

**Einfluss des C-reaktiven Proteins chirurgischer Patienten auf
die leukozytäre Interleukin-1 β -Freisetzung**

*Impact of C-Reactive Protein from Surgical Patients on the
Release of Leukocytic Interleukin-1 β*

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Humanbiologie
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von
Buschhaus, Christina
aus Siegen

Gießen 2024

Aus dem Fachbereich Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Klinik für Allgemein-, Viszeral-, Thorax- und Transplantationschirurgie

Sektion Experimentelle Chirurgie

Gutachterin: Prof. Dr. Veronika Grau

Gutachter: Prof. Dr. Dr. Christoph Klenk

Tag der Disputation: 04.06.2025

INHALTSVERZEICHNIS

| | |
|---|------------------|
| <i>Inhaltsverzeichnis</i> | <i>I</i> |
| <i>1 Einleitung</i> | <i>1</i> |
| 1.1 Das angeborene Immunsystem | 1 |
| 1.1.1 Bestandteile des angeborenen Immunsystems | 1 |
| 1.1.2 Akute-Phase-Reaktion und Aktivierung des Komplementsystems..... | 2 |
| 1.1.3 Erkennung von Gefahrensignalen durch Mustererkennungsrezeptoren ... | 4 |
| 1.2 Die Bedeutung von IL-1β | 6 |
| 1.2.1 Das proinflammatorische Zytokin IL-1 β | 6 |
| 1.2.2 Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms | 8 |
| 1.2.3 Signaltransduktion durch den purinergen Rezeptor P2RX7 | 10 |
| 1.2.4 Systemische Inflammation nach chirurgischem Trauma..... | 11 |
| 1.2.5 Cholinerge Regulation der IL-1 β -Freisetzung durch nikotinische Rezeptoren..... | 13 |
| 1.3 CRP – ein Akute-Phase-Protein | 14 |
| 1.3.1 Bildung und Struktur von CRP | 14 |
| 1.3.2 Interaktion von CRP mit Liganden | 17 |
| 1.3.3 Funktion und klinische Relevanz von CRP..... | 18 |
| 1.4 Zielsetzung der vorliegenden Arbeit | 20 |
| <i>2 Material und Methoden</i> | <i>23</i> |
| 2.1 Materialien | 23 |
| 2.1.1 Verbrauchsmaterialien | 23 |
| 2.1.2 Geräte | 24 |
| 2.1.3 Zelllinien | 25 |
| 2.1.4 Antikörper | 25 |
| 2.1.5 Reagenzien | 25 |
| 2.1.6 Kits und Assays | 27 |
| 2.1.7 Puffer und Lösungen | 28 |
| 2.1.8 Software | 29 |
| 2.2 Probanden und Patienten | 29 |

| | | |
|------------|--|-----------|
| 2.2.1 | Ethikvoten und Patientencharakteristika | 29 |
| 2.2.2 | Blutentnahme | 32 |
| 2.2.3 | Gewinnung von Blutplasmen | 32 |
| 2.3 | Zellkulturexperimente | 32 |
| 2.3.1 | Monozytäre THP-1-Zellen | 32 |
| 2.3.1.1 | Kultivierung | 32 |
| 2.3.1.2 | IL-1 β -Freisetzungsexperimente | 33 |
| 2.3.2 | Primäre Blutzellen..... | 34 |
| 2.3.2.1 | Unfraktionierte Blutzellen..... | 34 |
| 2.3.2.2 | Humane PBMCs..... | 35 |
| 2.4 | Proteinbiochemische Methoden | 37 |
| 2.4.1 | Quantifizierung der IL-1 β -Freisetzung mittels ELISA | 37 |
| 2.4.2 | Bestimmung der LDH-Aktivität zur Abschätzung des Anteils toter Zellen 38 | |
| 2.4.3 | Dissoziation von CRP | 38 |
| 2.4.4 | Proteinquantifizierung durch BCA-Test..... | 39 |
| 2.4.5 | Immunpräzipitation von CRP-Liganden-Komplexen aus Patientenplasmen..... | 39 |
| 2.4.6 | Affinitätsreinigung von endogenem CRP | 40 |
| 2.4.7 | BN-PAGE | 42 |
| 2.4.8 | SDS-PAGE | 42 |
| 2.4.9 | Proteintransfer und -nachweis mittels Western Blot | 44 |
| 2.5 | Massenspektrometrische Analyse isolierter CRP-Liganden-Komplexe...46 | |
| 2.6 | Molekulares Docking von Liganden mit CRP | 46 |
| 2.7 | Statistische Auswertung und Darstellung der experimentell erhobenen Daten 47 | |
| 3 | Ergebnisse..... | 48 |
| 3.1 | Untersuchungen von Blutplasmen chirurgischer Patienten..... | 48 |
| 3.1.1 | Dosisabhängiger Effekt von Blutplasmen auf die BzATP-induzierte IL- 1 β -Freisetzung..... | 48 |
| 3.1.2 | Einfluss chirurgischer Traumata auf die Wirkung von Blutplasmen im Rahmen BzATP-induzierter IL-1 β -Freisetzung | 51 |

| | | |
|------------|--|-----------|
| 3.2 | Untersuchungen an endogenem CRP chirurgischer Patienten..... | 55 |
| 3.2.1 | Einfluss einer schweren viszeralchirurgischen Operation auf die Plasmakonzentration von endogenem CRP | 55 |
| 3.2.2 | Effekt der Anreicherung von Patientenplasmen mit dem CRP-Liganden PC | 56 |
| 3.2.3 | Einfluss der Depletion von endogenem CRP aus Patientenplasmen..... | 59 |
| 3.2.4 | Charakterisierung der endogenen CRP-Liganden-Komplexe..... | 62 |
| 3.2.5 | Analyse der endogenen CRP-Konformation mittels BN-PAGE | 65 |
| 3.2.6 | Einfluss von mCRP auf die BzATP-induzierte IL-1 β -Freisetzung | 67 |
| 3.3 | Untersuchungen potentieller CRP-Liganden | 70 |
| 3.3.1 | Effekt von rCRP-PC-Komplexen auf die BzATP-induzierte IL-1 β -Freisetzung | 70 |
| 3.3.2 | Einfluss von Koffein auf die BzATP-induzierte IL-1 β -Freisetzung | 73 |
| 3.3.3 | Einfluss von Paracetamol auf die BzATP-induzierte IL-1 β -Freisetzung | 79 |
| 3.3.4 | <i>In silico</i> Docking potentieller CRP-Liganden | 81 |
| 4 | Diskussion..... | 84 |
| 4.1 | Erkenntnisse der vorliegenden Arbeit..... | 84 |
| 4.2 | Induktion des Akute-Phase-Proteins CRP durch ein chirurgisches Trauma | 86 |
| 4.3 | Inhibition der BzATP-induzierten IL-1β-Freisetzung | 87 |
| 4.3.1 | IL-1 β -Freisetzung als Zeichen Trauma-induzierter steriler Inflammation | 87 |
| 4.3.2 | Antiinflammatorische Effekte von Blutplasmen und der Einfluss chirurgischer Traumata..... | 92 |
| 4.4 | Relevanz von CRP bei der Inhibition der IL-1β-Freisetzung durch Patientenplasmen | 95 |
| 4.4.1 | Auswirkung der Depletion von CRP aus Blutplasmen | 95 |
| 4.4.2 | Einfluss der Zugabe des CRP-Liganden PC | 98 |
| 4.5 | Charakteristika endogener CRP-Liganden-Komplexe nach chirurgischem Trauma..... | 99 |
| 4.5.1 | Konformation von endogenem CRP in Patientenplasmen | 99 |
| 4.5.2 | Liganden des endogenen CRP in chirurgischen Patienten | 104 |

| | | |
|-------|---|-------------|
| 4.5.3 | Einfluss der potentiellen CRP-Liganden Koffein und Paracetamol auf die BzATP-induzierte IL-1 β -Freisetzung | 108 |
| 4.5.4 | Analyse mutmaßlicher CRP-Liganden-Komplexe <i>in vitro</i> | 111 |
| 4.6 | Klinische Relevanz der Ergebnisse | 112 |
| 4.7 | Limitationen und Ausblick der Studie | 114 |
| 4.8 | Schlussfolgerung | 117 |
| | <i>Zusammenfassung</i> | <i>V</i> |
| | <i>Abstract</i> | <i>VI</i> |
| | <i>Abkürzungsverzeichnis</i> | <i>VII</i> |
| | <i>Abbildungsverzeichnis</i> | <i>X</i> |
| | <i>Tabellenverzeichnis</i> | <i>XII</i> |
| | <i>Literaturverzeichnis</i> | <i>XIII</i> |
| | <i>Anhang</i> | <i>XXXI</i> |
| | Ergänzende Tabellen | XXXI |
| | Ergänzende Abbildungen | XXXIV |
| | <i>Publikationsverzeichnis</i> | <i>LV</i> |
| | Kongressbeiträge | LV |
| | <i>Ehrenwörtliche Erklärung</i> | <i>LVI</i> |
| | <i>Danksagung</i> | <i>LVII</i> |

1 EINLEITUNG

1.1 DAS ANGEBORENE IMMUNSYSTEM

1.1.1 BESTANDTEILE DES ANGEBORENEN IMMUNSYSTEMS

Die Bekämpfung von Pathogenen erfolgt in Säugetieren über ein hoch entwickeltes Abwehrsystem, das Immunsystem (Austermann et al., 2022; Haapasalo & Meri, 2019). Im Laufe der Evolution haben sich zwei verschiedene Zweige der Immunantwort entwickelt – hierbei kann zwischen angeborenem und erworbenem (adaptivem) Immunsystem unterschieden werden, die jedoch eng zusammenarbeiten (Harvanová et al., 2023; Kimbrell & Beutler, 2001). In der vorliegenden Arbeit liegt der Fokus auf dem angeborenen Immunsystem.

Bei einer Konfrontation des Körpers mit Pathogenen erfolgt die erste Reaktion über die angeborene Immunantwort, welche der adaptiven Immunantwort vorausgeht und zudem aus evolutionärer Sicht den älteren Teil des Immunsystems bildet (Kimbrell & Beutler, 2001). Die Reaktion des angeborenen Immunsystems dient dazu, eindringende Pathogene zu neutralisieren, die ablaufenden Entzündungsreaktionen schnellstmöglich zu beenden sowie die Homöostase der betroffenen Gewebe wiederherzustellen und läuft zu diesem Zweck sehr schnell ab (Austermann et al., 2022; Harvanová et al., 2023; Kimbrell & Beutler, 2001). Im Gegensatz zur adaptiven Immunantwort handelt es sich bei der angeborenen Immunantwort um eine unspezifische Reaktion, die im Laufe des Lebens kaum einer Entwicklung oder Anpassung unterliegt (Harvanová et al., 2023). Das angeborene Immunsystem setzt sich aus verschiedenen Komponenten wie physikalischen Barrieren sowie zellulären Bestandteilen zusammen (Harvanová et al., 2023). Physikalische bzw. mechanische Barrieren wie Haut und Schleimhäute stellen dabei den ersten Schritt in der Pathogen-Abwehr dar, bei dem eindringende Pathogene abgewehrt und aus dem Organismus transportiert werden (Harvanová et al., 2023). Zusätzlich spielen zelluläre Bestandteile eine wichtige Rolle: Zellen des angeborenen Immunsystems umfassen Mastzellen, Monozyten, Makrophagen, natürliche Killerzellen, dendritische Zellen und Granulozyten (Harvanová et al., 2023; Janeway & Medzhitov, 2002). Neben physikalischen Barrieren und zellulären Bestandteilen ist das angeborene Immunsystem auch durch humorale Bestandteile charakterisiert, welche im Folgenden näher beschrieben werden (Mantovani & Garlanda, 2023; Riera Romo et al., 2016).

