

Aus der Klinik für Innere Medizin mit Schwerpunkt Rheumatologie und  
klinische Immunologie  
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Zur metabolischen Hierarchie spezifischer Immunprozesse  
bei menschlichen Monozyten

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Pierre-Louis Krauß  
aus Jena

Datum der Promotion: 03.12.2021

Meinen Eltern

## **Vorwort**

Teilergebnisse und Textabschnitte (Abstract, Teile der Diskussion) dieser Arbeit wurden zur Veröffentlichung eingereicht bei „Frontiers in Immunology“ am 25.6.21 unter dem Titel „The production of IL-6 and phagocytosis are the most resilient immune functions in metabolically compromised human monocytes“ mit den Autoren Dr. Moritz Pfeiffenberger, Alexandra Damerau, Dr. med. Thomas Buttgereit, Dr. med. Yuling Chen, Dr. rer. nat. Timo Gaber und Prof. Dr. med. Frank Buttgereit.

## Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis .....	6
Tabellenverzeichnis .....	8
Abkürzungsverzeichnis .....	9
Kurzfassung .....	11
Abstract .....	12
1. Einleitung .....	13
1.1. Monozyten .....	13
1.1.1. Ursprung und Funktion .....	13
1.1.2. Subtypen .....	15
1.1.3. Klinischer Stellenwert .....	16
1.2. Stoffwechsel von Immunzellen .....	18
1.2.1. Überlebensnotwendige und spezifische Prozesse .....	18
1.2.2. Energie und Biosynthese .....	18
1.3. Stoffwechsel von menschlichen Monozyten .....	19
1.3.1. Aktivierung .....	19
1.3.2. Aktivierung unter metabolischer Belastung .....	20
1.4. Herleitung der Frage- und Aufgabenstellung .....	21
2. Material & Methoden .....	23
2.1. Präparation von Monozyten .....	23
2.2. Zellzählung .....	25
2.3. Zellkultur .....	26
2.4. Reagenzien in der Zellkultur und Sauerstoffverbrauchsmessung .....	28
2.5. Messung des Sauerstoffverbrauches mit der Clark Elektrode .....	29
2.6. Durchflusszytometrie .....	33
2.6.1. Allgemeines .....	33
2.6.2. Präparation der Monozyten .....	35
2.6.3. Lagerung der Monozyten bis zur Messung .....	36
2.6.4. Messung der intrazellulären reaktiven Sauerstoffspezies .....	36
2.6.5. Phagozytoseaktivität .....	37
2.6.6. Oberflächenmarker und intrazelluläre Zytokine .....	37
2.7. Messung des intrazellulären ATP-Gehaltes .....	39
2.8. Statistische Auswertung .....	40
3. Ergebnisse .....	41
3.1. Titration Myxothiazol .....	41
3.2. Vitalität der Zellen nach Inkubation .....	41
3.3. Titrations von VAS2870, Oligomycin A und FCCP .....	42

3.4.	Basalatmung .....	44
3.5.	NOX assoziierter Sauerstoffverbrauch .....	45
3.6.	Intrazelluläre reaktive Sauerstoffspezies .....	46
3.7.	Sauerstoffverbrauch der mitochondrialen ATP Produktion .....	47
3.8.	Intrazellulärer ATP Gehalt .....	48
3.9.	Nicht sensitiver Sauerstoffverbrauch .....	49
3.10.	Reservekapazität .....	50
3.11.	Oberflächenmarker.....	51
3.12.	Produktionskinetik inflammatorischer Zytokine .....	54
3.13.	Phagozytose .....	55
4.	Diskussion.....	57
4.1.	Modellwahl und pathophysiologische Bedeutung .....	57
4.2.	Hierarchie und Erklärungsansätze.....	57
4.3.	Zum Energie- und Sauerstoffmetabolismus in unserem Modell .....	58
4.3.1.	Energieversorgung.....	58
4.3.2.	Funktionalität der Monozyten und externe Vergleichbarkeit .....	59
4.4.	Immunfunktionen in unserem Modell.....	60
4.4.1.	Phagozytose .....	60
4.4.2.	ROS Produktion durch NOX .....	60
4.4.3.	NOX unabhängige ROS.....	61
4.4.4.	ROS: künstliche Fehlerquelle oder Mitspieler in der Hierarchie? .....	62
4.4.5.	Antigenpräsentation, endotheliale Adhäsion .....	62
4.4.6.	Produktion inflammatorischer Zytokine .....	63
4.5.	Limitationen .....	64
4.5.1.	Methodische Limitationen und Verzicht auf die Glykolyse .....	64
4.5.2.	Bedeutung der Glykolyse bei Monozyten/Makrophagen.....	65
4.6.	Einordnung der Ergebnisse in die aktuelle Literatur .....	66
4.6.1.	Der mitochondriale Stoffwechsel.....	66
4.6.2.	Phagozytose und IL-6 bei der Atherosklerose, Karzinogenese und RA .....	67
5.	Zusammenfassung und Fazit.....	69
6.	Literaturverzeichnis .....	71
7.	Anhang.....	81
7.1.	Eidesstattliche Versicherung .....	81
7.2.	Lebenslauf .....	82
7.3.	Vollständige Publikationsliste .....	83
7.4.	Danksagung .....	84

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung des Ergebnisses der Ficoll Paque Plus® Technik mit menschlichem Vollblut nach Zentrifugation. ....	24
Abbildung 2: Schematische Darstellung der magnetisch aktivierten Zellsortierung..	25
Abbildung 3: Zählfelder der Neubauer Zählkammer .....	26
Abbildung 4: Schematische Darstellung der Serumdialyse gegen RPMI 1640 ohne Glukose. ....	27
Abbildung 5: Schematische Darstellung der Schüttelkultur für Humane Monozyten.	28
Abbildung 6: Schematische Darstellung der Clark-Elektrode. ....	30
Abbildung 7: Aufbau Clark-Elektrode, Messkammer (ohne Magnetrührstation). ....	31
Abbildung 8: Exemplarische Darstellung der Bestimmung des Sauerstoffverbrauches mithilfe der Clark-Elektode.....	32
Abbildung 9: Zeitprotokoll der Sauerstoffverbrauchsmessungen humaner Monozyten nach jeweils 2 und 6 Stunden Inkubation. ....	32
Abbildung 10: Gating-Strategie bei der durchflusszytometrischen Kontrolle der Monozytenisolation. ....	35
Abbildung 11: Gating-Strategie bei der durchflusszytometrischen Messung der iROS menschlicher Monozyten. ....	36
Abbildung 12: Gating-Strategie bei der durchflusszytometrischen Messung der Expression der Oberflächenmarker CD16, CD11b, CD80 und HLA-DR bei menschlichen Monozyten. ....	38
Abbildung 13: Gating-Strategie bei der durchflusszytometrischen Messung des intrazellulären Gehalts an TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ und IL-6 menschlicher Monozyten. ....	39
Abbildung 14: Titration von Myxothiazol an menschlichen Monozyten in glukosefreiem RPMI Medium mit 10 % (v/v) glukosefreiem humanem AB Serum/RPMI. ....	41
Abbildung 15: Vitalität von ruhenden und stimulierten (100 ng/ml LPS) menschlichen Monozyten unter glukosefreien Bedingungen.....	42
Abbildung 16: Ergebnisse der Titration von VAS2870 bei ruhenden menschlichen Monozyten unter glukosefreien Bedingungen.....	43
Abbildung 17: Titration von Oligomycin A und FCCP bei ruhenden menschlichen Monozyten unter glukosefreien Bedingungen.....	44
Abbildung 18: Basalatmung von ruhenden und stimulierten (100 ng/ml LPS) menschlichen Monozyten unter glukosefreien Bedingungen.....	45

Abbildung 19: NOX assoziierter Sauerstoffverbrauch (=NAS) von ruhenden und stimulierten (100ng/ml LPS) menschlichen Monozyten unter glukosefreien Bedingungen. ....	46
Abbildung 20: MFI der CM-H2DCFDA Färbung von ruhenden und stimulierten (100 ng/ml LPS) menschlichen Monozyten nach 2 Stunden Inkubation unter glukosefreien Bedingungen. ....	47
Abbildung 21: Sauerstoffverbrauch assoziiert mit der mitochondrialen ATP-Produktion von ruhenden und stimulierten (100 ng/ml LPS) menschlichen Monozyten unter glukosefreien Bedingungen. ....	48
Abbildung 22: Intrazellulärer ATP Gehalt von ruhenden und stimulierten (100 ng/ml LPS) Monozyten nach 3 Stunden unter glukosefreien Bedingungen.....	49
Abbildung 23: Durch VAS2870 und Oligomycin A nicht beeinflussbarer Sauerstoffverbrauch von ruhenden und stimulierten (100 ng/ml LPS) menschlichen Monozyten unter glukosefreien Bedingungen.....	50
Abbildung 24: Reservekapazität ( $\Delta$ Sauerstoffverbrauch) von ruhenden und stimulierten (100 ng/ml LPS) menschlichen Monozyten unter glukosefreien Bedingungen. ....	51
Abbildung 25: Positivanteil von ruhenden und stimulierten (100 ng/ml LPS) Monozyten nach einer Färbung mit Antikörpern gegen CD80, CD16, HLA-DR und CD11b unter glukosefreien Bedingungen.....	52
Abbildung 26: Mediane Fluoreszenzintensität des Positivanteils von ruhenden und stimulierten (100 ng/ml LPS) Monozyten nach einer Färbung mit Antikörpern gegen CD80, CD16, HLA-DR und CD11b unter glukosefreien Bedingungen. ....	53
Abbildung 27: Positivanteil von ruhenden und stimulierten (100 ng/ml LPS) Monozyten nach einer Färbung mit Antikörpern gegen IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ und IL-6 unter glukosefreien Bedingungen. ....	54
Abbildung 28: Positivanteil von ruhenden und stimulierten (100 ng/ml LPS) Monozyten nach der Phagozytose von FITC-markierten E. Coli nach 1 Stunde Inkubation unter glukosefreien Bedingungen.....	55
Abbildung 29: Vereinfachte graphische Darstellung der metabolischen Hierarchie der Immunprozesse bei humanen Monozyten, welche in dieser Arbeit untersucht wurden. ....	70

## **Tabellenverzeichnis**

Tabelle 1: Liste der Antikörper und Farbstoffe, welche in der Durchflusszytometrie verwendet wurden. ....	34
---	----

## Abkürzungsverzeichnis

7-AAD	7-aminoactinomycin-D
AMPK	Adenosinmonophosphat aktivierte Proteinkinase
ATP	Adenosintriphosphat
A. dest.	Destilliertes Wasser
BFA	Brefeldin A
CD	Cluster of differentiation
CM-H <sub>2</sub> DCFDA	5-(und-6)-chloromethyl-2',7'-dichlorodihydrofluoresceindiacetate
CTLA-4	Zytotoxisches T lymphozentenantigen 4
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DMSO	Dimethylsulfoxid
FcγRIII	Fc-gamma Rezeptor 3
FCCP	Carbonylcyanid-p-trifluoromethoxyphenylhydrazon
FSC	Forward Scatter
GAPDH	Glycerinaldehyd-3phosphat-dehydrogenase
HIF	Hypoxie-induzierbarer-Faktor
HLA-DR	Humanes Leukozytenantigen des Isotyps DR
IL-1β	Interleukin 1 beta
IL-6	Interleukin 6
iROS	Intrazelluläre Reaktive Sauerstoffspezies
LPS	Lipopolysaccharid
LBP	Lipopolysaccharid-Bindungsprotein
Mac1/CR3	Makrophagen-antigen 1 und Komplement-Rezeptor 3
MAPK-p38	Mitogen-aktivierte Proteinkinase p38
MAS	Sauerstoffverbrauch assoziiert mit der mitochondrialen ATP-Produktion
MFI	Mediane Fluoreszenzintensität
MHCII	Haupthistokompatibilitätskomplex des Typs zwei
mRNA	Messenger Ribonukleinsäure
mTOR	Mammalian Target of Rapamycin
MYX1	2pmol Myxothiazol/10 <sup>6</sup> Zellen
MYX2	4pmol Myxothiazol/10 <sup>6</sup> Zellen
NADPH	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
NAS	NOX-Assoziierter Sauerstoffverbrauch
NF-κB	Nukleärer Faktor-κB
NK	Natural-Killer
NOX	NADPH Oxidase
OXPPOS	Oxidative Phosphorylierung
PBS	Phosphate buffered saline
PMA	Phorbol 12-myristate 13-acetat
RA	Rheumatoiden Arthritis
RB	Running Buffer
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
Rpm	Rotationen pro minute
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
SEM	Standard error of the mean
SLE	Systemischer Lupus erythematodes
SSC	Side Scatter
Th17	T-helfer 17
TLR	Toll-like-Rezeptor

TNF- $\alpha$   
v/v  
w/v

Tumor-nekrose-Faktor alpha  
Volume per Volume  
Weight per volume

## **Kurzfassung**

**Hintergrund:** Monozyten benötigen zur Ausführung spezifischer immunologischer Prozesse Energie und biosynthetische Substrate. Diese stehen in der Mikroumgebung einer Entzündung aufgrund von u.a. Hypoxie und Glukosemangel nur begrenzt zur Verfügung.

**Fragestellung:** Die Anpassung der Monozyten an metabolisch ungünstige Bedingungen sollte hier mithilfe einer stufenweise gehemmten OXPHOS unter Glukoseentzug untersucht werden. Hierbei sollte herausgefunden werden, ob spezifische immunologische Prozesse unter diesen Bedingungen einer Hierarchie unterliegen.

**Methoden:** Monozyten gesunder Spender wurden unter Glukoseentzug kultiviert, die mitochondriale ATP-Produktion wurde durch den Atmungskettenhemmstoff Myxothiazol stufenweise reduziert. Für insgesamt 3 Belastungsstufen mit Myxothiazol untersuchten wir durchflusszytometrisch die Phagozytosekapazität, die Expression der Oberflächenmoleküle CD16, CD80, CD11b, HLA-DR sowie die Produktion der inflammatorischen Zytokine IL-1 $\beta$ , IL-6 und TNF- $\alpha$ . Mit einer Clark-Elektrode wurden die Produktion von ROS durch NOX und die mitochondriale ATP-Produktion amperometrisch untersucht, die ATP-Menge der Zellen wurde luminometrisch bestimmt.

**Ergebnisse:** Die Monozyten zeigten keine Zeichen einer Apoptose unter Glukose- und/oder Energieentzug. Die metabolische Belastung beeinträchtigte vor allem die Expression der Marker CD11b und HLA-DR, die Produktion von TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  sowie die ROS Produktion durch NOX. Sie zeigte einen geringeren Effekt auf die Phagozytose und die IL-6 Produktion.

**Schlussfolgerung:** Unsere Ergebnisse sprechen klar für eine Hierarchie der Immunprozesse menschlicher, LPS-stimulierter Monozyten unter metabolischer Belastung. Dieses Wissen könnte zur Entwicklung zukünftiger Therapieansätze für Monozyten-vermittelte entzündliche Erkrankungen führen.

## **Abstract**

**Background:** At sites of inflammation, monocytes require energy and building blocks to fulfil immunological functions. They must cope with immunometabolic restrictions such as hypoxia and low glucose levels in the microenvironment.

**Objective:** To investigate the adaptive potential of human monocytes, we modelled conditions of immunometabolic restriction by gradual inhibition of OXPHOS in the absence of glucose.

**Methods:** Monocytes of healthy donors were cultivated under glucose free conditions, and mitochondrial ATP production was gradually decreased by Myxothiazol, an inhibitor of the respiration chain. For three different immunometabolic levels upon stimulation with LPS, we assessed phagocytosis, the expression of surface activation markers CD16, CD80, CD11b, HLA-DR and production of the inflammatory cytokines IL-1 $\beta$ , IL-6 and TNF- $\alpha$  by flow cytometry. With a Clark type electrode, we assessed ATP production and the production of reactive oxygen species through NOX amperometrically. ATP content was determined by luminometric assessment.

**Results:** Monocytes showed no sign of apoptosis following inhibition of mitochondrial respiration. In our model, the effect of immunometabolic restriction was most pronounced on the surface expression of CD11b, HLA-DR, production of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and production of ROS through NOX. Phagocytosis and the production of IL-6 were less affected.

**Conclusion:** Our data demonstrate a hierarchy of immune functions in LPS-stimulated human monocytes. This represents novel knowledge, which could potentially lead to the development of new therapeutic targets in monocyte-mediated inflammatory diseases.

## **1. Einleitung**

### **1.1. Monozyten**

#### **1.1.1. Ursprung und Funktion**

Humane Monozyten sind Leukozyten des peripheren Blutes. Im Immunsystem werden sie der angeborenen Immunabwehr zugeordnet. Sie gehören der myeloischen Zellreihe an und entstehen im Knochenmark aus eigenen hämatopoetischen Vorläuferzellen (Lee et al., 2015, Kawamura et al., 2017). Sie gelangen nach ihrer Reifung in den peripheren Blutkreislauf, um dort etwa einen Tag bis eine Woche zu verweilen (Guilliams et al., 2018, Patel et al., 2017). Sie sind in der Lage, zu Makrophagen, dendritischen Zellen und Osteoklasten zu differenzieren (Kylmaoja et al., 2018, Sander et al., 2017).

Die Phagozytose von pathogenem Material und Zelldebris gehört zu den wichtigsten Funktionen der Monozyten (Dale et al., 2008). Während der Phagozytose sind Monozyten in der Lage, reaktive Sauerstoffradikale (ROS) mithilfe der Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat (NADPH) Oxidase zu produzieren, um pathogene Erreger abzutöten (Bellavite, 1988). Es entstehen in den Phagosomen u.a. das Superoxid  $O_2^-$ , das Hydroxyl-Radikal  $HO\cdot$  oder Wasserstoffperoxid  $H_2O_2$ , welche bakterielle Membranen schädigen und so einen ersten Schritt der angeborenen Immunabwehr einleiten (Bellavite, 1988). Durch hocheffektive enzymatische Systeme wie die Superoxiddismutase, die Glutathion-Peroxidase oder die Katalase, können Phagozyten sich selbst vor den schädlichen ROS wie das Superoxid schützen, indem diese über mehrere Reaktionsschritte zu Wasser verstoffwechselt werden (Bellavite, 1988).

Im Anschluss an die Phagozytose erfolgt bei Monozyten die Antigenpräsentation: das aufgenommene Material wird durch die Fusion von Phagosom und Lysosom proteolytisch zersetzt (Stuart and Ezekowitz, 2005). Durch die Bindung eines in diesem Prozess entstandenen Polypeptids am Haupthistokompatibilitätskomplex des Typs zwei (MHCII) bildet sich ein Rezeptor/Ligand Komplex (Roche and Furuta, 2015, Stuart and Ezekowitz, 2005). Dieser interagiert daraufhin mit einem für dieses Antigen spezifischen T-Zell Rezeptors und kann bei der T-Zelle eine Immunantwort auslösen, falls eine adäquate Co-

stimulation erfolgt, z.B. über das CD28/CD80 Rezeptor/Ligandensystem (Lee et al., 2017, Lenschow et al., 1996). Alternativ kann mit dieser Interaktion eine immunologische Toleranzreaktion vermittelt werden, z.B. wenn das aufgenommene Material aus eigenen, apoptotischen Zellen besteht (Voll et al., 1997). Monozyten leisten somit im Immunsystem einen wichtigen Beitrag in der Diskriminierung des Eigen- und Fremdmaterials und Regulierung der Immunantwort.

Ein bei Monozyten gut erforschtes Molekül der Antigenpräsentation stellt das humane Leukozytenantigen des Isotyps DR (HLA-DR) dar. Die Expression dieses MHCII-Isotyps auf der Oberfläche von Monozyten liefert einen wichtigen Hinweis auf ihre Immunkompetenz. Eine erniedrigte Expression des Markers gilt im Rahmen einer Sepsis als Ausdruck für eine Immunsuppression (Venet et al., 2020). Dem derzeitigen Forschungsstand versteht man diese Immunsuppression als eine kompensatorische Gegenreaktion zur septischen Entzündungsaktivität (Venet et al., 2020, Bone et al., 1997). So ist die herabgesetzte Expression von HLA-DR klinisch mit einem längeren Aufenthalt auf der Intensivstation sowie mit mehr Komplikationen assoziiert (Tamulyte et al., 2019). Neben der Sepsis wird die reduzierte Oberflächenexpression von HLA-DR auf Monozyten auch als kompensatorische Antwort zu anderen systemischen Entzündungsreaktionen betrachtet (Mengos et al., 2019), wie sie beispielsweise im Rahmen einer schweren Verbrennung (Venet et al., 2007) oder einer schweren, akuten Pankreatitis (Gotzinger et al., 2000) auftreten können.

Monozyten befinden sich bei solchen Entzündungen im aktivierten Zustand, sie gelten insbesondere im Rahmen der Sepsis als potente Produzenten der proinflammatorischen Zytokine Interleukin-1- $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), IL-6 und Tumor-Nekrose-Faktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) (Dale et al., 2008). Die sezernierten Zytokine verursachen in den Blutgefäßen eine Erhöhung der Permeabilität sowie eine Abnahme des systemischen Kreislaufwiderstandes, dies äußert sich klinisch als Hypotension, bis hin zum Kreislaufchock (Calandra and Glauser, 1990, Wiesinger et al., 2013). Zusätzlich zeigen diese Zytokine eine endokrine Wirkung auf Endothelzellen, welche selbst zur Produktion von Zytokinen wie IL-6 oder IL-8 stimuliert werden. Dies trägt zum sogenannten Zytokinsturm bei, ein Kernmerkmal des septischen Schocks (Joffre et al., 2020).

Unter diesen pathologischen Umständen gelangen Monozyten durch Adhäsion und transendotheliale Migration zum Entzündungsherd (Dale et al., 2008, Schittenhelm et al., 2017, Shi and Pamer, 2011). Sie sind in der Lage, sich mithilfe der

Chemotaxis entlang von Konzentrationsgradienten entzündlicher Mediatoren zu bewegen, um so effektiv eine lokale Immunantwort auszulösen (Podolnikova et al., 2015). Die Chemotaxis wird u.a. durch das Integrin CD11b/CD18 vermittelt. Zusammen mit der Untereinheit CD18 bildet das Oberflächenmolekül CD11b den Makrophagen-antigen 1 und Komplement-Rezeptor 3 (Mac1/CR3), welcher über die Chemotaxis hinaus die Phagozytose von Komplement-gebundenen Partikeln ermöglicht (Schittenhelm et al., 2017). So sind Monozyten mit der Antigenpräsentation und der Phagozytose eine wichtige Schnittstelle zwischen dem angeborenen und dem adaptiven Immunsystem.

### **1.1.2. Subtypen**

Im peripheren Blut werden Monozyten nach der Oberflächenexpression ihrer Marker CD14 und CD16 unterteilt (Ziegler-Heitbrock, 2014, Ziegler-Heitbrock et al., 2010). CD14 ist ein Membranprotein mit einem Glycosylphosphatidylinositol (GPI) Anker und ohne intrazellulären Anteil. Zusammen mit dem Lipopolysaccharid-Bindungsprotein (LBP) dient es der Übertragung des Lipopolysaccharids (LPS) zum LPS-Rezeptorkomplex und der Zellaktivierung (Schutt, 1999, Ryu et al., 2017). CD16 ist der Fc-gamma Rezeptor 3 (FcγRIII), ein Rezeptor für die konstante Fc Region von Gamma-Immunglobulinen. Infolge einer Bindung von Immunkomplexen dimerisieren seine intrazellulären Immunorezeptor-Tyrosin-basierten Aktivierungsmuster (ITAM) und aktivieren die Zelle (Bosques and Manning, 2016).

Es wird in der Durchflusszytometrie zwischen den sogenannten klassischen (CD14 positiv/CD16 negativ), intermediären (CD14/CD16 doppelpositiv) und nicht klassischen (CD14 schwach positiv/CD16 positiv) Monozyten unterschieden (Ziegler-Heitbrock et al., 2010). Die intermediären Monozyten gelten als die potentesten pro-inflammatorischen Zellen: Beispielsweise produzieren sie die größten Mengen an TNF- $\alpha$  und weisen die höchste Expression an MHCII auf, u.a. HLA-DR sowie HLA-DM. Die klassischen Monozyten bilden den Subtyp, der am effektivsten Antigene präsentiert (Rossol et al., 2012, Lee et al., 2017). Den klassischen Monozyten wird bei einer Entzündung die rasche transendotheliale Migration und darauffolgende Phagozytose von pathogenem Material zugeschrieben (Sprangers et al., 2016). Die nicht klassischen Monozyten patrouillieren hingegen entlang der Gefäßwände und

spielen dort in der Wundheilung sowie Entfernung von Zelldebris eine wichtige Rolle (Thomas et al., 2015).

Diese Subtypen stellen keine eigenständige Zelltypen dar, sondern sind eher als Stadien zu verstehen, die jeder Monozyt in der Reihenfolge klassisch, intermediär, nicht-klassisch chronologisch durchläuft (Patel et al., 2017). Das monozytäre Kompartiment befindet sich also in einem ständigen Fließgleichgewicht, dessen Dynamik sich sowohl bei infektiösen als auch autoimmunologischen Erkrankungen verändern kann (Smiljanovic et al., 2018, Cooper et al., 2012, Mukherjee et al., 2015). Klinisch findet sich im Rahmen einer Sepsis ein erhöhter Anteil an intermediären und nicht klassischen Monozyten (Mukherjee et al., 2015). Weiterhin liefert die Subtypenverteilung bei der rheumatoiden Arthritis (RA) möglicherweise wichtige Hinweise zum Ansprechen auf eine Therapie mit Methotrexat (Cooper et al., 2012). So könnte die Subtypenverteilung im peripheren Blut von Patienten mit entzündlichen sowie infektiösen Erkrankungen in Zukunft eine zunehmende klinisch-diagnostische Relevanz haben.

### **1.1.3. Klinischer Stellenwert**

Eine maßgebliche Rolle spielen Monozyten in der Pathogenese der Atherosklerose (Back et al., 2019), indem sie durch transendotheliale Migration in die Blutgefäßwand gelangen, um subintimal einen chronischen Entzündungsprozess zu unterhalten (Bobryshev, 2006). Sie differenzieren in diesem Gebiet zu Makrophagen, nehmen Cholesterolester sowie Lipoproteine intrazellulär auf, um schließlich sogenannte Schaumzellen zu bilden, ein Kernmerkmal der atherosklerotischen Läsionen (Back et al., 2019). Phagozytierte Lipoproteine lösen wiederum bei den Makrophagen eine Ausschüttung von entzündlichen Zytokinen sowie Chemokinen aus, es werden weitere Monozyten im Sinne eines *circulus vitiosus* in die Läsion gelockt und somit der Entzündungsprozess fortgesetzt (Klouche et al., 1999).

Auch im Rahmen der Karzinogenese halten Monozyten ein chronisch-entzündliches, Tumor-förderndes Milieu aufrecht (Olingy et al., 2019). Sie fördern das Tumorwachstum, indem sie die Angiogenese anregen, entzündliche Zytokine produzieren und zu Tumor-assoziierten-Makrophagen differenzieren (Prenen and Mazzone, 2019, Rivera and Bergers, 2015, Lavin et al., 2017). Die Extravasation von Monozyten in das Tumorgebiet wird derzeit als therapeutischer Angriffspunkt

diskutiert, basierend auf Erkenntnissen aus kombinierten Maus/Menschmodellen für das hepatozelluläre Karzinom und das Pankreaskarzinom (Li et al., 2017, Sanford et al., 2013). Im Gegensatz hierzu sind Monozyten auch in der Lage, die Immunabwehr gegen malignes Gewebe durch das Anlocken von Natürlichen-Killer (NK) Zellen zu steigern (Lavin et al., 2017). Bei Patienten mit malignem Melanom sind nicht klassische Monozyten sogar die Haupteffektoren der Therapie mit Ipilimumab: der Antikörper gegen das zytotoxische T Lymphozyten Antigen 4 (CTLA-4) vermittelt in diesem Fall das Abtöten der tumorfördernden, regulatorischen T-Zellen durch die Monozyten (Romano et al., 2015). Das Monozyten-zu-Lymphozyten Verhältnis im peripheren Blut wird derzeit als zukünftiger Prognosemarker beim diffusen großzelligen B-Zell Lymphom, Kolorektal-, Ovarial- sowie nicht kleinzelligem Lungenkarzinom diskutiert (Olingy et al., 2019, Eo et al., 2016, Li et al., 2012, Stotz et al., 2014, Hu et al., 2014).

Ihr Phänotyp und ihre Funktionalität sind in verschiedenen chronisch entzündlichen Erkrankungen verändert (Ma et al., 2019). Eine abnorme Phagozytose liegt beispielsweise vor im Falle eines systemischen Lupus erythematoses (SLE) (Herrmann et al., 1998), Sjögren-Syndroms (Hauk et al., 2014) oder einer Zöliakie (Cupi et al., 2014). Monozyten der Patienten mit einer systemischen Sklerose weisen eine ausgeprägtere Neigung zur Differenzierung zu Myofibroblasten auf (Binai et al., 2012). Ebenso besitzen sie eine abnorme Antigenpräsentation im Rahmen der RA sowie der Zöliakie (Yoon et al., 2014, Cinova et al., 2007). Ihre pathophysiologische Rolle in der Entstehung solcher Erkrankungen findet diagnostische Anwendung. Das sialic acid-binding immunoglobulin-like lectin (Siglec-1) – ein Oberflächenmarker von Monozyten – ist ein klinisch bereits etablierter Biomarker zur Einschätzung der Krankheitsaktivität des SLE (Rose et al., 2017).

Zusammenfassend haben menschliche Monozyten durch ihre pathophysiologische Bedeutung bei infektiösen, malignen und chronisch-entzündlichen Erkrankungen einen sehr hohen klinischen Stellenwert. Sie könnten in Zukunft weiter in das Zentrum der Forschung geangen, um diagnostische sowie therapeutische Möglichkeiten in der Behandlung dieser Erkrankungen auszubauen.

