

Charakterisierung der Endotoxin induzierten Toleranzentwicklung von humanen monozytären Zellen

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Hohen Medizinischen Fakultät

der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität

Bonn

Alexandra Funken, geb. Klüners

aus Meerbusch

2023

Angefertigt mit der Genehmigung
der Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachterin: PD Dr. rer. nat. Stilla Frede
2. Gutachter: Prof. Dr. Heinz Walter Beck

Tag der Mündlichen Prüfung: 20.06.2023

Aus der Klinik für Anästhesiologie und Operative Intensivmedizin
Direktor: Prof. Dr. med. Mark Coburn

Inhaltsverzeichnis

| | |
|---|-----------|
| Abkürzungsverzeichnis | 6 |
| 1. Einleitung..... | 9 |
| 1.1 Grundlagen der Immunologie | 9 |
| 1.2 Sepsis..... | 12 |
| 1.3 Anti-Inflammation und CARS | 14 |
| 1.4 Molekulare Signaltransduktionswege der Inflammation und Anti-Inflammation | 16 |
| 1.5 Prinzipien der Toleranzinduktion und der epigenetischen Regulierung der Inflammation..... | 18 |
| 1.5.1 Modifikationen der molekularen Signaltransduktion..... | 19 |
| 1.5.2 Epigenetische Modifikationen | 21 |
| 1.5.3 Metabolische Effekte | 23 |
| 1.6 Ziel der Arbeit und Fragestellungen..... | 26 |
| 2. Material und Methoden | 28 |
| 2.1 Geräte, Material und Substanzen | 28 |
| 2.1.1 Geräte und Material..... | 28 |
| 2.1.2 Proteine..... | 30 |
| 2.1.3 Antikörper und Enzym Kits für ELISA | 30 |
| 2.1.3 LDH Zytotoxizitäts-Assay..... | 31 |
| 2.1.4 Zellkultur | 31 |
| 2.1.5 ELISA | 32 |
| 2.1.6 PCR | 32 |
| 2.1.7 Puffer und Lösungen | 32 |
| 2.2 Zelllinien und Zellkultur..... | 33 |
| 2.3 Versuchsbedingungen und Nachweisverfahren | 34 |
| 2.3.1 Etablierung der Endotoxin-Toleranz | 34 |
| 2.3.2. Endotoxin-Toleranz im Passageversuch mit Inhibitor Zugabe..... | 35 |
| 2.3.3 Erstellen von konditionierten Medien | 37 |
| 2.3.4 A549 Stimulation mit konditioniertem Medium | 38 |
| 2.3.5 Beendigung der Versuche | 38 |

| | |
|--|-----------|
| 2.3.6 Genexpressionsanalyse | 38 |
| 2.3.7 Bestimmung der Proteinsekretion mittels Sandwich-ELISA | 44 |
| 2.3.8 Bestimmung der Zellvitalität mittels LDH | 45 |
| 2.3.9 Bestimmung der mitochondrialen Aktivität /Vitalität mittels MTT-Assay | 47 |
| 2.4 Statistik..... | 48 |
| 3. Ergebnisse..... | 50 |
| 3.1 Endotoxin-Toleranz in monozytären THP-1 Zellen | 50 |
| 3.1.1 Auswirkungen der Endotoxin-Toleranz auf die Zytokin-Expression monozytärer THP-1 Zellen..... | 50 |
| 3.1.2 Auswirkungen der Endotoxin-Toleranz auf den Metabolismus monozytärer THP-1 Zellen | 57 |
| 3.2 Auswirkungen der Langzeit-Inkubation auf die Endotoxin-Toleranz in monozytären THP-1 Zellen..... | 59 |
| 3.3 Inhibitoren der HDACs und DMTs bewirken keine dauerhafte signifikante Veränderung der Endotoxin-Toleranz in monozytären THP-1 Zellen | 63 |
| 3.4 Endotoxin-Toleranz in epithelialen A549-Zellen..... | 68 |
| 3.4.1 Sensibilität der A549 Zellen gegenüber LPS..... | 68 |
| 3.4.2 Sensibilität der A549 Zellen gegenüber rekombinantem IL-1 β | 69 |
| 3.4.3 Übertragbarkeit der veränderten Immunantwort von THP-1 Zellen auf A549 Zellen mit konditionierten Medien | 71 |
| 4. Diskussion | 74 |
| 4.1 Endotoxin-Toleranz lässt sich im Zellmodell mit THP-1 Makrophagen simulieren und anhand proinflammatorischer Zytokine auf Gen- und Proteinebene nachweisen | 74 |
| 4.2 Endotoxin-Toleranz lässt sich über mehrere Zellgenerationen nachweisen..... | 76 |
| 4.3 Die Veränderung der Endotoxin-Toleranz über mehrere Zellgenerationen geht nicht mit einer anhaltenden Veränderung der Vitalität einher. | 78 |
| 4.4 Die Immunantwort der monozytären Zellen löst eine adäquate Proinflammation in Gewebezellen (A549) aus..... | 79 |
| 4.5 Die gewählten Inhibitoren verändern nicht die (epigenetische) Toleranzinduktion in der Langzeit-Beobachtung über drei Passagen..... | 80 |
| 4.6 Limitationen der Arbeit..... | 81 |
| 5. Zusammenfassung..... | 83 |
| 6. Abbildungsverzeichnis | 85 |

| | |
|--------------------------------------|-----------|
| 7. Tabellenverzeichnis | 86 |
| 8. Literaturverzeichnis | 87 |
| 9. Danksagungen | 92 |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|---------|--|
| A549 | Name einer humanen alveolaren Epithelzelllinie |
| AAMs | Alternatively Activated Macrophages |
| ANOVA | Varianzanalyse (ANalysis Of VAriance) |
| ATP | Adenosin-Triphosphat |
| BMDM | Bone Marrow Derived Macrophage |
| CAMs | Classically Activated Macrophages |
| CARS | Compensatory Anti-Inflammatory Response Syndrome |
| CCL | CC-Ligand |
| CD (14) | Cluster of Differentiation (14) |
| cDNA | complementary DNA |
| COX | Cyclooxygenase |
| CXCL | CXC-Ligand |
| DEPC | Diethylpyrocarbonat |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DNA | Deoxyribonucleic acid / DNS |
| DNMT | DNA-Methyltransferase |
| ELISA | Enzyme-linked Immunosorbent Assay |
| Et al. | et alia (lateinisch und andere) |
| FBS | Fetal Bovine Serum |

| | |
|-------|--|
| HAT | Histon-Acetyltransferase |
| HDAC | Histon-Deacetylase |
| HDM | Histon-Demethylase |
| HMT | Histon-Methyltransferase |
| IFN | Interferon |
| IL | Interleukin |
| INT | Iodnitrotetrazoliumchlorid |
| IRAK | Interleukin-1-Receptor assoziierte Kinase |
| LDH | Laktatdehydrogenase |
| LPS | Lipopolysaccharid |
| MAPK | Mitogen-Activated Protein Kinase |
| MTT | 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid |
| mRNA | messenger Ribonucleic Acid |
| n | Anzahl Versuchsdurchläufe |
| NAD | Nicotinamidadenindinukleotid |
| NFκB | Nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells |
| PAMPs | Pathogen-Activated-Molecular-Patterns |
| PBMC | Peripheral Blood Mononuclear Cell |
| PBS | Phosphate Buffered Saline |
| PCR | Polymerase Chain Reaction, Polymerase-Kettenreaktion |
| PRR | Pattern-Recognition-Rezeptor |

| | |
|-------|--|
| RNA | Riboneic Acid /RNS |
| SIRS | Systemic Inflammatory Response Syndrome |
| SOFA | Sequential Organ Failure Assessment |
| TGF | Transforming Growth Factor |
| THP-1 | Name einer humanen monozytären Zelllinie |
| TLR | Toll-Like Rezeptor |
| TNF | Tumornekrosefaktor |
| TSA | Trichostatin A |

1. Einleitung

1.1 Grundlagen der Immunologie

Das Immunsystem des Menschen schützt vor vier Arten von Pathogenen: Viren, Bakterien, Parasiten und Pilzen (Charles A Janeway, JR et al., 2001). Es kann in zelluläre und humorale Bestandteile, wie auch in das angeborene und das erworbene Immunsystem unterteilt werden. Zu den humoralen Bestandteilen des Immunsystems zählen Serumproteine wie Komplement und C-reaktives-Protein, Peptide (Defensine, Kathelizidine usw.), Zytokine, Enzyme und Antikörper. Die Zellen des Immunsystems entstammen den Vorläuferzellen im Knochenmark und können in eine myeloische und eine lymphatische Zellreihe, nach ihren Vorläuferzellen, eingeteilt werden.

Aus den myeloischen Vorläuferzellen gehen Granulozyten, monozytäre Zellen und Mastzellen hervor. Die lymphatischen Vorläuferzellen können sich zu Lymphozyten vom T-Zell oder B-Zell Typ, oder zu NK-Zellen differenzieren und sind während ihrer endgültigen Ausreifung in den Lymphknoten angesiedelt (Janeway, 2001).

Während die Lymphozyten zur erworbenen, adaptiven Immunantwort zählen, sind die anderen genannten Zelltypen Teil der angeborenen Immunantwort und können in ihrer Funktion Phagozyten und Mediator-sezernierende Zellen sein (An overview of the innate immune system - UpToDate, 20.08.2018).

Dringt ein Pathogen in den Wirt ein, kommt es in Kontakt mit Makrophagen, gewebsgebundenen Phagozyten. Diese tragen auf ihrer Oberfläche Rezeptoren, die als PRRs (Pattern Recognition Receptors) bezeichnet werden und auf Antigenmuster, sogenannte PAMPs (Pathogen-Associated Molecular Patterns) auf der Oberfläche vieler Pathogene, reagieren (An overview of the innate immune system - UpToDate, 20.08.2018). Auf diese PRRs, speziell den für die Erkennung von bakteriellem Endotoxin (LPS, Lipopolysaccharid) zuständigen Toll-Like-Rezeptor 4, wird zu einem späteren Zeitpunkt detaillierter eingegangen.

Die Immunzelle wird durch die Bindung an das Antigen aktiviert und sezerniert Zytokine und Chemokine, die eine lokale Entzündungsreaktion auslösen, weitere Zellen rekrutieren und das Komplement-System aktivieren.

Wenn diese „early lines of defense“ durchbrochen werden, folgt nach ca. 96 Stunden eine Antwort des adaptiven Immunsystems, mit lymphozytären, antigenspezifischen Effektorzellen und Memoryzellen, die eine erneute Infektion mit dem selben Pathogen verhindern kann (Charles A Janeway, JR et al., 2001).

Die folgende Tabelle gibt einen kurzen Überblick über pro- und anti-inflammatorische Zytokine und deren Effekte.

Tab. 1: Übersicht über die pro- und anti-inflammatorischen Zytokine, (nach (Audet und Anisman, 2013) .

| | Zytokin | Zellen | Effekt |
|----------------------------|---------------|---|---|
| PROINFLAMMATORISCH | | | |
| Interleukine | IL-1 β | Makrophagen, Monozyten, dendritische Zellen | Stimuliert Immunzellen und pro-inflammatorische Zytokine, reguliert Growth Faktor Aktivität |
| | IL-2 | Th1 Zellen | Wachstum und Differenzierung von T Zellen |
| | IL-6 | Makrophagen, Th2 Zellen | Synthese von Akut-Phase-Proteinen, Wachstum und Differenzierung von T und B Zellen, Sekretion von Antikörpern. |
| | IL-18 | Makrophagen, dendritische Zellen | Stimuliert Reifung von T und NK Zellen, stimuliert Produktion von IFN- γ , unterdrückt IL-4 |
| Interferone | IFN- α | B, T, und NK Zellen | Aktiviert Makrophagen und NK Zellen |
| | IFN- γ | Th1 und NK Zellen | Aktiviert Makrophagen und NK Zellen |
| Tumornekrosefaktor | TNF- α | Makrophagen, Th1 Zellen, NK Zellen, Mastozyten | Stimuliert Immunzellen, verursacht systemische Inflammation und Gewebsdestruktion |
| Andere Faktoren | MIF | Makrophagen | Blockiert anti-inflammatorische Fibroblasteneffekte von Glukokortikoiden |
| ANTIINFLAMMATORISCH | | | |
| Interleukine | IL-4 | T _H 2 Zellen, Mastzellen, Basophile | Stimuliert die Differenzierung von T _H 2 Zellen und B-Zellen, Vermindert die Produktion von T _H 1 Zellen |
| | IL-10 | Monozyten, T _H 1 und T _H 2 Zellen | Vermindert die Freisetzung proinflammatorischer Zytokine aus Makrophagen und T _H 1 Zellen, Stimuliert B-Zellen und T _H 2 Zellen |

Obwohl die beschriebenen Vorgänge zur Bekämpfung und Kontrolle lokaler Infektionen unerlässlich sind, führt die exzessive Ausschüttung von Zytokinen und Chemokinen, auch als Zytokin-Sturm bezeichnet, zur systemischen Entzündungsreaktion bis hin zum septischen Organversagen. So wird z. B. durch das pro-inflammatorische Zytokin TNF- α (Tumornekrosefaktor alpha) die Gefäßpermeabilität stark erhöht (Charles A Janeway, JR et al., 2001). Dies führt bei lokal begrenzter Entzündungsreaktion zu einem verstärkten und erleichterten Einwandern weiterer Immunzellen in das Entzündungsgebiet und damit zu einer verbesserten Kontrolle eingedrungener Pathogene. Bei systemischer Inflammation führt diese erhöhte Gefäßpermeabilität jedoch zu einem relativen Volumenmangel im Gefäßsystem des Patienten. Neben direkten Effekten der Zytokine kommt es bei überschießender Immunreaktion und einhergehendem Zytokin-Sturm zudem zu Dysregulationen in der Blutgerinnung, in der Apoptose und im Hormonhaushalt (Vasopressin, Cortison, Growth Hormone), was schlussendlich zum septischen Organversagen führt (Russell et al., 2011).

1.2 Sepsis

Laut einer Erhebung aus dem Jahr 2016 erkrankten weltweit jährlich über 30 Millionen Menschen an einer Sepsis, etwa sechs Millionen Menschen versterben daran jedes Jahr. Die Krankenhaus-Mortalität für Sepsis lag hierbei bei 17 % (Fleischmann et al., 2016).

Während Sepsis bislang definiert wurde als das Vorliegen eines Systemic Inflammatory Response Syndroms (SIRS) mit positivem Erregernachweis, hat sich diese Definition seit 2016 stark geändert. Der Begriff SIRS beschrieb eine Symptomkonstellation aus Hyperthermie, Tachykardie, Tachypnoe und Leukozytose, aus denen nach einem Score das Vorliegen einer SIRS abgeschätzt werden konnte (Russell et al., 2011). Eine solche systemische Immunreaktion kann neben Infektionen auch hervorgerufen werden durch Trauma, Verbrennungen, Operationen und autoimmune Vorgänge wie z. B. Pankreatitis. Die Definition wurde im Verlauf erweitert um die Begriffe der schweren Sepsis (Sepsis mit Organversagen) und des septischen Schocks (Sepsis mit kardiovaskulärer Dysfunktion). Die Abbildung 1 verdeutlicht das Prinzip der vormals angenommenen Definition der unterschiedlichen erklärten Begriffe.

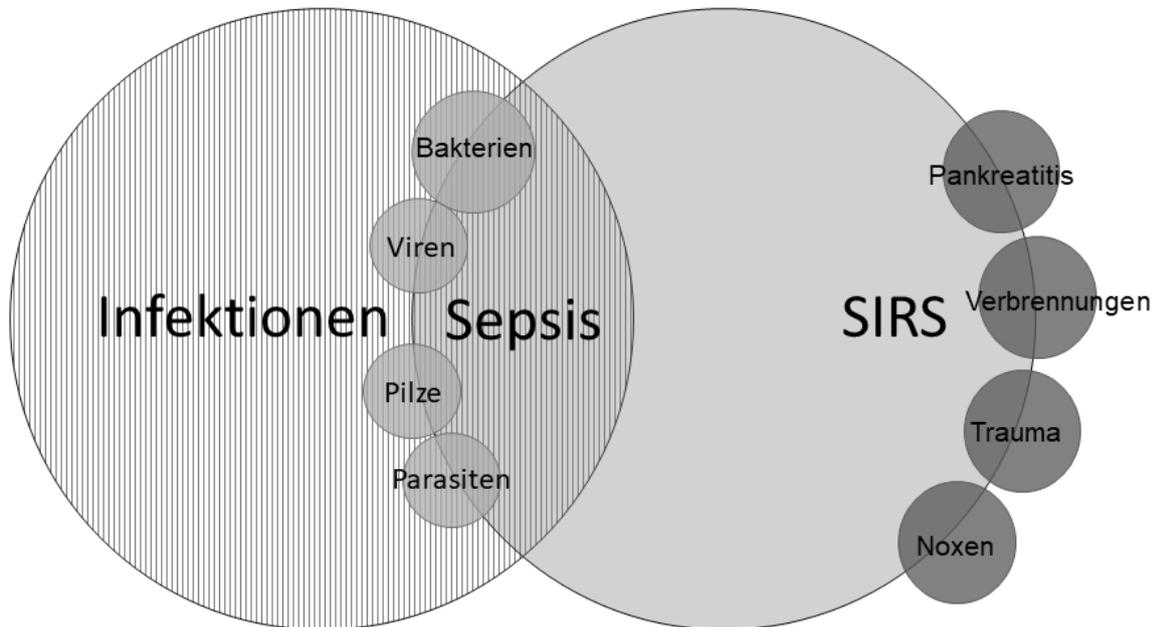


Abb. 1: Das Verhältnis von SIRS, Sepsis und Infektion.

Nach Sepsis-3 Definition (Singer et al., 2016) ist Sepsis als Krankheitsbild nun folgendermaßen definiert: „Sepsis ist ein lebensbedrohliches Organversagen, das durch eine dysregulierte Immunantwort des Wirtes auf eine Infektion entsteht“ (Marik und Taeb, 2017). Zur klinischen Feststellung des Krankheitsbildes wurde der SOFA-Score (SOFA= Sequential Organ Failure Assessment) etabliert. Zur Vereinfachung der Anwendung im klinischen Alltag wurde als vereinfachte Form der qSOFA Score (=quick SOFA) vorgeschlagen, bei dem binär die klinischen Aspekte Atemfrequenz (>22), Veränderung des mentalen Status (ja/nein) und der systolische Blutdruck (≤ 100 mmHg) ermittelt werden (Marik und Taeb, 2017).

Die folgende Tabelle veranschaulicht den neuen SOFA-Score

Tab. 2: SOFA Score (aus (Robert Koch-Institut) Epidemiologisches Bulletin)

| SOFA-Score | 1 | 2 | 3 | 4 |
|---|------------------|-------------------------------|--|--|
| Respiration PaO ₂ /FIO ₂ mmHg (kPa) | < 400 (53,3) | < 300 (40) | < 200 (26,7) mit respiratorischer Unterstützung | < 100 (13,3) mit respiratorischer Unterstützung |
| Koagulation: Thrombozyten (x10 ⁹ /l) | < 150 | < 100 | < 50 | < 20 |
| Leber Bilirubin (µmol/l) | 20–32 | 33–101 | 102–204 | 204 |
| Kardiovaskular | MAP < 70 mmHg | Dopamin < 5 oder Dobutamin | Dopamin 5,1–15,0 oder (Nor)Adrenalin ≤ 0,1 | Dopamin >15 oder (Nor)Adrenalin > 0,1 |
| Zentrales Nervensystem Glasgow Coma Score | 13–14 | 10–12 | 6–9 | < 6 |
| Niere Kreatinin (µmol/l) oder Urin-Output | 110–170 | 171–299 | 300–440 < 500 ml/Tag | 440 < 200 ml/Tag |

1.3 Anti-Inflammation und CARS

Neben der beschriebenen pro-inflammatorischen Antwort kommt es zudem zur zunehmenden Aktivierung anti-inflammatorischer Signalwege, auf deren genaue Signaltransduktion später noch eingegangen werden soll (s. 1.4. Molekulare Signaltransduktionswege der Inflammation und Anti-Inflammation). Hierbei werden anti-inflammatorische Zytokine wie IL-10 ausgeschüttet. Diese Faktoren sind laut Russell (Russell et al., 2011), verantwortlich für die Eindämmung der Entzündungsreaktion und die Toleranzbildung gegenüber wiederholt auftretenden Stimuli.

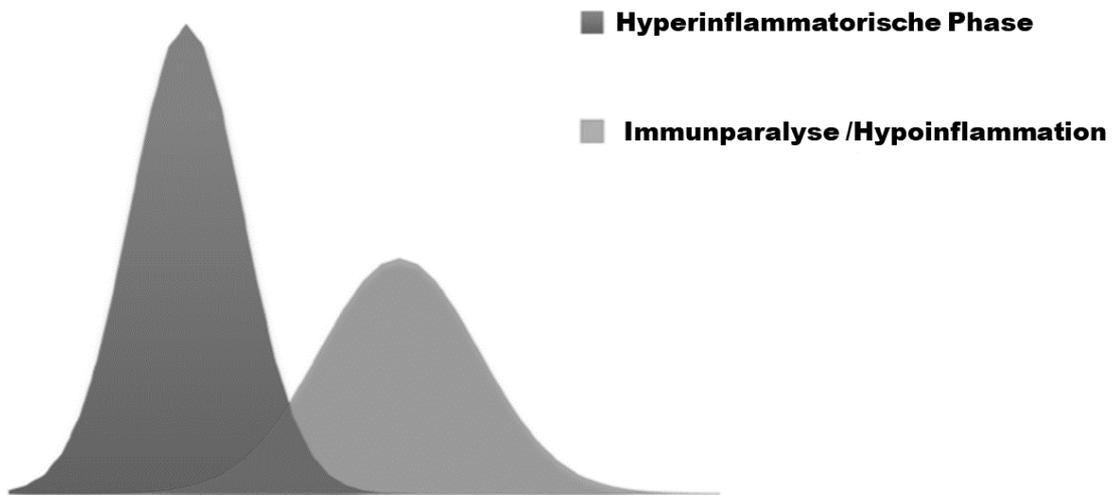


Abb. 2: Zeitverlauf der Immunantwort während septischer Infektionen (modifiziert nach (Hu et al., 2012)).

Abbildung 2, modifiziert nach Hu et al., 2012, veranschaulicht stilisiert den Verlauf der Immunantwort. Zu Beginn überwiegt klar die Pro-Inflammation, die überschießend auf den Stimulus reagiert. Im Verlauf nimmt die Anti-Inflammation immer stärker zu und dämmt die überschießende Immunantwort ein. Hierdurch kommt es im Verlauf der Sepsis nach 3-5 Tagen zu einem Überwiegen der Anti-Inflammation mit nachfolgender Immunparalyse, wodurch der Patient anfällig wird für opportunistische Infektionen. Diese kompensatorische Immunantwort wurde erstmalig durch Roger C. Bone als CARS (Compensatory Anti-Inflammatory Response Syndrome) bezeichnet (Bone, 1996).

Klinisch ist dieses Syndrom geprägt durch Anergie, Lymphopenie, Hypothermie und das Auftreten nosokomialer Infekte (Russell et al., 2011). Der immunparalytische Effekt kann Wochen, Monate und sogar Jahre anhalten. Hierbei kann es zu einer Langzeit-Immunsuppression kommen, was zu einer signifikanten Reduktion der Fünf- und Acht-Jahres-Überlebensraten der Patienten nach schwerer Sepsis, verglichen mit der nicht erkrankten, altersgleichen Bevölkerung führt (Carson et al., 2011). Es handelt sich

demnach also um einen Effekt, der noch lange nach Abklingen der Sepsis induzierten proinflammatorischen Immunantwort anhält.

Hierbei lassen sich zwei Ursachen vermuten:

1. Die andauernde Leukopenie führt zur langfristigen Immunsuppression
2. Verminderte Stimulierbarkeit der Immunzellen für pathogene Stimuli.

Tatsächlich kommt es im Rahmen der Sepsis, wie in 1.1 beschrieben, zur vermehrten Apoptose von Leukozyten, besonders Lymphozyten, sowie intestinalen Epithelzellen (Ward et al., 2008). Zusätzlich zur numerischen Reduzierung der Immunzellen, kommt es hierbei zur Freisetzung von Mediatoren, die immunsuppressive Effekte auf die Phagozyten haben, die das apoptotische Zellmaterial aufnehmen (Adib-Conquy und Cavaillon, 2009). Doch auch der Effekt der verminderten Stimulierbarkeit trifft zu. Nachweislich führt die wiederholte Gabe von bakteriellem Lipopolysaccharid (Endotoxin) in vitro zu einer verminderten Freisetzung proinflammatorischer Zytokine bei erneuter Stimulation (Biswas und Lopez-Collazo, 2009). Hierbei lassen sich mit LPS-Dosen (LPS aus E. Coli) zwischen 1 ng LPS/ml bis 10.000 ng LPS/ml signifikante Verringerungen der Immunantwort nach Zuführen eines zweiten Stimulus erreichen (Martin et al., 2001). Dieser Effekt wird als Endotoxin-Toleranz bezeichnet und lässt sich sowohl an murinen als auch an humanen Zellen demonstrieren und sogar in vivo nachweisen (Biswas und Lopez-Collazo, 2009).

Während Zellen, die mit geringen LPS-Dosen vorstimuliert wurden bei erneuter Stimulation eine verringerte Proinflammation und eine verstärkte Antiinflammation aufwiesen, zeigten Zellen, die mit ultra-niedrigen LPS-Dosen vorbehandelt wurden bei Re-Stimulation eine verstärkte proinflammatorische Immunantwort (Morris und Li, 2012). Diese Konditionierung wird als Shwartzman-Reaktion bezeichnet und ist nicht Gegenstand dieser Arbeit.

1.4 Molekulare Signaltransduktionswege der Inflammation und Anti-Inflammation

Wie in 1.1. bereits erwähnt, spielen Pattern-Recognition-Rezeptoren eine große Rolle in der Identifizierung von Pathogenen anhand von PAMPs (Pathogen-Activated-Molecular-Patterns). Zu den Pattern-Recognition-Rezeptoren zählen, neben Toll-Like-Rezeptoren (TLR), auch Rig-1-Like-Rezeptoren (RLR), NOD-Like-Rezeptoren (NLR), AIM2-Like-

Rezeptoren und C-Type-Lectin-Rezeptoren (CLR), sowie intrazelluläre DNA-Rezeptoren (Kawasaki und Kawai, 2014). Im humanen Immunsystem gibt es zehn unterschiedliche TLR-Typen, die unterschiedlichen Toll-Like-Rezeptoren und ihre Aufgaben zeigt Tabelle 3.