1.1.2 AKUTE-PHASE-REAKTION UND AKTIVIERUNG DES KOMPLEMENTSYSTEMS

Der humorale Teil der angeborenen Immunantwort setzt sich unter anderem aus dem Komplementsystem sowie den Produkten der sogenannten Akute-Phase-Reaktion zusammen (Mantovani & Garlanda, 2023; Riera Romo et al., 2016). Bei einer Entzündung oder Verletzung kommt es zur Ausschüttung von proinflammatorischen Zytokinen wie Interleukin (IL)-6, IL-1 β oder Tumornekrosefaktor- α (TNF- α), wodurch die Expression und Synthese von Akute-Phase-Proteinen hochreguliert wird (Mantovani & Garlanda, 2023; Riera Romo et al., 2016). Akute-Phase-Proteine umfassen dabei Komplement-, Koagulations- und Transportproteine, Proteinase-Inhibitoren sowie Serumamyloid-P-Komponente (SAP) und C-reaktives Protein (CRP) (Mantovani & Garlanda, 2023; Pepys & Hirschfield, 2003). Die Proteinsynthese von Akute-Phase-Proteinen wie SAP und CRP findet überwiegend in Hepatozyten statt (Kilpatrick & Volanakis, 1991; Mantovani & Garlanda, 2023). Typisch für die Akute-Phase-Reaktion ist ein rapider Anstieg der Proteinkonzentrationen nach Beginn der inflammatorischen Antwort (Mantovani & Garlanda, 2023; Pepys & Hirschfield, 2003). Sobald der inflammatorische Prozess rückläufig ist, erfolgt wiederum ein schneller Abfall der Konzentrationen (Mantovani & Garlanda, 2023). Insbesondere der Verlauf der Plasmakonzentration von CRP im Rahmen akuter inflammatorischer Prozesse spiegelt diese typische Akute-Phase-Reaktion wider (Mantovani & Garlanda, 2023). Unter den weiteren Akute-Phase-Proteinen zeigt in der Schnelligkeit der inflammatorischen Antwort lediglich SAP einen ähnlichen Verlauf wie CRP (Mantovani & Garlanda, 2023; Pepys & Hirschfield, 2003).

Die durch Inflammation im Rahmen der Akute-Phase-Reaktion induzierten Proteine, wie beispielsweise CRP, können in der Folge weitere Mechanismen des angeborenen Immunsystems, darunter das Komplementsystem, aktivieren (Haapasalo & Meri, 2019; Kaplan & Volanakis, 1974; Mantovani & Garlanda, 2023). Bestandteile des Komplementsystems, die sogenannten Komplementfaktoren, welche über molekulare Kaskaden Abwehrreaktionen gegen Pathogene vermitteln, machen circa 5 % aller Plasmaproteine aus (Kirschfink, 2014; Riera Romo et al., 2016).

Das Komplementsystem kann über verschiedene Wege aktiviert werden:

- alternativer Weg
- Lektin-Weg
- klassischer Weg

(Lubbers et al., 2017; Riera Romo et al., 2016).

Aus evolutionärer Sicht ist der alternative Weg der Komplement-Aktivierung der älteste Aktivierungsweg (Markiewski et al., 2008). Die Aktivierung erfolgt hierbei unter anderem durch ischämisches Gewebe oder eindringende Mikroorganismen wie Bakterien oder Viren (Kirschfink, 2014; Riera Romo et al., 2016; Sarma & Ward, 2011). Während der Aktivierung läuft ein sogenannter "*tickover*"-Mechanismus ab (Kirschfink, 2014; Markiewski et al., 2008). Hierbei handelt es sich um eine spontane Hydrolyse des Thioesters des Komplementproteins C3 zu C3(H₂O), woraufhin sich im Folgenden die Flüssigphasen-C3-Konvertase C3(H₂O)Bb bildet (Kirschfink, 2014; Markiewski et al., 2008). C3(H₂O)Bb wird zunächst durch das Regulator-Protein Properdin stabilisiert und schlussendlich wird die C3-Konvertase C3bBb gebildet (Kirschfink, 2014; Lubbers et al., 2017; Markiewski et al., 2008; Sarma & Ward, 2011).

Im Gegensatz dazu führt die Aktivierung des Komplementsystems durch den Lektin-Weg zur Bildung der C3-Konvertase C4b2b (Kirschfink, 2014; Sarma & Ward, 2011). Die Aktivierung erfolgt durch die Bindung von Mannose-bindendem Lektin an Pathogen-assoziierte molekulare Muster (englisch: *pathogen-associated molecular patterns*, PAMPs), wie beispielsweise terminale Zuckergruppen auf Bakterienoberflächen (Kirschfink, 2014; Markiewski et al., 2008; Riera Romo et al., 2016; Sarma & Ward, 2011). Dadurch werden Mannose-bindende Lektin-assoziierte Serinproteasen aktiviert, was letztlich zur Bildung der C3-Konvertase C4b2b führt (Kirschfink, 2014; Markiewski et al., 2008; Riera Romo et al., 2016; Sarma & Ward, 2011).

Wie 1974 zum ersten Mal durch Kaplan und Volanakis beschrieben wurde, kann die Aktivierung des Komplementsystems über den klassischen Weg unter anderem durch das Akute-Phase-Protein CRP initiiert werden (Kaplan & Volanakis, 1974). Der klassische Weg wird unabhängig von CRP auch durch Antikörper-Antigen-Komplexe (Immunglobulin G (IgG), Immunglobulin M (IgM)) aktiviert (Lubbers et al., 2017; Markiewski et al., 2008; Riera Romo et al., 2016). Durch die Interaktion mit CRP wird

zunächst der C1-Komplex aktiviert und über ein nachfolgendes proteolytisches Kaskadensystem, wie nach Aktivierung über den Lektin-Weg, die C3-Konvertase C4b2b gebildet (Kirschfink, 2014; Pepys & Hirschfield, 2003; Sarma & Ward, 2011).

Alle Aktivierungswege des Komplementsystems münden final in einen gemeinsamen terminalen Weg, der zur Bildung des sogenannten Membranangriffskomplexes (englisch: *membrane attack complex*, MAC; C5b-9 Komplex) führt (Lubbers et al., 2017; Markiewski et al., 2008; Riera Romo et al., 2016; Sarma & Ward, 2011). Bei dem MAC handelt es sich um einen lipophilen Komplex, durch den Poren in die Zellmembran eingebaut werden (Lubbers et al., 2017; Markiewski et al., 2008; Riera Romo et al., 2016; Sarma & Ward, 2011). Durch die resultierenden Ionenströme kommt es zunächst zu einer Störung der Zellfunktion, die im weiteren Verlauf im Absterben der Mitochondrien und schließlich in der Lyse der betroffenen Zelle enden (Kirschfink, 2014; Lubbers et al., 2017; Markiewski et al., 2008; Sarma & Ward, 2011).

1.1.3 ERKENNUNG VON GEFAHRENSIGNALLEN DURCH MUSTERERKENNUNGSREZEPTOREN

Die Erkennung potentieller Gefahrensignale wird im Rahmen der angeborenen Immunantwort von Säugetieren über sogenannte Mustererkennungsrezeptoren (englisch: *pattern recognition receptors*, PRRs) gesteuert (Janeway, 1989; Mantovani & Garlanda, 2023). Der Begriff wurde 1989 von Charles Alderson Janeway geprägt, der damit eine Weiterentwicklung der bis dahin verbreiteten immunologischen Modelle beschrieb (Janeway, 1989). PRRs sind genetisch kodiert und erkennen evolutionär konservierte molekulare Strukturen, welche als PAMPs bezeichnet werden (Austermann et al., 2022; Mantovani & Garlanda, 2023). Ein typisches PAMP ist beispielsweise Lipopolysaccharid (LPS), ein Bestandteil der Zellmembran gramnegativer Bakterien (Austermann et al., 2022; Fitzgerald & Kagan, 2020). Im Jahr 1994 postulierte Polly Matzinger das sogenannte Gefahrenmodell, welches zusätzlich körpereigene Strukturen als Gefahrensignale, also als mögliche PRR-Liganden, umfasst (Matzinger, 1994). Diese Strukturen, sogenannte Schaden-assoziierte molekulare Muster (englisch: *damage-associated molecular patterns*, DAMPs), beinhalten beispielsweise extrazelluläres Adenosintriphosphat (ATP) oder mitochondriale Desoxyribonukleinsäure (englisch: *deoxyribonucleic acid*, DNA) und können als Alarm-Signale agieren, die von

geschädigten Geweben ausgesandt werden und eine Immunantwort induzieren (Austermann et al., 2022; Rai et al., 2022).

PRRs können anhand ihrer subzellulären Lokalisation in zwei Klassen unterteilt werden: Man unterscheidet hierbei zwischen Transmembranproteinen, also membranständigen Rezeptoren in der Zellmembran oder in Membranen der Zellorganellen, und zytoplasmatischen Rezeptoren (Austermann et al., 2022; Huang et al., 2021; Lamkanfi & Dixit, 2014). Zu Letzteren lassen sich unter anderem *retinoic acid inducible gene-1* (RIG-1)-ähnliche-Rezeptoren (englisch: *RIG-1-like receptors*, RLRs) sowie *nucleotide-binding oligomerization domain* (NOD)-ähnliche-Rezeptoren (englisch: *NOD-like receptors*, NLRs) zuordnen (Lamkanfi & Dixit, 2014; Rai et al., 2022). Im Gegensatz dazu sind C-Typ-Lektin-Rezeptoren (englisch: *C-type lectin receptors*, CLRs) und Toll-ähnliche-Rezeptoren (englisch: *Toll-like receptors*, TLRs) meist Teil der membranständigen PRRs (Lamkanfi & Dixit, 2014; Rai et al., 2022).

Einer der bekanntesten Vertreter der Toll-Familie ist der Typ I-Transmembranrezeptor TLR4, der auf verschiedenen humanen Zellen, wie unter anderem Monozyten, exprimiert wird (Austermann et al., 2022; Dunzendorfer et al., 2004). TLRs sind durch drei Domänen gekennzeichnet:

- Extrazelluläre Domäne
- Intrazelluläre Toll/IL-1-Rezeptor (TIR)-Domäne
- Transmembran-Domäne

(Brubaker et al., 2015; Fitzgerald & Kagan, 2020).

Die Aktivierung von TLR4 durch LPS erfordert eine Reihe von zusätzlichen LPS-bindenden Proteinen (Fitzgerald & Kagan, 2020). Zunächst wird LPS auf der Oberfläche bakterieller Zellmembranen durch LPS-bindendes Protein gebunden und so verändert, dass einzelne LPS-Moleküle durch das Oberflächenmolekül *cluster of differentiation 14* (CD14) extrahiert werden können (Brubaker et al., 2015; Ciesielska et al., 2021; Fitzgerald & Kagan, 2020). Die LPS-Moleküle werden über CD14 an den myeloischen Differenzierungsfaktor-2 (englisch: *myeloid differentiation factor-2*, MD2) übertragen, welcher dann mit der extrazellulären TLR4-Domäne interagiert (Ciesielska et al., 2021; Fitzgerald & Kagan, 2020; Kawai & Akira, 2010). Dadurch kommt es über eine Wechselwirkung zwischen den TIR-Domänen zur Bildung eines Heterodimers aus zwei TLR4-MD2-Komplexen mit gebundenem LPS (Brubaker et al., 2015; Fitzgerald &

Kagan, 2020; Kawai & Akira, 2010). Im Anschluss wird eine Vielzahl nachgeschalteter Signaltransduktions-Kaskaden aktiviert, die unterschiedliche Funktionen vermitteln (Fitzgerald & Kagan, 2020; Kawai & Akira, 2010).