## **1.2. Stoffwechsel von Immunzellen**

### **1.2.1. Überlebensnotwendige und spezifische Prozesse**

Die Energie-verbrauchenden Funktionen von Immunzellen wie Monozyten können zwei Kategorien zugeordnet werden. Zu den allgemein überlebensnotwendigen Funktionen zählen u.a. der transmembranöse Kationenaustausch, die Synthese von Nukleinsäuren und die Synthese von Proteinen. (Buttgereit et al., 2000, Spies et al., 2012, Buttgereit et al., 1992, Princiotta et al., 2003). Zu den spezifischen immunologischen Funktionen gehören u.a. die Antigenpräsentation, die Phagozytose von pathogenem Material und die transendotheliale Migration (Buttgereit et al., 2000, Spies et al., 2012).

### **1.2.2. Energie und Biosynthese**

Um diese Funktionen auszuführen, benötigen Immunzellen aus biochemischer Sicht einerseits biosynthetische Substrate und andererseits Energieträger. Während biosynthetische Substrate als Bausteine u.a. für Zellmembranen, Nukleinsäuren oder Proteine dienen, ermöglicht der Energieträger Adenosintriphosphat (ATP) ihre effektive enzymatische Herstellung sowie darauffolgende Verwendung. Beide Komponenten stellt der Zellstoffwechsel bereit.

An der Entstehung des ATP sind die oxidative Phosphorylierung der Mitochondrien (OXPHOS) und die zytosolische Glykolyse beteiligt. Die OXPHOS liefert je Molekül Glukose 36 ATP und ist somit im Vergleich zu den 2 ATP, welche durch die Glykolyse gewonnen werden, weitaus effektiver. Der Zitratzyklus verbindet die OXPHOS mit der Glykolyse und stellt eine metabolische Drehscheibe dar: hier können neben der Glukose durch die Glykolyse auch Fettsäuren mit der  $\beta$ -Oxidation und Aminosäuren über anaplerotische Reaktionen zur Energiegewinnung über den Zitratzyklus beitragen.

Das Verhältnis von Glykolyse-zu-OXPHOS in der ATP-Produktion kann je nach Zelltyp und Art der Aktivierung unterschiedlich ausfallen (Ganeshan and Chawla, 2014). Der Grund für diese Wechselhaftigkeit liegt in der zweifachen Funktion dieser Reaktionswege: einerseits dienen sie der Energieversorgung der Zelle, andererseits bedienen sie die Zelle mit Substraten zur Ausführung ihrer Funktionen. Beispielsweise

können Makrophagen im aktivierten Zustand auf den Zitratzyklus sowohl als Quelle biosynthetischer Vorstufen zur Glykosylierung bestimmter Proteine, als auch zur ATP Produktion durch die OXPHOS zurückgreifen. In anderen Fällen muss jedoch der Zitratzyklus hauptsächlich zur Membransynthese durch die Produktion bestimmter Vorstufen von Phospholipiden genutzt werden, die ATP-Produktion übernimmt dann zum Großteil die Glykolyse (Jha et al., 2015, O'Neill et al., 2016, Tannahill et al., 2013).

Ein weiterer Umstand, welcher die Wichtung der ATP-Quellen der Zelle entscheidend mitbeeinflussen kann, ist die Verfügbarkeit der hierfür benötigten Substrate in der Mikroumgebung, zum Beispiel wie sie bei kleinen, umschriebenen, lokalen Entzündungsprozessen zu finden ist (Straub et al., 2010). Hier kann die extrazelluläre Matrix mittels Proteolyse oder Lipolyse abgebaut und die Produkte jeweils in den Zitratzyklus oder die Glykolyse eingeführt werden (Straub et al., 2010). Darüber hinaus sind Immunzellen wie Monozyten in der Lage, in der Abwesenheit von Sauerstoff ihren Energiebedarf trotz Ausfall der OXPHOS kompensatorisch über eine Erhöhung der glykolytischen Aktivität zu erhalten (Marsin et al., 2002).

Einige Moleküle des Zitratzyklus wie z.B auch Zitrat selber erfüllen sowohl die Funktionen von biosynthetischen Substraten als auch indirekter Energieträger im Rahmen anaplerotischer oder cataplerotischer Reaktionen (Owen et al., 2002). Glutamin gehört für Leukozyten zu den wichtigsten Quellen anaplerotischer Reaktionen (Arts et al., 2016). Es liefert in der menschlichen Niere und Leber die Vorstufe zur Gluconeogenese. Alle übrigen Zellen des Körpers verfügen lediglich über Deaminasen, die sie dazu befähigen, aus Glutamin über Glutamat den Citratzyklus mit  $\alpha$ -Ketoglutarat aufzufüllen, nicht aber die Glukose neu zu bilden. Für myeloische Zellen also eine wichtige alternative Energiequelle zur Glukose, um die Aktivität der OXPHOS aufrechtzuerhalten (Arts et al., 2016).

### **1.3. Stoffwechsel von menschlichen Monozyten**

#### **1.3.1. Aktivierung**

Der Stoffwechsel aktivierter Monozyten muss größeren Anforderungen gerecht werden, nicht zuletzt in Form einer gesteigerten Synthese des Energieträgers ATP (Straub et al., 2010). Diese wird durch das Vorhandensein von Sauerstoff und Glukose in der Mikroumgebung und darauffolgende Metabolisierung durch die Glykolyse und

die OXPHOS gewährleistet (Buttgereit et al., 2000, Krauss et al., 2001). Unter aeroben Ruhebedingungen weisen sie eine hohe glykolytische Aktivität auf, mehr als die Hälfte ihres ATPs wird über diesen Weg bereitgestellt (Kramer et al., 2014, Chacko et al., 2013). Die Mitochondrien tragen ebenso zur Energiegewinnung bei, ohne jedoch die OXPHOS in ihrer Kapazität vollständig auszulasten. Sie weisen eine hohe Reservekapazität auf, in anderen Worten: die Zelle kann den Sauerstoffumsatz über die Atmungskette steigern, um ihren Energiebedarf zu decken (Kramer et al., 2014, Chacko et al., 2013). Infolge einer Stimulation mit Toll-like-Rezeptor (TLR) Liganden werden je nach Rezeptorart und Ligand verschiedene metabolische Programme induziert (Lachmandas et al., 2016). Nach der Gabe von LPS nimmt die ATP-Produktion zu, der Glukoseverbrauch steigt trotz ausreichender Sauerstoffversorgung in der Umgebung drastisch an (Peter et al., 2015). Dieser Effekt wurde ursprünglich von Otto Warburg in Tumorzellen entdeckt und wird noch heute nach ihm benannt. (Warburg, 1925, Warburg et al., 1926). Umgekehrt zum Warburg Effekt kommt es im Falle einer Hemmung der Glykolyse zu einem Anstieg des Sauerstoffverbrauchs (Peter et al., 2015). Monozyten sind insgesamt in der Lage, ihren Energiebedarf unter Glukosefreien Bedingungen durch die Oxidation von gespeicherten Fettsäuren zu decken, ohne an Funktionalität zu verlieren (Raulien et al., 2017).

### **1.3.2. Aktivierung unter metabolischer Belastung**

Im Rahmen bestimmter Erkrankungen müssen sich Monozyten zusätzlich herausfordernden metabolischen Umständen stellen. Beispielsweise finden sich im Synovium entzündeter Gelenke von Patienten mit einer rheumatoiden Arthritis vermehrt fehlerhaft angelegte Blutgefäße. Diese sind strukturinstabil und weisen keinen Perizytenmantel auf, welcher auf regelhaft angelegten Blutgefäßen zu erwarten wäre. Sie versorgen das Synovium nur unzureichend mit Sauerstoff. Zudem reichern sich viele Immunzellen im entzündeten Gelenk an (Kennedy et al., 2010, Fearon et al., 2019). Daher ist dieses Milieu durch eine pathologische Hypoxie gekennzeichnet, die bereits in den 1970er Jahren in der Gelenkflüssigkeit von Patienten gemessen wurde (Falchuk et al., 1970, Lund-Olesen, 1970), und die mit einer konsekutiv erhöhten Expression der Hypoxie-induzierbaren-Faktoren (HIF) einhergeht (Hua and Dias, 2016). Sie stellt vermutlich einen Proliferationsreiz für fehlerhafte Gefäße dar, welche sich nach einer Therapie mit anti-TNF- $\alpha$ -Antikörpern selektiv zurückbilden

(Izquierdo et al., 2009, Kennedy et al., 2010). Als Ausdruck der Entzündungs- bzw. Glykolyseaktivität im Gelenk von Patienten mit RA finden sich erniedrigte Glukosekonzentrationen sowie erhöhte Laktatspiegel in der Synovialflüssigkeit (Yang et al., 2015). Zusammenfassend herrschen im chronisch entzündeten Gelenk bei Patienten mit RA hinsichtlich der Substratversorgung keine optimalen Bedingungen zur Produktion von ATP. Unter diesen ungünstigen bioenergetischen Bedingungen unterhalten unter anderem Monozyten trotzdem das Voranschreiten der RA-Pathogenese, indem sie u.a. das proinflammatorische Zytokin TNF- $\alpha$  produzieren, autoreaktive T-Zellen aktivieren (Belge et al., 2002, Yoon et al., 2014) und zu Makrophagen oder Osteoklasten differenzieren (Udalova et al., 2016, Komano et al., 2006).

Die Mikroumgebung solider Tumore liefert ein ähnliches Milieu. Aufgrund der zellulären Heterogenität, der inhomogenen Durchblutung sowie des fehlregulierten Stoffwechsels des malignen Gewebes, müssen Monozyten auch hier mit ungünstigen metabolischen Bedingungen umgehen (Lau and Heiden, 2020, Xiao et al., 2019). Vordergründig werden Glukose und Glutamin von Tumor- und Stromazellen verstoffwechselt, so herrscht neben der lokalen Hypoxie auch ein Mangel an diesen Substraten. Es häufen sich Laktat und andere Abbauprodukte an und der UmgebungspH sinkt (Warburg, 1925, Lau and Heiden, 2020). Maligne Zellen sind im Gegensatz zu den restlichen Zellen der Tumorumgebung in der Lage, das Laktat über einen umgekehrten Warburg-Effekt erneut in ihren Zitratzyklus zur Energieproduktion zu verwerten (Pavlides et al., 2009).

Die bioenergetischen Gegebenheiten, wie sie im Tumorgewebe oder im arthritischen Gelenk vorliegen, setzen bei erhaltener Funktionalität eine hervorragende Anpassungsfähigkeit der Monozyten voraus.

#### **1.4. Herleitung der Frage- und Aufgabenstellung**

Aus früheren Untersuchungen zu den Auswirkungen eingeschränkter ATP-Produktion in Rattenthymozyten ist eine Hierarchie der allgemein überlebensnotwendigen, ATP-verbrauchenden Prozesse bekannt (Buttgereit and Brand, 1995). In anderen Worten: Verfügt eine Zelle über weniger Energie, als sie zur Ausführung ihrer Funktionen tatsächlich benötigt, so wird die Ausführung bestimmter,

energieabhängiger Funktion zulasten hierarchisch „nachrangiger“ Funktionen bevorzugt (Buttgereit and Brand, 1995).

Vor diesem Hintergrund stellte sich die Frage, ob sich eine solche Hierarchie ebenfalls für die spezifischen Funktionen menschlicher Immunzellen ableiten lässt. Das Ziel dieser Arbeit war es daher, ein *in vitro* Modell mit einer graduell zunehmenden Einschränkung des Energie- und Biosynthesestoffwechsels zu entwickeln. Dieses Modell sollte dazu dienen, bioenergetisch ungünstige Bedingungen nachzustellen, wie sie im entzündeten Gelenk, in einem Tumor oder einem Infektionsherd vorkommen können.

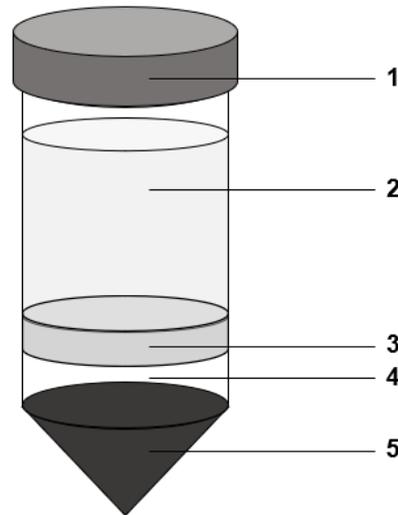
## **2. Material & Methoden**

### **2.1. Präparation von Monozyten**

Die Monozyten wurden aus dem peripheren Blut gesunder Mitarbeiter des Labors isoliert. Dies erfolgte nach entsprechender Information und schriftlicher Zustimmung auf Grundlage der Genehmigung des Forschungsvorhabens durch die Ethikkommission der Charité-Universitätsmedizin Berlin mit dem Votum EA1/207/17. Hierbei wurde darauf geachtet, dass die Spender keine Autoimmunpathologie in ihrer Vorgeschichte und keine Infektionssymptome aufwiesen. Ebenso waren die Einnahme immunsupprimierender Medikamente wie z.B. Glukokortikoide ein weiteres Ausschlusskriterium. Soweit möglich wurde auf eine gleichgeschlechtliche Verteilung der Spender innerhalb der Experimentenreihen geachtet. Das Alter der Spender und das Rauchverhalten wurden nicht berücksichtigt. Die Spender wurden gebeten, soweit möglich am Tag der Blutentnahme nüchtern zu erscheinen. Dies gewährleistete optimale optische Bedingungen bei der nachfolgenden Dichtegradientenzentrifugation.

Es wurden bei jedem der Spender 10 heparinisierte Blutröhrchen (Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland) à 10 ml mit Butterfly Sicherheitskanülen (Becton Dickinson) entnommen. Die 100 ml heparinisiertes Vollblut wurden in 5x50ml Schraubröhren (Sarstedt, Sarstedt, Deutschland) mit Spitzboden aus Polypropylen verteilt. Die geleerten Blutröhrchen wurden mit autoMACS<sup>®</sup> Running Buffer (RB) bei Raumtemperatur in den Schraubröhren ausgespült, um schließlich ein Gesamtvolumen von 37,5 ml Vollblut-Puffer-Gemisch zu erzeugen. Die Schraubröhren wurden vorsichtig mehrmalig geschwenkt, um das Gemisch zu homogenisieren. In Fünf weiteren Schraubröhren wurden 12,5 ml von Ficoll Paque Plus<sup>®</sup> (GE-Healthcare, Berlin, Deutschland) hinzugefügt. Anschließend wurde das Vollblut- Puffergemisch sorgfältig mit einer 25 ml serologischen Pipette (Corning, Corning, USA) und einer elektronischen Pipettierhilfe (Integra, Biebertal, Deutschland) auf dem Ficoll geschichtet. Die Schraubröhren wurden anschließend 35 min bei 400g, Raumtemperatur ohne Bremse zentrifugiert. Das Ficoll diente der Trennung der mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMC) von den anderen Blutbestandteilen: Das Prinzip basiert auf der unterschiedlichen Dichte der Zellpopulationen, wobei bei einer Zentrifugation die Dichte der PBMC nicht ausreicht,

um sich mit der Ficoll-enthaltenden Phase zu vermischen (Grievink et al., 2016). Sie bleiben nach der Zentrifugation an der Ficoll Grenze als Interphase übrig. Nach der Zentrifugation wurden jeweils 2,5 Interphasen (**Abbildung 1**) vorsichtig mit einer 10 ml Pipette (Corning) und einer Pipettierhilfe in einer neuen 50 ml Schraubröhre gegeben.

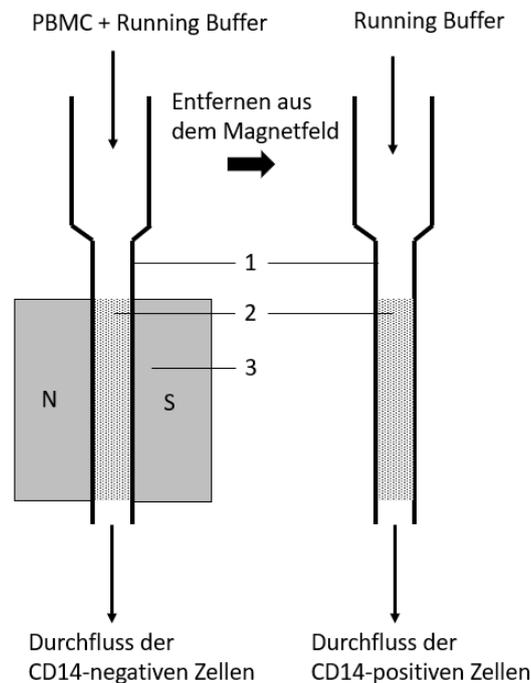


**Abbildung 1: Schematische Darstellung des Ergebnisses der Ficoll Paque Plus® Technik mit menschlichem Vollblut nach Zentrifugation.**

1: PP 50 ml Schraubröhre, 2: Running Buffer + Plasma Gemisch, 3: Interphase mit PBMC, 4: Ficoll Paque Plus®, 5: Erythrozyten, Granulozyten und Zelldebris

Mit eiskaltem RB wurde der Inhalt der insgesamt 2 Schraubröhren jeweils auf 50ml aufgefüllt. Diese wurden 10 min bei 300 x g und 4 °C zentrifugiert, der Überstand wurde verworfen und die Zellpellets jeweils in 1ml eiskaltem RB resuspendiert. Alle Zellen wurden in eine Schraubröhre gegeben und erneut auf 50 ml mit eiskaltem RB aufgefüllt sowie 10 min, 300 x g und 4 °C zentrifugiert. Die PBMC wurden anschließend gezählt und für 15 min auf Eis in 70 µl eiskaltem RB+ 10 µl Flebogamma (Grifols, Frankfurt, Deutschland) pro 10<sup>7</sup> Zellen inkubiert. Flebogamma besteht aus unbehandeltem, humanem Gamma-Immunglobulin (IgG): IgG1 66.6%, IgG2 28.5%, IgG3 2.7%, IgG4 2.2%. Dies diente dazu, unspezifische Antikörperbindungen durch die MicroBeads™ (Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland) zu verhindern. Microbeads™ waren in diesem Fall Antikörper gegen das Antigen Cluster of Differentiation 14 (CD14) der Monozyten (Ziegler-Heitbrock et al., 2010), gekoppelt mit 100 nm großen magnetischen Partikeln (Miltenyi et al., 1990). Zu 80 µl Zellgemisch wurden jeweils 20 µl MicroBeads™ gegeben und 15 min bei 4 °C im Dunkeln inkubiert.

Nach der Inkubation wurde das Zellgemisch 10 min bei 300 x g und 4 °C gewaschen und in 1 ml eiskaltem RB resuspendiert. Somit konnten die Monozyten in einer LS-Säule (Miltenyi Biotec GmbH) mit einer Stahlmatrix gegeben werden, um die ein Magnetfeld mit einem MidiMACS (Miltenyi Biotec GmbH) angelegt war (**Abbildung 2**).



**Abbildung 2: Schematische Darstellung der magnetisch aktivierten Zellsortierung.**

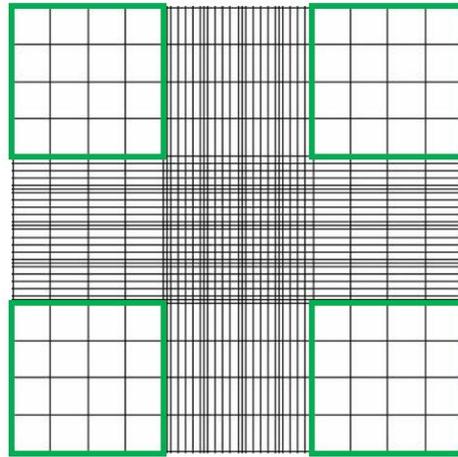
1: MACS™ LS-Säule, 2: Stahlmatrix, 3: MidiMACS™ Magnet mit Nord- (=N) und Südpol (=S).

Nach mehrmaligem Spülen der Säule mit eiskaltem RB konnten somit nach Entfernung des Magnetfeldes die aufgereinigten Monozyten in 4 ml eiskaltem RB in einem Rundboden-Polypropylenröhrchen (Sarstedt) eluiert werden. Die Monozyten wurden bis zur weiteren Verarbeitung auf Eis in RB gelagert.

## 2.2. Zellzählung

Die Zellzählung der Monozyten erfolgte mithilfe der Neubauer-Zählkammer (Brand, Berlin, Deutschland). Hierbei wurden 10 µl der Zelllösung in die Zählkammer gegeben und anschließend wurden alle Zellen gezählt, die sich in den Großquadranten der Kammer (**Abbildung 3**) befanden. Aus dieser Gesamtzahl wurde wiederum ein

Durchschnittswert für einen Großquadrant gebildet, der mit dem Verdünnungs- und Kammerfaktor korrigiert wurde, sodass sich eine Zellkonzentration für die Ursprungslösung ergab. Der Kammerfaktor betrug hier stets 10.000.



**Abbildung 3: Zählfelder der Neubauer Zählkammer**

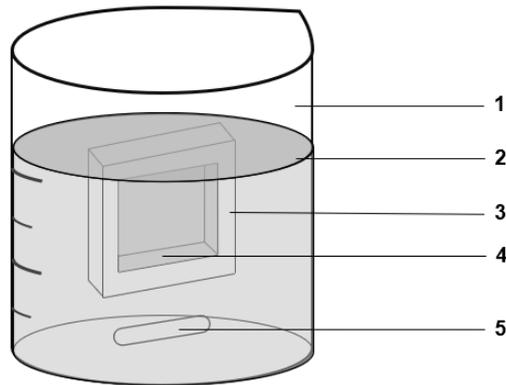
Die Felder, die zur Zellzählung der Monozyten verwendet wurden, sind grün umrandet.

### 2.3. Zellkultur

Alle Präparationsarbeiten und Zellkulturarbeiten wurden an einer Sterilwerkbank Herasafe™ (Thermofisher, Waltham, USA) durchgeführt. Zur Inkubation bei 37 °C in einer 5 % (v/v) CO<sub>2</sub>/Luft-Atmosphäre wurde ein Brutschrank (Binder, Tuttlingen, Deutschland) benutzt.

Die Monozyten wurden stets in glukosefreiem RPMI 1640 (Thermofisher) + 10 % (v/v) humanem AB Serum (Sigma-Aldrich, Hamburg, Deutschland) kultiviert.

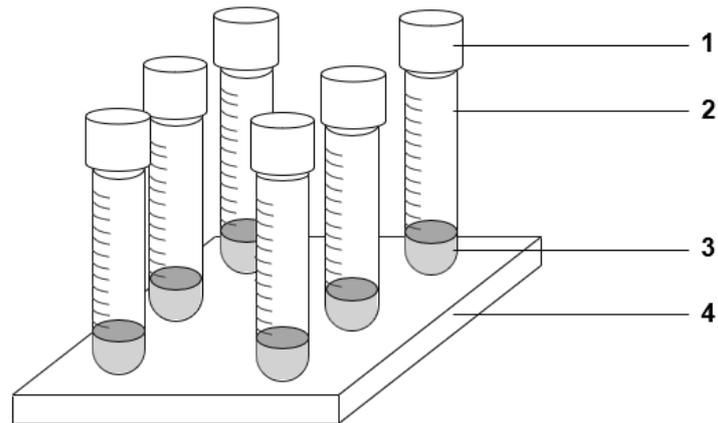
Um eine Störung der Experimente durch die eventuell vorhandene Restglukose im Humanserum zu vermeiden, wurde das Serum gegen insgesamt 3000 ml glukosefreies RPMI (cc-pro, Oberdorla, Deutschland) in einer 70 ml Kassette mit einem Molekulargewicht-Trennwert von 2,0 kDa dialysiert. Die Dialyse wurde in zwei Zyklen von 24 h bei 4 °C durchgeführt, dabei wurde eine Kassette in jeweils 1500 ml Dialysemedium in einem autoklavierten 2 L Becherglas (Thermofisher) inkubiert und das Dialysat nach 24 h durch 1500 ml frisches Medium ersetzt. Das Dialysemedium wurde konstant bei 200 rpm durchmischt (MR 3000, Heidolph Instruments, Schwabach, Deutschland) (**Abbildung 4**).



**Abbildung 4: Schematische Darstellung der Serumdialyse gegen RPMI 1640 ohne Glukose.**

Das Becherglas wurde zusammen mit dem magnetischen Rührfisch autoklaviert. Während der Inkubation im Kühlschrank wurde die Öffnung des Becherglases luftdicht und steril mit Aluminiumfolie verschlossen. 1: Becherglas, 2: Dialysat, 3: Dialysekassette, 4: Kassettenmembran mit Sicht auf Humanserum, 5: Magnetischer Rührfisch

Nach Isolation wurden die Monozyten 10 min mit glukosefreiem RPMI ohne Serum bei 300 x g, 4 °C gewaschen und anschließend in RPMI + 10% (v/v) dialysiertem humanes AB Serum resuspendiert. Nach der experimentellen Etablierungsphase wurden für die Inkubation bei 37 °C und 5 % (v/v) CO<sub>2</sub>/Luft folgende Zellkulturbedingungen festgelegt: Die Monozyten wurden jeweils in Aliquots von 300 µl bei einer Zelldichte von 10<sup>7</sup> Zellen/ml in 13 ml Rundboden Polypropylene Röhrchen (Sartstedt) unter konstantem Orbitalschütteln bei 120 rpm (KS250basic, IKA-Labortechnik, Staufen, Deutschland) inkubiert. Um trotz Sterilität einen ausreichenden Gasaustausch zu ermöglichen, wurden die Kappen lose auf die Röhrchen-Öffnung gesetzt. Diese Zellkultivierung ermöglichte eine konstante Homogenisierung des Zellgemisches bei gleichzeitiger Verhinderung einer vorzeitigen Adhäsion der Monozyten an der Röhrchen-Oberfläche. Hierdurch entfielen die Notwendigkeit einer manuellen Homogenisierung der Zelllösung mit der Pipette und das Einbringen von Luftblasen, welche die Messwerte bei der Sauerstoffverbrauchsmessung hätten verfälschen können. (**Abbildung 5**)



**Abbildung 5: Schematische Darstellung der Schüttelkultur für Humane Monozyten.**

Die Rundbodenröhrchen befanden sich auf dem Schüttler in vertikaler Position. Ein Röhrchen-Halter ist nicht mit abgebildet. 1: Lose Kappe, 2: 13 ml Rundboden PP Röhrchen, 3: 300 µl Zellgemisch, 4: Schüttlerplatte

#### **2.4. Reagenzien in der Zellkultur und Sauerstoffverbrauchsmessung**

Lipopolysaccharid (LPS) von *Escherichia Coli* O127:B8 (Sigma-Aldrich) wurde in einer Konzentration von 1 mg/ml in PBS (phosphate buffered saline: A. dest. + 0,15 M NaCl + 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 7,4, Deutsches Rheumaforschungszentrum Berlin) gelöst und bei -20°C aufbewahrt. Aus dieser Stocklösung wurden mit PBS Arbeitslösungen mit einer Konzentration von 10 µg/ml hergestellt. In den Experimenten betrug die LPS Konzentration stets 100 ng/ml. LPS bindet an CD14 auf der Oberfläche von Monozyten und löst im Rahmen einer Sepsis eine massenhafte Produktion proinflammatorischer Zytokine – den sogenannten Zytokinsturm – aus. LPS ist ein weit verbreitetes Stimulans, um die entzündlichen Funktionen menschlicher Monozyten im Rahmen der Sepsis zu untersuchen (Cavaillon, 2018).

Myxothiazol ist ein Antibiotikum und wird aus dem Bakterium *Myxococcus fulvus* gewonnen. Es hemmt irreversibel den Komplex III der mitochondrialen Atmungskette und eignet sich deswegen gut für eine zeitstabile Senkung der mitochondrialen ATP-Produktion (Thierbach and Reichenbach, 1981, Buttgerit and Brand, 1995). Myxothiazol wurde in Dimethylsulfoxid (DMSO) (beide von Sigma-Aldrich) bei einer

Konzentration von 1 mM gelöst und bei -20 °C aufbewahrt. Aliquots mit Konzentrationen von 1, 2, 3, 4, 5 µM dienten als Arbeitslösungen.

Phorbol 12-myristate 13-acetat (PMA) ist ein  $\text{Ca}^{2+}$  Ionophor und aktiviert Lymphozyten und Monozyten unspezifisch über die Proteinkinase C. Es führt bei Monozyten u.a. zur Produktion intrazellulärer Sauerstoffradikale (French et al., 1990). PMA (Sigma-Aldrich) wurde in 70 % (v/v) Ethanol/ $\text{H}_2\text{O}$  (Deutsches Rheumaforschungszentrum) in einer Konzentration von 1 mg/ml gelöst. Aus dieser Stocklösung wurden mit PBS Arbeitslösungen in einer Konzentration von 10 µg/ml hergestellt.

Brefeldin A (BFA) ist ein Antibiotikum und wird bei Monozyten zur Blockierung der Proteinsekretion eingesetzt. BFA wirkt durch Störung der Funktion der Translokation von Proteinen zum Golgi-Apparat (Schuerwegh et al., 2001, Paek, 2018). BFA wurde in 70% (v/v) Ethanol/ $\text{H}_2\text{O}$  (Deutsches Rheumaforschungszentrum) in einer Konzentration von 1 mg/ml gelöst, aliquotiert und bis zur Verwendung bei -20 °C gelagert.

Carbonylcyanid-p-trifluoromethoxyphenylhydrazon (FCCP) ist ein  $\text{H}^+$  Ionophor, welches die mitochondriale Atmungskette entkoppelt und den Sauerstoffbedarf der Mitochondrien erhöht (Wolf et al., 2019). FCCP wurde in DMSO in einer Konzentration von 40 mM gelöst und bis zur Verwendung bei -20 °C aufbewahrt. Aliquots mit einer Konzentration von 10 mM dienten als Arbeitslösung.

