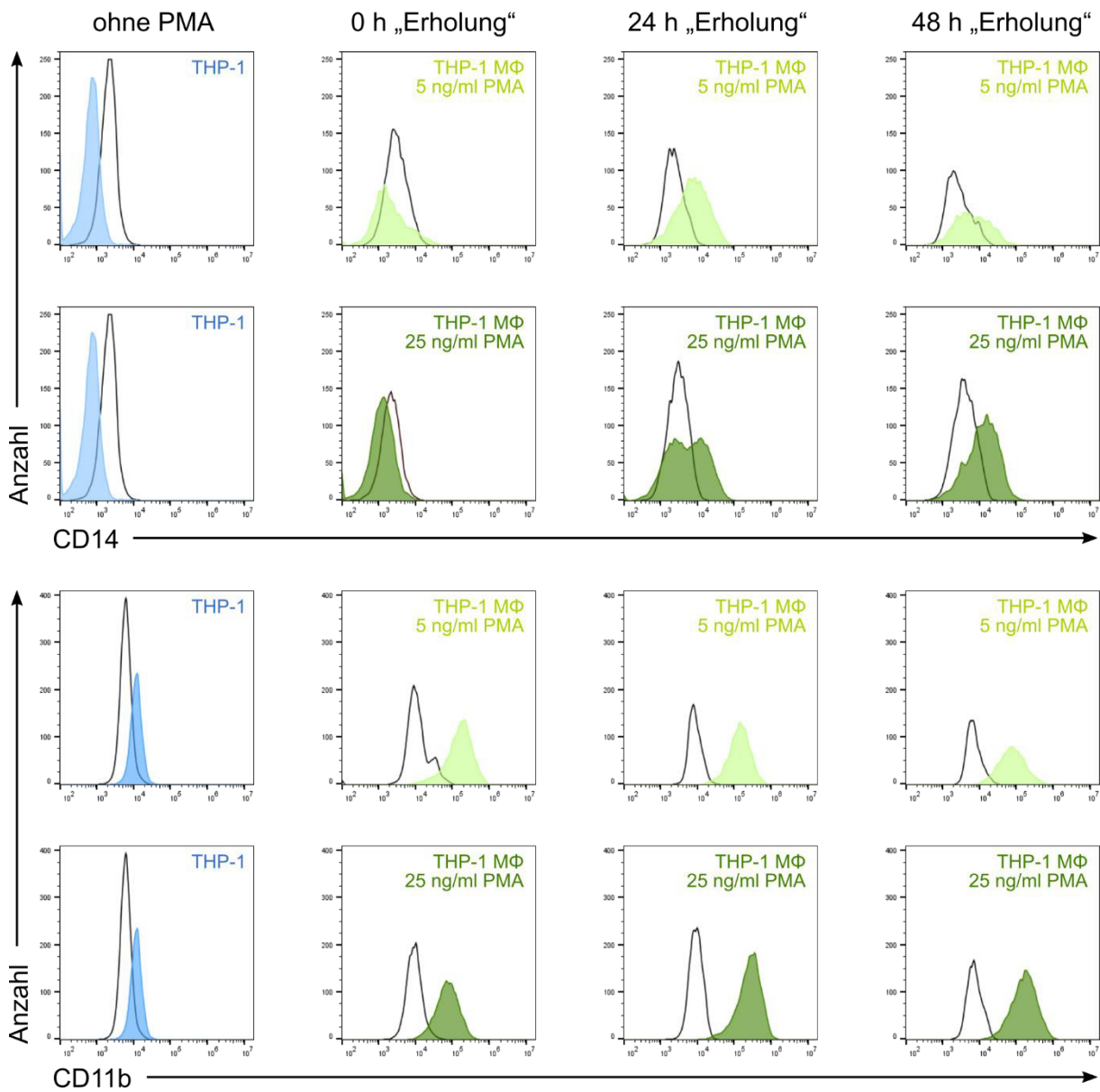
3.1.1 THP-1 Monozyten und THP-1 Makrophagen

THP-1 Zellen (THP-1) und die aus ihnen generierten Makrophagen (THP-1 M ϕ) sind weitreichend genutzte einfache Zelllinienmodelle, um molekulare (immunologische) Prozesse in *in vitro* Experimenten zu untersuchen. Dabei wird zur Differenzierung der Monozyten zu Makrophagen am häufigsten Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) verwendet [167]. Trotz der vielfachen Anwendung unterscheiden sich die in der Literatur verwendeten Differenzierungsmethoden mit PMA stark. Häufig findet man sehr unterschiedliche PMA-Konzentrationen sowie Stimulationszeiten. Teilweise wird auf eine anschließende Ruhephase mit PMA-freiem Medium verzichtet oder die Zeitspannen der Ruhephasen sind sehr unterschiedlich [192]. Es wird jedoch vielfach darauf hingewiesen, dass sowohl zu hohe PMA-Konzentrationen als auch das Auslassen einer Ruhephase nach der PMA-Exposition, zu einer Hochregulation bestimmter, durch NF κ B induzierter Gene führen kann. Hierdurch kann zum Beispiel der eigentliche Effekt von inflammatorischen Stimuli überdeckt und maskiert werden [192]. Dies macht es unumgänglich, die für die eigenen Laborvoraussetzungen optimalen Versuchsbedingungen ausfindig zu machen und eine geeignete Methode zu etablieren.

Die als Suspensionszellen vorliegenden THP-1 Monozyten wurden mit zwei verschiedenen PMA-Konzentrationen (5 und 25 ng/ml) über 48 Stunden als am häufigsten in der Literatur verwendeten Expositionszeit [193] behandelt. Anschließend wurden sie unterschiedlichen Erholungszeiten (0, 24 und 48 Stunden) ausgesetzt. Hierbei wurde jeweils die Expression der für THP-1 Makrophagen typischen Oberflächenmarker CD14 und CD11b [192, 194-196] bestimmt. Es zeigte sich, dass für beide PMA-

Konzentrationen eine bestmögliche, der Literatur entsprechende Expression von CD14 und CD11b nach einer Erholungszeit in PMA-freien Medium von 24 Stunden erreicht werden konnte (Abb. 3-1 A). Auf Grundlage dessen wurde unter diesen Bedingungen die TNF-Sekretion nach Stimulation mit unterschiedlichen LPS-Konzentrationen gemessen. THP-1 Makrophagen schütteten hierbei eine von der LPS-Konzentration unabhängige TNF-Menge aus, die bei einer Differenzierung mit 25 ng/ml PMA fast drei Mal so hoch war, wie bei dem Einsatz von 5 ng/ml. Außerdem zeigte sich besonders für die höhere PMA-Konzentrationen im Medium eine von den THP-1 Monozyten abweichende TNF Sekretion. (Abb. 3-1 B).

A



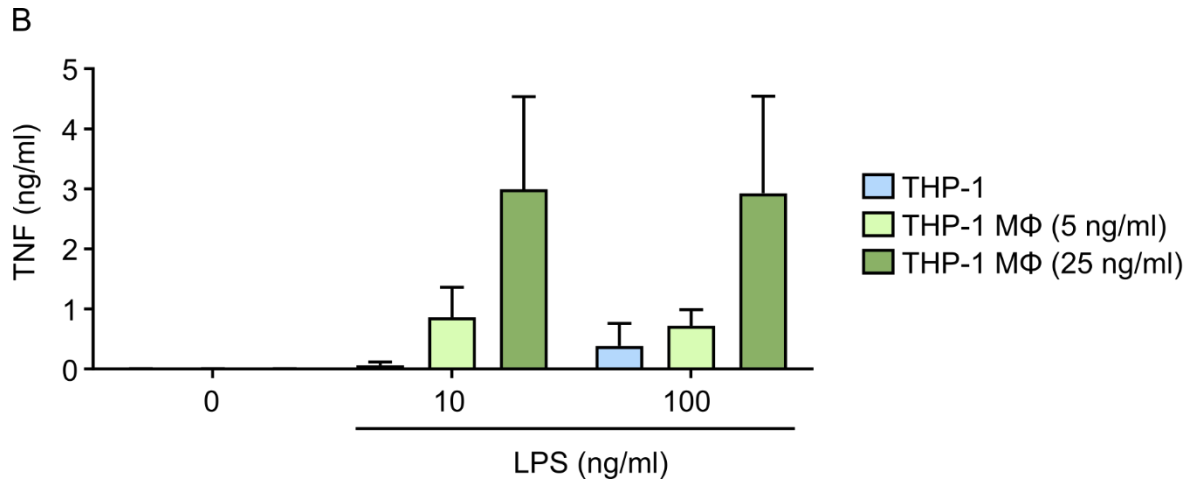


Abbildung 3-1: Aus THP-1 Monozyten generierte Makrophagen exprimieren typische Differenzierungsmarker und reagieren auf pro-inflammatorische Stimuli. (A) THP-1 Monozyten wurden ohne, mit 5 oder 25 ng/ml PMA für 48 Stunden behandelt. Anschließend wurde eine Erholungsphase in PMA-freiem Medium von 0, 24 oder 48 Stunden angeschlossen und die Veränderung der Expression der beiden Oberflächenmarker CD14 und CD11b (farbige Kurven) im Vergleich zu den jeweiligen Isotypenkontrollen (schwarze Kurven) mittels Durchflusszytometrie gemessen. Die Diagramme sind repräsentativ für 3 unabhängige Experimente. (B) THP-1 Monozyten wurden unbehandelt (THP-1) oder nach 48-stündiger Behandlung mit 5 oder 25 ng/ml PMA mit anschließender Ruhephase von 24 Stunden in PMA-freiem Medium (THP-1 MΦ) mit verschiedenen LPS-Konzentrationen behandelt. Die TNF-Sekretion in den Zellkulturüberständen wurde nach 3 Stunden mittels ELISA bestimmt. Das Balkendiagramm zeigt den Mittelwert + SD (n = 3). Die Abbildung ist ein modifizierter Nachdruck nach [197] mit freundlicher Erlaubnis von Elsevier.

Auf Grund dieser Ergebnisse wurde erfolgreich eine Differenzierungsmethode für THP-1 Makrophagen aus THP-1 Monozyten etabliert und in weiteren Experimenten angewendet (Abb. 3-2).

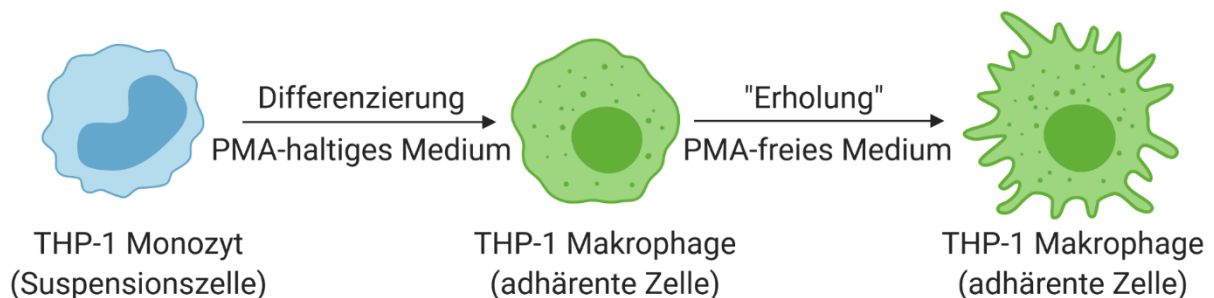
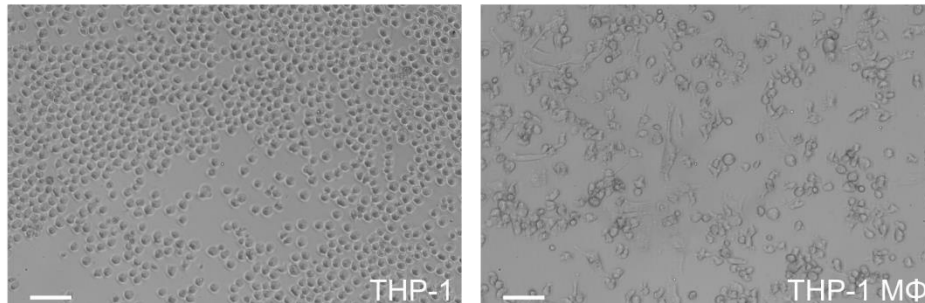


Abbildung 3-2: Schematische Darstellung der Differenzierung von THP-1 Monozyten zu THP-1 Makrophagen. Die als Suspensionszellen vorliegenden Monozyten wurden für 48 Stunden mit PMA-haltigem Medium (25 ng/ml) zu adhärenen THP-1 Makrophagen differenziert. Eine Erholungsphase von 24 Stunden mit PMA-freiem Medium wurde hieran angeschlossen, um die für die weiteren Behandlungen maturierten Makrophagen zu erhalten.

Die generierten THP-1 Makrophagen zeigten eine charakteristische Morphologie mit typischen Ausläufern zu den Seiten und waren adhären, während THP-1 Monozyten eine runde Form besaßen und als Suspensionszellen vorlagen (Abb. 3-3 A). Die unterschiedliche Morphologie konnte auch im Durchflusszytometer nachgewiesen werden. THP-1 Makrophagen zeigten eine erhöhte Granularität

(Verschiebung des SSC Signals nach oben) und eine erweiterte Zellgröße (Verschiebung des FSC Signals nach rechts), wie in Abbildung 3-3 B zu sehen ist.

A



B

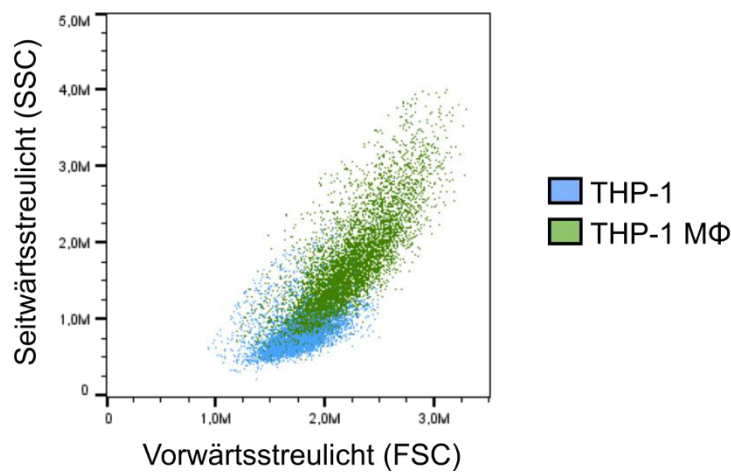


Abbildung 3-3: Morphologische Unterschiede von THP-1 Monozyten und THP-1 Makrophagen. THP-1 Monozyten (THP-1) zeigten unbehandelt oder nach 48-stündiger Behandlung mit 25 ng/ml PMA und anschließender Ruhephase von 24 Stunden in PMA-freiem Medium (A) unter dem Phasenkontrastmikroskop eine runde Morphologie (THP-1) oder typische Ausläufer zu allen Seiten (THP-1 M ϕ) sowie (B) eine unterschiedliche Verteilung im Dot Plot bei der Messung mittels Durchflusszytometrie. Bilder und Daten sind repräsentativ für 3 unabhängige Experimente. (A) Maßstabsskala entspricht 100 μ m.

3.1.2 Primären Makrophagen aus peripheren, mononukleären Blutzellen

Im Blut zirkulierende Monozyten können *in vivo* in Entzündungsorte migrieren und sich dort in Abhängigkeit der Umgebungsbedingungen zu Makrophagen entwickeln [11]. Dies macht es möglich, Monozyten aus humanem Blut zu isolieren und diese dann *in vitro* zu Makrophagen zu differenzieren. Für die Gewinnung von primären Monozyten aus humanem Blut existieren dabei zahlreiche Protokolle und Methoden. Diese inkludieren z. B. die Dichtezentrifugation, die Adhärenz der Zellen an Plastik sowie die Isolation auf Grund spezifischer Oberflächenmarker oder eine Kombination dieser Methoden [198]. Ausgehend von Buffycoat-Blutproben wurden zunächst über Dichtezentrifugation PBMCs isoliert. Aus diesen folgte in einem weiteren Schritt die Generierung von Monozyten. Dabei wurden zwei unterschiedlichen Methoden eingesetzt, zum einen wurde die Eigenschaft der Plastikadhärenz von Monozyten ausgenutzt, zum anderen wurden Monozyten mittels magnetischer CD14 Microbeads isoliert (Kap. 2.2.3.2). Die so erhaltenen Monozyten wurden im Anschluss daran in Anlehnung an die Literatur mit GM-CSF oder M-CSF zu M1 oder M2-ähnlichen Makrophagen polarisiert (GM-CSF M ϕ und M-CSF M ϕ) [199-201]. Während beide Makrophagentypen eine Expression von CD68 und CD11b zeigten, exprimierten mit M-CSF generierten Makrophagen überwiegend die für M2 Makrophagen typischen Oberflächenmarker CD14 und CD163. Dabei konnten beide Isolierungsmethoden vergleichbare Ergebnisse bezüglich der Oberflächenmarkerexpression zeigen (Abb. 3-4 A und B).

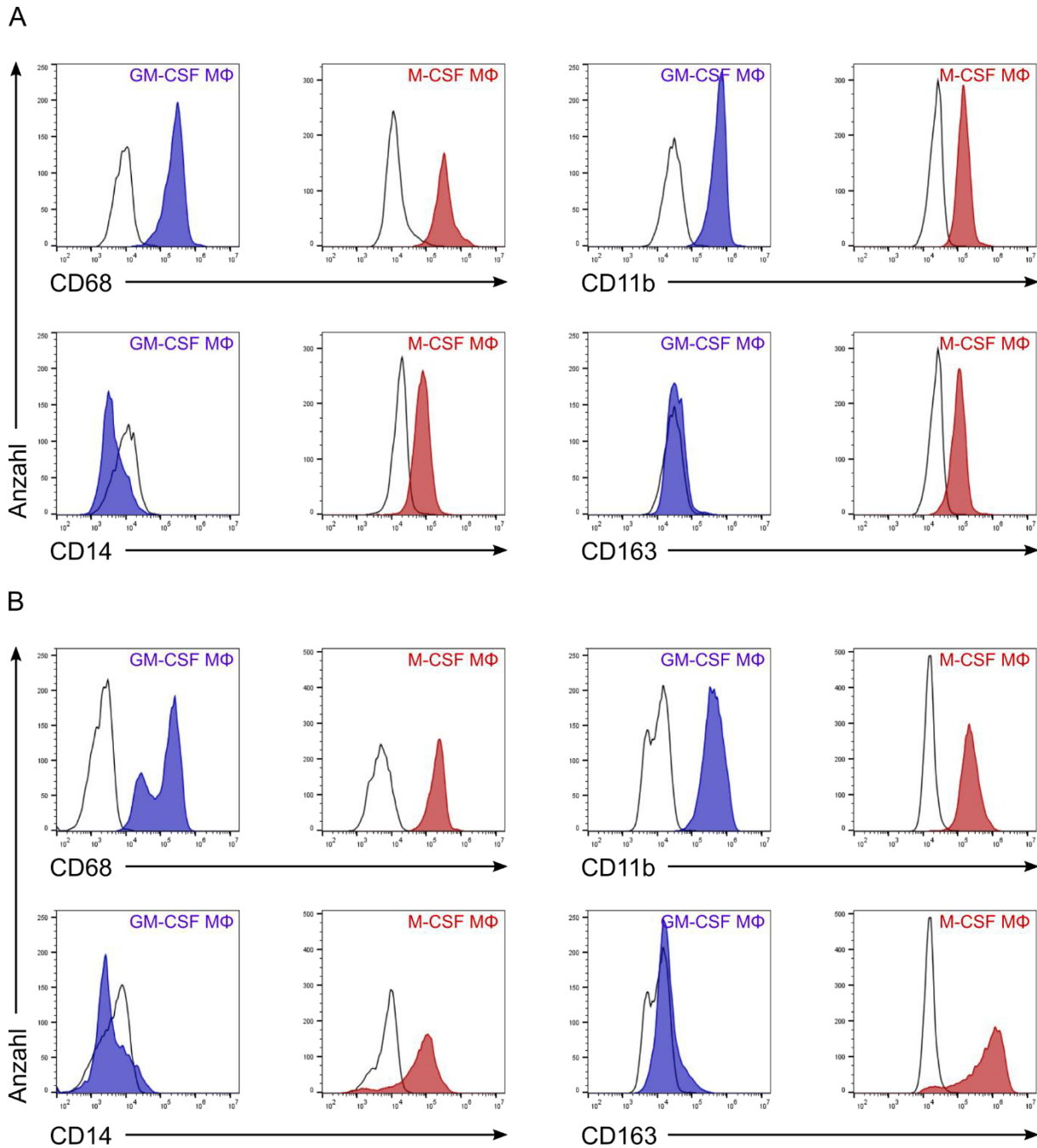


Abbildung 3-4: Aus primären Monozyten differenzierte Makrophagen exprimieren typische Differenzierungsmarker. Monozyten wurden mittels magnetischer CD14 Microbeads (A) oder über die Adhärenz an Plastikoberflächen (B) aus frisch isolierten PBMCs generiert. (A und B) Die Monozyten wurden entweder mit 100 ng/ml GM-CSF oder mit 50 ng/ml M-CSF für 7 Tage behandelt, um die jeweiligen Makrophagenpopulationen GM-CSF M ϕ oder M-CSF M ϕ , zu erhalten. Die Expression der Oberflächenmarker CD68, CD11b, CD14 und CD163 (farbige Kurven) wurde im Vergleich zu den jeweiligen Isotypenkontrollen (schwarze Kurven) gemessen und mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Die Daten sind repräsentativ für 3-4 unabhängige Experimente. Teile der Abbildung sind ein modifizierter Nachdruck nach [197] mit freundlicher Erlaubnis von Elsevier.

Die GM-CSF generierten Makrophagen hatten außerdem die in der Literatur beschriebene „Spiegeli“-Morphologie, während die M-CSF generierten Makrophagen eine spindelartige Form besaßen (Abb. 3-

5) [200-202]. Außerdem waren beide Zelltypen stark adhärenent an den Oberflächen der Plastikzellkulturware. Diese Tatsache führte allerdings auch dazu, dass das Ablösen der Zellen aus den Zellkulturflaschen und -platten sich, je nach Spender*in, als äußerst schwierig erwies. Teilweise wurden weniger als 1 Millionen Zellen aus 10-15 Millionen CD14 positiven Zellen bzw. 100-200 Millionen eingesäten PBMCs erhalten. Es wurden verschiedene Lösungen und Medien ausprobiert, um die Zellen erfolgreich abzulösen. Im Gegensatz zu kaltem oder warmem PBS/EDTA (Tab. 2-7), Accutase oder 0,25 %iger Trypsin-Lösung, erwies sich lediglich TrypLE Express, ein synthetisches Trypsin der Firma Thermo Fisher Scientific, als ausreichend, um die Makrophagen abzulösen. Dennoch gab es große spenderabhängige Unterschiede in der Ausbeute je nach Spender*in (zwischen 1-10 Millionen Zellen). Generell war das Ablösen mit den aus Adhärenz isolierten und differenzierten Makrophagen etwas effizienter, außerdem waren die magnetischen Microbeads im Verhältnis sehr teuer. Dies führte dazu, dass im Folgenden die Monozyten als Ausgangszellen für die Polarisierung zu Makrophagen durch diese Methode gewonnen wurden.

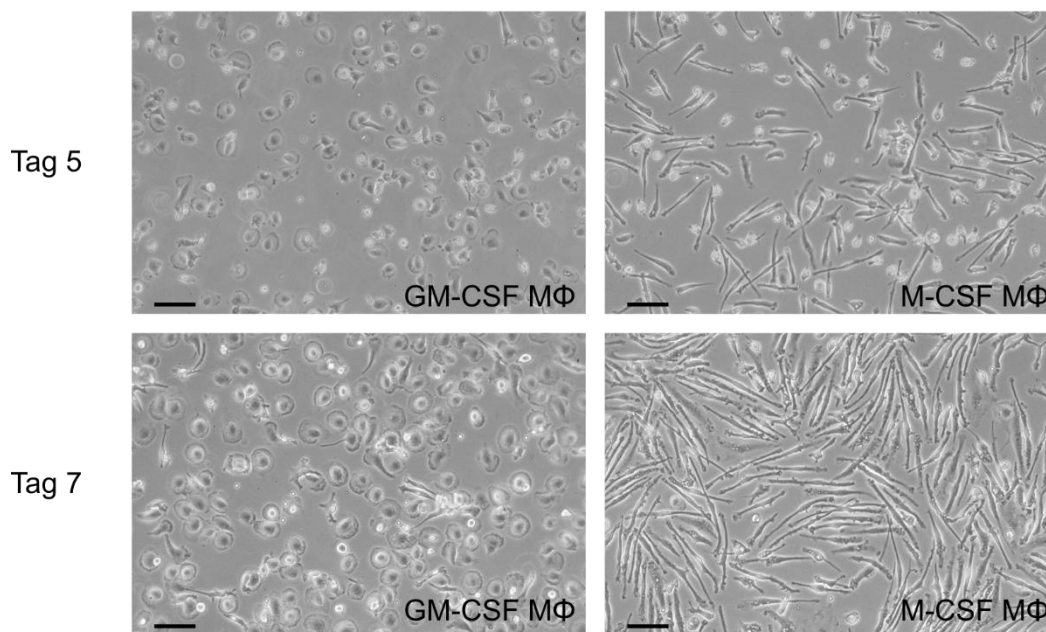


Abbildung 3-5: Vergleich der Morphologie von GM-CSF und M-CSF generierten Makrophagen. Phasenkontrastmikroskopische Aufnahmen zeigten eine deutliche Proliferation der mit 100 ng/ml GM-CSF und 50 ng/ml M-CSF polarisierten Makrophagen nach 7 Tagen im Vergleich zu 5 Tagen Kulturdauer. Außerdem hatten die GM-CSF M ϕ eine typische „Spiegeleimorphologie“, während die M-CSF M ϕ als spindelartige Zellen vorlagen. Maßstabsskala entspricht 100 μ m.

Das Zytokinprofil der erhaltenen Makrophagenpopulationen wies bei Stimulation mit LPS auf eine ausreichende Polarisation in Richtung pro-inflammatorischer M1 ähnliche Makrophagen bzw. anti-inflammatorischer M2 ähnliche Makrophagen hin [199-203], wobei GM-CSF generierten Makrophagen im Gegensatz zu M-CSF generierten Makrophagen mit einer erhöhten IL-6 Ausschüttung reagierten (Abb. 3-6 A), während umgekehrt die M-CSF generierten Makrophagen vermehrt IL-10 ausschütteten

(Abb. 3-6 B). Dabei war analog zu den THP-1 Makrophagen die Zytokinausschüttung unabhängig von der LPS-Konzentration.

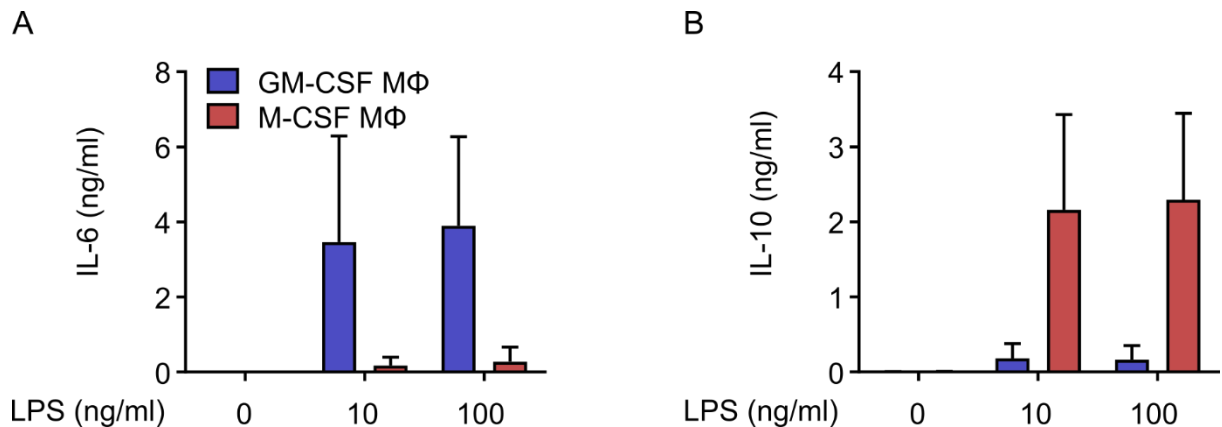


Abbildung 3-6: Die aus primären Monozyten differenzierte Makrophagen zeigen ein typisches Zytokinprofil. Primäre GM-CSF M ϕ oder M-CSF M ϕ wurden mit verschiedenen LPS-Konzentrationen behandelt. Die IL-6- und IL-10-Sekretion in den Zellkulturüberständen wurde nach 24 Stunden mittels ELISA bestimmt. Die Balkendiagramme zeigen den Mittelwert + SD von 3-4 unabhängigen Experimenten.

Im weiteren Verlauf meiner Arbeiten erwies sich speziell die Polarisierung von GM-CSF generierten Makrophagen als schwierig, oft besaßen die Zellen nicht die typische Morphologie und waren nicht adhärent (Abb. 3-7). Außerdem war die Ausbeute teilweise so gering, dass nicht ausreichend Zellen vorhanden waren, um vergleichbare Experimente durchzuführen.

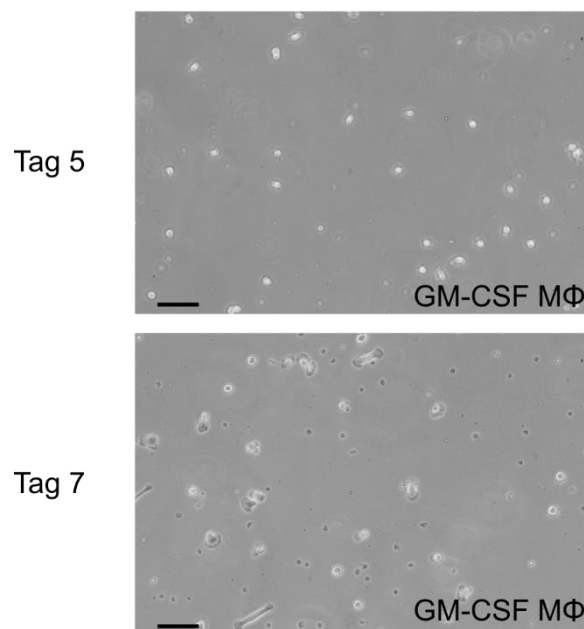


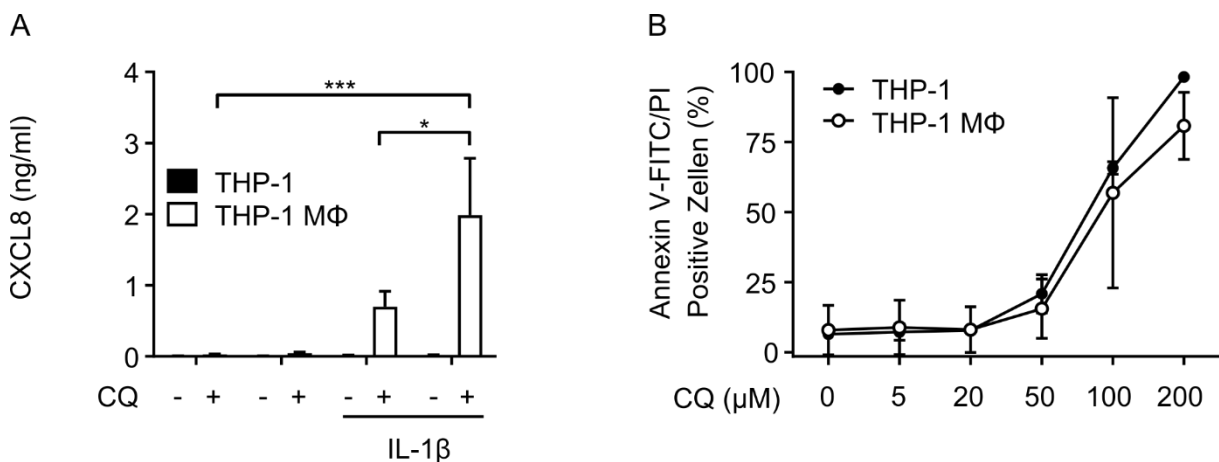
Abbildung 3-7: GM-CSF M ϕ zeigen weder typische Morphologie, noch adhärenente Eigenschaften. Phasenkontrastmikroskopische Aufnahmen zeigten fehlende Proliferation der mit 100 ng/ml GM-CSF-polarisierten Makrophagen nach 7 Tagen im Vergleich zu 5 Tagen Kulturdauer. Diese Zellen hatten eine runde monozytenartige Morphologie, statt der erwarteten „Spiegelei“-Morphologie. Maßstabsskala entspricht 100 μ m.

3.2 Lysosomotrope Arzneistoffe regulieren inflammatorische Prozesse in Makrophagen

Vorausgegangene Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe zeigen, dass lysosomotrope Arzneistoffe wie Chloroquin, Hydroxychloroquin sowie viele lipophile Beta-Adrenozeptor-Blocker die durch IL-1 β ausgelöste pro-inflammatorische Immunantwort in Langerhans Zellen und Dendritischen Zellen verstärken [156, 157]. Alle diese Wirkstoffe sind bekannt dafür, potentielle Auslöser entzündlicher Hauterkrankungen wie der Psoriasis zu sein [204, 205]. Auch Makrophagen sind generell am Entzündungsgeschehen dieser Erkrankung beteiligt [206], sodass im Folgenden gemäß der Zielsetzung der Arbeit der Einfluss von Chloroquin und anderen lysosomotropen Arzneistoffen unter inflammatorischen Bedingungen für diesen Zelltyp untersucht wurde.

3.2.1 Chloroquin moduliert inflammatorische Prozesse auf unterschiedliche Weise in THP-1 Monozyten und THP-1 Makrophagen

Bei der Stimulation von THP-1 Monozyten (THP-1) und THP-1 Makrophagen (THP-1 M ϕ) erhöhte Chloroquin (CQ) die durch IL-1 β ausgelöste Sekretion des pro-inflammatorischen Chemokins CXCL8/IL-8 in THP-1 Makrophagen, während keine messbaren Veränderungen in THP-1 Monozyten feststellbar waren (Abb. 3-8 A). Um den Einfluss toxischer Effekte auf die Zytokin- bzw. Chemokin-Sekretion auszuschließen, wurde die Zellviabilität mittels Annexin-V FITC/ Propidiumiodid-Doppelfärbung für verschiedene Chloroquin-Konzentrationen bestimmt (Abb. 3-8 B). Hier zeigte sich, dass bei einer Konzentration ≤ 20 μ M über 24 Stunden Stimulationszeit weder in THP-1 Monozyten, noch in THP-1 Makrophagen, toxische Effekte zu erwarten waren. Somit wurde auch in den folgenden Experimenten eine Konzentration von 20 μ M eingesetzt. Dennoch sezernierten THP-1 Makrophagen auch bei höheren, toxischen Chloroquinmengen konzentrationsabhängig CXCL8. THP-1 Monozyten waren erst bei Chloroquin-Konzentrationen über 100 μ M in der Lage, CXCL8 in ausreichender Menge auszuschütten (Abb. 3-8 C).



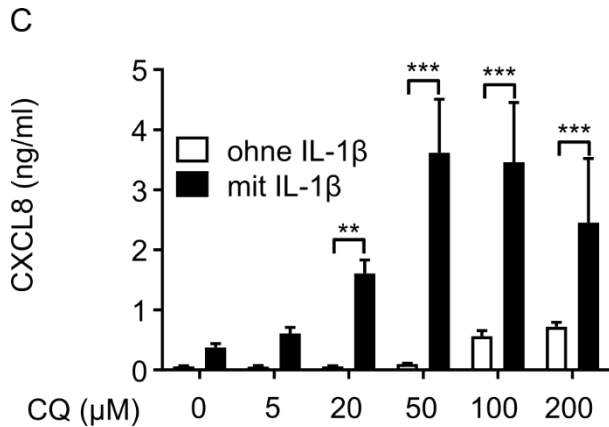


Abbildung 3-8: Chloroquin erhöht die CXCL8-Sekretion unter sterilen entzündlichen Bedingungen in THP-1 Makrophagen. THP-1 Monozyten (THP-1) und THP-1 Makrophagen (THP-1 Mφ) wurden für eine Stunde mit CQ (20 μM (A) oder 5-200 μM (B)) oder Wachstumsmedium vorinkubiert und anschließend in der An- oder Abwesenheit von Chloroquin mit rh-IL-1β (10 ng/ml) stimuliert. (A und C) Die CXCL8-Sekretion in den Zellkulturüberständen wurde nach 24 Stunden mittels ELISA bestimmt. Die Balkendiagramme zeigen den Mittelwert + SD (n = 3). Statistische Unterschiede: *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001, Einfaktorielle (A) oder Zweifaktorielle (C) Varianzanalyse, gefolgt vom Bonferroni-Test. (B) Die Zellviabilität wurde mittels Annexin-V FITC/PI-Doppelfärbung mit Hilfe der Durchflusszytometrie gemessen. Das Kurvendiagramm zeigt den Mittelwert ± SD (n = 3). Die Abbildung ist ein modifizierter Nachdruck nach [207] mit freundlicher Erlaubnis von Elsevier.

Neben CXCL8 ist auch das Chemokin CXCL2 über den IL-1 Signalweg regulierbar [208]. Korrespondierend zum Einfluss von Chloroquin auf die CXCL8 Sekretion unter sterilen inflammatorischen Bedingungen, wurde auch die Genexpression von CXCL2 in THP-1 Makrophagen bei Exposition mit Chloroquin im Vergleich zur alleinigen Stimulation mit IL-1β deutlich erhöht (Abb. 3-9).