Tab. 3: Toll-Like-Rezeptoren und ihre Liganden, modifiziert nach (An overview of the innate immune system - UpToDate, 20.08.2018).

| PRRs | Lokalisation | Ligand | Herkunft des Liganden |
|--------|--------------|--------------------|-----------------------------|
| TLR1 | Zellmembran | Triacyllipoprotein | Bakterien |
| TLR2 | Zellmembran | Lipoprotein | Bakterien, Viren, Parasiten |
| TLR3 | Endolysosom | dsRNA | Viren |
| TLR4 | Zellmembran | LPS | Bakterien, Viren |
| TLR5 | Zellmembran | Flagellin | Bakterien |
| TLR6 | Zellmembran | Diacyllipoprotein | Bakterien, Viren |
| TLR7/8 | Endolysosom | ssRNA | Viren, Bakterien |
| TLR9 | Endolysosom | CpG-DNA | Viren, Bakterien, Protozoen |
| TLR10 | Endolysosom | Unbekannt | Unbekannt |

Von besonderem Interesse ist der TLR4 Rezeptor, der das bakterielle Antigen LPS erkennt. Die Bindung des LPS-Moleküls an den Rezeptor erfolgt mithilfe der Cofaktoren MD2 und CD14. Nach Aktivierung des Rezeptors, werden verschiedene Signalkaskaden in Gang gesetzt, die aus unterschiedlichen Adaptermolekülen, Kinasen und Transkriptionsfaktoren bestehen (Kawasaki und Kawai, 2014). Besonders interessant für das Verständnis der molekularen Signaltransduktion bei Sepsis ist der Transkriptionsfaktor NFκB. NFκB ist eines der wichtigsten Elemente der angeborenen Immunantwort, da es die Transkription von mehr als 150 Genen stimuliert, die für Zytokine, Adhäsionsmoleküle, Enzyme und Faktoren der Apoptose kodieren (Russell et al., 2011). Die NFκB-Familie besteht aus fünf Untereinheiten, die durch Inhibitoren (IKK-Komplex) gebunden im Zytoplasma vorliegen. Im Zuge der Aktivierung des LPS/TLR4

Signalwegs kommt es zur Modifikation dieser Inhibitoren, Freisetzung und Dimerisierung der NFκB-Untereinheiten. Zu den wichtigsten durch NFκB gesteigert transkribierten Genen gehören COX-2, IL-1β, TNF-α und IL-6.

Weitere Transkriptionsfaktoren, die durch den LPS/TLR4 Signalweg aktiviert werden sind AP-1 (Activator-Protein-1) und IRF3 (Interferon-regulierender-Faktor-3), die ebenfalls die Transkription proinflammatorischer Zytokine und Mediatoren fördern (Russell et al., 2011).

1.5 Prinzipien der Toleranzinduktion und der epigenetischen Regulierung der Inflammation.

Monozytäre Zellen, diese umfassen Monozyten und Makrophagen, entstehen aus myeloischen Vorläuferzellen aus der Gruppe der Granulozyten-Makrophagen-Progenitorzellen (GMP) und gehören zum angeborenen Immunsystem. Monozyten zirkulieren im Blut und können auf bestimmte Reize hin ins Gewebe einwandern, um dort als Makrophagen an der Immunabwehr teilzunehmen (An overview of the innate immune system - UpToDate, 20.08.2018; Charles A Janeway, JR et al., 2001) Makrophagen sind gewebständige monozytäre Zellen mit Phagozytose-Aktivität, die aus eingewanderten Monozyten oder aus lokalen Stammzellen hervorgehen, die während der embryonalen Periode des Menschen dorthin eingewandert sind. Monozytäre Zellen lassen sich zudem nach ihren Oberflächenmarkern einteilen in klassische (CD14+), intermediate (CD14+CD16+), and nicht-klassische (CD16+) Zellen. Diese stellen heterogene Gruppen mit unterschiedlichen pro- und antiinflammatorischen Eigenschaften dar (Narasimhan et al., 2019). Erstere sind hierbei aktivierbar durch inflammatorische Stimuli, phagozytieren Pathogene und setzen proinflammatorische Zytokine zur Rekrutierung weiterer Immunzellen frei (Hoeksema und Winther 2016). Nicht-klassische Monozyten werden aufgrund ihrer Motilität entlang von vaskulären Strukturen auch als „Patrouillierende Monozyten“ bezeichnet. Sie detektieren u.a. beschädigte Endothelzellen und sind für die vaskuläre Homöostase wichtig. (Narasimhan et al., 2019). Im Mausmodell sind diese Subtypen als Ly6^{hi} und Ly6^{lo} Monozyten beschrieben, dabei entspricht im Vergleich der murinen und humanen Modelle a.e. Ly6^{hi} den klassischen und Ly6^{lo} den nicht-klassischen Monozyten (Narasimhan et al., 2019). Makrophagen lassen sich außerdem nach der Art ihres Aktivierungsmusters einteilen in CAMs und AAMs. CAMs, classically activated

macrophages, produzieren proinflammatorische Zytokine und spielen eine Rolle bei chronisch entzündlichen Erkrankungen. AAMs, alternatively activated macrophages, produzieren IL-10 und TGF β , die zum antiinflammatorischen Spektrum gehören (Fan und Cook, 2004). Andere Quellen verwenden hier synonym den Terminus M1 (proinflammatorische) und M2 (antiinflammatorische) Makrophagen (Thangavel et al., 2015). Ob CAMs aus klassischen Monozyten und AAMs entsprechend aus nicht-klassischen Monozyten hervorgehen, oder die Polarisation eher fließend ist, ist Gegenstand wissenschaftlicher Diskussionen.

1.5.1 Modifikationen der molekularen Signaltransduktion

Die Toleranzinduktion führt in Immunzellen nicht zu einer Herunterregulation des Metabolismus und des Energiehaushaltes, sondern zu dessen Modifikation. Es werden, wie in 1.3 beschrieben, vermehrt antiinflammatorische Zytokine und Chemokine exprimiert und sezerniert. Herunterreguliert werden die klassischen Zytokine der Proinflammation: TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-12, zudem die Chemokine CCL3, CCL4 und CXCL10 (Biswas und Lopez-Collazo, 2009).

Der TLR4-NF κ B-Signalweg (s. 1.4.) wird während der Toleranzinduktion auf unterschiedliche Arten modifiziert, was zu der beschriebenen verminderten Expression proinflammatorischer Zytokine führt (Morris und Li, 2012). Der Komplex aus TLR4 und MyD88, der die Signalkaskade intrazellulär in Gang setzt, wird herunterreguliert (Biswas und Lopez-Collazo, 2009). Zusätzlich wird die Signaltransduktion durch das MyD88-Protein gehemmt. Zudem wird die Kinase IRAK vermindert exprimiert und durch ein mutiertes Protein ohne Kinase-Fähigkeit, IRAK-M, ersetzt. Zudem zeit sich ein Shift im Verhältnis der NF κ B Komponenten, sodass das p50/p50 Homodimer verstärkt auftritt. Dieses hat einen inhibitorischen Effekt auf die Expression der kodierten inflammatorischen Transkripte, da es keine Transkription auslösen kann und mit den anderen Transkriptionsfaktoren um die DNA-Sequenzen konkurriert. Zudem unterstützt das p50/p50 Homodimer die Expression der Faktoren TGF- β , IL-10 und Cox-2 (Biswas und Lopez-Collazo, 2009).

Weitere Faktoren, deren Hochregulation die Toleranz positiv beeinflusst, sind SOCS-1, I κ B und IL-10. SOCS (suppressors of cytokine signaling) werden durch die verstärkt

auftretenden Tyrosinkinase vom TAM-Typ (Tyro3, Axl, und Mer Rezeptortyrosinkinase) hochreguliert. SOCS-1 interagiert mit IRAK und unterdrückt die Induktion der NFκB Reporter gene.

Zudem werden die Transkriptionsfaktoren IRF-3 und AP-1 durch die Hemmung der MAPK-Kinase und der TRAF-6 vermindert aktiv.

Erwähnenswert ist außerdem der Transkriptionsfaktor PPARγ, dessen vermehrte Aktivität die Expression von TNF-α, IL-6, IL-1β und NO auf Transkriptionsebene unterdrückt (Fan und Cook, 2004). Viele unterschiedliche Faktoren sind an der Entstehung der systemischen Endotoxin-Toleranz beteiligt und zum aktuellen Zeitpunkt noch Gegenstand der Forschung. Abbildung 3 soll einen kurzen Überblick über die relevantesten Mechanismen und Faktoren geben.

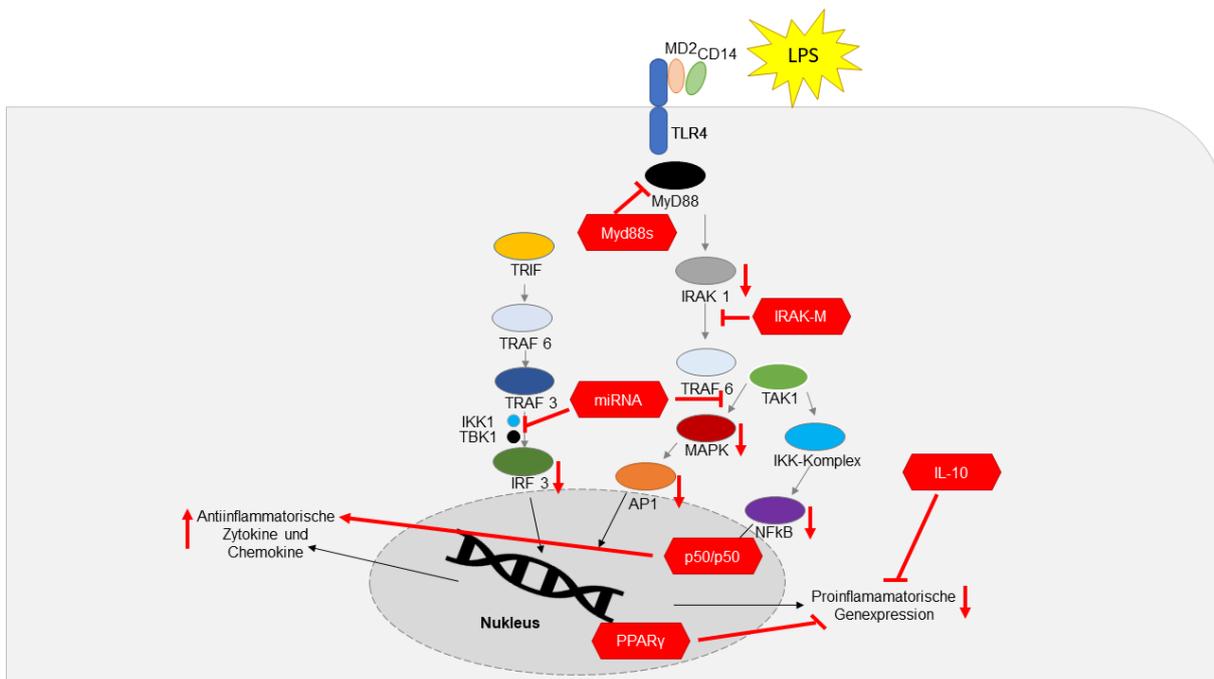


Abb. 3: Veränderung der Signaltransduktion bei Toleranzinduktion. MyD88s = short MyD88 ohne IRAK-1 Aktivierung, IRAK-M = Mutierte IRAK ohne Kinase-Funktion, p50/p50 = NFκB-p50-Homodimer PPARγ = Peroxisome Proliferator-Activated Rezeptor Gamma, miRNA = microRNA

1.5.2 Epigenetische Modifikationen

Epigenetische Modifikationen beeinflussen die Art, wie Polymerasen die DNA ablesen und damit das entstehende Transkript, ohne die Sequenz der DNA zu verändern. Sie sind zu großen Teilen vererbbar, unterliegen Umwelteinflüssen, sind umkehrbar und dadurch pharmazeutisch beeinflussbar (Hoeksema und Winther, 2016).

Die Mechanismen, die zu einer veränderten Immunantwort führen, müssen stabil und vererblich zwischen unterschiedlichen Zell-Generationen sein, um den beschriebenen Langzeit-Effekt der kompensatorischen Immunsuppression zu gewährleisten. Es scheinen jedoch nicht alle Gene der Proinflammation während der Toleranzinduktion unterdrückt zu werden. Laut Hoeksema (Hoeksema und Winther, 2016) gibt es toleranzinduzierbare und nicht toleranzinduzierbare Gene. Besonders sind daher Mechanismen in den Fokus von Forschenden und Klinikern gerückt, die Einfluss auf das Gen-Expressionsmuster haben. Hierzu zählen neben DNA-Methylierungen vor allem die Histonmodifikationen. Histone sind Proteine, die für die Organisation der dreidimensionalen DNA-Struktur in Chromatin-Fäden verantwortlich sind. Hierzu wird die DNA um die Histon-Moleküle gewickelt, wobei verschiedene Loci durch die entstandene dreidimensionale Struktur transkriptionell aktiviert oder inaktiviert werden, da ihre Erreichbarkeit für Polymerasen oder Transkriptionsfaktoren beeinflusst wird. Man spricht von Euchromatin (transkriptionell aktiv) und Heterochromatin (transkriptionell inaktiv) (Carson et al., 2011).

Histone können an ihren Aminosäureresten modifiziert werden, was sich je nach Art der Modifikation aktivierend oder inaktivierend auf das Transkript der zugehörigen DNA-Region auswirken kann. Zu den Arten der Modifikation gehören Acetylierungen, Methylierungen, Ubiquitinylierungen und Phosphorylierungen. Während Acetylierungen der Histon-Aminosäurereste aktivierend auf das Gen-Transkript wirken, können Methylierungen beide Effekte hervorrufen (Carson et al., 2011). Acetylierungen werden durch Histon-Acetyltransferasen (HATs), Deacetylierungen durch Histon-Deacetylasen

(HDACs) kontrolliert, Methylierungen an Histonen durch Histon-Methyltransferasen (HMTs) und Demethylierungen durch Histon-Demethylasen (HDMs).

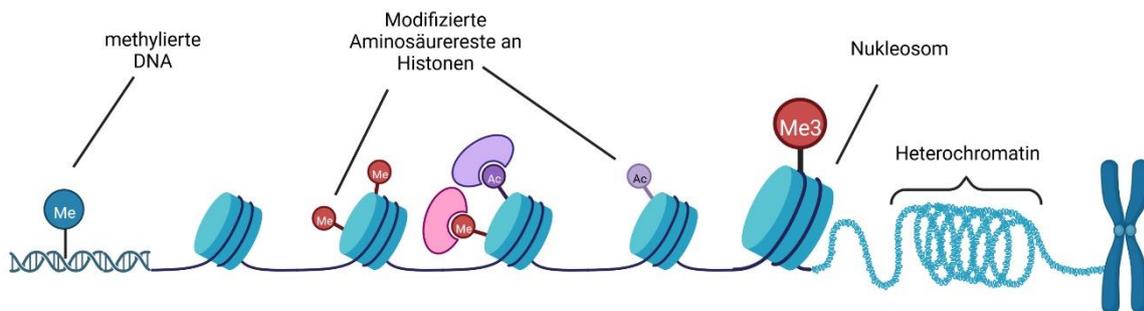


Abb. 4: Kondensation von DNA in Chromatin durch Histone. Erzeugt mit BioRender.com

Die Einheit aus DNA und Histon wird als Nucleosom bezeichnet, stark kondensiertes Chromatin als Heterochromatin. Epigenetische Modifikationen können an Histonen oder direkt an den DNA-Strängen erfolgen und beeinflussen die Transkription der entsprechenden Gen-Loci.

Während der systemischen antiinflammatorischen Immunantwort kommt es zu einer Verlagerung der T-Helferzell-Antwort von T_H1 zu T_H2 . Die Typ 2 Helferzellen sezernieren vermehrt IL-4, welches den entzündungsfördernden T_H1 Zytokinen wie IFN γ entgegenwirkt. IL-4 bewirkt über den NF κ B-Signalweg die Aktivierung der Histondemethylase KDM6B, die Anteil hat an der Kontrolle von 70 % der LPS induzierbaren Gene (Carson et al., 2011). KDM6B scheint über verschiedene Signalwege Anteil sowohl an der proinflammatorischen als auch an der antiinflammatorischen Immunantwort auf LPS zu haben. Eine besondere Rolle scheinen die Modifikationen an Histon 3 zu spielen.

Transkriptionsfaktoren und -Modulatoren der epigenetischen Modifikation wie das v-rel avian reticuloendotheliosis viral Onkogen Homolog B (RELB) und High-Mobility Group Box 1 (HMGB1) unterdrücken über Histonmodifikation an H3K9me2 (Methylierung des Lysinrests 9 an Histon 3) die Zytokine IL-1 β und TNF- α (Carson et al., 2011).

Die Histontrimethylierung H3K4me3 besteht in naiven Zellen und erhält die Transkription des Zytokins IL-6. Nach Toleranzinduktion geht diese Trimethylierung verloren, bzw. wird

durch HDMs abgebaut, was zu einer Unterdrückung der Transkription von IL-6 führt (Hoeksema und Winther, 2016).

DNA-Methylierung erfolgt durch DNA-Methyltransferasen (DNMTs) an benachbarten Cytosin-Guanin-Basen (CpG). Durch die Methylierung können Transkriptionsfaktoren hier nicht mehr binden, die Transkription der Sequenz wird „stumm“ geschaltet (Hoeksema und Winther, 2016).

Aus der Krebstherapie bekannt sind viele Zytostatika, die Einfluss haben auf die Epigenetik von Zellen. Histondeacetylase-Inhibitoren haben Einfluss auf die dreidimensionale Struktur der DNA und damit das Ablese-Muster. DNA-Methyltransferase-Inhibitoren interkalieren zwischen den Basen und binden den Methylrest, der damit nicht mehr die Transkription beeinflussen kann (Ciarlo et al., 2013). In verschiedenen Studien wurden protektive Effekte einer niedrig dosierten Therapie mit HDAC-Inhibitoren durch Modulation der Proinflammation bei Sepsis nachgewiesen (Ciarlo et al., 2013).

Die Modifikation dieser epigenetischen Prozesse durch DNMTs und HDACs führt zu einer Verlagerung der Monozyten-Polarisierung zugunsten des M2-Makrophagen-Typs, sowie zu einer Zellprotektion mit geringerer Apoptose-Rate ((Thangavel et al., 2015). Als Ziele dieser Therapie und damit Ursache der veränderten Immunantwort wurden die STAT3-Promotorregion des Histon 3, der MAPK-Signal Signalweg via p38MAPK und HuR identifiziert. Unter kombinierter Therapie mit Trichostatin A (TSA) und 5-Aza 2-deoxycytidine (Aza/Decitabin) konnte dort im Mausmodell ein verlängertes Überleben während einer LPS-Induzierten Acute Lung Injury (ALI) festgestellt werden.

1.5.3 Metabolische Effekte

Die Toleranzentwicklung hat nicht nur Einfluss auf die Transkription der DNA einer Zelle, sondern wirkt sich auch maßgeblich auf ihren Metabolismus aus.

Hierzu gehören Zuckerstoffwechsel, Fettstoffwechsel und Proteinstoffwechsel.

Neben der Bildung und Umwandlung dieser Stoffe, ist vor allem deren Abbau von entscheidender Bedeutung für den Metabolismus einer Zelle und die Energiegewinnung eines Organismus. Fette werden in der Lipolyse abgebaut, wobei als Abbauprodukte Fettsäuren entstehen. Diese werden über die β -Oxidation zu Acetyl-CoA verstoffwechselt,

was über Citratzyklus und Atmungskette zur Gewinnung von ATP umgesetzt wird (Löffler, 2008). Proteine werden in der Proteolyse in ihre Aminosäuren gespalten. Diese können nun entweder in ketogene oder glukogene Produkte umgewandelt werden und somit zur Neusynthese von Proteinen, Fetten oder Zuckern genutzt, oder dem Citratzyklus zugeführt werden. Zucker werden in der Glykolyse im Zytosol unter Energiegewinnung abgebaut, wobei Pyruvat entsteht. Dieses wird unter aeroben Bedingungen zu Acetyl-CoA umgewandelt, welches dann durch Citratzyklus und Atmungskette zur Energiegewinnung in Form von ATP verwendet wird. Diese beiden Vorgänge spielen sich in den Mitochondrien ab (Horn und Moc, 2012). Unter anaeroben Bedingungen wird das Pyruvat enzymatisch durch die Laktat-Dehydrogenase (LDH) zu Laktat umgesetzt. Abbildung 5 veranschaulicht die Glykolyse und die nachgeschalteten Stoffwechselwege.

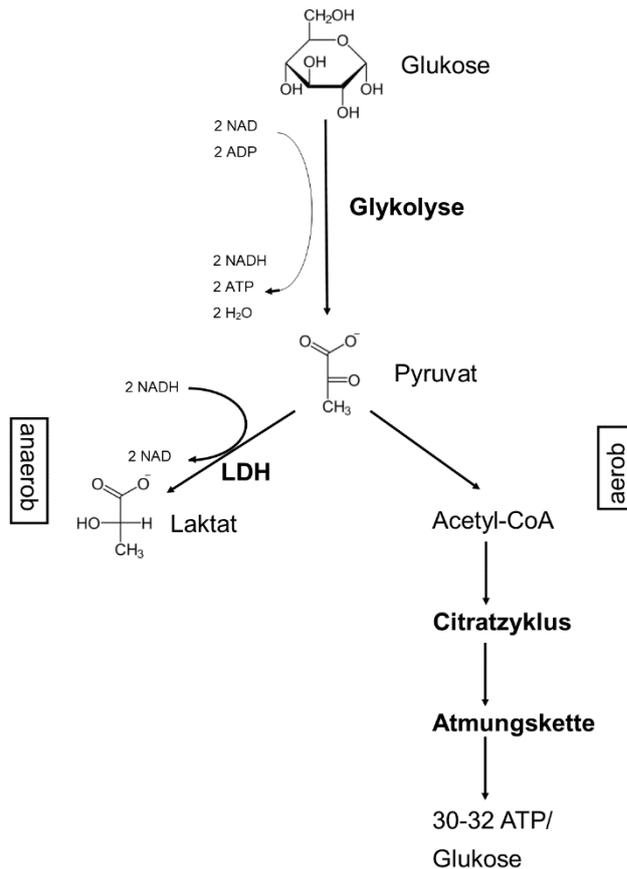


Abb. 5: Glykolyse und nachgeschaltete Stoffwechselwege unter aeroben und anaeroben Bedingungen.

Aus einem Molekül Glucose können nach aerober Verstoffwechslung, Citratzyklus und Atmungskette 32 ATP gewonnen werden. Unter anaeroben Bedingungen wird lediglich durch die Glykolyse Energie gewonnen, der Citratzyklus und die Atmungskette finden unter anaeroben Bedingungen nicht statt.

Während der proinflammatorischen Phase bei Sepsis kommt es zu einer Verlagerung der Energiegewinnung zugunsten des anaeroben Stoffwechselweges, also zur Glykolyse mit anschließender Umwandlung des Pyruvats zu Laktat unter Umgehung der Atmungskette. Diese bevorzugte, energieinsuffizientere Verstoffwechslung trotz ausreichendem Vorliegen von Sauerstoff wird als aerobe Glykolyse oder Warburg-Effekt bezeichnet und wurde erstmalig in Krebszellen beschrieben (Warburg, 1924).

Es wurden durch San-Millán et al. 2017 fünf Schritte der Laktatentstehung im Rahmen des Warburg-Effekts bei Krebszellen identifiziert:

1. Gesteigerte Aufnahme von Glucose in die Zelle, 2. Gesteigerte Expression und Aktivität glykolytischer Enzyme, 3. Verminderung der mitochondrialen Funktion 4. Vermehrte Laktatproduktion, -Anreicherung und -Ausschüttung, 5. Hochregulierung der Monocarboxylat-Transporter (MTC) MTC 1 und 4 (San-Millán und Brooks, 2017).

Ob diese Laktatgenese sich auch auf die oben beschriebene metabolische Dysfunktion bei Sepsis ausweiten lässt, ist jedoch unklar.

Bei der aeroben Glykolyse im septischen Metabolismus fallen Laktat und NAD an, es wird verstärkt Glukose verbraucht. Dabei liegen eine mitochondriale Dysfunktion und ein unausgeglichener Redox-Status vor, was mit einem schlechten Outcome bei Sepsis-Patienten korreliert (Cheng et al., 2016). Im Verlauf der Sepsis kommt es dann, analog zur zunehmenden Immunparalyse bzw. Toleranzbildung der Zellen, zu zunehmenden metabolischen Defekten. Die notwendige Energie zur Aufrechterhaltung eines suffizienten Zellstoffwechsels wird hierbei nicht alternativ über die β -Oxidation, also über den Abbau von Fettsäuren gewonnen, denn auch die Fettsäure-Transporter werden herunterreguliert. Stattdessen kommt es zu einer Herabregulation des Sauerstoffverbrauches. Dies führt zu einem Abfall des Laktats und Anhäufung des energiearmen Reduktionsäquivalentes NAD. Glykolyse, β -Oxidation und mitochondrialer Stoffwechsel werden heruntergefahren (Cheng et al., 2016). Es ist nicht klar, ob diese metabolische Paralyse Ursache, Begleiteffekt oder Folge der Immunparalyse ist, jedoch scheinen sich beide Effekte gegenseitig zu beeinflussen, die Zelle scheint vorübergehend in einen winterschlafartigen Zustand überzugehen.

