

Kontrolle der monozytären Interleukin-1 β - Freisetzung durch α 1-Antitrypsin

Control of monocytic interleukin-1 β release by α 1-antitrypsin

Inauguraldissertation

zur Erlangung des
Grades Doktor der Naturwissenschaften

Dr. rer. nat.

Im Fachbereich 08
Biologie und Chemie
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von
M. Sc. Alisa Mona Agne
aus Hanau

Gießen 2020

Dekan: Prof. Dr. Jürgen Janek
Physikalisch-Chemisches Institut
Justus-Liebig-Universität Gießen
Heinrich-Buff-Ring 17, 35392 Gießen

Erstgutachter: Prof. Dr. Ivan Manzini
Tierphysiologie und Molekulare Biomedizin
Justus-Liebig-Universität Gießen
Heinrich-Buff-Ring 38, 35392 Gießen

Zweitgutachterin: Prof. Dr. Veronika Grau
Klinik für Allgemein- und Thoraxchirurgie
Sektion Experimentelle Chirurgie
Feulgenstrasse 10 -12, 35392 Gießen

Die vorliegende Arbeit wurde vom Deutschen Zentrum für Lungenforschung (DZL) gefördert. Sie wurde in der Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Thoraxchirurgie der Uniklinik Gießen (Prof. Dr. med. Winfried Padberg) in der Sektion Experimentelle Chirurgie unter der Leitung von Prof. Dr. rer. nat. Veronika Grau angefertigt. Die Betreuung der Arbeit im naturwissenschaftlichen Fachbereich wurde von Prof. Dr. Ivan Manzini übernommen. Das Thema wurde von Prof. Dr. rer. nat. Veronika Grau gestellt, unter deren Betreuung und in deren Labor diese Arbeit entstand. Die Sektion Experimentelle Chirurgie ist Teil des UGMLC (Universities of Gießen and Marburg Lung Center) und des DZL.

Ich erkläre: „Ich habe die vorliegende Dissertation selbstständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit Hilfen angefertigt, die in der Dissertation angegeben wurden. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten Schriften entnommen oder auf mündlichen Auskünften beruhend gemacht sind, wurden als solche kenntlich gemacht. Die in der Dissertation erwähnten und von mir durchgeführten Untersuchungen wurden unter den Grundsätzen guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der ‚Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis‘ niedergelegt sind, durchgeführt.“

Alisa Mona Agne

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Die Aktivierung des angeborenen Immunsystems	1
1.2	Die Gefahrenerkennung durch TLR	3
1.2.1	TLR4-Aktivierung	3
1.3	Die Gefahrenerkennung durch NOD-like-Rezeptoren	4
1.3.1	NALP3-Aktivierung	5
1.4	Das Zytokin IL-1 β	6
1.5	Die systemischen Entzündungsreaktionen auf eine CPB-Operation	8
1.5.1	Immunreaktionen auf einen CPB.....	10
1.5.2	Immunreaktionen auf ein Trauma.....	12
1.6	Die cholinerge Kontrolle der monozytären IL-1 β -Freisetzung.....	13
1.7	Das Akute-Phase-Protein AAT.....	16
1.7.1	Produktion und Degradation.....	16
1.7.2	Struktur und Funktion.....	17
1.7.3	Anti-Proteasefunktion.....	17
1.7.4	Anti-inflammatorische Eigenschaften	18
1.7.5	Entkopplung der Anti-Proteasefunktion und der anti-inflammatorischen Eigenschaften	19
1.7.6	AAT-Mangel.....	20
1.7.7	Wirkung von AAT auf die monozytäre IL-1 β -Freisetzung	21
1.8	Die Fragestellungen der vorliegenden Arbeit	22
2	Material und Methoden.....	25
2.1	Geräte und Verbrauchsmaterialien	25
2.2	Reagenzien.....	26
2.3	Patientenmaterial	28
2.4	Zelllinie U937	30
2.4.1	Transfektion von U937-Zellen.....	30
2.5	Experimentelles Vorgehen zur Untersuchung der IL-1 β -Freisetzung	30
2.5.1	Stimulation der U937-Zellen	30

2.5.2	ELISA	31
2.5.3	LDH-Messung	31
2.6	Chromatographische Aufreinigung von AAT	31
2.6.1	Aufreinigung von AAT aus humanem Plasma	32
2.6.2	Pufferaustausch.....	32
2.7	Proteinoxidation mit N-Chlorosuccinimid.....	33
2.8	Komplexierung von AAT mit NE	33
2.9	Komplexierung von Plasma mit NE und PR-3	33
2.10	Aktivitätstest der NE.....	33
2.11	Gelelektrophorese	34
2.11.1	Probenvorbereitung.....	34
2.11.2	Proteinkonzentrationsbestimmung.....	34
2.11.3	SDS-PAGE	35
2.12	Proteinfärbung	36
2.13	Western-Blot.....	36
2.14	Statistik und Datenauswertung	38
3	Ergebnisse.....	39
3.1	Die BzATP-vermittelte IL-1 β -Freisetzung aus U937-Zellen	39
3.2	Untersuchungen zu AAT aus gesunden Probanden.....	40
3.2.1	Aufreinigung von AAT aus gesunden Probanden	40
3.2.2	Einfluss von aufgereinigtem AAT aus gesunden Probanden auf die BzATP-vermittelte IL-1 β -Freisetzung aus U937-Zellen.....	41
3.2.3	Komplexierung von aufgereinigtem AAT aus gesunden Probanden mit NE.....	44
3.3	Untersuchungen zu AAT aus CPB-Patienten	45
3.3.1	Die endogene Plasmakonzentration von AAT im Verlauf einer CPB-Operation.....	45
3.3.2	Aufreinigung von AAT aus CPB-Patienten.....	45
3.3.3	Einfluss von aufgereinigtem AAT aus CPB-Patienten auf die BzATP-vermittelte IL-1 β -Freisetzung aus U937-Zellen.....	48
3.3.4	Die gesamte Anti-Elastaseaktivität im Verlauf einer CPB-Operation.....	53
3.3.5	Komplexierung von aufgereinigtem AAT aus CPB-Patienten mit NE	54

3.3.6	Komplexierung von Plasma aus CPB-Patienten mit NE und PR3	56
3.4	Untersuchungen zu AAT-Präparaten und deren oxidierten Varianten	58
3.4.1	Einfluss der AAT-Präparate Prolastin [®] und Respreeza [®] auf die BzATP-vermittelte IL-1 β -Freisetzung aus U937-Zellen.....	58
3.4.2	Einfluss von oxidiertem AAT auf die BzATP-vermittelte IL-1 β -Freisetzung aus U937-Zellen.....	59
3.4.3	Effekt der Oxidation von AAT auf dessen Anti-Proteaseaktivität	68
3.5	Einfluss von nAChR siRNA auf die LPC- und GPC-vermittelte Inhibition der IL-1 β -Freisetzung aus U937-Zellen.....	69
3.6	Einfluss von DHA auf die BzATP-induzierte IL-1 β -Freisetzung aus U937-Zellen.....	74
3.7	Einfluss von nAChR-Antagonisten auf die DHA-induzierte Inhibition der BzATP-vermittelten IL-1 β -Freisetzung aus U937-Zellen	76
4	Diskussion.....	79
4.1	Die monozytäre IL-1 β -Freisetzung im Kontext einer CPB-Operation.....	79
4.2	Welche Relevanz hat die AAT-vermittelte Inhibition der monozytären IL-1 β -Freisetzung?	82
4.3	Die Aktivität von AAT aus gesunden Probanden.....	83
4.4	Die Aktivität von AAT während einer CPB-Operation.....	85
4.5	Die Aktivität der AAT-Präparate Prolastin [®] und Respreeza [®]	88
4.6	Der Einsatz von Prolastin [®] und Respreeza [®] zur Prävention eines SIRS nach CPB-Operation.....	91
4.7	Wirkmechanismus und Identität des AAT-vermittelten Faktor-x	92
4.7.1	DHA als potenzieller Faktor-x.....	94
4.8	Schlussfolgerung und Ausblick	96
5	Zusammenfassung	97
5.1	Summary.....	98
6	Literaturverzeichnis	99
7	Anhang.....	118
7.1	Ergänzende Abbildungen.....	118
8	Publikationen und Kongressbeiträge.....	124
9	Danksagung.....	127

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Zusammenfassung der α 1-Antitrypsin(AAT)-induzierten Inhibition der ATP-vermittelten Inflammation und Freisetzung von Interleukin-1 β (IL-1 β).....	22
Abbildung 2: Enzymatische Spaltung eines Phosphatidylcholins an der <i>sn</i> 2-Position durch die Ca ²⁺ -unabhängige Phospholipase-A2 β (iPLA2 β).....	24
Abbildung 3: Versuchsschema zur Stimulation der monozytären Zellen.....	31
Abbildung 4: Absolute und prozentuale Interleukin-1 β (IL-1 β)-Freisetzung aus mit Lipopolysaccharid (LPS) stimulierten und mit BzATP behandelten U937-Zellen und korrespondierende Lactatdehydrogenase (LDH)-Aktivität im Zellkulturüberstand.....	40
Abbildung 5: Qualitätsprüfung und Menge von AAT aus gesunden Spendern.....	41
Abbildung 6: Inhibition der Interleukin-1 β (IL-1 β)-Freisetzung aus mit Lipopolysaccharid (LPS) stimulierten und mit BzATP behandelten U937-Zellen durch aus gesunden Probanden aufgereinigtes AAT und korrespondierende Lactatdehydrogenase (LDH)-Aktivität im Zellkulturüberstand.	43
Abbildung 7: Komplexbildung von aufgereinigtem AAT aus gesunden Probanden mit neutrophiler Elastase.....	44
Abbildung 8: Plasmakonzentrationen von AAT aus Patienten zu unterschiedlichen Zeitpunkten einer kardiopulmonalen Bypass(CPB)-Operation.....	45
Abbildung 9: Qualitätsprüfung und Menge des aus Patientenplasma gewonnenem AAT zu unterschiedlichen Zeitpunkten einer kardiopulmonalen Bypass (CPB)-Operation.	47
Abbildung 10: Inhibition der Interleukin-1 β (IL-1 β)-Freisetzung aus mit Lipopolysaccharid (LPS) stimulierten und mit BzATP behandelten U937-Zellen durch aufgereinigtes AAT aus Patienten (AAT) zu zwei Zeitpunkten einer kardiopulmonalen Bypass (CPB)-Operation und korrespondierende Lactatdehydrogenase (LDH)-Aktivität im Zellkulturüberstand I.....	49
Abbildung 11: Inhibition der Interleukin-1 β (IL-1 β)-Freisetzung aus mit Lipopolysaccharid (LPS) stimulierten und mit BzATP behandelten U937-Zellen durch aufgereinigtes AAT aus Patienten (AAT) zu zwei Zeitpunkten einer kardiopulmonalen Bypass (CPB)-Operation und korrespondierende Lactatdehydrogenase (LDH)-Aktivität im Zellkulturüberstand II.	51
Abbildung 12: Dosisabhängige Inhibition der prozentualen Interleukin-1 β (IL-1 β)-Freisetzung aus mit Lipopolysaccharid (LPS) stimulierten und mit BzATP behandelten U937-Zellen durch AAT aus Patienten, aufgereinigt zu unterschiedlichen Zeitpunkten einer kardiopulmonalen Bypass (CPB)-Operation.....	52
Abbildung 13: Inhibition der neutrophilen Elastaseaktivität durch Plasma von kardiopulmonalen Bypass (CPB)-Patienten im Verlauf der Operation.	53
Abbildung 14: Komplexbildung von aufgereinigtem AAT aus Patienten mit neutrophiler Elastase zu unterschiedlichen Zeitpunkten einer kardiopulmonalen Bypass (CPB)-Operation.	55
Abbildung 15: Komplexbildungsfähigkeit von aufgereinigtem AAT aus Patienten mit neutrophiler Elastase im Verlauf einer kardiopulmonalen Bypass (CPB)-Operation.	56

Abbildung 16: Anti-Proteaseaktivität von Patientenplasma vor und nach einer kardiopulmonalen Bypass (CPB)-Operation.....	57
Abbildung 17: Inhibition der Interleukin-1 β (IL-1 β)-Freisetzung aus mit Lipopolysaccharid (LPS) stimulierten und mit BzATP behandelten U937-Zellen durch Prolastin [®] oder Respreeza [®] und korrespondierende Lactatdehydrogenase (LDH)-Aktivität im Zellkulturüberstand.	59
Abbildung 18: Inhibition der Interleukin-1 β (IL-1 β)-Freisetzung aus mit Lipopolysaccharid (LPS) stimulierten und mit BzATP behandelten U937-Zellen durch oxidiertes AAT und korrespondierende Lactatdehydrogenase (LDH)-Aktivität im Zellkulturüberstand.....	61
Abbildung 19: Inhibition der Interleukin-1 β (IL-1 β)-Freisetzung aus mit Lipopolysaccharid (LPS) stimulierten und mit BzATP behandelten U937-Zellen durch oxidiertes Prolastin [®] und korrespondierende Lactatdehydrogenase (LDH)-Aktivität im Zellkulturüberstand.	63
Abbildung 20: Inhibition der Interleukin-1 β (IL-1 β)-Freisetzung aus mit Lipopolysaccharid (LPS) stimulierten und mit BzATP behandelten U937-Zellen durch oxidiertes Respreeza [®] und korrespondierende Lactatdehydrogenase (LDH)-Aktivität im Zellkulturüberstand.	65
Abbildung 21: Vergleich der Dosis-Wirkungskurven nativer sowie oxidiertes AAT-Präparate.....	67
Abbildung 22: Anti-Proteaseaktivität von AAT, Prolastin [®] und Respreeza [®] und deren oxidierten Varianten.	68
Abbildung 23: Inhibition der Interleukin-1 β (IL-1 β)-Freisetzung aus mit Lipopolysaccharid (LPS) stimulierten und mit BzATP behandelten U937-Zellen durch GPC bei verminderter Expression der nAChR-Untereinheiten α 7, α 9 und α 10 sowie korrespondierende Lactatdehydrogenase(LDH)-Aktivität im Zellkulturüberstand.....	71
Abbildung 24: Inhibition der Interleukin-1 β (IL-1 β)-Freisetzung aus mit Lipopolysaccharid (LPS) stimulierten und mit BzATP behandelten U937-Zellen durch LPC bei verminderter Expression der nAChR-Untereinheiten α 7, α 9 und α 10 sowie korrespondierende Lactatdehydrogenase(LDH)-Aktivität im Zellkulturüberstand.....	73
Abbildung 25: Inhibition der Interleukin-1 β (IL-1 β)-Freisetzung aus mit Lipopolysaccharid (LPS) stimulierten und mit BzATP behandelten U937-Zellen durch Docosahexansäure (DHA) sowie korrespondierende Lactatdehydrogenase (LDH)-Aktivität im Zellkulturüberstand.	75
Abbildung 26: Inhibition der Interleukin-1 β (IL-1 β)-Freisetzung aus mit Lipopolysaccharid (LPS) stimulierten und mit BzATP behandelten U937-Zellen durch DHA und dessen Antagonisierung durch [V11L;V16D]ArIB, RgIA4, α -Btx sowie korrespondierende Lactatdehydrogenase (LDH)-Aktivität im Zellkulturüberstand.	78

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Geräte und Verbrauchsmaterialien.....	25
Tabelle 2: Reagenzien	26
Tabelle 3: Patientencharakteristika (n = 15).....	29
Tabelle 4: Pufferzusammensetzung zur Aufreinigung von AAT aus humanem Plasma.	32
Tabelle 5: Probenpuffer I.	34
Tabelle 6: Probenpuffer II.	34
Tabelle 7: Reagenzien zum Gießen eines Sammelgels.	35
Tabelle 8: Reagenzien zum Gießen eines 12%igen Trenngels.....	35
Tabelle 9: Reagenzien zur Herstellung des Laufpuffers.	36
Tabelle 10: Reagenzien zur Herstellung der Entfärberlösung.....	36
Tabelle 11: Reagenzien zum Herstellen des Transferpuffers.....	37
Tabelle 12: Reagenzien zum Herstellen einer 10-fach konzentrierten TBS- und PBS-Lösung.....	37
Tabelle 13: Antikörper.	38
Tabelle 14: Statistische Auswertung der dosisabhängigen Inhibitionskapazität auf die IL-1 β -Freisetzung aus U937-Zellen von AAT aus Patienten, aufgereinigt zu unterschiedlichen Zeitpunkten einer kardiopulmonalen Bypass (CPB)-Operation.....	52
Tabelle 15: Statistische Auswertung der Dosis-Wirkungsbeziehung von nativen und oxidierten AAT-Präparaten auf die IL-1 β -Freisetzung aus U937-Zellen.	67

Abkürzungen

α-Btx	α -Bungarotoxin
[V11L;V16D]ArIB	Antagonist der Untereinheiten $\alpha 7$ des nAChR
AAT	$\alpha 1$ -Antitrypsin
AATD	<i>$\alpha 1$-antitrypsin deficiency</i>
AAT-P	Prolastin [®]
AAT-R	Respreeza [®]
ACh	Acetylcholin
APP	Akute-Phase-Protein
APS	Ammoniumpersulfat
ASC	<i>apoptosis associated speck-like protein containing a caspase recruitment domain</i>
BCA	Bicinchoninsäure
BSA	Rinderserumalbumin
BzATP	2'(3')-O-(4-Benzoylbenzoyl)adenosin-5'-triphosphat
C-36	C-terminales Peptidfragment von AAT
CARD	<i>caspase recruitment domain</i>
CARS	<i>compensatory anti-inflammatory response syndrome</i>
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CPB	kardiopulmonaler Bypass
CRP	C-reaktives Protein
DAMP	<i>damage associated molecular patterns</i>
ddH₂O	zweifach destilliertes Wasser
DHA	Docosahexaensäure
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
FCS	fötales Kälberserum
GPC	Glycerophosphatidylcholin
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
HSP	<i>heat shock protein</i>
IC₅₀	halbmaximale Inhibitionskonzentration
IL	Interleukin
IL-18	Interleukin-18
IL-1R1	IL-1-Rezeptor Typ 1
IL-1Ra	IL-1 Rezeptorantagonist
IL-1α	Interleukin-1 α
IL-1β	Interleukin-1 β
IPAF	<i>ICE-protease-activating factor</i>
iPLA2β	Ca ²⁺ -unabhängige Phospholipase-A2 β
IRF	<i>interferon regulatory factor</i>
LDH	Lactat-Dehydrogenase
LPC	Lysophosphatidylcholin

LPS	Lipopolysaccharid
LRR	<i>leucin-rich repeats</i>
MyD88	<i>myeloid differentiation primary response 88</i>
n.s.	nicht signifikant
nAChR	nikotinischer Acetylcholinrezeptor
NACHT	NAIP (<i>neuronal apoptosis inhibitory protein</i>), CIITA (<i>MHC class II transcription activator</i>), HET-E (<i>incompatibility locus protein from Podospora anserina</i>) und TP1 (<i>telomerase-associated protein</i>)
NALP	<i>NACHT, LRR and PYD domains-containing proteins</i>
NCS	N-Chlorosuccinimid
NE	neutrophile Elastase
NF-κB	<i>nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i>
NLR	NOD-like Rezeptoren
NOD	Nukleotid-bindende und oligomerisierende Domäne
oxAAT	oxidiertes α 1-Antitrypsin
oxAAT-R	oxidiertes Respreeza [®]
PAMP	<i>pathogen associated molecular patterns</i>
PBMC	<i>peripheral blood mononuclear cells</i>
PBS	<i>phosphate-buffered saline</i>
PC	Phosphocholin
pro-IL-1β	pro-Interleukin-1 β
PRR	<i>pattern recognition receptors</i>
PVDF	Polyvinylidenfluorid
PYD	<i>pyrin domain</i>
RCL	<i>reactive center loop</i>
RgIA4	Antagonist der nAChR-Untereinheiten α 9 und α 10
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
SERPINA1	<i>serine protease inhibitor A1</i>
Serpine	<i>serine protease inhibitors</i>
SIRS	<i>systemic inflammatory response syndrome</i>
TBS	<i>Tris-buffered saline</i>
TBST	<i>Tris-buffered saline + 0,1% Tween</i>
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TIR	<i>Toll/IL-1 receptor</i>
TLR	Toll-like Rezeptoren
TNF	<i>tumor necrosis factor</i>
TRIF	<i>TIR-domain-containing adapter-inducing interferon-β</i>
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan

1 Einleitung

1.1 Die Aktivierung des angeborenen Immunsystems

Eine wichtige Funktion des Immunsystems besteht in der Erkennung und Bekämpfung eindringender Pathogene, ohne eigenes Gewebe zu beschädigen oder zu zerstören. Diese Aufgabe erscheint umso problematischer angesichts der Diversität an Pathogenen, die wiederum hohe Replikations- und Mutationsraten besitzen. Aufgrund dieser enormen Herausforderung haben multizelluläre Organismen im Laufe der Evolution verschiedene immunologische Erkennungsmechanismen entwickelt. In Vertebraten werden diese Mechanismen in die adaptive und angeborene Immunantwort unterteilt.

Der antigenspezifische, zeitlich versetzte, adaptive Teil des Immunsystems, welcher hauptsächlich durch die klonale Selektion und Expansion von T- und B-Zellen getragen wird, dient der spezifischen Antigenerkennung und Antikörperproduktion (Iwasaki & Medzhitov 2015). Dieser Teil gibt Vertebraten den entscheidenden Vorteil, ein immunologisches Gedächtnis entwickeln zu können. Jedoch hat das adaptive Immunsystem seine Limitationen. Zum einen können zufällig generierte Antigenrezeptoren keine Informationen über die Quelle oder den Kontext des Pathogens liefern, zum anderen benötigt die klonale Expansion und Differenzierung zu Effektorzellen Zeit (Janeway & Medzhitov 2002). Als Folge ist diese Immunreaktion zu langsam, um eine eindringende, sich schnell replizierende, mikrobielle Population zu bekämpfen. Zudem agiert das adaptive Immunsystem nicht selbstständig und bedarf stets der Hilfe und Kontrolle eines evolutionär älteren und konservierteren Teils des Immunsystems. Das angeborene Immunsystem erkennt die Anwesenheit und die Natur des Pathogens, bietet die ersten Abwehrmechanismen und kontrolliert die Initiierung und Konkretisierung der adaptiven Immunantwort (Medzhitov 2001).

Neben nicht-zellulären Bestandteilen wie dem Komplementsystem oder den Akute-Phase-Proteinen (APP) gehören Granulozyten, mononukleäre Phagozyten wie Monozyten, Makrophagen und dendritische Zellen sowie natürliche Killerzellen zu den zellulären Bestandteilen des angeborenen Immunsystems (Akira et al. 2006). Die Strategie des angeborenen Immunsystems basiert auf der Erkennung von mikrobiellen und viralen Bestandteilen, die evolutionär hoch konserviert, überlebenswichtig und charakteristisch für den mikrobiellen Organismus sind. Weil die Erkennungsziele des angeborenen Immunsystems hoch konservierte, molekulare „Muster“ sind, werden sie auch als *pathogen-associated molecular patterns* (PAMP) bezeichnet (Janeway 1989). Entsprechend erfolgt die zelluläre Erkennung eines Pathogens über Mustererkennungs-Rezeptoren (*pattern recognition receptors*, PRR), die hauptsächlich von Monozyten, Makrophagen, dendritischen Zellen aber auch B- und aktivierten T-Zellen exprimiert werden (Kawai & Akira 2010). Zu den PRR zählen zellmembranständige *Toll-like-Rezeptoren* (TLR) und die C-Typ Lektin-Rezeptoren, sowie

Nukleinsäure-bindende und oligomerisierende Domäne (NOD)-like-Rezeptoren (NLR) und sezernierte PRR wie z.B. Collectine (Martinon et al. 2009; Iwasaki & Medzhitov 2015).

Liganden für PRR können vielfältiger Natur sein. Zum einen werden intra- und extrazelluläre Liganden beschrieben, zum anderen wird zwischen körpereigenen (*damage-associated molecular patterns*, DAMP) und körperfremden Bestandteilen (PAMP) als Liganden unterschieden. Die Prägung dieser Begrifflichkeiten geht auf Charles Alderson Janeway (Janeway 1989) und Polly Matzinger (Matzinger 1994) zurück, welche ergänzende Erklärungsansätze für angeborene Erkennungsmechanismen lieferten. Das von Janeway 1989 postulierte Modell der PAMP geht von Polysacchariden, Glykolipiden, Lipoproteinen und Nukleinsäuren aus, welche in verschiedenen Kompartimenten der Erreger zu finden sind und von PRR erkannt werden können. Ergänzend beschrieb Matzinger 1994 das so genannte *danger model*, in welchen sie DAMP als Hauptliganden für PRR beschreibt. Hierzu zählen vor allem Bestandteile, die einen körpereigenen Ursprung haben und beispielsweise durch Verletzungen freigesetzt werden. Zu typischen DAMP zählen u.a. Harnsäurekristalle, extrazelluläres ATP, freie DNA, *high mobility group box protein 1*, Hitzeschock-Proteine (*heat shock protein*, HSP) sowie Bestandteile der extrazellulären Matrix wie Fibronectin und Heparansulfat (Tsan & Gao 2004; Bianchi 2007; Martinon et al. 2009; Matzinger 1994; Gong et al. 2020). Beide Modelle ergänzen sich in der Überlegung, dass der Prozess der Gefahrerkennung vom Immunsystem streng kontrolliert und gleichzeitig sensibel genug sein muss, um angemessen auf die jeweilige Gefahr reagieren zu können. Die Synthese beider Modelle mündet in der Vorstellung, dass das Auslösen einer Immunreaktion zwei Gefahrensignale benötigt, denkbar durch die Präsenz eines PAMP, beispielsweise ein aus der bakteriellen Zellwand stammendes Lipopolysaccharid (LPS) und eines DAMP, wie z.B. durch Zellschädigung freigesetztes ATP (Martinon et al. 2009; Gong et al. 2020).

Nicht nur die Natur des Liganden, auch der Erkennungsort ist eine essentielle Information, die die Intensität der Immunantwort mitbestimmt. So wird auf Pathogenerkennung im Blutkreislauf eine wesentlich stärkere Immunantwort ausgelöst als eine Erkennung in mukosalen Bereichen (Bianchi 2007). In diesem Zusammenhang spielt auch der erkennende Zelltyp eine entscheidende Rolle. Die Erkennung eines Pathogens von einem ortsständigen Gewebsmakrophagen löst eine weniger umfassende Immunreaktion aus als die Pathogenerkennung durch im Blutkreislauf zirkulierende Monozyten (Iwasaki & Medzhitov 2015).

Wird ein Gefahrensignal einmal von einer Zelle des angeborenen Immunsystems erkannt, führt dies zur Aktivierung der jeweiligen Zelle, was in der Ausschüttung von von pro- und anti-inflammatorischen Zytokinen und anderen Mediatoren mündet (Kawai & Akira 2010). Diese Prozesse triggern nicht nur unmittelbare Abwehrmaßnahmen wie die Einleitung einer Entzündung, sondern initiieren ebenso antigen-spezifische Immunreaktionen. Die Ausschüttung des jeweiligen Zytokingemischs orchestriert hierbei die jeweiligen Maßnahmen, die getroffen werden, um der

Gefährdung angemessen zu entgegnen. Das Ausmaß einer Immunreaktion wird somit maßgeblich während dieser initialen Prozesse mitbestimmt (Kawai & Akira 2010). Problematisch bei jeder Immunreaktion sind die Kollateralschäden für das umgebende Gewebe oder, bei systemischer Immunreaktion, für den gesamten Organismus. Aus diesem Grund sind diese ersten Schritte einer Immunreaktion streng kontrolliert und potenzieller Angriffspunkt für medizinische Interventionen (Kawasaki & Kawai 2014).

1.2 Die Gefahrenerkennung durch TLR

Die unter den Säugetieren als erstes und bis heute am ausführlichsten beschriebenen PRR ist die Gruppe der TLR (Kawasaki & Kawai 2014). Erstmals beschrieben wurden Toll-Rezeptoren in der Taufliege *Drosophila melanogaster*, wo ihnen neben einer Aufgabe in der Embryonalentwicklung auch die Aufgabe der Bekämpfung von Bakterien und Pilzen zugeschrieben wurde (Lemaitre et al. 1996). Bis heute sind im Menschen 12 Mitglieder dieser Rezeptorfamilie beschrieben worden (Fitzgerald & Kagan 2020). Die Lokalisation von TLR beschränkt sich auf die Zellmembran sowie intrazelluläre Membranen der Zellkompartimente, wo sie DAMP sowie PAMP erkennen und diese in unterschiedliche Zellsignale umwandeln (Brubaker et al. 2015). Die Erkennung der DAMP und PAMP wird durch eine Leucin-reiche Domäne (*leucine-rich repeats*, LLR) erreicht, wobei immer Homo- oder Heteromere zusammen mit weiteren Co-Rezeptoren zur Bindung des DAMP oder PAMP führen (Kawasaki & Kawai 2014). Die Signalübertragung der meisten TLR wird von der intrazellulären *Toll/IL-1 receptor* (TIR)-Domäne initiiert, wodurch es zur Rekrutierung von Adaptor-Proteinen wie *myeloid differentiation primary response 88* (MyD88) oder *TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β* (TRIF) kommt, die wiederum in der Aktivierung von *nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells* (NF- κ B), *interferon regulatory factors* (IRF) und *mitogen-activated protein-Kinasen* münden kann (Kawasaki & Kawai 2014). Endpunkte dieser Aktivierung ist die Expression von Zytokinen und Chemokinen, welche den Wirt letztendlich vor der Infektion mit dem eindringenden Pathogen schützt (Medzhitov 2001).

1.2.1 TLR4-Aktivierung

Abhängig von ihrer Lokalisation sowie der Ligandenbindung, werden verschiedene TLR unterschieden. Der humane TLR4 ist ein zellmembranständiger Rezeptor, der durch die Bindung des bakteriellen Zellwandbestandteils LPS sowie durch das eukaryotisch ubiquitär vorkommende HSP60 aktiviert wird (Ohashi et al. 2000). Er wird von einer Vielzahl an Zellen exprimiert, hauptsächlich aber von Makrophagen und dendritischen Zellen (Vaure & Liu 2014). Für die Erkennung von LPS benötigt TLR4 weitere Co-Rezeptoren, darunter das *lymphocyte antigen 96* und das *cluster of differentiation* (CD)14. LPS-bindende Proteine garantieren die Präsentation von LPS Monomeren an CD14 (Medzhitov 2001). Wurde LPS vom TLR4-Rezeptorkomplex erkannt, so kommt es zu MyD88- und TRIF-abhängigen Signalkaskaden. Beide Signalkaskaden führen zur Aktivierung der

Transkriptionsfaktoren NF- κ B, *activator protein 1* und IRF3 (Vaure & Liu 2014). Diese können zum einen für eine erhöhte Transkriptionsrate des pro-Interleukin-1 β (pro-IL-1 β) verantwortlich sein. Zum anderen vermitteln sie die Expression von Komponenten, die für die Initiierung eines Multiproteinkomplexes verantwortlich sind, der als Inflammasom bezeichnet wird (Abb. 1) (Bauernfeind et al. 2009; Martinon et al. 2009).

1.3 Die Gefahrenerkennung durch NOD-like-Rezeptoren

Wie im vorherigen Abschnitt beschrieben, lieferte die Entdeckung der TLR die Erklärung für die Gefahrenerkennung von Pathogenen und die als Reaktion eingeleiteten antimikrobiellen Maßnahmen. Die Gefahrenerkennung mikrobiellen, sowie nicht-mikrobiellen Ursprungs kann durch NOD-like Rezeptoren (NLR) vermittelt werden. Strukturell sind NLR dreiteilige Multidomänenproteine mit einer C-terminalen *leucin rich repeats* (LRR)-Domäne und einer N-terminalen Effektor-domäne, die sich je nach Unterfamilie unterscheidet. Hierbei kann es sich um eine *pyrin*-Domäne (PYD), *caspase recruitment*-Domäne (CARD) oder *baculovirus IAP repeat*-Domäne handeln (Platnich & Muruve 2019). Neben dieser Effektor-domäne befindet sich die NACHT [NAIP (*neuronal apoptosis inhibitory protein*), CIITA (*MHC class II transcription activator*), HET-E (*incompatibility locus protein from Podospora anserina*) und TP1 (*telomerase-associated protein*)]-Domäne, welche die Aufgabe der Gefahrenerkennung und Signalübertragung übernimmt (Damiano et al. 2004). Eine Unterfamilie der NLRs sind die *NACHT, LRR and PYD domains-containing proteins* (NALP). Die Bindung von Nucleinsäuren und die damit verbundene Oligomerisierung der NACHT-Domänen sind für die Aktivierung der NLR verantwortlich (Damiano et al. 2004). NALP repräsentieren die größte Unterfamilie und werden im Menschen durch 14 Gene codiert (Platnich & Muruve 2019). Eine umfangreiche Diversifikation dieser Proteinfamilie kann durch Genduplikationen zustande gekommen sein. Einige NALP wie NALP2 und NALP7 im Menschen sowie NALP4 und NALP9 in der Maus sind eindeutig Paraloge (Martinon et al. 2009). NALP1, NALP2 und NALP3 wird eine zentrale Rolle bei der Stabilisierung von Caspase-1-aktivierenden Komplexen zugeschrieben, welche auch als Inflammasome bezeichnet werden und erstmals 2002 beschrieben wurden (Platnich & Muruve 2019). Diese Multiproteinkomplexe stellen die Verbindung zwischen der Gefahrenerkennung sowie der proteolytischen Aktivierung der pro-inflammatorischen Zytokine Interleukin (IL)-1 β und IL-18 dar. Inflammasome sind Entitäten mit hohem Molekulargewicht, die als Zellkörper (griechisch „soma“) ähnlich wie Proteasome, Liposome oder Apoptosome beschrieben werden (Martinon et al. 2009). Ähnlich wie das Apoptose-einleitende Apoptosom aktiviert auch das Inflammasom Caspasen. Caspasen sind Proteasen, die intrazellulär als inaktive Zymogene produziert werden und zur Aktivierung proteolytisch prozessiert werden müssen (Martinon et al. 2002). Inflammasome aktivieren eine Klasse von Caspasen, die man als inflammatorische Caspasen bezeichnet. Obwohl über die Diversität und biochemischen Unterschiede noch wenig bekannt ist, unterscheidet man drei Prototypen von Inflammasomen: Das NALP1, NALP3 und das *ICE-protease-activating factor* (IPAF)-

Inflammasom (Platnich & Muruve 2019). Es wird angenommen, dass die PYD das Adaptorprotein *apoptosis associated speck-like protein containing a caspase recruitment domain* (ASC) rekrutiert (Martinon et al. 2002). Die CARD im Adaptorprotein ASC rekrutiert wiederum Procaspase-1 zum Inflammasomkomplex (Yamamoto et al. 2004). NALP1 und IPAF besitzen eine C- oder N-terminale Verlängerung, die eine CARD beinhaltet, welche wiederum eine zweite Procaspase-1 rekrutieren kann. Einmal rekrutiert, setzt sich eine autokatalytische Kaskade in Gang, die Procaspase-1 zur aktiven Caspase-1 spaltet (Elliott et al. 2009). Andere NALP wie NALP3, auch bekannt als NLRP3, besitzen diese Domäne nicht. Stattdessen interagiert das *CARD inhibitor of NF- κ B-activating ligands* (CARDINAL)-Protein, welches der C-terminalen CARD des NALP1 sehr ähnlich ist, mit dem Inflammasom (Bouchier-Hayes et al. 2001; Martinon et al. 2009). Durch diese PYD:PYD und CARD:CARD Interaktionen ergeben sich die beschriebenen großen molekularen Plattformen, die zur Aktivierung von Caspase-1 und zur Prozessierung von pro-IL-1 β führen (Martinon et al. 2009).

1.3.1 NALP3-Aktivierung

Zahlreiche Gefahrensignale, die das NALP3-Inflammasom aktivieren, wurden bisher beschrieben. Hierzu zählen Bestandteile mikrobiellen, sowie nicht-mikrobiellen Ursprungs. Mikrobielle Aktivatoren können doppelsträngige RNA oder bakterielle, porenbildende Toxine wie Nigericin sein (Martinon et al. 2009). Zu nicht-mikrobiellen Aktivatoren zählen Harnsäurekristalle, Asbest-, Kieselsäure- und Aluminiumpartikel und reaktive Sauerstoffspezies (ROS) (Martinon et al. 2009; Dostert et al. 2008).

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass verschiedene Gefahrensignale und Stimuli, die das NALP3-Inflammasom aktivieren, gleichermaßen einen K⁺-Efflux induzieren und somit die zytosolische K⁺-Konzentration herabsetzen (Kahlenberg & Dubyak 2004). Eine alleinige Zellyse in einem hypotonen Puffer kann zur Prozessierung von pro-IL-1 β führen. Beobachtet wurde, dass es zu einer spontanen Inflammasombildung kam, sofern die Zellintegrität beeinträchtigt wurde. Die Bildung des NALP3-Inflammasoms konnte wiederum verhindert werden, indem eine unphysiologisch hohe extrazelluläre K⁺-Konzentration verwendet wurde, die dem intrazellulären K⁺-Gehalt entsprach (Pétrilli et al. 2007). Dies führte zur Annahme, dass das Inflammasom Veränderungen der intrazellulären K⁺-Konzentration in Folge von Zellverletzungen als Gefahrensignal erkennt.

Extrazelluläres ATP kann ebenso als nicht-mikrobielles Gefahrensignal wahrgenommen werden, da dessen extrazelluläre Anwesenheit auf einen Verlust der Membranintegrität, beispielsweise in Form einer Verletzung, hinweist (Adinolfi et al. 2018). Wird im Zuge einer Zellverletzung intrazelluläres ATP freigesetzt, kann dies an den membranständigen purinergen Rezeptor P2X7 binden und dadurch die Aktivierung von NALP3 und Caspase-1 vermitteln (Martinon et al. 2006; Mariathasan et al. 2006; Adinolfi et al. 2018). Dass die Aktivierung von Caspase-1 durch ATP induziert werden kann und dabei ASC-abhängig ist, konnten Experimente mit ASC-defizienten Mäusen zeigen (Yamamoto et al.

2004). Die Beteiligung des NALP3-Inflammasoms an diesem Prozess konnte ebenfalls durch Experimente an gendefizienten Tieren bestätigt werden (Mariathasan et al. 2006; Sutterwala et al. 2006). Somit wirkt extrazelluläres ATP als Gefahrensignal, welches das NALP3-Inflammasom initiiert, die Caspase-1 aktiviert und damit die Reifung und Freisetzung von IL-1 β induziert (Martinon et al. 2009).

1.4 Das Zytokin IL-1 β

IL-1 β gehört zur IL-1-Zytokinfamilie, die bisher 11 Mitglieder umfasst (Dinarello 2018a). IL-1 β , IL-1 α , IL-1-Rezeptorantagonist (IL-1Ra) und IL-18 sind die am besten untersuchten Vertreter dieser Familie (Dinarello 2018b). Die biologische Wirkung aller Mitglieder ist, bis auf einige Ausnahmen, pro-inflammatorischer Natur (Dinarello 2018a). Da IL-1 β hauptsächlich von zirkulierenden Monozyten produziert wird, sind dessen Wirkungen systemisch, wohingegen IL-1 α vor allem lokale Effekte hervorruft und hauptsächlich von Gewebsmakrophagen freigesetzt wird (Dinarello 2005). Besonders IL-1 β wurde in zahlreichen tierischen Krankheitsmodellen und im Menschen untersucht, und seine Kontrolle findet bereits klinische Anwendung (Dinarello 2018a).

Die Prozessierung und Sekretion von IL-1 β ist stark kontrolliert. Es wird von Monozyten und Makrophagen, dendritischen Zellen, natürlichen Killerzellen und B-Lymphozyten gebildet, kann aber auch von Epithelzellen, Fibroblasten und Astrozyten produziert werden (Ren & Torres 2009). Werden diese Zellen mit Gefahrensignalen konfrontiert, produzieren sie zunächst das Vorläuferprotein pro-IL-1 β , welches im Zytosol akkumuliert (Dinarello 2018a). Die Produktion von großen Mengen an pro-IL-1 β mRNA in Monozyten kann beispielsweise durch Komplementkomponenten, Hypoxie oder Gerinnungsfaktoren ausgelöst werden, ohne dass eine Translation stattfindet (Dinarello 2009). Erst die Gefahrensignalerkennung durch TLR4-Liganden oder IL-1 β selbst führt zur Translation der produzierten mRNA (Dinarello 2009). Um die Reifung des translatierten pro-IL-1 β zu initiieren, bedarf es oft eines weiteren Gefahrensignals, welches die Komplexierung des NALP3-Inflammasom aktiviert (Dinarello 2018a). Erst die Caspase-1 führt zur Proteolyse des Vorläuferproteins und zu reifem IL-1 β , welches folglich sezerniert wird. Somit werden die Transkription, Translation und Reifung von IL-1 β stets isoliert betrachtet. Erst nachdem zwei Gefahrensignale, in Form eines PAMP wie LPS und DAMP wie ATP, erkannt wurden, wird hochpotentes, reifes IL-1 β freigesetzt (Abb. 1) (Dinarello 2009; Stoffels et al. 2015). Die Art und Weise, wie die Freisetzung von reifem IL-1 β vonstattengeht, ist nach wie vor umstritten. Bekannt ist, dass dem reifen als auch dem unreifen IL-1 β die Peptidsequenz zur Lokalisation im Golgiapparat sowie im endoplasmatischen Retikulum fehlt. Demnach wird die konventionelle Sekretion weitestgehend ausgeschlossen. Alternative Sekretionsrouten von IL-1 β scheinen lysosomaler, exosomaler oder mikrovesikulärer Natur zu sein und schließen sich gegenseitig nicht aus (Lopez-Castejon & Brough 2011). Auch die Sekretion durch Kanäle und Poren wird diskutiert (Bergsbaken et al. 2009). Diese unterschiedlichen Sekretionsmöglichkeiten werden mit der Stärke und Art des jeweiligen Stimulus oder der Summe aller

Stimuli assoziiert (Lopez-Castejon & Brough 2011). Neueste Untersuchungen zeigen, dass die IL-1 β -Freisetzung in hochgradig stimulierten Zellen hauptsächlich durch das porenformende Protein Gasdermin-D vermittelt wird (Evavold et al. 2018).

Einmal sezerniert kann IL-1 β an den IL-1-Rezeptor Typ 1 (IL-1R1) binden, diesen aktivieren und zusammen mit dem gleichzeitig rekrutiertem *IL-1 receptor accessory protein* einen hoch affinen Rezeptorkomplex bilden (Dinarello 2009). Dieser Rezeptorkomplex führt in aktivierten Zellen zu pro-inflammatorischen Signalkaskaden, die unter anderem zur T-Zell-Proliferation, B-Zell-Reifung, Produktion von weiteren Zytokinen und zur Schlaf- sowie Appetitregulation beitragen (Dinarello 2009). Ein Repräsentant der IL-1-Familie, IL-1Ra kann als natürlicher IL-1R1-Antagonist wirken, indem er an den IL-1R1 bindet und damit die Interaktion von IL-1 β mit seinem Rezeptor verhindert (Ren & Torres 2009).

Die physiologischen Funktionen von IL-1 β sind vielfältig. Zum einen fungiert IL-1 β als Pyrogen, induziert die Expression von Cyclooxygenase-2, Phospholipase-A2 und der *inducible nitric oxide synthase*, was zum Anstieg der Konzentrationen von Prostaglandin-E2, *platelet activating factor* und Stickstoffmonoxid (NO) führt (Dinarello 2009). Als Folge kommt es zu Fieber, gesteigertem Schmerzempfinden, Vasodilatation und Hypotonie. Als Zytokin des angeborenen Immunsystems initiiert es erste Entzündungsreaktionen wie die Expression von Adhäsionsmolekülen auf Endothelzellen. Zusammen mit der Induktion von Chemokinen initiiert IL-1 β die Infiltration von immunkompetenten Zellen in das Gewebe (Dinarello 2009). Weiterhin ist IL-1 β ein angiogener Faktor, der an der Tumormetastasierung beteiligt ist (Voronov et al. 2003). Wird IL-1 β in geringen Dosen von 1 - 10 ng/kg injiziert, so kommt es im Menschen zu Fieber, Neutrophilie, erhöhten Konzentrationen an NO, APP und Zytokinen wie IL-6. Speziell die Produktion von IL-6 scheint sehr sensitiv auf IL-1 β zu reagieren (Dinarello 1996). Die geringe Halbwertszeit von IL-1 β im Plasma ist der Grund, weshalb IL-6 als Surrogatparameter für die IL-1 β -Freisetzung *in vivo* verwendet wird (Kudo et al. 1990).

Neben diesen wichtigen Aufgaben in der Infektabwehr kann ein Überschuss an IL-1 β lebensbedrohlich für den Wirtsorganismus werden. Fehlregulationen können zu auto-inflammatorischen Erkrankungen wie Gicht, Typ-II-Diabetes sowie zu autoimmunen Erkrankungen wie der rheumatoiden Arthritis führen (Dinarello et al. 2012). Eine erblich bedingte, autoinflammatorische Erkrankung ist das Cryopyrin-assoziierte periodische Syndrom (CAPS), welches durch eine Mutation im *NALP3*-Gen verursacht wird. Dieser Gendefekt führt zu einer Überproduktion von IL-1 β und zur Entstehung systemischer Entzündungsreaktionen (Hoffman et al. 2001). Um IL-1 β -vermittelte Erkrankungen zu behandeln, sind Mechanismen zur Kontrolle der IL-1 β -Aktivität Gegenstand der Forschung. Seit 1993 kamen mehrere Medikamente zur Behandlung IL-1 β -vermittelter Erkrankungen auf den Markt. Anakinra, ein rekombinater IL-1Ra, der die Aktivität von IL-1 β und IL-1 α blockiert wird heute zur Behandlung des CAPS, aber auch anderer

autoinflammatorischer Erkrankungen eingesetzt (Dinarello et al. 2012). Eine weitere Möglichkeit zur Blockade der IL-1 β -Aktivität besteht in der Neutralisation des Proteins, entweder durch lösliche IL-1-Rezeptoren oder monoklonale Antikörper gegen IL-1 β . Der lösliche Decoy-Rezeptor Rilanocept und der monoklonale Antikörper Canakinumab werden derzeit in vielen klinischen Studien unterschiedlicher IL-1-vermittelter Erkrankungen erprobt (Dinarello et al. 2012). Auch die Kontrolle der IL-1 β -Produktion durch Caspase-1-Inhibitoren zur Behandlung autoinflammatorischer Erkrankungen wird diskutiert (Stack et al. 2005). Da jedoch alle therapeutischen Blockaden von IL-1 β zur verminderten Immunabwehr des Wirtsorganismus führen, kann es vermehrt zu Infektionen kommen. Auch können sich die Krankheitsverläufe einer Infektion durch eine therapeutische IL-1 β -Blockade verlängern (Dinarello et al. 2012). Aus diesem Grund zielen einige Forschungsansätze darauf ab, nur bestimmte Anteile der IL-1 β -Freisetzung zu kontrollieren. Indem man nur den Anteil an der gesamten IL-1 β -Freisetzung blockiert, die für die überschießende systemische Immunreaktion verantwortlich ist, könnte man eine erhöhte Infektanfälligkeit umgehen (Grau et al. 2019).

Auch schwere Verletzungen in Form eines Polytraumas, oder Operationen, die mit extrakorporaler Oxygenierung einhergehen, können zu erhöhten IL-1 β -Konzentrationen im Blut führen (Day & Taylor 2005). Somit sind Patienten, die sich beispielsweise einer Operation am offenen Herzen unterziehen und eine extrakorporale Oxygenierung benötigen, besonders gefährdet eine systemische Entzündungsreaktion zu entwickeln (Day & Taylor 2005; Bernardi et al. 2016; Allan et al. 2010). Untersuchungen konnten bereits zeigen, dass Patienten, die sich einer kardiopulmonalen Bypass(CPB)-Operation unterziehen, post-operativ erhöhte IL-1 β -Konzentrationen aufweisen (Roth-Isigkeit et al. 1999). Auf diesen Aspekt soll im nächsten Abschnitt eingegangen werden.

1.5 Die systemischen Entzündungsreaktionen auf eine CPB-Operation

Der CPB findet vor allem Anwendung während kardiochirurgischen Eingriffen. Die „Umgehung“ des kardiopulmonalen Kreislaufs garantiert, dass am blutleeren, nicht schlagendem Herzen operiert werden kann, während die Oxygenierung des Blutes weiterhin gewährleistet wird (Esper et al. 2014). Die extrakorporale Oxygenierung und damit die Zirkulation von Blut in artifiziellen Systemen ist somit ein Standardverfahren der Herzchirurgie. Eine Blutleere im Herzen kann durch eine Drainage des venösen Blutes im rechten Vorhof erreicht werden. Hierbei wird die *Vena cava superior* und *inferior* getrennt voneinander kanüliert. Passiv kann so das Blut in ein venöses Reservoir fließen, von wo aus es durch Roller- oder Zentrifugalpumpen zum eigentlichen Oxygenator gelangt (Baehner et al. 2012). Der Gasaustausch im Oxygenator erfolgt über eine semipermeable Membran, die den Gasaustausch zwischen Blut- und Gasgemisch durch Partialdruckdifferenzen ermöglicht. Nachdem das Blut oxygeniert sowie decarboxyliert wurde, wird es erneut über eine Kanüle der *Aorta ascendens* zugeführt und kann in den Körperkreislauf gelangen (Sarkar & Prabhu 2017). Die extrakorporale Zirkulation wurde 1953 erstmals in Anwendung und Form einer Herz-Lungen-Maschine realisiert

(Baehner et al. 2012). Die ständige Verbesserung dieses von John H. Gibbon erstmals etablierten Verfahrens verringerte auch die anfänglich hohe Morbidität sowie Letalität während des Eingriffs (Esper et al. 2014). Die systemischen und organspezifischen Folgen des Eingriffs sind jedoch bis heute Forschungsgegenstand.

Patienten, die sich einem kardiochirurgischen Eingriff mit CPB unterziehen, können eine systemische Entzündungsreaktion entwickeln, die sich post-operativ in folgenden Symptomen manifestieren kann (Singer et al. 2016):

- Fieber ($\geq 38^{\circ}\text{C}$) oder Hypothermie ($\leq 36^{\circ}\text{C}$),
- Tachykardie ($\geq 90/\text{min}$),
- Tachypnoe (Frequenz $\geq 20/\text{min}$) oder Hyperventilation ($\text{paCO}_2 \leq 33 \text{ mmHg}$),
- Leukozytose ($\geq 12000/\text{mm}^3$) oder Leukopenie ($\leq 4000/\text{mm}^3$) oder $\geq 10\%$ unreife Neutrophile im Differenzialblutbild.

Dabei laufen nach heutigem Forschungsstand simultan oder kurz aufeinander folgend, zwei entgegengesetzte Immunreaktionen ab (Xiao et al. 2011). Zum einen werden systemische, pro-inflammatorische Reaktionen in Form eines *systemic inflammatory response syndrome* (SIRS) eingeleitet, zum anderen kommt es zu einer kompensatorischen anti-inflammatorischen Reaktionen, dem *compensatory anti-inflammatory response syndrome* (CARS) (Sauaia et al. 2017). Die Intensität und Balance dieser beiden Reaktionen entscheidet letztendlich über die Schwere der systemischen Entzündungsreaktion und die post-operativen Komplikationen (Landis et al. 2014). Diese reichen von Fieber und diffusen Gewebsödemen, zu moderaten Reaktionen wie hämodynamische Instabilität und Koagulopathien, bis hin zu schwerwiegenden Komplikationen wie akuten Gewebsschädigungen, die unbehandelt zu Multiorganversagen und Tod des Patienten führen können (Landis et al. 2014). Die systemische Entzündung nach herzchirurgischen Eingriffen ist für die post-operative Morbidität und Letalität ausschlaggebend. Ein SIRS ist hauptsächlich durch pro-inflammatorische Aktivierung des angeborenen Immunsystems gekennzeichnet. Patienten, die ein schwerwiegendes SIRS entwickeln, sind besonders gefährdet ein frühes, post-operatives Organversagen zu erleiden. Patienten, die wiederum eine frühe, post-operative Inhibition der adaptiven Immunität durch ein CARS erfahren und damit pro-inflammatorischen Reaktionen entgegenwirken, entwickeln eine Anfälligkeit für sekundäre Gewebsschädigungen und -infektionen, die wiederum zu einem späten, post-operativen Organversagen führen können (Sauaia et al. 2017). Patienten, die einer zusätzlichen, fortbestehenden Infektion oder einer Stauungspneumonie unterliegen, zeigen eine erhöhte inflammatorische Reaktion auf einen kardiochirurgischen Eingriff (Day & Taylor 2005). Aus diesem Grund spricht man auch von *multiple hit*-Szenarien, die die Entstehung einer systemischen Entzündung begünstigen. In Bezug auf die Immunantwort wirken die pro-inflammatorischen Stimuli nicht additiv, sondern synergistisch (Day

& Taylor 2005). Auch in kardiochirurgischen Eingriffen mit einem CPB sind solche *multiple hit*-Szenarien denkbar, in welchen beispielsweise die Exposition mit artifiziellen Oberflächen des extrakorporalen Kreislaufs als *first hit* und durch das primäre chirurgische Trauma freigesetztes ATP als *second hit* fungiert (Tschoeke et al. 2007). Die systemische Entzündung nach CPB-Operation ist ein Resultat aus chirurgischem Trauma, der Aktivierung von Blutkomponenten im extrakorporalen Kreislauf, Ischämie-/Reperfusionsschäden und der Freisetzung von Endotoxinen (Landis et al. 2014). Im Folgenden werden diese Komponenten genauer betrachtet.

1.5.1 Immunreaktionen auf einen CPB

Die als Reaktion auf eine CPB-Operation beobachteten Entzündungsvorgänge lassen sich in zwei Phasen unterteilen. Die „frühe“, unmittelbare und die „späte“ Phase (Warren et al. 2009). Die „frühe“ Entzündungsreaktion erfolgt hauptsächlich als Antwort auf den Kontakt von zellulären und humoralen Blutbestandteilen mit den artifiziellen Oberflächen des extrakorporalen Kreislaufsystems (Warren et al. 2009). Normalerweise kommen diese Blutbestandteile nur mit den Gefäßendothelien in Kontakt, die wiederum stetig für ein homöostatisches Verhältnis von pro- und antikoagulatorischen Substanzen sorgen (Kirklin et al. 1983). Die Abwesenheit endothelialer Oberflächen im extrakorporalen Kreislauf verschiebt dieses Verhältnis zu Gunsten der Koagulation, weshalb das Blut während einer CPB-Operation heparinisiert werden muss (Kirklin et al. 1983). Gerät das heparinisierte Blut in Kontakt mit den artifiziellen Oberflächen, so werden Plasmaproteine direkt im Schlauchsystem adsorbiert (Edmunds 1998). Einige dieser Proteine unterlaufen aus diesem Grund Konformationsänderung, die wiederum zelluläre Blutbestandteile aktivieren können. Dieser Vorgang führt letztendlich zur Aktivierung von humoralen Systemen wie der intrinsischen und extrinsischen Koagulationskaskade, der Fibrinolyse und dem Komplementsystem (Kirklin et al. 1983). Weiterhin kommt es zur Aktivierung von Endothelien, Lymphozyten, Monozyten, Neutrophilen und Thrombozyten (Edmunds 1998). Das Zusammenspiel dieser Akteure ist komplex und bis heute nicht vollständig verstanden. Man weiß jedoch, dass vasoaktiven Substanzen, Proteine und Mikrothromben zur Initiierung der systemischen Entzündungsreaktion beitragen und mit den Komplikationen einer CPB-Operation korreliert sind (Warren et al. 2009). Hierunter fallen vor allem die Koagulopathien, Gewebsödeme und temporäres Organversagen (Day & Taylor 2005).

Die „späte“, meist post-operative Phase einer CPB-Operation ist weniger durch Kontaktaktivierung gekennzeichnet. Während dieser Phase spielt der Ischämie-/Reperfusionsschaden und die Endotoxämie eine Rolle (Warren et al. 2009; Wan et al. 1997). Während der CPB-Operation sorgt das Abklemmen der Aorta für eine Ischämie im Herz. Zudem kommt es zu einer Blutleere im Großteil der Lunge, die wiederum noch in Teilen mit oxygeniertem Blut aus den nicht betroffenen Bronchialarterien versorgt wird. Während der Ischämie kommt es zu endothelialen Schäden, die die Aktivierung von Neutrophilen bedingen (Dreyer et al. 1995). Ischämische Zellen produzieren große Mengen an ROS und pro-inflammatorischen Zytokinen (Zakkar et al. 2015). Nach der Operation

werden das ischämische Herz sowie das Lungengewebe wieder vollständig reperfundiert. Dieser Vorgang geht mit einer zusätzlichen Entzündungsreaktion einher, die wiederum mit einer Erhöhung der kapillären Permeabilität verbunden ist. Diese erhöhte Permeabilität kann letztendlich zu intestinalen Flüssigkeitsansammlungen, Leukozyteninfiltration, Koagulopathien und Organversagen führen (Warren et al. 2009). Die Reperfusion sorgt weiterhin für das erneute Vorhandensein von Sauerstoff, der zu weiteren, oxidativen Gewebsverletzungen führen kann. ROS schädigen hauptsächlich Endothelien in der Mikrozirkulation (Zakkar et al. 2015). Gelangen jedoch vermehrt Bestandteile verletzter Zellen in die gesamte Zirkulation, können sie zu Mediatoren einer systemischen Entzündungsreaktion werden (Warren et al. 2009). Neben dem Ischämie-/Reperfusionsschaden scheint auch die mit CPB-Operationen assoziierte Endotoxämie zur Entwicklung einer systemischen Entzündung beizutragen (Rossi et al. 2004). Endotoxine sind Bestandteile der Zellwand Gram-negativer Bakterien, darunter hauptsächlich LPS, die als Hauptstimuli für die Entwicklung eines SIRS gesehen werden (Warren et al. 2009). Der Anstieg von Endotoxinen im Blutkreislauf im Laufe einer CPB-Operation ist beschrieben, die Quelle dieser Endotoxine jedoch weitestgehend umstritten (Rocke et al. 1987). Klar ist jedoch, dass das Vorhandensein von Endotoxinen zu einer erhöhten Freisetzung pro-inflammatorischer Zytokine und zur alternativen Komplementaktivierung führen, was wiederum zur Entstehung einer systemischen Entzündung beiträgt (Warren et al. 2009).