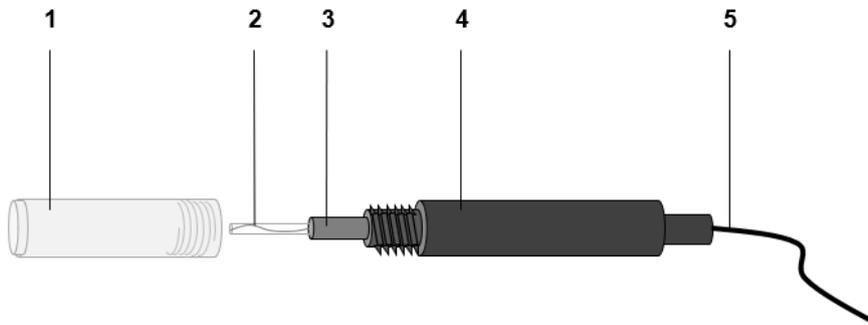
VAS2870 inhibiert die NADPH Oxidase (NOX) durch Alkylierung von Cystein-Resten in der Dehydrogenase-Domäne des Enzyms (Reis et al., 2020). VAS2870 (Sigma-Aldrich) wurde in DMSO in einer Konzentration von 50 mM gelöst und aliquotiert. Die Aliquots wurden bis zum Verbrauch bei -20 °C aufbewahrt.

Oligomycin A blockiert die mitochondriale ATP Produktion an der ATPase (Knowles and Kaplan, 1980). Oligomycin A (Sigma-Aldrich) wurde in DMSO in einer Konzentration von 5 mM gelöst und in einer Konzentration von 1 mM aliquotiert. Die Aliquots dienten als Arbeitslösung und wurden bis zum Verbrauch bei -20 °C aufbewahrt.

## **2.5. Messung des Sauerstoffverbrauches mit der Clark Elektrode**

Die Messung des Sauerstoffverbrauches der Monozyten erfolgte amperometrisch mithilfe einer Clark Elektrode. Die Clark-Elektrode besteht aus einer

Platin-Kathode und Silberchlorid-Anode, verbunden durch eine Kaliumchlorid Elektrolytlösung (**Abbildung 6**).

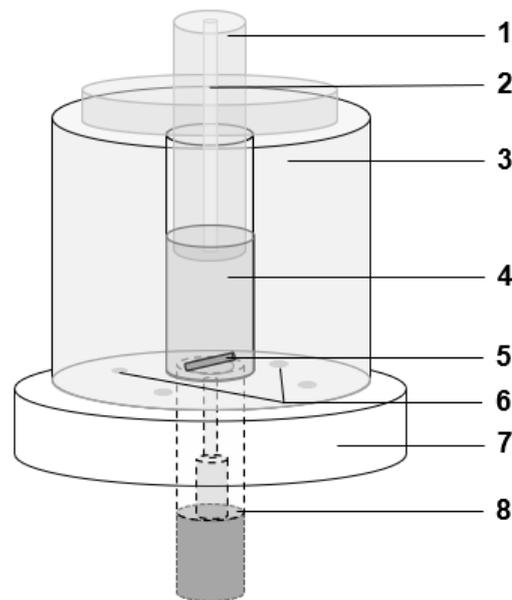


**Abbildung 6: Schematische Darstellung der Clark-Elektrode.**

1: Membranhalter mit Polypropylenmembran, hier wird die Elektrolytlösung hineingegeben. 2: Glasspitze mit Platinkathode, 3: Anode mit Silberchlorid-Beschichtung, 4: Elektrodenkörper, 5: Elektrodenkabel.

Die Spannung an der Kathode wird bei ca.  $-0,8$  mV gehalten, sodass Silber zu Silberionen reduziert wird und darauffolgend Silberchlorid mit den Chloridionen bildet. Gleichzeitig diffundiert Sauerstoff durch die Polypropylen Elektrodenmembran aus der getesteten Lösung in die Elektrolytlösung nach und wird an der Kathode reduziert, wobei Hydroxydionen entstehen. Hierbei entsteht Strom, proportional zum Sauerstoffgehalt der getesteten Lösung (Clark et al., 1953).

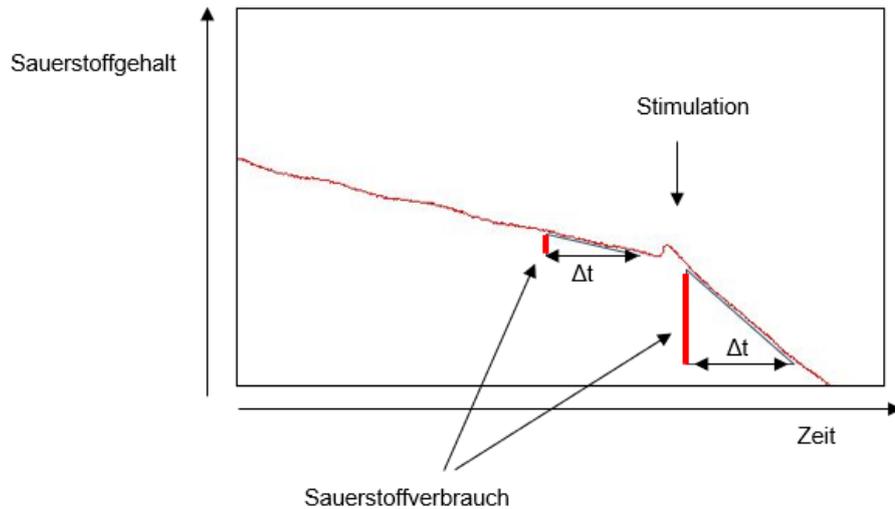
Die Clark Elektrode (SI130 Microcathode electrode, Strathkelvin, Schottland, Großbritannien) war an einem Messsystem (SI782 Meter, Strathkelvin) angeschlossen und in einer Messkammer (MT200, Strathkelvin) eingebaut. Eine Warmwasserquelle Pilot-One™, (Huber, Berching, Deutschland) war an der Messkammer mit zwei PVC-Schläuchen (Raufilam®, Rehau, Rehau, Deutschland) verbunden. Um die Temperatur der Messkammer auf  $37,0$  °C zu halten, wurde die Warmwasserpumpe auf 1500 rpm und  $37,4$  °C eingestellt. Inhibitoren wurden mithilfe einer  $1$  µl Glaspipette (Hamilton, Reno, USA) durch den Polykarbonatstöpsel in die Messkammer gegeben. (**Abbildung 7**) Insgesamt wurde in keiner Messung mehr als  $1$  µl zusätzliche Flüssigkeit in die Kammer gegeben, alle Flüssigkeiten wurden auf  $37,0$  °C in einem Wasserbad (GFL, Burgwedel, Deutschland) vorgewärmt.



**Abbildung 7: Aufbau Clark-Elektrode, Messkammer (ohne Magnetrührstation).**

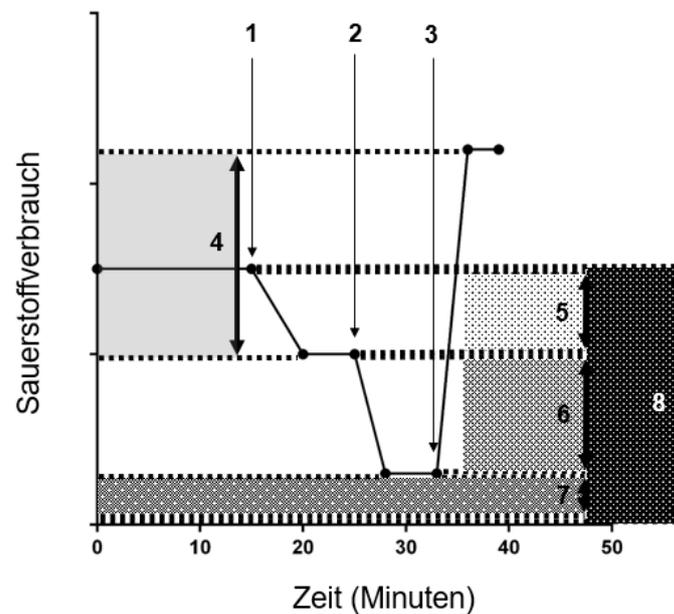
Die Elektrodenmembran bildete die Unterseite der Messkammer. 1: Polykarbonatstößel, 2: Stößelkanal zur Gabe von Flüssigkeiten in die Messkammer, 3: Glaskammer mit 37,0 °C Wasser, 4: 100 µl Zellgemisch, 5: Magnetischer Rührfisch, 6: Warmwasser Ein- und Ausfuhr, 7: Versiegelung Warmwasserkammer, 8: Clarkelektrode

Das Kalibrieren der Clark Elektrode erfolgte täglich vor dem Anfang der Experimente. Zur Festlegung des Sauerstoff Nullniveaus wurde eine 2% (w/v) Natriumsulfit (Sigma-Aldrich) Lösung in die Kammer gegeben. Zur Kalibrierung des Sauerstoff Höchstniveaus wurden 25 µl *Aqua destillata* (*A. dest.*) in die Kammer pipettiert und der magnetische Rührer auf 200 rpm eingestellt, um das *A. dest.* mit Luft zu sättigen. Ein Barometer (Fischer, Drebach, Deutschland) diente zur täglichen Messung des Luftdruckes, dieser wurde in der Software des Herstellers eingegeben (Strathkelvin) und diente zur Festlegung der höchstmöglichen Konzentration an gelöstem Sauerstoff im *A. dest.*. Während der gesamten Zeit der Kalibrierung wurde darauf geachtet, luftstromerzeugende Geräte wie z.B. sterile Werkbänke oder Zentrifugen auszuschalten. Der Luftdruck und die Sauerstoffkonzentration bei Luftsättigung wurden dokumentiert. Zur Messung wurden 120 µl der Zellsuspension mit  $3 - 9,0 \cdot 10^6$  Zellen/ml in die Kammer gegeben.



**Abbildung 8: Exemplarische Darstellung der Bestimmung des Sauerstoffverbrauches mithilfe der Clark-Elektrode.**

Die Abnahme der Sauerstoffkonzentration über den Zeitraum  $\Delta t$  ergibt den Sauerstoffverbrauch (hellrot dargestellt).



**Abbildung 9: Zeitprotokoll der Sauerstoffverbrauchsmessungen humaner Monozyten nach jeweils 2 und 6 Stunden Inkubation.**

1: nach 15 min Gabe von 50  $\mu\text{M}$  VAS2870, 2: nach 25 min Gabe von 1  $\mu\text{M}$  Oligomycin A, 3: Nach 33 min Gabe von 20  $\mu\text{M}$  FCCP, 4: Reservekapazität, 5: NAS, 6: MAS, 7: VAS2870 und Oligomycin A insensitiver Sauerstoffverbrauch, 8: Basalatmung.

Dabei wurden die Zellen aus dem Röhrchen durch umgekehrtes Pipettieren entnommen, sowohl im Röhrchen als auch in der Kammer vorsichtig homogenisiert. Vor der Messung wurden 10 µl zur Zellzählung entnommen und der Sauerstoffverbrauch auf die Anzahl der Zellen normalisiert. Nach der Zellzählung wurde der Magnetrührer aktiviert und die Kammer mit dem Polykarbonatstöpsel verschlossen. Nach einer 10-minütigen Gewöhnungsphase konnte die Basalatmung der Zellen gemessen werden. Der Sauerstoffverbrauch wurde in der Software über einen Zeitraum von 5 min gemessen (**Abbildung 8**).

Die Bestimmung des NOX-Assoziierten Sauerstoffverbrauches (NAS), der Basalatmung und des Sauerstoffverbrauches assoziiert mit der mitochondrialen ATP-Produktion (MAS) erfolgte nach 2 und 6 Stunden Inkubation. Nach der Gabe von VAS2870, Oligomycin A und wurde eine Gewöhnungsphase von 5 min, nach der Gabe von FCCP von 3 min angewandt, um die Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu gewährleisten (**Abbildung 9**). Alle Messungen wurden mithilfe der mitgelieferten Software ausgewertet.

## **2.6. Durchflusszytometrie**

### **2.6.1. Allgemeines**

In der Durchflusszytometrie werden Zellen mithilfe eines Laserstrahls charakterisiert. Die Zellen fließen in Laminarströmung an einer oder mehreren Laserquellen vorbei und zerstreuen das Licht aufgrund ihrer Größe (Vorwärtsstreulicht bzw. Forward Scatter, FSC) sowie ihrer Granularität und Membranfaltung (Seitwärtsstreulicht bzw. Side Scatter, SSC). Außerdem entsteht an den Zellen nach dem Kontakt mit dem Laserstrahl ein messbares Fluoreszenzsignal. Zusätzlich können Fluorochrom-markierte Antikörper unterschiedlicher Emissionsspektren dazu dienen, in derselben Probe unterschiedliche Antigene der Zellen zu markieren. Die Intensität des Fluoreszenzsignals gibt Auskunft über die Menge an gebundenen Antikörpern und somit über die Menge an Antigen der Zelle. Weiterhin können auch Stoffe verwendet werden, welche nicht an Antikörper konjugiert sind (Radcliff and Jaroszeski, 1998). Die verwendeten Farbstoffe und Antikörper sind in **Tabelle 1** zusammengefasst. Als Kontrollen wurden im Rahmen der durchflusszytometrischen Experimente stets ungefärbte Zellen als

Negativkontrollen sowie Einzelfärbungen als Kompensationskontrollen mitgeführt. Isotypen-Kontrollen wurden lediglich bei der Etablierung der Färbeprotokolle mitgeführt, um die effektive Blockade von unspezifischen, Fc-Rezeptor-vermittelten Färbungen mittels humanem IgG (siehe z.B. **2.6.2.**) zu überprüfen. Isotypen-Kontrollen (**Tabelle 1**) wurden gemäß der europäischen Leitlinie für Durchflusszytometrie nach der Etablierungsphase nicht mehr im Rahmen der Experimente mitgeführt, da sie – ausgenommen der im Rahmen der Etablierung untersuchten, Fc-Rezeptor vermittelten unspezifischen Färbung – keine verlässliche Aussage über unspezifische Färbungen liefern (Cossarizza et al., 2017).

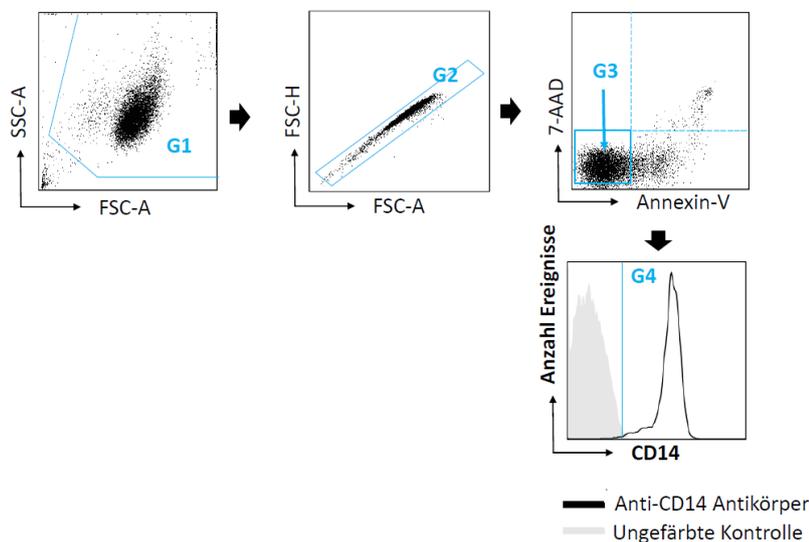
**Tabelle 1: Liste der Antikörper und Farbstoffe, welche in der Durchflusszytometrie verwendet wurden.**

n/a = nicht anwendbar.

Antikörper/ Farbstoffe	Konjugiertes Fluorochrom (Abkürzung)	Exzitation/ Fluoreszenz (nm)	Hersteller	Herkunftspezies und Isotypenkontrolle	Verdünnung
anti-CD14	Allophycocyanin- Cy7 (APC-Cy7)	650/767	Biologend	Maus IgG2a, κ	1:25
anti-CD14	Phycoerythrin- Vio770 (PE-Vio770)	565/619	Miltenyi	REA599, rekombinant	1:50
anti-CD16	PE-Vio770	565/619	Miltenyi	REA423, rekombinant	1:50
anti-CD16	VioBlue	400/452	Miltenyi	Maus IgMκ	1:11
anti-CD80	Allophycocyanin (APC)	652/660	Miltenyi	Maus IgG1κ	1:11
anti-CD11b	Phycoerythrin (PE)	565/619	Deutsches Rheumaforschungs- zentrum (DRFZ)	Maus IgG2b	1:100
anti-HLA- DR	VioBlue	400/452	Miltenyi	Maus IgG2aκ	1:11
anti-hTNF- α	Allophycocyanin- Vio770 (APC-Vio770)	656/775	Miltenyi	Mensch IgG1	1:50
anti-hIL-1β	PE	565/619	Thermofisher	Maus IgG1	1:10
anti-hIL-6	APC	652/660	Miltenyi	Ratte IgG1κ	1:11
7AAD	n/a	488/647	BD Pharmingen	n/a	1:20
Annexin-V	PE	565/619	Biologend	n/a	1:200
Annexin-V	Fluorescein Isothiocyanat (FITC)	495/520	Biologend	n/a	1:400
Zombie Green	n/a	488/515	Biologend	n/a	1:400
CM- H <sub>2</sub> DCFDA	n/a	492– 495/517– 527	Thermofisher	n/a	5 μM

## 2.6.2. Präparation der Monozyten

Nach der Präparation der Monozyten wurden jeweils  $10^5$  Monozyten in 1,5 ml Eppendorf-Gefäße (Sarstedt) mit eiskaltem RB gegeben. Sie wurden 8 min bei 300 x g mit 900 µl 4 °C gekühltem PBS (Deutsches Rheumaforschungszentrum Berlin, Deutschland) gewaschen und 10 min auf Eis in 10 µl Flebogamma inkubiert. Daraufhin wurden sie mit eiskaltem RB, mit oder ohne Anti-CD14-APC-Cy7 (Biolegend, San Diego, USA), in insgesamt 100 µl für weitere 15 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden sie 2-mal 8 min bei 300 x g, 4 °C mit PBS gewaschen und in 100 µl Binding Buffer (Biolegend) mit oder ohne 7-aminoactinomycin-D (7-AAD) (Becton Dickinson) oder FITC-Annexin-V (Biolegend) 15min bei Raumtemperatur gefärbt. Annexin-V bindet Kalzium-abhängig Phosphatidylserin-Reste welche im Rahmen der Apoptose vermehrt an der Zelloberfläche zu finden sind (van Engeland et al., 1998). Die Färbung wurde mit 400µl zusätzlichem Binding Buffer gestoppt und die Proben an einem Durchflusszytometer FACS-Canto™ II (Becton Dickinson) gemessen. Als lebend wurden Zellen bezeichnet, wenn sie weder Annexin-V noch 7-AAD positiv waren. Die Gatingstrategie wird in **Abbildung 10** verdeutlicht.



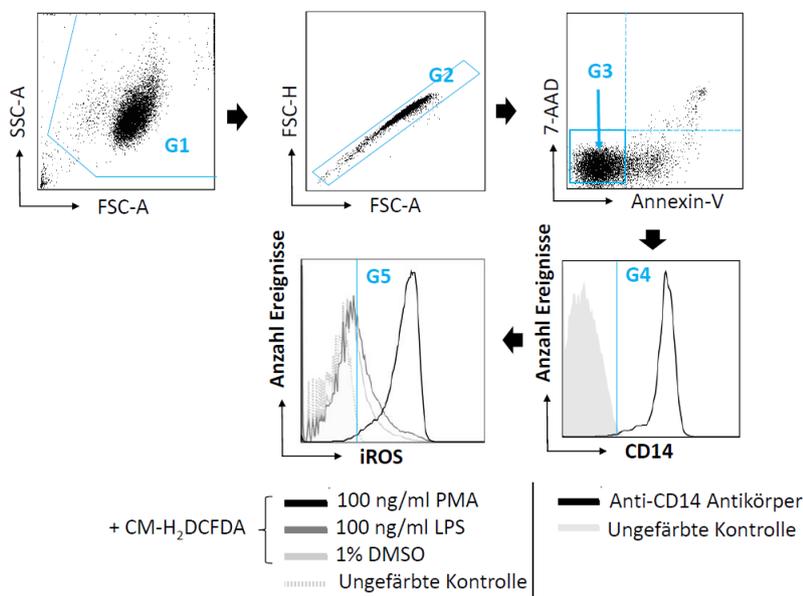
**Abbildung 10: Gating-Strategie bei der durchflusszytometrischen Kontrolle der Monozytenisolation.**

G1: Ausschluss von Zelldebris, G2: Ausschluss von Zelldoubletten, G3: Ausschluss von apoptotischen und toten Zellen. G4: Erfassung der Reinheit nach CD14-Expression.

### 2.6.3. Lagerung der Monozyten bis zur Messung

Nach einer Inkubation in der Schüttelkultur wurden vor jeder Färbung der Monozyten vor der Durchflusszytometrie die Rundbodenröhrchen 5 min auf Eis gelegt. Nach Zugabe von 1 ml eiskaltem RB und weiteren 15 min Inkubation auf Eis sowie vorsichtigem Pipettieren alle 5min wurden die Monozyten in 1,5 ml Eppendorf-Gefäße gegeben. Anschließend wurden sie zweimal 8 min mit PBS bei 300 x g, 4 °C gewaschen. Die Proben wurden nach der Färbung immer auf Eis gelagert und vor Licht geschützt.

### 2.6.4. Messung der intrazellulären reaktiven Sauerstoffspezies



**Abbildung 11: Gating-Strategie bei der durchflusszytometrischen Messung der iROS menschlicher Monozyten.**

G1: Ausschluss von Zelldebris, G2: Ausschluss von Zelldoubletten, G3: Ausschluss von toten und apoptotischen Zellen, G4: Ausschluss von CD14-negativen Zellen, G5: Erfassung der CM-H<sub>2</sub>DCFDA-positiven Zellen.

Zur Messung der intrazellulären Sauerstoffspezies (iROS) wurden die Monozyten nach Isolation 30 min bei 37 °C in PBS mit 5 µM 5-(und-6)-chloromethyl-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (CM-H<sub>2</sub>DCFDA) inkubiert. Anschließend wurden die Zellen 10 min bei Raumtemperatur mit PBS gewaschen und in Medium

mit oder ohne DMSO, LPS und/oder Myxothiazol für weitere 2 Stunden inkubiert. Eine Probe mit PMA diente als Positivkontrolle. Nach der Inkubation wurden die Monozyten 10 min bei Raumtemperatur und 300 x g mit RB gewaschen und entnommen. Sie wurden in 100 µl Binding Buffer mit oder ohne 7-AAD, Annexin-V-PE 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von 400 µl Binding Buffer wurden sie anschließend an einem Durchflusszytometer FACS-Canto™ II (Becton Dickinson) gemessen. Die Gatingstrategie wird in **Abbildung 11** verdeutlicht.

### **2.6.5. Phagozytoseaktivität**

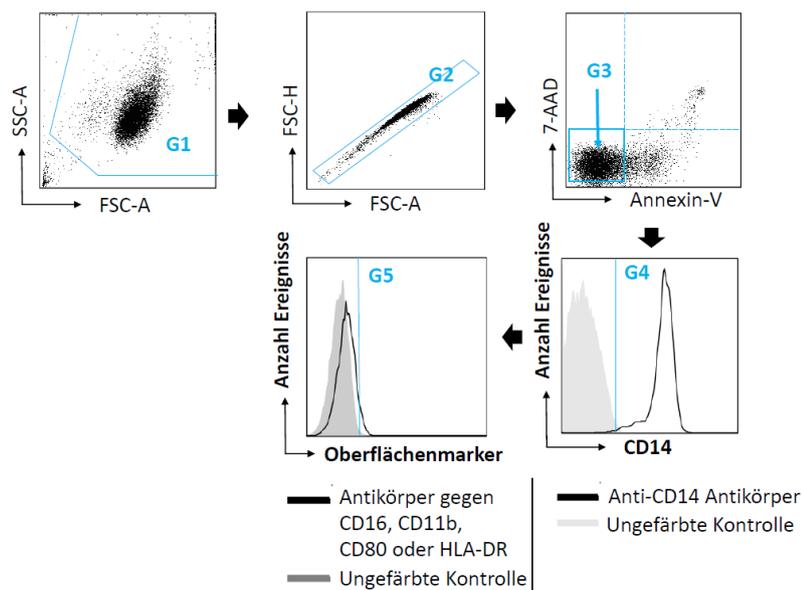
Die Bestimmung der Phagozytoseaktivität der Monozyten erfolgte mithilfe des Phagotest® (GlycoType, Heidelberg, Deutschland) nach Angaben des Herstellers. Der Phagotest® basiert auf die Phagozytose von FITC-markierten *E. coli* durch die Monozyten und die darauffolgende Messung der Fluoreszenz im FITC Kanal am Durchflusszytometer. Nach der Inkubation wurde das Signal nicht phagozytierter Bakterien mithilfe einer Quench™ Lösung für die spätere Messung unterdrückt. Eine Desoxyribonukleinsäure (DNA)-Färbelösung erlaubt außerdem das Unterscheiden der Zellen von den Bakterien, da Zellen nach Färbung ihrer DNA ein intensiveres Fluoreszenzsignal aussenden als Bakterien. Die Inkubationszeit betrug hier eine Stunde in Medium mit oder ohne DMSO, LPS und Myxothiazol. Eine Kontrolle blieb auf Eis stehen. Die Proben wurden an einem Durchflusszytometer FACS-Canto™ II (Becton Dickinson) gemessen.

### **2.6.6. Oberflächenmarker und intrazelluläre Zytokine**

Zur Bestimmung der Oberflächenantigene wurden die Monozyten 4 Stunden in der Schüttelkultur mit oder ohne DMSO, LPS und Myxothiazol inkubiert. Zur Bestimmung der intrazellulären Zytokine wurden die Monozyten 1 h mit oder ohne DMSO, LPS und Myxothiazol, anschließend mit zusätzlich 10 µg/ml BFA für eine oder 3 Stunden inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Monozyten entnommen und 10 min auf Eis in 10 µl Flebogamma inkubiert. Anschließend wurden 100 µl RB mit oder ohne die Antikörper anti-CD14-APC-Cy7, anti-CD14-Pe-Vio770 anti-CD16-PE-Vio770, anti-CD16-Vioblue anti-HLA-DR-VioBlue, anti-CD80-APC und anti-CD11b-PE hinzugegeben und die Zellen weitere 15min auf Eis inkubiert. Bei der Färbung der

Oberflächenmarker wurden die Zellen nach einem weiteren Waschgang 8 min mit PBS bei Raumtemperatur und 300 x g in Binding Buffer mit oder ohne Annexin-FITC und/oder 7-AAD 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 400 µl Binding Buffer zu jeder Probe gegeben und die Proben wurden an einem Durchflusszytometer FACS-Canto™ II (Becton Dickinson) gemessen. Die Gating Strategie wird in **Abbildung 12** verdeutlicht.

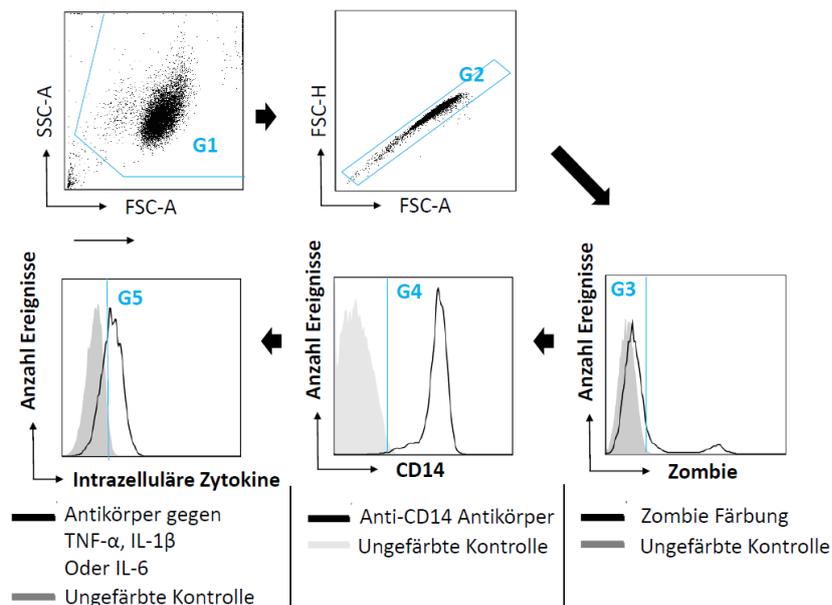
Bei der Färbung der intrazellulären Zytokine wurden die Zellen 8min mit RB bei 4 °C und 300 x g gewaschen und in 100 µl PBS mit oder ohne Zombie Green resuspendiert und 10 min inkubiert, um tote Zellen bei der darauffolgenden Messung auszuschließen. Zombie Green ist ein fixierbarer Farbstoff, welcher nur die Membran toter Zellen durchdringen kann. Nach einem erneuten Waschgang mit RB bei Raumtemperatur wurden die Zellen mithilfe des Inside Stain Kit (Miltenyi) fixiert und weitergefärbt.



**Abbildung 12: Gating-Strategie bei der durchflusszytometrischen Messung der Expression der Oberflächenmarker CD16, CD11b, CD80 und HLA-DR bei menschlichen Monozyten.**

G1: Ausschluss von Zelldebris, G2: Ausschluss von Zelldoubletten, G3: Ausschluss von apoptotischen und toten Zellen, G4: Ausschluss von CD14-negativen Zellen, G5: Erfassung der positiven Zellen nach Färbung mit Antikörpern gegen CD16, CD11b, CD80 und HLA-DR.

Die Zellen wurden in 250 µl RB + 250 µl InsideFix 20 min bei Raumtemperatur inkubiert, 10 min bei Raumtemperatur und 700 x g mit InsidePerm gewaschen und anschließend in 100 µl InsidePerm mit oder ohne die Antikörper anti-IL-6-APC, anti-TNF- $\alpha$ -APC-Vio770 und anti-IL-1 $\beta$ -PE für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einem Waschgang mit RB bei Raumtemperatur wurden die Proben in 400 µl RB resuspendiert und an einem Durchflusszytometer FACS-Canto™ II (Becton Dickinson) gemessen. Die Gating Strategie wird in **Abbildung 13** verdeutlicht.