1.6 Ziel der Arbeit und Fragestellungen

Ziel ist die Etablierung eines Zellmodells zur Charakterisierung der Endotoxin-Toleranz in monozytären Zellen über einen langen Zeitraum, sowie die Analyse der vermuteten epigenetischen Modifikation der Zytokinexpression und des Metabolismus. Hierzu werden Inkubationsversuche mit bakteriellem Lipopolysaccharid als Agens zur Stimulation einer proinflammatorischen Zellantwort und Etablierung einer Endotoxin-Toleranz durchgeführt,

auch unter Zugabe von Inhibitoren (TSA und DCA, vgl. 2.3.2) der epigenetischen Histon-Modifikation, und ausgewertet. Diese Inkubationsversuche erfolgen über einen verlängerten Zeitraum von bis zu sieben Tagen, um die Entwicklung der Endotoxin-Toleranz nach Ablauf mehrerer Teilungen, also über mehrere Zellgenerationen hinweg, zu beobachten. Das Hauptaugenmerk gilt den eventuellen Veränderungen der proinflammatorischen Immunantwort, die exemplarisch anhand der Zytokine IL-1 β und TNF- α auf Gen- und Proteinebene untersucht wird. Zudem wird die Übertragbarkeit der Endotoxin-Toleranz auf Gewebezellen anhand von konditionierten Medien untersucht.

Maßgeblich untersucht werden sollen Art und Dauer der Toleranz in kultivierbaren Monozyten hinsichtlich der folgenden Fragestellungen:

- 1. Lässt sich die Endotoxin-Toleranz in THP-1 Makrophagen simulieren und anhand der proinflammatorischen Zytokine IL-1 β und TNF- α auf Gen- und Proteinebene nachweisen?**
- 2. Ist die Endotoxin-Toleranz über mehrere Zellgenerationen persistierend?**
- 3. Ist die Weitergabe der Endotoxin-Toleranz über mehrere Zellgenerationen ggf. Ausdruck einer Zellselektion durch vermehrte Apoptose, oder Ausdruck einer epigenetischen Veränderung?**
- 4. Ist die Endotoxin-Toleranz von THP-1 Zellen auf typische Gewebszellen der klassischerweise betroffenen Organe (hier A549-Zellen) übertragbar?**
- 5. Verändern die gewählten Inhibitoren die Toleranzinduktion oder sind die epigenetischen Veränderungen hierunter sogar reversibel?**

2. Material und Methoden

2.1 Geräte, Material und Substanzen

2.1.1 Geräte und Material

2.1.1.1. Chemikalien

1. Chloroform (Applichem)
2. Decitabine (Cayman Chemical, Item Nr. 11166)
3. DEPC (Sigma Aldrich)
4. DMF (Dimethylformamid) (Uvasol, Merck)
5. DMSO (AppliChem)
6. Essigsäure 80 % (Merck)
7. Ethanol (Roth)
8. FBS, hitzeinaktiviert (Millipore)
9. Isopropanol (AppliChem)
10. LPS (Sigma Aldrich, B0111:B4)
11. MTT (Bio Chemica, A2231.0005)
12. Natriumhydrogenkarbonat (Merck)
13. Natriumhydroxid (Merck)
14. Natriumkarbonat (Merck)
15. Penicillin/Streptomycin (AppliChem)
16. Salzsäure 1N (Merck)

17. Schwefelsäure 2N (AppliChem)
18. 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB) und Wasserstoffperoxid (BD, TMB Substrat Reagent Set, Kat.Nr.: 555214)
19. Trizol (ambion life technologies, Ref. Nr. 15596018)
20. Trypsin/EDTA 0,25 % (gibco, Thermo Fisher Scientific)
21. TSA (Cayman Chemical, Item Nr. 89730)
22. Tween 20 (AppliChem)

2.1.1.2 Geräte und Verbrauchsmaterialien

1. Brutschrank:

Hera cell, Heraeus Instruments

2. Mikroskop

Nikon Eclipse 55100

3. PCR Gerät

ViiA™ 7 Real-Time PCR System, applied biosystems

4. ELISA Reader / Software

Cytation 3/ Gen 5, Biotek

5. Zellkultur-Werkbank

Hera safe, Heraeus Instruments

6. Photometer

Nano Drop 2000 Thermofisher

7. Plate Washer ELISA

Tecan Hydroflex

8. Zentrifugen

Eppendorf 5810R

Eppendorf 5415 R

2.1.2 Proteine

1. Rekombinantes IL-1 β (Millipore, Cat. Nr. IL038)

2.1.2.3 RT-Reagenzien, qPCR

2. High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit

(applied biosystems, Kat.Nr. 4368814)

3. Master Mix Taq man (applied biosystems, Ref. Nr. 4369016)

4. TaqMan Sonden

IL-1 β Kat.Nr. Hs01555410

IL-10 Kat.Nr. Hs00961622_m1

IL-6 Kat.Nr. Hs00174131_m1

TNF- α Kat.Nr. Dr03126850_m1

RPS 18 Hs01375212_g1

2.1.3 Antikörper und Enzym Kits für ELISA

1. Human IL-1 β

BD Biosciences, Kat.Nr. 557953

2. Human IL-10

BD Biosciences, Kat.Nr. 555157

3. Human IL-6

BD Biosciences, Kat.Nr. 555220

4. Human TNF- α

BD Biosciences, Kat.Nr. 555212

2.1.3 LDH Zytotoxizitäts-Assay

CytoTox 96 Non Radioactive Cytotoxicity Assay

Promega

Ref.Nr.: G1780

Inhalt:

1. Substrat Lösung
2. Assay Puffer (PBS+1 %BSA)
3. Lyse Lösung (9 % Triton X-100)
4. Stopp Lösung (1M Essigsäure)

2.1.4 Zellkultur

1. RPMI 1640 Medium

Gibco, Ref.Nr. 21875-034

2. DMEM(1X)+ GlutaMaxx Medium

Gibco, Ref.Nr. 61965-026

3. Zellkulturflaschen

T75 (Thermofischer Scientific)

T175 (Thermofischer Scientific)

4. Zellkulturplatten

6-well Zellkulturplatten (Sarstedt, Ref Nr. 833920)

24-well Zellkulturplatten (Cellstar, greiner-bio, Ref.Nr. 662160)

96 well Zellkulturplatten (Cellstar, greiner-bio, Ref.Nr. 655180)

5. Zellschaber steril (Sarstedt)

2.1.5 ELISA

1. Microplate 96 well, greiner bio-one

2.1.6 PCR

1. Platten: 4titude IMIAID Framestar 384 well

2.1.7 Puffer und Lösungen

PBS steril (Phosphate Buffered Saline, gibco)

Aqua dest.

PBS Tabletten (Carl Roth) 2 Stk. / Liter Aqua dest.

1. PBS-BSA (Zellkultur, IL-1 β Transportprotein)

0,1 mg Albumin Fraktion V /ml steriles PBS

2. Lysepuffer MTT

100 ml DMF (N,N-dimethylformamide)

100 ml Aqua dest.

20 g SDS

2,5 ml 80 % Essigsäure

2,5 ml 1N HCL

3. Coating Buffer (ELISA)

0,1 M Natrium Carbonat

10N NaOH

4. Assay Diluent

PBS unsteril mit 10 % hiFCS (heat-inactivated FCS)

5. Waschpuffer

PBS unsteril

500 µl Tween 20 / Liter PBS

2.2 Zelllinien und Zellkultur

THP-1 Zelllinie, DSMZ Nr.: ACC 16

A549 Zelllinie ATCC Nr.: CCL 185

Alle Zellkulturversuche wurden in einem Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ durchgeführt.

Die THP-1 Zellen wurden in T75 oder T175 Zellkultur-Flaschen kultiviert und im Intervall von 48 h geteilt. Es wurde eine Zellsuspension mit einer Dichte zwischen 5×10^5 Zellen/ml und 1×10^6 Zellen/ml angestrebt. Hier zeigten die Zellen ein optimales Teilungsverhalten mit einer Verdopplungszeit von 36-48 h. Die Zellen wurden bis zu einer Generationsdauer von maximal 20 Generationen kultiviert und danach verworfen. Zu Versuchsbeginn wurden die THP-1 Zellen mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer unter dem Mikroskop ausgezählt, durch Zentrifugation (800 rpm, 5 min) gesammelt und die entstandenen Zellpellets anschließend in frischem Medium auf 1×10^6 Zellen/ml resuspendiert. Dieser Prozess wird im Weiteren als Passagierung bezeichnet.

Die A549-Zellen wurden ebenfalls in T75 Zellkulturflaschen kultiviert und bei 100 % Konfluenz, etwa im Intervall von 48 h geteilt. Zur Subkultivierung wurde das Zellmedium abpipettiert, die Zellkultur mit PBS gespült und mit Trypsin/EDTA gelöst. Die Zellen wurden bis zu einer maximalen Passage-Dauer von 20 Passagen kultiviert und danach verworfen. Einige Tage vor Versuchsbeginn wurden die A549 Zellen passagiert und auf Zellkultur-Platten ausgesät. Bei mikroskopisch ermittelter Konfluenz von 80-90 % wurde der Versuch begonnen. Hierzu wurden die Zellen mit frischem Medium versehen. Die Zusammensetzung der verwendeten Zellkulturmedien ist wie folgt:

THP-1-Zellen:

RPMI 1640

10 % heat-inactivated FCS

A549-Zellen

DMEM

10 % heat inactivated FCS

1 % Pen/Strep

GlutaMaxx

2.3 Versuchsbedingungen und Nachweisverfahren

2.3.1 Etablierung der Endotoxin-Toleranz

2.3.1.1 in THP-1 Zellen

Die Zellzahl der THP-1 Zellsuspension wurde, wie in 2.2 beschrieben, auf 1×10^6 Zellen/ml eingestellt und auf 24-Well Platten mit einem ml Zellsuspension pro Well ausgesät. LPS wurde in PBS gelöst und steril filtriert in Aliquots mit 100 µg/ml bei -80 °C aufbewahrt. Es folgte die Stimulation (First Hit) mit 1 µg LPS/ml in der Versuchsgruppe, bzw. einem Äquivalenzvolumen PBS in der Kontrollgruppe für 24 oder 48 Stunden. Hiernach erfolgte, ohne oder mit Mediumwechsel die Zweitstimulation (Second Hit) mit jeweils LPS bzw. PBS in jeder Gruppe für sechs Stunden. Es entstanden so Versuchs- und Kontrollgruppen mit folgenden Stimulationsvorgängen:

Tab. 3: Versuchsgruppen Endotoxin-Toleranz THP-1

| Stimulationen | PBS 2. Stimulation | LPS 2. Stimulation |
|-------------------------------------|---------------------------|---------------------------|
| Kontrollgruppe (=PBS Vorinkubation) | Gruppe 1 | Gruppe 2 |
| Versuchsgruppe (=LPS Vorinkubation) | Gruppe 3 | Gruppe 4 |

2.3.2.2 In A549-Zellen

A549 Zellen wurden, wie in 2.2. beschrieben bei einer Konfluenz von 100 % mit neuem Medium versehen und für sechs Stunden mit unterschiedlichen Konzentrationen LPS stimuliert. Die Konzentrationen wurden als Titrationsreihe mit 1000 ng LPS/ml Medium bis 0,01 ng LPS/ml Medium erstellt. Die Kontrollgruppe wurde lediglich mit Medium inkubiert.

2.3.2. Endotoxin-Toleranz im Passageversuch mit Inhibitor Zugabe

THP-1 Zellen wurden, wie in 2.2. beschrieben, in frischem Medium resuspendiert und in Zellkulturflaschen ausgesät.

Die Inhibitoren wurden bis Versuchsbeginn bei -20 °C gelagert, zum Versuchsbeginn aufgetaut, in DMSO gelöst und bis zur gewünschten Konzentration in PBS verdünnt.

Es wurden fünf Versuchsgruppen und eine Kontrollgruppe angesetzt, die während der 48 Stunden dauernden Vorinkubation (First Hit) folgenden Reagenzien ausgesetzt wurden:

1. 1 µg LPS/ml
2. 1 µg LPS/ml, Decitabin 50 nmol/l, Trichostatin A 25 nmol/l in DMSO
3. Decitabin 50 nmol/l, Trichostatin A 25 nmol/l in DMSO
4. DMSO 0,148 µg/ml
5. 1 µg LPS/ml, DMSO 0,148 µg/ml

Die Kontrollgruppe wurde mit PBS versehen und ebenfalls 7 Tage inkubiert. Bei einer Generationsdauer von ca. 48-72 Stunden wurde dies als Vielfaches einer

Generationsdauer gewählt. Nach Ablauf der Inkubationsdauer s. Abbildung 6 wurden die Zellen mittels eines Zellschabers von der Oberfläche der Zellkulturflasche gelöst, einzeln ausgezählt und durch Zentrifugierung (800 rpm, 5 min) und Resuspension auf 1×10^6 Zellen/ml Medium zurückgesetzt (Passage nach 2, 4 und 7 Tagen). Hiernach erfolgte die weitere Inkubation bis zum Abschluss der Versuchsdauer nach 7 Tagen.

Jeweils zu den Zeitpunkten des Passagierung (P1-3, also nach 2, 4 und 7 Tagen) wurde Zellsuspension aus den in Abbildung 6 dargestellten Versuchsgruppen abgenommen und für Stimulationen eingesetzt. Diese erfolgten auf Zellkultur-Platten mit 24 Kammern mit 1 ml Zellsuspension pro Well. Es wurde jeweils für sechs Stunden mit $1 \mu\text{g}$ LPS/ml stimuliert (Second Hit), die jeweiligen Kontrollen mit PBS.

Zur besseren Verständlichkeit der Abläufe dient Abbildung 6.

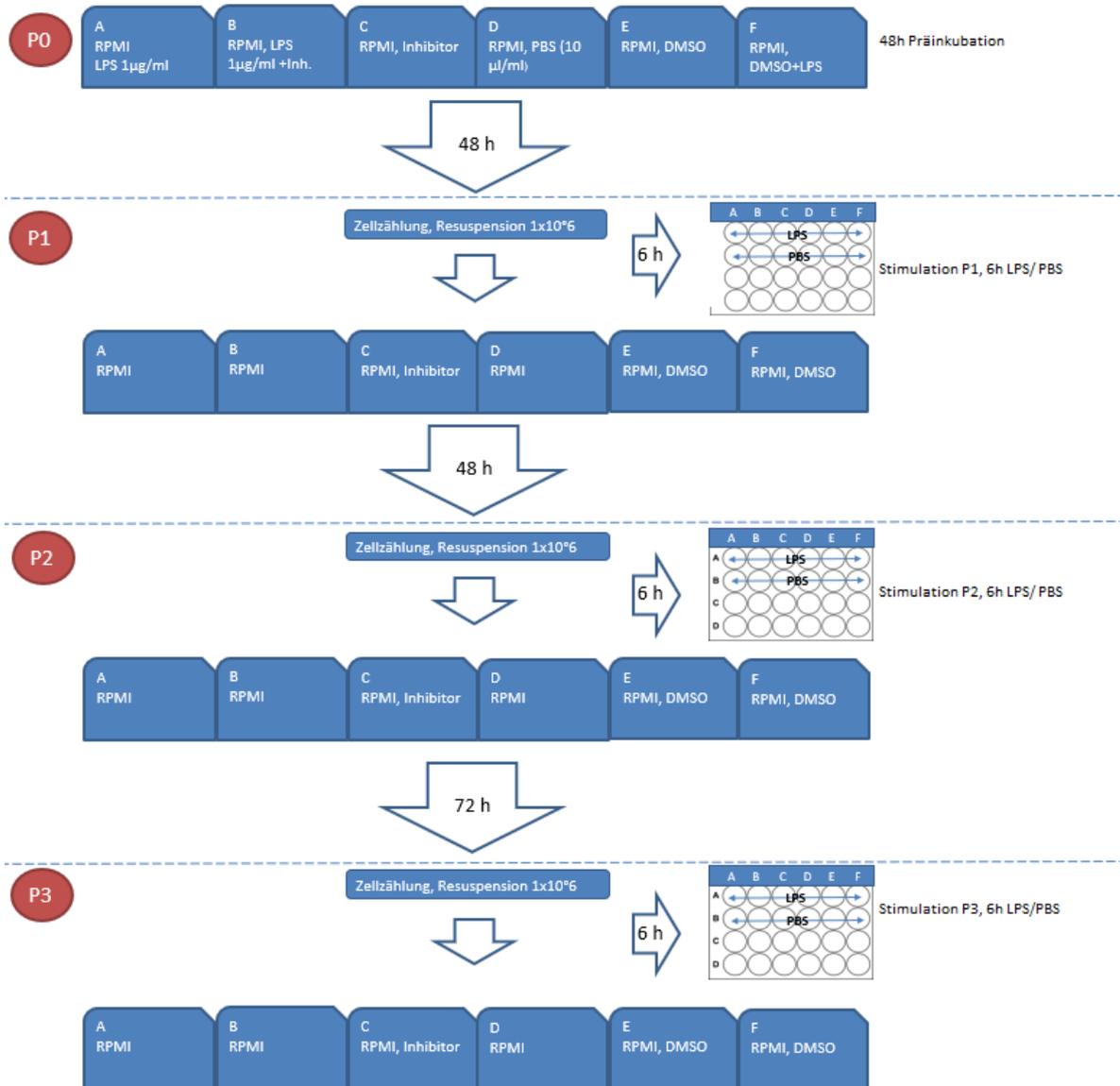


Abb. 6: schematisierter Ablauf der Inhibitor-Passage Versuche

2.3.3 Erstellen von konditionierten Medien

THP-1 Zellen wurden wie in 2.2. beschrieben in frischem Medium resuspendiert und in Zellkulturflaschen ausgesät. Es wurden die gleichen Versuchs- und Kontrollgruppen wie in 2.3.2. angesetzt und 48 Stunden inkubiert. Nach 48 Stunden wurde präinkubierte Zellsuspension entnommen und, ohne vorherige Passagierung, einer *Second Hit* Stimulation in einer Zellkultur-Platte mit 6 Kammern zugeführt. Es wurde jeweils für sechs

Stunden mit 1 µg LPS/ml bzw. PBS stimuliert (Second Hit). Die verbleibende Zellsuspension wurde passagiert und ebenfalls für sechs Stunden mit LPS bzw. PBS versetzt, um aus den Überständen konditionierte Medien zu gewinnen für Versuche mit anderen Zelllinien, siehe 2.3.4.

2.3.4 A549 Stimulation mit konditioniertem Medium

Konfluente A549 Kulturen auf Zellkultur-Platten mit sechs Kammern wurden für sechs Stunden mit den Versuchs-Medien aus konditionierten Medien und A549-Medium im Verhältnis 1:1 (s. 2.3.3.) inkubiert. Als Negativkontrolle wurden A549 Zellen lediglich in A549-Medium inkubiert. Als Positivkontrollen wurden Titrationsreihen aus rekombinantem IL-1 β in Versuchsmedium verwendet. Die Konzentrationen betragen zwischen 0,3 und 5 ng IL-1 β /ml Medium.

2.3.5 Beendigung der Versuche

Bei nicht-adhärenenten Zellen wurde zur Beendigung der Stimulation die Zellsuspension aus den Zellkulturplatten abgenommen und in Eppendorf Reaktionsgefäßen bei 800 x g zentrifugiert. Um adhärierende Zellen auf der Platte ebenfalls zu ernten, wurden die Wells mit je einem ml *Trizol* Lösung versehen. Der Überstand der abzentrifugierten Zellsuspensionen wurde abpipettiert und für molekularbiologische Untersuchungen bei -80 °C eingefroren. Die verbleibenden Zellpellets wurden gemeinsam mit den Zellen in dem *Trizol* aus den jeweiligen Wells gelöst und in den Eppendorf Reaktionsgefäßen bei -80 °C eingefroren.

2.3.6 Genexpressionsanalyse

2.3.6.1 RNA-Isolation und cDNA-Synthese

Die RNA-Isolation erfolgte nach der Methode von Chomczynski und Sacchi (Chomczynski und Sacchi, 1987).

Wie in 2.3.5 angegeben, wurden die Zellen beim Beenden des Versuches in *Trizol* gelöst und bis zur weiteren Verarbeitung bei -80 °C eingefroren. Die aufgetauten Zell-Lysate in *Trizol* wurden mit 200 µl Chloroform versehen, durch mehrmaliges Invertieren durchmischt und für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Hiernach erfolgte ein

Zentrifugationsschritt für 15 Minuten bei 4 °C und 12000 x g. Es entstand die Aufteilung in drei Phasen, wobei die untere Phase Proteine, die Interphase DNA-Moleküle und die obere, wässrige Phase RNA-Moleküle enthielt. Die obere Phase wurde abpipettiert und in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Es folgte die Präzipitation durch Zugabe von 500 µl Isopropanol und anschließender Inkubation bei Raumtemperatur für 15 Minuten. Anschließend wurde ein zweiter Zentrifugationsschritt für 15 Minuten bei 4 °C und 12000 x g durchgeführt. Der Überstand wurde im Anschluss verworfen und die entstandenen Pellets zwei Mal mit 1 ml 75 %iger Ethanol-Lösung in 0,1 %igem DEPC-H₂O gewaschen, jeweils mit einem weiteren Zentrifugationsschritt zwischen den Waschschritten. Die Ethanol-Lösung wurde verworfen, die RNA-Pellets bei Raumtemperatur ca. 20 Minuten getrocknet und in 15-30 µl 0,1 %igem DEPC-H₂O gelöst. Es folgte die photometrische Bestimmung des RNA-Gehaltes im UV-Photometer bei einer Absorption von 260 nm. Zur Überprüfung der Reinheit wurde der Quotient 260/280 nm gebildet. Die RNA wurde bei -80 °C eingefroren bis zur weiteren Verwendung.

Für die cDNA-Synthese wurden 2000 ng RNA eingesetzt und mit dem entsprechenden Volumen 0,1 %igem DEPC-H₂O auf 14,2 ml aufgefüllt. Der Master-Mix für die reverse Transkription wurde wie folgt angesetzt:

Tab. 4: Zusammensetzung RT-Master-Mix

| Komponente | µl pro Reaktion |
|--|-----------------|
| 10x reverse Transkriptase Puffer | 2 |
| 25x dNTPs | 0,8 |
| 10x random Primers | 2 |
| Multi Scribe reverse Transkriptase (50 U/µl) | 1 |

Zur verdünnten RNA wurden je 5,8 µl Master-Mix (Gesamtvolumen der Proben 20 µl mit 100 ng RNA/µl) hinzugegeben und mittels Vortexer gemischt. Nach kurzem Abzentrifugieren wurden die Proben im Thermocycler in cDNA umgeschrieben.

Hierbei wurde folgender Temperaturverlauf verwendet:

Schritt1: 25 °C 10 min

Schritt 2: 37 °C 120 min

Schritt 3: 85 °C 5 min

Schritt 4: 4 °C ∞

Die synthetisierte cDNA wurde im Verhältnis 1:12,5 verdünnt (8 ng/μl umgeschriebene RNA) und bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C gelagert.

2.3.6.2 Quantitative real time PCR

Auf bakterielle Stimuli reagieren Zellen mit Regulation der Zytokine und des Metabolismus. Dies lässt sich nicht nur auf der Ebene der Protein-Expression und der metabolischen Aktivität messen, sondern zeigt sich auch in der Transkriptionsaktivität einer Zelle. Bei der quantitativen Real-Time PCR wird die Amplifikation ausgewählter DNA-Sequenzen anhand von Fluoreszenz in Echtzeit während der exponentiellen Phase der Kettenreaktion bestimmt. Dies geschieht durch TaqMan[®]-Sonden (kurze komplementäre DNA-Sequenzen einer festgelegten Region mit bekanntem Transkript), die neben einem FAM-Fluoreszenzfarbstoff (einem sog. Reporter) auch einen Quencher enthalten, der das Signal des FAM unterbindet, solange beide am gleichen DNA-Segment gebunden sind. Durch die 5'-3' Exonukleaseaktivität der Taq-Enzyme wird der Reporter nach der Hybridisierung der Sonde mit einem komplementären DNA-Strang abgespalten und fortan nicht länger durch den Quencher unterdrückt (Applied Biosystems (08.2010), TaqMan[®] Gene Expression Master Mix Protocol).

Es entsteht ein Fluoreszenzsignal, das gemessen werden kann. Hierbei nimmt die Fluoreszenz während der exponentiellen Phase proportional mit der Menge der PCR-Produkte zu. Das Eintreten in die exponentielle Phase wird als Threshold-Wert bezeichnet, der Ct-Wert bezeichnet den Zyklus, bei dem das Fluoreszenzsignal in der jeweiligen Probe den Threshold-Wert erreicht.

Die Auswertung der erhaltenen Echtzeit-Fluoreszenzwerte erfolgt anhand der $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode. Hierbei wird der o.g. Ct-Wert des Referenzgens vom Ct-Wert des Zielgens der gleichen Probe abgezogen. Die Formel lautet:

$$\Delta\text{Ct} = \text{Ct} (\text{Zielgen}) - \text{Ct} (\text{Referenzgen}).$$

Nach der Formel

$$\Delta\Delta\text{Ct} = \Delta\text{Ct} (\text{Untersuchungsgruppe}) - \Delta\text{Ct} (\text{Kontrollgruppe})$$

erhält man schließlich den $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Wert, der die Differenz der Expression zwischen Untersuchungs- und Kontrollgruppe ausdrückt. Als Zielgene wurden die humanen Gene für IL-1 β , IL-6, IL-10 und TNF- α , als Housekeeping-Gen RPS18 verwendet.

Abbildung 7 veranschaulicht die Erhebung der Threshold-Werte.

