

**Analyse von epigenetischen Einflüssen auf funktionelle
Defizite von peripheren Immunzellen im Verlauf einer
Sepsis**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität
Bonn

Lennart Christian Wild

aus Bonn

2021

Angefertigt mit der Genehmigung
der Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachterin: PD Dr. rer. nat. Stilla Frede

2. Gutachterin: Prof. Dr. Tanja Schneider

Tag der Mündlichen Prüfung: 9. Februar 2021

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

**Ich widme diese Arbeit meinen Eltern Anna Maria und Klaus Peter Wild, deren
aufopfernde Unterstützung sie erst möglich gemacht hat.**

Inhaltsverzeichnis

	Abkürzungsverzeichnis	7
1.	Einleitung	10
1.1	Sepsis	10
1.2	CARS	12
1.3	Epigenetik	14
1.4	Lipopolysaccharid	17
1.5	Signaltransduktion	18
1.6	Adhäsion	21
1.7	Phagozytose	22
1.8	Fragestellung	24
2.	Material und Methoden	25
2.1	Material	25
2.1.1	Geräte	25
2.1.2	Verbrauchsmaterial	26
2.1.3	Chemikalien, Medien und Lösungen	27
2.1.4	Antikörper und Sonden	28
2.1.5	Kits	28
2.1.6	Software	29
2.1.7	Zelllinien	29
2.2	Methoden	30
2.2.1	Peripheral Blood Mononuclear Cell (PBMC)-Isolation	30
2.2.2	Kultur	32
2.2.3	Lipopolysaccharid (LPS)-Stimulation	32
2.2.4	Ribonucleinsäure (RNA)-Isolation	33
2.2.5	komplementäre Desoxyribonucleinsäure (cDNA)-Synthese	35
2.2.6	Quantitative Polymerase Chain Reaction (qPCR)	36
2.2.7	Enzym-linked Immunosorbent Assay (ELISA)	39
2.2.8	Zellseparation	41
2.2.9	Adhäsionsassay	43
2.2.10	Phagozytoseassay	44
2.2.11	Inhibitorbehandlung	46
2.2.12	DNA-Isolation	47
2.2.13	Methylierungsassay	47
2.2.14	Statistische Auswertung	49
3.	Ergebnisse	50

3.1	Veränderung der Genexpression durch Toleranzinduktion	50
3.2	Toleranzinduktion der Proteinsekretion	56
3.3	Effektorfunktionen	59
3.4	Methylierungsanalyse	62
4	Diskussion	64
4.1	Fragestellung	64
4.2	Toleranzinduktion und Zytokinexpression	64
4.3	Funktionelle Assays	66
4.4	Methylierungsanalyse	68
5.	Zusammenfassung	70
6.	Abbildungsverzeichnis	71
7.	Tabellenverzeichnis	76
8.	Literaturverzeichnis	77
9.	Danksagung	85

Abkürzungsverzeichnis

°C Grad Celsius

5-Aza. Decitabin

5mC 5-Methylcytosin

ANOVA analysis of variance

ARDS Acute Respiratory Distress Syndrome

CARS Compensatory Anti-inflammatory Response Syndrome

CD Cluster of differentiation

cDNA komplementäre Desoxyribonucleinsäure

CO₂ Kohlenstoffdioxid

CpG Cytosin-phosphatidyl-Guanin

DEPC Diethyldicarbonat

DMSO Dimethylsulfoxid

DNMT DNA-Methyltransferase

DNA Desoxyribonucleinsäure

ELISA Enzym-linked Immunosorbent Assay

ER Endoplasmatisches Retikulum

FACS fluorescence-activated cell sorting

Fab antigen-binding fragment

FBS fetal bovine serum

Fc crystallisable fragment

g Gewichtskraft

GCS Glasgow Coma Score

H⁺ Proton

HDAC Histon-Deacetylase

HLA humanes Leukozytenantigen

HPMEC Human Pulmonary Microvascular Endothelial Cell

IFN- β Interferon beta

IL Interleukin

IL-1 β Interleukin-1 beta

IRAK interleukin-1 receptor-associated kinase

IRF3 interferon-regulatory factor 3

LBP Lipopolysaccharid-bindendes-Protein

LPS Lipopolysaccharid

Lsg. Lösung

MACS Magnetic Cell Separation

MHC major histocompatibility complex

MM Master Mix

mRNA Messenger-Ribonucleinsäure

MyD88 myeloid differentiation primary-response protein 88

NF- κ B nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells

NTC Non Template Control

PAMP pathogen-associated molecular pattern

PBMC Peripheral Blood Mononuclear Cell

PBS Phosphate-buffered saline

PCR Polymerase-Kettenreaktion

PSGL1 P-selectin glycoprotein ligand-1

qPCR Quantitative Polymerase Chain Reaction

RNA Ribonucleinsäure

RT Raumtemperatur

RT-PCR Realtime-Polymerase-Kettenreaktion

S stimuliert

si-RNA short interfering RNA

SIRS Systemic Inflammatory Response Syndrome

SOFA Sequential Organ Failure Assessment

TLR Toll-like-Rezeptor

TNF- α Tumornekrosefaktor alpha

TRAF tumour necrosis factor receptor-associated factor

TSA Trichostatin A

US unstimuliert

ZNS Zentrales Nervensystem

1. Einleitung

1.1 Sepsis

Die Sepsis wird als lebensbedrohliche Organdysfunktion, ausgelöst durch eine dysregulierte Wirtsantwort auf eine Infektion, definiert (Singer, 2016). Sie ist ein hoch relevantes Krankheitsbild, das weiter an Bedeutung gewinnt. Obwohl in Deutschland die Sterblichkeit der Sepsispatienten zurück ging (Stevenson, 2014), stiegen die Fallzahlen seit 2007 um 5,7 % auf 279.530 Fälle im Jahr 2013. Zu beachten ist außerdem, dass auch die Behandlungszahlen der schweren Sepsis und des septischen Schocks von 2007 (53.722 Fälle) bis 2013 (115.421 Fälle) anstiegen (Fleischmann, 2016). Die Kosten zur Behandlung der Sepsis und ihrer Folgen belaufen sich auf 7,7 Milliarden Euro pro Jahr allein in Deutschland (Ursprung, 2016). Hierbei sind aber nur die direkten Kosten abgebildet, die Kosten für die Volkswirtschaft durch Verdienstauffälle etc. sind noch deutlich höher.

Die Leitlinien und Behandlung der Sepsis unterliegen ständiger Überprüfung und Revision. Während 2001 noch das Vorliegen eines Systemic Inflammatory Response Syndromes (SIRS) und ein passender Erregernachweis für die Diagnose Sepsis wegweisend waren, wurden im Februar 2016 komplexere Diagnosekriterien für die Sepsis vereinbart (Gül, 2017). Diese sog. Sepsis-3-Leitlinie stellt die Organfunktion des Patienten in den Mittelpunkt und erfasst diese mit Hilfe des Sequential Organ Failure Assessment (SOFA)-Scores. Hierbei werden Atmung, Glasgow Coma Score (GCS) als Parameter der Funktion des zentralen Nervensystems, Herz-Kreislauf-, Leberfunktion, Blutgerinnung und Nierenfunktion beurteilt (siehe Tabelle 1).

Der septische Schock wird in der neuen Leitlinie nach Laktatwerten und Vasopressorenbedarf definiert. Die oben genannte schwere Sepsis ist ein älterer Begriff, der zwar noch in einigen Publikationen Verwendung findet, in der neuen Leitlinie aber zu Gunsten einer kontinuierlichen Schweregradeinteilung aufgegeben wird. Als Begriffe kommen nur noch die Sepsis und der (septische) Schock vor (Singer, 2016). Zu beachten ist außerdem, dass der SOFA-Score auch bei anderen Formen der Organdysfunktion eingesetzt werden kann. Der Begriff SIRS findet ebenfalls weiterhin Verwendung, ist aber losgelöst von der Sepsis zu betrachten und beschreibt eine klinische Befundkonstellation, deren Auslöser nicht zwingend infektiöser Genese sein muss.

Tab. 1: Erstellung des SOFA-Scores: Bei einer akuten Änderung von mindestens +2 Punkten kann von einer Sepsis gesprochen werden; nach (Seedat, 2018)

SOFA-Score	1	2	3	4
Respiration PaO ₂ /FiO ₂ mmHg (kPa)	<400 (53,3)	<300 (40)	<200 (26,7) mit respi- ratorischer Unterstüt- zung	<100 (13,3) mit respi- ratorischer Unterstüt- zung
Koagulation Thrombozyten (x10 ⁹ /l)	<150	<100	<50	<20
Leber Bilirubin (μmol/l)	20-32	33-101	102-204	>204
Kardiovaskulär	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 Ner- vensystem (GCS)	13-14	10-12	6-9	<6
Niere Kreatinin (μmol/l) oder Urin-Output	110-170	171-299	300-440 <500ml/Tag	>440 <200ml/Tag

1.2 CARS

Das Compensatory Anti-inflammatory Response Syndrome (CARS) stellt die Gegenantwort zur SIRS dar. Es handelt sich um eine immunmodulatorische Reaktion, die den Körper vor einem Überschießen der Immunantwort schützen soll, aber selber zu einer Immunsuppression führen kann. Diese Immunsuppression kann noch Jahre nach Abklingen der Sepsis nachzuweisen sein (Reddy, 2001).

Eine zentrale Rolle in der Immunantwort und der Entstehung des CARS haben die Monozyten/Makrophagen. Neben der Antigenpräsentation stellt die Sekretion von Interleukinen (IL) und anderen Entzündungsmediatoren eine wichtige Funktion dieser Zellen dar. Gerade in der frühen Phase der Infektion sind diese Mechanismen essenziell für die Initiierung und Verstärkung der Immunantwort (Volk, 1996; Ward, 2008). Sowohl die Expression humaner Leukozytenantigene (HLA), als auch die IL-Expression (z.B. IL-1 β) zeigen sich in einer postseptischen Immunsuppression reduziert (Krakauer, 1993; Mira, 2017; Van den Berk, 1997). Dies wiederum hat ein CARS zur Folge. Die Bedeutung der postseptischen Immunsuppression wird dadurch deutlich, dass die meisten, unter adäquater Therapie verstorbenen Patienten den Zytokinsturm in der Sepsis überlebt haben und im Verlauf an Zweitinfektionen versterben (Chen, 2014; Otto, 2011; Patricio, 2019; Torgersen, 2009). In diesem Zusammenhang ist darauf hinzuweisen, dass die Begriffe CARS und postseptische Immundefizienz in der Literatur uneinheitlich verwendet werden. Im ursprünglichen Sinne meint aber das CARS eine direkt auf die Inflammation folgende und zum Teil parallel ablaufende Gegenreaktion, während die postseptische Immundefizienz eine längerfristige Immunsuppression beschreibt (siehe Abbildung1).

Interleukine geben sowohl Richtung, als auch Intensität der Reaktion auf einen inflammatorischen Reiz vor. Grundsätzlich kann zwischen pro- und antiinflammatorischen Interleukinen unterschieden werden, wobei Zytokine wie TGF- β und IL-10 eher antiinflammatorisch wirken (Jeong, 2017; Zhang, 2017). Tumornekrosefaktor alpha (TNF- α) und IL-1 β haben dagegen proinflammatorischen Charakter (Garib, 2016). Bei Sepsispatienten oder Patienten, die in der jüngeren Vergangenheit eine Sepsis durchgemacht haben, konnte nachgewiesen werden, dass TNF- α deutlich weniger exprimiert wird (Ertel, 1995). Für andere Interleukine ist die Datenlage je nach verwendetem Modell unterschiedlich. Wichtig bleibt jedoch, dass die Immunsuppression in der postseptischen Phase mit einer schlechten Prognose einhergeht (Hotchkiss, 2009; Leentjens, 2012). Manche Autoren sprechen gar von einer 5-Jahres-Überlebensrate von nur 25 % für Patienten, die eine Sepsis bereits überlebt haben (Deutschman, 2014).

Neben der Interleukinproduktion sind auch andere Funktionen verschiedener Immun- und

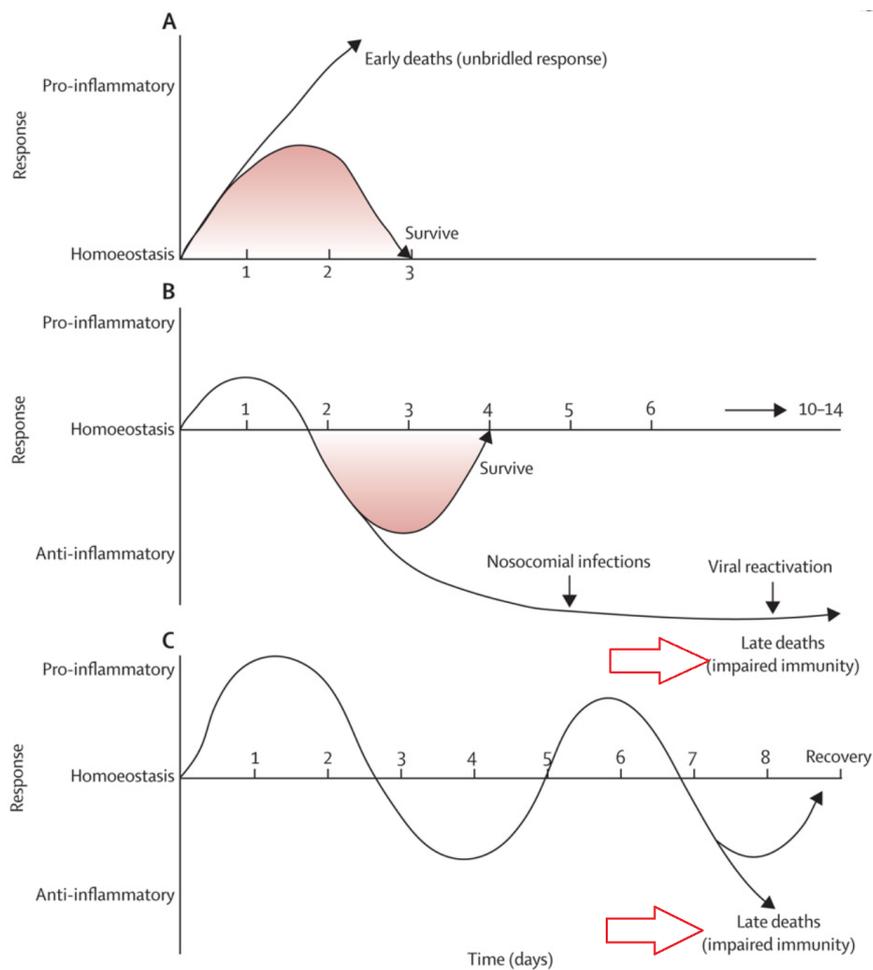


Abb. 1: Die meisten Sepsispatienten zeigen eine deutliche Hyperinflammation kurz nach der Infektion. Bereits in dieser Phase kann es zu tödlichen Verläufen kommen (A). Verläufe mit eingeschränkter inflammatorischer und ausgeprägter antiinflammatorischer Komponente (CARS) sind ebenfalls möglich (B). Auch diese können einen letalen Ausgang haben (in der Regel aber nach prolongiertem Verlauf). Wie in C dargestellt ist auch ein undulierender Verlauf mit pro- und antiinflammatorischen Phasen möglich, wobei letztere prognosebestimmend sind. Die roten Pfeile weisen auf die verzögerten Todesfälle hin, die Gegenstand dieser Arbeit sind, modifiziert nach (Hotchkiss, 2013).

Gewebezellen eingeschränkt. So sind für die Pathogenbeseitigung in verschiedenen Geweben Adhäsion, Extravasation und Phagozytose von immenser Bedeutung. Bei Adhäsion und Extravasation handelt es sich um multidimensionale Abläufe, die immer mindestens zwei Zelltypen involvieren (z.B. Immunzelle und Endothelzelle), entsprechend komplex sind die (patho-)physiologischen Zusammenhänge. Relevanz für diese Arbeit hat beispielsweise die für die Endothelbarriere in der Lunge gezeigte Lipopolysaccharid (LPS)-abhängige Funktionsstörung (Thangavel, 2014). LPS induziert Hyperpermeabilität in murinen Lungengefäßen und schädigt die Filterfunktion der Endothelzellen. In der

Folge kommt es zu einem Acute Respiratory Distress Syndrome (ARDS). In ähnlichen Modellen konnten mögliche Erklärungsansätze für die Genese dieser immunologischen Defizite gezeigt werden (siehe Abschnitt 1.3). Darüber hinaus sind die Expressionsmuster für wichtige Gene der Antigenpräsentation, Extravasation, Phagozytose, Apoptose und Induktion einer Inflammation in Monozyten von Patienten mit CARS verändert (Xu, 2012). Mit der funktionellen Relevanz dieser Veränderungen beschäftigt sich diese Arbeit.

1.3 Epigenetik

Die Epigenetik spielt bei der Fragestellung nach der Pathogenese der langfristigen Immunsuppression eine besondere Bedeutung. Die Modifikation von Histonen (Proteine, um die die DNA aufgewickelt ist) und die Methylierung von DNA-Abschnitten stellen zwei wesentliche biochemische Veränderungen dar, die stark beeinflussen, wie Zellen genetische Informationen abrufen können. Durch eine epigenetische Modulation der Genexpression können Immunzellen nachhaltig in ihrer Funktion, Aktivierbarkeit und Differenzierung gestört werden. Die Komplexität der Thematik zeigt sich bereits in der Schwierigkeit, allgemein gültige Definitionen für den Begriff „Epigenetik“ zu finden. Verschiedene Autoren bieten einige Definitionen an, die in etwa so umschrieben werden können:

Epigenetik umfasst alle mitotisch oder meiotisch vererbaren, nicht direkt in der Desoxyribonucleinsäure (DNA)-Sequenz codierten Faktoren, die die Entstehung von Merkmalen/Proteinen beeinflussen können.

Epigenetische Mechanismen sind wichtige Regulatoren der Genexpression unter physiologischen und pathologischen Bedingungen und haben einen sehr starken Einfluss auf die Inflammation und die Immunantwort im Rahmen von Infektionen. In diesem Kontext wurde bereits gezeigt, dass Makrophagen nach einer LPS-Toleranz-Induktion Histonmodifikationen in den Promotorregionen pro-inflammatorischer Zytokine aufweisen, die zu einer verringerten Produktion dieser Entzündungsmediatoren führen (El Gazzar, 2008). In LPS- und Influenza-induzierten akuten Lungenschädigungsmodellen wurde beobachtet, dass sich eine Behandlung mit dem DNA-Methyltransferase (DNMT)-Inhibitor 5-Aza-2'-Desoxycytidine, der epigenetische Modifikationen aufheben kann, protektiv auf den Krankheitsverlauf auswirkte (Singer, 2015; Thangavel, 2015).

Darüber hinaus besteht eine Verbindung zwischen epigenetischen Modifikationen im Genom von Endothelzellen und dem sepsis-korrelierten Multiorganversagen (Bomsztyk, 2015). Welche epigenetischen Modifikationen die Funktionalität der Immunzellen in der post-septischen Immunantwort beeinflussen ist bisher nicht untersucht.

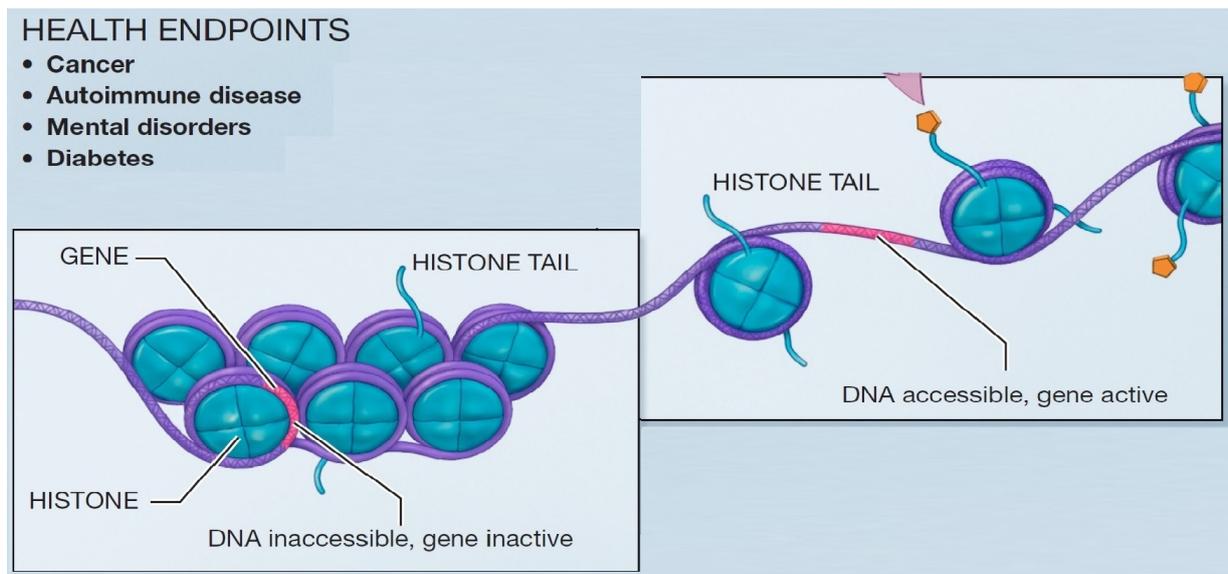


Abb. 2: Schematische Darstellung der Histon-DNA-Beziehung, rechts ist die DNA auf Grund von Strukturänderungen in den Histonen ablesbar; modifiziert nach (Mitchell, 2016)

Wie in Abbildung 2 dargestellt wird, spielt die Epigenetik in der Pathogenese verschiedener Erkrankungen eine Rolle. Am besten untersucht sind epigenetische Einflüsse in der Tumorentstehung (Nordlund, 2017). Die Inhibitoren epigenetisch bedeutsamer Enzyme Trichostatin A (TSA) und Decitabin (5-Aza.) sind zur Behandlung bestimmter onkologischer Krankheitsbilder zugelassen. Neben den in Abbildung 2 aufgeführten epigenetischen Vorgängen gibt es weitere wie z.B. die X-Inaktivierung oder den durch short interfering RNA (si-RNA) vermittelten Abbau von Messenger-Ribonucleinsäure (mRNA). Die einzelnen Modifikationen beeinflussen sich untereinander und sind in ihrer Komplexität und Interaktion nur in Ansätzen verstanden. Beispielsweise DNA-Methylierung führt meistens zu einer Inaktivierung der betroffenen Genabschnitte, aber auch hier gibt es Ausnahmen (Bahar Halpern, 2014).

DNA-Methylierungen finden nur in sogenannten Cytosin-phosphatidyl-Guanin (CpG)-Inseln statt. Des Weiteren sind im humanen System nur DNA-Methyltransferasen (DNMT) bekannt, die Cytosin methylieren (Ambrosi, 2017; Blow, 2016). Die besondere Bedeutung der CpG-Inseln ist dadurch gekennzeichnet, dass sie hauptsächlich in regulatorischen DNA-Bereichen wie Promotor- oder Enhancerregionen vorkommen (Jones, 2012).

Die in Abbildung 3 dargestellten Reaktionen zeigen, wie aus 5-Methylcytosin Cytosin entstehen kann. Ein mögliches Zwischenprodukt dieser Umwandlung ist Thymin. Werden die dargestellten Reaktionsketten unvollständig durchlaufen ist es möglich, dass Thymin in

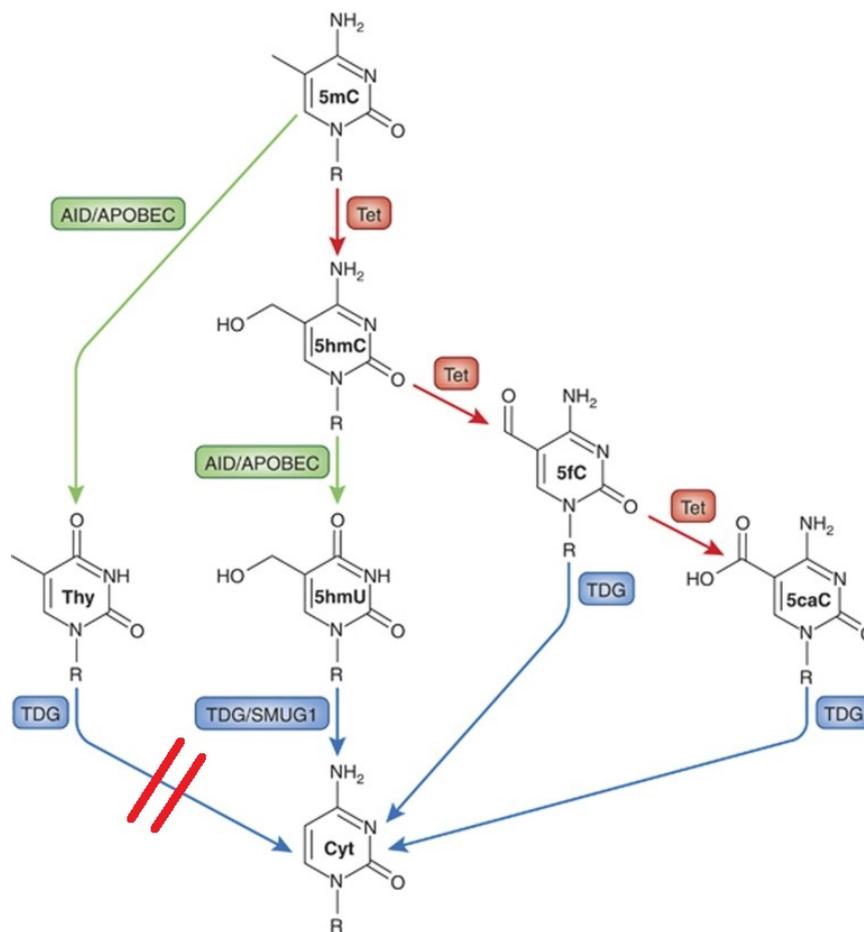


Abb. 3: Übersicht über mögliche reaktive Veränderungen von 5mC (5-Methylcytosin) mit Endpunkt Cytosin. Wird eine Reaktionskette nicht vollständig durchlaufen (siehe roter Doppelpfeil), ist ein Basenaustausch möglich. AID/APOBEC: activation-induced cytidine deaminase/apolipoprotein B mRNA editing enzyme complex, Tet: ten-eleven translocation enzyme, 5hmC: 5-Hydroxymethylcytosin, 5hmU: 5-Hydroxymethyluracil, 5fC: 5-Formylcytosin, 5caC: 5-Carboxylcytosin, TDG: Thymine DNA glycosylase, Cyt: Cytosin, Thy: Thymin modifiziert nach (Moore, 2013)

der Basensequenz bestehen bleibt und das jeweils nicht passende Guanin ausgetauscht wird. So entsteht eine Punktmutation. In der Folge verschwinden CpG-Inseln sukzessive. Es gibt aber auch Mechanismen, über die CpG-Inseln de-novo auftreten können, sodass eine Art Gleichgewicht innerhalb der Evolution herrscht (Blow, 2016). Grundsätzlich sind Promotoren relativ stabil, das heißt sie unterliegen nur wenigen evolutionären Veränderungen. Dies erklärt sich vor allem dadurch, dass Mutationen in Promotoren dazu führen können, dass das jeweilige Protein nicht oder nur unzureichend gebildet wird. Dies wiederum kann einen Selektionsnachteil zur Folge haben. Besonders Promotoren von Genen, die für Proteine kodieren, die eine zentrale Funktion erfüllen und häufig abgelesen werden, müssen funktionstüchtig bleiben; ein Expressionsverlust kann hier fatal sein. Daraus

ergibt sich die besondere Stabilität der Promotorabschnitte und damit verbunden der CpG-Inseln.