**Abbildung 13: Gating-Strategie bei der durchflusszytometrischen Messung des intrazellulären Gehalts an TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  und IL-6 menschlicher Monozyten.**

G1: Ausschluss von Zelldebris, G2: Ausschluss von Zelldubletten, G3: Ausschluss von toten Zellen, G4: Ausschluss von CD14-negativen Zellen, G5: Erfassung der positiven Zellen nach Intrazellulärer Färbung mit Antikörpern gegen TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  und IL-6.

## 2.7. Messung des intrazellulären ATP-Gehaltes

Zur Bestimmung des intrazellulären ATP Gehaltes wurden die Monozyten 3 Stunden in der Schüttelkultur mit oder ohne DMSO, LPS und Myxothiazol inkubiert. Das ATP Bioluminescence Assay Kit CLS II (Sigma-Aldrich) wurde hierzu verwendet. Nach der Inkubation wurden die Monozyten 10 min auf Eis gelegt, 10 min mit eiskaltem PBS bei 300 x g und 4 °C gewaschen und anschließend in 100µl Verdünnungspuffer

resuspendiert. Es wurden 100 µl Lysepuffer hinzugefügt und die Zellen wurden 5 min bei Raumtemperatur inkubiert, danach auf Eis gelagert. Das Lysat wurde 1:10 mit Verdünnungspuffer verdünnt und 50 µl wurden in einer schwarzen 96-Well Lumox® Platte gegeben. Eine Mischung aus 10 µl Lysepuffer + 190 µl Verdünnungspuffer diente als Negativkontrolle. Mithilfe einer 12-Kanal Pipette (Abimed, Langenfeld, Deutschland) wurden die 50 µl Luciferase zeitgleich in allen Proben und Kontrollkammern gegeben. Die Messung der Fluoreszenz erfolgte an einem Synergy HAT Plattenleser (BioTek, Bad Friedrichshall, Deutschland).

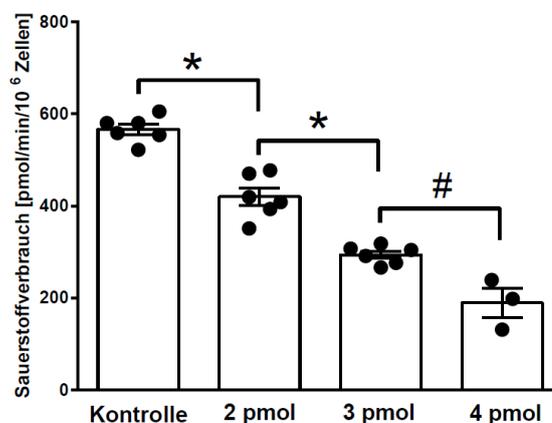
## **2.8. Statistische Auswertung**

Alle gewonnenen Daten wurden mit Microsoft Excel (Version 2007, Microsoft, USA) und Prism (Version 6, Graphpad, San Diego, USA) ausgewertet. Zur Auswertung der durchflusszytometrischen Messungen wurde die Software Flowjo v7.6.5 (BD Biosciences, San Jose, USA) verwendet. Alle Daten wurden als Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler (SEM) angegeben. Bei unabhängigen Gruppen wurde die statistische Signifikanz mit dem nicht parametrischen Mann-Whitney-U Test, bei abhängigen Gruppen mit dem nicht parametrischen Wilcoxon Test erfasst. Statistisch signifikant waren Unterschiede, bei denen die Irrtumswahrscheinlichkeit  $p < 0,05$  war.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Titration Myxothiazol

Die Basalatmung ruhender Monozyten nach 2 Stunden Inkubation betrug  $566 \pm 11.63$  pmol/min/ $10^6$  Zellen. Eine Behandlung mit steigenden Mengen an Myxothiazol reduzierte die Basalatmung auf  $419,7 \pm 47,71$  (2 pmol Myxothiazol / $10^6$  Zellen; MYX1 Belastung),  $293,0 \pm 19,81$  (3 pmol / $10^6$  Zellen) und  $189,3 \pm 54,52$  pmol/min/ $10^6$  Zellen (4 pmol / $10^6$  cells; MYX2 Belastung), was einer Reduktion der Basalatmung von jeweils 25 %, 50 % und 66 % entspricht. (**Abbildung 14**)



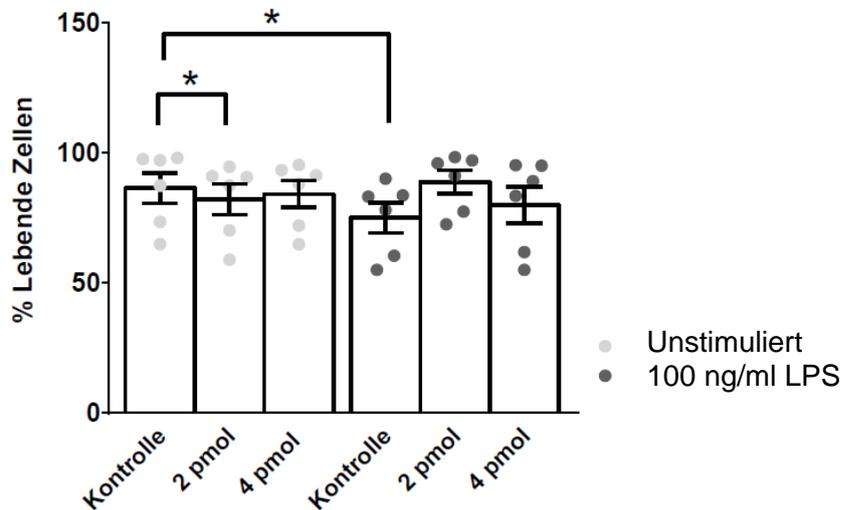
**Abbildung 14: Titration von Myxothiazol an menschlichen Monozyten in glukosefreiem RPMI Medium mit 10 % (v/v) glukosefreiem humanem AB Serum/RPMI.**

Die Kontrolle entspricht einer Vehikelkontrolle mit 1% (v/v) DMSO/Kulturmedium. Die Werte in pmol entsprechen der Menge an Myxothiazol für eine Million Zellen. Werte sind in Mittelwerte  $\pm$  SEM angegeben für  $n = 3$  (4 pmol) bis 6 (Kontrolle, 2 pmol, 3 pmol) unabhängige Experimente ohne Replikate (\* $p < 0,05$  Wilcoxon signed rank test, # $p < 0,05$  Mann-Whitney U Test).

#### 3.2. Vitalität der Zellen nach Inkubation

Nach 6 Stunden Inkubation unter glukosefreien Bedingungen mit oder ohne Myxothiazol und/oder LPS ergaben sich zwischen den Behandlungen statistisch signifikante Unterschiede im Anteil lebender Zellen.

Verglichen zur unbehandelten Kontrolle reduzierte die MYX1 Belastung den Anteil lebender Zellen von  $86,38 \pm 5,79$  auf  $82,12 \% \pm 5,82$  ( $p = 0,0475$ ). Die Stimulation mit LPS verminderte den Anteil lebender Zellen auf  $75,02 \% \pm 5,74$  ( $p = 0,0434$ , **Abbildung 15**)



**Abbildung 15: Vitalität von ruhenden und stimulierten (100 ng/ml LPS) menschlichen Monozyten unter glukosefreien Bedingungen.**

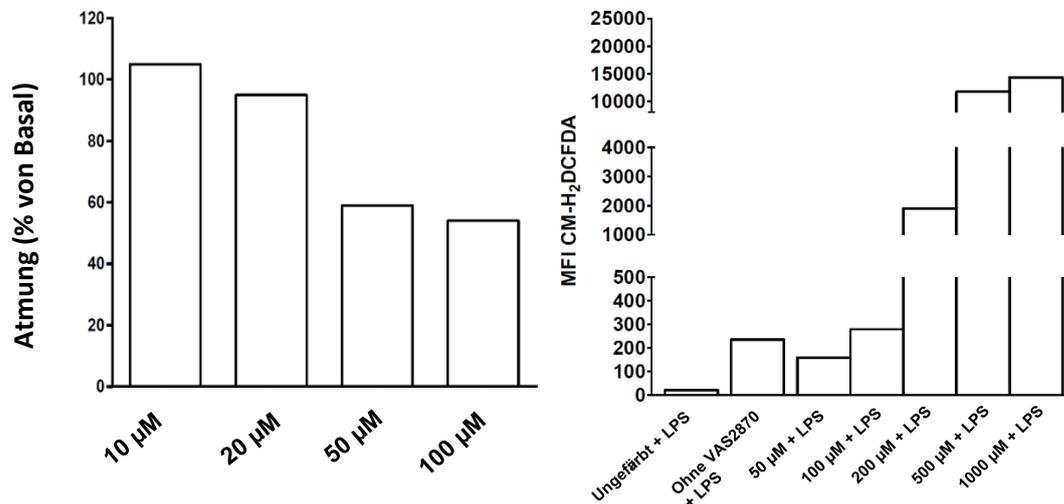
Die Kontrolle entspricht einer Vehikelkontrolle mit 1% (v/v) DMSO/Kulturmedium. Die Werte in pmol entsprechen der Menge an Myxothiazol für eine Million Zellen. Werte sind in Mittelwerte  $\pm$  SEM angegeben für  $n = 6$  unabhängige Experimente ohne Replikate (\* $p < 0,05$  Wilcoxon signed rank test).

Die Kombination von Stimulation mit LPS und Behandlung mit Myxothiazol hatte keinen messbaren Einfluss auf den Anteil lebender Monozyten nach 6 Stunden Inkubation. Es wurde mit den Myxothiazol-Mengen 2 pmol/ $10^6$  Zellen und 4 pmol/ $10^6$  Zellen gearbeitet, diese wurden jeweils MYX1 Belastung und MYX2 Belastung benannt.

### 3.3. Titrations von VAS2870, Oligomycin A und FCCP

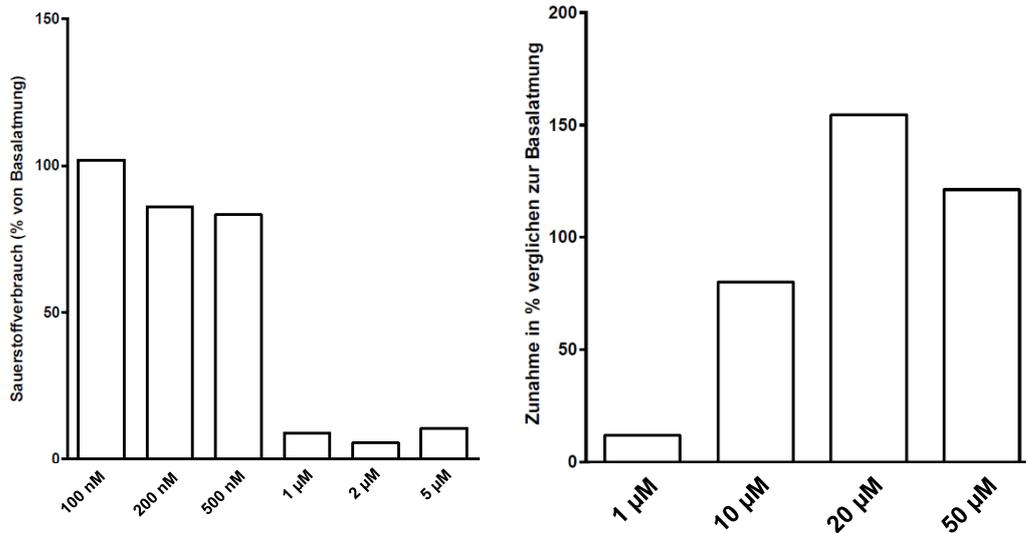
Nach 2 Stunden Inkubation unter glukosefreien Bedingungen ergaben die Titrations von VAS2870 50  $\mu$ M als geeignete Konzentration, um den Anteil an ROS Produktion der Basalatmung nachzuweisen. Diese Konzentration erwies sich sowohl

für die Experimente mit der Clark-Elektrode als auch für die durchflusszytometrischen Experimente als geeignet (**Abbildung 16**). Die geeigneten Konzentrationen für Oligomycin A und FCCP waren jeweils 1  $\mu\text{M}$  und 20  $\mu\text{M}$  (**Abbildung 17**).



**Abbildung 16: Ergebnisse der Titration von VAS2870 bei ruhenden menschlichen Monozyten unter glukosefreien Bedingungen.**

Dargestellt sind die Ergebnisse nach 2 Stunden Inkubation in der Clark Elektrode (links) und nach 2 Stunden Inkubation in der Anwesenheit von 100 ng/ml LPS und Färbung der iROS mittels CM-H<sub>2</sub>DCFDA (rechts), in beiden Fällen n = 1 (MFI = Mediane Fluoreszenzintensität).

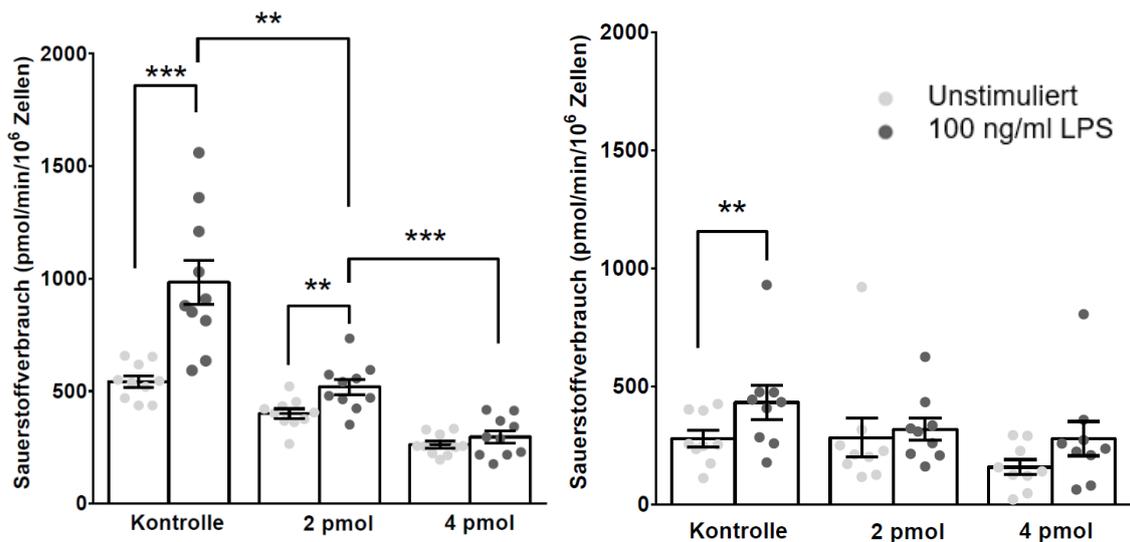


**Abbildung 17: Titration von Oligomycin A und FCCP bei ruhenden menschlichen Monozyten unter glukosefreien Bedingungen.**

Dargestellt sind die Ergebnisse der Titrations von Oligomycin A (links) und FCCP (rechts) bei ruhenden Monozyten nach 2 Stunden Inkubation in der Clark-Elektrode, in beiden Fällen  $n = 1$ .

### 3.4. Basalatmung

Nach 2 Stunden Inkubation stieg die Basalatmung der Monozyten nach einer Stimulation mit LPS um etwa 82 % (**Abbildung 18**). Die MYX1 Belastung reduzierte diesen Effekt auf eine Zunahme um nur etwa 30 %. Nach der Behandlung mit der MYX2 Belastung blieb der Anstieg der Basalatmung vollständig aus. Die Basalatmung der mit LPS stimulierten Monozyten wiesen signifikante Unterschiede auf, es zeigte sich eine Dosis-Wirkungsbeziehung zur eingesetzten Myxothiazol-Menge. Je höher die eingesetzte Menge an Myxothiazol, desto niedriger war die messbare Basalatmung. Nach einer Inkubation von 6 Stunden war die ursprüngliche Dosis-Wirkungsbeziehung nicht mehr nachzuweisen, lediglich die nicht mit Myxothiazol behandelten Monozyten wiesen in der LPS-stimulierten Gruppe eine signifikant höhere Basalatmung auf.

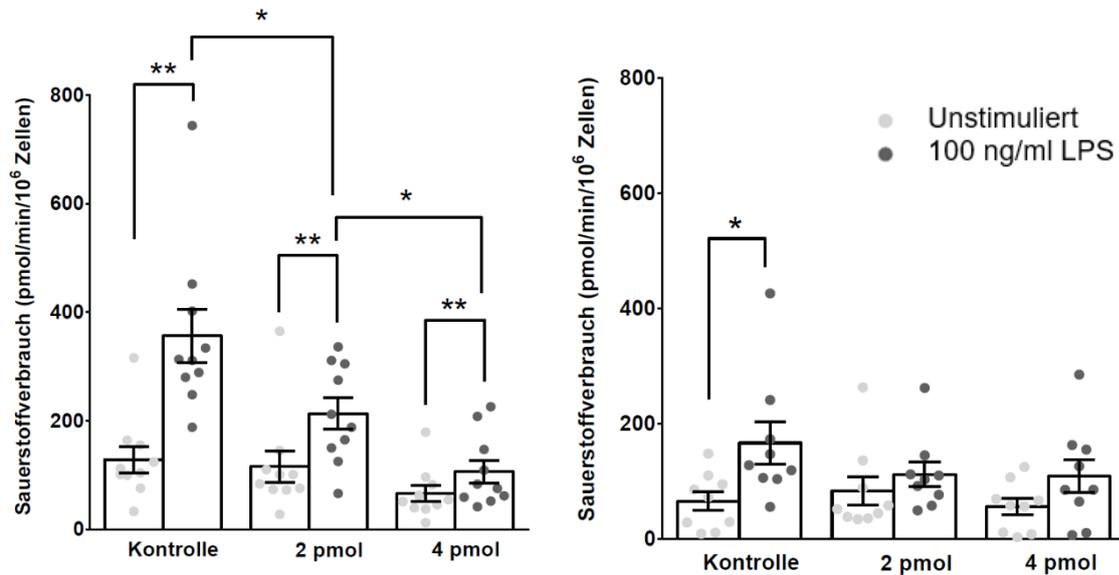


**Abbildung 18: Basalatmung von ruhenden und stimulierten (100 ng/ml LPS) menschlichen Monozyten unter glukosefreien Bedingungen.**

Dargestellt sind die Ergebnisse nach 2 Stunden (links) und 6 Stunden (rechts) Inkubation. Die Kontrolle entspricht einer Vehikelkontrolle mit 1% (v/v) DMSO/Kulturmedium. Die Werte in pmol entsprechen der Menge an Myxothiazol für eine Million Zellen. Werte sind in Mittelwerte  $\pm$  SEM angegeben für  $n = 11$  (links) und  $n = 9$  (rechts) unabhängige Experimente ohne Replikate (\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ , Wilcoxon signed rank test).

### 3.5. NOX assoziierter Sauerstoffverbrauch

Eine Dosis-Wirkungsbeziehung konnte auch für den NAS der Monozyten nachgewiesen werden. Diese ähnelte dem Effekt des Myxothiazols auf die Basalatmung: je höher die eingesetzte Menge an Myxothiazol, desto kleiner fiel der NAS bei den LPS-stimulierten Monozyten aus. LPS steigerte den NAS bei den nicht mit Myxothiazol behandelten Monozyten um etwa 178 %. Der NAS der Monozyten unter MYX1 Belastung stieg mit LPS um etwa 85 %, bei einer Belastung mit MYX2 nur noch um etwa 61 %. Nach 6 Stunden Inkubation war der NAS von den mit LPS stimulierten Kontrollzellen weiterhin signifikant höher, die Stimulation hatte jedoch auf die mit Myxothiazol behandelten Zellen keinen signifikanten Effekt mehr (**Abbildung 19**).

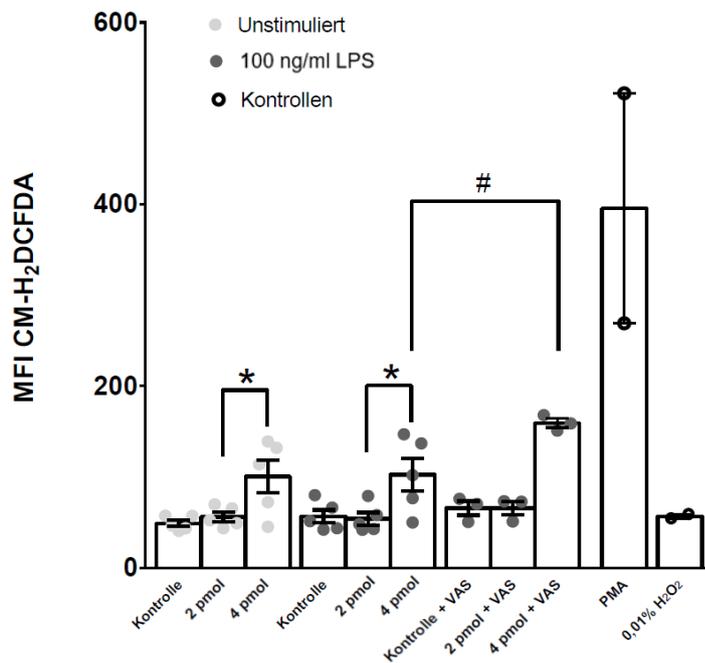


**Abbildung 19: NOX assoziierter Sauerstoffverbrauch (=NAS) von ruhenden und stimulierten (100 ng/ml LPS) menschlichen Monozyten unter glukosefreien Bedingungen.**

Dargestellt sind die Ergebnisse nach 2 Stunden (links) und 6 Stunden (rechts) Inkubation. Die Kontrolle entspricht einer Vehikelkontrolle mit 1% (v/v) DMSO/Kulturmedium. Die Werte in pmol entsprechen der Menge an Myxothiazol für eine Million Zellen. Werte sind in Mittelwerte  $\pm$  SEM angegeben für  $n = 11$  (links) und  $n = 9$  (rechts) unabhängige Experimente ohne Replikate (\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , Wilcoxon signed rank test)

### 3.6. Intrazelluläre reaktive Sauerstoffspezies

Entgegen den Erwartungen, die sich aus den Daten des NAS ableiten ließen, hatte die Stimulation der Monozyten mit LPS allein keinen signifikanten Einfluss auf ihren iROS-Gehalt. Es gab keinen signifikanten Unterschied zwischen den stimulierten und unstimulierten Gruppen sowohl bei den Kontrollzellen als auch unter MYX1 Belastung. Ebenso gab es keinen signifikanten Unterschied zwischen Kontrollzellen und MYX1-Belastung innerhalb der unstimulierten und innerhalb der mit LPS stimulierten Gruppen. Die Belastung der Monozyten mit MYX2 führte unabhängig von der Stimulation zu einem signifikanten Anstieg der iROS. Dieser ließ sich mit der Zugabe von VAS2870 signifikant steigern (**Abbildung 20**).

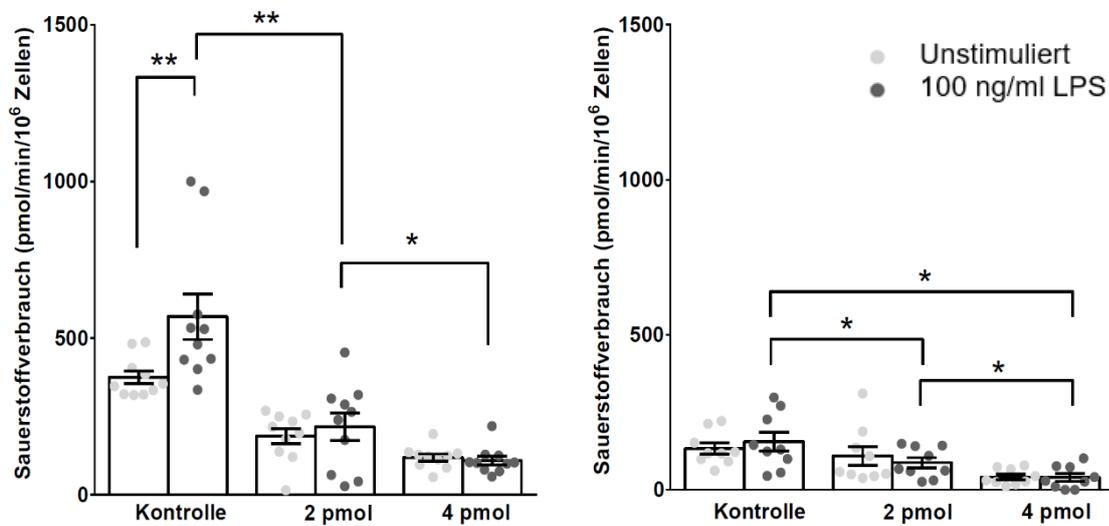


**Abbildung 20: MFI der CM-H<sub>2</sub>DCFDA Färbung von ruhenden und stimulierten (100 ng/ml LPS) menschlichen Monozyten nach 2 Stunden Inkubation unter glukosefreien Bedingungen.**

Die Kontrolle entspricht einer Vehikelkontrolle mit 1% (v/v) DMSO/ Kulturmedium. Die Werte in pmol entsprechen der Menge an Myxothiazol für eine Million Zellen. Werte sind in Mittelwerte  $\pm$  SEM angegeben für  $n = 5$  (Proben ohne VAS2870) und  $n=3$  (Proben mit VAS2870) Experimente mit 5 Spendern aus 2 Präparationen, ohne Replikate. Für Jede Präparation erfolgte eine Kontrolle mit PMA und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (jeweils  $n = 2$ ) (\* $p < 0,05$ , Wilcoxon signed rank test).

### 3.7. Sauerstoffverbrauch der mitochondrialen ATP Produktion

Der mittlere MAS der Monozyten verhielt sich ähnlich dem NAS: Eine Dosis-Wirkungsbeziehung konnte hier ebenfalls nachgewiesen werden. Je höher die eingesetzte Menge an Myxothiazol, desto niedriger war der MAS. Im Gegensatz zur Basalatmung und zum NAS war diese Dosis-Wirkungsbeziehung weiterhin nach 6 Stunden Inkubation nachzuweisen. Die Stimulation mit LPS bewirkte bei den Kontrollzellen lediglich nach 2 Stunden Inkubation einen signifikanten Anstieg des MAS um etwa 51 %. Dieser Effekt war nach 6 Stunden Inkubation nicht mehr nachzuweisen (**Abbildung 21**).



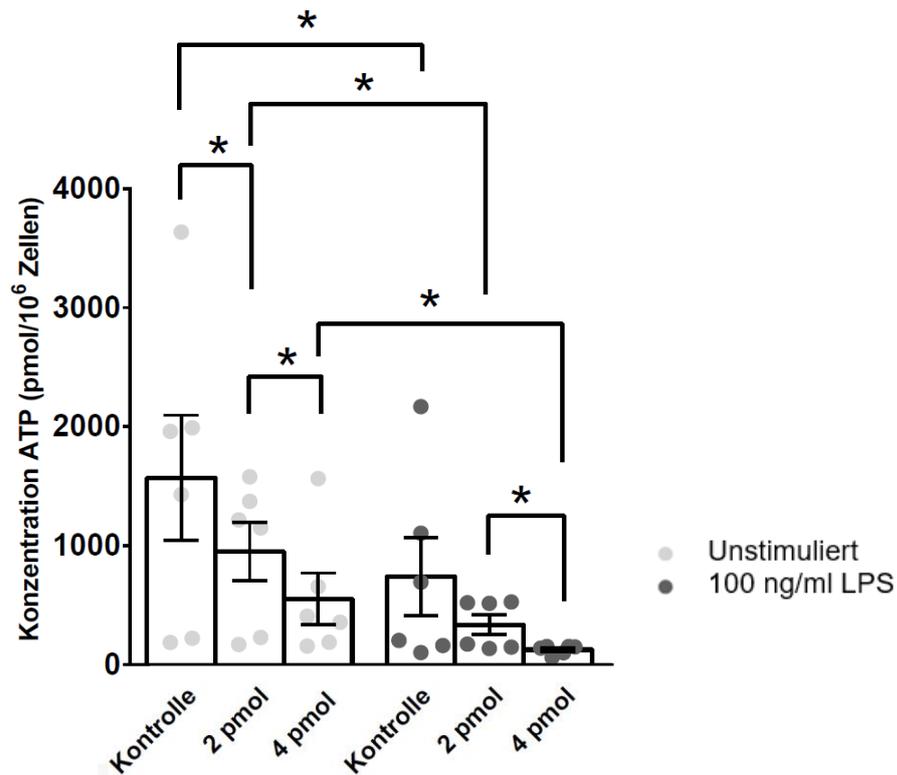
**Abbildung 21: Sauerstoffverbrauch assoziiert mit der mitochondrialen ATP-Produktion von ruhenden und stimulierten (100 ng/ml LPS) menschlichen Monozyten unter glukosefreien Bedingungen.**

Dargestellt sind die Ergebnisse nach 2 Stunden (links) und 6 Stunden (rechts) Inkubation. Die Kontrolle entspricht einer Vehikelkontrolle mit 1% (v/v) DMSO/Kulturmedium. Die Werte in pmol entsprechen der Menge an Myxothiazol für eine Million Zellen. Werte sind in Mittelwerte  $\pm$  SEM angegeben für  $n = 11$  (links) und  $n = 9$  (rechts) unabhängige Experimente ohne Replikate (\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , Wilcoxon signed rank test).

### 3.8. Intrazellulärer ATP Gehalt

Um die die energetische Situation der Monozyten vollständig zu beschreiben, , wurde auch der intrazelluläre ATP-Gehalt der Zellen nach 3 Stunden Inkubation bestimmt. Der ATP-Gehalt der mit LPS stimulierten Monozyten war signifikant niedriger als der ATP Gehalt der unstimulierten Monozyten unabhängig von der An- oder Abwesenheit von Myxothiazol. Es zeigte sich außerdem eine Dosis-Wirkungsbeziehung zwischen der eingesetzten Myxothiazolmenge und dem intrazellulären ATP-Gehalt bei den unstimulierten Monozyten. Bei den stimulierten Monozyten war ein signifikanter Unterschied jedoch nur zwischen der MYX1- und MYX2-Belastung zu messen. Der zelluläre ATP-Gehalt von mit LPS stimulierten

Monozyten war unter MYX2-Belastung nur noch 8 % der unstimulierten, nicht mit Myxothiazol behandelten Kontrolle (**Abbildung 22**).