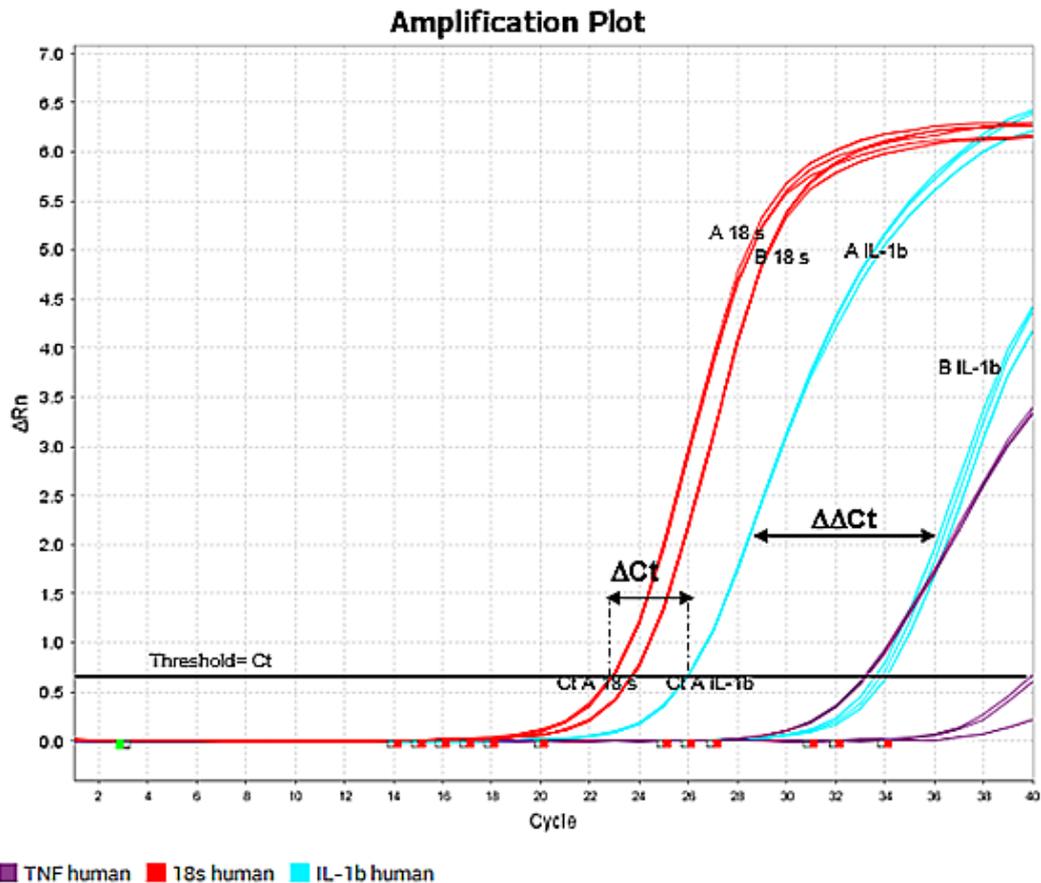


Abb. 7: Darstellung Ct-Wert, ΔCt -Wert und $\Delta\Delta Ct$ -Wert: Hierbei ist Gruppe A die Kontroll-Gruppe und Gruppe B die behandelte Gruppe, 18s das Referenz-Gen und IL-1 β das Ziel-Gen.

Die Proben aus 2.3.6 wurden während des Pipettiervorganges auf Eis gelagert, ebenso wurden die TaqMan[®] Sonden auf Eis aufgetaut und gekühlt und nach Verwendung wieder bei -20 °C gelagert.

Es wurden aus der cDNA je 6,65 μ l für Triplikate angesetzt. Die Einzelreaktionen wurden zur Bereinigung etwaiger Messungenauigkeiten als Triplikate angelegt. Jeder Einzelreaktion wurden 27 μ l Master-Mix hinzugefügt, dessen Zusammensetzung in Tabelle 6 aufgeführt ist. Hierdurch ergibt sich eine Menge von 15,8 ng der umgesetzten RNA pro Well bei Triplets à 10 μ l auf der 384 Kammer Platte. Es wurde zwecks Kontrolle möglicher Verunreinigungen der eingesetzten Substanzen mit Nukleinsäuren zudem eine No-Template-Control (NTC) erstellt, bei der anstatt cDNA ein gleiches Volumen 0,1 %iges

DEPC-H₂O hinzugefügt wurde. Dies geschah jeweils für die einzelnen Sonden, sowie für das Housekeeping-Gen RPS18.

Tab. 5: Zusammensetzung Master-Mix qPCR

| Hinzugefügtes Agens | Benötigtes Volumen pro Well in μ l |
|--|--|
| TaqMan [®] Gene Expression Master Mix | 5,55 |
| Sonde | 0,56 |
| 0,1 % DEPC-H ₂ O | 2,80 |
| Probe | 2,2 |

Auf einer 384-Kammer Reaktionsplatte wurden Triplikate mit je 10 μ l angesetzt. Die PCR in den einzelnen Kavitäten wurde nach folgendem Temperaturprofil durchgeführt, nach jedem Zyklus wurde die Fluoreszenz als Maß für den Produktzuwachs gemessen.

| | |
|-------------------------|---|
| Schritt 1: 50 °C 2min | Inkubationsphase, Enzymaktivierung |
| Schritt 2: 95 °C 10 min | Denaturierung |
| Schritt 3: 95 °C 15 sec | Denaturierung, dann Polymerisierung, 40 Zyklen |
| Schritt 4: 60 °C 1 min | |

Die Quantifizierung erfolgte anhand der $\Delta\Delta$ Ct-Methode.

2.3.7 Bestimmung der Proteinsekretion mittels Sandwich-ELISA

Wie bereits beschrieben, führen bakterielle Stimuli zur veränderten Expression proinflammatorischer und antiinflammatorischer Zytokine. Diese können im Sandwich-ELISA Verfahren nachgewiesen werden. Hierbei steht ELISA für Enzyme-linked Immunosorbent Assay und Sandwich für die Art des Aufbaus. Es wird zunächst eine 96-Well Mikrotiterplatte mit einem Antigen-spezifischen Capture-Antikörper beladen, der mit der Fc-Domäne an der Platten-Oberfläche bindet. An der spezifischen Antigen-bindenden Domäne bindet dann das gesuchte Protein. Nicht gebundene Proteine werden ausgewaschen.

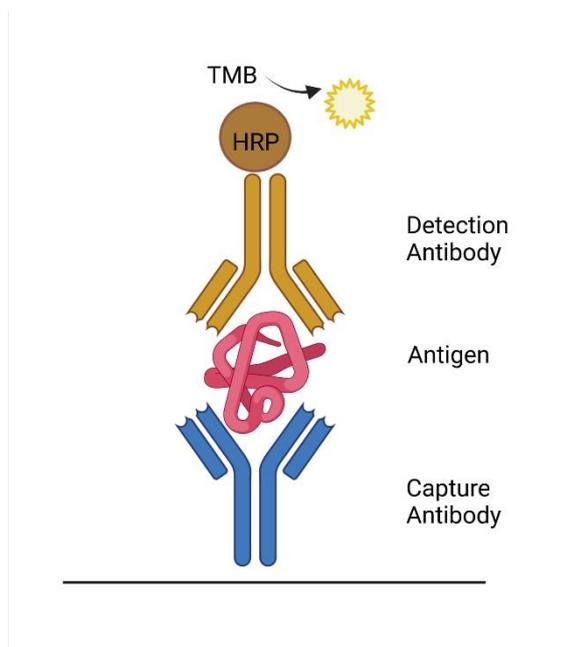


Abb. 8: Sandwich-ELISA, erstellt mit BioRender.com

Das zu detektierende Antigen wird im Folgenden mit dem Detection-Antikörper gebunden, an dessen Fc-Domäne ein Reporterenzym (Horseradish-Peroxidase) gebunden ist. Dieses spaltet das später hinzugegebene Substrat (TMB, Wasserstoffperoxid), wobei es zu einem Farbumschlag kommt. Dies ist durch Absorptionsmessung quantifizierbar. Der Ablauf ist in Abbildung 8 veranschaulicht.

Es erfolgten Proteinbestimmungen mittels Absorptionsmessung der humanen Zytokine IL-1 β , IL-6, IL-10, sowie TNF- α . Nach Protokoll der jeweiligen ELISA-Kits wurden am Vortag der Analyse 96-Kammer Platten mit 100 μ l Capture Antikörper in Coating Buffer

beschichtet und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Nach jedem Inkubationsschritt erfolgte jeweils ein Waschvorgang mit Waschpuffer über fünf Zyklen mit 300 µl im Microplate-Washer.

Die Überstände aus 2.3.5 wurden auf Eis aufgetaut. Für eine Stunde wurden die Platten anschließend mit Assay Diluent geblockt. Entsprechend den im jeweiligen Protokoll geforderten Konzentrationen wurden Standards als Verdünnungsreihe mit Standard Stock-Solution und Assay Diluent hergestellt. Nach erneutem Waschen wurden die Standards bzw. Proben in Duplikaten aufgetragen. Je nach erwarteter Proteinkonzentration mussten die Proben hierbei bis zu 20-fach in Assay Diluent verdünnt werden, um im messbaren Bereich der Absorptionsmessung zu bleiben. Es folgte eine zweistündige Inkubation. Nach abermaligem Waschen wurden die Platten nach individuellem Protokoll entweder mit Detection Antikörper und nach abgelaufener Inkubation mit Enzym Reagens, oder mit Working Reagens aus Detection Antikörper und Enzym Reagens inkubiert. Nach dem Waschen wurde die Substrat-Lösung aus 1:1 Wasserstoffperoxid und TMB hinzugegeben und geschützt vor Tageslicht bei Raumtemperatur bis zur gewünschten Farbentwicklung inkubiert. Dann wurde die Reaktion mit Schwefelsäure gestoppt und bei 450 nm mit Korrekturfaktor $\lambda = 570$ nm die Absorption bestimmt, wie in der Anleitung des Sets angegeben.

Die Absorptionswerte wurden als Werte bei $\lambda = 450$ nm angegeben.

Zur mathematischen Auswertung wurde der Mittelwert der Duplikate errechnet. Die Ermittlung der Proteinkonzentrationen erfolgte über Errechnung einer Standardkurve und Subtraktion der Absorption des Leerwertes (0 pg/ml) von den Mittelwerten der gemessenen Absorptionswerten. Zuletzt wurden die berechneten Mittelwerte mit der Steigung der Standardkurve und anschließend ggf. mit dem entsprechenden Verdünnungsfaktor multipliziert.

2.3.8 Bestimmung der Zellvitalität mittels LDH

Für die Zytotoxizitätsbestimmung wurde ein kolorimetrischer, nicht radioaktiver LDH-Assay verwendet. LDH, ein stabiles zytosolisches Enzym, wird bei Schädigung der Zellmembran in den Extrazellulärraum freigesetzt, wo es durch den Test messbar wird.

Dies kann z. B. durch einen inflammatorischen Stimulus hervorgerufen werden. Das CytoTox 96 Reagenz enthält neben INT auch Laktat, NAD^+ und Diaphorase.

Bei diesem Assay wird das Tetrazolium-Salz INT (2-[4-Iodophenyl]-3-[4-nitrophenyl]-5-phenyltetrazoliumchlorid) zu rotem Formazan umgewandelt. Dies geschieht durch die Spaltung von Laktat zu Pyruvat durch die LDH, wobei NAD^+ zu NADH/H^+ reduziert wird.

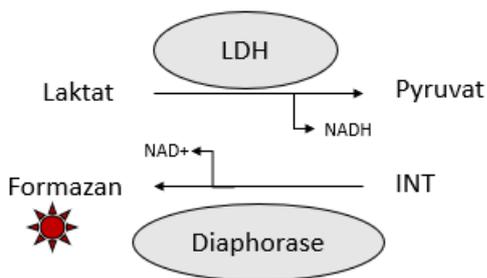


Abb. 9: Prinzip des LDH-Assays

Dies wiederum ermöglicht in Gegenwart der Diaphorase die Umwandlung des INT in Formazan und damit einen messbaren Farbumschlag, der proportional ist zur Zahl der zerfallenen Zellen. Im Falle der Positivkontrolle wird durch Zugabe des Triton Reagenz eine vollständige Zell-Lysierung erreicht, was zu einer maximalen LDH-Freisetzung führt.

Von den THP-1 Zellen aus 2.3.2 wurden jeweils zu den Zeitpunkten P1 und P3 (also nach 2 und 7 Tagen) Zytotoxizitätsbestimmungen durchgeführt. Hierzu wurden die nach Passagierung entstandenen Zellsuspensionen (1×10^6 Zellen/ml) der Versuchs- und Kontrollgruppen mit $100 \mu\text{l}/\text{Well}$ mit $n=12$ auf eine 96 Kammer Platte aufgetragen. Die Hälfte der Kammern wurde hierbei mit $1 \mu\text{g}$ LPS/ml versetzt, die andere Hälfte jeder Gruppe verblieb als Kontrolle. So entstanden die in 2.3.2 dargestellten sechs Gruppen mit je $n=6$ LPS-Stimulation (2nd Hit) und $n=6$ Kontroll-Proben pro Gruppe und Passage. Zudem wurden eine zellfreie Kontrolle (THP-1 Medium) und eine Positivkontrolle (LDH-Max, THP-1 naiv) jeweils in Triplikaten zeitgleich auf die Platte aufgetragen.

Es folgte eine Inkubation bei 37°C und 5% CO_2 für drei Stunden. Bereits 45 Minuten vor Ablauf der Inkubationszeit wurde die Positivkontrolle mit $10 \mu\text{l}$ Lyse Lösung versetzt. Nach

Ablauf der Inkubationszeit wurde die Platte bei 250 x g für vier Minuten zentrifugiert und der Überstand auf eine neue 96-Kammer Mikroplatte überführt. Der Substrat-Mix wurde mit Assay Puffer gelöst und unter Schutz vor Tageslicht 50 µl zu den Überständen auf die Platte pipettiert. Nach erneuter 30-minütiger Inkubation im Dunkeln wurde die Reaktion mittels 50 µl Stopp Lösung angehalten und die Absorption bei 490 nm ermittelt.

Die Wiederholungen der Messungen mit n=6 wurden mathematisch gemittelt, der Mittelwert der zellfreien Kontrollen von allen Proben subtrahiert und aus den erhaltenen Mittelwerten die Zytotoxizität ermittelt nach der Formel:

$$\% \text{ Zytotoxizität} = 100 \times \frac{\text{LDH Freisetzung Probe}}{\text{LDH Freisetzung Maximal}}$$

2.3.9 Bestimmung der mitochondrialen Aktivität /Vitalität mittels MTT-Assay

Der MTT-Assay ist, wie der LDH-Zytotoxizitätstest, ein kolorimetrisches Verfahren, bei dem durch enzymatische Umwandlung das rote Formazan entsteht. Beim MTT-Assay entsteht dies durch enzymatische Oxidoreduktasen aus dem Tetrazolium-Farbstoff MTT 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl) -2,5-diphenyltetrazoliumbromid. Diese Umwandlung ist NADH/H⁺ abhängig und gibt daher Aufschluss über die metabolische Aktivität der Zellen. Lebende, metabolisch aktive Zellen verstoffwechseln MTT und bilden daher viel Formazan während tote oder metabolisch inaktive Zellen kein Formazan bilden. Dies kann durch Absorptionsmessung quantifiziert werden.

MTT-Reagens wurde mit 5 mg MTT/ml PBS hergestellt. Die Lösung wurde anschließend steril filtriert und bis zu 4 Wochen dunkel und kalt gelagert bis zur Verwendung. Für den MTT-Assay wurden die THP-1 Zellsuspensionen aus 2.3.2 zu den Zeitpunkten nach 2 Tagen (P1) 4 Tagen (P2) und 7 Tagen (P3) mit 100 µl/Kammer auf einer 96-Kammer Platte ausgesät und mit LPS (1µg/ml) bzw. PBS (Äquivalenten) zwei Stunden inkubiert. Als Positivkontrolle diente hier die Gruppe aus naiven THP-1 Zellen, welche nur mit PBS inkubiert worden waren. Abbildung 10 zeigt das Platteninkubationsschema eines exemplarischen Versuchs.

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|---|-----------|----------|-------|-------|-------|----------|-----------|----------|-------|-------|-------|----------|
| A | LPS | LPS+Inh. | Inh. | PBS | DMSO | LPS+DMSO | LPS | LPS+Inh. | Inh. | PBS | DMSO | LPS+DMSO |
| B | LPS | LPS+Inh. | Inh. | PBS | DMSO | LPS+DMSO | LPS | LPS+Inh. | Inh. | PBS | DMSO | LPS+DMSO |
| C | LPS | LPS+Inh. | Inh. | PBS | DMSO | LPS+DMSO | LPS | LPS+Inh. | Inh. | PBS | DMSO | LPS+DMSO |
| D | LPS | LPS+Inh. | Inh. | PBS | DMSO | LPS+DMSO | LPS | LPS+Inh. | Inh. | PBS | DMSO | LPS+DMSO |
| E | LPS | LPS+Inh. | Inh. | PBS | DMSO | LPS+DMSO | LPS | LPS+Inh. | Inh. | PBS | DMSO | LPS+DMSO |
| F | LPS | LPS+Inh. | Inh. | PBS | DMSO | LPS+DMSO | LPS | LPS+Inh. | Inh. | PBS | DMSO | LPS+DMSO |
| G | LPS | LPS+Inh. | Inh. | PBS | DMSO | LPS+DMSO | LPS | LPS+Inh. | Inh. | PBS | DMSO | LPS+DMSO |
| H | Blank | Blank | Blank | Blank | Blank | Blank | Blank | Blank | Blank | Blank | Blank | Blank |
| | Versuch 1 | | | | | | Versuch 2 | | | | | |

Abb. 10 Beispiel Platteninkubationsschema MTT-Versuche

Eine zellfreie Kontrolle wurde aus THP-1 Medium erstellt (Blank). Hiernach erfolgte die Zugabe von 25 µl MTT/ Well und eine erneute Inkubation im Dunkeln für zwei Stunden. Danach wurden 100 µl Lysepuffer hinzugegeben und mehrere Stunden, zum Teil auch über Nacht inkubiert, bis mikroskopisch keine Kristalle in der Suspension mehr sichtbar waren. Dann erfolgte die Absorptionsmessung bei 540 nm mit Korrekturfaktor $\lambda=690$ nm. Nach Errechnen der Mittelwerte der Replikate wurde von diesen der Mittelwert der Blanks abgezogen und die Vitalität nach folgender Formel errechnet.

$$\% \text{ Vitalität} = 100 \times \frac{(\text{OD Probe} - \text{Blank})}{(\text{OD Positivkontrolle} - \text{Blank})}$$

2.4 Statistik

Die Kalkulation der gewünschten Werte aus den Rohdaten erfolgte nach den jeweils angegebenen Formeln, mittels Excel. Die hieraus entstandenen Daten wurden in Graph Pad Prism statistisch ausgewertet und zur Ermittlung der Signifikanz einem One-Way ANOVA mit Tukey Post-Test unterzogen. Die P-Werte wurden wie folgt angenommen:

ns $P > 0.05$

* $P \leq 0.05$

** $P \leq 0.01$

*** $P \leq 0.001$

**** $P \leq 0.0001$

3. Ergebnisse

3.1 Endotoxin-Toleranz in monozytären THP-1 Zellen

3.1.1 Auswirkungen der Endotoxin-Toleranz auf die Zytokin-Expression monozytärer THP-1 Zellen

Die Endotoxin-Toleranz wurde wie in 2.3.1 beschrieben induziert. Hierzu werden im Folgenden vergleichend Zellkulturansätze mit und ohne Mediumwechsel nach 48 Stunden Inkubation betrachtet.

Der Mediumwechsel erfolgte um eine Toleranzinduktion basierend auf epigenetischen Modifikationen zu untersuchen, die bei der Zellteilung weitergegeben wird. Um eine kontinuierliche Teilung der Zellen zu ermöglichen, wurde regelmäßig eine Reduktion der Zellzahl durch Auszählen und Resuspension unter Zugabe von neuem Wachstumsmedium durchgeführt.

Zwecks Benennung der Gruppen ist hier erneut Tabelle 4 aus Material und Methoden aufgeführt.

Tab. 6: Versuchsgruppen Endotoxin-Toleranz THP-1

| Stimulationen | PBS Second Hit | LPS Second Hit |
|-------------------------------------|-----------------------|-----------------------|
| Kontrollgruppe (=PBS Vorinkubation) | Gruppe 1 | Gruppe 2 |
| Versuchsgruppe (=LPS Vorinkubation) | Gruppe 3 | Gruppe 4 |

Hinsichtlich der betrachteten proinflammatorischen Zytokine zeigte sich allgemein eine deutlich erhöhte Zytokinexpression auf transkriptioneller, wie auch translationaler Ebene als Reaktion auf die Stimulation mit LPS. Dies zeigte sich im Vergleich der Kontrollgruppe (Gruppe 1) zu den Endotoxin-stimulierten Gruppen 2-4.

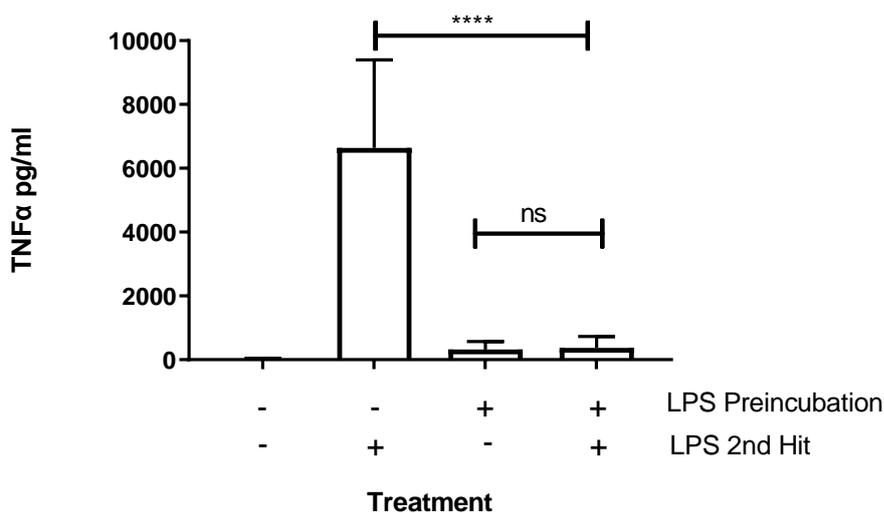
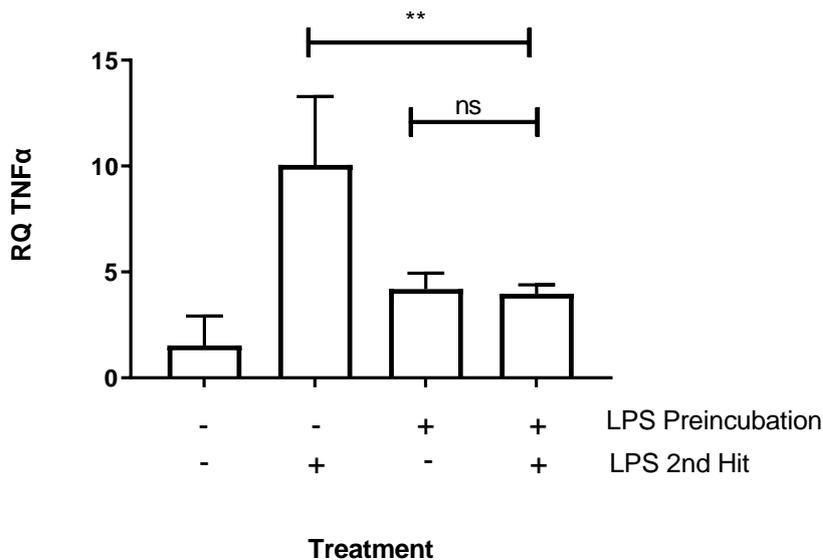


Abb. 11: LPS- Toleranzinduktion THP-1 qPCR- und ELISA-Ergebnisse TNF- α : THP-1 1×10^6 Zellen pro Milliliter. LPS-Präinkubation mit $1 \mu\text{g}$ LPS/ml für 48 Stunden, dann LPS-Stimulation für 6 Stunden mit $1 \mu\text{g}$ LPS/ml ohne Mediumwechsel. MW + SD (Mittelwert + Standardabweichung), ANOVA, Tukey Multiple Comparison Test. ns = $P > 0.05$, * = $P \leq 0.05$, ** = $P \leq 0.01$, *** = $P \leq 0.001$, **** = $P \leq 0.0001$

Bei den Zellkulturansätzen ohne zwischenzeitlichen Mediumwechsel (Passagierung) wurde die Endotoxin-Toleranz festgelegt als nicht-signifikanter Anstieg der Expressionsniveaus der untersuchten Zytokine (TNF- α , IL-1 β) der LPS-präinkubierten Zellen gegenüber naiven Zellen nach Endotoxin-Stimulation.

Für TNF- α ließ sich (s. Abbildung 11) zwischen Gruppe 2 (naive THP-1 Zellen) und den präinkubierten Zellen (Gruppe 4) eine signifikante Veränderung der Zytokin-Antwort nach zeitgleichem LPS-Stimulus feststellen. Die LPS-präinkubierten Zellen reagierten mit einer signifikant erniedrigten Transkription und Translation des Zytokins TNF- α auf den erneuten Stimulus.

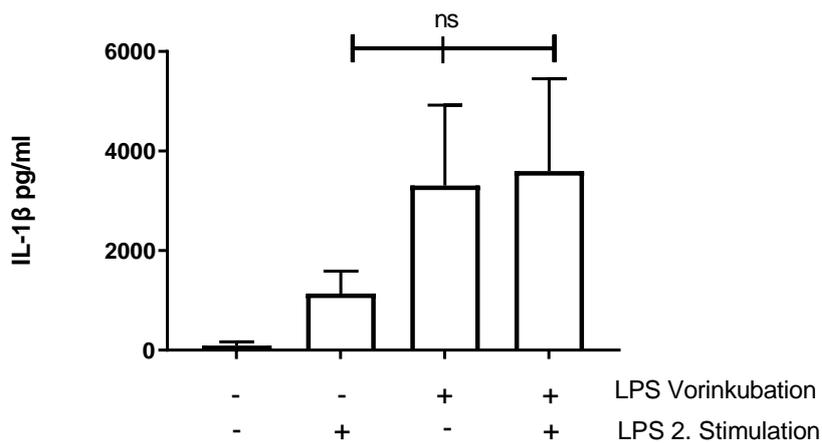
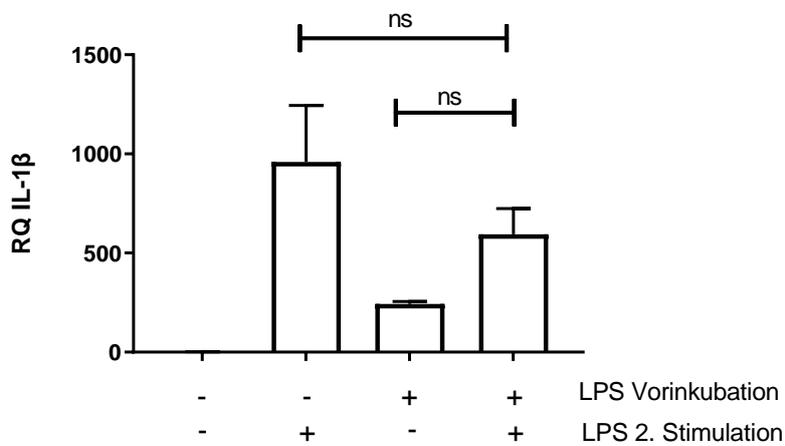


Abb. 12: LPS- Toleranzinduktion THP-1 qPCR- und ELISA-Ergebnisse IL-1 β : THP-1 1×10^6 Zellen pro Milliliter. LPS-Präinkubation mit $1 \mu\text{g}$ LPS/ml für 48 Stunden, dann LPS-Stimulation für 6 Stunden mit $1 \mu\text{g}$ LPS/ml ohne Mediumwechsel, MW + SD (Mittelwert + Standardabweichung), $n = 4$, ANOVA, Tukey Multiple Comparison Test, ns = $P > 0.05$, * = $P \leq 0.05$, ** = $P \leq 0.01$, *** = $P \leq 0.001$, **** = $P \leq 0.0001$

Analog hierzu wurden auch die Ergebnisse für IL-1 β ausgewertet (s. Abbildung 12). Hier zeigte sich ebenfalls eine moderate Toleranzinduktion auf Ebene der Genexpression, auch wenn kein statistisches Signifikanzniveau erreicht wurde. Ebenfalls weichen hier die Effekte auf transkriptioneller und translationaler Ebene stark voneinander ab. Zwischen

Gruppe 2 (PBS + LPS) im Vergleich zu Gruppe 4 (LPS + LPS) konnte auf Proteinebene keine Reduktion der IL-1 β Freisetzung festgestellt werden.