Werden die CpG-Inseln methyliert, sind die entsprechenden Promotoren unzugänglich, das heißt die methylierten CpG-Inseln erfüllen eine Silencerfunktion, schalten also die Expression betroffener Gene ab oder machen diese unwahrscheinlicher (Deaton, 2011; Illingworth, 2010). Obwohl sie engen Bezug zu vielen Promotorregionen haben, bleibt (auch auf Grund zahlreicher Interaktionen epigenetischer Mechanismen) das Ausmaß ihrer funktionellen Relevanz im humanen System weiter unklar (Blackledge and Klose, 2011).

Wie bereits in Abschnitt 1.2 dargestellt, konnten aber beispielsweise LPS-induzierte Endothelschäden durch die Inhibition epigenetischer Veränderungen/Enzyme, verhindert werden. Hierbei spielten vor allem die durch LPS-Stimulation hervorgerufenen Veränderungen beziehungsweise deren Verhinderung eine Rolle (Thangavel, 2014).

Histonmodifikationen zeigen je nach Art der Modifikation zwar eine Tendenz bezüglich aktivierendem oder inaktivierendem Charakter, eine strikte Einteilung ist aber auch hier nicht zulässig.

1.4 Lipopolysaccharid

LPS wird auf der äußeren Membran von gramnegativen Bakterien exprimiert. Das Lipopolysaccharid bindende Protein (LBP) kann beim Zerfall von gramnegativen Bakterien als sog. Endotoxin frei werdendes LPS binden und aktiviert daraufhin über Cluster of differentiation (CD)-14 und Toll-like-Rezeptor (TLR)-4 verschiedene Signalkaskaden (Ranoa, 2013).

TLRs sind eine heterogene Gruppe von Rezeptoren, die maßgeblich an der unspezifischen Abwehr von Pathogenen beteiligt sind. Sie erkennen sogenannte pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) und aktivieren zahlreiche Signalkaskaden (siehe Abbildung 4 und 5).

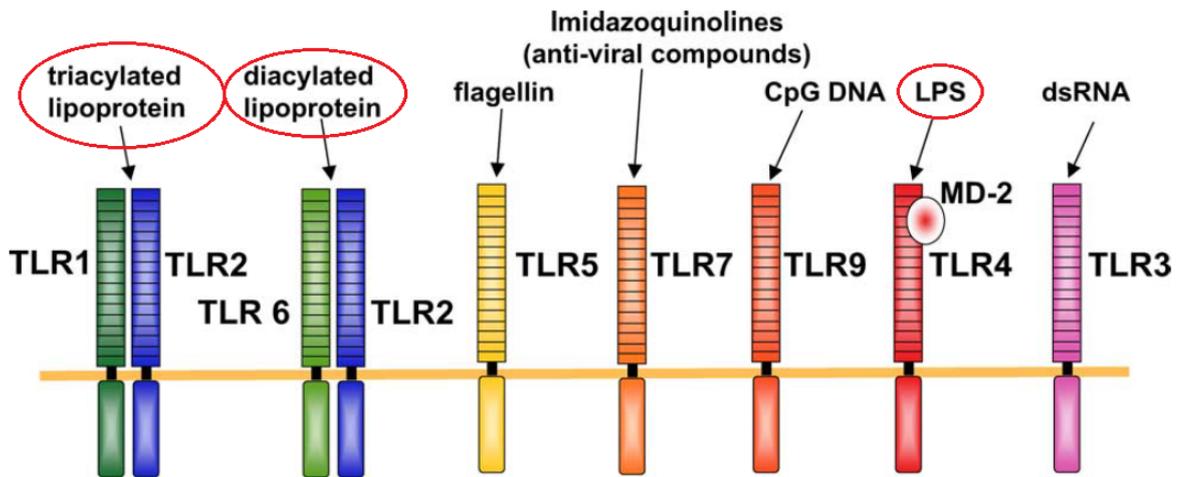


Abb. 4: Toll-like-Rezeptoren und ihre Liganden: TLR1 und TLR6 sind assoziiert mit TLR2 und erkennen triacylierte und diacylierte Lipoproteine. TLR4 ist in der Lage, LPS zu erkennen und zu binden. TLR5 ist ein Flagellinrezeptor. TLR3 erkennt doppelsträngige Virus-RNA, während TLR9 freie CpG-reiche DNA bindet. Die roten Kreise zeigen Bindungen an denen LPS(-Varianten) beteiligt sind. Modifiziert nach (Takeda, 2004)

TLR-4 wird vor allem auf Antigen-präsentierenden Zellen exprimiert (Vaure, 2014).

Wie aus Abbildung 5 deutlich wird, beeinflusst LPS die Transkription wichtiger Zytokine auf DNA-Ebene. Nach Bindung von LPS an TLR-4 wird über verschiedene Signalkaskaden der Transkriptionsfaktor *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells* ($NF-\kappa B$) aktiviert. Letzterer vermittelt dann durch Bindung an spezifische DNA-Motive die Initiierung der Transkription (Oeckinghaus, 2009).

1.5 Signaltransduktion

Die Bindung an CD-14 und das Lipopolysaccharid-bindende Protein (LBP) erleichtern die Bindung von LPS an den TLR-4. Der Rezeptorkomplex besteht aus zwei dimerisierten TLR-4, deren Bindung über das extrazelluläre Adapterprotein MD-2 vermittelt wird, welches auch die LPS-Erkennung unterstützt (Pålsson-McDermott, 2004).

Die nach Ligandenbindung aktivierten Signalkaskaden können in eine frühe und eine späte Antwort unterteilt werden. Die zeitlich frühere Signalkaskade ist von dem Adapterprotein *myeloid differentiation primary-response protein 88* (*MyD88*) und assoziierten Proteinen abhängig, die spätere dagegen nicht (Warner, 2013). So konnte in *MyD88*^(-/-) (Knock-out für *MyD88*) Mäusen gezeigt werden, dass eine $NF-\kappa B$ -Aktivierung weiterhin stattfindet, diese aber zeitlich verzögert ist. Außerdem konnte gezeigt werden, dass interferon-

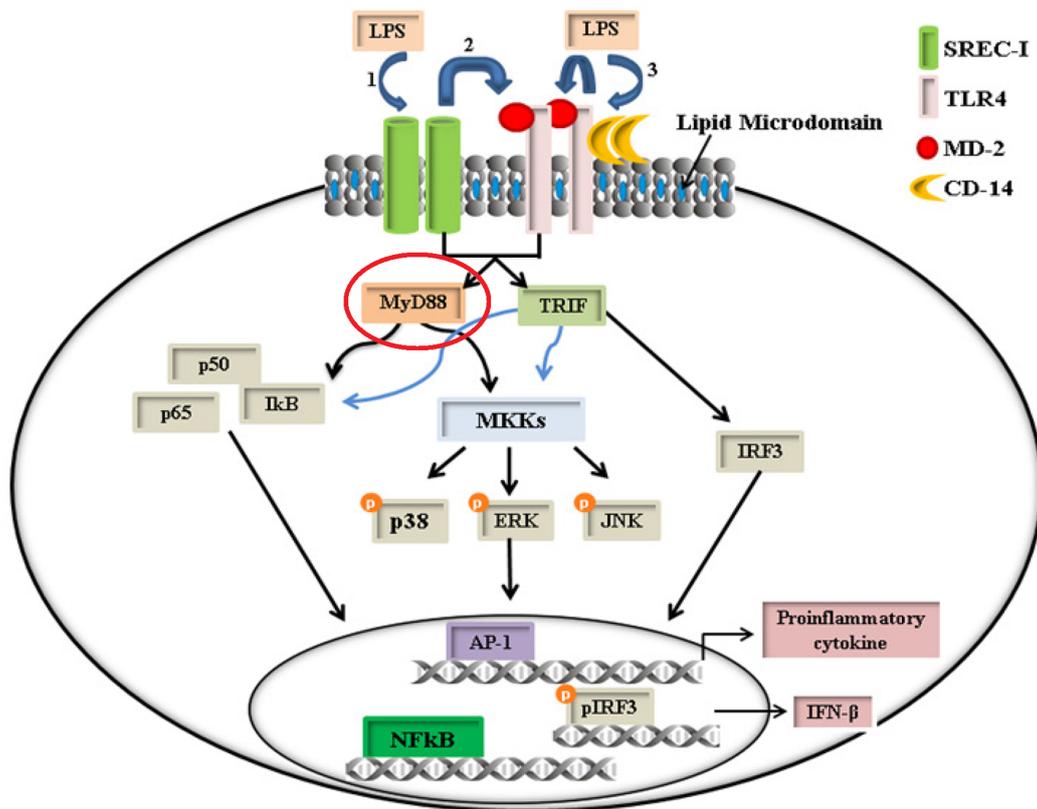


Abb. 5: Toll-like-Rezeptor-4 (TLR-4) und folgende Signalwege: Vermittlung der extrazellulären LPS-Bindung an TLR-4 über CD-14 und Aktivierung der Signalkaskade. Rot hinterlegt: Effektormoleküle, roter Kreis: MyD88 siehe Abbildung 6, modifiziert nach (Murshid, 2015)

regulatory factor 3 (IRF3)-abhängige Effekte auch beim Genotyp (-/-) stattfinden (Warner, 2013).

NF-κB und IRF3 fungieren dabei als Transkriptionsfaktoren und stellen den Endpunkt der Signaltransduktionskaskade dar (siehe Abbildung 5). Die frühe Phase der Signaltransduktion führt MyD88-abhängig zunächst zu einer Phosphorylierung von Proteinen aus der Gruppe der *interleukin-1 receptor-associated kinases (IRAKs)*. Diese wiederum aktivieren den *tumour necrosis factor receptor-associated factor (TRAF)-4*, welcher über weitere Binde- und Adapterproteine schließlich die Aktivität verschiedener Zielgene moduliert (Cabal-Hierro, 2014; Pålsson-McDermott, 2004).

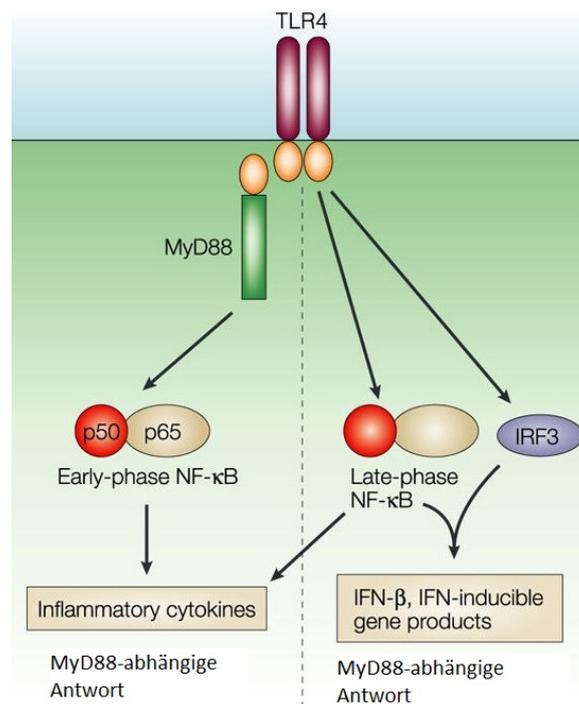


Abb. 6: Verschiedene Signalkaskaden der TLR-4-Aktivierung; der früher ablaufende, *NF-κB* vermittelte Zweig ist von MyD88 abhängig, der Zweig, welcher IRF3 involviert hingegen nicht. Ersterer führt zur Expression inflammatorischer Zytokine (TNF- α , IL-6 und andere), letzterer induziert IFN- β modifiziert nach (Akira, 2004).

Während die proinflammatorische Antwort auf den LPS-Stimulus stattfindet (siehe Abbildung 6), läuft gleichzeitig eine Gegenregulation ab. Dabei führen einige Proteine (zum Teil Splicevarianten von *NF-κB*-Aktivatoren) zu einer LPS-bezogenen Toleranzinduktion. Besonders hervorzuheben sind hier die Proteine SIGIRR, ST2 und MyD88s, die über Blockade des TLR-4 Signalwegs eine LPS-Toleranz erzeugen. Dabei werden sowohl Signalmoleküle komplexiert, als auch ihre Rekrutierung verhindert (MyD88s blockiert die Rekrutierung von IRAK-4) (Burns, 2003; Brint, 2004; Wald, 2003). Während TLR-4 abhängige Signalwege besonders betroffen sind, findet weiterhin geringer inhibierte Signaltransduktion über die anderen TLR-Subtypen statt. Daher sind beispielsweise Gene von proinflammatorischen Zytokinen stärker von der Toleranzinduktion betroffen, als Gene, die für Proteine codieren, die eine wichtige Rolle in der Wundheilung spielen. Auf diese Weise wird das Expressionsmuster in Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMCs) grundlegend durch LPS-Stimulation verändert (Butcher, 2018; Pena, 2011).

1.6 Adhäsion

Auf einen inflammatorischen Stimulus hin können sich Immunzellen am Endothel anlagern. In einem zweiten Schritt kann die Gefäßwand durchwandert werden, was als Extravasation bezeichnet wird. Klassischerweise werden bei der Adhäsion drei Phasen unterschieden: Rollen, Aktivierung und Bindung. Wenn ein Leukozyt entsprechend gebunden ist, kann anschließend die Diapedese erfolgen (Steeber, 2005). In neuerer Zeit sind zusätzliche Schritte der Adhäsion beschrieben worden, die zu einem besseren Verständnis des Vorgangs beitragen (siehe Abbildung 7).

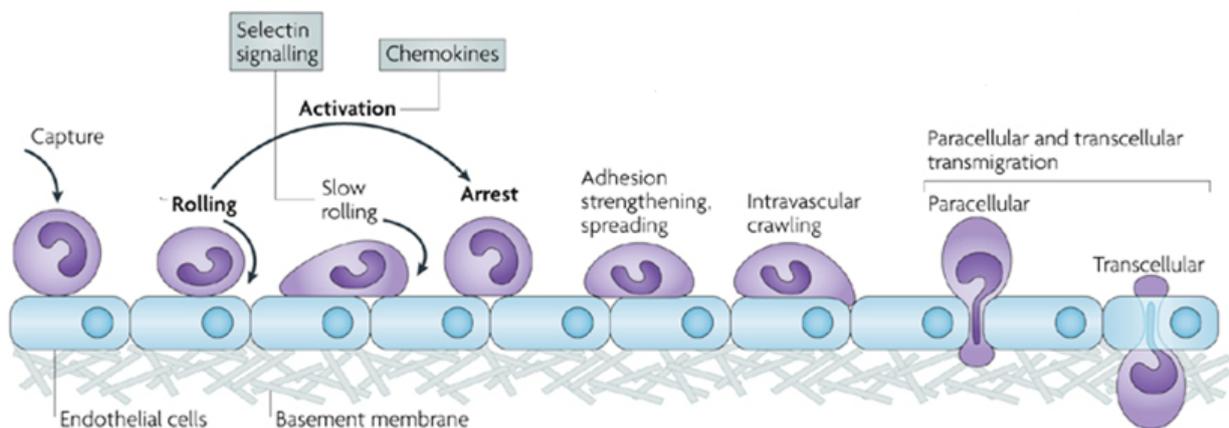


Abb. 7: Schritte der Adhäsion (klassische **fett** gedruckt) und Formen der Extravasation; mit vermittelnden Strukturen, modifiziert nach (Ley, 2007).

Rollen wird vor allem über Selektine vermittelt. E- und P-Selektine werden dabei vor allem von aktivierten Endothelzellen exprimiert, während Leukozyten eher L-Selektine aufweisen. Ihr wichtigster Ligand ist P-selectin glycoprotein ligand-1 (PSGL1), im Zusammenspiel sichern sie den ersten Kontakt von Blutzellen und Endothel (Kansas, 1995; Ley, 2007).

Die Aktivierung der Immunzellen geht vor allem von Chemokinen aus (VCAM, CXCL4). Diese werden vom Endothel gebildet und haben abhängig von der Rezeptorausstattung der Zielzelle unterschiedlich starke Effekte (Campbell, 1996, 1998). Durch die Aktivierung durchlaufen die Integrine weitgehende Strukturveränderungen, die zu einer höher affinen Bindung zwischen Endothel und Immunzellen führen (Kim, 2003). Nun sind die Immunzellen fest an das Endothel gebunden.

Da es sich bei der Adhäsion um einen essenziellen Schritt bei der Einleitung einer Im-

munreaktion auf ein Pathogen handelt, ist die Untersuchung eventueller Defizite in diesem Schritt wichtig bei der Untersuchung einer generellen Immundefizienz. Außerdem ist die Schädigung der Endothelbarriere Bestandteil der Sepsispathologie. Darüber hinaus ist die Verhinderung dieser Schrankenstörung durch die Verwendung von Inhibitoren epigenetischer Enzyme in der Literatur beschrieben (Thangavel, 2014).

1.7 Phagozytose

Neben einer Störung der Adhäsion wäre auch eine verminderte Phagozytose als Auslöser für eine postseptische Immundefizienz denkbar.

Phagozytose dient sowohl der Abwehr von Pathogenen (Erkennung über PAMPs etc.), als auch dem Abräumen von apoptotischem und nekrotischem Zellmaterial. Für die Phagozytose sind hauptsächlich Monozyten/Makrophagen, dendritische Zellen und neutrophile Granulozyten zuständig (Savina, 2007). Sowohl Pathogene als auch körpereigene Zellen exprimieren prophagozytotische und antiphagozytotische Signale. Entscheidend für das Einleiten der Phagozytose ist letztlich die Summe aus beiden (Flannagan, 2012).

Die Phagozytose wird durch die Bildung einer Membrantasche, die das Pathogen umschließt, eingeleitet. Dies geschieht durch gerichtete Aktinpolymerisation (May, 2000). Wenn sich diese Tasche schließt, entsteht ein frühes Phagosom, welches zwar seinen Inhalt in die Zelle internalisiert, aber noch keine wesentlichen Unterschiede zum extrazellulären Milieu aufweist und daher auch den Inhalt noch nicht abbaut.

Durch das Verschmelzen mit anderen Organellen reift das Phagosom immer weiter heran. Während dieser Reifung unterliegt das Proteasom der Organelle ständiger Veränderung. Diese Dynamik führt über verschiedenste Zwischenstufen zum fertigen Phagolysosom (Flannagan, 2012; Vieira, 2001). Zusätzlich sinkt durch die größere Aktivität von Protonenpumpen in der Membran des Phagolysosoms auch der pH-Wert (siehe Abbildung 8).

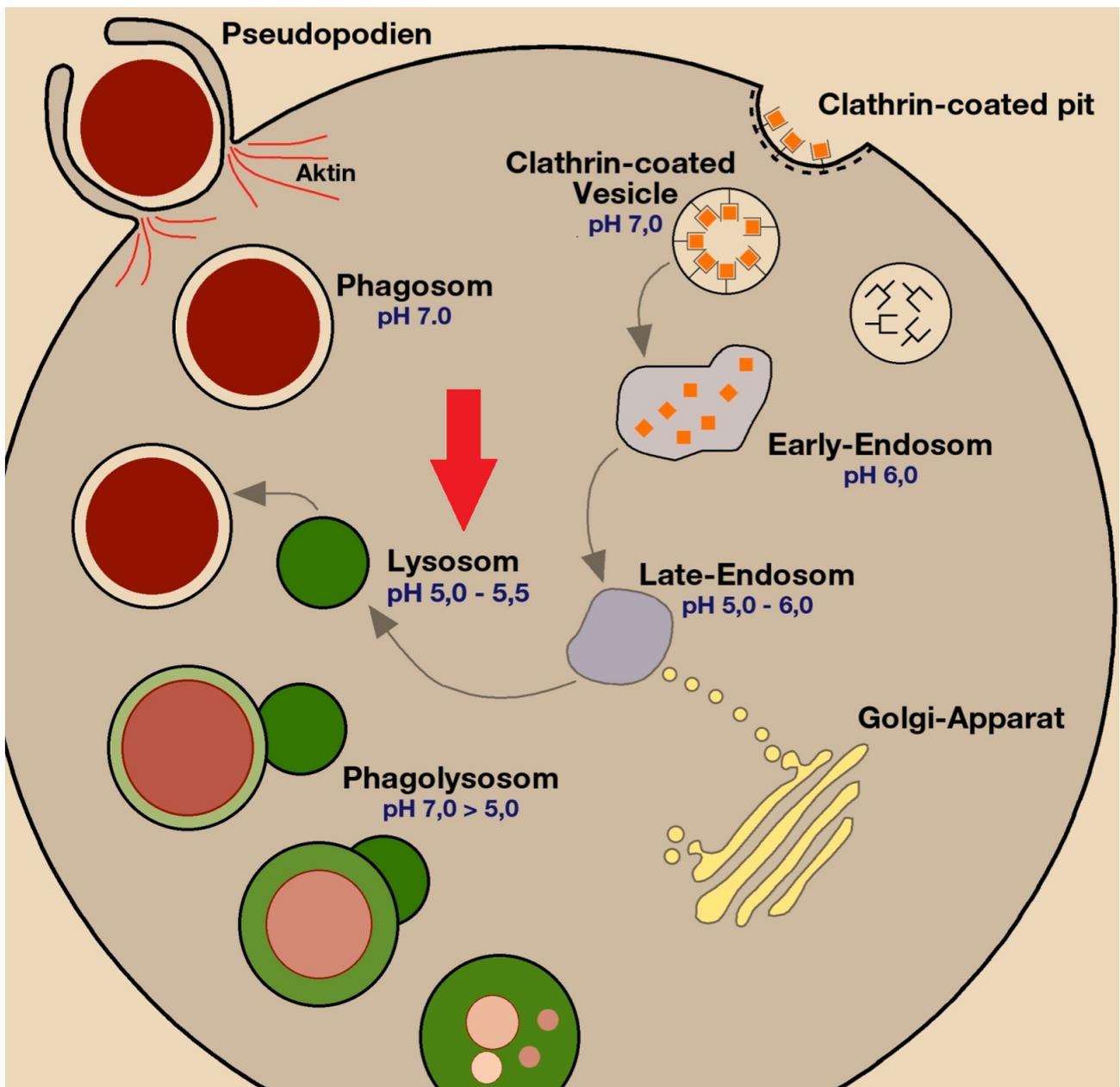


Abb. 8: Reifung des Phagosoms mit beteiligten Organellen und Entwicklung des pH-Wertes, roter Pfeil weißt auf pH-Wert der maximalen pH-Reduktion hin: siehe Abbildung 15, modifiziert nach (Flannagan, 2012)

1.8 Fragestellung

In dieser Arbeit soll der Einfluss epigenetischer Prozesse an der Entwicklung der postseptischen Immunsuppression im Modell der LPS induzierten Toleranzentwicklung genauer beleuchtet werden. Hierbei sollen im Detail folgende Fragen geklärt werden:

1. Wie verändert sich das Zytokinexpressionsprofil von PBMCs in der post-septischen Phase gegenüber einem erneuten Infektionsstimulus? Kann eine Toleranzentwicklung mit Hilfe eines Expressionsprofils in unserem in vitro Modell abgebildet werden?
2. Welche Auswirkungen hat eine LPS Stimulation auf die Phagozytoseleistung der PBMCs?
3. Wird die Adhäsionsfähigkeit von PBMCs an Endothelzellen durch LPS-Stimuli herabgesetzt?
4. Kann eine HDAC- und DNMT-Inhibitorbehandlung die LPS induzierten funktionellen Veränderungen in der Zytokinexpression der PBMCs rückgängig machen und damit indirekt den Nachweis einer epigenetischen Beteiligung liefern?
5. Lässt sich ein mechanistischer Nachweis für die reduzierte Effektorfunktion von peripheren Immunzellen durch epigenetische Methylierungsmodifikationen beobachten?