Dabei werden zunächst Adapterproteine, darunter *Toll/interleukin-1 receptor domain-containing adapter protein* (TIRAP) und *myeloid differentiation primary response protein 88* (MyD88), aktiviert (Ciesielska et al., 2021; Fitzgerald & Kagan, 2020). Diese Proteine vermitteln daraufhin unter anderem die Aktivierung der I κ B-Kinasen- α und - β , wodurch es nach Phosphorylierung von inhibitorischen I κ B-Proteinen zur Freisetzung des Transkriptionsfaktors *nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells* (NF- κ B) kommt (Austermann et al., 2022; Ciesielska et al., 2021; Fitzgerald & Kagan, 2020). Nach Verlagerung in den Zellkern kann NF- κ B die Transkription verschiedener proinflammatorischer Zytokine hochregulieren (Austermann et al., 2022; Ciesielska et al., 2021; Fitzgerald & Kagan, 2020).

1.2 DIE BEDEUTUNG VON IL-1 β

1.2.1 DAS PROINFLAMMATORISCHE ZY TOKIN IL-1 β

Bei Zytokinen handelt es sich um eine Klasse von Proteinen mit geringem Molekulargewicht, welche die interzelluläre Kommunikation, insbesondere zwischen Immunzellen, vermitteln (Harvanová et al., 2023; Riera Romo et al., 2016). Eine Untergruppe der Zytokine ist die IL-1-Familie, bestehend aus elf verschiedenen Zytokinen, die wiederum anhand verschiedener IL-1-Konsensussequenzen in drei Subklassen unterteilt werden können (Dinarello, 2018; Mantovani et al., 2019). Darüber hinaus kann eine Kategorisierung anhand der durch die Zytokine vermittelten Effekte erfolgen – die IL-1-Familie umfasst sowohl pro- als auch antiinflammatorisch wirksame Zytokine (Chan & Schroder, 2019; Harvanová et al., 2023). Ein Beispiel für ein antiinflammatorisches Zytokin ist der IL-1-Rezeptorantagonist (IL-1RA), der die Aktivität proinflammatorischer Zytokine wie IL-1 α und IL-1 β inhibieren kann (Chan & Schroder, 2019; Harvanová et al., 2023; Riera Romo et al., 2016). Diese beiden Zytokine aktivieren verschiedene Immunzellen, darunter Monozyten und Makrophagen, im Rahmen inflammatorischer Vorgänge (Chan & Schroder, 2019). Am Ort der Entzündung oder Verletzung wird IL-1 α direkt von den betroffenen Zellen freigesetzt und agiert als DAMP zur Initiierung steriler Inflammation (Chan & Schroder, 2019; Dinarello, 2018;

Harvanová et al., 2023). IL-1 β hingegen wird mit Hilfe von Inflammasomen aus Zellen freigesetzt, die zuvor im Rahmen der Inflammation durch DAMPs oder PAMPs aktiviert wurden, und rekrutiert weitere zelluläre Komponenten der Immunantwort, beispielsweise Granulozyten, an die geschädigten Stellen (Chan & Schroder, 2019). IL-1 α und IL-1 β nutzen für die Vermittlung der proinflammatorischen Effekte den gleichen Signalweg, der durch die Bindung der Zytokine an den IL-1-Rezeptor (IL-1R) Typ I initiiert wird (Chan & Schroder, 2019; Dinarello, 2018). Die Bindung führt zu einer Konformationsänderung des Rezeptors, woraufhin IL-1R3 als Co-Rezeptor bindet (Dinarello, 2018; Mantovani et al., 2019). Durch die Bindung von MyD88 an die TIR-Domänen der Rezeptoren kommt es über eine Kinase-Kaskade unter anderem zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B (Dinarello, 2018; Mantovani et al., 2019).

Die Vermittlung proinflammatorischer Effekte durch Interleukine ist ein relevanter Ansatzpunkt für die Entwicklung von Therapeutika für entzündliche Erkrankungen (Chan & Schroder, 2019). Ein bereits zugelassenes Therapeutikum ist Anakinra, ein rekombinanter IL-1RA, welches in der Behandlung von IL-1-vermittelten Erkrankungen wie der Autoimmunerkrankung rheumatoide Arthritis oder autoinflammatorischen Erkrankungen breite Anwendung findet (Cavalli & Dinarello, 2018; Mantovani et al., 2019). Weitere für den klinischen Einsatz zugelassene Therapeutika sind beispielsweise Canakinumab, ein gegen IL-1 β gerichteter monoklonaler Antikörper, und Bermekimab, ein gegen IL-1 α gerichteter monoklonaler Antikörper (Mantovani et al., 2019).

Die Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen wie IL-1 β wird endogen streng kontrolliert, da eine übermäßige Freisetzung zu einer systemischen Entzündung führt, die schwerwiegende Folgen haben kann (Cavalli & Dinarello, 2018; Chakraborty & Burns, 2022). Die endogene Kontrolle der IL-1 β -Freisetzung hängt von der Spaltung der inaktiven Proform in das bioaktive Molekül durch die Protease Caspase-1 ab (Dinarello, 2018; Mantovani et al., 2019). Die Spaltungsstelle für Caspase-1 befindet sich innerhalb der Konsensussequenz von IL-1 β (Dinarello, 2018; Mantovani et al., 2019). Die Aktivierung von Caspase-1 wird durch das *NLR family pyrin domain-containing protein 3* (NLRP3)-Inflammasom kontrolliert (Chan & Schroder, 2019).

1.2.2 AKTIVIERUNG DES NLRP3-INFLAMMASOMS

Die NLR-Familie ist eine Gruppe zytoplasmatischer und damit intrazellulär lokalisierter PRRs (Banerjee et al., 2022). Die Proteine der NLR-Familie bestehen typischerweise aus drei Domänen mit spezifischen Funktionen:

- *leucine-rich repeat* (LRR)-Domäne
- *neuronal apoptosis inhibitor protein, major histocompatibility complex class 2 transcription activator, heterokaryon incompatibility protein-E and telomerase-associated protein 1* (NACHT)-Domäne
- Effektor-Domäne

(Huang et al., 2021).

Die NACHT-Domäne, welche eine ATPase-Aktivität aufweist, befindet sich im Zentrum der Proteine, während die LRR-Domäne am Carboxy-Terminus (C-Terminus) lokalisiert ist (Banerjee et al., 2022; Martinon et al., 2009; Swanson et al., 2019). Letztere dient zum einen der autoinhibitorischen Regulation der NLR-Aktivierung und zum anderen der Erkennung von Liganden, wie beispielsweise PAMPs (Cassel & Sutterwala, 2010; Huang et al., 2021). Die am Amino-Terminus (N-Terminus) lokalisierte Effektor-Domäne unterscheidet sich je nach NLR-Unterfamilie: mögliche Domänen sind hierbei unter anderem die Pyrin-Domäne (englisch: *pyrin domain*, PYD) und die Caspase-Rekrutierungsdomäne (englisch: *caspase recruitment domain*, CARD), die die nachfolgende Signaltransduktion steuern (Cassel & Sutterwala, 2010; Huang et al., 2021).

Ein Protein aus der NLR-Unterfamilie, die durch eine N-terminale PYD charakterisiert ist, ist NLRP3 (Swanson et al., 2019). Durch Aktivierung von NLRP3 im Rahmen inflammatorischer Prozesse bildet sich das sogenannte NLRP3-Inflammasom (Banerjee et al., 2022). Inflammasome beschreiben im Allgemeinen intrazelluläre Zusammenlagerungen von Proteinen, die die Aktivierung von Proteasen wie Caspase-1 ermöglichen (Deng et al., 2018; Paik et al., 2021; Vladimer et al., 2013). Das NLRP3-Inflammasom besteht aus einer Zusammenlagerung der folgenden Komponenten:

- NLRP3
- *apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD* (ASC)
- Caspase-1

(Banerjee et al., 2022; Pelegrin, 2021).

ASC ist ein Protein, das in aktivierten Zellen filamentartige Strukturen, sogenannte „specks“, bildet und an dessen C-Terminus sich eine Caspase-Rekrutierungsdomäne befindet (Pelegrin, 2021; Swanson et al., 2019). Die Zusammenlagerung der Komponenten des Inflammasoms erfolgt einerseits durch PYD-PYD-Interaktionen zwischen den N-Termini von NLRP3 und ASC, und andererseits durch CARD-CARD-Interaktionen zwischen den C-Termini von ASC und dem inaktiven Zymogen Procaspase-1 (Fu & Wu, 2023; Paik et al., 2021; Pelegrin, 2021). Die durch proteolytische Spaltung entstehende bioaktive Protease Caspase-1 ermöglicht schließlich die Prozessierung von pro-IL-1 β zum aktiven proinflammatorischen Zytokin IL-1 β (Banerjee et al., 2022; Pelegrin, 2021). Mutationen in *CIAS1*, dem für NLRP3 kodierenden Gen, können zu systemischen inflammatorischen Erkrankungen wie dem familiären kälteinduzierten autoinflammatorischen Syndrom (englisch: *familial cold autoinflammatory syndrome*, FCAS) und dem Muckle-Wells-Syndrom führen (Hoffman et al., 2001). Neben der Freisetzung von IL-1 β durch proteolytische Prozessierung führt die Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms unter anderem auch zur Pyroptose von Immunzellen wie Monozyten und Makrophagen (Banerjee et al., 2022; Paik et al., 2021). Pyroptose ist eine Form des Zelltodes und wird durch das Protein Gasdermin-D vermittelt, das in Anwesenheit aktiver Caspase-1 gespalten wird und über die Bildung von Membranporen zur Lyse der Zellen führt (Banerjee et al., 2022; Swanson et al., 2019).

Die Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms wird streng durch einen zweistufigen Prozess kontrolliert, der sich aus den folgenden Schritten zusammensetzt:

- Vorbereitung (englisch: *priming*)
- Assemblierung (englisch: *assembly*)

(Paik et al., 2021; Swanson et al., 2019).

In der ersten Phase (*priming*) wird der Mustererkennungsrezeptor TLR4 auf Immunzellen beispielsweise durch LPS aus der Zellwand gramnegativer Bakterien aktiviert (Paik et al., 2021; Swanson et al., 2019). Wie bereits beschrieben, führt die Aktivierung von TLR4 zur Aktivierung von NF- κ B, einem Transkriptionsfaktor, der die Transkription verschiedener Zielgene reguliert (Cogswell et al., 1994). Dadurch wird unter anderem die Expression von NLRP3, Caspase-1 sowie pro-IL-1 β hochreguliert (Banerjee et al., 2022; Swanson et al., 2019). Zusätzlich führt das *priming* zu post-translationalen

Modifikationen von NLRP3, unter anderem (De-)Phosphorylierung und (De-)Ubiquitylierung, die die Aktivierung von NLRP3 entweder verhindern oder erleichtern und eine Stabilisierung von NLRP3 bewirken können (Banerjee et al., 2022; Paik et al., 2021; Swanson et al., 2019).

Um den zweiten Schritt der NLRP3-Inflammasom-Aktivierung, die Assemblierung des Inflammasoms (*assembly*), zu induzieren, ist neben der Bindung von LPS an TLR4 ein zweites Signal erforderlich (Swanson et al., 2019). Im Rahmen von Entzündungsprozessen und Gewebeschädigungen kann extrazelluläres ATP aus geschädigten Zellen freigesetzt werden (Pelegrin, 2021). In der Folge kann dieses durch den purinergeren Rezeptor P2X-Purinozeptor 7 (englisch: *P2X purinoceptor 7*, P2RX7) auf der Zelloberfläche von Monozyten und Makrophagen als DAMP erkannt werden (Banerjee et al., 2022; Pelegrin, 2021). Mittels Signaltransduktion wird dadurch die Assemblierung der Komponenten, die das NLRP3-Inflammasom bilden, induziert (Banerjee et al., 2022; Pelegrin, 2021).