Weil das CPB-Verfahren unabdingbar für die moderne Herzchirurgie ist, sind dessen post-operative Komplikationen und die Prävention einer systemischen Entzündung Gegenstand der Forschung. Da prädispositionierende Faktoren wie die Exposition zu artifiziellen Oberflächen, das chirurgische Trauma, der Ischämie-/Reperfusionsschaden und die Temperaturunterschiede nicht vollends vermieden werden können, werden vor allem folgende Ansätze unternommen: Zum einen wird versucht, komplett auf den CPB zu verzichten, indem so genannte *off-pump*-Operationen durchgeführt werden (Baehner et al. 2012). Zum anderen wird an der Biokompatibilität der kardiopulmonalen Kreisläufe gearbeitet und die Depletion von aktivierten Leukozyten unternommen (Day & Taylor 2005). Neuste Erkenntnisse widmen sich der Verminderung des Ischämie-/Reperfusionsschadens durch die Kontrolle von Serinproteasen, die durch Neutrophile ausgeschüttet werden und die auftretenden Gewebsverletzungen mitverursachen (Rehm et al. 2019). Hierbei zeigt auch die Anti-Protease α 1-Antitrypsin (AAT) protektive Effekte im Zusammenhang des Ischämie-/Reperfusionsschadens muriner Lungentransplantate (Götzfried et al. 2018). Eine weitere Möglichkeit besteht in der Anwendung und Entwicklung von Medikamenten wie Komplementinhibitoren oder anderen anti-inflammatorischen Substanzen. Andere Interventionen widmen sich der Kontrolle der Immunreaktionen auf das chirurgische Trauma, da bekannt ist, dass weniger der CPB selbst als mehr die Trauma-induzierten Vorgänge die Hauptursache für pro-inflammatorische Komplikationen nach CPB-Operation sind (Prondzinsky et al. 2005). Aus diesem Grund werden multifaktorielle

Interventionen als notwendig angesehen, um die systemische Entzündungsreaktion nach einer CPB-Operation zu minimieren (Landis et al. 2014).

1.5.2 Immunreaktionen auf ein Trauma

Schwerwiegende Operationen wie eine CPB-Operation gehen mit einem chirurgischen Trauma einher (Warren et al. 2009). Traumen sind nach wie vor weltweit eine der führenden Todesursachen (Lashoher et al. 2017). Die unmittelbare und frühe Mortalität ist vor allem durch den hämorrhagischen Schock und die direkte Verletzung innerer Organe begründet. Spätere post-traumatische Mortalitäten, die erst nach Tagen oder Wochen eintreten, sind komplexen, pathophysiologischen Prozessen geschuldet (Sobrino & Shafi 2013). Diese Prozesse resultieren aus einer systemischen Entzündungsreaktion als Antwort auf eine Vielzahl an Beeinträchtigungen, die während eines chirurgischen Traumas entstehen können: Die initiale Gewebsverletzungen, Blutverlust und daraus resultierende, sekundäre Gewebsverletzungen führen zu einer lokalen und systemischen Freisetzung endogener Mediatoren, die als DAMP fungieren (Hirsiger et al. 2012). Die Erkennung dieser DAMP durch Zellen des angeborenen Immunsystems führt letztendlich zur Einleitung pro-inflammatorischer und immunsuppressiver Prozesse, die einer homöostatischen Feinregulation unterliegen (Huber-Lang et al. 2018). Die Dauer und Stärke Trauma-induzierter Prozesse variiert stark und kann im Falle einer überschießenden pro-inflammatorischen Antwort zu sekundären Gewebsverletzungen und daraus resultierendem Multiorganversagen und Tod führen (Sauaia et al. 2017).

Unter den zahlreichen Mechanismen, die an der Entwicklung einer post-traumatischen systemischen Entzündung beteiligt sind, sind Inflammasome vielversprechende Angriffspunkte. Viele der Trauma-induzierten DAMP werden von NLR erkannt, induzieren die Inflammasomaktivierung und tragen zur Pathogenese der sekundären Gewebsverletzung bei (Saïd-Sadier & Ojcius 2012; Bortolotti et al. 2018). Immer mehr Untersuchungen deuten darauf hin, dass das NALP3-Inflammasom eine wichtige Rolle bei der sekundären Gewebsverletzungen und der Dysbalance der Immunreaktion nach Trauma spielt (Iyer et al. 2009; Starzl et al. 2015; Minutoli et al. 2016; Albalawi et al. 2017). Die Trauma-induzierte Aktivierung des NALP3-Inflammasoms führt weiterhin zur vermehrten Freisetzung von IL-1 β . Durch die zahlreichen systemischen und lokalen Effekte ist IL-1 β ein essentieller Bestandteil der Trauma-induzierten Immunreaktion (Dinarello 2009; Garlanda et al. 2013; Starzl et al. 2015). Außerdem sollen Inflammasome zur Dysfunktion von Monozyten während der post-traumatischen Immunsuppression beitragen (Relja et al. 2015). Sobald das CARS vorherrscht, kann es zu einer anhaltenden Immunsuppression, sekundären Infektionen und Organversagen kommen (Vanzant et al. 2014). Die Inaktivierung von Monozyten und Makrophagen steht während dieser immunsuppressiven Reaktion im Vordergrund (Hosseinian et al. 2015).

Die frühe Inhibition der Inflammasomaktivierung durch die Prävention der Freisetzung von DAMP und IL-1 β während der initialen und sekundären Gewebsschädigung scheint ein vielversprechender

Angriffspunkt zur Vermeidung von SIRS und CARS nach Trauma zu sein. Viele Interventionen zielen auf die Neutralisation von IL-1 β und IL-18 ab (Huber-Lang et al. 2018; Lord et al. 2014). Die Entdeckung von Inhibitoren, die gezielt die NALP3-Inflammasomaktivierung verhindern, ist für die Behandlung Trauma-induzierter Immunreaktionen von besonderem Interesse. Sie haben den entscheidenden Vorteil, lediglich die NALP3-induzierte Freisetzung von IL-1 β zu verhindern, ohne die Freisetzung durch andere Inflammasome oder Signalwege zu stören und damit das Risiko für sekundäre Infektionen durch Immunsuppression zu erhöhen (Coll et al. 2015; Lamkanfi & Dixit 2017). Eine weitere Möglichkeit, die NALP3-Inflammasomaktivierung zu kontrollieren, besteht in der Inhibition der Inflammasom-Aktivatoren. Ein Mechanismus, der die ATP-induzierte NALP3-Inflammasomaktivierung und IL-1 β -Freisetzung inhibieren kann, wird im nächsten Abschnitt erläutert.

1.6 Die cholinerge Kontrolle der monozytären IL-1 β -Freisetzung

Wie bereits in Abschnitt 1.4 erwähnt, ist die Freisetzung von IL-1 β aus Monozyten streng kontrolliert. Die Freisetzung bedarf meist zwei aufeinanderfolgender Gefahrensignale in Form von DAMP oder PAMP. Um exzessive Entzündungsprozesse zu vermeiden, hat das Immunsystem Kontrollmechanismen entwickelt, um Einfluss auf diesen Prozess nehmen zu können. Ein Mechanismus, der die monozytäre, ATP-induzierte IL-1 β -Freisetzung kontrolliert, wird durch den Neurotransmitter Acetylcholin (ACh) vermittelt (Hecker et al. 2015). Die cholinerge Kontrolle der monozytären IL-1 β -Freisetzung soll in diesem Abschnitt genauer erläutert werden.

ACh ist einer der ältesten Neurotransmitter, der im zentralen und peripheren Nervensystem identifiziert wurde. Erstmals 1867 von der Firma Bayer chemisch synthetisiert, blieb die biologische Funktion von ACh lange unentdeckt. Erst 1914 konnte die Beobachtung gemacht werden, dass das aus Pilzen stammende ACh den Muskeltonus des Herzens reduziert, jedoch den der glatten Darmmuskulatur zu stimulieren schien (Tansey 2006). ACh und ACh-synthetisierende Enzyme ließen sich in verschiedenen Lebensformen ohne Nervensystem nachweisen, was eine non-neuronale Funktion erahnen ließ (Horiuchi et al. 2003). Heute weiß man, dass ACh von vielen non-neuronalen Zellen wie Lymphozyten und Endothelzellen freigesetzt wird und ein breites Spektrum an weiteren, physiologischen Funktionen besitzt (Kawashima et al. 2015). Eine der wichtigsten non-neuronalen Funktionen ist sein immunmodulatorisches Potenzial (Kawashima et al. 2012; Olofsson et al. 2012; Cox et al. 2020). Die Expression muskarinischer und nikotinischer ACh-Rezeptoren in Immunzellen ist seit den frühen 1970er Jahren aufgrund von vielfältigen Funktionsstudien mit Agonisten wie Carbacholoxotremerin und Nikotin bekannt (Kawashima & Fujii 2000). Weiterhin konnte die Expression dieser Rezeptoren auf Immunzellen durch Bindungsstudien mit radioaktiv-markierten Liganden wie α -Bungarotoxin (α -Btx) bestätigt werden (Fujii et al. 2017a). Dass ACh jedoch auf zirkulierende Immunzellen wirken kann, blieb lange umstritten, bis die Anwesenheit von ACh im Blut nachgewiesen werden konnte (Kawashima & Fujii 2000). Nach dieser Entdeckung wurde eine

Vielzahl an Untersuchungen unternommen, die zeigen, dass Immunzellen alle nötigen Komponenten enthalten, um ein Nervensystem-unabhängiges, cholinerges System zu unterhalten (Neumann et al. 2007). Zu diesem System gehört die Cholin-Acetyltransferase, die Acetylcholinesterase sowie muskarinische und nikotinische Acetylcholinrezeptoren (nAChR) (Fujii et al. 2017b). Jüngste Untersuchungen zum cholinergem System in Immunzellen lassen vermuten, dass non-neuronales ACh eine Schlüsselfunktion in der Regulation des Immunsystems einnimmt (Fujii et al. 2017a; Cox et al. 2020).

Ein wichtiger Teilaspekt in der Regulation des Immunsystems ist die ATP-vermittelte IL-1 β -Freisetzung. Hecker et al. konnte erstmals zeigen, dass ACh diese IL-1 β -Freisetzung aus Monozyten inhibieren kann (Hecker et al. 2015). Mechanistisch konnte die Beteiligung nAChR, die klassischerweise in der neuronalen Signalweiterleitung involviert sind, identifiziert werden. Die Expression dieser Rezeptoren in non-neuronalen Zellen wie Leukozyten wurde durch andere Arbeiten bestätigt (Albuquerque et al. 2009). Allgemein setzen sich neuronale sowie non-neuronale nAChR aus den Untereinheiten $\alpha 2 - \alpha 7$, $\alpha 9$ und $\alpha 10$ sowie $\beta 2 - \beta 4$ zusammen (Fujii et al. 2017a). Die Untereinheit $\alpha 8$ ist lediglich im visuellen Systemen der Vögel nachgewiesen worden (Lohmann et al. 2000). Die Expressionen der Untereinheiten $\alpha 9$ (*CHRNA9*) und $\alpha 10$ (*CHRNA10*) wurden erstmals in mechanosensorischen Haarzellen im Innenohr der Ratte gezeigt, wo sie meist zusammen exprimiert sind (Elgoyhen et al. 1994; Elgoyhen et al. 2001). Die Expression der nAChR-Untereinheit $\alpha 7$ (*CHRNA7*) wurde im peripheren und zentralen Nervensystem, sowie in vielen non-neuronalen Zellen wie Leukozyten nachgewiesen (Fujii et al. 2017a). Die Aktivierung von ionotropen nAChR führt klassischerweise zur Depolarisation der Zellmembran, bedingt durch die Permeabilitätserhöhung für Na⁺, K⁺ und Ca²⁺-Ionen. Besonders der Ca²⁺-Einstrom durch den Rezeptor kann intrazelluläre Signalwege einleiten (Albuquerque et al. 2009). Interessanterweise scheinen die nAChR, die an der Inhibition der ATP-induzierten IL-1 β -Freisetzung beteiligt sind, keine ionotrope Funktion auszuüben (Richter et al. 2016). Vielmehr wird von einer unkonventionellen, non-neuronalen, metabotropen Funktion ausgegangen, die von den Untereinheiten $\alpha 7$, $\alpha 9$ und $\alpha 10$ auszugehen scheint (Hecker et al. 2015; Richter et al. 2016). Die Aktivierung dieser unkonventionellen nAChR wiederum induziert die Inhibition des P2X7-Rezeptors. Als Resultat kann dieser nicht mehr auf ATP ionotrop reagieren (Hecker et al. 2015; Richter et al. 2016). Die Aktivierung des Inflammasoms sowie die proteolytische Spaltung von pro-IL-1 β sind somit gehemmt, was letztendlich die Freisetzung von IL-1 β verhindert (Hecker et al. 2015).

Der zuvor beschriebene, cholinerge Mechanismus zur Kontrolle der ATP-induzierten, monozytären IL-1 β -Freisetzung ist nicht zu verwechseln mit dem „cholinergen anti-inflammatorischen Reflex“ (Tracey 2002), der sich durch folgende Beobachtungen konstruieren lässt: In einem Mausmodell des septischen Schocks konnte die Stimulation efferenter Vagusfasern die Folgen einer LPS-induzierten Endotoxämie verhindern und die Plasmakonzentration von TNF α verringern (Borovikova et al. 2000).

Gleichermaßen konnten ACh und Nikotin die LPS-induzierte Freisetzung von TNF α aus humanen Makrophagen hemmen (Borovikova et al. 2000). Die protektiven Effekte der Vagusnerv-Stimulation ließen sich in *Chrna7^{-/-}*-Mäusen nicht beobachten (Wang et al. 2003). Auch eine Splenektomie in Ratten sorgte für das Verschwinden der protektiven Effekte, die durch Vagusnerv-Stimulation und Nikotin induziert wurden (Huston et al. 2006). Aus diesen und weiteren Beobachtungen wurde der Wirkmechanismus des cholinergen anti-inflammatorischen Reflexes abgeleitet: Die sensorische Wahrnehmung von Infektionen oder Verletzungen erfolgt durch Afferenzen des Vagusnervs, die Informationen in integrative Bereiche des Gehirnstamms weiterleiten, wo sie verarbeitet werden. Das ausgehende Signal wird über efferente Vagusfasern und dem postganglionären Milznerv zur Milz weitergeleitet, wo daraufhin eine Noradrenalin-Ausschüttung stattfindet (Rosas-Ballina & Tracey 2009). Diese Ausschüttung stimuliert T-Zellen zur Freisetzung von ACh, welches wiederum von Makrophagen wahrgenommen werden kann, die nAChR exprimieren (Rosas-Ballina et al. 2011). Die Stimulation von $\alpha 7$ -nAChR durch ACh wiederum sorgt für die verringerte LPS-induzierte Ausschüttung pro-inflammatorischer Zytokine (Borovikova et al. 2000; Fujii et al. 2017a). Eine Beteiligung des anti-inflammatorischen Reflexes an der cholinergen Inhibition der bereits erwähnten ATP-induzierten IL-1 β -Freisetzung aus Monozyten kann nicht ausgeschlossen werden, wenn man bedenkt, dass ACh-freisetzende T-Zellen aus der Milz in den Blutstrom auswandern und so in Kontakt mit Monozyten kommen können. Allerdings scheinen sich die Effekte, die durch die Aktivierung der nAChR induziert werden, zu unterscheiden. Während die Aktivierung des $\alpha 7$ -nAChR in Makrophagen keinen posttranslationalen Effekt auf die IL-1 β -Produktion zu haben scheint (Borovikova et al. 2000), wird durch die Aktivierung der nAChR-Untereinheiten $\alpha 7$, $\alpha 9$ und $\alpha 10$ gezielt die ionotrope Funktion der P2X7-Rezeptoren inhibiert und damit die posttranslationale Reifung des Proteins verhindert (Hecker et al. 2015). Beide Effekte schließen sich jedoch nicht zwangsläufig aus.

Neben ACh konnten weitere, unkonventionelle nikotinische Agonisten identifiziert werden, die ebenfalls in der Lage sind, die ATP-vermittelte IL-1 β -Freisetzung aus Monozyten zu inhibieren. Hierzu zählen Phosphocholin (PC) sowie PC-haltige Moleküle wie Glycerophosphocholin (GPC), Lysophosphatidylcholin (LPC) sowie der Surfactantbestandteil Dipalmitoylphosphatidylcholin (Zakrzewicz et al. 2017; Backhaus et al. 2017; Richter et al. 2016; Hecker et al. 2015; Grau et al. 2019). Bakterien machen sich dieses cholinerge anti-inflammatorische System zunutze, indem sie PC-modifizierte Makromoleküle produzieren, um die Immunantwort und insbesondere die Freisetzung von IL-1 β durch den Wirtsorganismus abzuschwächen und damit ihre eigene Existenz zu verteidigen (Hecker et al. 2015; Richter et al. 2018a). Klinisch wurde beobachtet, dass IL-1 β -vermittelte rheumatische Erkrankungen seltener oder in abgeschwächter Form in Ländern auftreten, die mit höheren Konzentrationen von PC-modifizierter Makromolekülen konfrontiert sind als Industriestaaten (Kalla & Tikly 2003). *In vitro*-Experimente sowie Arthritis-Mausmodelle bestätigen die protektive Wirkung PC-modifizierter Makromoleküle in diesem Kontext (Al-Riyami & Harnett 2012; Harnett et al. 2008). Eine weitere Arbeit zeigt die anti-inflammatorischen Wirkung von PC, welches an C-

reaktivem Protein (CRP) gebunden ist. Die Bindung von PC an CRP potenziert hierbei die Inhibition der ATP-induzierten IL-1 β -Freisetzung aus Monozyten um ein Vielfaches (Richter et al. 2018b). Diese cholinerg vermittelte Inhibition der IL-1 β -Freisetzung kann durch ein weiteres APP vermittelt werden, das im nächsten Abschnitt genauer erläutert wird.

1.7 Das Akute-Phase-Protein AAT

AAT (*serine protease inhibitor A1*, *SERPINA1*) ist als APP ein Teil der Akute-Phase-Reaktion, welche als unspezifische Immunantwort auf Gewebsschädigungen einsetzt. Es wird vermehrt im Zuge der frühen Ereignisse einer Entzündungsreaktion von Hepatozyten synthetisiert und in den Blutkreislauf sezerniert, um im geschädigten Gewebe anzukommen (Janciauskiene 2013). Induziert wird diese Sekretion durch die pro-inflammatorischen Zytokine IL-6, IL-1 und TNF α . Als Antwort werden die Konzentrationen positiv regulierter APP wie CRP, AAT, Fibrinogen oder das saures α 1-Glycoprotein stark erhöht und die Expression von Transthyretin, Transferrin, Albumin sowie Retinol- und Cortisol-bindender Proteine vermindert (Janciauskiene et al. 2013). Die hepatogene Expression von CRP und saurem α 1-Glycoprotein wird durch IL-6 und IL-1 reguliert, wohingegen die Expression von AAT hauptsächlich durch IL-6 angeregt wird (Cray et al. 2009). APP tragen zunächst zur Entzündungsreaktion bei, spielen jedoch auch eine zentrale Rolle in der Limitation der lokalen und systemischen Entzündungsreaktion. Diese duale Charakteristik zeigt sich im Falle von AAT durch die Tatsache, dass AAT sowohl die Freisetzung des pro-inflammatorischen Zytokins IL-1 als auch dessen anti-inflammatorischen Gegenspieler IL-1Ra in mononukleären Zellen des peripheren Blutes (*peripheral blood mononuclear cell*, PBMC) induziert (Tilg et al. 1993).

1.7.1 Produktion und Degradation

AAT wird konstitutiv von Hepatozyten exprimiert und ins Blut sezerniert. Es zirkuliert im Blut in Konzentrationen von 1 – 1,5 mg/ml (\cong 19 – 38 μ M), wobei diese Konzentration während einer Akute-Phase-Reaktion auf 2 – 3 mg/ml ansteigen kann (Janciauskiene et al. 2011). Die Halbwertszeit von AAT beträgt 3 – 5 Tage. Neben diesen hohen Konzentration in der Zirkulation findet man AAT auch in geringeren Konzentrationen in anderen Körperflüssigkeiten sowie in zahlreichen Geweben (Janciauskiene et al. 2011). Die Konzentration von AAT in Alveolarflüssigkeit beträgt beispielsweise nur 10 % der Plasmakonzentration (Janciauskiene 2001). Obwohl die Produktion von AAT hauptsächlich durch die Leber getragen wird, können auch Neutrophile, Monozyten, sowie pulmonale und intestinale Epithelzellen das Protein synthetisieren (Perlmutter et al. 1985; Ray et al. 1982; Geboes et al. 1982). Lokale Gewebskonzentrationen können als Reaktion auf eine Entzündungsreaktion bis um das 11-fache durch die lokale Synthese von infiltrierten und residenten Immunzellen sowie Epithelien ansteigen (Boskovic & Twining 1997). Pro-inflammatorische Zytokine wie IL-6, IL-1 oder TNF α und Endotoxine stimulieren hierbei Monozyten oder Gewebsmakrophagen zur Produktion von AAT (Knoell et al. 1998; Perlmutter & Punsal 1988). Humanes Bronchialepithel

hingegen wird durch Oncostatin-M, TNF α und Interferon- γ zur AAT-Produktion angeregt (Boutten et al. 1998). Eine positive, autoregulatorische Expressionsaktivität wurde in mononukleären Phagozyten gefunden, sobald diese mit Proteasen oder im Komplex mit AAT stimuliert wurden (Perlmutter & Punsal 1988). Der Abbau von AAT wird hauptsächlich im Komplex mit Proteasen vermittelt. Dazu erkennen *serpin-enzyme complex*-Rezeptoren die Komplexe aus AAT und Proteasen und vermitteln deren Internalisierung und Degradation. Des Weiteren kann AAT von Endothelzellen endozytiert werden (Sohrab et al. 2009).

1.7.2 Struktur und Funktion

AAT besteht aus einer Polypeptidkette mit 394 Aminosäuren mit einem freien Cysteinrest sowie drei Asparagin-gekoppelten Carboxylierungen und besitzt eine molekulare Masse von 52 kDa (Boerema et al. 2017). Strukturell besteht AAT aus drei β -Faltblättern und neun α -Helices. AAT gehört zur Superfamilie der Serinprotease-Inhibitoren (*serine protease inhibitors*, Serpine). Diese Superfamilie beschreibt mit 1500 Mitgliedern die größte und am weitesten verbreitete Familie an Protease-Inhibitoren (Law et al. 2006). Phylogenetisch werden alle eukaryotischen Serpine in 16 Kladen eingeteilt, wobei AAT zur Klade A(1-13) gehört, die lediglich extrazelluläre Anti-Proteasen umfasst (Irving 2000). Im Menschen wurden bis heute 36 serpinähnliche Gene identifiziert (Irving 2000). Die Mehrheit aller Serpine inhibiert mit großer Affinität Serinproteasen. Die am besten untersuchte Funktion von AAT ist demnach seine Anti-Proteasefunktion. Interessanterweise erschienen in den letzten dreißig Jahren viele Arbeiten, die andere Eigenschaften identifizierten konnten, die entweder in Zusammenhang mit der Anti-Proteasefunktion stehen, oder komplett unabhängig von dieser existieren. Es konnte z.B. gezeigt werden, dass AAT

- (i) die Produktion von ROS durch Neutrophile vermindert (Bucurenci et al. 1992),
- (ii) die Apoptose von Hepatozyten verhindert (van Molle et al. 1997),
- (iii) die LPS-induzierte Aktivierung von Monozyten inhibiert (Janciauskiene et al. 2004),
- (iv) im Vollblut als endogener Inhibitor der pro-inflammatorischen Zytokinproduktion fungiert (Pott et al. 2009).

Diese Untersuchungen trugen im Wesentlichen dazu bei, das Verständnis der physiologischen Funktion des Proteins zu erweitern. Demnach schreibt man AAT heute neben der Inhibition von Serinproteasen eine Rolle in anti-inflammatorischen Prozessen zu (Ehlers 2014). Beide Eigenschaften und deren strukturelle Grundlagen werden im Folgenden erläutert.

1.7.3 Anti-Proteasefunktion

AAT ist der am häufigsten vorkommende Proteaseinhibitor im menschlichen Blut (Janciauskiene 2013). Im Gewebe dient es dem Schutz vor übermäßigem Gewebsabbau durch Serinproteasen im Falle einer Entzündungsreaktion. Funktionsuntersuchungen beschäftigten sich hauptsächlich mit der Anti-

Proteaseaktivität des Proteins, weshalb die strukturellen Elemente dieser Funktion gut untersucht sind. Das reaktive Zentrum und damit der Interaktionsort mit der jeweiligen, zu inhibierenden Serinprotease beschreibt eine über das Protein herausragende Schleife (*reactive center loop*, RCL), die in diesem Fall als Pseudosubstrat dient (Law et al. 2006). Sobald die proteolytische Spaltung der Serinprotease vorgenommen wurde, faltet sich der N-terminale Abschnitt dieser Schleife in eine „Tasche“ der drei β -Faltblattstrukturen, sodass ein vierter, parallel laufender Strang entsteht. Man spricht in diesem Kontext auch von zwei Konformationszuständen des Proteins, der *stressed* (S)- und *relaxed* (R)-Konformation von AAT, wobei die (R)-Konformation eine deutlich höhere thermische Stabilität aufweist (Law et al. 2006). Der Übergang zwischen (S)- und (R)-Konformation führt zur Inhibition der jeweiligen Serinprotease (Irving 2000). Hierbei kommt es zur teilweisen Verzerrung der RCL, sodass die vollständige Hydrolyse von AAT ausbleibt und beide Enzyme in diesem kovalenten Zwischenstadium irreversibel verharren. Aus diesem Grund wird AAT wie viele andere Serpine auch als *suicide inhibitors* bezeichnet (Huntington et al. 2000). Die hauptsächlich durch AAT inhibierten Serinproteasen sind die neutrophile Elastase (NE) und die Proteinase-3 (PR3). Die Komplexierung von AAT mit NE und PR3 ist daher ein Standardverfahren zur Untersuchung der Anti-Proteasefunktion. AAT ist jedoch auch in der Lage, Trypsin, Kallikrein-7 und -14 sowie Matriptase zu inhibieren (Janciauskiene et al. 2011). Weiterhin gibt es Hinweise, dass AAT auch Cysteinproteasen wie die Caspase-3 oder Metalloproteasen inhibieren kann (Petrache et al. 2006; Ehlers 2014).

1.7.4 Anti-inflammatorische Eigenschaften

Wie bereits angedeutet, vermittelt AAT zahlreiche anti-inflammatorische Effekte in Zellen des angeborenen Immunsystems. Bei Neutrophilen sorgt AAT für eine Abschwächung der Chemotaxis (Bergin et al. 2010). Auch die Degranulation von Neutrophilen ist unter AAT vermindert (Bergin et al. 2014). Dendritische Zellen produzieren durch AAT vermehrt anti-inflammatorische Zytokine (Ozeri et al. 2012). *In vitro*-Untersuchungen zeigten, dass AAT die Aktivierung von Monozyten durch LPS inhibiert (Janciauskiene et al. 2004). Zudem ist die LPS-induzierte Produktion von pro-inflammatorischen Zytokinen im Vollblut AAT-defizienter Patienten erhöht, wenn man sie mit gesunden Probanden vergleicht (Pott et al. 2009). Dies schien mit der Inhibition von NF- κ B sowie die Induktion der cAMP-Produktion in Verbindung zu stehen (Janciauskiene et al. 2007; Pott et al. 2009). Auf Mechanismen zur Modulation der Zytokinproduktion wird in Abschnitt 1.7.7 genauer eingegangen. Die strukturellen und molekularen Grundlagen der anti-inflammatorischen sowie anti-apoptotischen Eigenschaften von AAT sind bis heute nicht vollends verstanden. Während in einigen Untersuchungen eine Beteiligung der RCL beschrieben wurde (Tilg et al. 1993), zeigen andere Arbeiten eine vollständige Entkopplung von der Anti-Proteasefunktion und der Aktivität der RCL (Janciauskiene et al. 2013). Einige dieser Effekte sind vermutlich durch Abschnitte im Protein vermittelt, die nicht im Zusammenhang mit der Bindung der Serinprotease stehen. Die verantwortlichen Proteinstrukturen bleiben jedoch unaufgeklärt. Eine Vermutung wird durch Ehlers

2004 angestellt: Da AAT sich Strukturelemente mit Corticosteroid-bindenden Proteinen teilt, die ebenfalls zur Serpin-Superfamilie gehören, wird vermutet, dass ein gemeinsames β -Fass-Strukturmotiv als eine mögliche Interaktionsstelle für andere Moleküle fungiert (Ehlers 2014; Huber & Carrell 1989). So steht dieses Strukturmotiv im Verdacht, für die Assoziation von AAT und Cholesterol in *lipid rafts* verantwortlich zu sein (Lewis 2012). Neben dem β -Fass-Strukturmotiv gaben auch drei Glykosylierungsstellen in der Struktur des Proteins Anlass zu Untersuchungen, die zeigten, dass eine Bindung von IL-8 an einer oder mehrerer dieser Glykosylierungsstellen erfolgt (Bergin et al. 2010; Huber & Carrell 1989). Weitere Bindungspartner können HSP sein (Finotti & Pagetta 2004).

1.7.5 Entkopplung der Anti-Proteasefunktion und der anti-inflammatorischen Eigenschaften

Es ist nicht vollständig von der Hand zu weisen, dass die anti-inflammatorischen Effekte von AAT durch dessen Anti-Proteasefunktion vermittelt werden, da die Freisetzung und Aktivität von Proteasen während Entzündungsprozessen zum Fortbestehen eben dieser beitragen (Ehlers 2014). In isolierten PBMC induziert AAT die Produktion von IL-1Ra, was hauptsächlich durch die Aktivierung des *serpin-enzyme complex*-Rezeptors vermittelt zu sein scheint und die Beteiligung der Anti-Proteasefunktion von AAT bei anti-inflammatorischen Prozessen betont (Tilg et al. 1993). Auf der anderen Seite gibt es zahlreiche Untersuchungen, die eine Entkopplung der anti-inflammatorischen Eigenschaften von der Anti-Proteasefunktion postulieren. Hierbei wird die immunmodulatorische Wirksamkeit von oxidiertem AAT betont, welchem die Anti-Proteasefunktion fehlt (Ruta Aldonyte 2004; Churg et al. 2001; Aldonyte et al. 2004). Es ist sowohl die native als auch die oxidierte Form von AAT in der Lage, die LPS-induzierte TNF α und IL-1 β -Freisetzung aus Monozyten zu inhibieren und gleichzeitig die Freisetzung von IL-10 zu verstärken (Janciauskiene et al. 2004), was für eine Entkopplung beider Funktionen spricht. Auch andere Serpine zeigen ähnliche Funktionsweisen. Beispielsweise wird über anti-inflammatorische Eigenschaften des *secretory leucocyte protease inhibitors* berichtet, welche ebenfalls von der Anti-Proteasefunktion entkoppelt sind (Zhang et al. 1997).

Neben den immunmodulatorischen Eigenschaften des Volllängenproteins wurden auch Untersuchungen mit Proteinfragmenten von AAT in diesem Kontext durchgeführt. Hierbei ist das aus 36 Aminosäuren bestehende, C-terminale Peptidfragment (C-36) zu nennen, welches nach der Komplexierungsreaktion von AAT und einer Serinprotease als pro-inflammatorisches Spaltprodukt entstehen kann (Ehlers 2014). C-36 führte *in vitro* zur Aktivierung von Neutrophilen und zur monozytären Freisetzung von pro-inflammatorischen Zytokinen (Janciauskiene et al. 2001; Subramaniam et al. 2006). Interessanterweise wirkt C-36 auf monozytäre Zellen als schwacher LPS-ähnlicher Agonist, denn in der Abwesenheit von LPS stimuliert C-36 die Freisetzung von TNF α und IL-1 β , während es in der Anwesenheit von LPS die Induktion der Zytokinfreisetzung antagonisiert (Subramaniam et al. 2006). Somit wird C-36 im Sinne der Immunmodulation eine kontextabhängige,

duale Rolle zugeschrieben (Ehlers 2014). Demnach kann gesagt werden, dass viele anti-inflammatorische Effekte von AAT unabhängig von dessen Anti-Proteaseaktivität vermittelt werden, da sie sowohl durch oxidierte als auch fragmentierte Varianten von AAT induziert werden können (Übersicht siehe (Jonigk et al. 2013b)).

1.7.6 AAT-Mangel

Hereditäre AAT-Mängel sind durch Mutationen im *SERPINA1*-Gen begründet. Bisher wurden über 100 Polymorphismen des Gens identifiziert, die in einer Dysfunktionalität oder einer starken Reduktion der Plasmakonzentration resultieren können (Cazzola et al. 2020). Eine drastische Reduktion der Plasmakonzentration wird bei homozygoten Trägern des Z-Allels beobachtet, die eine dysfunktionale Variante des Proteins exprimieren. Diese Z-Variante ist fehlgefaltet und polymerisiert stark, sodass es zur Proteinakkumulation im endoplasmatischen Retikulum in Hepatozyten kommt und nur wenig Protein im Plasma ankommen kann. Homozygote Träger dieses AAT-Allels werden mit dem Genotyp ZZ beschrieben, wohingegen homozygote Träger des Wildtyp-Allels mit dem Genotyp MM bezeichnet werden (Karatas & Bouche-careilh 2020). Ein genetisch-bedingter AAT-Mangel (*α 1-antitrypsin deficiency*, AATD) ist mit dem Auftreten chronischer Lungen- und Lebererkrankungen verbunden und betrifft etwa einen von 5000 Menschen (Karatas & Bouche-careilh 2020). Die Behandlungsstrategie für Patienten mit frühzeitig auftretendem Lungenemphysem und AATD ist eine Augmentationstherapie (Cazzola et al. 2020). Hierzu werden Patienten mit aus Plasma gewonnenem AAT augmentiert, das in Deutschland unter den Namen Prolastin[®] (Grifols, Deutschland) oder Respreeza[®] (CSL Behring, Deutschland) vertrieben wird. Die konventionelle Anwendung von AAT-Präparaten wurde bereits in vielen klinischen Studien evaluiert (Torres-Durán et al. 2018). Hierbei wird hauptsächlich die Progression des Lungenemphysems behandelt. Interessanterweise ist ein AATD oft mit dem zusätzlichen Auftreten von inflammatorischen Erkrankungen assoziiert, die sich unter Augmentationstherapie besonders stark verbessern. Patienten mit AATD-assoziiierter Panniculitis beispielsweise erfahren unter der AAT-Augmentation eine deutliche Besserung (Furey et al. 1996; Gross et al. 2009). Neben Panniculitis wurde der AATD mit inflammatorischen Erkrankungen wie Asthma, Bronchiektasie, rheumatoider Arthritis, Psoriasis, chronischer Urticaria, Glomerulonephritis, Pankreatitis, multipler Sklerose oder Fibromyalgie in Verbindung gebracht (Janciauskiene et al. 2011). Eine unkonventionelle Anwendung der AAT-Augmentationstherapie zeigte bereits bei der Behandlung von Diabetes, rheumatoider Arthritis, cystischer Fibrose, der Transplantatabstoßung, multipler Sklerose oder der Graft-versus-Host-Erkrankung Erfolge (Lewis 2012; Blanco et al. 2011). Auch wenn kein genetischer AATD vorliegt, kann AAT modifiziert oder inaktiviert werden und ein lokaler oder systemischer AAT-Mangel entstehen. Auch über eine Behandlung eines solch erworbenen AAT-Mangels durch Augmentationstherapie wird diskutiert (Janciauskiene et al. 2013).

1.7.7 Wirkung von AAT auf die monozytäre IL-1 β -Freisetzung

An PBMC wurde die AAT-vermittelte Inhibition einiger LPS-induzierter pro-inflammatorischer Zytokine gezeigt (Janciauskiene et al. 2004). Der zugrundeliegende Mechanismus beinhaltet den Anstieg der intrazellulären cAMP-Konzentration sowie daraus resultierende Veränderungen der Oberflächenexpression von CD14 (Churg et al. 2001; Janciauskiene et al. 2007; Nita et al. 2007). Die Arbeiten von Janciauskiene et al. 2004 und Nita et al. 2005 untersuchten die LPS-induzierte Freisetzung von IL-1 β aus PBMC nach 18 Stunden. Hierbei konnte eine deutliche Inhibition sowohl durch Prolastin[®], als auch durch aus gesunden Probanden frisch isoliertes AAT beobachtet werden (Janciauskiene et al. 2004; Nita et al. 2005). Pott et al. 2009 konnte ebenfalls eine Inhibition der spontanen IL-1 β -Freisetzung aus Vollblut nach 18 Stunden nachweisen (Pott et al. 2009).

Die Inhibition der ATP-induzierten Freisetzung von IL-1 β aus Monozyten wurde von Siebers et al. 2018 untersucht. Diese Arbeit konnte zeigen, dass AAT die ATP-induzierte, Inflammasom-abhängige IL-1 β -Freisetzung aus monozytären Zellen inhibiert (Siebers et al. 2018). Diese Arbeit liefert erstmals ein Erklärungsansatz, der die zugrundeliegenden Mechanismen der Inhibition der monozytären IL-1 β -Freisetzung durch AAT beschreibt. Hierbei inhibieren physiologische Konzentrationen von AAT die ATP-induzierte IL-1 β -Freisetzung aus monozytären U937-Zellen, PBMC und CD14⁺-Monozyten (Siebers et al. 2018). Prolastin[®] sowie aus gesunden Probanden frisch isoliertes AAT zeigen hier eine deutliche Aktivität. Wie in Abbildung (Abb.) 1 gezeigt, scheint AAT mechanistisch an den *scavenger*-Rezeptor CD36 zu binden, dessen Oberflächenexpression auf Monozyten bereits beschrieben wurde (Janciauskiene et al. 2001; Siebers et al. 2018). Die Aktivierung von CD36 führt weiterhin zur Aktivierung der Ca²⁺-unabhängigen Phospholipase-A2 β (iPLA2 β) und zur Freisetzung eines niedermolekularen Faktors, welcher wiederum cholinerge Aktivität aufweist (Siebers et al. 2018). Die Identität dieses Faktors ist bisher unbekannt und dieser wird daher als Faktor-x bezeichnet. Die Stimulation von nAChR durch Faktor-x löst wiederum unkonventionelle, metabotrope Effekte aus, die die ATP-induzierte Ionenkanalfunktion des P2X7-Rezeptors inhibieren und dadurch die Freisetzung von IL-1 β verhindern (Siebers et al. 2018). Experimente an U937-Zellen konnten zeigen, dass die nAChR-Untereinheiten α 9 zusammen mit α 10 oder α 7 unverzichtbar für die Inhibition der ATP-induzierten IL-1 β Freisetzung durch AAT sind (Abb. 1, (Siebers et al. 2018)). Eine andere Arbeit beobachtete ähnliche Abläufe bei der Inhibition der ATP-induzierten IL-1 β -Freisetzung aus Monozyten durch eine weitere Anti-Protease (Zakrzewicz et al. 2019). Diese Arbeiten gaben Anlass zu weiteren Untersuchungen, deren Fragestellungen im nächsten Abschnitt erläutert werden.

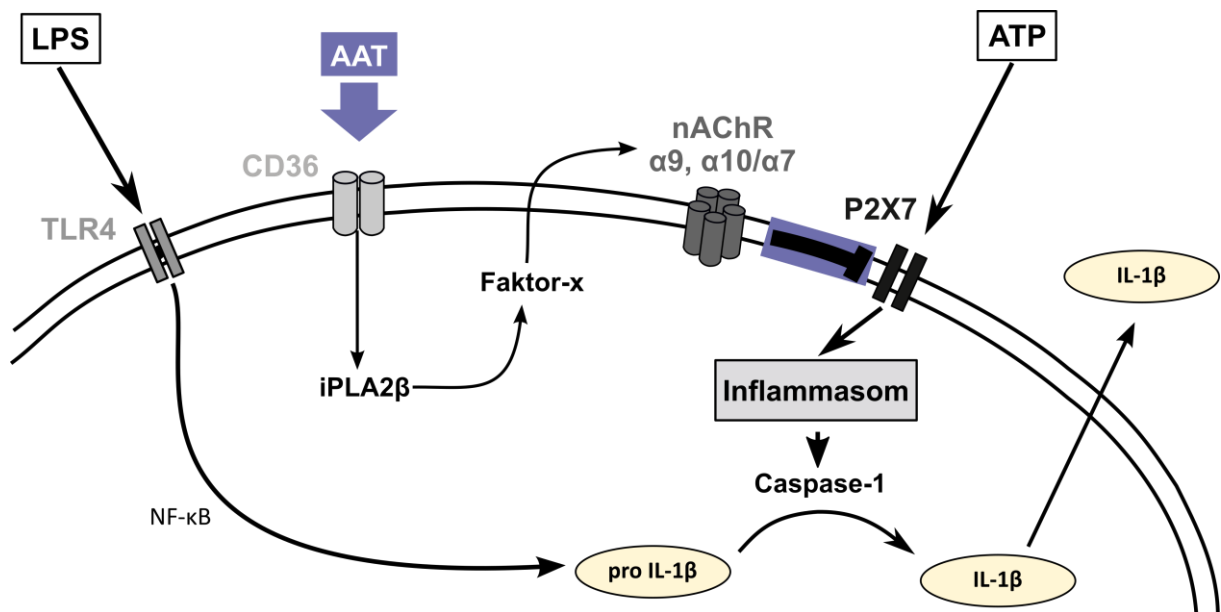


Abbildung 1: Schematische Zusammenfassung der α 1-Antitrypsin(AAT)-induzierten Inhibition der ATP-vermittelten Inflammasomaktivierung und Freisetzung von Interleukin-1 β (IL-1 β). Die Aktivierung des Toll-like Rezeptors 4 (TLR4) durch Lipopolysaccharid (LPS) induziert die Expression der Vorläuferproteins pro-IL-1 β durch die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B. Die Aktivierung des ATP-sensitiven P2X7-Rezeptors bedingt die Inflammasom-vermittelte Aktivität der Caspase-1, die wiederum die Spaltung von pro-IL-1 β zu reifem IL-1 β induziert. Inhibiert wird dieser Signalweg durch AAT, welches an den *scavenger*-Rezeptor CD36 bindet und damit die Ca^{2+} -unabhängige Phospholipase-A2 β (iPLA2 β) aktiviert, welche wiederum die Produktion eines niedermolekularen Faktors mit cholinergischer Aktivität (Faktor-x) induziert. Die Freisetzung des Faktor-x aktiviert nikotinische Acetylcholinrezeptoren (nAChR) bestehend aus den Untereinheiten α 9, α 10 und/oder α 7, welcher wiederum die Aktivierung des ATP-sensitiven P2X7-Rezeptors (P2X7) und damit die Reifung von pro-IL-1 β inhibiert. Modifiziert nach Siebers et al. 2018.

1.8 Die Fragestellungen der vorliegenden Arbeit

Wie zuvor beschrieben, verdeutlichen immer mehr Untersuchungen die anti-inflammatorischen Eigenschaften von AAT neben seiner Anti-Proteasefunktion (siehe Abschnitt 1.7.4). Die Fähigkeit zur Inhibition der IL- β -Freisetzung aus monozytären Zellen eröffnet die Möglichkeit, AAT-Präparate wie Prolastin[®] und Respreza[®] in unkonventionellen Anwendungsgebieten, etwa zur Prävention eines IL-1 β -vermittelten SIRS einzusetzen, das nach einer CPB-Operation auftreten kann. Aus diesem Grund wurden in der vorliegenden Arbeit folgende Untersuchungen unternommen:

(i) Charakterisierung von endogenem AAT aus gesunden Probanden sowie CPB-Patienten.

Zunächst wurde der Frage nachgegangen, ob eine AAT-Augmentation zur Prävention eines IL-1 β -vermittelten SIRS nach CPB-Operation geeignet sein könnte. Eine AAT-Augmentation während einer CPB-Operation wäre jedoch nur dann begründet, wenn das endogene AAT des Patienten während der Operation seine Fähigkeit verliert, die monozytäre IL-1 β -Freisetzung zu inhibieren. Ein solch erworbener AAT-Mangel ist durch einen schweren operativen Eingriff einer CPB-Operation denkbar. Durch die Aktivierung von Neutrophilen, die Freisetzung von Proteasen und ROS sowie die hämodynamischen Veränderungen, die während der Operation

auftreten, könnte das endogene AAT nicht mehr vollständig in der Lage sein, den systemischen Anstieg an IL-1 β zu inhibieren und damit die Entwicklung eines SIRS gefördert werden. Demnach würde nur ein erworbener AAT-Mangel eine AAT-Augmentation zur Prävention einer systemischen Entzündungsreaktion durch CPB-Operation rechtfertigen. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurden folgende Versuche unternommen: Endogenes AAT wurde durch Affinitätschromatografie aus dem Plasma gesunder Spender oder CPB-Patienten gewonnen und anschließend *in vitro* untersucht. Um eventuelle Veränderungen in der Funktionalität feststellen zu können, wurden CPB-Patienten im zeitlichen Verlauf einer Operation Blut abgenommen. Zur Untersuchung der Anti-Proteaseaktivität wurde das gewonnene AAT mit NE komplexiert und mittels *Comassie*-Färbung visualisiert. Zur Untersuchung der inhibitorischen Aktivität auf die ATP-induzierte IL-1 β -Freisetzung aus Monozyten wurde das gewonnene AAT zusammen mit ATP auf eine mit LPS vorstimulierte monozytäre Zelllinie gegeben und die freigesetzte IL-1 β -Konzentration ermittelt.

(ii) Charakterisierung der inhibitorischen Aktivität kommerzieller AAT-Präparate und deren oxidierten Varianten auf die IL-1 β -Freisetzung aus Monozyten.

Ein weiteres Problem stellt die enorme Heterogenität der kommerziell erhältlichen AAT-Präparate dar, die sich hinsichtlich ihrer Proteinmodifikation und -reinheit stark unterscheiden (siehe Übersicht (Boerema et al. 2017)). Diese Untersuchungen konnten zeigen, dass sich der Oxidationsgrad der jeweiligen AAT-Präparate stark unterscheidet. Der Oxidationsgrad von AAT wiederum scheint stark mit dessen inflammatorischer Modulationsfähigkeit in Verbindung zu stehen. Daher ergab sich für die vorliegende Arbeit folgende Vorgehensweise: Die in Deutschland zugelassenen AAT-Präparate Prolastin[®] und Respreeza[®] sowie das aus gesunden Probanden aufgereinigte AAT wurden zunächst chemisch oxidiert. Native sowie oxidierte AAT-Präparate wurden anschließend zusammen mit ATP auf mit LPS vorstimulierte, monozytäre Zellen gegeben und die IL-1 β -Freisetzung bestimmt. Die inhibitorische Kapazität wurde im Anschluss durch die Erstellung von Dosis-Wirkungskurven charakterisiert und miteinander verglichen.

(iii) Identifizierung des AAT-vermittelten Faktors mit cholinergem Aktivität (Faktor-x).

In Vorarbeiten (Siebers et al. 2018) wurde gezeigt, dass monozytäre Zellen auf eine Stimulation mit AAT mit einer Aktivierung der iPLA2 β reagieren, die wiederum zur Produktion eines freigesetzten Faktors beiträgt, welcher cholinerge Aktivität aufweist (Abb. 1). Die chemische Identität dieses freigesetzten Faktors ist bis heute unaufgeklärt. Vereinfachend wird in der vorliegenden Arbeit im Zusammenhang mit diesen freigesetzten Molekülen nachfolgend von einem „Faktor-x“ gesprochen, was jedoch die Anwesenheit mehrerer, aktiver Moleküle nicht ausschließt. Das Wissen über die Beteiligung der iPLA2 β trug im Wesentlichen zur Eingrenzung des gesuchten Faktor-x bei: Da Phosphatidylcholine Substrate der iPLA2 β sind

(O'Donnell et al. 2018), könnten deren Metabolite als Kandidaten für den Faktor-x in Frage kommen. Die Hydrolyse von Phosphatidylcholinen durch iPLA2 β erfolgt stets durch die Spaltung der Esterbindung an der *sn2*-Position, wodurch freie Fettsäuren und PC-haltige Metabolite wie LPC entstehen (O'Donnell et al. 2018) (Abb. 2). Somit könnte es sich bei den aktiven Komponenten des Faktor-x entweder um PC-haltige Metabolite von Phosphatidylcholinen oder freie Fettsäuren handeln (Siebers et al. 2018). Um sich der Identität des AAT-vermittelten Faktor-x zu nähern, wurde zunächst die inhibitorische Aktivität unterschiedlicher PC-haltiger Metabolite der iPLA2 β und freie Fettsäuren auf die IL-1 β -Freisetzung aus monozytären Zellen untersucht. Sofern eine inhibitorische Aktivität festzustellen war, wurden die Rezeptorbedürfnisse der inhibitorisch aktiven Substanzen durch die Verwendung von spezifischen nAChR-Antagonisten und *small-interfering* RNA (siRNA) ermittelt und mit den Rezeptorbedürfnissen des AAT-vermittelten Faktor-x verglichen.

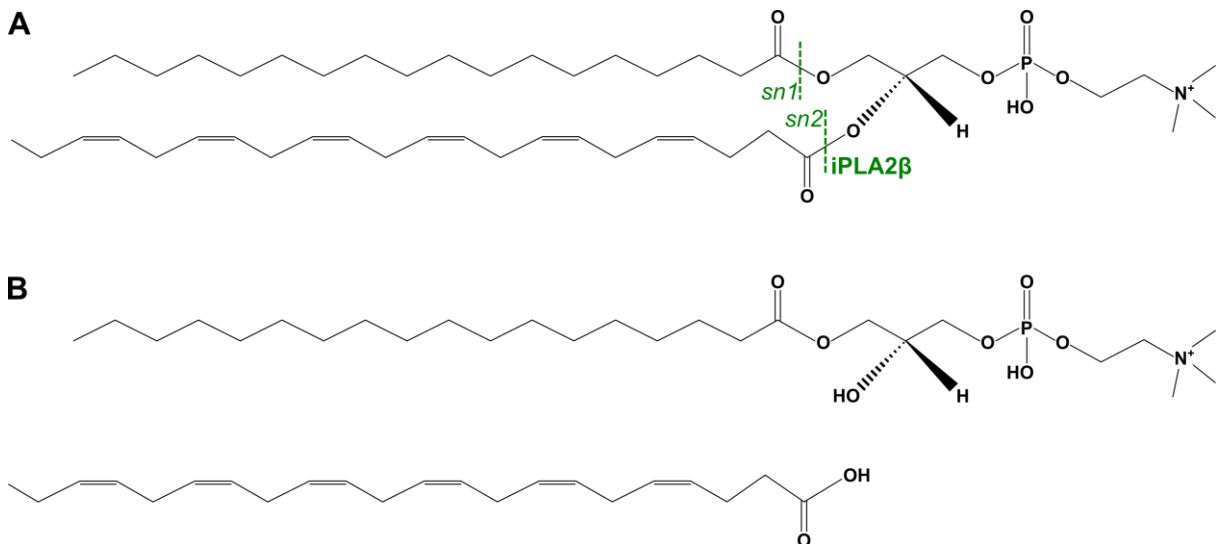


Abbildung 2: Enzymatische Spaltung eines Phosphatidylcholins an der *sn2*-Position durch die Ca^{2+} -unabhängige Phospholipase-A2 β (iPLA2 β). In (A) dargestellt ist ein Phosphatidylcholin, welches an der *sn2*-Position durch iPLA1 β hydrolisiert werden kann. In (B) dargestellt die Produkte der Hydrolyse durch iPLA2 β , ein Lysophosphatidylcholin und eine variierende freie Fettsäure, in diesem Fall Docosahexaensäure (DHA). Modifiziert nach O'Donnell et al. 2018.

2 Material und Methoden

2.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Tabelle 1: Geräte und Verbrauchsmaterialien

Artikel	Firma
10 ml Röhren	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
24-well-Mikrotiterplatten	Greiner Bio-One
50 ml Röhren	Greiner Bio-One
96-well-Mikrotiterplatten	Greiner Bio-One
AlphaDigiDoc Software (1201)	Genetic Technologies, Inc., Salt Lake City UT, USA
Amersham Hyperfilm–Röntgenfilm (TM ECL)	GE Healthcare Life Sciences, Chicago, IL, USA
Amicon®-Ultrafiltrationseinheit (Ultra 0.5 ml)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Analysewaage, AE 100	Mettler/Toledo, Gießen, Deutschland
Blotting-Kammer	von Keutz, Reiskirchen, Deutschland
Brutschrank Heracell 240i CO2-Inkubator	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Brutschrank/Wärmeschrank	Thermo Fisher Scientific
ChemiDoc MP Imaging Device	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
Einmalkanülen	B. Braun, Melsungen, Deutschland
Einmalspritze	B. Braun
Elektrophoresekammer	von Keutz
Gießapparatur	von Keutz
GraphPad Prism® Software (Version 6)	GraphPad Software, La Jolla, CA, USA
IBM SPSS Statistiksoftware (Version 25)	IBM, Armonk, NY, USA
Infinite® M200 Spektrophotometer	Tecan, Männedorf, Schweiz
Mikroskop Laborlux D	Leitz, Wetzlar, Deutschland
Mikroskop Labovert	Leitz
Mikrotiterplatten-Photometer FluoStar Optima®	BMG Labtech, Offenburg, Deutschland
NanoDrop 1000	Peqlab Biotechnologie, Erlangen, Deutschland
Netzgeräte	von Keutz
Nucleofector Device II	Lonza Cologne GmbH, Köln, Deutschland
pH-Meter, Ultra Basic UB-10	Denver Instruments, Göttingen, Deutschland

Pipette Pipetman 10 - 100	Gilson, Middleton, WI, USA
Pipette Reference (0,5 – 10, 10 – 100, 100 - 1000)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
<i>Poly-prep chromatography columns</i>	Bio-Rad
Precision Plus Protein™ Dual Color Standard	Bio-Rad
PVDF Membran, Immobilon-P	Merck
Scanner Canon 9000F Mark II	Canon, Krefeld, Deutschland
Sicherheitswerkbank Zellkultur Class II ENA 2	Nuaire, Plymouth, MN, USA
S-Monovette® Heparinröhrchen	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Statistiksoftware R (Version 3.6.1)	Freie Software
Sterilfilter (0,22 µm)	Merck, Millipore
Thermal Cycler G-Storm GS482	AlphaMetrix Biotech, Rödermark, Deutschland
Ultraschallbad Sonorex Super RK102H	Bandelin, Berlin, Deutschland
Vektorgrafiksoftware Inkscape	Freie Software
Vortex Mixer REAX 2000	Heidolph, Schwabach, Deutschland
Wasserbad	Köttermann, Uetze/Hänigsen, Deutschland
Wippschüttler	Kobe Labor- und Krankenhausbedarf, Marburg, Deutschland
Zählkammer Neubauer Tiefe: 0,1 mm 0,0025 mm²	Laboroptik, Friedrichsdorf, Deutschland
Zentrifuge Rotina 420R	Hettich, Tuttlingen, Deutschland

2.2 Reagenzien

Tabelle 2: Reagenzien

Artikel	Firma
[V11L;V16D]ArIB (*)	zur Verfügung gestellt von M. McIntosh
1-Palmitoyl-sn-Glycero-3-Phosphocholin (LPC) (*)	Merck, Sigma-Aldrich
2'(3')-O-(4-Benzoylbenzoyl)adenosin-5'-triphosphat (BzATP) (+)	Jena Bioscience, Jena, Deutschland
β-Mercaptoethanol ≥ 99 %	Merck, Sigma-Aldrich, Darmstadt, Deutschland
Acrylamidlösung (Rotiphorese Gel 30, 30 % Acrylamid, 0,8 % Bisacrylamid, 37, 5:1)	ROTH®
α1-Antitrypsin (AAT) Select®-Medium	GE Healthcare Life Sciences
α-Bungarotoxin (α-Btx) (*)	TOCRIS, Wiesbaden, Deutschland
Amaxa® Nucleofector Kit C	Lonza Cologne GmbH
Ammoniumpersulfat (APS) ≥ 98 %, p.a.	Merck, Sigma-Aldrich

Aqua dest. (ddH₂O)	B.Braun, Melsungen, Deutschland
Bovine serum albumin (BSA) Standardklasse, Fraktion V (*)	Serva, Heidelberg, Deutschland
Bromphenolblau Natriumsalz	ROTH [®] , Karlsruhe, Deutschland
Comassie Blue (Brilliant Blue R 250) (#)	Merck, Sigma-Aldrich
Proteaseinhibitor (compet[™] mini)	Roche, Basel, Schweiz
CytoTox96 non-radioactive cytotoxicity assay	Promega, Madison, WI, USA
Dinatriumhydrogenphosphat > 99,8 % (Na₂HPO₄)	Merck, Sigma-Aldrich
Docosahexaensäure (DHA) (#)	Merck, Sigma-Aldrich
Elastasesubstrat (N-succinyl-Ala-Ala-Ala-p-nitroanilid)	Merck
Entwicklerlösung	Adefo-Chemie, Dietzenbach, Deutschland
Essigsäure 96%, p.a.	Riedel-de Haen, Seelze, Deutschland
Ethanol ≥ 99,9 %, p.a.	Merck, Sigma-Aldrich
Fixierlösung	Adefo-Chemie
Fötale Kälberserum (FCS)	Biochrome, Berlin, Deutschland
Glycerin ≥ 98,5 %, p.a.	Merck, Sigma-Aldrich
Glycin > 99 %	ROTH [®]
Human IL-1β DuoSet[®] ELISA	R&D Systems [®] a biotchn [®] brand, Minneapolis, MS, USA
Isopropanol ≥ 99,9 %, p.a.	Merck, Sigma-Aldrich
Kaliumchlorid > 99,8 % (KCl)	ROTH [®]
Kaliumhydrogenphosphat > 99,8 % (KH₂PO₄)	Merck, Sigma-Aldrich
L-Glutamin	Gibco [™] Life Technologies, Thermo Fischer Scientific
Lipopolysaccharid (LPS, L2654) aus E.coli (*)	Merck, Sigma-Aldrich
Lumi-Light Western Blotting Substrat	Roche
L-α-G-PC (GPC) (*)	Merck, Sigma-Aldrich
Magnesiumchlorid (MgCl₂), ≥ 99,9 %, p.a.	ROTH [®]
Methanol, ≥ 98,5 %, p.a.	Merck
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED) ≥ 98,5 %, p.a.	ROTH [®]
Natriumacetat	ROTH [®]
Natriumchlorid (NaCl) > 99,8 %	Merck, Sigma-Aldrich
Natriumlaurylsulfat (SDS) > 99,5 %	ROTH [®]

N-Chlorosuccinimid, 98 % p.a.	Merck, Sigma-Aldrich
Neutrophile Elastase (NE)	Merck
ON-TARGETplus CHRNA7/9/10 siRNA SMARTpool	Dharmacon Inc., Lafayette, CO, USA
ON-TARGETplus <i>non-targeting pool</i>	Dharmacon Inc.
Phosphate-buffered saline (PBS)	Gibco™ Life Technologies, Thermo Fischer Scientific
Pierce™ BCA protein assay Kit	Thermo Fisher Scientific
Proteinase-3 (PR3)	Merck
RgIA4 (*)	zur Verfügung gestellt von M. McIntosh, Salt Lake City, UT, USA
RMPI-1640-Medium	Gibco™ Life Technologies, Thermo Fischer Scientific
Salzsäure (HCl), 96 %, p.a.	Merck
SERPINA1 ELISA	Abnova Ltd., Cambridge, UK
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris) ≥ 99,9 %, p.a.	ROTH®
Trypanblau	Merck, Sigma-Aldrich
Tween-20	Merck

(*) gelöst in ddH₂O, (#) gelöst in Methanol, (+) gelöst in ddH₂O und PBS (1:1).