Wurden die Zellen zwischen der ersten und der zweiten LPS-Stimulation (Preinkubation bzw. 2nd Hit) einem Mediumwechsel (Passage) unterzogen, zeigte sich die Endotoxin-Toleranz verstärkt (s. Abbildungen 13 und 14). Insbesondere zeigte sich eine deutliche Veränderung der IL-1 β Expression in Gruppe 2 (PBS + LPS) gegenüber Gruppe 4 (LPS + LPS) auf translationaler Ebene. Hier ließ sich nun ein signifikanter Unterschied zwischen den betrachteten Gruppen nachweisen, der auf eine verstärkte Toleranz der LPS präinkubierten Zellen (Gruppe 4) hinweist. Analog zu der Auswertung der Versuche mit unpassagierten Zellen zeigte sich hier die größte Ausprägung der Endotoxin-Toleranz bei TNF- α , sowohl auf Genexpressionsebene als auch auf Proteinebene.

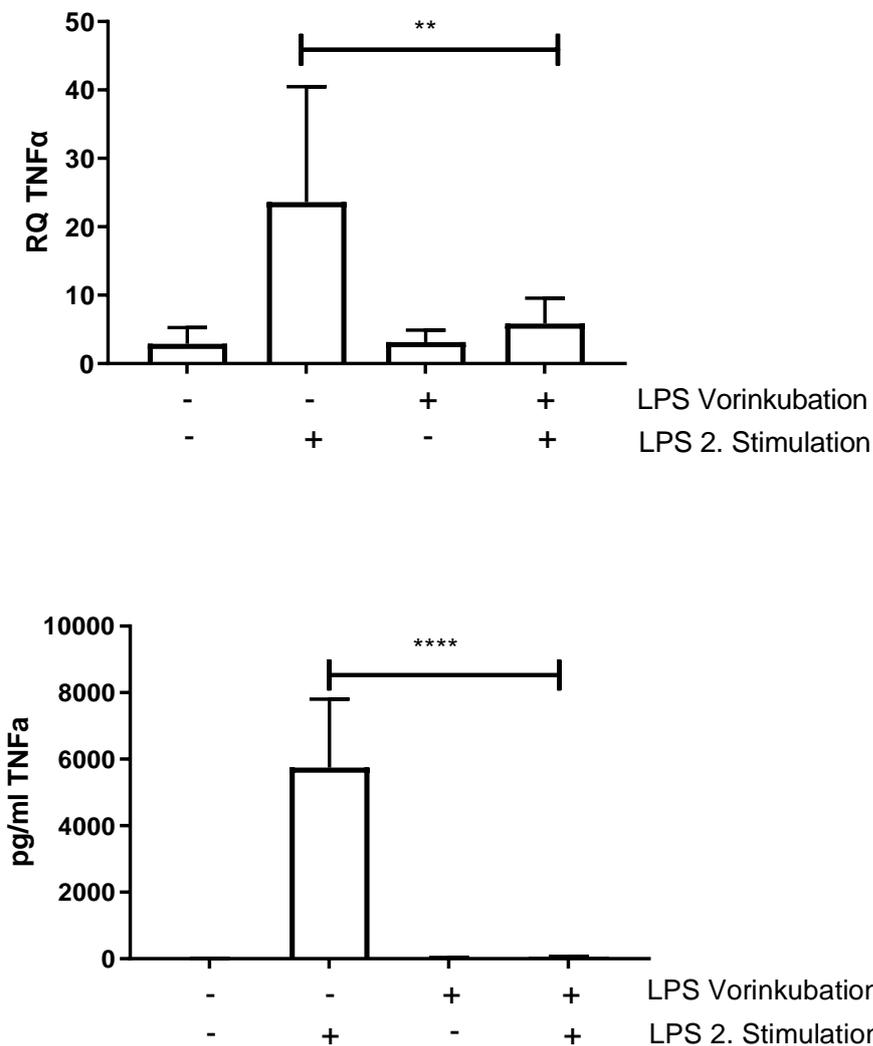


Abb. 13: LPS-Toleranzinduktion THP-1 qPCR- und ELISA-Ergebnisse TNF- α mit Mediumwechsel:

THP-1 1×10^6 Zellen pro Milliliter. LPS-Präinkubation mit $1 \mu\text{g}$ LPS/ml für 48 Stunden, dann Passagierung (Auszählen, Abzentrifugieren, Mediumwechsel, Resuspension auf 1×10^6 Zellen /ml). Erneute LPS-Stimulation für 6 Stunden mit $1 \mu\text{g}$ LPS/ml. $n=8-9$. MW + SD (Mittelwert + Standardabweichung), $P < 0,0001$, ANOVA, Tukey Multiple Comparison Test. ns = $P > 0.05$, * = $P \leq 0.05$, ** = $P \leq 0.01$, *** = $P \leq 0.001$, **** = $P \leq 0.0001$

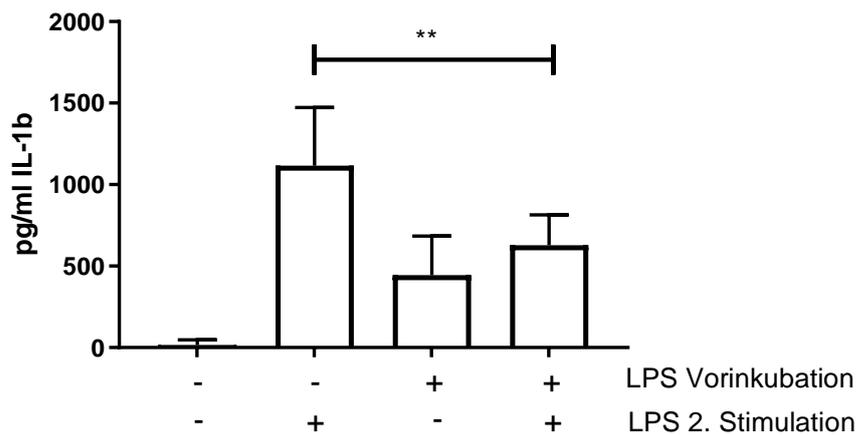
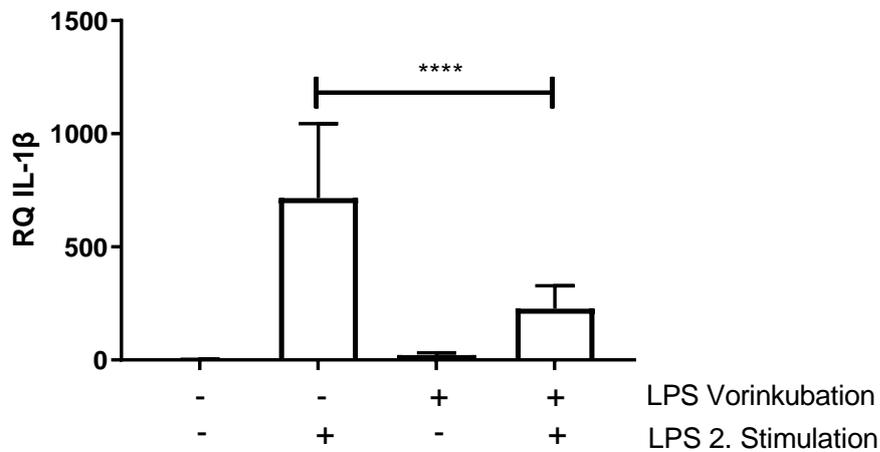


Abb. 14 LPS-Toleranzinduktion THP-1 qPCR- und ELISA-Ergebnisse IL-1 β mit Mediumwechsel:

THP-1 1×10^6 Zellen pro Milliliter. LPS-Präinkubation mit $1 \mu\text{g}$ LPS/ml für 48 Stunden, dann Passagierung (Auszählen, Abzentrifugieren, Mediumwechsel, Resuspension auf 1×10^6 Zellen /ml). Erneute LPS-Stimulation für 6 Stunden mit $1 \mu\text{g}$ LPS/ml. $n=8-9$. MW + SD (Mittelwert + Standardabweichung), $P < 0,0001$, ANOVA, Tukey Multiple Comparison Test, ns = $P > 0,05$, * = $P \leq 0,05$, ** = $P \leq 0,01$, *** = $P \leq 0,001$, **** = $P \leq 0,0001$

3.1.2 Auswirkungen der Endotoxin-Toleranz auf den Metabolismus monozytärer THP-1 Zellen

Auf metabolischer Ebene ließ sich im LDH Zytotoxizitäts-Assay kein signifikanter kurzfristiger Unterschied, wie auf Transkriptions- und Translationsebene beschrieben, nachweisen (Abbildung 15). Es zeigte sich in allen Gruppen von LPS behandelten THP-1 Monozyten eine gesteigerte LDH-Freisetzung verglichen mit den naiven Zellen. Dies kann als gesteigerte Glykolyse im Sinne des Warburg-Effekts gedeutet werden.

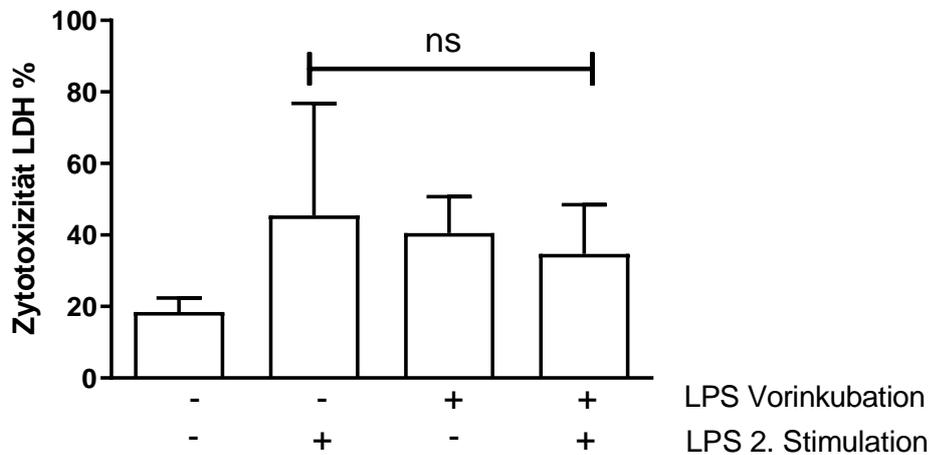


Abb. 15: LPS-Toleranzinduktion THP-1 LDH Zytotoxizität Ergebnisse:

THP-1 1×10^6 Zellen pro Milliliter. LPS-Präinkubation mit $1 \mu\text{g}$ LPS/ml für 48 Stunden, dann Passagierung (Auszählen, Abzentrifugieren, Mediumwechsel, Resuspension auf 1×10^6 Zellen /ml). Anschließend 2nd Hit LPS Stimulation für 3 h mit $1 \mu\text{g}$ LPS/ml. $n=3$. MW + SD (Mittelwert + Standardabweichung), $P < 0,0001$, ANOVA, Tukey Multiple Comparison Test. ns = $P > 0.05$, * = $P \leq 0.05$, ** = $P \leq 0.01$, *** = $P \leq 0.001$, **** = $P \leq 0.0001$.

Wie in 2.3.9 beschrieben, wurde zur Ermittlung der Zellvitalität ein MTT-Test durchgeführt. Dies diente sowohl der Untersuchung einer Selektionierung toleranter Zellen, als auch als Marker der mitochondrialen Aktivität der Zellen unter LPS-Stimulation und Endotoxin-Toleranz. Hier zeigt sich in Abb. 16 bei zunächst verminderter mitochondrialer Aktivität nach 48h LPS-Inkubation eine signifikant verbesserte Vitalität, also eine Regeneration der Zellvitalität nach dreimaliger Passagierung zum Zeitpunkt sieben Tage nach Beginn der LPS-Inkubation. Die Vitalität der LPS-Gruppe wird in Prozent der Kontrollgruppe (PBS) angegeben und unterschied sich nach Ablauf des einwöchigen Versuches nicht mehr signifikant von der Kontrollgruppe.

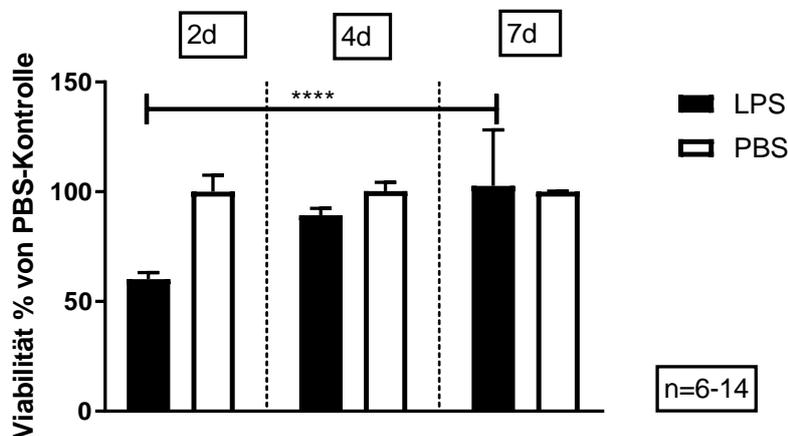


Abb.16: LPS-Toleranzinduktion THP-1 Vitalität MTT-Auswertung: THP-1 Zellen 1×10^6 /ml, $1 \mu\text{g}$ LPS/ml bzw. PBS-Gabe, 48h Inkubation, Passagierung (Auszählen, Abzentrifugieren, Mediumwechsel, Resuspension auf 1×10^6 Zellen/ml). nach 2d, 4d und 7d. MTT-Test zu angegebenen Zeitpunkten. n=6-14. MW + SD (Mittelwert + Standardabweichung), $P < 0,0001$, ANOVA, Tukey Multiple Comparison Test.

3.2 Auswirkungen der Langzeit-Inkubation auf die Endotoxin-Toleranz in monozytären THP-1 Zellen

Die Expressionslevel der untersuchten Zytokine IL-1 β und TNF- α zeigten (Abb. 17) eine anhaltende Endotoxin-Toleranz im Vergleich der verschiedenen Behandlungsgruppen untereinander über den beobachteten Zeitraum auf. Es ließ sich jedoch betreffend der RNA-Transkription des Zytokins TNF- α ein Trend zur Abnahme dieser Toleranz sechs Tage nach dem initialen Endotoxin-Stimulus feststellen.

Analog zeigte auf Ebene der sezernierten Zytokine IL-1 β und TNF- α (Abb. 18) das Expressionslevel bzw. die Konzentration der freigesetzten Zytokine einen signifikanten Unterschied zwischen den Behandlungsgruppen, was auf eine unterschiedliche Ausbildung der Endotoxin-Toleranz hindeutet. Jedoch zeigte sich auch hier der oben beschriebene Trend. Die Zellen, die sechs Tage zuvor erstmalig mit Endotoxin (LPS) inkubiert wurden, produzierten nun nach erneuter Stimulation wieder deutlich mehr Zytokin. Jedoch bestand weiterhin eine Endotoxin-Toleranz mit signifikantem Unterschied zwischen den Gruppen 2 (PBS+LPS) und 4 (LPS+LPS).

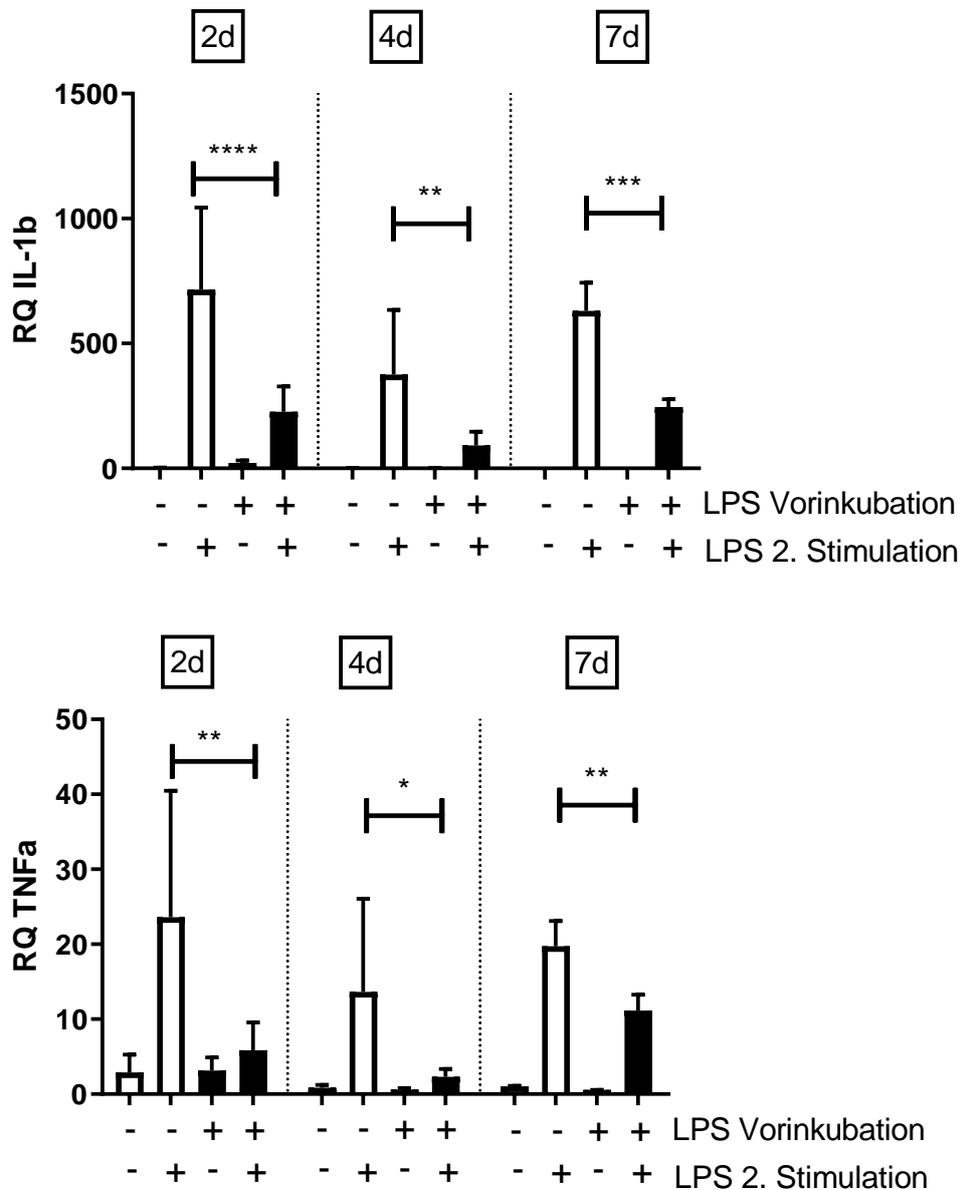


Abb. 17: Langzeit LPS-Toleranzentwicklung THP-1 qPCR-Ergebnisse IL-1 β und TNF- α :

THP-1 Zellen 1×10^6 /ml, 1 μ g LPS/ml bzw. PBS-Gabe, 48h Inkubation, Passagierung (Auszählen, Abzentrifugieren, Mediumwechsel, Resuspension auf 1×10^6 Zellen/ml) nach 2d, 4d und 7d. Dann separate LPS/PBS-Stimulation auf Zellkulturplatten für 6 Stunden mit 1 μ g LPS/ml nach jeder Passagierung. Fortsetzung der Inkubation der verbliebenen Zellkulturen bis zum nächsten Passagierungs-Zeitpunkt. n=3-8.

qPCR-Auswertung: MW + SD (Mittelwert + Standardabweichung), $P < 0,0001$, ANOVA, Tukey Multiple Comparison Test. ns = $P > 0.05$, * = $P \leq 0.05$, ** = $P \leq 0.01$, *** = $P \leq 0.001$, **** = $P \leq 0.0001$.

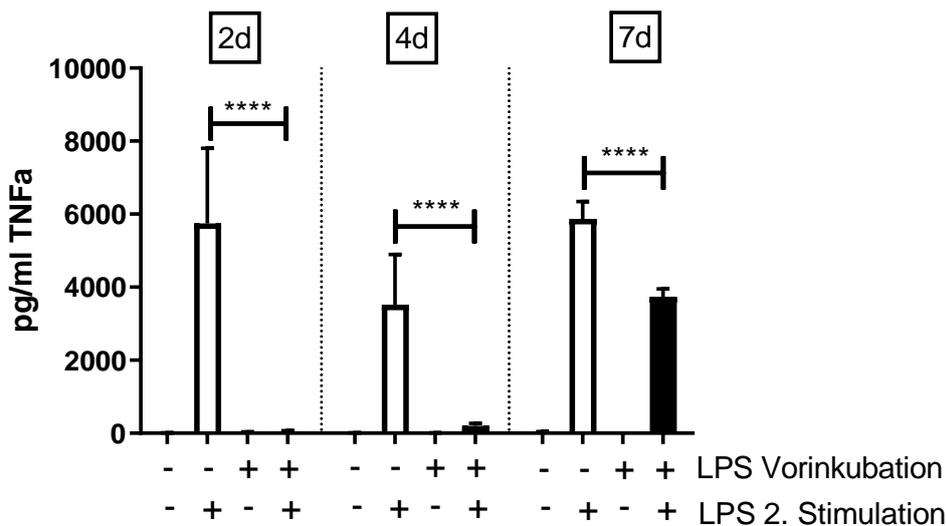
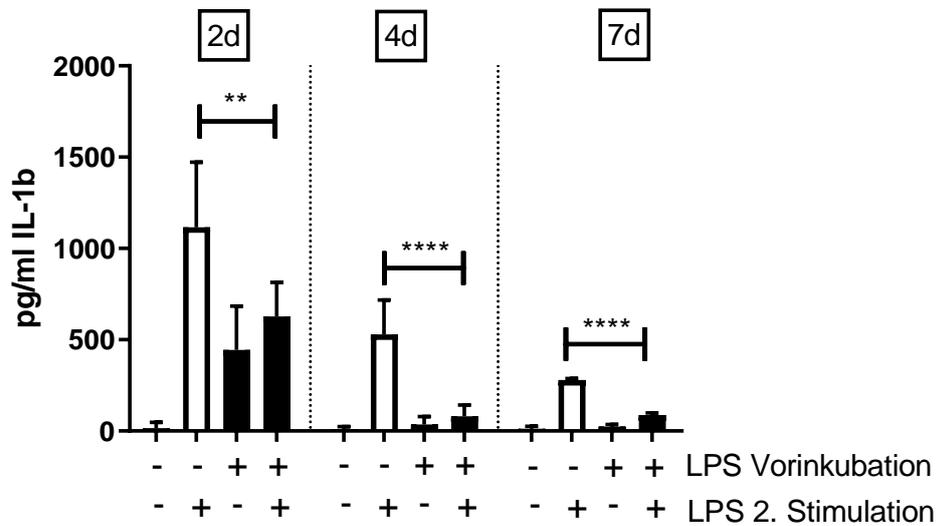


Abb. 18: Langzeit LPS-Toleranzentwicklung THP-1 ELISA-Ergebnisse IL-1 β und TNF- α : THP-1 Zellen 1×10^6 /ml, $1 \mu\text{g}$ LPS/ml bzw. PBS-Gabe, 48h Inkubation, Passagierung (Auszählen, Abzentrifugieren, Mediumwechsel, Resuspension auf 1×10^6 Zellen/ml) nach 2d, 4d und 7d. Dann separate LPS/PBS-Stimulation auf Zellkulturplatten für 6 Stunden mit $1 \mu\text{g}$ LPS nach jeder Passagierung. Fortsetzung der Inkubation der verbliebenen Zellkulturen bis zum nächsten Passagierungs-Zeitpunkt. $n=3-8$. ELISA-Auswertung: MW + SD (Mittelwert + Standardabweichung), ANOVA, Tukey Multiple Comparison Test. ns = $P > 0.05$, * = $P \leq 0.05$, ** = $P \leq 0.01$, *** = $P \leq 0.001$, **** = $P \leq 0.0001$.

Bei keinem der betrachteten Zytokine IL-6 und IL-10 ließ sich eine statistisch signifikante Endotoxin-Toleranz nachweisen, weshalb diese im Verlauf nicht weiter bestimmt wurden. Dies traf für ELISA und PCR als Nachweismethoden zu (s. Abbildung 19).