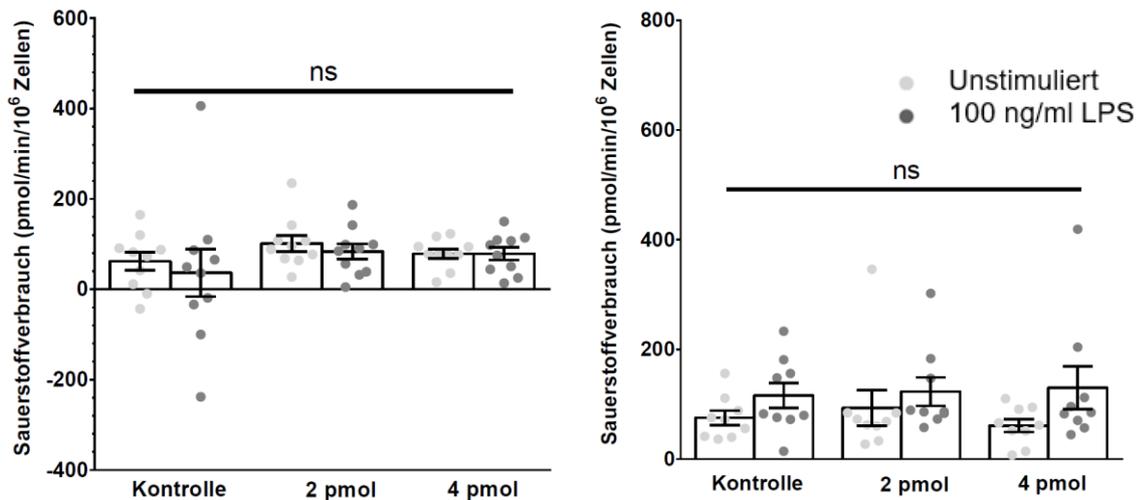


**Abbildung 22: Intrazellulärer ATP Gehalt von ruhenden und stimulierten (100 ng/ml LPS) Monozyten nach 3 Stunden unter glukosefreien Bedingungen.**

Die Kontrolle entspricht einer Vehikelkontrolle mit 1% (v/v) DMSO/ Kulturmedium. Die Werte in pmol entsprechen der Menge an Myxothiazol für eine Million Zellen. Werte sind in Mittelwerte  $\pm$  SEM angegeben für  $n = 6$  unabhängige Experimente ohne Replikate (\* $p < 0,05$ , Wilcoxon signed rank test).

### 3.9. Nicht sensitiver Sauerstoffverbrauch

Der nach der Behandlung mit VAS2870 und Oligomycin A nicht beeinflussbare Sauerstoffverbrauch war unter keiner analysierten Kondition signifikant von LPS oder Myxothiazol verändert (**Abbildung 23**).

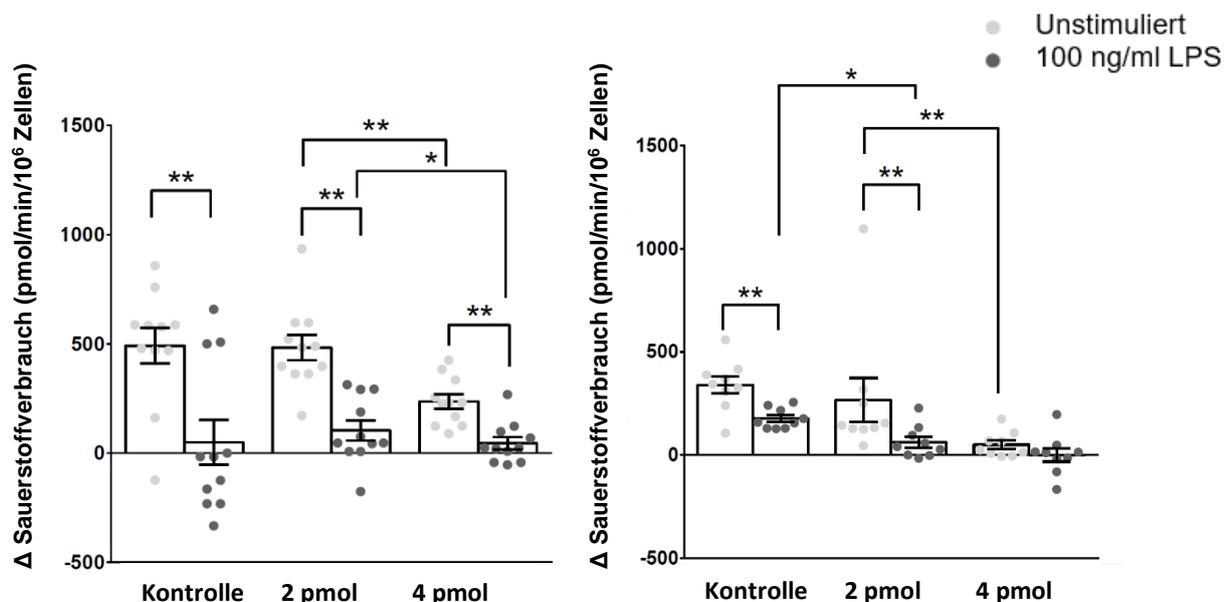


**Abbildung 23: Durch VAS2870 und Oligomycin A nicht beeinflussbarer Sauerstoffverbrauch von ruhenden und stimulierten (100 ng/ml LPS) menschlichen Monozyten unter glukosefreien Bedingungen.**

Dargestellt sind die Ergebnisse nach 2 Stunden (links) und 6 Stunden (rechts) Inkubation. Die Kontrolle entspricht einer Vehikelkontrolle mit 1% (v/v) DMSO/ Kulturmedium. Die Werte in pmol entsprechen der Menge an Myxothiazol für eine Million Zellen. Werte sind in Mittelwerte  $\pm$  SEM angegeben für  $n = 11$  (links) und  $n = 9$  (rechts) unabhängige Experimente ohne Replikate (Wilcoxon signed rank test, ns = nicht signifikant).

### 3.10. Reservekapazität

Zur genaueren Beurteilung des mitochondrialen Stoffwechsels wurde die Reservekapazität der Monozyten bestimmt. Zu allen Zeitpunkten bewirkte die Stimulation mit LPS eine signifikante Minderung der Reservekapazität, hiervon ausgenommen zeigten sich die mit LPS stimulierten und MYX2 belasteten Monozyten nach 6 Stunden Inkubation: hier war ein Effekt nicht mehr messbar. Zu allen Zeitpunkten bewirkte bei den unstimulierten Monozyten erst die Belastung mit MYX2 eine signifikante Minderung der Reservekapazität (**Abbildung 24**).



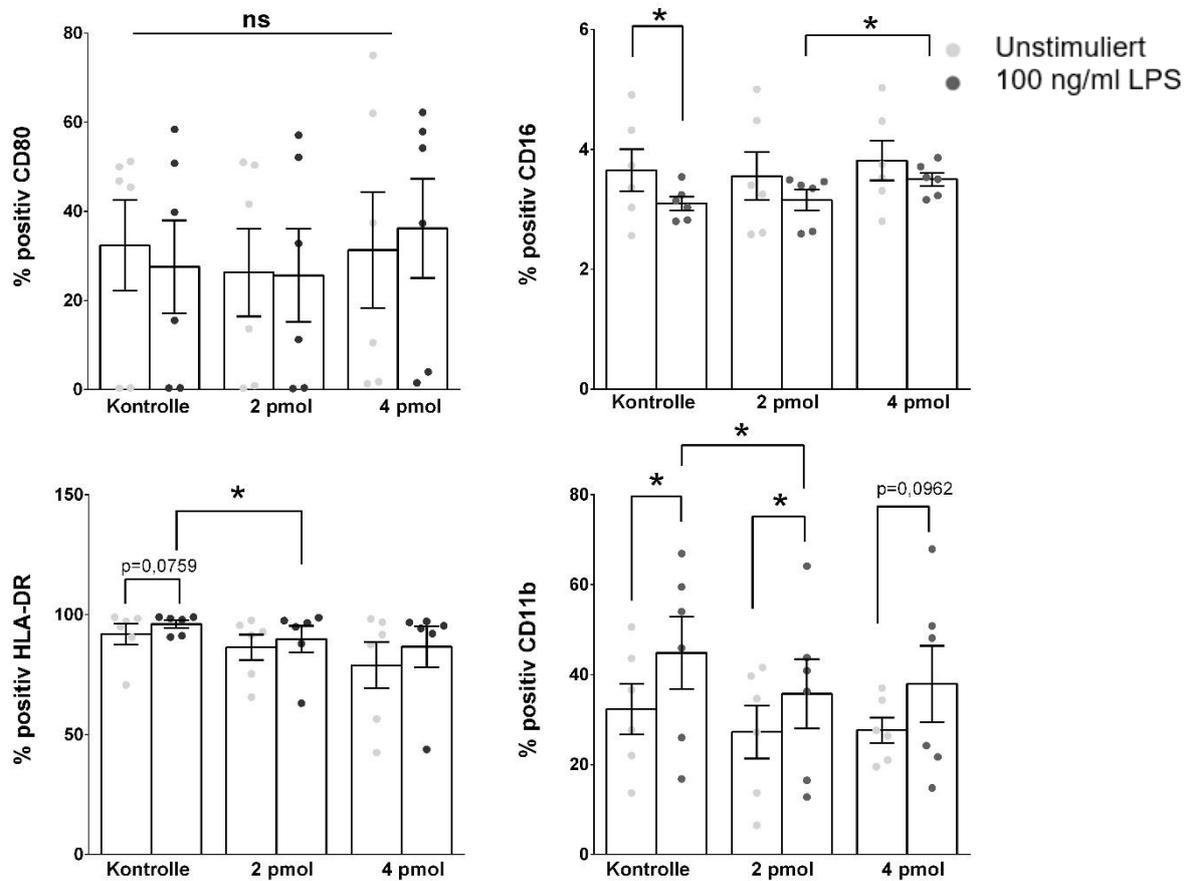
**Abbildung 24: Reservekapazität ( $\Delta$  Sauerstoffverbrauch) von ruhenden und stimulierten (100 ng/ml LPS) menschlichen Monozyten unter glukosefreien Bedingungen.**

Dargestellt sind die Ergebnisse nach 2 Stunden (links) und 6 Stunden (rechts) Inkubation. Die Kontrolle entspricht einer Vehikelkontrolle mit 1% (v/v) DMSO/Kulturmedium. Die Werte in pmol entsprechen der Menge an Myxothiazol für eine Million Zellen. Werte sind in Mittelwerte  $\pm$  SEM angegeben für  $n = 11$  (links) und  $n = 9$  (rechts) unabhängige Experimente ohne Replikate (\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , Wilcoxon signed rank test).

### 3.11. Oberflächenmarker

Um den Einfluss einer metabolischen Belastung auf dem Oberflächenphänotyp der Monozyten zu untersuchen, wurden die Expression mehrerer Aktivierungsmarker untersucht. In den mit LPS stimulierten Gruppen führte eine Belastung mit MYX1 zu einer Reduktion der CD80-positiven Population und eine Belastung mit MYX2 zu einer Steigerung der CD16-positiven Population, in der nicht mit Myxothiazol behandelten Gruppe nahm die CD16-positive Population ab. Die Behandlung mit Myxothiazol beeinflusste vor allem die Oberflächenmarker HLA-DR und CD11b. Unter MYX1 Belastung nahm der Anteil an HLA-DR positiven Monozyten signifikant ab (**Abbildung 22**). Die für CD11b positive Population war bei den mit LPS stimulierten

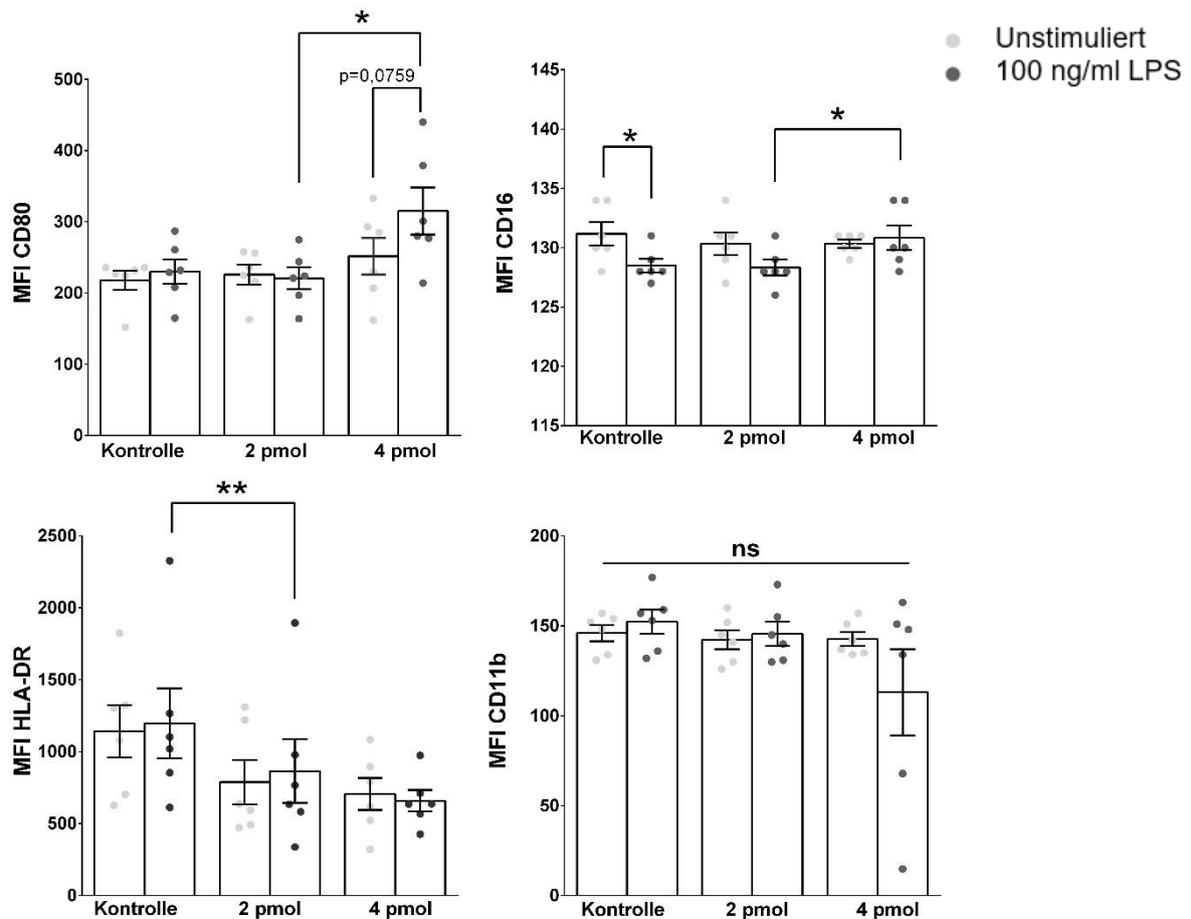
Monozyten signifikant erhöht in den Kontrollzellen und nach MYX1 Belastung. Dieser Effekt war unter MYX2 Belastung nicht mehr nachzuweisen.



**Abbildung 25: Positivanteil von ruhenden und stimulierten (100 ng/ml LPS) Monozyten nach einer Färbung mit Antikörpern gegen CD80, CD16, HLA-DR und CD11b unter glukosefreien Bedingungen.**

Die Färbung der Monozyten erfolgte nach 4 Stunden Inkubation. Die Kontrolle entspricht einer Vehikelkontrolle mit 1% (v/v) DMSO/Kulturmedium. Die Werte in pmol entsprechen der Menge an Myxothiazol für eine Million Zellen. Werte sind in Mittelwerte  $\pm$  SEM angegeben für  $n = 6$  unabhängige Experimente ohne Replikate (\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , Wilcoxon signed rank test)

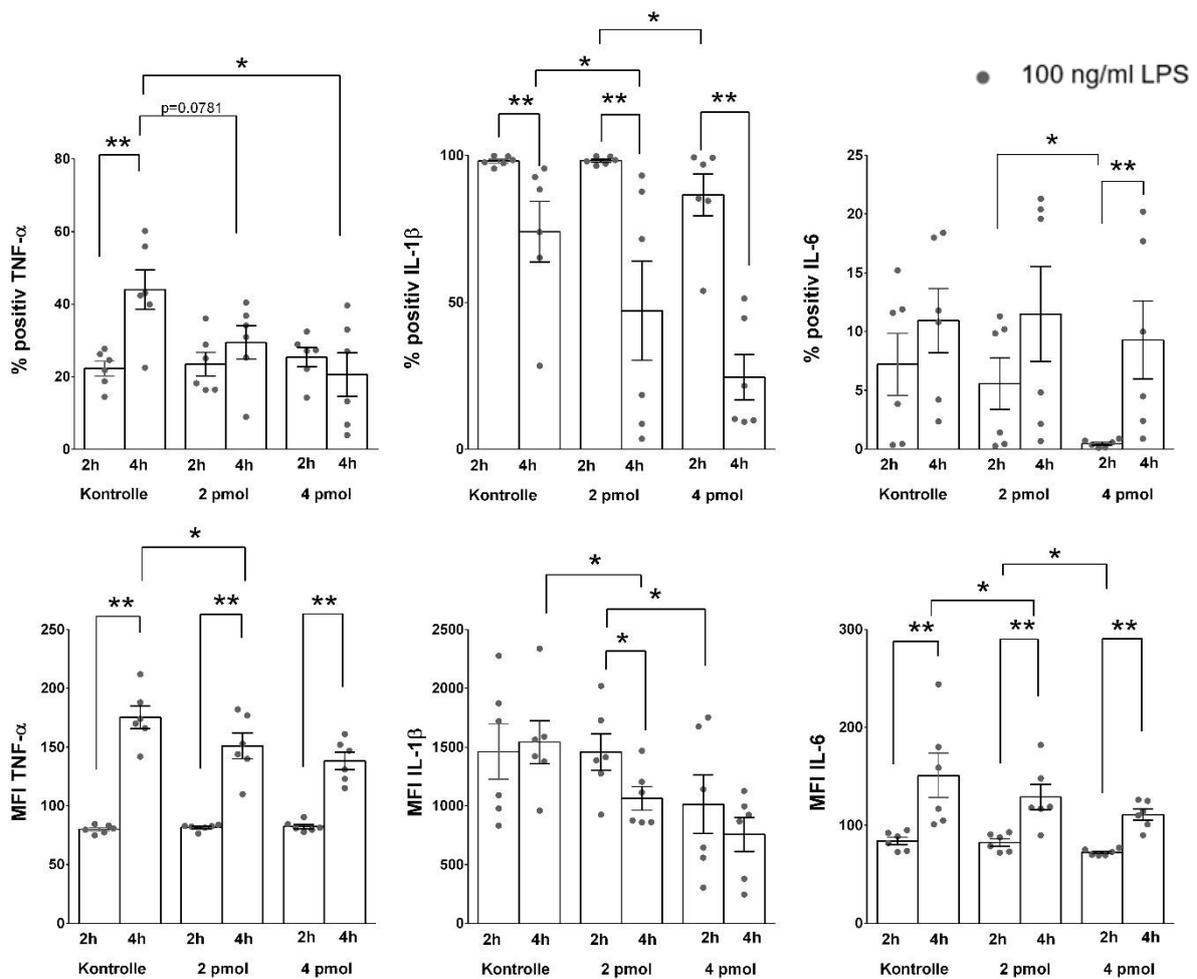
Innerhalb der Gruppe von mit LPS stimulierten Monozyten hatte nur die Belastung mit MYX1 einen signifikanten Effekt: die für CD11b positive Population war hier im Vergleich zu den Kontrollzellen signifikant erniedrigt (**Abbildung 25 und 26**).



**Abbildung 26: Mediane Fluoreszenzintensität des Positivanteils von ruhenden und stimulierten (100 ng/ml LPS) Monozyten nach einer Färbung mit Antikörpern gegen CD80, CD16, HLA-DR und CD11b unter glukosefreien Bedingungen.**

Die Färbung der Monozyten erfolgte nach 4 Stunden Inkubation. Die Kontrolle entspricht einer Vehikelkontrolle mit 1% (v/v) DMSO/Kulturmedium. Die Werte in pmol entsprechen der Menge an Myxothiazol für eine Million Zellen. Werte sind in Mittelwerte  $\pm$  SEM angegeben für  $n = 6$  unabhängige Experimente ohne Replikate (\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , Wilcoxon signed rank test)

### 3.12. Produktionskinetik inflammatorischer Zytokine



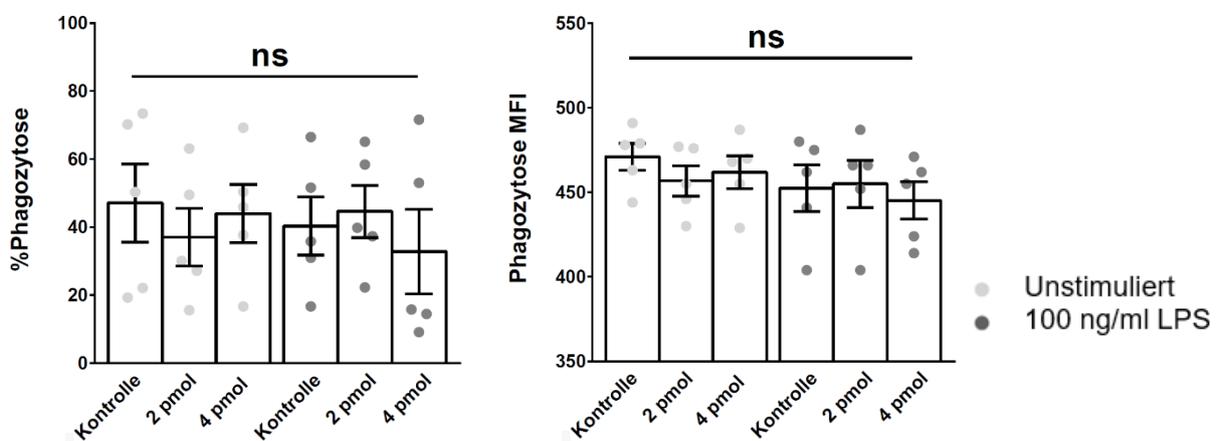
**Abbildung 27: Positivanteil von ruhenden und stimulierten (100 ng/ml LPS) Monozyten nach einer Färbung mit Antikörpern gegen IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  und IL-6 unter glukosefreien Bedingungen.**

Dargestellt sind die Ergebnisse für die Zytokine IL-1 $\beta$  (oben mitte), TNF- $\alpha$  (oben links) und IL-6 (oben rechts) sowie dazugehörige MFI der Positivpopulation (jeweils unterhalb dargestellt). Die Monozyten wurden nach 1 Stunde Prestimulation mit oder ohne LPS mit 10  $\mu$ g/ml BFA behandelt und nach zusätzlich 1 oder 3 Stunden Inkubation gefärbt. Die Kontrolle entspricht einer Vehikelkontrolle mit 1% (v/v) DMSO/Kulturmedium. Die Werte in pmol entsprechen der Menge an Myxothiazol für eine Million Zellen. Werte sind in Mittelwerte  $\pm$  SEM angegeben für n = 6 unabhängige Experimente ohne Replikate (\*p < 0,05, \*\*p < 0,01, Wilcoxon signed rank test).

Um den Einfluss einer metabolischen Belastung auf die Produktion inflammatorischer Zytokine zu untersuchen, wurden die Zytokine IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  und IL-

6 bei den Monozyten zu zwei unterschiedlichen Zeitpunkten unter Sekretionsblockade gefärbt. Zu allen Zeitpunkten führte die Stimulation mit LPS bei den Monozyten für alle Zytokine zu einem Anstieg der Positivpopulation (Daten nicht gezeigt). Am ersten Zeitpunkt von 2 Stunden zeigte sich eine signifikante Reduktion von Positivpopulation und MFI für IL-6 bei den mit MYX2 belasteten Monozyten im Vergleich zur MYX1 Belastung. Dieser Effekt konnte zum zweiten Zeitpunkt von 4 Stunden für IL-1 $\beta$  nicht mehr nachgewiesen werden, stattdessen trat die signifikante Reduktion zwischen den Kontrollzellen und MYX1 Zellen auf (**Abbildung 27**). Es gab zum Zeitpunkt von 4 Stunden im Fall der Positivpopulation von IL-6 keinen signifikanten Unterschied innerhalb der Gruppe der mit LPS stimulierten Monozyten: die mit MYX2 belasteten Monozyten erreichten etwa die gleichen Werte wie die nicht mit Myxothiazol behandelten Kontrollzellen. Im Fall von TNF- $\alpha$  verhinderte die Behandlung mit Myxothiazol in allen Konzentrationen einen Anstieg der Positivpopulation vom Zeitpunkt 2 zu 4 Stunden. Der Anstieg der MFI war jedoch für alle Gruppen signifikant. (**Abbildung 27**)

### 3.13. Phagozytose



**Abbildung 28: Positivanteil von ruhenden und stimulierten (100 ng/ml LPS) Monozyten nach der Phagozytose von FITC-markierten E. Coli nach 1 Stunde Inkubation unter glukosefreien Bedingungen.**

Die Kontrolle entspricht einer Vehikelkontrolle mit 1% (v/v) DMSO/Kulturmedium. Die Werte in pmol entsprechen der Menge an Myxothiazol für eine Million Zellen. Werte sind in Mittelwerte  $\pm$  SEM angegeben für  $n = 5$  unabhängige Experimente ohne Replikate (Wilcoxon signed rank test, ns = nicht signifikant).

Um den Einfluss einer metabolischen Belastung auf die Phagozytose der Monozyten zu untersuchen, wurden die Monozyten mithilfe FITC-markierter *E. Coli* mit oder ohne LPS als Co-stimulation inkubiert. Keine Myxothiazol Konzentration konnte die Phagozytosekapazität der Monozyten signifikant beeinträchtigen (**Abbildung 28**).

## 4. Diskussion

### 4.1. Modellwahl und pathophysiologische Bedeutung

In dieser Arbeit etablierte ich ein Modell der metabolischen Belastung von Monozyten, analog zu den Bedingungen, die in entzündlichen Gebieten wie in Tumoren oder im arthritischen Gelenk herrschen. Einleitend wurde dargestellt, dass der Energie- und Biosynthese-Stoffwechsel für die Funktionalität der Monozyten notwendig ist. In unserem Modell waren nicht nur die Energieproduktion durch Abwesenheit von Glukose und Hemmung der OXPHOS reduziert, sondern auch die Herstellung biosynthetischer Substrate aus Produkten der Glykolyse. Zu diesen Produkten führen u.a. der Pentose-Phosphat-Weg, der Serin-Synthese-Weg und der Glycerol-Phosphat-Shuttle, sie sind auf den Kohlenstoff des Glukosemoleküls angewiesen und zählen zu den wichtigsten Stoffwechselwegen bei aktivierten Immunzellen (Gaber et al., 2017). Nach unserem Kenntnisstand gibt es derzeit keine weiteren Untersuchungen zu humanen Monozyten mit einer zu unserem Modell analogen Fragestellung oder mit dem Ziel, stufenweise metabolische Belastungen zu simulieren, um eine *in-vivo* Situation abzubilden bzw. eine Hierarchie herauszuarbeiten.

### 4.2. Hierarchie und Erklärungsansätze

In einen ersten Schritt demonstrierten wir, dass unser experimentelles Herangehen die Vitalität der Monozyten nicht kritisch beeinflusste (**Abbildung 15**).

Wir konnten zeigen, dass für Monozyten die Phagozytose und die LPS-induzierte Produktion des Zytokins IL-6 auch unter Bedingungen metabolischer Belastung eine zentrale Bedeutung haben (**Abbildungen 27 und 28**). Andere Prozesse, wie die Produktion von iROS oder die Expression von Oberflächenmolekülen, werden unter MYX2-Belastung zweitrangig. Diese Prozesse zeigten sich bereits unter MYX1-Belastung beeinflusst.

Die zugrundeliegenden Mechanismen der Hierarchie in unserem Modell bleiben zu klären. Denkbar scheint zunächst die Möglichkeit eines aktiven Signalwegs, welcher für jeden Prozess einzeln die Anpassung an die metabolischen Bedingungen vornimmt. Dieser könnte aus einem Sensor für biosynthetische Substrate und/oder

Energieträger bestehen, welcher mithilfe einer Kinaseaktivität den Ablauf besagter Prozesse modulieren könnte. Ein derartiger Sensor wurde für den zellulären Energiehaushalt bei Säugetieren bereits beschrieben. Es handelt sich um die AMP-aktivierte Proteinkinase (AMPK). Sie wird aktiviert, wenn das intrazelluläre Verhältnis von AMP zu ATP ansteigt, wenn also der ATP-Verbrauch die Produktionskapazität übersteigt (Marsin et al., 2002, Hardie, 2011).

Die AMPK ist bei Aktivierung nach dem heutigen Forschungsstand jedoch nicht nur an einen Prozess gebunden. Sie fungiert als Integrationszentrum von mindestens zwei Prozessen. Bei murinen T-Zellen koordiniert sie unter Glukosemangel simultan die Erhöhung der mitochondrialen ATP-Produktion und die Reduktion der Zytokinproduktion (Blagih et al., 2015). Bei menschlichen Monozyten vermittelt zusätzlich die Proteinkinase mammalian Target of Rapamycin (mTOR) die Wirkung der AMPK auf ihre Zielproteine (Cheng et al., 2014). Die Kinase mTOR moduliert u.a. multiple anabole Stoffwechselwege, beeinflusst die Apoptose, die Glykolyse sowie die mitochondriale Biogenese (Saxton and Sabatini, 2017). In diesem Kontext scheint die metabolische Hierarchie ein Produkt eines komplexen Integrationssystems zu sein. So beinhaltet dieses System mindestens einen Energiesensor mit pleiotroper Wirkung. Dies schließt wahrscheinlich die Möglichkeit der eingangs erwähnten, prozess-spezifischen Sensoren nicht aus. Jedoch wird hierdurch eine gründliche Erforschung des gesamten Integrationsystems zur erfolgreichen Aufschlüsselung der Hierarchie notwendig.