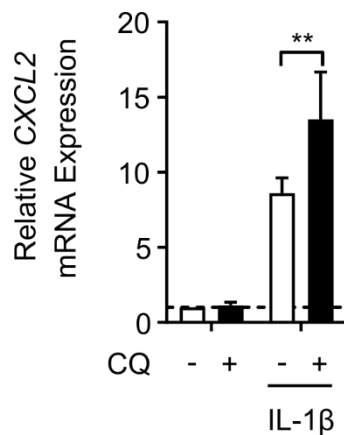


Abbildung 3-9: Chloroquin erhöht die CXCL2 Expression unter sterilen inflammatorischen Bedingungen in THP-1 Makrophagen. THP-1 Makrophagen wurden mit oder ohne Chloroquin (20 μM) in An- oder Abwesenheit von rh-IL-1β (10 ng/ml) stimuliert. Die Genexpressionswerte von CXCL2 nach 16 Stunden Inkubationszeit wurden auf das Haushaltsgen GAPDH normalisiert und die jeweiligen Werte wurden auf die Kontrolle bezogen (Kontrolle bezeichnet mit dem Wert 1.0). Das Balkendiagramm zeigt den Mittelwert + SD (n = 3). Die Abbildung ist ein modifizierter Nachdruck nach [207] mit freundlicher Erlaubnis von Elsevier.

Sowohl der IL-1 Rezeptor als auch die TLRs gehören zur TIR-Familie. Eines der Hauptmerkmale der TIR-Familie ist die so genannte TIR-Domäne, welche unentbehrlich für die Signaltransduktion ist [138, 209]. Chloroquin zeigte in früheren Arbeiten unserer Arbeitsgruppe einen ähnlichen Effekt auf die proinflammatorische Immunantwort Dendritischer Zellen auf einen TLR2/1-Agonisten im Vergleich zu IL-1 β [156]. Chloroquin erhöhte jedoch die durch den TLR4-Agonisten LPS, den TLR2/6-Agonisten Pam₂CSK₄ (Pam2) oder den TLR2/1-Agonisten Pam₃CSK₄ (Pam3) ausgelöste CXCL8 Sekretion in Makrophagen nicht (Abb. 3-10).

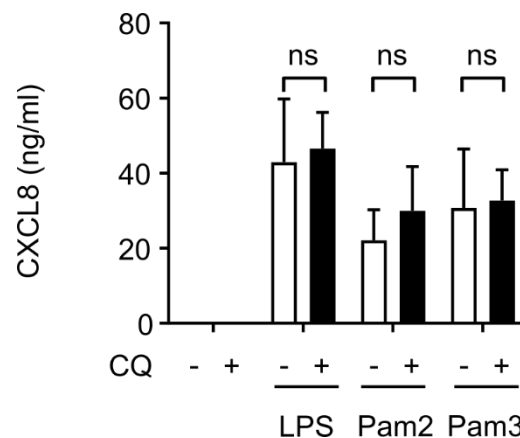


Abbildung 3-10: Chloroquin hat keinen Einfluss auf die CXCL8-Sekretion bei Stimulation des TLR4 oder des TLR2. THP-1 Makrophagen wurden für eine Stunde mit oder ohne Chloroquin (20 μ M) vorinkubiert und anschließend mit LPS, Pam₂CSK₄ (Pam2) oder Pam₃CSK₄ (Pam3) (alle jeweils 100 ng/ml) in An- oder Abwesenheit von Chloroquin stimuliert. Die CXCL8-Sekretion in den Zellkulturüberständen wurde nach 24 Stunden mittels ELISA bestimmt. Das Balkendiagramm zeigt den Mittelwert + SD (n = 3-4). Die Abbildung ist ein modifizierter Nachdruck nach [207] mit freundlicher Erlaubnis von Elsevier.

Neben der Tatsache, dass Chloroquin arzneimittelinduzierte Psoriasis auslösen kann und somit eine Steigerung der Immunantwort zu verursachen scheint [210], wird es auf Grund seiner antiinflammatorischen Eigenschaften auch zur Behandlung der rheumatischen Arthritis, des systemischen Lupus erythematoses und anderen rheumatischer Erkrankungen eingesetzt [153]. Als möglicher Mechanismus wird vermehrt eine durch Chloroquin hervorgerufene Senkung der über den TLR4-induzierten TNF-Sekretion in Makrophagen diskutiert [211, 212]. Dennoch konnte Chloroquin die durch TNF-Ausschüttung bei Ko-Stimulation mit LPS in THP-1 Makrophagen nur geringfügig senken (Abb. 3-11).

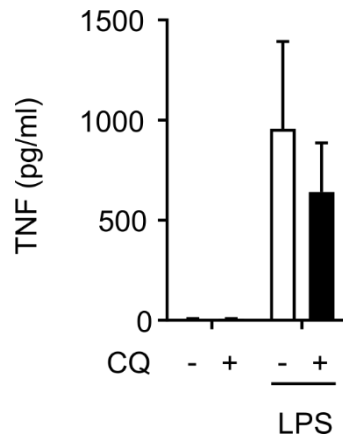


Abbildung 3-11: Chloroquin zeigt einen geringen anti-inflammatorischen Effekt bei LPS-Stimulation in THP-1 Makrophagen. THP-1 Makrophagen wurden für eine Stunde mit oder ohne Chloroquin (20 μ M) vorinkubiert und anschließend mit LPS (100 ng/ml) in An- oder Abwesenheit von Chloroquin stimuliert. Die TNF-Sekretion in den Zellkulturüberständen wurde nach 24 Stunden mittels ELISA bestimmt. Das Balkendiagramm zeigt den Mittelwert + SD (n = 4). Die Abbildung ist ein modifizierter Nachdruck nach [207] mit freundlicher Erlaubnis von Elsevier.

3.2.2 Chloroquin zeigt ähnliche pro- und anti-inflammatorische Effekte in primären Makrophagen

Neben den Untersuchungen in THP-1 Makrophagen, wurde der Einfluss von Chloroquin ebenfalls in primären Makrophagen ermittelt. Sowohl in M1 als auch in M2 ähnlichen Makrophagen zeigte Chloroquin einen anti-inflammatorischen Effekt auf die IL-6-Ausschüttung bei Stimulation des TLR4. Unter sterilen pro-inflammatorischen Bedingungen erhöhte Chloroquin die IL-6-Sekretion in M-CSF generierten Makrophagen, während dieser Effekt in GM-CSF generierten Makrophagen nicht messbar war (Abb. 3-12 A und B). Ein zusätzlicher Effekt von Chloroquin auf die CXCL8-Genexpression durch LPS blieb aus, während der Effekt der IL-1 β -Stimulation leicht erhöht werden konnte (Abb. 3-12 C). Der Vergleich von GM-CSF und M-CSF generierten Makrophagen bleibt jedoch schwierig, da die Polarisierung mit GM-CSF oft scheiterte und zu wenig Zellen generiert werden konnten, sodass nicht ausreichende Wiederholungen für diesen Versuch durchgeführt werden konnten.

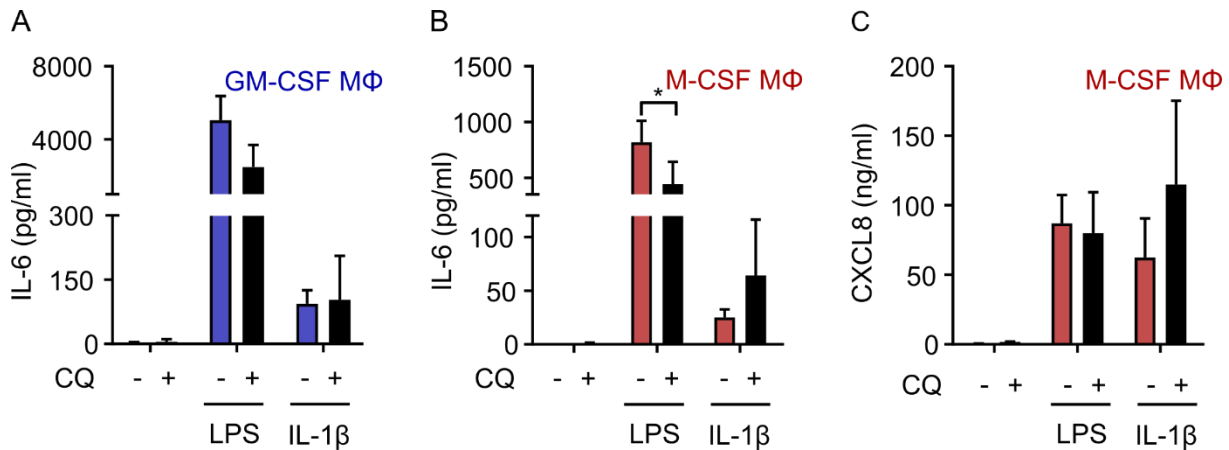


Abbildung 3-12-: Chloroquin beeinflusst die Immunantwort in primären Makrophagen auf unterschiedliche Art. Primäre (A) GM-CSF Mφ (blau) oder (B und C) M-CSF Mφ (rot) wurden für eine Stunde mit oder ohne Chloroquin (20 μ M) vorinkubiert und anschließend mit LPS (100 ng/ml) oder rh-IL-1 β (10 ng/ml) in An- oder Abwesenheit von Chloroquin stimuliert. Die IL-6- (A und B) und CXCL8-Sekretion (C) in den Zellkulturüberständen wurde nach 24 Stunden mittels ELISA bestimmt. Die Balkendiagramme zeigen den Mittelwert + SD ((A) n = 2 und (B und C) n = 3-4). Die Abbildung ist ein modifizierter Nachdruck nach [207] mit freundlicher Erlaubnis von Elsevier.

3.2.3 Andere lysosomotrope Stoffe zeigen ähnliche pro-inflammatorische Effekte unter sterilen inflammatorischen Bedingungen im Vergleich zu Chloroquin

Auf Grund ihrer chemischen Eigenschaften akkumulieren lysosomotrope Stoffe in sauren Zellorganellen. Neben Chloroquin konnte auch für Hydroxychloroquin in Langerhans Zellen und Makrophagen eine erhöhte pro-inflammatorische Immunantwort unter sterilen Entzündungsbedingungen gezeigt werden [156, 207]. Abgesehen von den beiden Quinin-Derivaten, gibt es noch weitere lysosomotrope Arzneistoffe, die bei anderen Indikationen zum Einsatz kommen. So steigerten auch Beta-Adrenozeptor-Antagonisten die Expression und Sekretion von pro-inflammatorischen Zyto- bzw. Chemokinen bei Ko-Stimulation mit IL-1 β [157]. Dies konnte auch für das Antidepressivum Fluoxetin (FLX) oder das Antipsychotikum Chlorpromazin (CPZ) gezeigt werden. Dabei erhöhten sowohl Fluoxetin (Abb. 3-13 A), als auch Chlorpromazin (Abb. 3-13 C) konzentrationsabhängig die CXCL8-Sekretion unter sterilen pro-inflammatorischen Bedingungen in THP-1 Makrophagen. Die gesteigerte Immunantwort war jedoch nicht durch eine vermehrte Zytotoxizität der beiden Arzneistoffe bedingt (Abb. 3-13 B und D).

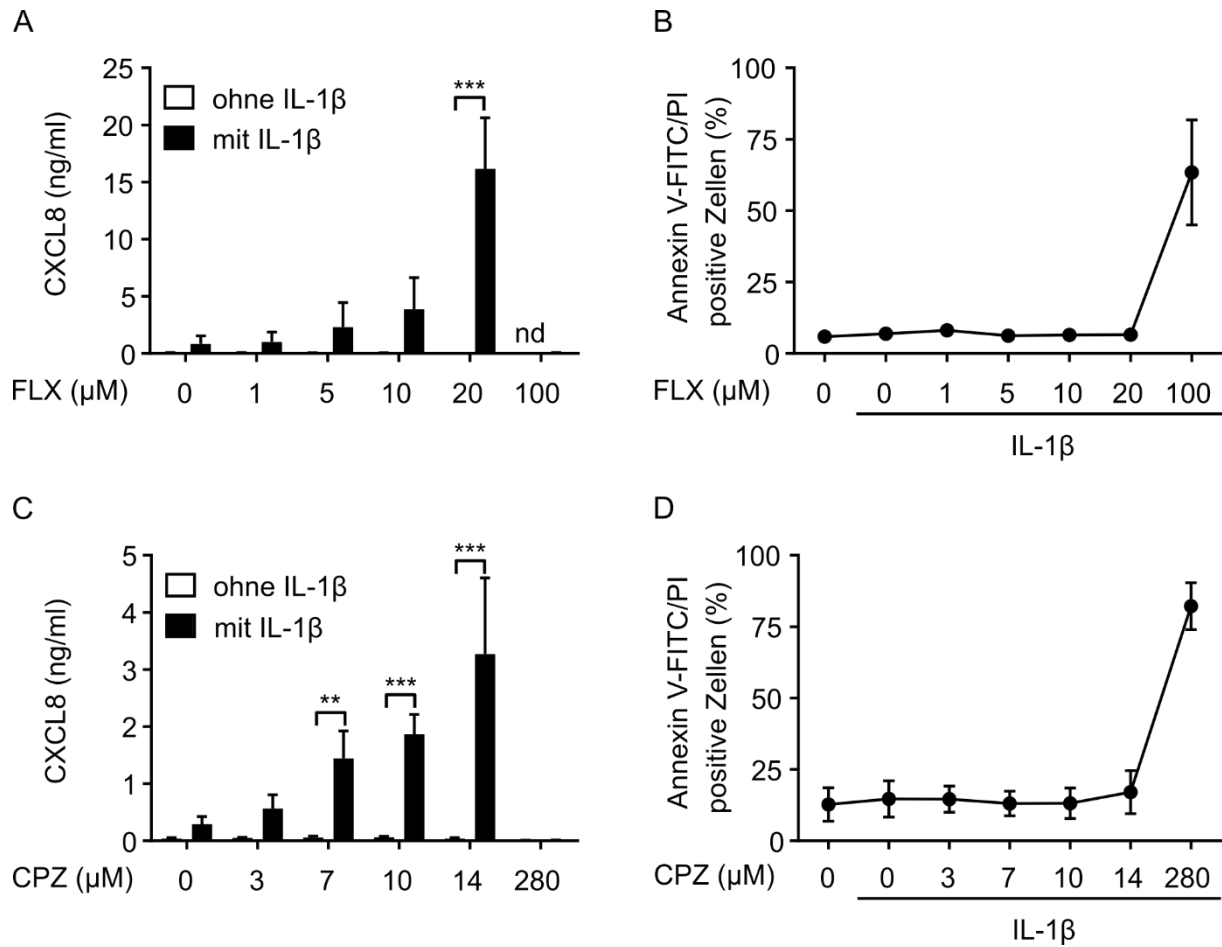


Abbildung 3-13: Lysosomotrope Arzneistoffe erhöhen generell konzentrationsabhängig die CXCL-8-Sekretion in THP-1 Makrophagen. THP-1 Makrophagen wurden für eine Stunde mit verschiedenen Konzentrationen von FLX (1-100 μM), CPZ (3-28 μM) oder Wachstumsmedium vorinkubiert und anschließend in der An- oder Abwesenheit von FLX oder CPZ mit rh-IL-1 β (10 ng/ml) stimuliert. (A und C) Die CXCL8-Sekretion in den Zellkulturüberständen wurde nach 24 Stunden mittels ELISA bestimmt. Die Balkendiagramme zeigen den Mittelwert + SD (n = 3). Statistische Unterschiede: **P < 0.01, ***P < 0.001, Zweifaktorielle Varianzanalyse, gefolgt vom Bonferroni-Test. (B und D) Die Zellviabilität wurde mittels Annexin-V-FITC/PI-Doppelfärbung mit Hilfe der Durchflusszytometrie gemessen. Die Kurvendiagramme zeigen den Mittelwert \pm SD (n = 3). Die Abbildung ist ein modifizierter Nachdruck nach [207] mit freundlicher Erlaubnis von Elsevier.

3.3 Einfluss lysosomotroper Stoffe auf zelluläre Prozesse

Das Lysosom ist als degradierende Organelle an verschiedenen zellulären Prozessen wie der Endozytose oder der Autophagozytose beteiligt [213]. Zwar ist bereits bekannt, dass lysosomotrope Stoffe diese Mechanismen beeinflussen können [1, 214], in wie weit dies mit möglichen daraus resultierenden Entzündungsreaktionen in Verbindung steht, ist jedoch wenig untersucht.

3.3.1 Der pro-inflammatorische Effekt von Chloroquin ist bedingt durch seinen Lysosomotropismus

Die Anhäufung schwach basischer Substanzen in sauren Zellkompartimenten legt nahe, dass diese dort den pH-Wert anzuheben vermögen und so die Funktion vieler pH-abhängiger Enzyme gestört ist. Als Folge können lysosomalen Dysfunktionen auftreten [108]. Zur Detektion saurer Zellkompartimente wird häufig der Fluoreszenzfarbstoff LysoTracker verwendet, der bei niedrigen pH-Werten protoniert vorliegt und so eine messbare Fluoreszenz zeigt [215, 216].

Folglich wurden THP-1 Makrophagen mit LysoTracker Red (LTR) vorinkubiert und anschließend mit Chloroquin, Chlorpromazin oder Fluoxetin in der An- oder Abwesenheit von IL-1 β behandelt. Für Chloroquin zeigte sich sowohl eine qualitative Erniedrigung der LTR Färbung unter dem Mikroskop (Abb. 3-14 A), als auch eine mittels Durchflusszytometrie quantitativ messbare Senkung der Fluoreszenzintensität im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 3-14 B). Alle weiteren eingesetzten Arzneistoffe erniedrigten dabei die Intensität der LTR Färbung ebenfalls nach 30 Minuten, wobei die Reduktion durch Chloroquin am stärksten war. Allerdings normalisierte sich die LTR Färbung im Vergleich zur Kontrolle nach 4 Stunden wieder, für Fluoxetin war sogar eine Erhöhung messbar (Abb. 3-14 B). Somit scheint es in THP-1 Makrophagen eine kurzzeitige Steigerung des pH-Wertes durch lysosomotrope Arzneistoffe zu geben, die sich nach einer gewissen Zeit wieder normalisiert. Dies korrespondiert mit Untersuchungen anderen Zelltypen wie Langerhans Zellen, H9c2 Zellen und ARPE-19 Zellen [108, 109, 157].

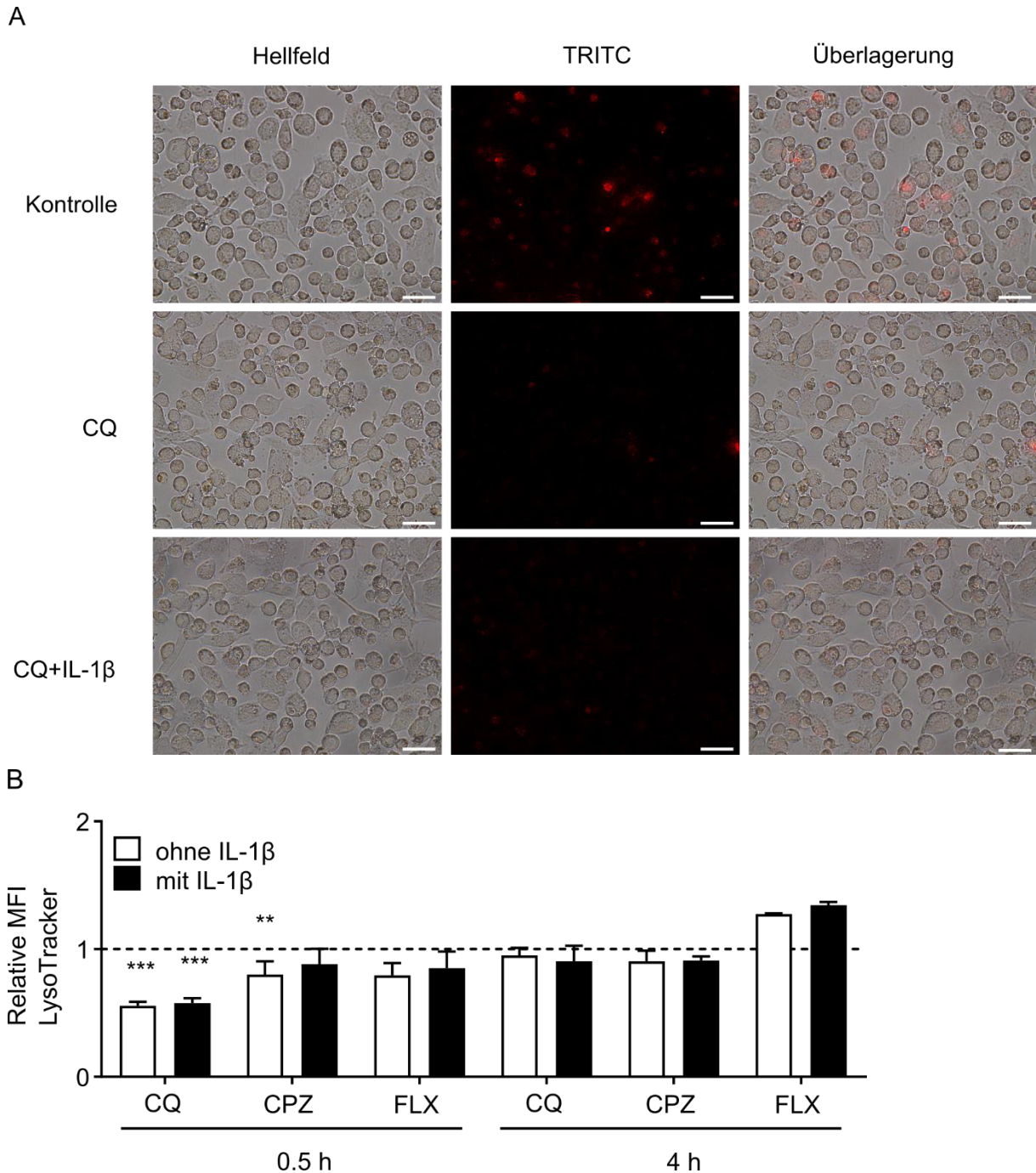
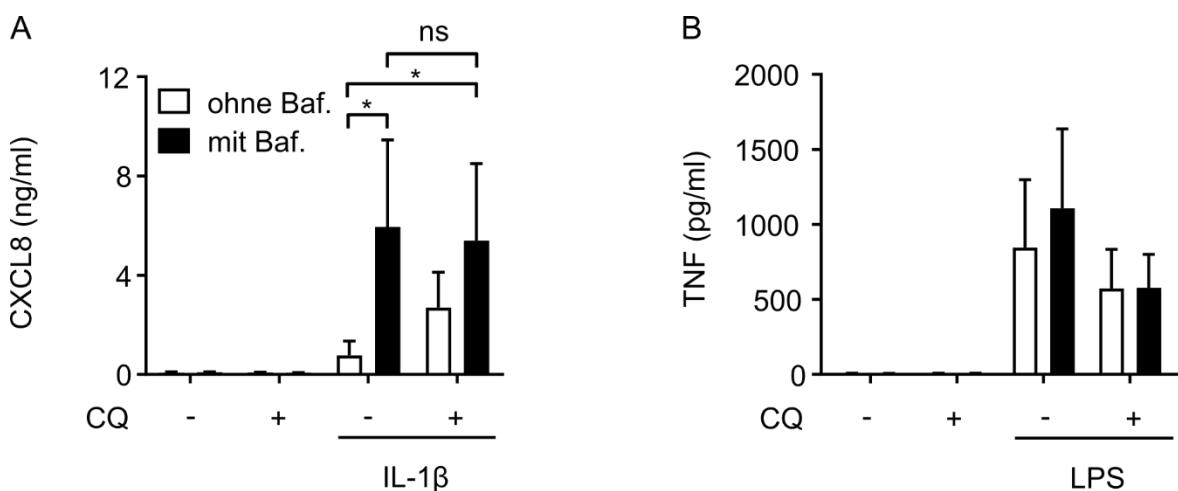


Abbildung 3-14: Lysosomotrope Arzneistoffe verändern den pH-Wert in sauren Zellkompartimenten in THP-1 Makrophagen. THP-1 Makrophagen wurden mit LTR behandelt und für eine Stunde mit Chloroquin (20 μ M), Chlorpromazin (14 μ M), Fluoxetin (20 μ M) oder Wachstumsmedium vorinkubiert und anschließend für 30 Minuten (A und B) oder 4 Stunden (B) mit oder ohne rh-IL-1 β (10 ng/ml) in der An- oder Abwesenheit der jeweiligen Arzneistoffe stimuliert. (A) Die Bilder zeigen fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen nach 30 Minuten Inkubationszeit. Maßstabsskala entspricht 50 μ m. (B) Die Intensität der LysoTracker Färbung der abgelösten Zellen wurde mit dem Durchflusszytometer bestimmt, wobei die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) mittels FlowJo Software analysiert wurde und die Proben auf die unbehandelte Kontrolle normalisiert wurden. (Kontrolle bezeichnet mit dem Wert 1). Das Balkendiagramm zeigt den Mittelwert +SD (n = 3). Statistische Unterschiede: **P < 0,01, ***P < 0,001, Einstichproben-t Test. Teil B der Abbildung ist ein modifizierter Nachdruck nach [207] mit freundlicher Erlaubnis von Elsevier.

Wie aus Abbildung 3-14 ersichtlich, vermag Chloroquin auf Grund seiner lysosomotropen Eigenschaften den lysosomalen pH-Wert zu erhöhen. Um zu untersuchen, in wie weit die Lysosomotropie in Zusammenhang mit der Erhöhung der pro-inflammatorische Immunantwort auf IL-1 β steht, wurde die pH-Wert-abhängige Akkumulation von Chloroquin durch Vorinkubation mit Bafilomycin A₁ unterbunden. Als Inhibitor der vATPase, einer Protonenpumpe, die für die Aufrechterhaltung des sauren pH-Wertes im Lysosom sorgt [56], erschwerte Bafilomycin A₁ folglich die pH-abhängige Anreicherung von Chloroquin.

Die Ko-Stimulation mit Bafilomycon A₁ führte bereits zu einer deutlich gesteigerten pro-inflammatorischen Immunantwort im Gegensatz zur Behandlung mit IL-1 β allein (Abb. 3-15 A). Ein weiterer Zusatz von Chloroquin brachte keine additiven Effekte. Dies unterstreicht die These, dass die Lysosomotropie im Zusammenhang mit dem pro-inflammatorischen Effekt von Chloroquin unter sterilen entzündlichen Bedingungen in Makrophagen steht. Auch die Ergebnisse mit den ebenfalls lysosomotropen Stoffe Fluoxetin und Chlorpromazin (Abb. 3-13) bestätigen dies.

Im Gegensatz dazu wird für den anti-inflammatorischen Effekt von Chloroquin in Bezug auf die TNF-Expression ein von der Lysosomotropie unabhängiger Mechanismus diskutiert [211]. Korrespondierend dazu beeinflusste Bafilomycin A₁ weder die pro-inflammatorische Wirkung von LPS allein noch den anti-inflammatorischen Effekt bei Zugabe von Chloroquin (Abb. 3-15 B). Neben der Senkung der LPS-induzierten TNF-Freisetzung, vermag Chloroquin auch die IL-6-Produktion bei LPS-Stimulaiton zu inhibieren. Bafilomycin A₁ alleine senkte die durch LPS-Stimulation ausgelöste IL-6 Freisetzung und eine Zugabe von Chloroquin hatte kaum additive Effekte (Abb. 3-15 C), sodass hier von einem von der Lysosomotropie abhängigen Mechanismus ausgegangen werden kann. Dies korrespondiert mit der Annahme, dass der molekularer Mechanismus des anti-inflammatorischen Effekts von Chloroquin auf die TNF- und die IL-6 Sekretion bei TLR4-Stimulation unterschiedlich verläuft [212].



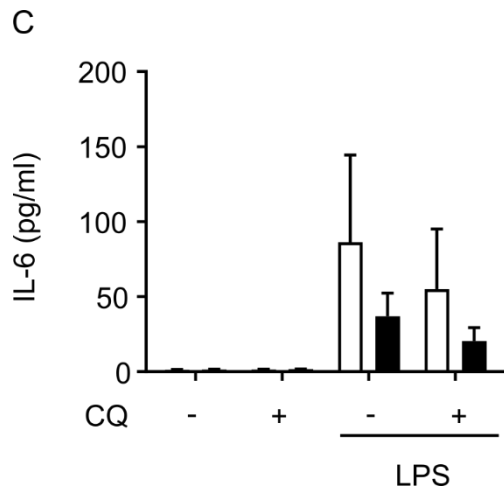


Abbildung 3-15: Der pro-inflammatorische Effekt von Chloroquin ist abhängig vom Lysosomotropismus. THP-1 Makrophagen wurden für 2 Stunden mit Bafilomycin A₁ (Baf.; 100 nM) oder Wachstumsmedium vorinkubiert und anschließend in An- oder Abwesenheit von CQ (20 µM) mit oder ohne rh-IL-1β (10 ng/ml) stimuliert. Die CXCL8-, TNF oder IL-6-Sekretion in den Zellkulturüberständen wurde nach 24 Stunden mittels ELISA bestimmt. Die Balkendiagramme zeigen den Mittelwert + SD (A: n = 3, B und C: n = 4). Statistische Unterschiede: *P < 0.05, Einfaktorielle Varianzanalyse, gefolgt vom Bonferroni-Test. Teil A der Abbildung ist ein modifizierter Nachdruck nach [207] mit freundlicher Erlaubnis von Elsevier.

3.3.2 Einfluss auf die Autophagozytose

Während Chloroquin für seine Autophagie-inhibierende Wirkung bekannt ist, werden für Chlorpromazin und Fluoxetin sowohl eine Induktion als auch eine Hemmung der Autophagozytose diskutiert [1, 217-219]. Der Einfluss dieser Stoffe auf die LC3-Konversion und die p62 Expression wurden somit in THP-1 Makrophagen untersucht. Beide sind typische Marker bei der Untersuchung des autophagischen Flux, eine vermehrte Umwandlung von LC3-I zu LC3-II sowie eine erhöhte Akkumulation des Autophagiesubstrats p62 lassen auf eine Anhäufung von Autophagosomen durch eine Autophagozytose-Inhibierung schließen [50].

Chloroquin erhöhte wie erwartet die LC3-I zu LC3-II Konversation als auch die p62 Expression. Fluoxetin hatte dabei einen ähnlich inhibierenden Effekt auf die Autophagozytose in THP-1 Makrophagen während Chlorpromazin weder das Verhältnis von LC3-II zu LC3-I, noch die p62 Proteinexpression steigern konnte (Abb. 3-16).

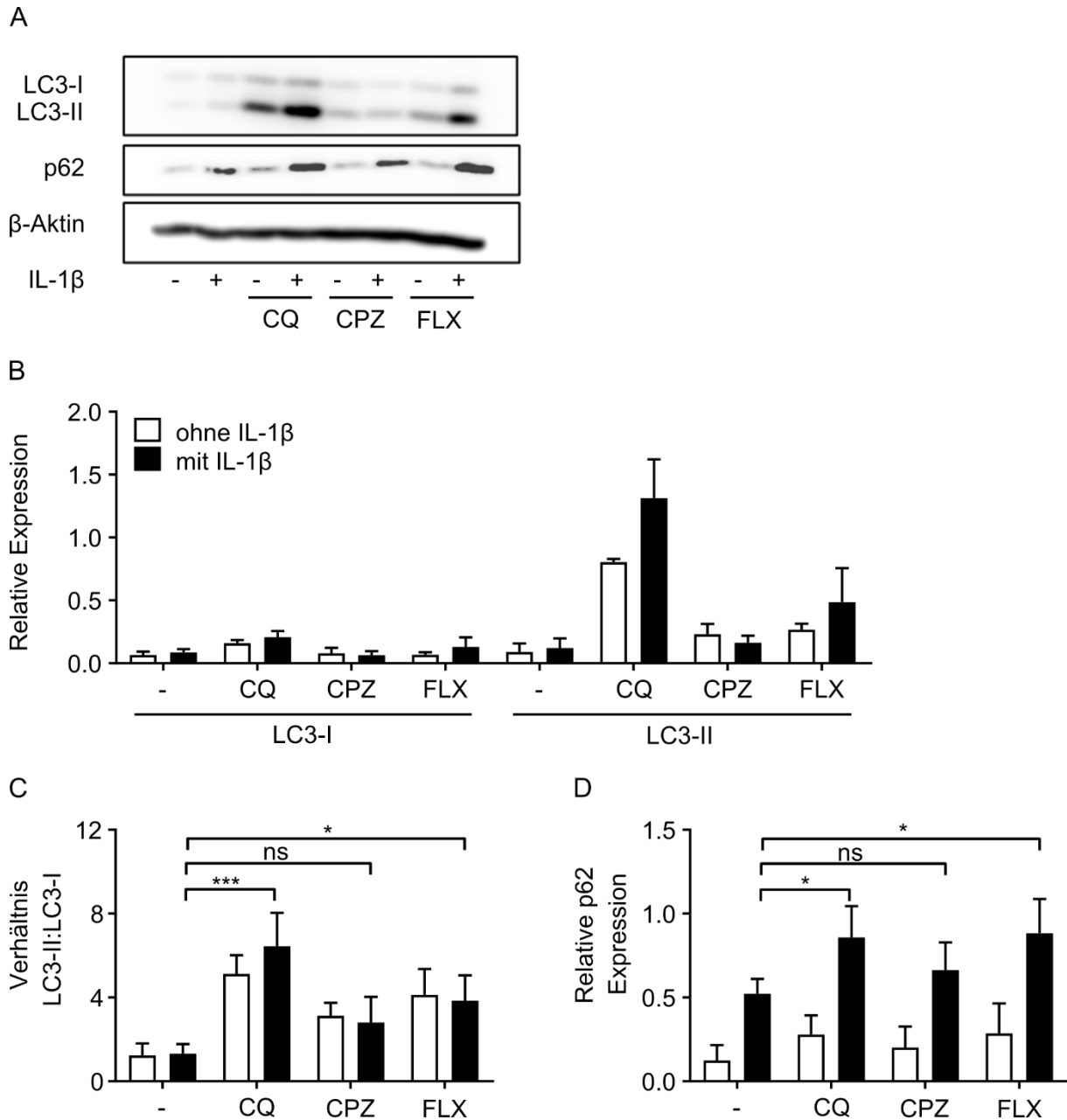


Abbildung 3-16: Chloroquin und Fluoxetin inhibieren den autophagischen Flux in THP-1 Makrophagen. (A-D) THP-1 Makrophagen wurden für eine Stunde mit Chloroquin (20 μ M), Chlorpromazin (14 μ M), Fluoxetin (20 μ M) oder Wachstumsmedium vorinkubiert und anschließend in An- oder Abwesenheit von Chloroquin, Chlorpromazin oder Fluoxetin mit oder ohne rh-IL-1 β (10 ng/ml) stimuliert. Die Proteinlevel von LC3-I, LC3-II, p62 und β -Aktin aus den Zelllysaten wurden mittels Western Blot Analytik bestimmt. Die Daten repräsentieren 4 unabhängige Experimente. (B und C) Die Proteinexpression wurde mittels densitometrischer Analyse bestimmt, wobei β -Aktin als Kontrolle diente. Die Balkendiagramme zeigen den Mittelwert + SD (n = 4). Statistische Unterschiede: *P < 0,05, ***P < 0,001, einfaktorielle Varianzanalyse, gefolgt vom Bonferroni-Test. Die Abbildung ist ein modifizierter Nachdruck nach [207] mit freundlicher Erlaubnis von Elsevier.

Neben seiner Rolle als Rezeptor für die selektive Autophagozytose, hat das Protein p62/SQSTM1 noch eine Vielzahl an weiteren Aufgaben. Als Bindungspartner kann es unter anderem sowohl die Aktivierung des anti-oxidativen Transkriptionsfaktors Nrf2 (*Nuclear factor erythroid 2-related factor 2*), des

Proteinkomplexes mTORC1 als auch die NF κ B-Signalwege beeinflussen und wird somit auch als „Alleskönner“ („*Jack of all trades*“) betitelt [220]. Darüber hinaus kann p62 an die MAPK p38 binden und diese aktivieren [221]. Die Phosphorylierung von MAPK, wie JNK und p38 ist Teil des zytosolischen IL-1 Signalwegs und kann in einer pro-inflammatorischen Immunantwort enden [137]. p62 ist auch dafür bekannt, die durch IL-1 β -Stimulation ausgelöste Phosphorylierung von p38 zu regulieren und die hierdurch induzierte Genexpression von *CXCL8* zu stabilisieren [222, 223]. Unsere bisherigen Arbeiten mit Chloroquin und Propranolol zeigen ebenfalls eine deutliche p38-Abhängigkeit der pro-inflammatorischen Immunantwort unter sterilen inflammatorischen Bedingungen in Langerhans Zellen [156, 157].

Der Einsatz unterschiedlicher Inhibitoren des MAPK Signalwegs in THP-1 Makrophagen konnte diese Annahme bestätigen. Dabei zeigte sich deutlich, dass weder der MAPK Kinase (MKK) 1/2 (U0126) noch der JNK Inhibitor (SP600125) einen Einfluss auf die *CXCL8*-Sekretion unter sterilen entzündlichen Bedingungen bei Stimulation mit Chloroquin hatte. Im Gegensatz dazu, führte die Unterdrückung von p38 mit SB202190 zu einer deutlichen Senkung der pro-inflammatorischen Immunantwort auf IL-1 β und Chloroquin in THP-1 Makrophagen (Abb. 3-17).