2.3 Patientenmaterial

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Blutproben wurden innerhalb der klinischen Studien unter prüfärztlicher Aufsicht von Herrn Dr. Christian Koch (DRKS, klinische Prüfnummer 00010959) und Herrn Dr. Andreas Hecker gewonnen. Die Studien wurden durch die Ethikkommission des medizinischen Fachbereichs der Justus-Liebig-Universität Gießen, Deutschland genehmigt (AZ 30/16, AZ 81/13) und in Übereinstimmung mit der Deklaration von Helsinki durchgeführt. Jeder Patient wurde von einem Prüfarzt aufgeklärt. Eine schriftliche Einverständniserklärung unter Selbstauskunft wurde von jedem Patienten, gesunden Probanden oder einem gesetzlichen Vertreter des Patienten unterschrieben. Die Probandenkohorte bestand aus über 18-jährigen, gesunden und nicht rauchenden Männern aus einer Subkohorte einer prospektiven Single-Center-Pilotstudie. Die Patientencharakteristika wurden in Tabelle (Tab.) 3 zusammengefasst. Eingeschlossen wurden männliche sowie weibliche Patienten über 18 Jahren mit einer Indikation für eine CPB einschließende koronare Bypass-Operation und einer erwarteten Operationsdauer von über 2 Stunden. Patienten, die eine Herzklappen-Operation benötigten, wurden ausgeschlossen. Weitere Ausschlusskriterien waren Arrhythmien, Schwangerschaft, Teilnahme in weiteren interventionellen Studien, Infektionen oder Autoimmunerkrankungen, immun-suppressive oder -modulierende Medikationen, eine linksventrikulären Auswurffraktion unter 30 % oder eine renale Dysfunktion. Die Blutabnahme erfolgte 15 min nach Einleitung der Anästhesie, 15 und 60 min nach Anschluss an den extrakorporalen

Kreislauf sowie 15 min nach Beenden des extrakorporalen Kreislaufs. Die Anästhesie sowie alle operativen Verfahren erfolgten nach lokal standardisiertem Protokoll. Die Blutabnahme erfolgte in ein Monovette[®]-Heparinröhrchen, welches anschließend 10 min bei 4°C und 2000 g zentrifugiert wurde. Das Blutplasma wurde aliquotiert und bei -80°C gelagert.

Tabelle 3: Patientencharakteristika (n = 15)

Alter (Jahren)	64 (52 - 75)
Männliches Geschlecht (n/%)	13 (86,6)
Größe (m)	1,73 (1,64 – 1,83)
Körpergewicht (kg)	83,5 (78 – 120)
BMI	27,65 (23,1 – 35,8)
Vorerkrankungen	
Hypertonie (n/%)	14 (93,3)
Akuter Myokardinfarkt (n/%)	4 (26,6)
Klappenerkrankung (n/%)	2 (13,3)
Schlaganfall (n/%)	3 (20)
Chronische Niereninsuffizienz (n/%)	2 (13,3)
Hepatische Insuffizienz (n/%)	9
Diabetes (n/%)	6 (40)
Rauchen (n/%)	6 (40)
Laborbefunde	
Leukozytenzahl (x 1000/µl)	7,7 (4 – 11,1)
Hämoglobin (g/dl)	13,9 (11,1 – 15,7)
Thrombozyten (x 1000/µl)	263 (140 – 360)
INR	1 (0,9 – 1,1)
Fibrinogen (g/l)	3,5 (2,9 – 4,4)
aPTT (sec)	28 (22 – 37)
Kreatinin (mg/dl)	0,9 (0,7 – 2,9)
Harnstoff (mg/dl)	20 (18 – 56)
CK (U/l)	88 (55 – 226)
Troponin I (µg/l)	0,0125 (0 – 0,14)
C-reaktives Protein (mg/dl)	2,04 (0,5 – 15,24)

Werte sind dargestellt als Median oder Anzahl n (%), aPTT, *activated partial thromboplastin time*; BMI, *body mass index*; CK, *Creatinkinase*; INR, *international normalized ratio*.

2.4 Zelllinie U937

Die humane, monozytäre Lymphom-Zelllinie U937 wurde vom Leibniz-Institut DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ, Braunschweig, Deutschland) bezogen und mit 10 % fötalem Kälberserum (FCS) sowie 2 mM L-Glutamin supplementiertem RPMI-1640-Medium bei 37°C und 5 % CO₂-Sättigung kultiviert. Das Wechseln des mit FCS und L-Glutamin supplementiertem RPMI-Mediums sowie das Passagieren der U937-Zellen wurden alle drei Tage vorgenommen. Alle experimentellen Vorhaben sowie das Passagieren der Zellen wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt. In der exponentiellen Zellwachstumsphase wurden 1 x 10⁶ Zellen/ml in 24-well-Mikrotiterplatten ausgesät und mit 1 µg/ml/1 x 10⁶ Zellen LPS aus *Escherichia coli* für 5 Stunden bei 37°C und 5 % CO₂ vorinkubiert. Danach folgte eine Stimulation mit 2'(3')-O-(4-Benzoylbenzoyl)adenosin-5'-triphosphat (BzATP) mit einer Konzentration von 100 µM für 30 min bei 37°C und 5 % CO₂-Sättigung. Anschließend wurden die Zellen zentrifugiert, um Zellen und Zellüberstände voneinander zu trennen. Der Zell-freie Zellkulturüberstand wurde abgenommen und bis zur IL-1β- sowie Lactat-Dehydrogenase (LDH)-Messung bei -20°C gelagert.

2.4.1 Transfektion von U937-Zellen

Eine Transfektion mit siRNA erfolgte nach Herstellerangaben mittels Elektroporation mit dem Nukleofector Device II und dem Amaxa[®] Cell Line Nucleofector Kit C für U937-Zellen. Dafür wurden 1 x 10⁶ Zellen mit 30 pmol ON-TARGETplus siRNA für *CHRNA7*, *-9* und *-10* transfiziert. Als Kontrolle erfolgte die Transfektion mit unspezifischer ON-TARGETplus *non-targeting pool* siRNA. Nach 48 Stunden erfolgte das experimentelle Vorgehen, welches in Abschnitt 2.5 genauer erläutert wird.

2.5 Experimentelles Vorgehen zur Untersuchung der IL-1β-Freisetzung

2.5.1 Stimulation der U937-Zellen

Die Zellzählung von 10 µl Zellsuspension erfolgte in einer Vitalfärbelösung mit Trypanblau im Verhältnis 1:10 mittels Neubauer Zählkammer. Alle Experimente zur Untersuchung der IL-1β-Freisetzung aus U937-Zellen folgten dem in Abb. 3 dargestellten Versuchsschema. Die Zellen wurden zunächst mit 1 µg/ml LPS bei 37°C im Brutschrank vorstimuliert. Danach erfolgte bei 37°C und 5 % CO₂ eine 30-minütige Stimulation mit BzATP (100 µM) und der für den jeweiligen Versuch eingesetzten Substanz oder dem Substanzgemisch. Als Kontrollansätze dienten jeweils eine alleinige LPS-Stimulation, eine LPS- und BzATP-Stimulation sowie keinerlei Stimulation. Eine Zentrifugation von 500 g für 8 min bei 4°C ermöglichte die Trennung von Zellen und Zellüberständen. Anschließend erfolgte die Abnahme der Zellüberstände und die Messung der IL-1β-Konzentration mit Hilfe eines *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) sowie die Messung der der LDH-Konzentration.

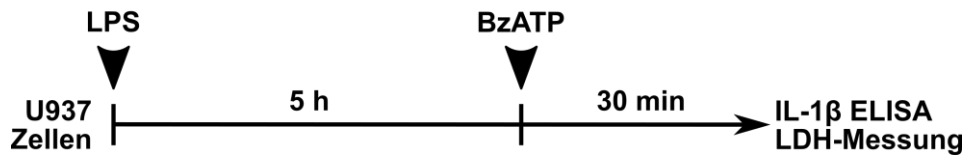


Abbildung 3: Versuchsschema zur Stimulation der U937-Zellen. Ausgesäte Zellen wurden zunächst mit Lipopolysaccharid (LPS) 5 Stunden (5 h) bei 37°C und 5 % CO₂-Sättigung im Brutschrank inkubiert. Danach erfolgte eine 30-minütige Stimulation mit 100 μM 2'(3')-O-(4-Benzoylbenzoyl)adenosin-5'-triphosphat (BzATP) und der für den jeweiligen Versuch eingesetzte Substanz oder das Substanzgemisch. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation, die Abnahme der Zellkulturüberstände und die Bestimmung der Interleukin-1β (IL-1β)-Konzentration über einen *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) sowie die Messung der Lactat-Dehydrogenase (LDH)-Aktivität.

2.5.2 ELISA

Um die Ausschüttung von IL-1β in Überständen von U937-Zellen zu messen, wurde ein IL-1β DuoSet[®] ELISA für humane Proben nach Herstellerangaben verwendet. Der Nachweisbereich lag bei 1,95 – 125 pg/ml IL-1β. Die Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben von R&D Systems[®]. Zur Quantifizierung der AAT-Konzentration im Plasma von CPB-Patienten wurde ein SERPINA1 ELISA Kit mit einem Nachweisbereich von 6,25 – 400 ng/ml nach Herstellerangaben verwendet. Die Quantifizierung des Extinktionssignals erfolgte spektrophotometrisch im Mikrotiterplatten-Photometer FluoStar Optima[®] bei einer Wellenlänge von 450 nm.

2.5.3 LDH-Messung

Eine Aussage über die Zytotoxizität der verwendeten Chemikalien konnte mit Hilfe eines CytoTox96 *non-radioactive cytotoxicity assays* getroffen werden. Hierbei wurde die Menge an LDH im Überstand der U937-Zellen bestimmt, indem nach Herstellerangaben vorgegangen wurde. Ein Referenzwert legte sich durch die LDH-Konzentration von U937-Zellen fest, die einer vorherigen Lyse unterzogen wurden und somit eine maximale LDH-Ausschüttung zeigen. Die Herstellung dieser Referenzprobe (*total release*) erfolgte stets parallel zu allen Versuchsansätzen, sodass eine Aussage über die Zytotoxizität der experimentellen Zellbehandlung möglich war. Eine Leerprobe wurde durch einen zellfreien Ansatz generiert.

2.6 Chromatographische Aufreinigung von AAT

Zur Aufreinigung von nativem AAT aus humanen Plasmen gesunder Probanden und CPB-Patienten wurde eine Affinitätschromatographie mit einem AAT Select[®]-Medium durchgeführt. Das im AAT Select[®]-Medium verwendete Antikörperfragment stammt ursprünglich aus der mit AAT immunisierten Spezies *Lama glama*. Die Produktion dieser Antikörperfragmente wurde durch die Klonierung und Expression in *Saccharomyces cerevisiae* erreicht, sodass ein nicht-tierischer Herstellungsprozess garantiert werden konnte. Dieses Affinitätschromatographiemedium wurde zur Aufreinigung von AAT aus humanem Plasma verwendet.

2.6.1 Aufreinigung von AAT aus humanem Plasma

Das verwendete Affinitätschromatographiemedium wurde in *poly-prep chromatography columns* eingebracht und mit Bindungspuffer (Tab. 4) versetzt. Vor und nach jedem Probenauftrag erfolgte ein Waschschrift der Säule mit 10 ml des Bindungspuffers. Die Lagerung des Affinitätsmediums erfolgte bei 4°C im Bindungspuffer. Die chromatographische Aufreinigung von nativem AAT aus Plasmen gesunder Probanden und CPB-Patienten erfolgte mit Hilfe des AAT Select[®]-Mediums. Hierzu wurde die Blutentnahme in ein 7,5 ml Monovette[®]-Heparinröhrchen vorgenommen, welches im direkten Anschluss bei 4°C und 2000 g für 10 min zentrifugiert wurde. Der Plasmaanteil wurde abgenommen und bei -20°C gelagert. Die Plasmaproben wurden auf Eis aufgetaut und direkt mit eiskaltem Bindungspuffer im Verhältnis 1:3 verdünnt. Danach erfolgte eine Sterilfiltration durch einen 0,22 µm Sterilfilter. Der Probenauftrag von 3 ml erfolgte in 1 ml-Schritten, wobei die Durchflussfraktionen aufbewahrt wurden. Die Elution wurde durch die Applikation des Elutionspuffers (Tab. 4) mit hoher Magnesiumkonzentration erreicht. Das Eluat wurde in Röhrchen auf Eis aufgefangen und im Anschluss durch Amicon[®]-Ultrafiltration aufbereitet (siehe Abschnitt 2.6.2). Um zu garantieren, dass sich keine restlichen Proteine in der Säule befinden, wurde nach der Elution ein Ablösungsschritt mit einem Ablösungspuffer (Tab. 4) von niedrigem pH vorgenommen und anschließend erneut mit Bindungspuffer gespült, um eine Wiederverwendung der Säule zu gewährleisten. Zur Validierung des Aufreinigungsverfahrens wurden im Anschluss alle Fraktionen auf ihren Protein- sowie AAT-Gehalt mittels Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) und anschließender Proteinfärbung oder *Western-Blot* überprüft (siehe Abschnitte 2.11.3, 2.12 und 2.13).

Tabelle 4: Pufferzusammensetzungen für die Aufreinigung von AAT aus humanem Plasma

Bindungspuffer	Elutionspuffer	Ablösungspuffer
20 mM Tris/HCl	20 mM Tris/HCl	PBS/HCl
150 mM NaCl	2 M MgCl ₂	
pH 7,4	pH 7,4	pH 2

2.6.2 Pufferaustausch

Nach der Elution aus der Affinitätssäule wurde AAT zunächst konzentriert und in *phosphate-buffered saline* (PBS) überführt. Hierzu wurden alle Eluatfraktionen aus der Affinitätsaufreinigung gepoolt und auf eine Amicon[®]-Ultrafiltrationsseinheit mit einem *cut-off* von 10 kDa geladen und dreimal bei 4°C und 14000 g für 10 min zentrifugiert. Zwischen jedem Zentrifugationsschritt wurde die Amicon[®]-Einheit erneut mit PBS aufgefüllt. Am Ende des Zentrifugationszyklus wurden alle Proben auf ein identisches Volumen aufgefüllt und anschließend die Proteinkonzentration bestimmt (siehe Abschnitt 2.11.2).

2.7 Proteinoxidation mit N-Chlorosuccinimid

Die chemische Oxidation von AAT erfolgte mit N-Chlorosuccinimid (NCS) in einem Verhältnis von 1:25. Hierzu wurde das zu oxidierende Protein in einer Konzentration von 20 mg/ml mit einer 0.1 M NCS Lösung bei pH 8 für 30 min und Raumtemperatur (RT) inkubiert. Anschließend erfolgte die Abtrennung von NCS durch eine Amicon[®]-Ultrafiltration mit einem *cut-off* von 10 kDa. Hierzu wurde die Ultrafiltrationseinheit zunächst mit einem Äquilibrierungspuffer, bestehend aus 0,05 M Tris/HCl und 0,15 M NaCl pH 7,4 äquilibriert und anschließend mit dem NCS-oxidiertem Proteingemisch beladen und bei 14000 g für 5 min und 4°C zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen sowie der Überstand in der Ultrafiltrationseinheit mit PBS erneut auf 20 mg/ml eingestellt und bei -20°C gelagert.

2.8 Komplexierung von AAT mit NE

Die Oxidation von AAT mit NCS führt bekanntermaßen zur Inaktivierung dessen Anti-Proteaseaktivität (Taggart et al. 2000). Aus diesem Grund eignet sich die kovalente Komplexierung von AAT mit dessen Substrat NE besonders gut, um die Oxidationseffizienz durch NCS sowie die allgemeine Anti-Proteaseaktivität unterschiedlicher AAT-Präparationen zu überprüfen. Hierzu wurde humane NE zunächst in einem Lagerungspuffer (50 mM Natriumacetat und 200 mM NaCl, pH 5.5) in einer Stockkonzentration von 80 µM gelöst und bei -20°C gelagert. In einem Reaktionspuffer (100 mM Tris/HCl und 500 mM NaCl, pH 7,4) erfolgte die Komplexierung von AAT und NE im molekularen Verhältnis von 1:2 für 30 min bei 37°C. Abgestoppt wurde die Reaktion durch die Zugabe des denaturierenden Probenpuffers II (Tab. 6) und 5 minütigem Kochen bei 90°C. Um die Komplexierung beider Proteine zu visualisieren, wurden die Proben in einem SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und anschließend einer Proteinfärbung (Abschnitt 2.12) und einer immunhistochemischen Färbung mit AAT-Antikörpern (Bethyl) unterzogen.

2.9 Komplexierung von Plasma mit NE und PR-3

Die gesamte Anti-Proteaseaktivität von Patientenplasma wurde im Labor Molekulare Pneumologie der Medizinischen Hochschule Hannover ermittelt. Hierzu wurde Plasma mit NE oder PR3 im molekularen Verhältnis von 1:1,5 für 30 min bei 37°C inkubiert. Die Komplexe wurden auf 90°C erhitzt und unter nicht-reduzierenden Bedingungen in einem 7,5%igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Ein immunhistochemischer Nachweis erfolgte mit polyklonalen Antikörpern gegen AAT (Agilent Dako) im *Western Blot*-Verfahren.

2.10 Aktivitätstest der NE

Die Quantifizierung der NE-Inhibitionskapazität von AAT wurde im Labor Molekulare Pneumologie an der Medizinischen Hochschule Hannover durchgeführt. Hierzu wurde Plasma mit NE (4 nM in 100 mM Tris/HCl, pH 8) im molekularen Verhältnis von 1:1,5 bei 37°C für 5 min vorinkubiert. Danach

erfolgte die Zugabe des Elastasesubstrats N-succinyl-Ala-Ala-Ala-p-nitroanilide nach Herstellerangaben. Die Absorption bei 405 nm wurde mit Hilfe des Infinite[®] M200 Spektrophotometers ausgelesen. Als Positivkontrolle diente eine Probe mit NE und Elastasesubstrat, auf die alle getesteten Proben normalisiert wurden. Alle Proben wurden doppelt bestimmt.

2.11 Gelelektrophorese

Im Zuge der Analyse von Proteingemischen wurde eine SDS-PAGE durchgeführt, welche es ermöglichte, Proteine nach ihrem Molekulargewicht aufzutrennen. Hierzu musste zunächst eine Probenvorbereitung vorgenommen und die Konzentration an Proteinen im Gemisch bestimmt werden.

2.11.1 Probenvorbereitung

Die Probenvorbereitung erfolgte in einem Puffersystem (Tab. 5 und 6), welches das Proteingemisch solubilisiert, denaturiert sowie reduziert und eventuelle Proteininteraktionen auflöst. Zum Probenauftrag in einer SDS-PAGE wurden Probenpuffer I und II im Verhältnis 1:1 verwendet und die Probe anschließend für 8 min auf 70°C erhitzt.

Tabelle 5: Probenpuffer I

Menge	Reagenzien
624 µl	Tris/HCl (1 M)
2,3 ml	10 % SDS
7,0 ml	ddH ₂ O
1 Tablette	Proteaseinhibitor

Tabelle 6: Probenpuffer II

Menge	Reagenzien
624 µl	Tris/HCl (1 M)
4 ml	Glycerin
2,3 ml	10 % SDS
1,6 ml	β-Mercaptothanol
Spatelspitze	Bromphenolblau
1 Tablette	Proteaseinhibitor

2.11.2 Proteinkonzentrationsbestimmung

Um die Proteinkonzentration einer Probe zu messen, wurde der Bicinchoninsäure (BCA)-Test durchgeführt. Zur Durchführung des BCA-Tests wurde ein Pierce[™] BCA *protein assay* Kit verwendet und nach Herstellerangaben verfahren. Die frisch angesetzte BCA-Lösungen B und C, welche

zweiwertige Kupferionen und Bicinchoninsäure enthalten, wurden mit der alkalischen BCA-Lösung A gemischt. Je 150 µl des Gemischs aus Lösung A/B/C wurden in einer 96-well-Mikrotiterplatte mit je 150 µl der 1:200 verdünnten Probe versetzt und für 120 min bei 37°C inkubiert. Nach Abkühlung auf RT wurde die Extinktion im Fluostar Optima® Mikrotiterplatten-Photometer bei einer Wellenlänge von 550 nm gemessen. Für jede Probe fand eine Dreifachbestimmung statt. Zur Berechnung der Proteinkonzentration aus den Extinktionswerten diente eine Verdünnungsreihe von Rinderserumalbumin (BSA) als Standard.

2.11.3 SDS-PAGE

Die SDS-PAGE diente der Auftrennung von Proteingemischen nach ihrem Molekulargewicht unter denaturierenden Bedingungen. Zunächst wurde ein 10%iges SDS-Gel in einer vorgefertigten Gießapparatur hergestellt. Das SDS-Gel setzt sich aus zwei Gelanteilen zusammen. Das Sammelgel (Tab. 7) ermöglicht das initiale Konzentrieren der Probe vor der eigentlichen Auftrennung des Gemischs im Trenngel (Tab. 8). Der Probenauftrag erfolgte in die vorgefertigten Taschen des Gels. Zusätzlich erfolgte in jedem Gel die Beladung mit einem angefärbten Precision Plus Protein™ Dual Color Standard, der nachfolgend als Marker für den Proteinstandard bezeichnet wird.

Tabelle 7: Reagenzien zum Gießen eines Sammelgels

Sammelgel		Sammelgel-Puffer	
Menge	Reagenzien	Menge	Reagenzien
1,35 ml	ddH ₂ O	6,06 g	Tris/HCl
790 µl	Sammelgel-Puffer	4 ml	10 % SDS
312,5 µl	Acrylamidlösung		pH 6,8
5,65 µl	APS		
4,5µl	TEMED	Mit ddH₂O auf 100 ml auffüllen.	

Tabelle 8: Reagenzien zum Gießen eines 10%igen Trenngels

Trenngel		Trenngel-Puffer	
Menge	Reagenzien	Menge	Reagenzien
1,83 ml	ddH ₂ O	18,16 g	Tris/HCl
1,08 ml	Trenngel-Puffer	4 ml	10 % SDS
1,46 ml	Acrylamidlösung		pH 8,8
7,7 µl	APS		
3 µl	TEMED	Mit ddH₂O auf 100 ml auffüllen.	

Der verwendete Laufpuffer (Tab. 9) wurde immer frisch angesetzt und die Proteine zunächst 10 min bei 90 mV, danach 70 min bei einer Spannung von 120 mV aufgetrennt.

Tabelle 9: Reagenzien zur Herstellung des Laufpuffers

Menge	Reagenzien
6,08 g	Tris
28,84 g	Glycin
20 ml	10 % SDS

Mit ddH₂O auf 2 Liter auffüllen.

Nach gelelektrophoretischer Auftrennung des Proteingemisches konnte entweder eine unspezifische Proteinfärbung oder eine spezifische Immunfärbung mittels *Western-Blot* vorgenommen werden.

2.12 Proteinfärbung

Zur unspezifischen Proteinfärbung eines in einem SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennten Proteingemisches wurde der Farbstoff *Comassie Brilliant Blue R-250* in einer 3 mM Methanol-Färbelösung verwendet. Hierbei wurde das Gel 8 min in der Färbelösung auf einem Wippschüttler inkubiert und im Anschluss dreimal mit einer Entfärberlösung (Tab. 10) gewaschen. Die Dokumentation des gefärbten Gels erfolgte mit einem dem ChemiDoc MP Imaging System.

Tabelle 10: Reagenzien zur Herstellung der Entfärberlösung

Menge	Reagenzien
500 ml	Methanol
35 ml	96 % Essigsäure

Mit ddH₂O auf 1 Liter auffüllen.

2.13 Western-Blot

Ein spezifischer Nachweis eines Proteins innerhalb eines Proteingemischs erfolgte durch die *Western-Blot* Methode. Nach einer gelelektrophoretischen Auftrennung wurden die Proteine zunächst auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran übertragen und dort durch Antikörper detektiert. Die Detektion des Antigens von Interesse wurde mit einem Primärantikörper vorgenommen. Ein Sekundärantikörper erfüllte die Überbrückungsfunktion zwischen Antigen und detektierbarem Signal, indem er zum einen an den Primärantikörper bindet und zum anderen an ein Reporterenzym gekoppelt ist. Die *horseradish-peroxidase* (HRP) wurde dabei als Reporterenzym benutzt, da die Zugabe eines geeigneten Substrats für dieses Enzym in einem Lichtsignal resultierte, welches mit Hilfe eines Röntgenfilms detektiert wurde. Hierzu wurde eine PVDF-Membran zunächst in Methanol aktiviert, luftblasenfrei auf das Gel gelegt und mit je einer Lage Filterpapier und 4 Lagen Scotch-Brite-

Schwämmen aufeinandergeschichtet. Im Anschluss erfolgte die Übertragung der Proteine in einer *Blotting*-Kammer mit 90 mA für 90 min pro Gel in einem Transferpuffer (Tab. 11). Für den immunologischen Nachweis der transferierten Proteine wurde die Membran zunächst eine Stunde bei RT getrocknet, anschließend erneut durch Methanol aktiviert und 10 min in *Tris-buffered saline* (TBS) oder PBS äquilibriert (Tab. 12). Um unspezifische Bindungen der Antikörper zu minimieren, wurde die Membran zunächst eine Stunde in einer 5 % BSA/TBS- oder 5 % Milchpulver/PBS-Lösung inkubiert. Die Verwendung der Primär- und Sekundärantikörper ist in Tab. 13 zusammengefasst. Vor und nach der Verwendung der Sekundärantikörper erfolgte ein dreimaliger Waschschrift mit 0,1 % Tween in TBS (TBST) oder PBS (PBST) für 10 min.

Tabelle 11: Reagenzien zum Herstellen des Transferpuffers

Menge	Reagenzien
6 g	Tris
28,6 g	Glycin
10 ml	10 % SDS
400 ml	Methanol

Mit ddH₂O auf 1 Liter auffüllen.

Tabelle 12: Reagenzien zum Herstellen einer 10-fach konzentrierten TBS- und PBS-Lösung

10-fach konzentrierte TBS-Lösung		10-fach konzentrierte TBS-Lösung	
Menge	Reagenzien	Menge	Reagenzien
24 g	Tris	80 g	NaCl
88 g	NaCl	2 g	KCl
		14,4 g	Na ₂ HPO ₄
		2,4 g	KH ₂ PO ₄
	pH 7,6		pH 7,4
Mit ddH₂O auf 1 Liter auffüllen.		Mit ddH₂O auf 1 Liter auffüllen.	

Tabelle 13: Antikörper

	Antikörper	Klonalität	Verdünnung	Lösung	Inkubationsdauer	Hersteller
primär	Ziege α -AAT	polyklonal	1:20000	5 % BSA/TBS	über Nacht	Bethyl
	Kaninchen α -AAT	polyclonal	1:50000	5 % Milchpulver/PBS	über Nacht	Agilent Dako
sekundär	Kaninchen α -Ziege Immunglobulin, HRP gekoppelt	polyklonal	1:5000	2,5 % BSA/TBST	90 min	Agilent Dako
	Ziege α -Kaninchen- Immunglobulin, HRP gekoppelt	polyklonal	1:5000	2,5 % Milchpulver/PBST	60 min	Agilent Dako

α , anti; HRP, *horseradish peroxidase*; BSA, *bovine serum albumin*; PBS, *phosphate-buffered saline*; TBS, *Tris-buffered saline*

Der indirekte Nachweis des Proteins über den HRP-gekoppelten Sekundärantikörper (Tab. 13) erfolgte mit Hilfe des *Lumi-Light*-Nachweissystems gemäß Herstellerangaben, wobei die Visualisierung über die Belichtung eines Amersham Hyperfilm-Röntgenfilms und die anschließende Verwendung der Entwickler- und Fixiererkonzentrate in 10%igen Eintauchlösungen erfolgte. Die Digitalisierung dieser Filme erfolgte mit Hilfe eines Canon 9000F Mark II Scanners. Densitometrische Messungen wurden mit Hilfe der AlphaDigiDoc-Software vorgenommen.

2.14 Statistik und Datenauswertung

Alle statistischen Auswertungen wurden mit dem Programm GraphPad Prism[®] (Version 6, GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) oder der IBM SPSS Statistiksoftware (Version 25, IBM, Armonk, NY, USA) durchgeführt. Zur statistischen Beurteilung von mehr als zwei unabhängigen Stichproben wurde zunächst der Kruskal-Wallis-Test durchgeführt. Bei einem p-Wert kleiner oder gleich 0,05 wurde der Mann-Whitney-U-Test benutzt, um den Vergleich zweier Gruppen durchzuführen. Die statistische Auswertung abhängiger Stichproben erfolgte durch die Verwendung des Wilcoxon-Rangsummentests. Als signifikant wurde der Unterschied zweier Gruppen mit einem p-Wert von kleiner oder gleich 0,05 beschrieben. Ein p-Wert größer als 0,05 wurde als nicht signifikant (n.s.) erachtet. Der exakte Wert wurde mit „p“ angegeben. P-Werte in multiplen Testungen wurden nach Bonferroni-Holm korrigiert. Die Anzahl der durchgeführten Experimente wurde als „n“ angegeben. Zur Berechnung der halbmaximalen Inhibitionskonzentrationen (IC₅₀) wurde das lineare Regressionsmodell Weibull-Typ-2 und die freie Statistiksoftware R (Version 3.6.1) verwendet. Alle Abbildungen wurden mit der freien Vektorgrafiksoftware Inkscape angefertigt.

3 Ergebnisse

3.1 Die BzATP-vermittelte IL-1 β -Freisetzung aus U937-Zellen

Die IL-1 β -Freisetzung aus U937-Zellen wurde durch zwei Stimuli induziert. Zunächst erfuhren alle Zellen eine fünfstündige Vorstimulation mit LPS (1 μ g/ml), auf die eine 30-minütige Stimulation mit BzATP (100 μ M) folgte. Als Kontrolleexperimente dienten jeweils ein Ansatz ohne jegliche Stimuli sowie ein weiterer Ansatz mit LPS-vorstimulierten Zellen. Diese Kontrolleexperimente wurden in allen experimentellen Ansätzen parallel durchgeführt. Da alle BzATP-Applikationen immer in Kombination mit einer fünfstündigen Vorstimulation mit LPS durchgeführt wurden, wurde im Folgenden von der Erwähnung dieser Vorstimulation in Ansätzen mit BzATP abgesehen.

Folgende Daten stellen eine Zusammenfassung aller in dieser Arbeit gezeigten Datenreihen dar. Unbehandelte U937-Zellen setzten nach fünf Stunden IL-1 β -Konzentrationen von durchschnittlich 1,3 pg/ml frei (n = 58, Abb. 4A). Nach fünfstündiger LPS-Applikation kam es zu einer spontanen, BzATP-unabhängigen IL-1 β -Freisetzung von 2,68 pg/ml (n = 68, Abb. 4A). Wurden die mit LPS vorstimulierten U937-Zellen zusätzlich 30 Minuten mit BzATP behandelt, so kam es zu einem signifikanten Anstieg der IL-1 β -Freisetzung auf durchschnittlich 47,33 pg/ml, mit einer Schwankungsbreite von 24,4 – 76,42 pg/ml ($p \leq 0,00001$, n = 68, Abb. 4A). Die IL-1 β -Konzentration in Zellkulturüberständen von U937-Zellen, die mit LPS vorstimuliert und mit BzATP für 30 min inkubiert wurden, wurde auf 100 % gesetzt. Normalisierte Werte der IL-1 β -Freisetzung sind in Abb. 4B dargestellt. Hierbei ergaben sich Werte für LPS-behandelte U937-Zellen von 5 % IL-1 β -Freisetzung (n = 68, Abb. 4B), die sich signifikant von BzATP-behandelten Ansätzen unterschieden ($p \leq 0,00001$, n = 68, Abb. 4B). Keine der Behandlungen führten zu drastischen Veränderungen der LDH-Aktivität im Überstand der U937-Zellen (Abb. 4C). Alle Ansätze zeigten eine LDH-Aktivität unter 10 %, lediglich ein unbehandelter Ansatz zeigte eine erhöhte Aktivität der LDH von 24,3 % (Abb. 4C). Diese Beobachtungen bestätigen vorangegangene Untersuchungen (Hecker et al. 2015; Richter et al. 2016; Amati et al. 2017; Backhaus et al. 2017; Hiller et al. 2018; Richter et al. 2018b; Siebers et al. 2018).

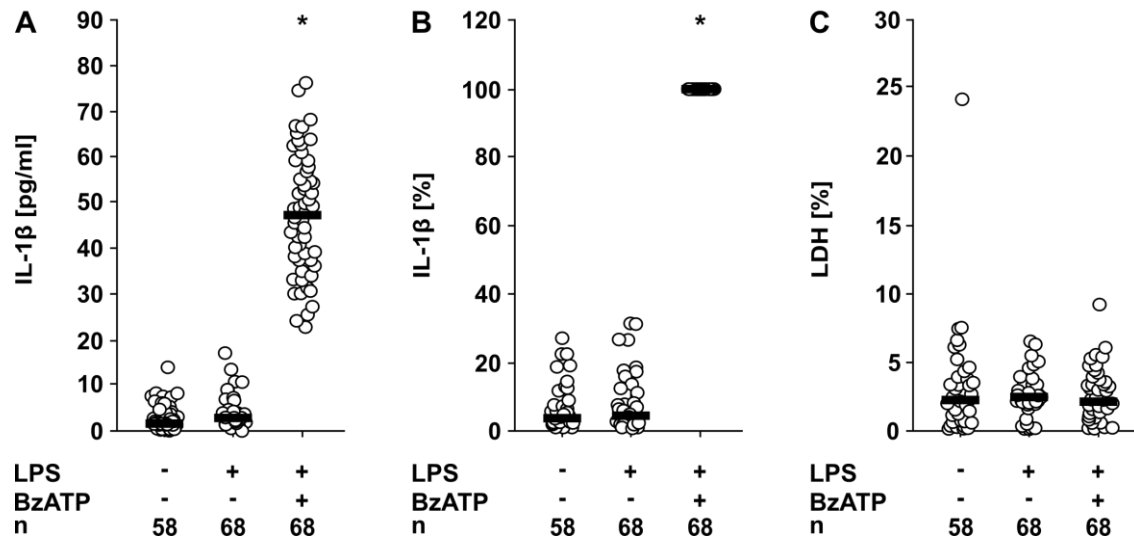


Abbildung 4: Absolute und prozentuale Interleukin-1 β (IL-1 β)-Freisetzung aus mit Lipopolysaccharid (LPS) stimulierten und mit BzATP behandelten U937-Zellen und korrespondierende Lactatdehydrogenase (LDH)-Aktivität im Zellkulturüberstand. Die Einzelwerte sind als Punkte dargestellt, die Balken entsprechen den Medianen und die Antennen den Perzentilen 25 und 75 (A, B, C). Die Applikation von 2'(3')-O-(4-Benzoylbenzoyl)adenosin-5'-triphosphat (BzATP, 100 μ M) führt in mit LPS stimulierten U937-Zellen zu einer signifikant erhöhten IL-1 β -Ausschüttung (A). Der Anstieg der IL-1 β -Freisetzung unter LPS und BzATP wurde auf 100 % gesetzt (B). Weder LPS noch BzATP verändern die LDH-Freisetzung der Zellen im Verhältnis zur maximalen Freisetzung aus lysierten Zellen (C). Kruskal-Wallis-Test gefolgt vom Mann-Whitney-U-Test (*; $p \leq 0,00001$ verglichen mit LPS behandelten Ansätzen).

Aufgrund der hohen Schwankungsbreite der IL-1 β -Freisetzung in BzATP-behandelten Ansätzen, wurden im Nachfolgenden lediglich normalisierte Werte dargestellt und verglichen. Korrespondierende Absolutwerte wurden in ergänzenden Abbildungen im Anhang dargestellt. Ansätze mit einer LDH-Aktivität unter 10 % wurden als unverändert angesehen.

3.2 Untersuchungen zu AAT aus gesunden Probanden

3.2.1 Aufreinigung von AAT aus gesunden Probanden

Um die Aktivität von endogenem AAT auf die monozytäre IL-1 β -Freisetzung zu untersuchen, wurde das Protein zunächst aus Plasmen gesunder Probanden mittels Affinitätschromatographie aufgereinigt. Um die Qualität der Aufreinigung zu überprüfen, erfolgten anschließend eine Auftrennung der während der Affinitätschromatografie entstandenen Proteinfractionen im SDS-Polyacrylamidgel und eine nachfolgende Proteinfärbung. Die Spezifität der Aufreinigung wurde parallel mittels *Western-Blot* mit Immundetektion durch Anti-AAT-Antikörper (Bethyl) durchgeführt.

Wie im SDS-Polyacrylamidgel zu erkennen, zeigte sich während des Ablaufs der chromatografischen Aufreinigung eine deutliche Abnahme des Gesamtproteingehalts (Abb. 5). Die Durchfluss- und Waschfraktionen wiesen deutlich geringere Proteingehalte auf als die Fraktion des Ausgangsmaterials (Abb. 5A). In der Eluatfraktion befindet sich eine deutlich sichtbare Bande mit einer geschätzten molekularen Masse von 52 kDa (Abb. 5A). In der Regenerationsfraktion war kein Protein nachweisbar

(Abb. 5A). Mittels Immundetektion durch gegen AAT gerichtete Antikörper ließ sich eine Bande mit der geschätzten molekularen Masse von 52 kDa im Ausgangsmaterial und in der Eluatfraktion nachweisen (Abb. 5A). Um einen Eindruck über die aufgereinigte AAT-Menge nach Affinitätschromatografie zu erhalten, wurde der Gesamtproteingehalt in den Eluatfraktionen aus vier gesunden Spendern mittels BCA bestimmt. Der Gesamtproteingehalt nach AAT-Aufreinigung betrug durchschnittlich 1,57 mg/ml ($n = 4$, Abb. 5B).

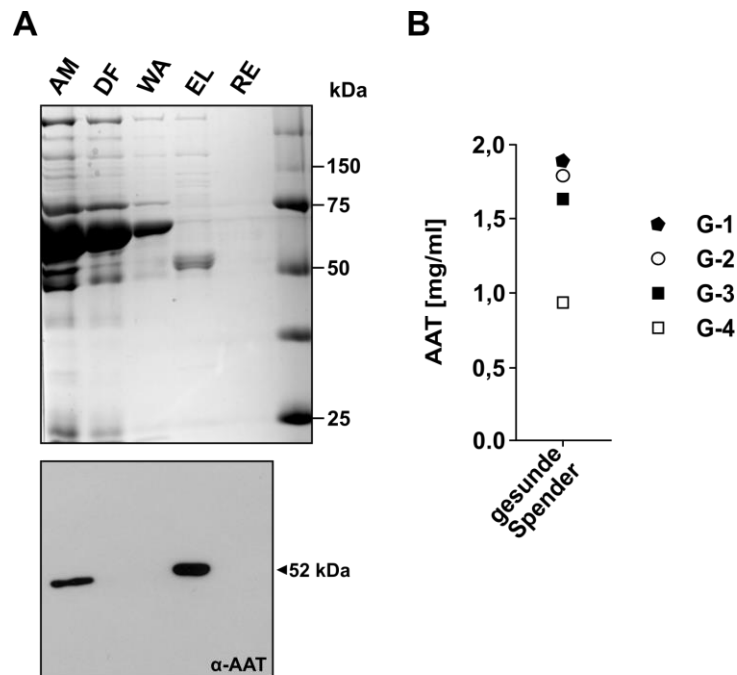


Abbildung 5: Qualitätsprüfung und Menge von AAT aus gesunden Spendern. In (A) dargestellt sind die aus dem Plasma eines gesunden Probanden resultierenden Aufreinigungsfraktionen aufgetrennt in *Comassie*-gefärbtem SDS-Polyacrylamidgel (10 %) (obere Reihe) und mittels *Western-Blot* detektiertes AAT (Bethyl, α -AAT, 52 kDa, unterer Reihe) nach Affinitätschromatografie. Repräsentatives Beispiel aus vier gesunden Probanden. Proteinstandard rechts; AM, Ausgangsmaterial; DF, Durchflussfraktion; WA, Waschfraktion; EL, Eluat; RE, Regenerationsfraktion. In (B) dargestellt ist der Gesamtproteingehalt der Eluatfraktion von vier gesunden Spendern (G-1, G-2, G-3, G-4), gemessen mittels BCA nach Affinitätsaufreinigung.

3.2.2 Einfluss von aufgereinigtem AAT aus gesunden Probanden auf die BzATP-vermittelte IL-1 β -Freisetzung aus U937-Zellen

Um zu untersuchen, ob endogenes AAT in der Lage ist, die monozytäre IL-1 β -Freisetzung zu inhibieren, wurde das aus vier gesunden Probanden aufgereinigte Protein in unterschiedlichen Konzentrationen auf LPS-stimulierte und BzATP-behandelte U937-Zellen gegeben. Absolutwerte der IL-1 β -Konzentrationen sind in der ergänzenden Abb. 1 im Anhang dargestellt.

Die IL-1 β -Konzentration in Zellkulturüberständen von U937-Zellen, die mit LPS vorstimuliert und mit BzATP für 30 min inkubiert wurden, wurde auf 100 % gesetzt. Die BzATP-unabhängige IL-1 β -Freisetzung unter LPS betrug 18 % (n = 4, Abb. 6A). Das aufgereinigte AAT aus gesunden Probanden inhibierte dosisabhängig die BzATP-induzierte IL-1 β -Freisetzung (Abb. 6A). Der errechnete IC₅₀-Wert betrug 0,18 mg/ml (Abb. 6A). Die physiologische Plasmakonzentration von 1 mg/ml erzeugte eine signifikante Inhibition der IL-1 β -Freisetzung (p = 0,029, n = 4, Abb. 6A). Eine Veränderung in der LDH-Aktivität unter AAT konnte nicht beobachtet werden (\leq 10 % LDH-Aktivität, Abb. 6B). Lediglich ein Ansatz ohne Substanzapplikation zeigte eine erhöhte LDH-Aktivität von 24 % (Abb. 6B).

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass das aus gesunden Probanden aufgereinigte AAT die BzATP-induzierte IL-1 β -Freisetzung dosisabhängig mit einem IC₅₀ von 0,18 mg/ml inhibiert.

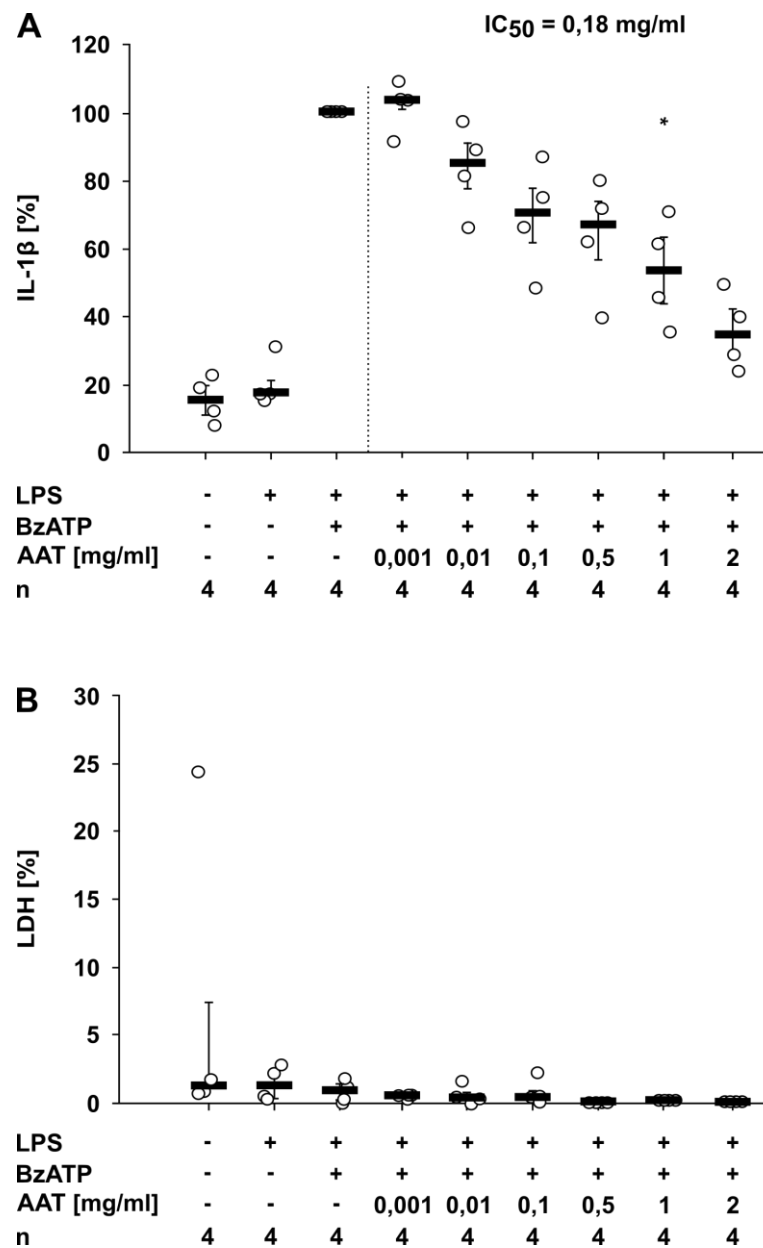


Abbildung 6: Inhibition der Interleukin-1 β (IL-1 β)-Freisetzung aus mit Lipopolysaccharid (LPS) stimulierten und mit BzATP behandelten U937-Zellen durch aus gesunden Probanden aufgereinigtes AAT und korrespondierende Lactatdehydrogenase (LDH)-Aktivität im Zellkulturüberstand. Die Einzelwerte sind als Punkte dargestellt, die Balken entsprechen den Medianen und die Antennen den Perzentilen 25 und 75 (**A**, **B**). In (**A**) dargestellt ist die IL-1 β -Freisetzung normalisiert zu mit LPS und BzATP behandelten Ansätzen. Die Applikation von 2'(3')-O-(4-Benzoylbenzoyl)adenosin-5'-triphosphat (BzATP, 100 μ M) führt in mit LPS stimulierten U937-Zellen zu einer erhöhten IL-1 β -Ausschüttung. Das aus gesunden Probanden aufgereinigte AAT (G-1 – G-4) inhibiert die BzATP-induzierte IL-1 β -Freisetzung dosisabhängig (IC₅₀ = 0,18 mg/ml). Korrespondierende Absolutwerte sind in der ergänzenden Abbildung 1 dargestellt. In (**B**) dargestellt ist die unveränderte LDH-Freisetzung unter der Applikation von LPS, BzATP und AAT im Verhältnis zur maximalen Freisetzung aus lysierten Zellen. Kruskal-Wallis-Test gefolgt vom Mann-Whitney-U-Test (*; $p \leq 0,05$ verglichen mit LPS- und BzATP-behandelten Ansätzen).

3.2.3 Komplexierung von aufgereinigtem AAT aus gesunden Probanden mit NE

Um herauszufinden, ob endogenes AAT in der Lage ist, Komplexe mit NE zu bilden, wurde das aus vier gesunden Probanden gewonnene AAT jeweils mit oder ohne NE für 30 min inkubiert, anschließend in einem SDS-Polyacrylamidgel unter denaturierenden Bedingungen aufgetrennt und die Proteine im Gel angefärbt sowie AAT mittels Immundetektion visualisiert.

Im gefärbten SDS-Gel war in Ansätzen ohne NE jeweils eine prominente Proteinbande oberhalb des molekularen Massebereichs von 50 kDa (Proteinbande 1) und eine deutlich schwächere Bande unterhalb des molekularen Massebereichs von 75 kDa (Proteinbande 3) zu erkennen. Beide Banden konnten mittels *Western-Blot* mit AAT-spezifischen Antikörpern visualisiert werden (Abb. 7). Weiterhin traten im gefärbten Gel Proteinbanden unterhalb des molekularen Massebereichs von 75 kDa (Proteinbande 2) auf, welche sich nicht mittels *Western-Blot* detektieren ließen (Abb. 7).

Die Inkubation von endogenem AAT aus Proband 1, 3 und 4 und NE führte zu einer Abschwächung der Bande im molekularen Massebereich von 50 kDa und zur Intensivierung der Bande unterhalb des molekularen Massebereichs um 75 kDa (Abb. 7). Das endogene AAT aus Proband 2 führte nach der Inkubation mit NE zu einer Intensivierung der Bande um den molekularen Massebereich 75 kDa, jedoch zeigt sich die Bande oberhalb des molekularen Massebereichs von 50 kDa nicht schwächer als im Ansatz ohne NE (Abb. 7).

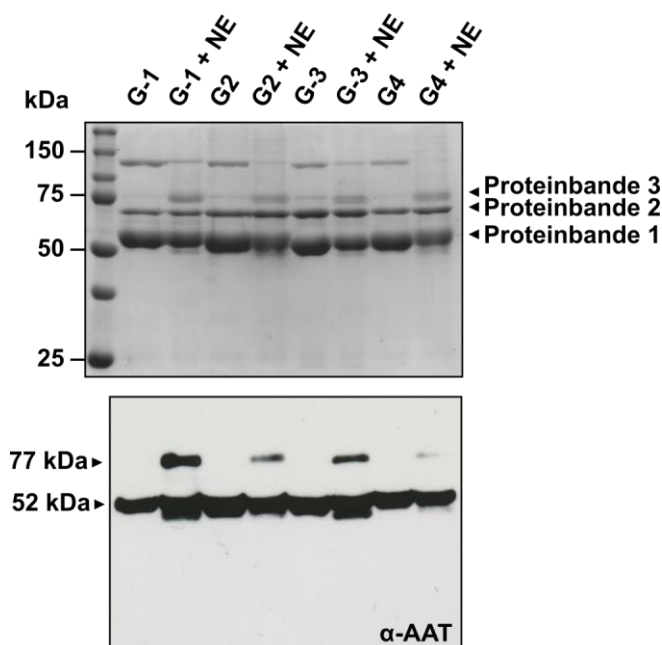


Abbildung 7: Komplexbildung von aufgereinigtem AAT aus gesunden Probanden mit neutrophiler Elastase. Komplexe aus AAT und neutrophiler Elastase (NE) aufgetrennt in *Comassie*-gefärbten SDS-Polyacrylamidgel (10 %, obere Reihe) und mittels *Western-Blot* detektiertes AAT (Bethyl, α -AAT, 52 kDa, untere Reihe) aus vier gesunden Probanden (G-1 - G-4). Proteinstandard links; kDa, Kilodalton.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass das aus gesunden Probanden gewonnene AAT in der Lage ist, Komplexe mit NE zu bilden. Da sich Proteinbande 2 nicht mittels Immundetektion visualisieren ließ, wurde sie als unspezifische Verunreinigung der AAT-Präparate angesehen.

3.3 Untersuchungen zu AAT aus CPB-Patienten

3.3.1 Die endogene Plasmakonzentration von AAT im Verlauf einer CPB-Operation

Um aufzuklären, ob Patienten im Verlauf einer CPB-Operation Veränderungen in der endogenen AAT-Plasmakonzentration erfahren, wurde das Plasma von fünf Patienten zu vier Zeitpunkten einer CPB-Operation untersucht. Die AAT-Konzentration im Plasma wurde mittels ELISA bestimmt.

Die durchschnittliche AAT-Konzentration vor dem Beginn der CPB-Operation betrug 2,9 mg/ml (prä-OP, n = 5, Abb. 8). Fünfzehn Minuten nach dem Anschluss an den extrakorporalen Kreislauf der CPB-Operation ergab sich eine durchschnittliche AAT-Konzentration von 2,5 mg/ml, welche sich bei fortlaufender Operation kaum veränderte (60' CPB: 2,7 mg/ml AAT-Konzentration, n = 5, Abb. 8). Eine leichte Abnahme der AAT-Konzentration ergab sich 15 Minuten nach dem Beenden des extrakorporalen Kreislaufs auf 2,3 mg/ml (post-CPB, n = 5, Abb. 8). Durch eine CPB-Operation ergab sich demnach keine signifikante Veränderungen der AAT-Konzentration ($p = 0,08$, n = 5, Abb. 8). Anzumerken ist, dass die hier gemessenen AAT-Konzentrationen im Patientenplasma deutlich über den physiologischen Plasmakonzentrationen lagen (Janciauskiene et al. 2011).

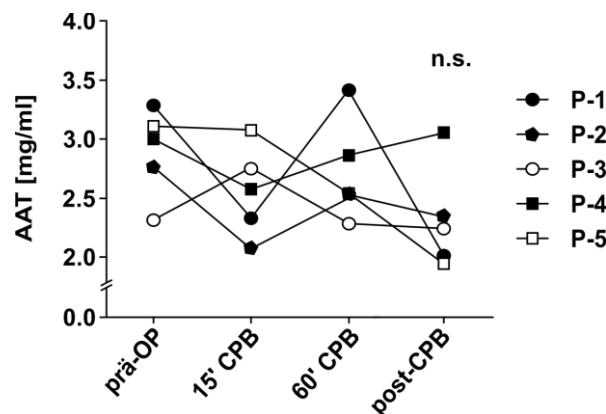


Abbildung 8: Plasmakonzentrationen von AAT aus Patienten zu unterschiedlichen Zeitpunkten einer kardiopulmonalen Bypass (CPB)-Operation. Die Plasmakonzentrationen von AAT von fünf Patienten (P-1, P-2, P-3, P-4, P-5) zu vier Zeitpunkten einer CPB-Operation, gemessen mittels ELISA. Blutabnahmezeitpunkte: 15 min nach Einleitung der Anästhesie vor dem Beginn der Operation (prä-OP), 15 min (15' CPB) sowie 60 min (60' CPB) nach dem Anschluss an den extrakorporalen Kreislauf und 15 min nach dem Beenden des extrakorporalen Kreislaufs (post-CPB). Wilcoxon-Rangsummentest (n.s., $p > 0,05$ verglichen mit dem Zeitpunkt prä-OP).

3.3.2 Aufreinigung von AAT aus CPB-Patienten

Um die inhibitorische Aktivität von endogenem AAT aus Patienten auf die monozytäre IL-1 β -Freisetzung im zeitlichen Verlauf einer CPB-Operation zu untersuchen, wurde das Protein zunächst aus Plasmen von CPB-Patienten zu unterschiedlichen Blutabnahmezeitpunkten einer CPB-Operation mittels Affinitätschromatographie aufgereinigt.

Die Qualitätsprüfung der Affinitätschromatographie erfolgte mit der Auftrennung der unterschiedlichen Aufreinigungsfractionen im SDS-Polyacrylamidgel und anschließender Proteinfärbung. Dargestellt sind alle vier Blutabnahmezeitpunkte der CPB-Operation (Abb. 9A). Für alle Blutabnahmezeitpunkte war eine deutliche Abnahme des Gesamtproteingehaltes zwischen Ausgangsmaterial und Waschfraktion erkennbar, was sich im Proteingehalt der Eluatfraktion fortsetzte (Abb. 9A). Die Eluatfraktionen aller Blutproben enthielt eine schwache Bande im Bereich von 50 kDa (Abb. 9A). In den Regenerationsfraktionen war kein Protein nachweisbar (Abb. 9A). Im *Western-Blot* ließen sich durch Anti-AAT-Antikörper Banden im molekularen Massebereich von 52 kDa im Ausgangsmaterial und in der Eluatfraktion nachweisen (Abb. 9A). Um einen Eindruck über die Menge an AAT nach Affinitätschromatografie zu erhalten, wurde der Gesamtproteingehalt in den Eluatfraktionen zu unterschiedlicher Zeitpunkten der CPB-Operation in fünf Patienten mittels BCA bestimmt. Die Gesamtproteingehalte nach AAT-Aufreinigung aus Patienten wurden im zeitlichen Verlauf der CPB-Operation in Abb. 9B dargestellt. Die durchschnittliche AAT-Menge vor dem Beginn der CPB-Operation betrug 0,90 mg/ml und lag damit tendenziell leicht unter der AAT-Menge aus gesunden Spendern (n = 4, Abb. 9B). Fünfzehn Minuten nach dem Anschluss an den extrakorporalen Kreislauf der CPB-Operation ergab sich eine durchschnittliche AAT-Menge von 0,88 mg/ml, welche sich bei fortlaufender Operation und 15 min nach der Operation nicht veränderte (n = 5, 60' CPB: 0,9 mg/ml AAT-Menge, post-OP: 0,69 mg/ml, Abb. 9B). Demnach ergab sich durch eine CPB- Operation keine signifikante Veränderungen in der AAT-Menge ($p = 0,138$, Abb. 9B).