### **4.3. Zum Energie- und Sauerstoffmetabolismus in unserem Modell**

#### **4.3.1. Energieversorgung**

Myxothiazol reduzierte die Basalatmung der behandelten Monozyten nachhaltig (**Abbildung 18**). Der Effekt von Myxothiazol auf dem MAS blieb signifikant, selbst nach einer Dauer von 6 Stunden. Dies zeigte, dass sich die Zellen auf unterschiedlichen Niveaus der mitochondrialen Atmung für die gesamte Dauer der Experimente befanden. Um dies zu bestätigen wurde der jeweilige ATP-Gehalt der Zellen gemessen. LPS-stimulierte Zellen zeigten einen niedrigeren ATP-Gehalt als die unstimulierten Kontrollen, während sie einen erhöhten Sauerstoffverbrauch assoziiert mit der mitochondrialen ATP-Produktion (=MAS) aufwiesen (**Abbildungen 21 und**

22). Eine Erklärung hierfür könnte der höhere ATP-Verbrauch der LPS-stimulierten Zellen darstellen, welcher unter glukosefreien Bedingungen nicht durch eine erhöhte mitochondriale oder glykolytische ATP-Produktion kompensiert werden kann. In diesem Zusammenhang ist bereits bekannt, dass Monozyten für den Verlust der Glykolyse als ATP-Quelle mit einer erhöhten  $\beta$ -Oxidation von Fettsäuren neben einer Steigerung des AMP/ATP-Verhältnisses kompensieren können (Raulien et al., 2017). Ein weiterer Hinweis für die maximale Auslastung der Mitochondrien lässt sich in der signifikanten Abnahme der mitochondrialen Reservekapazität infolge einer Stimulation mit LPS unter glukosefreien Bedingungen ablesen (**Abbildung 24**). Hieraus geht hervor, dass es den Monozyten unter diesen Bedingungen nicht mehr möglich war, zusätzlichen Sauerstoff für die mitochondriale Energieproduktion zu verbrauchen. Denn der ATP Verbrauch würde ohne Glukoseentzug zu einem Anstieg des AMP/ATP Verhältnisses und zur konsekutiven Steigerung der Glykolyse führen, wahrscheinlich unter Aktivierung der AMPK (Marsin et al., 2002).

#### 4.3.2. Funktionalität der Monozyten und externe Vergleichbarkeit

Einleitend wurde dargestellt, dass die Glykolyse sowohl ATP als auch biosynthetische Intermediate für den Zellstoffwechsel liefert. Da das hier präsentierte Modell die Glykolyse als metabolischen Weg ausschließt, war die wichtigste Voraussetzung dieser Arbeit, dass Monozyten trotz Glukoseentzug in der Lage sind, die untersuchten immunologischen Zellfunktionen auszuführen. Ohne diese erfüllte Voraussetzung wären die Monozyten-Populationen mit unterschiedlichen metabolischen Belastungen nicht miteinander vergleichbar gewesen. Tatsächlich waren Monozyten in der Lage, alle untersuchten Funktionen auszuführen. Weiterhin ergaben die hier durchgeführten Untersuchungen ähnliche Werte des Sauerstoffverbrauches wie bei Raulien und Kollegen berichtet wurde (Raulien et al., 2017). Raulien und Kollegen konnten für Monozyten eine mittlere Basalatmung von ca. 420 pmol/min/ $10^6$  Zellen nachweisen. Der von uns gemessene Wert betrug 984,1 pmol/min/ $10^6$  Zellen betrug (Raulien et al., 2017). Dieser Unterschied lässt sich möglicherweise durch variable Verfügbarkeiten von Substraten (z.B. Glutamin oder Fettsäuren im Zellkulturmedium), unterschiedliche Isolationsmethoden mit konsekutiven, minimalen Unterschieden in der Zusammensetzung der Zellpopulationen (CD14 positive Selektion vs. negative Selektion),

Inkubationsprotokolle (Suspensionskultur mit vs. ohne Orbitalschütteln) oder Art der Messung des Sauerstoffverbrauches, (Clark-Elektrode vs. Seahorse X Flux-Analyzer) erklären (Raulien et al., 2017, Yarbro and Pence, 2019). Darüber hinaus berichteten Yarbro und Kollegen (Yarbro and Pence, 2019) über einen mit den hier dargestellten Ergebnissen besser vergleichbaren Sauerstoffverbrauch von ca. 1200 pmol/min/10<sup>6</sup> Zellen. So lassen sich die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit also gut in derzeit existierenden Berichte einordnen.

#### **4.4. Immunfunktionen in unserem Modell**

##### **4.4.1. Phagozytose**

Es konnte vermutet werden, dass die Phagozytose bei Monozyten in unserem Modell die höchste Position innerhalb der Hierarchie einnimmt. Monozyten gehören zu den professionellen Phagozyten, die Zellgruppe mit der größten Bandbreite an Partikelgrößen, welche aufgenommen werden können (Rabinovitch, 1995). Vorangegangene Arbeiten unseres Labors zeigten bereits, dass Myxothiazol die Phagozytose humaner Monozyten erst ab einem Sauerstoffverbrauch von weniger als 20% des Ausgangswertes beeinflussen kann (Tripmacher, 2005). Da in unserer Arbeit die MYX2-Belastung den Sauerstoffverbrauch auf lediglich 33 % des Ausgangswertes reduzierte, entsprach das Ergebnis der hier unbeeinträchtigten Phagozytose unseren Erwartungen. Dieses Ergebnis konnte die Validität unseres Modells untermauern.

##### **4.4.2. ROS Produktion durch NOX**

Der NOX-assoziierte Sauerstoffverbrauch (=NAS) in unserer Arbeit ähnelte dem berichteten Ergebnis von Raulien und Kollegen, er entsprach etwa einem Drittel des Gesamtverbrauchs infolge einer Stimulation mit LPS (Raulien et al., 2017). Dies spricht dafür, dass die ROS Produktion durch NOX wahrscheinlich in beiden Arbeiten einen ähnlichen Anteil am Gesamtverbrauch hatten. Nach Ablauf von 2 Stunden zeigte sich eine Dosis-Wirkungsbeziehung zwischen der eingesetzten Menge an Myxothiazol und der Reduktion des NAS. Zu diesem Zeitpunkt konnte außerdem durch LPS im Vergleich zu den unstimulierten Zellen eine Steigerung des NAS erreicht werden, welche zum Zeitpunkt 6 h nicht mehr nachweisbar war. Dies könnte an einer im

Zeitverlauf geringeren Verfügbarkeit von ATP gelegen haben. Zusätzlich ergaben sich bei den Messungen des NAS innerhalb der unstimulierten Zellen zu keinem Zeitpunkt Unterschiede zwischen den mit Myxothiazol behandelten Populationen (**Abbildung 19**). Es ist daher wahrscheinlich, dass Myxothiazol alleinig keinen Einfluss auf die Aktivität der NOX hatte.

#### 4.4.3. NOX unabhängige ROS

Der Gehalt an iROS der LPS-stimulierten, MYX1-belasteten und der Kontrollzellen war ähnlich (**Abbildung 20**). Der durch VAS2870 und Oligomycin nicht beeinflussbare Sauerstoffverbrauch beider Populationen wies keinen signifikanten Unterschied auf (**Abbildung 23**), allerdings war der NAS der MYX1-belasteten Zellen signifikant niedriger (**Abbildung 19**). Hier war offenbar ein weiterer, nicht erfasster Mechanismus für den ähnlichen iROS-Gehalt beider Populationen verantwortlich.

Hierfür gibt es zwei mögliche Erklärungen. Zunächst könnten die Schutzmechanismen wie das Glutathion-Peroxidase-System an Effektivität verloren haben, da die Biosynthese des Glutathions ATP benötigt (Forman et al., 2009). Ein Hinweis hierfür ist, dass LPS die *de novo* Biosynthese des Glutathions in Monozyten reduziert (Zhang et al., 2017), während es zusätzlich die Glutathion-Aufnahme erhöht (Seres et al., 2000). Des Weiteren stellt Glutathion ein zusätzliches Zielmolekül des pan-NOX Hemmers VAS2870 dar, welchen wir in unserer Arbeit benutzten (Sun et al., 2012, Reis et al., 2020). Dies könnte den signifikanten Anstieg der iROS der Monozyten nach der VAS2870 Behandlung miterklären (**Abbildung 20**). Dies insbesondere auch, wenn die NOX als ROS-Quelle durch Wirkung des VAS2870 ausgeschlossen war.

Alternativ oder zusätzlich könnten NOX-unabhängige iROS durch die MYX1-Belastung entstanden sein (Starkov and Fiskum, 2001). MYX2-belastete Zellen zeigten einen signifikant höheren Gehalt an iROS als MYX1-belastete und Kontrollzellen. Eine Hemmung der NOX steigerte diesen Effekt signifikant (**Abbildung 20**). Eine mögliche Quelle für NOX-unabhängige iROS Produktion könnte mitochondrial sein (Orr et al., 2015, Starkov and Fiskum, 2001).

#### 4.4.4. ROS: künstliche Fehlerquelle oder Mitspieler in der Hierarchie?

Diese mitochondrialen iROS stabilisieren HIF-1 $\alpha$  durch die Hemmung des Enzyms prolyl Hydroxylase (PHD) (Calvani et al., 2012, Guzy et al., 2008, Hagen, 2012, Lee et al., 2016). Interessanterweise kann Myxothiazol auch die Stabilisierung des HIF-1 $\alpha$  verhindern (Orr et al., 2015). Allerdings wurde Myxothiazol im Rahmen dieser Forschungsarbeiten in Konzentrationen eingesetzt, welche das 50- bis 100-fache der höchsten Konzentration unserer Arbeit entsprechen (Starkov and Fiskum, 2001, Orr et al., 2015). Darüber hinaus findet selbst im Falle einer Akkumulation von HIF-1 $\alpha$  in humanen Monozyten keine Translokation zum Zellkern statt. Eine Stimulation mit LPS hat hierauf keinen weiteren Einfluss (Fangradt et al., 2012). Die Effekte einer Hypoxie und einer LPS Stimulation werden bei humanen Monozyten nicht durch HIF-1 $\alpha$ , sondern hauptsächlich durch den nukleären Faktor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) vermittelt (Guha and Mackman, 2001, Strehl et al., 2014).

Die erhöhten iROS in unserer Arbeit könnten mit der Mitogen-aktivierten Proteinkinase p38 (MAPK-p38) interagiert haben (Carter et al., 1999, Lee et al., 2019). Die Kinase MAPK-p38 vermittelt neben mTOR einige intrazelluläre Effekte einer Stimulation mit LPS, nicht mitochondriale iROS sind für ihre Aktivierung notwendig (Lee et al., 2019). Darüber hinaus greift die AMPK bei LPS-stimulierten Monozyten unter glukosefreien Bedingungen in unterschiedlichen Prozessen ein. Darunter befinden sich die Oxidation von freien Fettsäuren und die ROS-Produktion durch NOX (Raulien et al., 2017). Zusätzlich können iROS in murinen Zellen die AMPK aktivieren (Hinchy et al., 2018). Wenn dies auf humane Monozyten übertragbar ist, erschweren die iROS in unserer Arbeit die Interpretation unserer Ergebnisse. Sollten die iROS unter metabolischer Belastung jedoch *in vivo* in ähnlicher Weise wie in unserer Arbeit entstehen, könnten sie für die Hierarchie als Botenstoff eine zentrale Rolle einnehmen.

#### 4.4.5. Antigenpräsentation, endotheliale Adhäsion

Neben der Produktion von ROS und der Phagozytose zählen die Präsentation von Antigenen und die Adhäsion/transendotheliale Migration zu den wichtigsten Funktionen humaner Monozyten (Dale et al., 2008, Schittenhelm et al., 2017). Die Oberflächenexpression von HLA-DR (MFI, **Abbildung 26**) und CD11b (% positiv, **Abbildung 25**), stellvertretend für beide Funktionen, zeigten sich infolge der MYX1-

und MYX2-Belastung signifikant erniedrigt. Diese Abnahme suggeriert, dass sich eine metabolische Belastung negativ auf die Immunkompetenz bzw. die Antigenpräsentation und Rekrutierung der Monozyten zum Inflammationsgeschehen auswirkt (Schittenhelm et al., 2017, Tamulyte et al., 2019).

Einen Einfluss auf die Expression von CD11b könnte Myxothiazol durch die verursachte Erhöhung der iROS haben. Es ist bekannt, dass iROS bei LPS-stimulierten Monozyten die MFI von CD11b erhöhen, dies ist vermittelt durch MAPK-p38 (Lee et al., 2019). In der Studie von Lee und Kollegen bewirkte die Hemmung der Glykolyse mit 2-DG das Ausbleiben einer Steigerung der MFI von CD11b. Dies steht im Einklang mit unseren Ergebnissen, da wir in Abwesenheit von Glukose gearbeitet haben (Lee et al., 2019). Die LPS-stimulierten Monozyten in unserer Arbeit zeigten sich ohne Myxothiazol-Behandlung dennoch in der Lage, die prozentuale Positivpopulation für CD11b unter Glukoseentzug zu steigern (**Abbildung 25**). In der LPS-stimulierten Gruppe war die prozentuale Positivpopulation für CD11b bereits unter MYX1 Belastung signifikant reduziert (**Abbildung 25**). Da die MYX2 Belastung, nicht aber die MYX1 Belastung, die iROS der Monozyten steigerte (**Abbildung 20**), lag in unserer Arbeit unter MYX 1 Belastung wahrscheinlich keine zusätzliche Stimulation zur Erhöhung der prozentualen CD11b Expression vor. Die Abnahme dieser Expression unter MYX1 Belastung (**Abbildung 25**) lässt sich somit eher mit einem weiteren, möglicherweise substrat-abhängigen, Mechanismus erklären.

#### 4.4.6. Produktion inflammatorischer Zytokine

Ein Merkmal von humanen Monozyten ist die Produktion von inflammatorischen Zytokinen als Antwort auf unterschiedliche Stimuli wie z.B. im arthritischen Gelenk (Roberts et al., 2015). Humane Monozyten tragen wesentlich zur Pathogenese der Sepsis bei, indem sie inflammatorische Zytokine wie TNF- $\alpha$  sezernieren, welche ihren Höchstwert nach 2 Stunden erreichen und bereits nach 6 Stunden nicht mehr nachweisbar sind. Der hieraus entstehende „Zytokinsturm“ ist ein Kernmerkmal der Pathophysiologie der Sepsis und wird als derzeit potenzielle therapeutische Angriffsstelle angesehen (Chousterman et al., 2017). Zur Modellierung dieses „Zytokinsturms“ untersuchten wir die Produktion der Zytokine IL-1 $\beta$ , IL-6 and TNF- $\alpha$ .

Der intrazelluläre Gehalt humaner Monozyten für diese Zytokine weist in den ersten 6 Stunden nach einer LPS-Stimulation und einer Sekretionsblockade mit

Brefeldin A einen nahezu linearen Anstieg über die Zeit auf (Schuerwegh et al., 2001). Dementsprechend eignen sich diese Zytokine gut, Unterschiede zur Produktionsdynamik in dem hier präsentierten Modell herauszuarbeiten. So haben zu diesen Unterschieden hauptsächlich die Abwesenheit von Glukose sowie die verminderte mitochondriale ATP Produktion beigetragen.

Infolge der metabolischen Belastung nahm vor allem die Produktion von IL-1 $\beta$  ab (**Abbildung 27**). Das Zytokin TNF- $\alpha$  war geringer von dieser Abnahme betroffen. Zwar fanden sich im Zeitverlauf ebenfalls weniger TNF- $\alpha$  positive Monozyten, trotz dessen kompensierten diese offenbar über eine Zunahme der Produktion pro Zelle, was sich aus der MFI-Zunahme ableiten lässt (**Abbildung 27**). Die Produktion von IL-6 wies die größte Dynamik auf: nach 4 Stunden konnten die Monozyten unbeachtet der metabolischen Belastung die gleiche Menge IL-6 produzieren. Insgesamt sprechen die Daten unseres Modells für eine höhere Priorität der IL-6 Produktion gegenüber der Produktion von TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$ .

## **4.5. Limitationen**

### **4.5.1. Methodische Limitationen und Verzicht auf die Glykolyse**

In der vorliegenden Arbeit etablierten wir ein Modell mit dem Ziel, den Einfluss von metabolisch ungünstigen Bedingungen auf die immunologisch relevante Funktionalität von Monozyten zu untersuchen. Die Monozyten wurden mithilfe einer positiven CD14 Selektion isoliert, sie stammten aus dem peripheren Blut gesunder Mitarbeiter\*innen des Labors. Aus diesen Gründen ist die hieraus entstehende Abbildung aller Monozyten-Subtypen (klassisch, intermediär, nicht klassisch), wie sie im Blut oder in der Synovialflüssigkeit vorliegen, nicht sicher der Realität entsprechend. Außerdem wandten wir zur Untersuchung des Metabolismus der Monozyten die Sauerstoffverbrauchsmessung mithilfe der Clark-Elektrode an. Trotz der Sorgfalt bei den Sauerstoffverbrauchsmessungen war das Eindringen von Luft über den Arbeitskanal des Polykarbonat-Stöpsels der Messkammer (**Abbildung 7**) ein möglicher Störfaktor für die Genauigkeit der Messungen. Dies verursachte in einzelnen Messungen eine geringe Erhöhung des Sauerstoffgehaltes im Medium, was negative Messwerte des Sauerstoffverbrauches zur Folge hatte (**Abbildungen 23 und 24**). Dieser Störfaktor beeinflusste jedoch lediglich die Sauerstoffverbrauchswerte der

Reservekapazität und des nicht durch VAS2870 und Oligomycin A beeinflussbaren Sauerstoffverbrauches (**Abbildungen 23 und 24**). Der MAS sowie der NAS waren nämlich das rechnerische Ergebnis eines Unterschieds zwischen dem Wert vor- und nach der Gabe eines spezifischen Inhibitors und somit hier unbeeinflusst.

Um Bedingungen einer metabolischen Belastung kontrolliert herzustellen, war eine irreversible Einschränkung der mitochondrialen ATP Produktion mit Myxothiazol notwendig (Thierbach and Reichenbach, 1981, Buttgerit and Brand, 1995). Eine parallel kontrollierte, graduelle Reduktion der Glykolyse wäre nicht sinnvoll gewesen, weswegen wir uns für einen vollständigen Glukoseentzug entschieden haben. In menschlichen Monozyten wird die Transkription der TNF- $\alpha$  messenger Ribonukleinsäure (mRNA) durch die Bindung mit der Glycerinaldehyd-3phosphat-dehydrogenase (GAPDH) unterdrückt, ein Mechanismus, welcher sensitiv auf Änderungen des glykolytischen Flusses reagiert (Millet et al., 2016). Weiterhin reduziert die Glykolyse die Oberflächenexpression von CD11b infolge einer LPS Stimulation (Lee et al., 2019). So hätte die Glykolyse, sofern in unterschiedlichem Maße in unserem Modell vorhanden, die Aussagekraft unserer Ergebnisse bezüglich dieser wesentlichen Untersuchungsendpunkte einschränken können.

#### **4.5.2. Bedeutung der Glykolyse bei Monozyten/Makrophagen**

Weiterhin ist Bedeutung der Glykolyse in menschlichen Monozyten/Makrophagen nicht vollständig geklärt. Die aktuelle Literatur liefert widersprüchliche Aussagen. Mehrere Arbeiten benutzten Glukose-Isotope oder 2-Deoxyglukose (2-DG) in Mauszellen und konnten zeigen, dass sich der Stoffwechsel in LPS-aktivierten Monozyten/Makrophagen zugunsten der Glykolyse verschiebt, diese außerdem essentiell für die Produktion von TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  *in vivo* ist (Tannahill et al., 2013, Rodriguez-Prados et al., 2010). Außerdem konnte gezeigt werden, dass die Differenzierung von menschlichen Monozyten zu Makrophagen ebenfalls durch 2-DG beeinflussbar ist (Suzuki et al., 2016). Im Gegensatz hierzu konnten Liu und Kollegen zeigen, dass infolge einer Stimulation mit LPS menschliche Monozyten die Quelle ihrer ATP-Produktion von der Glykolyse zugunsten der OXPHOS verschieben (Liu et al., 2015). Des Weiteren wurden in einem kürzlich veröffentlichten Bericht Monozyten/Makrophagen der Maus den menschlichen Zellen gegenübergestellt. Hier erwies sich infolge einer LPS-Stimulation die OXPHOS als primäre ATP-Quelle, im

Gegensatz zu den Mauszellen, welche hierzu vordergründig die Glykolyse nutzen (Vijayan et al., 2019). Darüber hinaus lieferte eine jüngst veröffentlichte Arbeit an menschlichen Monozyten/Makrophagen weitere Erkenntnisse zur Glykolyse: ein Glukoseentzug hat keinen wesentlichen Einfluss auf die LPS-induzierte Zytokin-Antwort der Zellen. Der in anderen Studien beobachtete Effekt des 2-DG ist nicht auf eine reduzierte Glykolyse, sondern auf einer Zunahme der Fehlfaltungsantwort bei der Proteinproduktion zurückzuführen (Murugina et al., 2020). So steht unser Ergebnis, d.h. die uneingeschränkte Zytokinproduktion bei menschlichen Monozyten trotz Glukoseentzug, zumindest teilweise im Einklang mit der aktuellen Literatur.

#### **4.6. Einordnung der Ergebnisse in die aktuelle Literatur**

##### **4.6.1. Der mitochondriale Stoffwechsel**

Die Modellierung einer beeinträchtigten mitochondrialen ATP-Produktion, wie in unserer Arbeit vorgenommen, könnte wertvolle Informationen zur Pathogenese Monozyten-vermittelter Erkrankungen liefern. Wichtige Beispiele sind die Atherosklerose (Moroni et al., 2019) und die RA (Zeisbrich et al., 2018). Hier zeigen Monozyten/Makrophagen einen mitochondrialen Hypermetabolismus (Zeisbrich et al., 2018), dies jedoch im Kontext einer Hypoxie (Sluimer et al., 2008, Falchuk et al., 1970). Die Prävalenz der Atherosklerose sowie der RA erreichen ihre höchsten Werte innerhalb der älteren Populationsschichten (Wang and Bennett, 2012, van Onna and Boonen, 2016). Die mitochondriale Reservekapazität der Monozyten nimmt im Alter von 60-80 deutlich ab, verglichen mit 18-35-Jährigen (Pence and Yarbrow, 2018), die pathophysiologische Bedeutung hiervon ist bislang unklar. Mausmodelle bestätigten dies bereits bei der Atherosklerose, da hier die alters-assoziierte mitochondriale Dysfunktion ihre Entstehung beschleunigt (Tyrrell et al., 2020). Monozyten sowie Makrophagen von RA Patienten im Alter von durchschnittlich 54,3 Jahren haben verglichen mit gesunden Kontrollen sowohl eine erhöhte Reservekapazität als auch einen höheren mitochondrialen Grundumsatz (Zeisbrich et al., 2018). Es fehlt insgesamt an Modellen, welche die metabolischen Voraussetzungen von Zellen älterer Patienten berücksichtigen. Ein Modell mit reduziertem mitochondrialem Stoffwechsel könnte so neben dem besseren Verständnis der metabolischen Situation bei diesen Erkrankungen, auch besser auf eine alternde Gesellschaft übertragbar sein.

#### **4.6.2. Phagozytose und IL-6 bei der Atherosklerose, Karzinogenese und RA**

Auf zellulärer Ebene sind Monozyten in Mausmodellen wichtige Protagonisten in der Pathogenese der Atherosklerose. Sie differenzieren entweder zu Schaumzellen, oder halten als Makrophagen die chronische Entzündungsreaktion in der Subintima der Gefäßwand aufrecht (Williams et al., 2020, Kim et al., 2018). Besonders in den letzten Jahren ist die Aufmerksamkeit auf den chronischen Entzündungsprozess der Atherosklerose gelenkt worden (Ridker and Luscher, 2014). Zunächst konnte in Mausmodellen eine zentrale Rolle für das Zytokin IL-6 in der Entstehung der Erkrankung ausgearbeitet werden (Schuett et al., 2012). Im Verlauf wurden gezielte Therapien gegen die Zytokine IL-1 $\beta$  und IL-6 bei der Atherosklerose klinisch eingesetzt. Anakinra, ein monoklonaler IL-1 $\beta$  Antikörper, zeigte in der CANTOS Studie eine signifikante Reduktion kardiovaskulärer Ereignisse bei Patienten nach einem Myokardinfarkt, ohne Einfluss auf die Lipoproteine im Serum (Ridker et al., 2017). Die klinischen Vorteile einer Gabe von Tocilizumab werden derzeit bei Patienten mit Zustand nach Myokardinfarkt untersucht, nachdem erste positive Effekte belegt wurden (Kleveland et al., 2016).

Auf molekularer Ebene stehen Monozyten verschiedene Mechanismen zur Verfügung, um die Immunantwort gegen maligne Zellen zu unterstützen. Sie können Zytokine produzieren, welche bei Tumorzellen eine Apoptose auslösen (Griffith et al., 1999) oder diese Antikörper-vermittelt abtöten (Olingy et al., 2019, Yeap et al., 2016). Im Gegensatz hierzu können sie auch, wie einleitend erwähnt, das Tumorwachstum durch eine chronische Entzündung begünstigen (Prenen and Mazzone, 2019, Rivera and Bergers, 2015, Lavin et al., 2017). Monozyten sind, wie in unserem Modell, in der Mikroumgebung von malignen Tumoren aufgrund von Hypoxie und Nährstoffmangel besonderen metabolischen Herausforderungen ausgesetzt (Lau and Heiden, 2020, Xiao et al., 2019). Funktionell konnte in Mausmodellen für IL-6 eine immunsuppressive Wirkung auf die anti-tumorale Immunantwort nachgewiesen werden. So zeigten Kitamura und Kollegen, dass IL-6 im Tumorgebiet die HLA-DR Expression von dendritischen Zellen reduziert. Als Konsequenz war ihre Immunkompetenz herabgesetzt. Insbesondere ihre Fähigkeit, Tumorantigene zu präsentieren, um T-Zellen mit antitumoröser Aktivität zu aktivieren, war hierdurch beeinträchtigt (Kitamura et al., 2017). Kong und Kollegen zeigten, dass Mäuse mit hepatozellulärem Karzinom im Vergleich zu gesunden Kontrollen signifikant höhere IL-6 Spiegel und

Monozytenzahlen im peripheren Blut aufweisen (Kong et al., 2016). Klinisch werden das IL-6 bzw. der lösliche IL-6 Rezeptor als Biomarker im Rahmen der Therapie des Ösophagus-, Kolorektal-, und Pankreaskarzinoms diskutiert (Makuuchi et al., 2013, Knupfer and Preiss, 2010, Mitsunaga et al., 2013). So scheint das Zytokin IL-6 eine wichtige Rolle bei der Entstehung von malignen Tumoren zu spielen.

Mit der Produktion inflammatorischer Zytokine und einem erhöhten Zellumsatz sind Monozyten bei der RA an der Entzündung im arthritischen Gelenk maßgeblich beteiligt (Smiljanovic et al., 2018). Seit den 1980er Jahren ist bekannt, dass Monozyten von RA-Patienten insgesamt eine höhere Phagozytoseaktivität als Gesunde aufweisen (Steven et al., 1984). Besonders eine Zunahme der Fähigkeit zur Antikörper-vermittelten Phagozytose ist bei RA-Patienten zu beobachten (Hoch and Schur, 1981). Monozyten in der Synovia des arthritischen Gelenks weisen eine hohe CD16 Expression auf, was ihnen eine effektivere Antikörper-vermittelte Phagozytose ermöglicht (Yoon et al., 2014). Diese synovialen Monozyten spielen eine wichtige Rolle in der Induktion einer pathologischen, krankheitsfördernden, T-helfer 17 (Th17) Antwort bei CD4 positiven T-Zellen (Yoon et al., 2014). In einem kürzlich veröffentlichten Bericht konnten Lee und Kollegen zeigen, dass das von Monozyten produzierte IL-6 wesentlich zur Induktion der Expression von CD16 bei Monozyten beiträgt (Lee et al., 2020). Das von Monozyten produzierte IL-6 ist außerdem essenziell, um im arthritischen Gelenk eine Progression der RA mittels Th17 Antwort zu verursachen (Zheng et al., 2014). Klinisch gehören Anti-TNF- $\alpha$  Antikörper zu den wichtigsten modernen therapeutischen Optionen bei der RA (Kerschbaumer et al., 2020). Interessanterweise ist die Unterdrückung der Produktion des monozytären IL-6 einer der Hauptmechanismen, mit denen Anti-TNF- $\alpha$  Antikörper ihre therapeutische Wirkung erzielen (Zheng et al., 2014).

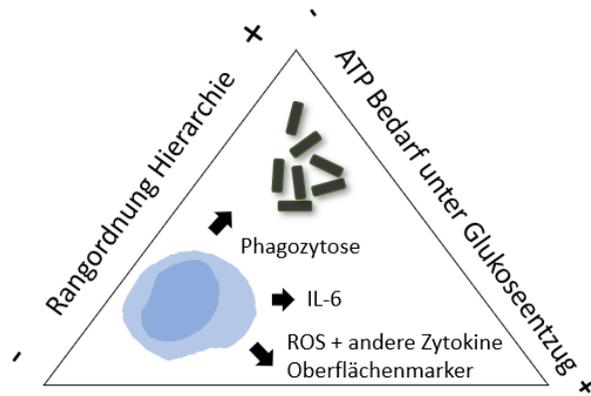
Zusammenfassend lässt sich für die Phagozytose und die IL-6 Produktion von humanen Monozyten in der aktuellen Literatur eine substantielle pathophysiologische Rolle für die Atherosklerose, Karzinogenese und RA hervorheben. Auch eine metabolische Belastung der Monozyten kennzeichnet die Pathogenese dieser Erkrankungen. Insgesamt untermauert die aktuelle Literatur die in dieser Arbeit herausgearbeitete metabolische Hierarchie von Immunprozessen bei humanen Monozyten.