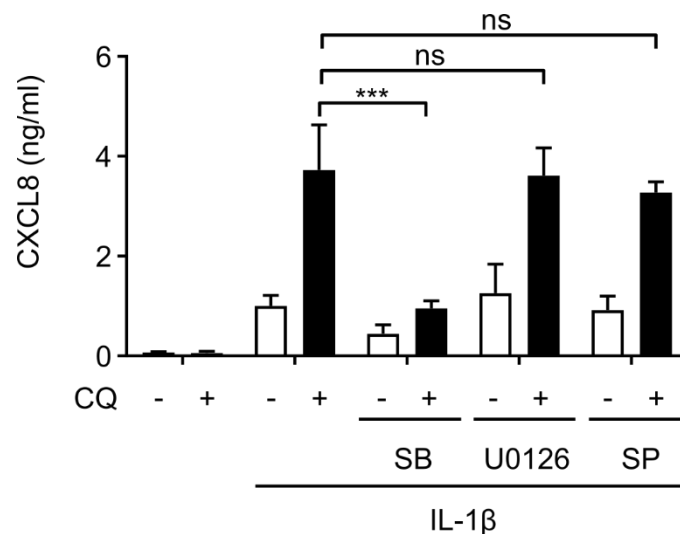
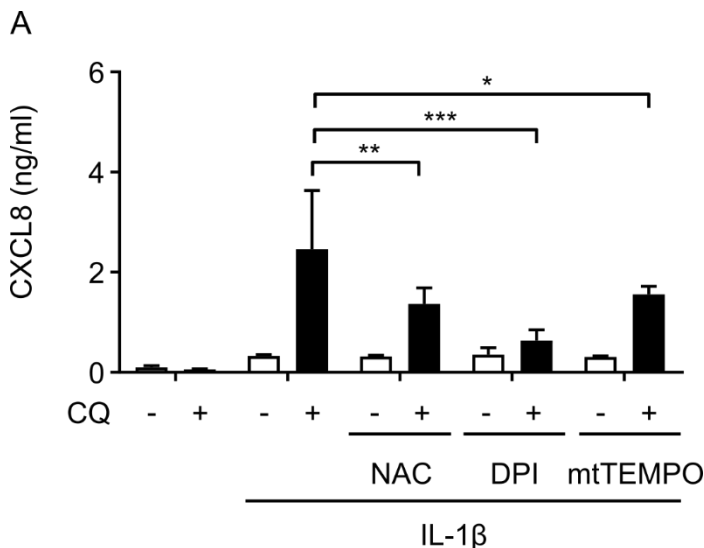


Abbildung 3-17: Chloroquin erhöht die pro-inflammatorische Immunantwort auf IL-1 β in THP-1 Makrophagen in Abhängigkeit von der MAPK p38. THP-1 Makrophagen wurden für eine Stunde mit dem selektivem p38 MAPK Inhibitoren SB202190 (SB), dem ERK1/2 Inhibitor U0126 und dem JNK Inhibitor SP600125 (SP; jeweils 10 μ M) oder Wachstumsmedium vorinkubiert. Anschließend wurde in An- oder Abwesenheit von Chloroquin (20 μ M) mit oder ohne rh-IL-1 β (10 ng/ml) stimuliert. Die *CXCL8*-Sekretion in den Zellkulturüberständen wurde nach 24 Stunden mittels ELISA bestimmt. Das Balkendiagramm zeigt den Mittelwert + SD (n = 3). Statistische Unterschiede: ***P < 0.001, einfaktorielles Varianzanalyse, gefolgt vom Bonferroni-Test. Die Abbildung ist ein modifizierter Nachdruck nach [207] mit freundlicher Erlaubnis von Elsevier.

Wie bereits erwähnt, steht p62 über die Aktivierung des Nrf-Signalweges auch in Zusammenhang mit oxidativem Stress [220]. Antioxidantien und ROS sind dabei wichtige Signalmoleküle. Als ROS werden kleine, kurzlebige und sehr reaktive Moleküle wie beispielsweise Hyperoxid-Anionen, freie Radikale als auch Wasserstoffperoxid bezeichnet. Als Hauptquellen gelten sowohl die Mitochondrien, die ROS als Nebenprodukt der Atmungskette generieren als auch die NADPH Oxidase, die besonders in Neutrophilen Granulozyten und Phagozyten vorkommt. Auch bei Entzündungsreaktionen kann es zu erhöhtem oxidativem Stress kommen [224]. Die Akkumulierung von ROS kann wiederum zu oxidativen Schäden führen, aus denen mitochondriale Dysfunktionen und Gewebsverletzungen resultieren können. Dadurch kann auch die Autophagozytose angetriggert werden, um beispielsweise geschädigte Mitochondrien und Proteinaggregate aus dem Zytoplasma zu entfernen und so Zellschäden vorzubeugen [225]. Auf der anderen Seite führt eine Unterdrückung der Autophagozytose zu einer Anhäufung von geschädigten, ROS-produzierenden Mitochondrien und somit zu erhöhten intrazellulären ROS Mengen [69].

Um den Zusammenhang zwischen lysosomotropen Stoffen, Entzündungsreaktionen und ROS zu untersuchen, wurden verschiedenen ROS-Inhibitoren eingesetzt. Dabei konnte sowohl der allgemeine Radikalfänger N-Acetyl-L-cystein (NAC), als auch der NADPH und Stickstoffmonoxidsynthase-Hemmer Diphenyleneiodonium (DPI) die durch IL-1 β und Chloroquin ausgelöste CXCL8-Sekretion signifikant senken. Zusätzlich wurde auch ein Hemmstoff von mitochondrialer ROS eingesetzt, der ebenfalls zu ähnlichen Ergebnissen führte (Abb. 3-18 A). Ein Einfluss der Toxizität der eingesetzten Substanzen konnte mittels LDH Assay ausgeschlossen werden (Abb. 3-18 B).



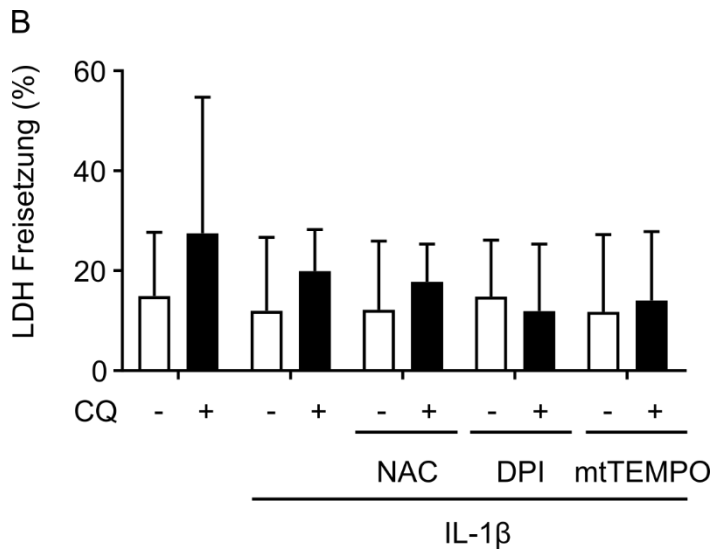


Abbildung 3-18: Der pro-inflammatorische Effekt von Chloroquin und IL-1 β kann durch verschiedene ROS Inhibitoren abgemildert werden. THP-1 Makrophagen wurden für eine Stunde mit oder ohne Chloroquin (20 μ M) vorinkubiert und anschließend mit oder ohne rh-IL-1 β (10 ng/ml) in An- oder Abwesenheit von Chloroquin, N-Acetyl-L-Cystein (NAC; 1 mM), Diphenyleneiodonium (DPI, 5 μ M) oder mitoTEMPO (mtTEMPO, 10 μ M) stimuliert. (A) Die CXCL8-Sekretion in den Zellkulturüberständen wurde nach 24 Stunden mittels ELISA bestimmt. (B) Zur Beurteilung der Zellviabilität wurde die LDH-Ausschüttung in den Zellkulturüberständen nach 24 Stunden gemessen. Die Balkendiagramme zeigen den Mittelwert + SD (n = 3). Statistische Unterschiede: *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001, einfaktorielles Varianzanalyse, gefolgt vom Bonferroni-Test. Teil A der Abbildung ist ein modifizierter Nachdruck nach [207] mit freundlicher Erlaubnis von Elsevier.

Dies deckt sich mit Ergebnissen in Langerhans Zellen, wo Chloroquin und Propranolol insbesondere die Ausschüttung von mitochondrialem ROS induzierten [157]. In THP-1 Makrophagen wurde ebenfalls ein Farbstoff eingesetzt, der von Mitochondrien produzierten oxidativen Stress detektiert (MitoSox Red). Jedoch konnte eher ein leichter Rückgang an Mitochondrialem ROS bei Stimulation mit Chloroquin nach einer und drei Stunden festgestellt werden (Abb. 3-19A).

Als weitere Methode zur Detektion von oxidativem Stress wurde die Elektronenspinresonanz (ESR) Spektroskopie eingesetzt, wobei die Reduzierung des Radikalfängers TEMPO (2,2,6,6-Tetramethylpiperidin 1-oxyl) erfasst wurde [189]. Nach einer Stunde Messzeit konnten keine wesentlichen Änderungen der TEMPO-Reduzierung im Vergleich zu Kontrolle erfasst werden (Abb. 3-19 B und C). Diese etwas widersprüchlichen Ergebnisse in Bezug auf den Einfluss von Chloroquin auf die ROS-Produktion in Makrophagen lassen möglicherweise auf eine spezielle, schwer zu erfassende Kinetik schließen, die es weiter zu untersuchen gilt.

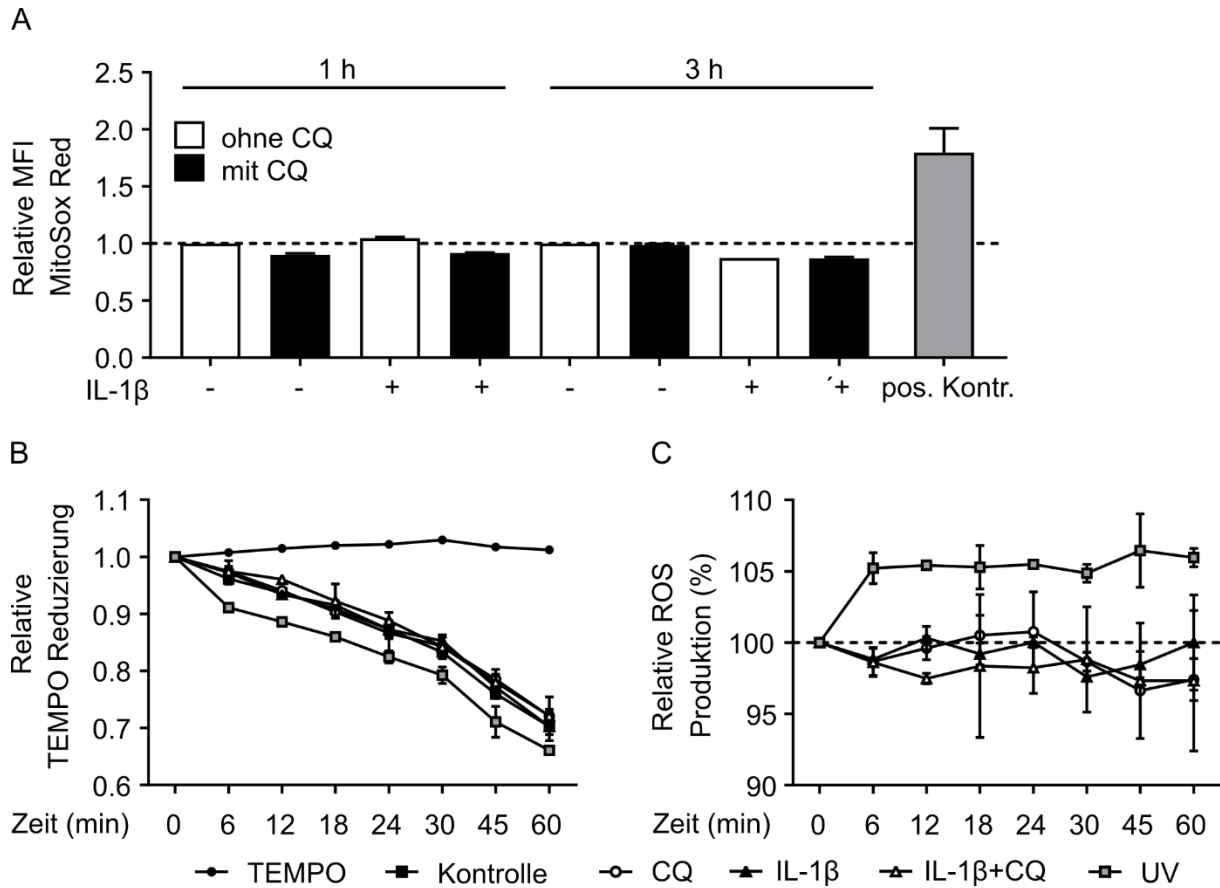
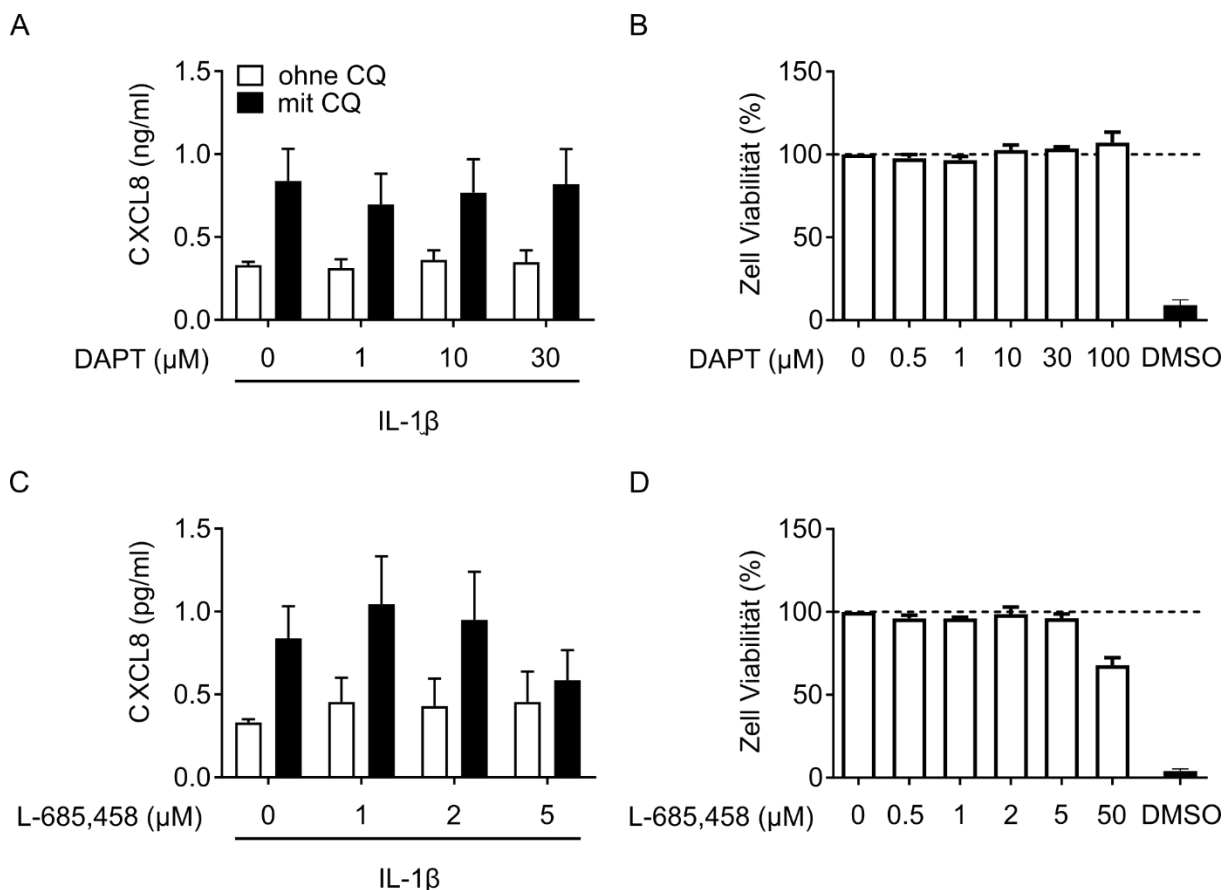


Abbildung 3-19: Chloroquin induziert keine messbaren ROS. (A) THP-1 Makrophagen wurden für eine Stunde mit oder ohne Chloroquin (20 μ M) vorinkubiert und anschließend mit rh-IL-1 β (10 ng/ml) in An- oder Abwesenheit von Chloroquin für eine und drei Stunden stimuliert. Für die Positivkontrolle wurden die Zellen für 30 Minuten mit Antimycin A (10 μ M) versetzt. Danach wurde für 30 Minuten mit MitoSox Red (5 μ M) inkubiert. Die abgelösten Zellen wurden schließlich mittels Durchflusszytometrie vermessen. Die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) wurde mittels FlowJo Software analysiert und die Proben wurden auf die unbehandelte Kontrolle normalisiert. (Kontrolle bezeichnet mit dem Wert 1). Das Balkendiagramm zeigt den Mittelwert + SD (n = 2). (B) THP-1 Makrophagen wurden mit TEMPO (100 μ M) und Wachstumsmedium oder rh-IL-1 β (10 ng/ml) in der An- oder Abwesenheit von Chloroquin (20 μ M) versetzt. Alle 6 Minuten wurde die TEMPO-Reduzierung mittels ESR gemessen. Als Positivkontrolle wurde mit UV-Licht (70 mJ/cm²) bestrahlt. (A) Die Messzahl der Amplitude wurde auf die Werte der reinen TEMPO-Lösung (100 μ M) zum Zeitpunkt 0 bezogen (Wert = 1). (B) Die Proben wurden auf die unbehandelte Kontrolle normalisiert (Kontrolle bezeichnet mit dem Wert 100 %). Die Kurvendiagramme zeigen den Mittelwert + SD (n = 2).

Studien zeigen einen Zusammenhang zwischen Autophagie-Inhibierung durch Chloroquin und eine erhöhte Aktivität des NOTCH1 (Notch Rezeptor 1) Signalweges [226], außerdem kann das Immunsystem über den NOTCH Signalweg moduliert werden. Neben der schon langen bekannten Funktion bei der Differenzierung, Regulierung und Aktivierung von lymphoiden T und B-Zellen, ist mittlerweile auch bekannt, dass der NOTCH Signalweg auch in die angeborene Immunantwort und das Entzündungsgeschehen eingreift [227]. Immunzellen können dabei sowohl NOTCH Rezeptoren exprimieren als auch dessen Liganden auf ihrer Oberfläche besitzen und so beispielsweise mit ihrer

Nachbarzelle kommunizieren. Der klassische NOTCH Signalweg setzt dabei voraus, dass ein Ligand an den Rezeptor bindet. Hierdurch kommt es zu verschiedenen Spaltungsvorgängen, wobei die Spaltung der intrazellulären NOTCH Domäne (NICD) von der Zellmembran durch eine γ -Sekretase am entscheidendsten ist. Dies erlaubt der NICD in den Zellkern zu wandern, wo es die Transkription von bestimmten Targetgenen aktivieren kann [228]. Außerdem ist vermehrt beschrieben, dass die Stimulierung von TLR zu einer erhöhten Expression von NOTCH Rezeptoren an der Zelloberfläche von Makrophagen führen kann. In wie weit dies zu einer pro- oder anti-inflammatorischen Immunantwort führt, wird dabei jedoch kontrovers diskutiert [229-231].

Da Chloroquin in THP-1 Makrophagen ebenfalls in der Lage ist, die Immunantwort in die pro- oder anti-inflammatorische Richtung zu lenken (Kap. 3.2.1), wurde im Folgenden untersucht, in wie weit der NOTCH Signalweg beteiligt ist. Hierfür wurden unterschiedliche Inhibitoren der γ -Sekretase eingesetzt. Jedoch konnte keiner der drei getesteten NOTCH Inhibitoren die CXCL8-Ausschüttung beeinflussen (Abb.3-20 A, C, E), wobei die Zellviabilität davon unbeeinflusst blieb (Abb. 3-20 B, D, F).



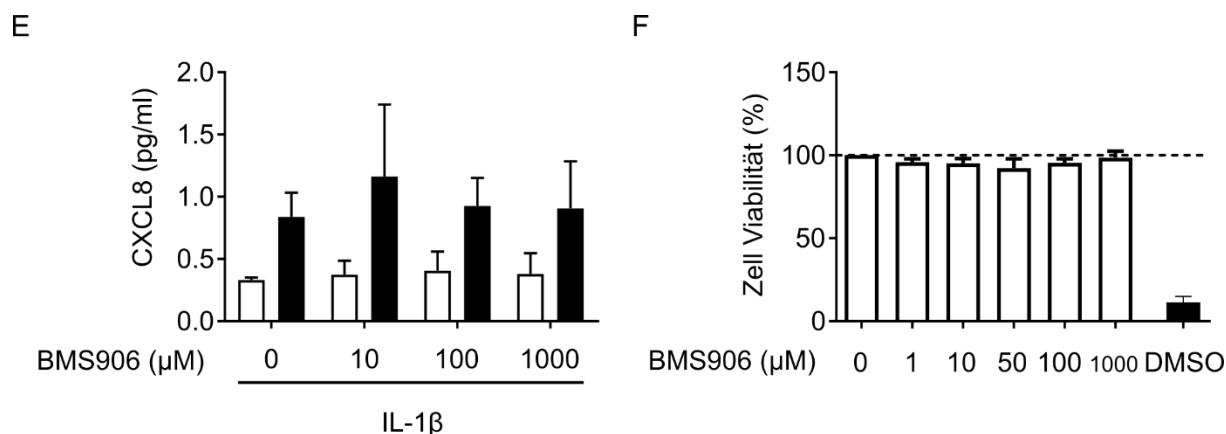
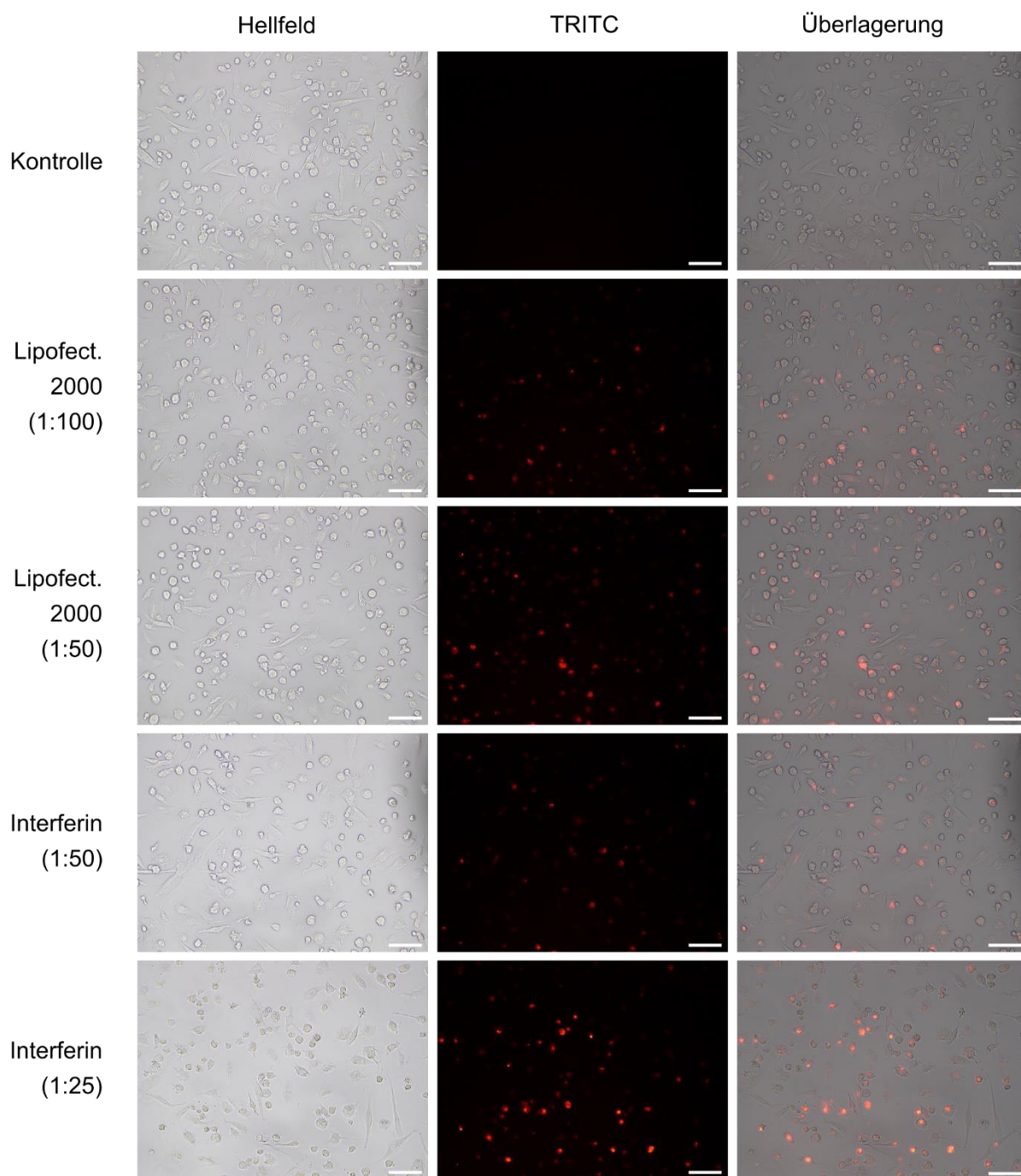


Abbildung 3-20: Chloroquin hat keinen Einfluss auf den NOTCH Signalweg unter sterilen inflammatorischen Bedingungen in THP-1 Makrophagen. THP-1 Makrophagen wurden für eine Stunde mit Chloroquin (20 µM) oder Wachstumsmedium vorinkubiert. Anschließend wurde in An- oder Abwesenheit von Chloroquin und/ oder verschiedenen Konzentrationen der NOTCH Inhibitoren (A und B) DAPT (0.5 – 100 µM), (C und D) L-685,458 (0.5 – 50 µM) und (E und F) BMS-906024 (BMS906; 1 – 1000 µM) mit oder ohne rh-IL-1β (10 ng/ml) stimuliert. (A, C und E) Die CXCL8-Sekretion in den Zellkulturüberständen wurde nach 24 Stunden mittels ELISA bestimmt. Die Balkendiagramme zeigen den Mittelwert + SD (n = 4). (B, D und F) Die Zellviabilität wurde nach 24 Stunden mittels MTT-Test bestimmt, wobei DMSO (10 % v/v) als Positivkontrolle eingesetzt wurde. Die Viabilität wurde auf die unbehandelte Kontrolle bezogen (Kontrolle bezeichnet mit dem Wert 100 %). Die Abbildung ist ein modifizierter Nachdruck nach [207] mit freundlicher Erlaubnis von Elsevier.

Um nachzuweisen, ob die Inhibierung des autophagischen Fluxes tatsächlich eine Folge der behinderten Fusionierung von Autophagosom und Lysosom ist, können Gene ausgeschaltet werden, die für die Fusion von beiden Organellen eine Rolle spielen. Im Anschluss daran ist es möglich, den Einfluss auf die Immunantwort auf IL-1β genauer zu betrachten. Hierfür bietet sich z. B. das Einbringen von siRNA in die Zellen an. siRNA sind kleine RNA-Stränge, die an gezielte Abschnitte der mRNA binden und zu dessen Abbau führen. Hierdurch bleibt die Translation des jeweiligen Abschnitts aus und die Expression des korrespondierenden Proteins wird verhindert [172]. Das Einbringen von siRNA in Immunzellen ist jedoch weniger trivial, da sich diese in der Regel nicht weiter teilen und die Zellviabilität negativ beeinflusst wird [232, 233]. Deshalb sollte zunächst eine Methode zur Einbringung von siRNA in THP-1 Makrophagen zu etablieren werden. Neben der Elektroporation und der viralen Transfektion, eignen sich auch Transfektionsreagenzien, um dieses Ziel zu erreichen.

Im Folgenden wurden hierfür zwei unterschiedliche Verdünnungen von Lipofectamin 2000 (Lipofect. 2000) von Thermo Fisher Scientific und von INTERFERin (Interferin) von der Firma Polyplus-transfection eingesetzt. Zur Visualisierung der Transfektionseffizienz wurde eine mit einem Fluoreszenzfarbstoff markierte siRNA verwendet. Unter dem Fluoreszenzmikroskop war ersichtlich, dass die beiden schwächeren Verdünnungen der eingesetzten Transfektionsreagenzien eine bessere Effizienz zeigten (Abb. 3-21 A). Die Zellviabilität wurde mittels LDH-Test bestimmt. Hier ergab sich insbesondere eine gesteigerte LDH-Freisetzung für die höhere INTERFERin-Konzentration (Abb. 3-21 B), sodass in weiteren Experimenten Lipofectamin 2000 in der Verdünnung 1:50 zum Einsatz kam.

A



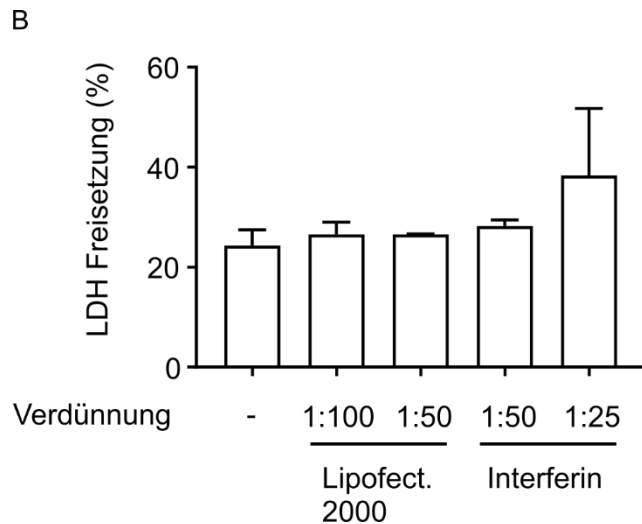


Abbildung 3-21: siRNA-Transfektionseffizienz und Toxizität von verschiedenen THP-1 Makrophagen. THP-1 Makrophagen wurden mit unterschiedlichen Verdünnungen Lipofectamin 2000 (Lipofect. 2000) (1:100 und 1:50) oder INTERFERin (Interferin) (1:50 und 1:25) mit fluoreszenzmarkierter siRNA transfiziert. (A) Zur Beurteilung der Transfektionseffizienz wurden die lebenden Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet. Die Bilder sind repräsentativ für 2 unabhängige Experimente. Maßstabsskala entspricht 50 μ m. (B) Zur Beurteilung der Zellviabilität wurde die LDH-Ausschüttung in den Zellkulturüberständen nach 24 Stunden gemessen. Das Balkendiagramm zeigt den Mittelwert + SD (n = 2).

Für das eigentliche Experiment wurde eine siRNA gegen STX-17 eingesetzt. STX-17 ist als SNARE Protein an der Fusion von Autophagosom und Lysosom beteiligt. Die Genausschaltung von STX-17 sorgt somit zu einer Inhibierung des autophagischen Flux [234].

Dabei konnte die Genexpression mit der zuvor etablierten Methode erfolgreich um 50 % reduziert werden (Abb. 3-22 A). Im weiteren Verlauf wurde untersucht, in wie weit die Genausschaltung von STX-17 unter sterilen inflammatorischen Bedingungen einen ähnlichen Effekt bringt, wie die Behandlung mit lysosomotropen Arzneistoffen. In mit siRNA gegen STX-17 behandelten Zellen zeigte sich jedoch keinen Effekt auf die CXCL8 Sekretion, wenn THP-1 Makrophagen mit IL-1 β stimuliert wurden. Der Zusatz von Chloroquin zeigte jedoch keine Unterschiede zwischen der CXCL8-Sekretion der Zellen, die mit Kontroll-siRNA (Ktrl.) und siRNA gegen STX-17 (STX-17) transfiziert wurden (Abb. 3-22 B).

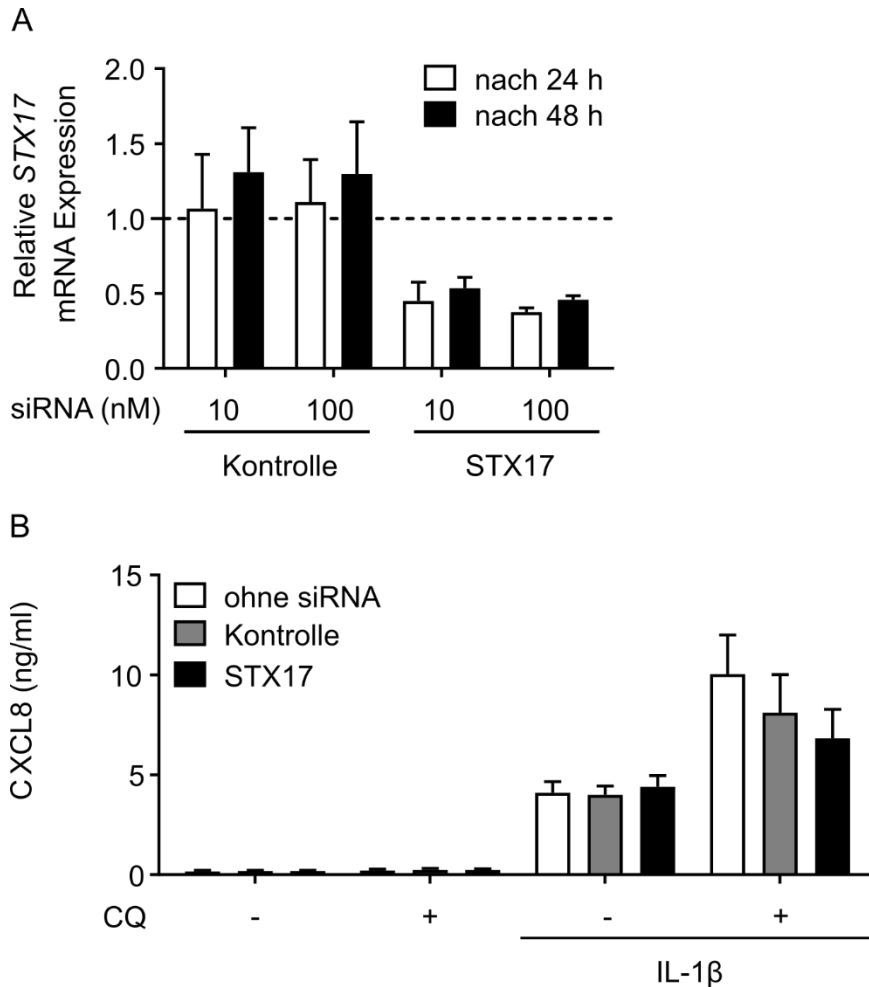


Abbildung 3-22: STX-17 hat keinen Einfluss auf die CXCL8 Sekretion in THP-1 Makrophagen. (A) THP-1 Makrophagen wurden mittels Lipofectamin 2000 mit verschiedenen Konzentrationen von siRNA gegen STX-17 (STX-17) und Kontroll-siRNA (Kontrolle.) (10 oder 100 nM) transfiziert und die Genexpression von STX-17 nach 24 und 48 Stunden mittels qPCR bestimmt. Die Genexpressionswerte von *STX-17* wurden auf das Haushaltsgen *GAPDH* normalisiert und die jeweiligen Werte wurden auf die Kontrolle bezogen (Kontrolle bezeichnet mit dem Wert 1.0). Das Balkendiagramm zeigt den Mittelwert + SD (n = 4). (B) THP-1 Makrophagen wurden mittels Lipofectamin 2000 mit siRNA gegen STX-17 (STX-17) und Kontroll-siRNA (Kontrolle) (100 nM) oder nur mit Lipofectamin 2000 (ohne siRNA) behandelt. 24 Stunden nach der Transfektion, wurden die Zellen mit Chloroquin (20 μ M) oder Wachstumsmedium für eine Stunde vorinkubiert und anschließend mit rh-IL-1 β (10 ng/ml) in der An- oder Abwesenheit von Chloroquin stimuliert. Die CXCL8-Sekretion in den Zellkulturüberständen wurde nach 24 Stunden mittels ELISA bestimmt. Das Balkendiagramm zeigt den Mittelwert + SD (n = 3).

3.3.3 Einfluss auf die Rezeptorendozytose und -internalisierung

Trotz seiner lysosomotropen Eigenschaften, konnte Chlorpromazin im Gegensatz zu Chloroquin und Fluoxetin den autophagischen Flux in den eingesetzten Konzentrationen in THP-1 Makrophagen nicht unterdrücken (Abb. 3-16). Interessanterweise ist Chlorpromazin genauso wie Chloroquin, schon lange als Inhibitor der Clathrin-vermittelten Endozytose bekannt [235]. Dabei sorgt Chlorpromazin dafür, dass für die Endozytose entscheidende Proteine wie AP-2 und Clathrin von der Plasmamembran entfernt werden und so die Endozytose erschwert wird [90]. Dynasore ist ein weiterer Endozytosehemmer, der

die GTPase Dynamin inhibiert und so das Abschnüren des Endosomens von der Plasmamembran verhindert [92]. Eine Ko-Stimulation von THP-1 Makrophagen mit Dynasore führte zu einer Verdopplung der CXCL8-Sekretion im Vergleich zur Stimulation mit IL-1 β alleine (Abb. 3-23). Somit wurde angenommen, dass neben den autophagieinhibierenden Eigenschaften der lysosomotropen Arzneistoffe, auch der Einfluss auf die Endozytose eine Rolle spielen könnte.

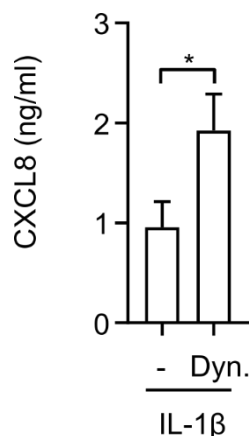


Abbildung 3-23: Der Endozytose-Inhibitor Dynasore erhöht die pro-inflammatorische Immunantwort auf IL-1 β in THP-1 Makrophagen. THP-1 Makrophagen wurden für 2 Stunden mit Dynasore (Dyn., 80 μ M) oder Wachstumsmedium vorinkubiert. Anschließend wurde mit oder ohne rh-IL-1 β (10 ng/ml) stimuliert. Die CXCL8-Sekretion in den Zellkulturüberständen wurde nach 24 Stunden mittels ELISA bestimmt. Das Balkendiagramm zeigt den Mittelwert + SD (n = 3). Statistische Unterschiede: *P < 0.05, ungepaarter t-Test. Die Abbildung ist ein modifizierter Nachdruck nach [207] mit freundlicher Erlaubnis von Elsevier.