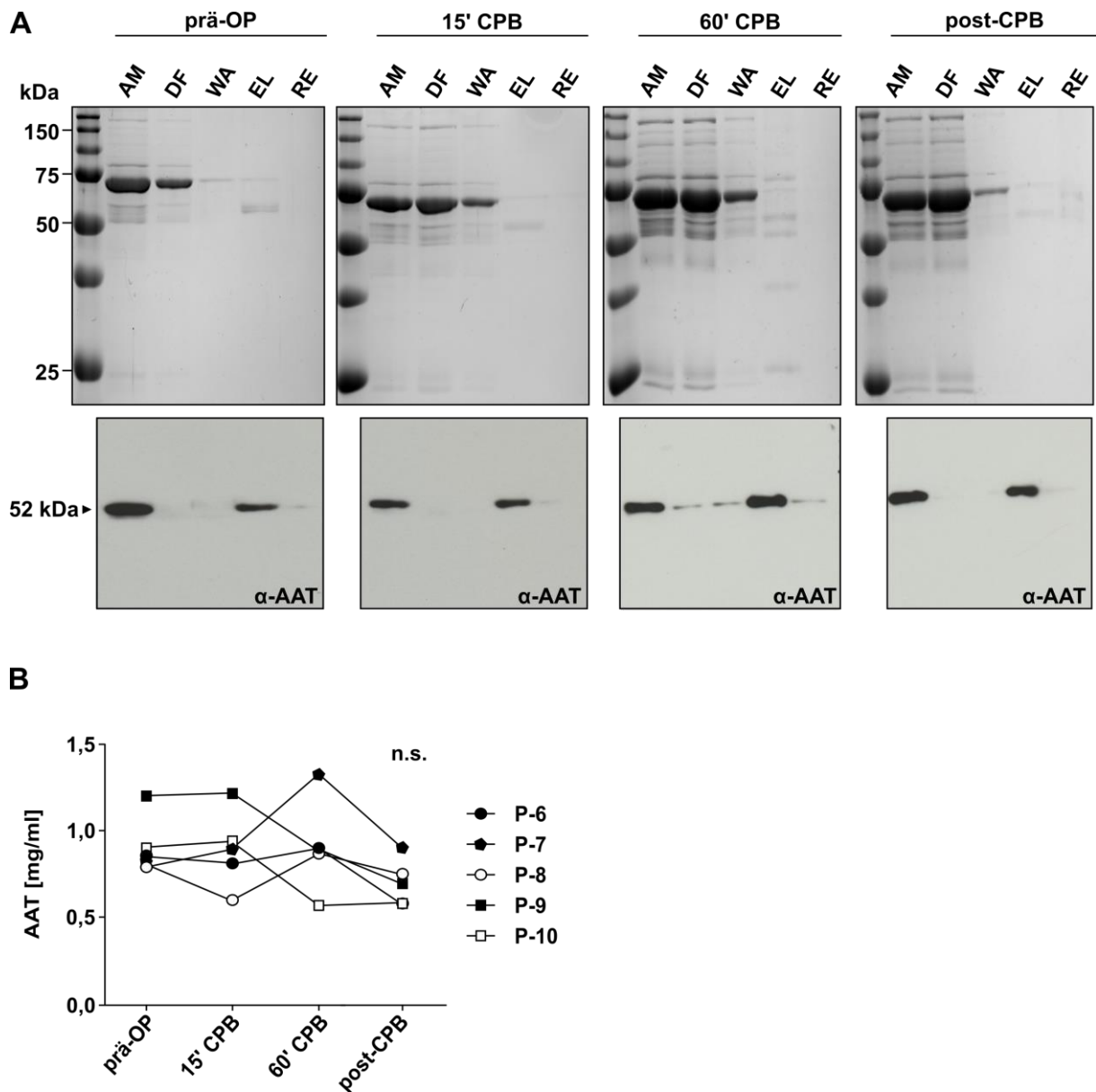


Abbildung 9: Qualitätsprüfung und Menge des aus Patientenplasma gewonnenem AAT zu unterschiedlichen Zeitpunkten einer kardiopulmonalen Bypass (CPB)-Operation. In (A) dargestellt sind die Aufreinigungsfractionen aufgetrennt in *Comassie*-gefärbten SDS-Polyacrylamidgelen (10 %) (obere Reihe) und das mittels *Western-Blot* detektierte AAT (Bethyl, α -AAT, 52 kDa, untere Reihe) aus Proben unterschiedlicher Blutabnahmezeitpunkte einer CPB-Operation, ein repräsentatives Beispiel aus 5 Patienten. Proteinstandards links; AM, Ausgangsmaterial; DF, Durchflussfraktion; WA, Waschfraktion; EL, Eluat; RE, Regenerationsfraktion. In (B) dargestellt ist der Gesamtproteingehalt der Eluatfraktion von fünf Patienten (P-6, P-7, P-8, P-9, P-10) zu vier Zeitpunkten einer CPB-Operation, gemessen mittels BCA nach Affinitätsaufreinigung. Blutabnahmezeitpunkte: 15 min nach Einleitung der Anästhesie vor dem Beginn der Operation (prä-OP), 15 min (15' CPB) sowie 60 min (60' CPB) nach dem Anschluss an den extrakorporalen Kreislauf und 15 min nach dem Beenden des extrakorporalen Kreislaufs (post-CPB). Wilcoxon-Rangsummentest (n.s., $p > 0,05$ verglichen mit dem Zeitpunkt prä-OP).

3.3.3 Einfluss von aufgereinigtem AAT aus CPB-Patienten auf die BzATP-vermittelte IL-1 β -Freisetzung aus U937-Zellen

Um zu untersuchen, ob die inhibitorische Aktivität von AAT auf die BzATP-induzierte Freisetzung von IL-1 β durch eine CPB-Operation verändert wird, wurde das AAT aus fünf Patienten zu vier Zeitpunkten einer CPB-Operation in aufsteigenden Konzentrationen auf LPS-stimulierte und BzATP-behandelte U937-Zellen gegeben. Die IL-1 β -Konzentrationen sowie die LDH-Aktivität wurden anschließend in Zellüberständen gemessen. Die Ergebnisse für Proben aller vier Blutabnahmezeitpunkte der CPB-Operation wurden in Abb. 10 und 11 dargestellt. Absolutwerte der IL-1 β -Konzentrationen sind in der ergänzenden Abb. 2 im Anhang dargestellt. Anhand dieser Dosis-Wirkungskurven wurden die IC₅₀-Werte nach dem Weibull-Typ-2 berechnet und statistisch miteinander verglichen (Abb. 12).

Zunächst wurde das aus CPB-Patienten aufgereinigte AAT aus den ersten zwei Blutabnahmen untersucht. Diese Zeitpunkte entsprechen dem Zustand vor der Operation (prä-OP) sowie dem Zustand, der 15 min nach dem Anschluss an den extrakorporalen Kreislauf vorliegt (15'-CPB). Die IL-1 β -Konzentration in Zellkulturüberständen von U937-Zellen, die mit LPS vorstimuliert und mit BzATP für 30 min inkubiert wurden, wurde auf 100 % gesetzt. Die BzATP-unabhängige IL-1 β -Freisetzung unter LPS betrug 19 % (n = 5, Abb. 10A). Das aufgereinigte AAT aus CPB-Patienten vor der Operation war bereits bei einer Konzentration von 0,002 mg/ml in der Lage, die die BzATP-vermittelte IL-1 β -Freisetzung auf 81 % zu reduzieren (n = 5, Abb. 10A). Auch höhere Konzentrationen an AAT, das zu diesem Zeitpunkt aufgereinigt wurde, führten zur Inhibition der IL-1 β -Freisetzung (n = 5, Abb. 10A). Die physiologische Plasmakonzentration von 1 mg/ml erzeugte eine signifikante Inhibition der IL-1 β -Freisetzung (prä-OP, p = 0,008, n = 5, Abb. 10A). Der errechnete IC₅₀-Wert betrug 0,02 mg/ml (prä-OP, Abb. 10A). Das AAT aus der Blutabnahme, die 15 min nach dem Anschluss an den extrakorporalen Kreislauf der CPB-Operation erfolgte, war bei einer Konzentration von 0,02 mg/ml in der Lage, die BzATP-vermittelte IL-1 β -Freisetzung auf 72 % zu reduzieren (n = 5, Abb. 10A). Auch höhere Konzentrationen an AAT zu diesem Zeitpunkt führten zur Inhibition der IL-1 β -Freisetzung (n = 5, Abb. 10A). Die physiologische Plasmakonzentration von 1 mg/ml erzeugte eine signifikante Inhibition der IL-1 β -Freisetzung (15' CPB, p = 0,008, n = 5, Abb. 10A). Der errechnete IC₅₀-Wert betrug 0,02 mg/ml (15' CPB, Abb. 10A). Eine Veränderung in der LDH-Aktivität unter AAT aus der Blutabnahme vor der Operation sowie 15 min nach Anschluss an den extrakorporalen Kreislauf konnte nicht beobachtet werden (\leq 10 % LDH-Aktivität, Abb. 10B).

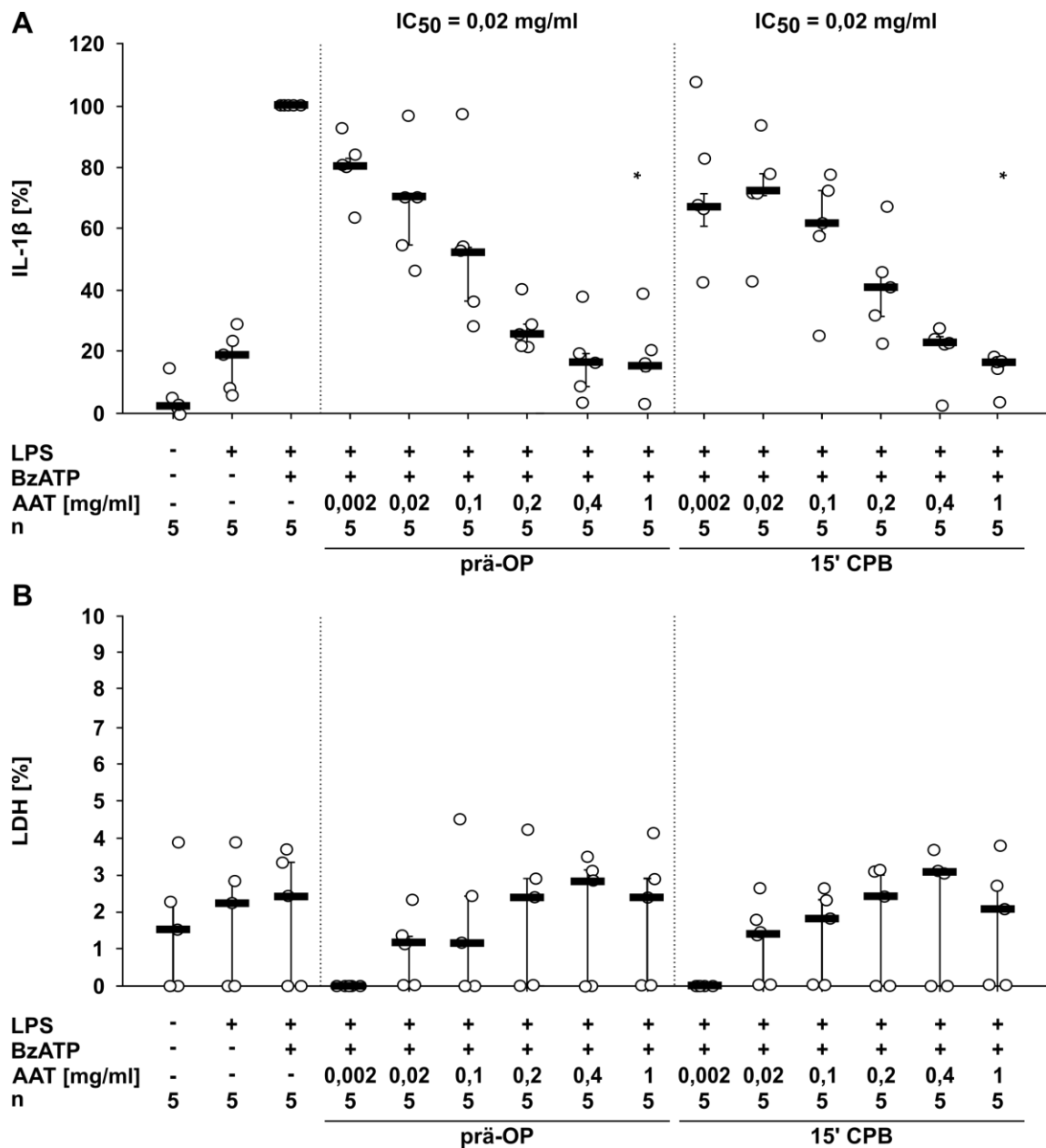


Abbildung 10: Inhibition der Interleukin-1 β (IL-1 β)-Freisetzung aus mit Lipopolysaccharid (LPS) stimulierten und mit BzATP behandelten U937-Zellen durch aufgereinigtes AAT aus Patienten (AAT) zu zwei Zeitpunkten einer kardiopulmonalen Bypass (CPB)-Operation und korrespondierende Lactatdehydrogenase (LDH)-Aktivität im Zellkulturüberstand I. Die Einzelwerte sind als Punkte dargestellt, die Balken entsprechen den Medianen und die Antennen den Perzentilen 25 und 75. Blutabnahmezeitpunkte: 15 min nach Einleitung der Anästhesie vor dem Beginn der Operation (prä-OP); 15 min (15' CPB) nach dem Anschluss an den extrakorporalen Kreislauf (A, B). Korrespondierende Absolutwerte sind in der ergänzenden Abbildung 2 dargestellt. In (A) dargestellt ist die IL-1 β -Freisetzung normalisiert zu mit LPS und BzATP behandelten Ansätzen. Die Applikation von 2'(3')-O-(4-Benzoylbenzoyl)adenosin-5'-triphosphat (BzATP, 100 μ M) führt in mit LPS stimulierten U937-Zellen zu einer erhöhten IL-1 β -Ausschüttung. Das aus fünf Patienten aufgereinigte AAT (P-6, P-7, P-8, P-9, P-10) zum Zeitpunkt prä-OP und 15' CPB inhibiert die BzATP-induzierte IL-1 β -Freisetzung dosisabhängig (prä-OP, IC₅₀ = 0,02 mg/ml, 15' CPB, IC₅₀ = 0,02 mg/ml). In (B) dargestellt ist die unveränderte LDH-Freisetzung unter der Applikation von LPS, BzATP und AAT im Verhältnis zur maximalen Freisetzung aus lysierten Zellen. Kruskal-Wallis-Test gefolgt vom Mann-Whitney-U-Test (*; $p \leq 0,05$ verglichen mit LPS- und BzATP-behandelten Ansätzen).

Auch das aus den weiteren zwei Blutabnahmezeitpunkten aufgereinigte AAT wurde wie im zuvor beschriebenen Versuchsaufbau auf die inhibierende Wirkung der IL-1 β Freisetzung aus U937-Zellen getestet (Abb. 11A). Diese Zeitpunkte entsprechen dem Zustand, der 60 min nach dem Anschluss an den extrakorporalen Kreislauf vorliegt (60'-CPB) und dem Zustand, der 15 min nach Beenden des extrakorporalen Kreislaufs vorliegt (post-OP). Die BzATP-unabhängige IL-1 β -Freisetzung unter LPS betrug 1 % (n = 5, Abb. 11A). Das AAT aus der Blutabnahme, die 60 min nach dem Anschluss an den extrakorporalen Kreislauf der CPB-Operation erfolgte, war bei einer Konzentration von 0,02 mg/ml in der Lage, die BzATP-vermittelte IL-1 β -Freisetzung auf 80 % zu reduzieren (n = 5, Abb. 11A). Auch höhere Konzentrationen an AAT führten zur Inhibition der IL-1 β -Freisetzung zu diesem Zeitpunkt (n = 5, Abb. 11A). Die physiologische Plasmakonzentration von 1 mg/ml erzeugte eine signifikante Inhibition der IL-1 β -Freisetzung (p = 0,008, n = 5, 60' CPB, Abb. 11A). Der errechnete IC₅₀-Wert betrug 0,04 mg/ml (60' CPB, Abb. 11A). Das AAT aus der Blutabnahme, die 15 min nach dem Beenden des extrakorporalen Kreislaufs erfolgte, war mit einer Konzentration von 0,02 mg/ml in der Lage, die BzATP-vermittelte IL-1 β -Freisetzung auf 68 % zu reduzieren (n = 5, Abb. 11A). Auch höhere Konzentrationen an AAT dieses Zeitpunktes führten zur Reduktion der IL-1 β -Freisetzung (n = 5, Abb. 11A). Die physiologische Plasmakonzentration von 1 mg/ml erzeugte eine signifikante Inhibition der IL-1 β -Freisetzung (p = 0,008, n = 5, post-CPB, Abb. 11A). Der errechnete IC₅₀-Wert betrug 0,04 mg/ml (post-CPB, Abb. 11A). Eine Veränderung in der LDH-Aktivität unter AAT aus der Blutabnahme, die 60 min nach dem Anschluss des extrakorporalen Kreislaufs erfolgte, und der Blutabnahme, welche 15 min nach dem Beenden des extrakorporalen Kreislaufs vorgenommen wurde, konnte nicht beobachtet werden (\leq 10 % LDH-Aktivität, Abb. 11B).

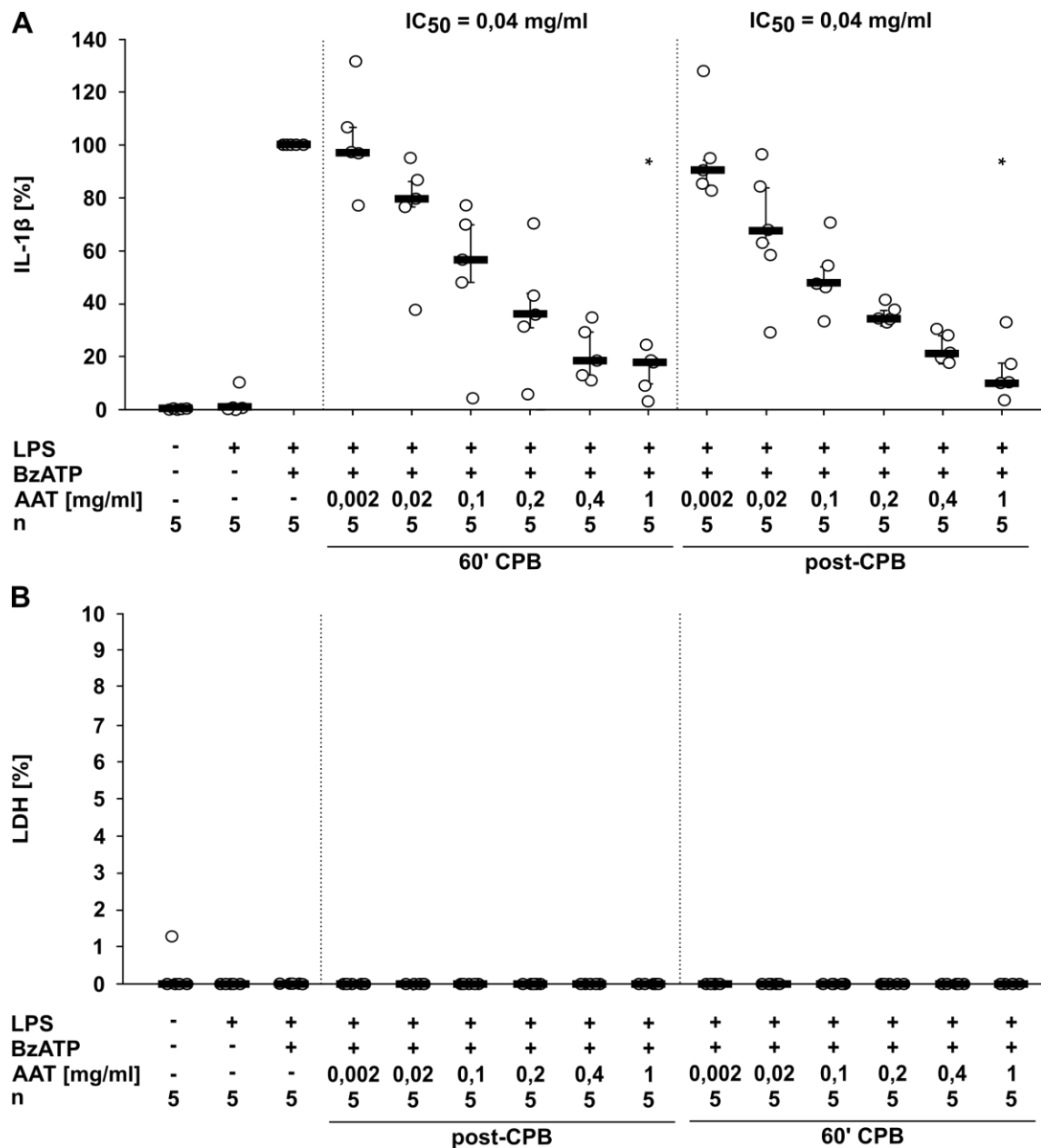


Abbildung 11: Inhibition der Interleukin-1 β (IL-1 β)-Freisetzung aus mit Lipopolysaccharid (LPS) stimulierten und mit BzATP behandelten U937-Zellen durch aufgereinigtes AAT aus Patienten (AAT) zu zwei Zeitpunkten einer kardiopulmonalen Bypass (CPB)-Operation und korrespondierende Lactatdehydrogenase (LDH)-Aktivität im Zellkulturüberstand II. Die Einzelwerte sind als Punkte dargestellt, die Balken entsprechen den Medianen und die Antennen den Perzentilen 25 und 75. Blutabnahmezeitpunkte: 60 min (60' CPB) nach dem Anschluss an den extrakorporalen Kreislauf und 15 min nach Beenden des extrakorporalen Kreislaufs (post-CPB) (A, B). In (A) dargestellt ist die IL-1 β -Freisetzung normalisiert zu mit LPS und BzATP behandelten Ansätzen. Die Applikation von 2'(3')-O-(4-Benzoylbenzoyl)adenosin-5'-triphosphat (BzATP, 100 μ M) führt in mit LPS stimulierten U937-Zellen zu einer erhöhten IL-1 β -Ausschüttung. Das aus fünf Patienten aufgereinigte AAT (P-6, P-7, P-8, P-9, P-10) zum Zeitpunkt 60' CPB und post-CPB inhibiert die BzATP-induzierte IL-1 β -Freisetzung dosisabhängig (60' CPB, IC₅₀ = 0,04 mg/ml, post-CPB, IC₅₀ = 0,04 mg/ml). Korrespondierende Absolutwerte sind in der ergänzenden Abbildung 2 dargestellt. In (B) dargestellt ist die unveränderte LDH-Freisetzung unter der Applikation von LPS, BzATP und AAT im Verhältnis zur maximalen Freisetzung aus lysierten Zellen. Kruskal-Wallis-Test gefolgt vom Mann-Whitney-U-Test (*; $p \leq 0,05$ verglichen mit LPS- und BzATP-behandelten Ansätzen).

Die Dosis-Wirkungskurven von AAT im Verlauf einer CPB-Operation wurden nach dem linearen Regressionsmodell Weibull-Typ-2 verglichen (Abb. 12). Hierbei wurden sowohl IC_{50} -Werte miteinander verglichen, als auch die Steigungen (Tab. 14). Eine signifikante Zunahme des IC_{50} -Werts wurde nach Ablauf der Operation beobachtet, wenn man ihn mit dem IC_{50} -Wert vor der Operation vergleicht ($p = 0,01$, $n = 5$, Tab. 14). Betrachtet man die Steigungen, so fällt auf, dass sich der Steigungswert 60 min in der Operation verringert hat, wenn man ihn mit dem Steigungswert vor der Operation vergleicht. Die Dosiswirkungskurve 60 min in der Operation zeigt demnach einen signifikant steileren Abfall als die Kurve vor der Operation ($p = 0,04$, $n = 5$, Tab. 14, Abb. 12).

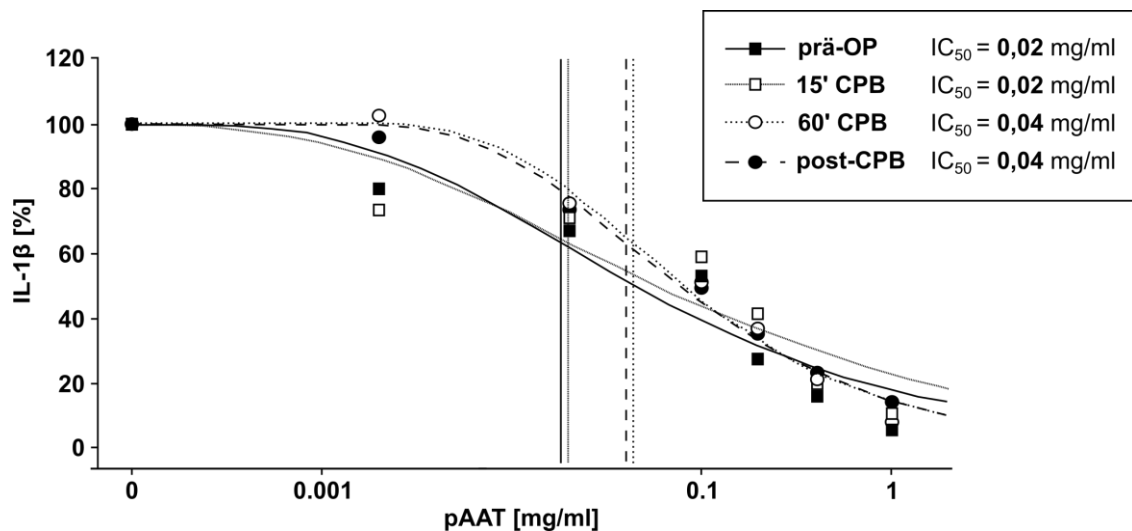


Abbildung 12: Dosisabhängige Inhibition der prozentualen Interleukin-1 β (IL-1 β)-Freisetzung aus mit Lipopolysaccharid (LPS) stimulierten und mit BzATP behandelten U937-Zellen durch AAT aus Patienten, aufgereinigt zu unterschiedlichen Zeitpunkten einer kardiopulmonalen Bypass (CPB)-Operation. Die Applikation von 2'(3')-O-(4-Benzoylbenzoyl)adenosin-5'-triphosphat (BzATP, 100 μ M) führt in mit LPS stimulierten U937-Zellen zur IL-1 β -Ausschüttung. Das aus den Plasmen von fünf CPB-Patienten aufgereinigte AAT (P-6, P-7, P-8, P-9, P-10) inhibiert die IL-1 β -Freisetzung dosisabhängig. Blutabnahmezeitpunkte: 15 min nach Einleitung der Anästhesie vor dem Beginn der Operation (prä-OP), 15 min (15' CPB) und 60 min (60' CPB) nach dem Anschluss an den extrakorporalen Kreislauf und 15 min nach Beenden des extrakorporalen Kreislaufs (post-CPB). Lineares Regressionsmodell nach Weibull-Typ-2.

Tabelle 14: Statistische Auswertung der dosisabhängigen Inhibitionskapazität auf die IL-1 β -Freisetzung aus U937-Zellen von AAT aus Patienten, aufgereinigt zu unterschiedlichen Zeitpunkten einer kardiopulmonalen Bypass (CPB)-Operation.

Verglichene Blutabnahmezeitpunkte	p-Wert (IC_{50})	p-Wert (Steigung)
prä-OP vs. 60' CPB	n.g.	0,04
prä-OP vs. post-OP	0,01	n.g.

n.g. nicht getestet

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass AAT zu jedem Zeitpunkt einer CPB-Operation in der Lage war, die IL-1 β -Freisetzung aus U937-Zellen zu inhibieren. Nach der Operation nahm die

inhibitorische Aktivität von AAT jedoch signifikant ab, wenn man sie mit der inhibitorischen Aktivität vor Operationsbeginn vergleicht. Anhand der Steigung war zu erkennen, dass sich auch die Dynamik der Dosis-Wirkungsbeziehung verändert. Anzumerken ist, dass zu jedem Zeitpunkt der CPB-Operation bereits AAT-Konzentrationen inhibitorische Aktivität aufwiesen, die weit unter der physiologischen Plasmakonzentration liegen.

3.3.4 Die gesamte Anti-Elastaseaktivität im Verlauf einer CPB-Operation

Um der Fragestellung nachzugehen, ob sich im Gesamtplasma Veränderungen in der Inhibitionsfähigkeit der neutrophilen Elastaseaktivität im zeitlichen Verlauf einer CPB-Operation ergeben, wurden die Plasmen von fünf Patienten zu vier Zeitpunkten einer CPB-Operation mit neutrophiler Elastase inkubiert und ein kolorimetrischer Test zur gesamten neutrophilen Elastaseaktivität durchgeführt. Zur Normalisierung der Werte diente ein Ansatz ohne Plasma. Die Ergebnisse dieser Untersuchung wurden in Abb. 13 zusammengefasst.

Eine Inhibition der neutrophilen Elastase durch Patientenplasma konnte zu jedem Zeitpunkt einer CPB-Operation nachgewiesen werden. Jedoch nimmt die Inhibition der neutrophilen Elastase in Patienten im Verlauf der CPB-Operation von $50,18 \pm 14,86 \%$ auf $33,14 \pm 6,22 \%$ ab (Abb. 13). Vergleicht man die prozentuale Inhibition der neutrophilen Elastase durch Patientenplasma vor und nach der CPB-Operation, so zeigt sich eine signifikante Abnahme der Anti-Elastasefunktion ($p = 0,043$, $n = 5$, Abb. 13). Demnach ergab sich eine Beeinträchtigung der gesamten Anti-Elastasefunktion im Blutplasma während einer CPB-Operation um etwa 30 %.

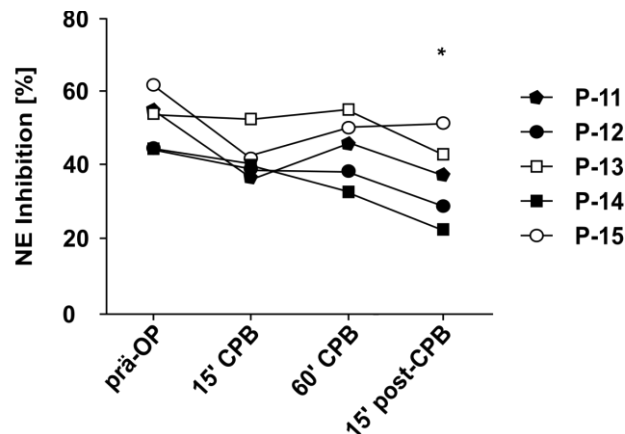


Abbildung 13: Inhibition der neutrophilen Elastaseaktivität durch Plasma von kardiopulmonalen Bypass (CPB)-Patienten im Verlauf der Operation. Die prozentuale Inhibition der Plasmen von fünf Patienten (P-11, P-12, P-13, P-14, P-15) zu vier Zeitpunkten einer CPB-Operation. Blutabnahmezeitpunkte: 15 min nach Einleitung der Anästhesie vor dem Beginn der Operation (prä-OP), 15 min (15' CPB) sowie 60 min (60' CPB) nach dem Anschluss an den extrakorporalen Kreislauf und 15 min nach dem Beenden des extrakorporalen Kreislaufs (post-CPB). Werte normalisiert zu Ansätzen ohne AAT. Wilcoxon-Rangsummentest (*; $p \geq 0,05$ verglichen mit dem Zeitpunkt prä-OP).

3.3.5 Komplexierung von aufgereinigtem AAT aus CPB-Patienten mit NE

Um die AAT-vermittelte Anti-Elastaseaktivität im Verlauf einer CPB-Operation zu untersuchen, wurde das aus fünf Patienten gewonnene AAT zu vier Zeitpunkten einer CPB-Operation jeweils mit oder ohne NE für 30 min inkubiert, anschließend in einem SDS-Polyacrylamidgel unter denaturierenden Bedingungen aufgetrennt und eine Proteinfärbung vorgenommen. Eine anschließende Immundetektion mittels *Western-Blot* erlaubte die densitometrische Quantifizierung der Komplexe aus endogenem AAT aus CPB-Patienten und NE.

Wie Abb. 14 zu entnehmen ist, war in den Ansätzen ohne NE bei allen Patienten zu jedem Zeitpunkt der CPB-Operation eine Bande im molekularen Massebereich von 50 kDa (Proteinbande 1), unterhalb des molekularen Massebereichs von 75 kDa (Proteinbande 2), sowie oberhalb des molekularen Massebereichs von 75 kDa (Proteinbande 3) zu erkennen. Wurde das endogene AAT mit NE inkubiert, führte dies interindividuell zu folgenden Veränderung im Bandenmuster: Proteinbande 1 nahm deutlich an Intensität ab, wobei sich Proteinbande 2 nicht in ihrer Intensität veränderte. Die Intensität von Proteinbande 3 nahm jedoch deutlich zu (Abb. 14). Die Anti-AAT-Antikörper detektierten Proteinbande 1 mit einer geschätzten molekularen Masse von 52 kDa, sowie Proteinbande 3 mit einer geschätzten molekularen Masse von 77 kDa (Abb. 14). Die Intensität dieser der 77 kDa-Bande variierte jedoch intraindividuell zwischen den Proben, die zu verschiedenen Zeitpunkten einer CPB-Operation gewonnen wurden (Abb. 14). Zusätzlich detektierten die Anti-AAT-Antikörper weitere Banden: Selten wurde eine schwache Bande mit der geschätzten molekularen Masse von 48 kDa detektiert. Diese Bande trat jedoch nur in Ansätzen auf, die mit einer Inkubation mit NE einhergingen (Abb. 14). Häufiger kam es zur Detektion von Banden oberhalb des molekularen Massebereichs von 150 kDa, wenn endogenes AAT mit NE inkubiert wurde (Abb. 14).

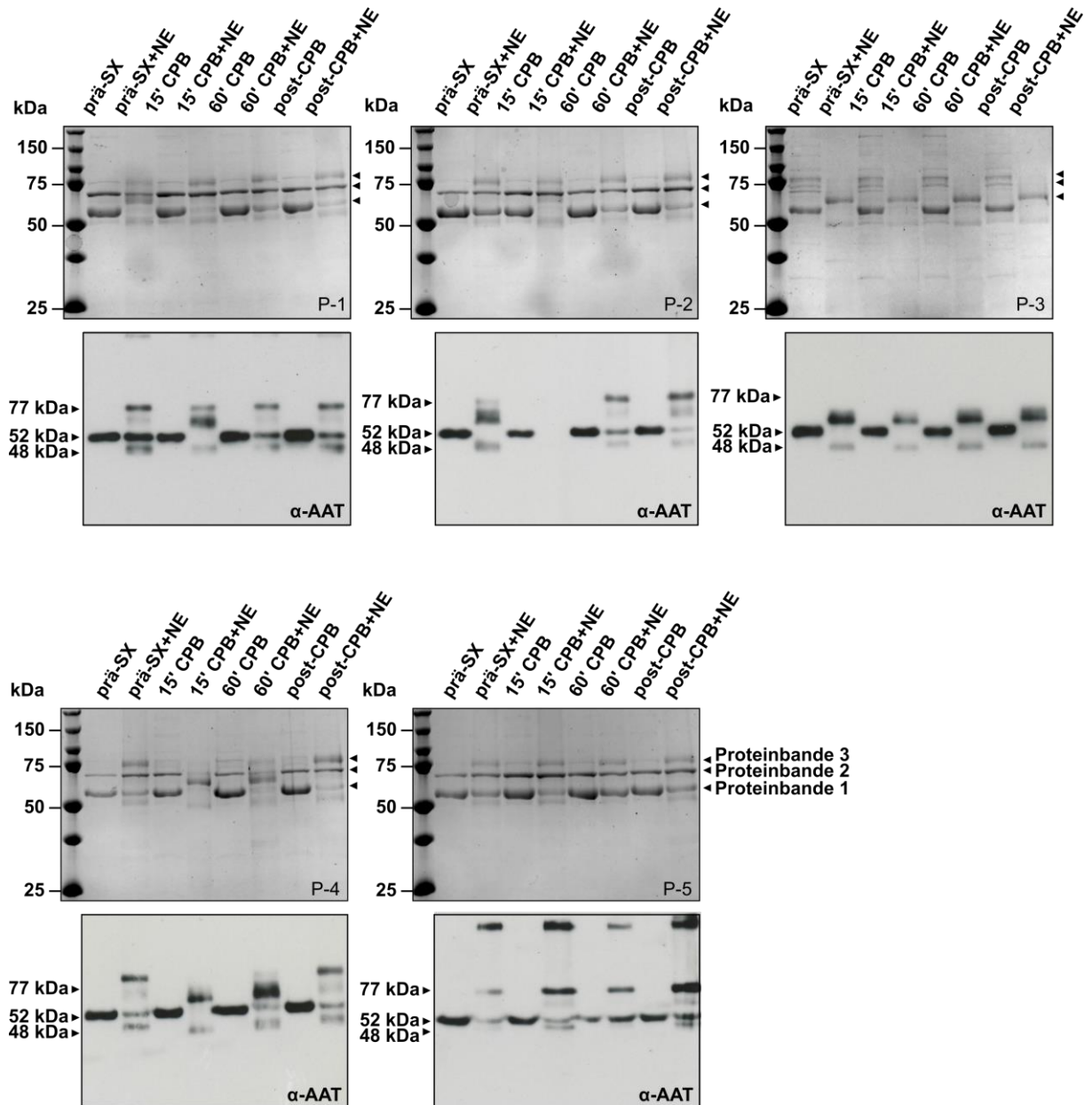


Abbildung 14: Komplexbildung von aufgereinigtem AAT aus Patienten mit neutrophiler Elastase zu unterschiedlichen Zeitpunkten einer kardiopulmonalen Bypass (CPB)-Operation. Komplexe aus AAT und neutrophiler Elastase (NE) aufgetrennt in *Comassie*-gefärbten SDS-Polyacrylamidgelen (10 %, obere Reihen) und mittels *Western-Blot* detektiertes AAT (Bethyl, α -AAT, 52 kDa, untere Reihen) aus Proben unterschiedlicher Blutabnahmezeitpunkte von fünf CPB-Patienten (P-5, P-8, P-22, P-30, P-34). Proteinstandard links; kDa, Kilodalton; Blutabnahmezeitpunkte: 15 min nach Einleitung der Anästhesie vor dem Beginn der Operation (prä-OP), 15 min (15' CPB) sowie 60 min (60' CPB) nach dem Anschluss an den extrakorporalen Kreislauf und 15 min nach dem Beenden des extrakorporalen Kreislaufs (post-CPB).

Die *Western-Blots* wurden folgendermaßen quantifiziert: Alle Banden oberhalb des molekularen Massenbereichs von 52 kDa wurden als komplexiertes AAT definiert. Banden im molekularen Massebereich von und unter 52 kDa wurden als unkomplexiert definiert. Die Bandenintensitäten des komplexiertem und des gesamten AAT wurde ins Verhältnis gesetzt und in Abbildung 14 dargestellt. Hieraus ergaben sich keine signifikanten Veränderungen durch die Operation ($p = 0,5$, $n = 5$, Abb. 15).

Eine Beeinträchtigung der Komplexierungsfähigkeit von endogenem AAT mit NE im Verlauf einer CPB-Operation wurde nicht beobachtet.

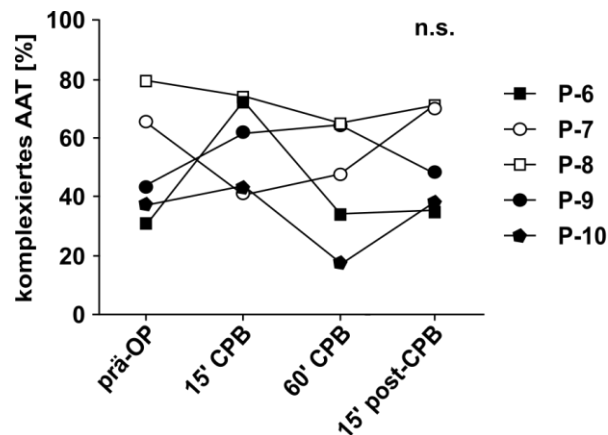


Abbildung 15: Komplexierungsfähigkeit von aufgereinigtem AAT aus Patienten mit neutrophiler Elastase im Verlauf einer kardiopulmonalen Bypass (CPB)-Operation. Die Inhibition der neutrophilen Elastaseaktivität durch affinitätsaufgereinigtes AAT von fünf Patienten (P-6, P-7, P-8, P-9, P-10) zu vier Zeitpunkten einer CPB-Operation. Densitometrische Auswertung der Bandenintensität von komplexiertem AAT im Verhältnis zur gesamten AAT-Bandenintensität der Probe. Blutabnahmezeitpunkte: 15 min nach Einleitung der Anästhesie vor dem Beginn der Operation (prä-OP), 15 min (15' CPB) sowie 60 min (60' CPB) nach dem Anschluss an den extrakorporalen Kreislauf und 15 min nach dem Beenden des extrakorporalen Kreislaufs (post-CPB). Wilcoxon-Rangsummentest (n.s., $p > 0,05$ verglichen mit dem Zeitpunkt prä-OP).

3.3.6 Komplexierung von Plasma aus CPB-Patienten mit NE und PR3

Da sich die Ergebnisse aus Abschnitt 3.3.4 und 3.3.5 widersprechen, wurden äquivalente Untersuchungen in einem Kooperationslabor an der Medizinischen Hochschule Hannover durchgeführt. Hierzu wurde Plasma von fünf weiteren CPB -Patienten vor und nach einer CPB-Operation entweder mit NE oder PR3 inkubiert, in einem SDS-Polyacrylamidgel unter denaturierenden Bedingungen aufgetrennt und eine Immundetektion mit mittels *Western-Blot* vorgenommen. Dies erlaubte die densitometrische Quantifizierung der Komplexe aus endogenem AAT und NE sowie PR3, indem alle Banden oberhalb des molekularen Massenbereichs von 52 kDa als komplexiertes AAT definiert wurden. Banden im molekularen Massebereich von und unter 52 kDa wurden als unkomplexiert definiert. In diesen Experimenten wurde zusätzlich sowohl Prolastin[®] als auch das Plasma eines gesunden Spenders mit dem Genotyp MM als Positivkontrolle und das eines Spenders mit dem Genotyp ZZ als Negativkontrolle verwendet.

In allen Proben kam es vor und nach der CPB-Operation zur Komplexierung von endogenem AAT und NE ($n = 5$, Abb. 16A). Hierbei gab es keine signifikanten quantitativen Veränderungen der AAT-Komplexe durch die CPB-Operation ($p = 0,686$, $n = 5$, Abb. 16A). Jedoch war eine mäßige inter- sowie intraindividuelle Variation zu beobachten. Die Komplexierung von Patientenplasma mit PR3 war ebenfalls in jedem Patienten möglich ($n = 5$, Abb. 16B). Die densitometrische Quantifizierung ergab jedoch eine leichte, signifikante Verbesserung der Komplexierungsfähigkeit nach der Operation ($p = 0,042$, $n = 5$, Abb. 16B).

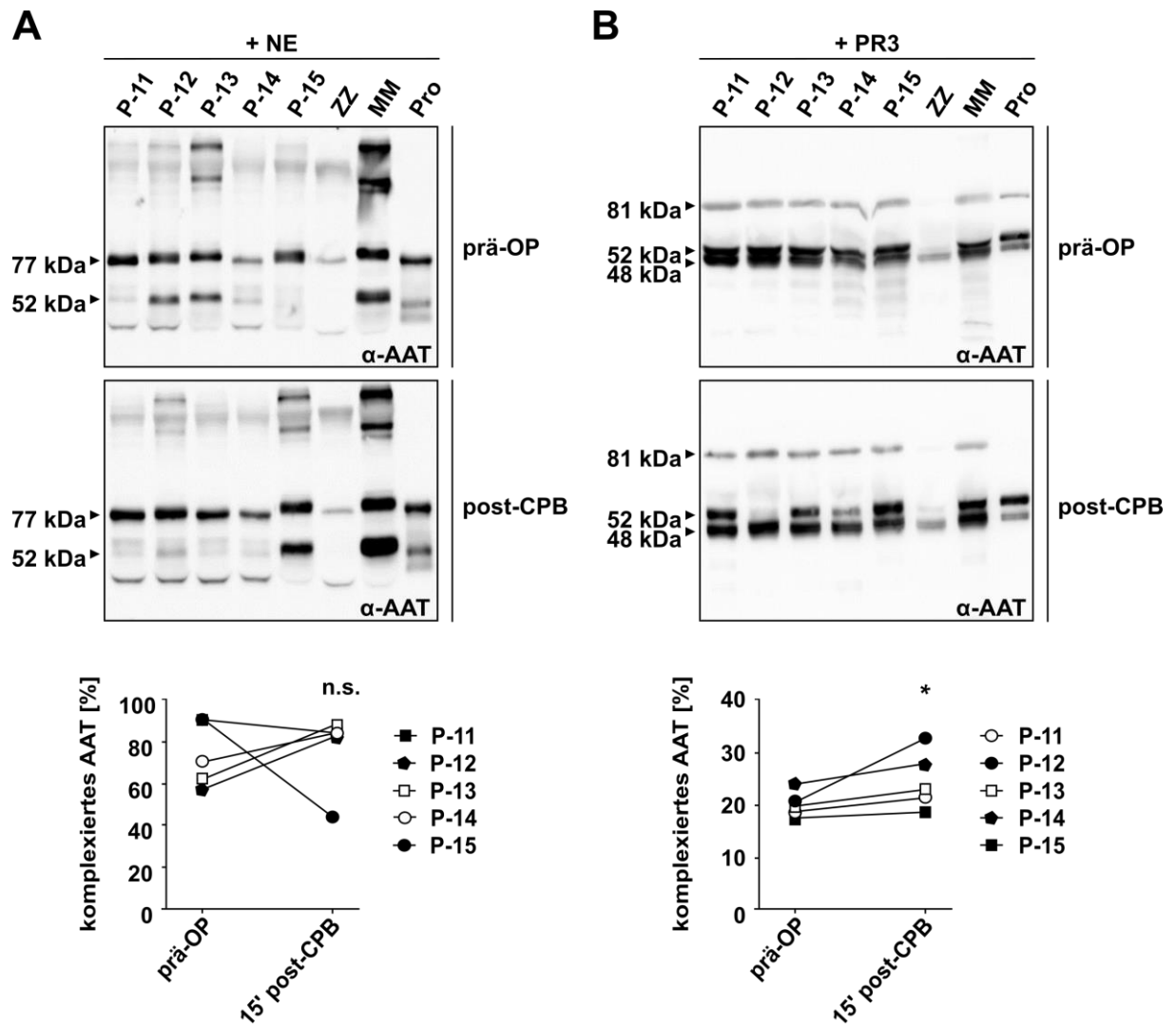


Abbildung 16: Anti-Proteaseaktivität von Patientenplasma vor und nach einer kardiopulmonalen Bypass (CPB)-Operation. Komplexe aus Patientenplasma und (A) neutrophiler Elastase (NE) und (B) Proteinase-3 (PR3), aufgetrennt unter nicht-reduzierenden Bedingungen in SDS-Polyacrylamidgelen (7,5 %) und mittels *Western-Blot* detektiertes AAT (Agilent Dako, α -AAT, 52 kDa) aus Proben zweier Blutabnahmezeitpunkte von fünf CPB-Patienten (P-11, P-12, P-13, P-14, P-15). Densitometrische Auswertung der Bandenintensität von komplexiertem AAT mit (A) NE (77 kDa) oder (B) PR3 (81 kDa) im Verhältnis zur gesamten AAT-Bandenintensität der Probe. Blutabnahmezeitpunkte: 15 min nach Einleitung der Anästhesie vor dem Beginn der Operation (prä-OP) und 15 min nach dem Beenden des extrakorporalen Kreislaufs (post-CPB). Wilcoxon-Rangsummentest (*, $p \leq 0,05$, n.s., $p > 0,05$ verglichen mit dem Zeitpunkt prä-OP).

3.4 Untersuchungen zu AAT-Präparaten und deren oxidierten Varianten

3.4.1 Einfluss der AAT-Präparate Prolastin[®] und Respreeza[®] auf die BzATP-vermittelte IL-1 β -Freisetzung aus U937-Zellen

Um den Einfluss der AAT-Präparate Prolastin[®] und Respreeza[®] auf die monozytäre, BzATP-vermittelte IL-1 β -Freisetzung zu untersuchen, wurden mit LPS (0,1 μ g/ml) stimulierte U937-Zellen 30 min mit BzATP (100 μ M) in Kombination mit Prolastin[®] oder Respreeza[®] inkubiert und anschließend die IL-1 β -Konzentration sowie die LDH-Aktivität im Zellüberstand gemessen. Absolutwerte der IL-1 β -Konzentrationen sind in der ergänzenden Abb. 3 im Anhang dargestellt.

Die IL-1 β -Konzentration in Zellkulturüberständen von U937-Zellen, die mit LPS vorstimuliert und mit BzATP für 30 min inkubiert wurden, wurde auf 100 % gesetzt. Die BzATP-unabhängige Freisetzung von IL-1 β betrug demnach 3 % (n = 8, Abb. 17A). Die gemeinsame Applikation von Prolastin[®] (AAT-P, 1 mg/ml) und BzATP hingegen reduzierte die gemessenen IL-1 β -Konzentrationen im Überstand signifikant auf 5 % (p = 0,004, n = 4, Abb. 17A). Diese Beobachtung stimmt mit bereits publizierten Daten überein (Siebers et al. 2018). Die gemeinsame Applikation von 1 mg/ml Respreeza[®] und BzATP hingegen führte im Zellüberstand zu einer Reduktion der IL-1 β -Freisetzung auf 81 % (p = 0,004, n = 4, Abb. 17A). Diese Reduktion durch Respreeza[®] ist jedoch signifikant geringer als die Reduktion durch dieselbe Dosis Prolastin[®] (p = 0,029, n = 4, Abb. 17A). Hierbei führten weder Prolastin[®] noch Respreeza[®] in der genannten Konzentration zu einer vermehrten LDH-Aktivität im Überstand (\leq 10 % LDH-Aktivität, Abb. 17B).

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass sich die BzATP-vermittelte IL-1 β -Freisetzung aus U937-Zellen durch Prolastin[®] vollständig inhibieren ließ, während dieselbe Konzentration an Respreeza[®] dazu nicht in der Lage war.

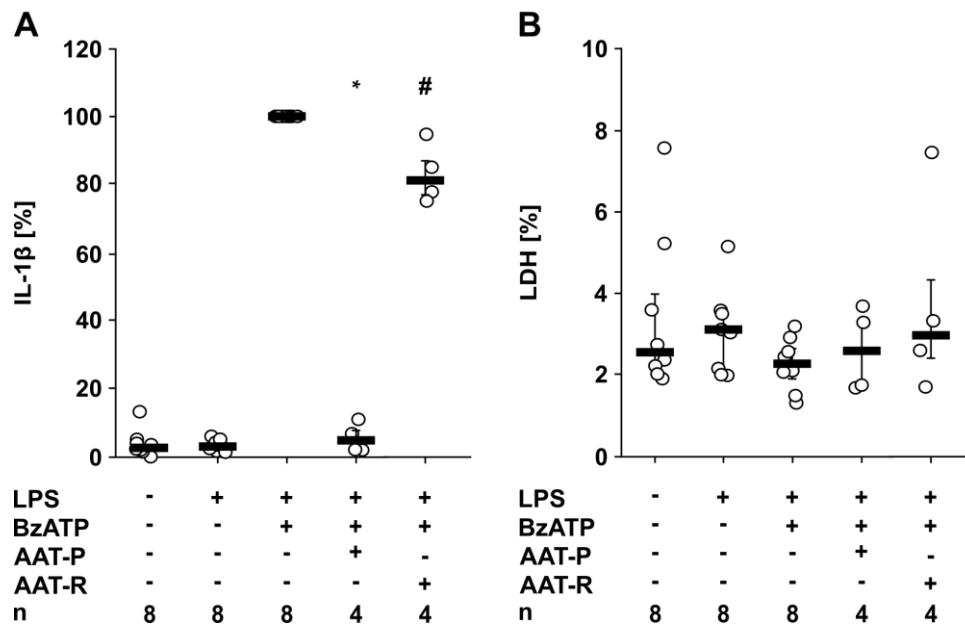


Abbildung 17: Inhibition der Interleukin-1 β (IL-1 β)-Freisetzung aus mit Lipopolysaccharid (LPS) stimulierten und mit BzATP behandelten U937-Zellen durch Prolastin[®] oder Respreeza[®] und korrespondierende Lactatdehydrogenase (LDH)-Aktivität im Zellkulturüberstand. Die Einzelwerte sind als Punkte dargestellt, die Balken entsprechen den Medianen und die Antennen den Perzentilen 25 und 75 (A, B). (A) Die Applikation von 2'(3')-O-(4-Benzoylbenzoyl)adenosin-5'-triphosphat (BzATP, 100 μ M) führt in mit LPS stimulierten U937-Zellen zur erhöhten IL-1 β -Ausschüttung, die jeweils als Referenzwert (100 %) dient. Prolastin[®] (AAT-P, 1 mg/ml) und Respreeza[®] (AAT-R, 1 mg/ml) inhibieren die BzATP-induzierte IL-1 β -Freisetzung, verändern jedoch nicht die LDH-Freisetzung der Zellen im Verhältnis zur maximalen Freisetzung aus lysierten Zellen (B). Respreeza[®] inhibiert die BzATP-induzierte IL-1 β -Freisetzung signifikant weniger stark als dieselbe Dosis Prolastin[®]. Korrespondierende Absolutwerte sind in der ergänzenden Abbildung 3 dargestellt. Kruskal-Wallis-Test gefolgt vom Mann-Whitney-U-Test (*, $p \leq 0,05$, verglichen mit LPS- und BzATP-behandelten Ansätzen; #, $p \leq 0,05$ verglichen mit LPS-, BzATP- und AAT-P-behandelten Ansätzen).

3.4.2 Einfluss von oxidiertem AAT auf die BzATP-vermittelte IL-1 β -Freisetzung aus U937-Zellen

Um den Einfluss von oxidiertem AAT zu untersuchen, wurden native AAT-Präparate gesunder Spender zunächst mit N-Chlorosuccinimid (NCS) oxidiert, anschließend zusammen mit BzATP (100 μ M) 30 min auf mit LPS vorstimulierte U937-Zellen appliziert und die IL-1 β - sowie die LDH-Freisetzung in den Zellüberstand gemessen und in den Abb. 18, 19 und 20 dargestellt. Absolutwerte der IL-1 β -Konzentrationen sind in der ergänzenden Abbildung 4, 5 und 6 im Anhang dargestellt. Anhand der Dosis-Wirkungskurven wurden die halbmaximalen Inhibitionskonzentrationen (IC_{50} -Werte) nach Weibull-Typ-2 berechnet und anschließend statistisch miteinander verglichen (Abb. 21).

Zunächst wurde die Inhibition der BzATP-induzierten IL-1 β -Freisetzung durch AAT aus gesunden Blutspendern und dessen oxidierte Form, oxAAT, untersucht. Eine Dosis-Wirkungskurve von aus gesunden Probanden frisch isoliertem nativem AAT wurde bereits in Abschnitt 3.2.2 in Abb. 6 dargestellt.

Die IL-1 β -Konzentration in Zellkulturüberständen von U937-Zellen, die mit LPS vorstimuliert und mit BzATP für 30 min inkubiert wurden, wurde auf 100 % gesetzt. Die BzATP-unabhängige IL-1 β -Freisetzung belief sich auf 16 % (n = 8, Abb. 18A). Oxidiertes AAT war bereits bei einer Konzentration von 0,01 mg/ml in der Lage, die BzATP-induzierte IL-1 β -Freisetzung signifikant auf 75 % zu reduzieren (p = 0,004, n = 4, Abb. 18A). Höhere Konzentrationen von 0,1, 0,5, 1 und 2 mg/ml führten ebenfalls zur Reduktion der BzATP-induzierten IL-1 β -Freisetzung (n = 4, Abb. 18A). Der errechnete IC₅₀-Wert der BzATP-vermittelten IL-1 β -Freisetzung durch oxidiertes AAT betrug 0,036 mg/ml (Abb. 18A). Natives AAT aus gesunden Probanden mit einer Konzentration von 1 mg/ml reduzierte die BzATP-induzierte IL-1 β Freisetzung auf 32 % und unterschied sich nicht signifikant von Ansätzen, die mit derselben Menge oxidiertem AAT behandelt wurden (p = 0,057, n = 4, Abb. 18A). Keine der genannten Konzentrationen an AAT sowie oxidiertem AAT führten zu einer vermehrten Freisetzung von LDH aus BzATP-stimulierten U937-Zellen (\leq 10 % LDH-Aktivität, Abb. 18B).

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass oxidiertes AAT aus gesunden Blutspendern die BzATP-induzierte IL-1 β -Freisetzung mit einem IC₅₀-Wert von 0,04 mg/ml dosisabhängig inhibiert.