## 5. Zusammenfassung und Fazit

Als Immunzellen benötigen Monozyten eine ausreichende Versorgung u.a. an Energie in Form von ATP und biosynthetischen Bausteinen, um funktionieren zu können. Diese Versorgung wird durch Verstoffwechslung u.a. von Glukose, Aminosäuren sowie Sauerstoff aus der Mikroumgebung gewährleistet. Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, ein *in vitro* Modell zur Beeinträchtigung des Zellstoffwechsels zu etablieren, wie sie in der Mikroumgebung entzündlicher Prozesse vorliegt, wie z.B. im entzündeten Gelenk von Patienten mit RA. Mithilfe dieses Modells sollte untersucht werden, wie menschliche Monozyten auf einer graduellen Einschränkung ihres Stoffwechsels reagieren. Insbesondere sollte herausgefunden werden, ob hiervon die Ausführung wesentlicher immunologischer Prozesse gleichermaßen oder differenziert betroffen ist. In anderen Worten: ob eine metabolische Hierarchie der immunologischen Prozesse menschlicher Monozyten möglich ist.

Wir etablierten erfolgreich ein Modell mit einer kontrollierten Einschränkung des Stoffwechsels durch vollständigen Glukoseentzug und Hemmung der Atmungskette mit Myxothiazol. Es wurden CD14+ Monozyten mit LPS stimuliert und infolge gradueller Hemmung des Stoffwechsels die Ausführung von Phagozytose, Produktion von ROS, Expression wichtiger Oberflächenmarker sowie Produktion inflammatorischer Zytokine untersucht. Unsere Ergebnisse sprechen klar für die Existenz einer metabolischen Hierarchie der Immunprozesse bei menschlichen Monozyten. Wir identifizierten durch unsere Ergebnisse die Phagozytose und die Produktion des Zytokins IL-6 als höherrangige Funktionen, verglichen mit der Produktion von ROS, anderer Zytokine sowie der Expression von Oberflächenmarkern (**Abbildung 29**).

Die Mechanismen, welche für diese Hierarchie ursächlich sind, bleiben zu erforschen. Zunächst kann nicht davon ausgegangen werden, dass diese Hierarchie für die Monozyten in allen Situationen des beeinträchtigten Stoffwechsels gleich ausfallen wird. Die Vielzahl an Variablen des untersuchten Systems wie u.a. die Art der Stimulation, Zusammensetzung der Mikroumgebung oder interindividuelle Unterschiede verändern mit hoher Wahrscheinlichkeit die metabolischen Verhältnisse je nach Krankheitsbild oder Individuum.



**Abbildung 29: Vereinfachte graphische Darstellung der metabolischen Hierarchie der Immunprozesse bei humanen Monozyten, welche in dieser Arbeit untersucht wurden.**

Dennoch konnten wir hier zeigen, dass eine metabolische Hierarchie in menschlichen Monozyten vorliegen kann. Das Prinzip einer metabolischen Hierarchie, sofern z.B. auf maligne Tumoren, die RA oder Atherosklerose übertragbar, könnte sich als sinnvoller Forschungsgegenstand zur Erarbeitung neuer therapeutischer Ansätze erweisen.

## 6. Literaturverzeichnis

- ARTS, R. J., NOVAKOVIC, B., TER HORST, R., CARVALHO, A., BEKKERING, S., LACHMANDAS, E., RODRIGUES, F., SILVESTRE, R., CHENG, S. C., WANG, S. Y., HABIBI, E., GONCALVES, L. G., MESQUITA, I., CUNHA, C., VAN LAARHOVEN, A., VAN DE VEERDONK, F. L., WILLIAMS, D. L., VAN DER MEER, J. W., LOGIE, C., O'NEILL, L. A., DINARELLO, C. A., RIKSEN, N. P., VAN CREVEL, R., CLISH, C., NOTEBAART, R. A., JOOSTEN, L. A., STUNNENBERG, H. G., XAVIER, R. J. & NETEA, M. G. 2016. Glutaminolysis and Fumarate Accumulation Integrate Immunometabolic and Epigenetic Programs in Trained Immunity. *Cell Metab*, 24, 807-819.
- BACK, M., YURDAGUL, A., JR., TABAS, I., OORNI, K. & KOVANEN, P. T. 2019. Inflammation and its resolution in atherosclerosis: mediators and therapeutic opportunities. *Nat Rev Cardiol*, 16, 389-406.
- BELGE, K. U., DAYYANI, F., HORELT, A., SIEDLAR, M., FRANKENBERGER, M., FRANKENBERGER, B., ESPEVIK, T. & ZIEGLER-HEITBROCK, L. 2002. The proinflammatory CD14+CD16+DR++ monocytes are a major source of TNF. *J Immunol*, 168, 3536-42.
- BELLAVITE, P. 1988. The superoxide-forming enzymatic system of phagocytes. *Free Radic Biol Med*, 4, 225-61.
- BINAI, N., O'REILLY, S., GRIFFITHS, B., VAN LAAR, J. M. & HUGLE, T. 2012. Differentiation potential of CD14+ monocytes into myofibroblasts in patients with systemic sclerosis. *PLoS One*, 7, e33508.
- BLAGIH, J., COULOMBE, F., VINCENT, E. E., DUPUY, F., GALICIA-VAZQUEZ, G., YURCHENKO, E., RAISSI, T. C., VAN DER WINDT, G. J., VIOLLET, B., PEARCE, E. L., PELLETIER, J., PICCIRILLO, C. A., KRAWCZYK, C. M., DIVANGAHI, M. & JONES, R. G. 2015. The energy sensor AMPK regulates T cell metabolic adaptation and effector responses in vivo. *Immunity*, 42, 41-54.
- BOBRY SHEV, Y. V. 2006. Monocyte recruitment and foam cell formation in atherosclerosis. *Micron*, 37, 208-22.
- BONE, R. C., GRODZIN, C. J. & BALK, R. A. 1997. Sepsis: a new hypothesis for pathogenesis of the disease process. *Chest*, 112, 235-43.
- BOSQUES, C. J. & MANNING, A. M. 2016. Fc-gamma receptors: Attractive targets for autoimmune drug discovery searching for intelligent therapeutic designs. *Autoimmun Rev*, 15, 1081-1088.
- BUTTGEREIT, F. & BRAND, M. D. 1995. A hierarchy of ATP-consuming processes in mammalian cells. *Biochem J*, 312 ( Pt 1), 163-7.
- BUTTGEREIT, F., BRAND, M. D. & MULLER, M. 1992. ConA induced changes in energy metabolism of rat thymocytes. *Biosci Rep*, 12, 381-6.
- BUTTGEREIT, F., BURMESTER, G. R. & BRAND, M. D. 2000. Bioenergetics of immune functions: fundamental and therapeutic aspects. *Immunol Today*, 21, 192-9.
- CALANDRA, T. & GLAUSER, M. P. 1990. Cytokines and septic shock. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 13, 377-81.
- CALVANI, M., COMITO, G., GIANNONI, E. & CHIARUGI, P. 2012. Time-dependent stabilization of hypoxia inducible factor-1alpha by different intracellular sources of reactive oxygen species. *PLoS One*, 7, e38388.
- CARTER, A. B., MONICK, M. M. & HUNNINGHAKE, G. W. 1999. Both Erk and p38 kinases are necessary for cytokine gene transcription. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 20, 751-8.
- CAVAILLON, J. M. 2018. Exotoxins and endotoxins: Inducers of inflammatory cytokines. *Toxicon*, 149, 45-53.
- CHACKO, B. K., KRAMER, P. A., RAVI, S., JOHNSON, M. S., HARDY, R. W., BALLINGER, S. W. & DARLEY-USMAR, V. M. 2013. Methods for defining distinct bioenergetic profiles in platelets, lymphocytes, monocytes, and neutrophils, and the oxidative burst from human blood. *Lab Invest*, 93, 690-700.
- CHENG, S. C., QUINTIN, J., CRAMER, R. A., SHEPARDSON, K. M., SAEED, S., KUMAR, V., GIAMARELLOS-BOURBOULIS, E. J., MARTENS, J. H., RAO, N. A., AGHAJANIREFAH, A., MANJERI, G. R., LI, Y., IFRIM, D. C., ARTS, R. J., VAN DER VEER, B. M., DEEN, P. M., LOGIE, C., O'NEILL, L. A.,

- WILLEMS, P., VAN DE VEERDONK, F. L., VAN DER MEER, J. W., NG, A., JOOSTEN, L. A., WIJMEGA, C., STUNNENBERG, H. G., XAVIER, R. J. & NETEA, M. G. 2014. mTOR- and HIF-1alpha-mediated aerobic glycolysis as metabolic basis for trained immunity. *Science*, 345, 1250684.
- CHOUSTERMAN, B. G., SWIRSKI, F. K. & WEBER, G. F. 2017. Cytokine storm and sepsis disease pathogenesis. *Semin Immunopathol*, 39, 517-528.
- CINOVA, J., PALOVA-JELINKOVA, L., SMYTHIES, L. E., CERNA, M., PECHAROVA, B., DVORAK, M., FRUHAUF, P., TLASKALOVA-HOGENOVA, H., SMITH, P. D. & TUCKOVA, L. 2007. Gliadin peptides activate blood monocytes from patients with celiac disease. *J Clin Immunol*, 27, 201-9.
- CLARK, L. C., JR., WOLF, R., GRANGER, D. & TAYLOR, Z. 1953. Continuous recording of blood oxygen tensions by polarography. *J Appl Physiol*, 6, 189-93.
- COOPER, D. L., MARTIN, S. G., ROBINSON, J. I., MACKIE, S. L., CHARLES, C. J., NAM, J., CONSORTIUM, Y., ISAACS, J. D., EMERY, P. & MORGAN, A. W. 2012. FcgammaRIIIa expression on monocytes in rheumatoid arthritis: role in immune-complex stimulated TNF production and non-response to methotrexate therapy. *PLoS One*, 7, e28918.
- COSSARIZZA, A., CHANG, H. D., RADBRUCH, A., AKDIS, M., ANDRA, I., ANNUNZIATO, F., BACHER, P., BARNABA, V., BATTISTINI, L., BAUER, W. M., BAUMGART, S., BECHER, B., BEISKER, W., BEREK, C., BLANCO, A., BORSELLINO, G., BOULAIS, P. E., BRINKMAN, R. R., BUSCHER, M., BUSCH, D. H., BUSHNELL, T. P., CAO, X., CAVANI, A., CHATTOPADHYAY, P. K., CHENG, Q., CHOW, S., CLERICI, M., COOKE, A., COSMA, A., COSMI, L., CUMANO, A., DANG, V. D., DAVIES, D., DE BIASI, S., DEL ZOTTO, G., DELLA BELLA, S., DELLABONA, P., DENIZ, G., DESSING, M., DIEFENBACH, A., DI SANTO, J., DIELI, F., DOLF, A., DONNENBERG, V. S., DORNER, T., EHRHARDT, G. R. A., ENDL, E., ENGEL, P., ENGELHARDT, B., ESSER, C., EVERTS, B., DREHER, A., FALK, C. S., FEHNIGER, T. A., FILBY, A., FILLATREAU, S., FOLLO, M., FORSTER, I., FOSTER, J., FOULDS, G. A., FRENETTE, P. S., GALBRAITH, D., GARBI, N., GARCIA-GODOY, M. D., GEGINAT, J., GHORESCHI, K., GIBELLINI, L., GOETTLINGER, C., GOODYEAR, C. S., GORI, A., GROGAN, J., GROSS, M., GRUTZKAU, A., GRUMMITT, D., HAHN, J., HAMMER, Q., HAUSER, A. E., HAVILAND, D. L., HEDLEY, D., HERRERA, G., HERRMANN, M., HIEPE, F., HOLLAND, T., HOMBRINK, P., HOUSTON, J. P., HOYER, B. F., HUANG, B., HUNTER, C. A., IANNONE, A., JACK, H. M., JAVEGA, B., JONJIC, S., JUELKE, K., JUNG, S., KAISER, T., KALINA, T., KELLER, B., KHAN, S., KIENHOFER, D., KRONEIS, T., et al. 2017. Guidelines for the use of flow cytometry and cell sorting in immunological studies. *Eur J Immunol*, 47, 1584-1797.
- CUPI, M. L., SARRA, M., DE NITTO, D., FRANZE, E., MARAFINI, I., MONTELEONE, I., DEL VECCHIO BLANCO, G., PAOLUZI, O. A., DI FUSCO, D., GENTILESCHI, P., ORTENZI, A., COLANTONI, A., PALLONE, F. & MONTELEONE, G. 2014. Defective expression of scavenger receptors in celiac disease mucosa. *PLoS One*, 9, e100980.
- DALE, D. C., BOXER, L. & LILES, W. C. 2008. The phagocytes: neutrophils and monocytes. *Blood*, 112, 935-45.
- EO, W. K., CHANG, H. J., KWON, S. H., KOH, S. B., KIM, Y. O., JI, Y. I., KIM, H. B., LEE, J. Y., SUH, D. S., KIM, K. H., CHANG, I. J., KIM, H. Y. & CHANG, S. C. 2016. The Lymphocyte-Monocyte Ratio Predicts Patient Survival and Aggressiveness of Ovarian Cancer. *J Cancer*, 7, 289-96.
- FALCHUK, K. H., GOETZL, E. J. & KULKA, J. P. 1970. Respiratory gases of synovial fluids. An approach to synovial tissue circulatory-metabolic imbalance in rheumatoid arthritis. *Am J Med*, 49, 223-31.
- FANGRADT, M., HAHNE, M., GABER, T., STREHL, C., RAUCH, R., HOFF, P., LOHNING, M., BURMESTER, G. R. & BUTTGEREIT, F. 2012. Human monocytes and macrophages differ in their mechanisms of adaptation to hypoxia. *Arthritis Res Ther*, 14, R181.
- FEARON, U., HANLON, M. M., WADE, S. M. & FLETCHER, J. M. 2019. Altered metabolic pathways regulate synovial inflammation in rheumatoid arthritis. *Clin Exp Immunol*, 197, 170-180.
- FORMAN, H. J., ZHANG, H. & RINNA, A. 2009. Glutathione: overview of its protective roles, measurement, and biosynthesis. *Mol Aspects Med*, 30, 1-12.

- FRENCH, J. K., HURST, N. P. & BETTS, W. H. 1990. Phorbol 12-myristate 13-acetate, A23187 and L-adrenaline inhibit phospholipid methylation in human monocytes and lymphocytes. Inhibition is independent of oxyradical production and phospholipid hydrolysis. *Free Radic Biol Med*, 9, 271-7.
- GABER, T., STREHL, C. & BUTTGEREIT, F. 2017. Metabolic regulation of inflammation. *Nat Rev Rheumatol*, 13, 267-279.
- GANESHAN, K. & CHAWLA, A. 2014. Metabolic regulation of immune responses. *Annu Rev Immunol*, 32, 609-34.
- GOTZINGER, P., SAUTNER, T., SPITTLER, A., BARLAN, M., WAMSER, P., ROTH, E., JAKESZ, R. & FUGGER, R. 2000. Severe acute pancreatitis causes alterations in HLA-DR and CD14 expression on peripheral blood monocytes independently of surgical treatment. *Eur J Surg*, 166, 628-32.
- GRIEVINK, H. W., LUISMAN, T., KLUFT, C., MOERLAND, M. & MALONE, K. E. 2016. Comparison of Three Isolation Techniques for Human Peripheral Blood Mononuclear Cells: Cell Recovery and Viability, Population Composition, and Cell Functionality. *Biopreserv Biobank*, 14, 410-415.
- GRIFFITH, T. S., WILEY, S. R., KUBIN, M. Z., SEDGER, L. M., MALISZEWSKI, C. R. & FANGER, N. A. 1999. Monocyte-mediated tumoricidal activity via the tumor necrosis factor-related cytokine, TRAIL. *J Exp Med*, 189, 1343-54.
- GUHA, M. & MACKMAN, N. 2001. LPS induction of gene expression in human monocytes. *Cell Signal*, 13, 85-94.
- GUILLIAMS, M., MILDNER, A. & YONA, S. 2018. Developmental and Functional Heterogeneity of Monocytes. *Immunity*, 49, 595-613.
- GUZY, R. D., SHARMA, B., BELL, E., CHANDEL, N. S. & SCHUMACKER, P. T. 2008. Loss of the SdhB, but Not the SdhA, subunit of complex II triggers reactive oxygen species-dependent hypoxia-inducible factor activation and tumorigenesis. *Mol Cell Biol*, 28, 718-31.
- HAGEN, T. 2012. Oxygen versus Reactive Oxygen in the Regulation of HIF-1alpha: The Balance Tips. *Biochem Res Int*, 2012, 436981.
- HARDIE, D. G. 2011. AMP-activated protein kinase: an energy sensor that regulates all aspects of cell function. *Genes Dev*, 25, 1895-908.
- HAUK, V., FRACCAROLI, L., GRASSO, E., EIMON, A., RAMHORST, R., HUBSCHER, O. & PEREZ LEIROS, C. 2014. Monocytes from Sjogren's syndrome patients display increased vasoactive intestinal peptide receptor 2 expression and impaired apoptotic cell phagocytosis. *Clin Exp Immunol*, 177, 662-70.
- HERRMANN, M., VOLL, R. E., ZOLLER, O. M., HAGENHOFER, M., PONNER, B. B. & KALDEN, J. R. 1998. Impaired phagocytosis of apoptotic cell material by monocyte-derived macrophages from patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*, 41, 1241-50.
- HINCHY, E. C., GRUSZCZYK, A. V., WILLOWS, R., NAVARATNAM, N., HALL, A. R., BATES, G., BRIGHT, T. P., KRIEG, T., CARLING, D. & MURPHY, M. P. 2018. Mitochondria-derived ROS activate AMP-activated protein kinase (AMPK) indirectly. *J Biol Chem*, 293, 17208-17217.
- HOCH, S. & SCHUR, P. H. 1981. Monocyte receptor function in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*, 24, 1268-7.
- HU, P., SHEN, H., WANG, G., ZHANG, P., LIU, Q. & DU, J. 2014. Prognostic significance of systemic inflammation-based lymphocyte- monocyte ratio in patients with lung cancer: based on a large cohort study. *PLoS One*, 9, e108062.
- HUA, S. & DIAS, T. H. 2016. Hypoxia-Inducible Factor (HIF) as a Target for Novel Therapies in Rheumatoid Arthritis. *Front Pharmacol*, 7, 184.
- IZQUIERDO, E., CANETE, J. D., CELIS, R., SANTIAGO, B., USATEGUI, A., SANMARTI, R., DEL REY, M. J. & PABLOS, J. L. 2009. Immature blood vessels in rheumatoid synovium are selectively depleted in response to anti-TNF therapy. *PLoS One*, 4, e8131.
- JHA, A. K., HUANG, S. C., SERGUSHICHEV, A., LAMPROPOULOU, V., IVANOVA, Y., LOGINICHEVA, E., CHMIELEWSKI, K., STEWART, K. M., ASHALL, J., EVERTS, B., PEARCE, E. J., DRIGGERS, E. M. &

- ARTYOMOV, M. N. 2015. Network integration of parallel metabolic and transcriptional data reveals metabolic modules that regulate macrophage polarization. *Immunity*, 42, 419-30.
- JOFFRE, J., HELLMAN, J., INCE, C. & AIT-OUFELLA, H. 2020. Endothelial Responses in Sepsis. *Am J Respir Crit Care Med*, 202, 361-370.
- KAWAMURA, S., ONAI, N., MIYA, F., SATO, T., TSUNODA, T., KURABAYASHI, K., YOTSUMOTO, S., KURODA, S., TAKENAKA, K., AKASHI, K. & OHTEKI, T. 2017. Identification of a Human Clonogenic Progenitor with Strict Monocyte Differentiation Potential: A Counterpart of Mouse cMoPs. *Immunity*, 46, 835-848 e4.
- KENNEDY, A., NG, C. T., BINIECKA, M., SABER, T., TAYLOR, C., O'SULLIVAN, J., VEALE, D. J. & FEARON, U. 2010. Angiogenesis and blood vessel stability in inflammatory arthritis. *Arthritis Rheum*, 62, 711-21.
- KERSCHBAUMER, A., SEPRIANO, A., SMOLEN, J. S., VAN DER HEIJDE, D., DOUGADOS, M., VAN VOLLENHOVEN, R., MCINNES, I. B., BIJLSMA, J. W. J., BURMESTER, G. R., DE WIT, M., FALZON, L. & LANDEWE, R. 2020. Efficacy of pharmacological treatment in rheumatoid arthritis: a systematic literature research informing the 2019 update of the EULAR recommendations for management of rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*, 79, 744-759.
- KIM, K., SHIM, D., LEE, J. S., ZAITSEV, K., WILLIAMS, J. W., KIM, K. W., JANG, M. Y., SEOK JANG, H., YUN, T. J., LEE, S. H., YOON, W. K., PRAT, A., SEIDAH, N. G., CHOI, J., LEE, S. P., YOON, S. H., NAM, J. W., SEONG, J. K., OH, G. T., RANDOLPH, G. J., ARTYOMOV, M. N., CHEONG, C. & CHOI, J. H. 2018. Transcriptome Analysis Reveals Nonfoamy Rather Than Foamy Plaque Macrophages Are Proinflammatory in Atherosclerotic Murine Models. *Circ Res*, 123, 1127-1142.
- KITAMURA, H., OHNO, Y., TOYOSHIMA, Y., OHTAKE, J., HOMMA, S., KAWAMURA, H., TAKAHASHI, N. & TAKETOMI, A. 2017. Interleukin-6/STAT3 signaling as a promising target to improve the efficacy of cancer immunotherapy. *Cancer Sci*, 108, 1947-1952.
- KLEVELAND, O., KUNSZT, G., BRATLIE, M., UELAND, T., BROCH, K., HOLTE, E., MICHELSEN, A. E., BENDZ, B., AMUNDSEN, B. H., ESPEVIK, T., AAKHUS, S., DAMAS, J. K., AUKRUST, P., WISETH, R. & GULLESTAD, L. 2016. Effect of a single dose of the interleukin-6 receptor antagonist tocilizumab on inflammation and troponin T release in patients with non-ST-elevation myocardial infarction: a double-blind, randomized, placebo-controlled phase 2 trial. *Eur Heart J*, 37, 2406-13.
- KLOUCHE, M., MAY, A. E., HEMMES, M., MESSNER, M., KANSE, S. M., PREISSNER, K. T. & BHAKDI, S. 1999. Enzymatically modified, nonoxidized LDL induces selective adhesion and transmigration of monocytes and T-lymphocytes through human endothelial cell monolayers. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 19, 784-93.
- KNOWLES, A. F. & KAPLAN, N. O. 1980. Oxidative phosphorylation and ATPase activities of human tumor mitochondria. *Biochim Biophys Acta*, 590, 170-81.
- KNUPFER, H. & PREISS, R. 2010. Serum interleukin-6 levels in colorectal cancer patients--a summary of published results. *Int J Colorectal Dis*, 25, 135-40.
- KOMANO, Y., NANKI, T., HAYASHIDA, K., TANIGUCHI, K. & MIYASAKA, N. 2006. Identification of a human peripheral blood monocyte subset that differentiates into osteoclasts. *Arthritis Res Ther*, 8, R152.
- KONG, L., ZHOU, Y., BU, H., LV, T., SHI, Y. & YANG, J. 2016. Deletion of interleukin-6 in monocytes/macrophages suppresses the initiation of hepatocellular carcinoma in mice. *J Exp Clin Cancer Res*, 35, 131.
- KRAMER, P. A., RAVI, S., CHACKO, B., JOHNSON, M. S. & DARLEY-USMAR, V. M. 2014. A review of the mitochondrial and glycolytic metabolism in human platelets and leukocytes: implications for their use as bioenergetic biomarkers. *Redox Biol*, 2, 206-10.
- KRAUSS, S., BRAND, M. D. & BUTTGEREIT, F. 2001. Signaling takes a breath--new quantitative perspectives on bioenergetics and signal transduction. *Immunity*, 15, 497-502.

- KYLMAOJA, E., NAKAMURA, M., TURUNEN, S., PATLAKA, C., ANDERSSON, G., LEHENKARI, P. & TUUKKANEN, J. 2018. Peripheral blood monocytes show increased osteoclast differentiation potential compared to bone marrow monocytes. *Heliyon*, 4, e00780.
- LACHMANDAS, E., BOUTENS, L., RATTER, J. M., HIJMANS, A., HOOIVELD, G. J., JOOSTEN, L. A., RODENBURG, R. J., FRANSEN, J. A., HOUTKOOPER, R. H., VAN CREVEL, R., NETEA, M. G. & STIENSTRA, R. 2016. Microbial stimulation of different Toll-like receptor signalling pathways induces diverse metabolic programmes in human monocytes. *Nat Microbiol*, 2, 16246.
- LAU, A. N. & HEIDEN, M. G. V. 2020. Metabolism in the Tumor Microenvironment. *Annual Review of Cancer Biology*, 4, 17-40.
- LAVIN, Y., KOBAYASHI, S., LEADER, A., AMIR, E. D., ELEFANT, N., BIGENWALD, C., REMARK, R., SWEENEY, R., BECKER, C. D., LEVINE, J. H., MEINHOF, K., CHOW, A., KIM-SHULZE, S., WOLF, A., MEDAGLIA, C., LI, H., RYTLEWSKI, J. A., EMERSON, R. O., SOLOVYOV, A., GREENBAUM, B. D., SANDERS, C., VIGNALI, M., BEASLEY, M. B., FLORES, R., GNJATIC, S., PE'ER, D., RAHMAN, A., AMIT, I. & MERAD, M. 2017. Innate Immune Landscape in Early Lung Adenocarcinoma by Paired Single-Cell Analyses. *Cell*, 169, 750-765 e17.
- LEE, G., WON, H. S., LEE, Y. M., CHOI, J. W., OH, T. I., JANG, J. H., CHOI, D. K., LIM, B. O., KIM, Y. J., PARK, J. W., PUIGSERVER, P. & LIM, J. H. 2016. Oxidative Dimerization of PHD2 is Responsible for its Inactivation and Contributes to Metabolic Reprogramming via HIF-1alpha Activation. *Sci Rep*, 6, 18928.
- LEE, J., BRETON, G., OLIVEIRA, T. Y., ZHOU, Y. J., ALJOUFI, A., PUHR, S., CAMERON, M. J., SEKALY, R. P., NUSSENZWEIG, M. C. & LIU, K. 2015. Restricted dendritic cell and monocyte progenitors in human cord blood and bone marrow. *J Exp Med*, 212, 385-99.
- LEE, J., TAM, H., ADLER, L., ILSTAD-MINNIHAN, A., MACAUBAS, C. & MELLINS, E. D. 2017. The MHC class II antigen presentation pathway in human monocytes differs by subset and is regulated by cytokines. *PLoS One*, 12, e0183594.
- LEE, M. K. S., AL-SHAREA, A., SHIHATA, W. A., BERTUZZO VEIGA, C., COONEY, O. D., FLEETWOOD, A. J., FLYNN, M. C., CLAESON, E., PALMER, C. S., LANCASTER, G. I., HENSTRIDGE, D. C., HAMILTON, J. A. & MURPHY, A. J. 2019. Glycolysis Is Required for LPS-Induced Activation and Adhesion of Human CD14(+)CD16(-) Monocytes. *Front Immunol*, 10, 2054.
- LEE, S. J., YOON, B. R., KIM, H. Y., YOO, S. J., KANG, S. W. & LEE, W. W. 2020. Activated Platelets Convert CD14(+)CD16(-) Into CD14(+)CD16(+) Monocytes With Enhanced FcgammaR-Mediated Phagocytosis and Skewed M2 Polarization. *Front Immunol*, 11, 611133.
- LENSCHOW, D. J., WALUNAS, T. L. & BLUESTONE, J. A. 1996. CD28/B7 system of T cell costimulation. *Annu Rev Immunol*, 14, 233-58.
- LI, X., YAO, W., YUAN, Y., CHEN, P., LI, B., LI, J., CHU, R., SONG, H., XIE, D., JIANG, X. & WANG, H. 2017. Targeting of tumour-infiltrating macrophages via CCL2/CCR2 signalling as a therapeutic strategy against hepatocellular carcinoma. *Gut*, 66, 157-167.
- LI, Z. M., HUANG, J. J., XIA, Y., SUN, J., HUANG, Y., WANG, Y., ZHU, Y. J., LI, Y. J., ZHAO, W., WEI, W. X., LIN, T. Y., HUANG, H. Q. & JIANG, W. Q. 2012. Blood lymphocyte-to-monocyte ratio identifies high-risk patients in diffuse large B-cell lymphoma treated with R-CHOP. *PLoS One*, 7, e41658.
- LIU, T. F., VACHHARAJANI, V., MILLET, P., BHARADWAJ, M. S., MOLINA, A. J. & MCCALL, C. E. 2015. Sequential actions of SIRT1-RELB-SIRT3 coordinate nuclear-mitochondrial communication during immunometabolic adaptation to acute inflammation and sepsis. *J Biol Chem*, 290, 396-408.
- LUND-OLESEN, K. 1970. Oxygen tension in synovial fluids. *Arthritis Rheum*, 13, 769-76.
- MA, W. T., GAO, F., GU, K. & CHEN, D. K. 2019. The Role of Monocytes and Macrophages in Autoimmune Diseases: A Comprehensive Review. *Front Immunol*, 10, 1140.
- MAKUUCHI, Y., HONDA, K., OSAKA, Y., KATO, K., KOJIMA, T., DAIKO, H., IGAKI, H., ITO, Y., HOSHINO, S., TACHIBANA, S., WATANABE, T., FURUTA, K., SEKINE, S., UMAKI, T., WATABE, Y., MIURA, N., ONO, M., TSUCHIDA, A. & YAMADA, T. 2013. Soluble interleukin-6 receptor is a serum