Der Signalweg von IL-1 kann über die Endozytose des korrespondierenden Rezeptors kontrolliert werden. So triggert die Stimulation mit IL-1 β die Internalisierung des IL-1 Rezeptors, was schließlich die lysosomale Degradierung nach sich ziehen kann [147]. Chloroquin inhibiert beispielsweise die Endozytose des EGFR [111]. Dies ließ vermuten, dass lysosomotrope Stoffe möglicherweise die zelluläre Aufnahme von IL-1 Rezeptoren auf der Zelloberfläche inhibieren, was folglich zu einer erhöhten Anzahl an Rezeptoren auf der Zelloberfläche führt. Hierdurch ständen mehr Rezeptoren zur Stimulation zur Verfügung, was wiederum eine Erhöhung der pro-inflammatorischen Immunantwort auf IL-1 β erklären könnte.

IL-1 β bindet an IL-1R1, der hierdurch mit IL-1RAcP dimerisiert. Der hierbei entstandene Rezeptorkomplex ermöglicht das Ankurbeln der Signalkaskade, die schließlich in der vermehrten Expression pro-entzündlicher Stoffe, wie z. B. CXCL8, endet [236].

Um den Einfluss lysosomotroper Stoffe auf die extrazelluläre IL-1 Rezeptordichte zu untersuchen, wurde die Expression von IL-1R1 mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Stimulation mit IL-1 β allein sorgte dabei zu einer geringeren Lokalisierung von IL-1R1 nach 12 Stunden Inkubationszeit auf der Zelloberfläche (Abb. 3-24 A), welche nach 24 Stunden reversibel war (Abb. 3-24 D). Ko-Stimulation mit Chloroquin erhöhte zeitabhängig die IL-1R1 Expression und war nach 24 Stunden sogar um das 3-

fache erhöht (Abb. 3-24 B und D). Der Dynamin-Inhibitor Dynasore steigerte die IL-1R1 Expression ebenfalls, jedoch mit einer anderen Kinetik im Vergleich zur Stimulation mit Chloroquin. So war hier ein Anstieg der Rezeptorenanzahl bereits nach einer Stunde messbar, was in dem unterschiedlichen Mechanismus der Endozytoseinhibierung im Vergleich zu Chloroquin begründet sein könnte (Abb. 3-24 C). Darüber hinaus zeigten sowohl die Ko-Stimulation mit Chlorpromazin als auch insbesondere die zusätzliche Stimulation mit Fluoxetin eine Erhöhung der extrazellulären IL-1R1 Rezeptorexpression. Diese Beobachtungen korrelierten ebenfalls mit der erhöhten CXCL8 Ausschüttung durch die lysosomotropen Arzneistoffe sowie Endozytoseinhibitoren bei IL-1 β Stimulation (Abb. 3-13 A und C und Abb. 3-23).

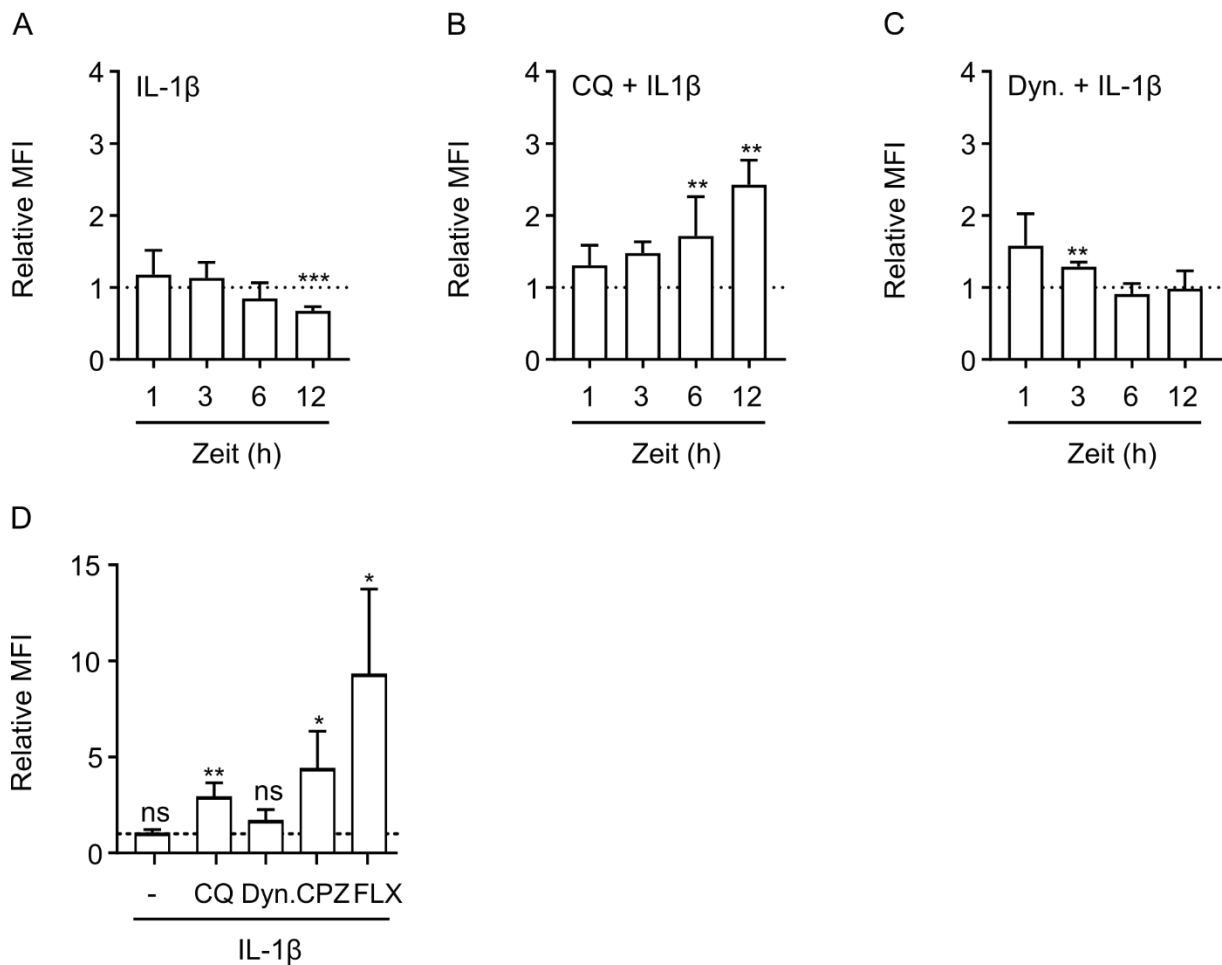


Abbildung 3-24: Lysosomotrope Arzneistoffe und Endozytoseinhibitoren verhindern die Internalisierung des IL-1R1. THP-1 Makrophagen wurden mit (A und D) Wachstumsmedium, (B und D) Chloroquin (20 μ M), (D) Chlorpromazin (14 μ M) oder Fluoxetin (20 μ M) für eine Stunde oder (C und D) mit Dynasore (80 μ M) für 2 Stunden vorinkubiert. Anschließend wurde in der An- oder Abwesenheit von Chloroquin, Chlorpromazin oder Fluoxetin mit rh-IL-1 β (10 ng/ml) stimuliert. (A-D) Nach der Ablösung wurden die Zellen mit PE-konjugierten Antikörpern behandelt und die IL-1R1 Expression mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Die MFI wurde mittels FlowJo Software analysiert. Die MFI der Isotypenkontrolle wurde von den Proben subtrahiert und die Proben wurden auf die unbehandelte Kontrolle normalisiert (Kontrolle bezeichnet mit dem Wert 1). Die Balkendiagramme zeigen den Mittelwert + SD (n = 3). Statistische Unterschiede: *P < 0.05, **P < 0.01, Einstichproben-t-Test. Die Abbildung ist ein modifizierter Nachdruck nach [207] mit freundlicher Erlaubnis von Elsevier.

3.4 IFN- γ erniedrigt den pro-inflammatorischen Effekt von Chloroquin

IFN- γ ist ein wichtiges pro-inflammatorisches Zytokin. Viele Studien zeigen, dass die immunmodulatorischen Eigenschaften im Zusammenhang mit der durch IFN- γ bedingten Autophagozytoseinduzierung stehen [237, 238]. Interessanter Weise zeigte eine Ko-Stimulation von IFN- γ mit IL-1 β und Chloroquin eine Erniedrigung der CXCL8 Expression, sowohl auf Genebene (Abb. 3-25 A) als auch auf Proteinebene (Abb. 3-25 B). Dies wies daraufhin, dass ein autophagozytose-induzierender Stoff die durch lysosomotrope Stoffe induzierte gesteigerte pro-inflammatorische Immunantwort auf IL-1 β erniedrigen kann. Folglich bekräftigt dies die Aussage, dass es einen Zusammenhang zwischen verstärkter Entzündungsreaktion und Inhibierung des autophagischen Flux gibt.

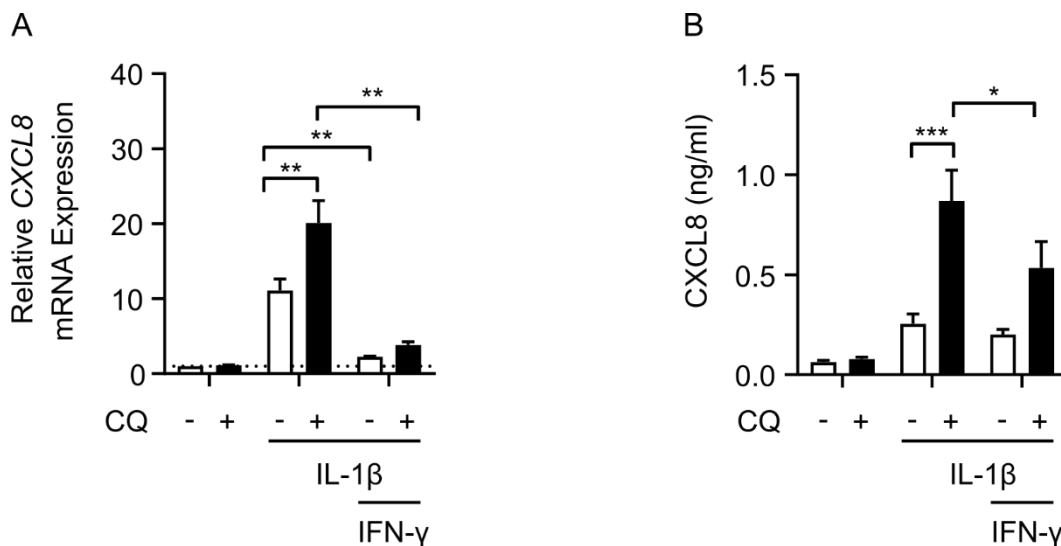


Abbildung 3-25: IFN- γ erniedrigt die pro-inflammatorischen Effekte von Chloroquin unter sterilen inflammatorischen Bedingungen. THP-1 Makrophagen wurden in An- oder Abwesenheit von Chloroquin (20 μ M) mit oder ohne rh-IL-1 β (10 ng/ml) und/ oder IFN- γ (1050 IU/ml) stimuliert. (A) Die Genexpressionswerte von CXCL8 nach 16 Stunden Inkubationszeit wurden auf das Haushaltsgen GAPDH normalisiert und die jeweiligen Werte wurden auf die Kontrolle bezogen (Kontrolle bezeichnet mit dem Wert 1.0). (B) Die CXCL8-Sekretion in den Zellkulturüberständen wurde nach 24 Stunden mittels ELISA bestimmt. Die Balkendiagramme zeigen den Mittelwert + SD (n = 3). Statistische Unterschiede: *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001, einfaktorische Varianzanalyse, gefolgt vom Bonferroni-Test. Die Abbildung ist ein modifizierter Nachdruck nach [207] mit freundlicher Erlaubnis von Elsevier.

IFN- γ hatte zumindest auf Genebene bereits einen Einfluss auf die CXCL8-Expression bei alleiniger Stimulation mit IL-1 β (Abb. 3-25 A). Korrespondierend dazu ist beschrieben, dass IFN- γ auch anti-inflammatorische Eigenschaften besitzt und den IL-1 Signalweg direkt beeinflussen kann [239]. Der IL-1 Signalweg kann durch den endogenen IL-1 Rezeptor Antagonisten (IL-1Ra) kontrolliert werden. IL-1Ra verhindert die Bindung von IL-1 α und IL-1 β an den IL-1R1, sodass die IL-1 Signalkaskade unterbunden wird [240]. IFN- γ führt in PBMCs zu einer erhöhten Ausschüttung von IL-1Ra und kann so zu einer anti-inflammatorischen Immunantwort beitragen [241].

In THP-1 Makrophagen erreichte die Ko-Stimulation mit IFN- γ bei Behandlung mit IL-1 β in An- oder Abwesenheit von Chloroquin ebenfalls eine Erhöhung der Genexpression von *IL-1Ra* (Abb. 3-26 A), jedoch konnte keine Ausschüttung in den Zellkulturüberständen auf Proteinebene detektiert werden (Abb. 3-26 B). Als weiterer Negativregulator des IL-1 Signalwegs fungiert IL-1R2, der zwar mit IL-1RAcP dimerisieren kann, es jedoch auf Grund der fehlenden TIR-Domäne nicht zu einer Weiterführung der Signalkaskade kommt [143]. Dennoch beeinflusste IFN- γ die Genexpression von *IL-1R2* bei Stimulation mit Chloroquin unter sterilen entzündlichen Bedingungen nicht (Abb. 3-26 C).

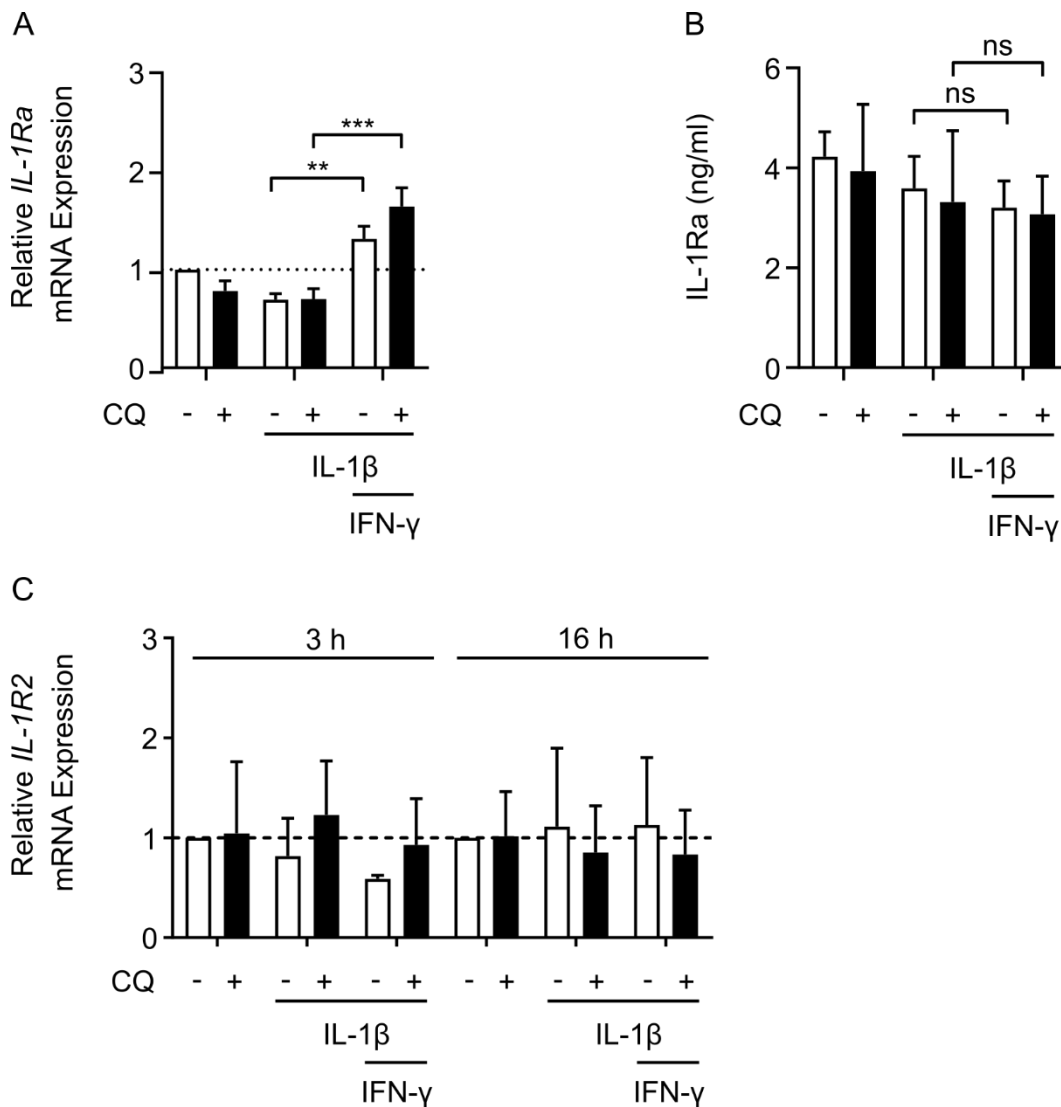


Abbildung 3-26: IFN- γ hat keinen Einfluss auf endogene Negativregulatoren des IL-1 Signalwegs. THP-1 Makrophagen wurden in An- oder Abwesenheit von Chloroquin (20 μ M) mit oder ohne rh-IL-1 β (10 ng/ml) und/ oder IFN- γ (1050 IU/ml) stimuliert. (A und C) Die Genexpressionswerte von *IL-1Ra* (A) und *IL-1R2* (C) nach 16 Stunden Inkubationszeit wurden auf das Haushaltsgen *GAPDH* normalisiert und die jeweiligen Werte wurden auf die Kontrolle bezogen (Kontrolle bezeichnet mit dem Wert 1.0). (B) Die IL-1Ra-Sekretion in den Zellkulturüberständen wurde nach 24 Stunden mittels ELISA bestimmt. Die Balkendiagramme zeigen den Mittelwert + SD (n = 3). Statistische Unterschiede: **P < 0.01, ***P < 0.001, einfaktorielle Varianzanalyse, gefolgt vom Bonferroni-Test. Teil A und B der Abbildung sind ein modifizierter Nachdruck nach [207] mit freundlicher Erlaubnis von Elsevier.

Neben der autophagieinduzierenden Wirkung von IFN- γ , ist ebenfalls eine Erhöhung der Phagozytoseaktivität bekannt [66]. Die Phagozytose ist eine Sonderform der Endozytose [72], somit ist auch ein Einfluss von IFN- γ auf die Rezeptorendozytose denkbar. Während die Behandlung von THP-1 Makrophagen mit IFN- γ alleine keinerlei Auswirkungen auf die Rezeptorexpression von IL-1R1 hatte (Abb. 3-27 A), war nach 6 und 12 Stunden Inkubationszeit mit zusätzlich IL-1 β und Chloroquin eine etwas geringere Rezeptordichte (Abb. 3-27 B) im Gegensatz zur Stimulation ohne IFN- γ (Abb. 3-24 B) sichtbar. Dieser Effekt war jedoch noch 24 Stunden aufgehoben, sodass hier ein ähnliches Ergebnis erzielt wurde, wie bei der Behandlung mit IL-1 β und Chloroquin alleine (Abb. 3-24 D), sodass davon ausgegangen werden kann, dass IFN- γ keinen Einfluss auf die Rezeptorinternalisierung von IL-1R1 hat.

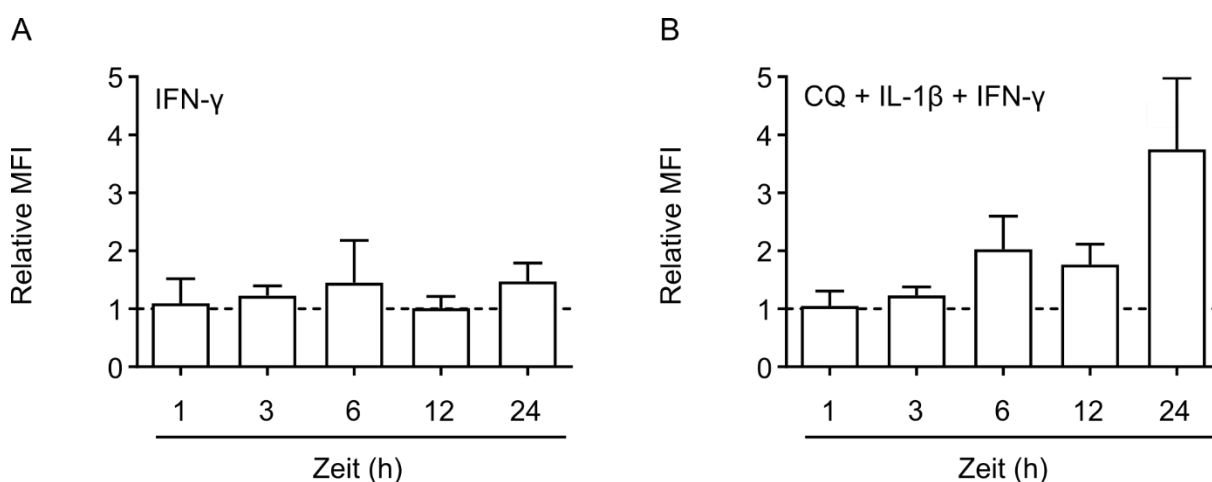


Abbildung 3-27: IFN- γ hat keinen Einfluss auf die Rezeptor-Internalisierung des IL-1R1. THP-1 Makrophagen wurden in mit IFN- γ (1050 IU/ml) alleine (A) oder in Anwesenheit von Chloroquin (20 μ M) und rh-IL-1 β (10 ng/ml) (B) stimuliert. Nach der Ablösung wurden die Zellen mit PE-konjugierten Antikörpern behandelt und die IL-1R1 Expression mittel Durchflusszytometrie bestimmt. Die MFI wurde mittels FlowJo Software analysiert. Die MFI der Isotypenkontrolle wurde von den Proben subtrahiert und die Proben wurden auf die unbehandelte Kontrolle normalisiert. (Kontrolle bezeichnet mit dem Wert 1). Die Balkendiagramme zeigen den Mittelwert + SD (n = 3).

Die Generierung von IL-1 β in myeloiden Zellen ist streng kontrolliert und wird in erster Linie über das Inflammasom bereitgestellt, wobei dies in zwei Schritten abläuft. Zunächst erfolgt durch bestimmte Stimuli ein *Priming*, sodass vermehrt pro-IL-1 β zur Verfügung steht, das in einem weiteren Schritt, der eigentlichen NLRP3-Aktivierung durch das Enzym Caspase-1 gespalten und so in seine aktive Form überführt wird (Kap. 1.3.2) [135].

Die Autophagozytose und das Inflammasom können sich gegenseitig beeinflussen. So kann auf der einen Seite die Aktivierung des Inflammasoms durch die Autophagozytose kontrolliert werden, auf der anderen Seite ist sowohl NLRP3 als auch IL-1 β ein Autophagiesubstrat. Eine exzessive Aktivierung der Immunantwort kann so unterbunden werden [68]. Auch das Lysosom selbst ist als an der NLRP3 Aktivierung beteiligt [242], während Hydroxychloroquin die NLRP3-Aktivierung unterdrücken kann [243]. Unsere Arbeitsgruppe konnten jedoch weder in Langerhans Zellen, noch in THP-1 Makrophagen

ein Zusammenspiel des NLRP3 Inflammasoms mit lysosomotropen Arzneistoffen unter sterilen entzündlichen Bedingungen feststellen [157, 207]. Auch die Genexpression von *IL-1 β* wurde bei Zugabe von Chloroquin im Vergleich zur Stimulation mit *IL-1 β* allein nicht beeinflusst. Die Ko-Stimulation mit *IFN- γ* konnte jedoch kurzfristig die *IL-1 β* -Expression, im Vergleich zur alleinigen Stimulation mit *IL-1 β* , in An- oder Abwesenheit von Chloroquin stark hochregulieren (Abb. 3-28). Somit wird ein Einfluss von *IFN- γ* auf den *Priming*-Schritt des NLRP3 Inflammasoms vermutet, der aber noch weiterer Untersuchungen bedarf.

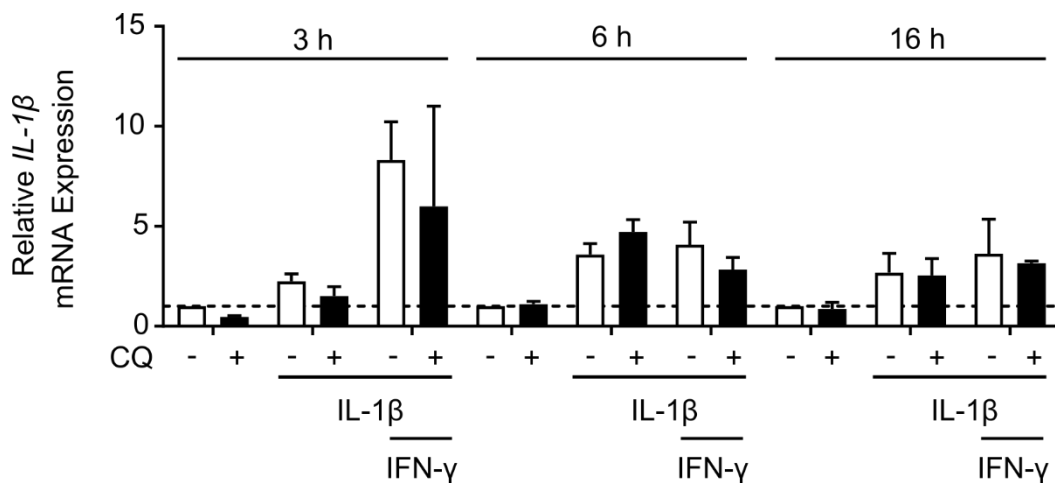


Abbildung 3-28: *IFN- γ* erhöht kurzfristig die *IL-1 β* Genexpression. THP-1 Makrophagen wurden in An- oder Abwesenheit von Chloroquin (20 μ M) mit oder ohne rh-*IL-1 β* (10 ng/ml) und/ oder *IFN- γ* (1050 IU/ml) stimuliert. Die Genexpressionswerte von *IL-1 β* nach 3, 6 und 16 Stunden Inkubationszeit wurden auf das Haushaltsgen *GAPDH* normalisiert und die jeweiligen Werte wurden auf die Kontrolle bezogen (Kontrolle bezeichnet mit dem Wert 1.0). Das Balkendiagramm zeigt den Mittelwert + SD (n = 3). Die Abbildung ist ein modifizierter Nachdruck nach [207] mit freundlicher Erlaubnis von Elsevier.

3.5 Einfluss von Chloroquin unter sterilen inflammatorischen Bedingungen in HEK293 Zellen

Bis hier konnte gezeigt werden, dass Chloroquin und andere lysosomotrope Stoffe die pro-inflammatorische Immunantwort auf IL-1 β in Makrophagen, Langerhans Zellen und Dendritischen Zellen erhöhen [156, 157]. Ob diese Erkenntnisse spezifisch für bestimmte Zelltypen des angeborenen Immunsystems sind, ist jedoch noch nicht geklärt. Um diese Hypothese in einer weiteren Zellart zu testen, eignete sich hierfür als weitreichend eingesetzte Zelllinie HEK293 Zellen, die aus menschlichen embryonalen Nierenzellen generiert werden. Darüber hinaus wird diese Zelllinie auch extensiv für Genmodifizierungsstudien und Gen-Knockdown-Techniken genutzt, da diese relativ einfach zu kultivieren sind und sich mit gängigen Verfahren, wie der RNA-Interferenz, modifizieren lassen [244]. Dies ist zwar beispielweise mit THP-1 Zellen möglich, jedoch weniger trivial (Kap. 3.3.2).

Vorversuche in HEK293 Zellen zeigten zunächst, dass diese zwar auf die Stimulation mit IL-1 β und/oder Chloroquin reagierten, die CXCL8-Ausschüttung jedoch mit 20-50 pg/ml sehr gering ausfiel (Abb. 3-29). Dennoch konnte ein minimaler Effekt von Chloroquin unter sterilen inflammatorischen Bedingungen erkannt werden.

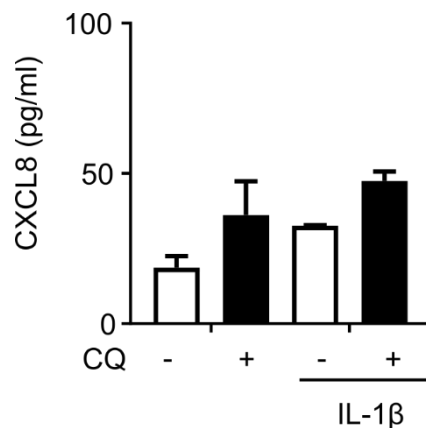


Abbildung 3-29: Chloroquin erhöht die CXCL8 Sekretion in HEK293 Zellen. HEK293 Zellen wurden für eine Stunde mit Chloroquin (20 μ M) oder Wachstumsmedium vorinkubiert und anschließend mit rh-IL-1 β (10 ng/ml) in der An- oder Abwesenheit von Chloroquin stimuliert. Die CXCL8 Sekretion in den Zellkulturüberständen wurde nach 24 Stunden mittels ELISA bestimmt. Das Balkendiagramm zeigt den Mittelwert + SD (n = 2).

Da einfache HEK293 Zellen jedoch kaum IL-1 Rezeptoren exprimieren [245], wurden für weitere Versuche transfizierte HEK blue IL-1 β Zellen der Firma Invivogen verwendet.

Neben der Tatsache, dass HEK blue IL-1 β Zellen stabil mit dem IL-1 Rezeptor transfiziert sind, sezernieren sie bei Aktivierung des NF κ B und AP-1 Signalwegs SEAP, das in den Zellkulturüberständen detektiert werden kann und als Maß für die pro-inflammatorische Immunantwort gilt [246]. Bei der Behandlung der HEK blue IL-1 β Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen von IL-1 β ergab sich

eine typische Konzentrations-Wirkungskurve (Abb. 3-30 A) und bewies somit die Funktionalität des SEAP-Reporter Experiments. In einem weiteren Vorversuch wurde die Toxizität von Chloroquin in den HEK blue IL-1 β Zellen mittels MTT Test untersucht (Abb. 3-30 B). Auch hier zeigte sich, dass ähnliche Ergebnisse wie in den THP-1 Makrophagen erreicht werden konnten (Abb. 3-8 B), sodass für weitere Versuche ebenfalls mit einer Chloroquin-Konzentration von 20 μ M gearbeitet wurde.

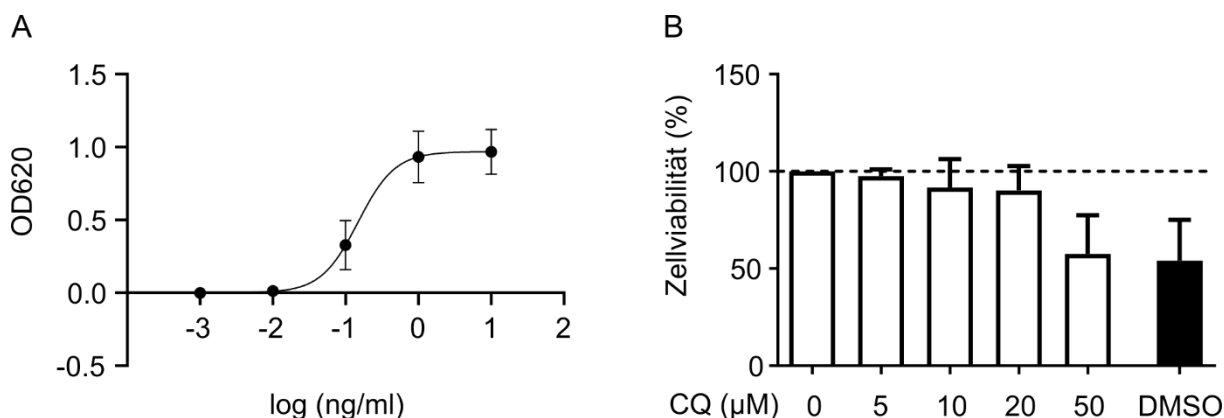


Abbildung 3-30: HEK blue IL-1 β Zellen reagieren auf die Stimulation mit IL-1 β und zeigen eine angemessene Zellviabilität bei Behandlung mit Chloroquin. (A) HEK blue IL-1 β Zellen wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen von rh-IL-1 β (0,001-10 ng/ml) behandelt. Nach 24 Stunden wurde die SEAP Freisetzung ins Zellkulturmedium mittels Quantibule Assay photometrisch vermessen. Das Kurvendiagramm zeigt den Mittelwert \pm SD (n = 4). (B) HEK blue IL-1 β Zellen wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen von Chloroquin (5-50 μ M) behandelt. Die Zellviabilität wurde nach 24 Stunden mittels MTT-Test bestimmt, wobei DMSO (10 % v/v) als Positivkontrolle eingesetzt wurde. Die Viabilität wurde auf die unbehandelte Kontrolle bezogen (Kontrolle bezeichnet mit dem Wert 100 %). Das Balkendiagramm zeigt den Mittelwert + SD (n = 4).

In weiteren Experimenten wurden die transfizierten HEK293 Zellen mit IL- β in der An- und Abwesenheit von Chloroquin stimuliert und erneut die SEAP-Freisetzung gemessen. Interessanterweise ergab sich hier eine Reduzierung der SEAP-Freisetzung durch Chloroquin (Abb. 3-31 A). Chloroquin gilt als Induktor für ER Stress [247, 248], der die SEAP Aktivität beeinflussen kann und wodurch die SEAP Sekretion runterreguliert wird [249]. Eine Untersuchung der Zytokinausschüttung zeigte allerdings keinen Effekt der Chloroquinstimulation unter sterilen inflammatorischen Bedingungen. Zwar war hier die CXCL8-Sekretion im Vergleich zu den einfachen HEK293 Zellen erhöht (Abb. 3-29), jedoch konnte auch hier nur eine Zytokinmenge zwischen 150 und 200 pg/ml detektiert werden (Abb. 3-31 B).

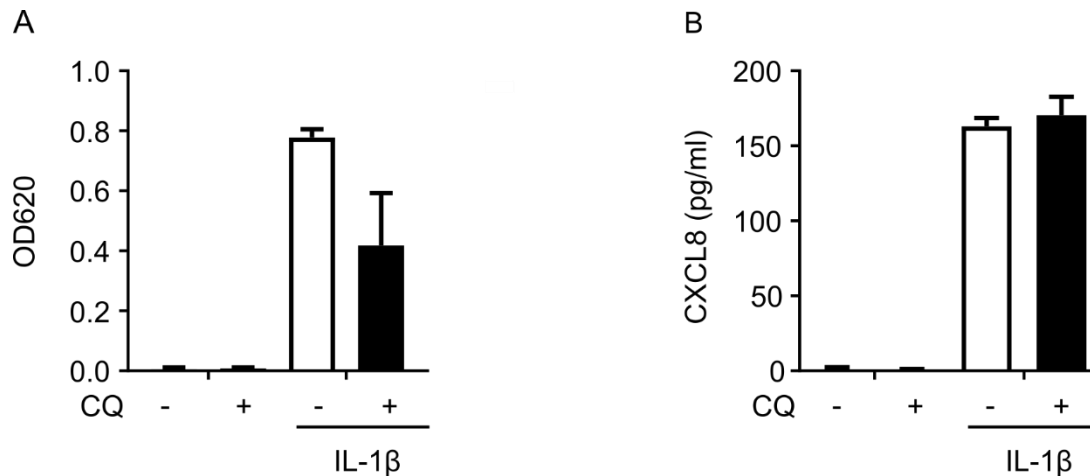


Abbildung 3-31: Chloroquin zeigt unterschiedliche Effekte in HEK blue IL-1 β Zellen. HEK blue IL-1 β Zellen wurden für eine Stunde mit Chloroquin (20 μ M) oder Wachstumsmedium vorinkubiert und anschließend mit rh-IL-1 β (10 ng/ml) in der An- oder Abwesenheit von Chloroquin stimuliert. (A) Nach 24 Stunden wurde die SEAP Freisetzung ins Zellkulturmedium mittels Quantibule Assay photometrisch vermessen. (B) Die CXCL8 Sekretion in den Zellkulturüberständen wurde nach 24 Stunden mittels ELISA bestimmt. Die Balkendiagramme zeigen den Mittelwert + SD (n = 4).

Herstellerinformationen zufolge, sezernieren HEK Zellen allgemein nur sehr geringe Mengen an Zyto- und Chemokinen wie CXCL8, sodass von einer Messung abgeraten wurde. Somit untersuchte ich in einem weiteren Experiment die Expression von CXCL8 und CXCL2 als zwei typischen, durch IL-1 β Stimulation induzierbare Gene [208]. Nach 3 Stunden Inkubationszeit steigerte Chloroquin die CXCL8 Expression fast um das 20-fache im Vergleich zur alleinigen Stimulation mit IL-1 β (Abb. 3-32 A) und auch die CXCL2 Expression, die in Makrophagen durch Chloroquin unter sterilen inflammatorischen Bedingungen ebenfalls erhöht wurde (Abb. 3-9), wurde ähnlich stark induziert (Abb. 3-32 B). Nach 6 Stunden war jedoch in beiden Fällen kein Einfluss von Chloroquin mehr nachweisbar. Dennoch war dies ein Hinweis darauf, dass Chloroquin den IL-1 Signalweg auch in Zellen, die nicht zum Immunsystem gehören, beeinflusste.