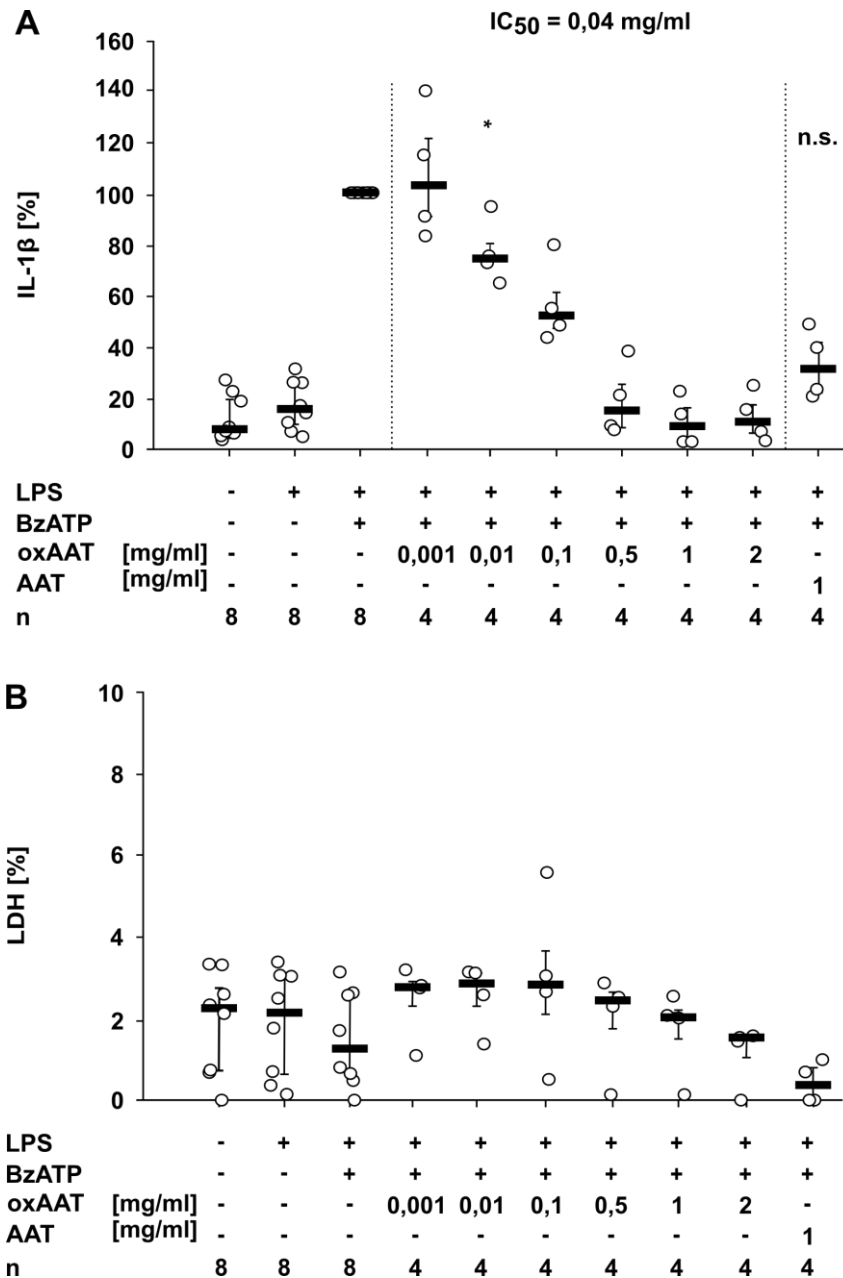


Abbildung 18: Inhibition der Interleukin-1 β (IL-1 β)-Freisetzung aus mit Lipopolysaccharid (LPS) stimulierten und mit BzATP behandelten U937-Zellen durch oxidiertes AAT und korrespondierende Lactatdehydrogenase (LDH)-Aktivität im Zellkulturüberstand. Die Einzelwerte sind als Punkte dargestellt, die Balken entsprechen den Medianen und die Antennen den Perzentilen 25 und 75 (**A**, **B**). In (**A**) dargestellt ist die IL-1 β -Freisetzung normalisiert zu mit LPS und BzATP behandelten Ansätzen. Die Applikation von 2'(3')-O-(4-Benzoylbenzoyl)adenosin-5'-triphosphat (BzATP, 100 μ M) führt in mit LPS stimulierten U937-Zellen zu einer erhöhten IL-1 β -Ausschüttung. Das durch N-Chlorosuccinimid oxidierte AAT inhibiert die BzATP-induzierte IL-1 β -Freisetzung dosisabhängig (oxAAT, $IC_{50} = 0,04 \text{ mg/ml}$). AAT besitzt ebenfalls inhibitorische Aktivität. Korrespondierende Absolutwerte sind in der ergänzenden Abbildung 4 dargestellt. In (**B**) dargestellt ist die unveränderte LDH-Freisetzung unter der Applikation von LPS, BzATP, AAT oder oxAAT im Verhältnis zur maximalen Freisetzung aus lysierten Zellen. Kruskal-Wallis-Test gefolgt vom Mann-Whitney-U-Test (*, $p \leq 0,05$, verglichen mit LPS- und BzATP-behandelten Ansätzen; n.s., $p > 0,05$ verglichen mit Ansätzen, die mit 1 mg/ml oxAAT behandelt wurden).

Als nächstes wurde die Inhibition der BzATP-induzierten IL-1 β -Freisetzung durch Prolastin[®] (AAT-P) und oxidiertes Prolastin[®] (oxAAT-P) untersucht. Eine Dosis-Wirkungskurve von nativem Prolastin[®] wurde bereits veröffentlicht und ergab einen IC₅₀-Wert von 0,21 mg/ml (Siebers et al. 2018).

Die IL-1 β -Konzentration in Zellkulturüberständen von U937-Zellen, die mit LPS vorstimuliert und mit BzATP für 30 min inkubiert wurden, wurde auf 100 % gesetzt. Die BzATP-unabhängige IL-1 β -Freisetzung belief sich auf 4 % (n = 10, Abb. 19A). Oxidiertes Prolastin[®] war bei einer Konzentration von 0,5 mg/ml in der Lage, die BzATP-induzierte IL-1 β -Freisetzung signifikant auf 75 % zu reduzieren (oxAAT-P, p = 0,002, n = 4, Abb. 19A). Höhere Konzentrationen von 1 und 2 mg/ml oxAAT-P führten ebenfalls zur Inhibition der BzATP-induzierten IL-1 β -Freisetzung (n = 4, Abb. 19A). Der errechnete IC₅₀-Wert der BzATP-vermittelten IL-1 β -Freisetzung durch oxidiertes Prolastin[®] betrug 0,09 mg/ml (Abb. 19A). Natives Prolastin[®] mit einer Konzentration von 1 mg/ml reduzierte die BzATP-induzierte IL-1 β Freisetzung auf 6 % und unterschied sich nicht signifikant von Ansätzen, die mit der gleichen Menge oxidiertem Prolastin[®] behandelt wurden (p = 0,762, n = 6, Abb. 19A). Keine der genannten Konzentrationen führten zu einer vermehrten Aktivität der LDH aus BzATP-stimulierten U937-Zellen (\leq 10 % LDH-Aktivität, Abb. 19B).

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass oxidiertes Prolastin[®] die BzATP-induzierte IL-1 β -Freisetzung dosisabhängig inhibiert. Eine voll wirksame Inhibition ergab sich für oxidiertes Prolastin[®] ab einer Konzentration von 0.5 mg/ml.

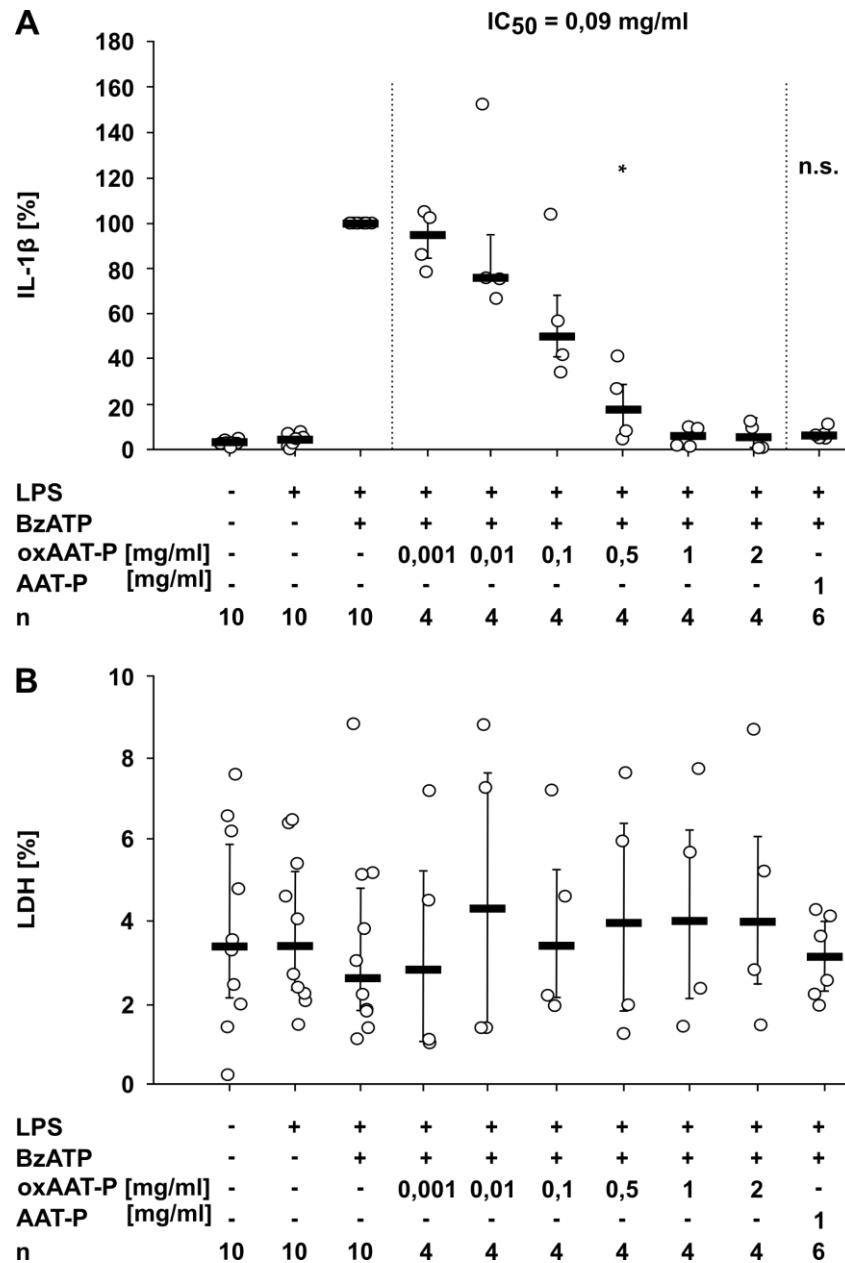


Abbildung 19: Inhibition der Interleukin-1 β (IL-1 β)-Freisetzung aus mit Lipopolysaccharid (LPS) stimulierten und mit BzATP behandelten U937-Zellen durch oxidiertes Prolastin[®] und korrespondierende Lactatdehydrogenase (LDH)-Aktivität im Zellkulturüberstand. Die Einzelwerte sind als Punkte dargestellt, die Balken entsprechen den Medianen und die Antennen den Perzentilen 25 und 75 (**A**, **B**). In (**A**) dargestellt ist die IL-1 β -Freisetzung normalisiert zu mit LPS und BzATP behandelten Ansätzen. Die Applikation von 2'(3')-O-(4-Benzoylbenzoyl)adenosin-5'-triphosphat (BzATP, 100 μ M) führt in mit LPS stimulierten U937-Zellen zu einer erhöhten IL-1 β -Ausschüttung. Das durch N-Chlorosuccinimid oxidierte Prolastin[®] inhibiert die BzATP-induzierte IL-1 β -Freisetzung dosisabhängig (oxAAT-P, $IC_{50} = 0,09 \text{ mg/ml}$). Prolastin[®] (AAT-P) besitzt ebenfalls inhibitorische Aktivität. Korrespondierende Absolutwerte sind in der ergänzenden Abbildung 5 dargestellt. In (**B**) dargestellt ist die unveränderte LDH-Freisetzung unter der Applikation von LPS, BzATP, AAT-P oder oxAAT-P im Verhältnis zur maximalen Freisetzung aus lysierten Zellen. Kruskal-Wallis-Test gefolgt vom Mann-Whitney-U-Test (*, $p \leq 0,05$, verglichen mit LPS- und BzATP-behandelten Ansätzen; n.s., $p > 0,05$ verglichen mit Ansätzen, die mit 1 mg/ml oxAAT-P behandelt wurden).

Zuletzt wurde die Inhibition der BzATP-induzierten IL-1 β -Freisetzung durch Respreeza[®] (AAT-R) und oxidiertes Respreeza[®] (oxAAT-R) untersucht. Eine Dosis-Wirkungsbeziehung von nativem Respreeza[®] wurde nicht untersucht, da Respreeza im nativen Zustand nur eingeschränkte Funktionalität aufwies (siehe Abschnitt 3.4.1. Abb. 17).

Die IL-1 β -Konzentration in Zellkulturüberständen von U937-Zellen, die mit LPS vorstimuliert und mit BzATP für 30 min inkubiert wurden, wurde auf 100 % gesetzt. Die BzATP-unabhängige IL-1 β -Freisetzung belief sich auf 6 % (n = 10, Abb. 20A). Oxidiertes Respreeza[®] war bei einer Konzentration von 0,001 mg/ml in der Lage, die BzATP-induzierte IL-1 β -Freisetzung signifikant auf 87 % zu reduzieren (oxAAT-R, p = 0,002, n = 4, Abb. 20A). Höhere Konzentrationen von 0,01, 0,1, 0,5, 1 und 2 mg/ml oxidiertem Respreeza[®] führten ebenfalls zur Inhibition der BzATP-induzierten IL-1 β -Freisetzung (n = 4, Abb. 20A). Der errechnete IC₅₀-Wert der BzATP-vermittelten IL-1 β -Freisetzung durch oxidiertes Respreeza[®] betrug 0,04 mg/ml (Abb. 20A). Natives Respreeza[®] mit einer Konzentration von 1 mg/ml reduzierte die BzATP-induzierte IL-1 β Freisetzung auf 80 % und unterscheidet sich damit signifikant von derselben Dosis oxidiertem Respreeza[®] (p = 0,01, n = 6, Abb. 20A). Weder oxidiertes Respreeza[®] noch natives Respreeza[®] führte in den genannten Konzentrationen zu einer vermehrten Aktivität der LDH aus BzATP-stimulierten U937-Zellen (\leq 10 % LDH-Aktivität, Abb. 20B).

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass oxidiertes Respreeza[®] die BzATP-induzierte IL-1 β -Freisetzung dosisabhängig inhibiert. Natives Respreeza[®] inhibiert die BzATP-induzierte IL-1 β -Freisetzung signifikant schlechter als oxidiertes Respreeza[®].

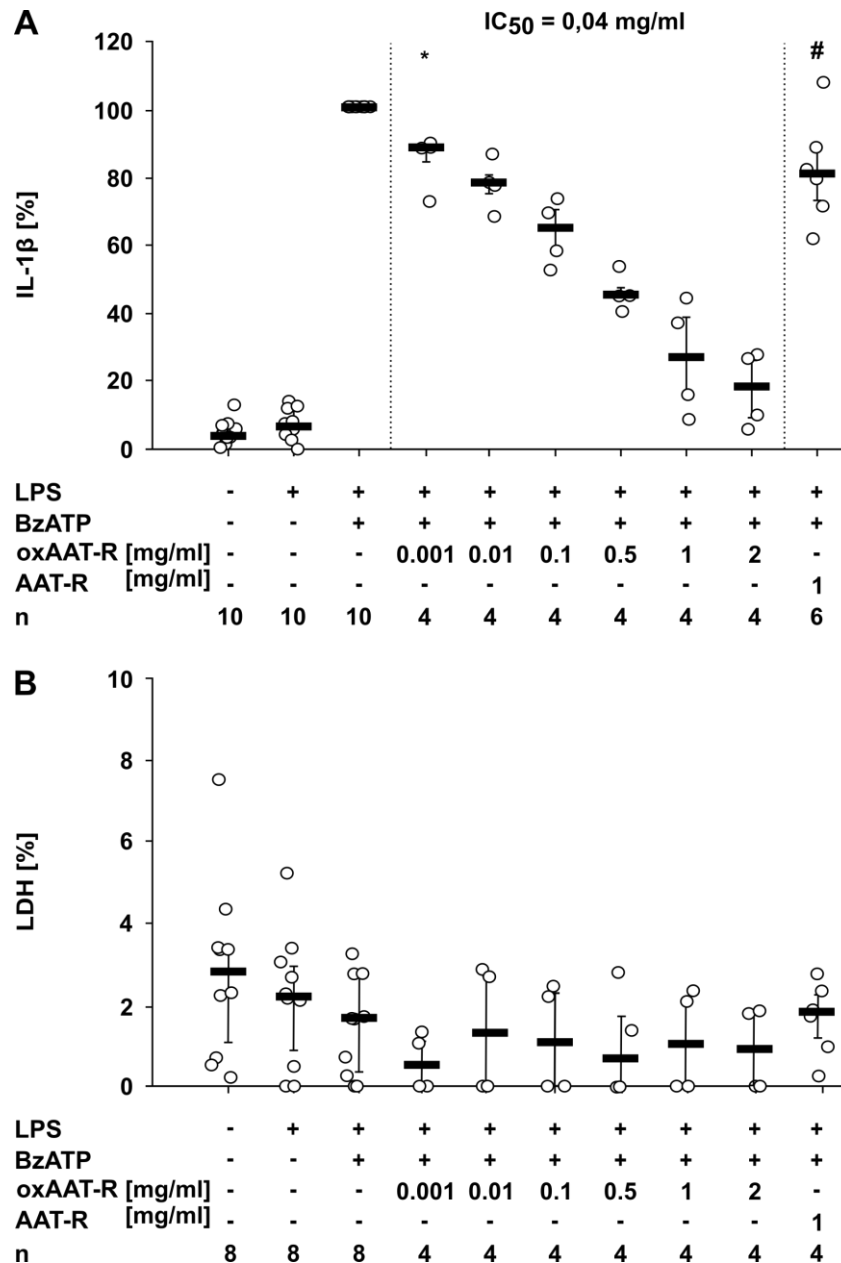


Abbildung 20: Inhibition der Interleukin-1 β (IL-1 β)-Freisetzung aus mit Lipopolysaccharid (LPS) stimulierten und mit BzATP behandelten U937-Zellen durch oxidiertes Respreeza[®] und korrespondierende Lactatdehydrogenase (LDH)-Aktivität im Zellkulturüberstand. Die Einzelwerte sind als Punkte dargestellt, die Balken entsprechen den Medianen und die Antennen den Perzentilen 25 und 75 (**A**, **B**). In (**A**) dargestellt ist die IL-1 β -Freisetzung normalisiert zu mit LPS und BzATP behandelten Ansätzen. Die Applikation von 2'(3')-O-(4-Benzoylbenzoyl)adenosin-5'-triphosphat (BzATP, 100 μ M) führt in mit LPS stimulierten U937-Zellen zu einer erhöhten IL-1 β -Ausschüttung. Das durch N-Chlorosuccinimid oxidierte Respreeza[®] inhibiert die BzATP-induzierte IL-1 β -Freisetzung dosisabhängig (oxAAT-R, IC₅₀ = 0,04 mg/ml). Respreeza[®] (AAT-R) besitzt keine inhibitorische Aktivität. Korrespondierende Absolutwerte sind in der ergänzenden Abbildung 6 dargestellt. In (**B**) dargestellt ist die unveränderte LDH-Freisetzung unter der Applikation von LPS, BzATP, AAT-R oder oxAAT-R im Verhältnis zur maximalen Freisetzung aus lysierten Zellen. Kruskal-Wallis-Test gefolgt vom Mann-Whitney-U-Test (*, $p \leq 0,05$, verglichen mit LPS- und BzATP-behandelten Ansätzen; #, $p \leq 0,05$ verglichen mit Ansätzen, die mit 1 mg/ml oxAAT-R behandelt wurden).

Die Dosis-Wirkungskurven der verschiedenen nativen und oxidierten AAT-Präparate wurden nach dem linearen Regressionsmodell Weibull-Typ-2 verglichen (Abb. 21). Hierbei wurden sowohl die IC_{50} -Werte miteinander verglichen, als auch die Steigungen. Die Ergebnisse des statistischen Vergleichs der nativen sowie oxidierten AAT-Präparate wurden in Tab. 15 dargestellt.

Die nach dem linearen Regressionsmodell Weibull-Typ-2 berechneten IC_{50} -Werte einzelner AAT-Präparate ergaben folgende Beobachtungen: Natives AAT aus gesunden Spendern inhibiert die IL-1 β -Freisetzung aus U937-Zellen mit einem IC_{50} von 0,18 mg/ml (Abb. 21). Wurde natives AAT oxidiert, so verringerte sich der IC_{50} -Wert auf 0,04 mg/ml und erreicht damit den geringsten Wert aller getesteten AAT-Präparate. Natives Prolastin[®] inhibiert die IL-1 β -Freisetzung aus U937-Zellen mit einem IC_{50} -Wert von 0,21 mg/ml und entspricht damit dem höchsten IC_{50} -Wert der hier getesteten AAT-Präparate. Wurde Prolastin[®] oxidiert, so betrug der IC_{50} -Wert nur lediglich 0,09 mg/ml (Abb. 21). Respreeza[®] war nicht zur vollständigen Inhibition der IL-1 β -Freisetzung fähig, erreichte jedoch durch Oxidation eine voll wirksame Inhibition mit einem IC_{50} -Wert von 0,04 mg/ml und liegt damit nah am IC_{50} -Wert von oxidiertem AAT aus gesunden Spendern (Abb. 21). Signifikante Unterschiede in den IC_{50} -Werten von oxidierten AAT-Varianten ergaben sich lediglich zwischen oxidiertem AAT, welches aus gesunden Probanden aufgereinigt wurde und oxidiertem Prolastin[®]: Oxidiertes AAT besaß einen signifikant geringeren IC_{50} -Wert als oxidiertes Prolastin[®] ($p = 0,0018$, $n = 4$, Tab. 15). Wurden die Steigungen der einzelnen Dosis-Wirkungskurven miteinander verglichen, so ergaben sich signifikante Unterschiede zwischen AAT aus gesunden Probanden und dessen oxidiertes Variante ($p = 0,04$, $n = 4$, Tab. 15), sowie zwischen AAT aus gesunden Probanden und Prolastin[®] ($p \leq 0,00006$, $n = 4$, Tab. 15). Auffällig war, dass die Dosis-Wirkungskurven von Prolastin[®] sowie dessen oxidiertes Variante deutlich steiler abfielen als der Rest der getesteten AAT-Präparate (Abb. 21). Auch der statistische Vergleich der Steigungen von oxidiertem Prolastin[®] und oxidiertem AAT aus gesunden Probanden ergab, einen signifikant steileren Abfall der Dosiswirkungskurve für oxidiertes Prolastin[®] ($p = 0,005$, $n = 4$, Tab.15).

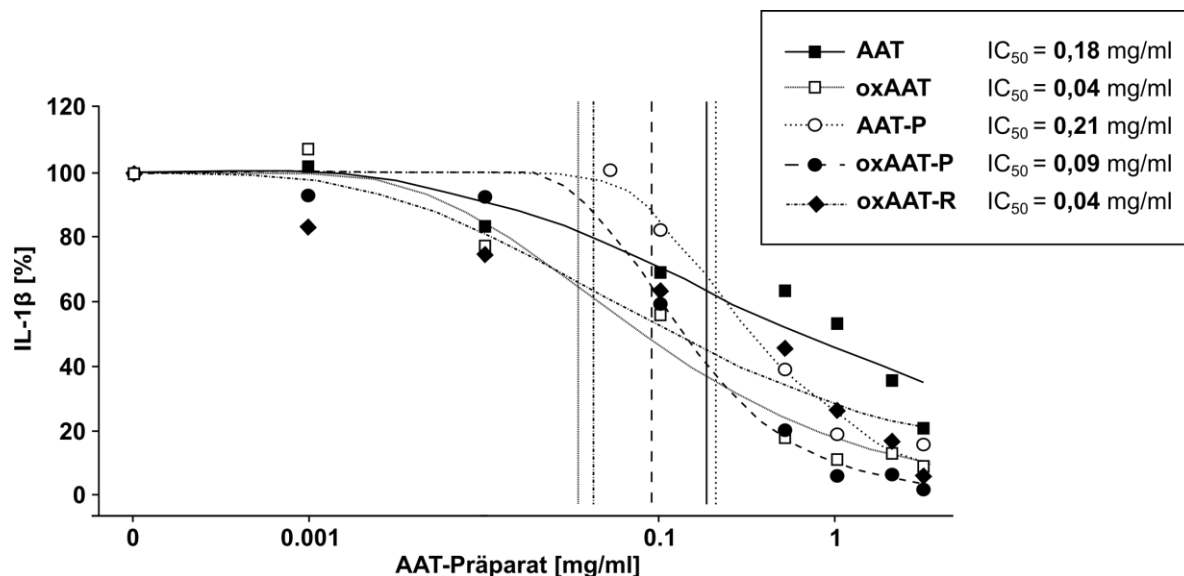


Abbildung 21: Vergleich der Dosis-Wirkungskurven nativer sowie oxidiertes AAT-Präparate. Die Applikation von 2'(3')-O-(4-Benzoylbenzoyl)adenosin-5'-triphosphat (BzATP, 100 μ M) führt in mit LPS stimulierten U937-Zellen zur IL-1 β -Ausschüttung. Natives AAT aus gesunden Probanden (AAT) und das AAT-Präparat Prolastin[®] (AAT-P) sowie die oxidierten AAT-Präparate oxAAT, oxAAT-P und oxAAT-R inhibieren die IL-1 β -Freisetzung dosisabhängig. Datenreihen für Prolastin[®] sind reanalysiert aus Siebers et al. 2018. oxAAT, oxidiertes AAT aus gesunden Spendern; oxAAT-P, oxidiertes Prolastin[®]; AAT-R, Respreeza[®]; oxAAT-R, oxidiertes Respreeza[®]. Lineares Regressionsmodell nach Weibull-Typ-2.

Tabelle 15: Statistische Auswertung der Dosis-Wirkungsbeziehung von nativen und oxidierten AAT-Präparaten auf die IL-1 β -Freisetzung aus U937-Zellen.

Verglichene Präparate	AAT-	p-Wert (IC ₅₀)	p-Wert (Steigung)
AAT vs. AAT-P		1	$\leq 0,00006$
AAT vs oxAAT		0,52	0,04
AAT-P vs oxAAT-P		0,3	0,62
oxAAT vs. oxAAT-P		0,0018	0,005
oxAAT vs.oxAAT-R		1	0,52
oxAAT-P vs. oxAAT-R		1	0,15

oxAAT, oxidiertes AAT aus gesunden Spendern; AAT-P, Prolastin[®]; oxAAT-P, oxidiertes Prolastin[®]; AAT-R, Respreeza[®]; oxAAT-R, oxidiertes Respreeza[®]. p-Werte korrigiert nach Bonferroni-Holm.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass alle AAT-Präparate außer nativem Respreeza[®] dazu in der Lage waren, die IL-1 β -Freisetzung aus U937-Zellen zu inhibieren. Generell führte die Oxidation von AAT-Präparaten zu einer Minderung der IC₅₀-Werte und damit zu einer Verbesserung der inhibitorischen Aktivität. Oxidiertes AAT aus gesunden Probanden wies hierbei die höchste

inhibitorische Aktivität auf die IL-1 β -Freisetzung aus U937-Zellen auf, gefolgt von oxidiertem Respreeza[®] und oxidiertem Prolastin[®], nativem AAT aus gesunden Probanden und nativem Prolastin[®]. Anhand der Steigungen war zudem zu erkennen, dass natives sowie oxidiertes Prolastin[®] im Vergleich zu allen anderen AAT-Präparaten eine andere Dynamik der Dosis-Wirkungsbeziehung aufwies.

3.4.3 Effekt der Oxidation von AAT auf dessen Anti-Proteaseaktivität

Um herauszufinden, ob die Oxidation von AAT durch NCS erfolgreich war, wurden die nativen als auch die oxidierten AAT-Varianten aus gesunden Spendern, Prolastin[®] und Respreeza[®] mit NE inkubiert und anschließend in einem SDS-Polyacrylamidgel unter denaturierenden Bedingungen aufgetrennt und die Proteine im Gel angefärbt.

Deutlich erkennbar war eine starke Proteinbande mit einer geschätzten molekularen Masse von 52 kDa in allen Ansätzen ohne NE (Proteinbande 1, Abb. 22A,B,C). In Ansätzen mit nativen AAT-Varianten und NE war neben schwachen Banden im molekularen Massebereich von 50 – 70 kDa eine starke Bande mit der geschätzten molekularen Masse von 77 kDa zu erkennen (Proteinbande 2, Abb. 22A,B,C). Diese Bande ließ sich in Ansätzen mit oxidierten AAT-Varianten und NE nicht finden (Abb. 22A,B,C). Jedoch ist in diesen Ansätzen eine mittelschwache Bande mit der geschätzten molekularen Masse von 48 kDa erkennbar.

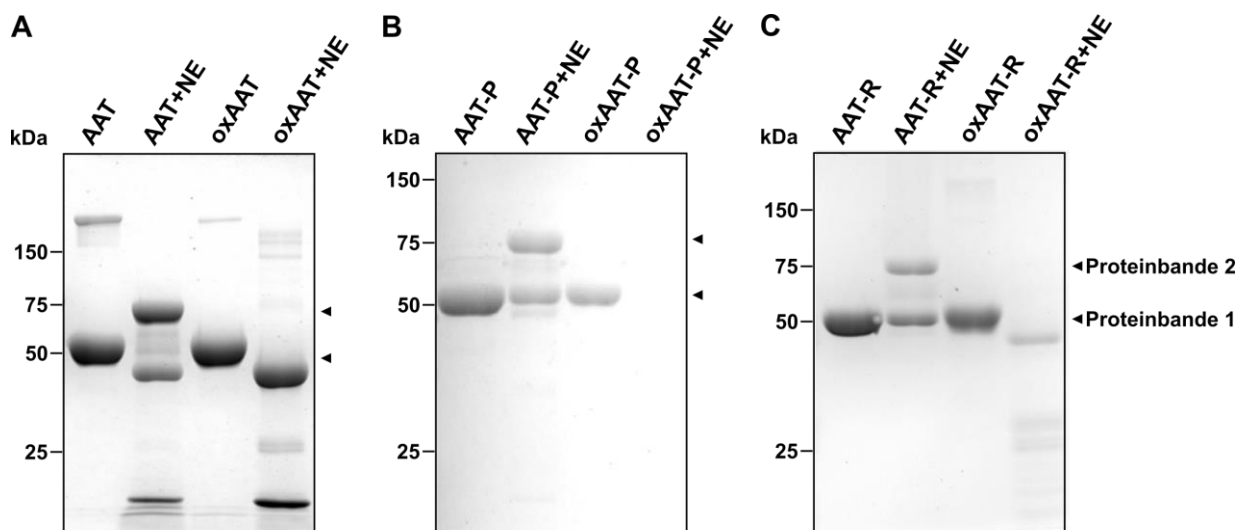


Abbildung 22: Anti-Proteaseaktivität von AAT, Prolastin[®] und Respreeza[®] und deren oxidierten Varianten. Komplexe aus dem AAT gesunder Probanden (A), dem AAT-Präparaten Prolastin[®] (AAT-P) (B) und Respreeza[®] (AAT-R) (C), sowie deren durch N-Chlorosuccinimid (NCS) oxidierte Varianten (oxAAT, oxAAT-P und oxAAT-R) und neutrophiler Elastase (NE), aufgetrennt in *Comassie*-gefärbtem SDS-Polyacrylamidgelen (10 %). Die mit NCS oxidierten AAT-Präparate bilden keine Komplexe mit NE.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die NCS-induzierte Oxidation aller eingesetzten nativen AAT-Präparate zum Verlust der Komplexierungsfähigkeit mit NE und demnach zum Verlust der Anti-Proteaseaktivität führten.

3.5 Einfluss von nAChR siRNA auf die LPC- und GPC-vermittelte Inhibition der IL-1 β -Freisetzung aus U937-Zellen

Die AAT-vermittelte Inhibition der IL-1 β -Freisetzung aus U937-Zellen wird unter anderem durch einen niedermolekularen Faktor vermittelt, der von Monozyten freigesetzt wird und nach aktuellem Verständnis als Agonist an nAChR bindet, wodurch er letztendlich die Aktivierung des P2X7-Rezeptors durch BzATP verhindert (Zakrzewicz et al. 2017). Durch das Wissen über die Beteiligung der iPLA2 β am AAT-vermittelten Wirkmechanismus, entstand die Überlegung, dass iPLA2 β -vermittelte, niedermolekulare Spaltprodukte von Phosphatidylcholinen die AAT-induzierte Inhibition der IL-1 β -Freisetzung vermitteln. Die enzymatische Aktivität der iPLA2 β spaltet Phosphatidylcholine an der *sn2*-Position zu LPC und freien Fettsäuren (Kabarowski et al. 2002). Durch einen weiteren Lipase-vermittelten Schritt wird LPC zu GPC und einer weiteren, freien Fettsäure gespalten (O'Donnell et al. 2018).

Da LPC und GPC bereits als nAChR-Agonisten identifiziert wurden, die ähnliche Effekte in U937-Zellen auslösen (Zakrzewicz et al. 2017), drängt sich die Frage auf, ob diese Moleküle durch die Stimulation mit AAT ausgeschüttet werden und so die beschriebenen Effekte vermitteln. Um sich dieser Fragestellung zu nähern, wurden Vergleiche zwischen den nAChR-Untereinheiten angestellt, die für die LPC-, GPC-vermittelte Inhibition der IL-1 β Freisetzung benötigt werden. Die Rezeptorbedürfnisse von GPC und LPC konnten anschließend mit den Rezeptorbedürfnissen des AAT-vermittelten Faktors verglichen werden. Experimente mit nAChR-Antagonisten konnten bereits zeigen, dass die LPC- und GPC-vermittelte Inhibition der IL-1 β -Freisetzung aus U937-Zellen hauptsächlich durch die nAChR-Untereinheiten $\alpha 9$ und $\alpha 10$ vermittelt werden (Zakrzewicz et al. 2017). Im Nachfolgenden wurden siRNA-Experimente zur Verifizierung dieser Ergebnisse vorgenommen.

Die Expression der nAChR-Untereinheiten $\alpha 7$, $\alpha 9$ und $\alpha 10$ wurde durch siRNA-Transfektion in U937-Zellen vermindert (Zakrzewicz et al. 2017). Als Kontrollexperiment diente die Transfektion mit unspezifischer siRNA. Zeitnah durchgeführte Expressionsuntersuchungen mittels quantitativer Reverse-Transkriptase-PCR konnten die Spezifität der verwendeten siRNA und die Effektivität der Expressionsminderung für die nAChR-Untereinheiten $\alpha 9$ und $\alpha 10$, jedoch nicht für die Untereinheit $\alpha 7$, beweisen (Zakrzewicz et al. 2017). Die Applikation von BzATP erfolgte anschließend in An- und Abwesenheit von GPC und LPC auf transfizierte U937-Zellen, welche eine Vorstimulation mit LPS erfahren haben. Die IL-1 β -Freisetzung und die LDH-Aktivität wurden anschließend im Zellkulturüberstand bestimmt. Absolutwerte der IL-1 β -Konzentrationen sind in den ergänzenden Abbildungen 7 und 8 im Anhang dargestellt.

Die IL-1 β -Konzentration in Zellkulturüberständen von U937-Zellen, die mit LPS vorstimuliert und mit BzATP für 30 min inkubiert wurden, wurde auf 100 % gesetzt. Die IL-1 β -Freisetzung unter LPS betrug 5 % (n = 5, Abb. 23A). Die Applikation von GPC (100 μ M) führte in U937-Zellen, die mit

unspezifischer siRNA transfiziert wurden, zu einer signifikanten und vollständigen Inhibition der BzATP-induzierten IL-1 β -Freisetzung (7 % IL-1 β -Freisetzung, $p = 0,008$, $n = 5$, Abb. 23A). Die Transfektion von U937-Zellen mit spezifischer siRNA, die gegen die nAChR-Untereinheit $\alpha 7$ gerichtet war, reagierten auf die Applikation von LPC ebenfalls mit einer signifikanten Reduktion der IL-1 β -Freisetzung (35 % IL-1 β -Freisetzung, $p = 0,029$, $n = 4$, Abb. 23A), die im Vergleich zu Kontrollexperimenten geringer ausfiel, sich jedoch nicht signifikant von diesen unterschied ($p = 0,190$, $n = 4$, Abb. 23A). Transfizierte Zellen mit siRNA gegen die nAChR-Untereinheit $\alpha 9$ reagierten auf die Applikation von GPC ebenfalls mit einer signifikanten Reduktion der BzATP-induzierten IL-1 β -Freisetzung ($p = 0,029$, $n = 4$, Abb. 23A), jedoch fiel die GPC-vermittelte Reduktion geringer aus und unterschied sich signifikant von der GPC-vermittelten Inhibition der Kontrollexperimente (76 % IL-1 β -Freisetzung, $p = 0,016$, $n = 4$, Abb. 23A). Auch die mit siRNA gegen die nAChR-Untereinheit $\alpha 10$ transfizierten U937-Zellen reagierten auf GPC mit einer signifikanten Reduktion der IL-1 β -Freisetzung (68 % IL-1 β -Freisetzung, $p = 0,029$, $n = 4$, Abb. 23A), wobei die GPC-vermittelte Reduktion im Vergleich zu Kontrollexperimenten signifikant geringer ausfiel ($p = 0,016$, $n = 4$, Abb. 23A). Weder die siRNA-Transfektion noch die GPC-Applikation führten zu einer Veränderung der LDH-Aktivität im Überstand der U937-Zellen (≤ 10 % LDH-Aktivität, Abb. 23B).

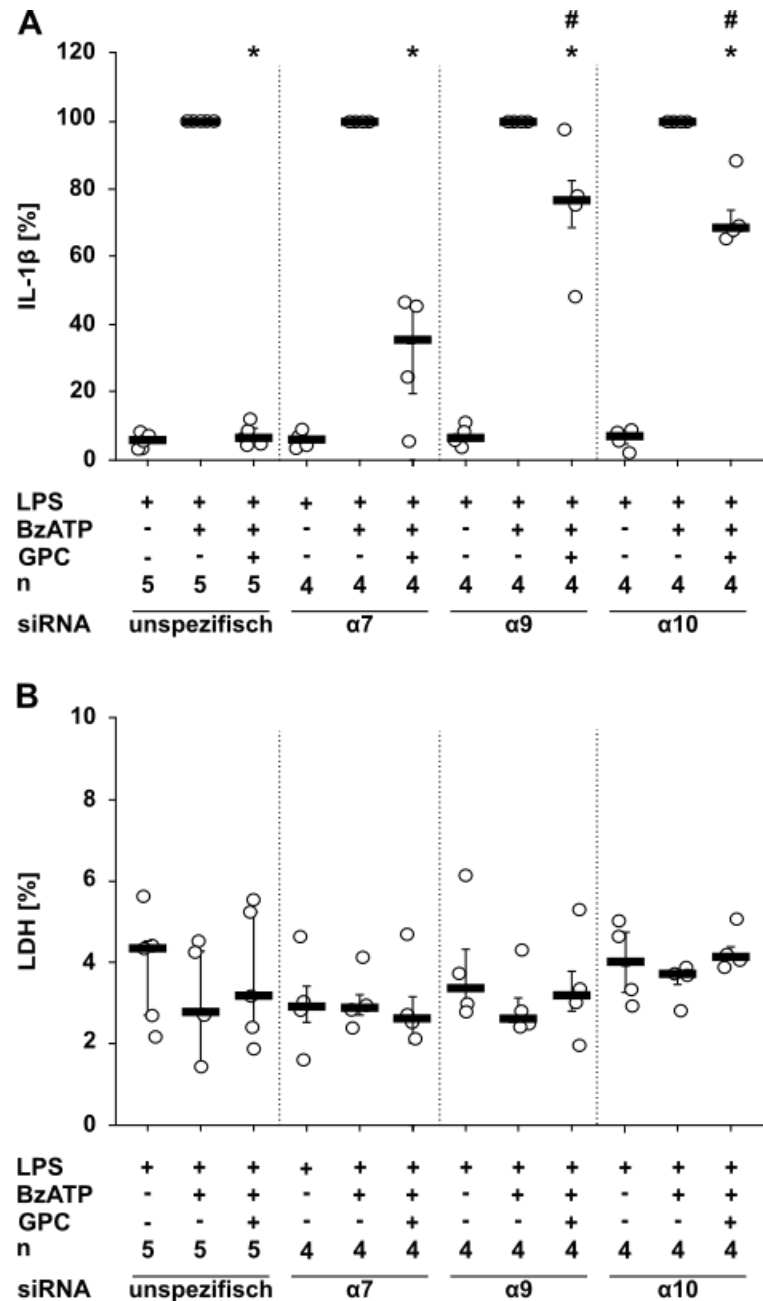


Abbildung 23: Inhibition der Interleukin-1 β (IL-1 β)-Freisetzung aus mit Lipopolysaccharid (LPS) stimulierten und mit BzATP behandelten U937-Zellen durch GPC bei verminderter Expression der nAChR-Untereinheiten $\alpha 7$, $\alpha 9$ und $\alpha 10$ sowie korrespondierende Lactatdehydrogenase(LDH)-Aktivität im Zellkulturüberstand. Die Einzelwerte sind als Punkte dargestellt, die Balken entsprechen den Medianen und die Antennen den Perzentilen 25 und 75 (**A**, **B**). In (**A**) dargestellt ist die IL-1 β -Freisetzung normalisiert zu LPS und von 2'(3')-O-(4-Benzoylbenzoyl)adenosin-5'-triphosphat (BzATP) behandelten Ansätzen. Die Applikation BzATP (100 μ M) führt in mit LPS stimulierten und siRNA-transfizierten U937-Zellen zu einer erhöhten IL-1 β -Ausschüttung. Glycerophosphocholin (GPC, 100 μ M) inhibiert die BzATP-induzierte IL-1 β -Freisetzung vollständig in Kontrollexperimenten (unspezifisch). Bei verminderter Expression der nAChR-Untereinheiten $\alpha 7$, $\alpha 9$ und $\alpha 10$ ist diese GPC-vermittelte Inhibition abgeschwächt. Korrespondierende Absolutwerte sind in der ergänzenden Abbildung 7 dargestellt. In (**B**) dargestellt ist die unveränderte LDH-Freisetzung unter der Applikation von LPS, BzATP und AAT im Verhältnis zur maximalen Freisetzung aus lysierten Zellen. Kruskal-Wallis-Test gefolgt vom Mann-Whitney-U-Test (*, $p \leq 0,05$ verglichen mit LPS und BzATP behandelten Ansätzen der einzelnen Expressionsminderungen; #, $p \leq 0,05$ verglichen mit LPS- und BzATP-behandelten Ansätzen des Kontrollexperimentes).

Die IL-1 β -Konzentration in Zellkulturüberständen von U937-Zellen, die mit LPS vorstimuliert und mit BzATP für 30 min inkubiert wurden, wurde auf 100 % gesetzt. Die IL-1 β -Freisetzung unter LPS betrug 5 % (n = 5, Abb. 24A). Die Applikation von LPC (10 μ M) führte in U937-Zellen, die mit unspezifischer siRNA transfiziert wurden, zu einer signifikanten und vollständigen Inhibition der BzATP-induzierten IL-1 β -Freisetzung (11 % IL-1 β -Freisetzung, p = 0,008, n = 5, Abb. 24A). Die Transfektion von U937-Zellen mit spezifischer siRNA, die gegen die nAChR-Untereinheit α 7 gerichtet war, reagierten auf die Applikation von LPC ebenfalls mit einer signifikanten Reduktion der IL-1 β -Freisetzung, die sich signifikant von der LPC-vermittelten Reduktion in Kontrollexperimenten unterschied (35 % IL-1 β -Freisetzung, p = 0,016, n = 4, Abb. 24A). Transfizierte Zellen mit siRNA gegen die nAChR-Untereinheit α 9 reagierten auf die Applikation von LPC ebenfalls mit einer signifikanten Reduktion der BzATP-induzierten IL-1 β -Freisetzung (p = 0,029, n = 4, Abb. 24A), jedoch fiel die LPC-vermittelte Reduktion deutlich geringer aus und unterschied sich signifikant von der LPC-vermittelten Inhibition der Kontrollexperimente (90 % IL-1 β -Freisetzung, p = 0,016, n = 4, Abb. 24A). Auch die mit siRNA gegen die nAChR-Untereinheit α 10 transfizierten U937-Zellen reagierten auf LPC mit einer signifikanten Reduktion der IL-1 β -Freisetzung (66 % IL-1 β -Freisetzung, p = 0,029, n = 4, Abb. 24A), wobei die GPC-vermittelte Reduktion im Vergleich zu Kontrollexperimenten signifikant geringer ausfiel (p = 0,016, n = 4, Abb. 24A). Weder die siRNA-Transfektion noch die GPC-Applikation führten zu einer Veränderung der LDH-Aktivität im Überstand der U937-Zellen (\leq 10 % LDH-Aktivität, Abb. 24B).

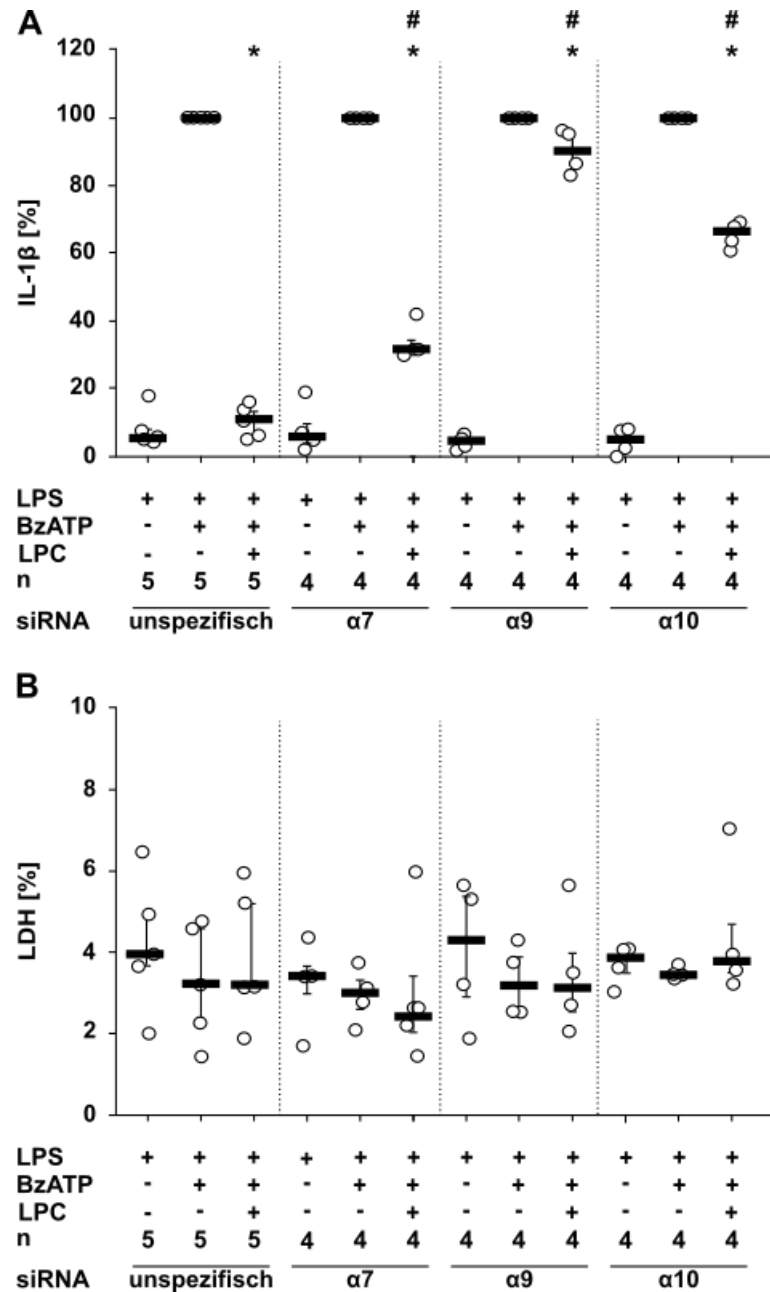


Abbildung 24: Inhibition der Interleukin-1 β (IL-1 β)-Freisetzung aus mit Lipopolysaccharid (LPS) stimulierten und mit BzATP behandelten U937-Zellen durch LPC bei verminderter Expression der nAChR-Untereinheiten $\alpha 7$, $\alpha 9$ und $\alpha 10$ sowie korrespondierende Lactatdehydrogenase(LDH)-Aktivität im Zellkulturüberstand.. Die Einzelwerte sind als Punkte dargestellt, die Balken entsprechen den Medianen und die Antennen den Perzentilen 25 und 75 (**A**, **B**). In (**A**) dargestellt ist die IL-1 β -Freisetzung normalisiert zu LPS und 2'(3')-O-(4-Benzoylbenzoyl)adenosin-5'-triphosphat (BzATP) behandelten Ansätzen. Die Applikation von BzATP (100 μ M) führt in mit LPS stimulierten U937-Zellen zu einer erhöhten IL-1 β -Ausschüttung. Lysophosphatidylcholin (LPC, 10 μ M) inhibiert die BzATP-induzierte IL-1 β -Freisetzung vollständig in Kontrollexperimenten (unspezifisch). Bei verminderter Expression der nAChR-Untereinheiten $\alpha 7$, $\alpha 9$ und $\alpha 10$ ist diese GPC-vermittelte Inhibition abgeschwächt. Korrespondierende Absolutwerte sind in der ergänzenden Abbildung 8 dargestellt. In (**B**) dargestellt ist die unveränderte LDH-Freisetzung unter der Applikation von LPS, BzATP und AAT im Verhältnis zur maximalen Freisetzung aus lysierten Zellen. Kruskal-Wallis-Test gefolgt vom Mann-Whitney-U-Test (*, $p \leq 0,05$ verglichen mit LPS und BzATP behandelten Ansätzen der einzelnen Expressionsminderungen; #, $p \leq 0,05$ verglichen mit LPS und BzATP behandelten Ansätzen des Kontrollexperiments).

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass sowohl die GPC- als auch die LPC-vermittelte Inhibition der IL-1 β -Freisetzung aus U937-Zellen durch die Expressionsminderung der einzelnen nAChR-Untereinheiten $\alpha 7$, $\alpha 9$ und $\alpha 10$ beeinträchtigt wurde. Die größte Beeinträchtigung erfuhren die Zellen unter der Expressionsminderung der nAChR-Untereinheiten $\alpha 9$ und $\alpha 10$, deren Anwesenheit für die GPC- als auch LPC-vermittelte Inhibition der IL-1 β -Freisetzung demnach als obligat erachtet wurden. Die nAChR-Untereinheit $\alpha 7$ scheint für die GPC- und LPC-vermittelte Inhibition der IL-1 β -Freisetzung aus U937-Zellen eine untergeordnete Rolle zu spielen.

3.6 Einfluss von DHA auf die BzATP-induzierte IL-1 β -Freisetzung aus U937-Zellen

Da, wie im vorigen Abschnitt bereits erläutert, sowohl LPC als auch GPC zwar eine inhibitorische Aktivität auf die BzATP-induzierte IL-1 β -Freisetzung haben, jedoch vermutlich nicht dem durch AAT induzierten Faktor-x entsprechen, entstand die Überlegung, dass eine durch iPLA2 β freigesetzte Fettsäure der niedermolekulare Faktor-x mit inhibitorischer Aktivität sein könnte. Eine Fettsäure, die durch die Aktivität der iPLA2 β aus Phosphatidylcholinen freigesetzt werden kann, ist Docosahexaensäure (DHA). Deren Aktivität auf die BzATP-induzierte IL-1 β -Freisetzung wurde zunächst untersucht.

Um herauszufinden, ob DHA einen Einfluss auf die BzATP-induzierte IL-1 β -Freisetzung hat, wurden LPS-vorbehandelte U937-Zellen gleichzeitig mit BzATP und DHA behandelt und anschließend die IL-1 β Konzentration sowie die LDH-Aktivität im Überstand der Zellen bestimmt. Absolutwerte der IL-1 β -Konzentrationen sind in der ergänzenden Abbildung 9 im Anhang dargestellt.

Die IL-1 β -Konzentration in Zellkulturüberständen von U937-Zellen, die mit LPS vorstimuliert und mit BzATP für 30 min inkubiert wurden, wurde auf 100 % gesetzt. Hierbei ergab sich zunächst eine IL-1 β -Freisetzung unter LPS von 3 % (n = 4, Abb. 25A). Eine Konzentration von 2,5 μ M DHA führte in U937-Zellen zu einer Reduktion der BzATP-induzierten IL-1 β -Freisetzung auf 83 % (n = 5, Abb. 25A). Bei einer Konzentration von 40 μ M DHA konnte eine vollständige, signifikante Inhibition der BzATP-induzierten IL-1 β -Freisetzung auf 12 % beobachtet werden (p = 0,029, n = 4, Abb. 25A). Konzentrationen von 20, 40, 80, 160 und 240 μ M DHA führten ebenfalls zur Inhibition der IL-1 β -Freisetzung aus U937-Zellen (n = 4, Abb. 25A).

Eine voll wirksame Inhibition der IL-1 β -Freisetzung ergab sich mit den Konzentrationen von 40, 80, 160 und 240 μ M DHA (n = 4, Abb. 25A). Der errechnete IC₅₀-Wert betrug 12 μ M (Abb. 25A). Eine Veränderung in der LDH-Aktivität unter DHA konnte nicht beobachtet werden (\leq 10 % LDH-Aktivität, Abb. 25B). Lediglich ein Wert lag knapp über 10 % (Abb. 25B).

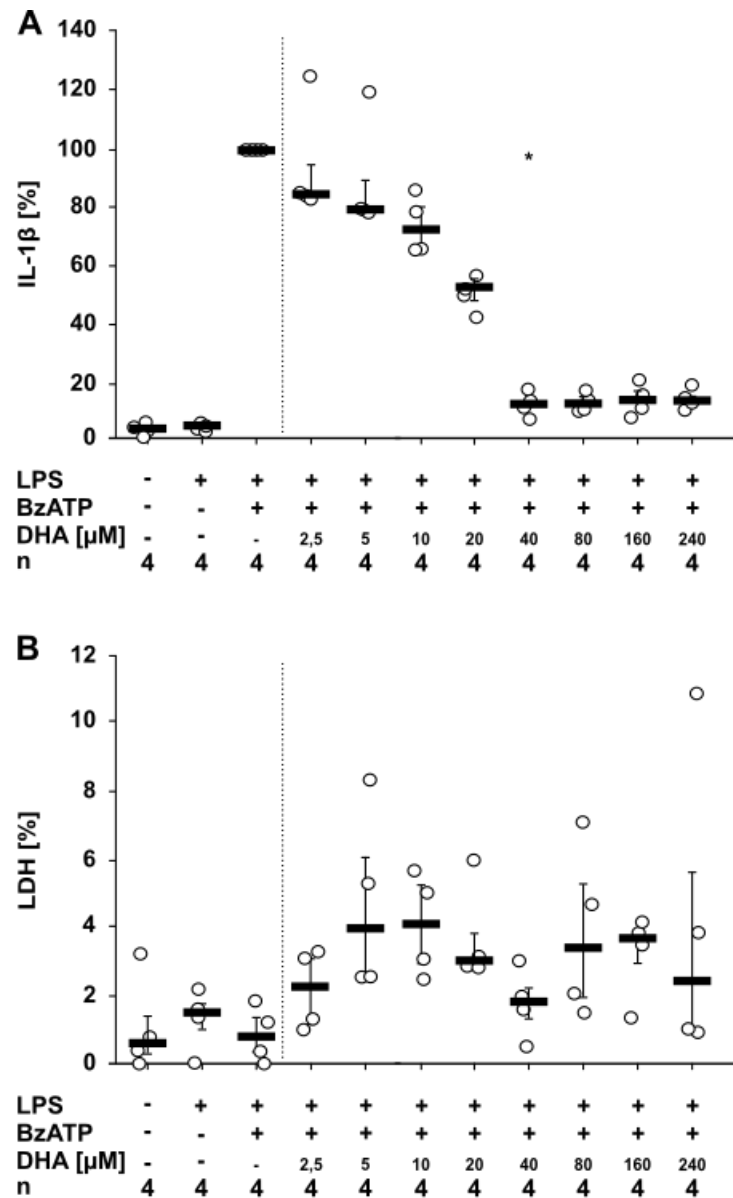


Abbildung 25: Inhibition der Interleukin-1 β (IL-1 β)-Freisetzung aus mit Lipopolysaccharid (LPS) stimulierten und mit BzATP behandelten U937-Zellen durch Docosahexaensäure (DHA) sowie korrespondierende Lactatdehydrogenase (LDH)-Aktivität im Zellkulturüberstand. Die Einzelwerte sind als Punkte dargestellt, die Balken entsprechen den Medianen und die Antennen den Perzentilen 25 und 75 (A, B). In (A) dargestellt ist die IL-1 β -Freisetzung normalisiert zu mit LPS und BzATP behandelten Ansätzen. Die Applikation von 2'(3')-O-(4-Benzoylbenzoyl)adenosin-5'-triphosphat (BzATP, 100 μ M) führt in mit LPS stimulierten U937-Zellen zu einer erhöhten IL-1 β -Ausschüttung. DHA (2,5 – 240 μ M) inhibiert die BzATP-induzierte IL-1 β -Freisetzung dosisabhängig. Korrespondierende Absolutwerte sind in der ergänzenden Abbildung 9 dargestellt. In (B) dargestellt ist die weitgehend unveränderte LDH-Freisetzung unter der Applikation von LPS, BzATP und DHA im Verhältnis zur maximalen Freisetzung aus lysierten Zellen. Kruskal-Wallis-Test gefolgt vom Mann-Whitney-U-Test (*, $p \leq 0,05$ verglichen mit LPS- und BzATP-behandelten Ansätzen).

3.7 Einfluss von nAChR-Antagonisten auf die DHA-induzierte Inhibition der BzATP-vermittelten IL-1 β -Freisetzung aus U937-Zellen

Da gezeigt werden konnte, dass DHA die BzATP-induzierte IL-1 β -Freisetzung aus U937-Zellen inhibiert, sollte als nächstes untersucht werden, ob DHA der durch AAT-induzierte niedermolekulare Faktor-x sein kann, der in U937-Zellen die Inhibition der BzATP-induzierte IL-1 β -Freisetzung vermittelt.

Die AAT-vermittelte Inhibition der BzATP-induzierten IL-1 β -Freisetzung ist abhängig von den nAChR-Untereinheit $\alpha 9$, in Kombination mit $\alpha 7$ oder $\alpha 10$ (Siebers et al. 2018). Um herauszufinden, ob DHA die AAT-induzierte Inhibition der BzATP-vermittelten IL-1 β -Freisetzung vermittelt, wurden nachfolgend die Rezeptorbedürfnisse von DHA untersucht und mit den Rezeptorbedürfnissen des AAT-vermittelten Faktors verglichen.

Hierzu wurde DHA (40 μ M) zusammen mit BzATP (100 μ M) für 30 min auf mit LPS vorstimulierte U937-Zellen gegeben und anschließend die IL-1 β -Konzentration in den Zellüberständen bestimmt. Trat eine Inhibition ein, so wurden die Rezeptorbedürfnisse dieser Inhibition durch den Einsatz von nikotinischen Antagonisten untersucht. Hierzu kamen die nikotinischen Antagonisten α -Btx (1 μ M), [V11L;V16D]ArIB (500 nM) und RgIA4 (200 nM) zum Einsatz. [V11L;V16D]ArIB sollte hierbei spezifisch die Untereinheit $\alpha 7$ nAChR antagonisieren, wobei RgIA4 als spezifischer Antagonist der Untereinheit $\alpha 9$ eingesetzt wurde (Richter et al., 2016; Romero et al., 2017; Whiteaker et al., 2007). Der generelle nikotinische Antagonist α -Btx kam zur Antagonisierung der nAChR-Untereinheiten $\alpha 7$, $\alpha 9$ und/oder $\alpha 10$ zum Einsatz (Fujii et al. 2017a). Dazu wurde die BzATP-Applikation mit dem jeweiligen nikotinischen Antagonisten und DHA kombiniert. Zur Kontrolle erfolgte eine gemeinsame Applikation des Lösungsmittels Methanol und BzATP. Absolutwerte der IL-1 β -Konzentrationen sind in der ergänzenden Abb. 10 im Anhang dargestellt.