1.2.3 SIGNALTRANSDUKTION DURCH DEN PURINERGEN REZEPTOR P2RX7

Bei purinergeren Rezeptoren handelt es sich um Transmembranproteine, welche extrazellulär lokalisierte Nukleotide oder Nukleoside erkennen können (Pelegrin, 2021). Die erste Beschreibung der purinergeren Signalgebung erfolgte 1972 durch Geoffrey Burnstock (Burnstock, 1972). Die Familie der purinergeren P2-Rezeptoren wird in zwei Untergruppen unterteilt: Liganden-gesteuerte, ionotrope P2X-Rezeptoren und G-Proteingekoppelte, metabotrope P2Y-Rezeptoren (Jiang et al., 2021; Kanellopoulos & Delarasse, 2019). Im Gegensatz zu den P2Y-Rezeptoren sind die P2X-Rezeptoren selektiv für ATP (Di Virgilio et al., 2017).

Der Rezeptor P2RX7 ist einer der P2X-Rezeptoren und erfüllt eine Vielzahl von Funktionen im Rahmen der Immunantwort (Di Virgilio et al., 2017; Jiang et al., 2021). Die trimere Struktur von P2RX7 wird maßgeblich durch eine extrazelluläre Domäne sowie zwei α -helikale Transmembrandomänen in jedem Monomer bestimmt (Di Virgilio et al., 2017; Jiang et al., 2021; Kanellopoulos & Delarasse, 2019). Die N- und C-Termini aller Untereinheiten des P2RX7 sind intrazellulär lokalisiert (Di Virgilio et al., 2017; Jiang et al., 2021; Kanellopoulos & Delarasse, 2019). Das für P2RX7 charakteristische lange C-terminale Ende beinhaltet eine Vielzahl von Proteinbindungsstellen, eine

Cystein-reiche Domäne, eine zytoplasmatische Kappe und eine Ballast-Region (Di Virgilio et al., 2017; McCarthy et al., 2019). Über diese verschiedenen Regionen werden diverse Effekte vermittelt, was in einer großen funktionellen Relevanz der intrazellulären C-Termini resultiert (Di Virgilio et al., 2017; McCarthy et al., 2019). Extrazellulär lokalisiert befinden sich insgesamt drei Bindungsstellen für ATP (Di Virgilio et al., 2017; Jiang et al., 2021). Die Aktivierung von P2RX7 durch extrazelluläres ATP führt zu einer Konformationsänderung, welche den Einstrom von Na^+ und Ca^{2+} in die Zelle sowie den Ausstrom von K^+ aus dem Zytoplasma in den extrazellulären Raum ermöglicht (Adinolfi et al., 2018; Jiang et al., 2021; Paik et al., 2021). Der K^+ -Ausstrom resultiert in der Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms (Akbal et al., 2022). Extrazelluläres ATP, welches beispielsweise im Rahmen eines chirurgischen Traumas durch Gewebeschädigung freigesetzt wird, wirkt somit als DAMP, das über die Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms eine Entzündung durch IL-1 β -Freisetzung induziert (Chakraborty & Burns, 2022; Di Virgilio et al., 2017; Rai et al., 2022).

1.2.4 SYSTEMISCHE INFLAMMATION NACH CHIRURGISCHEM TRAUMA

Die übermäßige Freisetzung inflammatorischer Mediatoren wie IL-1 β in den Blutkreislauf kann zu einer systemischen Ausbreitung der zuvor lokalen Inflammation führen, was schwerwiegende Folgen haben kann – unter anderem das sogenannte systemische inflammatorische Response-Syndrom (englisch: *systemic inflammatory response syndrome*, SIRS) (Chakraborty & Burns, 2022; Rai et al., 2022; Surbatovic et al., 2013). SIRS beschreibt eine durch ein steriles Trauma induzierte systemische Entzündungsreaktion, bei der im Gegensatz zur Sepsis keine zusätzliche Infektion vorliegt (Rai et al., 2022). Die Grundlage für eine einheitliche Definition des SIRS wurde 1991 während einer Konsensuskonferenz des *American College of Chest Physicians* und der *Society of Critical Care Medicine* geschaffen (Bone et al., 1992). Nach einigen Anpassungen in den darauffolgenden Jahren wurde 2016 schließlich „Sepsis-3“ als Definition auf einer weiteren Konsensuskonferenz der *European Society of Intensive Care Medicine* und der *Society of Critical Care Medicine* etabliert (Singer et al., 2016). Aus dieser Definition entwickelte sich das medizinische Scoring-System *quick sequential organ failure assessment* (qSOFA) zur Diagnose eines SIRS: Ein SIRS liegt nach qSOFA-Score vor, wenn

- der systolische Blutdruck unter 100 mmHg,
- die maximale Atemfrequenz über 22 pro Minute und
- der minimale Punktwert der Glasgow-Koma-Skala (englisch: *Glasgow Coma Scale*, GCS) unter 15 liegt (Chakraborty & Burns, 2022; Singer et al., 2016).

Der qSOFA-Score stellt damit eine Vereinfachung des umfangreicheren *sequential organ failure assessment* (SOFA)-Score für den klinischen Alltag dar (Singer et al., 2016).

Die Pathophysiologie des SIRS wurde 1997 von Bone et al. als fünfstufige Kaskade beschrieben (Bone et al., 1997; Chakraborty & Burns, 2022). Ausgehend von einer Schädigung, beispielsweise durch ein chirurgisches Trauma, kommt es zunächst zu einer DAMP-vermittelten lokalen Entzündungsreaktion (Bone et al., 1997; Chakraborty & Burns, 2022; Rai et al., 2022). Bei entsprechender Schwere der Schädigung und somit anhaltender inflammatorischer Reaktion weitet sich die Inflammation auf eine systemische Ebene aus (Bone et al., 1997; Chakraborty & Burns, 2022; Sikora et al., 2023). Es kommt zum kompensatorischen antiinflammatorischen Response-Syndrom (englisch: *compensatory anti-inflammatory response syndrome*, CARS), um durch antiinflammatorische Gegenreaktionen wieder ein Gleichgewicht herzustellen (Bone et al., 1997; Chakraborty & Burns, 2022; Sikora et al., 2023). Gelingt dies nicht, überwiegt entweder das CARS und die Patienten¹ erreichen einen Zustand starker Immunsuppression, oder die proinflammatorischen Effekte überwiegen und es kommt zum Übergang in ein SIRS (Bone et al., 1997; Chakraborty & Burns, 2022; Sikora et al., 2023). Stabilisiert sich der Zustand nicht, kommt es im weiteren Verlauf zu einem antagonistischen Response-Syndrom (englisch: *mixed antagonist response syndrome*, MARS), welches durch periodische Wechsel zwischen CARS (Immunsuppression) und SIRS (schwere Inflammation) charakterisiert ist (Sikora et al., 2023). Dies kann schließlich zu multipler Organdysfunktion (englisch: *multiple organ dysfunction syndrome*, MODS) führen, was in vielen Fällen mit dem Versterben der betroffenen Patienten endet (Bone et al., 1997; Chakraborty & Burns, 2022; Sikora et al., 2023).

Aufgrund des möglichen schweren Verlaufs eines SIRS ist es wichtig, dieses als postoperative Komplikation insbesondere im Rahmen schwerer chirurgischer Eingriffe

¹ Aus Gründen der besseren Lesbarkeit wird in der vorliegenden Arbeit das generische Maskulinum verwendet. Sämtliche verwendeten Personenbezeichnungen beziehen sich gleichermaßen auf alle Geschlechter.

frühzeitig zu erkennen (Buttenschoen et al., 2010; Lahiri et al., 2016). Zur Diagnostik und Überwachung kommen dabei verschiedene Messungen zum Einsatz. Neben den bereits erwähnten Bewertungsskalen wie SOFA-Score und qSOFA-Score haben sich inzwischen auch diverse Biomarker zur Diagnostik etabliert (Chakraborty & Burns, 2022). Hierzu zählen unter anderem IL-6, CRP, Leptin und Procalcitonin, welches vor allem dem Monitoring infektiöser Prozesse und damit der Unterscheidung von SIRS und Sepsis dient (Chakraborty & Burns, 2022; Rai et al., 2022).

1.2.5 CHOLINERGE REGULATION DER IL-1 β -FREISETZUNG DURCH NIKOTINISCHE REZEPTOREN

Die potentiell schwerwiegenden Folgen inflammatorischer Prozesse durch die Freisetzung von IL-1 β nach Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms erfordern verschiedene Regulationsmechanismen. Eine Möglichkeit ist hierbei die Aktivierung von nikotinischen Acetylcholinrezeptoren (nAChRs), die sowohl auf neuronalen Zellen als auch auf nicht-neuronalen Zellen wie Skelettmuskel- und Immunzellen lokalisiert sein können (Fujii et al., 2017; Hecker et al., 2015). Neben muskarinischen Acetylcholinrezeptoren dienen nAChRs der Erkennung des seit langer Zeit charakterisierten Neurotransmitters Acetylcholin (ACh) (Fujii et al., 2017). nAChRs sind Liganden-gesteuerte Ionenkanalrezeptoren, deren namensgebender Ligand Nikotin ist (Halder & Lal, 2021; Richter & Grau, 2023; Zoli et al., 2018). Die Rezeptoren setzen sich aus fünf Untereinheiten zusammen, die entweder als Homomere oder Heteromere kombiniert sind und im Zentrum eine ionendurchlässige Pore bilden (Halder & Lal, 2021; Kabbani & Nichols, 2018; Zoli et al., 2018). Mögliche Kombinationen bilden sich dabei aus den im Menschen insgesamt bekannten 16 Untereinheiten, wobei bisher beschriebene Kombinationen unter anderem Homopentamere aus $\alpha 7$ - oder $\alpha 9$ -Untereinheiten und Heteropentamere aus $\alpha 2$ - $\alpha 7$ mit $\beta 2$ - $\beta 4$ Untereinheiten sowie aus $\alpha 9$ - mit $\alpha 10$ -Untereinheiten umfassen (Richter & Grau, 2023; Zoli et al., 2018). Die Aktivierung der nAChRs durch Bindung von Liganden führt zu einer Konformationsänderung, welche den Ionenkanal öffnet, was zum Einstrom von Na⁺ und Ca²⁺ in die Zelle und zum Ausstrom von K⁺ aus der Zelle führt (Halder & Lal, 2021; Zoli et al., 2018). Neben der ionotropen Signaltransduktion werden den $\alpha 7$ -Untereinheiten auch metabotrope Effekte zugeschrieben, die über G-Protein-gekoppelte Rezeptoren vermittelt werden (Fujii et al., 2017; Kabbani & Nichols, 2018; Richter & Grau, 2023).

Die Erforschung der Beteiligung von nAChRs an der Regulation der Immunantwort wurde von der Arbeitsgruppe um Kevin Tracey geprägt, der erstmals den Begriff ‘*cholinergic anti-inflammatory pathway*’ verwendete, nachdem gezeigt werden konnte, dass ACh inflammatorische Prozesse durch Inhibition der Freisetzung proinflammatorischer Zytokine aus LPS-stimulierten humanen Makrophagen über die nAChR-Untereinheit $\alpha 7$ auf post-transkriptioneller Ebene regulieren kann (Borovikova et al., 2000; H. Wang et al., 2003). Unsere Arbeitsgruppe konnte einen cholinergen Mechanismus in Immunzellen auf Proteinebene zeigen, bei dem die IL-1 β -Freisetzung aus Monozyten durch Inhibition der ATP-induzierten NLRP3-Inflammasom-Aktivierung über nAChRs reguliert wird (Hecker et al., 2015; Richter & Grau, 2023). Die Aktivierung von nAChRs, insbesondere der $\alpha 9$ -Untereinheit, unterbindet dabei die Signaltransduktion des P2RX7 nach Bindung des synthetischen ATP-Analogons 2’(3’)-O-(4-Benzoylbenzoyl)adenosin-5’-triphosphat (BzATP), sodass die Zusammenlagerung des NLRP3-Inflammasoms nicht induziert und in der Folge kein IL-1 β freigesetzt wird (Hecker et al., 2015; Richter & Grau, 2023). Der Mechanismus scheint unter anderem über eine Aktivierung der endothelialen Stickstoffmonoxid (NO)-Synthase vermittelt zu werden, wodurch es zu einer Modifikation des P2RX7 kommt, welche die ionotrope Funktion des Rezeptors inhibiert (Richter, Ascii, et al., 2023). Neben klassischen nAChR-Agonisten wie ACh oder Nikotin konnte inzwischen eine Vielzahl weiterer Agonisten identifiziert werden, die einen inhibitorischen Effekt auf die ATP-induzierte IL-1 β -Freisetzung zeigen – hierunter zählen Phosphocholin (PC) sowie Lysophosphatidylcholin (LPC), Glycerophosphatidylcholin (GPC) und Dipalmitoylphosphatidylcholin (DPPC) (Backhaus et al., 2017; Hecker et al., 2015; Richter et al., 2016; Richter & Grau, 2023). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass im ungebundenen Zustand unwirksame PC-Konzentrationen nach Bindung an bovines Serumalbumin (BSA) sowie an CRP effektiv nAChRs aktivieren und darüber die IL-1 β -Freisetzung inhibieren (Hecker et al., 2015; Richter et al., 2018; Richter & Grau, 2023).