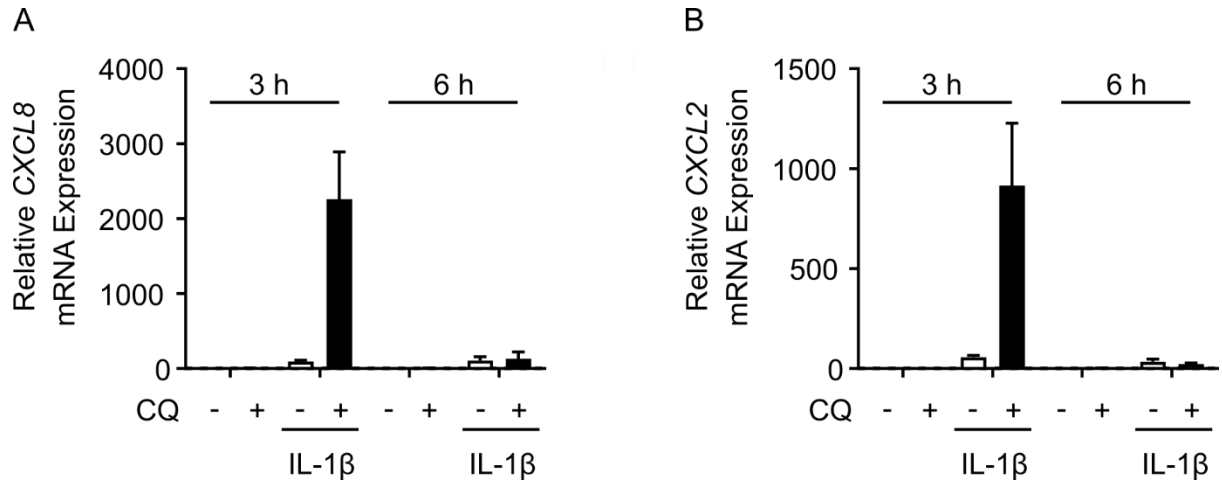


Abbildung 3-32: Chloroquin erhöht die Expression von durch IL-1 β induzierbaren Genen in HEK blue IL-1 β Zellen. HEK blue IL-1 β Zellen wurden für eine Stunde mit Chloroquin (20 μ M) oder Wachstumsmedium vorinkubiert und anschließend mit rh-IL-1 β (10 ng/ml) in der An- oder Abwesenheit von Chloroquin stimuliert. Die Genexpressionswerte von (A) *CXCL8* und (B) *CXCL2* nach 3 und 6 Stunden Inkubationszeit wurden auf das Haushaltsgen *YWHAZ* normalisiert und die jeweiligen Werte wurden auf die Kontrolle bezogen (Kontrolle bezeichnet mit dem Wert 1.0). Die Balkendiagramme zeigen den Mittelwert + SD (n = 3).

4. Diskussion

4.1 *In vitro* Modelle für Studien in Makrophagen

Auf Grund der großen Diversität von Makrophagen als einer der wichtigsten Zelltypen der angeborenen Immunantwort auf der einen, sowie der weitreichenden Komplexität von immunologischen Vorgängen auf der anderen Seite, besteht eine besondere Herausforderung in der Identifizierung und Etablierung geeigneter *in vitro* Modelle. In der vorliegenden Arbeit wurden zu Makrophagen ausdifferenzierte THP-1 Zellen als Zelllinienmodell sowie Makrophagen aus peripheren, mononukleären Blutzellen als Primärzellen verwendet und erfolgreich charakterisiert und etabliert. Diese Modelle bieten eine kosteneffiziente und praktikable Grundlage zur Erforschung komplexer immunologischer Vorgänge [167]. Dennoch handelt es sich hierbei um Modelle, somit ist deren Verwendung und die Übertragbarkeit auf *in vivo* Geschehnisse stets kritisch zu hinterfragen. Dabei ist sowohl die Vergleichbarkeit von Zelllinien und Primärzellen zu betrachten, als auch die Übertragbarkeit von *in vitro* auf *in vivo* (Tier)Modelle sowie auf das tatsächliche Geschehen im menschlichen Organismus.

4.1.1 THP-1 Zellen und THP-1 Makrophagen als Zelllinie

Zur Differenzierung von THP-1 Makrophagen aus THP-1 Monozyten eignet sich sowohl PMA als auch 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ (VD₃). Der Einsatz von PMA gegenüber VD₃ inklusive Erholungszeit in PMA-freiem Medium führt zu einer deutlich besseren Vergleichbarkeit mit primären Makrophagen hinsichtlich Morphologie und zellspezifischer Markern [194]. Schon 5-25 ng/ml PMA für 48 Stunden reichten aus, um die vermehrte Expression von den in der Literatur beschriebenen Zelloberflächenmarkern CD14 und CD11b zu erreichen (Abb. 3-1 A) sowie eine typische Morphologie und Adhärenz der Zellen zu erreichen (Abb. 3-3), wobei eine Erholungszeit von 24 Stunden unabdingbar war [192, 194, 196]. Im Gegensatz zu den Monozyten, zeigte die differenzierten Makrophagen eine hohe TNF-Sekretion, die von der eingesetzten PMA-Konzentration abhing (Abb. 3-1 B) und mit der Literatur korrespondierte [192, 250]. Das etablierte Protokoll zur Differenzierung war außerdem äußerst praktikabel in der Durchführung, insbesondere in Bezug auf eine 5-Tage-Woche, so konnten die Zellen beispielsweise zu Beginn der Woche am Montag mit PMA eingesät werden, am Mittwoch erfolgte der Mediumwechsel auf PMA-freies Medium zur Erholung und am Donnerstag konnten die Zellen dann für weitere Stimulationsversuche verwendet werden. Bei einer Stimulationszeit von in der Regel nicht mehr als 24 Stunden, konnte so am Freitag ein Experiment beendet werden und die erhaltenen Proben weiter ausgewertet werden. Dennoch ist beim Vergleich von eigenen Versuchsergebnissen in THP-1 Makrophagen mit der Literatur immer zu beachten, dass es nahezu in jeder Arbeit Unterschiede bezüglich der PMA-Konzentration, der Stimulations- und der Erholungszeiten gibt, die einen entscheidenden Einfluss auf die Versuchsergebnisse haben können.

In einigen Arbeiten werden die THP-1 Makrophagen auch in einem weiteren Schritt mit IFN- γ und LPS oder IL-4 zu M1 oder M2 Makrophagen polarisiert [251, 252]. Dies wurde zwar in dieser Arbeit nicht

untersucht, könnte aber in Zukunft noch weitere Aufschlüsse geben, insbesondere im Hinblick auf die Vergleichbarkeit von THP-1 Makrophagen und primären M1 und M2 Makrophagen.

Neben den in dieser Arbeit verwendeten THP-1 Zellen, gibt es eine Reihe weiterer humaner, monozytärer Zelllinien, die zur Erforschung von immunologischen Vorgängen in Makrophagen verwendet werden können. Hierzu zählen unter anderem die U937, ML-2, HL-60 oder Mono Mac 6 Zellen, wobei die U937 und die THP-1 Zellen hiervon die am häufigsten genutzten Zelllinien sind [193]. Die THP-1 Zellen stammen ursprünglich aus dem Blut eines 1-jährigen, männlichen Patienten mit einer akuten, monozytären Leukämie [253], während U937 Zellen aus dem generalisiertem, histozytären Lymphom eines 37-jährigen, männlichen Patienten isoliert wurden [254]. Sie unterscheiden sich somit vor allem in ihrem Entwicklungsgrad und ihrer Herkunft, wobei U937 Zellen herangereifte Zellen aus dem Gewebe und THP-1 Monozyten geringer gereifte, aus dem Blut stammende Monozyten sind [167]. Somit sind THP-1 Zellen besser mit den primären, aus peripheren mononukleären Blutzellen stammenden Monozyten vergleichbar. Dennoch lassen sich sowohl die U937 Zellen gleichermaßen mit PMA zu Makrophagen ausdifferenzieren [193], was einen Vergleich der beiden Zelllinienmodelle insbesondere in Bezug auf die Immunantwort auf lysosomotrope Stoffe unter sterilen entzündlichen Bedingungen interessant machen könnte. Zumindest in Bezug auf die anti-inflammatorischen Immunantwort auf Chloroquin bei Ko-Stimulation mit LPS konnten sowohl für THP-1 als auch U937 Makrophagen ein ähnlicher Effekt festgestellt werden [212].

4.1.2 Primäre Makrophagen aus peripheren, mononukleären Blutzellen

Im Gegensatz zu den immortalisierten Zelllinien, können auch primäre Zellen verwendet werden, welche zunächst frisch isoliert, ausdifferenziert und dann direkt verwendet werden müssen. Hierfür wurden mit zwei unterschiedlichen Methoden Monozyten aus peripheren, mononukleären Blutzellen isoliert, die zuvor über Dichtezentrifugation aus Buffycoat-Blutproben abgetrennt wurden. In einem weiteren Schritt wurden die so erhaltenen Monozyten mit GM-CSF oder M-CSF über 7 Tage zu M1- und M2-ähnlichen Makrophagen polarisiert. Dies simulierte in gewisser Weise *in vitro* die Generierung von rekrutierten Makrophagen aus im Blut zirkulierenden Monozyten nach, die auf Grund der unterschiedlichen, in diesem Fall künstlich geschaffenen, entzündlichen Umgebung zu M1 oder M2 ähnlichen Makrophagenpopulationen heranreifen.

Für die Generierung der Monozyten aus PBMCs wurden die Monozyten zum einen durch magnetische Microbeads gegen den für Monozyten typischen Oberflächenmarker CD14 abgetrennt, zum anderen wurde zur Isolierung die Eigenschaft ausgenutzt, dass Monozyten an Plastikoberflächen adhäreren, während die Lymphozyten, Erythrozyten und sonstiger Zellschrott als Suspensionsüberstand abgesaugt werden konnten (Abb. 2-2).

Im Vergleich lieferten beide Methoden ähnliche Makrophagenpopulationen mit vergleichbarer Morphologie und Expression der Oberflächenmarker, jedoch waren die Makrophagen, die aus den Monozyten generiert wurden, die durch die Adhärenz an Plastikoberflächen isoliert wurden, leichter ablösbar und ergaben eine höhere Ausbeute, wobei dies dennoch einer großen Spendervariabilität unterlag. Insbesondere die Polarisierung von GM-CSF generierten Makrophagen war leider nicht reproduzierbar möglich, obwohl dies in der Literatur mit einer ähnlichen Methodik publiziert ist [199-202, 255, 256]. Auf der anderen Seite wird in vielen Arbeiten nicht zwischen M1 und M2 Makrophagen unterschieden, sondern nur mit M-CSF generierten Makrophagen gearbeitet [257-260]. Zusätzlich stellt sich die Frage, ob und in wie weit die Unterscheidung von M1 und M2 Makrophagen die eigentlichen Gegebenheiten *in vivo* zu stark vereinfacht, insbesondere im Hinblick darauf, dass die M1 Makrophagen auch in der Lage sind, sich in M2 Makrophagen umzuwandeln und beide Subtypen auch nebeneinander vorkommen können. Außerdem können M2 Makrophagen noch weiter in M2a, M2b und M2c Makrophagen unterschieden werden [25].

Grundlage und Ausgangsmaterial für die Generierung der primären Makrophagen waren Buffycoat Blutkonserven, die aus den Blutspenden anonymer Spender*innen generiert und vom DRK Nord-Ost bereitgestellt wurden. Dabei handelte es sich um Spenden, bei denen Spender*innen im Alter zwischen 18 und 72 Jahren miteingeschlossen wurden, unabhängig von Alter, Herkunft und Geschlecht. Studien zeigen zwar, dass diese Faktoren generell einen Einfluss auf die Zusammensetzung der Blutzellen haben, die Anzahl der Monozyten hiervon jedoch nicht betroffen ist [261]. Da jedoch die Blutzellen untereinander interagieren, kann nicht ausgeschlossen werden, dass unterschiedliche Anteile an Blutzellen auch einen Einfluss auf die Generierung der Primärzellen *in vitro* haben können [191]. Außerdem untersuchte eine andere Studie die Blutzellen von verschiedenen Spendern*innen hinsichtlich des Geno- und Phänotyps und stellte dabei erhebliche Unterschiede fest [262]. Eine weitere Studie zeigt, dass primäre Makrophagen aus 3 verschiedenen Spender*innen in einem unterschiedlichen Maß den TLR4 exprimieren und hierdurch auch eine unterschiedliche Antwort auf LPS resultiert [263]. Zusätzlich wurde der Gesundheitszustand der Spender der verwendeten Buffycoats zwar als gesund angenommen, jedoch konnten (Vor-)Erkrankungen nicht ausgeschlossen werden. All dies unterstreicht, dass bei der Verwendung von Primärzellen eine hohe Spendervariabilität vorliegt, die erheblichen Einfluss auf die Versuchsergebnisse haben kann. Auf der anderen Seite spiegelt gerade dies auch sehr gut die Realität wider, in der jeder Mensch als Individuum betrachtet werden muss und unterschiedlich auf entzündliche und pharmakologische Stimuli reagiert. Von daher sollten trotz der Schwierigkeiten bei der Arbeit mit Primärzellen das Modell nicht außer Acht gelassen werden und weiter daran gearbeitet werden, gute Isolierungs- und Generierungsmodelle zu etablieren, die zumindest bei der Charakterisierung der Zellarten und -populationen reproduzierbare Ergebnisse gewährleisten.

4.1.3 Übertragbarkeit von *in vitro* auf *in vivo* Studien

Bei der *in vitro* Arbeit mit Zellen stellt sich immer wieder die Frage der Übertragbarkeit auf die Geschehnisse *in vivo*. Besonders bei der Erforschung von immunologischen Vorgängen ist stets zu beachten, dass die einzelnen Zellarten in Kontakt miteinander stehen und über diese über die Exprimierung von Oberflächenmarkern und anderen Proteinen auf der Zelloberfläche sowie die Ausschüttung von Zytokinen miteinander kommunizieren und aufeinander reagieren [191]. Insbesondere für die Makrophagen ist bekannt, dass diese ihre Funktion immer wieder an die äußeren Gegebenheiten anpassen können [14]. Außerdem kann die Interaktion von Zellen des angeborenen und des erworbenen Immunsystems am Ende ausschlaggebend für eine adäquate Immunantwort sein [264]. Um dies genauer zu untersuchen, wäre beispielsweise eine Ko-Kultur mit anderen Zellarten möglich. Für THP-1 Zellen ist beispielsweise eine Ko-Kultur mit Jurkat T-Zellen, die eine immortalisierte T-Zelllinie darstellen, beschrieben. So sorgt die Anwesenheit von Jurkat T-Zellen bei einer Infektion mit *Chlamydia trachomatis* für einen Wechsel von einer pro- in eine anti-inflammatorische Immunantwort der THP-1 Makrophagen [265]. Außerdem wurde bereits von unserer Arbeitsgruppe gezeigt, dass primäre Langerhans Zellen unter Einfluss von IL-1 β und Chloroquin nach Ko-Kultur mit T_H-Zellen den T_H1- in Richtung T_H17-Zelltyp verschieben konnten [156]. Es wäre sicherlich auch denkbar, sich in diesem Zusammenhang die Auswirkungen der Anwesenheit von Dendritischen Zellen und/ oder T-Zellen auf den Phänotyp und die inflammatorische Immunantwort von Makrophagen auf der einen, sowie die Veränderungen dendritischer und T-Zellen auf der anderen Seite anzuschauen.

Darüber hinaus werden *in vivo* Experimente in Nagetieren wie Mäusen oder Ratten immer noch als Goldstandard in der (immun)pharmakologischen Forschung angesehen, obwohl klar ist, dass sich das Immunsystem und die Immunantwort von Maus und Mensch unterscheidet [266]. Besonders in Hinblick auf die angeborene Immunität ergeben sich entscheidende Unterschiede, so sind im Menschen bis zu 10 TLRs bekannt, während man in der Maus bis dato 12 finden konnte. Außerdem gibt es Unterschiede in der Spezifität der Liganden und der Expression der Rezeptoren [267]. Darüber hinaus gibt es signifikante Unterschiede in der Anzahl von Monozyten in der Maus und im Menschen. Während der Anteil der Monozyten an den Blutzellen im Menschen ca. 10 % beträgt, sind es bei der Maus nur ca. 2-4%, was zusätzlich die Frage aufwirft, in wie weit Monozyten in Maus und Mensch unterschiedliche Aufgaben in der Pathophysiologie übernehmen [11]. Dennoch konnten mehrfach, vergleichbare anti-inflammatorischen Wirkungen von Chloroquin in humanen und Zellen aus Mäusen nachgewiesen werden [212, 268, 269]. Somit könnte es trotz der Unterschiede von Maus und Mensch sicherlich interessant sein, die pro-inflammatorischen Effekte unter sterilen entzündlichen Bedingungen in Maus-Zellen oder sogar in einem Mausmodell zu testen. Neben den klassischen Mausmodellen gibt es mittlerweile die so genannten „Humanisierten Mäuse“, bei denen immundefizienten Mäusen humane Zellen eingepflanzt werden, um so die Unterschiede zwischen Mensch und Maus zu minimieren [270].

4.2 Lysosomotrope Stoffe nehmen Einfluss auf die Zytokinsekretion unter sterilen pro-inflammatorischen Bedingungen in Makrophagen

Chloroquin, Fluoxetin und Chlorpromazin verstärkten die pro-inflammatorische Immunantwort auf IL-1 β in Makrophagen ähnlich wie lipophile Beta-Blocker in Langerhans Zellen [157], was die generelle Beteiligung des angeborenen Immunsystems an durch lysosomotrope Arzneistoffe ausgelösten Entzündungsreaktionen bekräftigt.

4.2.1 Chloroquin moduliert die Immunantwort in Makrophagen auf unterschiedliche Weise

Chloroquin, genauso wie sein Derivat Hydroxychloroquin, ist schon seit fast über 100 Jahren als Antimalariamittel im Einsatz. Bereits zu Beginn des 17. Jahrhunderts wurde erstmals Chinarinde zur Behandlung der Malaria eingesetzt, später identifizierte man die Quinine als eine wirksame Komponente. Dies führte schließlich zur Zulassung des synthetischen Quininderivats Chloroquin im Jahr 1949 und wenige Jahre später zur Zulassung von Hydroxychloroquin durch die FDA [153]. Neben vermehrt auftretender Resistenzen des Malariaerregers kann sowohl bei einer Therapie mit Chloroquin als auch mit Hydroxychloroquin eine arzneimittelinduzierte Psoriasis auftreten [271]. IL-23 spielt insbesondere bei der Pathogenese der autoinflammatorischen Psoriasis-erkrankung eine entscheidende Rolle, ebenso wie ein spezieller Typ der T_H-Zellen, die als T_H17-Zellen bezeichnet werden [272]. Studien unserer Arbeitsgruppe vermuten die Beteiligung von dermalen Dendritischen Zellen und Langerhans Zellen am Entzündungsgeschehen dieser unerwünschten Arzneimittelwirkung, wobei die durch IL-1 β induzierte IL-23-Sekretion durch beide Antimalariamittel in aus Monozyten generierten Langerhans Zellen deutlich erhöht werden konnte [156]. Die Frage, in wie weit Makrophagen generell beteiligt sind, ist jedoch noch nicht eindeutig geklärt.

So konnte ich zeigen, dass Chloroquin eine Erhöhung der CXCL8-Sekretion unter sterilen entzündlichen Bedingungen in THP-1 Makrophagen auslösen konnte (Abb. 3-8 A). In primären M-CSF generierten Makrophagen konnte diese Beobachtung bestätigt werden, wenn auch auf Grund der Spendervariabilität keine signifikanten Ergebnisse erzielt werden konnten (Abb. 3-12). CXCL8 als auch CXCL2, sind zwei pro-inflammatorische Chemokine, dessen Sekretionen vor allem durch IL-1 β reguliert werden [208]. Die Tatsache, dass Chloroquin unter sterilen entzündlichen Bedingungen auch die Genexpression von CXCL2 hochregulierte (Abb. 3-9), deutet eine Interaktion von lysosomotropen Stoffen und mit dem IL-1 Signalwegs an, die bisher noch nicht genauer untersucht wurde.

Chloroquin und Hydroxychloroquin werden auch zur Behandlung von rheumatischen Erkrankungen wie der rheumatoiden Arthritis, dem systemische Lupus erythematodes und dem primären Sjögren Syndrom eingesetzt [273]. Auch wenn die genauen Mechanismen noch nicht eindeutig geklärt sind, so wird vermutet, dass Chloroquin die Signalweiterleitung bei Stimulation von extra- und intrazellulärer TLRs

zu inhibieren vermag und so eine anti-inflammatorische Wirkung auslösen kann [212, 274]. Interessanterweise zeigte Chloroquin bei Stimulation von THP-1 Makrophagen mit dem TLR4-Agonisten LPS nur eine geringe Senkung der durch LPS-induzierten TNF-Ausschüttung (Abb. 3-11), wohingegen der anti-inflammatorische Effekt in primären Makrophagen (Abb. 3-12 A und B) signifikant ausfiel. Viele Publikationen zeigen zwar eine deutliche Senkung der pro-inflammatorischen Zytokine bei Ko-Stimulation mit LPS und Chloroquin sowohl in verschiedenen Makrophagenzelllinien als auch in PBMCs [211, 212, 268], jedoch muss beim Vergleich mit meinen nicht so deutlichen Ergebnissen auf den Einsatz von sehr unterschiedlichen Chloroquin-Konzentrationen als auch Abweichungen in den Differenzierungs- und Isolierungsmethoden der verwendeten Zelltypen hingewiesen werden. In einer Arbeit wurde erst mit einer Konzentrationen von 100 μ M ein signifikanter anti-inflammatorischer Effekt in THP-1 Makrophagen gezeigt [212], während in einer anderen Arbeit mit PBMCs schon bei einer Chloroquin-Konzentration von 10 μ M eine signifikante Senkung der TNF-Sekretion im Vergleich zur alleinigen Stimulation mit LPS erreicht werden konnte. Chloroquin-Konzentrationen über 50 μ M zeigten in meinem THP-1 Modell jedoch schon deutliche zytotoxische Effekte (Abb. 3-8 B), sodass im weiteren Verlauf der Arbeit darauf verzichtet wurde, höhere Konzentrationen einzusetzen. Dennoch zeigte Chloroquin in THP-1 Makrophagen auch noch bei toxischen Konzentrationen einen pro-inflammatorischen Effekt bei Ko-Stimulation mit IL-1 β im Vergleich zur alleinigen Behandlung mit IL-1 β (Abb. 3-8 C). An dieser Stelle könnte sicherlich auch die Untersuchung der anti-inflammatorischen Wirkung von verschiedenen Chloroquin-Konzentrationen bei LPS-Stimulation in THP-1 Makrophagen interessant sein, um die Vergleichbarkeit der veröffentlichten Studien mit meinen Ergebnissen noch genauer zu untersuchen.

Generell konnten jedoch ähnliche Ergebnisse in THP-1 Makrophagen und Primärzellen erreicht werden. Die hohe Streuung der Ergebnisse in Primärzellen könnte sich vor allem durch die biologische Variabilität der Spender*innen ergeben. So zeigen auch *in vitro* generierte Makrophagen eine variable Expression bestimmter Oberflächenproteine, die mit dem unterschiedlichen inflammatorischen Ansprechen auf oxidiertes *Low-density* Lipoprotein korrelierte [275]. Dies zeigt ebenfalls Schwierigkeiten, mit primären Makrophagen signifikante Ergebnisse zu erhalten, wobei natürlich gerade dies die Wirklichkeit besser abbildet. Darüber hinaus war die Arbeit mit Primärzellen zusätzlich durch eine unterschiedliche Zellausbeute erschwert und im Gegensatz zu Zelllinien können die Zellen in der Regel nicht eingefroren werden sondern müssen direkt nach der Isolation verwendet werden. Trotz vieler Ähnlichkeiten zu den THP-1 Makrophagen [194] muss dennoch darauf geachtet werden, dass Zelllinie und Primärzellen sich unterscheiden und nicht alle Ergebnisse 1:1 übertragen werden können [195]. Dennoch bieten Zelllinien eine einfach zu handhabende Alternative, die sich besonders für mechanistische Studien eignet.

4.2.2 Der pro-inflammatorische Effekt lysosomotroper Stoffe hängt mit den chemischen Eigenschaften zusammen

Der selektive Serotonin-Wiederaufnahme-Hemmer Fluoxetin sowie das Antipsychotikum Chlorpromazin zeigten im Vergleich zu Chloroquin eine ähnliche pro-inflammatorische Immunantwort bei Ko-Stimulation mit IL-1 β (Abb. 3-13 A und C). Beide Arzneistoffe besitzen wie Chloroquin einen pK_s-Wert zwischen 6,5 und 11 und einen clogP-Wert über 2 und werden somit als lysosomotrop bezeichnet (Tab. 1-3). Auch in vorangegangenen Arbeiten unserer Arbeitsgruppe konnte bereits in Langerhans Zellen gezeigt werden, dass der beobachtete pro-inflammatorische Effekt mit der Lysosomotropie zusammenhängt. Lipophile Beta-Andrenozeptor-Blocker wie Propranolol und Penbutolol erhöhten dort die IL-23-Sekretion unter sterilen entzündlichen Bedingungen, während dieser Effekt bei Arzneistoffen mit einem clogP-Wert unter 2 weniger stark ausgeprägt war [157]. Der Zusammenhang zwischen Lysosomotropie und Verstärkung von Entzündungsreaktionen ist also in unterschiedlichen Zelltypen des angeborenen Immunsystems vorhanden.

Die Aufrechterhaltung des lysosomalen pH-Werts wird über eine vATPase reguliert, die als Protonenpumpe fungiert [97]. Die Tatsache, dass der vATPase Inhibitor Bafilomycin A₁ selbst in der Lage war, die CXCL8-Sekretion bei Ko-Stimulation mit IL-1 β zu erhöhen (Abb. 3-15 A), ist ein weiterer Hinweis darauf, dass Beeinträchtigungen der lysosomalen Funktion und der pro-inflammatorischen Immunantwort in Zusammenhang stehen. Bei zusätzlicher Stimulation mit Chloroquin konnten sich die Effekte der beiden Stoffe jedoch nicht addieren. Da die Akkumulation lysosomotroper Stoffe in sauren Organellen vom pH-Wert abhängig ist, kann man davon ausgehen, dass eine vorherige Erhöhung des lysosomalen pH-Werts durch Bafilomycin A₁ die Anreicherung von Chloroquin im Lysosom erschwert und dadurch ein zusätzlicher pro-inflammatorischer Effekt ausbleibt. Für den anti-inflammatorischen Effekt bei Ko-Stimulation mit LPS schien ebenfalls die Senkung der IL-6-Sekretion mit der Lysosomotropie zusammenhängen (Abb 3-15 C), während die TNF-Sekretion nicht durch Bafilomycin A₁ allein gesenkt werden konnte (Abb. 3-15 B). Dies deckt sich mit Studien, die für die Inhibierung der LPS-induzierten TNF-Ausschüttung in Makrophagen einen von der Lysosomotropie unabhängigen Mechanismus diskutieren [211]. Auch mechanistische Unterschiede in der Senkung der IL-6 und TNF-Sekretion bei Ko-Stimulation mit LPS durch Chloroquin wurden bereits gezeigt und können durch diese Ergebnisse bestätigt werden [212].

Chloroquin, Fluoxetin und Chlorpromazin zeigten eine Erniedrigung der LTR Färbung nach 30 Minuten, was auf eine Erhöhung des lysosomalen pH-Werts schließen lässt [108]. Dies wurde jedoch nach 4 Stunden wieder aufgehoben, Fluoxetin sorgte nach längerer Inkubation sogar für eine erhöhte LTR Färbung im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 3-14). Auch wenn dies zunächst überraschend ist, so zeigt eine Studie in H9C2 Zellen ebenfalls eine kurzzeitige Verminderung der LTR-Färbung die nach 4 Stunden wieder aufgehoben wurde. Dabei wird ein Kompensationsmechanismus der Zelle diskutiert, bei

dem auf lysosomale Störungen mit einer Erhöhung der lysosomalen Aktivität und der lysosomalen Biogenese reagiert wird, wodurch jedoch die Degradierungsleistung der Lysosomen nicht wiederhergestellt werden konnte [109]. Eine erhöhte Anhäufung des Autophagiesubstrats p62 konnte in THP-1 Makrophagen auch für die Stimulation mit Chloroquin und Fluoxetin festgestellt werden, sodass auch hier von gestörten lysosomalen Verdauungsprozessen ausgegangen werden kann (Abb. 3-16). Um diese These noch weiter zu stützen sollte zusätzlich untersucht werden, welchen Einfluss Chloroquin, Fluoxetin und insbesondere Chlorpromazin auf die lysosomale Aktivität und Biogenese haben. Bei lysosomaler Disruption können lysosomalen Proteasen wie den Cathepsine ins Zytosol freigesetzt werden und über eine Aktivierung des Inflammasoms auch entzündliche Reaktionen sowie Pyroptose auslösen [242]. Eine Aktivitätsbestimmung dieser Cathepsine sowie dessen Lokalisierung bei der Behandlung mit lysosomotropen Stoffen könnte sicherlich weiteren Aufschluss über die Frage der Beteiligung der Lysosomotropie am Entzündungsgeschehen geben. Auch ein genauer Blick auf die Transkriptionsfaktoren TFEB, TFE3, TFEC und MiTF, die die lysosomale Zusammensetzung und Funktion regulieren wäre sinnvoll, um eine Beeinflussung der lysosomalen Biogenese zu erforschen [101].

4.3 Der Einfluss lysosomotroper Stoffe auf Autophagozytose und Endozytose steht im Zusammenhang mit dem pro-inflammatorischen Effekt unter sterilen entzündlichen Bedingungen

Die durch die Behandlung mit lysosomotropen Stoffen bedingte lysosomale Dysfunktion kann sowohl die Degradierung der autophagosomalen als auch der endosomalen Ladung beeinträchtigen [98]. Umgekehrt sind die Autophagozytose als auch die Endozytose wichtige Regulatoren der Immunantwort [147, 276]. Im Einklang damit konnte die folgende Arbeit zeigen, dass die Autophagie-inhibierenden Eigenschaften als auch die verminderte Internalisierung von IL-1 Rezeptoren durch lysosomotrope Stoffe sterile Entzündungen in Makrophagen begünstigen.

4.3.1 Chloroquin, Fluoxetin und Chlorpromazin modulieren die Autophagozytose auf unterschiedliche Weise

Während Chloroquin schon lange ein anerkannter Autophagie-Inhibitor ist [111], wird in der Literatur für Fluoxetin und Chlorpromazin sowohl eine Induktion als auch eine Behinderung des autophagischen Flux diskutiert [1, 217-219]. Wie erwartet, inhibierte Chloroquin die Degradierung von Autophagosomen in THP-1 Makrophagen genauso wie Fluoxetin. Im Gegensatz dazu konnte Chlorpromazin die LC3-I zu LC3-II Konversion sowie die Expression von p62 nicht hochregulieren, sodass Chlorpromazin in den

eingesetzten Konzentrationen die Autophagozytose in THP-1 Makrophagen nicht beeinflusste (Abb. 3-16).

Erst kürzlich fand eine Studie heraus, dass der Mechanismus der Inhibition des autophagischen Flux vor allem in der Verhinderung der Fusion von Autophagosom und Lysosom liegt und weniger in der Störung des pH-Werts und der degradierenden Eigenschaften des Lysosoms begründet ist [111]. Dennoch sollten weitere Experimente durchgeführt werden, um eine bessere Aussage diesbezüglich treffen zu können. Hochauflösende, bildgebende Verfahren wie die Elektronenmikroskopie könnten genutzt werden, um das intrazelluläre Geschehen besser abzubilden und eine mögliche Akkumulation der Autophagosomen durch lysosomotrope Stoffe in THP-1 Makrophagen zu zeigen. Außerdem könnte man mittels Fluoreszenzmikroskopie die Ko-Lokalisation eines lysosomalen und eines autophagosomalen Markers zeigen. So konnte in unserem Arbeitskreis bereits gezeigt werden, dass die Ko-Lokalisation von LAMP1 und LC3 in Langerhans Zellen durch Propranolol ausblieb [157]. Zusätzlich können auch bestimmte Gene ausgeschaltet werden, die für Proteine translatieren, die an der Fusion von Autophagosom und Lysosom beteiligt sind.

4.3.2 Der pro-inflammatorische Effekt von Chloroquin unter sterilen entzündlichen Bedingungen in Makrophagen steht in Zusammenhang mit der Autophagie-Inhibition

STX-17 ist eines der Proteine, das als autophagosomales SNARE an der Verschmelzung von Autophagosom und Lysosom teilnimmt. Somit wurde in der vorliegenden Arbeit siRNA gegen STX-17 eingesetzt. Jedoch hatte die IL-1 β -Stimulation von THP-1 Makrophagen, die mit siRNA gegen STX-17 transfiziert waren, keine Auswirkungen auf die CXCL8-Ausschüttung im Vergleich zu den Kontrollen. Dies lässt darauf schließen, dass die Inhibierung der Fusion von Autophagosom und Lysosom durch Chloroquin nicht alleine entscheidend für die pro-inflammatorische Immunantwort bei Ko-Stimulation mit IL-1 β ist. Jedoch waren die Werte für die CXCL8-Sekretion allein durch die Kontrollen mit dem Transfektionsreagenz Lipofectamin 2000 um mehr als das 5-fache erhöht als in den bisherigen Experimenten (Abb. 3-22 B). Lipofectamin 2000 hat also schon allein einen pro-inflammatorischen Effekt auf THP-1 Makrophagen, obwohl die Zellviabilität nicht beeinflusst war (Abb. 3-21 B). Somit stellt sich die Frage, ob der Effekt von Lipofectamin 2000 allein eventuell andere Effekte überdeckt. In wie weit Lipofectamin 2000 das angeborene Immunsystem beeinflusst ist jedoch wenig untersucht. Zumindest berichtet eine Studie aus dem letzten Jahr darüber, dass Lipofectamin 2000 den Typ I Interferon-Signalweg in Maus-Makrophagen beeinflussen kann [277]. Auf der anderen Seite war die Runterregulation des STX-17 Gens nur bis auf die Hälfte möglich, was unter anderem auch daran liegt, dass generell Immunzellen schwerer transfizierbar sind [232, 233]. Sicherlich könnte man aber an dieser Stelle noch andere Transfektionsmethoden, wie beispielsweise die Elektroporation, oder weitere

Transfektionsreagenzien ausprobieren. Zusätzlich wurde erst kürzlich ein neuer Inhibitor von STX-17 entdeckt [278], sodass dessen Testung sicherlich auch aufschlussreich sein könnte.

Die Konversion von LC3-I zu LC3-II in Verbindung mit einer Akkumulation des Autophagiesubstrats p62 sind klassische Marker zur Untersuchung des autophagischen Flux [50]. Neben seiner Rolle als Adapterprotein für die bei der selektiven Autophagozytose zu degradierenden intrazellulären Bestandteilen, sind die Funktionen und Aufgaben von p62 vielfältig. So kann es unter anderem oxidative, metabolische und entzündliche Signalwege regulieren [220]. Zu den entzündlichen Signalwegen zählt auch der NFκB-Signalweg. Dabei kann p62 über die Ubiquitinierung des IKK-Komplexes den Transkriptionsfaktor NFκB aktivieren [279]. Darüber hinaus hat es auch einen Einfluss auf die Degradierung von A20, welcher ein Negativregulator des NFκB Signalwegs ist [280]. Außerdem kann p62 über einen positiven Feedback-Mechanismus durch NFκB hochreguliert werden [281]. Studien konnten auch zeigen, dass die durch IL-1β induzierte CXCL8-Sekretion in p62 transfizierten Zellen erhöht ist [223] und p62 maßgeblich an der durch Chloroquin ausgelösten NFκB-Aktivierung und CXCL8 Genexpression beteiligt zu sein scheint [282]. Zusätzlich ist eine Interaktion von p62 und der MAPK p38 beschrieben [220, 222]. In THP-1 Makrophagen konnte die durch IL-1β und Chloroquin induzierte CXCL8-Sekretion durch die Inhibierung der MAPK p38 komplett verhindert werden (Abb. 3-17), was bereits für Chloroquin und Propranolol in Langerhans Zellen gezeigt werden konnte [156, 157].