- biomarker for the response of esophageal carcinoma to neoadjuvant chemoradiotherapy. *Cancer Sci*, 104, 1045-51.
- MARSIN, A. S., BOUZIN, C., BERTRAND, L. & HUE, L. 2002. The stimulation of glycolysis by hypoxia in activated monocytes is mediated by AMP-activated protein kinase and inducible 6-phosphofructo-2-kinase. *J Biol Chem*, 277, 30778-83.
- MENGOS, A. E., GASTINEAU, D. A. & GUSTAFSON, M. P. 2019. The CD14(+)/HLA-DR(lo/neg) Monocyte: An Immunosuppressive Phenotype That Restrains Responses to Cancer Immunotherapy. *Front Immunol*, 10, 1147.
- MILLET, P., VACHHARAJANI, V., MCPHAIL, L., YOZA, B. & MCCALL, C. E. 2016. GAPDH Binding to TNF-alpha mRNA Contributes to Posttranscriptional Repression in Monocytes: A Novel Mechanism of Communication between Inflammation and Metabolism. *J Immunol*, 196, 2541-51.
- MILTENYI, S., MULLER, W., WEICHEL, W. & RADBRUCH, A. 1990. High gradient magnetic cell separation with MACS. *Cytometry*, 11, 231-8.
- MITSUNAGA, S., IKEDA, M., SHIMIZU, S., OHNO, I., FURUSE, J., INAGAKI, M., HIGASHI, S., KATO, H., TERAO, K. & OCHIAI, A. 2013. Serum levels of IL-6 and IL-1beta can predict the efficacy of gemcitabine in patients with advanced pancreatic cancer. *Br J Cancer*, 108, 2063-9.
- MORONI, F., AMMIRATI, E., NORATA, G. D., MAGNONI, M. & CAMICI, P. G. 2019. The Role of Monocytes and Macrophages in Human Atherosclerosis, Plaque Neoangiogenesis, and Atherothrombosis. *Mediators Inflamm*, 2019, 7434376.
- MUKHERJEE, R., KANTI BARMAN, P., KUMAR THATOI, P., TRIPATHY, R., KUMAR DAS, B. & RAVINDRAN, B. 2015. Non-Classical monocytes display inflammatory features: Validation in Sepsis and Systemic Lupus Erythematosus. *Sci Rep*, 5, 13886.
- MURUGINA, N. E., BUDIKHINA, A. S., DAGIL, Y. A., MAXIMCHIK, P. V., BALYASOVA, L. S., MURUGIN, V. V., MELNIKOV, M. V., SHAROVA, V. S., NIKOLAEVA, A. M., CHKADUA, G. Z., PINEGIN, B. V. & PASHENKOV, M. V. 2020. Glycolytic reprogramming of macrophages activated by NOD1 and TLR4 agonists: No association with proinflammatory cytokine production in normoxia. *J Biol Chem*, 295, 3099-3114.
- O'NEILL, L. A., KISHTON, R. J. & RATHMELL, J. 2016. A guide to immunometabolism for immunologists. *Nat Rev Immunol*, 16, 553-65.
- OLINGY, C. E., DINH, H. Q. & HEDRICK, C. C. 2019. Monocyte heterogeneity and functions in cancer. *J Leukoc Biol*, 106, 309-322.
- ORR, A. L., VARGAS, L., TURK, C. N., BAATEN, J. E., MATZEN, J. T., DARDOV, V. J., ATTLE, S. J., LI, J., QUACKENBUSH, D. C., GONCALVES, R. L., PEREVOSHCHIKOVA, I. V., PETRASSI, H. M., MEEUSEN, S. L., AINSCOW, E. K. & BRAND, M. D. 2015. Suppressors of superoxide production from mitochondrial complex III. *Nat Chem Biol*, 11, 834-6.
- OWEN, O. E., KALHAN, S. C. & HANSON, R. W. 2002. The key role of anaplerosis and cataplerosis for citric acid cycle function. *J Biol Chem*, 277, 30409-12.
- PAEK, S. M. 2018. Recent Synthesis and Discovery of Brefeldin A Analogs. *Mar Drugs*, 16.
- PATEL, A. A., ZHANG, Y., FULLERTON, J. N., BOELEN, L., RONGVAUX, A., MAINI, A. A., BIGLEY, V., FLAVELL, R. A., GILROY, D. W., ASQUITH, B., MACALLAN, D. & YONA, S. 2017. The fate and lifespan of human monocyte subsets in steady state and systemic inflammation. *J Exp Med*, 214, 1913-1923.
- PAVLIDES, S., WHITAKER-MENEZES, D., CASTELLO-CROS, R., FLOMENBERG, N., WITKIEWICZ, A. K., FRANK, P. G., CASIMIRO, M. C., WANG, C., FORTINA, P., ADDYA, S., PESTELL, R. G., MARTINEZ-OUTSCHOORN, U. E., SOTGIA, F. & LISANTI, M. P. 2009. The reverse Warburg effect: aerobic glycolysis in cancer associated fibroblasts and the tumor stroma. *Cell Cycle*, 8, 3984-4001.
- PENCE, B. D. & YARBRO, J. R. 2018. Aging impairs mitochondrial respiratory capacity in classical monocytes. *Exp Gerontol*, 108, 112-117.
- PETER, K., REHLI, M., SINGER, K., RENNER-SATTLER, K. & KREUTZ, M. 2015. Lactic acid delays the inflammatory response of human monocytes. *Biochem Biophys Res Commun*, 457, 412-8.

- PODOLNIKOVA, N. P., PODOLNIKOV, A. V., HAAS, T. A., LISHKO, V. K. & UGAROVA, T. P. 2015. Ligand recognition specificity of leukocyte integrin alphaMbeta2 (Mac-1, CD11b/CD18) and its functional consequences. *Biochemistry*, 54, 1408-20.
- PRENEN, H. & MAZZONE, M. 2019. Tumor-associated macrophages: a short compendium. *Cell Mol Life Sci*, 76, 1447-1458.
- PRINCIOTTA, M. F., FINZI, D., QIAN, S. B., GIBBS, J., SCHUCHMANN, S., BUTTGEREIT, F., BENNINK, J. R. & YEWEDELL, J. W. 2003. Quantitating protein synthesis, degradation, and endogenous antigen processing. *Immunity*, 18, 343-54.
- RABINOVITCH, M. 1995. Professional and non-professional phagocytes: an introduction. *Trends Cell Biol*, 5, 85-7.
- RADCLIFF, G. & JAROSZESKI, M. J. 1998. Basics of flow cytometry. *Methods Mol Biol*, 91, 1-24.
- RAULIEN, N., FRIEDRICH, K., STROBEL, S., RUBNER, S., BAUMANN, S., VON BERGEN, M., KORNER, A., KRUEGER, M., ROSSOL, M. & WAGNER, U. 2017. Fatty Acid Oxidation Compensates for Lipopolysaccharide-Induced Warburg Effect in Glucose-Deprived Monocytes. *Front Immunol*, 8, 609.
- REIS, J., MASSARI, M., MARCHESI, S., CECCON, M., AALBERS, F. S., CORANA, F., VALENTE, S., MAI, A., MAGNANI, F. & MATTEVI, A. 2020. A closer look into NADPH oxidase inhibitors: Validation and insight into their mechanism of action. *Redox Biol*, 32, 101466.
- RIDKER, P. M., EVERETT, B. M., THUREN, T., MACFADYEN, J. G., CHANG, W. H., BALLANTYNE, C., FONSECA, F., NICOLAU, J., KOENIG, W., ANKER, S. D., KASTELEIN, J. J. P., CORNEL, J. H., PAIS, P., PELLA, D., GENEST, J., CIFKOVA, R., LORENZATTI, A., FORSTER, T., KOBALAVA, Z., VIDASIMITI, L., FLATHER, M., SHIMOKAWA, H., OGAWA, H., DELLBORG, M., ROSSI, P. R. F., TROQUAY, R. P. T., LIBBY, P., GLYNN, R. J. & GROUP, C. T. 2017. Antiinflammatory Therapy with Canakinumab for Atherosclerotic Disease. *N Engl J Med*, 377, 1119-1131.
- RIDKER, P. M. & LUSCHER, T. F. 2014. Anti-inflammatory therapies for cardiovascular disease. *Eur Heart J*, 35, 1782-91.
- RIVERA, L. B. & BERGERS, G. 2015. Intertwined regulation of angiogenesis and immunity by myeloid cells. *Trends Immunol*, 36, 240-9.
- ROBERTS, C. A., DICKINSON, A. K. & TAAMS, L. S. 2015. The Interplay Between Monocytes/Macrophages and CD4(+) T Cell Subsets in Rheumatoid Arthritis. *Front Immunol*, 6, 571.
- ROCHE, P. A. & FURUTA, K. 2015. The ins and outs of MHC class II-mediated antigen processing and presentation. *Nat Rev Immunol*, 15, 203-16.
- RODRIGUEZ-PRADOS, J. C., TRAVES, P. G., CUENCA, J., RICO, D., ARAGONES, J., MARTIN-SANZ, P., CASCANTE, M. & BOSCA, L. 2010. Substrate fate in activated macrophages: a comparison between innate, classic, and alternative activation. *J Immunol*, 185, 605-14.
- ROMANO, E., KUSIO-KOBIALKA, M., FOUKAS, P. G., BAUMGAERTNER, P., MEYER, C., BALLABENI, P., MICHIELIN, O., WEIDE, B., ROMERO, P. & SPEISER, D. E. 2015. Ipilimumab-dependent cell-mediated cytotoxicity of regulatory T cells ex vivo by nonclassical monocytes in melanoma patients. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 112, 6140-5.
- ROSE, T., GRUTZKAU, A., KLOTSCHKE, J., ENGHARD, P., FLECHSIG, A., KELLER, J., RIEMECASTEN, G., RADBRUCH, A., BURMESTER, G. R., DORNER, T., HIEPE, F. & BIESEN, R. 2017. Are interferon-related biomarkers advantageous for monitoring disease activity in systemic lupus erythematosus? A longitudinal benchmark study. *Rheumatology (Oxford)*, 56, 1618-1626.
- ROSSOL, M., KRAUS, S., PIERER, M., BAERWALD, C. & WAGNER, U. 2012. The CD14(bright) CD16+ monocyte subset is expanded in rheumatoid arthritis and promotes expansion of the Th17 cell population. *Arthritis Rheum*, 64, 671-7.
- RYU, J. K., KIM, S. J., RAH, S. H., KANG, J. I., JUNG, H. E., LEE, D., LEE, H. K., LEE, J. O., PARK, B. S., YOON, T. Y. & KIM, H. M. 2017. Reconstruction of LPS Transfer Cascade Reveals Structural Determinants within LBP, CD14, and TLR4-MD2 for Efficient LPS Recognition and Transfer. *Immunity*, 46, 38-50.

- SANDER, J., SCHMIDT, S. V., CIROVIC, B., MCGOVERN, N., PAPANTONOPOULOU, O., HARDT, A. L., ASCHENBRENNER, A. C., KREER, C., QUAST, T., XU, A. M., SCHMIDLEITHNER, L. M., THEIS, H., THI HUONG, L. D., SUMATOH, H. R. B., LAUTERBACH, M. A. R., SCHULTE-SCHREPPING, J., GUNTHER, P., XUE, J., BASSLER, K., ULAS, T., KLEE, K., KATZMARSKI, N., HERRESTHAL, S., KREBS, W., MARTIN, B., LATZ, E., HANDLER, K., KRAUT, M., KOLANUS, W., BEYER, M., FALK, C. S., WIEGMANN, B., BURGDORF, S., MELOSH, N. A., NEWELL, E. W., GINHOUX, F., SCHLITZER, A. & SCHULTZE, J. L. 2017. Cellular Differentiation of Human Monocytes Is Regulated by Time-Dependent Interleukin-4 Signaling and the Transcriptional Regulator NCOR2. *Immunity*, 47, 1051-1066 e12.
- SANFORD, D. E., BELT, B. A., PANI, R. Z., MAYER, A., DESHPANDE, A. D., CARPENTER, D., MITCHEM, J. B., PLAMBECK-SUESS, S. M., WORLEY, L. A., GOETZ, B. D., WANG-GILLAM, A., EBERLEIN, T. J., DENARDO, D. G., GOEDEGEBUURE, S. P. & LINEHAN, D. C. 2013. Inflammatory monocyte mobilization decreases patient survival in pancreatic cancer: a role for targeting the CCL2/CCR2 axis. *Clin Cancer Res*, 19, 3404-15.
- SAXTON, R. A. & SABATINI, D. M. 2017. mTOR Signaling in Growth, Metabolism, and Disease. *Cell*, 168, 960-976.
- SCHITTENHELM, L., HILKENS, C. M. & MORRISON, V. L. 2017. beta2 Integrins As Regulators of Dendritic Cell, Monocyte, and Macrophage Function. *Front Immunol*, 8, 1866.
- SCHUERWEGH, A. J., STEVENS, W. J., BRIDTS, C. H. & DE CLERCK, L. S. 2001. Evaluation of monensin and brefeldin A for flow cytometric determination of interleukin-1 beta, interleukin-6, and tumor necrosis factor-alpha in monocytes. *Cytometry*, 46, 172-6.
- SCHUETT, H., OESTREICH, R., WAETZIG, G. H., ANNEMA, W., LUCHTEFELD, M., HILLMER, A., BAVENDIEK, U., VON FELDEN, J., DIVCHEV, D., KEMPF, T., WOLLERT, K. C., SEEGERT, D., ROSE-JOHN, S., TIETGE, U. J., SCHIEFFER, B. & GROTE, K. 2012. Transsignaling of interleukin-6 crucially contributes to atherosclerosis in mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 32, 281-90.
- SCHUTT, C. 1999. Cd14. *Int J Biochem Cell Biol*, 31, 545-9.
- SERES, T., KNICKELBEIN, R. G., WARSHAW, J. B. & JOHNSTON, R. B., JR. 2000. The phagocytosis-associated respiratory burst in human monocytes is associated with increased uptake of glutathione. *J Immunol*, 165, 3333-40.
- SHI, C. & PAMER, E. G. 2011. Monocyte recruitment during infection and inflammation. *Nat Rev Immunol*, 11, 762-74.
- SLUIMER, J. C., GASC, J. M., VAN WANROIJ, J. L., KISTERS, N., GROENEWEG, M., SOLLEWIJN GELPKE, M. D., CLEUTJENS, J. P., VAN DEN AKKER, L. H., CORVOL, P., WOUTERS, B. G., DAEMEN, M. J. & BIJNENS, A. P. 2008. Hypoxia, hypoxia-inducible transcription factor, and macrophages in human atherosclerotic plaques are correlated with intraplaque angiogenesis. *J Am Coll Cardiol*, 51, 1258-65.
- SMILJANOVIC, B., RADZIKOWSKA, A., KUCA-WARNAWIN, E., KUROWSKA, W., GRUN, J. R., STUHLMULLER, B., BONIN, M., SCHULTE-WREDE, U., SORENSEN, T., KYOGOKU, C., BRUNS, A., HERMANN, S., OHRNDORF, S., AUPPERLE, K., BACKHAUS, M., BURMESTER, G. R., RADBRUCH, A., GRUTZKAU, A., MASLINSKI, W. & HAUPL, T. 2018. Monocyte alterations in rheumatoid arthritis are dominated by preterm release from bone marrow and prominent triggering in the joint. *Ann Rheum Dis*, 77, 300-308.
- SPIES, C. M., STRAUB, R. H. & BUTTGEREIT, F. 2012. Energy metabolism and rheumatic diseases: from cell to organism. *Arthritis Res Ther*, 14, 216.
- SPRANGERS, S., DE VRIES, T. J. & EVERTS, V. 2016. Monocyte Heterogeneity: Consequences for Monocyte-Derived Immune Cells. *J Immunol Res*, 2016, 1475435.
- STARKOV, A. A. & FISKUM, G. 2001. Myxothiazol induces H(2)O(2) production from mitochondrial respiratory chain. *Biochem Biophys Res Commun*, 281, 645-50.
- STEVEN, M. M., LENNIE, S. E., STURROCK, R. D. & GEMMELL, C. G. 1984. Enhanced bacterial phagocytosis by peripheral blood monocytes in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*, 43, 435-9.

- STOTZ, M., PICHLER, M., ABSSENGER, G., SZKANDERA, J., ARMINGER, F., SCHABERL-MOSER, R., SAMONIGG, H., STOJAKOVIC, T. & GERGER, A. 2014. The preoperative lymphocyte to monocyte ratio predicts clinical outcome in patients with stage III colon cancer. *Br J Cancer*, 110, 435-40.
- STRAUB, R. H., CUTOLO, M., BUTTGEREIT, F. & PONGRATZ, G. 2010. Energy regulation and neuroendocrine-immune control in chronic inflammatory diseases. *J Intern Med*, 267, 543-60.
- STREHL, C., FANGRADT, M., FEARON, U., GABER, T., BUTTGEREIT, F. & VEALE, D. J. 2014. Hypoxia: how does the monocyte-macrophage system respond to changes in oxygen availability? *J Leukoc Biol*, 95, 233-41.
- STUART, L. M. & EZEKOWITZ, R. A. 2005. Phagocytosis: elegant complexity. *Immunity*, 22, 539-50.
- SUN, Q. A., HESS, D. T., WANG, B., MIYAGI, M. & STAMLER, J. S. 2012. Off-target thiol alkylation by the NADPH oxidase inhibitor 3-benzyl-7-(2-benzoxazolyl)thio-1,2,3-triazolo[4,5-d]pyrimidine (VAS2870). *Free Radic Biol Med*, 52, 1897-902.
- SUZUKI, H., HISAMATSU, T., CHIBA, S., MORI, K., KITAZUME, M. T., SHIMAMURA, K., NAKAMOTO, N., MATSUOKA, K., EBINUMA, H., NAGANUMA, M. & KANAI, T. 2016. Glycolytic pathway affects differentiation of human monocytes to regulatory macrophages. *Immunol Lett*, 176, 18-27.
- TAMULYTE, S., KOPPLIN, J., BRENNER, T., WEIGAND, M. A. & UHLE, F. 2019. Monocyte HLA-DR Assessment by a Novel Point-of-Care Device Is Feasible for Early Identification of ICU Patients With Complicated Courses-A Proof-of-Principle Study. *Front Immunol*, 10, 432.
- TANNAHILL, G. M., CURTIS, A. M., ADAMIK, J., PALSSON-MCDERMOTT, E. M., MCGETTRICK, A. F., GOEL, G., FREZZA, C., BERNARD, N. J., KELLY, B., FOLEY, N. H., ZHENG, L., GARDET, A., TONG, Z., JANY, S. S., CORR, S. C., HANEKLAUS, M., CAFFREY, B. E., PIERCE, K., WALMSLEY, S., BEASLEY, F. C., CUMMINS, E., NIZET, V., WHYTE, M., TAYLOR, C. T., LIN, H., MASTERS, S. L., GOTTLIEB, E., KELLY, V. P., CLISH, C., AURON, P. E., XAVIER, R. J. & O'NEILL, L. A. 2013. Succinate is an inflammatory signal that induces IL-1beta through HIF-1alpha. *Nature*, 496, 238-42.
- THIERBACH, G. & REICHENBACH, H. 1981. Myxothiazol, a new antibiotic interfering with respiration. *Antimicrob Agents Chemother*, 19, 504-7.
- THOMAS, G., TACKE, R., HEDRICK, C. C. & HANNA, R. N. 2015. Nonclassical patrolling monocyte function in the vasculature. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 35, 1306-16.
- TRIPMACHER, R. 2005. *Untersuchungen zu Wirkungen einer eingeschränkten Energiesynthese auf Funktionen von humanen Immunzellen*. Humboldt-Universität zu Berlin, Medizinische Fakultät - Universitätsklinikum Charité.
- TYRRELL, D. J., BLIN, M. G., SONG, J., WOOD, S. C., ZHANG, M., BEARD, D. A. & GOLDSTEIN, D. R. 2020. Age-Associated Mitochondrial Dysfunction Accelerates Atherogenesis. *Circ Res*, 126, 298-314.
- UDALOVA, I. A., MANTOVANI, A. & FELDMANN, M. 2016. Macrophage heterogeneity in the context of rheumatoid arthritis. *Nat Rev Rheumatol*, 12, 472-85.
- VAN ENGELAND, M., NIELAND, L. J., RAMAEKERS, F. C., SCHUTTE, B. & REUTELINGSPERGER, C. P. 1998. Annexin V-affinity assay: a review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure. *Cytometry*, 31, 1-9.
- VAN ONNA, M. & BOONEN, A. 2016. The challenging interplay between rheumatoid arthritis, ageing and comorbidities. *BMC Musculoskelet Disord*, 17, 184.
- VENET, F., DEMARET, J., GOSSEZ, M. & MONNERET, G. 2020. Myeloid cells in sepsis-acquired immunodeficiency. *Ann N Y Acad Sci*.
- VENET, F., TISSOT, S., DEBARD, A. L., FAUDOT, C., CRAMPE, C., PACHOT, A., AYALA, A. & MONNERET, G. 2007. Decreased monocyte human leukocyte antigen-DR expression after severe burn injury: Correlation with severity and secondary septic shock. *Crit Care Med*, 35, 1910-7.
- VIJAYAN, V., PRADHAN, P., BRAUD, L., FUCHS, H. R., GUELER, F., MOTTERLINI, R., FORESTI, R. & IMMENSCHUH, S. 2019. Human and murine macrophages exhibit differential metabolic responses to lipopolysaccharide - A divergent role for glycolysis. *Redox Biol*, 22, 101147.

- VOLL, R. E., HERRMANN, M., ROTH, E. A., STACH, C., KALDEN, J. R. & GIRKONTAITE, I. 1997. Immunosuppressive effects of apoptotic cells. *Nature*, 390, 350-1.
- WANG, J. C. & BENNETT, M. 2012. Aging and atherosclerosis: mechanisms, functional consequences, and potential therapeutics for cellular senescence. *Circ Res*, 111, 245-59.
- WARBURG, O. 1925. The Metabolism of Carcinoma Cells. *The Journal of Cancer Research*, 9, 148-163.
- WARBURG, O., WIND, F. & NEGELEIN, E. 1926. Über den Stoffwechsel von Tumoren im Körper. *Klinische Wochenschrift*, 5, 829-832.
- WIESINGER, A., PETERS, W., CHAPPELL, D., KENTRUP, D., REUTER, S., PAVENSTADT, H., OBERLEITHNER, H. & KUMPERS, P. 2013. Nanomechanics of the endothelial glycocalyx in experimental sepsis. *PLoS One*, 8, e80905.
- WILLIAMS, J. W., ZAITSEV, K., KIM, K. W., IVANOV, S., SAUNDERS, B. T., SCHRANK, P. R., KIM, K., ELVINGTON, A., KIM, S. H., TUCKER, C. G., WOHLTMANN, M., FIFE, B. T., EPELMAN, S., ARTYOMOV, M. N., LAVINE, K. J., ZINSELMAYER, B. H., CHOI, J. H. & RANDOLPH, G. J. 2020. Limited proliferation capacity of aortic intima resident macrophages requires monocyte recruitment for atherosclerotic plaque progression. *Nat Immunol*, 21, 1194-1204.
- WOLF, D. M., SEGAWA, M., KONDADI, A. K., ANAND, R., BAILEY, S. T., REICHERT, A. S., VAN DER BLIEK, A. M., SHACKELFORD, D. B., LIESA, M. & SHIRIHAI, O. S. 2019. Individual cristae within the same mitochondrion display different membrane potentials and are functionally independent. *EMBO J*, 38, e101056.
- XIAO, Z., DAI, Z. & LOCASALE, J. W. 2019. Metabolic landscape of the tumor microenvironment at single cell resolution. *Nat Commun*, 10, 3763.
- YANG, X. Y., ZHENG, K. D., LIN, K., ZHENG, G., ZOU, H., WANG, J. M., LIN, Y. Y., CHUKA, C. M., GE, R. S., ZHAI, W. & WANG, J. G. 2015. Energy Metabolism Disorder as a Contributing Factor of Rheumatoid Arthritis: A Comparative Proteomic and Metabolomic Study. *PLoS One*, 10, e0132695.
- YARBRO, J. R. & PENCE, B. D. 2019. Classical monocytes from older adults maintain capacity for metabolic compensation during glucose deprivation and lipopolysaccharide stimulation. *Mech Ageing Dev*, 183, 111146.
- YEAP, W. H., WONG, K. L., SHIMASAKI, N., TEO, E. C., QUEK, J. K., YONG, H. X., DIONG, C. P., BERTOLETTI, A., LINN, Y. C. & WONG, S. C. 2016. CD16 is indispensable for antibody-dependent cellular cytotoxicity by human monocytes. *Sci Rep*, 6, 34310.
- YOON, B. R., YOO, S. J., CHOI, Y., CHUNG, Y. H., KIM, J., YOO, I. S., KANG, S. W. & LEE, W. W. 2014. Functional phenotype of synovial monocytes modulating inflammatory T-cell responses in rheumatoid arthritis (RA). *PLoS One*, 9, e109775.
- ZEISBRICH, M., YANES, R. E., ZHANG, H., WATANABE, R., LI, Y., BROSIG, L., HONG, J., WALLIS, B. B., GIACOMINI, J. C., ASSIMES, T. L., GORONZY, J. J. & WEYAND, C. M. 2018. Hypermetabolic macrophages in rheumatoid arthritis and coronary artery disease due to glycogen synthase kinase 3b inactivation. *Ann Rheum Dis*, 77, 1053-1062.
- ZHANG, H., LIU, H., ZHOU, L., YUEN, J. & FORMAN, H. J. 2017. Temporal changes in glutathione biosynthesis during the lipopolysaccharide-induced inflammatory response of THP-1 macrophages. *Free Radic Biol Med*, 113, 304-310.
- ZHENG, Y., SUN, L., JIANG, T., ZHANG, D., HE, D. & NIE, H. 2014. TNFalpha promotes Th17 cell differentiation through IL-6 and IL-1beta produced by monocytes in rheumatoid arthritis. *J Immunol Res*, 2014, 385352.
- ZIEGLER-HEITBROCK, L. 2014. Monocyte subsets in man and other species. *Cell Immunol*, 289, 135-9.
- ZIEGLER-HEITBROCK, L., ANCUTA, P., CROWE, S., DALOD, M., GRAU, V., HART, D. N., LEENEN, P. J., LIU, Y. J., MACPHERSON, G., RANDOLPH, G. J., SCHERBERICH, J., SCHMITZ, J., SHORTMAN, K., SOZZANI, S., STROBL, H., ZEMBALA, M., AUSTYN, J. M. & LUTZ, M. B. 2010. Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. *Blood*, 116, e74-80.

## 7. Anhang

### 7.1. Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Pierre-Louis Krauß, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „**Zur metabolischen Hierarchie spezifischer Immunprozesse bei menschlichen Monozyten**“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren/innen beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) werden von mir verantwortet.

Ich versichere ferner, dass ich die in Zusammenarbeit mit anderen Personen generierten Daten, Datenauswertungen und Schlussfolgerungen korrekt gekennzeichnet und meinen eigenen Beitrag sowie die Beiträge anderer Personen korrekt kenntlich gemacht habe (siehe Anteilserklärung). Texte oder Textteile, die gemeinsam mit anderen erstellt oder verwendet wurden, habe ich korrekt kenntlich gemacht.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Erstbetreuer/in, angegeben sind. Für sämtliche im Rahmen der Dissertation entstandenen Publikationen wurden die Richtlinien des ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors; [www.icmje.org](http://www.icmje.org)) zur Autorenschaft eingehalten. Ich erkläre ferner, dass ich mich zur Einhaltung der Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis verpflichte.

Weiterhin versichere ich, dass ich diese Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits an einer anderen Fakultät eingereicht habe.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§§156, 161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

## **7.2. Lebenslauf**

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

### 7.3. Vollständige Publikationsliste

**Krauß P**, Buttgereit T, Chen Y, Pfeiffenberger M, Gaber T, Buttgereit F. The Energy-dependent Hierarchy of Immune Functions in Human Monocytes [poster]. *Arthritis Rheumatol.* 2020; 72 (suppl 10).

*Abstract im Rahmen eines Kurzvortrags zur Jahrestagung des American College of Rheumatology (ACR) 2020.*

*(Impact Factor im Jahr 2019: 9.586)*

Chen Y, Ye Y, Wu H, **Krauß P**, Löwe P, Pfeiffenberger M, Ehlers L, Damerau A, Hoff P, Buttgereit F, Gaber T.

Metabolic Reprogramming in Memory CD4+ T Cells Is Associated with Immune Cell Dysfunction During Aging [poster]. *Arthritis Rheumatol.* 2020; 72 (suppl 10).

*Abstract im Rahmen eines Beitrags zur Jahrestagung des American College of Rheumatology (ACR) 2020.*

*(Impact Factor im Jahr 2019: 9.586)*

#### **7.4. Danksagung**

Die vorliegende Arbeit ist in der Arbeitsgruppe von Herrn Professor Frank Buttgerit entstanden. Die Experimente wurden sowohl im deutschen Rheumaforschungszentrum als auch im rheumatologischen Forschungslabor der Charité durchgeführt.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Buttgerit, der mir die Wahl und Bearbeitung des Themas ermöglicht hat. Ich danke ihm für das entgegengebrachte Vertrauen, die intensive Unterstützung, wunderbare Betreuung und die nachhaltige Förderung meines wissenschaftlichen Interesses.

Manuela Jakstadt und Dr. Cindy Strehl danke ich für die unkomplizierte Einarbeitung und Unterstützung bei den technischen Arbeiten im Labor. Auch allen anderen Mitgliedern der Arbeitsgruppe sei für ihre Hilfe gedankt.

Mit Herrn PD Dr. med. Thomas Häupl durfte ich zahlreiche persönliche sowie fachliche, sehr förderliche Diskussionen führen.

Herrn Moritz Pfeiffenberger danke ich für seine fachliche und private Hilfe, die gemeinsamen schönen Momente sowie für die Freundschaft, die in den letzten Jahren entstanden ist.

Mein tief empfundener Dank gilt Herrn Dr. rer. nat. Timo Gaber, für die private sowie fachliche Unterstützung während meiner Zeit als Doktorand. Aus unserer Zusammenarbeit ist eine solide freundschaftliche Beziehung entstanden, auf die ich auch in schwierigen Momenten immer zählen konnte.