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Name	Hersteller
340 pH/Temp. Meter	Beckman Coulter GmbH, Krefeld, Deutschland
accu-jet pro	Brand, Wertheim, Deutschland
Auflichtmikroskop Eclipse TS100	Nikon Instruments, Amsterdam, Niederlande
Brutschrank New Brunswick Galaxy 170R	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, Deutschland
Brutschrank Zellkultur	Binder, Tuttlingen, Deutschland
BD FACSCANTO II	BD Biosciences, San Jose, USA
Cytation 3 Reader	BioTek, Winooski, USA
ELISA-Reader Expert 96	Biochrom, Cambridge, UK
Eppendorf Pipetten Reference 2 (10,100,1000 μ l)	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, Deutschland
Eppen Research Plus Mehrkanalpipette (300 μ l)	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, Deutschland
Eppendorf Zentrifugen (5430 R,5810 R, 5415 R)	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, Deutschland
Feinwaage Sartorius CP225D-0CE	Data Weighing Systems, Elk Grove, USA
MACS Separator Magnet	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
Magnetrührer MR Hei-Standard	Heidolph, Schwabach, Deutschland
Matrix Multichannel Pipette	Thermo-Scientific, Wilmington, USA
Micro Plate Washer, Asys Hitech	Biochrom, Cambridge, UK
Spectrophotometer NanoDrop 2000	Thermo-Scientific, Wilmington, USA
Sterilbank Herasafe	Heraeus, Hanau, Deutschland
Thermocycler T Gradient	Biometra, Göttingen, Deutschland
ViiA 7 Real Time PCR System	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Vortex-Genie 2	Scientific Industries, Bohemia, USA
Zählkammer	Brand, Wertheim, Deutschland

2.1.2 Verbrauchsmaterial

Produkt	Hersteller
6, 24, 96 Well Cell Culture Plate (Polystyrol)	Greiner Bio One, Solingen, Deutschland
96 Well Microplate, F-Bottom, black	Greiner Bio One, Solingen, Deutschland
Adhesive Microplate Seal 135x80 mm	Biozym, Hessisch Oldendorf, Deutschland
Alkoholisches Hautantiseptikum	Schülke, Norderstedt, Deutschland
Cellstar Tubes (15, 50 ml)	Greiner Bio One, Solingen, Deutschland
Einmalpipetten (2,5,2 5ml)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Einmalpipetten (10 ml)	Greiner Bio One, Solingen, Deutschland
Eppendorf Tubes (0,5, 1,5, 2 ml)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
FrameStar 384 PCR Platten	4titude, Dorking, GB
LS Columns	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
Matrix Pipettenspitzen 384	Thermo Scientific, San Diego, USA
Nitril BestGen Handschuhe (M,L)	Meditrade, Kiefersfelden, Deutschland
Pipettenspitzen (10, 20, 100, 200, 1000 μ l)	Biozym, Hessisch Oldendorf, Deutschland
Safety-Multifly 21G 200 mm	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
SHIELDskin CHEM L	SHIELD Scientific, Bennekom, Niederlande
S-Monovette 9 ml EDTA	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Zellkulturflaschen 500 ml	Thermo Scientific, Wilmington, USA

2.1.3 Chemikalien, Medien und Lösungen

Produkt	Hersteller
AccuGENE 10x PBS	Lonza, Rockland, USA
Accutase Solution	PromoCell GmbH, Heidelberg, Deutschland
Chloroform	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Decitabin	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Dimehtylsulfoxide (DMSO)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Histopaque-1077	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Histopaque-1119	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Lipopolysaccharides Escherichia coli 0111:B4	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
MACS Puffer	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
Medium RPMI 1640 mit L-Glutamin	Lonza, Rockland, USA
MV-2 Medium + Supplement	PromoCell GmbH, Heidelberg, Deutschland
PBS Tabletten	Life Technologies, Carlsbad, USA
Phosphate Buffered Saline(PBS) pH 7,4	Life Technologies, Carlsbad, USA
RT-qPCR Mastermix TaqMan	Applied Biosystems, Foster City, USA
Schwefelsäure [1 mol/l]	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Trichostatin A	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
TRIzol Reagent	Life Technologies, Carlsbad, USA
Tween 20	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Ultra Pure Water (DEPC)	Life Technologies, Carlsbad, USA

2.1.4 Antikörper und Sonden

BD Calibrite APC Beads	BD Biosciences, San Diego, USA
BD Compensation Beads	BD Biosciences, San Diego, USA
FACS-Antikörper (Anti-Human)	
CD3 PerCP-Cyanine5.5	eBioscience, San Diego, USA
CD14 APC-eFluor 780	eBioscience, San Diego, USA
CD15 Brilliant Violet 421	BioLegend, San Diego, USA
CD16 PE-Cyanine7	eBioscience, San Diego, USA
CD64 PE	eBioscience, San Diego, USA
CD163 APC	eBioscience, San Diego, USA
pHrodo Green E. coli BioParticles conjugate	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Real-Time-PCR Sonden	
IL-1 β	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
IL-6	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
IL-10	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
TNF α	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

2.1.5 Kits

cDNA Reverse Transcription Kit	Applied Biosystems, Foster City, USA
ELISA human IL-1 β	BD Biosciences, San Diego, USA
ELISA human IL-10	BD Biosciences, San Diego, USA
ELISA human TNF- α	BD Biosciences, San Diego, USA
EpiTect 96 Bisulfite	Qiagen, Hilden, Deutschland
Genomic DNA Isolations-Kit	Machery-Nagel, Düren, Deutschland
Infinium MethylationEPIC	Illumina, San Diego, USA
Pan Monocyte Isolation Kit, human	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland

2.1.6 Software

FACS-Diva V8.0.1	BD Biosciences, San Diego, USA
FlowJo v10	FlowJo, LLE, Ashland, USA
NanoDrop 2000/2000c Operating Software, version 1.6	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Prism 5 Version 5.02	Graphpad Software, Inc., La Jolla, USA
ViiA 7 RUO Version 1.2.1	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

2.1.7 Zelllinien

HPMECs-STR.1	PromoCell, Heidelberg, Deutschland
--------------	------------------------------------

2.2 Methoden

2.2.1 PBMC-Isolation

Von gesunden, freiwilligen Probanden wurden je nach Verwendungszweck 9 bis 36 ml Vollblut gewonnen. Dazu wurde eine Cubitalvene punktiert und das Blut in mit EDTA versetzten Blutentnahmeröhrchen gesammelt. Unter sterilen Bedingungen wurde mit Hilfe von zwei verschiedenen Zuckerlösungen (Histopaque-1070 u. -1119) ein Dichtegradient erzeugt. Hierzu wurden je 3ml von jeder Lösung verwendet. Das weniger dichte Histopaque 1070 wurde zuerst in ein 15 ml Röhrchen gegeben, das dichtere Histopaque 1119 anschließend mit einer Pasteur-Pipette darunter geschichtet. Auf den entstandenen Gradienten wurden 6 ml Vollblut pipettiert (siehe Abbildung 9).

Die 15 ml Röhrchen wurden bei 700 g, Raumtemperatur (RT) und ohne Bremse für 30 min zentrifugiert. Zwischen dem Histopaque-1077 und der Plasmafraktion, bildete sich ein Ring, der die PBMCs enthielt.

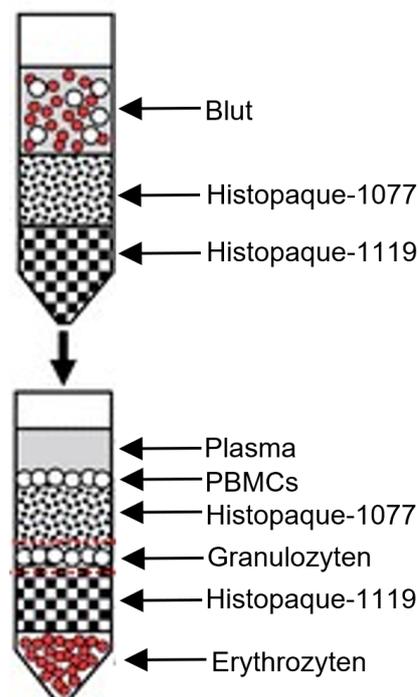


Abb. 9: Vollblutaufreinigung über Glukosegradienten mit Hilfe von Histopaque, modifiziert nach (Han, 2013)

In einem nächsten Schritt wurden die PBMCs mit Hilfe einer Pipette abgenommen und jeweils in ein frisches 15 ml Röhrchen überführt. Dabei wurden möglichst viele Zellen entnommen, aber nie mehr als 4 ml überführt. Ebenso wurde darauf geachtet, keine Zellen aus anderen Fraktionen mit zu überführen.

Die Zellen wurden drei mal mit je 10 ml Phosphate-buffered saline (PBS) gewaschen. Dazu wurden 10 ml PBS hinzugegeben und die Röhrchen für 10 min bei 300 g, RT und aktiver Bremse zentrifugiert.

Der Überstand wurde wieder verworfen und die Zellen in 10 ml Medium (RPMI 1640+10 % fetal bovine serum (FBS)) resuspendiert. RPMI 1640 ist ein Standardmedium, das zur Kultivierung unterschiedlichster Zelllinien verwendet wird, enthalten sind Biotin, Vitamin B₁₂, p-Aminobenzoesäure, weitere Vitamine, L-Glutamin und Phenolrot als pH-Indikator. Es enthält aber keine Proteine und Lipide, die durch die Zugabe von 10 % FBS ergänzt werden.

Um für die folgenden Versuche vergleichbare Ausgangsbedingungen zu erzeugen, musste eine festgelegte Zellzahl erreicht werden. Zu diesem Zweck wurden die in der Suspension enthaltenen Zellen ausgezählt. Um die Zählung zu vereinfachen, wurde die Zellsuspension mit dem Faktor 1:10 in Medium verdünnt. 10 μ l verdünnte Zellsuspension wurden in eine Zählkammer (Neubauer) pipettiert, vier Großquadrate wurden ausgezählt und die Gesamtzellzahl bestimmt. Abhängig von dem folgenden Versuch wurde eine passende Zellzahl aus der Zellsuspension entnommen.

Alle Untersuchungen, die am Menschen durchgeführt wurden, wurden auf der Grundlage der revidierten Deklaration von Helsinki des Weltärztebundes (1983) und den entsprechenden gesetzlichen Grundlagen durchgeführt.

2.2.2 Kultur

PBMCs

Unabhängig von den Absolutzahlen wurden die Zellen immer in der Konzentration 1×10^6 /ml Medium eingesetzt. Die PBMCs wurden in 6-, 24- oder 96-Well Platten ausgesät. Größere Anzahlen als 2×10^6 Zellen wurden in 6-Well Platten ausgesät; für weniger als 500.000 Zellen wurden 96-Well Platten verwendet. Entsprechend wurden in den 24-Well Platten Zellzahlen zwischen 500.000 und 2×10^6 pro Well ausgesät.

Anschließend wurden die Zellen für mindestens 16 h (abweichende Inkubationslängen ausgewiesen) bei 37 Grad Celsius ($^{\circ}\text{C}$), 100 % relativer Luftfeuchtigkeit und in 5 % CO_2 in Luft inkubiert.

Human Pulmonary Microvascular Endothelial Cells (HPMECs)

HPMECs wurden aufgetaut und zu je 500.000 Zellen in 20 ml Endothelial Cell growth MV-2 Medium in einer Zellkulturflasche (500 ml) ausgesät. Die Zellen wurden alle zwei Tage unter dem Mikroskop begutachtet und wurden bei ca. 80 % Zelldichte auf neue Zellkulturflaschen aufgeteilt. Dazu wurde das Medium abgesaugt und die Zellen mit 10 ml PBS gespült. Anschließend wurden 2 ml Accutase hinzugegeben, um die Zellen enzymatisch vom Boden der Kulturflasche zu lösen, die Flaschen leicht geschüttelt und für 3 min bei 37°C inkubiert. Durch Zugabe von 8 ml MV-2 Medium wurde die Enzymreaktion gestoppt, die Zellen wurden vereinzelt und wie in 2.2.1 beschrieben, in der Neubauer-Zählkammer gezählt.

Je 2×10^6 Zellen wurden in jede Flasche gegeben und mit Medium (MV-2) auf 20 ml aufgefüllt. Die Zellen wurden maximal bis zur achten Passage verwendet und das Medium wurde spätestens nach 3 Tagen getauscht.

2.2.3 LPS-Stimulation

Die LPS-Stimulation diente der *in vitro* Simulation einer Sepsis. Die wie oben beschrieben gewonnenen PBMCs wurden je nach Versuchsprotokoll entweder einmal (1. Hit) oder zweimal (1. + 2. Hit) mit LPS behandelt. Dabei erfolgte der 1. Hit immer in der Konzentration 10 ng/ml und der 2. Hit immer mit 100 ng/ml. Die Kontrollen wurden mit entsprechenden Mengen Medium behandelt.

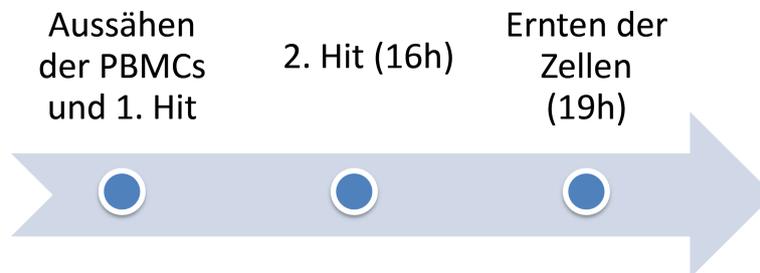


Abb. 10: Stimulationsschema für die PBMC-Versuche: 1. und 2. Hit erfolgen entweder mit RPMI-1640 Medium oder mit LPS. Dabei erfolgt der 1. Hit mit dem Aussähen und der 2. Hit nach 16 Stunden. Nach weiteren 3 Stunden werden die Zellen geerntet.

Inkubiert wurden die Zellen 16 h mit dem 1. Hit und 3 h mit dem 2. Hit (siehe Abbildung 10). Nach Ablauf dieser Zeitspanne wurden die Zellen aus den Wells geerntet und in ein 15 ml Röhrchen überführt; diese wurden 5 min bei 800 g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und in ein 1,5 ml Eppendorf-Tube verbracht. Das zurückgebliebene Zellpellet und der Überstand wurden beide bei -80 °C eingefroren. Die LPS-Stimulation der HPMECs ist im Abschnitt 2.2.9 beschrieben.

2.2.4 Ribonucleinsäure (RNA)-Isolation

Es wurden je 6×10^6 Zellen pro Versuchsdurchlauf für jedes Behandlungsregime verwendet, die entsprechenden Überstände wurden für Enzym-linked Immunosorbent Assays (ELISAs) verwendet (siehe 2.2.7). Die benötigten Proben wurden auf Eis aufgetaut und die Pellets in 1 ml Trizol resuspendiert, das die Zellen zerstört und die zu extrahierende RNA schützt. Im Anschluss wurden zu jeder Probe 200 μ l Chloroform gegeben. Dabei bildet das Chloroform eine zweite Phase, wobei die RNA in der wässrigen Phase gelöst ist. Nachdem die Proben von Hand invertiert wurden, inkubierten sie für 3 min bei RT. Um die RNA-Phase zu separieren, wurde bei 12.000 g und 4 °C für 15 min zentrifugiert. Die obere, wässrige Phase enthält schließlich die RNA, daher wurde sie in ein neues 1,5 ml Eppendorf-Tube überführt. Um eine Ausfällung der RNA zu erreichen, wurden im

nächsten Schritt je 500 μ l Isopropanol hinzugegeben und die Proben gevortext. Die so durchmischten Proben wurden anschließend für 10 min bei RT inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation (12.000 g, 10 min, 4 °C) wurde der Überstand verworfen. 1 ml 75 % Ethanol in Diethyldicarbonat (DEPC)-Wasser (1 Volumenprozent DEPC in H₂O) wurde hinzugefügt und die Proben erneut gevortext. DEPC zerstört RNAsen (RNA-spaltenden Enzyme) und ist daher für das Ansetzen von Lösungen zur RNA-Gewinnung geeignet.

Nun folgte eine erneute Zentrifugation (10.000 g, 5 min, 4 °C), nach der wiederum der Überstand verworfen wurde. Dieser Behandlungszyklus mit Ethanolzugabe, Vortexen, Zentrifugation und Verwerfen des Überstandes wurde im Anschluss noch einmal wiederholt. Dies diente vor allem dem Entfernen von Trizol- und Isopropanolrückständen, die nach der Auftrennung von RNA und anderen Bestandteilen noch vorhanden sein könnten.

Um das Ethanol von der RNA zu entfernen, wurden die Reaktionsgefäße 30 min unter dem Abzug getrocknet. Im Anschluss wurden die Pellets in je 20 μ l DEPC-Wasser resuspendiert und die Reaktionsgefäße bis zur weiteren Bearbeitung auf Eis gestellt.

Der RNA-Gehalt der Proben wurde photometrisch analysiert (Nanodrop). Dabei wurde die Messung auf das Lösungsmittel (DEPC)-Wasser geeicht und jeweils 1,5 μ l der Proben gemessen. Die so bestimmten Konzentrationen flossen in die späteren Verdünnungsschritte ein. Diese stellten sicher, dass alle Proben vergleichbare Mengen RNA für die komplementäre Desoxyribonucleinsäure (cDNA)-Synthese enthielten. Zur Sicherstellung der Reinheit wurde nicht nur bei 260 nm (Absorptionsmaximum für RNA) gemessen, sondern auch bei 230 nm (Absorptionsmaximua für Lösungsmittel: Phenole, Alkohole etc.) und 280 nm (Absorptionsmaximum für Proteine). Aus diesen photometrischen Werten wurden Quotienten bestimmt (260/230 und 260/280), wobei der 260/280 Quotient zwischen 1,8 und 2 liegen sollte.

2.2.5 cDNA-Synthese

Um die mRNA-Expression der Zellen zu untersuchen, musste die isolierte RNA zuerst in cDNA umgeschrieben werden. Zu diesem Zweck wurde das High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit der Firma Thermo Fisher Scientific Inc. verwendet. Die einzelnen Komponenten des Kits wurden, wie in Tabelle 2 angegeben, verwendet.

Tab. 2: Komponenten im High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit und die benötigten Menge pro Reaktion

Komponenten	Anteil an Mastermix	Volumen pro Reaktion (in μl)
10x RT Buffer	20 %	1,16
25x dNTP Mix (100 mM)	8 %	0,46
10x RT Random Primers	20 %	1,16
MultiScribe Reverse Transcriptase	10 %	0,58
RNAse-freies H ₂ O	42 %	2,4
Gesamt	100 %	5,8

Pro Reaktion wurden 5,8 μl Master Mix (MM) eingesetzt und 14,2 μl verdünnte RNA-Lösung, deren Konzentration so gewählt wurde, dass 2000 ng enthalten waren. Die gesamte erforderliche MM-Menge wurde für alle Reaktionsansätze ausgerechnet und ein MM für alle Proben (+10 %; Pipettierverlust etc.) erstellt. Die entsprechenden Versuchsansätze wurden im Thermocycler einer vorgegebenen Temperaturabfolge ausgesetzt, sodass die nötigen Reaktionen stattfinden konnten (s. Tabelle 3).

Tab. 3: Reaktionsablauf Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion

Reaktionsschritt	Temperatur	Zeitdauer
Anlagerung	25 °C	10 min
cDNA-Synthese	37 °C	120 min
Reverse-Transkriptase Denaturierung	85 °C	5 s
Kühlung	4 °C	99 h

Der Denaturierungsschritt ist nach abgeschlossener cDNA-Synthese erforderlich um Beeinträchtigungen des weiteren Versuchsablaufs zu verhindern. Bei kurzem Erhitzen auf 85

°C wird die Reverse Transkriptase denaturiert und verliert ihre Funktion. Der letzte Schritt ist kein obligater Schritt der cDNA-Synthese, sondern dient vielmehr dem Schutz des Produkts und erlaubt eine Versuchsdurchführung über Nacht. Im Anschluss wurde die cDNA 1:12,5 verdünnt (Endkonzentration: 8 µg/ml), das heißt bei einem Volumen von 20 µl wurden nochmal 230 µl DEPC hinzugegeben.

2.2.6 Quantitative Polymerase Chain Reaction (qPCR)

Die durch die cDNA-Synthese gewonnene DNA wurde im nächsten Schritt mit Hilfe der qPCR amplifiziert. Dabei wird unter den Zielgenen ein relativer Expressionsunterschied konserviert und darstellbar, der Rückschlüsse auf die vorhandenen Expressionsmuster erlaubt. Dazu wurde für jedes zu untersuchende Zielgen ein MM aus Zielsonde, TaqMan Gene Expression Master Mix (enthält Polymerase, Puffer und Nukleotide) (Applied Biosystems) und DEPC-H₂O angesetzt.

Das Gen der 18s schweren RNA-Untereinheit der Ribosomen wurde als Housekeeping Gen verwendet. Die für 18s bestimmten Expressionslevel können als Expressionsbaseline angesehen werden, da die 18s-Expressionslevel von externen Stimuli weitgehend unabhängig sind (Bas, 2004). Sie eignen sich als Bezugsgröße für die Expressionslevel anderer Zielgene (s.u.). Der MM wurde in ausreichendem Volumen angesetzt, um eine Dreifachbestimmung zu ermöglichen. Pro Reaktion wurden 5,55 µl TaqMan Gene Expression Master Mix, 0,56 µl Sonde und 2,80 µl DEPC-H₂O eingesetzt. Diese MMs wurden gevortext und anschließend in entsprechenden Reaktionsgefäßen vorgelegt: Für jede DNA-Probe gab es einen Ansatz pro Zielgen und einen Ansatz für 18s. Für jedes Zielgen gab es eine Non Template Control (NTC)-Kontrolle, die DEPC-H₂O statt DNA enthält. Es wird erwartet, dass das Fluoreszenzsignal der NTC-Kontrolle unter der Detektionsschwelle bleibt; sie dient also als Negativkontrolle, um eine Kontamination mit Fremd-DNA auszuschließen.

Nun wurden 6,65 µl der cDNA in 0,5 ml Eppendorf-Tubes pipettiert. Die Ansätze wurden nochmal kurz abzentrifugiert, um sicherzustellen, dass sich alle Reaktionskomponenten am Boden des Gefäßes befinden. Im Anschluss wurden 10 µl der Proben mit einer Mehrkanalpipette auf eine 384-Well Platte pipettiert. Jede Probe wurde in Dreifachbestimmung aufgetragen. Schließlich wurde die Platte mit einer Folie versiegelt. Diese soll sicherstellen, dass das Reaktionsgemisch auch bei den hohen Temperaturen der qPCR im Well verbleibt, außerdem schützt sie vor Kontamination.

Die Proben wurden in der entsprechenden Software (ViiA 7 RUO Version 1.2.1) des qPCR-Gerätes (ViiA 7) erfasst und konnten so den Ergebniswerten zugeordnet werden.

Außerdem wurde so die Zyklenzahl (40) sowie die einzelnen Reaktionsphasen festgelegt. Nach einem kurzen Vorheizen beginnt der ViiA 7 mit der Denaturierungsphase (95 °C), in der die DNA-Stränge voneinander getrennt werden. Dies dauert 15 Sekunden. Im Anschluss kühlt das System auf 60 °C herunter. In dieser Phase (1 min) hybridisieren zunächst die spezifischen Primer, bevor die DNA-Polymerase beginnt, einen neuen DNA-Strang zu synthetisieren. Die Sonden binden an komplementäre DNA-Abschnitte. Wenn die Polymerase die Sonden erreicht, werden Reporter-Moleküle von den Quenchern der Sonden gelöst und fluoreszieren.

Die Fluoreszenz der noch an Taq-Sonden gebundene Reporter wird von sog. Quencher-Molekülen unterdrückt, die sich in unmittelbarer Nähe befinden. Bei der laufenden DNA-Synthese werden aber beide Moleküle getrennt und entfernen sich so voneinander. So kann der Quencher die vom Reporter ausgesendete Fluoreszenz nicht mehr absorbieren. Die während der Amplifikation gemessene Fluoreszenz kann als quantitatives Maß für die Replikation des Zielgens angesehen werden. Diese wiederum erlaubt Rückschlüsse auf die ursprünglich vorhandene cDNA bzw. mRNA-Menge. Die Doppelstränge werden im Anschluss wieder denaturiert/getrennt und die Einzelsträngen durchlaufen den Zyklus erneut.

Erfasst wird letztlich der Zeitpunkt zu dem die abgegebene Fluoreszenz den Schwellenwert übersteigt bzw. ob sie es nicht tut. Den Schwellenwert bestimmen sowohl die Hintergrundstrahlung als auch das Fluoreszenzlevel, das am Übergang von linearer zu exponentieller Substratsynthese erreicht wird. In der Auswertung ist dann entscheidend, in welchem Zyklus das Signal eines bestimmten Zielgens den Schwellenwert übersteigt. Hierbei wird auf den Zeitpunkt (Zykluszahl), zu dem 18s in der Probe detektierbar wird, normiert. Diese Normierung wird durchgeführt, um evtl. unterschiedliche Gesamt-DNA-Mengen in den Ansätzen auszugleichen.