4.3.3 Einfluss auf ROS

Der Zusammenhang von oxidativem Stress und der Autophagozytose-Aktivität ist bereits vielfach beschrieben, wobei die Mitochondrien als Hauptquelle für ROS gelten. Diese werden besonders über die mitochondriale Atmungskette frei, wobei beschädigte Mitochondrien über Autophagozytose degradiert werden können, da vermehrter oxidativer Stress zu erheblichen Zellschäden führen kann. Dabei ist auch die so genannte Mitophagie als selektive Autophagie abhängig vom Autophagozytoserezeptor p62 [283]. Studien zeigen, dass sowohl Chloroquin als auch Bafilomycin A₁ in Neuronen der Maus die Funktion von Mitochondrien negativ beeinflussen und zu einer erhöhten Anzahl an beschädigten Mitochondrien führen [284]. In Maus-Makrophagen konnte Chloroquin die ROS Produktion bei Infektion der Zellen mit *Staphylococcus aureus* steigern [285] und auch in humanen Astroglia Zellen führte Chloroquin zu einer vermehrten ROS Produktion, die in Zusammenhang mit der Sekretion von CXCL8 stand [286]. Verschiedene ROS Inhibitoren konnten in THP-1 Makrophagen ebenfalls die CXCL8-Sekretion bei Ko-Stimulation mit IL-1β und Chloroquin senken, was darauf schließen lässt, dass auch eine durch Chloroquin induzierte ROS-Sekretion eine Rolle spielt (Abb. 3-18 A). Propranolol induziert in Langerhans Zellen insbesondere mitochondriale ROS durch Inhibition der Mitophagie [157]. In THP-1 Makrophagen konnte jedoch keine mitochondriale ROS-Produktion nach einer und nach 3 Stunden nachzuweisen werden (Abb. 3-19). Möglicherweise folgt die ROS Produktion einer sehr speziellen

Kinetik, die hier nicht abgedeckt werden konnte. In einem weiteren Experiment wurde mittels ESR-Spektroskopie die Reduzierung des Radikalfängers TEMPO in Anwesenheit von Chloroquin und IL-1 β gemessen. Auch hier konnte keine ROS Produktion im Vergleich zur Kontrolle in einem Messzeitraum von einer Stunde festgestellt werden (Abb. 3-20). Die Messung erfolgte in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Martina Meinke in den Laboren der Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie der Charité Berlin. Die Arbeitsgruppe hat bereits Erfahrung mit der ROS-Bestimmung in humanen Keratinozyten [189], wobei hier nach eigener Aussage die TEMPO Reduzierung allein in der Kontrolle im Allgemeinen viel langsamer erfolgte als bei den von mir getesteten THP-1 Makrophagen. Makrophagen gelte als starke ROS produzierende Zellen, vor allem bei der Immunantwort gegen Pathogene. Auf der anderen Seite müssen die Zellen in der Lage sein, sich selbst gegen den oxidativen Stress zu schützen, indem antioxidative Signalwege angetriggert werden [287]. Ein wichtiger antioxidativer Signalweg verläuft über die Aktivierung des Transkriptionsfaktors Nrf2, was in der vermehrten Expression von Antioxidantien Glutathion and Thioredoxin resultiert [288]. Die antioxidative Zellantwort ist auch mit der selektive Autophagie assoziiert, wobei der Autophagie-Rezeptor p62 mit KEAP1 (*Kelch-like ECH-associated protein 1*) interagieren kann, was zur Aktivierung von Nrf2 führt [289]. Somit könnte eine Untersuchung dieser Signalwege weitere Aufschlüsse über die Rolle von ROS bei der durch lysosomotrope Stoffe induzierten pro-inflammatorischen Immunantwort unter sterilen entzündlichen Bedingungen bringen. Zusätzlich könnte das Ablösen der Zellen, das hier für beide durchgeführten Methoden nötig war, zusätzlicher Stress für die Zellen bedeutet haben und möglicherweise sofort zu einer vermehrten ROS-Ausschüttung geführt hat, die jedoch nicht erfasst werden konnte. In Zukunft sollten also noch weitere Methoden getestet werden, bei denen eine kinetische Messung der Zellen innerhalb der Zellkulturplatte ohne Ablösen möglich ist.

4.3.4 Lysosomotrope Stoffe und Rezeptorendozytose

Während Chloroquin und Fluoxetin in THP-1 Makrophagen die Autophagozytose in einem späten Stadium inhibieren konnten, war dies für das ebenso lysosomotrope Chlorpromazin nicht der Fall. Interessanter Weise ist Chlorpromazin im Gegensatz zu Chloroquin und Fluoxetin nicht dafür bekannt, eine arzneimittel-induzierte Psoriasis auszulösen. Chlorpromazin gilt jedoch schon länger als ein Inhibitor der Endozytose [90]. Korrespondierend dazu löst der Endozytose-Inhibitor Dynasore einen ähnlichen pro-inflammatorischen Effekt wie lysosomotropen Stoffe aus, wenn mit IL-1 β ko-stimuliert wurde (Abb. 3-23). Eine übermäßige Stimulation mit Zytokinen wie TNF, IL-6 oder IL-1 können zu Entzündungsreaktionen und Autoimmunkrankheiten wie der rheumatoiden Arthritis oder Morbus Crohn führen, sodass die resultierenden Signalkaskaden auch über die Endozytose der jeweiligen Rezeptoren auf der Zelloberfläche reguliert werden können [147]. Somit wurde vermutet, dass lysosomotrope Stoffe in der Lage sind, die Internalisierung des IL-1 Rezeptors zu unterbinden und dadurch diese vermehrt auf

der Zelloberfläche zur Verfügung stehen, was wiederum in einer verstärkten Immunantwort auf IL-1 β resultiert. Ich konnte zeigen, dass alle eingesetzten lysosomotropen Arzneistoffe die extrazelluläre Expression des IL-1 Rezeptor Monomers IL-1RI erhöhen konnten (Abb. 3-24 D). Dies war ebenso für Dynasore der Fall, jedoch zeigte sich der Effekt bereits nach einer Stunde und wurde schließlich nach 12 Stunden wieder aufgehoben. Dies lässt sich mit dem unterschiedlichen Mechanismus der Endozytoseinhibierung erklären (Abb. 3-24 C), wobei Dynasore schon zu Beginn bei der Bildung des Endosoms dessen Abschnürung verhindert [92]. In Übereinstimmung hiermit konnte eine Studie kürzlich zeigen, dass die Inhibierung der Rezeptorendozytose durch Dynasore und andere Endozytose-Inhibitoren in Zellen, die den IL-1 Rezeptor überexprimieren, zu einer erhöhten Genexpression von CXCL8 führten [148].

Auf Grund seiner anti-inflammatorischen Eigenschaften wird Chloroquin auch zur Behandlung von rheumatischen Erkrankungen eingesetzt, wenn auch die zugrundeliegenden Mechanismen nicht eindeutig geklärt sind [273]. Sowohl Chloroquin als auch Bafilomycin A₁ konnten die anti-inflammatorischen Eigenschaften von Glucocorticoiden durch die Inhibierung des korrespondierenden zytosolischen Rezeptors verhindern. Gleichermäßen erhöhte Chloroquin auch die Aktivierung von Androgen- und Östrogenrezeptoren [290]. Auch die Signaltransduktion von TGF β konnte in einer Arbeit durch die Endozytoseinhibition des korrespondierenden Rezeptors durch Chloroquin und andere Endozytoseinhibitoren verstärkt werden [291]. Dies unterstützt die Annahme, dass Chloroquin und andere lysosmotrope Stoffe in der Lage sind, die Signaltransduktion des IL-1 Rezeptors über die Inhibierung der Rezeptordegradierung zu erhöhen. In weiteren Experimenten sollte der intrazelluläre Transport des IL-1 Rezeptors genauer untersucht werden. Hierfür könnte man verschiedene Marker der Endosomen sowie den IL-1 Rezeptor selbst mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern markieren und eventuelle Ko-Lokalisationen mittels Fluoreszenzmikroskopie untersuchen.

Als weitere Mechanismen für den anti-inflammatorischen Effekt von Chloroquin wird auch eine Beeinflussung des TLR4 diskutiert, Studien zeigen, dass Chloroquin zwar nicht in der Lage ist, die Internalisierung des TLR4 nach LPS-Stimulation zu unterbinden, jedoch die intrazelluläre Lokalisation von LPS und TLR4 beeinflusst wird, wodurch ein Rezeptorrecycling erschwert wird [292]. Dies korreliert auch mit der Annahme, dass die Runterregulation der TNF-Expression durch Chloroquin bei LPS-Stimulation nach einem Mechanismus verläuft, der von der Lysosomotropie unabhängig ist [211]. Chloroquin und andere lysosomotrope Stoffe scheinen also nicht die Rezeptorendozytose von jedem beliebigen Rezeptor im gleichen Maß zu beeinflussen.

4.3.5 Einfluss von IFN- γ

IFN- γ ist als pro-inflammatorisches Zytokin bekannt, das vor allem von T_H1-Zellen und NKs ausgeschüttet wird. Bei der Bindung an seinen Rezeptor wird über den JAK (Januskinase)/STAT1 *signal*

transducers and activators of transcription)-Signalweg die Transkription Interferon-stimulierender Gene auslöst. Ursprünglich war IFN- γ vor allem das wichtigste Zytokin bei der Aktivierung und Polarisierung von M1 Makrophagen [293]. Darüber hinaus spielt IFN- γ eine wichtige Rolle bei der Abwehr von Pathogenen und der Entstehung chronisch entzündlicher Erkrankungen sowie Autoimmunerkrankungen. Mittlerweile sind darüber hinaus auch viele anti-inflammatorische Wirkungen von IFN- γ bekannt, die die Annahme, dass es sich bei diesem Zytokin um ein rein pro-inflammatorisches Zytokin handelt, widerlegen [239].

Eine Ko-Stimulation von THP-1 Makrophagen mit IFN- γ und IL-1 β mit oder ohne Chloroquin, konnte ebenfalls zeigen, dass IFN- γ sowohl die CXCL8 Expression auf Genebene als auch die Sekretion auf Proteinebene runterregulieren konnte (Abb. 3-25). Diese Erkenntnisse decken sich mit einer älteren Studie in primären Monozyten, in der bereits gezeigt werden konnte, dass IFN- γ die durch IL-1 β induzierte CXCL8 Sekretion konzentrationsabhängig senken konnte [294]. Dies ließ vermuten, dass IFN- γ einen Einfluss auf den IL-1 Signalweg haben könnte. Der IL-1 Signalweg wird unter anderem durch den endogen vorkommenden IL-1Ra negativ reguliert. Eine ältere Studie zeigt ebenfalls, dass sowohl IFN- γ als auch das Typ I Interferon IFN- α in der Lage sind, IL-1Ra in PBMCs hoch zu regulieren, während der Effekt *in vivo* für IFN- γ , im Gegensatz zur Behandlung mit IFN- α , nur schwach sichtbar war [241]. In THP-1 Makrophagen konnte IFN- γ zwar die Genexpression von IL-1Ra leicht erhöhen (Abb. 3-26 A), eine vermehrte Sekretion durch die Ko-Stimulation mit dem Typ II Interferon blieb jedoch aus (Abb. 3-26 B). Der IL-1R2, ein weiterer Negativregulator des IL-1 Signalwegs, wurde ebenfalls durch IFN- γ nicht beeinflusst (Abb. 3-26 C). Da der pro-inflammatorische Effekt von Chloroquin unter sterilen entzündlichen Bedingungen auch auf eine verminderte Internalisierung des IL-1 Rezeptors zurückzuführen war, wurde ebenfalls überprüft, in wie weit IFN- γ die Rezeptor-Expression beeinflusst. Auch wenn nach 12 Stunden die Anzahl an IL-1R1 im Gegensatz zur alleinigen Stimulation mit Chloroquin und IL-1 β leicht vermindert war, so war dieser Trend nach 24 Stunden Inkubationszeit nicht mehr sichtbar (Abb. 3-27). Somit ist davon auszugehen, dass IFN- γ in Anwesenheit von IL-1 β und Chloroquin keinen Einfluss auf den IL-1 Signalweg in THP-1 Makrophagen nimmt.

Die Aktivierung verschiedener TLRs und Zytokinrezeptoren durch die jeweiligen Liganden kann über den NF κ B-Weg zu einer erhöhten Expression von pro-IL-1 β führen, das in einem weiteren Schritt durch das Inflammasom zu seiner aktiven Form prozessiert werden kann (Kap. 1.3.2 und Abb. 1-6). Ob und in wie weit IFN- γ die Generierung von IL-1 β beeinflusst wird in der Literatur kontrovers diskutiert. So scheint IFN- γ in Maus-Makrophagen die IL-1 β Genexpression und Proteinsekretion zu verringern [295, 296], während in humanen Zellen eher eine Erhöhung der IL-1 β Produktion durch IFN- γ zu beobachten ist [295, 297]. In THP-1 Makrophagen konnte IFN- γ zu einer Erhöhung der IL-1 β Genexpression nach einer 3-stündigen Inkubationszeit beitragen, nach längerer Inkubationszeit war dieser Effekt jedoch aufgehoben (Abb. 3-28). Es könnte also vermutet werden, dass IFN- γ zu einem frühen Zeitpunkt einen Einfluss auf das *Priming*-Signal des Inflammasoms hat. In wie weit dies einen Einfluss auf den anti-

inflammatorischen Effekt in Hinblick auf die CXCL8 Expression und Sekretion hat, bedarf jedoch noch weiteren Untersuchungen.

IFN- γ gilt neben vielen weiteren pro-inflammatorischen Zytokinen als Induktor der Autophagozytose [64]. Dies spielt vor allem eine wichtige Rolle bei der Eliminierung des intrazellulären Pathogens *Mycobacterium tuberculosis* in Makrophagen [237]. Ausgehend von der Hypothese, dass die Inhibierung des autophagischen Flux zu einer verstärkten pro-inflammatorischen Immunantwort auf IL-1 β beiträgt, könnte IFN- γ die Autophagozytose induzieren und so die Inhibition aufheben. Dadurch könnte wiederum der pro-inflammatorische Effekt rückgängig gemacht werden und die CXCL8 Expression und Sekretion bei Ko-Stimulation mit IL-1 β und Chloroquin durch IFN- γ runterreguliert werden. Um dies genauer zu untersuchen, wäre sicherlich interessant, ob andere Induktoren der Autophagozytose wie Rapamycin ebenfalls in der Lage sind, einen ähnlichen Effekt wie IFN- γ zu erzielen. Wie genau IFN- γ die Autophagozytose induziert, ist nicht eindeutig bekannt. Es wird unter anderem vermutet, dass IFN- γ über die Beeinflussung des MAPK p38 Signalweg die Autophagozytose-Aktivität zu steigern vermag [238]. Eine neuere Studie zeigt außerdem, dass IFN- γ auch die lysosomale Biogenese durch Aktivierung von TFEB erhöht [298]. Ob IFN- γ die durch lysosomotrope Arzneistoffe hervorgerufene lysosomale Störungen aufzuheben vermag, bedarf jedoch weiteren Untersuchungen.

Auch der durch IFN- γ induzierte JAK/STAT-Signalweg kann durch die Autophagozytose reguliert werden. Dies könnte auf Grund der Ergebnisse in dieser Arbeit noch weiter erforscht werden. Auch die Frage, in wie weit Chloroquin mit dem JAK/STAT-Signalweg interagiert, ist noch nicht hinreichend geklärt. Eine kürzlich erschienene Studie beschreibt zumindest, dass Chloroquin die Phosphorylierung von STAT1 in Dendritischen Zellen induziert [299].

IFN- γ kann auch epigenetische Veränderungen in Zellen hervorrufen. Dies ist insbesondere bei der Polarisierung von naiven Makrophagen zu klassisch aktivierten M1 Makrophagen der Fall [293]. Epigenetische Veränderungen werden auch als einer der Mechanismen für das Ausbilden eines Gedächtnis der angeborenen Immunantwort angesehen, das als Trainierte Immunität bezeichnet wird [300]. Auf der anderen Seite ist auch eine Toleranz des angeborenen Immunsystems bei erneutem Antigenkontakt beschrieben [301]. Zwar ist davon auszugehen, dass dies bei der gleichzeitigen Inkubation mit Chloroquin und IL-1 β eine untergeordnete Rolle spielt, da die Zeit für ein ausreichende Hervorrufung einer Toleranz nicht gegeben sein mag, jedoch ist der Effekt der Senkung der CXCL8-Sekretion durch IFN- γ nicht besonders stark ausgeprägt. Somit wäre es sicherlich interessant zu sehen, wie sich eine längere, alleinige Präinkubation mit anschließendem Ausruhen der Zellen ohne IFN- γ auf eine anschließende Neu-Stimulation mit IL-1 β und Chloroquin auswirkt.

4.4 Ist der Mechanismus zellspezifisch?

Abhängig von der MAPK p38, ROS und der Inhibierung des autophagischen Flux konnten lysosomotrope Stoffe die pro-inflammatorische Immunantwort von Makrophagen unter sterilen entzündlichen Bedingungen deutlich steigern. Darüber hinaus ist eine Verhinderung der Internalisierung des IL-1 Rezeptors beteiligt (Abb. 4-1).

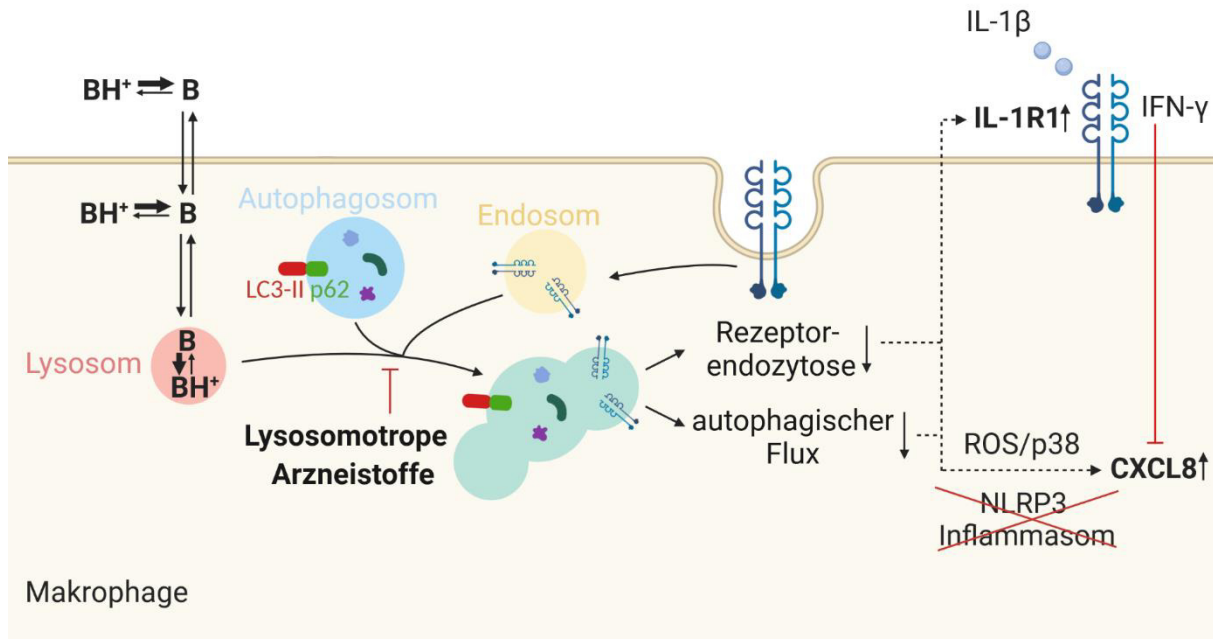


Abbildung 4-1: Lysosomotrope Arzneistoffe beeinflussen sterile entzündliche Prozesse in Makrophagen. In Makrophagen akkumulieren lysosomotrope Arzneistoffe auf Grund ihrer chemischen Eigenschaften in sauren Zellorganellen wie dem Lysosom und verhindern so die Fusion mit dem Autophagosom und dem Endosom. Es kommt zur Inhibition des autophagischen Flux auf der einen Seite, was an der vermehrten Anhäufung der autophagosomalen Marker LC3-II und p62 messbar ist. Auf der anderen Seite wird die Rezeptorendozytose des IL-1R1 negativ beeinflusst, was in einer erhöhten IL-1R1-Expression resultiert. Dies führt bei Stimulation mit IL-1 β zu einer verstärkten Sekretion von CXCL8, die sowohl von ROS als auch von der MAPK p38 abhängig ist, jedoch ohne den Einfluss des NLRP3 Inflammasoms verläuft. Die zusätzliche Stimulation mit IFN- γ senkt hingegen die CXCL8-Ausschüttung. Die Abbildung ist ein modifizierter Nachdruck nach [207] mit freundlicher Erlaubnis von Elsevier.

In wie weit lysosomotrope Stoffe ähnliche Effekte in anderen Zelltypen zeigen und ob die Mechanismen dahinter entsprechend verlaufen ist jedoch noch nicht ausreichend geklärt. Da sich diese Arbeit insbesondere auf Ergebnisse in Langerhans Zellen und Dendritischen Zellen stützt, soll im Folgenden nochmals genauer auf die bisherigen Ergebnisse eingegangen werden. Des Weiteren wurden verschiedene Typen von HEK293 Zellen ebenfalls auf ihr inflammatorisches Ansprechen auf Chloroquin in Anwesenheit von IL-1 β untersucht.

4.4.1 Studien in Langerhans Zellen und dermalen Dendritischen Zellen

In unserer Arbeitsgruppe wurden bereits weitreichende Studien mit lysosomotropen Arzneistoffen in Langerhans Zellen und dermalen Dendritischen Zellen durchgeführt. Langerhans Zellen und Dendritische Zellen zeichnen sich vor allem als professionelle, antigenpräsentierende Zellen aus und spielen so eine entscheidende Rolle bei der Aktivierung von T-Zellen des adaptiven Immunsystems [302]. Die Zugehörigkeit der Langerhans Zellen zu den Dendritischen Zellen oder den Makrophagen wird seit vielen Jahren kontrovers diskutiert. Langerhans Zellen sind mit ihren dendritischen Ausläufern in der Epidermis ansässig, wo sie die erste Barriere für Pathogene, die über die Haut eindringen, ausmachen. Sie exprimieren eine hohe Anzahl an MHC-II Molekülen, worüber sie Antigene bzw. Antigenfragmente präsentieren können. Hierfür sind sie in der Lage, ins periphere lymphatische Gewebe einzuwandern und mit T-Zellen zu interagieren. Betrachtet man ausschließlich den Phänotyp und die Funktionen der Langerhans Zellen, so würde man diese eindeutig den Dendritischen Zellen zuordnen [303].

Auf dem heutigen Stand der Wissenschaft ist man allerdings dazu übergegangen, Zelltypen auf Grund ihrer Ontogenese einzuteilen. Man geht davon aus, dass Langerhans Zellen von embryonischen Vorläuferzellen abstammen, die der primitiven und definitiven Hämatopoese entspringen (Abb. 1-1) und unter *steady-state* Bedingungen in der Lage sind, sich selbst zu regenerieren. Im postembryonalen Stadium können weitere Langerhans Zellen im Falle einer Entzündung aus dem Knochenmarkstammenden, im Blut zirkulierenden Monozyten generiert werden. Ihre Entwicklung ist von den äußerlichen Gegebenheiten abhängig. Auf Grund dieser Gemeinsamkeit mit Makrophagen und des gemeinsamen Ursprungs werden sie vielfach zu den gewebsansässigen Makrophagen der Epidermis gezählt [304].

Interessanter Weise zeigten auch *in vitro* aus Monozyten generierte Dendritische Zellen (MoDCs) und Langerhans Zellen (MoLCs) Unterschiede im Ansprechen auf lysosomotrope Stoffe unter sterilen entzündlichen Bedingungen. So konnte Chloroquin als auch Hydroxychloroquin die proinflammatorische Antwort auf IL-1 β in Bezug auf die IL-23 Sekretion in MoLCs deutlich steigern, während für die MoDCs kein messbarer Unterschied der IL-23 Ausschüttung im Gegensatz zur alleinigen IL-1 β -Stimulation zu sehen war [156]. Ähnliches könnte auch für Propranolol und andere lysosomotrope Beta-Andrenozeptor-Blocker unter sterilen entzündlichen Bedingungen beobachtet werden. In Bezug auf die CXCL8-Sekretion konnte allerdings für beide Zelltypen gezeigt werden, dass Propranolol zu einer verstärkten Chemokin-Sekretion bei Ko-Stimulation mit IL-1 β führen konnte. Dies deckt sich mit meinen Ergebnissen in THP-1 Makrophagen und primären Makrophagen, obwohl keine IL-23 Sekretion detektiert werden konnte (nicht gezeigte Daten) [157]. Auch für die Abhängigkeit von der MAPK p38, die inhibitorischen Effekte auf den autophagischen Flux sowie den Einfluss von ROS konnten Parallelen in Langerhans Zellen und Makrophagen gezogen werden, was darauf schließen lässt, dass zumindest

mechanistisch viele Gemeinsamkeiten zwischen den unterschiedlichen Zelltypen herrschen, wenn auch Unterschiede bezüglich der IL-23 Sekretion bestehen. An dieser Stelle wären *in vivo* Studien im Mausmodell interessant, um insbesondere den Aspekt des Zusammenspiels der verschiedenen Zelltypen des angeborenen Immunsystems zu untersuchen und die *in vitro* Ergebnisse zu untermauern.

4.4.2 Studien in Epithelzellen

Neben den beschriebenen Effekten und Mechanismen, die bisher in Immunzellen festgestellt werden konnten, ist noch nicht eindeutig geklärt, ob der pro-inflammatorische Effekt lysosomotroper Stoffe unabhängig von der Zellart auftritt. Chloroquin und andere Endozytoseinhibitoren zeigten bereits in mit dem IL-1 Rezeptor transfizierten HEK293 Zellen eine Erhöhung der *CXCL8* Expression [148]. HEK293 Zellen sind besonders interessant, da diese sich im Gegensatz zu Immunzellen leichter transfizieren lassen und so mechanistische Studien vereinfacht werden. Somit wurde auch im letzten Teil meiner Arbeit mit diesem Zelltyp gearbeitet. In nicht-transfizierten HEK293 Zellen konnte Chloroquin nur eine leichte Erhöhung der *CXCL8*-Sekretion unter sterilen entzündlichen Bedingungen bewirken (Abb. 3-29). In weiteren Experimenten wurden mit dem IL-1 Rezeptor transfizierte HEK blue Zellen verwendet, die zusätzlich noch mit einem SEAP-Reporter gen transfiziert waren und so die Rezeptoraktivierung auch kolorimetrisch nachgewiesen werden konnte. Die Arbeit mit HEK blue IL-1 β Zellen war jedoch weniger trivial als angenommen. Möglicherweise störte Chloroquin durch die Induktion von ER-Stress den SEAP-Reporter-Test (Abb. 3-31 A) [247-249] und auch die *CXCL8*-Proteinsekretion der HEK blue IL-1 β Zellen war im Allgemeinen so schwach (Abb. 3-31 B), dass zunächst keine wesentlichen Aussagen über die Einflüsse von Chloroquin auf die Antwort auf IL-1 β gemacht werden konnten. Interessanterweise steigerte Chloroquin nach 3-stündiger Inkubationszeit die Genexpression von *CXCL8* fast um das 2000-fache (Abb. 3-32 A) und auch für ein weiteres, durch IL-1 β induzierbares Gen, *CXCL2*, konnte eine ähnlich starke Expressionssteigerung festgestellt werden (Abb. 3-32 B). So kann schließlich davon ausgegangen werden kann, dass Chloroquin auch eine Verstärkung der pro-inflammatorischen Immunantwort auf IL-1 β in Epithelzellen nach sich zieht und somit von einem von der Zellart unabhängigen Mechanismus ausgegangen werden kann. Eine umfassende Untersuchung der durch Chloroquin unter sterilen entzündlichen Bedingungen induzierten Gene mittels mRNA-Gensequenzierung ist in Planung. Die hierbei gewonnenen Erkenntnisse könnten wiederum auf Immunzellen übertragen werden, um weitere Informationen über die mechanistischen Hintergründe des pro-inflammatorischen Effekts lysosomotroper Stoffe unter sterilen entzündlichen Bedingungen zu erhalten. Auch weitere lysosomotrope Stoffe sowie Endozytose-Inhibitoren könnten in den HEK Zellen getestet werden.

4.5 Lysosomotrope Stoffe und Covid-19

Im Dezember 2019 wurde erstmals Covid-19 bei Patient*innen in Wuhan, China festgestellt. Die durch das SARS-CoV-2 ausgelöst Viruserkrankung kann zu einer Pneumonie mit tödlichem Ausgang führen. Als sich schnell ausbreitende und leicht zu übertragende Erkrankung stellt Covid-19 besonders für ältere Menschen und Patient*innen mit Vorerkrankungen eine Gefahr dar. Schließlich wurde im März 2020 Covid-19 durch die Weltgesundheits-Organisation (WHO) zur Pandemie erklärt [305, 306]. Derzeit beläuft sich die Zahl der weltweit auf Covid-19 positiv getesteten Personen laut WHO auf knapp 55 Millionen mit über einer 1,3 Millionen Todesfällen (Stand: 18.11.2020), sodass mit Hochdruck nach einer vielversprechenden Arzneimitteltherapie geforscht wird und auf Grund der Dringlichkeit auf bereits erforschte und/ oder bei anderen Indikationen zugelassene Arzneistoffe zurückgegriffen wird [307].

Der Einsatz von Chloroquin und Hydroxychloroquin bei viralen Erkrankungen wurde immer wieder untersucht, so gibt es beispielsweise Studien zur Behandlung der Influenza [308], des Humanen Immundefizienz-Virus [309], des Zika-Virus [310] und des Ebola-Virus [311], wobei die Ergebnisse nicht zwangsläufig den erwünschten Effekt zeigten. Als anti-viraler Mechanismus wird vor allem die Aufnahme-Hemmung der Viren über die durch Chloroquin und Hydroxychloroquin ausgelösten endosomalen pH-Wert-Veränderungen diskutiert [91].

SARS-CoV-2 bindet mit seinen Spikeproteinen an den ACE-2 Rezeptor der Wirtszellen und kann so über Endozytose aufgenommen werden. Schließlich kann das Virus durch die pH-abhängige Protease Cathepsin L das Spike Protein spalten und die virale Fusion mit der endosomalen bzw. lysosomalen Membran initiieren, sodass sowohl virale Proteine transkribiert als auch die virale RNA repliziert werden kann [312]. Nach der viralen Replikation durch die Wirtszelle können die neuen Viren über Exozytose ausgeschleust werden und so in einem zweiten Schritt das Immunsystem aktivieren. Dies kann in einigen Fällen auch zu einem so genannten Zytokin-Sturm führen, der für die Patient*innen lebensbedrohlich sein kann [313].

Schon im Januar 2020 wurde eine erste Studie veröffentlicht, in der sich Chloroquin in Vero E 6 Zellen wirksam gegen SARS-CoV-2 zeigte [314]. Die Studie erhielt weltweite Aufmerksamkeit und führte dazu, dass zahlreiche klinische Studien durchgeführt wurden. Parallel dazu sorgte die FDA im März durch eine Notzulassung von Chloroquin und Hydroxychloroquin für dem Einsatz beider Arzneistoffe zur Prophylaxe und zur Behandlung von Covid-19 in den Vereinigten Staaten für einen weitreichenderen Einsatz beider Arzneistoffe. Diese Entscheidung wurde jedoch wenige Monate später zurückgenommen, da beide Arzneistoffe nicht den gewünschten Effekt zeigten und schwerwiegenden Nebenwirkungen auftraten, die insbesondere das Herz betrafen und zu Arrhythmien und Herzversagen führten [315]. Dies war im besonders hohen Maß durch die Kombination von Chloroquin/ Hydroxychloroquin mit dem Makrolidantibiotikum Azithromycin zu beobachten, dass genau wie die beiden Quinine dafür bekannt ist, die QT-Zeit zu verlängern und so Herzrhythmusstörungen zu begünstigen [316].

Auch eine kürzlich veröffentlichte Studie zeigt, dass der anti-virale Effekt von Chloroquin/Hydroxychloroquin von der Zellart abhängt und keine Wirksamkeit in humanen Calu-3 Lungenzellen nachgewiesen werden konnte [317]. Zusätzlich wird vermutet, dass das SARS-CoV-2 auch über einen von der Endozytose unabhängigen Weg aufgenommen werden kann, wobei pH-Wert Veränderungen eine untergeordnete Rolle spielen [312]. Auch dies könnte ein Grund dafür sein, warum für Chloroquin/Hydroxychloroquin keine ausreichende Wirksamkeit gegen Covid-19 festgestellt werden konnte.

Auf der anderen Seite wurde mehrfach festgestellt, dass Patient*innen in psychiatrischen Einrichtungen im Vergleich zu dem dort arbeitendem Personal mit einer geringeren Wahrscheinlichkeit an Covid-19 erkranken [318]. Hierbei ist anzumerken, dass viele dort eingesetzte Antipsychotika und Antidepressiva, genauso wie Chloroquin und Hydroxychloroquin, lysosmotrope Eigenschaften aufweisen. So ist bereits über Chlorpromazin bekannt, dass es *in vitro* anti-viral gegen das *Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus* (MERS-CoV) Wirksamkeit zeigte [319]. So sind bisweilen zwei Studien mit Chlorpromazin bei Covid-19 bereits in Planung [320, 321]. Für das Antidepressivum Fluoxetin zeigt eine aktuelle *in vitro* Studien ebenfalls eine Senkung der Viruslast sowohl in Vero E-6 Zellen als auch in Calu-3 Zellen [322], in denen für Chloroquin keine anti-virale Wirkung gegen SARS-CoV-2 festgestellt werden konnte [317]. Auch für Fluoxetin sind bisher zwei klinische Studien geplant, um die Wirksamkeit gegen Covid-19 zu überprüfen [323, 324]. Für Chloroquin und Hydroxychloroquin sind trotz der bisherigen eher negativen Datenlage bei der Bekämpfung der Covid-19 Pandemie weitere Studien in Planung, so finden sich unter den Sucheinträgen zu Covid-19 und Chloroquin/ Hydroxychloroquin auf der Website <http://www.clinicaltrials.gov/> 21 geplante Studien (Stand: 18.11.2020) [325]. Interessanter Weise finden sich wenig Angaben zum pro-inflammatorischen Effekt bei der Gabe lysosomotroper Arzneistoffe gegen Covid-19 in der Literatur, lediglich von unerwünschten Arzneimittelwirkungen, die die Haut betreffen, ist bei einigen Studien mit Chloroquin und Hydroxychloroquin die Rede [326]. Da jedoch auch IL-1 eine Rolle bei Covid-19 Erkrankungen spielt, könnten lysosomotrope Arzneistoffe die Immunantwort auf IL-1 verstärken und so auch zu einer Bekämpfung des Virus beitragen [327, 328]. Auf der anderen Seite ist wie bereits beschrieben, der Zytokinsturm eine gefürchtete Komplikation bei Covid-19 Patienten, die negative Folgen für den Krankheitsverlauf und die Mortalität haben können. Gefürchtete Nebenwirkungen wie kardiale Ereignisse und Herzrhythmusstörungen sind auch durch die ebenfalls QT-Zeit verlängernden Arzneistoffe Chlorpromazin und Fluoxetin nicht auszuschließen [316], wobei diese anders als Chloroquin eine viel geringere Halbwertszeit besitzen [329-331]. Da Covid-19 insbesondere eine Gefahr für die ältere Bevölkerung darstellt, bleibt die Frage offen, ob nicht dies genau auch die Zielgruppe für kardiale Nebenwirkungen ist. Um diese unerwünschten Arzneimittelwirkungen zu umgehen, wäre der Einsatz niedrigerer Dosen bei lokaler Applikation mittels Inhalation eine Option für diese Arzneistoffe, da die Viren in der Regel primär die Atemwege befallen. In einer Studie mit inhalativem Hydroxychloroquin konnte bereits gezeigt werden, dass unter den Proband*innen, die den Arzneistoff erhielten, keine das Herz betreffende Nebenwirkungen, auftraten [332].

Welchen Einfluss die Autophagozytose der Viren hat, die auch als Virophagie bezeichnet wird, ist ebenfalls noch nicht eindeutig geklärt. Es wird vermutet, dass zwar auf der einen Seite die Virophagie wichtig zur Abwehr und zur Bekämpfung der Viren ist, auf der anderen Seite das Recycling von Proteinen und Nukleinsäuren durch die Autophagozytose auch überlebenswichtig für die Virenreplikation und somit die Virusvermehrung durch den Wirt sein kann [333].

Abschließend lässt sich sagen, dass auch wenn die Anwendung lysosomotroper Stoffe bei der Covid-19 Pandemie noch keine bahnbrechenden positiven Ergebnisse brachte, die Erforschung dieser Arzneistoffe weiter vorangetrieben sollte. Insbesondere über die pro-inflammatorischen Eigenschaften dieser Stoffe ist immer noch wenig bekannt. Das plötzliche Auftreten von weiteren Erkrankungen, die die gesamte Weltbevölkerung bedrohen, wird uns sicherlich immer wieder begleiten, sodass ein schnelles Handeln und das Zurückgreifen auf alte bekannte Arzneistoffe immer wieder in den Fokus rücken werden.

5. Zusammenfassung/ Summary

5.1 Zusammenfassung

Makrophagen sind als die wichtigsten Vertreter der Phagozyten im hohen Maße an der zellulären angeborenen Immunantwort beteiligt. Neben ihrem Einsatz gegen eindringende Pathogene, können sie auch an sterilen entzündlichen Reaktionen beteiligt sein und so an der Pathogenese chronisch entzündlicher Erkrankungen wie Psoriasis, rheumatoider Arthritis oder Morbus Crohn mitwirken. Bei Entzündungsreaktionen ist generell eine komplexe Interaktion zahlreicher zellulärer Signalwege und Prozesse zu beobachten. Lysosomotrope Arzneistoffe wie Chloroquin, Chlorpromazin und Fluoxetin können auf Grund ihrer chemischen Eigenschaften in Lysosomen akkumulieren und so zu Störungen von Autophagozytose und Endozytose führen. Während die Autophagozytose als Selbstverdauungsprozess intrazelluläre Bestandteile verarbeitet, werden bei der Endozytose extrazelluläre und/ oder membranassoziierte Komponenten aufgenommen. Sowohl die Autophagozytose als auch die Endozytose können mit der Verschmelzung des Lysosoms enden, wobei die jeweilige Ladung degradiert oder recycelt werden kann. Da die Immunantwort selbst über diese Prozesse reguliert werden kann, können Störungen zu schwerwiegenden inflammatorischen Reaktionen und chronischen Entzündungen führen. Interleukin-(IL-)1 β ist ein pro-inflammatorisches Zytokin, das ohne den Einfluss exogener Pathogene zu sterilen Entzündungen führen kann. Dabei bindet es an den IL-1 Rezeptor Typ 1 (IL-1R1), der dadurch mit dem IL-1 Rezeptor akzessorisches Protein (IL-1RAcP) dimerisiert und eine Signalkaskade auslöst. Am Ende kommt es zu einer erhöhten Expression von Proteinen, die zu einer verstärkten pro-inflammatorischen Immunantwort beitragen können. Das Chemokin CXCL8/IL-8 ist eines dieser durch IL-1 β induzierter Proteine.