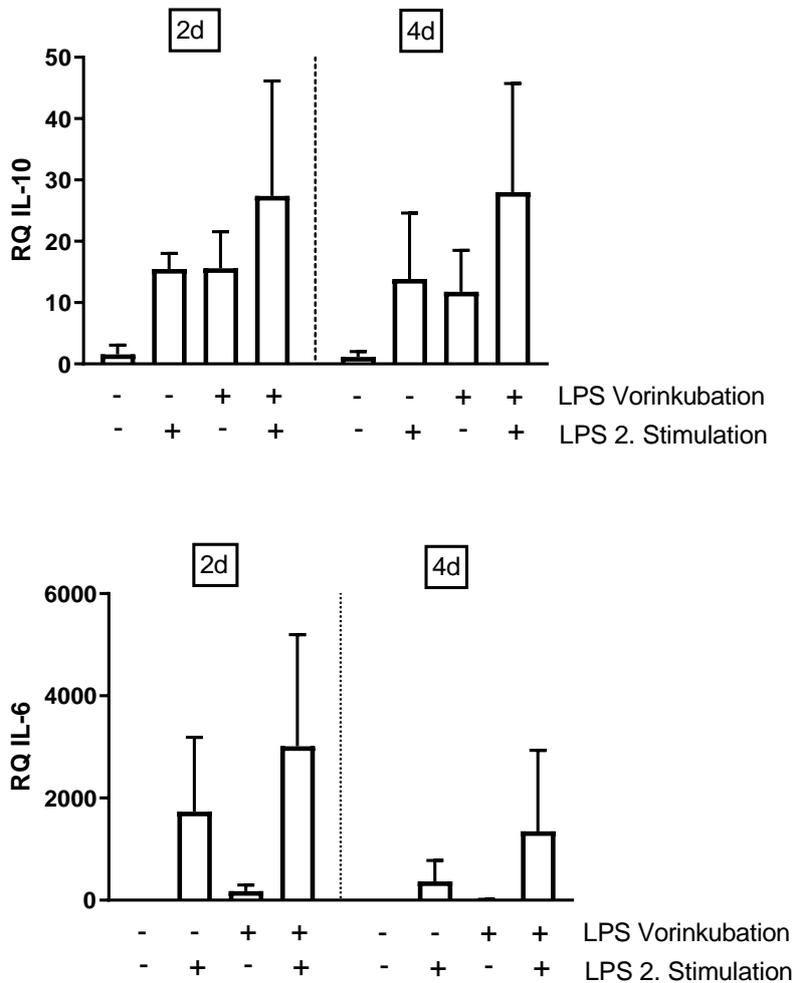


Abb. 19: LPS-Toleranzentwicklung THP-1 qPCR-Ergebnisse IL-10 und IL-6: THP-1 Zellen 1×10^6 /ml, $1 \mu\text{g}$ LPS/ml bzw. PBS-Gabe, 48h Inkubation, Passagierung (Auszählen, Abzentrifugieren, Mediumwechsel, Resuspension auf 1×10^6 Zellen/ml) nach 2d, 4d und 7d. Dann separate LPS/PBS-Stimulation auf Zellkulturplatten für 6 Stunden mit $1 \mu\text{g}$ LPS nach jeder Passagierung. Fortsetzung der Inkubation der verbliebenen Zellkulturen bis zum nächsten Passagierungs-Zeitpunkt. $n=4$. qPCR-Auswertung: MW + SD (Mittelwert + Standardabweichung), ANOVA, Tukey Multiple Comparison Test. ns = $P > 0.05$, * = $P \leq 0.05$, ** = $P \leq 0.01$, *** = $P \leq 0.001$, **** = $P \leq 0.0001$.

3.3 Inhibitoren der HDACs und DMTs bewirken keine dauerhafte signifikante Veränderung der Endotoxin-Toleranz in monozytären THP-1 Zellen

Angesichts der anhaltenden Endotoxin-Toleranz der monozytären Zellen über die Dauer einer Zellgeneration hinaus, können epigenetische Veränderungen als deren Ursache vermutet werden. Wie unter 1.5.2 erläutert, konnte bislang *vitro* eine vermehrte M2 Polarisierung LPS-exponierter monozytärer Zellen durch Inkubation mit Inhibitoren der Histonmodifikation induziert werden. Dies führt, auch durch Veränderung der Immunantwort, zu einer geringeren Apoptoserate der stimulierten Zellen. Es lässt sich vermuten, dass durch die M2-Polarisierung mit Ausprägung einer antiinflammatorischen Immunantwort die LPS-induzierte immunometabolische Paralyse zumindest anteilig umgangen werden kann, woraus eine verbesserte Vitalität der Zellen resultieren würde. Eingesetzt wurden hier Trichostatin A (TSA) und Decitabin (DCB).

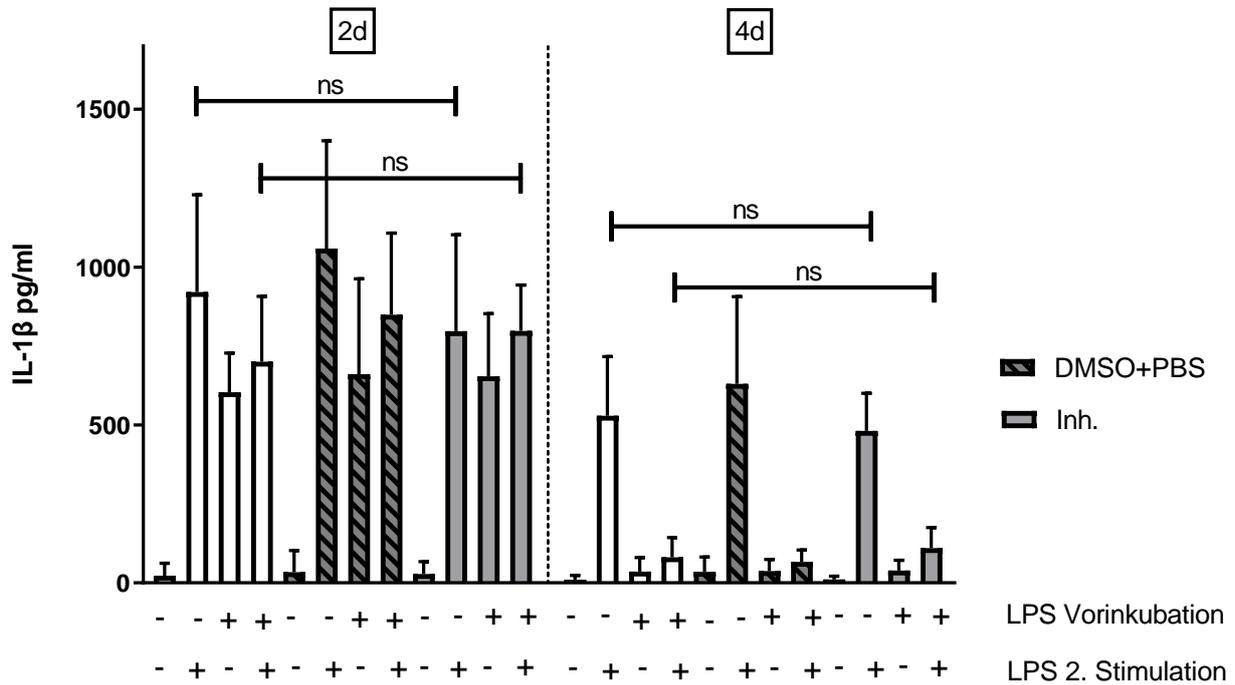


Abb. 20: THP-1 LPS-Toleranzentwicklung ELISA-Ergebnisse IL-1 β , Langzeit-Versuch mit Zugabe von Inhibitoren der Histonmodifikation (TSA und DCB in DMSO): THP-1 Zellen 1×10^6 /ml, $1 \mu\text{g}$ LPS/ml DMSO/Inhibitor-Gabe bzw. PBS-Gabe, 48h Inkubation, Passagierung (Auszählen, Abzentrifugieren, Mediumwechsel, Resuspension auf 1×10^6 Zellen/ml) nach 2 d, 4 d und 7 d. Erneute Zugabe von Inhibitoren in DMSO bzw. DMSO nach jeder Passagierung. Dann separate LPS/PBS-Stimulation auf Zellkulturplatten für 6 Stunden mit $1 \mu\text{g}$ LPS nach jeder Passagierung. Fortsetzung der Inkubation der verbliebenen Zellkulturen bis zum nächsten Passagierungs-Zeitpunkt. $n=5$. ELISA-Auswertung: MW + SD (Mittelwert + Standardabweichung), ANOVA, Tukey Multiple Comparison Test. ns = $P > 0.05$, * = $P \leq 0.05$, ** = $P \leq 0.01$, *** = $P \leq 0.001$, **** = $P \leq 0.0001$.

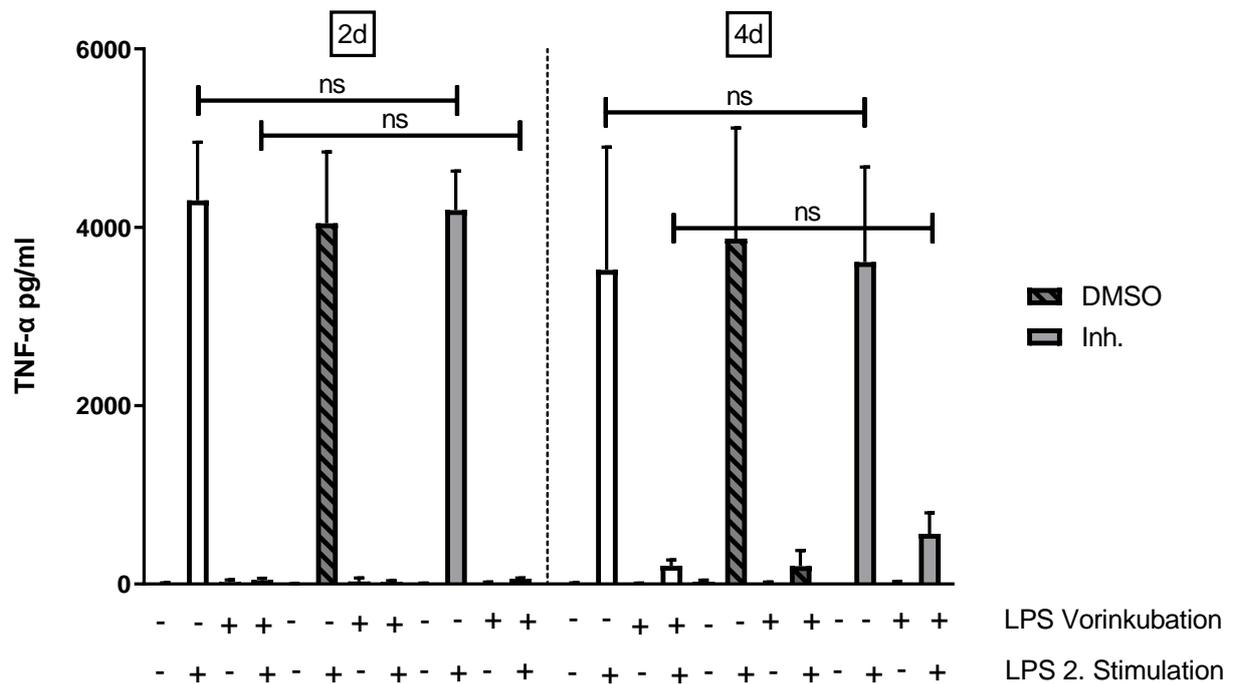


Abb. 21: THP-1 LPS-Toleranzentwicklung ELISA-Ergebnisse TNF- α , Langzeit-Versuch mit Zugabe von Inhibitoren der Histonmodifikation (TSA und DCB in DMSO):

THP-1 Zellen 1×10^6 /ml, $1 \mu\text{g}$ LPS/ml DMSO/Inhibitor-Gabe bzw. PBS-Gabe, 48h Inkubation, Passagierung (Auszählen, Abzentrifugieren, Mediumwechsel, Resuspension auf 1×10^6 Zellen/ml) nach 2 d, 4 d und 7 d. Erneute Zugabe von Inhibitoren in DMSO bzw. DMSO nach jeder Passagierung. Dann separate LPS/PBS-Stimulation auf Zellkulturplatten für 6 Stunden mit $1 \mu\text{g}$ LPS nach jeder Passagierung. Fortsetzung der Inkubation der verbliebenen Zellkulturen bis zum nächsten Passagierungs-Zeitpunkt. $n=5$. ELISA-Auswertung: MW + SD (Mittelwert + Standardabweichung), ANOVA, Tukey Multiple Comparison Test. ns = $P > 0.05$, * = $P \leq 0.05$, ** = $P \leq 0.01$, *** = $P \leq 0.001$, **** = $P \leq 0.0001$.

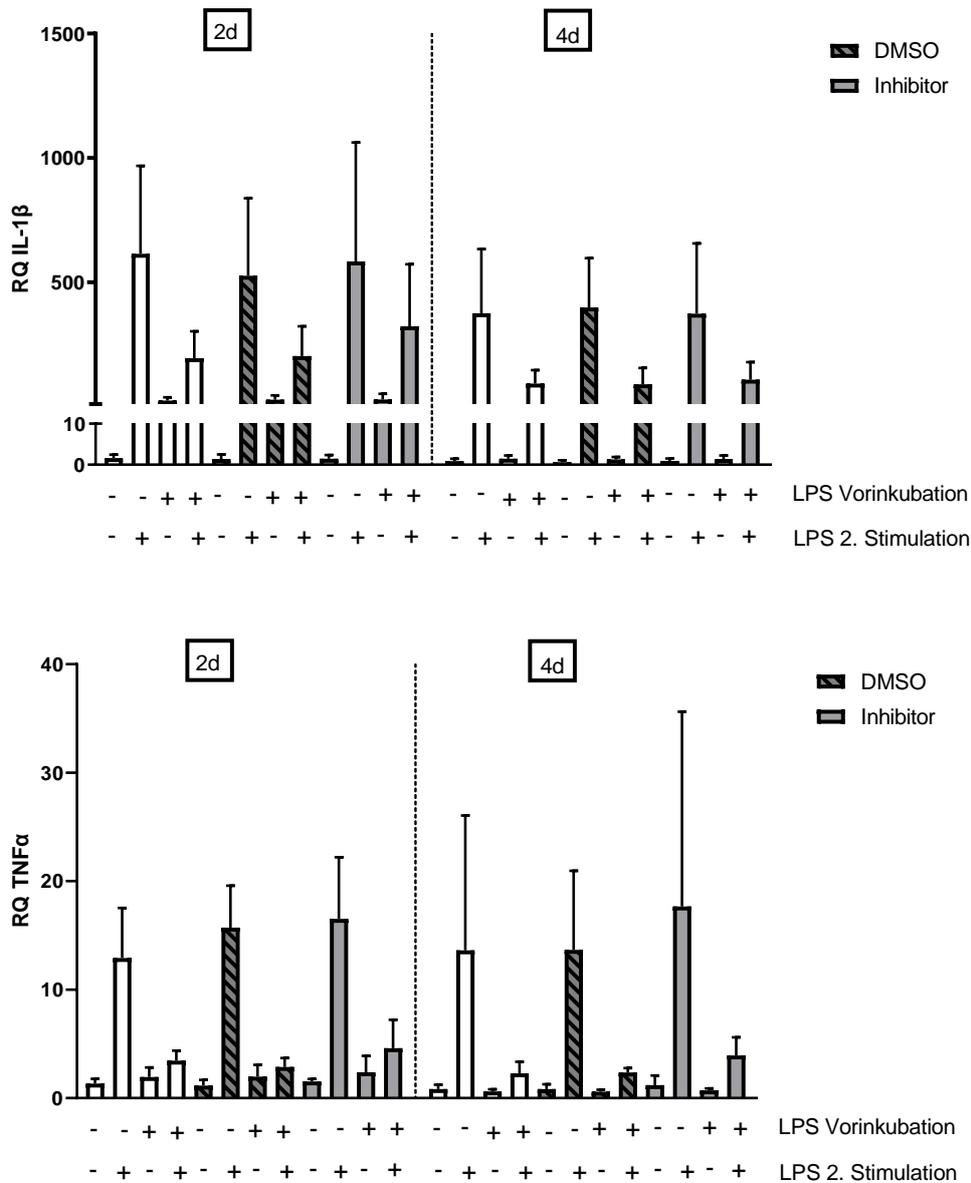


Abb. 22: THP-1 LPS-Toleranzentwicklung qPCR-Ergebnisse IL-1 β und TNF- α Langzeit-Versuch mit Zugabe von Inhibitoren der Histonmodifikation (TSA und DCB in DMSO): THP-1 Zellen 1×10^6 /ml, $1 \mu\text{g}$ LPS/ml DMSO/Inhibitor-Gabe bzw. PBS-Gabe, 48h Inkubation, Passagierung (Auszählen, Abzentrifugieren, Mediumwechsel, Resuspension auf 1×10^6 Zellen/ml) nach 2 d, 4 d und 7 d. Erneute Zugabe von Inhibitoren in DMSO bzw. DMSO nach jeder Passagierung. Dann separate LPS/PBS-Stimulation auf Zellkulturplatten für 6 Stunden mit $1 \mu\text{g}$ LPS nach jeder Passagierung. Fortsetzung der Inkubation der verbliebenen Zellkulturen bis zum nächsten Passagierungs-Zeitpunkt. $n = 5$. ELISA-Auswertung: MW + SD (Mittelwert + Standardabweichung), ANOVA, Tukey Multiple Comparison Test. ns = $P > 0.05$, * = $P \leq 0.05$, ** = $P \leq 0.01$, *** = $P \leq 0.001$, **** = $P \leq 0.0001$.

Bezüglich der proinflammatorischen Zytokine IL-1 β und TNF- α ließ sich kein signifikanter Langzeit-Effekt einer Inkubation mit den verwendeten Inhibitoren Decitabin und Trichostatin A auf die Entwicklung und Persistenz der Endotoxin-Toleranz feststellen (Abbildung 20 bis 22). Die mit Inhibitoren inkubierten Zellen verhielten sich analog zu der Vergleichsgruppe ohne Inhibitor. Das heißt, sie zeigten eine Toleranzinduktion der vorstimulierten Gruppe gegenüber den naiven Zellen über den gesamten beobachteten Zeitraum, ohne dass sich die Inhibition der Histonmodifikation signifikant hierauf auswirkte.

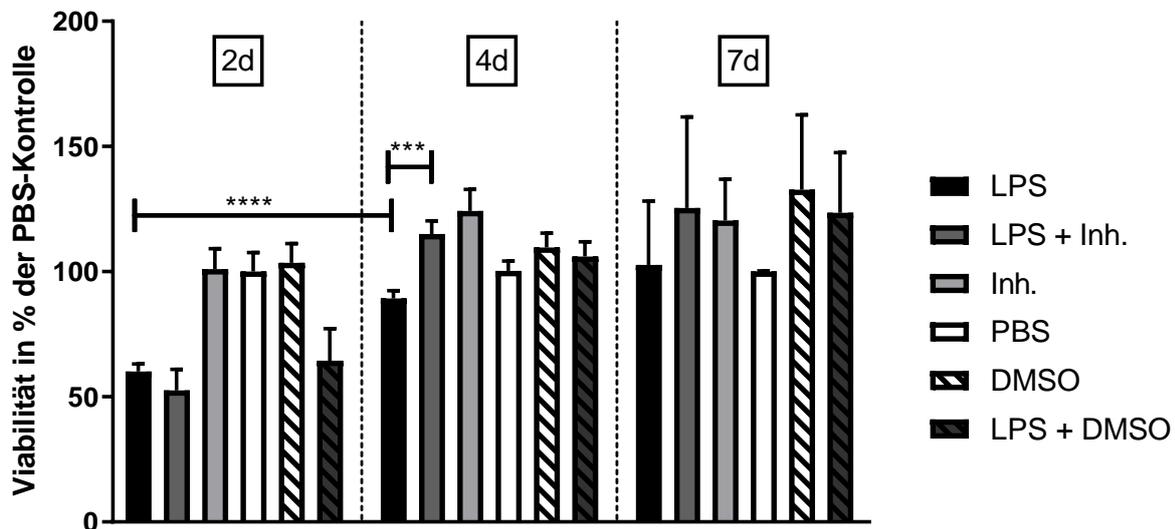


Abb. 23: MTT Auswertung Langzeit-Versuch mit Zugabe von Inhibitoren der Histonmodifikation (TSA und DCB in DMSO):

THP-1 Zellen 1×10^6 /ml, $1 \mu\text{g}$ LPS/ml DMSO/Inhibitor-Gabe bzw. PBS-Gabe, 48h Inkubation, Passagierung (Auszählen, Abzentrifugieren, Mediumwechsel, Resuspension auf 1×10^6 Zellen/ml) nach 2 d, 4 d und 7 d. Erneute Zugabe von Inhibitoren in DMSO bzw. DMSO nach jeder Passagierung. MTT Test zu angegebenen Zeitpunkten. $n=6-14$. X-Achse: Vitalität in % in Bezug zur unbehandelten Kontrolle (PBS). Y-Achse: Behandlung und Beobachtungszeitpunkt. MW + SD (Mittelwert + Standardabweichung), ANOVA, Tukey Multiple Comparison Test. ns = $P > 0.05$, * = $P \leq 0.05$, ** = $P \leq 0.01$, *** = $P \leq 0.001$, **** = $P \leq 0.0001$.

Im Vergleich der Gruppen „LPS“ und „LPS + Inh.“ zeigte sich in oben gezeigter Abbildung (Abb. 22) zwischen den Beobachtungszeitpunkten 2d und 7d (d= Tage nach initialer LPS-Exposition/ nach Versuchsbeginn) keine signifikante Änderung der Vitalität. Nach der initialen Stimulation über 48 h zeigten die Zellen, die zusätzlich zur Stimulation mit Inhibitor inkubiert wurden keine signifikant höhere metabolische Aktivität bzw. Vitalität in Bezug auf die unbehandelte Vergleichsgruppe (PBS). Die Vitalität unterschied sich jedoch zwischen beiden Zeitpunkten gegenüber dem Zeitpunkt „4d“ vier Tage nach Beginn. Hierbei ließ sich ein signifikanter positiver Effekt des Inhibitors auf die Regeneration der Vitalität gegenüber der LPS-Gruppe ohne Inhibitor-Zugabe feststellen. Dieser Effekt ließ sich jedoch 48 h später nicht mehr nachweisen. Es kam also isoliert im Zeitraum vier Tage nach Versuchsbeginn zu einer Steigerung der Vitalität der Endotoxin toleranten Zellen, die mit Inhibitoren der Histonmodifikation behandelt wurden. Hier handelte es sich jedoch nur um einen kurzzeitigen Effekt.

3.4 Endotoxin-Toleranz in epithelialen A549-Zellen

Zunächst betrachteten wir die Sensibilität der A549-Zellen gegenüber Endotoxin (LPS), und gegenüber IL-1 β als exemplarisches proinflammatorischen Zytokin. Da es sich um einen Proof-of-Principle Nachweis zur Untersuchung der o.g. Überlegungen handelte, erfolgte die Inkubation über verkürzte Zeiträume (6 Stunden Präinkubation + 2 Stunden zweite Stimulation).

3.4.1 Sensibilität der A549 Zellen gegenüber LPS

Es wurden die Effekte verschiedener Konzentrationen von LPS im A549-Medium getestet, wie in Abbildung 23 aufgeführt. Hierbei konnte keine signifikante Immunantwort der untersuchten Zytokine auf den Endotoxin-Stimulus nachgewiesen werden. Es kann also davon ausgegangen werden, dass das verbleibende LPS aus der Konditionierung der THP-1 Zellen sich nicht signifikant auf die Immunantwort der A549-Zellen auswirkt.

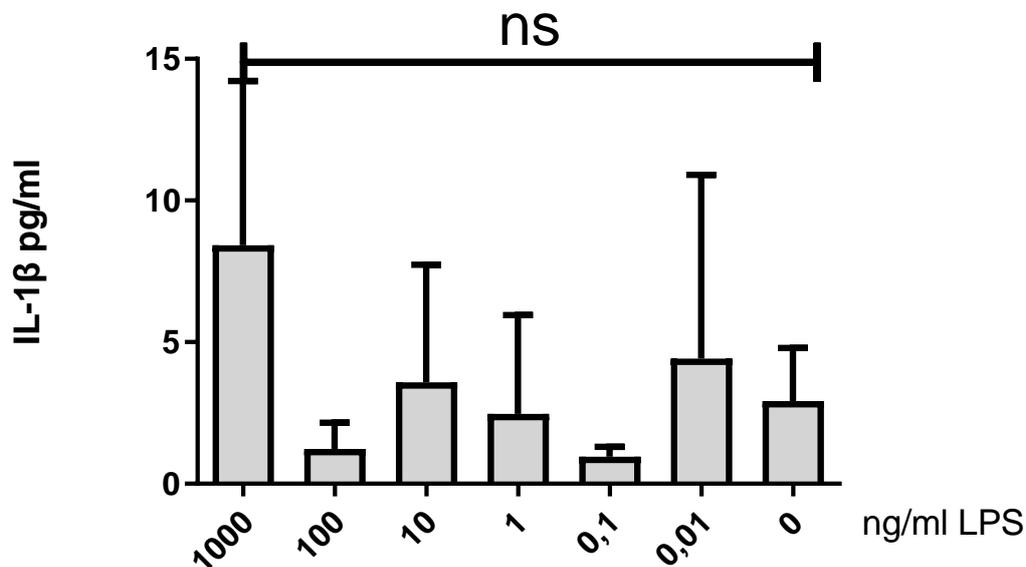


Abb. 24: LPS-Stimulation A549 Zellen, IL-1 β ELISA:

A549 Zellen auf Zellkulturschalen, dicht bewachsen. Inkubation mit als Verdünnungsreihe hergestellten LPS-Konzentrationen in DMEM 1000 ng – 0,01 ng/ml, Inkubation Kontrollgruppe (0 ng/ml) mit PBS. Inkubation für 6 h. Auswertung ELISA: MW + SD (Mittelwert + Standardabweichung), ANOVA, Tukey Multiple Comparison Test. ns = $P > 0.05$, * = $P \leq 0.05$, ** = $P \leq 0.01$, *** = $P \leq 0.001$, **** = $P \leq 0.0001$. n=3.

3.4.2 Sensibilität der A549 Zellen gegenüber rekombinantem IL-1 β

Untersucht werden sollte der Charakter der Immunantwort von A549 Zellen als Antwort auf eine Stimulation mit rekombinantem IL-1 β . Dies diene sowohl zur Unterscheidung einer konditionierbaren oder toleranzinduzierbaren Antwort, als auch als Maßstab für die proinflammatorische Antwort der Zellen auf eine definierte Menge IL1- β . Zuletzt diene die Versuchsreihe auch als Bestätigung des Konzepts, dass A549 Zellen durch IL-1 β stimulierbar sind.