Die gemessene Zahl an Zyklen, nach denen der Schwellenwert überwunden wird, wird mit CT bezeichnet (siehe Abbildung 11). Bei der verwendeten Delta-Delta-CT-Methode, werden die bestimmten CT-Werte wie folgt ausgewertet:

Die CT-Werte aller Proben für 18s werden von den CT-Werten des zu untersuchenden Zielgens in der jeweils gleichen Probe abgezogen (=Delta-CT). Wobei ein hoher CT-Wert bedeutet, dass ein Signal nach vielen Zyklen den Schwellenwert überwand und daher eine geringe Menge an cDNA in der Probe zu finden war.

Der Delta-CT-Wert einer zuvor bestimmte Kontrollprobe, zu der die Expressionslevel der anderen Proben in Relation gesetzt werden sollen, wird von den Delta-CT-Werten aller

$$(CT(\text{Zielgen}) - CT(18s)) - CT(\text{Kontrolle}) = \Delta\Delta\text{-CT}$$

anderen Proben abgezogen, so kommt der Delta-Delta-CT-Wert zustande.

In einem letzten Schritt wird der RQ-Wert nach der Formel $RQ = 2^{\Delta\Delta\text{-CT}}$ bestimmt, so dass sich für die Kontrolle ein Wert von 1 ergibt und für Proben mit viel Substrat ein Wert größer 1 bzw. für wenig Substrat ein Wert kleiner 1.

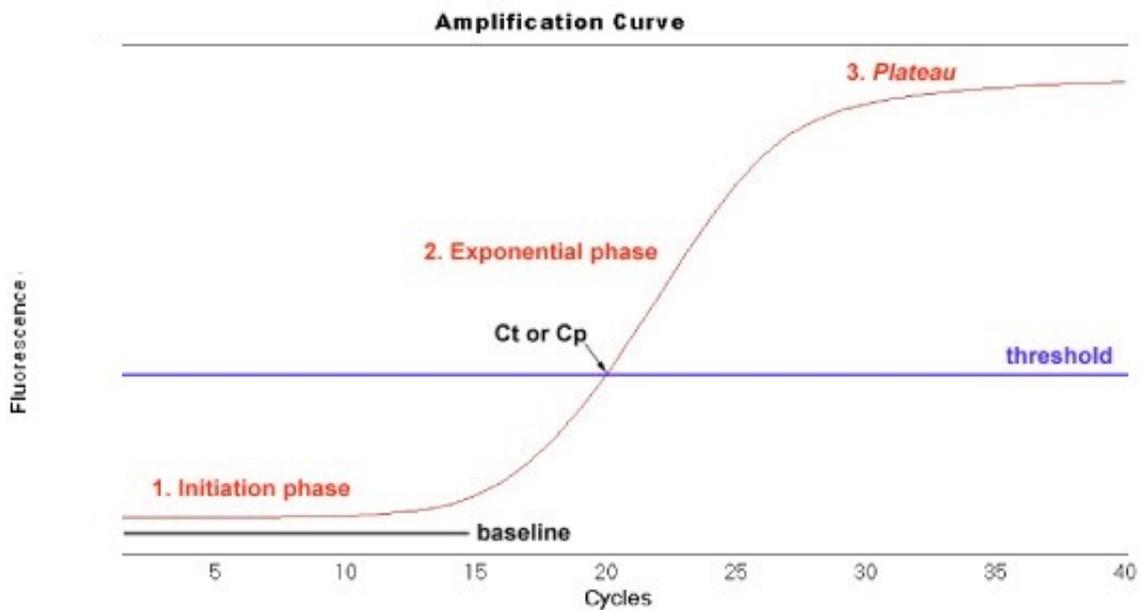


Abb. 11: Kurvendarstellung der durch die Substratvermehrung freiwerdenden Fluoreszenz in der qPCR. Am Punkt Ct übersteigt die Fluoreszenz den Schwellenwert. modifiziert nach (Rodriguez-Lazaro, 2013)

2.2.7 ELISA

Um Proteinlevel nach entsprechender Stimulation (siehe Abschnitt 2.2.3) zu messen, wurden für die Zytokine Interleukin-1 beta ($IL-1\beta$), $TNF-\alpha$ und $IL-10$ ELISAs durchgeführt. Bei den verwendeten Kits der Firma BD Biosciences (San Diego, USA) handelt es sich um sog. Sandwich-ELISAs. Das Prinzip eines Sandwich-ELISAs ist im Folgenden in Abbildung 12 dargestellt.

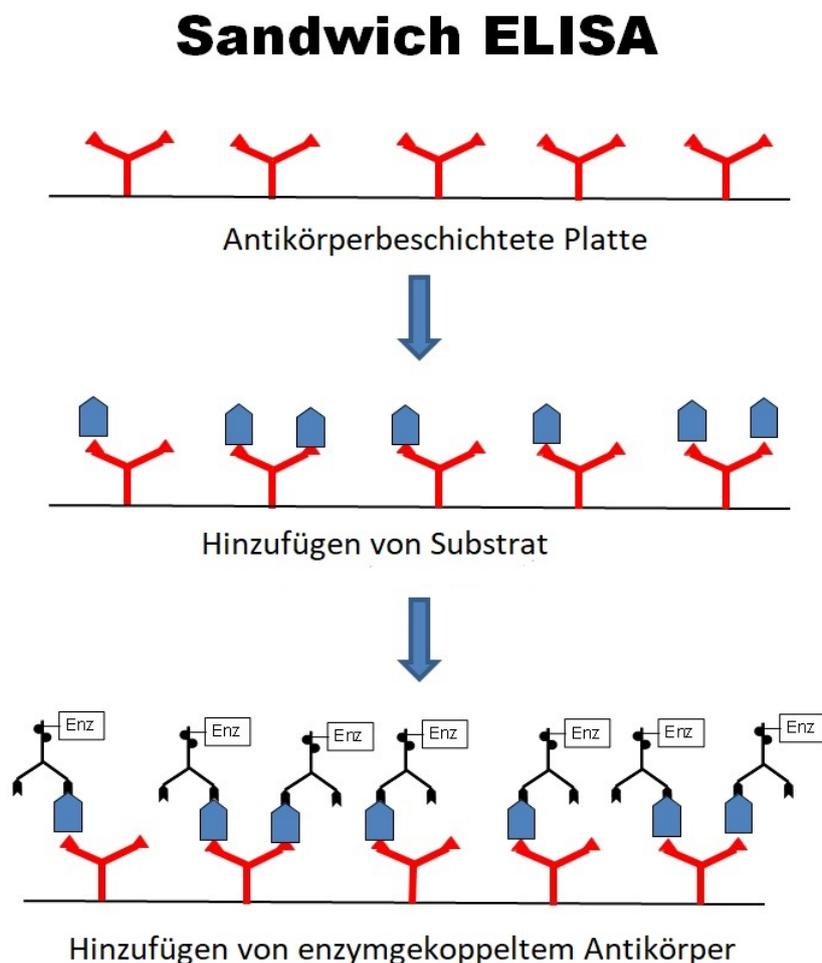


Abb. 12: Allgemeines Prinzip eines Sandwich-ELISAs. Auf eine antikörperbeschichtete Platte wird das Substrat aufgebracht, welches an die Antikörper bindet. Ungebundenes Substrat wird entfernt. Ein zweiter Antikörper wird hinzugegeben, dieser bindet wiederum an das verbliebene Substrat und ist an ein Enzym gekoppelt, welches eine Reaktion katalysiert, die zum Beispiel ein fluoreszentes Produkt hat. Diese Fluoreszenz ist direkt proportional zur Menge an vorhandenem Substrat, modifiziert nach (Sittampalam, 2004).

Im Folgenden wird exemplarisch das Protokoll des IL-1 β -ELISAs vorgestellt. Außer unterschiedlichen spezifischen Antikörpern unterscheiden sich die Versuchsprotokolle für die Zielgene IL-10 und TNF- α nicht von dem gezeigten. Allerdings sind die Standardkonzentrationen für die beiden letztgenannten durchgehend doppelt so hoch (7,8 pg/ml - 500 pg/ml).

Eine 96-Well-Platte wurde mit 100 μ l Coating Antibody je Well beschichtet. Dieser war im Verhältnis 1:250 in Coating Buffer gelöst (1 h Coating Buffer: 7,13g NaHCO₃, 1,59g Na₂CO₃ in 1 l H₂O; pH bei 9,5). Anschließend wurde die Platte versiegelt und über Nacht bei 4 °C im Kühlschrank inkubiert.

Am nächsten Tag wurde jedes Well mit je 200 μ l Waschpuffer gespült (Waschpuffer: PBS mit 0,05 % Tween-20) und die Platte anschließend ausgeklopft. Dann wurden die Wells mit je 200 μ l Assay Diluent geblockt (Assay Diluent: PBS mit 10 % FBS) und für 1 h bei RT inkubiert und anschließend wie beschrieben gewaschen.

Im nächsten Schritt wurden die Standards vorbereitet. Um den höchsten Standard (250 pg/ml) zu erhalten, wurde eine Stammlösung der Konzentration 25 μ g/ml 1:100 verdünnt (10 μ l Stock Solution auf 990 μ l Assay Diluent). Die weiteren Standards wurden durch 1:2 Verdünnung hergestellt (siehe Abbildung 13). Die Proben wurden je 1:10 in Assay Diluent verdünnt und mit je 100 μ l in Doppelbestimmung auf die Platte aufgebracht. Ebenso wurden 100 μ l jedes Standards in Doppelbestimmung auf die Platte pipettiert. In zwei Wells wurde nur Assay Diluent als Blank verwendet. Es folgte eine zweistündige Inkubation bei RT.

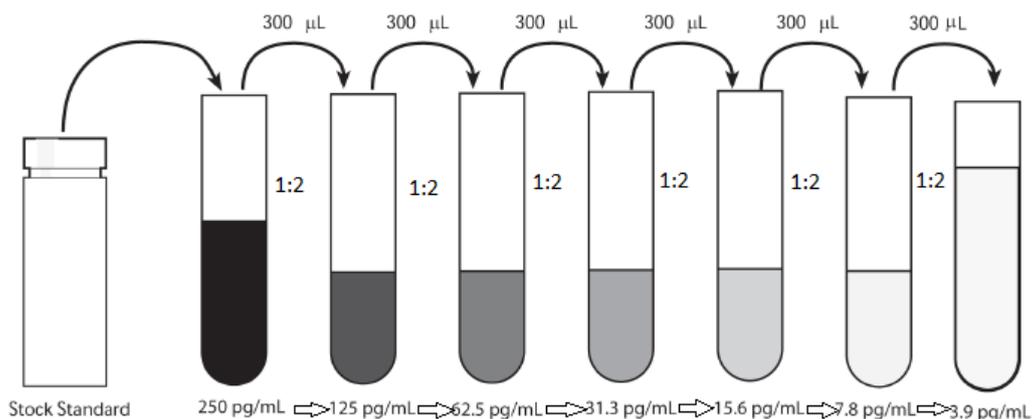


Abb. 13: Herstellung der Standards (Verdünnungsreihe immer im Verhältnis 1:2) für IL-1 β ; vorgelegt sind je 300 μ l Assay Diluent; andere Zielproteine abweichend (modifiziert nach BD Bio Tech Data Sheet ELISA IL-1b).

Nach einem erneuten identischen Waschschrift wurden 100 μ l Detection Antibody (1:1000

in Assay Diluent verdünnt) auf jedes Well gegeben. Nachdem die Platte für 1 h bei RT inkubiert hatte, wurde erneut gewaschen. Im nächsten Schritt wurden je 100 μl Enzyme Reagent (enthält Meerrettichperoxidase) (1:250 in Assay Diluent verdünnt) zugegeben, woraufhin die Platte erneut 30 min bei RT inkubierte. Nach einem letzten Waschschrift wurden je 100 μl Substrat Solution hinzupipettiert (Substrat Solution: Tetramethylbenzidin und Wasserstoffperoxid im Verhältnis 1:1). Für die folgende letzte Inkubation wurde die Platte nicht versiegelt, aber 30 min im Dunkeln gelagert.

Mit je 50 μl H_2SO_4 wurde die Reaktion gestoppt. Es kam zum Farbumschlag von blau zu gelb. In einem letzten Schritt wurde die Absorption in einem Microplate-Reader bei 450 nm gemessen. Von diesem Ergebnis wurde das Ergebnis der Korrekturwellenlänge 570 nm abgezogen. Von allen korrigierten Messwerten wurde der Wert der Blankmessung abgezogen. Aus den Standards wurde eine Regressionsgerade durch den Nullpunkt gelegt, deren Steigung bestimmt wurde. Die Messwerte der Proben wurden mit dem Kehrwert der Verdünnung multipliziert (10), dann wurden sie durch die Steigung der Geraden dividiert. Ergebnis dieser Rechnung war die Konzentration des Zielproteins in pg/ml.

2.2.8 Zellseparation

Aus der PBMC-Zellsuspension sollten in einem weiteren Schritt die Monozyten isoliert werden, um feststellen zu können, ob die beobachteten Veränderungen dieser Population zuzuordnen sind. Bei der Auftrennung der verschiedenen Populationen muss darauf geachtet werden, dass die Selektion selbst keine metabolische Aktivierung der betroffenen Zellen induziert. Diese Gefahr besteht vor allem bei der so genannten Positivselektion, bei der die zu separierenden Zellen direkt mit Hilfe von Antikörpern markiert werden. Diese Antikörper können die metabolische Aktivität der Zellen verändern (Mayer, 2011). Durch diese Aktivierung können die Ergebnisse der folgenden Untersuchungen verfälscht werden, da eine Folge der separationsassoziierten Aktivierung beobachtet wird und nicht die gewünschte Aktivierung im Rahmen des eigentlichen Versuches.

Beim fluorescence-activated cell sorting (FACS) kommt dieses Verfahren zum Einsatz. Die Magnetic Cell Separation (MACS) bietet darüber hinaus die Möglichkeit der Negativselektion, bei der nur die nicht zu untersuchenden Zellen mit magnetischen Antikörpern markiert werden und so extrahiert werden (siehe Abbildung 14).

Bei der MACS durchläuft die Zellsuspension eine Separationssäule, welche an einem Magneten hängt. Dadurch verbleiben die magnetisch markierten Zellen in der Säule, während die nicht markierten Zellen unten herausfließen.

Aus den oben genannten Gründen wurde eine MACS-negativ-Selektion durchgeführt. Im

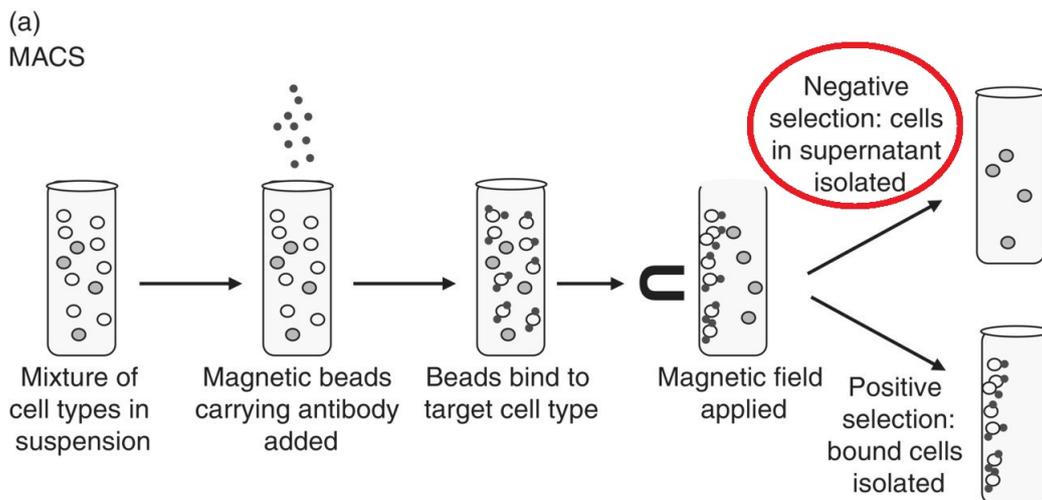


Abb. 14: Positive und negative Selektion mit Hilfe von magnetischen Antikörpern, rot markiert ist die vorteilhaftere negative Selektion, modifiziert nach (Kathleen M Botham, 2016).

ersten Schritt wurden die Zellen gezählt und 1×10^7 Zellen aus der Suspension entnommen. Diese wurden bei 4°C , 300 g für 10 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in $30\ \mu\text{l}$ Puffer resuspendiert. Im nächsten Schritt wurden je $10\ \mu\text{l}$ FcR Blocking Reagent und Biotin-Antibody Cocktail hinzugefügt. Das Blocking Reagent blockt die unspezifischen Bindungen im Antibody Cocktail, der dann hochspezifische Bindungen eingeht. Die Antikörper sind biotinmarkiert um im Verlauf von einem zweiten Antikörper gebunden werden zu können.

Der Ansatz wurde gut durchmischt und anschließend für 5 min bei 4°C inkubiert. Dann wurden nochmals $30\ \mu\text{l}$ PBS-Puffer hinzugegeben. Um die bereits gebundenen Antikörper magnetisch zu machen, wurden mit MicroBeads gekoppelte Anti-Biotin-Antikörper hinzugegeben ($20\ \mu\text{l}$). Es folgte eine weitere Inkubation bei 4°C für 10 min.

Zur Separation mussten die Säulen (LS Columns) vorbereitet werden. Dazu wurden sie mit 3 ml PBS-Puffer gespült. Im Anschluss wurde die Zellsuspension auf die Säule aufgebracht, erneut mit 3 ml Puffer gespült und der Durchfluss aufgefangen. Dieser wurde erneut auf die Säule gegeben und mit 3 weiteren ml Puffer gespült. Dieser Ablauf wurde noch einmal wiederholt.

Die markierten Zellen verbleiben im Anschluss in der Säule und der Durchfluss enthält die gesuchten, nicht markierten Zellen.

2.2.9 Adhäsionsassay

Die Effektorfunktionen von Immunzellen müssen im Zusammenspiel mit anderen beteiligten Zellarten untersucht werden. Dies gilt im Besonderen für die Adhäsion. Für den Adhäsionsassay wurden HPMECs und PBMCs verwendet. Die HPMECs bilden dabei die Zellschicht, an die die PBMCs adhäreren. Da es sich bei den HPMEC-STR.1 um immortalisierte Zellen handelt, können mit ihnen längerfristige Effekte beobachtet werden, als es mit PBMCs möglich wäre. Daher wurden für diesen Versuch die HPMECs LPS-Stimulationen unterzogen und ihre Interaktion mit PBMCs untersucht. Auf diese Weise kann beobachtet werden, wie PBMCs an stimulierten Endothelzellen adhäreren und welche Veränderungen sich in diesem Zusammenhang ergeben.

In 24-Well-Platten wurden 50.000 HPMECs je Well ausgesät. Nach zwei Tagen waren die Zellen angewachsen und das Medium wurde erneuert. Die Zellen der Spalten 3 und 5 wurden zudem mit LPS [$1 \mu\text{g/ml}$] stimuliert (siehe Tabelle 4). Am nächsten Tag wurde wieder das Medium gewechselt und die Spalten 3 und 5 erneut mit LPS in der angegebenen Konzentration stimuliert. Dies wurde an einem dritten Tag nochmals wiederholt, bis am vierten Tag nur das Medium gewechselt wurde. Um die unmittelbare LPS-Aktivierung abzuwarten, wurden die Zellen nochmals 3 Tage inkubiert, bis schließlich der eigentliche Versuch durchgeführt wurde.

Die PBMCs wurden, wie im Kapitel PBMC-Isolation dargestellt, gewonnen. Im Anschluss wurden von mehreren Probanden je 5×10^6 Zellen in 5 ml Medium (RPMI 1640) mit $0,5 \mu\text{l/ml}$ Calcein-AM 1 h im Brutschrank inkubiert. Es wurden verschiedene Probanden gewählt, um zu sehen wie konstant die zu beobachtenden Effekte zwischen den Individuen sind.

Calcein fluoresziert und darf deswegen während des gesamten Versuchs keinem direkten Licht ausgesetzt werden. Der Farbstoff beginnt allerdings erst zu fluoreszieren, nachdem er gespalten wurde. Diese Aufgabe übernimmt die zelluläre Esterase, extrazellulärer Farbstoff fluoresziert daher nicht.

Nach Abschluss der Inkubation wurden die Zellen abzentrifugiert (300 g, 5 min, RT, ohne Bremse) und der Überstand verworfen. Anschließend wurden die Zellen mit 10 ml PBS gewaschen und erneut abzentrifugiert. Nach erneutem Verwerfen des Überstandes wurden die PBMCs in 5 ml Medium (RPMI 1640) aufgenommen. Das Medium der HPMECs wurde ebenfalls abgesaugt und auch diese mit $0,5 \text{ ml}$ PBS pro Well gespült.

Nun wurden je $500 \mu\text{l}$ der PBMC-Lösung auf die Wells der Reihen 2 bis 5 gegeben. Anschließend wurde die Platte 30 min im Brutschrank inkubiert.

Schließlich wurden die Wells noch zweimal mit je 1 ml PBS gewaschen, hierbei wurden die

Tab. 4: Adhäsionsassay auf 24-Well-Plate, Proben in Vierfachbestimmung, P1: Proband 1, P2: Proband 2, US: Unstimulierte HPMECs, S: Stimulierte HPMECs

	1	2	3	4	5	6
A	Blank	P1 + US	P1 + S	P2 + US	P2 + S	leer
B						
C						
D						

nicht adhärenen PBMCs weggespült. Alle Zellen, die dann (durch die Calceinmarkierung) noch leuchteten, waren auch adhären. Nun konnte die Platte in einem Fluoreszenzreader (Cytation 3 Reader) analysiert werden.

2.2.10 Phagozytoseassay

Für den Phagozytoseassay wurden die PBMCs statt mit einem 2. Hit LPS mit pHrodos der Firma ThermoFisher Scientific inkubiert. PHrodos sind Fragmente von abgetöteten E.coli Bakterien, die mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt (in diesem Fall FITC) wurden. Dieser Farbstoff hat an sich schon eine Fluoreszenzaktivität, diese wird aber in Abhängigkeit vom pH-Wert größer oder kleiner. Das Fluoreszenzmaximum liegt dabei bei einem pH-Wert von 4 (siehe Abbildung 15). Dies ist auch der pH-Wert der in Lysosomen vorliegt (Flannagan, 2012). Daher kann davon ausgegangen werden, dass phagozytierte pHrodos stärker fluoreszieren als solche, die frei im Medium/Puffer vorliegen.

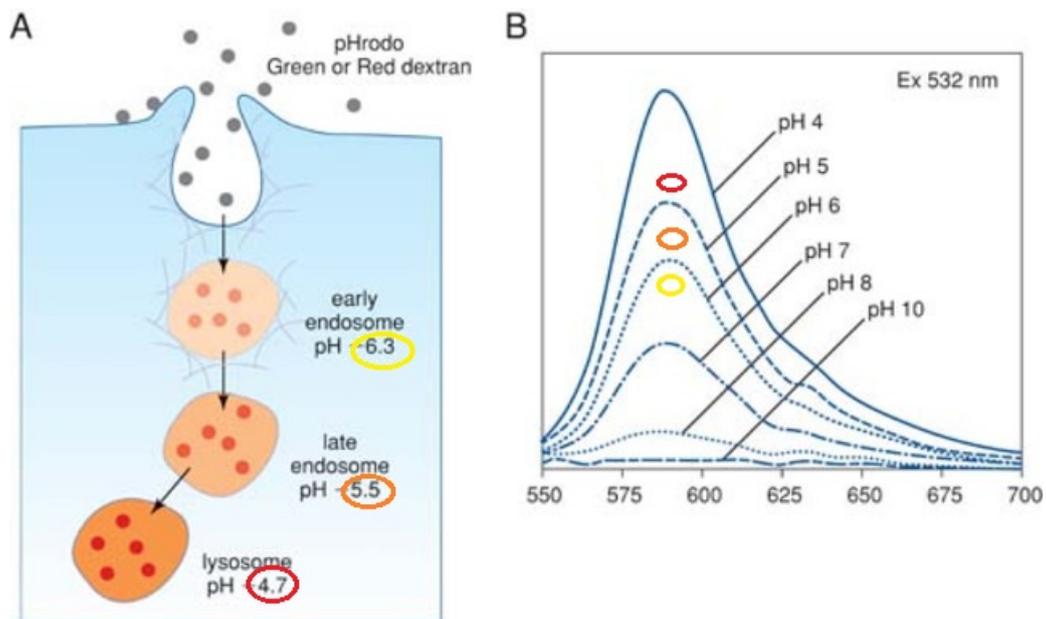


Abb. 15: pH-abhängige Eigenschaften der pHrodos. A: Mit der Endosomreifung nimmt der pH-Wert im Endo-/Lysosom ab und die Fluoreszenz zu. B: Darstellung der Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit vom pH-Wert; Exitation bei 532 nm, modifiziert nach (Dolman, 2013).

Die PBMCs wurden wie in Abschnitt 2.2.1 beschrieben gewonnen, anschließend wurden 1×10^6 Zellen (in 1 ml Medium) pro Well auf eine 24-Well Platte aufgebracht. Diese wurden mit unterschiedlichen LPS-Konzentrationen stimuliert.

Tab. 5: 24-Well Platte: PBMCs von zwei verschiedenen Probanden (P1/P2), die mit LPS stimuliert wurden. Die Zahlen geben die LPS-Konzentration in [ng/ml] an. K=Kontrolle; Medium statt LPS

Donor PBMCs		1	2	3	4	5	6
P1	A	K	1000	100	10	1	0,1
	B	K	1000	100	10	1	0,1
P2	C	K	1000	100	10	1	0,1
	D	K	1000	100	10	1	0,1

Nachdem die Zellen wie in Tabelle 5 behandelt wurden, inkubierten sie für 24 h im Brutschrank. Anschließend wurden die PBMCs aus den Wells geerntet und abzentrifugiert (800 g, RT, 5 min). Der Überstand wurde verworfen.