In der vorliegenden Arbeit dienten humane Makrophagen als *in vitro* Modell zur Untersuchung immunpharmakologischer Vorgänge, die mit lysosomotropen Stoffen assoziiert sind, um indikationsunabhängig sowohl erwünschte als auch unerwünschte Wirkungen dieser Arzneistoffe besser zu verstehen. Gemäß der Zielsetzung wurden hierfür die optimalen Kulturbedingungen für aus THP-1 Monozyten differenzierte Makrophagen als auch für aus peripheren mononukleären Blutzellen (PBMCs) generierte primäre Makrophagen etabliert. Sowohl die THP-1 Makrophagen als auch die mit M-CSF generierten primären Makrophagen zeigten dabei reproduzierbare Ergebnisse hinsichtlich zellspezifischer Oberflächenmarker und der Immunantwort auf Lipopolysaccharid (LPS), während sich die Generierung der mit GM-CSF polarisierten primären Makrophagen als schwieriger erwies. Im Verlauf der Arbeit wurde ein Großteil der Experimente an THP-1 Makrophagen durchgeführt und soweit möglich, mit den Ergebnissen in primären Makrophagen verglichen.

Für den zweite Teil der Arbeit wurden THP-1 Makrophagen und primäre Makrophagen mit lysosomotropen Arzneistoffen behandelt und die immunmodulatorischen Eigenschaften genauer untersucht.

Sowohl das Antimalariamittel Chloroquin, als auch das ebenfalls lysosomotrope Antidepressivum Fluoxetin sowie das Antipsychotikum Chlorpromazin konnten die CXCL8-Sekretion in THP-1 Makrophagen unter sterilen entzündlichen Bedingungen deutlich erhöhen. Die pro-inflammatorischen Effekte konnten auch weitestgehend in primären Makrophagen bestätigt werden.

Für Chloroquin und Fluoxetin konnte in THP-1 Makrophagen ein Zusammenhang mit dessen Autophagie-inhibierenden Eigenschaften nachgewiesen werden. Dies wurde bekräftigt durch zusätzliche Stimulation mit dem Autophagozytose-induzierenden Interferon- γ (IFN- γ), dass die CXCL8 Expression und Sekretion in THP-1 Makrophagen in Anwesenheit von Chloroquin und IL-1 β runterregulierte. Auch die Abhängigkeit des pro-inflammatorischen Effekts von der mitogenaktivierte Proteinkinase (MAPK) p38 als auch von der Bildung reaktiver oxidativer Spezies (ROS) konnte gezeigt werden.

Interessanterweise konnte das lysosomotrope Chlorpromazin die LC3-I zu LC3-II Konversion als auch die Akkumulation von p62 nicht erhöhen, wobei beide als typische Autophagiemarker gelten. Chlorpromazin ist auch als Hemmstoff der Endozytose bekannt, korrespondierend dazu erhöhte der Endozytoseinhibitor Dynasore ebenfalls die CXCL8-Sekretion bei Ko-Stimulation mit IL-1 β in THP-1 Makrophagen. Weitere Untersuchungen zeigten, dass alle eingesetzten lysosomotropen Arzneistoffe die extrazelluläre Expression des IL-1R1 verstärkten. Somit wird ein Zusammenhang zwischen der erhöhten Immunantwort auf IL-1 β und der Inhibierung der Rezeptorendozytose von IL-1R1 vermutet.

Zukünftige Studien sollten aufklären, in welchem Maß der intrazelluläre Transport des Rezeptors beeinflusst wird. Außerdem sollte mit weiteren Experimenten bestätigt werden, dass Chloroquin, Fluoxetin und Chlorpromazin die Autophagozytose unterschiedlich beeinflussen.

Im letzten Teil der Arbeit erhöhte Chloroquin auch in mit dem IL-1 Rezeptor transfizierten HEK Zellen die Genexpression von *CXCL8* bei Behandlung mit IL-1 β im Vergleich zu alleinigen IL-1 β Stimulation stark. Dies bekräftigt einen von der Zellart-unabhängigen Mechanismus und eine zeigt eine gute Möglichkeit auf, weitere beteiligte Gene genauer zu untersuchen. Da sich HEK Zellen insbesondere für Gen-Knockdown-Studien eignen, sollten sie angesetzt werden, um weitere Aufschlüsse über die zugrunde liegenden Mechanismen des pro-inflammatorischen Effekts lysosomotroper Stoffe zu erhalten. Auch die Durchführung entsprechender *in vivo* Experimente kann die in dieser Arbeit gefundenen Ergebnisse bekräftigen, wobei der Unterschied des humanen und murinen Immunsystems nicht außer Acht gelassen werden darf.

Meine Untersuchungen liefern neue Einblicke in potenzielle immunregulatorische Mechanismen in Makrophagen die erklären könnten, wie lysosomotrope Arzneistoffe entzündliche Prozesse regulieren. Schließlich zeigt der aktuelle Einsatz vieler lysosomotroper Stoffe bei der durch das schwere akute respiratorische Syndrom-Coronavirus-2 (SARS-CoV-2) ausgelösten der Covid-19 (*Coronavirus disease*) Pandemie das ungebrochene Interesse an diesen Arzneistoffen.

5.2 Summary

Macrophages play a significant role in innate immunity as they are one of the most important kinds of phagocytes. Besides their mission to fight against invading pathogens, they contribute to sterile inflammation. As a consequence, macrophages take part in chronic inflammatory diseases like psoriasis, rheumatoid arthritis, and Crohn's disease. In general, inflammation is characterised by a complex interplay between various signalling pathways and processes. Lysosomotropic drugs like chloroquine, chlorpromazine and fluoxetine can accumulate in lysosomes due to their chemical properties resulting in autophagosomal and endosomal perturbation. While intracellular cargo is processed by autophagy, extracellular and/ or membrane-associated content is ingested by endocytosis. Autophagy as well as endocytosis can end in fusion with the lysosome, at which point cargo is degraded or recycled. Since inflammatory responses may be regulated by both processes, disruptions can lead to serious inflammatory reactions and chronic inflammation.

Interleukin-(IL-)1 β is a pro-inflammatory cytokine leading to sterile inflammation without any impact from exogenous pathogens. Therefore, it binds to IL-1 receptor type 1 (IL-1R1) resulting in dimerization with IL-1 receptor accessory protein (IL-1RAcP) and provoking a signalling-cascade. This ends in an increased expression of pro-inflammatory proteins. The chemokine CXCL8/ IL-8 is one of these pro-inflammatory proteins.

In this work, human macrophages were used as an *in vitro* model to investigate immune-pharmacological mechanisms associated with lysosomotropic drugs. This results in a better understanding of desired and undesired adverse drug effects. Due to the scientific aim, the optimal cell culture conditions of THP-1 derived macrophages, as well as primary MCSF-generated macrophages from peripheral blood mononuclear cells (PBMCs), were determined. THP-1 macrophages as well as primary M-CSF generated macrophages showed reproducible results in the expression of cell surface markers and their inflammatory response to lipopolysaccharide (LPS). However, the generation of GM-CSF polarized macrophages was not as simple. In the course of work, most experiments were done in THP-1 macrophages and if possible, compared to the results in primary macrophages.

The second part of this work deals with the modulation of inflammatory processes in macrophages by lysosomotropic drugs to determine the immunomodulatory properties of these drugs.

The antimalarial chloroquine as well as the likewise lysosomotropic antidepressant fluoxetine and the antipsychotic chlorpromazine could elevate the CXCL8 secretion under sterile inflammatory conditions in THP-1 macrophages. The pro-inflammatory effects could be largely proven in primary macrophages. In this context, chloroquine as well as fluoxetine were able to inhibit autophagy. This was confirmed by the observation that the autophagy-inducer interferon- γ (IFN- γ) impaired CXCL8 expression and secretion in the presence of chloroquine and IL-1 β in THP-1 macrophages. Moreover, the pro-

inflammatory effect was also dependent of mitogen activated protein kinase (MAPK) p38 and the production of reactive oxygen species (ROS).

However, the lysosomotropic chlorpromazine failed to increase LC3-I to LC3-II conversion as well as p62 accumulation as typical markers for autophagy inhibition. Chlorpromazine is known as inhibitor of endocytosis corresponding with the fact, that the endocytosis inhibitor dynasore was also able to increase CXCL8 secretion under sterile inflammatory conditions in THP-1 macrophages. Further investigations showed that all used lysosomotropic agents could elevate the extracellular expression of IL-1R1. Consequently, it is suggested that there is a connection between the increased pro-inflammatory response to IL-1 β and the inhibition of IL-1R1-endocytosis.

Future studies should investigate the dimension of intracellular receptor trafficking. Moreover, further experiments should confirm that chloroquine, fluoxetine and chlorpromazine affect autophagy in a different way.

The last part of this work deals with the effect of chloroquine in HEK cells transfected with the IL-1 receptor under sterile inflammatory conditions. Chloroquine together with IL-1 β highly increased gene expression of CXCL8 in comparison to treatment of transfected HEK cells with IL-1 β alone. This supports the conclusion that the general mechanism is independent of cell type, while other participating genes should be studied in details. HEK cells are especially suitable for gene-knock down experiments, thus they should be used for further experiments to gain more insight into the mechanism of how lysosomotropic drugs modulate inflammatory responses. Moreover, corresponding in vivo experiments could confirm the findings in vitro. However, differences between the human and the murine immune system should not be disregarded.

My findings provide new insight into potentially crucial immunoregulatory mechanisms in macrophages that may explain how lysosomotropic drugs regulate inflammatory responses.

Finally, the use of lysosomotropic drugs to fight coronavirus disease (Covid-19) provoked by the acute respiratory syndrome-coronavirus-2 (SARS-CoV-2) shows the unbroken interest in these drugs.

6. Literaturverzeichnis

1. Ashoor, R., et al., *The contribution of lysosomotropism to autophagy perturbation*. PLoS One, 2013. **8**(11): p. e82481.
2. Dikic, I. and Z. Elazar, *Mechanism and medical implications of mammalian autophagy*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2018. **19**(6): p. 349-364.
3. Netea, M.G., et al., *A guiding map for inflammation*. Nat Immunol, 2017. **18**(8): p. 826-831.
4. Gasteiger, G., et al., *Cellular Innate Immunity: An Old Game with New Players*. J Innate Immun, 2017. **9**(2): p. 111-125.
5. Watanabe, S., et al., *The role of macrophages in the resolution of inflammation*. J Clin Invest, 2019. **129**(7): p. 2619-2628.
6. Metchnikoff, E., *Untersuchungen über die mesodermalen Phagocyten einiger Wirbeltiere*. Biol Zent Bl, 1883. **3**: p. 560-5.
7. Merien, F., *A Journey with Elie Metchnikoff: From Innate Cell Mechanisms in Infectious Diseases to Quantum Biology*. Front Public Health, 2016. **4**: p. 125.
8. De Kleer, I., et al., *Ontogeny of myeloid cells*. Front Immunol, 2014. **5**: p. 423.
9. Orkin, S.H. and L.I. Zon, *Hematopoiesis: an evolving paradigm for stem cell biology*. Cell, 2008. **132**(4): p. 631-44.
10. van Furth, R., *Macrophage activity and clinical immunology. Origin and kinetics of mononuclear phagocytes*. Ann N Y Acad Sci, 1976. **278**: p. 161-75.
11. Ginhoux, F. and S. Jung, *Monocytes and macrophages: developmental pathways and tissue homeostasis*. Nat Rev Immunol, 2014. **14**(6): p. 392-404.
12. Epelman, S., K.J. Lavine, and G.J. Randolph, *Origin and functions of tissue macrophages*. Immunity, 2014. **41**(1): p. 21-35.
13. Davies, L.C., et al., *Tissue-resident macrophages*. Nat Immunol, 2013. **14**(10): p. 986-95.
14. Wynn, T.A., A. Chawla, and J.W. Pollard, *Macrophage biology in development, homeostasis and disease*. Nature, 2013. **496**(7446): p. 445-55.
15. Lavin, Y., et al., *Regulation of macrophage development and function in peripheral tissues*. Nat Rev Immunol, 2015. **15**(12): p. 731-44.
16. Bain, C.C. and A. Schridde, *Origin, Differentiation, and Function of Intestinal Macrophages*. Front Immunol, 2018. **9**: p. 2733.
17. Ginhoux, F., et al., *Fate mapping analysis reveals that adult microglia derive from primitive macrophages*. Science, 2010. **330**(6005): p. 841-5.
18. Ajami, B., et al., *Local self-renewal can sustain CNS microglia maintenance and function throughout adult life*. Nat Neurosci, 2007. **10**(12): p. 1538-43.
19. Bigley, V. and M. Collin, *Dendritic cell, monocyte, B and NK lymphoid deficiency defines the lost lineages of a new GATA-2 dependent myelodysplastic syndrome*. Haematologica, 2011. **96**(8): p. 1081-3.

20. Bian, Z., et al., *Deciphering human macrophage development at single-cell resolution*. Nature, 2020. **582**(7813): p. 571-576.
21. Gordon, S. and L. Martinez-Pomares, *Physiological roles of macrophages*. Pflugers Arch, 2017. **469**(3-4): p. 365-374.
22. Mills, C.D., et al., *M-1/M-2 macrophages and the Th1/Th2 paradigm*. J Immunol, 2000. **164**(12): p. 6166-73.
23. Mosmann, T.R., et al., *Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins*. J Immunol, 1986. **136**(7): p. 2348-57.
24. Luckheeram, R.V., et al., *CD4⁺T cells: differentiation and functions*. Clin Dev Immunol, 2012. **2012**: p. 925135.
25. Martinez, F.O. and S. Gordon, *The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment*. F1000Prime Rep, 2014. **6**: p. 13.
26. Stein, M., et al., *Interleukin 4 potently enhances murine macrophage mannose receptor activity: a marker of alternative immunologic macrophage activation*. J Exp Med, 1992. **176**(1): p. 287-92.
27. Doyle, A.G., et al., *Interleukin-13 alters the activation state of murine macrophages in vitro: comparison with interleukin-4 and interferon-gamma*. Eur J Immunol, 1994. **24**(6): p. 1441-5.
28. Ferrante, C.J., et al., *The adenosine-dependent angiogenic switch of macrophages to an M2-like phenotype is independent of interleukin-4 receptor alpha (IL-4R α) signaling*. Inflammation, 2013. **36**(4): p. 921-31.
29. Mantovani, A., et al., *Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes*. Trends Immunol, 2002. **23**(11): p. 549-55.
30. Dey, A., J. Allen, and P.A. Hankey-Giblin, *Ontogeny and polarization of macrophages in inflammation: blood monocytes versus tissue macrophages*. Front Immunol, 2014. **5**: p. 683.
31. Röszer, T., *Understanding the Mysterious M2 Macrophage through Activation Markers and Effector Mechanisms*. Mediators Inflamm, 2015. **2015**: p. 816460.
32. Kikuchi, K., et al., *Macrophages Switch Their Phenotype by Regulating Maf Expression during Different Phases of Inflammation*. The Journal of Immunology, 2018. **201**(2): p. 635-651.
33. Takeuchi, O. and S. Akira, *Pattern recognition receptors and inflammation*. Cell, 2010. **140**(6): p. 805-20.
34. Chen, G.Y. and G. Nuñez, *Sterile inflammation: sensing and reacting to damage*. Nat Rev Immunol, 2010. **10**(12): p. 826-37.
35. Amarante-Mendes, G.P., et al., *Pattern Recognition Receptors and the Host Cell Death Molecular Machinery*. Front Immunol, 2018. **9**: p. 2379.

36. Gordon, S., *Phagocytosis: An Immunobiologic Process*. Immunity, 2016. **44**(3): p. 463-475.
37. Rosales, C. and E. Uribe-Querol, *Phagocytosis: A Fundamental Process in Immunity*. Biomed Res Int, 2017. **2017**: p. 9042851.
38. Rock, K.L., E. Reits, and J. Neefjes, *Present Yourself! By MHC Class I and MHC Class II Molecules*. Trends Immunol, 2016. **37**(11): p. 724-737.
39. Iles, K.E. and H.J. Forman, *Macrophage signaling and respiratory burst*. Immunol Res, 2002. **26**(1-3): p. 95-105.
40. Turner, M.D., et al., *Cytokines and chemokines: At the crossroads of cell signalling and inflammatory disease*. Biochim Biophys Acta, 2014. **1843**(11): p. 2563-2582.
41. Lukens, J.R., J.M. Gross, and T.D. Kanneganti, *IL-1 family cytokines trigger sterile inflammatory disease*. Front Immunol, 2012. **3**: p. 315.
42. Kaneko, N., et al., *The role of interleukin-1 in general pathology*. Inflamm Regen, 2019. **39**: p. 12.
43. Netea, M.G., et al., *Defining trained immunity and its role in health and disease*. Nat Rev Immunol, 2020. **20**(6): p. 375-388.
44. Birgisdottir Å, B. and T. Johansen, *Autophagy and endocytosis - interconnections and interdependencies*. J Cell Sci, 2020. **133**(10).
45. Glick, D., S. Barth, and K.F. Macleod, *Autophagy: cellular and molecular mechanisms*. J Pathol, 2010. **221**(1): p. 3-12.
46. Mizushima, N., *A brief history of autophagy from cell biology to physiology and disease*. Nat Cell Biol, 2018. **20**(5): p. 521-527.
47. Mizushima, N., T. Yoshimori, and Y. Ohsumi, *The role of Atg proteins in autophagosome formation*. Annu Rev Cell Dev Biol, 2011. **27**: p. 107-32.
48. Loos, B., A. du Toit, and J.H. Hofmeyr, *Defining and measuring autophagosome flux—concept and reality*. Autophagy, 2014. **10**(11): p. 2087-96.
49. Gatica, D., V. Lahiri, and D.J. Klionsky, *Cargo recognition and degradation by selective autophagy*. Nat Cell Biol, 2018. **20**(3): p. 233-242.
50. Klionsky, D.J., et al., *Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition)*. Autophagy, 2016. **12**(1): p. 1-222.
51. Palikaras, K., E. Lionaki, and N. Tavernarakis, *Mechanisms of mitophagy in cellular homeostasis, physiology and pathology*. Nat Cell Biol, 2018. **20**(9): p. 1013-1022.
52. Tanemura, M., et al., *Rapamycin causes upregulation of autophagy and impairs islets function both in vitro and in vivo*. Am J Transplant, 2012. **12**(1): p. 102-14.
53. Vlahos, C.J., et al., *A specific inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase, 2-(4-morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one (LY294002)*. J Biol Chem, 1994. **269**(7): p. 5241-8.

54. Powis, G., et al., *Wortmannin, a potent and selective inhibitor of phosphatidylinositol-3-kinase*. *Cancer Res*, 1994. **54**(9): p. 2419-23.
55. Blommaart, E.F., et al., *The phosphatidylinositol 3-kinase inhibitors wortmannin and LY294002 inhibit autophagy in isolated rat hepatocytes*. *Eur J Biochem*, 1997. **243**(1-2): p. 240-6.
56. Mauvezin, C. and T.P. Neufeld, *Bafilomycin A1 disrupts autophagic flux by inhibiting both V-ATPase-dependent acidification and Ca-P60A/SERCA-dependent autophagosome-lysosome fusion*. *Autophagy*, 2015. **11**(8): p. 1437-8.
57. Sharma, V., et al., *Selective Autophagy and Xenophagy in Infection and Disease*. *Front Cell Dev Biol*, 2018. **6**: p. 147.
58. Levine, B., N. Mizushima, and H.W. Virgin, *Autophagy in immunity and inflammation*. *Nature*, 2011. **469**(7330): p. 323-35.
59. Oh, J.E. and H.K. Lee, *Pattern recognition receptors and autophagy*. *Front Immunol*, 2014. **5**: p. 300.
60. Shi, C.S. and J.H. Kehrl, *TRAF6 and A20 regulate lysine 63-linked ubiquitination of Beclin-1 to control TLR4-induced autophagy*. *Sci Signal*, 2010. **3**(123): p. ra42.
61. Delgado, M.A., et al., *Toll-like receptors control autophagy*. *Embo j*, 2008. **27**(7): p. 1110-21.
62. Negroni, A., et al., *NOD2 induces autophagy to control AIEC bacteria infectiveness in intestinal epithelial cells*. *Inflamm Res*, 2016. **65**(10): p. 803-13.
63. Travassos, L.H., et al., *Nod1 and Nod2 direct autophagy by recruiting ATG16L1 to the plasma membrane at the site of bacterial entry*. *Nat Immunol*, 2010. **11**(1): p. 55-62.
64. Ge, Y., M. Huang, and Y.M. Yao, *Autophagy and proinflammatory cytokines: Interactions and clinical implications*. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2018. **43**: p. 38-46.
65. Schroder, K., et al., *Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions*. *J Leukoc Biol*, 2004. **75**(2): p. 163-89.
66. Chang, Y.P., et al., *Autophagy facilitates an IFN- γ response and signal transduction*. *Microbes Infect*, 2011. **13**(11): p. 888-94.
67. Yang, Y., et al., *Recent advances in the mechanisms of NLRP3 inflammasome activation and its inhibitors*. *Cell Death Dis*, 2019. **10**(2): p. 128.
68. Takahama, M., S. Akira, and T. Saitoh, *Autophagy limits activation of the inflammasomes*. *Immunol Rev*, 2018. **281**(1): p. 62-73.
69. Zhou, R., et al., *A role for mitochondria in NLRP3 inflammasome activation*. *Nature*, 2011. **469**(7329): p. 221-5.
70. Nakahira, K., et al., *Autophagy proteins regulate innate immune responses by inhibiting the release of mitochondrial DNA mediated by the NALP3 inflammasome*. *Nat Immunol*, 2011. **12**(3): p. 222-30.

71. Wu, T.T., W.M. Li, and Y.M. Yao, *Interactions between Autophagy and Inhibitory Cytokines*. Int J Biol Sci, 2016. **12**(7): p. 884-97.
72. Kumari, S., S. Mg, and S. Mayor, *Endocytosis unplugged: multiple ways to enter the cell*. Cell Res, 2010. **20**(3): p. 256-75.
73. Kaksonen, M. and A. Roux, *Mechanisms of clathrin-mediated endocytosis*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2018. **19**(5): p. 313-326.
74. Stenmark, H., *Rab GTPases as coordinators of vesicle traffic*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2009. **10**(8): p. 513-25.
75. Hu, Y.B., et al., *The endosomal-lysosomal system: from acidification and cargo sorting to neurodegeneration*. Transl Neurodegener, 2015. **4**: p. 18.
76. Klionsky, D.J., E.L. Eskelinen, and V. Deretic, *Autophagosomes, phagosomes, autolysosomes, phagolysosomes, autophagolysosomes... wait, I'm confused*. Autophagy, 2014. **10**(4): p. 549-51.
77. Burd, C. and P.J. Cullen, *Retromer: a master conductor of endosome sorting*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2014. **6**(2).
78. Kagan, J.C., et al., *TRAM couples endocytosis of Toll-like receptor 4 to the induction of interferon-beta*. Nat Immunol, 2008. **9**(4): p. 361-8.
79. Minton, K., *Regulation of endosomal TLRs*. Nat Rev Immunol, 2019. **19**(11): p. 660-661.
80. Ou, X., et al., *Characterization of spike glycoprotein of SARS-CoV-2 on virus entry and its immune cross-reactivity with SARS-CoV*. Nat Commun, 2020. **11**(1): p. 1620.
81. Hoffmann, M., et al., *SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor*. Cell, 2020. **181**(2): p. 271-280.e8.
82. Glebov, O.O., *Understanding SARS-CoV-2 endocytosis for COVID-19 drug repurposing*. Febs j, 2020.
83. Royle, S.J., *The cellular functions of clathrin*. Cell Mol Life Sci, 2006. **63**(16): p. 1823-32.
84. Traub, L.M., *Regarding the amazing choreography of clathrin coats*. PLoS Biol, 2011. **9**(3): p. e1001037.
85. Simons, K. and M.J. Gerl, *Revitalizing membrane rafts: new tools and insights*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2010. **11**(10): p. 688-99.
86. Parton, R.G. and K. Simons, *The multiple faces of caveolae*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2007. **8**(3): p. 185-94.
87. Parton, R.G., *Caveolae: Structure, Function, and Relationship to Disease*. Annu Rev Cell Dev Biol, 2018. **34**: p. 111-136.
88. Lamaze, C., et al., *Interleukin 2 receptors and detergent-resistant membrane domains define a clathrin-independent endocytic pathway*. Mol Cell, 2001. **7**(3): p. 661-71.

89. Otto, G.P. and B.J. Nichols, *The roles of flotillin microdomains--endocytosis and beyond*. J Cell Sci, 2011. **124**(Pt 23): p. 3933-40.
90. Wang, L.H., K.G. Rothberg, and R.G. Anderson, *Mis-assembly of clathrin lattices on endosomes reveals a regulatory switch for coated pit formation*. J Cell Biol, 1993. **123**(5): p. 1107-17.
91. Al-Bari, M.A.A., *Targeting endosomal acidification by chloroquine analogs as a promising strategy for the treatment of emerging viral diseases*. Pharmacol Res Perspect, 2017. **5**(1): p. e00293.
92. Macia, E., et al., *Dynasore, a cell-permeable inhibitor of dynamin*. Dev Cell, 2006. **10**(6): p. 839-50.
93. Tomas, A., C.E. Futter, and E.R. Eden, *EGF receptor trafficking: consequences for signaling and cancer*. Trends Cell Biol, 2014. **24**(1): p. 26-34.
94. Xu, H. and D. Ren, *Lysosomal physiology*. Annu Rev Physiol, 2015. **77**: p. 57-80.
95. De Duve, C., et al., *Lysosomotropic agents*. Biochem Pharmacol, 1974. **23**(18): p. 2495-2531.
96. de Duve, C., *The lysosome turns fifty*. Nat Cell Biol, 2005. **7**(9): p. 847-9.
97. Luzio, J.P., P.R. Pryor, and N.A. Bright, *Lysosomes: fusion and function*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2007. **8**(8): p. 622-32.
98. Ballabio, A. and J.S. Bonifacino, *Lysosomes as dynamic regulators of cell and organismal homeostasis*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2020. **21**(2): p. 101-118.
99. Hemesath, T.J., et al., *microphthalmia, a critical factor in melanocyte development, defines a discrete transcription factor family*. Genes Dev, 1994. **8**(22): p. 2770-80.
100. Martina, J.A., et al., *The nutrient-responsive transcription factor TFE3 promotes autophagy, lysosomal biogenesis, and clearance of cellular debris*. Sci Signal, 2014. **7**(309): p. ra9.
101. Sardiello, M., et al., *A gene network regulating lysosomal biogenesis and function*. Science, 2009. **325**(5939): p. 473-7.
102. Li, X., et al., *A molecular mechanism to regulate lysosome motility for lysosome positioning and tubulation*. Nat Cell Biol, 2016. **18**(4): p. 404-17.
103. Pu, J., et al., *BORC, a multisubunit complex that regulates lysosome positioning*. Dev Cell, 2015. **33**(2): p. 176-88.
104. Hegedüs, K., et al., *Evolutionarily conserved role and physiological relevance of a STX17/Syx17 (syntaxin 17)-containing SNARE complex in autophagosome fusion with endosomes and lysosomes*. Autophagy, 2013. **9**(10): p. 1642-6.
105. Itakura, E. and N. Mizushima, *Syntaxin 17: the autophagosomal SNARE*. Autophagy, 2013. **9**(6): p. 917-9.
106. Simonaro, C.M., *Lysosomes, Lysosomal Storage Diseases, and Inflammation*. J Inborn Errors Metab Screen, 2016. **4**: p. 2326409816650465.

107. Platt, F.M., et al., *Lysosomal storage diseases*. Nat Rev Dis Primers, 2018. **4**(1): p. 27.
108. Nadanaciva, S., et al., *A high content screening assay for identifying lysosomotropic compounds*. Toxicol In Vitro, 2011. **25**(3): p. 715-23.
109. Lu, S., et al., *Lysosomal adaptation: How cells respond to lysosomotropic compounds*. PLoS One, 2017. **12**(3): p. e0173771.
110. Wishart, D.S., et al., *DrugBank 5.0: a major update to the DrugBank database for 2018*. Nucleic Acids Res, 2018. **46**(D1): p. D1074-d1082.
111. Mauthe, M., et al., *Chloroquine inhibits autophagic flux by decreasing autophagosome-lysosome fusion*. Autophagy, 2018. **14**(8): p. 1435-1455.
112. Dinarello, C.A., *Interleukin-1 in the pathogenesis and treatment of inflammatory diseases*. Blood, 2011. **117**(14): p. 3720-32.
113. Dinarello, C.A., *Overview of the IL-1 family in innate inflammation and acquired immunity*. Immunol Rev, 2018. **281**(1): p. 8-27.
114. Akash, M.S., K. Rehman, and S. Chen, *IL-1Ra and its delivery strategies: inserting the association in perspective*. Pharm Res, 2013. **30**(11): p. 2951-66.
115. Garlanda, C., C.A. Dinarello, and A. Mantovani, *The interleukin-1 family: back to the future*. Immunity, 2013. **39**(6): p. 1003-18.
116. Di Paolo, N.C. and D.M. Shayakhmetov, *Interleukin 1 α and the inflammatory process*. Nat Immunol, 2016. **17**(8): p. 906-13.
117. Yang, D., Z. Han, and J.J. Oppenheim, *Alarmins and immunity*. Immunol Rev, 2017. **280**(1): p. 41-56.
118. Sollberger, G., et al., *Caspase-1: the inflammasome and beyond*. Innate Immun, 2014. **20**(2): p. 115-25.
119. Kim, B., et al., *The Interleukin-1 α Precursor is Biologically Active and is Likely a Key Alarmin in the IL-1 Family of Cytokines*. Front Immunol, 2013. **4**: p. 391.
120. Swanson, K.V., M. Deng, and J.P. Ting, *The NLRP3 inflammasome: molecular activation and regulation to therapeutics*. Nat Rev Immunol, 2019. **19**(8): p. 477-489.
121. Dinarello, C.A., *The history of fever, leukocytic pyrogen and interleukin-1*. Temperature (Austin), 2015. **2**(1): p. 8-16.
122. Dinarello, C.A., et al., *Tumor necrosis factor (cachectin) is an endogenous pyrogen and induces production of interleukin 1*. J Exp Med, 1986. **163**(6): p. 1433-50.
123. Dinarello, C.A., et al., *Interleukin-6 as an endogenous pyrogen: induction of prostaglandin E2 in brain but not in peripheral blood mononuclear cells*. Brain Res, 1991. **562**(2): p. 199-206.
124. Dinarello, C.A., *A clinical perspective of IL-1 β as the gatekeeper of inflammation*. Eur J Immunol, 2011. **41**(5): p. 1203-17.

125. Lamkanfi, M. and V.M. Dixit, *Mechanisms and functions of inflammasomes*. Cell, 2014. **157**(5): p. 1013-22.
126. Schroder, K. and J. Tschopp, *The inflammasomes*. Cell, 2010. **140**(6): p. 821-32.
127. Muñoz-Planillo, R., et al., *K⁺ efflux is the common trigger of NLRP3 inflammasome activation by bacterial toxins and particulate matter*. Immunity, 2013. **38**(6): p. 1142-53.
128. Surprenant, A., et al., *The cytolytic P2Z receptor for extracellular ATP identified as a P2X receptor (P2X7)*. Science, 1996. **272**(5262): p. 735-8.
129. Samways, D.S., Z. Li, and T.M. Egan, *Principles and properties of ion flow in P2X receptors*. Front Cell Neurosci, 2014. **8**: p. 6.
130. Hornung, V., et al., *Silica crystals and aluminum salts activate the NALP3 inflammasome through phagosomal destabilization*. Nat Immunol, 2008. **9**(8): p. 847-56.
131. Katsnelson, M.A., et al., *NLRP3 inflammasome signaling is activated by low-level lysosome disruption but inhibited by extensive lysosome disruption: roles for K⁺ efflux and Ca²⁺ influx*. Am J Physiol Cell Physiol, 2016. **311**(1): p. C83-c100.
132. Sorbara, M.T. and S.E. Girardin, *Mitochondrial ROS fuel the inflammasome*. Cell Res, 2011. **21**(4): p. 558-60.
133. Tiku, V., M.W. Tan, and I. Dikic, *Mitochondrial Functions in Infection and Immunity*. Trends Cell Biol, 2020. **30**(4): p. 263-275.
134. Paiva, C.N. and M.T. Bozza, *Are reactive oxygen species always detrimental to pathogens?* Antioxid Redox Signal, 2014. **20**(6): p. 1000-37.
135. Kelley, N., et al., *The NLRP3 Inflammasome: An Overview of Mechanisms of Activation and Regulation*. Int J Mol Sci, 2019. **20**(13).
136. Brikos, C., et al., *Mass spectrometric analysis of the endogenous type I interleukin-1 (IL-1) receptor signaling complex formed after IL-1 binding identifies IL-1RAcP, MyD88, and IRAK-4 as the stable components*. Mol Cell Proteomics, 2007. **6**(9): p. 1551-9.
137. Weber, A., P. Wasiliew, and M. Kracht, *Interleukin-1 (IL-1) pathway*. Sci Signal, 2010. **3**(105): p. cm1.
138. Martin, M.U. and H. Wesche, *Summary and comparison of the signaling mechanisms of the Toll/interleukin-1 receptor family*. Biochim Biophys Acta, 2002. **1592**(3): p. 265-80.
139. Arend, W.P., *The balance between IL-1 and IL-1Ra in disease*. Cytokine Growth Factor Rev, 2002. **13**(4-5): p. 323-40.
140. Ramírez, J. and J.D. Cañete, *Anakinra for the treatment of rheumatoid arthritis: a safety evaluation*. Expert Opin Drug Saf, 2018. **17**(7): p. 727-732.
141. Vastert, S.J., et al., *Anakinra in children and adults with Still's disease*. Rheumatology (Oxford), 2019. **58**(Suppl 6): p. vi9-vi22.

142. Sönmez, H.E., et al., *Anakinra treatment in macrophage activation syndrome: a single center experience and systemic review of literature*. Clin Rheumatol, 2018. **37**(12): p. 3329-3335.
143. Schlüter, T., et al., *Regulation of IL-1 signaling by the decoy receptor IL-1R2*. J Mol Med (Berl), 2018. **96**(10): p. 983-992.
144. Symons, J.A., P.R. Young, and G.W. Duff, *Soluble type II interleukin 1 (IL-1) receptor binds and blocks processing of IL-1 beta precursor and loses affinity for IL-1 receptor antagonist*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(5): p. 1714-8.
145. R&D Systems Inc, *IL-1 Family Signaling Pathways*. 2019.
146. Cendrowski, J., A. Mamińska, and M. Miaczynska, *Endocytic regulation of cytokine receptor signaling*. Cytokine Growth Factor Rev, 2016. **32**: p. 63-73.
147. Hermanns, H.M., et al., *Endocytosis of pro-inflammatory cytokine receptors and its relevance for signal transduction*. Biol Chem, 2016. **397**(8): p. 695-708.
148. Hansen, B., et al., *Regulation of NF- κ B-dependent gene expression by ligand-induced endocytosis of the interleukin-1 receptor*. Cell Signal, 2013. **25**(1): p. 214-28.
149. Windheim, M. and B. Hansen, *Interleukin-1-induced activation of the small GTPase Rac1 depends on receptor internalization and regulates gene expression*. Cell Signal, 2014. **26**(1): p. 49-55.
150. Dutta, D., et al., *Pitstop 2 is a potent inhibitor of clathrin-independent endocytosis*. PLoS One, 2012. **7**(9): p. e45799.
151. Windheim, M., *Interleukin-1-induced gene expression requires the membrane-raft-dependent internalization of the interleukin-1 receptor*. Cell Signal, 2016. **28**(10): p. 1520-9.
152. Tiligada, E., et al., *The expanding role of immunopharmacology: IUPHAR Review 16*. Br J Pharmacol, 2015. **172**(17): p. 4217-27.
153. Schrezenmeier, E. and T. Dörner, *Mechanisms of action of hydroxychloroquine and chloroquine: implications for rheumatology*. Nat Rev Rheumatol, 2020. **16**(3): p. 155-166.
154. Yun, C.W. and S.H. Lee, *The Roles of Autophagy in Cancer*. Int J Mol Sci, 2018. **19**(11).
155. Said, A., et al., *Inflammatory conditions distinctively alter immunological functions of Langerhans-like cells and dendritic cells in vitro*. Immunology, 2015. **144**(2): p. 218-30.
156. Said, A., et al., *Chloroquine promotes IL-17 production by CD4+ T cells via p38-dependent IL-23 release by monocyte-derived Langerhans-like cells*. J Immunol, 2014. **193**(12): p. 6135-43.
157. Müller, G., C. Lübow, and G. Weindl, *Lysosomotropic beta blockers induce oxidative stress and IL23A production in Langerhans cells*. Autophagy, 2020. **16**(8): p. 1380-1395.
158. Heinbockel, L., et al., *Preclinical investigations reveal the broad-spectrum neutralizing activity of peptide Pep19-2.5 on bacterial pathogenicity factors*. Antimicrob Agents Chemother, 2013. **57**(3): p. 1480-7.