Die IL-1 β -Konzentration in Zellkulturüberständen von U937-Zellen, die mit LPS vorstimuliert und mit BzATP für 30 min inkubiert wurden, wurde auf 100 % gesetzt. Die IL-1 β -Freisetzung unter LPS betrug 0 % (n = 4, Abb. 26A). Die Applikation von Methanol veränderte die BzATP-induzierte IL-1 β -Freisetzung nicht (101 % IL-1 β -Freisetzung, n = 4, Abb. 26A). Die Applikation von DHA (40 μ M) hingegen führte in U937-Zellen zu einer signifikanten und vollständigen Inhibition der BzATP-induzierten IL-1 β -Freisetzung (7 % IL-1 β -Freisetzung, p = 0,029, n = 4, Abb. 26A). Der nikotinische Antagonist [V11L;V16D]ArIB war in der Lage, die Inhibition der BzATP-vermittelten IL-1 β -Freisetzung durch DHA aufzuheben (101 % IL-1 β -Freisetzung, n = 4, Abb. 26A). Die IL-1 β -Konzentrationen unter DHA unterschieden sich signifikant zwischen [V11L;V16D]ArIB-behandelten Ansätzen und Ansätzen ohne [V11L;V16D]ArIB (p = 0,029, n = 4, Abb. 26A). Die kombinierte Applikation des nAChR-Antagonisten RgIA4 und DHA resultierte in einer BzATP-vermittelten IL-

1 β -Freisetzung von 92 %, welche den Konzentrationsbereichen unter alleiniger BzATP-Applikation entsprachen. Diese Ansätze unterschieden sich signifikant von DHA behandelten Ansätzen ($p = 0,029$, $n = 4$, Abb. 26A). Auch die Applikation von α -Btx konnte die DHA-vermittelte Inhibition der BzATP-induzierten IL-1 β -Freisetzung fast vollständig aufheben (88 % IL-1 β -Freisetzung, $n = 4$, Abb. 26A). Die LDH-Aktivität im Überstand der Zellen unter der Applikation von Methanol, DHA, [V11L;V16D]ArIB, RgIA4 und α -Btx lag unter 10 % (Abb. 26B).

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die DHA-vermittelte Inhibition der IL-1 β -Freisetzung aus U937-Zellen durch Antagonisierung der nAChR-Untereinheiten $\alpha 7$, $\alpha 9$ und $\alpha 10$ beeinträchtigt wurde. Hierbei scheinen die Antagonisierung der nAChR-Untereinheit $\alpha 9$ in Kombination mit $\alpha 10$, die alleinige Antagonisierung der nAChR-Untereinheit $\alpha 7$ als auch die gemeinsame Antagonisierung der Untereinheiten $\alpha 7$ mit $\alpha 9$ gleichwertige Effekte hervorzurufen. Demnach konnte die Anwesenheit aller drei nAChR-Untereinheiten als obligatorisch erachtet werden.

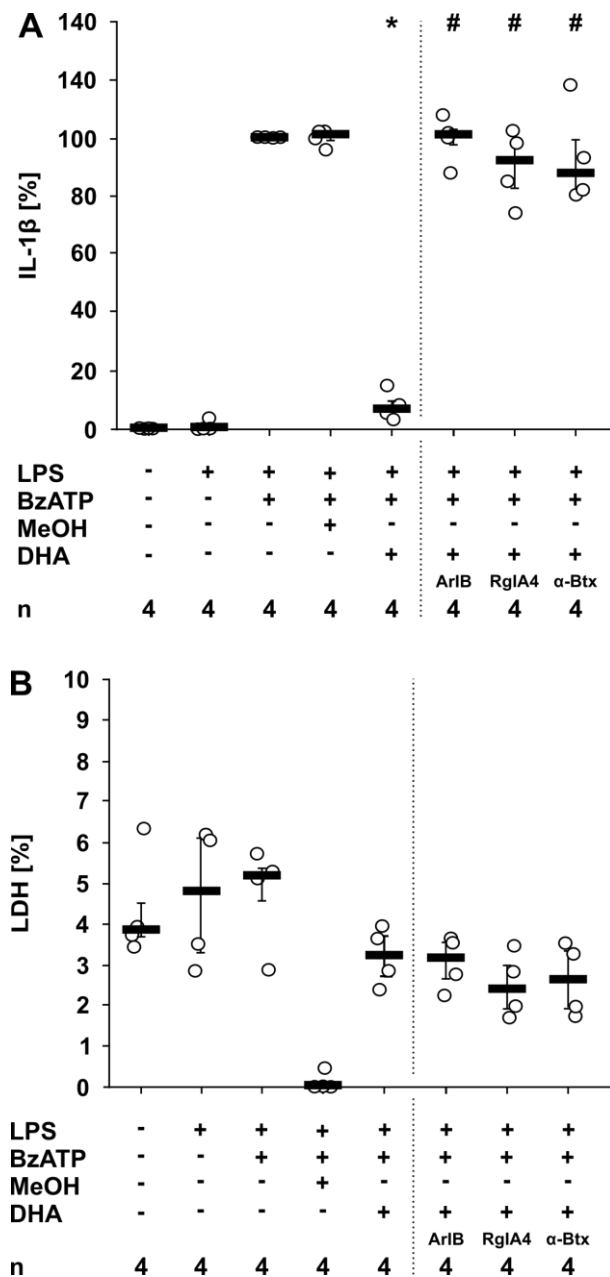


Abbildung 26: Inhibition der Interleukin-1 β (IL-1 β)-Freisetzung aus mit Lipopolysaccharid (LPS) stimulierten und mit BzATP behandelten U937-Zellen durch DHA und dessen Antagonisierung durch [V11L;V16D]ArIB, RgIA4, α -Btx sowie korrespondierende Lactatdehydrogenase (LDH)-Aktivität im Zellkulturüberstand. Die Einzelwerte sind als Punkte dargestellt, die Balken entsprechen den Medianen und die Antennen den Perzentilen 25 und 75 (**A**, **B**). In (**A**) dargestellt ist die IL-1 β -Freisetzung normalisiert zu mit LPS und BzATP behandelten Ansätzen. Die Applikation von 2'(3')-O-(4-Benzoylbenzoyl)adenosin-5'-triphosphat (BzATP, 100 μ M) führt in mit LPS stimulierten U937-Zellen zu einer erhöhten IL-1 β -Ausschüttung. DHA (40 μ M) inhibiert die BzATP-induzierte IL-1 β -Freisetzung vollständig. Die DHA-vermittelte Inhibition der BzATP-induzierten IL-1 β -Freisetzung ist durch [V11L;V16D]ArIB (ArIB, 500 nM), RgIA4 (200 nM) und α -Btx (1 μ M) aufgehoben. Korrespondierende Absolutwerte sind in der ergänzenden Abbildung 10 dargestellt. In (**B**) dargestellt ist die unveränderte LDH-Freisetzung unter der Applikation von LPS, BzATP, [V11L;V16D]ArIB, RgIA4, α -Btx im Verhältnis zur maximalen Freisetzung aus lysierten Zellen. DHA; Docosahexansäure. Kruskal-Wallis-Test gefolgt vom Mann-Whitney-U-Test (*; $p \leq 0,05$ verglichen mit LPS- und BzATP-behandelten Ansätzen, #; $p \leq 0,05$ verglichen mit LPS, BzATP und DHA behandelten Ansätzen).

4 Diskussion

4.1 Die monozytäre IL-1 β -Freisetzung im Kontext einer CPB-Operation

Eine CPB-Operation ist durch mehrere Prozesse gekennzeichnet, die zur Entstehung einer systemischen Entzündung beitragen: Das chirurgische Trauma, einhergehend mit Blutverlust und daraus resultierende sekundäre Gewebsverletzungen, sowie der extrakorporale Kreislauf des CPB, der Blutbestandteile in Kontakt mit artifiziellen Oberflächen bringt. Als Folge kann ein SIRS entstehen, welches das Risiko für den Patienten erhöht, an einem Multiorganversagen zu sterben (Cauwels et al. 2014). Nach einer CPB-Operation kommt es zum systemischen Anstieg des pro-inflammatorischen Zytokins IL-1 β , einem wichtigen Mediator für systemische Entzündungsreaktionen (Warren et al. 2009). Es wird sowohl durch Trauma induziert als auch als Reaktion auf artifizielle Oberflächen und während Gewebsschädigungen durch Ischämie und Reperfusion von aktivierten Monozyten produziert (Warren et al. 2009). Die Tatsache, dass der Hauptanteil der systemischen IL-1 β -Freisetzung durch Monozyten getragen wird (Dinarello 2009), betont die Wichtigkeit dieser Zellen in der Pathogenese eines SIRS nach CPB-Operation.

Die Freisetzung von monozytärem IL-1 β wird klassischerweise durch einen zweistufigen Prozess gesteuert, der durch zwei unabhängige Stimuli induziert werden kann. Der erste Stimulus kann beispielsweise durch die Erkennung eines Gefahrensignals durch den TLR4 erfolgen. Die Aktivierung des TLR4 veranlasst die erhöhte Expression von NALP3-Proteinen und des unreifen Vorläuferproteins pro-IL-1 β (Dinarello et al. 2012; Kawasaki & Kawai 2014). Diese Voraktivierung wird auch als *priming* bezeichnet. Ein zweiter Stimulus induziert die Assemblierung des NALP3-Inflammasomkomplexes und die Reifung von pro-IL-1 β . Diese Initiierung des NALP3-Inflammasoms führt auch zur Freisetzung von biologisch aktivem IL-1 β (Shao et al. 2015). Dieser zweistufige Prozess, gekennzeichnet durch Voraktivierung und Initiierung des NALP3-Inflammasoms, wurde mehrfach in unterschiedlichen Trauma-Modellen gezeigt. In konzeptuellen Beweisexperimenten von Iyer et al. reagierten murine Makrophagen durch Zellverletzungen, die durch Hypoxie, Komplementaktivierung und mechanische Kräfte induziert wurden, mit der Voraktivierung der Zellen und einer Initiierung des NALP3-Inflammasomkomplexes (Iyer et al. 2009). Weiterhin führt die peritoneale Injektion von nekrotischen Zellen in Mäusen zur Initiierung des NALP3-Inflammasoms in Makrophagen (Iyer et al. 2009). Eine experimentelle Peritonitis in der Maus wird daher oft zur Erforschung des NALP3-Inflammasoms *in vivo* verwendet. Mechanischer Stress kann in Nagetieren sowohl zur Voraktivierung als auch zur Initiierung des NALP3-Inflammasoms führen (Starzl et al. 2015; Albalawi et al. 2017). Ähnliche Beobachtungen wurden als Reaktion auf Ischämie und Hypoxie im Gehirn, Herz und in der Niere von Mäusen gemacht (Minutoli et al. 2016).

Stimuli, die entweder zur Voraktivierung oder zur Initiierung des NALP3-Inflammasoms führen, können innerhalb einer CPB-Operation folgendermaßen aussehen: Die Voraktivierung durch Liganden des TLR4, die im Kontext einer CPB-Operation auftreten können, sind entweder Endotoxine wie LPS oder Bestandteile nicht-bakteriellen Ursprungs. Die Konzentration von Endotoxinen ist während einer CPB-Operation merklich erhöht (Rocke et al. 1987), sodass Monozyten mit ihnen in Kontakt kommen (Warren et al. 2009). Auch körpereigene TLR4-Liganden wie HSP werden vermehrt an der Oberfläche von Endothelzellen während einer CPB-Operation exprimiert, was zur Voraktivierung von Monozyten führen kann (Ohashi et al. 2000; Chaudhry et al. 2010). In der vorliegenden Arbeit wurde zur Voraktivierung der monozytären Zellen LPS verwendet. Wie erwartet führte dieses fünfständige *priming* der U937-Zellen zu keinem signifikanten Anstieg der IL-1 β -Freisetzung (Abb. 4). Der zweite Schritt, die Initiierung des NALP3-Inflammasoms, ist durch eine Vielzahl an Stimuli denkbar, die während einer CPB-Operation auftreten können. Hierzu zählen vor allem Stimuli, die durch das chirurgische Trauma und die resultierenden Zellverletzungen freigesetzt werden. Extrazelluläres ATP ist dabei ein klassischer Aktivator des NALP3-Inflammasoms (Shimada et al. 2012; Gombault et al. 2012). Bekannt ist, dass die Freisetzung von intrazellulärem ATP durch initiale und sekundäre Gewebsverletzung während eines chirurgischen Traumas für die Aktivierung des P2X7-Rezeptors und damit für die Initiierung des NALP3-Inflammasoms sorgen kann (Schneider et al. 2006; Adinolfi et al. 2018). Die in der vorliegenden Arbeit untersuchte ATP-induzierte IL-1 β -Freisetzung aus U937-Zellen bestätigt die Initiierung des NALP3-Inflammasoms durch die Aktivierung des P2X7-Rezeptors *in vitro* (Abb. 4). Extrazelluläres ATP als Ligand des P2X7-Rezeptors führt in U937-Zellen vermutlich zur Initiierung des NALP3-Inflammasoms, wodurch eine Reifung des Vorläuferproteins zu IL-1 β erfolgen konnte, welches sich wiederum im Überstand der Zellen finden ließ. Diese Beobachtungen bestätigen vorangegangene Arbeiten (Hecker et al. 2015; Richter et al. 2016; Amati et al. 2017; Backhaus et al. 2017; Hiller et al. 2018; Richter et al. 2018b; Siebers et al. 2018). Diese Arbeiten zeigen auch, dass sich die an U937-Zellen beobachteten Effekte auch in primären Monozyten wie PBMC und CD14⁺-Monozyten verifizieren lassen. Die große Schwankungsbreite der ATP-vermittelten IL-1 β -Freisetzung wurde bereits in vorangegangenen Arbeiten beobachtet. Diese Beobachtung wurde in der vorliegenden Arbeit zum Anlass genommen, normalisierte Werte darzustellen. Die Gründe für die beobachteten Schwankungen sind jedoch unbekannt.

Die Initiierung des NALP3-Inflammasoms kann neben der IL-1 β -Freisetzung auch zum pyroptischen Zelltod der aktivierten Zelle führen (Platnich & Muruve 2019). Klassischerweise ist der pyroptische Zelltod als Abwehrmechanismus von intrazellulär infizierten Makrophagen bekannt (Martinon et al. 2009). Im Gegensatz zum apoptotischen Zelltod, tritt bei der Pyroptose intrazelluläres Material aus der perforierten Zelle aus und fördert damit Entzündungsprozesse im umliegenden Gewebe. Um auszuschließen, dass die IL-1 β -Freisetzung aus U937-Zellen durch vermehrte Pyroptose-induzierte Membranperforation zustande kommt, wurde in jedem experimentellen Ansatz parallel eine LDH-Messung durchgeführt. Hierbei wird die Konzentration der LDH bestimmt, die ausschließlich im

Zellinneren exprimiert ist, jedoch bei Perforation der Zellmembran nach Außen treten kann. Da die LDH-Konzentration im Überstand der U937-Zellen überwiegend weniger als 10% betrug und sich nach Zugabe von BzATP nicht wesentlich änderte, konnte ausgeschlossen werden, dass die Freisetzung von IL-1 β durch unspezifische Zellperforation ausgelöst wurde. Lediglich ein unbehandelter Ansatz zeigte eine erhöhte LDH-Konzentration von 24 % (Abb. 6). Dieser Ansatz zeigte jedoch keine erhöhte IL-1 β -Freisetzung, sodass auf einen Ausschluss des Experiments verzichtet wurde. Weiterhin konnte sichergestellt werden, dass keine der verwendeten Substanzen zytotoxische Effekte hervorgerufen haben. Auch die Transfektion der U937-Zellen wirkte nicht zytotoxisch (Abb. 25). In einigen zellfreien Kontrollansätzen wurde eine höhere LDH-Konzentration gemessen als in Zellkulturüberständen. In diesen Fällen wurde die LDH-Konzentration der Überstände auf 0 % gesetzt (Abb. 11). Das gehäufte Auftreten dieser erhöhten Absorptionswerte in zellfreien Ansätzen korrelierte mit der vorübergehenden Verwendung einer bestimmten FCS-Charge als Mediumszusatz. Dies könnte die erhöhte LDH-Konzentration in zellfreien Ansätzen erklären.

Limitationen dieser Untersuchungen

Selbstverständlich unterliegen die hier vorgenommenen Untersuchungen einigen Limitationen. U937-Zellen wurden zwar bereits im Kontext Trauma-assoziiertes Immunreaktionen verwendet (Battle et al. 1998; Lünemann et al. 2006), können jedoch nicht den physiologischen Zustand eines Monozyten *in vivo* repräsentieren. Die multifaktoriellen Ereignisse einer CPB-Operation sind schwer zu erfassen. Daher repräsentiert die Untersuchung der ATP-induzierten Freisetzung von IL-1 β lediglich einen Teilaspekt Trauma-induzierter Gewebsverletzungen. Während und nach einer CPB-Operation kommt es neben Gewebsverletzungen zu weiteren, potenziell pro-inflammatorischen Vorgängen (Day & Taylor 2005). Die Pumpen- und Oxygenatoren erzeugen veränderte intravaskuläre Drücke und die Zusammensetzung der Blutgase wird künstlich verändert (Millar et al. 2016). Es kommt zu drastischen Veränderungen des Blutvolumens und zur Veränderung von Plasmaproteinen (Esper et al. 2014). Das Blut kommt mit artifiziellen Oberflächen in Kontakt und Endothelien des Gefäßsystems erfahren unnatürliche Scherkräfte (Warren et al. 2009). Das Koagulationssystem wird aktiviert und verändert (Millar et al. 2016). All diese Prozesse sind dazu in der Lage, die körpereigene Homöostase zu stören und zur Entwicklung eines SIRS beizutragen (Day & Taylor 2005). Inwiefern Wechselwirkungen zwischen Trauma-induzierten und CPB-induzierten Prozessen die Pathogenese eines SIRS vorantreiben, ist bisher nur in einer Studie untersucht worden (Prondzinsky et al. 2005). Hierbei konnte festgestellt werden, dass das chirurgische Trauma mehr zur Entwicklung eines SIRS beiträgt als der CPB selbst. Es existieren zudem Mausmodelle zur Imitation einer CPB-Operation (Madrahimov et al. 2018), die zu weiteren Untersuchungen dieser Fragestellung geeignet sein könnten.

4.2 Welche Relevanz hat die AAT-vermittelte Inhibition der monozytären IL-1 β -Freisetzung?

Die Arbeit von Siebers et al. 2018 zeigte deutlich, dass physiologische Konzentrationen von AAT dazu in der Lage sind, die ATP-induzierte IL-1 β -Freisetzung aus monozytären Zellen zu inhibieren. Hierbei wurde der Effekt sowohl an U937-Zellen als auch an primären Monozyten und PBMC verifiziert, was die Relevanz dieses Mechanismus *in vivo* unterstreicht. Die Tatsache, dass Monozyten und AAT im Blutgefäßsystem miteinander in Kontakt kommen, spricht für einen mechanistischen Zusammenhang. Eine kürzlich veröffentlichte Untersuchung einer großen Kohorte gesunder Individuen konnte zudem eine negative Korrelation zwischen AAT- und IL-1 β -Konzentrationen im Blut nachweisen (Ter Horst et al. 2016). Weiterhin scheint es logisch, dass APP als Regulatoren eben der pro-inflammatorischen Mediatoren zum Einsatz kommen, von denen sie selbst induziert werden. Der Anstieg von IL-1 β , IL-6 und TNF α als Reaktion auf eine Gefahrenerkennung zieht die hepatische Sekretion von APP nach sich (Cray et al. 2009). Die monozytäre IL-1 β -Freisetzung induziert in denselben Zellen die Produktion von IL-6, dessen systemischer Konzentrationsanstieg zur hepatischen Sekretion von AAT führt (Tosato & Jones 1990; Janciauskiene et al. 2013). AAT wiederum ist in der Lage, die pro-inflammatorischen Vorgänge zu limitieren und deren Auswirkungen zu modulieren: Zum einen wird durch dessen Anti-Proteasefunktion einem vermehrten, pro-inflammatorisch bedingten Gewebsabbau entgegengewirkt. Als zweite Funktion kommen neben der inhibitorischen Wirkung auf die monozytäre IL-1 β -Freisetzung zahlreiche, weitere Eigenschaften hinzu, die allesamt die pro-inflammatorische Reaktion auf ein Gefahrensignal eindämmen (Janciauskiene et al. 2018). Diese Beobachtungen machen einen negativen *feedback loop* denkbar, der ein Überschießen der durch IL-1 β - und IL-6-vermittelten Immunreaktion verhindern soll. Dass die anti-inflammatorischen Eigenschaften von AAT zum Erhalt des körpereigenen inflammatorischen Gleichgewichts beitragen, ist mehrfach beschrieben (Janciauskiene et al. 2013). Demnach ist eine solche Rolle auch im Kontext der systemischen IL-1 β -Freisetzung denkbar.

Gleichzeitig ist fraglich, inwiefern und in welchen Konzentrationen AAT in Kontakt mit Blutmonozyten kommt. Die physiologische Plasmakonzentration von AAT liegt zwischen 1 und 1,5 mg/ml (Janciauskiene et al. 2011). Innerhalb des Blutgefäßsystems können sich Reaktionsräume bilden, die unterschiedliche Konzentrationen an Blutbestandteilen aufweisen (Pries 2019). In Gefäßen mit geringem Durchmesser kommt es zur Ausbildung einer Axialströmung und einer zellarmen Randströmung (Pries 2019). Gefäßwandnahe Scherkräfte sorgen für die Axialmigration von Erythrozyten und weiteren zellulären Bestandteilen des Blutes, sodass ein umspülender Plasmastrom entsteht. Denkbar ist, dass sich eine Akkumulation von AAT in der zellarmen Randströmung ergibt und patrouillierende Monozyten an der Gefäßwand einer deutlich höheren AAT-Konzentration ausgesetzt sind. Hierbei ist jedoch auch zu beachten, dass AAT von Endothelien endozytiert werden kann, was die AAT-Konzentration in Randströmungen beeinflussen würde (Sohrab et al. 2009). Monozyten, die sich im Axialstrom befinden, könnten dagegen geringeren AAT-Konzentrationen

ausgesetzt sein. Demnach ist die Frage nach wirksamen AAT-Konzentrationen zur Inhibition der monozytären IL-1 β -Freisetzung *in vivo* schwer zu beantworten.

Neben der Frage nach relevanten AAT-Konzentrationen zur Wirkung der anti-inflammatorischen Effekte, besteht auch die Frage nach der molekularen Erscheinungsform des Proteins. AAT kann verschiedene Modifikationen unterlaufen, die unterschiedliche Auswirkungen auf die Aktivität des Proteins haben. Zunächst führt die Komplexierung mit einer Protease zur Inaktivierung der Anti-Proteaseaktivität, was wiederum selbst zu pro-inflammatorischen Effekten führt (Janciauskiene et al. 2013). Während der Komplexierung kommt es außerdem zur Abspaltung des C-36-Peptidfragments, welchem wiederum pro-inflammatorische Eigenschaften zugesprochen werden (Subramaniam et al. 2006). Weiterhin ist die Oxidation eine Modifikation, welche, wenn sie einen Methioninrest in der RCL des Proteins betrifft, zur Inaktivierung der Anti-Proteasefunktion führt und das Protein anfälliger für eine Polymerisierung macht (Li et al. 2009). Polymerisiertes AAT selbst scheint ebenfalls veränderte Aktivität aufzuweisen. Es wird von pro-inflammatorischen Effekten und einem Verlust der Anti-Proteaseaktivität gesprochen (Aldonyte et al. 2004). Auch die S-Nitrosylierung von AAT wird als Prozess beschrieben, der pro-inflammatorische Auswirkungen hat (Kaner et al. 2019). Demnach ist denkbar, dass alle Modifikationen von AAT zum Verlust der inhibitorischen Aktivität auf die ATP-induzierte IL-1 β -Freisetzung führen können, was letztendlich die Progression einer systemischen Entzündungsreaktion bedeuten kann. Um zu verstehen, welche Relevanz die Inhibition der ATP-induzierten IL-1 β -Freisetzung durch AAT hat, bedarf es weiterer Untersuchungen, die diesen Fragestellungen nachgehen.

4.3 Die Aktivität von AAT aus gesunden Probanden

Die inhibitorische Aktivität von AAT aus gesunden Probanden auf die ATP-induzierte IL-1 β -Freisetzung

In vorangegangenen Arbeiten zur Inhibition der ATP-vermittelten IL-1 β -Freisetzung konnte gezeigt werden, dass das AAT-Präparat Prolastin[®] eine deutliche Aktivität besitzt (IC₅₀ = 0,2 mg/ml, (Siebers et al. 2018)). Um herauszufinden, ob endogenes AAT aus gesunden Probanden ähnliche Aktivität aufweist, wurde zunächst eine Affinitätschromatografie zur Aufreinigung von AAT aus Plasma vorgenommen. Mit dieser Methode ließ sich AAT in hoher Reinheit isolieren (Abb. 5). Die inhibitorische Aktivität des AATs aus gesunden Probanden auf die ATP-induzierte IL-1 β -Freisetzung Monozyten liegt mit einem IC₅₀ Wert von 0,18 mg/ml weit unter physiologischen Plasmakonzentrationen und ist der von Prolastin[®] ähnlich (Abb. 21, (Siebers et al. 2018)). Demnach kann festgehalten werden, dass die IC₅₀ von AAT aus gesunden Probanden der IC₅₀ von Prolastin[®] entspricht. Vergleicht man jedoch die Steigungen der Dosis-Wirkbeziehung beider Präparate miteinander, so zeigt sich, dass die Dosis-Wirkungskurve von Prolastin[®] deutlich steiler abfällt, als die des AATs aus gesunden Probanden (Tab. 15). Die Interpretation dieser Steigungsunterschiede gestaltet sich schwierig. Daher sollen zunächst maßgebliche Unterschiede zwischen AAT aus

gesunden Probanden und Prolastin[®] in Betracht gezogen werden. Aus der Literatur ist bekannt, dass Prolastin[®] unter allen AAT-Präparaten den höchsten Anteil an AAT-Polymeren besitzt (Boerema et al. 2017). Ginge man davon aus, dass Polymerisierungsgrade von AAT für unterschiedliche Dynamiken in der Dosis-Wirkbeziehung verantwortlich sind, so könnte daraus geschlossen werden, dass AAT aus gesunden Spendern kaum Polymere aufweist und sich aus diesem Grund die starken Steigungsunterschiede ergeben. Verfolgt man diesen Gedanken weiter, so gelangt man zu der Hypothese, dass der Polymerisierungsgrad die Bindung an den- und/oder die Aktivität des Rezeptors beeinflusst, der die AAT-induzierte Inhibition der IL-1 β -Freisetzung in Monozyten vermittelt. Möglicherweise interagieren Polymere kooperativ mit mehreren CD36-Molekülen an der Zelloberfläche, was die Form der Dosis-Wirkungskurve erklären könnte. Zur Überprüfung dieser Überlegung bietet sich eine native Gelelektrophorese unter nicht-denaturierenden Bedingungen an, um Unterschiede im Polymerisierungsgrad festzustellen.

Da die IC₅₀ von nativem AAT weit unter der physiologischen Plasmakonzentration (1 – 1,5 mg/ml) liegt, kann vermutet werden, dass das endogene AAT in gesunden Personen ausreicht, um die ATP-induzierte IL-1 β -Freisetzung aus zirkulierenden Monozyten vollständig zu inhibieren. Auch die Auswertung der AAT-Menge nach Affinitätschromatografie deutet darauf hin, dass die hier untersuchten Probanden AAT-Konzentrationen im physiologischen Bereich aufwiesen (Abb. 5B, Abb. 9B), diese jedoch tendenziell etwas geringer sind als die in der Literatur beschriebenen (Bornhorst et al. 2013). Diese leichte Abweichung von den erwarteten Werten ist vermutlich auf Verluste bei der Affinitätschromatografie und kleine Fehler bei der Proteingehaltsbestimmung zurückzuführen. Fraglich ist jedoch, wie es bei diesen AAT-Konzentrationen *in vivo* überhaupt zu einem ATP-induzierten Anstieg der IL-1 β -Konzentration im Blut kommen kann. Eine Überlegung könnte sein, dass ATP-unabhängige, alternative Inflammasomaktivierungen in Monozyten vorherrschend sind. Weiterhin gibt es zahlreiche gegenregulatorische Mechanismen, die die Sensitivität von nAChR und damit die Intensität der AAT-vermittelten Inhibition der Inflammasomaktivierung beeinflussen. Zu nennen sind hierbei *secreted Ly-6/uPAR related proteins*, die ins Blut sezerniert werden und besonders das metabotrope *signaling* nAChR modulieren (Lyukmanova et al. 2016). Denkbar ist auch, dass AAT während einer systemischen Entzündungsreaktion Modifikationen erfährt, die es in seiner Inhibitionsfähigkeit einschränkt. Diese Überlegungen führen zu der Hypothese, dass AAT in gesunden Probanden eine protektive, anti-inflammatorische Rolle hat, die eventuell im Falle einer systemischen Entzündungsreaktion außer Kraft gesetzt wird.

Die Anti-Proteasefunktion von AAT aus gesunden Probanden

Die Komplexfähigkeit von AAT aus gesunden Probanden mit NE ist nicht eingeschränkt, was auf eine intakte Anti-Proteaseaktivität hindeutet (Abb. 7). Die Untersuchungen der Komplexfähigkeit mit NE stellt jedoch nicht die einzige Möglichkeit dar, die Anti-Proteasefunktion von AAT zu untersuchen. Um der Fragestellung weiter nachzugehen, könnten

kolorimetrische Tests zur Elastaseaktivität angestellt werden. Da aus der Literatur bekannt ist, dass vor allem die Oxidation von AAT zur Inaktivierung der Anti-Proteasefunktion führt (Taggart et al. 2000), kann hieraus indirekt geschlossen werden, dass AAT in der Zirkulation von gesunden Probanden in unoxidiertem Zustand vorliegt. Jedoch muss bei dieser Schlussfolgerung in Betracht gezogen werden, dass die Aufreinigungsprozedur den Oxidationszustand des Proteins verfälschen könnte.

Schlussfolgernd kann gesagt werden, dass AAT aus gesunden Probanden die ATP-induzierte IL-1 β -Freisetzung genauso gut inhibiert, wie das bereits untersuchte AAT-Präparat Prolastin[®] (Siebers et al. 2018). Die Ergebnisse lassen jedoch vermuten, dass es Unterschiede zwischen den Präparaten gibt, die sich durch Polymerisierungsgrade erklären lassen könnten. Außerdem ist AAT aus gesunden Probanden erwartungsgemäß zur Inhibition der NE fähig.

4.4 Die Aktivität von AAT während einer CPB-Operation

Die AAT-Konzentration im Verlauf einer CPB-Operation

Um herauszufinden, ob AAT während einer CPB-Operation einen Funktionsverlust erfährt, wurde AAT zu vier Zeitpunkten der Operation über eine Affinitätssäule aus dem Plasma der Patienten isoliert. Vergleichbar mit der Aufreinigung aus gesunden Probanden, ließ sich hierbei AAT mit hoher Reinheit gewinnen (Abb. 9A). Die AAT-Menge der Affinitätsaufreinigung unterschied sich nicht zwischen den untersuchten Zeitpunkten der CPB-Operation. Aus diesem Grund wurde zusätzlich eine Konzentrationsbestimmung im Plasma mittels ELISA durchgeführt. Hierbei ergaben sich zwar keine signifikanten Veränderungen, es war jedoch tendenziell eine leichte Abnahme erkennbar (Abb. 8). Erwartungsgemäß sollte die AAT-Konzentration im Verlauf der Operation abnehmen, da sich das Blutvolumen durch die Verwendung von *priming solutions* im extrakorporalen Kreislauf erhöht (Esper et al. 2014). Das Volumen der *priming solution* entspricht etwa 30 % des gesamten Blutvolumens und resultiert in einer Blutverdünnung (Esper et al. 2014), die sich bereits nach 15 Minuten einstellt und durch einen Konzentrationsabfall des AATs kennzeichnen würde. Es ist sehr unwahrscheinlich, dass sich in dieser kurzen Zeit eine Kompensation durch hepatische Sekretion eingestellt hat, die den ausbleibenden Konzentrationsabfall erklären könnte. Auffällig war zudem, dass alle im ELISA gemessenen AAT-Konzentrationen über der physiologischen Plasmakonzentration lagen. Diese hohen Konzentrationen sind vermutlich durch technische Probleme zu erklären, ähnlich wie die nicht bestätigte Konzentrationsabnahme. Die Bestimmung der AAT-Plasmakonzentrationen wird diagnostisch durch Nephelometrie vorgenommen. Leider konnte aufgrund der Limitation der Probenvolumina in dieser Arbeit keine nephelometrischen Konzentrationsbestimmungen vorgenommen werden. Dadurch wird die Vergleichbarkeit mit anderen Untersuchungen erschwert. Interessanterweise kamen vorangegangene Untersuchungen zu AAT-Konzentrationen im Kontext einer CPB-Operation zu widersprüchlichen Ergebnissen. Einige Arbeiten berichteten ebenfalls von ausbleibenden Veränderungen in der AAT-Plasmakonzentration (Claremont & Branthwaite 1980; Siminelakis et al. 1996), andere Untersuchungen wiederum konnten eine drastische Abnahme

feststellen (Pickering et al. 1983; Jönsson 1996; Buyukates et al. 2008). Diese widersprüchlichen Beobachtungen lassen sich möglicherweise durch Variationen in der Operationstechnik, perioperative Medikationen und den Techniken zur AAT-Quantifizierung erklären.

Die inhibitorische Aktivität von AAT auf die ATP-induzierte IL-1 β -Freisetzung im Verlauf einer CPB-Operation

Wie im vorangegangenen Abschnitt bereits diskutiert, ist aufgereinigtes AAT aus gesunden Probanden dazu in der Lage, die ATP-induzierte IL-1 β -Freisetzung aus monozytären Zellen zu inhibieren. Ob diese inhibitorische Funktion während einer CPB-Operation beeinträchtigt ist, sollte durch die Gabe von aufgereinigtem AAT aus CPB-Patienten auf mit LPS-stimulierte und ATP-behandelte U937-Zellen aufgeklärt werden. Hierbei stellte sich heraus, dass das aus CPB-Patienten aufgereinigte AAT zu jedem Zeitpunkt der Operation in der Lage war, die ATP-vermittelte IL-1 β -Freisetzung aus U937-Zellen dosisabhängig zu inhibieren (Abb. 10 und 11). Die IC₅₀ ist hierbei nach der Operation signifikant größer als davor (Abb. 12, Tab. 14). Daraus kann geschlossen werden, dass sich die anti-inflammatorische Funktion von AAT während einer CPB-Operation verändert. Da sich jedoch die Veränderungen in der IC₅₀ von AAT in einem Bereich weit unter den Konzentrationen im Plasma befinden, ist die physiologische Bedeutung dieser Zunahme fraglich (Agné et al. 2020). Interessanterweise verändern sich die Steigungen der Dosis-Wirkbeziehung von AAT aus CPB-Patienten im Verlauf der Operation (Abb. 12). Geht man erneut davon aus, dass die Steigung der Dosis-Wirkbeziehung eine Aussage über den Polymersierungsgrad erlaubt, wäre demnach zu schlussfolgern, dass AAT im Laufe der Operation vermehrt polymerisiert. In der Tat lassen sich vermehrt Polymere von AAT im pro-inflammatorischen Kontext finden (Mulgrew et al. 2004; Gross et al. 2009). Zur Überprüfung des Polymerisationsgrades bietet sich auch in diesem Fall eine native Gelelektrophorese unter nicht-denaturierenden Bedingungen an. Vorläufige Untersuchungen dazu wurden im Labor Molekulare Pneumologie der Medizinischen Hochschule Hannover durchgeführt und ergaben keinerlei Veränderungen im Polymerisationsgrad, wenn man AAT vor und nach der CPB-Operation vergleicht (Ergebnisse nicht gezeigt). Ebenfalls bekannt ist, dass besonders oxidiertes AAT zur Polymerisierung neigt, daher könnte auch eine Zunahme des Oxidationsgrades zu erwarten sein. Einen Hinweis auf den Oxidationsgrad könnten die Ergebnisse der Komplexierungsexperimente mit NE liefern (Abb. 14): Hierbei ergaben sich im Verlauf der Operation keine Unterschiede in der Komplexierungsfähigkeit, die durch Oxidation verloren gegangen wäre.

Die Anti-Proteasefunktion von AAT im Verlauf einer CPB-Operation

Die Untersuchungen zur Anti-Proteasefunktion von Patienten-AAT ergaben widersprüchliche Ergebnisse. In der Anti-NE-Aktivität des Plasmas von CPB-Patienten, welche kolorimetrisch bestimmt wurde, zeigte sich eine Abnahme von rund 30 % (Abb. 13). Interessanterweise entspricht diese Inhibition in etwa die der erwarteten Blutverdünnung zum Anfang der Operation (Esper et al. 2014). Jedoch muss hier von der gesamten inhibitorischen Aktivität des Plasmas ausgegangen werden,

die neben der Inhibition durch AAT auch durch andere Anti-Proteasen getragen wird. So ist beispielsweise auch α 1-Makroglobulin in der Lage, NE zu inhibieren (Groutas et al. 2011). Eine AAT-spezifische Inhibition von Proteasen wurde durch die Visualisierung und Quantifizierung von Komplexen aus AAT und NE sowie PR3 vorgenommen. Hierzu wurden unterschiedliche Vorgehensweisen in zwei Laboratorien vorgenommen: Die Komplexe aus aufgereinigtem AAT und NE wurden in der Sektion Experimentelle Chirurgie in Gießen durch polyklonale Antikörper aus der Ziege mittels *Western-Blot* visualisiert. Die Visualisierung von Komplexen aus dem gesamten Plasma und NE sowie PR3 erfolgte im Labor Molekulare Pneumologie an der Medizinischen Hochschule Hannover durch polyklonale Antikörper eines anderen Herstellers. Beide Untersuchungen bestätigen sich in dem Ergebnis, dass die Anti-NE-Aktivität von AAT während der Operation erhalten bleibt (Abb. 15 und 16). Andere Untersuchungen konnten im Gegensatz zu den aktuellen Ergebnissen eine deutliche postoperative Zunahme an Komplexen zwischen AAT und NE feststellen (Borowiec et al. 1997; Butler et al. 1993; Finn et al. 1996). Dieser Anstieg in AAT/NE-Komplexen wird überwiegend durch eine erhöhte Freisetzung von NE in die Zirkulation erklärt (Boeken et al. 2002; Yusa et al. 1995). Weiterhin wird berichtet, dass periphere Blutmonozyten im inflammatorischen Milieu vermehrt AAT produzieren, welches wiederum direkt mit Proteasen komplexiert, die ebenfalls von diesen Zellen freigesetzt werden (Knoell et al. 1998). Die AAT-Sekretion von Phagozyten macht zwar im Gegensatz zur hepatischen Sekretion nur einen geringen Teil aus (Janciauskiene et al. 2013), geht man aber von einer massiven Aktivierung dieser Zellen im Kontext einer CPB-Operation aus, so könnte dieser Aspekt zum Anstieg von AAT/NE-Komplexen in der Zirkulation beitragen. Im Gegensatz zur unveränderten Komplexierungsfähigkeit mit NE scheint die Komplexierungsfähigkeit von AAT mit PR3 leicht zuzunehmen (Abb. 16). Ob diese leichte Tendenz von biomedizinischer Relevanz ist, bleibt fraglich. Sie deutet jedoch auf Veränderungen während einer CPB-Operation hin.

Zusammenfassend kann vermutet werden, dass die beobachtete Abnahme der Anti-NE-Aktivität im Patientenplasma nicht durch eine Dysfunktionalität in der Anti-Proteasefunktion von AAT zustande kommt, sondern vielmehr eine Folge der Blutverdünnung darstellt. Die funktionelle Veränderung anderer Proteasen im Kontext einer CPB-Operation könnte dennoch von klinischer Relevanz sein und bedarf weiterer Untersuchungen.

Limitationen dieser Untersuchungen

Die vorliegenden Untersuchungen zur Aktivität von AAT während einer CPB-Operation unterliegen weiteren Limitationen, die im Folgenden diskutiert werden sollen. Zunächst ist die geringe Patientenzahl zu nennen, die letztendlich nur die Bildung von Hypothesen erlaubt. Weiterhin wurden unterschiedliche Patientengruppen für unterschiedliche, funktionelle Auswertungen verwendet, was einen direkten Vergleich der Ergebnisse ausschließt. Obwohl AAT ein breites Spektrum an anti-inflammatorischen Effekten auslösen kann (Ehlers 2014), widmete sich diese Arbeit lediglich der Modulation der monozytären, ATP-induzierten IL-1 β -Freisetzung, deren Wichtigkeit im Kontext eines

SIRS jedoch von großer Bedeutung sein könnte. In diesem Zusammenhang ist es wichtig, die unterschiedlichen Phasen der CPB-Operation zu erwähnen, die die potenzielle Pathogenese des SIRS bedingen. So wird in der frühen, perioperativen Phase der Operation vorrangig die Exposition mit artifiziellen Oberflächen und das chirurgische Trauma ausschlaggebend für eine systemisch erhöhte IL-1 β -Freisetzung sein, zu späteren Zeitpunkten nach der Operation kommen der Ischämie-/Reperfusionsschaden sowie eine eventuelle Bakteriämie und/oder Endotoxämie als starke proinflammatorische Trigger hinzu (Warren et al. 2009; Bortolotti et al. 2018). In der vorliegenden Arbeit wurden lediglich die frühen, peri- und postoperativen Zeitpunkte untersucht, die sich im Zuge inflammatorischen Antwort vermutlich von späteren postoperativen Untersuchungen unterscheiden. Ausserdem bleibt fraglich, ob die beobachteten Effekte auf das chirurgische Trauma oder die Exposition mit artifiziellen Oberflächen zurückzuführen sind. Weiterhin entwickelte keiner der hier untersuchten Patienten postoperativ ein SIRS oder Sepsis, was die Aussagekraft der Untersuchungen deutlich abschwächt. Demnach sind die hier angestellten Untersuchungen lediglich als Pilotstudie anzusehen. Um der Fragestellung gerecht zu werden, sollten zukünftig Untersuchungen mit einer deutlich größeren Patientenkohorte durchgeführt werden, die postoperativ ein SIRS entwickelt. Weiterhin sollten spätere postoperative Zeitpunkte untersucht werden, um die Auswirkungen eines Ischämie und Reperfusionsschadens auf die Aktivität des endogenen AATs beurteilen zu können.

Schlussfolgernd kann gesagt werden, dass sich die inhibitorische Aktivität von AAT auf die monozytäre, ATP-induzierte IL-1 β -Freisetzung durch eine CPB-Operation leicht verringert. Die AAT-spezifische Anti-Proteaseaktivität bleibt in diesem Kontext unverändert, jedoch wurde eine leichte Abnahme der gesamten Anti-Proteaseaktivität beobachtet. Um die Frage zu beantworten, ob sich eine AAT-Augmentation im Kontext einer CPB-Operation protektiv auf postoperative Entzündungsprozesse auswirkt, müssen weitere Untersuchungen *in vivo* vorgenommen werden. Für eine AAT-Augmentation von CPB-Patienten kämen in Deutschland prinzipiell zwei Präparate in Frage (Prolastin[®] und Respreeza[®]), deren inhibitorische Aktivität auf die monozytäre ATP-induzierte IL-1 β -Freisetzung in dieser Arbeit untersucht wurde. Diese Ergebnisse werden im nächsten Abschnitt diskutiert.

4.5 Die Aktivität der AAT-Präparate Prolastin[®] und Respreeza[®]

Die inhibitorische Aktivität von Prolastin[®] und Respreeza[®] auf die ATP-induzierte IL-1 β -Freisetzung

Der Einsatz von Prolastin[®] und Respreeza[®] im Kontext der ATP-induzierten Freisetzung von IL-1 β aus U937-Zellen zeigte einen deutlichen Unterschied in der Inhibitionskapazität beider Präparate (Abb. 17). Respreeza[®] inhibiert hierbei deutlich schlechter als Prolastin[®]. Nach Boerema et al. unterscheiden sich Prolastin[®] und Respreeza[®] nicht maßgeblich in ihrer Anti-Proteaseaktivität, was ein Hinweis auf eine funktionelle Entkopplung der immunologischen und der anti-Proteasfunktion sein kann (Boerema et al. 2017). Unterschiede zwischen den Präparaten könnten durch die

Aufreinigungsprozedur zustande kommen. Bei der Aufreinigung von AAT aus humanem Plasma erfolgen mehrere, aufeinanderfolgende Präzipitations- und Chromatografieschritte. Die Aufreinigungsprozedur von Respreeza[®] enthält einen zusätzlichen Chromatografieschritt durch eine hydrophobe Matrix, der bei der Aufreinigung von Prolastin[®] nicht unternommen wird (Boerema et al. 2017). Dieser Unterschied ist vor allem dafür verantwortlich, dass Respreeza[®] einen geringeren Anteil an Unreinheiten aufweist (Boerema et al. 2017). Demnach ist denkbar, dass die inhibitorische Aktivität von Prolastin[®] auf Verunreinigungen im Präparat zurückzuführen ist.

Denkbare Unreinheiten, die sich durch eine hydrophobe Interaktionschromatografie beseitigen lassen, sind z.B. aus dem Plasma stammende Fettsäuren. Aus diesem Grund wurden im Rahmen dieser Arbeit Untersuchungen unternommen, die die inhibitorische Aktivität von Respreeza[®] in Kombination mit Fettsäuren untersuchen sollten. Ähnliche Untersuchungen wurden bereits von anderen Arbeitsgruppen vorgenommen, die die Kombination von Respreeza[®] und Fettsäuren wie Linolsäure und Ölsäure auf die Inhibition der IL-1 β -Freisetzung aus Neutrophilen untersuchten. Hier wurde ein deutlicher Unterschied zwischen Fettsäure-freiem Respreeza[®] und mit Fettsäuren versetztem Respreeza[®] festgestellt (Aggarwal et al. 2016). Eine Aktivierung der inhibitorischen Aktivität von Respreeza[®] durch eine Inkubation mit Fettsäuren ließ sich in vorläufigen Experimenten jedoch nicht beobachten (Ergebnisse nicht gezeigt). Jedoch zeigen langkettige Fettsäuren wie DHA selbst eine inhibitorische Aktivität auf die ATP-induzierte IL-1 β -Freisetzung (Abb. 26), was die Beteiligung von fettsäurehaltigen Unreinheiten am inhibitorischen Effekt von Prolastin[®] nicht vollends ausschließt.

Ein weiterer Unterschied in der Aufreinigungsprozedur von Prolastin[®] und Respreeza[®] besteht in der Durchführung eines Reduktionsschritts, der während der Aufreinigung von Respreeza[®] vorgenommen wird (Zemaira US Patent 8,722,624 CSL Behring 2014, (Bertolini et al. 2013). Demnach könnte die Reduktion von Respreeza[®] für dessen verminderte inhibitorische Aktivität verantwortlich sein. Eine Oxidation von Respreeza[®] sollte demnach die inhibitorische Aktivität auf die ATP-induzierte IL-1 β -Freisetzung aus U937-Zellen verstärken. Wurde Respreeza[®] mit oxidierendem NCS vorbehandelt, konnte tatsächlich eine dosisabhängige Inhibition der IL-1 β Freisetzung aus U937-Zellen beobachtet werden ($IC_{50} = 0,04$ mg/ml, Abb. 21). Die IC_{50} von oxidiertem Respreeza[®] ist demnach sogar niedriger als die IC_{50} von Prolastin[®] ($IC_{50} = 0,21$ mg/ml, (Siebers et al. 2018). Die Oxidation von Prolastin[®] durch NCS scheint dessen inhibitorische Aktivität im Vergleich zu nativem Prolastin[®] ebenfalls tendenziell zu erhöhen ($IC_{50} = 0,09$ mg/ml, Abb. 21, Tab. 15). Generell kann daraus geschlossen werden, dass AAT einen gewissen Oxidationsgrad benötigt, um die ATP-induzierte IL-1 β -Freisetzung aus U937-Zellen zu inhibieren. Fraglich hierbei bleibt jedoch, welche Aminosäuren eine Oxidation erfahren und welche Funktionen diese haben. Bekannt ist, dass vor Allem Cystein- sowie Methioninreste oxidiert werden können. Cysteinreste verlieren durch die Oxidation ihre Fähigkeit zur Ausbildung von Disulfidbrücken (Griffiths & Cooney 2002). AAT besitzt einen Cysteinrest in der Position 232 (Cys232), der jedoch nicht an der Ausbildung einer Disulfidbrücke beteiligt zu sein scheint (Griffiths & Cooney 2002). Obwohl Cys232 eine hohe Reaktivität aufweist, bleibt seine

Funktion innerhalb des Proteins bisher unbekannt. Eine Arbeit aus dem Jahr 2019 untersucht eine weitere post-translationale Modifikation dieses Aminosäurerestes, die S-Nitrosylierung (Kaner et al. 2019). Hierbei wurden vor allem anti-bakterielle und pro-inflammatorische Effekte durch nitrosyliertes AAT beobachtet. Modifikationen an Methioninresten von AAT sind durchaus besser untersucht. AAT besitzt neun Methioninreste, von welchen zwei zur Funktionalität der RCL beitragen (Met358 und Met351). Aus diesem Grund wird auch die Oxidation dieser Methioninreste mit der Inaktivierung der Anti-Proteaseaktivität in Verbindung gebracht (Taggart et al. 2000). Somit kann durch die vorliegenden Ergebnisse geschlossen werden, dass die Inhibition der ATP-induzierten IL-1 β -Freisetzung aus U937-Zellen durch oxidiertes Respreeza[®] unabhängig von dessen Anti-Proteasefunktion verläuft.

Die Entkopplung der Anti-Protease- und der anti-inflammatorischen Aktivität von AAT

Um herauszufinden, ob die inhibitorische Aktivität von AAT auf die ATP-induzierte IL-1 β -Freisetzung aus U937-Zellen unabhängig von dessen Anti-Proteaseaktivität verläuft, wurde im Zuge dieser Arbeit inhibitorisch aktives (oxidiertes Respreeza[®]) sowie inhibitorisch inaktives Respreeza[®] mit NE komplexiert. Sobald inhibitorisch inaktives Respreeza[®] eine Vorbehandlung mit NCS erfuhr, konnten keine Komplexe zwischen Respreeza[®] und NE nachgewiesen werden (Abb. 22), sodass von einer fehlenden Anti-Proteaseaktivität auszugehen ist. Inhibitorisch inaktives Respreeza[®] hingegen war in der Lage, Komplexe mit NE zu bilden, was für eine intakte Anti-Proteaseaktivität spricht (Abb. 22). Demnach konnte gezeigt werden, dass die inhibitorische Aktivität von AAT auf die ATP-induzierte IL-1 β -Freisetzung nicht von einer intakten Anti-Proteaseaktivität abhängt. Diese Beobachtung stimmt mit Untersuchungen überein, die ebenfalls eine Entkopplung der anti-inflammatorischen- und der Anti-Proteasefunktion von AAT postulieren (Churg et al. 2001; Aldonyte et al. 2004; Janciauskiene et al. 2004; Subramaniam et al. 2006; Jonigk et al. 2013a). Zu klären bleibt, ob Komplexe aus AAT und NE in der Lage sind, die ATP-induzierte IL-1 β -Freisetzung aus U937-Zellen zu inhibieren.

Zur physiologischen Bedeutung dieser funktionellen Entkopplung lassen sich folgende Vermutungen anstellen: Zunächst ist festzuhalten, dass sich die Oxidation positiv auf die Inhibition der ATP-induzierten IL-1 β -Freisetzung auswirkt. Die Oxidation von AAT hat demnach in diesem Kontext einen anti-inflammatorischen Effekt. Interessanterweise gibt es einige Arbeiten, die pro-inflammatorische Effekte beobachten, wenn AAT oxidiert wird (Padrines et al. 1989; Moraga & Janciauskiene 2000; Li et al. 2009). Es wird jedoch vermutet, dass diese beobachteten Effekte durch den Verlust der Anti-Proteasefunktion verursacht werden. Diese Annahme erhärtet sich mit der Arbeit von Jonigk et al. 2013, in der anti-inflammatorische Effekte unabhängig von der Anti-Proteasefunktion verlaufen: Hier ist rekombinantes AAT ohne Anti-Proteasefunktion in der Lage, anti-inflammatorische Effekte hervorzurufen und dabei viel potenter zu sein als natives AAT (Jonigk et al. 2013a). Die

Oxidation des Proteins spielt hierbei keine Rolle. Demnach ist denkbar, dass weniger die Oxidation und mehr die Inaktivierung der Anti-Proteasefunktion anti-inflammatorische Eigenschaften verstärkt.

Gleichzeitig muss eine funktionelle Entkopplung nicht bedeuten, dass AAT entweder anti-inflammatorisch oder Proteasen komplexierend wirkt. Es ist denkbar, dass die Oxidation von AAT nicht zwangsläufig in einer Inaktivierung der Anti-Proteasefunktion resultieren muss. Geht man von mehreren oxidierbaren Aminosäureresten im Protein aus, ergibt sich folgende Überlegung: Oxidierende Bedingungen modifizieren zunächst Aminosäurereste, die strukturell nicht an der RCL des Proteins beteiligt sind. Diese oxidierten Aminosäuren sind essentiell für die Inhibition der ATP-induzierten IL-1 β -Freisetzung, eventuell für die Bindung an CD36. Die oxidierbaren Aminosäuren, die für die Anti-Proteasefunktion wichtig sind und sich in der RCL befinden, werden erst oxidiert, wenn alle anderen Aminosäuren bereits oxidiert sind. Demnach kann ein Zwischenzustand des Proteins existieren, der die IL-1 β -Freisetzung inhibieren und Proteasen komplexieren kann. Welche Erscheinungsform im Blut und/oder Gewebe vorherrscht, bleibt jedoch fraglich. Nimmt man an, dass AAT im Gewebe vollständig oxidiert werden kann, so würde dies vor der Komplexbildung mit Proteasen und der hierdurch initiierten Beseitigung durch Makrophagen schützen (Joslin et al. 1991). Somit könnte oxidiertes anti-inflammatorisches AAT vor einer Degradation im Gewebe geschützt sein.

4.6 Der Einsatz von Prolastin[®] und Respreeza[®] zur Prävention eines SIRS nach CPB-Operation

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass sich die ATP-vermittelte IL-1 β -Freisetzung aus U937-Zellen durch Prolastin[®], aber nicht durch Respreeza[®] inhibieren lässt (Abb. 17). Demnach ist zu schlussfolgern, dass sich zur Prävention eines durch IL-1 β induzierten SIRS, etwa nach einem schwerem chirurgischen Eingriff, Prolastin[®] besser eignet als Respreeza[®]. Da sich Respreeza[®] jedoch durch Oxidation aktivieren lässt, ist denkbar, dass auch Respreeza[®] inhibitorisch aktiv sein könnte, wenn es *in vivo* in ein oxidierendes Milieu gerät. Dass oxidiertes AAT im Blut vorkommt, zeigen mehrere Arbeiten (Glaser et al. 1987; Ueda et al. 2002). Auch eine enzymatische Reduktion des Proteins scheint im Blut nicht stattzufinden (Glaser et al. 1987). Ob Respreeza[®] *in vivo* eine Reaktivierung erfährt, bleibt jedoch fraglich. Außerdem bekannt ist, dass Prolastin[®] deutlich mehr Unreinheiten und Polymere aufweist als Respreeza[®] (Boerema et al. 2017). Da polymerisiertem AAT viele pro-inflammatorische Eigenschaften zugesprochen werden (Aldonyte et al. 2004; Gross et al. 2009), könnte die Verwendung von Prolastin[®] zur Prävention einer systemischen Entzündungsreaktion kontraindiziert sein. Auf der anderen Seite konnten bereits in vorläufigen Studien gezeigt werden, dass eine Prolastin[®]-Augmentation protektiv auf inflammatorische Folgen eines Ischämie-/Reperfusionsschadens wirkt (Abouzaki et al. 2018). Demnach muss der Frage nach dem geeigneten AAT-Präparat zur Prävention eines SIRS weiter nachgegangen werden.

Neben der Frage des geeigneten AAT-Präparats eröffnet sich auch die Frage nach dem angemessenen Zeitpunkt der Augmentation. Während und nach einer CPB-Operation induzieren viele unabhängige Vorgänge die Freisetzung von IL-1 β . Perioperativ sind die Stimuli durch das chirurgische Trauma und die Kontaktaktivierung durch artifizielle Oberflächen Hauptgrund für die monozytäre IL-1 β -Freisetzung. Postoperativ stimuliert der Ischämie-/Reperfusionsschaden und eine eventuelle Endotoxämie die Produktion und Ausschüttung des Zytokins. Ein systemischer Anstieg der IL-1 β -Konzentration zeigt sich erst Stunden nach der Operation (Roth-Isigkeit et al. 1999). Die maximale IL-1 β -Konzentration wird dabei am ersten postoperativen Tag erreicht. Denkbar ist, dass die perioperativen Stimuli eine Voraktivierung monozytärer Inflammasome induzieren, die eine verstärkte postoperative Antwort auf den Ischämie-/Reperfusionsschaden erzeugt. Da AAT vermutlich auch die Voraktivierung der IL-1 β -Freisetzung in Monozyten inhibieren kann (Janciauskiene et al. 2004; Nita et al. 2005; Pott et al. 2009), könnte eine perioperative Augmentation sinnvoll sein. Dagegen spricht die Gefahr, durch eine perioperative IL-1 β -Blockade antimikrobielle Abwehrmechanismen zu schwächen. Da AAT während einer CPB-Operation keinen nennenswerten Funktionsverlust erleidet, sollte ohnehin genug intaktes AAT zur Inhibition der IL-1 β -Freisetzung vorhanden sein (Abb. 8, 10 und 11). Da innerhalb der vorliegenden Arbeit keine späten, postoperativen Zeitpunkte untersucht wurden, besteht die Möglichkeit, dass AAT nach der Operation Funktionseinbußen erfährt, die den drastischen Anstieg an IL-1 β einen Tag nach der Operation erklären könnten (Roth-Isigkeit et al. 1999). Sollte sich diese Hypothese bestätigen, könnte sich eine postoperative AAT-Augmentation zur Prävention eines SIRS nach CPB-Operation eignen.