Die lyophilisierten pHrosos wurden in 2 ml Medium (RPMI 1640) gelöst und anschließend gevortext. Dann wurden sie in Medium (RPMI 1640) 1:10 verdünnt. In jeweils einem ml dieser Verdünnung wurden die Zellen resuspendiert und wieder (nach dem Schema in Tabelle 5) auf eine frische schwarze Platte ausgesät. Diese hat den Vorteil, dass Streueffekte minimiert werden. Nach 2 h Inkubation im Brutschrank wurde die Fluoreszenz auf der Platte photometrisch bestimmt. Dazu wurde sie im Cytation 3 Reader gemessen (Excitation/Emission[nm]: 509/533). Da einzelne punktuelle Messungen eine zu große Varianz zeigten, wurde ein *Area Scan* mit 3x3 Messungen pro Well durchgeführt und das arithmetische Mittel bestimmt.

2.2.11 Inhibitorbehandlung

Um zu klären, ob eine eventuelle Toleranzinduktion auf epigenetische Mechanismen zurückzuführen ist, wurden zwei etablierte Inhibitoren epigenetischer Enzyme eingesetzt: Decitabin (5-Aza-2'-desoxycytidin) und Trichostatin A. Ersteres blockiert DNA- und RNA-Methyltransferasen, letzteres ist ein Inhibitor der Histondeacetylasenklassen 1 und 2 (Karahoca, 2013; Sato, 2005).

Decitabin und TSA wurden in Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst.

Die PBMCs wurden wie in 2.2.1 isoliert, wie in 2.2.2 kultiviert und wie in 2.2.3 stimuliert. Zeitgleich mit dem 1. Hit wurden die Inhibitoren zugegeben. Als Kontrolle diente eine weitere Gruppe, zu der neben LPS/Medium statt den Inhibitoren ein entsprechendes Volumen DMSO gegeben wurde (siehe Tabelle 6).

Tab. 6: Behandlungsgruppen für Inhibitorversuche; 1: 1. Hit (über Nacht), 2: 2. Hit(3 h), 1+2: 1. und 2. Hit(über Nacht bzw. 3 h), M: Mediumkontrolle, Inhib.: Inhibitorgabe (mit 1. Hit), DMSO: DMSO-Kontrolle (mit 1. Hit) Durchgeführt in 6-Well-Platten in Doppelbestimmung; hier abweichend dargestellt.

M DMSO	M Inhib.
1 DMSO	1 Inhib.
2 DMSO	2 Inhib.
1+2 DMSO	1+2 Inhib.

2.2.12 DNA-Isolation

Um eine Methylierungsanalyse durchzuführen, wurde die DNA aus (wie in Abschnitt 2.2.13 beschrieben) unstimulierten und stimulierten Zellen gewonnen. Diese DNA-Isolation wurde mit Hilfe eines Isolationskits für genomische DNA (Machery Nagel) durchgeführt.

Pro Behandlungsgruppe wurden 10^7 Zellen in $200 \mu\text{l}$ eines im Kit enthaltenen Lysepuffers (T1) resuspendiert. Im nächsten Schritt wurden $25 \mu\text{l}$ Proteinase und $200 \mu\text{l}$ eines zweiten Lysepuffers (B3) hinzugegeben. Die Proben wurden gut durchmischt und bei 70°C für 15 min inkubiert. Im Anschluss wurden je $210 \mu\text{l}$ Ethanol hinzugefügt und die Proben nochmals durchmischt. Dabei wurde die DNA als Präzipitat sichtbar.

Um die DNA aus den Proben zu isolieren, wurde jede Probe auf eine Säule mit Silica Membran gegeben, an der die DNA gebunden wurde. Die Säule wurde in ein $1,5 \text{ ml}$ Reaktionsgefäß gestellt, welches den Durchfluss aufnahm. Die Proben wurden für 1 min bei 11.000 g zentrifugiert, der Durchfluss verworfen. Beim folgenden Waschschrift wurden $500 \mu\text{l}$ Waschpuffer (BW) hinzugegeben, erneut für 1 min bei 11.000 g zentrifugiert und der Durchfluss schließlich verworfen. Ebenso wurde ein zweiter Waschschrift mit $600 \mu\text{l}$ eines zweiten Waschpuffers (B5) durchgeführt und der Durchfluss wiederum verworfen.

Um die Membran zu trocknen und Lösungsmittelreste zu entfernen wurde sie erneut für 1 min bei 11.000 g zentrifugiert. Nun befand sich nur noch die DNA in der Membran und konnte in einem letzten Schritt aus ihr herausgelöst werden. Dazu wurden die Membranen in neue $1,5 \text{ ml}$ Reaktionsgefäße platziert. $100 \mu\text{l}$ Elutionspuffer (BE) wurde auf die Membran gegeben und diese anschließend für 1 min bei 11.000 g zentrifugiert. Der Durchfluss (der nun die DNA enthält) wurde bei -20°C eingefroren und innerhalb von wenigen Tagen weiterverarbeitet.

2.2.13 Methylierungsassay

In Zusammenarbeit mit dem Institut für Humangenetik der Universitätsklinik Bonn wurden die Methylierungslevel in CpG-sites analysiert. Dafür wurden Proben von vier Probanden, wie in 2.2.1 beschrieben, gewonnen und anschließend über Nacht mit 10 ng/ml LPS inkubiert. Die Zellen wurden dann bei 300 g abzentrifugiert.

Wie in Abschnitt 2.2.12 beschrieben, wurde die DNA isoliert und im Anschluss eine Bisulfit Konversion der DNA durchgeführt, bei der unmethylierte Cytosinbasen in Uracil konver-

tiert werden, während methyliertes Cytosin unverändert bleibt (siehe Abbildungen 16,17).

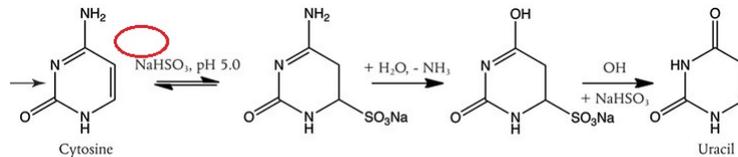


Abb. 16: Bisulfit Konversion von unmethyliertem Cytosin, modifiziert nach (Huang, 2010)

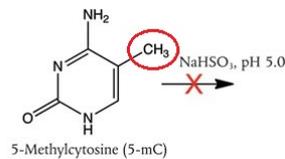


Abb. 17: Fehlende Bisulfit Konversion bei methyliertem Cytosin, modifiziert nach (Huang, 2010)

In einem nächsten Schritt wurde die DNA über Nacht amplifiziert. Das Produkt wurde durch enzymatischen Verdau fragmentiert um kürzere DNA-Abschnitte zu erhalten. Die Fragmente wurden durch Ethanol präzipitiert und dann bei 4 °C abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die DNA in einem Hybridisierungspuffer resuspendiert. Nun wurden die Proben auf einen Analyse Chip aufgetragen (BeadChip, Illumina); bei der folgenden Inkubation hybridisierten die DNA-Fragmente mit den auf dem Chip vorhandenen Sonden. Auf diesem sind Sonden für 500.000 CpG-Sites aufgebracht, jeweils eine, die die methylierte und eine, die die unmethylierte Variante erkennt. Die Erkennung beruht auf der Hybridisierung zwischen der zu untersuchenden DNA und den komplementären Sonden. Durch die zuvor durchgeführte Bisulfitkonversion kann zwischen methyliertem und unmethyliertem Cytosin unterschieden werden.

In einer weiteren Inkubation über Nacht lagerten sich die Proben an die entsprechenden Sonden an. Im Anschluss wurden unspezifisch gebundene Proben abgewaschen. Um die übrige Menge an DNA messbar zu machen, wurden die verbliebenen Fragmente verlängert und mit Fluorochromen markiert. In einem letzten Schritt wurden die Proben mit einem Laser angeregt und die abgestrahlte Fluoreszenz wurde gemessen. Jeder Position kann eine CpG-site zugeordnet werden und über die Intensität der Fluoreszenz kann darauf zurückgeschlossen werden, in wie vielen Zellen der (un-)methylierte Zustand vorlag.

2.2.14 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Daten wurde mit GraphPad Prism 5 (GraphPad Software Inc.) durchgeführt. Zur Signifikanzbestimmung zwischen zwei Gruppen wurde der t-Test mit einem Konfidenzintervall von $p < 0,05$ verwendet. Wenn mehrere Gruppen miteinander verglichen werden sollten, wurde eine 1-way analysis of variance (ANOVA) gefolgt von einem Tukey multiple comparison durchgeführt. Auch hier galt $p < 0,05$ als Konfidenzintervall.

Statistisch signifikante Ergebnisse wurden in den entsprechenden Graphiken durch die folgenden Symbole gekennzeichnet (siehe Tabelle 7).

Tab. 7: Signifikanzniveaus mit entsprechenden Symbolen

*	$p < 0,05$
***	$p < 0,0001$
n.s.	nicht signifikant

Wenn keine Kennzeichnung erfolgte, waren die dargestellten Gruppen nicht signifikant unterschiedlich oder ein signifikanter Unterschied nicht von inhaltlicher Relevanz.

3. Ergebnisse

3.1 Veränderung der Genexpression durch Toleranzinduktion

Um den Einfluss der LPS-Stimulation auf die Zytokinexpression zu untersuchen, wurden die Expressionslevel mit Hilfe von cDNA-Synthese und qPCR untersucht. Ziel der Versuche war zu eruieren, ob durch die LPS-Stimulation eine Toleranzinduktion hinsichtlich der Produktion der Zytokine IL-1 β , TNF- α und IL-10 erreicht werden konnte.

Die Analysen wurden mit PBMCs, die, wie in Abschnitten 2.2.1 und 2.2.3 beschrieben, isoliert und behandelt wurden, durchgeführt. Die Zellen wurden 16 h mit 10 ng/ml LPS (1. Hit) behandelt, am folgenden Tag wurde mit 100 ng/ml LPS für 3 h stimuliert. Die Kontrollen erhielten entsprechende Volumina Medium.

Im Falle von IL-1 β zeigte sich eine deutliche Hochregulation / Induktion der Genexpression auf die alleinige LPS-Stimulation sowohl mit 10 ng/ml (1. Hit) als auch mit 100 ng/ml (2. Hit), wobei die Stimulation mit 100 ng/ml zu einer deutlich höheren IL-1 β -Expression führte. Es konnte gezeigt werden, dass die Stimulation mit einem 2. Hit, bei zuvor erfolgtem 1. Hit keinen zusätzlichen Effekt gegenüber ausschließlicher Stimulation mit dem 1. Hit hat (siehe Abbildung 18).

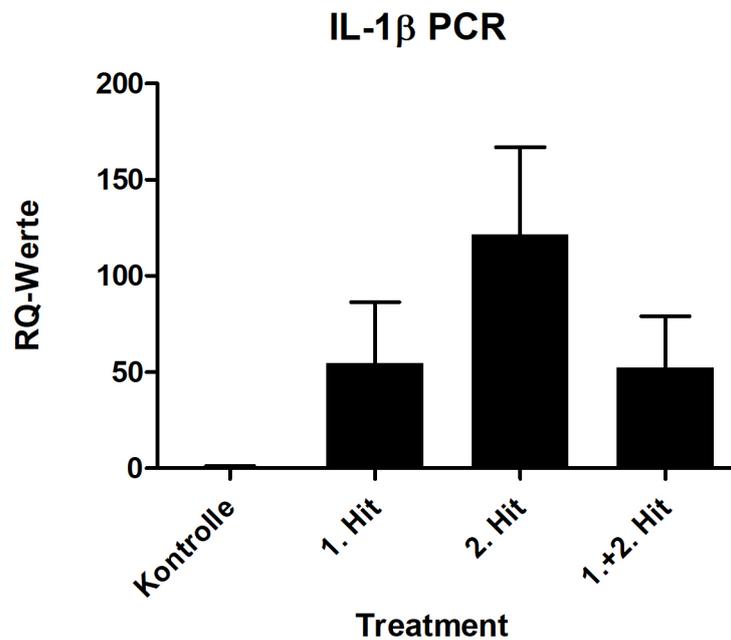


Abb. 18: qPCR mit Zielgen IL-1 β ; Kontrolle mit Medium statt mit LPS behandelt, 1. Hit mit 10 ng/ml LPS über Nacht und 3 h Medium inkubiert, 2. Hit mit 100 ng/ml LPS inkubiert (zuvorige über Nacht Inkubation mit Medium), 1.+2. Hit mit 10 ng/ml LPS über Nacht und 3 h LPS siehe 2.2.3. RQ-Wert: Expressionsrate relativ zur Kontrolle (Faktor). Statistische Auswertung mit 1-way ANOVA und Tukey comparison test, dargestellt sind Mittelwerte und Standardfehler, es zeigten sich keine relevanten, statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen, n=5.

In Abbildung 19 zeigt sich ein ähnliches Bild für TNF- α wie in Abbildung 18 für IL-1 β . Der deutlichste Unterschied besteht in den wesentlich geringeren RQ-Werten für die Gruppen 1. Hit und 1.+2. Hit. Die Gruppe 2. Hit unterscheidet sich signifikant von der Gruppe 1.+2. Hit ($p < 0,0001$). Währenddessen zeigt sich kein signifikanter Unterschied zwischen der Kontrollgruppe und der Gruppe 1.+2. Hit.

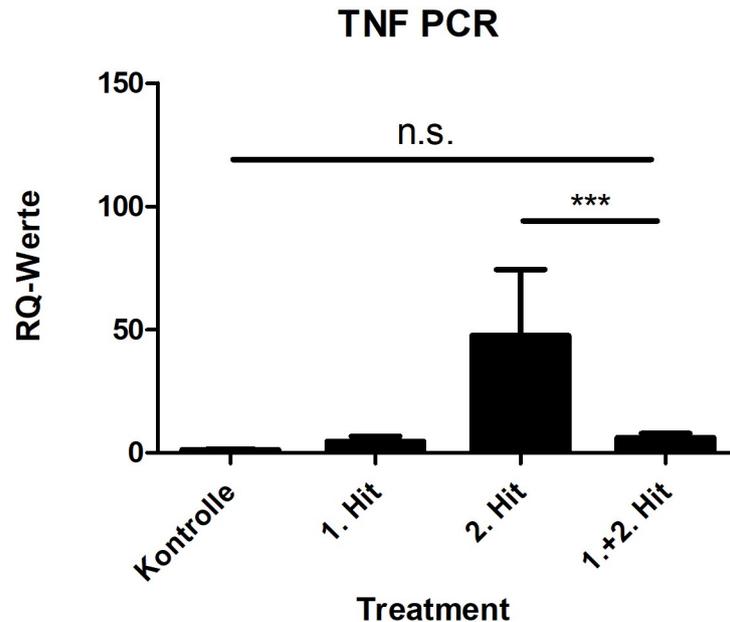


Abb. 19: qPCR mit Zielgen TNF- α ; Kontrolle mit Medium statt mit LPS behandelt, 1. Hit mit 10 ng/ml LPS über Nacht und 3 h Medium inkubiert, 2. Hit mit 100 ng/ml LPS inkubiert (zuvorige über Nacht Inkubation mit Medium), 1.+2. Hit mit 10 ng/ml LPS über Nacht und 3 h LPS siehe 2.2.3. n.s.: nicht signifikant, ***: $p < 0,0001$. RQ-Wert: Expressionsrate relativ zur Kontrolle (Faktor). Statistische Auswertung mit 1-way ANOVA und Tukey comparison test, dargestellt sind Mittelwerte und Standardfehler, $n=8$.

Die folgende Abbildung 20 zeigt, dass die IL-10-Polymerase-Kettenreaktion (PCR) eine deutlich geringere Induktion der Transkriptionsaktivität für IL-10 im Vergleich zu IL-1 β und TNF- α nachwies.

Darüber hinaus bewegen sich die Transkriptionslevel der mit LPS behandelten Gruppen über dem der Kontrolle, unterscheiden sich aber untereinander nur unwesentlich.

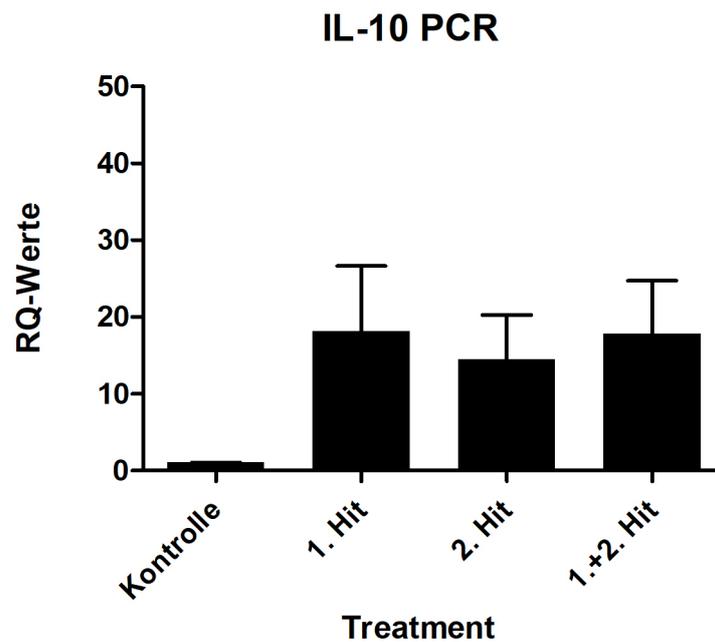


Abb. 20: qPCR mit Zielgen IL-10; Kontrolle mit Medium statt mit LPS behandelt, 1. Hit mit 10 ng/ml LPS über Nacht und 3 h Medium inkubiert, 2. Hit mit 100 ng/ml LPS inkubiert (zuvorige über Nacht Inkubation mit Medium), 1.+2. Hit mit 10 ng/ml LPS über Nacht und 3 h LPS siehe 2.2.3. RQ-Wert: Expressionsrate relativ zur Kontrolle (Faktor). Statistische Auswertung mit 1-way ANOVA und Tukey comparison test, dargestellt sind Mittelwerte und Standardfehler, es zeigten sich keine relevanten, statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen, n=5.

Die folgende Abbildung 21 zeigt die Ergebnisse von Untersuchungen, in denen versucht wurde, die bei der TNF- α -Expression beobachtete Toleranz mit Hilfe eines Inhibitors epigenetischer Enzyme rückgängig zu machen (siehe Abschnitte 2.2.11). Im Übrigen wurde ein Vorgehen gewählt, das dem Versuch zu Abbildung 19 entspricht.

Innerhalb der DMSO-Kontrollen (Lösungsmittel für Inhibitoren), zeigen sich ähnliche Werte wie in Abbildung 19. Innerhalb der mit Inhibitor behandelten Gruppen zeigen sich durchgängig höhere RQ-Werte als bei den Kontrollen. Innerhalb dieser Gruppe und zwischen den Gruppen gibt es aber keine signifikanten Unterschiede, die nicht schon in der PCR ohne Inhibitor gezeigt wurden.

Im Vergleich der Inhibitorgruppe (Behandlung mit 5-Aza. und TSA) der Kontrollgruppe (DMSO) zeigen sich keine signifikanten Unterschiede in der TNF- α -Expression. In beiden Gruppen führt die Behandlung mit dem 2. Hit zur zum Beobachtungszeitpunkt stärksten Induktion der TNF- α -Expression.

TNF PCR mit Inhibitor

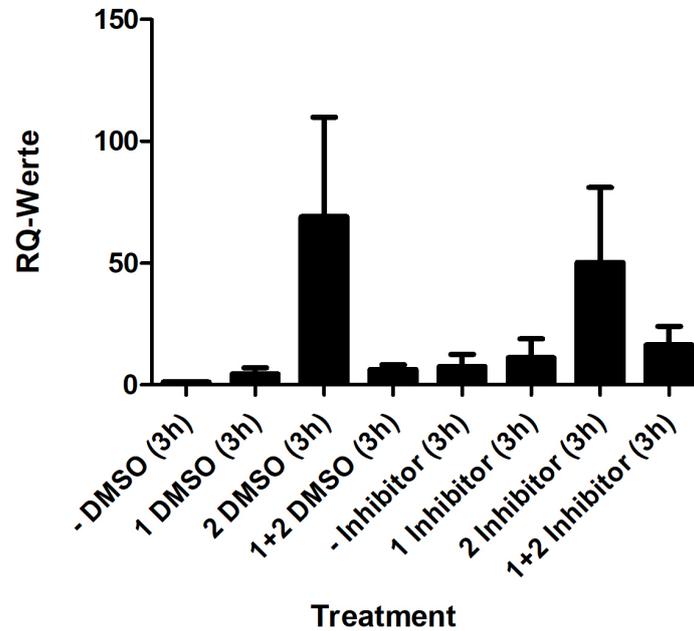


Abb. 21: qPCR mit Zielgen TNF- α und Inhibitorgabe; - mit Medium statt mit LPS behandelt, 1. Hit mit 10 ng/ml LPS über Nacht und 3 h Medium inkubiert, 2. Hit mit 100 ng/ml LPS inkubiert (zuvorige über Nacht Inkubation mit Medium), 1.+2. Hit mit 10 ng/ml LPS über Nacht und 3 h LPS siehe 2.2.3. Inhibitorgabe/DMSO-Gabe mit 1. Hit, Konzentration Inhibitoren siehe 2.2.11. RQ-Wert: Expressionsrate relativ zur Kontrolle (Faktor). Statistische Auswertung mit 1-way ANOVA und Tukey comparison test, dargestellt sind Mittelwerte und Standardfehler, es zeigten sich keine relevanten, statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen, n=8 für DMSO Kontrollen und n=3 für Inhibitor-Behandlung.

3.2 Toleranzinduktion der Proteinsekretion

Die Abbildungen 22, 23 und 24 zeigen die Ergebnisse der ELISAs, welche mit den Überständen der Stimulationsversuche, die den Ergebnissen aus Abschnitt 3.1 zu Grunde liegen, durchgeführt wurden.

Die Proteinmengen in den Überständen wurden bestimmt, um feststellen zu können, wie viel Protein produziert wurde. Die RNA-Analysen geben hierüber nur mittelbar Aufschluss, zeigen die zeitliche Dimension aber besser.

In der folgenden Abbildung 22 werden die gemessenen Proteinkonzentrationen für IL-1 β gezeigt. Auch hier zeigt sich eine deutliche Stimulation der IL-1 β -Produktion durch die LPS-Zugabe. Zellen, die über Nacht mit LPS inkubiert wurden, produzierten etwas mehr IL-1 β als die Zellen, die über 3 h inkubiert wurden.

Die Gruppe, die beidem ausgesetzt wurde, zeigt nur unwesentlich mehr IL-1 β im Überstand und keinesfalls ist ein additiver Effekt zu beobachten.

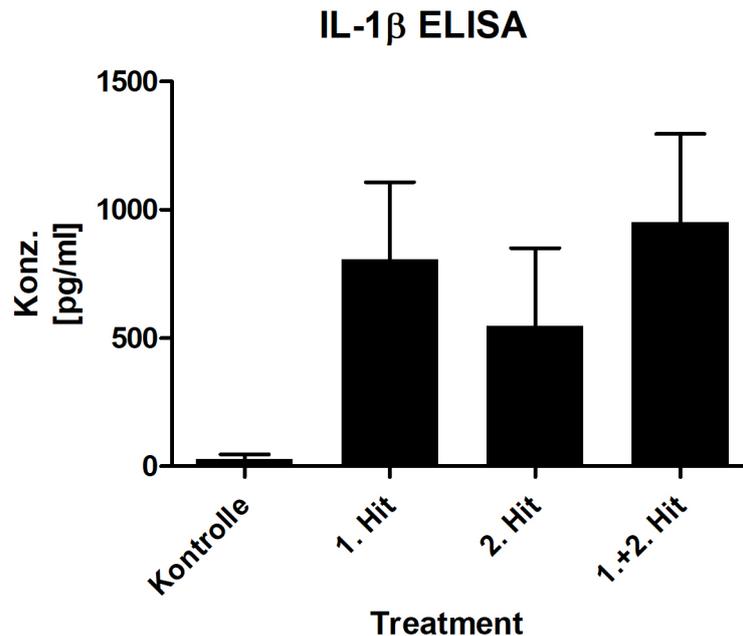


Abb. 22: Ergebnisse des ELISAs für IL-1 β ; Kontrolle mit Medium statt mit LPS behandelt, 1. Hit mit 10 ng/ml LPS über Nacht und 3 h Medium inkubiert, 2. Hit mit 100 ng/ml LPS inkubiert (zuvorige über Nacht Inkubation mit Medium), 1.+2. Hit mit 10 ng/ml LPS über Nacht und 3 h LPS siehe 2.2.3. Statistische Auswertung mit 1-way ANOVA und Tukey comparison test, dargestellt sind Mittelwerte und Standardfehler, es zeigten sich keine relevanten, statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen, n=5.

In Abbildung 23 kommen die TNF- α -Konzentrationen in den Überständen der verschiedenen Gruppen zur Darstellung. Hierbei zeigt sich eine signifikant höhere Proteinmenge in der Gruppe 1. Hit gegenüber der Kontrolle.

Darüber hinaus sind die Proteinkonzentrationen in den anderen Gruppen sehr ähnlich. Und es gibt keinen signifikanten Unterschied zwischen der Gruppe 1. Hit und der Gruppe 1.+2. Hit.