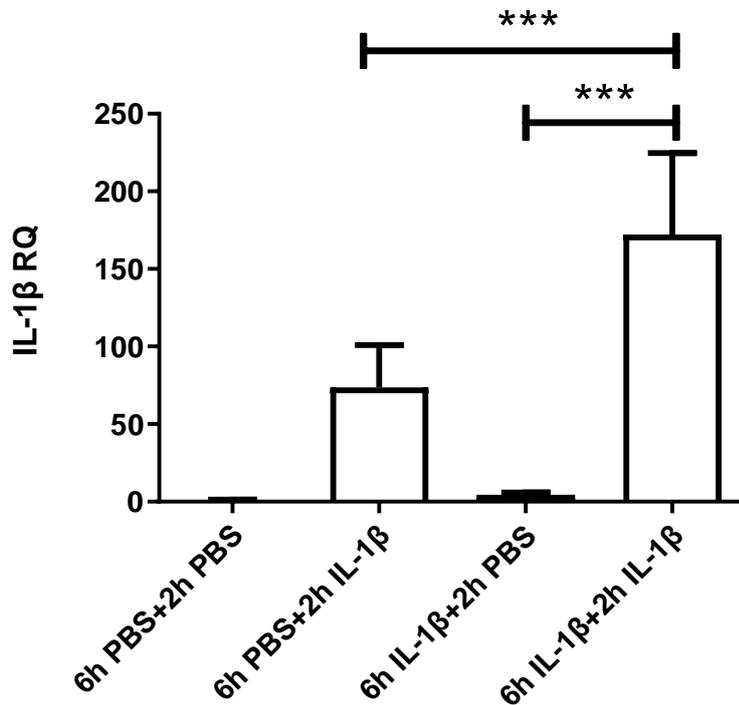


Abb. 25 Stimulation A549 Zellen mit rekombinatem IL-1 β , qPCR IL1-b:
 A549 Zellen auf Zellkulturschalen, dicht bewachsen. Inkubation mit 1ng/ml IL-1 β bzw. PBS. Inkubation für 6 h. Dann Restimulation für 2 h, n=6. Auswertung qPCR: MW + SD (Mittelwert + Standardabweichung), ANOVA, Tukey Multiple Comparison Test. ns = $P > 0.05$, * = $P \leq 0.05$, ** = $P \leq 0.01$, *** = $P \leq 0.001$, **** = $P \leq 0.0001$.

In der PCR-Analyse der IL-1 β stimulierten A549-Zellen (Abb. 24) konnte ein kurzfristiges Ansteigen des IL-1 β Transkriptes als Reaktion auf die Stimulation beobachtet werden. Es ist von einem kurzfristigen Effekt auszugehen, da sich in der Gruppe, die über 6 Stunden stimuliert wurde und dann 2 h ruhte, keine erhöhte IL-1 β Transkription nachweisen ließ. Die Zellen schienen jedoch eine erhöhte Suszeptibilität gegenüber dem erneuten Stimulus aufzuweisen: Es zeigte sich eine signifikant erhöhte IL-1 β Genexpression in der doppelt stimulierten Gruppe gegenüber der lediglich über zwei Stunden stimulierten Gruppe.

3.4.3 Übertragbarkeit der veränderten Immunantwort von THP-1 Zellen auf A549 Zellen mit konditionierten Medien

Diese Versuche dienten dem Nachweis der Übertragbarkeit der Toleranzinduktion auf andere Zellreihen über konditioniertes Medium. Untersucht wurde hier, ob die beobachteten Zytokine und deren reduzierte Freisetzung im Rahmen der Endotoxin-Toleranz an gewebständigen Zellen eine analoge Reaktion hervorrufen, oder gegebenenfalls eine signifikante Proinflammation abseits der untersuchten Zytokine im konditionierten Medium weiterbesteht.

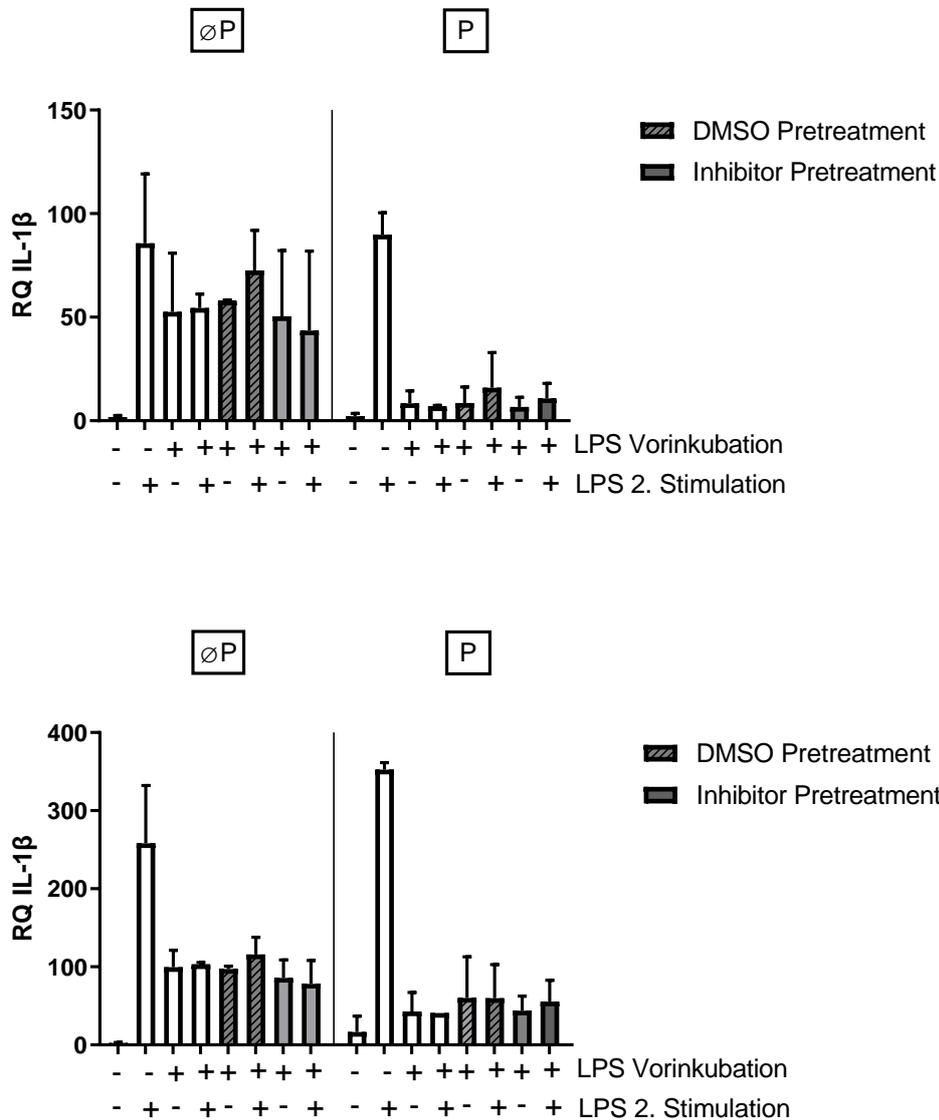


Abb. 26: Stimulation von A549 Zellen mit konditionierten Medien aus THP-1 Zellen unter Zugabe von Inhibitoren der Histonmodifikation (TSA und DCB in DMSO), qPCR-Ergebnisse IL-1 β und TNF- α :

Herstellen der konditionierten Medien mit bzw. ohne Passagierung (P bzw. øP) wie in 2.3.3 erläutert. Stimulation der A549-Zellen mit konditionierten Medien: Inkubation für 6 Stunden. Analyse: qPCR IL-1 β bzw. TNF- α . Auswertung qPCR: MW + SD (Mittelwert + Standardabweichung), n=4. ANOVA, Tukey Multiple Comparison Test. ns = P > 0.05, * = P ≤ 0.05, ** = P ≤ 0.01, *** = P ≤ 0.001, **** = P ≤ 0.0001.

In den konditionierten Medien aus THP-1 Zellen, die nicht passagiert wurden, waren alle im Zeitraum der Stimulation und Restimulation ausgeschütteten Zytokine enthalten, während die konditionierten Medien passagierter Zellen nur die Zytokine aufweisen, die als Antwort auf die erneute Exposition gegenüber LPS ausgeschüttet wurden. Erwartungsgemäß lag daher in den Medien passagierter Zellen weniger Zytokin vor, als in denen von Zellen, die zwischenzeitlich keine Passage unterzogen wurden.

Es zeigte sich ein proportionales Ansprechen der transkriptionellen Aktivität der A549-Zellen auf die im ELISA nachweisbaren Zytokin-Level im konditionierten Medium (s. Abbildung 25). Auch hier schien der Inhibitor keinen Einfluss auf die Zytokin-Aktivität der A549-Zellen zu haben, die eine klar proinflammatorische Antwort zeigten. Da im konditionierten Medium der toleranten Zellen, wie in Abbildungen 15 und 16 erkennbar, niedrigere Konzentrationen an proinflammatorischen Zytokinen herrschten, war analog auch eine signifikant niedrigere Antwort der A549 Zellen auf das konditionierte Medium aus diesen Gruppen zu beobachten. Wie unter 3.3 beschrieben, konnte durch gleichzeitige Inkubation mit den Inhibitoren der Histonmodifikation (TSA und DCB) keine signifikante Veränderung der Endotoxin-Toleranz von THP-1 Zellen beobachtet werden im Vergleich zu THP-1 Zellen, die nicht mit Inhibitoren inkubiert wurden. Analog unterschied sich auch die proinflammatorische Immunantwort der A549-Zellen nicht zwischen Versuchsgruppen mit bzw. ohne Inhibitor-Zugabe.

4. Diskussion

Das Compensatory Antiinflammatory Response Syndrom (CARS) zeichnet sich, wie in 1.3 beschrieben durch ein verringertes Langzeit-Überleben der Patienten im Zeitraum bis zu acht Jahre nach initialer Inflammation aus. Die Zellen der angeborenen Immunantwort verfügen über eine intravasale Lebensspanne weniger Stunden bis einiger Tage (Borghans et al., 2018). Daher muss jeder Effekt, der von Zellen der angeborenen Immunantwort ausgeht, über viele Zell-Generationen persistieren.

4.1 Endotoxin-Toleranz lässt sich im Zellmodell mit THP-1 Makrophagen simulieren und anhand proinflammatorischer Zytokine auf Gen- und Proteinebene nachweisen

Die Induzierbarkeit von Endotoxin-Toleranz wurde *in vitro* anhand humaner PBMCs und THP-1 Zellen (Shiratori et al., 2017), (Yoza et al., 1998b; Yoza et al., 1998a) sowie an murinen Monozyten (Dobrovolskaia et al., 2003) nachgewiesen. Zur Induktion einer möglichst langanhaltenden Endotoxin-Toleranz, sowie zur Simulation einer fulminanten Sepsis, entschieden wir uns für die Stimulation mit einer hohen LPS-Dosis über den gewählten Zeitraum, wie oben beschrieben. Hierunter ließ sich eine Endotoxin-Toleranz etablieren, die durch signifikant verminderte Freisetzung und Transkription der proinflammatorischen Zytokine IL1- β und TNF- α gezeigt werden konnte. Diese Zytokine wurden zum Nachweis der Endotoxin-Toleranz gewählt, da sie maßgebliche Produkte der TLR-4 Signalkaskade sind (Russell et al., 2011) und im Rahmen der Toleranzinduktion supprimiert werden (Fan und Cook, 2004).

Der Nachweis der Entwicklung einer Endotoxin-Toleranz basierend auf epigenetischen Modifikationen ist bei monozytären Zellen schwer zu erbringen, da diese Zellen nicht mehr teilungsfähig sind. Anhand primärer monozytärer Zellen (PBMCs, BMDMs) lässt sich realistisch eine akute Infektion simulieren und nachvollziehen. Diese Zellen sind jedoch nicht teilungsfähig und haben *ex vivo* eine stark verkürzte Lebensdauer, was eine Beobachtung über mehr als 24 Stunden erschwert. THP-1 Zellen hingegen sind Zellen einer monozytären Leukämie und damit immortalisiert und teilungsfähig. Sie lassen sich

über lange Zeit inkubieren und sind geeignet für die Untersuchung eines Langzeit-Effektes.

Durch den Schritt des Mediumwechsels vor erneuter Stimulation ließ sich die Endotoxin-Toleranz deutlicher darstellen. Dieser diente der Elimination im Medium verbleibender Zytokine, ein hiernach anhaltender und zwischen Zellgenerationen vererbbarer Effekt muss also auf epigenetischen Prozessen beruhen. Im Vergleich der Gruppe mit Mediumwechsel zu der Gruppe ohne Mediumwechsel ergibt sich, dass der Großteil der Zytokin-Freisetzung in der toleranzinduzierten Gruppe innerhalb der Präinkubation, also innerhalb der ersten 48 Stunden, erfolgt sein muss. Möglich wäre daher im Falle von IL-1 β eine Erschöpfung des zytosolisch vorliegenden Pro-Zytokins und daher eine Abnahme der Freisetzung nach Aktivierung durch die Caspase-1. Hier lässt sich jedoch argumentieren, dass dieser Effekt mit niedrigeren Dosen Endotoxin, so bezeichneten „super low doses“ (Morris und Li, 2012) umgangen werden kann. Nach Stimulation mit niedrigeren Dosen (0,1 ng/ml) lässt sich *in vivo* und *in vitro* eine Konditionierung, also eine verstärkte Reaktion auf einen zweiten, stärkeren Stimulus (100 ng/ml LPS), etablieren. Hier sind unterschiedliche Dosierungen und Zeiträume beschrieben, insgesamt umfassten die Beobachtungszeiträume z. B. jeweils 4 Stunden (Deng et al., 2013). Diskutiert wird hierbei, dass es im Rahmen der Immunkonditionierung, anders als bei der Immuntoleranz, nicht zu einer Aktivierung des NF κ B Signalwegs kommt, welcher über verschiedene Signalwege (SOCS, I κ B α , MKP-1) neben proinflammatorischen auch kompensatorische negative Regulatoren aktiviert (Morris und Li, 2012), (Ifrim et al., 2014). Demnach handelt es sich bei dem hier beobachteten Effekt am ehesten um einen tatsächlichen Toleranzeffekt und nicht um eine Erschöpfung der Zytokinspeicher. Ebenfalls lässt sich dies durch die gleichzeitig verminderte Freisetzung von Zytokinen, wie auch auf mRNA-Ebene bestärken. Eine Erschöpfung des zytosolisch gespeicherten Zytokins würde nicht zu einer Herabregulation der Genexpression des beobachteten Zytokins führen. Während anhand von TNF- α eine prompte Induktion der Endotoxin-Toleranz beobachtet werden kann, scheint die Freisetzung von IL-1 β etwas verlangsamt herunterreguliert zu werden. Auf Ebene der Genexpression lässt sich der Effekt der Toleranzinduktion schon nach 48 Stunden in voller Deutlichkeit nachweisen. Ausschlaggebend hierfür ist vermutlich der zusätzliche Aktivierungsschritt in der IL-1 β

Synthese, der eine Verzögerung der IL-1 β Freisetzung durch die NLRP-3 Inflammasom-abhängige Spaltung des pro-IL-1 β mittels Caspase bewirkt (Latz et al., 2013). Auch das Inflammasom unterliegt einer Modulation im Rahmen der Sepsis, in deren Rahmen es zu einer Hochregulation der SREBP (sterol regulatory element binding proteins), welche induzierend auf NLRP3, die Bildung von ASC-Dimeren, das Inflammasom und damit die Freisetzung von aktiviertem IL-1 β wirken (Thapa und Lee, 2019). Damit ist dieser Mechanismus gegenüber der Sekretion eines aktiven Zytokins verlangsamt. Theoretisch lässt sich durch zum Zeitpunkt der Gegenregulation bereits dimerisiertem ASC, welches dann zu einer Aktivierung des bereits zytosolisch vorliegenden Pro-IL-1 β führt, ein verzögerter Eintritt der Endotoxin-Toleranz erklären.

Das Protein TNF- α wird bereits in aktiver Form sezerniert und zeigt vermutlich daher eine promptere Toleranzinduktion.

Die Toleranzinduktion zeigt sich in einer reduzierten Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine und nicht in einer signifikant vermehrten Antiinflammation. Für die Zytokine IL-10 und IL-6 ließ sich keine signifikante Modulation der Immunantwort nachweisen. In der Modulation des NF κ B Signalweges sind neben IL-10 auch SOCS (Biswas und Lopez-Collazo, 2009), und miRNAs (Vergadi et al., 2018), sowie PPAR γ beteiligt. IL-10 unterdrückt die Expression von TNF- α und IL-1 β , ist jedoch nicht Auslöser der Immuntoleranz (Fan und Cook, 2004). Die Gewichtung der einzelnen Faktoren in ihrer Auswirkung auf die Immunmodulation ist hierbei jedoch unklar. Das hergebrachte Modell der differentiellen CAM- (classically activated macrophages) oder AAM-Polarisierung (alternatively activated macrophages), bei dem CAMs eine hohe proinflammatorische, AAMs eine hohe antiinflammatorische Zytokinexpression zugeschrieben wird, erscheint jedoch eine stark vereinfachte Darstellung eines Spektrums unterschiedlicher Aktivierungen monozytärer Zellen zu sein (Hoeksema und Winther, 2016).

4.2 Endotoxin-Toleranz lässt sich über mehrere Zellgenerationen nachweisen

In den Passage-Versuchen konnte hier eine Persistenz der Toleranz der Monozyten gegenüber bakteriellem Lipopolysaccharid nachgewiesen werden. Da in diesem Modell

kein anderer Zelltyp beteiligt war und der Effekt über die mittlere Teilungsrate der THP-1 Zellen (36-48 Stunden) hinausgeht, liegt eine epigenetische Veränderung als Ursache der verminderten Stimulierbarkeit nahe. In jedem Falle lässt sich anhand der bekannten Generationsdauer postulieren, dass eine Endotoxin-Toleranz auch in einer Tochter-Zellpopulation vormals toleranzinduzierter Zellen nachweisbar ist und die beobachtete Toleranz sich zwischen Zellgenerationen (also etwa 48 h) nicht um mehr als 50 % verringert, wie es bei einem reinen Verdünnungseffekt durch Entstehung neuer, nicht toleranter Zellen der Fall wäre.

Zur Bestimmung der Vitalität bzw. der mitochondrialen Funktion wurden MTT- und LDH-Assays durchgeführt, in denen sich jeweils in der akuten Phase nach initialer Stimulation eine Verminderung der Vitalität bzw. eine vermehrte Zytotoxizität über alle LPS-stimulierten Gruppen hinweg ergab. Es ergab sich kein signifikanter Unterschied der Zytotoxizitätsniveaus in Bezug auf die Stimulationsdauer (3 bzw. 48 Stunden). Es scheint sich hier also um einen unmittelbaren bzw. kurzfristigen Effekt zu handeln.

Der Effekt auf die Zytokinexpression überdauert die passager eingeschränkte Vitalität nach initialer LPS-Stimulation, weshalb von einem Effekt auszugehen ist, der die initial vorherrschende immunometabolische Paralyse der akuten Sepsis überdauert. Es lässt sich argumentieren, dass es in diesem Zeitfenster der ersten 48 Stunden nach Beginn der Stimulation zu einer Selektion der monozytären Zellen kommt. Bekanntlich weisen M1 und M2 Makrophagen einen unterschiedlichen Metabolismus auf. Während M1 Makrophagen sich durch den eingangs beschriebenen Warburg-Effekt auszeichnen, liegt in M2 Makrophagen eine Verschiebung zugunsten der oxidativen Phosphorylierung und eines gesteigerten Fettsäure-Stoffwechsels vor (Thapa und Lee, 2019). Dem gegenüber steht die metabolische Dysregulation Endotoxin toleranter Zellen, die eine Herabregulation des gesamten Energiestoffwechsels aufweisen (Cheng et al., 2016) .

Die Veränderungen des Metabolismus (Cheng et al., 2016) und die massive Proinflammation, sowie die durch das Inflammasom induzierte Pyroptose (Latz et al., 2013) könnte zu einem Untergang der proinflammatorisch polarisierten Zellen führen, in dessen Folge die M2 oder alternativ aktivierten Monozyten überwiegen. Es käme somit zu einer Selektion der antiinflammatorischen Zellen und einer Verbreitung der

antiinflammatorischen Ausprägung auf die nachfolgenden Zell-Generationen. Fraglich ist, ob die Polarisierung der monozytären Zellen stets fluktuierend und reversibel ist oder als Reaktion auf den endotoxinen Stimulus induziert wird.

Möglich ist zudem das Vorliegen einer *Hibernation*, also einer vorübergehenden, winterschlafartigen Phase mit Herunterregulation des Zellmetabolismus. Hierdurch ließe sich der erneute Anstieg der Zytokinexpression nach 7 Tagen erklären. In in-vivo Studien zeigte sich in PBMCs aus Sepsis-Patienten eine Erholung der immunometabolischen Paralyse nach Erholung der Patienten, etwa 7 Tage nach Beginn der Sepsis (Cheng et al., 2016). Hierbei könnte es sich um naive PBMCs handeln, die erst nach Exposition der ersten Zellen gegenüber dem Stimulus aus Knochenmark oder Milz freigesetzt wurden. In vitro zeigt sich bei THP-1 Zellen etwa fünf Tage nach Endotoxin-Stimulation eine Regeneration der initial attenuierten Proliferationsrate (Weisheit et al., 2020). Der MTT Assay setzt herabgesetzte mitochondriale Aktivität mit Zelltod gleich. Ein winterschlafartiger Zustand würde hierbei nicht berücksichtigt. Ggf. ist die erniedrigte Vitalität über einen kurzfristigen Zeitraum Ausdruck der mitochondrialen Dysfunktion bzw. metabolischen Paralyse.

4.3 Die Veränderung der Endotoxin-Toleranz über mehrere Zellgenerationen geht nicht mit einer anhaltenden Veränderung der Vitalität einher.

Wie unter 4.2. geschildert, kommt es nicht zu einer anhaltenden Einschränkung der Vitalität der LPS-inkubierten Zellen. Die Zytotoxizität unterscheidet sich zwischen den Gruppen der LPS-präinkubierten THP-1 Zellen und denen, welche erstmalig stimuliert wurden nicht signifikant. Die Dauer der LPS-Exposition scheint hierbei also nicht maßgeblich zu sein. Der LDH Assay ist als Messinstrument der Auswirkungen von Zytotoxizität auf Zellen gedacht, kann aber ggf. auch Aufschluss über die metabolische Situation der Zellen geben. Gemessen wird die LDH-Freisetzung im Medium, was mit Zelltod gleichgesetzt wird.

Dass die zweifach stimulierten THP-1 Zellen kein signifikant höheres LDH-Niveau aufweisen als die präinkubierten Zellen, spricht ggf. für eine eingeschränkte

Laktatproduktion. LDH lässt sich nicht mit Laktat gleichsetzen, hierzu wäre ein Laktat-Assay erforderlich. Hier konnte durch Weisheit und Mitarbeiter (Weisheit et al., 2020) kein signifikanter Unterschied in der Laktatproduktion toleranter gegenüber nicht toleranter THP-1 Zellen im Rahmen einer erneuten LPS-Exposition festgestellt werden. Dies könnte gegebenenfalls Ausdruck eines antagonistischen Effekts sein; die Laktatproduktion ist in toleranzinduzierten PBMC-Zellen erniedrigt (Cheng et al., 2016), jedoch ist die Laktatproduktion in Krebszellen gesteigert (San-Millán und Brooks, 2017), bei THP-1 Zellen handelt es sich um monozytäre Leukämiezellen. Es lässt sich spekulieren, dass beide Effekte sich ggf. aufheben.

4.4 Die Immunantwort der monozytären Zellen löst eine adäquate Proinflammation in Gewebezellen (A549) aus

Bei A549-Zellen handelt es sich um eine humane Zelllinie eines pulmonalen Adenocarcinoms. Sie lassen sich am ehesten als Alveolarzellen Typ II (AT-II) charakterisieren (Foster et al., 1998) und werden aufgrund ihrer guten Kultivierbarkeit häufig als AT-II-Zellmodell eingesetzt (Thorley et al., 2007).

Alveoläre Makrophagen und Pneumozyten bilden als gewebständige Zellen der Lunge die lokale Immunabwehr und tragen Toll-like Rezeptoren, insbesondere TLR-4 und TLR-2. Sie verursachen bei Antigen-Exposition über Chemokine und Zytokine die Aktivierung und Migration zirkulierender Immunzellen (Thorley et al., 2007), (Goodman et al., 1998). Die proinflammatorischen Zytokine werden hauptsächlich von Alveolarmakrophagen sezerniert, doch auch das pulmonale Epithel spielt eine Rolle in der Ausschüttung von Zyto- und Chemokinen (Manicone, 2009) wie MCP-1, IL-8 und Growth-Related Oncogene α (GRO- α) als Reaktion auf einen bakteriellen Stimulus (Thorley et al., 2007). Massiv verstärkt wird die Immunantwort jedoch im Zusammenspiel der monozytären und epithelialen Zellen, es kommt in Co-Kulturen, durch TNF- α mediiert, zu einem massiven Anstieg der Zytokinausschüttung alveolarer Epithelzellen (Grandel et al., 2009).

Die Stimulation mit LPS führt in unserem Versuchsaufbau mit A549-Zellen nicht zu einer relevanten Ausschüttung von IL1- β . Die Antwort der A549-Zellen auf rekombinantes IL1-

β hingegen ist konditionierbar und nicht toleranzinduzierbar. Die Immunantwort verstärkt sich also durch höhere Dosen und längere Inkubation mit rekombinantem IL-1 β und schwächt sich mit wiederholter Exposition nicht ab. In Versuchen mit konditionierten Medien spiegeln die Gewebezellen in ihrer Immunantwort die Zytokin-Niveaus der THP-1 Zellen wider. Konditionierte Medien toleranzinduzierter Zellen rufen demnach eine geringere IL-1 β Antwort in den A549-Zellen hervor als Medien erstmalig stimulierter THP-1-Zellen. Hierdurch lässt sich ableiten, dass es zu einer reduzierten Ausschüttung der beobachteten proinflammatorischen Zytokine kommt und nicht zu einer signifikanten gegenregulatorischen antiinflammatorischen Immunantwort.