4.7 Wirkmechanismus und Identität des AAT-vermittelten Faktor-x

Zentrale Aspekte des Wirkmechanismus von AAT auf die ATP-induzierte IL-1 β -Freisetzung aus U937-Zellen wurden bereits in der Arbeit von Siebers et al. 2018 beschrieben: AAT bindet an den *Scavenger*-Rezeptor CD36 und aktiviert damit die iPLA2 β , welche wiederum die Produktion eines niedermolekularen Faktors mit cholinergem Charakter, den Faktor-x, induziert. Die Freisetzung des Faktor-x aktiviert nAChR, bestehend aus den Untereinheiten $\alpha 9$, $\alpha 10$ und/oder $\alpha 7$, welcher wiederum die Aktivierung des ATP-sensitiven P2X7-Rezeptors und damit die Reifung von pro-IL-1 β inhibiert (Abb. 1). Anzumerken ist, dass die Untersuchungen zum AAT-induzierten Signalweg lediglich mit Prolastin[®] durchgeführt wurden. Ob die nativen und oxidierten Varianten von AAT denselben Signalweg auslösen und einen Faktor-x induzieren, wurde bisher nicht gezeigt, ist aber wahrscheinlich. Vereinfachend wird im Nachfolgenden jedoch von einem AAT-induzierten Faktor-x gesprochen.

Als Faktor-x wurden iPLA2 β -abhängige Spaltprodukte von Phosphatidylcholinen in Betracht gezogen (O'Donnell et al. 2018). Die Hydrolyse von Phosphatidylcholinen durch iPLA2 β erfolgt stets durch die Spaltung der Esterbindung an der *sn2*-Position, wodurch freie Fettsäuren und das PC-haltige LPC entstehen (O'Donnell et al. 2018) (Abb. 2). Somit könnte es sich bei den aktiven Komponenten des

Faktor-x entweder um PC-haltige Metabolite von Phosphatidylcholinen oder freie Fettsäuren handeln (Siebers et al. 2018). Für einige dieser Metabolite konnte bereits eine inhibitorische Aktivität auf die monozytäre IL-1 β -Freisetzung gezeigt werden (Zakrzewicz et al. 2017), wodurch sie sich als Kandidaten für den AAT-vermittelten Faktor-x qualifizieren. Die inhibitorische Aktivität von freien Fettsäuren auf die ATP-vermittelte IL-1 β -Freisetzung sind bisher weniger gut untersucht und Teil der vorliegenden Arbeit.

Um zu überprüfen, ob Metabolite von Phosphatidylcholinen als Faktor-x in Frage kommen, bietet sich der Vergleich der Rezeptorbedürfnisse zwischen Faktor-x und anderen unkonventionellen nAChR-Agonisten an. Phosphatidylcholine besitzt eine PC-haltige Kopfgruppe, eine Glycerolgruppe und zwei unpolare Fettsäurereste. Durch die Abspaltung des Fettsäurerests an Position *sn2* entsteht LPC, das wiederum weiter zu GPC metabolisiert werden kann. Es wurde bereits gezeigt, dass LPC viele Funktionen des angeborenen und adaptiven Immunsystems modulieren kann, ohne einen cholinergen Mechanismus zu benutzen (Kabarowski et al. 2002; Stock et al. 2006; Carneiro et al. 2013). Die Aktivität von LPC auf die ATP-vermittelte IL-1 β -Freisetzung in Monozyten ist jedoch cholinerg vermittelt und relativ gut untersucht. Demnach ist bekannt, dass LPC und GPC metabotrope Aktivität an nAChR in U937-Zellen auslösen, was sie als Kandidaten für den AAT-vermittelten Faktor-x qualifizieren (Zakrzewicz et al. 2017). Experimente mit nAChR-Antagonisten zeigten, dass die LPC- und GPC-vermittelte Inhibition der IL-1 β -Freisetzung aus U937-Zellen durch die nAChR-Untereinheiten $\alpha 9$ und $\alpha 10$ vermittelt werden und die Untereinheit $\alpha 7$ nicht notwendig ist (Zakrzewicz et al. 2017). Zur Bestätigung dieser Ergebnisse wurden innerhalb der vorliegenden Arbeit Experimente durchgeführt, in denen die Expression einzelner nAChR-Untereinheiten durch siRNA reduziert wurde. Diese Untersuchungen ergaben, dass die Expressionsminderung der nAChR-Untereinheiten $\alpha 9$ und $\alpha 10$ die größten Auswirkungen auf die Inhibition der ATP-induzierten IL-1 β -Freisetzung durch LPC und GPC haben, wohingegen die reduzierte Expression der Untereinheit $\alpha 7$ kaum Auswirkungen hatte (Abb. 23 und 24). Damit bestätigen sich die Experimente mit nAChR-Antagonisten (Zakrzewicz et al. 2017). Vergleicht man die Rezeptorbedürfnisse des AAT-vermittelten Faktor-x mit denjenigen von LPC und GPC, so wird ein Unterschied deutlich: Der AAT-vermittelte Faktor-x bedarf zur Inhibition der ATP-induzierten IL-1 β -Freisetzung zwar auch der nAChR-Untereinheit $\alpha 9$, jedoch wahlweise in Kombination mit $\alpha 10$ oder $\alpha 7$ (Siebers et al. 2018). Daraus kann geschlossen werden, dass weder GPC noch LPC der AAT-vermittelte Faktor-x ist. Einschränkend muss jedoch gesagt werden, dass lediglich ein LPC, nämlich 1-Palmitoyl-*sn*-Glycero-3-Phosphocholin, analysiert worden ist. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass LPC mit anderen Fettsäureresten sich ähnlich wie der Faktor-x verhält.

Diskussion technischer Aspekte

Obwohl sich die vorliegenden Ergebnisse der Expressionsminderung durch siRNA und die Antagonisierungsexperimente bestätigten, sind beide Techniken fehleranfällig. Problematiken bei der siRNA-Technik sind zunächst die Effektivität der Expressionsminderung. Diese ist abhängig von der Spezifität und Effektivität der ausgewählten siRNA-Sequenzen, der jeweiligen Transfektionsmethode und der Halbwertszeit des expressionsgeminderten Proteins. Bei der Auswahl der siRNA-Konstrukte wurden mehrere spezifische Sequenzen für ein mRNA-Ziel verwendet, um die Effektivität der Expressionsminderung zu steigern. Die Qualität der Expressionsminderung wurde anschließend mittels quantitativer Reverse-Transkriptase-PCR überprüft, die eine gute Effizienz für die nAChR-Untereinheiten $\alpha 9$ und $\alpha 10$ ergab (Zakrzewicz et al. 2017). Die Expressionsminderung der Untereinheit $\alpha 7$ jedoch konnte nicht bestätigt werden, da bereits die Grundexpression zu gering für eine Quantifizierung war (Zakrzewicz et al. 2017). Aufgrund fehlender Antikörper für nAChR-Untereinheiten (Moser et al. 2007; Rommel et al. 2015), bleibt die Untersuchung der Proteinexpression dieser Rezeptoren problematisch. Aus diesem Grund ist auch die Untersuchung der Halbwertszeiten nAChR-Untereinheiten schwierig. Eine Untersuchung, die sich mit der Halbwertszeit nAChR in der neuromuskulären Endplatte beschäftigt, konnte Halbwertszeiten von 28 Stunden *in vivo* nachweisen (Bruneau & Akaaboune 2006). Die 48-stündige Inkubationszeit der siRNA sollte demnach ausreichen, um bereits exprimierte nAChR abzubauen. Zu beachten ist jedoch, dass sich die Halbwertszeiten zwischen wiederverwerteten Rezeptoren, die bereits internalisiert wurden, und solchen, die neu auf der Zelloberfläche erscheinen, unterscheiden. Dieses Rezeptorrecycling erschwert Untersuchungen zur Proteinexpression nAChR zusätzlich. Aufgrund der fehlenden Antikörper bilden Antagonisten für nAChR eine wichtige Grundlage für die Erforschung dieser Rezeptoren. Die Frage nach der Spezifität der verwendeten Antagonisten ist daher von großer Bedeutung. Es existieren zahlreiche Liganden für nAChR, die antagonisierende Effekte am Rezeptor auslösen können. Generelle nAChR-Antagonisten wie α -Btx richten sich nicht spezifisch gegen eine Untereinheit des Rezeptors, sodass unspezifische Effekte nie vollends ausgeschlossen werden können (McIntosh et al. 2009). Spezifische Antagonisten für nAChR sind modifizierte Conopeptide, wie [V11L;V16D]ArIB und RgIA4, die ausschließlich an eine nAChR-Untereinheit binden und auch für die vorliegenden Untersuchungen verwendet wurden (Grau et al. 2019). Bisher gibt es keine Berichte über *off-target*-Wirkungen dieser Conopeptide.

4.7.1 DHA als potenzieller Faktor-x

Bei der Hydrolyse von Phosphatidylcholinen durch iPLA2 β kommt es neben LPC zur Bildung freier Fettsäuren (Abb. 2). Eine Fettsäure, die durch die Aktivität der iPLA2 β entstehen kann, ist DHA. DHA und andere langkettige, mehrfach ungesättigte Fettsäuren haben überwiegend anti-inflammatorische Auswirkungen auf Zellen des angeborenen Immunsystems (O'Donnell et al. 2018). Es wurde bereits gezeigt, dass DHA die LPS-induzierte Ausschüttung von IL-1 β aus monozytären Zellen inhibiert (Mullen et al. 2010). Die hier vorliegenden Untersuchungen konnten zeigen, dass auch

die ATP-induzierte IL-1 β -Freisetzung aus U937-Zellen durch DHA dosisabhängig inhibiert wird (Abb. 25). Hierbei erreichten schon Konzentrationen von 10 μ M DHA einen signifikanten Effekt. Die physiologischen Plasmakonzentrationen von DHA und anderer freier Fettsäuren wird unter anderem durch die Ernährung bestimmt und unterliegt einer großen Schwankungsbreite (Stark et al. 2016). Daher ist es schwierig zu beurteilen, ob die verwendeten DHA-Konzentrationen physiologisch sind. Bekannt ist jedoch, dass DHA-Konzentrationen negativ mit der Häufigkeit von Herz-Kreislauferkrankungen korrelieren (Stark et al. 2016). Die kardioprotektiven Eigenschaften von DHA werden auf anti-inflammatorische Effekte zurückgeführt (Mullen et al. 2010; O'Donnell et al. 2018) und sind mit den vorliegenden Ergebnissen vereinbar.

Da DHA wie AAT die ATP-induzierte IL-1 β -Freisetzung aus U937-Zellen inhibiert, kommt DHA als potenzieller Kandidat des AAT-vermittelten Faktor-x in Frage. Die cholinerge Aktivität von DHA wurde in der vorliegenden Arbeit durch die Verwendung von nAChR-Antagonisten überprüft. Die Tatsache, dass die ATP-induzierte IL-1 β -Freisetzung aus U937-Zellen vollständig antagonisiert werden konnte (Abb. 26), spricht für einen cholinerg vermittelten Wirkmechanismus. Schaut man sich die Rezeptorbedürfnisse genauer an, so scheinen die nAChR-Untereinheiten $\alpha 7$, $\alpha 9$ und $\alpha 10$ am DHA-vermittelten Wirkmechanismus beteiligt zu sein (Abb. 26). Da der AAT-vermittelten Faktor-x auch in Abwesenheit der nAChR-Untereinheit $\alpha 7$ wirksam ist (Siebers et al. 2018), kann DHA als Kandidat für den gesuchten Faktor-x ausgeschlossen werden.

Die Identität des gesuchten Faktor-x konnte innerhalb der vorliegenden Arbeit nicht aufgeklärt werden. Es gibt jedoch zahlreiche weitere Kandidaten, die in Frage kommen. Neben dem hier untersuchten LPC 1-Palmitoyl-sn-Glycero-3-Phosphocholin existieren weitere LPC-Spezies wie 1-Steaoryl-sn-Glycero-3-Phosphocholin oder 1-Oleooyl-sn-Glycero-3-Phosphocholin, die hier nicht untersucht wurden. Fettsäuren, die an der *sn2*-Position von Phosphatidylcholinen durch iPLA2 β hydrolysiert werden, sind neben DHA vor allem Linolsäure, Arachidonsäure und Eicosapentaensäure (O'Donnell et al. 2018). Vorläufige Experimente zeigten jedoch keine Wirksamkeit dieser Fettsäuren auf die ATP-induzierte IL-1 β -Freisetzung aus monozytären Zellen (Daten nicht gezeigt). Um die Identität des gesuchten Faktors einzugrenzen, bieten sich massenspektrometrische Untersuchungen (Lipidomics) an, die die Lipidkomponenten in den Überständen AAT-stimulierter U937-Zellen identifizieren könnten. Ein solcher Ansatz wurde bereits an Proben unternommen, deren aktive Lipidfraktionen über eine hydrophobe Interaktionschromatografie angereichert wurden. Aktive Fraktionen enthielten vermehrt Lipidmediatoren wie Resolvin-D₁ und -E₁, sowie Leukotrien-B₄ und Thromboxan-B₃, die jedoch keine inhibitorische Aktivität auf die monozytäre, ATP-induzierte IL-1 β -Freisetzung zu haben scheinen (Daten nicht gezeigt) und sich daher als Kandidaten für den Faktor-x disqualifizieren. Vermutlich liegen die Konzentrationen des Faktor-x in Bereichen unter der typischen Nachweisgrenze von Lipidomics.

4.8 Schlussfolgerung und Ausblick

In der vorliegenden Arbeit sollte die Aktivität von endogenem AAT aus gesunden Probanden und CPB-Patienten charakterisiert werden. Hieraus ergab sich, dass AAT aus gesunden Probanden die ATP-induzierte IL-1 β -Freisetzung aus monozytären Zellen inhibiert. AAT aus CPB-Patienten erfährt durch die Operation keine nennenswerten inhibitorischen Funktionsverluste, wobei zu klären bleibt, ob dieser Befund zu späteren Zeitpunkten nach der Operation erhalten bleibt. In der Anti-Proteasefunktion scheinen sich während einer CPB-Operation Veränderungen zu ergeben, deren biomedizinische Relevanz jedoch unklar bleibt. Weiterhin sollte die inhibitorische Aktivität der AAT-Präparate Prolastin[®] und Respreeza[®] und deren oxidierten Varianten charakterisiert werden. Prolastin[®] hatte erwartungsgemäß eine inhibitorische Aktivität auf die ATP-induzierte IL-1 β -Freisetzung, wobei Respreeza[®] diese nicht aufwies. Die inhibitorische Aktivität von Respreeza[®] ließ sich jedoch durch Oxidation aktivieren. Generell verbesserte sich die inhibitorische Aktivität aller AAT-Präparate durch Oxidation. Weiterhin konnte bewiesen werden, dass die inhibitorische Aktivität auf die ATP-induzierte IL-1 β -Freisetzung nicht an eine intakte Anti-Proteasefunktion gekoppelt ist. Zu klären bleibt, ob Respreeza[®] *in vivo* eine Aktivierung erfährt. Um zu klären, ob eine AAT-Augmentation zur Prävention eines SIRS nach CPB-Operation geeignet sein könnte, sollte zunächst untersucht werden (i) ob sich ein inhibitorischer Funktionsverlust zu späteren, postoperativen Zeitpunkten einstellt und wenn ja, (ii) welchen Oxidationszustand AAT-Präparate *in vivo* haben.

Weiterin sollte sich diese Arbeit der Identifikation des AAT-induzierten Faktor-x widmen. Potenzielle Kandidaten wie LPC, GPC und DHA konnten aufgrund von abweichenden Rezeptorbedürfnissen ausgeschlossen werden. DHA konnte jedoch eine inhibitorische Aktivität auf die ATP-induzierte IL-1 β -Freisetzung nachgewiesen werden. Massenspektrometrische Untersuchungen konnten die durch AAT-induzierten und chromatographisch angereicherten Lipidkomponenten Resolvin D₁ und E₁, sowie Leukotrien B₄ und Thromboxan B₃ identifizieren. Jedoch ließ sich für keine dieser Komponenten eine inhibitorische Aktivität auf die ATP-induzierte IL-1 β -Freisetzung beobachten. Der gesuchte Faktor-x befindet sich wahrscheinlich unter der massenspektrometrisch detektierbaren Nachweisgrenze. Als nächstes zu klären wäre, ob andere LPC-Spezies oder cholinhaltige Verbindungen inhibitorische Aktivität zeigen und deren Rezeptorbedürfnisse mit den Bedürfnissen von Faktor-x übereinstimmen.

5 Zusammenfassung

Diese Arbeit beschäftigt sich mit der Freisetzung des pro-inflammatorischen Zytokins Interleukin-1 β (IL-1 β) aus Monozyten. Die Freisetzung von IL-1 β kann zur Entstehung einer systemischen Entzündungsreaktion beitragen und bedarf daher einer strengen Kontrolle. Das Akute-Phase-Protein α 1-Antitrypsin (AAT) hat neben seiner Funktion als Anti-Protease vielfache, anti-inflammatorische Eigenschaften, die während einer schweren Operation eingeschränkt sein könnten. AAT ist z.B. in der Lage, die IL- β -Freisetzung aus Monozyten zu inhibieren, wenn diese durch die Aktivität des P2X Purinozeptor 7 (P2X7) induziert wurde. Der P2X7-Rezeptor wird durch die Wahrnehmung des extrazellulären Gefahrensignals ATP aktiviert und führt zur Assemblierung eines intrazellulären Inflammasomkomplexes, dem *NACHT, LRR and PYD domains-containing protein 3* (NALP3)-Inflammasoms, welches wiederum die Reifung und Freisetzung von IL-1 β veranlasst. AAT kann die Aktivierung des P2X7-Rezeptors und durch ATP verhindern, was zur Inhibition der ATP-induzierten IL-1 β -Freisetzung führt. AAT benötigt für diese Inhibition die Aktivität des *scavenger*-Rezeptors CD36 und der Ca²⁺-unabhängigen Phospholipase-A2 β (iPLA2 β). Nach heutiger Auffassung führt die Aktivität der iPLA2 β zur Freisetzung von Phosphatidylcholinmetaboliten, die durch die monozytären Zelllinie U937 freigesetzt werden und eine metabotrope Aktivität von nikotinergen Acetylcholinrezeptoren (nAChR) induzieren. Die nAChR-Aktivierung inhibiert wiederum den P2X7-Rezeptor. Die Identität dieses cholinergen Faktors (Faktor-x) ist bis heute unklar.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob AAT während einer kardiopulmonalen Bypass(CPB)-Operation die Fähigkeit verliert, die ATP-induzierte IL-1 β -Freisetzung aus U937-Zellen zu inhibieren. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen deuten darauf hin, dass die inhibitorische Kapazität von AAT auf die ATP-induzierte IL-1 β -Freisetzung leicht abnimmt, diese Abnahme vermutlich jedoch keine physiologische Konsequenz hat. Die Anti-Proteasfunktion von AAT scheint durch eine CPB-Operation ebenfalls keine gravierenden Veränderungen zu erfahren. Jedoch konnte festgestellt werden, dass der Oxidationszustand des Proteins entscheidend für die Inhibition der ATP-induzierten IL-1 β -Freisetzung ist.

Weiterhin wurde sich der Identität des cholinergen Faktors gewidmet, der durch AAT aus U937-Zellen freigesetzt wird. Potenzielle Kandidaten des Faktor-x wurden mit Hilfe von siRNA-Technologie und spezifischen Antagonisten gegen nAChR-Untereinheiten untersucht. Die Spaltprodukte der iPLA2 β 1-Palmitoyl-sn-Glycero-3-Phosphocholin und Glycerophosphocholin wurden aufgrund von abweichenden Rezeptorbedürfnissen disqualifiziert. Docosahexaensäure, eine freie Fettsäure, die bei der Spaltung von Phosphatidylcholinen durch iPLA2 β freigesetzt werden kann, inhibiert zwar die ATP-induzierte IL-1 β -Freisetzung, ist jedoch nicht der gesuchte Faktor-x. Die Aufklärung des Faktor-x ist für die Entwicklung neuer Therapeutika sehr erstrebenswert, da er die Eigenschaft besitzt, selektiv metabotrope nAChR-Funktionen zu

induzieren, jedoch keine ionotropen nAChR-Funktionen. Kommerzielle AAT-Präparate zur Prävention systemischer Entzündungen einzusetzen, ist aufgrund der hohen Verfügbarkeit und geringen Nebenwirkungen von besonderem Interesse, bedarf jedoch weiterer Untersuchungen.

5.1 Summary

The release of the pro-inflammatory cytokine interleukin-1 β (IL-1 β) by monocytes can contribute to the development of a systemic inflammation and therefore requires strict control. In addition to its function as an anti-protease, the acute phase protein α 1-antitrypsin (AAT) has multiple anti-inflammatory properties that can be potentially be impaired by major surgery. AAT is able to inhibit IL- β release from monocytes, when induced by P2X7 receptor activation. The P2X7 receptor is activated by the perception of the extracellular danger signal ATP and leads to the assembly of an intracellular inflammasome complex, the NACHT, LRR and PYD domains-containing protein 3 (NALP3) inflammasome. The NALP3-inflammasome, in turn, facilitates the maturation and the release of IL-1 β . AAT can prevent the activation of the P2X7 receptor and thus the perception of ATP. For the inhibition of the ATP-induced release of IL-1 β , AAT requires the activity of the scavenger receptor CD36 and the Ca²⁺-independent phosphatase A2 β (iPLA2 β). According to the current concept, the activation of iPLA2 β results in the production of metabolites of phosphatidylcholines, which are released by the monocytic cell line U937 and induce metabotropic functions of nicotinic acetylcholine receptors (nAChR). The molecular identity of this cholinergic factor (factor-x) is still unknown.

The present work investigated whether AAT loses the ability to inhibit the ATP-induced IL-1 β release by U937 cells during cardiopulmonary bypass (CPB) surgery. The results of these studies indicate that the inhibitory capacity of AAT on ATP-induced IL-1 β release is slightly decreased, which is presumably without any physiological consequence. The anti-protease function of AAT remains unchanged by CPB surgery as well. However, it was found that the oxidation state of the protein is crucial for the inhibition of the ATP-induced IL-1 β release.

Furthermore, the factor-x released from U937 cells upon stimulation with AAT was investigated. Potential candidates were examined using siRNA technology and specific antagonists for nAChR subunits. The iPLA2 β cleavage products 1-palmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine and glycerophosphocholine were disqualified due to receptor requirements different from factor-x. Docosahexaenic acid, a free fatty acid that can be released by iPLA2 β when phosphatidylcholines are cleaved, inhibits the ATP-induced IL-1 β release, but also differs from factor-x. Identifying factor-x may be interesting for the development of novel therapeutics, since it selectively provokes metabotropic nAChR functions while avoiding ionotropic functions. Due to their availability and few side effects, the use of commercial AAT preparations for the prevention of systemic inflammation is of particular interest.

6 Literaturverzeichnis

- Abouzaki, N. A.; Christopher, S.; Trankle, C.; van Tassell, B. W.; Carbone, S.; Mauro, A. G.; Buckley, L.; Toldo, S.; Abbate, A. (2018): Inhibiting the inflammatory injury after Myocardial ischemia reperfusion with plasma-derived alpha-1 antitrypsin: a post hoc analysis of the VCU- α 1RT Study. *Journal of cardiovascular pharmacology* 71 (6): 375–379.
- Adinolfi, E.; Giuliani, A. L.; Marchi, E. de; Pegoraro, A.; Orioli, E.; Di Virgilio, F. (2018): The P2X7 receptor: A main player in inflammation. *Biochemical pharmacology* 151: 234–244.
- Aggarwal, N.; Korenbaum, E.; Mahadeva, R.; Immenschuh, S.; Grau, V.; Dinarello, C. A.; Welte, T.; Janciauskiene, S. (2016): α -Linoleic acid enhances the capacity of α -1 antitrypsin to inhibit lipopolysaccharide induced IL-1 β in human blood neutrophils. *Molecular medicine (Cambridge, Mass.)* 22: 680–693.
- Agné, A.; Richter, K.; Tumpara, S.; Sauer, A.-L.; Beckert, F.; Wrenger, S.; Zakrzewicz, A.; Hecker, A.; Markmann, M.; Koch, C.; Zajonz, T.; Sander, M.; Böning, A.; Padberg, W.; Janciauskiene, S.; Grau, V. (2020): Does heart surgery change the capacity of α 1-antitrypsin to inhibit the ATP-induced release of monocytic interleukin-1 β ? A preliminary study. *International immunopharmacology* 81: 106297.
- Akira, S.; Uematsu, S.; Takeuchi, O. (2006): Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 124 (4): 783–801.
- Albalawi, F.; Lu, W.; Beckel, J. M.; Lim, J. C.; McCaughey, S. A.; Mitchell, C. H. (2017): The P2X7 receptor primes IL-1 β and the NLRP3 inflammasome in astrocytes exposed to mechanical strain. *Frontiers in Cellular Neuroscience* 11: 227.
- Albuquerque, E. X.; Pereira, E. F. R.; Alkondon, M.; Rogers, S. W. (2009): Mammalian nicotinic acetylcholine receptors: from structure to function. *Physiological reviews* 89 (1): 73–120.
- Aldonyte, R.; Jansson, L.; Janciauskiene, S. (2004): Concentration-dependent effects of native and polymerised alpha1-antitrypsin on primary human monocytes, in vitro. *BMC cell biology* 5: 11.
- Allan, C. K.; Newburger, J. W.; McGrath, E.; Elder, J.; Psinos, C.; Laussen, P. C.; del Nido, P. J.; Wypij, D.; McGowan, F. X., JR (2010): The relationship between inflammatory activation and clinical outcome after infant cardiopulmonary bypass. *Anesthesia and analgesia* 111 (5): 1244–1251.
- Al-Riyami, L.; Harnett, W. (2012): Immunomodulatory properties of ES-62, a phosphorylcholine-containing glycoprotein secreted by *Acanthocheilonema viteae*. *Endocrine, metabolic & immune disorders drug targets* 12 (1): 45–52.
- Amati, A.-L.; Zakrzewicz, A.; Siebers, R.; Wilker, S.; Heldmann, S.; Zakrzewicz, D.; Hecker, A.; McIntosh, J. M.; Padberg, W.; Grau, V. (2017): Chemokines (CCL3, CCL4, and CCL5)

- inhibit ATP-induced release of IL-1 β by monocytic cells. *Mediators of inflammation* 2017: 1434872.
- Backhaus, S.; Zakrzewicz, A.; Richter, K.; Damm, J.; Wilker, S.; Fuchs-Moll, G.; Küllmar, M.; Hecker, A.; Manzini, I.; Ruppert, C.; McIntosh, J. M.; Padberg, W.; Grau, V. (2017): Surfactant inhibits ATP-induced release of interleukin-1 β via nicotinic acetylcholine receptors. *Journal of lipid research* 58 (6): 1055–1066.
- Baehner, T.; Boehm, O.; Probst, C.; Poetzsch, B.; Hoeft, A.; Baumgarten, G.; Knuefermann, P. (2012): Kardiopulmonaler Bypass in der Herzchirurgie. *Der Anaesthetist* 61 (10): 846–856.
- Battle, J.; Ha, T.; Li, C.; Della Beffa, V.; Rice, P.; Kalbfleisch, J.; Browder, W.; Williams, D. (1998): Ligand binding to the (1 -- 3)-beta-D-glucan receptor stimulates NFkappaB activation, but not apoptosis in U937 cells. *Biochemical and biophysical research communications* 249 (2): 499–504.
- Bauernfeind, F. G.; Horvath, G.; Stutz, A.; Alnemri, E. S.; MacDonald, K.; Speert, D.; Fernandes-Alnemri, T.; Wu, J.; Monks, B. G.; Fitzgerald, K. A.; Hornung, V.; Latz, E. (2009): Cutting edge. NF-kappaB activating pattern recognition and cytokine receptors license NLRP3 inflammasome activation by regulating NLRP3 expression. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 183 (2): 787–791.
- Bergin, D. A.; Reeves, E. P.; Hurley, K.; Wolfe, R.; Jameel, R.; Fitzgerald, S.; McElvaney, N. G. (2014): The circulating proteinase inhibitor α -1 antitrypsin regulates neutrophil degranulation and autoimmunity. *Science translational medicine* 6 (217): 217ra1.
- Bergin, D. A.; Reeves, E. P.; Meleady, P.; Henry, M.; McElvaney, O. J.; Carroll, T. P.; Condrón, C.; Chotirmall, S. H.; Clynes, M.; O'Neill, S. J.; McElvaney, N. G. (2010): α -1 Antitrypsin regulates human neutrophil chemotaxis induced by soluble immune complexes and IL-8. *The Journal of clinical investigation* 120 (12): 4236–4250.
- Bergsbaken, T.; Fink, S. L.; Cookson, B. T. (2009): Pyroptosis: host cell death and inflammation. *Nature reviews. Microbiology* 7 (2): 99–109.
- Bernardi, M. H.; Rinoesl, H.; Dragosits, K.; Ristl, R.; Hoffelner, F.; Opfermann, P.; Lamm, C.; Preissing, F.; Wiedemann, D.; Hiesmayr, M. J.; Spittler, A. (2016): Effect of hemoadsorption during cardiopulmonary bypass surgery - a blinded, randomized, controlled pilot study using a novel adsorbent. *Critical care (London, England)* 20: 96.
- Bertolini, J.; Goss, N. u. Curling, J. M. /Hrsg. (2013): Production of plasma proteins for therapeutic use. Wiley. Hoboken, N.J. 496 S.
- Bianchi, M. E. (2007): DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. *Journal of leukocyte biology* 81 (1): 1–5.
- Blanco, I.; Lara, B.; Serres, F. de (2011): Efficacy of alpha1-antitrypsin augmentation therapy in conditions other than pulmonary emphysema. *Orphanet journal of rare diseases* 6: 14.

- Boeken, U.; Feindt, P.; Schulte, H. D.; Gams, E. (2002): Elastase release following myocardial ischemia during extracorporeal circulation (ECC) -- marker of ongoing systemic inflammation? *The Thoracic and cardiovascular surgeon* 50 (3): 136–140.
- Boerema, D. J.; An, B.; Gandhi, R. P.; Papineau, R.; Regnier, E.; Wilder, A.; Molitor, A.; Tang, A. P.; Kee, S. M. (2017): Biochemical comparison of four commercially available human α 1-proteinase inhibitors for treatment of α 1-antitrypsin deficiency. *Biologicals: journal of the International Association of Biological Standardization* 50: 63–72.
- Bornhorst, J. A.; Greene, D. N.; Ashwood, E. R.; Grenache, D. G. (2013): α 1-Antitrypsin phenotypes and associated serum protein concentrations in a large clinical population. *Chest* 143 (4): 1000–1008.
- Borovikova, L. V.; Ivanova, S.; Zhang, M.; Yang, H.; Botchkina, G. I.; Watkins, L. R.; Wang, H.; Abumrad, N.; Eaton, J. W.; Tracey, K. J. (2000): Vagus nerve stimulation attenuates the systemic inflammatory response to endotoxin. *Nature* 405 (6785): 458–462.
- Borowiec, J.; Bagge, L.; Saldeen, T.; Thelin, S. (1997): Biocompatibility reflected by haemostasis variables during cardiopulmonary bypass using heparin-coated circuits. *The Thoracic and cardiovascular surgeon* 45 (4): 163–167.
- Bortolotti, P.; Faure, E.; Kipnis, E. (2018): Inflammasomes in tissue damages and immune disorders after trauma. *Frontiers in immunology* 9: 1900.
- Boskovic, G.; Twining, S. S. (1997): Retinol and retinaldehyde specifically increase α 1-proteinase inhibitor in the human cornea. *Biochemical Journal* 322 (3): 751–756.
- Bouchier-Hayes, L.; Conroy, H.; Egan, H.; Adrain, C.; Creagh, E. M.; MacFarlane, M.; Martin, S. J. (2001): CARDINAL, a novel caspase recruitment domain protein, is an inhibitor of multiple NF-kappa B activation pathways. *The Journal of biological chemistry* 276 (47): 44069–44077.
- Boutten, A.; Venembre, P.; Seta, N.; Hamelin, J.; Aubier, M.; Durand, G.; Dehoux, M. S. (1998): Oncostatin M is a potent stimulator of alpha1-antitrypsin secretion in lung epithelial cells: modulation by transforming growth factor-beta and interferon-gamma. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 18 (4): 511–520.
- Brubaker, S. W.; Bonham, K. S.; Zandoni, I.; Kagan, J. C. (2015): Innate immune pattern recognition: a cell biological perspective. *Annual review of immunology* 33: 257–290.
- Bruneau, E. G.; Akaaboune, M. (2006): The dynamics of recycled acetylcholine receptors at the neuromuscular junction in vivo. *Development (Cambridge, England)* 133 (22): 4485–4493.
- Bucurenci, N.; Blake, D. R.; Chidwick, K.; Winyard, P. G. (1992): Inhibition of neutrophil superoxide production by human plasma α 1 -antitrypsin. *FEBS letters* 300 (1): 21–24.
- Butler, J.; Baigrie, R. J.; Parker, D.; Chong, J. L.; Shale, D. J.; Pillai, R.; Westaby, S.; Rocker, G. M. (1993): Systemic inflammatory responses to cardiopulmonary bypass: a pilot study of the effects of pentoxifylline. *Respiratory medicine* 87 (4): 285–288.

- Buyukates, M.; Acikgoz, S.; Kandemir, O.; Aktunc, E.; Ceylan, E.; Can, M. (2008): Use of warm priming solution in open heart surgery: its effects on hemodynamics and acute inflammation. *Perfusion* 23 (2): 89–94.
- Carneiro, A. B.; Iaciura, B. M. F.; Nohara, L. L.; Lopes, C. D.; Veas, E. M. C.; Mariano, V. S.; Bozza, P. T.; Lopes, U. G.; Atella, G. C.; Almeida, I. C.; Silva-Neto, M. A. C. (2013): Lysophosphatidylcholine triggers TLR2- and TLR4-mediated signaling pathways but counteracts LPS-induced NO synthesis in peritoneal macrophages by inhibiting NF- κ B translocation and MAPK/ERK phosphorylation. *PLoS one* 8 (9): e76233.
- Cauwels, A.; Rogge, E.; Vandendriessche, B.; Shiva, S.; Brouckaert, P. (2014): Extracellular ATP drives systemic inflammation, tissue damage and mortality. *Cell death & disease* 5: e1102.
- Cazzola, M.; Stolz, D.; Rogliani, P.; Matera, M. G. (2020): α 1-Antitrypsin deficiency and chronic respiratory disorders. *European respiratory review: an official journal of the European Respiratory Society* 29 (155).
- Chaudhry, A. Z.; Diodato, M. D.; Massad, M. G. (2010): Heat shock protein expression during cardiac surgery. *World journal of surgery* 34 (4): 682–683.
- Churg, A.; Dai, J.; Zay, K.; Karsan, A.; Hendricks, R.; Yee, C.; Martin, R.; MacKenzie, R.; Xie, C.; Zhang, L.; Shapiro, S.; Wright, J. L. (2001): Alpha-1-antitrypsin and a broad spectrum metalloprotease inhibitor, RS113456, have similar acute anti-inflammatory effects. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 81 (8): 1119–1131.
- Claremont, D. J.; Branthwaite, M. A. (1980): Metabolic indices of pulmonary damage. Changes in angiotensin converting enzyme and alpha 1 anti-trypsin activity after cardiopulmonary bypass. *Anaesthesia* 35 (9): 863–868.
- Coll, R. C.; Robertson, A. A. B.; Chae, J. J.; Higgins, S. C.; Muñoz-Planillo, R.; Inserra, M. C.; Vetter, I.; Dungan, L. S.; Monks, B. G.; Stutz, A.; Croker, D. E.; Butler, M. S.; Haneklaus, M.; Sutton, C. E.; Núñez, G.; Latz, E.; Kastner, D. L.; Mills, K. H. G.; Masters, S. L.; Schroder, K.; Cooper, M. A.; O'Neill, L. A. J. (2015): A small-molecule inhibitor of the NLRP3 inflammasome for the treatment of inflammatory diseases. *Nature medicine* 21 (3): 248–255.
- Cox, M. A.; Bassi, C.; Saunders, M. E.; Nechanitzky, R.; Morgado-Palacin, I.; Zheng, C.; Mak, T. W. (2020): Beyond neurotransmission: acetylcholine in immunity and inflammation. *Journal of internal medicine* 287 (2): 120–133.
- Cray, C.; Zaias, J.; Altman, N. H. (2009): Acute phase response in animals: a review. *Comparative medicine* 59 (6): 517–526.
- Damiano, J. S.; Oliveira, V.; Welsh, K.; Reed, J. C. (2004): Heterotypic interactions among NACHT domains. Implications for regulation of innate immune responses. *The Biochemical journal* 381 (Pt 1): 213–219.
- Day, J. R. S.; Taylor, K. M. (2005): The systemic inflammatory response syndrome and cardiopulmonary bypass. *International journal of surgery (London, England)* 3 (2): 129–140.

- Dinarello, C. A. (1996): Biologic basis for interleukin-1 in disease. *Blood* 87 (6): 2095–2147.
- Dinarello, C. A. (2005): Blocking IL-1 in systemic inflammation. *The Journal of experimental medicine* 201 (9): 1355–1359.
- Dinarello, C. A. (2009): Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family. *Annual review of immunology* 27: 519–550.
- Dinarello, C. A. (2018a): Introduction to the interleukin-1 family of cytokines and receptors: drivers of innate inflammation and acquired immunity. *Immunological reviews* 281 (1): 5–7.
- Dinarello, C. A. (2018b): Overview of the IL-1 family in innate inflammation and acquired immunity. *Immunological reviews* 281 (1): 8–27.
- Dinarello, C. A.; Simon, A.; van der Meer, J. W. M. (2012): Treating inflammation by blocking interleukin-1 in a broad spectrum of diseases. *Nature reviews. Drug discovery* 11 (8): 633–652.
- Dostert, C.; Pétrilli, V.; van Bruggen, R.; Steele, C.; Mossman, B. T.; Tschopp, J. (2008): Innate immune activation through Nalp3 inflammasome sensing of asbestos and silica. *Science (New York, N.Y.)* 320 (5876): 674–677.
- Dreyer, W. J.; Michael, L. H.; Millman, E. E.; Berens, K. L.; Geske, R. S. (1995): Neutrophil sequestration and pulmonary dysfunction in a canine model of open heart surgery with cardiopulmonary bypass. Evidence for a CD18-dependent mechanism. *Circulation* 92 (8): 2276–2283.
- Edmunds, L.H. (1998): Inflammatory response to cardiopulmonary bypass. *The Annals of thoracic surgery* 66 (5): S12-S16.
- Ehlers, M. R. (2014): Immune-modulating effects of alpha-1 antitrypsin. *Biological chemistry* 395 (10): 1187–1193.
- Elgoyhen, A. B.; Johnson, D. S.; Boulter, J.; Vetter, D. E.; Heinemann, S. (1994): Alpha 9: an acetylcholine receptor with novel pharmacological properties expressed in rat cochlear hair cells. *Cell* 79 (4): 705–715.
- Elgoyhen, A. B.; Vetter, D. E.; Katz, E.; Rothlin, C. V.; Heinemann, S. F.; Boulter, J. (2001): alpha10. A determinant of nicotinic cholinergic receptor function in mammalian vestibular and cochlear mechanosensory hair cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98 (6): 3501–3506.
- Elliott, J. M.; Rouge, L.; Wiesmann, C.; Scheer, J. M. (2009): Crystal structure of procaspase-1 zymogen domain reveals insight into inflammatory caspase autoactivation. *The Journal of biological chemistry* 284 (10): 6546–6553.
- Esper, S. A.; Subramaniam, K.; Tanaka, K. A. (2014): Pathophysiology of cardiopulmonary bypass. Current strategies for the prevention and treatment of anemia, coagulopathy, and organ dysfunction. *Seminars in cardiothoracic and vascular anesthesia* 18 (2): 161–176.

- Evavold, C. L.; Ruan, J.; Tan, Y.; Xia, S.; Wu, H.; Kagan, J. C. (2018): The pore-forming protein gasdermin D regulates interleukin-1 secretion from living macrophages. *Immunity* 48 (1): 35-44.e6.
- Finn, A.; Morgan, B. P.; Rebuck, N.; Klein, N.; Rogers, C. A.; Hibbs, M.; Elliott, M.; Shore, D. F.; Evans, T. W.; Strobel, S.; Moat, N. (1996): Effects of inhibition of complement activation using recombinant soluble complement receptor 1 on neutrophil CD11b/CD18 and L-selectin expression and release of interleukin-8 and elastase in simulated cardiopulmonary bypass. *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery* 111 (2): 451–459.
- Finotti, P.; Pagetta, A. (2004): A heat shock protein70 fusion protein with alpha1-antitrypsin in plasma of type 1 diabetic subjects. *Biochemical and biophysical research communications* 315 (2): 297–305.
- Fitzgerald, K. A.; Kagan, J. C. (2020): Toll-like receptors and the control of immunity. *Cell* 180 (6): 1044–1066.
- Fujii, T.; Mashimo, M.; Moriwaki, Y.; Misawa, H.; Ono, S.; Horiguchi, K.; Kawashima, K. (2017a): Expression and function of the cholinergic system in immune cells. *Frontiers in immunology* 8: 1085.
- Fujii, T.; Mashimo, M.; Moriwaki, Y.; Misawa, H.; Ono, S.; Horiguchi, K.; Kawashima, K. (2017b): Physiological functions of the cholinergic system in immune cells. *Journal of pharmacological sciences* 134 (1): 1–21.
- Furey, N. L.; Golden, R. S.; Potts, S. R. (1996): Treatment of alpha-1-antitrypsin deficiency, massive edema, and panniculitis with alpha-1 protease inhibitor. *Annals of internal medicine* 125 (8): 699.
- Garlanda, C.; Dinarello, C. A.; Mantovani, A. (2013): The interleukin-1 family: back to the future. *Immunity* 39 (6): 1003–1018.
- Geboes, K.; Ray, M. B.; Rutgeerts, P.; Callea, F.; Desmet, V. J.; Vantrappen, G. (1982): Morphological identification of alpha-I-antitrypsin in the human small intestine. *Histopathology* 6 (1): 55–60.
- Glaser, C. B.; Karic, L.; Parmelee, S.; Premachandra, B. R.; Hinkston, D.; Abrams, W. R. (1987): Studies on the turnover of methionine oxidized alpha-1-protease inhibitor in rats. *The American review of respiratory disease* 136 (4): 857–861.
- Gombault, A.; Baron, L.; Couillin, I. (2012): ATP release and purinergic signaling in NLRP3 inflammasome activation. *Frontiers in immunology* 3: 414.
- Gong, T.; Liu, L.; Jiang, W.; Zhou, R. (2020): DAMP-sensing receptors in sterile inflammation and inflammatory diseases. *Nature reviews. Immunology* 20 (2): 95–112.
- Götzfried, J.; Smirnova, N. F.; Morrone, C.; Korkmaz, B.; Yildirim, A. Ö.; Eickelberg, O.; Jenne, D. E. (2018): Preservation with α 1-antitrypsin improves primary graft function of murine lung

- transplants. *The Journal of heart and lung transplantation: the official publication of the International Society for Heart Transplantation* 37 (8): 1021–1028.
- Grau, V.; Richter, K.; Hone, A. J.; McIntosh, J. M. (2019): Conopeptides [V11L;V16D]ArIB and RgIA4: Powerful tools for the identification of novel nicotinic acetylcholine receptors in monocytes. *Frontiers in Pharmacology* 9: 1499.
- Griffiths, S. W.; Cooney, C. L. (2002): Relationship between protein structure and methionine oxidation in recombinant human alpha 1-antitrypsin. *Biochemistry* 41 (20): 6245–6252.
- Gross, B.; Grebe, M.; Wencker, M.; Stoller, J. K.; Bjursten, L. M.; Janciauskiene, S. (2009): New Findings in PiZZ alpha1-antitrypsin deficiency-related panniculitis. Demonstration of skin polymers and high dosing requirements of intravenous augmentation therapy. *Dermatology (Basel, Switzerland)* 218 (4): 370–375.
- Groutas, W. C.; Dou, D.; Alliston, K. R. (2011): Neutrophil elastase inhibitors. *Expert opinion on therapeutic patents* 21 (3): 339–354.
- Harnett, M. M.; Kean, D. E.; Boitelle, A.; McGuinness, S.; Thalhamer, T.; Steiger, C. N.; Egan, C.; Al-Riyami, L.; Alcocer, M. J.; Houston, K. M.; Gracie, J. A.; McInnes, I. B.; Harnett, W. (2008): The phosphorycholine moiety of the filarial nematode immunomodulator ES-62 is responsible for its anti-inflammatory action in arthritis. *Annals of the rheumatic diseases* 67 (4): 518–523.
- Hecker, A.; Kullmar, M.; Wilker, S.; Richter, K.; Zakrzewicz, A.; Atanasova, S.; Mathes, V.; Timm, T.; Lerner, S.; Klein, J.; Kaufmann, A.; Bauer, S.; Padberg, W.; Kummer, W.; Janciauskiene, S.; Fronius, M.; Schweda, E. K. H.; Lochnit, G.; Grau, V. (2015): Phosphocholine-modified macromolecules and canonical nicotinic agonists inhibit ATP-induced IL-1 β release. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 195 (5): 2325–2334.
- Hiller, S. D.; Heldmann, S.; Richter, K.; Jurastow, I.; Küllmar, M.; Hecker, A.; Wilker, S.; Fuchs-Moll, G.; Manzini, I.; Schmalzing, G.; Kummer, W.; Padberg, W.; McIntosh, J. M.; Damm, J.; Zakrzewicz, A.; Grau, V. (2018): β -nicotinamide adenine dinucleotide (β -NAD) inhibits ATP-dependent IL-1 β release from human monocytic cells. *International journal of molecular sciences* 19 (4).
- Hirsiger, S.; Simmen, H.-P.; Werner, C. M. L.; Wanner, G. A.; Rittirsch, D. (2012): Danger signals activating the immune response after trauma. *Mediators of inflammation* 2012: 315941.
- Hoffman, H. M.; Mueller, J. L.; Broide, D. H.; Wanderer, A. A.; Kolodner, R. D. (2001): Mutation of a new gene encoding a putative pyrin-like protein causes familial cold autoinflammatory syndrome and Muckle-Wells syndrome. *Nature genetics* 29 (3): 301–305.
- Horiuchi, Y.; Kimura, R.; Kato, N.; Fujii, T.; Seki, M.; Endo, T.; Kato, T.; Kawashima, K. (2003): Evolutional study on acetylcholine expression. *Life sciences* 72 (15): 1745–1756.

- Hosseinian, N.; Cho, Y.; Lockey, R. F.; Kolliputi, N. (2015): The role of the NLRP3 inflammasome in pulmonary diseases. *Therapeutic advances in respiratory disease* 9 (4): 188–197.
- Huber, R.; Carrell, R. W. (1989): Implications of the three-dimensional structure of alpha 1-antitrypsin for structure and function of serpins. *Biochemistry* 28 (23): 8951–8966.
- Huber-Lang, M.; Lambris, J. D.; Ward, P. A. (2018): Innate immune responses to trauma. *Nature immunology* 19 (4): 327–341.
- Huntington, J. A.; Read, R. J.; Carrell, R. W. (2000): Structure of a serpin-protease complex shows inhibition by deformation. *Nature* 407 (6806): 923–926.
- Huston, J. M.; Ochani, M.; Rosas-Ballina, M.; Liao, H.; Ochani, K.; Pavlov, V. A.; Gallowitsch-Puerta, M.; Ashok, M.; Czura, C. J.; Foxwell, B.; Tracey, K. J.; Ulloa, L. (2006): Splenectomy inactivates the cholinergic antiinflammatory pathway during lethal endotoxemia and polymicrobial sepsis. *The Journal of experimental medicine* 203 (7): 1623–1628.
- Irving, J. A. (2000): Phylogeny of the serpin superfamily: implications of patterns of amino acid conservation for structure and function. *Genome Research* 10 (12): 1845–1864.
- Iwasaki, A.; Medzhitov, R. (2015): Control of adaptive immunity by the innate immune system. *Nature immunology* 16 (4): 343–353.
- Iyer, S. S.; Pulsikens, W. P.; Sadler, J. J.; Butter, L. M.; Teske, G. J.; Ulland, T. K.; Eisenbarth, S. C.; Florquin, S.; Flavell, R. A.; Leemans, J. C.; Sutterwala, F. S. (2009): Necrotic cells trigger a sterile inflammatory response through the Nlrp3 inflammasome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106 (48): 20388–20393.
- Janciauskiene, S. (2001): Conformational properties of serine proteinase inhibitors (serpins) confer multiple pathophysiological roles. *Biochimica et biophysica acta* 1535 (3): 221–235.
- Janciauskiene, S. /Hrsg. (2013): Acute phase proteins. InTech. Croatia. vii, 180.
- Janciauskiene, S.; Larsson, S.; Larsson, P.; Virtala, R.; Jansson, L.; Stevens, T. (2004): Inhibition of lipopolysaccharide-mediated human monocyte activation, in vitro, by alpha1-antitrypsin. *Biochemical and biophysical research communications* 321 (3): 592–600.
- Janciauskiene, S.; Moraga, F.; Lindgren, S. (2001): C-terminal fragment of alpha1-antitrypsin activates human monocytes to a pro-inflammatory state through interactions with the CD36 scavenger receptor and LDL receptor. *Atherosclerosis* 158 (1): 41–51.
- Janciauskiene, S.; Wrenger, S.; Immenschuh, S.; Olejnicka, B.; Greulich, T.; Welte, T.; Chorostowska-Wynimko, J. (2018): The multifaceted effects of alpha1-antitrypsin on neutrophil functions. *Frontiers in pharmacology* 9: 341.
- Janciauskiene, S.; Wrenger, S.; Welte, T. (2013): Immunoregulatory properties of acute phase proteins — specific focus on α 1-antitrypsin. In: Janciauskiene, S. (Hrsg.): Acute phase proteins. InTech. Croatia.

- Janciauskiene, S. M.; Bals, R.; Koczulla, R.; Vogelmeier, C.; Köhnlein, T.; Welte, T. (2011): The discovery of α 1-antitrypsin and its role in health and disease. *Respiratory medicine* 105 (8): 1129–1139.
- Janciauskiene, S. M.; Nita, I. M.; Stevens, T. (2007): Alpha1-antitrypsin, old dog, new tricks. Alpha1-antitrypsin exerts in vitro anti-inflammatory activity in human monocytes by elevating cAMP. *The Journal of biological chemistry* 282 (12): 8573–8582.
- Janeway, C. (1989): Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology* 54 Pt 1: 1–13.
- Janeway, C.; Medzhitov, R. (2002): Innate immune recognition. *Annual review of immunology* 20: 197–216.
- Jonigk, D.; Al-Omari, M.; Maegel, L.; Müller, M.; Izykowski, N.; Hong, J.; Hong, K.; Kim, S.-H.; Dorsch, M.; Mahadeva, R.; Laenger, F.; Kreipe, H.; Braun, A.; Shahaf, G.; Lewis, E. C.; Welte, T.; Dinarello, C. A.; Janciauskiene, S. (2013a): Anti-inflammatory and immunomodulatory properties of alpha1-antitrypsin without inhibition of elastase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110 (37): 15007–15012.
- Jonigk, D.; Al-Omari, M.; Maegel, L.; Müller, M.; Izykowski, N.; Hong, J.; Hong, K.; Kim, S.-H.; Dorsch, M.; Mahadeva, R.; Laenger, F.; Kreipe, H.; Braun, A.; Shahaf, G.; Lewis, E. C.; Welte, T.; Dinarello, C. A.; Janciauskiene, S. (2013b): Anti-inflammatory and immunomodulatory properties of α 1-antitrypsin without inhibition of elastase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110 (37): 15007–15012.
- Jönsson, P. (1996): Cardiopulmonary bypass causes release of leukocyte proteinase-3. *Scandinavian journal of clinical and laboratory investigation* 56 (8): 721–723.
- Joslin, G.; Fallon, R. J.; Bullock, J.; Adams, S. P.; Perlmutter, D. H. (1991): The SEC receptor recognizes a pentapeptide neodomain of alpha 1-antitrypsin-protease complexes. *The Journal of biological chemistry* 266 (17): 11282–11288.
- Kabarowski, J. H.S.; Xu, Y.; Witte, O. N. (2002): Lysophosphatidylcholine as a ligand for immunoregulation. *Biochemical pharmacology* 64 (2): 161–167.
- Kahlenberg, J. M.; Dubyak, G. R. (2004): Mechanisms of caspase-1 activation by P2X7 receptor-mediated K⁺ release. *American journal of physiology. Cell physiology* 286 (5): C1100-8.
- Kalla, A. A.; Tikly, M. (2003): Rheumatoid arthritis in the developing world. *Best practice & research. Clinical rheumatology* 17 (5): 863–875.
- Kaner, Z.; Engelman, R.; Schuster, R.; Rider, P.; Greenberg, D.; Av-Gay, Y.; Benhar, M.; Lewis, E. C. (2019): S-nitrosylation of α 1-antitrypsin triggers macrophages toward inflammatory phenotype and enhances intra-cellular bacteria elimination. *Frontiers in immunology* 10: 590.

- Karatas, E.; Bouche-careilh, M. (2020): Alpha 1-antitrypsin deficiency: a disorder of proteostasis-mediated protein folding and trafficking pathways. *International journal of molecular sciences* 21 (4).
- Kawai, T.; Akira, S. (2010): The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nature immunology* 11 (5): 373–384.
- Kawasaki, T.; Kawai, T. (2014): Toll-like receptor signaling pathways. *Frontiers in immunology* 5: 461.
- Kawashima, K.; Fujii, T. (2000): Extraneuronal cholinergic system in lymphocytes. *Pharmacology & therapeutics* 86 (1): 29–48.
- Kawashima, K.; Fujii, T.; Moriwaki, Y.; Misawa, H.; Horiguchi, K. (2012): Reconciling neuronally and nonneuronally derived acetylcholine in the regulation of immune function. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1261: 7–17.
- Kawashima, K.; Fujii, T.; Moriwaki, Y.; Misawa, H.; Horiguchi, K. (2015): Non-neuronal cholinergic system in regulation of immune function with a focus on $\alpha 7$ nAChRs. *International immunopharmacology* 29 (1): 127–134.
- Kirklín, J. K.; Westaby, S.; Blackstone, E. H.; Kirklín, J. W.; Chenoweth, D. E.; Pacifico, A. D. (1983): Complement and the damaging effects of cardiopulmonary bypass. *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery* 86 (6): 845–857.
- Knoell, D. L.; Ralston, D. R.; Coulter, K. R.; Wewers, M. D. (1998): Alpha 1-antitrypsin and protease complexation is induced by lipopolysaccharide, interleukin-1beta, and tumor necrosis factor-alpha in monocytes. *American journal of respiratory and critical care medicine* 157 (1): 246–255.
- Kudo, S.; Mizuno, K.; Hirai, Y.; Shimizu, T. (1990): Clearance and tissue distribution of recombinant human interleukin 1 beta in rats. *Cancer research* 50 (18): 5751–5755.
- Lamkanfi, M.; Dixit, V. M. (2017): A new lead to NLRP3 inhibition. *The Journal of experimental medicine* 214 (11): 3147–3149.
- Landis, R. C.; Brown, J. R.; Fitzgerald, D.; Likosky, D. S.; Shore-Lesserson, L.; Baker, R. A.; Hammon, J. W. (2014): Attenuating the systemic inflammatory response to adult cardiopulmonary bypass: a critical review of the evidence base. *The Journal of Extracorporeal Technology* 46 (3): 197–211.
- Lashoher, A.; Schneider, E. B.; Juillard, C.; Stevens, K.; Colantuoni, E.; Berry, W. R.; Bloem, C.; Chadbunchachai, W.; Dharap, S.; Dy, S. M.; Dziekan, G.; Gruen, R. L.; Henry, J. A.; Huwer, C.; Joshipura, M.; Kelley, E.; Krug, E.; Kumar, V.; Kyamanywa, P.; Mefire, A. C.; Musafir, M.; Nathens, A. B.; Ngendahayo, E.; Nguyen, T. S.; Roy, N.; Pronovost, P. J.; Khan, I. Q.; Razzak, J. A.; Rubiano, A. M.; Turner, J. A.; Varghese, M.; Zakirova, R.; Mock, C. (2017): Implementation of the World Health Organization trauma care checklist program in 11

- centers across multiple economic strata: effect on care process measures. *World journal of surgery* 41 (4): 954–962.
- Law, R. H. P.; Zhang, Q.; McGowan, S.; Buckle, A. M.; Silverman, G. A.; Wong, W.; Rosado, C. J.; Langendorf, C. G.; Pike, R. N.; Bird, P. I.; Whisstock, J. C. (2006): An overview of the serpin superfamily. *Genome biology* 7 (5): 216.
- Lemaitre, B.; Nicolas, E.; Michaut, L.; Reichhart, J. M.; Hoffmann, J. A. (1996): The dorsoventral regulatory gene cassette *spatzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell* 86 (6): 973–983.
- Lewis, E. C. (2012): Expanding the clinical indications for $\alpha(1)$ -antitrypsin therapy. *Molecular medicine (Cambridge, Mass.)* 18: 957–970.
- Li, Z.; Alam, S.; Wang, J.; Sandstrom, C. S.; Janciauskiene, S.; Mahadeva, R. (2009): Oxidized $\{\alpha\}1$ -antitrypsin stimulates the release of monocyte chemoattractant protein-1 from lung epithelial cells: potential role in emphysema. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology* 297 (2): L388-400.
- Lohmann, T. H.; Torrão, A. S.; Britto, L. R.; Lindstrom, J.; Hamassaki-Britto, D. E. (2000): A comparative non-radioactive in situ hybridization and immunohistochemical study of the distribution of $\alpha 7$ and $\alpha 8$ subunits of the nicotinic acetylcholine receptors in visual areas of the chick brain. *Brain research* 852 (2): 463–469.
- Lopez-Castejon, G.; Brough, D. (2011): Understanding the mechanism of IL-1 β secretion. *Cytokine & growth factor reviews* 22 (4): 189–195.
- Lord, J. M.; Midwinter, M. J.; Chen, Y.-F.; Belli, A.; Brohi, K.; Kovacs, E. J.; Koenderman, L.; Kubes, P.; Lilford, R. J. (2014): The systemic immune response to trauma: an overview of pathophysiology and treatment. *Lancet (London, England)* 384 (9952): 1455–1465.
- Lünemann, A.; Ullrich, O.; Diestel, A.; Jöns, T.; Ninnemann, O.; Kovac, A.; Pohl, E. E.; Hass, R.; Nitsch, R.; Hendrix, S. (2006): Macrophage/microglia activation factor expression is restricted to lesion-associated microglial cells after brain trauma. *Glia* 53 (4): 412–419.
- Lyukmanova, E. N.; Shulepko, M. A.; Kudryavtsev, D.; Bychkov, M. L.; Kulbatskii, D. S.; Kasheverov, I. E.; Astapova, M. V.; Feofanov, A. V.; Thomsen, M. S.; Mikkelsen, J. D.; Shenkarev, Z. O.; Tsetlin, V. I.; Dolgikh, D. A.; Kirpichnikov, M. P. (2016): Human secreted Ly-6/uPAR related protein-1 (SLURP-1) is a selective allosteric antagonist of $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor. *PloS one* 11 (2): e0149733.
- Madrahimov, N.; Boyle, E. C.; Gueler, F.; Goecke, T.; Knöfel, A.-K.; Irkha, V.; Maegel, L.; Höffler, K.; Natanov, R.; Ismail, I.; Maus, U.; Kühn, C.; Warnecke, G.; Shrestha, M.-L.; Cebotari, S.; Haverich, A. (2018): Novel mouse model of cardiopulmonary bypass. *European journal of cardio-thoracic surgery: official journal of the European Association for Cardio-thoracic Surgery* 53 (1): 186–193.