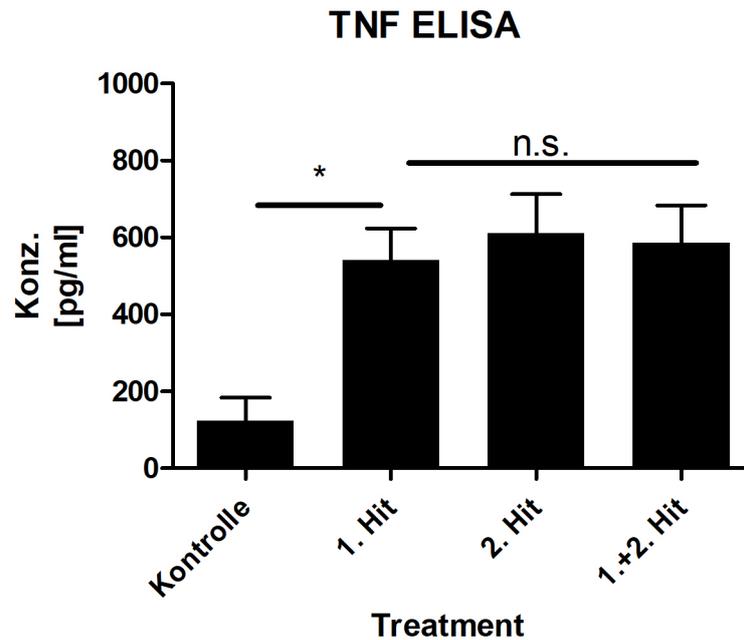


Abb. 23: Ergebnisse des ELISAs für TNF- α ; Kontrolle mit Medium statt mit LPS behandelt, 1. Hit mit 10 ng/ml LPS über Nacht und 3 h Medium inkubiert, 2. Hit mit 100 ng/ml LPS inkubiert (zuvorige über Nacht Inkubation mit Medium), 1.+2. Hit mit 10 ng/ml LPS über Nacht und 3 h LPS siehe 2.2.3. Statistische Auswertung mit 1-way ANOVA und Tukey comparison test, dargestellt sind Mittelwerte und Standardfehler, n=7.

Bei der Untersuchung der sezernierten Mengen des Proteins IL-10 (siehe Abbildung 24) zeigten sich in den Gruppen 1. Hit und 1.+2. Hit deutlich erhöhte Konzentrationen gegenüber der Gruppe 2. Hit und der Kontrollgruppe.

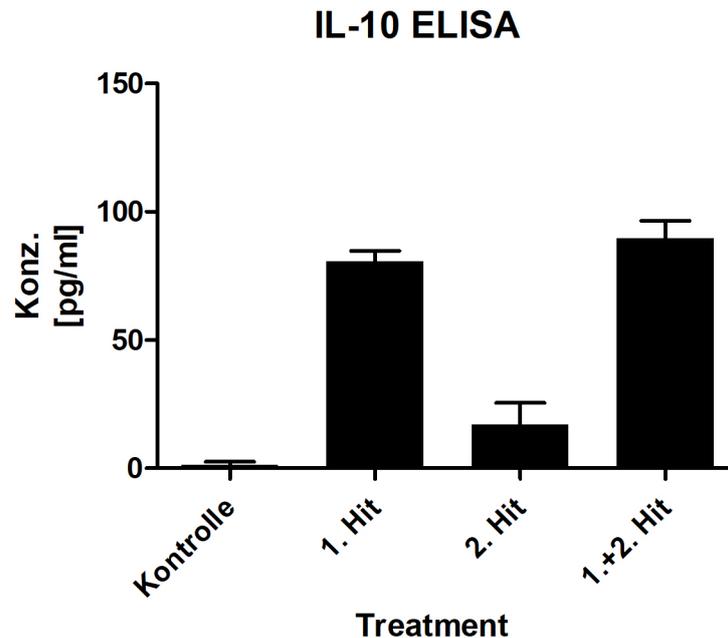


Abb. 24: Ergebnisse des ELISAs für IL-10; Kontrolle mit Medium statt mit LPS behandelt, 1. Hit mit 10 ng/ml LPS über Nacht und 3 h Medium inkubiert, 2. Hit mit 100 ng/ml LPS inkubiert (zuvorige über Nacht Inkubation mit Medium), 1.+2. Hit mit 10 ng/ml LPS über Nacht und 3 h LPS siehe 2.2.3. Statistische Auswertung mit 1-way ANOVA und Tukey comparison test, dargestellt sind Mittelwerte und Standardfehler, es zeigten sich keine relevanten, statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen, n=5.

3.3 Effektorfunktionen

Ziel der Phagozytoseversuche war es, zu untersuchen, ob eine Vorstimulation mit LPS zu einer Herabsetzung der Phagozytosefähigkeit (Toleranzinduktion) führt.

Die folgenden Abbildungen 25, 26 und 27 zeigen die Ergebnisse der Versuche zur Phagozytoseleistung mit LPS vorstimulierten PBMCs, diese wurden mit den angegebenen Konzentrationen LPS über Nacht inkubiert. Der 2. Hit entfällt hier auf die pHrodos, die sowohl einen weiteren Stimulus (Bakterienbestandteile), als auch die Fluoreszenzquelle einbringen. Zur Methodik siehe Abschnitt 2.2.10.

In Abbildung 25 ist der signifikante Unterschied ($p < 0,05$) in der Fluoreszenzintensität zwischen der mit LPS (0,1 ng/ml) vorstimulierten Gruppe und der Kontrollgruppe zu sehen. Diese Fluoreszenzintensität korreliert direkt mit der Menge aufgenommener pHrodos.

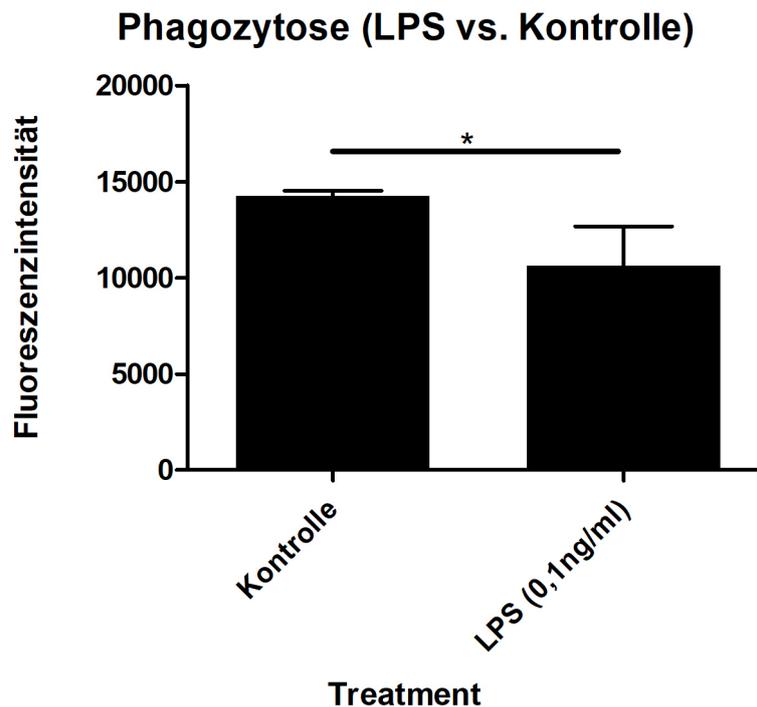


Abb. 25: Phagozytoseassay mit vorstimulierten PBMCs: Kontrolle mit Medium statt mit LPS behandelt, 1. Hit 0,1 ng/ml LPS über Nacht, im Anschluss 3 h Inkubation mit pHrodos, Fluoreszenzintensität korreliert mit Phagozytoseaktivität, siehe 2.2.10. n=4 *: $p < 0,05$., dargestellt sind Mittelwerte und Standardfehler, statistische Auswertung mit t-Test.

Um zu untersuchen, ob sich der in Abbildung 25 beobachtete Effekt noch verstärken lässt, wurden die Zellen mit verschiedenen höheren LPS-Konzentrationen vorbehandelt (siehe Abbildung 26).

Hierbei zeigten sich mit steigender Konzentration sich der Intensität der Kontrolle annähernde Fluoreszenzintensitäten; bis bei einer Konzentration von 1 mg/ml fast wieder die Phagozytoseleistung unstimulierter Zellen erreicht wird. Dabei wird aber die Phagozytoseleistung der unstimulierten Zellen in den Versuchen, nie von der vorstimulierten Zellen überboten.

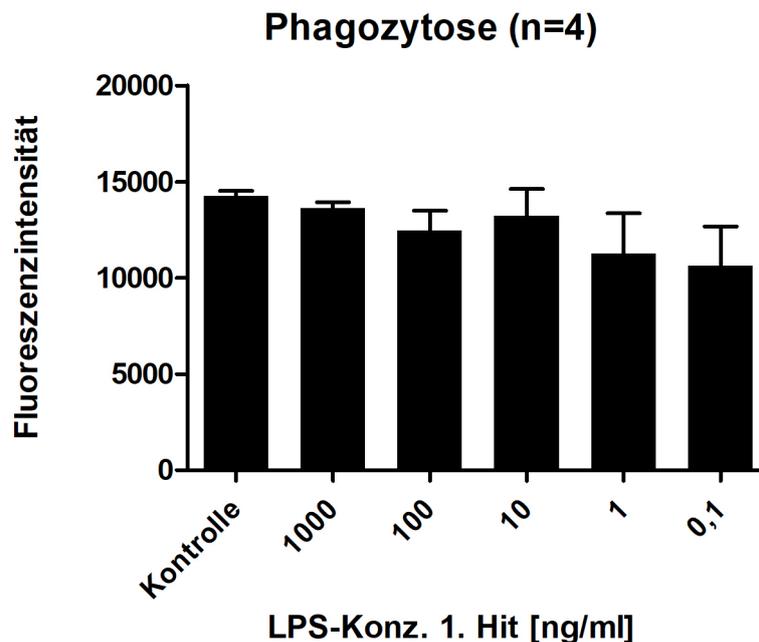


Abb. 26: Phagozytoseassay mit vorstimulierten PBMCs: Kontrolle mit Medium statt mit LPS behandelt, 1. Hit mit unterschiedlichen Konzentrationen LPS über Nacht, im Anschluss 3 h Inkubation mit pHrodos, Fluoreszenzintensität korreliert mit Phagozytoseaktivität, siehe 2.2.10, n=4, signifikante Unterschiede ließen sich nicht beobachten, dargestellt sind Mittelwerte und Standardfehler, Statistische Auswertung mit 1-way ANOVA und Tukey comparison test.

Die oben dargestellte Konzentrationsabhängigkeit, zeigte sich bei einem Probanden besonders deutlich und ist im Folgenden einzeln dargestellt (siehe Abbildung 27). Die gezeigten Daten sind auch Teil der Abbildung 26. Die in Abbildung 27 dargestellten Ergebnisse zeigen einen Abfall der Phagozytoseleistung auf ein Drittel der Kontrolle bei einem Probanden, während sich die Fluoreszenzaktivität bei den Zellen anderer Probanden kaum durch unterschiedliche LPS-Konzentrationen beeinflussen ließ (siehe Abbildung 26).

Als weitere funktionelle Analyse wurde ein Adhäsionsassay durchgeführt, bei dem unstimulierte PBMCs an vorstimulierte HPMECs adhäreren. Zur Methodik siehe Abschnitt 2.2.9. Grundsätzlich konnte eine Adhäsion zwischen den beiden Zelltypen beobachtet werden. Es zeigte sich aber kein signifikanter Unterschied zwischen der vorbehandelten Gruppe und der Kontrolle.

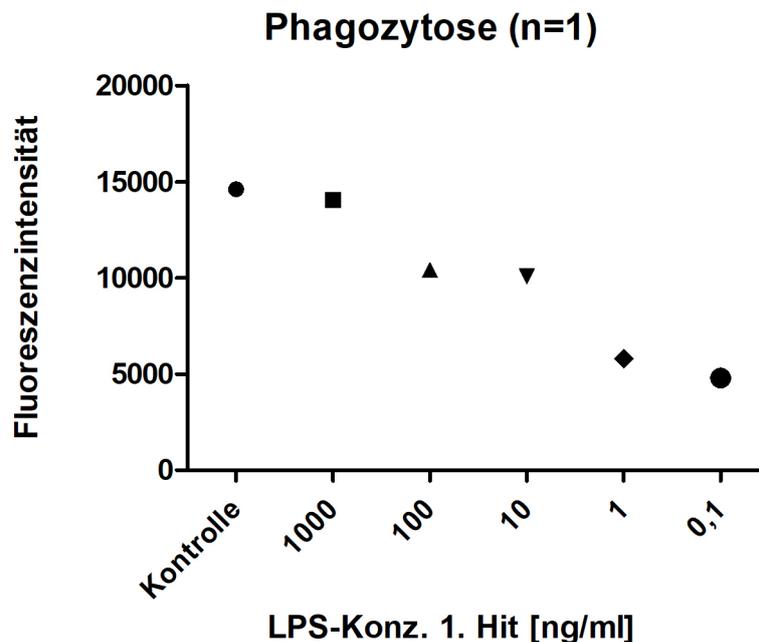


Abb. 27: Phagozytoseassay mit vorstimulierten PBMCs: Einzelner Proband aus den Daten der Abbildung 26, dessen Zellen mit abnehmender Konzentration des 1. Hits eine schwächer werdende Phagozytoseleistung zeigen. Kontrolle mit Medium statt mit LPS behandelt, 1. Hit mit unterschiedlichen Konzentrationen LPS über Nacht, im Anschluss 3 h Inkubation mit pHrodo, Fluoreszenzintensität korreliert mit Phagozytoseaktivität, siehe 2.2.10, dargestellt sind Mittelwerte und Standardfehler, Statistische Auswertung mit 1-way ANOVA und Tukey comparison test, n=1.

3.4 Methylierungsanalyse

Diese Analyse wurde durchgeführt um darzustellen, in welchen Genen epigenetische Veränderungen durch die vorgenommene LPS-Stimulation hauptsächlich stattfinden und welchen Signalwegen diese zugeordnet werden können.

Die folgende Tabelle zeigt die Ergebnisse der durchgeführten Methylierungsanalyse. Es wurden stimulierte und nicht stimulierte PBMCs (Stimulation nach 2.2.3) verschiedener Probanden auf den Methylierungsgrad ihrer CpG-Sites hin untersucht. Die entsprechenden Gene wurden verschiedenen Pathways zugeordnet und diese wurden in absteigender Anzahl der enthaltenen signifikant regulierten CpG-Sites aufgelistet. Signifikant reguliert kann in diesem Zusammenhang sowohl eine Zunahme als auch eine Abnahme der Methylierung der CpG-Sites bedeuten.

Wie aus Tabelle 8 deutlich wird, sind die meisten der untersuchten CpG-Sites differenziell methyliert.

Tab. 8: Methylierungsveränderungen in einzelnen Pathways mit Anzahl der CpG-Inseln, der regulierten Sites und p-Values. KEGG Pathway: Code in der Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, N: Anzahl der analysierten CpG-Inseln, DE: Anzahl der differenziell methylierten CpG-Inseln, P.DE: P-Wert für die entsprechenden Inseln.

KEGG Pathway	Pathway	N	DE	P.DE
hsa01100	Metabolic pathways	1252	870	6,27E-255
hsa05200	Pathways in cancer	394	316	1,20E-97
hsa05165	Human papillomavirus infection	318	244	1,79E-66
hsa04151	PI3K-Akt signaling pathway	339	243	9,24E-59
hsa04010	MAPK signaling pathway	255	197	5,27E-50
hsa05166	HTLV-I infection	252	192	1,05E-49
hsa04360	Axon guidance	174	151	2,22E-45
hsa04144	Endocytosis	244	186	4,18E-45
hsa04015	Rap1 signaling pathway	210	167	1,86E-44
hsa04014	Ras signaling pathway	226	173	2,24E-43
hsa05169	Epstein-Barr virus infection	197	156	3,43E-41
hsa04510	Focal adhesion	198	159	4,35E-41
hsa05205	Proteoglycans in cancer	203	157	1,11E-37
hsa04810	Regulation of actin cytoskeleton	211	160	8,19E-37
hsa05202	Transcriptional misregulation in cancer	181	141	7,12E-36
hsa05203	Viral carcinogenesis	198	149	1,27E-35
hsa05167	Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus infection	186	140	2,96E-35
hsa04022	cGMP-PKG signaling pathway	162	132	1,17E-35
hsa05016	Huntington's disease	186	140	1,65E-34
hsa04141	Protein processing in endoplasmic reticulum	165	131	1,85E-34

4. Diskussion

4.1 Fragestellung

Diese Arbeit beschäftigt sich mit mehreren Fragen rund um die Toleranzinduktion von PBMCs durch LPS. Konkret wurden sowohl die Zytokinexpression, wie auch Defizite in den anderen Funktionen (Phagozytose, Adhäsion) nach LPS-Stimulation untersucht.

In einem zweiten Schritt wurde versucht, einen Zusammenhang zwischen der beobachteten Toleranz und epigenetischen Modifikationen herzustellen.

Patienten mit einem geschwächten Immunsystem durch eine antiinflammatorische Reaktion auf eine Sepsis haben eine deutlich schlechtere Prognose im Bezug auf eine mögliche Sekundärinfektion (Hotchkiss, 2013). Daher kommt der Untersuchung dieser Defizite und ihres Ursprungs eine direkte klinische Bedeutung zu.

4.2 Toleranzinduktion und Zytokinexpression

Eine Toleranzinduktion durch LPS ist vor allem für die TNF- α -Expression in verschiedenen Zelllinien nachgewiesen (Brogdon, 2013). In Übereinstimmung mit der Literatur zeigt sich daher in Abbildung 23, dass die Menge des sezernierten Proteins (TNF- α) zwischen der 1. Hit Gruppe und der 1.+2. Hit Gruppe nicht signifikant unterschiedlich ist. Darüber hinaus zeigt sich in der passenden quantitativen qPCR (siehe Abbildung 19), dass ein 2. Hit bei erfolgtem 1. Hit keine Expressionssteigerung von TNF- α zur Folge hat. Dadurch kann nicht nur die erfolgreiche Toleranzinduktion gezeigt werden, sondern darüber hinaus auch, dass ein früh eingreifender Toleranzmechanismus die Expression von TNF- α verhindert.

Für die Expression der Zielgene/-proteine IL-10 und IL-1 β ist die Toleranzinduktion (im Einklang mit der Literatur (Rigato, 2003)), nicht so ausgeprägt, wie für TNF- α . Die Expressionslevel von IL-1 β konnten durch die Kombination beider Hits nicht über das Niveau des 2. Hits alleine gehoben werden bzw. bleiben darunter und auf dem Level des 1. Hits. Das Maß der Toleranzinduktion bleibt aber hinter dem für TNF- α zurück.

Für IL-10 konnte keine Toleranzinduktion gezeigt werden, diese spräche aber auch gegen die Entwicklung einer Immundefizienz, da IL-10 ein eher antiinflammatorisches Interleukin ist (Steen, 2019) und damit der Immunreaktion entgegenwirkt.

In einem nächsten Schritt wurde versucht, die für TNF- α beobachtete Toleranzentwicklung durch Inhibitoren epigenetischer Enzyme (Decitabin und Trichostatin A) zu verhin-

dern. Wie in Abbildung 21 deutlich wird, konnte dies aber nicht erreicht werden. Die Transkriptionslevel für die Gruppe 1.+2. Hit erreichen auch mit Inhibitor nicht das Niveau der Gruppe 2. Hit ohne Inhibitor. Zwar ist die Transkriptionsaktivität in der Gruppe 1.+2. Hit mit Inhibitorzugabe etwas höher, als die in der vergleichbaren Gruppe ohne Inhibitor, aber ein signifikanter Unterschied konnte nicht ermittelt werden. Des Weiteren zeigt sich eine unspezifische Aktivierung der TNF- α -Expression durch die Inhibitoren, was die Aussagekraft der Untersuchung deutlich schmälert, da eine Wirkung der Inhibitoren jenseits der intendierten angenommen werden muss.

Eine mögliche Erklärung für die mangelnde Aufhebung der Toleranz durch die Inhibitoren wäre, dass sie nicht in der Lage sind eine epigenetische Toleranzinduktion zu verhindern. Es ist außerdem denkbar, dass der gewünschte Effekt auf DNA-Ebene erreicht wurde, dieser aber in den Daten nicht zu sehen ist, da er von anderen schneller wirkenden Regulationsmechanismen überlagert wird.

Als beschriebene Mechanismen für (kurzfristige) Toleranzinduktion kommen vor allen Abbau/Internalisierung von Rezeptoren (Di Guglielmo, 2003) und deren Desensibilisierung (Lohse, 1996) in Frage. Als kurzfristige Effekte sind darüber hinaus der endosomale Abbau von TLR-4-Rezeptoren (Husebye, 2006) und die (De-)Phosphorylierung wichtiger Proteine der Signaltransduktion (Liu, 2019) in der Literatur beschrieben. Ebenso wurde eine Unterbrechung der TLR-Signaltransduktion durch nicht codierende RNA-Molekülen dargelegt (Vergadi, 2018).

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Zytokinexpression nicht generell in der Gruppe 1.+2. Hit reduziert war, daher muss die generelle Abschwächung der LPS-Signaltransduktion auf Rezeptorebene als unwahrscheinlich angesehen werden. Vielmehr muss vor dem Hintergrund der genannten Untersuchungen eine differenzierte Betrachtung der Toleranzinduktion mit unterschiedlichen Mechanismen vorgenommen werden. Darüber hinaus sollte die zeitliche Dimension Beachtung finden; während die kurz- und mittelfristigen antiinflammatorischen Vorgänge in der Sepsis relativ gut erforscht sind, sind die Mechanismen der längerfristigen Immunsuppression deutlich schlechter verstanden. Epigenetische Veränderungen sind als Grund für eine längerfristige Immunsuppression ein wichtiger Erklärungsansatz. Gleichzeitig stößt hier das gewählte Modell an seine Grenzen. Ein Vorteil der Verwendung primärer humaner Zellen ist neben der guten Verfügbarkeit, die Nähe zu physiologischen Bedingungen, die bei der Verwendung von immortalisierten Zellen (zum Teil) verloren geht. Gleichzeitig ergibt sich der Nachteil, dass primäre Zellen deutlich kürzere Lebensspannen haben (Kobayashi, 2012) und daher Effekte bis maximal 48 h nach Entnahme der Zellen beobachtet werden können. Dennoch ist davon auszugehen, dass epigenetische Veränderungen bereits wenige Stunden nach dem auslösenden Stimulus nachweisbar sind (Lim, 2014).

Fraglich bleibt weiterhin wie die in peripheren Zellen stattfindenden Veränderungen, eine Toleranzinduktion über Monate bis Jahre herbeiführen können, da die Lebensdauer der Zellen nur Stunden bis Tage beträgt. Zwar wurden veränderte Zellpopulationszusammensetzungen und Milzveränderungen im Tiermodell beschrieben (Bomans, 2018; Mitroulis, 2018), aber die Mediation dieser Veränderungen ist ungeklärt. Hervorzuheben ist, dass epigenetische Veränderungen auch bei der physiologischen Toleranzinduktion und Reifung von monozytären Zellen eine zentrale Rolle spielen (Saeed, 2014), die genaue Rolle bei pathologischer Immundefizienz verbleibt aber weiterhin unklar.

4.3 Funktionelle Assays

In den durchgeführten Phagozytoseassays (siehe Abschnitt 3.3), konnte einer funktionelle Toleranzinduktion gezeigt werden. Diese war signifikant für eine LPS-Konzentration von 0,1 ng/ml für den 1. Hit. Neben der zytokinbezogenen Toleranz, zeigt dieses Ergebnis einen weiteren Aspekt der funktionellen Defizienz toleranter Zellen, welcher für humane Zellen nicht vorbeschrieben ist.

Anders als erwartet, nimmt die Toleranzinduktion mit steigender LPS-Konzentration aber eher ab als zu. Dies kann dadurch erklärt werden, dass durch die LPS-Zugabe in den Zellen gleichzeitig eine Aktivierung der Phagozytoseaktivität, wie auch eine Toleranzinduktion stattfinden. Dabei scheint die Toleranzinduktion auf geringere Dosen LPS anzusprechen, während die Aktivierung höhere Konzentrationen erfordert um erstere auszugleichen.

Darüber hinaus wäre denkbar, dass unterschiedliche LPS-Konzentrationen die Monozyten für verschiedene Funktionen programmieren und so unterschiedliche Aufgaben der Zellen priorisiert werden (z.B. Phagozytose vs. Zytokinproduktion) (Pena, 2011).

Eine andere Hypothese wäre, dass zum Untersuchungszeitpunkt (3 h nach pHrodo-Zugabe) die Aktivierung durch geringere Dosen LPS bereits deutlich schwächer ist, während höhere Dosen zu einer längeren Persistenz physiologisch relevanter LPS-Konzentrationen führen und daher die inflammatorische Reaktion zum Untersuchungszeitpunkt die antiinflammatorische Gegenreaktion übertrifft.

Ebenfalls denkbar wäre, dass LPS-Zugabe unabhängig von der Konzentration keine Stimulation der Phagozytoseleistung herbeiführen kann, die bei geringen Dosen beobachtete Toleranzinduktion aber bei höheren Konzentrationen blockiert wird. Im Hinblick auf die Frage, ob die Toleranz der untersuchten Zellen auf eine Rezeptorinaktivierung oder eine Unterbrechung der unmittelbar folgenden Signaltransduktion zurückzuführen sei, muss im Zusammenhang mit der Phagozytose darauf verwiesen werden, dass eine Rezeptorin-

aktivierung bei hohen Dosen LPS stärker stattfindet als bei niedrigen. Da die gezeigten Daten eine gegenteilige Aussage treffen, muss die Rezeptorinaktivierung in diesem Zusammenhang als unwahrscheinliche alleinige Erklärung angesehen werden.