1.3 CRP – EIN AKUTE-PHASE-PROTEIN

1.3.1 BILDUNG UND STRUKTUR VON CRP

CRP ist ein Protein, welches im Rahmen von Traumata, Entzündungen sowie Infektionen vielfältige Funktionen ausübt (Noone et al., 2021; Olson et al., 2023). CRP wurde zum ersten Mal 1930 durch Tillett und Francis beschrieben, die zeigen konnten, dass ein

Serumbestandteil eine Präzipitation von C-Polysacchariden in der Zellwand von *Streptococcus pneumoniae* induzieren kann (Kushner, 2023; Tillett & Francis, 1930). Weitere Untersuchungen zeigten, dass es sich bei diesem Bestandteil um ein Protein handelt, was schließlich zur Bezeichnung C-reaktives Protein führte (Abernethy & Avery, 1941; Kushner, 2023). CRP wird den Akute-Phase-Proteinen zugeordnet, da es im Rahmen der Akute-Phase-Reaktion als Antwort auf Entzündungsprozesse gebildet wird (Gabay & Kushner, 1999; Rizo-Téllez et al., 2023).

CRP ist Teil der Pentraxin-Familie (Geyer et al., 2021; Mantovani et al., 2008). Pentraxine beschreiben eine Familie evolutionär konservierter Proteine und werden in kurze und lange Pentraxine unterteilt (Haapasalo & Meri, 2019). Ein Hauptvertreter der Gruppe der langen Pentraxine ist Pentraxin 3, während CRP und SAP der Gruppe der kurzen Pentraxine zugeordnet werden (Haapasalo & Meri, 2019; Mantovani et al., 2008). Die meisten Pentraxine sind durch eine zyklische, pentagonale Symmetrie der Untereinheiten charakterisiert und weisen eine Ca^{2+} -abhängige Fähigkeit zur Bindung von Liganden auf (Kilpatrick & Volanakis, 1991; Mold et al., 1999). Charakteristisch ist außerdem eine am C-Terminus lokalisierte, konservierte Pentraxin-Domäne mit einer Länge von circa 200 Aminosäuren (Haapasalo & Meri, 2019). Pentraxine zählen zu den löslichen PRRs, wodurch ihnen eine wichtige Rolle im Rahmen der angeborenen Immunantwort zugeschrieben werden kann (Mantovani et al., 2008).

Die zuvor beschriebenen Charakteristika von Pentraxinen spiegeln sich auch in der Struktur von CRP wider. Humanes CRP setzt sich aus fünf identischen Untereinheiten mit einem Molekulargewicht von jeweils circa 23 kDa (206 Aminosäuren) zusammen, welche sich durch nicht-kovalente Bindungen als zyklisches Pentamer zusammenlagern (Olson et al., 2023; Osmand et al., 1977; Shrive et al., 1996). Durch die diskoidale Struktur des pentameren CRPs (pCRP) können zwei verschiedene Oberflächen unterschieden werden: Auf der A-Seite (*'activating face'*) befindet sich an jeder monomeren Untereinheit eine tiefe Spalte, während sich auf der B-Seite (*'binding face'*) jedes Monomers eine hydrophobe Tasche mit jeweils zwei Calciumionen befindet, über die beispielsweise die Bindung von PC an CRP erfolgt (Noone et al., 2021; Shrive et al., 1996; Thompson et al., 1999).

Im physiologischen Zustand liegt CRP im humanen Plasma in sehr geringen Konzentrationen von $< 3 \text{ mg/l}$ vor (Newling et al., 2019; Pepys & Hirschfield, 2003).

CRP wird primär von Hepatozyten exprimiert, mittlerweile wurde die Expression von CRP aber auch in anderen Zelltypen wie unter anderem peripheren mononukleären Blutzellen (englisch: *peripheral blood mononuclear cells*, PBMCs), Makrophagen und Endothelzellen beschrieben (Olson et al., 2023). Als Akute-Phase-Protein unterliegt CRP starken Schwankungen in der Expression, abhängig von inflammatorischen Prozessen (Kilpatrick & Volanakis, 1991; Noone et al., 2021). Im Rahmen einer Entzündung oder Gewebeschädigung werden proinflammatorische Zytokine wie IL-1 β und IL-6 freigesetzt (Cabrera-Rivera et al., 2022; Shrive et al., 1996). Die zirkulierenden Zytokine stimulieren die hepatische Produktion und Freisetzung verschiedener Akute-Phase-Proteine, wobei IL-6 über die Aktivierung des Transkriptionsfaktors *signal transducer and activator of transcription 3* (STAT3) ein Hauptinduktor für die CRP-Expression ist (Ngwa et al., 2022; Shrive et al., 1996). Andere Faktoren wie IL-1 β können den Effekt von IL-6 verstärken, sind aber nicht zu einer alleinigen Induktion der CRP-Expression in der Lage (Ngwa et al., 2022; Volanakis, 2001). Während der Akute-Phase-Reaktion reduziert sich die Zeit, die CRP bis zum Austreten aus dem endoplasmatischen Retikulum benötigt, drastisch und die CRP-Konzentration im Plasma übersteigt die Ausgangskonzentration nach circa sechs Stunden (Noone et al., 2021; Pepys & Hirschfield, 2003; Volanakis, 2001). Nach circa 48 Stunden wird ein Peak erreicht, bei dem die CRP-Konzentration mehr als 1000-fach über der Ausgangskonzentration liegen kann (Noone et al., 2021; Pepys & Hirschfield, 2003).

Neben der nativen pentameren Form, welche als lösliche Komponente im humanen Plasma vorliegt, kann CRP in zwei weiteren Formen auftreten, die durch Dissoziation der pentameren Form entstehen (Eisenhardt et al., 2009; Zeller et al., 2022). Unter inflammatorischen Bedingungen kommt es zu Phospholipase-A2-abhängigen Veränderungen der Membranoberflächen geschädigter Zellen, welche die Bindung von pCRP begünstigen (Eisenhardt et al., 2009; Rizo-Téllez et al., 2023; Zeller et al., 2022). Die Bindung verändert die Konformation von pCRP zu einem teilweise dissoziierten Pentamer (pCRP*), in welchem ein proinflammatorisches Neoepitop exponiert wird (Olson et al., 2023; Thiele et al., 2014). Da die Dissoziation von pCRP irreversibel ist, kommt es schließlich zur vollständigen Trennung der Untereinheiten und CRP liegt in seiner monomeren Form (mCRP) vor (Olson et al., 2023; Zeller et al., 2022). Neben der Bindung von pCRP an Membranoberflächen wird die Dissoziation von pCRP durch weitere Faktoren beeinflusst. Zum einen können leicht saure pH-Werte, wie sie

typischerweise in inflammatorischen Milieus vorliegen, zu Konformationsänderungen des pCRP führen (Olson et al., 2023; Rizo-Téllez et al., 2023). Zum anderen wird die Konformation von CRP durch die Bindung von Liganden beeinflusst. So kommt es in Abwesenheit von Ca^{2+} zur Dissoziation von pCRP zu mCRP, während die Bindung von beispielsweise 1,6-bis(phosphocholin)-hexan (1,6-bis-PC), einem synthetischen Liganden, die pentamere Struktur von CRP stabilisieren und damit die Dissoziation zu mCRP verhindern kann (Olson et al., 2023; Zeller et al., 2022).

1.3.2 INTERAKTION VON CRP MIT LIGANDEN

Die Analyse der Liganden-Bindungsstellen sowie möglicher Liganden des CRP ist von großem Interesse, da hierdurch weitere Einblicke in die Rolle von CRP im Rahmen inflammatorischer Prozesse gewonnen werden können. Dies könnte zu Ansatzpunkten für die Entwicklung von Therapeutika für inflammatorische Erkrankungen führen.

Wie bereits beschrieben, werden im pCRP zwei Oberflächen der diskoidalen Struktur unterschieden, die verschiedene Bindungsstellen aufweisen. Auf der A-Seite resultieren aus der Faltung und Zusammenlagerung der monomeren Untereinheiten tiefe Spalten, in denen Liganden binden können (Agrawal et al., 2001). Ein Ligand, der an dieser Bindungsstelle binden kann, ist C1q, ein Bestandteil des Komplementsystems (Agrawal et al., 2001; Kaplan & Volanakis, 1974; Noone et al., 2021). C1q kann, nach Bindung an Membranoberflächen geschädigter Zellen, aktiviertes CRP erkennen und binden (Agrawal et al., 2001; Kaplan & Volanakis, 1974; Noone et al., 2021). Die gleiche Bindungsstelle vermittelt zudem die Interaktion von Liganden-gebundenem CRP mit Fc-Rezeptoren (FcR), wodurch es zur Hochregulation der Synthese proinflammatorischer Zytokine kommt (Newling et al., 2019; Sproston & Ashworth, 2018). Die Interaktion zwischen CRP und FcRs sowie die dadurch vermittelten Effekte unterscheiden sich je nach vorliegender CRP-Isoform: Die Hochregulation der Expression proinflammatorischer Zytokine erfolgt nach Bindung von pCRP an $\text{Fc}\gamma\text{RI}$ und $\text{Fc}\gamma\text{RIIa}$, während mCRP mit $\text{Fc}\gamma\text{RIIIa}$ und $\text{Fc}\gamma\text{RIIIb}$ interagiert (Newling et al., 2019; Sproston & Ashworth, 2018). Die Interaktion von Liganden mit der A-Seite des CRP erfolgt überwiegend über elektrostatische Wechselwirkungen und ist Ca^{2+} -unabhängig, kann allerdings durch Veränderungen des pH-Wertes und der Ca^{2+} -Konzentration in der Umgebung beeinflusst werden (Agrawal et al., 2001; Noone et al., 2021).

Zusätzlich zu der Bindungsstelle auf der A-Seite weist die B-Seite des CRP je Monomer eine Ca^{2+} -abhängige Liganden-Bindungsstelle auf (Shrive et al., 1996). Der Hauptligand, der an diese Stelle bindet, ist PC (Pepys & Hirschfield, 2003; Volanakis & Kaplan, 1971). PC ist eine Vorläufersubstanz von Phosphatidylcholin, die während der Umwandlung von Cholin durch die Cholin-Kinase entsteht und dann weiter zu Phosphatidylcholin umgewandelt wird (Li & Vance, 2008; Richter et al., 2016). Darüber hinaus ist PC auch eines der Abbauprodukte von Phosphatidylcholin (Li & Vance, 2008; Richter et al., 2016). Als Bestandteil der Zellmembranen von Säugetieren wird die PC-Kopfgruppe des Phosphatidylcholins für CRP zugänglich, sobald die Zellmembranstruktur durch Schädigungen verändert wird (Newling et al., 2019).