4.5 Die gewählten Inhibitoren verändern nicht die (epigenetische) Toleranzinduktion in der Langzeit-Beobachtung über drei Passagen

Eine Veränderung der Immunantwort hinsichtlich der Polarisierung unter kombinierter HDAC/DNMT Therapie ließ sich im THP-1 Modell weder im kurzfristigen Zeitraum noch über den verlängerten Zeitraum von 7 Tagen, bzw drei Passagen nachweisen. Nach (Thangavel et al., 2015) wäre mit einer Verlagerung der Immunantwort zugunsten einer M2 Polarisierung der Makrophagen zu rechnen, sowie mit einer verbesserten Vitalität während der LPS-Stimulation. Es stellte sich lediglich mittelfristig eine verbesserte Vitalität der LPS-stimulierten Zellen unter Inhibitor-Therapie ein. Während der simulierten akuten Phase der Inflammation, also der 48-stündigen Präinkubation, ergab sich keine Verbesserung der Vitalität als Effekt der Inhibitor-Therapie, wie er im Rahmen der Untersuchungen von Thangavel et al. beschrieben worden war. Wir vermuten, dass dem die Natur der immortalisierten THP-1 Zellen zugrunde liegt. Die verwendeten Substanzen werden zur Therapie z. B. der AML eingesetzt und verhindern in handelsüblicher Dosierung die Proliferation maligner Zellen über eine Veränderung der Methylierungsmuster an Promoterregionen und Unterdrückung von de-novo Methylierungen (Bender et al., 1998). Bei Decitabin (5-Aza) und Trichostatin-A (TSA) handelt es sich um Substanzen, welche als Zytostatika zugelassen sind und hier, zur Vermeidung eines zytotoxischen Effekts, in niedriger Dosierung eingesetzt wurden. In der o.g. Arbeit von Thangavel et al. wurden jedoch BMDMs aus Mäusen verwendet. Ggf.

liegen hier antagonistisch wirkende Effekte der Inhibitoren auf die Zellproliferation vor. Wie unter 3.3 erwähnt, haben die gewählten Inhibitoren der Histonmodifikation (Decitabin und Trichostatin A) keinen signifikanten Langzeit-Effekt auf die Toleranzinduktion in THP-1 Zellen. Die Entwicklung und Persistenz einer Endotoxin-Toleranz über mehrere Zellgenerationen hinweg durch epigenetische Modifikationen wird also entweder durch die gewählten Substanzen nicht suffizient gehemmt, oder die Ausbildung und Aufrechterhaltung der Endotoxin-Toleranz ist nicht hauptsächlich durch epigenetische Modifikationen zu begründen.

4.6 Limitationen der Arbeit

Eine Untersuchung von (epigenetischen) Langzeiteffekten ist anhand primärer humaner monozytärer Zellen aufgrund der fehlenden Teilungsfähigkeit und verkürzten Lebensdauer dieser Zellen nicht sinnvoll möglich. Daher wurden immortalisierte Zellen der THP-1 Linie für die durchgeführten Versuche gewählt. Jedoch lässt die Untersuchung anhand solcher immortalisierter Zellen nur bedingt Rückschlüsse auf die Verhältnisse *in vivo* zu, da der Stoffwechsel, wie auch die Signalkaskaden in immortalisierten Zellen mitunter stark von *in vivo* Modellen abweichen (Schildberger et al., 2013).

Zudem wird hier durch eine ausschließliche Stimulation mit bakteriellem Endotoxin eine selektive Stimulation einzelner PRRs (siehe 1.4) simuliert. Die verschiedenen aufgeführten Membranrezeptoren werden durch unterschiedliche mikrobielle Liganden aktiviert, die nachgeschalteten Signalwege weichen je nach Stimulus voneinander ab. So führt zum Beispiel die Stimulation mit Lipoteichonsäure zu einer vermehrten Aktivierung des TLR-2 Signalweges, die Aktivierung von TLR-9 geschieht jedoch vermehrt durch CpG-DNA (Ifrim et al., 2014). *In vitro* wäre bei Stimulation mit Bakterien oder unterschiedlichen Liganden mit einer komplexeren gegenseitigen Beeinflussung der unterschiedlichen Signalkaskaden zu rechnen, welche über Signalproteine und Kinasen wie MyD88 und IRAK-1 die proinflammatorische Immunantwort regulieren (Kawasaki und Kawai, 2014).

Auch die Wirkung der Inhibitoren der Histonmodifikation könnte durch die genetischen Unterschiede der immortalisierten THP-1 Zellen gegenüber z. B. PBMCs verändert sein. Die verwendeten Inhibitoren Decitabin (5-Aza) und Trichostatin-A (TSA) scheinen im MTT-Assay die Regeneration der Vitalität positiv zu beeinflussen, jedoch müssen Vitalität, Proliferation und Endotoxin-Toleranz nicht zwingend Ausdruck derselben inflammatorischen Prozesse sein und können unabhängig voneinander beeinflusst werden. Zur genaueren Beleuchtung dieser Fragestellung wären jedoch detaillierte Beobachtungen von Nöten. Außerdem wäre es notwendig, den Unterschied der Vitalitätsbestimmung und Bestimmung der mitochondrialen Aktivität zu quantifizieren, da die Zellen in einer Art Hibernation ebenfalls eine herabgesetzte metabolische Aktivität aufweisen würden. Der MTT-Assay setzt jedoch die Verminderung metabolischer Aktivität mit verminderter Vitalität gleich. Es wäre also eine vergleichende Analyse mittels MTT und Live/Dead-Assay (FACS-Analyse) notwendig, um zuverlässige Aussagen hierzu zuzulassen.

A549 Zellen (Alveolarzellen) wurden als Vertreter häufig im Rahmen einer Sepsis betroffener Gewebe gewählt. Als solche sind sie an der Immunantwort beteiligt. Jedoch bildet das untersuchte Zytokin IL-1 β nicht die führende Immunantwort der alveolaren Epithelzellen ab (Thorley et al., 2007). Interessant wäre, ob die Ausschüttung der hauptsächlich in ATII-Zellen ausgeschütteten Zytokine und Chemokine (wie MCP-1, IL-8 und Growth-Related Oncogene α) in A549 Zellen ebenfalls die Endotoxin-Toleranz der monozytären Zellen widerspiegelt, oder ob es hierbei zu einem Konditionierungseffekt kommt. Zudem sind A549-Zellen, ebenso wie THP-1 Zellen als immortale Zelllinien nicht vollständig zur Simulation einer in-vivo Situation geeignet. Hierzu wäre ein Cokultur-Zellmodell aus isolierten primären humanen Alveolar- und monozytären Zellen geeignet, um die möglichen Mechanismen der Endotoxin-Toleranz und deren Auswirkungen auf Chemotaxis und Inflammation gewebsständiger Zellen zu charakterisieren. Zudem liegen im pulmonalen Gewebe verschiedene Typen von Alveolarzellen gemeinsam vor, zudem kommt es im Rahmen der Inflammation zum Einwandern zirkulierender Immunzellen wie z. B. Granulozyten in das Gewebe. Dies lässt sich in vitro nur sehr eingeschränkt simulieren.

5. Zusammenfassung

CARS (Compensatory Antiinflammatory Response Syndrome) beschreibt eine durch SIRS oder Sepsis induzierte Immunparalyse, die den Wirt prolongiert anfällig für opportunistische Infektionen macht. Ursächlich hierfür ist neben einer Depletion der Leukozyten auch die Ausbildung einer Endotoxin-Toleranz in Immunzellen (Carson et al., 2011). Mechanismen der Endotoxin-Toleranz umfassen neben Modifikationen der molekularen Signaltransduktion, insbesondere des TLR-4-NF κ B-Signalwegs (Morris und Li, 2012), auch epigenetische Veränderungen der Transkriptionsaktivität z. B. proinflammatorischer Zytokine (Hoeksema und Winther, 2016), sowie Veränderungen des Metabolismus von Immunzellen mit Entstehung einer metabolischen Paralyse (Cheng et al., 2016). Unter Inhibition der Histonmodifikation konnte *in vitro* und *in vivo* eine Verlagerung der Monozyten-Polarisierung zugunsten eines antiinflammatorischen Zelltyps mit zellprotektivem Effekt und nachfolgend verringerter Apoptose-Rate und verlängertem Überleben bei LPS-induzierter Inflammation beobachtet werden (Thangavel et al., 2015). Ziel der vorliegenden Arbeit war die Etablierung eines Modells zur Untersuchung der Endotoxin-Toleranz von monozytären Zellen über einen Zeitraum von bis zu sieben Tagen, um die Persistenz der Veränderungen über mehrere Zellgenerationen zu untersuchen und ob die Endotoxin-Toleranz durch Inhibitoren der Histonmodifikation (Trichostatin A und Decitabine) modifiziert werden kann.

Hierzu wurde in humanen, immortalisierten monozytären Zellen (THP-1) durch Zugabe von LPS (1 mg/ml) eine Endotoxin-Toleranz induziert und über einen Zeitraum von sieben Tagen die Immunantwort und Zellvitalität unter Zugabe von oben genannten Inhibitoren untersucht. Das gewählte THP-1 Modell erscheint zur Untersuchung der längerfristigen Effekte einer Endotoxin-Toleranz prinzipiell geeignet, die Endotoxin-Toleranz lässt sich in diesem Modell etablieren und die Persistenz über einen Zeitraum von sieben Tagen, bis zu drei Zellteilungen, beobachten. Anhand der proinflammatorischen Zytokine IL1- β und TNF- α lässt sich eine anhaltende Herabregulation im Rahmen der Endotoxin-Toleranz nachweisen. Diese scheint nicht durch eine anhaltend verminderte Vitalität der Endotoxin stimulierten Zellen bedingt zu sein. Eine führende oder zunehmende Antiinflammation als

Motor der Endotoxin-Toleranz ließ sich nicht nachweisen. Die verminderte Stimulierbarkeit der THP-1 Zellen lässt sich durch Zugabe von Inhibitoren der Histonmodifikation nicht modifizieren, diese haben zudem keine signifikante Auswirkung auf die Vitalität der Zellen. Die nachweisbar anhaltende Immunparalyse spricht für eine Weitergabe der Endotoxin-Toleranz über mindestens drei Zellgenerationen hinaus, ein relevanter Auswascheffekt der Toleranz durch Zellteilung lässt sich nicht darstellen, was eine epigenetische Modifikation als Ursache der anhaltenden Endotoxin-Toleranz nahelegt. Neben der veränderten Immunantwort scheint auch der Metabolismus der Zellen zumindest kurzfristig verändert zu sein. Möglich wäre eine Selektion von antiinflammatorisch polarisierten Monozyten oder eine Veränderung der Polarisierung durch Endotoxin Exposition. Durch anhaltende immuno-metabolische Veränderungen, die über Zellgenerationen hinweg vererbt werden, lässt sich die im Menschen beobachtete, teils Monate anhaltende Immundefizienz im Rahmen des CARS nachvollziehen.

6. Abbildungsverzeichnis

| | |
|---|----|
| Abb. 1: Das Verhältnis von SIRS, Sepsis und Infektion. | 13 |
| Abb. 2: Zeitverlauf der Immunantwort während septischer Infektionen | 15 |
| Abb. 3: Veränderung der Signaltransduktion bei Toleranzinduktion..... | 20 |
| Abb. 4: Kondensation von DNA in Chromatin durch Histone | 22 |
| Abb. 5: Glykolyse und nachgeschaltete Stoffwechselwege unter aeroben und anaeroben Bedingungen..... | 25 |
| Abb. 6: schematisierter Ablauf der Inhibitor-Passage Versuche | 37 |
| Abb. 7: Darstellung Ct-Wert, Δ CT-Wert und $\Delta\Delta$ CT-Wert: Hierbei ist Gruppe A die Kontroll-Gruppe und Gruppe B die behandelte Gruppe, 18s das Referenz-Gen und IL-1 β das Ziel-Gen..... | 42 |
| Abb. 8: Sandwich-ELISA, erstellt mit BioRender.com | 44 |
| Abb. 9: Prinzip des LDH-Assays | 46 |
| Abb. 10 Beispiel Platteninkubationsschema MTT-Versuche | 48 |
| Abb. 11: LPS- Toleranzinduktion THP-1 qPCR- und ELISA-Ergebnisse TNF- α :..... | 51 |
| Abb. 12: LPS- Toleranzinduktion THP-1 qPCR- und ELISA-Ergebnisse IL-1 β : | 53 |
| Abb. 13: LPS-Toleranzinduktion THP-1 qPCR- und ELISA-Ergebnisse TNF- α mit Mediumwechsel: | 55 |
| Abb. 14 LPS-Toleranzinduktion THP-1 qPCR- und ELISA-Ergebnisse IL-1 β mit Mediumwechsel: | 56 |
| Abb. 15: LPS-Toleranzinduktion THP-1 LDH Zytotoxizität Ergebnisse: | 57 |
| Abb.16: LPS-Toleranzinduktion THP-1 Vitalität MTT-Auswertung: | 58 |
| Abb. 17: Langzeit LPS-Toleranzentwicklung THP-1 qPCR-Ergebnisse IL-1 β und TNF- α :..... | 60 |
| Abb. 18: Langzeit LPS-Toleranzentwicklung THP-1 ELISA-Ergebnisse IL-1 β und TNF- α : | 61 |
| Abb. 19: LPS-Toleranzentwicklung THP-1 qPCR-Ergebnisse IL-10 und IL-6: | 62 |
| Abb. 20: THP-1 LPS-Toleranzentwicklung ELISA-Ergebnisse IL-1 β , Langzeit-Versuch mit Zugabe von Inhibitoren der Histonmodifikation (TSA und DCB in DMSO): | 64 |

| | |
|---|----|
| Abb. 21: THP-1 LPS-Toleranzentwicklung ELISA-Ergebnisse TNF- α , Langzeit-Versuch mit Zugabe von Inhibitoren der Histonmodifikation (TSA und DCB in DMSO): | 65 |
| Abb. 22: THP-1 LPS-Toleranzentwicklung qPCR-Ergebnisse IL-1 β und TNF- α Langzeit-Versuch mit Zugabe von Inhibitoren der Histonmodifikation (TSA und DCB in DMSO): | 66 |
| Abb. 23: MTT Auswertung Langzeit-Versuch mit Zugabe von Inhibitoren der Histonmodifikation (TSA und DCB in DMSO): | 67 |
| Abb. 24: LPS-Stimulation A549 Zellen, IL-1 β ELISA: | 69 |
| Abb. 25: Stimulation A549 Zellen mit rekombinatem IL-1 β , qPCR IL1-b: | 70 |
| Abb. 26: Stimulation von A549 Zellen mit konditionierten Medien aus THP-1 Zellen unter Zugabe von Inhibitoren der Histonmodifikation (TSA und DCB in DMSO), qPCR-Ergebnisse IL-1 β und TNF- α : | 72 |

7. Tabellenverzeichnis

| | |
|---|----|
| Tab. 1: Übersicht über die pro- und anti-inflammatorischen Zytokine, | 11 |
| Tab. 2: SOFA Score, Aus (Robert Koch-Institut (RKI)) Epidemiologisches Bulletin..... | 14 |
| Tab. 4: Versuchsgruppen Endotoxin-Toleranz THP-1 | 35 |
| Tab. 5: Zusammensetzung RT-Master-Mix | 39 |
| Tab. 6: Zusammensetzung Master-Mix qPCR | 43 |
| Tab. 7: Versuchsgruppen Endotoxin-Toleranz THP-1 | 50 |

8. Literaturverzeichnis

Adib-Conquy M, Cavaillon J-M (2009) Compensatory anti-inflammatory response syndrome. *Thromb Haemost* 101:36–47

An overview of the innate immune system - UpToDate (20.08.2018) (Zugriff vom 28.08.2018). https://www.uptodate.com/contents/an-overview-of-the-innate-immune-system?search=innate%20immune%20system&source=search_result&selectedTitle=1~150&usage_type=default&display_rank=1

Audet M-C, Anisman H (2013) Interplay between pro-inflammatory cytokines and growth factors in depressive illnesses. *Front Cell Neurosci* 7:68

Bender CM, Pao MM, Jones PA (1998) Inhibition of DNA methylation by 5-aza-2'-deoxycytidine suppresses the growth of human tumor cell lines. *Cancer research* 58:95–101

Biswas SK, Lopez-Collazo E (2009) Endotoxin tolerance: new mechanisms, molecules and clinical significance. *Trends in Immunology* 30:475–487

Bone RC (1996) Sir Isaac Newton, sepsis, SIRS, and CARS. *Crit Care Med* 24:1125–1128

Borghans JAM, Tesselaar K, Boer RJ de (2018) Current best estimates for the average lifespans of mouse and human leukocytes: reviewing two decades of deuterium-labeling experiments. *Immunol Rev* 285:233–248

Carson WF, Cavassani KA, Dou Y, Kunkel SL (2011) Epigenetic regulation of immune cell functions during post-septic immunosuppression. *Epigenetics* 6:273–283

Charles A Janeway, JR, Travers P, Walport M, Shlomchik MJ (2001) Principles of innate and adaptive immunity. Garland Science

Cheng S-C, Scicluna BP, Arts RJW, Gresnigt MS, Lachmandas E, Giamarellos-Bourboulis EJ, Kox M, Manjeri GR, Wagenaars JAL, Cremer OL, Leentjens J, van der Meer AJ et al (2016) Broad defects in the energy metabolism of leukocytes underlie immunoparalysis in sepsis. *Nat Immunol* 17:406–413

- Chomczynski P, Sacchi N (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162:156–159
- Ciarlo E, Savva A, Roger T (2013) Epigenetics in sepsis: targeting histone deacetylases. *Int J Antimicrob Agents* 42 Suppl:S8-12
- Deng H, Maitra U, Morris M, Li L (2013) Molecular mechanism responsible for the priming of macrophage activation. *J Biol Chem* 288:3897–3906
- Dobrovolskaia MA, Medvedev AE, Thomas KE, Cuesta N, Toshchakov V, Ren T, Cody MJ, Michalek SM, Rice NR, Vogel SN (2003) Induction of in vitro reprogramming by Toll-like receptor (TLR)2 and TLR4 agonists in murine macrophages: effects of TLR "homotolerance" versus "heterotolerance" on NF-kappa B signaling pathway components. *J Immunol* 170:508–519
- Fan H, Cook JA (2004) Molecular mechanisms of endotoxin tolerance. *J Endotoxin Res* 10:71–84
- Fleischmann C, Scherag A, Adhikari NKJ, Hartog CS, Tsaganos T, Schlattmann P, Angus DC, Reinhart K (2016) Assessment of Global Incidence and Mortality of Hospital-treated Sepsis. Current Estimates and Limitations. *Am J Respir Crit Care Med* 193:259–272
- Foster KA, Oster CG, Mayer MM, Avery ML, Audus KL (1998) Characterization of the A549 cell line as a type II pulmonary epithelial cell model for drug metabolism. *Experimental cell research* 243:359–366
- Goodman RB, Strieter RM, Frevert CW, Cummings CJ, Tekamp-Olson P, Kunkel SL, Walz A, Martin TR (1998) Quantitative comparison of C-X-C chemokines produced by endotoxin-stimulated human alveolar macrophages. *Am J Physiol* 275:L87-95
- Grandel U, Heygster D, Sibelius U, Fink L, Sigel S, Seeger W, Grimminger F, Hattar K (2009) Amplification of lipopolysaccharide-induced cytokine synthesis in non-small cell lung cancer/neutrophil cocultures. *Mol Cancer Res* 7:1729–1735
- Hoeksema MA, Winther MPJ de (2016) Epigenetic Regulation of Monocyte and Macrophage Function. *Antioxid Redox Signal* 25:758–774

- Horn F, Moc I (2012) Biochemie des Menschen. Das Lehrbuch für das Medizinstudium. Thieme: Stuttgart
- Hu SB, Zider A, Deng JC (2012) When host defense goes awry: Modeling sepsis-induced immunosuppression. *Drug Discov Today Dis Models* 9:e33-e38
- Ifrim DC, Quintin J, Joosten LAB, Jacobs C, Jansen T, Jacobs L, Gow NAR, Williams DL, van der Meer JWM, Netea MG (2014) Trained immunity or tolerance: opposing functional programs induced in human monocytes after engagement of various pattern recognition receptors. *Clin Vaccine Immunol* 21:534–545
- Janeway C (2001) Immunobiology. The immune system in health and disease ; [animated CD-ROM inside. Garland Publ: New York, NY
- Kawasaki T, Kawai T (2014) Toll-like receptor signaling pathways. *Front Immunol* 5:461
- Latz E, Xiao TS, Stutz A (2013) Activation and regulation of the inflammasomes. *Nat Rev Immunol* 13:397–411
- Löffler G (2008) Basiswissen Biochemie. Mit Pathobiochemie ; mit 139 Tabellen. Springer: Heidelberg
- Manicone AM (2009) Role of the pulmonary epithelium and inflammatory signals in acute lung injury. *Expert Rev Clin Immunol* 5:63–75
- Marik PE, Taeb AM (2017) SIRS, qSOFA and new sepsis definition. *J Thorac Dis* 9:943–945
- Martin M, Katz J, Vogel SN, Michalek SM (2001) Differential induction of endotoxin tolerance by lipopolysaccharides derived from *Porphyromonas gingivalis* and *Escherichia coli*. *J Immunol* 167:5278–5285
- Morris M, Li L (2012) Molecular mechanisms and pathological consequences of endotoxin tolerance and priming. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 60:13–18
- Narasimhan PB, Marcovecchio P, Hamers AAJ, Hedrick CC (2019) Nonclassical Monocytes in Health and Disease. *Annu Rev Immunol* 37:439–456
- Robert Koch-Institut Epidemiologisches Bulletin des Robert Koch-Institut Ausgabe 37/2017

- Russell JA, Boyd J, Nakada T, Thair S, Walley KR (2011) Molecular mechanisms of sepsis. *Contrib Microbiol* 17:48–85
- San-Millán I, Brooks GA (2017) Reexamining cancer metabolism: lactate production for carcinogenesis could be the purpose and explanation of the Warburg Effect. *Carcinogenesis* 38:119–133
- Schildberger A, Rossmanith E, Eichhorn T, Strassl K, Weber V (2013) Monocytes, peripheral blood mononuclear cells, and THP-1 cells exhibit different cytokine expression patterns following stimulation with lipopolysaccharide. *Mediators Inflamm* 2013:697972
- Shiratori H, Feinweber C, Luckhardt S, Linke B, Resch E, Geisslinger G, Weigert A, Parnham MJ (2017) THP-1 and human peripheral blood mononuclear cell-derived macrophages differ in their capacity to polarize in vitro. *Mol Immunol* 88:58–68
- Singer M, Deutschman CS, Seymour CW, Shankar-Hari M, Annane D, Bauer M, Bellomo R, Bernard GR, Chiche J-D, Coopersmith CM, Hotchkiss RS, Levy MM et al (2016) The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA* 315:801–810
- Thangavel J, Samanta S, Rajasingh S, Barani B, Xuan Y-T, Dawn B, Rajasingh J (2015) Epigenetic modifiers reduce inflammation and modulate macrophage phenotype during endotoxemia-induced acute lung injury. *J Cell Sci* 128:3094–3105
- Thapa B, Lee K (2019) Metabolic influence on macrophage polarization and pathogenesis. *BMB Rep.* 52:360–372
- Thorley AJ, Ford PA, Giembycz MA, Goldstraw P, Young A, Tetley TD (2007) Differential regulation of cytokine release and leukocyte migration by lipopolysaccharide-stimulated primary human lung alveolar type II epithelial cells and macrophages. *J Immunol* 178:463–473
- Vergadi E, Vaporidi K, Tsatsanis C (2018) Regulation of Endotoxin Tolerance and Compensatory Anti-inflammatory Response Syndrome by Non-coding RNAs. *Front Immunol* 9:2705

- Warburg O (1924) über den Stoffwechsel der Carcinomzelle. *Naturwissenschaften* 12:1131–1137
- Ward NS, Casserly B, Ayala A (2008) The compensatory anti-inflammatory response syndrome (CARS) in critically ill patients. *Clin Chest Med* 29:617-25, viii
- Weisheit CK, Klüners A, Wild L, Casalter A, Heilmann-Heimbach S, Sivalingam S, Kleiner JL, Ehrentraut SF, Hoeft A, Frede S, Ehrentraut H (2020) Sustained Immunoparalysis in Endotoxin-Tolerized Monocytic Cells. *Mediators Inflamm* 2020:8294342
- Yoza B, LaRue K, McCall C (1998a) Molecular mechanisms responsible for endotoxin tolerance. *Prog Clin Biol Res* 397:209–215
- Yoza BK, Wells JD, McCall CE (1998b) Interleukin-1 β Expression after Inhibition of Protein Phosphatases in Endotoxin-Tolerant Cells. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 5:281–287

9. Danksagungen

Mein Dank gilt Prof. Dr. Baumgarten, unter dessen Führung meine Forschung zu dieser Fragestellung an der Klinik für Anästhesiologie und Intensivmedizin initiiert wurde.

Bei dieser Gelegenheit muss ich zudem meiner Doktormutter PD Dr. Stilla Frede meinen Dank äußern, die meine Arbeit durch ihre Unterstützung und Beratung beeinflusst hat und sich zur Übernahme meines Doktoranden-Betreuungs-Vertrages zum Promotionsverfahren bereit erklärt hat.

Mein besonderer Dank gilt meinen wissenschaftlichen Betreuerinnen Dr. med Christina Weisheit und Dr. rer nat Heidi Ehrentraut für die enorme Unterstützung bei der Umsetzung der gesamten Arbeit.

An dieser Stelle möchte ich zudem allen Mitarbeitern und Mitarbeiterinnen des Forschungslabors der Klinik für Anästhesiologie und Intensivmedizin Uniklinikum Bonn meinen großen Dank aussprechen, die mich bei der Durchführung der Experimente und beim Erlernen der erforderlichen Techniken unterstützt haben.

Zudem möchte ich auch meinem Oberarzt, PD Dr. Philipp Lutz, Medizinische Klinik und Poliklinik I - Allgemeine Innere Medizin, für die moralische Unterstützung und Motivation danken.

Meinen Eltern, meinen Geschwistern und Freunden, insbesondere Alexander Killer, danke ich für ihre Geduld und Ermutigung, sowie hilfreiche Kritik während des Studiums und der Arbeit an dieser Doktorarbeit.