In der Literatur ist die verminderte Produktion von *Scavenging*- und anderen an der Phagozytose beteiligten Proteinen nach LPS-Stimulation vorbeschrieben (Mantovani, 2005). Vergleichbares gilt für die verminderte Expression von major histocompatibility complex (MHC)-Klasse-II-Proteinen, welche eine verschlechterte Antigenpräsentation zur Folge hat und damit die gegenseitige Aktivierung der Immunzellen erschwert (Wolk, 2000). Ein ähnlicher Mechanismus wäre für die hier gezeigten Ergebnisse denkbar.

Die in dieser Arbeit gezeigten Daten zur Toleranzinduktion im Bezug auf Phagozytose beruhen auf einer LPS-Stimulation über Nacht (wobei die Kontrollen mit Medium behandelt wurden) mit unterschiedlichen Konzentrationen und einer anschließenden dreistündigen Inkubation mit pHrodo, die sowohl als Fluoreszenzquelle, als auch als 2. Hit dienen.

Wie im Vergleich der Abbildungen 26 und 27 deutlich wird, sind die Phagozytoseleistungen interindividuell sehr verschieden. Auch im Konzentrationsverlauf zeigen sich klare Unterschiede. Allen gemeinsam ist allerdings, dass bei einer LPS-Konzentration von 1 mg/ml kaum ein Unterschied zur Kontrolle zu sehen ist.

Weiterführend zu untersuchen wäre, ob auf Grundlage der Empfindlichkeit für Toleranzinduktion der PBMCs eine Einteilung von Sepsispatienten in Gruppen möglich wäre und ob diese Gruppen bei Reinfektion nach Sepsis unterschiedlich gute Prognosen hätten. Zusätzlich könnte man die Gruppen auf epigenetische Ausgangsfaktoren und deren Veränderungen durch Sepsis untersuchen.

Im außerdem durchgeführten Adhäsionsassay konnte keine Toleranzinduktion beobachtet werden. Dies kann aber nicht als Ausschluss eines entsprechenden Vorgangs gewertet werden. Die Adhäsion ist im Gegensatz zur Phagozytose etwas komplexer, da sie die direkte Interaktion zweier Zelltypen darstellt, die einer vielschichtigen Homöostase unterliegt (Daniel, 2013; Lee, 2014; Ley, 2007). Es gelang aber weder mit der alleinigen Stimulation der PBMCs oder HPMECs, noch mit der gemeinsamen Stimulation beider Zelltypen eine Toleranz im Hinblick auf die Adhäsion zu erreichen. Die immortalisierten HPMECs wurden ausgewählt, um mittelfristige Effekte nachzuweisen.

Die Adhäsionsfähigkeit von postseptischen Immunzellen ist relativ schlecht untersucht. Gut erforscht ist hingegen die kapilläre Schrankenstörung und endotheliale Dysfunktion in der akuten Sepsis (Bannerman, 1999; Pietrasanta, 2019). Die Wiederherstellung der genannten Funktionen stellt einen wichtigen Schritt in der Genesung von Sepsispatienten dar. Ob diese Wiederherstellung aber in allen Fällen vollständig gelingt, bleibt Gegenstand folgender Untersuchungen.

4.4 Methylierungsanalyse

Der Methylierungsanalyse wurden mit 10 ng/ml LPS über Nacht stimulierte PBMCs zugeführt. Ziel des Versuchs war es herauszufinden, ob und falls dem so wäre, welche epigenetischen Veränderungen durch die LPS-Stimulation hervorgerufen werden.

In der Auswertung der Methylierungsanalyse wurden sowohl Methylierungsveränderungen einer Vielzahl einzelner Zielgene, als auch Pathways untersucht (diese sind im Abschnitt 3.4 ausführlich dargestellt). Für einzelne Zielgene ergaben sich keine signifikanten Veränderungen. Zwar waren viele Gene deutlich unterschiedlich methyliert, aber nach statistischer Normierung, war kein Zielgen signifikant verändert. Dies ist zum Teil auch durch die zu hohe Inhomogenität der Probanden (Alter, Geschlecht etc.) und der dabei zu geringen Zahl (n=4) zu erklären.

Bezogen auf die Pathways fanden in metabolischen Pathways die meisten Veränderungen statt. Dies ist wahrscheinlich auf die nach LPS-Stimulus stattfindende Umstellung auf oxidativen Stoffwechsel zurückzuführen (Kelly, 2015). Dass hierbei die metabolischen Pathways in besonderem Maße verändert sind, deckt sich mit der Beobachtung, dass viele der in der Toleranzinduktion beteiligten Proteine metabolische Steuerfunktionen haben. So spielt beispielsweise der Hypoxie-induzierte-Faktor-1a eine besondere Rolle in der postseptischen Immunsuppression; in Abhängigkeit von seinem Expressionslevel wird der metabolische Status der betroffenen Zellen bedeutend verändert (Cheng, 2016; Vachharajani, 2014). Die genauen Folgen bleiben Gegenstand aktueller Forschung.

Grundsätzlich passen die beobachteten Veränderung dieser Arbeit in die Darstellungen anderer Autoren, dass gerade metabolische Veränderungen eine besondere Relevanz in der Sepsis besitzen und in Zusammenhang mit dem Outcome von Sepsispatienten gebracht werden können (Belikova, 2007; Chen, 2009). Metabolische Veränderungen sind bereits einige Jahre als wichtiger Faktor für die Entstehung von septischem Organversagen in der Diskussion (Carré, 2008; Singer, 2008).

Darüber hinaus spielt auch die Signaltransduktion über *PI3K-Akt* eine wichtige Rolle in der Pathogenese der Sepsis. So sind zum Beispiel Nieren- und Lungenschäden nach LPS-Stimulation im Tiermodell beschrieben, die maßgeblich über diesen Signalweg vermittelt werden (Meng, 2018; Zhao, 2020). Die Unterbindung dieser Effekte ist Gegenstand aktueller Forschung.

Epigenetische Veränderungen an dieser Stelle könnten also auch zu einer (reversiblen) Einschränkung der Immunkompetenz führen. Eine Verbesserung von Immunkompetenz und Organfunktion durch die Inhibition der Inflammation und damit der epigenetischen Veränderungen, ist im Tiermodell vorbeschrieben (Zhao, 2020). Dieser Mechanismus wird von einigen Autoren als vielversprechender Angriffspunkt für Therapieentwicklungen an-

gesehen.

Ähnliche Effekte werden für Signaltransduktion über den *MAP*-Kinase-Signalweg angenommen. Auch dieser spielt eine zentrale Rolle in der Induktion akuter Lungenschäden in der Sepsis (Shao, 2020). Sollte es durch die Veränderung in der Methylierung in den CpG-Inseln der Gene, die für Proteine dieser Signalketten codieren, zu einer Aktivitätsveränderung dieser Signalwege kommen, so könnte das ein Teil der sichtbaren Immunmodulation nach durchgemachter Sepsis sein. Die zugrundeliegenden Interaktionen sind äußerst komplex und unzureichend verstanden.

Besondere Beachtung hat unter anderem die Rolle der Blutplättchen in der Sepsis und deren Funktionseinschränkung im Zusammenhang mit den genannten Signaltransduktionswegen erfahren. Im Tiermodell konnte gezeigt werden, dass eine LPS-Stimulation die Aggregationsfähigkeit der Blutplättchen deutlich einschränkt. Durch die Inhibition der *PI3K-Akt*-, *cGMP-PKG*-Signalwege, konnte dies verhindert werden (Lopes-Pires, 2015). Dieses Beispiel demonstriert, dass die nachgewiesenen Veränderungen in der Methylierung der CpG-Inseln ein möglicher Erklärungsansatz für die postseptische Immunmodulation sind. Um die klinische Relevanz dieser einzelnen Veränderungen zu beurteilen, sind weitergehende Untersuchungen von Nöten.

Darüber hinaus zeigt sich, dass die epigenetischen Effekte der LPS-Stimulation sehr vielfältig sind und die Identifikation einzelner sepsisspezifischer Veränderungen ein großes Patientenkollektiv erfordern würde.

5. Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde die postseptische Immunsuppression in einem humanen Zellkulturmodell untersucht. Ausgehend von der Beobachtung, dass Patienten, die eine Sepsis überlebt haben, bei erneuter Infektionen eine schlechtere Prognose haben, hat sich diese Arbeit den Fragen gewidmet, welche funktionellen Defizite in primären, mononukleären Zellen im Post-Sepsis-Modell zu beobachten sind und welchen Einfluss epigenetische Faktoren auf das Auftreten und den Bestand dieser Defizite haben.

Von gesunden Probanden wurde Vollblut gewonnen, aus dem die mononukleären Zellen mit Hilfe eines Dichtegradienten isoliert wurden. Um die Veränderung durch eine bakterielle Sepsis abzubilden, wurden die Zellen über Nacht mit Lipopolysaccharid (10 ng/ml) inkubiert. Im Anschluss erfolgte eine weitere Inkubation mit Lipopolysaccharid (100 ng/ml), die eine erneute Infektion simulieren sollte.

Im Folgenden wurde die Antwort der Zellen auf diese zweite Stimulation in Abhängigkeit von der Vorstimulation untersucht. Dabei wurden Zytokinexpression, Adhäsionsfähigkeit und Phagozytoseleistung ermittelt. Für TNF- α zeigte sich, dass nach einer erfolgten ersten Stimulation, die zweite Stimulation nahezu keine Expressionsantwort mehr auslöste.

In den funktionellen Untersuchungen konnte eine signifikante Verminderung der Phagozytoseleistung mononukleärer Zellen nach LPS-Stimulation gezeigt werden. Dabei wurde die zweite Stimulation durch die Zugabe fluoreszierender Bakterienbestandteile ersetzt. Im Anschluss wurde die Menge aufgenommener bakterieller Partikel über Messung der Fluoreszenzintensität bestimmt. Außerdem konnte gezeigt werden, dass geringere Mengen LPS eine stärkere Toleranzinduktion induzieren. Dabei führte keine Vorstimulation (unabhängig von der Konzentration) zu einer Steigerung der Phagozytoseleistung über die der naiven Zellen. Für die Adhäsion mononukleärer Zellen an Endothelzellen konnte diese Toleranzinduktion nicht gezeigt werden.

Die Behandlung mit Inhibitoren epigenetischer Enzyme führte zu keiner signifikanten Veränderung der beobachteten Toleranzinduktion (TNF- α -Expression). Eine Methylierungsanalyse konnte Hinweise auf die Bedeutung epigenetischer Veränderungen für die vorliegende Fragestellung liefern, sie aber nicht eindeutig belegen.

Sowohl in den Expressionsanalysen als auch in den funktionellen Assays zeigte sich eine hohe interindividuelle Varianz zwischen den Zellen verschiedener Probanden. Gleichzeitig war bei wiederholten Versuchen die intraindividuelle Varianz sehr gering.

Daher bleibt die Frage, ob es möglich und wenn ja klinisch relevant ist, Patienten mit ähnlicher (Epi-)Genetik in Gruppen einzuteilen, die ein Risikoabschätzung bezüglich Morbidität und Mortalität bei Sepsis und Reinfektion ermöglichen.

6. Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1: Die meisten Sepsispatienten zeigen eine deutliche Hyperinflammation kurz nach der Infektion. Bereits in dieser Phase kann es zu tödlichen Verläufen kommen (A). Verläufe mit eingeschränkter inflammatorischer und ausgeprägter antiinflammatorischer Komponente (CARS) sind ebenfalls möglich (B). Auch diese können einen letalen Ausgang haben (in der Regel aber nach prolongiertem Verlauf). Wie in C dargestellt ist auch ein undulierender Verlauf mit pro- und antiinflammatorischen Phasen möglich, wobei letztere prognosebestimmend sind. Die roten Pfeile weisen auf die verzögerten Todesfälle hin, die Gegenstand dieser Arbeit sind, modifiziert nach (Hotchkiss, 2013) 13
- Abbildung 2: Schematische Darstellung der Histon-DNA-Beziehung, rechts ist die DNA auf Grund von Strukturänderungen in den Histonen ablesbar; modifiziert nach (Mitchell, 2016) 15
- Abbildung 3: Übersicht über mögliche reaktive Veränderungen von 5mC (5-Methylcytosin) mit Endpunkt Cytosin. Wird eine Reaktionskette nicht vollständig durchlaufen (siehe roter Doppelstrich), ist ein Basenaustausch möglich. AID/APOBEC: activation-induced cytidine deaminase/apolipoprotein B mRNA editing enzyme complex, Tet: ten-eleven translocation enzyme, 5hmC: 5-Hydroxymethylcytosin, 5hmU: 5-Hydroxymethyluracil, 5fC: 5-Formylcytosin, 5caC: 5-Carboxylcytosin, TDG: Thymine DNA glycosylase, Cyt: Cytosin, Thy: Thymin modifiziert nach (Moore, 2013) 16
- Abbildung 4: Toll-like-Rezeptoren und ihre Liganden: TLR1 und TLR6 sind assoziiert mit TLR2 und erkennen triacylierte und diacylierte Lipoproteine. TLR4 ist in der Lage, LPS zu erkennen und zu binden. TLR5 ist ein Flagellinrezeptor. TLR3 erkennt doppelsträngige Virus-RNA, während TLR9 freie CpG-reiche DNA bindet. Die roten Kreise zeigen Bindungen an denen LPS(-Varianten) beteiligt sind. Modifiziert nach (Takeda, 2004) 18

- Abbildung 5: Verschiedene Signalkaskaden der TLR-4-Aktivierung; der früher ablaufende, *NF- κ B* vermittelte Zweig ist von MyD88 abhängig, der Zweig, welcher IRF3 involviert hingegen nicht. Ersterer führt zur Expression inflammatorischer Zytokine (TNF- α , IL-6 und andere), letzterer induziert IFN- β modifiziert nach (Murshid, 2015) 19
- Abbildung 6: Verschiedene Signalkaskaden der TLR-4-Aktivierung; der früher ablaufende, *NF- κ B* vermittelte Zweig ist von MyD88 abhängig, der Zweig, welcher IRF3 involviert hingegen nicht. Ersterer führt zur Expression inflammatorischer Zytokine (TNF- α , IL-6 und andere), letzterer induziert IFN- β modifiziert nach (Akira, 2004) 20
- Abbildung 7: Schritte der Adhäsion (klassische fett gedruckt) und Formen der Extravasation; mit vermittelnden Strukturen, modifiziert nach (Ley, 2007) 21
- Abbildung 8: Reifung des Phagosoms mit beteiligten Organellen und Entwicklung des pH-Wertes, roter Pfeil weißt auf pH-Wert der maximalen pHrodo- Aktivierung hin: siehe Abbildung 15, modifiziert nach (Flannagan, 2012) 23
- Abbildung 9: Vollblutauftrennung über Glukosegradienten mit Hilfe von Histo- 30
paque, modifiziert nach (Han, 2013)
- Abbildung 10: Stimulationsschema für die PBMC-Versuche: 1. und 2. Hit erfol- 33
gen entweder mit RMPI-1640 Medium oder mit LPS. Dabei erfolgt der 1. Hit mit dem Aussähen und der 2. Hit nach 16 Stunden. Nach weiteren 3 Stunden werden die Zellen geerntet
- Abbildung 11: Kurvendarstellung der durch die Substratvermehrung freiwerden- 38
den Fluoreszenz in der qPCR. Am Punkt Ct übersteigt die Fluoreszenz den Schwellenwert. modifiziert nach (Rodriguez-Lazaro, 2013)
- Abbildung 12: Allgemeines Prinzip eines Sandwich-ELISAs. Auf eine antikörper- 39
beschichtete Platte wird das Substrat aufgebracht, welches an die Antikörper bindet. Ungebundenes Substrat wird entfernt. Ein zweiter Antikörper wird hinzugegeben, dieser bindet wiederum an das verbliebene Substrat und ist an ein Enzym gekoppelt, welches eine Reaktion katalysiert, die zum Beispiel ein fluoreszentes Produkt hat. Diese Fluoreszenz ist direkt proportional zur Menge an vorhandenem Substrat, modifiziert nach (Sittampalam, 2004)

- Abbildung 13: Herstellung der Standards (Verdünnungsreihe immer im Verhältnis 1:2) für IL-1 β ; vorgelegt sind je 300 μ l Assay Diluent; andere Zielproteine abweichend (modifiziert nach BD Bio Tech Data Sheet ELISA IL-1b) 40
- Abbildung 14: Positive und negative Selektion mit Hilfe von magnetischen Antikörpern, rot markiert ist die vorteilhaftere negative Selektion, modifiziert nach (Kathleen M Botham, 2016) 42
- Abbildung 15: pH-abhängige Eigenschaften der pHrodos. A: Mit der Endosomreifung nimmt der pH-Wert im Endo-/Lysosom ab und die Fluoreszenz zu. B: Darstellung der Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit vom pHWert; Excitation bei 532 nm, modifiziert nach (Dolman, 2013) 45
- Abbildung 16: Bisulfit Konversion von unmethyliertem Cytosin, modifiziert nach (Huang, 2010) 48
- Abbildung 17: Fehlende Bisulfit Konversion bei methyliertem Cytosin, modifiziert nach (Huang, 2010) 48
- Abbildung 18: qPCR mit Zielgen IL-1 β ; Kontrolle mit Medium statt mit LPS behandelt, 1. Hit mit 10 ng/ml LPS über Nacht und 3 h Medium inkubiert, 2. Hit mit 100 ng/ml LPS inkubiert (zuvorige über Nacht Inkubation mit Medium), 1.+2. Hit mit 10 ng/ml LPS über Nacht und 3 h LPS siehe 2.2.3. RQ-Wert: Expressionsrate relativ zur Kontrolle (Faktor). Statistische Auswertung mit 1-way ANOVA und Tukey comparison test, dargestellt sind Mittelwerte und Standardfehler, es zeigten sich keine relevanten, statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen, n=5. 51
- Abbildung 19: qPCR mit Zielgen TNF- α ; Kontrolle mit Medium statt mit LPS behandelt, 1. Hit mit 10 ng/ml LPS über Nacht und 3 h Medium inkubiert, 2. Hit mit 100 ng/ml LPS inkubiert (zuvorige über Nacht Inkubation mit Medium), 1.+2. Hit mit 10 ng/ml LPS über Nacht und 3 h LPS siehe 2.2.3. n.s.: nicht signifikant, ***: p<0,0001. RQ-Wert: Expressionsrate relativ zur Kontrolle (Faktor). Statistische Auswertung mit 1-way ANOVA und Tukey comparison test, dargestellt sind Mittelwerte und Standardfehler, n=8. 52

- Abbildung 20: qPCR mit Zielgen IL-10; Kontrolle mit Medium statt mit LPS behandelt, 1. Hit mit 10 ng/ml LPS über Nacht und 3 h Medium inkubiert, 2. Hit mit 100 ng/ml LPS inkubiert (zuvorige über Nacht Inkubation mit Medium), 1.+2. Hit mit 10 ng/ml LPS über Nacht und 3 h LPS siehe 2.2.3. RQ-Wert: Expressionsrate relativ zur Kontrolle (Faktor). Statistische Auswertung mit 1-way ANOVA und Tukey comparison test, dargestellt sind Mittelwerte und Standardfehler, es zeigten sich keine relevanten, statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen, n=5. 53
- Abbildung 21: qPCR mit Zielgen TNF- α und Inhibitorgabe; - mit Medium statt mit LPS behandelt, 1. Hit mit 10 ng/ml LPS über Nacht und 3 h Medium inkubiert, 2. Hit mit 100 ng/ml LPS inkubiert (zuvorige über Nacht Inkubation mit Medium), 1.+2. Hit mit 10 ng/ml LPS über Nacht und 3 h LPS siehe 2.2.3. Inhibitorgabe/DMSO-Gabe mit 1. Hit, Konzentration Inhibitoren siehe 2.2.11. RQ-Wert: Expressionsrate relativ zur Kontrolle (Faktor). Statistische Auswertung mit 1-way ANOVA und Tukey comparison test, dargestellt sind Mittelwerte und Standardfehler, es zeigten sich keine relevanten, statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen, n=8 für DMSO Kontrollen und n=3 für Inhibitor-Behandlung. 55
- Abbildung 22: Ergebnisse des ELISAs für IL-1 β ; Kontrolle mit Medium statt mit LPS behandelt, 1. Hit mit 10 ng/ml LPS über Nacht und 3 h Medium inkubiert, 2. Hit mit 100 ng/ml LPS inkubiert (zuvorige über Nacht Inkubation mit Medium), 1.+2. Hit mit 10 ng/ml LPS über Nacht und 3 h LPS siehe 2.2.3. Statistische Auswertung mit 1-way ANOVA und Tukey comparison test, dargestellt sind Mittelwerte und Standardfehler, es zeigten sich keine relevanten, statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen, n=5. 57
- Abbildung 23: Ergebnisse des ELISAs für TNF- α ; Kontrolle mit Medium statt mit LPS behandelt, 1. Hit mit 10 ng/ml LPS über Nacht und 3 h Medium inkubiert, 2. Hit mit 100 ng/ml LPS inkubiert (zuvorige über Nacht Inkubation mit Medium), 1.+2. Hit mit 10 ng/ml LPS über Nacht und 3 h LPS siehe 2.2.3. Statistische Auswertung mit 1-way ANOVA und Tukey comparison test, dargestellt sind Mittelwerte und Standardfehler, n=7 58

- Abbildung 24: Ergebnisse des ELISAs für IL-10; Kontrolle mit Medium statt mit LPS behandelt, 1. Hit mit 10 ng/ml LPS über Nacht und 3 h Medium inkubiert, 2. Hit mit 100 ng/ml LPS inkubiert (zuvorige über Nacht Inkubation mit Medium), 1.+2. Hit mit 10 ng/ml LPS über Nacht und 3 h LPS siehe 2.2.3. Statistische Auswertung mit 1-way ANOVA und Tukey comparison test, dargestellt sind Mittelwerte und Standardfehler, es zeigten sich keine relevanten, statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen, n=5. 59
- Abbildung 25: Phagozytoseassay mit vorstimulierten PBMCs: Kontrolle mit Medium statt mit LPS behandelt, 1. Hit 0,1 ng/ml LPS über Nacht, im Anschluss 3 h Inkubation mit pHrodo, Fluoreszenzintensität korreliert mit Phagozytoseaktivität, siehe 2.2.10. n=4 *: $p < 0,05$., dargestellt sind Mittelwerte und Standardfehler, statistische Auswertung mit t-Test. 60
- Abbildung 26: Phagozytoseassay mit vorstimulierten PBMCs: Kontrolle mit Medium statt mit LPS behandelt, 1. Hit mit unterschiedlichen Konzentrationen LPS über Nacht, im Anschluss 3 h Inkubation mit pHrodo, Fluoreszenzintensität korreliert mit Phagozytoseaktivität, siehe 2.2.10, n=4, signifikante Unterschiede ließen sich nicht beobachten, dargestellt sind Mittelwerte und Standardfehler, Statistische Auswertung mit 1- way ANOVA und Tukey comparison test. 61
- Abbildung 27: Phagozytoseassay mit vorstimulierten PBMCs: Einzelner Proband aus den Daten der Abbildung 26, dessen Zellen mit abnehmender Konzentration des 1. Hits eine schwächer werdende Phagozytoseleistung zeigen. Kontrolle mit Medium statt mit LPS behandelt, 1. Hit mit unterschiedlichen Konzentrationen LPS über Nacht, im Anschluss 3 h Inkubation mit pHrodo, Fluoreszenzintensität korreliert mit Phagozytoseaktivität, siehe 2.2.10, dargestellt sind Mittelwerte und Standardfehler, Statistische Auswertung mit 1-way ANOVA und Tukey comparison test, n=1. 62

7. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Erstellung des SOFA-Scores: Bei einer akuten Änderung von mindestens +2 Punkten kann von einer Sepsis gesprochen werden; nach (Seedat, 2018)	11
Tabelle 2:	Komponenten im High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit und die benötigten Menge pro Reaktion	35
Tabelle 3:	Reaktionsablauf Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion	35
Tabelle 4:	Adhäsionsassay auf 24-Well-Plate, Proben in Vierfachbestimmung, P1: Proband 1, P2: Proband 2, US: Unstimulierte HPMECs, S: Stimulierte HPMECs	44
Tabelle 5:	24-Well Platte: PBMCs von zwei verschiedenen Probanden (P1/P2), die mit LPS stimuliert wurden. Die Zahlen geben die LPS-Konzentration in [ng/ml] an. K=Kontrolle; Medium statt LPS	45
Tabelle 6:	Behandlungsgruppen für Inhibitorversuche; 1: 1. Hit (über Nacht), 2: 2. Hit(3 h), 1+2: 1. und 2. Hit(über Nacht bzw. 3 h), M: Mediumkontrolle, Inhib.: Inhibitorgabe (mit 1. Hit), DMSO: DMSO-Kontrolle (mit 1. Hit) Durchgeführt in 6-Well-Platten in Doppelbestimmung; hier abweichend dargestellt	46
Tabelle 7:	Signifikanzniveaus mit entsprechenden Symbolen	49
Tabelle 8:	Methylierungsveränderungen in einzelnen Pathways mit Anzahl der CpG-Inseln, der regulierten Sites und p-Values. KEGG Pathway: Code in der Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, N: Anzahl der analysierten CpG-Inseln, DE: Anzahl der differenziell methylierten CpG-Inseln, P.DE: P-Wert für die entsprechenden Inseln	63