Inzwischen konnte eine Vielzahl weiterer Liganden identifiziert werden, die mit CRP interagieren. Die Aktivierung des Komplementsystems durch CRP wird neben der Interaktion mit C1q auch durch die Interaktion mit Faktor H, einem Bestandteil des alternativen Komplementwegs, gefördert (Mantovani et al., 2008). Weitere Interaktionspartner von CRP sind unter anderem Fibronectin, Histone, Polykationen und der Plättchen-aktivierende Faktor (englisch: *platelet-activating factor*, PAF) (Filep et al., 1991; Mantovani et al., 2008; Olson et al., 2023). Des Weiteren wurden diverse niedermolekulare Inhibitoren entwickelt, welche mit CRP interagieren: Die bivalente Substanz 1,6-bis-PC verknüpft zwei CRP-Pentamere über die B-Seite zu einem Dekamer und erschwert so die Dissoziation, während die monovalente Verbindung C10M (3-(Dibutylamino)propylphosphonsäure) die Dissoziation allein durch die Bindung und Blockierung der Bindungsstellen auf der B-Seite verhindert (Pepys et al., 2006; Rizo-Téllez et al., 2023; Zeller et al., 2022).

1.3.3 FUNKTION UND KLINISCHE RELEVANZ VON CRP

Aufgrund der rapide ansteigenden Konzentration von zirkulierendem CRP im Rahmen inflammatorischer Prozesse ist CRP im Blut ein im klinischen Alltag vielfältig eingesetzter Biomarker zur Verlaufsbeobachtung von Infektionen und Entzündungen (Filep, 2022; Hokama & Nakamura, 1987; Olson et al., 2023). Wie bereits beschrieben, liegt die CRP-Konzentration im humanen Blut im physiologischen Zustand bei $< 3 \text{ mg/l}$, steigt aber innerhalb der ersten vier bis sechs Stunden nach Auftreten einer Entzündung um ein Vielfaches an (Newling et al., 2019; Noone et al., 2021; Pepys & Hirschfield, 2003; Volanakis, 2001; Williams et al., 2020). Die Aufhebung des initialen Stimulus

durch die erfolgreiche Behandlung der Entzündungsursache führt zu einem raschen Abfall der CRP-Konzentration (Pepys & Hirschfield, 2003; Sproston & Ashworth, 2018). Die Geschwindigkeit wird durch die Halbwertszeit des CRP im Blutplasma von 19 Stunden limitiert (Pepys & Hirschfield, 2003; Rizo-Téllez et al., 2023). Da die Halbwertszeit sowohl unter physiologischen als auch unter pathologischen Bedingungen konstant bleibt, hängt die CRP-Konzentration direkt von vorliegenden pathologischen Prozessen ab, welche die hepatische CRP-Synthese induzieren (Pepys & Hirschfield, 2003; Rizo-Téllez et al., 2023). Als Biomarker ist CRP unter anderem ein wichtiger Bestandteil der Diagnostik und des Monitorings postoperativer Komplikationen wie Sepsis oder der assoziierten inflammatorischen Erkrankungen SIRS, CARS und MARS (Edwards et al., 2011; Luhulima et al., 2022; Luo et al., 2022). In diesem Zusammenhang wird CRP durch Procalcitonin als Biomarker ergänzt, da die Procalcitonin-Konzentration bereits innerhalb von zwei bis vier Stunden nach Auftreten eines inflammatorischen oder infektiösen Stimulus ansteigt und somit noch vor CRP einen Hinweis auf das Vorliegen pathologischer Prozesse geben kann (Chakraborty & Burns, 2022; Luhulima et al., 2022). Neben dem Einsatz als Biomarker für akute Entzündungen und postoperative Komplikationen findet die Quantifizierung der CRP-Konzentration im Blutplasma zunehmend Anwendung in der Überwachung chronisch inflammatorischer Erkrankungen, bei denen es lediglich zu einem geringen, jedoch lang anhaltenden Anstieg der CRP-Konzentration kommt (Banait et al., 2022; Olson et al., 2023). Hierzu zählen verschiedene kardiovaskuläre Erkrankungen, Diabetes mellitus Typ 2, Autoimmunerkrankungen wie rheumatoide Arthritis oder systemischer Lupus erythematodes, Alzheimer- oder Parkinson-Erkrankungen (Banait et al., 2022; Svanberg et al., 2023).

Als Akute-Phase-Protein kann CRP vielfältige Funktionen vermitteln, die sowohl pro- als auch antiinflammatorische Wirkungen haben können (Olson et al., 2023; Rizo-Téllez et al., 2023). Die proinflammatorischen Eigenschaften werden vor allem pCRP* und mCRP zugeschrieben und umfassen unter anderem die Aktivierung von Thrombozyten, die Freisetzung proinflammatorischer Zytokine aus Monozyten sowie die vermehrte Phagozytose (Del Giudice & Gangestad, 2018; Olson et al., 2023; Rizo-Téllez et al., 2023). Im Gegensatz dazu vermittelt pCRP überwiegend antiinflammatorische Effekte, wie beispielsweise die Reduktion der Adhäsion von Neutrophilen, die Hemmung der PAF-induzierten Thrombozytenaggregation sowie die Reduktion der durch

Immunkomplexe induzierten Freisetzung von Typ-I-Interferonen bei systemischem Lupus erythematoses (Olson et al., 2023; Rizo-Téllez et al., 2023; Svanberg et al., 2023).

Aufgrund der zentralen Rolle von CRP bei Entzündungsprozessen ist dieses Akute-Phase-Protein auf der Suche nach Therapeutika zunehmend in den Vordergrund gerückt. Eine Stabilisierung der antiinflammatorischen Wirkung könnte dabei helfen, inflammatorische Erkrankungen zu regulieren und damit schwerwiegende Komplikationen zu verhindern. Da die proinflammatorische Wirkung von CRP aber nicht nur zu überschießenden Entzündungsreaktionen führen kann, sondern durch die Aktivierung des angeborenen Immunsystems auch wesentlich zu Heilungsprozessen beiträgt, müssen bei der Entwicklung von Therapeutika viele Aspekte berücksichtigt werden. In der vorliegenden Arbeit sollen CRP und endogene CRP-Liganden im Zusammenhang mit schweren chirurgischen Eingriffen untersucht werden, um ein besseres Verständnis möglicher antiinflammatorischer Effekte zu gewinnen.

1.4 ZIELSETZUNG DER VORLIEGENDEN ARBEIT

In Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass unwirksame Konzentrationen von ungebundenem PC nach Bindung an CRP die durch das ATP-Analogon BzATP induzierte IL-1 β -Freisetzung aus Monozyten über die Aktivierung von nAChRs inhibieren können (Richter et al., 2018) (siehe Abschnitt 1.2.5). Während rekombinantes CRP (rCRP) keinen inhibitorischen Effekt zeigte, konnte sowohl für Ca²⁺-abhängig an rCRP gebundenes PC als auch für humanes natives CRP (nCRP) eine Inhibition der BzATP-induzierten IL-1 β -Freisetzung aus monozytären U937-Zellen nachgewiesen werden (Richter et al., 2018). Die inhibitorische Wirkung von nCRP konnte zudem in mononukleären Zellen aus dem peripheren Blut gesunder Probanden bestätigt werden (Richter et al., 2018). In einer prospektiven klinischen Studie mit polytraumatisierten Patienten konnte eine negative Korrelation zwischen der CRP-Plasmakonzentration und der IL-1 β -Plasmakonzentration am Folgetag nachgewiesen werden (Richter et al., 2018). Des Weiteren konnte in einer retrospektiven klinischen Studie, bei weiblichen Patienten ohne Statintherapie einer Patientenkohorte mit Lungenteilresektion, eine negative Korrelation zwischen der präoperativen CRP-Plasmakonzentration und postoperativem Fieber gezeigt werden (Meyer et al., 2020). Diese beiden Studien liefern somit weitere Hinweise auf einen CRP-vermittelten antiinflammatorischen Effekt im Rahmen steriler Traumata.

Basierend auf den beschriebenen Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe wurden folgende Hypothesen aufgestellt:

- Endogenes CRP (eCRP) kann antiinflammatorische Effekte vermitteln.
- Der Anstieg der CRP-Konzentration während einer Akute-Phase-Reaktion nach chirurgischem Trauma verändert das antiinflammatorische Potential des Blutplasmas.
- Die antiinflammatorische Kapazität von CRP wird durch die Bindung und die Eigenschaften endogener Liganden beeinflusst.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollen diese Hypothesen experimentell überprüft werden, mit dem Ziel, neue Erkenntnisse über die pathophysiologische Rolle des CRP zu gewinnen. Zu diesem Zweck werden Blutproben von Patienten mit schweren viszeralchirurgischen Eingriffen präoperativ sowie zu zwei postoperativen Zeitpunkten entnommen. Bei diesen Patienten kommt es aufgrund der intraoperativ induzierten Gewebeschädigungen zu einer Akute-Phase-Reaktion, die mit einem starken Anstieg der CRP-Werte im Blutplasma der Patienten einhergeht. Typischerweise ist ein Peak der CRP-Plasmakonzentrationen nach circa 48 Stunden, also um den zweiten postoperativen Tag herum, zu erwarten, bevor es im weiteren Verlauf bei Ausbleiben relevanter Komplikationen zu einem Abfall der CRP-Konzentrationen kommt. Das antiinflammatorische Potential des Blutplasmas wird anhand der inhibitorischen Wirkung auf die BzATP-induzierte IL-1 β -Freisetzung aus autologen Blutzellen und monozytären THP-1-Zellen analysiert. Um die Rolle endogener CRP-Liganden-Komplexe bei der Wirkung des Blutplasmas zu untersuchen, werden diese am zweiten und fünften postoperativen Tag durch Immunpräzipitation mit einem anti-CRP-Antikörper aus dem Blutplasma der Patienten isoliert. Es wird untersucht, wie sich das CRP-depletierte Plasma im Vergleich zum CRP-haltigen Blutplasma auf die BzATP-induzierte IL-1 β -Freisetzung aus autologen Blutzellen und monozytären THP-1-Zellen auswirkt. Zusätzlich werden die isolierten CRP-Liganden-Komplexe in Zusammenarbeit mit der *Metabolomics Core Facility* des Instituts für Vaskuläre Signalgebung der Goethe-Universität Frankfurt am Main (Dr. Stephan Klatt) massenspektrometrisch charakterisiert. Die Informationen über die chemische Natur der endogenen CRP-Liganden und deren Verhalten im frühen postoperativen Verlauf sollen anschließend genutzt werden, um das entsprechende antiinflammatorische Potential im Rahmen BzATP-induzierter IL-1 β -Freisetzung zu untersuchen.