159. Banfi, G., G.L. Salvagno, and G. Lippi, *The role of ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA) as in vitro anticoagulant for diagnostic purposes*. Clin Chem Lab Med, 2007. **45**(5): p. 565-76.
160. Ushach, I. and A. Zlotnik, *Biological role of granulocyte macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) and macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) on cells of the myeloid lineage*. J Leukoc Biol, 2016. **100**(3): p. 481-9.
161. Triglia, R.P. and W.D. Linscott, *Titers of nine complement components, conglutinin and C3b-inactivator in adult and fetal bovine sera*. Mol Immunol, 1980. **17**(6): p. 741-8.
162. Leshem, B., D. Yogev, and D. Fiorentini, *Heat inactivation of fetal calf serum is not required for in vitro measurement of lymphocyte functions*. J Immunol Methods, 1999. **223**(2): p. 249-54.
163. Grabowski, M., et al., *Identification and validation of a novel dual small-molecule TLR2/8 antagonist*. Biochem Pharmacol, 2020. **177**: p. 113957.
164. Grabowski, M., et al., *The novel small-molecule antagonist MMG-11 preferentially inhibits TLR2/1 signaling*. Biochem Pharmacol, 2020. **171**: p. 113687.
165. Grabowski, M., et al., *Identification of a pyrogallol derivative as a potent and selective human TLR2 antagonist by structure-based virtual screening*. Biochem Pharmacol, 2018. **154**: p. 148-160.
166. Šribar, D., et al., *Identification and characterization of a novel chemotype for human TLR8 inhibitors*. Eur J Med Chem, 2019. **179**: p. 744-752.
167. Chanput, W., J.J. Mes, and H.J. Wichers, *THP-1 cell line: an in vitro cell model for immune modulation approach*. Int Immunopharmacol, 2014. **23**(1): p. 37-45.
168. Guilliams, M., A. Mildner, and S. Yona, *Developmental and Functional Heterogeneity of Monocytes*. Immunity, 2018. **49**(4): p. 595-613.
169. Nielsen, M.C., M.N. Andersen, and H.J. Møller, *Monocyte isolation techniques significantly impact the phenotype of both isolated monocytes and derived macrophages in vitro*. Immunology, 2020. **159**(1): p. 63-74.
170. Graham, F.L., et al., *Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5*. J Gen Virol, 1977. **36**(1): p. 59-74.
171. Uphoff, C.C. and H.G. Drexler, *Detection of Mycoplasma contamination in cell cultures*. Curr Protoc Mol Biol, 2014. **106**: p. 28.4.1-14.
172. Han, H., *RNA Interference to Knock Down Gene Expression*. Methods Mol Biol, 2018. **1706**: p. 293-302.
173. Ryan, J., et al., *Introduction to Modern Methods in Light Microscopy*. Methods Mol Biol, 2017. **1563**: p. 1-15.

174. Coling, D. and B. Kachar, *Theory and application of fluorescence microscopy*. Curr Protoc Neurosci, 2001. **Chapter 2**: p. Unit 2.1.
175. Adan, A., et al., *Flow cytometry: basic principles and applications*. Crit Rev Biotechnol, 2017. **37**(2): p. 163-176.
176. Wiederschain, G.Y., *The Molecular Probes handbook. A guide to fluorescent probes and labeling technologies*. Biochemistry (Moscow), 2011. **76**(11): p. 1276-1276.
177. Adan, A., Y. Kiraz, and Y. Baran, *Cell Proliferation and Cytotoxicity Assays*. Curr Pharm Biotechnol, 2016. **17**(14): p. 1213-1221.
178. Crowley, L.C., et al., *Quantitation of Apoptosis and Necrosis by Annexin V Binding, Propidium Iodide Uptake, and Flow Cytometry*. Cold Spring Harb Protoc, 2016. **2016**(11).
179. Riss, T.L., et al., *Cell Viability Assays*, in *Assay Guidance Manual*, S. Markossian, et al., Editors. 2004, Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences: Bethesda (MD).
180. Gan, S.D. and K.R. Patel, *Enzyme immunoassay and enzyme-linked immunosorbent assay*. J Invest Dermatol, 2013. **133**(9): p. e12.
181. Garibyan, L. and N. Avashia, *Polymerase chain reaction*. J Invest Dermatol, 2013. **133**(3): p. 1-4.
182. Markoulatos, P., N. Siafakas, and M. Moncany, *Multiplex polymerase chain reaction: a practical approach*. J Clin Lab Anal, 2002. **16**(1): p. 47-51.
183. Mahmood, T. and P.C. Yang, *Western blot: technique, theory, and trouble shooting*. N Am J Med Sci, 2012. **4**(9): p. 429-34.
184. Wingfield, P.T., *Use of protein folding reagents*. Curr Protoc Protein Sci, 2001. **Appendix 3**: p. Appendix 3A.
185. Smith, P.K., et al., *Measurement of protein using bicinchoninic acid*. Anal Biochem, 1985. **150**(1): p. 76-85.
186. Manns, J.M., *SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE) of Proteins*. Curr Protoc Microbiol, 2011. **22**(1): p. A.3M.1-A.3M.13.
187. Kurien, B.T. and R.H. Scofield, *Western blotting: an introduction*. Methods Mol Biol, 2015. **1312**: p. 17-30.
188. Kempe, S., H. Metz, and K. Mäder, *Application of electron paramagnetic resonance (EPR) spectroscopy and imaging in drug delivery research - chances and challenges*. Eur J Pharm Biopharm, 2010. **74**(1): p. 55-66.
189. Lohan, S.B., et al., *EPR Technology as Sensitive Method for Oxidative Stress Detection in Primary and Secondary Keratinocytes Induced by Two Selected Nanoparticles*. Cell Biochem Biophys, 2017. **75**(3-4): p. 359-367.

190. Schenborn, E. and D. Groskreutz, *Reporter gene vectors and assays*. Mol Biotechnol, 1999. **13**(1): p. 29-44.
191. Fang, P., et al., *Immune cell subset differentiation and tissue inflammation*. J Hematol Oncol, 2018. **11**(1): p. 97.
192. Park, E.K., et al., *Optimized THP-1 differentiation is required for the detection of responses to weak stimuli*. Inflamm Res, 2007. **56**(1): p. 45-50.
193. Chanput, W., V. Peters, and H. Wichers, *THP-1 and U937 Cells*, in *The Impact of Food Bioactives on Health: in vitro and ex vivo models*, K. Verhoeckx, et al., Editors. 2015, SpringerCopyright 2015, The Author(s). Cham (CH). p. 147-59.
194. Daigneault, M., et al., *The identification of markers of macrophage differentiation in PMA-stimulated THP-1 cells and monocyte-derived macrophages*. PLoS One, 2010. **5**(1): p. e8668.
195. Kohro, T., et al., *A comparison of differences in the gene expression profiles of phorbol 12-myristate 13-acetate differentiated THP-1 cells and human monocyte-derived macrophage*. J Atheroscler Thromb, 2004. **11**(2): p. 88-97.
196. Mittar, D., R.I. Paramban, and C. McIntyre. *Application Note Flow Cytometry and High-Content Imaging to Identify Markers of Monocyte-Macrophage Differentiation*. 2011.
197. Pfalzgraff, A., et al., *LPS-neutralizing peptides reduce outer membrane vesicle-induced inflammatory responses*. Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids, 2019. **1864**(10): p. 1503-1513.
198. Wahl, L.M., et al., *Isolation of human monocyte populations*. Curr Protoc Immunol, 2006. **Chapter 7**: p. Unit 7.6A.
199. Verreck, F.A., et al., *Human IL-23-producing type 1 macrophages promote but IL-10-producing type 2 macrophages subvert immunity to (myco)bacteria*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(13): p. 4560-5.
200. Rey-Giraud, F., M. Hafner, and C.H. Ries, *In vitro generation of monocyte-derived macrophages under serum-free conditions improves their tumor promoting functions*. PLoS One, 2012. **7**(8): p. e42656.
201. Verreck, F.A., et al., *Phenotypic and functional profiling of human proinflammatory type-1 and anti-inflammatory type-2 macrophages in response to microbial antigens and IFN-gamma- and CD40L-mediated costimulation*. J Leukoc Biol, 2006. **79**(2): p. 285-93.
202. Zarif, J.C., et al., *A phased strategy to differentiate human CD14⁺ monocytes into classically and alternatively activated macrophages and dendritic cells*. Biotechniques, 2016. **61**(1): p. 33-41.
203. Erbel, C., et al., *An in vitro model to study heterogeneity of human macrophage differentiation and polarization*. J Vis Exp, 2013(76): p. e50332.

204. Kim, G.K. and J.Q. Del Rosso, *Drug-provoked psoriasis: is it drug induced or drug aggravated?: understanding pathophysiology and clinical relevance*. J Clin Aesthet Dermatol, 2010. **3**(1): p. 32-8.
205. Balak, D.M. and E. Hajdarbegovic, *Drug-induced psoriasis: clinical perspectives*. Psoriasis (Auckl), 2017. **7**: p. 87-94.
206. Wang, Y., et al., *Monocytes/Macrophages play a pathogenic role in IL-23 mediated psoriasis-like skin inflammation*. Sci Rep, 2019. **9**(1): p. 5310.
207. Lübow, C., J. Bockstiegel, and G. Weindl, *Lysosomotropic drugs enhance pro-inflammatory responses to IL-1 β in macrophages by inhibiting internalization of the IL-1 receptor*. Biochem Pharmacol, 2020. **175**: p. 113864.
208. Jurida, L., et al., *The Activation of IL-1-Induced Enhancers Depends on TAK1 Kinase Activity and NF- κ B p65*. Cell Rep, 2015. **10**(5): p. 726-739.
209. Cohen, P., *The TLR and IL-1 signalling network at a glance*. J Cell Sci, 2014. **127**(Pt 11): p. 2383-90.
210. Damstra, R.J. and W.A. van Vloten, *[Exacerbation of psoriasis caused by malaria prophylaxis with chloroquine and proguanil]*. Ned Tijdschr Geneesk, 1991. **135**(15): p. 671-3.
211. Weber, S.M. and S.M. Levitz, *Chloroquine interferes with lipopolysaccharide-induced TNF-alpha gene expression by a nonlysosomotropic mechanism*. J Immunol, 2000. **165**(3): p. 1534-40.
212. Jang, C.H., et al., *Chloroquine inhibits production of TNF-alpha, IL-1beta and IL-6 from lipopolysaccharide-stimulated human monocytes/macrophages by different modes*. Rheumatology (Oxford), 2006. **45**(6): p. 703-10.
213. Lawrence, R.E. and R. Zoncu, *The lysosome as a cellular centre for signalling, metabolism and quality control*. Nat Cell Biol, 2019. **21**(2): p. 133-142.
214. Pisonero-Vaquero, S. and D.L. Medina, *Lysosomotropic Drugs: Pharmacological Tools to Study Lysosomal Function*. Curr Drug Metab, 2017. **18**(12): p. 1147-1158.
215. Chikte, S., N. Panchal, and G. Warnes, *Use of LysoTracker dyes: a flow cytometric study of autophagy*. Cytometry A, 2014. **85**(2): p. 169-78.
216. Wiederschain, G.Y., *The Molecular Probes handbook. A guide to fluorescent probes and labeling technologies*. 2011, Springer Science & Business Media.
217. Shin, S.Y., et al., *The antipsychotic agent chlorpromazine induces autophagic cell death by inhibiting the Akt/mTOR pathway in human U-87MG glioma cells*. Carcinogenesis, 2013. **34**(9): p. 2080-9.
218. Bowie, M., et al., *Fluoxetine induces cytotoxic endoplasmic reticulum stress and autophagy in triple negative breast cancer*. World J Clin Oncol, 2015. **6**(6): p. 299-311.

219. Sun, D., et al., *Fluoxetine induces autophagic cell death via eEF2K-AMPK-mTOR-ULK complex axis in triple negative breast cancer*. Cell Prolif, 2018. **51**(2): p. e12402.
220. Sánchez-Martín, P., T. Saito, and M. Komatsu, *p62/SQSTM1: 'Jack of all trades' in health and cancer*. Febs j, 2019. **286**(1): p. 8-23.
221. Sudo, T., M. Maruyama, and H. Osada, *p62 functions as a p38 MAP kinase regulator*. Biochem Biophys Res Commun, 2000. **269**(2): p. 521-5.
222. Kawai, K., et al., *Specific regulation of cytokine-dependent p38 MAP kinase activation by p62/SQSTM1*. J Biochem, 2008. **143**(6): p. 765-72.
223. Korhonen, E., et al., *SQSTM1/p62 regulates the production of IL-8 and MCP-1 in IL-1 β -stimulated human retinal pigment epithelial cells*. Cytokine, 2019. **116**: p. 70-77.
224. Sies, H. and D.P. Jones, *Reactive oxygen species (ROS) as pleiotropic physiological signalling agents*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2020. **21**(7): p. 363-383.
225. Li, L., et al., *ROS and Autophagy: Interactions and Molecular Regulatory Mechanisms*. Cell Mol Neurobiol, 2015. **35**(5): p. 615-21.
226. Maes, H., et al., *Tumor vessel normalization by chloroquine independent of autophagy*. Cancer Cell, 2014. **26**(2): p. 190-206.
227. Shang, Y., S. Smith, and X. Hu, *Role of Notch signaling in regulating innate immunity and inflammation in health and disease*. Protein Cell, 2016. **7**(3): p. 159-74.
228. Guruharsha, K.G., M.W. Kankel, and S. Artavanis-Tsakonas, *The Notch signalling system: recent insights into the complexity of a conserved pathway*. Nat Rev Genet, 2012. **13**(9): p. 654-66.
229. Palaga, T., et al., *Notch signaling is activated by TLR stimulation and regulates macrophage functions*. Eur J Immunol, 2008. **38**(1): p. 174-83.
230. Wongchana, W., et al., *Notch signaling regulates the responses of lipopolysaccharide-stimulated macrophages in the presence of immune complexes*. PLoS One, 2018. **13**(6): p. e0198609.
231. Zhang, Q., et al., *Notch signal suppresses Toll-like receptor-triggered inflammatory responses in macrophages by inhibiting extracellular signal-regulated kinase 1/2-mediated nuclear factor κ B activation*. J Biol Chem, 2012. **287**(9): p. 6208-17.
232. Schnoor, M., et al., *Efficient non-viral transfection of THP-1 cells*. J Immunol Methods, 2009. **344**(2): p. 109-15.
233. Maeß, M.B., B. Wittig, and S. Lorkowski, *Highly efficient transfection of human THP-1 macrophages by nucleofection*. J Vis Exp, 2014(91): p. e51960.
234. Jiang, P., et al., *The HOPS complex mediates autophagosome-lysosome fusion through interaction with syntaxin 17*. Mol Biol Cell, 2014. **25**(8): p. 1327-37.

235. Dutta, D. and J.G. Donaldson, *Search for inhibitors of endocytosis: Intended specificity and unintended consequences*. Cell Logist, 2012. **2**(4): p. 203-208.
236. Gabay, C., C. Lamacchia, and G. Palmer, *IL-1 pathways in inflammation and human diseases*. Nat Rev Rheumatol, 2010. **6**(4): p. 232-41.
237. Rovetta, A.I., et al., *IFNG-mediated immune responses enhance autophagy against Mycobacterium tuberculosis antigens in patients with active tuberculosis*. Autophagy, 2014. **10**(12): p. 2109-21.
238. Matsuzawa, T., et al., *IFN- γ elicits macrophage autophagy via the p38 MAPK signaling pathway*. J Immunol, 2012. **189**(2): p. 813-8.
239. Mühl, H. and J. Pfeilschifter, *Anti-inflammatory properties of pro-inflammatory interferon-gamma*. Int Immunopharmacol, 2003. **3**(9): p. 1247-55.
240. Cavalli, G. and C.A. Dinarello, *Anakinra Therapy for Non-cancer Inflammatory Diseases*. Front Pharmacol, 2018. **9**: p. 1157.
241. Tilg, H., et al., *Induction of circulating IL-1 receptor antagonist by IFN treatment*. J Immunol, 1993. **150**(10): p. 4687-92.
242. Campden, R.I. and Y. Zhang, *The role of lysosomal cysteine cathepsins in NLRP3 inflammasome activation*. Arch Biochem Biophys, 2019. **670**: p. 32-42.
243. Tang, T.T., et al., *Hydroxychloroquine attenuates renal ischemia/reperfusion injury by inhibiting cathepsin mediated NLRP3 inflammasome activation*. Cell Death Dis, 2018. **9**(3): p. 351.
244. Thomas, P. and T.G. Smart, *HEK293 cell line: a vehicle for the expression of recombinant proteins*. J Pharmacol Toxicol Methods, 2005. **51**(3): p. 187-200.
245. Bausch-Fluck, D., et al., *A mass spectrometric-derived cell surface protein atlas*. PLoS One, 2015. **10**(3): p. e0121314.
246. InvivoGen, *HEK-Blue™ IL-1 β Cells*. Technical Datasheet. **Version 20D06-MM**.
247. Masud Alam, M., et al., *Inhibition of autophagy by chloroquine induces apoptosis in primary effusion lymphoma in vitro and in vivo through induction of endoplasmic reticulum stress*. Apoptosis, 2016. **21**(10): p. 1191-201.
248. Jia, B., et al., *Autophagy inhibitor chloroquine induces apoptosis of cholangiocarcinoma cells via endoplasmic reticulum stress*. Oncol Lett, 2018. **16**(3): p. 3509-3516.
249. Hiramatsu, N., et al., *Secreted protein-based reporter systems for monitoring inflammatory events: critical interference by endoplasmic reticulum stress*. J Immunol Methods, 2006. **315**(1-2): p. 202-7.
250. Takashiba, S., et al., *Differentiation of monocytes to macrophages primes cells for lipopolysaccharide stimulation via accumulation of cytoplasmic nuclear factor kappaB*. Infect Immun, 1999. **67**(11): p. 5573-8.

251. Spencer, M., et al., *Adipose tissue macrophages in insulin-resistant subjects are associated with collagen VI and fibrosis and demonstrate alternative activation*. American journal of physiology. Endocrinology and metabolism, 2010. **299**(6): p. E1016-E1027.
252. Chanput, W., et al., *Characterization of polarized THP-1 macrophages and polarizing ability of LPS and food compounds*. Food Funct, 2013. **4**(2): p. 266-76.
253. Tsuchiya, S., et al., *Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1)*. Int J Cancer, 1980. **26**(2): p. 171-6.
254. Sundström, C. and K. Nilsson, *Establishment and characterization of a human histiocytic lymphoma cell line (U-937)*. Int J Cancer, 1976. **17**(5): p. 565-77.
255. Budai, M.M., J. Tózsér, and S. Benkő, *Different dynamics of NLRP3 inflammasome-mediated IL-1 β production in GM-CSF- and M-CSF-differentiated human macrophages*. J Leukoc Biol, 2017. **101**(6): p. 1335-1347.
256. Lescoat, A., et al., *Distinct Properties of Human M-CSF and GM-CSF Monocyte-Derived Macrophages to Simulate Pathological Lung Conditions In Vitro: Application to Systemic and Inflammatory Disorders with Pulmonary Involvement*. Int J Mol Sci, 2018. **19**(3).
257. Montañó, F., S. Grinstein, and R. Levin, *Quantitative Phagocytosis Assays in Primary and Cultured Macrophages*. Methods Mol Biol, 2018. **1784**: p. 151-163.
258. Kennedy, J.J., et al., *Infection and Functional Modulation of Human Monocytes and Macrophages by Varicella-Zoster Virus*. J Virol, 2019. **93**(3).
259. Fangradt, M., et al., *Human monocytes and macrophages differ in their mechanisms of adaptation to hypoxia*. Arthritis Res Ther, 2012. **14**(4): p. R181.
260. Negash, A.A., et al., *Modulation of calcium signaling pathway by hepatitis C virus core protein stimulates NLRP3 inflammasome activation*. PLoS Pathog, 2019. **15**(2): p. e1007593.
261. Tollerud, D.J., et al., *The influence of age, race, and gender on peripheral blood mononuclear-cell subsets in healthy nonsmokers*. J Clin Immunol, 1989. **9**(3): p. 214-22.
262. Astle, W.J., et al., *The Allelic Landscape of Human Blood Cell Trait Variation and Links to Common Complex Disease*. Cell, 2016. **167**(5): p. 1415-1429.e19.
263. Neumann, J., et al., *Nanoscale distribution of TLR4 on primary human macrophages stimulated with LPS and ATI*. Nanoscale, 2019. **11**(19): p. 9769-9779.
264. Clark, R. and T. Kupper, *Old meets new: the interaction between innate and adaptive immunity*. J Invest Dermatol, 2005. **125**(4): p. 629-37.
265. Azenabor, A.A., et al., *Chlamydia trachomatis induces anti-inflammatory effect in human macrophages by attenuation of immune mediators in Jurkat T-cells*. Immunobiology, 2011. **216**(12): p. 1248-55.
266. Mestas, J. and C.C. Hughes, *Of mice and not men: differences between mouse and human immunology*. J Immunol, 2004. **172**(5): p. 2731-8.

267. Zschaler, J., D. Schlorke, and J. Arnhold, *Differences in innate immune response between man and mouse*. Crit Rev Immunol, 2014. **34**(5): p. 433-54.
268. Chen, X., et al., *The Antimalarial Chloroquine Suppresses LPS-Induced NLRP3 Inflammasome Activation and Confers Protection against Murine Endotoxic Shock*. Mediators Inflamm, 2017. **2017**: p. 6543237.
269. Zhou, D., et al., *Chloroquine differentially modulates inflammatory cytokine expression in RAW 264.7 cells in response to inactivated Staphylococcus aureus*. Inflammation, 2015. **38**(2): p. 745-55.
270. Shultz, L.D., et al., *Humanized mice for immune system investigation: progress, promise and challenges*. Nat Rev Immunol, 2012. **12**(11): p. 786-98.
271. Tsankov, N., I. Angelova, and J. Kazandjieva, *Drug-induced psoriasis. Recognition and management*. Am J Clin Dermatol, 2000. **1**(3): p. 159-65.
272. Di Meglio, P. and F.O. Nestle, *The role of IL-23 in the immunopathogenesis of psoriasis*. F1000 Biol Rep, 2010. **2**.
273. Rainsford, K.D., et al., *Therapy and pharmacological properties of hydroxychloroquine and chloroquine in treatment of systemic lupus erythematosus, rheumatoid arthritis and related diseases*. Inflammopharmacology, 2015. **23**(5): p. 231-69.
274. An, J., et al., *Antimalarial Drugs as Immune Modulators: New Mechanisms for Old Drugs*. Annu Rev Med, 2017. **68**: p. 317-330.
275. Martín-Fuentes, P., et al., *Individual variation of scavenger receptor expression in human macrophages with oxidized low-density lipoprotein is associated with a differential inflammatory response*. J Immunol, 2007. **179**(5): p. 3242-8.
276. Deretic, V. and B. Levine, *Autophagy balances inflammation in innate immunity*. Autophagy, 2018. **14**(2): p. 243-251.
277. Guo, X., et al., *Transfection reagent Lipofectamine triggers type I interferon signaling activation in macrophages*. Immunol Cell Biol, 2019. **97**(1): p. 92-96.
278. Vats, S. and R. Manjithaya, *A reversible autophagy inhibitor blocks autophagosome-lysosome fusion by preventing Stx17 loading onto autophagosomes*. Mol Biol Cell, 2019. **30**(17): p. 2283-2295.
279. Zotti, T., et al., *TRAF6-mediated ubiquitination of NEMO requires p62/sequestosome-1*. Mol Immunol, 2014. **58**(1): p. 27-31.
280. Kanayama, M., et al., *Autophagy enhances NF κ B activity in specific tissue macrophages by sequestering A20 to boost antifungal immunity*. Nat Commun, 2015. **6**: p. 5779.
281. Ling, J., et al., *KrasG12D-induced IKK2/ β /NF- κ B activation by IL-1 α and p62 feedforward loops is required for development of pancreatic ductal adenocarcinoma*. Cancer Cell, 2012. **21**(1): p. 105-20.

282. Yang, S., et al., *NF- κ B Signaling Activation Induced by Chloroquine Requires Autophagosome, p62 Protein, and c-Jun N-terminal Kinase (JNK) Signaling and Promotes Tumor Cell Resistance*. J Biol Chem, 2017. **292**(8): p. 3379-3388.
283. Filomeni, G., D. De Zio, and F. Cecconi, *Oxidative stress and autophagy: the clash between damage and metabolic needs*. Cell Death Differ, 2015. **22**(3): p. 377-88.
284. Redmann, M., et al., *Inhibition of autophagy with bafilomycin and chloroquine decreases mitochondrial quality and bioenergetic function in primary neurons*. Redox Biol, 2017. **11**: p. 73-81.
285. Dey, S. and B. Bishayi, *Killing of Staphylococcus aureus in murine macrophages by chloroquine used alone and in combination with ciprofloxacin or azithromycin*. J Inflamm Res, 2015. **8**: p. 29-47.
286. Park, J., et al., *Reactive oxygen species mediate chloroquine-induced expression of chemokines by human astroglial cells*. Glia, 2004. **47**(1): p. 9-20.
287. Wang, P., et al., *Macrophage achieves self-protection against oxidative stress-induced ageing through the Mst-Nrf2 axis*. Nat Commun, 2019. **10**(1): p. 755.
288. Vomund, S., et al., *Nrf2, the Master Regulator of Anti-Oxidative Responses*. Int J Mol Sci, 2017. **18**(12).
289. Nezis, I.P. and H. Stenmark, *p62 at the interface of autophagy, oxidative stress signaling, and cancer*. Antioxid Redox Signal, 2012. **17**(5): p. 786-93.
290. He, Y., et al., *Identification of a lysosomal pathway that modulates glucocorticoid signaling and the inflammatory response*. Sci Signal, 2011. **4**(180): p. ra44.
291. Chen, C.L., et al., *Inhibitors of clathrin-dependent endocytosis enhance TGF β signaling and responses*. J Cell Sci, 2009. **122**(Pt 11): p. 1863-71.
292. Wang, Y., et al., *Inhibition of clathrin/dynamin-dependent internalization interferes with LPS-mediated TRAM-TRIF-dependent signaling pathway*. Cell Immunol, 2012. **274**(1-2): p. 121-9.
293. Ivashkiv, L.B., *IFN γ : signalling, epigenetics and roles in immunity, metabolism, disease and cancer immunotherapy*. Nat Rev Immunol, 2018. **18**(9): p. 545-558.
294. Schnyder-Candrian, S., et al., *Interferon-alpha and interferon-gamma down-regulate the production of interleukin-8 and ENA-78 in human monocytes*. J Leukoc Biol, 1995. **57**(6): p. 929-35.
295. Masters, S.L., et al., *Regulation of interleukin-1beta by interferon-gamma is species specific, limited by suppressor of cytokine signalling 1 and influences interleukin-17 production*. EMBO Rep, 2010. **11**(8): p. 640-6.
296. Eigenbrod, T., K.A. Bode, and A.H. Dalpke, *Early inhibition of IL-1 β expression by IFN- γ is mediated by impaired binding of NF- κ B to the IL-1 β promoter but is independent of nitric oxide*. J Immunol, 2013. **190**(12): p. 6533-41.

297. Xie, C.B., et al., *Complement Membrane Attack Complexes Assemble NLRP3 Inflammasomes Triggering IL-1 Activation of IFN- γ -Primed Human Endothelium*. *Circ Res*, 2019. **124**(12): p. 1747-1759.
298. Singh, N., et al., *Antimycobacterial effect of IFNG (interferon gamma)-induced autophagy depends on HMOX1 (heme oxygenase 1)-mediated increase in intracellular calcium levels and modulation of PPP3/calcineurin-TFEB (transcription factor EB) axis*. *Autophagy*, 2018. **14**(6): p. 972-991.
299. Thome, R., et al., *Chloroquine-treated dendritic cells require STAT1 signaling for their tolerogenic activity*. *Eur J Immunol*, 2018. **48**(7): p. 1228-1234.
300. van der Heijden, C., et al., *Epigenetics and Trained Immunity*. *Antioxid Redox Signal*, 2018. **29**(11): p. 1023-1040.
301. Boraschi, D. and P. Italiani, *Innate Immune Memory: Time for Adopting a Correct Terminology*. *Front Immunol*, 2018. **9**: p. 799.
302. Merad, M., F. Ginhoux, and M. Collin, *Origin, homeostasis and function of Langerhans cells and other langerin-expressing dendritic cells*. *Nat Rev Immunol*, 2008. **8**(12): p. 935-47.
303. Deckers, J., H. Hammad, and E. Hoste, *Langerhans Cells: Sensing the Environment in Health and Disease*. *Front Immunol*, 2018. **9**: p. 93.
304. Doebel, T., B. Voisin, and K. Nagao, *Langerhans Cells - The Macrophage in Dendritic Cell Clothing*. *Trends Immunol*, 2017. **38**(11): p. 817-828.
305. Tay, M.Z., et al., *The trinity of COVID-19: immunity, inflammation and intervention*. *Nat Rev Immunol*, 2020. **20**(6): p. 363-374.
306. Goldin, C.J., et al., *Identifying pathophysiological bases of disease in COVID-19*. *Transl Med Commun*, 2020. **5**(1): p. 15.
307. Ali, M.J., et al., *Treatment Options for COVID-19: A Review*. *Front Med (Lausanne)*, 2020. **7**: p. 480.
308. Paton, N.I., et al., *Chloroquine for influenza prevention: a randomised, double-blind, placebo controlled trial*. *Lancet Infect Dis*, 2011. **11**(9): p. 677-83.
309. Sperber, K., et al., *Hydroxychloroquine treatment of patients with human immunodeficiency virus type 1*. *Clin Ther*, 1995. **17**(4): p. 622-36.
310. Delvecchio, R., et al., *Chloroquine, an Endocytosis Blocking Agent, Inhibits Zika Virus Infection in Different Cell Models*. *Viruses*, 2016. **8**(12).
311. Dowall, S.D., et al., *Chloroquine inhibited Ebola virus replication in vitro but failed to protect against infection and disease in the in vivo guinea pig model*. *J Gen Virol*, 2015. **96**(12): p. 3484-3492.
312. Xiu, S., et al., *Inhibitors of SARS-CoV-2 Entry: Current and Future Opportunities*. *J Med Chem*, 2020.

313. Coperchini, F., et al., *The cytokine storm in COVID-19: An overview of the involvement of the chemokine/chemokine-receptor system*. Cytokine Growth Factor Rev, 2020. **53**: p. 25-32.
314. Wang, M., et al., *Remdesivir and chloroquine effectively inhibit the recently emerged novel coronavirus (2019-nCoV) in vitro*. Cell Res, 2020. **30**(3): p. 269-271.
315. U.S. Food and Drug Administration (FDA). *Coronavirus (COVID-19) Update: FDA Revokes Emergency Use Authorization for Chloroquine and Hydroxychloroquine*. FDA News Release 2020 /06 /15 [cited 2020 /10 /01]; Available from: <https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/coronavirus-covid-19-update-fda-revokes-emergency-use-authorization-chloroquine-and>.
316. Nachimuthu, S., M.D. Assar, and J.M. Schussler, *Drug-induced QT interval prolongation: mechanisms and clinical management*. Ther Adv Drug Saf, 2012. **3**(5): p. 241-53.
317. Hoffmann, M., et al., *Chloroquine does not inhibit infection of human lung cells with SARS-CoV-2*. Nature, 2020. **585**(7826): p. 588-590.
318. Plaze, M., et al., *Repurposing chlorpromazine to treat COVID-19: The reCoVery study*. Encephale, 2020. **46**(3): p. 169-172.
319. Dyall, J., et al., *Repurposing of clinically developed drugs for treatment of Middle East respiratory syndrome coronavirus infection*. Antimicrob Agents Chemother, 2014. **58**(8): p. 4885-93.
320. NCT04366739. *Repurposing of Chlorpromazine in Covid-19 Treatment (reCoVery)*. [cited 2020 / 10/ 01]; Available from: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04366739?term=chlorpromazine&cond=Covid-19&draw=2&rank=1>.
321. NCT04354805. *Administration of Chlorpromazine as a Treatment for COVID-19*. [cited 2020 / 10/ 01]; Available from: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04354805?term=chlorpromazine&cond=Covid-19&draw=2&rank=2>.
322. Schloer, S., et al., *Targeting the endolysosomal host-SARS-CoV-2 interface by clinically licensed functional inhibitors of acid sphingomyelinase (FIASMA) including the antidepressant fluoxetine*. Emerg Microbes Infect, 2020. **9**(1): p. 2245-2255.
323. NCT04570449. *Pilot Randomized Controlled Trial: Fluoxetine to Reduce Hospitalization From COVID-19 Infection (FloR COVID-19)*. [cited 2020 / 10/ 01]; Available from: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04570449?term=Fluoxetine&cond=Covid19&draw=2&rank=1>.
324. NCT04377308. *Fluoxetine to Reduce Intubation and Death After COVID19 Infection*. [cited 2020 / 10/ 01]; Available from:

- <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04377308?term=Fluoxetine&cond=Covid19&draw=2&rank=2>.
325. U.S. National Library of Medicine. *ClinicalTrials.gov*. 2020/ 11/ 18]; Available from: https://www.clinicaltrials.gov/ct2/results?term=Chloroquine%2C+Hydroxychloroquine&cond=covid19&Search=Apply&recrs=b&recrs=a&recrs=f&recrs=d&age_v=&gndr=&type=&rslt.
326. Cortegiani, A., et al., *Update I. A systematic review on the efficacy and safety of chloroquine/hydroxychloroquine for COVID-19*. *J Crit Care*, 2020. **59**: p. 176-190.
327. Cauchois, R., et al., *Early IL-1 receptor blockade in severe inflammatory respiratory failure complicating COVID-19*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2020. **117**(32): p. 18951-18953.
328. van de Veerdonk, F.L. and M.G. Netea, *Blocking IL-1 to prevent respiratory failure in COVID-19*. *Crit Care*, 2020. **24**(1): p. 445.
329. Browning, D.J., *Pharmacology of Chloroquine and Hydroxychloroquine*. Hydroxychloroquine and Chloroquine Retinopathy, 2014: p. 35-63.
330. Marken, P.A. and J.S. Munro, *Selecting a Selective Serotonin Reuptake Inhibitor: Clinically Important Distinguishing Features*. *Prim Care Companion J Clin Psychiatry*, 2000. **2**(6): p. 205-210.
331. Yeung, P.K., et al., *Pharmacokinetics of chlorpromazine and key metabolites*. *Eur J Clin Pharmacol*, 1993. **45**(6): p. 563-9.
332. Kavanagh, O., et al., *Inhaled hydroxychloroquine to improve efficacy and reduce harm in the treatment of COVID-19*. *Med Hypotheses*, 2020. **143**: p. 110110.
333. Mijaljica, D. and D.J. Klionsky, *Autophagy/virophagy: a "disposal strategy" to combat COVID-19*. *Autophagy*, 2020: p. 1-2.

7. Auflistung der Veröffentlichungen und Förderungen

7.1 Originalarbeiten

Charlotte Lübow, Judith Bockstiegel, Günther Weindl. *Lysosomotropic drugs enhance pro-inflammatory responses to IL-1 β in macrophages by inhibiting internalization of the IL-1 receptor*. Biochememical Pharmacology. 2020. 175: p. 113864.

Gerrit Müller, **Charlotte Lübow**, Günther Weindl. *Lysosomotropic beta blockers induce oxidative stress and IL23A production in Langerhans cells*. Autophagy. 2020. 16(8): p. 1380-1395.

Anja Pfalzgraff, Wilma Correa, Lena Heinbockel, Andra B.Schromm, **Charlotte Lübow**, Nicolas Gisch, Guillermo Martinez-de-Tejada, Klaus Brandenburg, Günther Weindl. *LPS-neutralizing peptides reduce outer membrane vesicle-induced inflammatory responses*. Biochimica et biophysica acta Molecular and cell biology of lipids. 2019. 1864(10): p. 1503-1513.

7.2 Vorträge

Charlotte Lübow, Günther Weindl (2019) *Lysosomotropic drugs enhance pro-inflammatory responses to IL-1 β in macrophages by inhibiting internalisation of the IL-1 receptor*. 4th German Pharm-Tox Summit, Stuttgart, Deutschland, 25.– 28.02.2019

Charlotte Lübow, Günther Weindl (2018) *Differential modulation of inflammatory responses in macrophages by chloroquine*. Tag der Pharmazie (DPhG) „Der Wissenschaftliche Nachwuchs stellt sich vor – Shaping future pharmaceutical research: Junior scientists present“, Berlin, Deutschland, 06.07.2018

7.3 Posterbeiträge

Charlotte Lübow, Günther Weindl (2019) *Lysosomotropic drugs enhance pro-inflammatory responses to IL-1 β in macrophages by inhibiting internalisation of the IL-1 receptor*. Novel Concepts in Innate Immunity, Tübingen, Deutschland, 12. – 14.06.2019

Charlotte Lübow, Günther Weindl (2018) *Differential regulation of inflammatory responses in macrophages by chloroquine*. TOLL 2018, Porto, Portugal, 06. – 09.06.2018

Charlotte Lübow, Günther Weindl (2018) *Differential modulation of inflammatory responses in macrophages by chloroquine*. São Paulo School of Advanced Science in Cell Biology (SPCell), São Paulo, Brasilien, 03. – 13.03.2018

Charlotte Lübow, Günther Weindl (2018) *Differential modulation of inflammatory responses in macrophages by chloroquine*. 3rd German Pharm-Tox Summit - 84th Annual Meeting of the German Society for Experimental and Clinical Pharmacology and Toxicology (DGPT) and 20th Annual Meeting of Association of Clinical Pharmacology (VKliPha), Göttingen, Deutschland, 26.02. – 01.03.2018

Charlotte Lübow, Günther Weindl (2017) *Chloroquine induces ROS-mediated IL-8 production in macrophages*. VIB conference series “ER stress, Autophagy and Immune System”, Brügge, Belgien, 26. – 27.01.2017

7.4 Stipendien und Förderungen

Reisestipendium der Frauenförderung des Fachbereichs Biologie, Chemie und Pharmazie der FU Berlin für die Teilnahme an der TOLL 2018 Konferenz in Porto, Portugal, 06. – 09.06.2018

Reisestipendium der Funding Agency of São Paulo State (FAPESP) für die Teilnahme am Workshop São Paulo School of Advanced Science in Cell Biology (SPCell) in São Paulo, Brasilien, 03. – 13.03.2018

Reisestipendium der Frauenförderung des Fachbereichs Biologie, Chemie und Pharmazie der FU Berlin für die Teilnahme an der 4th German Pharm-Tox Summit, in Stuttgart, Deutschland, 25.– 28.02.2019