8. Literaturverzeichnis

- Akira S, Takeda K. Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol.* 2004; 4: 499-511
- Ambrosi C, Manzo M, Baubec T. Dynamics and Context-Dependent Roles of DNA Methylation. *J Mol Biol.* 2017; 429: 1459-1475
- Bahar Halpern K, Vana T, Walker MD. Paradoxical role of DNA methylation in activation of FoxA2 gene expression during endoderm development. *J Biol Chem.* 2014; 289: 23882-23892
- Bannerman D, Goldblum S. Direct effects of endotoxin on the endothelium: barrier function and injury. *Lab Invest.* 1999; 79: 1181-1899
- Bas A, Forsberg G, Hammarstrom S, Hammarstrom M-L. Utility of the Housekeeping Genes 18S rRNA, beta-Actin and Glyceraldehyde-3-Phosphate-Dehydrogenase for Normalization in Real-Time Quantitative Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction Analysis of Gene Expression in Human T Lymphocytes. *Scand J Immunol.* 2004; 59: 566-573
- Belikova I, Lukaszewicz AC, Faivre V, Damoiseil C, Singer M, Payen D. Oxygen consumption of human peripheral blood mononuclear cells in severe human sepsis. *Crit Care Med.* 2007; 35: 2702-2708
- Blow MJ, Clark TA, Daum CG, Deutschbauer AM, Fomenkov A, Fries R, Froula J, Kang DD, Malmstrom RR, Morgan RD, Posfai J, Singh K, Visel A, Wetmore K, Zhao Z, Rubin EM, Korlach J, Pennacchio LA, Roberts RJ. The Epigenomic Landscape of Prokaryotes. *PLoS Genet.* 2016; 12: 1-28
- Bomans K, Schenz J, Sztwiertnia I, Schaack D, Weigand MA, Uhle F. Sepsis Induces a Long-Lasting State of Trained Immunity in Bone Marrow Monocytes. *Front Immunol.* 2018; 9: 2685
- Bomszyk K, Mar D, An D, Sharifian R, Mikula M, Gharib SA, Altemeier WA, Liles WC, Denisenko O. Experimental acute lung injury induces multi-organ epigenetic modifications in key angiogenic genes implicated in sepsis-associated endothelial dysfunction. *Crit Care.* 2015; 19: 225
- Brint EK, Xu D, Liu H, Dunne A, McKenzie ANJ, O'Neill LAJ, Liew FY. ST2 is an inhibitor of interleukin 1 receptor and Toll-like receptor 4 signaling and maintains endotoxin tolerance. *Nat Immunol.* 2004; 5: 373-379
- Brogdon JL, Xu Y, Szabo SJ, An S, Buxton F, Cohen D, Dc W, Huang Q. Histone deacetylase activities are required for innate immune cell control of Th1 but not Th2 effector cell function Histone deacetylase activities are required for innate immune cell control of Th1 but not Th2 effector cell function. *Blood.* 2013; 109: 1123-1130
- Burns K, Janssens S, Brissoni B, Olivos N, Beyaert R, Tschopp J. Inhibition of Interleukin 1 Receptor/Toll-like Receptor Signaling through the Alternatively Spliced, Short Form of

- MyD88 Is Due to Its Failure to Recruit IRAK-4. *J Exp Med.* 2003; 197
- Butcher SK, O'Carroll CE, Wells CA, Carmody RJ. Toll-like receptors drive specific patterns of tolerance and training on restimulation of macrophages. *Front Immunol.* 2018; 9
- Cabal-Hierro L, Rodríguez M, Artime N, Iglesias J, Ugarte L, Prado MA, Lazo PS. TRAF-mediated modulation of NF- κ B AND JNK Activation by TNFR2. *Cell Signal.* 2014; 26: 2658-2666
- Campbell JJ, Qin S, Bacon KB, Mackay CR, Butcher EC. Biology of chemokine and classical chemoattractant receptors: differential requirements for adhesion-triggering versus chemotactic responses in lymphoid cells. *J Cell Biol.* 1996; 134: 255-266
- Campbell JJ. Chemokines and the Arrest of Lymphocytes Rolling Under Flow Conditions. *Science.* 1998; 279: 381-384
- Carré JE, Singer M. Cellular energetic metabolism in sepsis: The need for a systems approach. Vol. 1777, *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics.* Elsevier; 2008. 763-771
- Chen MF, Kuan FC, Yen TC, Lu MS, Lin PY, Chung YH, Chen WC, Lee K Der. IL-6-stimulated CD11b+CD14+HLA-DR-myeloid-derived suppressor cells, are associated with progression and poor prognosis in squamous cell carcinoma of the esophagus. *Oncotarget.* 2014; 5: 8716-8728
- Chen T, Lin X, Xu J, Tan R, Ji J, Shen P. Redox imbalance provokes deactivation of macrophages in sepsis. *Proteomics - Clin Appl.* 2009; 3: 1000-1009
- 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, van de Veerdonk FL, Bonten MJ, Schultz MJ, Willems PHGM, Pickkers P, Joosten LAB, van der Poll T, Netea MG. Broad defects in the energy metabolism of leukocytes underlie immunoparalysis in sepsis. *Nat Immunol.* 2016; 17: 406-413
- Daniel AE, Van Buul JD. Endothelial junction regulation: A prerequisite for leukocytes crossing the vessel wall. Vol. 5, *Journal of Innate Immunity.* S. Karger AG; 2013: 324-335
- Deaton AM, Bird A. CpG islands and the regulation of transcription. *Genes Dev.* 2011; 25: 1010-1022
- Deutschman CS, Tracey KJ. Sepsis: Current Dogma and New Perspectives. *Immunity.* 2014; 40: 463-475
- Di Guglielmo GM, Le Roy C, Goodfellow AF, Wrana JL. Distinct endocytic pathways regulate TGF- β receptor signalling and turnover. *Nat Cell Biol.* 2003; 5: 410-421
- Dolman NJ, Kilgore JA, Davidson MW. A Review of Reagents for Fluorescence Microscopy of Cellular Compartments and Structures, Part I: BacMam Labeling and Reagents for Vesicular Structures. *Curr Protoc Cytom.* 2013; 65: 123001-123027

- El Gazzar M, Yoza BK, Chen X, Hu J, Hawkins GA, McCall CE. G9a and HP1 couple histone and DNA methylation to TNF-alpha transcription silencing during endotoxin tolerance. *J Biol Chem.* 2008; 283: 32198-32208
- Ertel W, Kremer JP, Kenney J, Steckholzer U, Jarrar D, Trentz O, Schildberg FW. Down-regulation of proinflammatory cytokine release in whole blood from septic patients. *Blood.* 1995; 85: 1341-1347
- Flannagan RS, Jaumouillé V, Grinstein S. The Cell Biology of Phagocytosis. *Annu Rev Pathol Mech Dis.* 2012; 7: 61-98
- Fleischmann C, Thomas-Rueddel DO, Hartmann M, Hartog CS, Welte T, Heublein S, Dennler U, Reinhart K. Fallzahlen und sterblichkeitsraten von sepsis-patienten im krankenhaus. *Dtsch Arztebl Int.* 2016; 113: 159-166
- Garib FY, Rizopulu AP, Kuchmiy AA, Garib VF. Inactivation of inflammasomes by pathogens regulates inflammation. *Biochem.* 2016; 81: 1326-1339
- Gül F, Arslantas MK, Cinel I, Kumar A. Changing Definitions of Sepsis. *Turkish J Anaesthesiol Reanim.* 2017; 45: 129-138
- Han S-I, Joo Y-D, Han K-H, Feldbauer K, Terpitz U, Haase W, Schneider-Hohendorf T, Bamberg E, Sukhorukov VL. An electrorotation technique for measuring the dielectric properties of cells with simultaneous use of negative quadrupolar dielectrophoresis and electrorotation. *Analyst.* 2013; 138: 1529
- Hotchkiss RS, Monneret G, Payen D. Immunosuppression in sepsis: A novel understanding of the disorder and a new therapeutic approach. Vol. 13, *The Lancet Infectious Diseases.* NIH Public Access; 2013. 260-268
- Hotchkiss RS, Coopersmith CM, McDunn JE, Ferguson TA. The sepsis seesaw: tilting toward immunosuppression. *Nat Med.* 2009; 15: 496-497
- Huang Y, Pastor WA, Shen Y, Tahiliani M, Liu DR, Rao A. The behaviour of 5-hydroxymethylcytosine in bisulfite sequencing. *PLoS One.* 2010; 5
- Husebye H, Halaas Ø, Stenmark H, Tunheim G, Sandanger Ø, Bogen B, Brech A, Latz E, Espevik T. Endocytic pathways regulate Toll-like receptor 4 signaling and link innate and adaptive immunity. *EMBO J.* 2006; 25: 683-692
- Illingworth RS, Gruenewald-Schneider U, Webb S, Kerr ARW, James KD, Turner DJ, Smith C, Harrison DJ, Andrews R, Bird AP. Orphan CpG islands identify numerous conserved promoters in the mammalian genome. *PLoS Genet.* 2010; 6: 1001134
- Jeong Y-H, Park J-S, Kim D-H, Kang JL, Kim H-S. Anti-inflammatory mechanism of lonchocarpine in LPS- or poly(I:C)-induced neuroinflammation. *Pharmacol Res.* 2017; 119: 431-442
- Jones PA. Functions of DNA methylation: islands, start sites, gene bodies and beyond. *Nat Rev Genet.* 2012; 13: 484-492

- Kanias G. Selectins and their ligands: current concepts and controversies. *Blood*. 1995; 85: 603-606
- Karahoca M, Momparler RL. Pharmacokinetic and pharmacodynamic analysis of 5-aza-2-deoxycytidine (decitabine) in the design of its dose-schedule for cancer therapy. *Clin Epigenetics*. 2013; 5: 3
- Kathleen M Botham. Cellular Models in Nutrition Research. *Oncohematol*
- Kelly B, O'Neill LAJ. Metabolic reprogramming in macrophages and dendritic cells in innate immunity. *Cell Res*. 2015; 25: 771-784
- Kim M. Bidirectional Transmembrane Signaling by Cytoplasmic Domain Separation in Integrins. *Science*. 2003; 301: 1720-1725
- Kobayashi DT, Decker D, Zaworski P, Klott K, McGonigal J, Ghazal N, Sly L, Chung B, Vanderlugt J, Chen KS. Evaluation of Peripheral Blood Mononuclear Cell Processing and Analysis for Survival Motor Neuron Protein. *PLoS One*. 2012; 7
- Krakauer T, Oppenheim JJ. IL-1 and tumor necrosis factor- α each up-regulate both the expression of IFN- γ receptors and enhance IFN- γ -induced HLA-DR expression on human monocytes and a human monocytic cell line (THP-1). *J Immunol*. 1993; 150: 1205-1211
- Lee SJ, Choi EK, Seo KW, Bae JU, Park SY, Kim CD. TLR4-mediated expression of Mac-1 in monocytes plays a pivotal role in monocyte adhesion to vascular endothelium. *PLoS One*. 2014; 9
- Leentjens J, Kox M, Koch RM, Preijers F, Joosten LAB, Van Der Hoeven JG, Netea MG, Pickkers P. Reversal of immunoparalysis in humans in vivo: A double-blind, placebo-controlled, randomized pilot study. *Am J Respir Crit Care Med*. 2012; 186: 838-845
- Ley K, Laudanna C, Cybulsky MI, Nourshargh S. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nat Rev Immunol*. 2007; 7: 678-689
- Lim ASP, Srivastava GP, Yu L, Chibnik LB, Xu J, Buchman AS, Schneider JA, Myers AJ, Bennett DA, De Jager PL. 24-hour rhythms of DNA methylation and their relation with rhythms of RNA expression in the human dorsolateral prefrontal cortex. *PLoS Genet*. 2014; 10: 1004792
- Liu D, Cao S, Zhou Y, Xiong Y. Recent advances in endotoxin tolerance. *J Cell Biochem*. 2019; 120: 56-70
- Lohse MJ, Engelhardt S, Danner S, Böhm M. Mechanisms of beta-adrenergic receptor desensitization: from molecular biology to heart failure. *Basic Res Cardiol*. 1996; 91 Suppl 2: 29-34
- Lopes-Pires ME, Naime ACA, Cardelli NJA, Anjos DJ, Antunes E, Marcondes S. PKC and AKT modulate cGMP/PKG signaling pathway on platelet aggregation in experimental sepsis. *PLoS One*. 2015; 10

- Mantovani, A, Sica, A, Locati M. Macrophage Polarization Comes of Age. *Immunity*. 2005; 23: 344-346
- May RC, Caron E, Hall A, Machesky LM. Involvement of the Arp2 / 3 complex in phagocytosis mediated by Fc R or CR3. *J Cell Sci*. 2000; 2: 246-248
- Mayer A, Lee S, Lendlein A, Jung F, Hiebl B. Efficacy of CD14+ blood monocytes/ macrophages isolation: positive versus negative MACS protocol. *Clin Hemorheol Microcirc*. 2011; 48: 57-63
- Meng L, Li L, Lu S, Li K, Su Z, Wang Y. The protective effect of dexmedetomidine on LPS-induced acute lung injury through the HMGB1-mediated TLR4/NF-kB and PI3K/Akt/mTOR pathways. *Mol Immunol*. 2018; 94: 7-17
- Mira JC, Gentile LF, Mathias BJ, Efron PA, Brakenridge SC, Mohr AM. Sepsis Pathophysiology, Chronic Critical Illness and PICS. *Crit Care Med*. 2017; 45: 253-262
- Mitchell E, Klein SL, Argyropoulos K V, Sharma A, Chan RB, Toth JG. Epigenetic Mechanisms. *Nat Commun*. 2016; 7: 1-16
- Mitroulis I, Ruppova K, Wang B, Chen L-S, Grzybek M, Grinenko T, Eugster A, Troullinaki M, Palladini A, Kourtzelis I, Chatzigeorgiou A, Schlitzer A, Beyer M, Joosten LA, Isermann B, Lesche M, Petzold A, Simons K, Henry I, Dahl A, Schultze JL, Wielockx B, Zamboni N, Mirtschink P, Coskun Ü, Hajishengallis G, Netea MG, Chavakis T. Modulation of Myelopoiesis Progenitors Is an Integral Component of Trained Immunity. *Cell*. 2018; 172: 147
- Moore LD, Le T, Fan G. DNA methylation and its basic function. *Neuropsychopharmacology*. 2013; 38: 23-38
- Murshid A, Gong J, Prince T, Borges TJ, Calderwood SK. Scavenger receptor SREC-1 mediated entry of TLR4 into lipid microdomains and triggered inflammatory cytokine release in RAW 2647 cells upon LPS activation. *PLoS One*. 2015; 10: 122529
- Nordlund J, Syvänen A-C. Epigenetics in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Semin Cancer Biol*. 2017
- Oeckinghaus A, Ghosh S. The NF-kappaB family of transcription factors and its regulation. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2009; 1: 34
- Otto GP, Sossdorf M, Claus RA, Rödel J, Menge K, Reinhart K, Bauer M, Riedemann NC. The late phase of sepsis is characterized by an increased microbiological burden and death rate. *Crit Care*. 2011; 15: 183
- Pålsson-McDermott EM, O'Neill LAJ. Signal transduction by the lipopolysaccharide receptor, Toll-like receptor-4. *Immunology*. 2004; 113: 153-162
- Patricio P, Paiva JA, Borrego LM. Immune response in bacterial and Candida sepsis . *Eur J Microbiol Immunol*. 2019; 9: 105-113
- Pena OM, Pistolic J, Raj D, Fjell CD, Hancock REW. Endotoxin Tolerance Represents a Distinctive State of Alternative Polarization (M2) in Human Mononuclear Cells. *J Immunol*.

2011; 186: 7243-7254

Pietrasanta C, Pugni L, Ronchi A, Bottino I, Ghirardi B, Sanchez-Schmitz G, Borriello F, Mosca F, Levy O. Vascular Endothelium in Neonatal Sepsis: Basic Mechanisms and Translational Opportunities. *Front Pediatr.* 2019; 7: 340

Ranoa DRE, Kelley SL, Tapping RI. Human lipopolysaccharide-binding protein (LBP) and CD14 independently deliver triacylated lipoproteins to Toll-like receptor 1 (TLR1) and TLR2 and enhance formation of the ternary signaling complex. *J Biol Chem.* 2013; 288: 9729-9741

Reddy RC, Chen GH, Tekchandani PK, Standiford TJ. Sepsis-Induced Immunosuppression From Bad to Worse. *Immunol Res.* 2001; 24: 273-288

Rigato O, Salomao R. Impaired production of interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha but not of interleukin 10 in whole blood of patients with sepsis. *Shock.* 2003; 19: 113-116

Rodriguez-Lazaro D. Real-time PCR in food science : current technology and applications. Caister Academic Press. 2013; 6

Saeed S, Quintin J, Kerstens HHD, Rao NA, Aghajani-refah A, Matarese F, Cheng S-C, Ratter J, Berentsen K, van der Ent MA, Sharifi N, Janssen-Megens EM, Ter Huurne M, Mandoli A, van Schaik T, Ng A, Burden F, Downes K, Frontini M, Kumar V, Giamarellos-Bourboulis EJ, Ouwehand WH, van der Meer JWM, Joosten LAB, Wijmenga C, Martens JHA, Xavier RJ, Logie C, Netea MG, Stunnenberg HG. Epigenetic programming of monocyte-to-macrophage differentiation and trained innate immunity. *Science.* 2014; 345: 1251086

Sato TA. Molecular inhibition of histone deacetylation results in major enhancement of the production of IL-1beta in response to LPS. *AJP Endocrinol Metab.* 2005; 290: 490-493

Savina A, Amigorena S. Phagocytosis and antigen presentation in dendritic cells. *Immunol Rev.* 2007; 219: 143-156

Seedat J. *Epidemiologisches Bulletin* 37/2017. *Das Epidemiol Bull.* 2018; 37

Shao Y, Chen X, Liu Y, Chen X, Li C, Wang L, Zhao W. Dexmedetomidine alleviates lung injury in sepsis mice through regulating P38 MAPK signaling pathway. *Panminerva Med.* 2020

Singer BD, Mock JR, Aggarwal NR, Garibaldi BT, Sidhaye VK, Florez MA, Chau E, Gibbs KW, Mandke P, Tripathi A, Yegnasubramanian S, King LS, D'Alessio FR. Regulatory T cell DNA methyltransferase inhibition accelerates resolution of lung inflammation. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2015; 52: 641-652

Singer M, Bellomo R, Bernard GR, Chiche J, Craig M, Hotchkiss RS, Levy MM, Marshall JC, Martin GS, Opal SM, Rubenfeld GD, Der T Van, Vincent J, Angus DC. HHS Public Access. *Jama.* 2016; 315: 801-810

- Singer M. Cellular Dysfunction in Sepsis. Vol. 29, Clinics in Chest Medicine. 2008; 655-660
- Sittampalam GS, Grossman A, Brimacombe K, Arkin M, Auld D, Austin C, Baell J, Bejcek B, Caaveiro JMM, Chung TDY, Coussens NP, Dahlin JL, Devanaryan V, Foley TL, Glicksman M, Hall MD, Haas J V., Hoare SRJ, Inglese J, Iversen PW, Kahl SD, Kales SC, Kirshner S, Lal-Nag M, Li Z, McGee J, McManus O, Riss T, O. Joseph Trask J, Weidner JR, Wildey MJ, Xia M, Xu X. Assay Guidance Manual. Assay Guidance Manual. Eli Lilly, Company and the National Center for Advancing Translational Sciences; 2004
- Steeber DA, Guglielmo MV. A new twist to the leukocyte adhesion cascade: intimate co-operation is key. *Trends Immunol.* 2005; 26: 9-12
- Steen EH, Wang X, Balaji S, Butte MJ, Bollyky PL, Keswani SG. The Role of the Anti-Inflammatory Cytokine Interleukin-10 in Tissue Fibrosis. *Adv Wound Care.* 2019; 9: 184
- Stevenson EK, Rubenstein AR, Radin GT, Wiener RS, Walkey AJ. Two Decades of Mortality Trends Among Patients With Severe Sepsis. *Crit Care Med.* 2014; 42: 625-631
- Takeda K, Akira S. TLR signaling pathways. *Semin Immunol.* 2004; 16: 3-9
- Thangavel J, Malik AB, Elias HK, Rajasingh S, Simpson AD, Sundivakkam PK, Vogel SM, Xuan YT, Dawn B, Rajasingh J. Combinatorial therapy with acetylation and methylation modifiers attenuates lung vascular hyperpermeability in endotoxemia-induced mouse inflammatory lung injury. *Am J Pathol.* 2014; 184: 2237-2249
- Thangavel J, Samanta S, Rajasingh S, Barani B, Xuan YT, Dawn B, Rajasingh J. Epigenetic modifiers reduce inflammation and modulate macrophage phenotype during endotoxemia-induced acute lung injury. *J Cell Sci.* 2015; 128: 3094-3105
- Torgersen C, Moser P, Luckner G, Mayr V, Jochberger S, Hasibeder WR, Dünser MW. Macroscopic Postmortem Findings in 235 Surgical Intensive Care Patients with Sepsis. *Anesth Analg.* 2009; 108: 1841-1847
- Ursprung I. Sepsis in Deutschland. 2016; 12-17
- Vachharajani V, Liu T, McCall CE. Epigenetic coordination of acute systemic inflammation: potential therapeutic targets. *Expert Rev Clin Immunol.* 2014; 10: 1141-1150
- Van den Berk JMM, Oldenburger RHJ, van den Berg AP, Klompaker IJ, Mesander G, van Son WJ, van der Bij W, Slooff MJH, The Th. low HLA-DR expression on monocytes as a prognostic marker for bacterial sepsis after liver transplantation. *Transplantation.* 1997; 63: 1846-1848
- Vaure C, Liu Y. A comparative review of toll-like receptor 4 expression and functionality in different animal species. *Front Immunol.* 2014; 5: 316
- Vergadi E, Vaporidi K, Tsatsanis C. Regulation of Endotoxin Tolerance and Compensatory Anti-inflammatory Response Syndrome by Non-coding RNAs. *Front Immunol.* 2018; 9: 2705
- Vieira O V, Botelho RJ, Rameh L, Brachmann SM, Matsuo T, Davidson HW, Schreiber A,

- Backer JM, Cantley LC, Grinstein S. Distinct roles of class I and class III phosphatidylinositol 3-kinases in phagosome formation and maturation. *J Cell Biol.* 2001; 155: 19-25
- Volk HD, Reinke P, Krausch D, Zuckermann H, Asadullah K, Müller JM, Döcke WD, Kox WJ. Monocyte deactivation—rationale for a new therapeutic strategy in sepsis. *Intensive Care Med.* 1996; 22 Suppl 4: 474-481
- Wald D, Qin J, Zhao Z, Qian Y, Naramura M, Tian L, Towne J, Sims JE, Stark GR, Li X. SIGIRR, a negative regulator of Toll-like receptor interleukin 1 receptor signaling. *Nat Immunol.* 2003; 4: 920-927
- Ward NS, Casserly B, Ayala A. The compensatory anti-inflammatory response syndrome (CARS) in critically ill patients. *Clin Chest Med.* 2008; 29: 617-625
- Warner N, Nunez G. MyD88: A Critical Adaptor Protein in Innate Immunity Signal Transduction. *J Immunol.* 2013; 190: 3-4
- Wolk K, Döcke WD, von Baehr V, Volk HD, Sabat R. Impaired antigen presentation by human monocytes during endotoxin tolerance. *Blood.* 2000; 96: 218-223
- Xu PB, Lou JS, Ren Y, Miao C hong, Deng X ming. Gene expression profiling reveals the defining features of monocytes from septic patients with compensatory anti-inflammatory response syndrome. *J Infect.* 2012; 65: 380-391
- Zhang Z, Guo Y, Liu Y, Li C, Guo M, Deng G. IFN- β Displays Anti-Inflammatory Effects on Staphylococcus aureus Endometritis via Inhibiting the Activation of the NF- κ B and MAPK Pathways in Mice. *Biomed Res Int.* 2017; 2017: 2350482
- Zhao Y, Feng X, Li B, Sha J, Wang C, Yang T, Cui H, Fan H. Dexmedetomidine Protects Against Lipopolysaccharide-Induced Acute Kidney Injury by Enhancing Autophagy Through Inhibition of the PI3K/AKT/mTOR Pathway. *Front Pharmacol.* 2020; 11

9. Danksagung

Ich möchte allen danken, die mich bei der Entstehung dieser Arbeit unterstützt haben. Für die Planung, Korrektur und Betreuung danke ich Heidi Ehentraut, Christina Weisheit und Stilla Frede. Ohne Mario Fox, Jan Lucas Kleiner und Susanne Schulz wären mir deutlich weniger Versuche geglückt; ich danke euch für eure Tipps und eure praktische Unterstützung.

Außerdem gilt mein Dank den anderen Doktoranden der Arbeitsgruppe; allen voran Marcel Scheck und Kim Kaummans.

Letztere ist mir über die Jahre eine gute Freundin geworden und hat mich mit ihrer positiven Art immer wieder motiviert.

Ein großes Vorbild in meiner Zeit im Labor war mir Konrad Peukert. Vor deiner Leistungsbereitschaft und deinem Wissen ziehe ich den Hut! Dein trockener Humor hat mir manchen langen Labortag versüßt. Du hast mich gerade als es schwierig wurde, wie kein anderer bei der Stange gehalten, dich für mich eingesetzt und mich durch wissenschaftliche wie persönliche Krise begleitet. Danke!

Außerdem möchte ich dem BONFOR-Förderprogramm danken, das mich mit einem Sci-Med Promotionsstipendium unterstützte.