Die Charakterisierung endogener CRP-Liganden könnte Ansatzpunkte für die Entwicklung therapeutisch nutzbarer Liganden zur Stabilisierung und Potenzierung der antiinflammatorischen Kapazität von CRP liefern. Der Einsatz von CRP-basierten Therapeutika könnte eine durch übermäßige IL-1 β -Freisetzung vermittelte Entzündung bei schweren chirurgischen Eingriffen verhindern, ohne die Infektabwehr maßgeblich zu beeinträchtigen. Dies würde zu einer signifikanten Verbesserung des postoperativen Verlaufs führen.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 MATERIALIEN

2.1.1 VERBRAUCHSMATERIALIEN

Tabelle 1: Verwendete Verbrauchsmaterialien und Herstellerangaben.

| Bezeichnung | Hersteller |
|---|--|
| Amersham Hyperfilm™ ECL | GE Healthcare, Chicago, IL, USA |
| Amicon® Ultra-0,5 Centrifugal Filter Device 3 K | Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland |
| Bemis™ Parafilm M® 4 In. x 125 Ft. | Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA |
| CELLSTAR® Tubes 15 ml, 50 ml | Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich |
| Combi-Stopper Verschlusskoneen rot | B. Braun, Melsungen, Deutschland |
| Einweghandschuhe Vasco® Nitril Soft white | B. Braun |
| Einwegkanülen BD Microlance™ 3, 27 G 3/4“ | BD, Franklin Lakes, NJ, USA |
| Einwegspritzen Injekt® Luer Solo 10 ml, 20 ml | B. Braun |
| Einwegspritzen Omnifix® 5 ml | B. Braun |
| Filter-Pipettenspitzen 10 µl, 200 µl, 1000 µl | nerbe plus, Winsen, Deutschland |
| Hydrobin® 100 | Ambratec, Mainz, Deutschland |
| LeucoSEP™ Röhrchen 50 ml | Greiner Bio-One |
| Membran-Adapter | Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland |
| Mucocit® T Desinfektion | Schülke & Mayr, Norderstedt, Deutschland |
| NativePAGE™ 4 - 16 %, Bis-Tris, 1,0 mm, Mini-Protein-Gele | Thermo Fisher Scientific |
| Nunc™ Kryo-Röhrchen | Thermo Fisher Scientific |
| Pipettenspitzen 10 µl, 200 µl, 1000 µl | Sarstedt |
| Polyvinylidenfluorid | Merck Millipore |
| Transfermembran Immobilon®-P | |
| Reagiergefäße 0,5 ml, 1,5 ml | Sarstedt |
| Safety-Multifly®-Kanüle 21 G x 3/4“ | Sarstedt |
| Serologische Pipetten, steril 5 ml, 10 ml, 25 ml | Greiner Bio-One |
| Steriles Zellsieb Fisher Brand™ 40 µm | Thermo Fisher Scientific |
| TC-Schale 100, Standard | Sarstedt |
| Zellkulturflasche T-75, Suspension, Filterkappe | Sarstedt |
| Zellkulturplatte 48-well | Greiner Bio-One |
| Zellkulturplatte 96-well Suspension F | Sarstedt |

2.1.2 GERÄTE

Tabelle 2: Verwendete Geräte und Herstellerangaben.

| Bezeichnung | Hersteller |
|--|--|
| Analysewaage AE100 | Mettler-Toledo, Gießen, Deutschland |
| Blotting-/ Elektrophorese-Kammer & Zubehör | Von Keutz Labortechnik, Reiskirchen, Deutschland |
| CanoScan 9000F Mark II Scanner | Canon, Tokio, Japan |
| CLARIOstar Plus Mikroplatten-Reader | BMG Labtech, Ortenberg, Deutschland |
| CO₂-Inkubator HERAccl v10i | Thermo Fisher Scientific |
| Durchlichtmikroskop Leica DMLS | Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland |
| Dynabeads[®] MX Mixer | Thermo Fisher Scientific, Invitrogen, Waltham, MA, USA |
| DynaMag[™]-15 Magnet | Thermo Fisher Scientific, Invitrogen |
| Elektrophorese Netzgerät Consort E835 | Von Keutz Labortechnik |
| FLUOStar Optima[®] Photometer | BMG Labtech |
| Heizblock HX-1 | Peqlab Biotechnologie, Erlangen, Deutschland |
| iBright[™] 1500 Imaging System | Thermo Fisher Scientific, Invitrogen |
| Magnetrührer RH basic 2 | IKA Werke, Staufen im Breisgau, Deutschland |
| Mehrkanalpipette Reference[®] 2, 8-Kanal 30 - 300 µl | Eppendorf, Hamburg, Deutschland |
| Mikropipetten Research Plus 0,5 - 10 µl, 10 - 100 µl, 100 - 1000 µl | Eppendorf |
| Mikroskop Leitz Labovert | Leica Microsystems |
| Mini-Blot-Modul | Thermo Fisher Scientific |
| Mini-Gel-Tank | Thermo Fisher Scientific |
| pH-Messgerät UB-10 UltraBasic | Denver Instruments, Göttingen, Deutschland |
| Pipettierhilfe pipetus[®] | Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt, Deutschland |
| Präzisionswaage Kern PLJ 600-2GM | Kern & Sohn, Balingen, Deutschland |
| Rollenmischer Stuart[®] SRT9 | Cole-Parmer, Vernon Hills, IL, USA |
| Schüttelinkubator 311DS | Labnet International, Edison, NJ, USA |
| Sterilwerkbank MSC-Advantage[™] | Thermo Fisher Scientific |
| Ultraschallbad USC100T | VWR International, Radnor, PA, USA |
| Vortexer LLG[®]-uniTEXER | Lab Logistics Group, Meckenheim, Deutschland |
| Wasserbad | Köttermann, Uetze, Deutschland |
| Wippschüttler ST 5 | Otto E. Kobe, Marburg, Deutschland |
| Zählkammer Neubauer <i>Improved</i> | Laboroptik, Lancing, UK |
| Zentrifuge Mikro 200R | Andreas Hettich, Tuttlingen, Deutschland |
| Zentrifuge Rotina 380R | Andreas Hettich |
| Zentrifuge Rotina 420R | Andreas Hettich |

2.1.3 ZELLINIEN

Tabelle 3: Eingesetzte Zelllinien und Bezugsquellen.

| Bezeichnung | Bezugsquelle |
|----------------|--|
| THP-1 (ACC 16) | Leibniz-Institut DSMZ - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, Deutschland |

2.1.4 ANTIKÖRPER

Tabelle 4: Für Western Blot und Immunpräzipitation verwendete Antikörper, Informationen zu Antigenen und Art der Antikörper sowie Herstellerangaben mit Katalognummern. CRP, C-reaktives Protein; HRP, *horseradish peroxidase*; IgG, Immunglobulin G.

| Antikörper | Antigen | Verwendung | Hersteller und Katalognummer |
|--|-------------|------------------------------------|---|
| Kaninchen anti-Maus-IgG, HRP-gekoppelt (polyklonal) | Murines IgG | Sekundärantikörper Western Blot | Dako Denmark, Glostrup, Dänemark. #P0260 |
| Maus anti-CRP (monoklonal) | Humanes CRP | Primärantikörper Western Blot | MyBioSource, San Diego, CA, USA. #MBS531611 |
| Maus anti-CRP (monoklonal) | Humanes CRP | Immunpräzipitation | Merck Sigma-Aldrich, Darmstadt, Deutschland. #C1688 |
| Maus IgG1-Isotypkontrolle (monoklonal) | – | Immunpräzipitation | R&D Systems, Minneapolis, MN, USA. #MAB002 |

2.1.5 REAGENZIEN

Tabelle 5: Verwendete Reagenzien und Herstellerangaben mit Katalognummern.

| Bezeichnung | Hersteller und Katalognummer |
|---|---|
| 2-Mercaptoethanol $\geq 99,0$ % | Merck Sigma-Aldrich. #M6250 |
| 2-Propanol $\geq 99,8$ % | Merck Sigma-Aldrich. #33539 |
| APS, Ammoniumperoxodisulfat $\geq 98,5$ % | Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland. #9592 |
| Aqua B. Braun | B. Braun. #0082479E |
| Bicin PUFFERAN[®] ≥ 99 % | Carl Roth. #9162 |
| Bis-Tris PUFFERAN[®] ≥ 99 % | Carl Roth. #9140 |
| Bromphenolblau | Carl Roth. #A512 |
| BSA, Rinderserumalbumin | Serva Electrophoresis, Heidelberg, Deutschland. #11930.03 |

| | |
|---|---|
| BzATP, 2'(3')-O-(4-Benzoyl-benzoyl)adenosin-5'-triphosphat, Tri(triethylammonium)-Salz | Jena Bioscience, Jena, Deutschland. #NU-1620 |
| CaCl₂·2H₂O, Calciumchlorid-Dihydrat ≥ 99 % | Merck Sigma-Aldrich. #C3881 |
| cComplete™ Mini, EDTA-freier Protease-Inhibitor-Cocktail | Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland. #11836170001 |
| Coomassie Brilliantblau G-250 | Merck Sigma-Aldrich. #B0770 |
| D(+)-Glukose-Monohydrat ≥ 99,5 % | Carl Roth. #6780 |
| DTT, DL-Dithiothreitol | Merck Sigma-Aldrich. #D9779 |
| EDTA, Ethylendiamintetraessigsäure 0,5 M, pH 8,0, steril | bioWORLD, Dublin, OH, USA. #40120777 |
| EDTA-Natriumsalz | Serva Electrophoresis. #11280 |
| Entwicklerkonzentrat | Adefo-Chemie, Neu-Isenburg, Deutschland. #00009 |
| Essigsäure 100 % | Merck Sigma-Aldrich. #100063 |
| Ethanol | Merck Sigma-Aldrich. #32205 |
| FBS, Fötales Rinderserum | Capricorn Scientific, Ebsdorfergrund, Deutschland. #FBS-16A |
| Fixierkonzentrat | Adefo-Chemie. #00062 |
| Glycerin ≥ 99 % | Merck Sigma-Aldrich. #G2025 |
| Glycin PUFFERAN® ≥ 99,9 % | Carl Roth. #3908 |
| Harnstoff | Merck Sigma-Aldrich. #U0631 |
| HCl, Salzsäure 1 N | Merck Millipore. #109057 |
| HCl, Salzsäure 25 % | Carl Roth. #6331 |
| Heparin-Natrium-25000-ratiopharm® 25000 I.E./5 ml Heparin-Natrium | Ratiopharm, Ulm, Deutschland. #3029843 |
| HEPES-Natriumsalz, 4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethansulfonsäure | Merck, Darmstadt, Deutschland. #1.15231.0250 |
| KCl, Kaliumchlorid | Merck Millipore. #104936 |
| KH₂PO₄, Kaliumdihydrogenphosphat | Merck Millipore. #104873 |
| Koffein | Merck Sigma-Aldrich. #C0750 |
| LPS, Lipopolysaccharid aus <i>Escherichia coli</i> O26:B6 | Merck Sigma-Aldrich. #L2654 |
| Methanol ≥ 99,8 % | Merck Sigma-Aldrich. #32213 |
| MgCl₂·6H₂O, Magnesiumchlorid-Hexahydrat ≥ 99 % | Carl Roth. #HN03 |
| Milchpulver, <i>Blotting grade</i> | Carl Roth. #T145 |
| <i>Monocyte attachment</i> Medium | PromoCell, Heidelberg, Deutschland. #C-28051 |
| NaCl, Natriumchlorid ≥ 99,5 % | Carl Roth. #3957 |
| NaH₂PO₄·2H₂O, Natriumdihydrogenphosphat-Dihydrat | Merck. #106345 |
| NaOH, Natriumhydroxid 1 N | Merck Millipore. #109137 |
| NativeMark™ ungefärbter Proteinstandard | Thermo Fisher Scientific. #LC0725 |
| nCRP, humanes natives C-reaktives Protein | Merck Millipore. #AG723 |
| Paracetamol 10 mg/ml Infusionslösung | B. Braun. |

| | |
|--|---|
| PBS, Dulbecco's Phosphat-gepufferte Salzlösung, ohne Calcium | Merck Sigma-Aldrich. #D8537 |
| Phosphocholinchlorid-Calciumsalz Tetrahydrat | Merck Sigma-Aldrich. #P0378 |
| Pierce® Wasser, LC-MS-Gütegrad | Thermo Fisher Scientific. #51140 |
| Pierce™ <i>p</i>-Aminophenyl Phosphorylcholin-Agarose | Thermo Fisher Scientific. #20307 |
| Ponceau S Färbelösung | Thermo Fisher Scientific. #A40000279 |
| Precision Plus Protein™ Dual Colour Standard | Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA. #1610374 |
| rCRP, C-reaktives Protein, human, rekombinant aus <i>Escherichia coli</i> | Merck Millipore. #236608 |
| Rotiphorese® Gel 30 (37,5:1) | Carl Roth. #3029 |
| RPMI Roswell Park Memorial Institute 1640-Medium, mit L-Glutamin | Capricorn Scientific. #RPMI-A |
| RPMI 1640-Medium, mit L-Glutamin und Natriumbicarbonat | Merck Sigma-Aldrich. #R8758 |
| S 24795, 2-[2-(4-Bromphenyl)-2-oxoethyl]-1-methylpyridiniumiodid | Tocris Bioscience, Bristol, UK. #3518 |
| SDS, Natriumdodecylsulfat ultra pure ≥ 99,5 % | Carl Roth. #2326 |
| TEMED, Tetramethylethylendiamin ≥ 98,5 % | Carl Roth. #2367.3 |
| Tricin PUFFERAN® ≥ 99 % | Carl Roth. #6977 |
| TRIS PUFFERAN®, Tris(hydroxymethyl)aminomethan ≥ 99,9 % | Carl Roth. #4855 |
| Trypanblau-Lösung | Merck Sigma-Aldrich. #T8154 |
| Türks Lösung | Merck Millipore. #109277 |
| Tween®-20 | Merck Sigma-Aldrich. #8.22184 |