- Mariathasan, S.; Weiss, D. S.; Newton, K.; McBride, J.; O'Rourke, K.; Roose-Girma, M.; Lee, W. P.; Weinrauch, Y.; Monack, D. M.; Dixit, V. M. (2006): Cryopyrin activates the inflammasome in response to toxins and ATP. *Nature* 440 (7081): 228–232.
- Martinon, F.; Burns, K.; Tschopp, J. (2002): The inflammasome. A molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta. *Molecular cell* 10 (2): 417–426.
- Martinon, F.; Mayor, A.; Tschopp, J. (2009): The inflammasomes: guardians of the body. *Annual review of immunology* 27: 229–265.
- Martinon, F.; Pétrilli, V.; Mayor, A.; Tardivel, A.; Tschopp, J. (2006): Gout-associated uric acid crystals activate the NALP3 inflammasome. *Nature* 440 (7081): 237–241.
- Matzinger, P. (1994): Tolerance, danger, and the extended family. *Annual review of immunology* 12: 991–1045.
- McIntosh, J. M.; Absalom, N.; Chebib, M.; Elgoyhen, A. B.; Vincler, M. (2009): Alpha9 nicotinic acetylcholine receptors and the treatment of pain. *Biochemical pharmacology* 78 (7): 693–702.
- Medzhitov, R. (2001): Toll-like receptors and innate immunity. *Nature reviews. Immunology* 1 (2): 135–145.
- Millar, J. E.; Fanning, J. P.; McDonald, C. I.; McAuley, D. F.; Fraser, J. F. (2016): The inflammatory response to extracorporeal membrane oxygenation (ECMO): a review of the pathophysiology. *Critical care (London, England)* 20 (1): 387.
- Minutoli, L.; Puzzolo, D.; Rinaldi, M.; Irrera, N.; Marini, H.; Arcoraci, V.; Bitto, A.; Crea, G.; Pisani, A.; Squadrito, F.; Trichilo, V.; Bruschetta, D.; Micali, A.; Altavilla, D. (2016): ROS-mediated NLRP3 inflammasome activation in brain, heart, kidney, and testis ischemia/reperfusion injury. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2016.
- Moraga, F.; Janciauskiene, S. (2000): Activation of primary human monocytes by the oxidized form of alpha1-antitrypsin. *The Journal of biological chemistry* 275 (11): 7693–7700.
- Moser, N.; Mechawar, N.; Jones, I.; Gochberg-Sarver, A.; Orr-Urtreger, A.; Plomann, M.; Salas, R.; Molles, B.; Marubio, L.; Roth, U.; Maskos, U.; Winzer-Serhan, U.; Bourgeois, J.-P.; Le Sourd, A.-M.; Biasi, M. de; Schröder, H.; Lindstrom, J.; Maelicke, A.; Changeux, J.-P.; Wevers, A. (2007): Evaluating the suitability of nicotinic acetylcholine receptor antibodies for standard immunodetection procedures. *Journal of neurochemistry* 102 (2): 479–492.
- Mulgrew, A. T.; Taggart, C. C.; Lawless, M. W.; Greene, C. M.; Brantly, M. L.; O'Neill, S. J.; McElvaney, N. G. (2004): Z alpha1-antitrypsin polymerizes in the lung and acts as a neutrophil chemoattractant. *Chest* 125 (5): 1952–1957.
- Mullen, A.; Loscher, C. E.; Roche, H. M. (2010): Anti-inflammatory effects of EPA and DHA are dependent upon time and dose-response elements associated with LPS stimulation in THP-1-derived macrophages. *The Journal of nutritional biochemistry* 21 (5): 444–450.

- Neumann, S.; Razen, M.; Habermehl, P.; Meyer, C. U.; Zepp, F.; Kirkpatrick, C. J.; Wessler, I. (2007): The non-neuronal cholinergic system in peripheral blood cells: effects of nicotinic and muscarinic receptor antagonists on phagocytosis, respiratory burst and migration. *Life sciences* 80 (24-25): 2361–2364.
- Nita, I.; Hollander, C.; Westin, U.; Janciauskiene, S.-M. (2005): Prolastin, a pharmaceutical preparation of purified human alpha1-antitrypsin, blocks endotoxin-mediated cytokine release. *Respiratory research* 6: 12.
- Nita, I. M.; Serapinas, D.; Janciauskiene, S. M. (2007): alpha1-Antitrypsin regulates CD14 expression and soluble CD14 levels in human monocytes in vitro. *The international journal of biochemistry & cell biology* 39 (6): 1165–1176.
- O'Donnell, V. B.; Rossjohn, J.; Wakelam, M. J. (2018): Phospholipid signaling in innate immune cells. *The Journal of clinical investigation*.
- Ohashi, K.; Burkart, V.; Flohé, S.; Kolb, H. (2000): Cutting edge. Heat shock protein 60 is a putative endogenous ligand of the toll-like receptor-4 complex. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 164 (2): 558–561.
- Olofsson, P. S.; Rosas-Ballina, M.; Levine, Y. A.; Tracey, K. J. (2012): Rethinking inflammation. Neural circuits in the regulation of immunity. *Immunological reviews* 248 (1): 188–204.
- Ozeri, E.; Mizrahi, M.; Shahaf, G.; Lewis, E. C. (2012): α -1 antitrypsin promotes semimature, IL-10-producing and readily migrating tolerogenic dendritic cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 189 (1): 146–153.
- Padrines, M.; Schneider-Pozzer, M.; Bieth, J. G. (1989): Inhibition of neutrophil elastase by alpha-1-proteinase inhibitor oxidized by activated neutrophils. *The American review of respiratory disease* 139 (3): 783–790.
- Perlmutter, D. H.; Kay, R. M.; Cole, F. S.; Rossing, T. H.; van Thiel, D.; Colten, H. R. (1985): The cellular defect in alpha 1-proteinase inhibitor (alpha 1-PI) deficiency is expressed in human monocytes and in *Xenopus* oocytes injected with human liver mRNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 82 (20): 6918–6921.
- Perlmutter, D. H.; Punsal, P. I. (1988): Distinct and additive effects of elastase and endotoxin on expression of alpha 1 proteinase inhibitor in mononuclear phagocytes. *The Journal of biological chemistry* 263 (31): 16499–16503.
- Petrache, I.; Fijalkowska, I.; Medler, T. R.; Skirball, J.; Cruz, P.; Zhen, L.; Petrache, H. I.; Flotte, T. R.; Tuder, R. M. (2006): α -1 antitrypsin inhibits caspase-3 activity, preventing lung endothelial cell apoptosis. *The American Journal of Pathology* 169 (4): 1155–1166.
- Pétrilli, V.; Papin, S.; Dostert, C.; Mayor, A.; Martinon, F.; Tschopp, J. (2007): Activation of the NALP3 inflammasome is triggered by low intracellular potassium concentration. *Cell death and differentiation* 14 (9): 1583–1589.

- Pickering, N. J.; Brody, J. I.; Fink, G. B.; Finnegan, J. O.; Ablaza, S. (1983): The behavior of Antithrombin III, alpha 2 macroglobulin, and alpha 1 antitrypsin during cardiopulmonary bypass. *American Journal of Clinical Pathology* 80 (4): 459–464.
- Platnich, J. M.; Muruve, D. A. (2019): NOD-like receptors and inflammasomes: a review of their canonical and non-canonical signaling pathways. *Archives of biochemistry and biophysics*.
- Pott, G. B.; Chan, E. D.; Dinarello, C. A.; Shapiro, L. (2009): Alpha-1-antitrypsin is an endogenous inhibitor of proinflammatory cytokine production in whole blood. *Journal of leukocyte biology* 85 (5): 886–895.
- Pries, A. R. (2019): Microvascular hemodynamics: System properties1. *Biorheology* 56 (1): 1–13.
- Prondzinsky, R.; Knüpfer, A.; Loppnow, H.; Redling, F.; Lehmann, D. W.; Stabenow, I.; Witthaut, R.; Unverzagt, S.; Radke, J.; Zerkowski, H.-R.; Werdan, K. (2005): Surgical trauma affects the proinflammatory status after cardiac surgery to a higher degree than cardiopulmonary bypass. *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery* 129 (4): 760–766.
- Ray, M. B.; Geboes, K.; Callea, F.; Desmet, V. J. (1982): Alpha-1-antitrypsin immunoreactivity in gastric carcinoid. *Histopathology* 6 (3): 289–297.
- Rehm, S. R. T.; Smirnova, N. F.; Morrone, C.; Götzfried, J.; Feuchtinger, A.; Pedersen, J.; Korkmaz, B.; Yildirim, A. Ö.; Jenne, D. E. (2019): Premedication with a cathepsin C inhibitor alleviates early primary graft dysfunction in mouse recipients after lung transplantation. *Scientific reports* 9 (1): 9925.
- Relja, B.; Horstmann, J. P.; Konradowitz, K.; Jurida, K.; Schaible, A.; Neunaber, C.; Oppermann, E.; Marzi, I. (2015): Nlrp1 inflammasome is downregulated in trauma patients. *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)* 93 (12): 1391–1400.
- Ren, K.; Torres, R. (2009): Role of interleukin-1beta during pain and inflammation. *Brain research reviews* 60 (1): 57–64.
- Richter, K.; Koch, C.; Perniss, A.; Wolf, P. M.; Schweda, E. K. H.; Wichmann, S.; Wilker, S.; Magel, I.; Sander, M.; McIntosh, J. M.; Padberg, W.; Grau, V. (2018a): Phosphocholine-modified lipooligosaccharides of haemophilus influenzae inhibit ATP-induced IL-1 β release by pulmonary epithelial cells. *Molecules (Basel, Switzerland)* 23 (8).
- Richter, K.; Mathes, V.; Fronius, M.; Althaus, M.; Hecker, A.; Krasteva-Christ, G.; Padberg, W.; Hone, A. J.; McIntosh, J. M.; Zakrzewicz, A.; Grau, V. (2016): Phosphocholine - an agonist of metabotropic but not of ionotropic functions of α 9-containing nicotinic acetylcholine receptors. *Scientific reports* 6: 28660.
- Richter, K.; Sagawe, S.; Hecker, A.; Küllmar, M.; Askevold, I.; Damm, J.; Heldmann, S.; Pöhlmann, M.; Ruhrmann, S.; Sander, M.; Schlüter, K.-D.; Wilker, S.; König, I. R.; Kummer, W.; Padberg, W.; Hone, A. J.; McIntosh, J. M.; Zakrzewicz, A. T.; Koch, C.; Grau, V. (2018b): C-reactive protein stimulates nicotinic acetylcholine receptors to control ATP-mediated monocytic inflammasome activation. *Frontiers in immunology* 9: 1604.

- Rocke, D. A.; Gaffin, S. L.; Wells, M. T.; Koen, Y.; Brock-Utine, J. G. (1987): Endotoxemia associated with cardiopulmonary bypass. *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery* 93 (6): 832–837.
- Rommel, F. R.; Raghavan, B.; Paddenberg, R.; Kummer, W.; Tumala, S.; Lochnit, G.; Gieler, U.; Peters, E. M. J. (2015): Suitability of nicotinic acetylcholine receptor $\alpha 7$ and muscarinic acetylcholine receptor 3 antibodies for immune detection: evaluation in murine skin. *The journal of histochemistry and cytochemistry: official journal of the Histochemistry Society* 63 (5): 329–339.
- Rosas-Ballina, M.; Olofsson, P. S.; Ochani, M.; Valdés-Ferrer, S. I.; Levine, Y. A.; Reardon, C.; Tusche, M. W.; Pavlov, V. A.; Andersson, U.; Chavan, S.; Mak, T. W.; Tracey, K. J. (2011): Acetylcholine-synthesizing T cells relay neural signals in a vagus nerve circuit. *Science (New York, N.Y.)* 334 (6052): 98–101.
- Rosas-Ballina, M.; Tracey, K. J. (2009): Cholinergic control of inflammation. *Journal of internal medicine* 265 (6): 663–679.
- Rossi, M.; Sganga, G.; Mazzone, M.; Valenza, V.; Guarneri, S.; Portale, G.; Carbone, L.; Gatta, L.; Pioli, C.; Sanguinetti, M.; Montalto, M.; Glieca, F.; Fadda, G.; Schiavello, R.; Silveri, N. G. (2004): Cardiopulmonary bypass in man: role of the intestine in a self-limiting inflammatory response with demonstrable bacterial translocation. *The Annals of thoracic surgery* 77 (2): 612–618.
- Roth-Isigkeit; Borstel; Seyfarth; Schmucker (1999): Perioperative serum levels of tumour-necrosis-factor alpha (TNF-alpha), IL-1beta, IL-6, IL-10 and soluble IL-2 receptor in patients undergoing cardiac surgery with cardiopulmonary bypass without and with correction for haemodilution. *Clinical and experimental immunology* 118 (2): 242–246.
- Ruta Aldonyte (2004): concentration-dependent effects of native and polymerized $\alpha 1$ -antitrypsin on primary human monocytes in vitro.
- Säid-Sadier, N.; Ojcius, D. M. (2012): Alarmins, inflammasomes and immunity. *Biomedical journal* 35 (6): 437–449.
- Sarkar, M.; Prabhu, V. (2017): Basics of cardiopulmonary bypass. *Indian journal of anaesthesia* 61 (9): 760–767.
- Sauaia, A.; Moore, F. A.; Moore, E. (2017): Postinjury inflammation and organ dysfunction. *Critical care clinics* 33 (1): 167–191.
- Schneider, E. M.; Vorlaender, K.; Ma, X.; Du, W.; Weiss, M. (2006): Role of ATP in trauma-associated cytokine release and apoptosis by P2X7 ion channel stimulation. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1090: 245–252.
- Shao, B.-Z.; Xu, Z.-Q.; Han, B.-Z.; Su, D.-F.; Liu, C. (2015): NLRP3 inflammasome and its inhibitors: a review. *Frontiers in Pharmacology* 6: 262.

- Shimada, K.; Crother, T. R.; Karlin, J.; Dagvadorj, J.; Chiba, N.; Chen, S.; Ramanujan, V. K.; Wolf, A. J.; Vergnes, L.; Ojcius, D. M.; Rentsendorj, A.; Vargas, M.; Guerrero, C.; Wang, Y.; Fitzgerald, K. A.; Underhill, D. M.; Town, T.; Arditi, M. (2012): Oxidized mitochondrial DNA activates the NLRP3 inflammasome during apoptosis. *Immunity* 36 (3): 401–414.
- Siebers, K.; Fink, B.; Zakrzewicz, A.; Agne, A.; Richter, K.; Konzok, S.; Hecker, A.; Zukunft, S.; Kullmar, M.; Klein, J.; McIntosh, J. M.; Timm, T.; Sewald, K.; Padberg, W.; Aggarwal, N.; Chamulitrat, W.; Santoso, S.; Xia, W.; Janciauskiene, S.; Grau, V. (2018): Alpha-1 antitrypsin inhibits ATP-mediated release of interleukin-1beta via CD36 and nicotinic acetylcholine receptors. *Frontiers in immunology* 9: 877.
- Siminelakis, S.; Bossinakou, I.; Antoniou, F.; Pallanza, Z.; Tolios, J.; Vasilogiannakopoulou, D.; Kasapli, M.; Parigori, P.; Chlapoutakis, E. (1996): A study of the effects of extracorporeal circulation on the immunologic system of humans. *Journal of cardiothoracic and vascular anesthesia* 10 (7): 893–898.
- Singer, M.; Deutschman, C. S.; Seymour, C. W.; Shankar-Hari, M.; Annane, D.; Bauer, M.; Bellomo, R.; Bernard, G. R.; Chiche, J.-D.; Coopersmith, C. M.; Hotchkiss, R. S.; Levy, M. M.; Marshall, J. C.; Martin, G. S.; Opal, S. M.; Rubenfeld, G. D.; van der Poll, T.; Vincent, J.-L.; Angus, D. C. (2016): The third international consensus definitions for sepsis and septic shock (sepsis-3). *JAMA* 315 (8): 801–810.
- Sobrinho, J.; Shafi, S. (2013): Timing and causes of death after injuries. *Proceedings (Baylor University Medical Center)* 26 (2): 120–123.
- Sohrab, S.; Petrusca, D. N.; Lockett, A. D.; Schweitzer, K. S.; Rush, N. I.; Gu, Y.; Kamocki, K.; Garrison, J.; Petrache, I. (2009): Mechanism of alpha-1 antitrypsin endocytosis by lung endothelium. *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 23 (9): 3149–3158.
- Stack, J. H.; Beaumont, K.; Larsen, P. D.; Straley, K. S.; Henkel, G. W.; Randle, J. C. R.; Hoffman, H. M. (2005): IL-converting enzyme/caspase-1 inhibitor VX-765 blocks the hypersensitive response to an inflammatory stimulus in monocytes from familial cold autoinflammatory syndrome patients. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 175 (4): 2630–2634.
- Stark, K. D.; van Elswyk, M. E.; Higgins, M. R.; Weatherford, C. A.; Salem, N. (2016): Global survey of the omega-3 fatty acids, docosahexaenoic acid and eicosapentaenoic acid in the blood stream of healthy adults. *Progress in lipid research* 63: 132–152.
- Starzl, R.; Wolfram, D.; Zamora, R.; Jefferson, B.; Barclay, D.; Ho, C.; Gorantla, V.; Brandacher, G.; Schneeberger, S.; Andrew Lee, W. P.; Carbonell, J.; Vodovotz, Y. (2015): Cardiac arrest disrupts caspase-1 and patterns of inflammatory mediators differently in skin and muscle following localized tissue injury in rats: insights from data-driven modeling. *Frontiers in Immunology* 6.

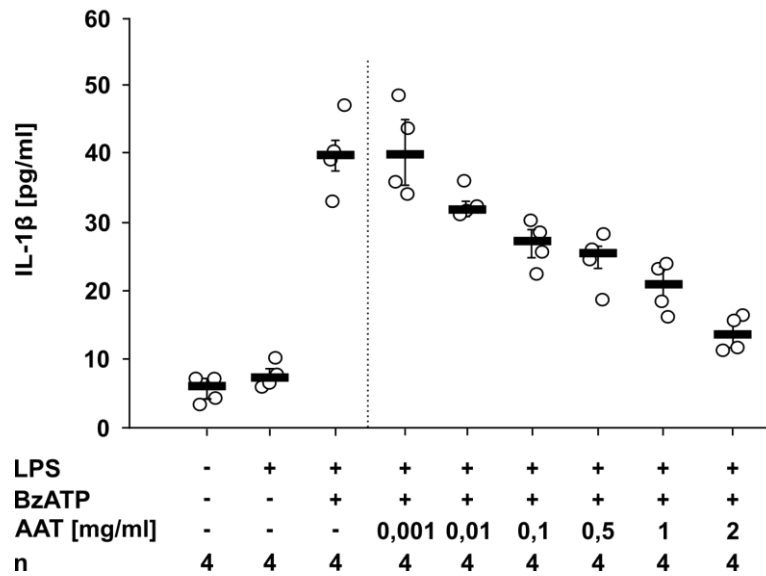
- Stock, C.; Schilling, T.; Schwab, A.; Eder, C. (2006): Lysophosphatidylcholine stimulates IL-1beta release from microglia via a P2X7 receptor-independent mechanism. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 177 (12): 8560–8568.
- Stoffels, M.; Zaal, R.; Kok, N.; van der Meer, J. W. M.; Dinarello, C. A.; Simon, A. (2015): ATP-induced IL-1 β specific secretion: true under stringent conditions. *Frontiers in immunology* 6: 54.
- Subramaniam, D.; Glader, P.; Wachenfeldt, K. von; Burneckiene, J.; Stevens, T.; Janciauskiene, S. (2006): C-36 peptide, a degradation product of alpha1-antitrypsin, modulates human monocyte activation through LPS signaling pathways. *The international journal of biochemistry & cell biology* 38 (4): 563–575.
- Sutterwala, F. S.; Ogura, Y.; Szczepanik, M.; Lara-Tejero, M.; Lichtenberger, G. S.; Grant, E. P.; Bertin, J.; Coyle, A. J.; Galán, J. E.; Askenase, P. W.; Flavell, R. A. (2006): Critical role for NALP3/CIAS1/Cryopyrin in innate and adaptive immunity through its regulation of caspase-1. *Immunity* 24 (3): 317–327.
- Taggart, C.; Cervantes-Laurean, D.; Kim, G.; McElvaney, N. G.; Wehr, N.; Moss, J.; Levine, R. L. (2000): Oxidation of either methionine 351 or methionine 358 in alpha 1-antitrypsin causes loss of anti-neutrophil elastase activity. *The Journal of biological chemistry* 275 (35): 27258–27265.
- Tansey, E. M. (2006): Henry Dale and the discovery of acetylcholine. *Comptes rendus biologiques* 329 (5-6): 419–425.
- Ter Horst, R.; Jaeger, M.; Smeekens, S. P.; Oosting, M.; Swertz, M. A.; Li, Y.; Kumar, V.; Diavatopoulos, D. A.; Jansen, A. F. M.; Lemmers, H.; Toenhake-Dijkstra, H.; van Herwaarden, A. E.; Janssen, M.; van der Molen, R. G.; Joosten, I.; Sweep, F. C. G. J.; Smit, J. W.; Netea-Maier, R. T.; Koenders, M. M. J. F.; Xavier, R. J.; van der Meer, J. W. M.; Dinarello, C. A.; Pavelka, N.; Wijmenga, C.; Notebaart, R. A.; Joosten, L. A. B.; Netea, M. G. (2016): Host and environmental factors influencing individual human cytokine responses. *Cell* 167 (4): 1111-1124.e13.
- Tilg, H.; Vannier, E.; Vachino, G.; Dinarello, C. A.; Mier, J. W. (1993): Antiinflammatory properties of hepatic acute phase proteins: preferential induction of interleukin 1 (IL-1) receptor antagonist over IL-1 beta synthesis by human peripheral blood mononuclear cells. *The Journal of experimental medicine* 178 (5): 1629–1636.
- Torres-Durán, M.; Lopez-Campos, J. L.; Barrecheguren, M.; Miravittles, M.; Martínez-Delgado, B.; Castillo, S.; Escribano, A.; Balóira, A.; Navarro-García, M. M.; Pellicer, D.; Bañuls, L.; Magallón, M.; Casas, F.; Dasí, F. (2018): Alpha-1 antitrypsin deficiency: outstanding questions and future directions. *Orphanet journal of rare diseases* 13 (1): 114.
- Tosato, G.; Jones, K. D. (1990): Interleukin-1 induces interleukin-6 production in peripheral blood monocytes. *Blood* 75 (6): 1305–1310.

- Tracey, K. J. (2002): The inflammatory reflex. *Nature* 420 (6917): 853–859.
- Tsan, M.-F.; Gao, B. (2004): Endogenous ligands of Toll-like receptors. *Journal of leukocyte biology* 76 (3): 514–519.
- Tschoeke, S. K.; Hellmuth, M.; Hostmann, A.; Ertel, W.; Oberholzer, A. (2007): The early second hit in trauma management augments the proinflammatory immune response to multiple injuries. *The Journal of trauma* 62 (6): 1396-403; discussion 1403-4.
- Ueda, M.; Mashiba, S.; Uchida, K. (2002): Evaluation of oxidized alpha-1-antitrypsin in blood as an oxidative stress marker using anti-oxidative alpha1-AT monoclonal antibody. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry* 317 (1-2): 125–131.
- van Molle, W.; Libert, C.; Fiers, W.; Brouckaert, P. (1997): Alpha 1-acid glycoprotein and alpha 1-antitrypsin inhibit TNF-induced but not anti-Fas-induced apoptosis of hepatocytes in mice. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 159 (7): 3555–3564.
- Vanzant, E. L.; Lopez, C. M.; Ozrazgat-Baslanti, T.; Ungaro, R.; Davis, R.; Cuenca, A. G.; Gentile, L. F.; Nacionales, D. C.; Cuenca, A. L.; Bihorac, A.; Leeuwenburgh, C.; Lanz, J.; Baker, H. V.; McKinley, B.; Moldawer, L. L.; Moore, F. A.; Efron, P. A. (2014): Persistent inflammation, immunosuppression, and catabolism syndrome after severe blunt trauma. *The journal of trauma and acute care surgery* 76 (1): 21-9; discussion 29-30.
- Vaure, C.; Liu, Y. (2014): A comparative review of toll-like receptor 4 expression and functionality in different animal species. *Frontiers in immunology* 5: 316.
- Voronov, E.; Shouval, D. S.; Krelin, Y.; Cagnano, E.; Benharroch, D.; Iwakura, Y.; Dinarello, C. A.; Apte, R. N. (2003): IL-1 is required for tumor invasiveness and angiogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100 (5): 2645–2650.
- Wan, S.; LeClerc, J. L.; Vincent, J. L. (1997): Inflammatory response to cardiopulmonary bypass: mechanisms involved and possible therapeutic strategies. *Chest* 112 (3): 676–692.
- Wang, H.; Yu, M.; Ochani, M.; Amella, C. A.; Tanovic, M.; Susarla, S.; Li, J. H.; Wang, H.; Yang, H.; Ulloa, L.; Al-Abed, Y.; Czura, C. J.; Tracey, K. J. (2003): Nicotinic acetylcholine receptor alpha7 subunit is an essential regulator of inflammation. *Nature* 421 (6921): 384–388.
- Warren, O. J.; Smith, A. J.; Alexiou, C.; Rogers, P. L. B.; Jawad, N.; Vincent, C.; Darzi, A. W.; Athanasiou, T. (2009): The inflammatory response to cardiopulmonary bypass: part 1--mechanisms of pathogenesis. *Journal of cardiothoracic and vascular anesthesia* 23 (2): 223–231.
- Xiao, W.; Mindrinos, M. N.; Seok, J.; Cuschieri, J.; Cuenca, A. G.; Gao, H.; Hayden, D. L.; Hennessy, L.; MOORE, E. E.; Minei, J. P.; Bankey, P. E.; Johnson, J. L.; Sperry, J.; Nathens, A. B.; Billiar, T. R.; West, M. A.; Brownstein, B. H.; Mason, P. H.; Baker, H. V.; Finnerty, C. C.; Jeschke, M. G.; López, M. C.; Klein, M. B.; Gamelli, R. L.; Gibran, N. S.; Arnoldo, B.; Xu, W.; Zhang, Y.; Calvano, S. E.; McDonald-Smith, G. P.; Schoenfeld, D. A.; Storey, J. D.; Cobb, J. P.; Warren, H. S.; Moldawer, L. L.; Herndon, D. N.; Lowry, S. F.; Maier, R. V.;

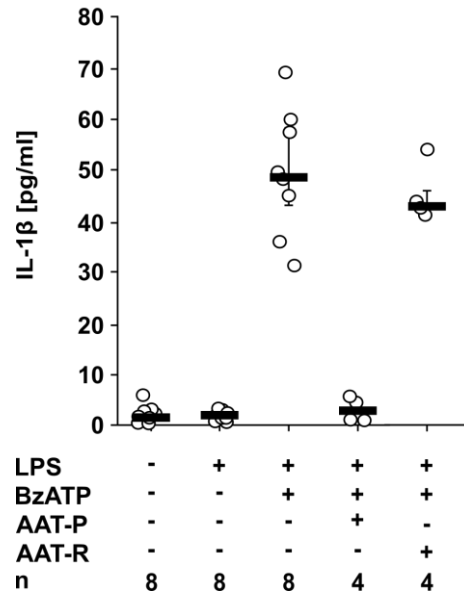
- Davis, R. W.; Tompkins, R. G. (2011): A genomic storm in critically injured humans. *The Journal of experimental medicine* 208 (13): 2581–2590.
- Yamamoto, M.; Yaginuma, K.; Tsutsui, H.; Sagara, J.; Guan, X.; Seki, E.; Yasuda, K.; Yamamoto, M.; Akira, S.; Nakanishi, K.; Noda, T.; Taniguchi, S. (2004): ASC is essential for LPS-induced activation of procaspase-1 independently of TLR-associated signal adaptor molecules. *Genes to cells: devoted to molecular & cellular mechanisms* 9 (11): 1055–1067.
- Yusa, T.; Nohara, A.; Sunagawa, M. (1995): Relationship between plasma neutrophil elastase and respiratory index of patients who had undergone cardiac surgery with cardiopulmonary bypass. *Journal of anesthesia* 9 (4): 324–328.
- Zakkar, M.; Ascione, R.; James, A. F.; Angelini, G. D.; Suleiman, M. S. (2015): Inflammation, oxidative stress and postoperative atrial fibrillation in cardiac surgery. *Pharmacology & therapeutics* 154: 13–20.
- Zakrzewicz, A.; Richter, K.; Agné, A.; Wilker, S.; Siebers, K.; Fink, B.; Krasteva-Christ, G.; Althaus, M.; Padberg, W.; Hone, A. J.; McIntosh, J. M.; Grau, V. (2017): Canonical and novel non-canonical cholinergic agonists inhibit ATP-induced release of monocytic interleukin-1 β via different combinations of nicotinic acetylcholine receptor subunits α 7, α 9 and α 10. *Frontiers in Cellular Neuroscience* 11: 189.
- Zakrzewicz, A.; Richter, K.; Zakrzewicz, D.; Siebers, K.; Damm, J.; Agné, A.; Hecker, A.; McIntosh, J. M.; Chamulitrat, W.; Krasteva-Christ, G.; Manzini, I.; Tikkanen, R.; Padberg, W.; Janciauskiene, S.; Grau, V. (2019): SLPI inhibits ATP-mediated maturation of IL-1 β in human monocytic leukocytes: a novel function of an old player. *Frontiers in immunology* 10: 664.
- Zhang, Y.; DeWitt, D. L.; McNeely, T. B.; Wahl, S. M.; Wahl, L. M. (1997): Secretory leukocyte protease inhibitor suppresses the production of monocyte prostaglandin H synthase-2, prostaglandin E2, and matrix metalloproteinases. *The Journal of clinical investigation* 99 (5): 894–900.

7 Anhang

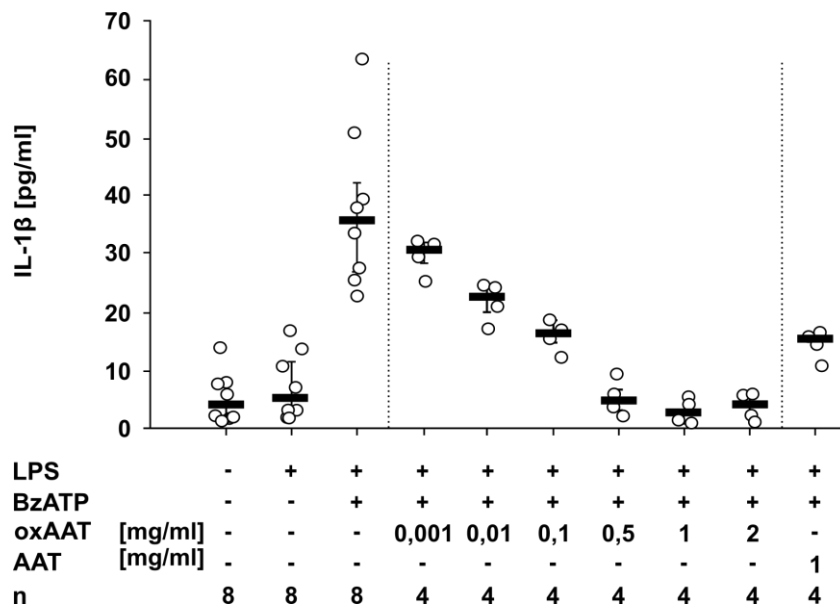
7.1 Ergänzende Abbildungen



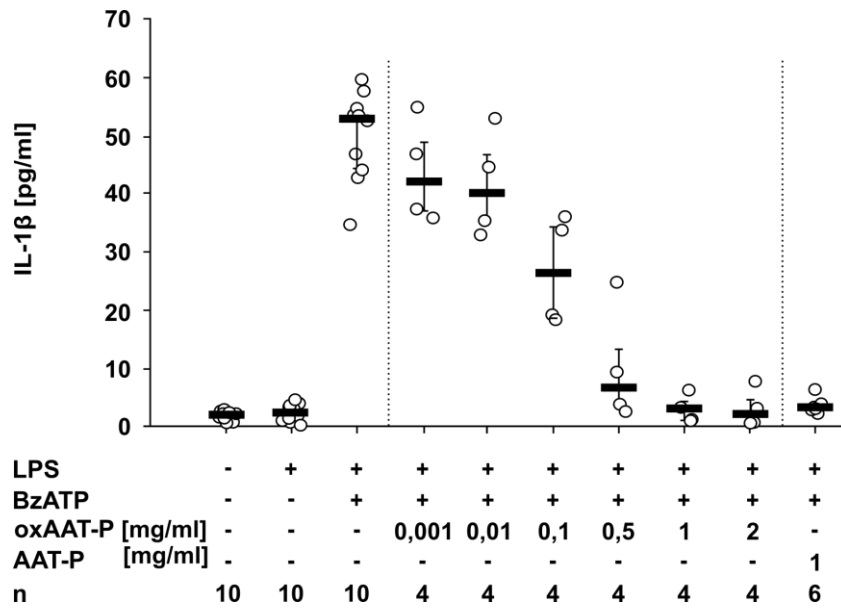
Ergänzende Abbildung 1: Inhibition der Interleukin-1 β (IL-1 β)-Freisetzung aus mit Lipopolysaccharid (LPS) stimulierten und mit BzATP behandelten U937-Zellen durch aus gesunden Probanden aufgereinigtes AAT. Dargestellt sind die mit Abbildung 6 korrespondierenden Absolutwerte. Die Einzelwerte sind als Punkte dargestellt, die Balken entsprechen den Medianen und die Antennen den Perzentilen 25 und 75. BzATP, 2'(3')-O-(4-Benzoylbenzoyl)adenosin-5'-triphosphat (100 μ M).



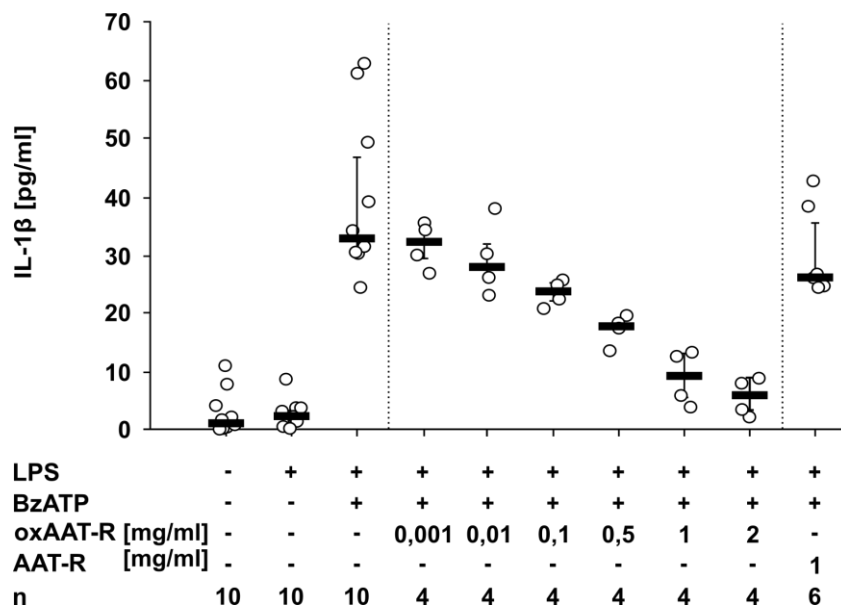
Ergänzende Abbildung 3: Inhibition der Interleukin-1 β (IL-1 β)-Freisetzung aus mit Lipopolysaccharid (LPS) stimulierten und mit BzATP behandelten U937-Zellen durch Prolastin[®] und Respreeza[®]. Dargestellt sind die mit Abbildung 17 korrespondierenden Absolutwerte. Die Einzelwerte sind als Punkte dargestellt, die Balken entsprechen den Medianen und die Antennen den Perzentilen 25 und 75. BzATP, 2'(3')-O-(4-Benzoylbenzoyl)adenosin-5'-triphosphat (100 μ M); AAT-P, Prolastin[®] (1 mg/ml); AAT-R, Respreeza[®] (1 mg/ml).



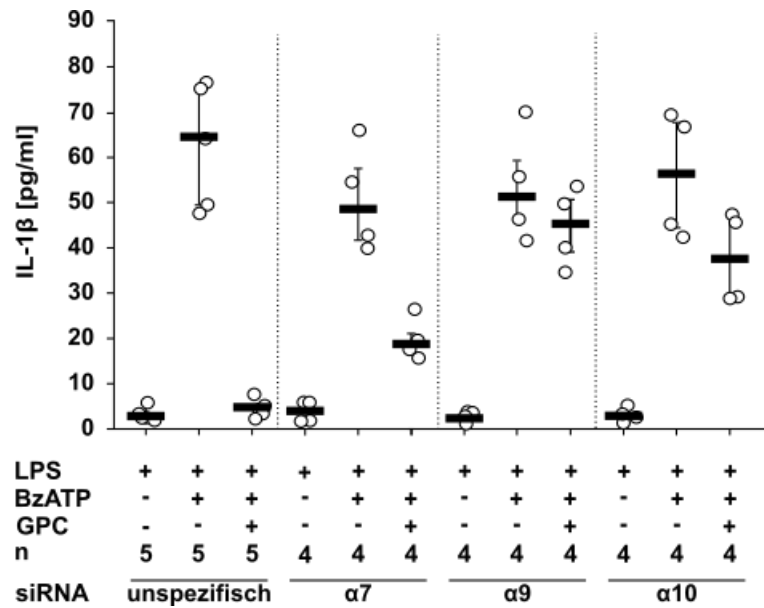
Ergänzende Abbildung 4: Inhibition der Interleukin-1 β (IL-1 β)-Freisetzung aus mit Lipopolysaccharid (LPS) stimulierten und mit BzATP behandelten U937-Zellen durch AAT und oxidiertes AAT. Dargestellt sind die mit Abbildung 18 korrespondierenden Absolutwerte. Die Einzelwerte sind als Punkte dargestellt, die Balken entsprechen den Medianen und die Antennen den Perzentilen 25 und 75. BzATP, 2'(3')-O-(4-Benzoylbenzoyl)adenosin-5'-triphosphat (100 μ M); oxAAT; oxidiertes AAT.



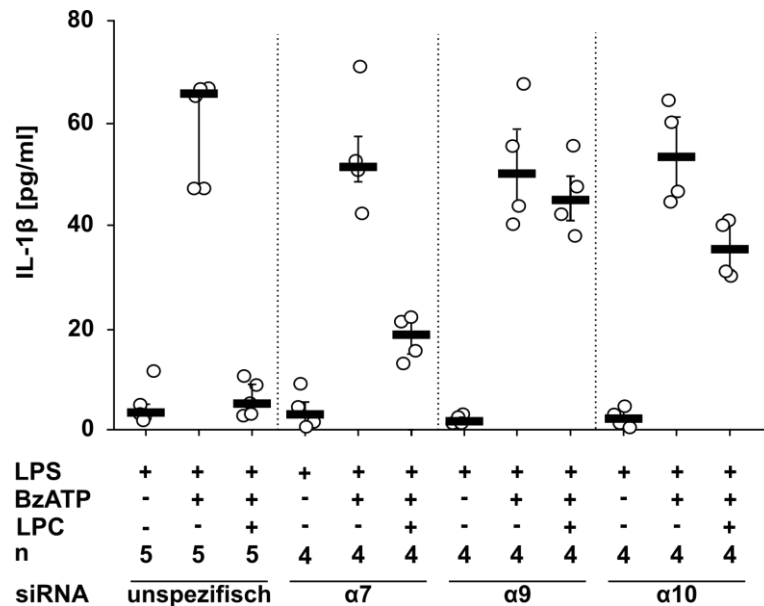
Ergänzende Abbildung 5: Inhibition der Interleukin-1 β (IL-1 β)-Freisetzung aus mit Lipopolysaccharid (LPS) stimulierten und mit BzATP behandelten U937-Zellen durch Prolastin[®] und oxidiertes Prolastin[®]. Dargestellt sind die mit Abbildung 19 korrespondierenden Absolutwerte. Die Einzelwerte sind als Punkte dargestellt, die Balken entsprechen den Medianen und die Antennen den Perzentilen 25 und 75. BzATP, 2'(3')-O-(4-Benzoylbenzoyl)adenosin-5'-triphosphat (100 μ M); oxAAT-P, oxidiertes Prolastin[®]; AAT-P, Prolastin[®].



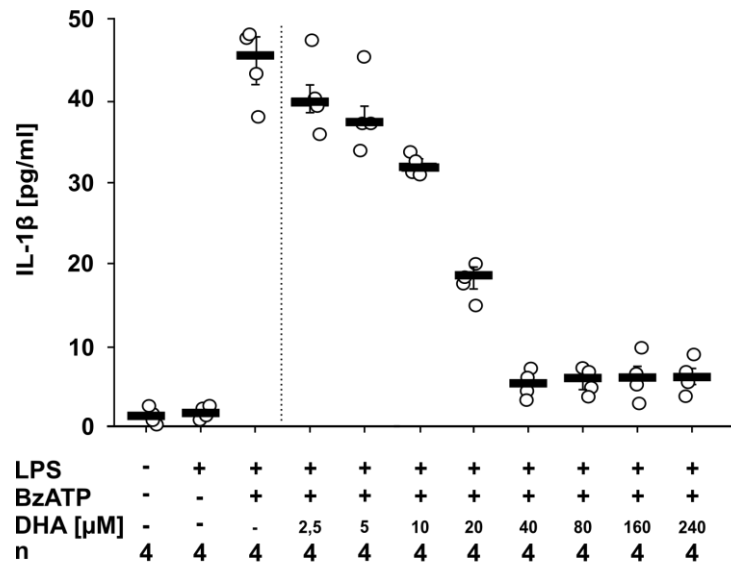
Ergänzende Abbildung 6: Inhibition der Interleukin-1 β (IL-1 β)-Freisetzung aus mit Lipopolysaccharid (LPS) stimulierten und mit BzATP behandelten U937-Zellen durch Respreeza[®] und oxidiertes Respreeza[®]. Dargestellt sind die mit Abbildung 20 korrespondierenden Absolutwerte. Die Einzelwerte sind als Punkte dargestellt, die Balken entsprechen den Medianen und die Antennen den Perzentilen 25 und 75. BzATP, 2'(3')-O-(4-Benzoylbenzoyl)adenosin-5'-triphosphat (100 μ M); oxAAT-R, oxidiertes Respreeza[®]; AAT-R, Respreeza[®].



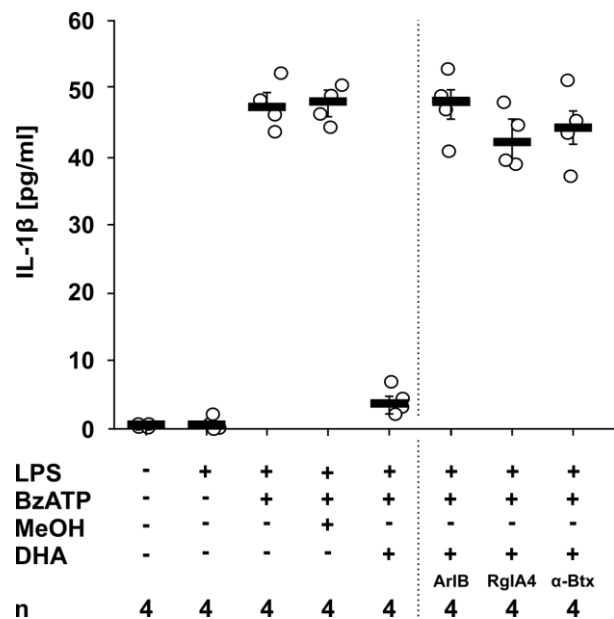
Ergänzende Abbildung 7: Inhibition der Interleukin-1 β (IL-1 β)-Freisetzung aus mit Lipopolysaccharid (LPS) stimulierten und mit BzATP behandelten U937-Zellen durch GPC bei verminderter Expression der nAChR-Untereinheiten α 7, α 9 und α 10. Dargestellt sind die mit Abbildung 23 korrespondierenden Absolutwerte. Die Einzelwerte sind als Punkte dargestellt, die Balken entsprechen den Medianen und die Antennen den Perzentilen 25 und 75. BzATP, 2'(3')-O-(4-Benzoylbenzoyl)adenosin-5'-triphosphat (100 μ M); GPC, Glycerophosphocholin (100 μ M).



Ergänzende Abbildung 8: Inhibition der Interleukin-1 β (IL-1 β)-Freisetzung aus mit Lipopolysaccharid (LPS) stimulierten und mit BzATP behandelten U937-Zellen durch LPC bei verminderter Expression der nAChR-Untereinheiten α 7, α 9 und α 10. Dargestellt sind die mit Abbildung 24 korrespondierenden Absolutwerte. Die Einzelwerte sind als Punkte dargestellt, die Balken entsprechen den Medianen und die Antennen den Perzentilen 25 und 75. BzATP, 2'(3')-O-(4-Benzoylbenzoyl)adenosin-5'-triphosphat (100 μ M); LPC, Lysophosphatidylcholin (10 μ M).



Ergänzende Abbildung 9: Inhibition der Interleukin-1 β (IL-1 β)-Freisetzung aus mit Lipopolysaccharid (LPS) stimulierten und mit BzATP behandelten U937-Zellen durch DHA. Dargestellt sind die mit Abbildung 25 korrespondierenden Absolutwerte. Die Einzelwerte sind als Punkte dargestellt, die Balken entsprechen den Medianen und die Antennen den Perzentilen 25 und 75. BzATP, 2'(3')-O-(4-Benzoylbenzoyl)adenosin-5'-triphosphat (100 μ M); DHA, Docosahexaensäure (40 μ M).



Ergänzende Abbildung 10: Inhibition der Interleukin-1 β (IL-1 β)-Freisetzung aus mit Lipopolysaccharid (LPS) stimulierten und mit BzATP behandelten U937-Zellen durch DHA und dessen Antagonisierung durch ArIB, RgIA4, α -Btx. Dargestellt sind die mit Abbildung 26 korrespondierenden Absolutwerte. Die Einzelwerte sind als Punkte dargestellt, die Balken entsprechen den Medianen und die Antennen den Perzentilen 25 und 75. BzATP, 2'(3')-O-(4-Benzoylbenzoyl)adenosin-5'-triphosphat (100 μ M); MeOH, Methanol; DHA, Docosahexaensäure (40 μ M); RgIA (200 nM); ArIB, [V11L;V16D]ArIB (500 nM); α -Btx, α -Bungarotoxin (1 μ M).

8 Publikationen und Kongressbeiträge

Publikationen

- Agne, A.**; Richter, K.; Tumpara, S.; Sauer, A.-L.; Beckert, F.; Wrenger, S.; Zakrzewicz, A.; Hecker, A.; Markmann, M.; Koch, C.; Zajonz, T.; Sander, M.; Böning, A.; Padberg, W.; Janciauskiene, S.; Grau, V. (2020): Does heart surgery change the capacity of $\alpha 1$ -antitrypsin to inhibit the ATP-induced release of monocytic interleukin-1 β ? A preliminary study. *International immunopharmacology* 81: 106297.
- Zakrzewicz, A.; Richter, K.; Zakrzewicz, D.; Siebers, K.; Damm, J.; **Agne, A.**; Hecker, A.; McIntosh, J. M.; Chamulitrat, W.; Krasteva-Christ, G.; Manzini, I.; Tikkanen, R.; Padberg, W.; Janciauskiene, S.; Grau, V. (2019): SLPI inhibits ATP-mediated maturation of IL-1 β in human monocytic leukocytes: a novel function of an old player. *Frontiers in immunology* 10: 664.
- Siebers, K.; Fink, B.; Zakrzewicz, A.; **Agne, A.**; Richter, K.; Konzok, S.; Hecker, A.; Zukunft, S.; Kullmar, M.; Klein, J.; McIntosh, J. M.; Timm, T.; Sewald, K.; Padberg, W.; Aggarwal, N.; Chamulitrat, W.; Santoso, S.; Xia, W.; Janciauskiene, S.; Grau, V. (2018): Alpha-1 antitrypsin inhibits ATP-mediated release of interleukin-1beta via CD36 and nicotinic acetylcholine receptors. *Frontiers in immunology* 9: 877.
- Zakrzewicz, A.; Richter, K.; **Agne, A.**; Wilker, S.; Siebers, K.; Fink, B.; Krasteva-Christ, G.; Althaus, M.; Padberg, W.; Hone, A. J.; McIntosh, J. M.; Grau, V. (2017): Canonical and novel non-canonical cholinergic agonists inhibit ATP-induced release of monocytic interleukin-1 β via different combinations of nicotinic acetylcholine receptor subunits $\alpha 7$, $\alpha 9$ and $\alpha 10$. *Frontiers in Cellular Neuroscience* 11: 189.
- Agne A.**; Baldin JP.; Benjamin AR.; Orogo-Wenn MC.; Wichmann L.; Olson KR.; Walters DV.; Althaus M. (2015): Hydrogen sulfide decreases β -adrenergic agonist-stimulated lung liquid clearance by inhibiting ENaC-mediated transepithelial sodium absorption. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology* 308: 636–49.

Konferenzbeiträge

- 2020 Posterpräsentation auf dem 9. Jahrestreffen des Deutschen Zentrums für Lungenforschung (DZL), Travemünde
- **Agne A.**; Richter K.; Tumpara S.; Wrenger S.; Salipalli S.; Sauer AL.; Beckert F.; Zakrzewicz A.; Markmann M.; Koch C.; Zajonz T.; Böning A.; Sander M.; Padberg W.; Janciauskiene S.; Grau V. Alpha1-antitrypsin activity during cardiopulmonary bypass surgery.
- 2019 Vortrag auf dem dritten Science-Day des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität, Gießen (Bester Vortrag im Bereich „Klinische Forschung/Patientennahe Forschung“)
- **Agne A.**; Richter K.; Tumpara S.; Wrenger S.; Salipalli S.; Sauer AL.; Beckert F.; Zakrzewicz A.; Markmann M.; Koch C.; Zajonz T.; Böning A.; Sander M.; Padberg W.; Janciauskiene S.; Grau V. Inhibition of ATP-induced IL-1 β release from monocytes by alpha1-antitrypsin is not impaired during cardiopulmonary bypass.
- 2019 Posterpräsentation auf dem 5th International Symposium on Non-neuronal Acetylcholine, Long Beach, CA (Poster Award)
- **Agne A.**; Siebers K.; Fink B.; Zakrzewicz A.; Richter K.; Hecker A.; Küllmar M.; McIntosh JM.; Timm T.; Aggarwal N.; Chamulitrat W.; Koch C.; Zajonz T.; Böning A.; Sander M.; Padberg W.; Janciauskiene S.; Grau V. Alpha1-antitrypsin induces the secretion of an agonist of $\alpha 9^*$ nicotinic acetylcholine receptors that inhibit the ATP-induced release of monocytic interleukin-1 β .
- 2019 Posterpräsentation auf dem II Joint Meeting of the German Society for Immunology (DGfI) and the Italian Society of Immunology, Clinical Immunology and Allergology (SIICA), München
- **Agne A.**; Wilker S.; Salipalli S.; Richter K.; Zakrzewicz A.; Sauer AL.; Beckert F.; Koch C.; Zajonz T.; Böning A.; Sander M.; Padberg W.; Janciauskiene S.; Grau V. Inhibition of ATP-induced monocytic IL-1 β release by endogenous alpha1-antitrypsin is not affected by cardiopulmonary bypass surgery.
- 2019 Posterpräsentation auf dem 8. Jahrestreffen des Deutschen Zentrums für Lungenforschung (DZL), Mannheim
- **Agne A.**; Wilker S.; Salipalli S.; Richter K.; Zakrzewicz A.; Sauer AL.; Beckert F.; Koch C.; Zajonz T.; Böning A.; Sander M.; Padberg W.; Janciauskiene S.; Grau V. Endogenous alpha1-antitrypsin retains its potency to inhibit ATP-induced monocytic IL-1 β release during cardiopulmonary bypass surgery.

- 2018 e-Posterpräsentation auf den 22. Chirurgischen Forschungstagen, Erlangen
- **Agne A.**; Wilker S.; Salipalli S.; Richter K.; Zakrzewicz A.; Sauer AL.; Beckert F.; Koch C.; Zajonz T.; Böning A.; Sander M.; Padberg W.; Janciauskiene S.; Grau V. Alpha1-antitrypsin isolated from cardiopulmonary bypass patients retains its potency to inhibit ATP-induced monocytic IL-1 β release.
- 2018 Posterpräsentation auf der LE STUDIUM Konferenz Neurotransmitters: non-neuronal functions and therapeutic opportunities, Orléans
- Siebers K.; Fink B.; Zakrzewicz A.; Richter K.; Konzok S.; **Agne A.**; Hecker A.; Zukunft S.; Küllmar M.; Klein.; McIntosh JM.; Timm T.; Sewald K.; Padberg W.; Aggarwal N.; Chamulitrat W.; Santoso S.; Xia W.; Janciauskiene S.; Grau V. Alpha1-antitrypsin inhibits ATP- mediated IL-1 β release from monocytes via CD36 and nicotinic acetylcholine receptors.
- 2018 Posterpräsentation auf dem 7. Jahrestreffen des Deutschen Zentrums für Lungenforschung (DZL), Bad Nauheim
- **Agne A.**; Siebers K.; Wilker S.; Salipalli S.; Richter K.; Zakrzewicz A.; Sauer AL.; Beckert F.; Koch C.; Zajonz T.; Böning A.; Sander M.; Padberg W.; Janciauskiene S.; Grau V. Alpha1-antitrypsin inhibits the ATP-induced release of monocytic Interleukin-1 β independent of its antiprotease activity.
- 2017 Posterpräsentation auf der Herbsttagung der Sektionen Zellbiologie und Infektiologie und Tuberkulose der Deutschen Gesellschaft für Pneumologie und Beatmungsmedizin e.V. (DGP), Gießen
- **Agne A.**; Siebers K.; Wilker S.; Salipalli S.; Richter K.; Zakrzewicz A.; Sauer AL.; Beckert F.; Koch C.; Zajonz T.; Böning A.; Sander M.; Padberg W.; Janciauskiene S.; Grau V. Alpha1-antitrypsin inhibits the ATP-induced release of monocytic Interleukin-1 β .
- 2014 Posterpräsentation auf der 93. Tagung der Deutschen Physiologischen Gesellschaft
- **Agne A.**; Baldin JP.; Orogo-Wenn MC.; Wichmann L.; Walters DV.; Althaus M. Hydrogen sulfide decreases β -agonist stimulated lung liquid clearance by inhibiting cAMP-regulated transepithelial sodium absorption.

Graduiertenprogramme

- 08/10 – 13/10/2017 Teilnahme an der 9. Herbstschule der Deutschen Gesellschaft für Immunologie (DGfI) „**Current Concepts in Immunology**“, Merseburg
- 2017 – 2019 Teilnahme am internationalen Graduiertenkolleg „**Molecular Biology and Medicine of the Lung**“, Gießen

9 Danksagung

Zuallerletzt möchte ich mich bei den Menschen bedanken, ohne die diese Arbeit nicht zustande gekommen wäre.

Zunächst gilt mein größter Dank **Prof. Dr. Veronika Grau** für die Überlassung des Themas, die fachliche Unterstützung und die Bereitstellung des Arbeitsplatzes. Noch mehr möchte ich mich für ihr Vertrauen und das Verständnis bedanken, das sie mir stets entgegengebracht hat.

Weiterhin möchte ich mich bei Herrn **Prof. Dr. Ivan Manzini** für die Berteeung im Fachbereich 08 und seine fachliche Unterstützung bedanken. Herrn **PD Dr. Matthias Hecker** und Frau **Prof. Dr. Tina Trenczek** danke ich für die Bewertung meiner Disputation.

Frau **Prof. Dr. Sabina Janciauskiene** und ihrem gesamten Laborteam danke ich für den exzellenten fachlichen Austausch, die technische Unterstützung und die tolle Zusammenarbeit.

Als nächstes möchte ich **Dr. Katrin Richter** und **Dr. Anna Zakrzewicz** für die wissenschaftliche und moralische Unterstützung danken, die sie mir während meiner Zeit im Labor und darüber hinaus entgegengebracht haben.

Allen Mitarbeiter/innen, Ärztinnen und Ärzten der Experimentellen Chirurgie und der Anästhesie danke ich für ihre Offenheit und das tolle Arbeitsklima. Danke für die exzellente technische Unterstützung und eure Geduld **Gabi Fuchs-Moll**, **Katrin Petri**, **Sabine Stumpf** und **Sigrid Wilker**. **Melanie Markmann** danke ich für die Unterstützung in Statistikfragen. Bei dem Team der CPB-Studie, **Dr. Christian Koch**, **Anna-Lena Sauer** und **Frauke Beckert** möchte ich mich für die Bereitstellung der Proben und die tolle Zusammenarbeit bedanken. **Jelena**, **Anca-Laura**, **Anna 1** und **Anna 2**, **Max** und **Juliane** danke ich für die tolle Zeit im Büro. **Philipp** und **Leon** danke ich für die kulinarische Versorgung und Vieles darüber hinaus.

Zuletzt bin ich sehr dankbar für die bedingungslose Unterstützung meiner Freunde und Familie.