2.1.6 KITS UND ASSAYS

Tabelle 6: Eingesetzte Kits bzw. Assays und Herstellerangaben mit Katalognummern.

| Bezeichnung | Hersteller |
|--|---|
| CytoTox 96® Non-Radioactive Cytotoxicity Assay | Promega, Madison, WI, USA. #G1780 |
| Dynabeads™ Antibody Coupling Kit | Thermo Fisher Scientific, Invitrogen. #14311D |
| Humaner IL-1β/IL-1F2 DuoSet enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) | R&D Systems. #DY201 |
| Micro BCA™ Protein-Assay-Kit | Thermo Fisher Scientific. #23235. |
| SuperSignal™ West Dura Extended Duration Substrate | Thermo Fisher Scientific. #34076 |

2.1.7 PUFFER UND LÖSUNGEN

Tabelle 7: Zusammensetzungen der verwendeten Puffer und Lösungen. CaCl₂, Calciumchlorid; dH₂O, destilliertes Wasser; DTT, DL-Dithiothreitol; EDTA, Ethylendiamintetraessigsäure; HCl, Salzsäure; KCl, Kaliumchlorid; KH₂PO₄, Kaliumdihydrogenphosphat; mCRP, monomeres C-reaktives Protein; MgCl₂, Magnesiumchlorid; NaCl, Natriumchlorid; NaH₂PO₄, Natriumdihydrogenphosphat; nCRP, humanes natives C-reaktives Protein; SDS, Natriumdodecylsulfat; v/v, englisch: *volume per volume*; w/v, englisch: *weight per volume*.

| Bezeichnung | Zusammensetzung |
|--|--|
| Bath solution 2 mM Ca²⁺ | 5,4 mM KCl, 120 mM NaCl, 2 mM CaCl ₂ , 1 mM MgCl ₂ , 10 mM HEPES, 25 mM D(+)-Glukose-Monohydrat, dH ₂ O, pH 7,4 |
| Bath solution 5 mM Ca²⁺ | 5,4 mM KCl, 120 mM NaCl, 5 mM CaCl ₂ , 1 mM MgCl ₂ , 10 mM HEPES, 25 mM D(+)-Glukose-Monohydrat, dH ₂ O, pH 7,4 |
| Coomassie-Entfärbelösung | 50 % (v/v) Methanol, 3,5 % (v/v) 100 % Essigsäure, dH ₂ O |
| Coomassie-Färbelösung | 50 % (v/v) Methanol, 3,5 % (v/v) 100 % Essigsäure, 25 % (w/v) Coomassie Brillantblau G-250 |
| Dissoziationslösung | 8 M Harnstoff, 10 mM EDTA, dH ₂ O |
| Elutionspuffer | 5,4 mM KCl, 120 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1 mM MgCl ₂ , 10 mM HEPES, 25 mM D(+)-Glukose-Monohydrat, dH ₂ O, pH 7,4 |
| Gelpuffer 1 x | 10 mM DTT, 1 % SDS, dH ₂ O |
| Laufpuffer | 25,09 mM Tris, 192 mM Glycin, 0,1 % (w/v) SDS, dH ₂ O |
| mCRP-Lagerpuffer | 0,01 M Tris-HCl pH 7,3, 0,05 M NaCl, dH ₂ O |
| NativePAGE™ Anodenpuffer 1 x | 1 x NativePAGE™ Laufpuffer 20 x |
| NativePAGE™ Kathodenpuffer light blue | 5 % (v/v) NativePAGE™ Laufpuffer 20 x, 0,5 % (v/v) NativePAGE™ Kathodenpuffer-Additiv 20 x, dH ₂ O |
| NativePAGE™ Kathodenpuffer-Additiv 20 x | 0,4 % (w/v) Coomassie Brillantblau G-250, dH ₂ O |
| NativePAGE™ Laufpuffer 20 x | 1 M Bis-Tris, 1 M Tricin, dH ₂ O, pH 6,8 |
| NativePAGE™ Probenpuffer 4 x | 0,2 M Bis-Tris, 0,2 M NaCl, 40 % (w/v) Glycerin, 0,004 % Ponceau S, 64,2 mM HCl, dH ₂ O, pH 7,2 |
| nCRP-Lagerpuffer | 10 mM Tris-HCl pH 7,5, 100 mM NaCl, 2 mM CaCl ₂ , 0,1 % NaN ₃ |
| NuPAGE™ Transferpuffer 20 x | 0,5 M Bicin, 0,5 M Bis-Tris, 20 mM EDTA, dH ₂ O, pH 7,2 |
| PBS 10 x | 1,37 M NaCl, 26,83 mM KCl, 91,28 mM NaH ₂ PO ₄ , 14,7 mM KH ₂ PO ₄ , dH ₂ O, pH 7,2 |

| | |
|-------------------------|---|
| PBS-T | 0,1 % (v/v) Tween [®] -20 in 1 x PBS |
| Probenpuffer I | 62,5 mM Tris-HCl pH 6,8, 2 % (w/v) SDS, 1 Tablette cOmplete [™] Mini (Proteaseinhibitor), dH ₂ O |
| Probenpuffer II | 62,5 mM Tris-HCl pH 6,8, 2 % (w/v) SDS, 20 % (v/v) Glycerin, 10 % (v/v) 2-Mercaptoethanol, 1 Tablette cOmplete [™] Mini (Proteaseinhibitor), 0,002 % (w/v) Bromphenolblau, dH ₂ O |
| Probenpuffer 2 x | 125 mM Tris-HCl pH 6,8, 4 % (w/v) SDS, 20 % (v/v) Glycerin, 10 % (v/v) 2-Mercaptoethanol, 0,002 % (w/v) Bromphenolblau, 1 Tablette cOmplete [™] Mini (Proteaseinhibitor), dH ₂ O |
| Sammelgel-Puffer | 0,5 M Tris, 0,4 % (w/v) SDS, dH ₂ O, pH 6,8 |
| Transferpuffer | 24,76 mM Tris, 190 mM Glycin, 20 % (v/v) Methanol, 0,05 % (w/v) SDS, dH ₂ O |
| Trenngel-Puffer | 1,5 M Tris, 0,4 % (w/v) SDS, dH ₂ O, pH 8,8 |

2.1.8 SOFTWARE

Tabelle 8: Verwendete Software und Herstellerangaben.

| Bezeichnung | Hersteller |
|--|---|
| Compound Discoverer[™], Version 3.3 | Thermo Fisher Scientific |
| Inkscape Vektorgrafik-Programm, Version 1.3.2 | Freie Software (<i>General Public License</i>) |
| Microsoft Office 365 | Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA |
| R Statistiksoftware, Version 4.3.2 | Freie Software (<i>GNU General Public License</i>) |
| SPSS Statistiksoftware, Version 29 | IBM, Armonk, NY, USA |
| UCSF Chimera, Version 1.17.3 | <i>Resource for Biocomputing, Visualization, and Informatics (RBVI), University of California, San Francisco, CA, USA</i> |
| Zotero Literaturverwaltungsprogramm, Version 6.0.37 | Freie Software (<i>Corporation for Digital Scholarship, Vienna, VA, USA</i>) |

2.2 PROBANDEN UND PATIENTEN

2.2.1 ETHIKVOTEN UND PATIENTENCHARAKTERISTIKA

Für die Verwendung von humanen PBMCs gesunder Probanden wurden Blutproben im Rahmen der klinischen Studie AZ 98/23 gewonnen, welche durch die Ethikkommission

der Justus-Liebig-Universität in Gießen, Deutschland, genehmigt wurde. Volljährige, nichtrauchende Probanden ohne Vorerkrankungen wurden nach prüfärztlicher Aufklärung durch Herrn Prof. Dr. med. Andreas Hecker und Unterzeichnung einer schriftlichen Einverständniserklärung in die Probandenkohorte eingeschlossen.

Die durch die Ethikkommission der Justus-Liebig-Universität in Gießen bewilligte klinische Studie AZ 262/20 ermöglichte die Gewinnung der in dieser Arbeit untersuchten Blutproben von Patienten. Die in die Studie eingeschlossenen Patienten wurden prüfärztlich durch Frau Dr. med. Anca-Laura Amati aufgeklärt und eine schriftliche Einverständniserklärung wurde von allen Patienten bzw. einem gesetzlichen Vertreter unterschrieben.

Für die Teilnahme an der klinischen Studie wurden volljährige Patienten mit einer bevorstehenden schweren viszeralchirurgischen Operation in der Klinik für Allgemein-, Viszeral-, Thorax- und Transplantationschirurgie des Universitätsklinikums Gießen und Marburg (UKGM), Standort Gießen, ausgewählt. Die durchgeführten Operationen umfassten elektive Eingriffe wie beispielsweise subtotale Gastrektomien, partielle Duodenopankreatektomien und thorako-abdominelle Ösophagusresektionen. Das Vorliegen einer Schwangerschaft oder einer chronisch-entzündlichen Vorerkrankung, die Einnahme von immunsupprimierenden Medikamenten oder eine kürzlich erfolgte anderweitige Operation führten zum Ausschluss der betreffenden Patienten aus der Studie. Die grundlegenden perioperativen Charakteristika der in die Studie eingeschlossenen Patienten sind in den folgenden Tabellen aufgelistet (Tabelle 9, Tabelle 10):

Tabelle 9: Grundlegende präoperative Charakteristika der in die Studie eingeschlossenen Patienten (n = 16). Die Daten sind als Mediane mit Minimum bis Maximum, Anzahl (n) oder prozentual (%) dargestellt. ASA, englisch: *American Society of Anesthesiologists*; BMI, Body-Mass-Index; COPD, englisch: *chronic obstructive pulmonary disease*.

| | |
|--------------------------------------|--------------------|
| Alter (Jahre) | 64,5 (25 - 76) |
| Geschlechtsverteilung (n / %) | |
| männlich | 14 (87,5 %) |
| weiblich | 2 (12,5 %) |
| BMI (kg/m²) | 24,9 (19,4 - 32,1) |
| Blutgruppe (n / %) | |
| 0 | 6 (37,5 %) |
| A | 6 (37,5 %) |
| B | 3 (18,75 %) |
| AB | 1 (6,25 %) |

| | |
|----------------------------------|---------------------|
| Aktueller Raucher (n / %) | |
| ja | 3 (18,75 %) |
| nein | 3 (18,75 %) |
| keine Angabe | 10 (62,5 %) |
| Komorbiditäten (n / %) | |
| COPD | 3 (18,75 %) |
| Diabetes | 2 (12,5 %) |
| Gastritis | 2 (12,5 %) |
| Hypertonie | 5 (31,25 %) |
| Myokardinfarkt | 3 (18,75 %) |
| Nierenfunktionsstörung | 3 (18,75 %) |
| Diagnose (n / %) | |
| Magenkarzinom | 1 (6,25 %) |
| Ösophaguskarzinom | 8 (50 %) |
| Pankreaskarzinom | 5 (31,25 %) |
| Papillenadenom | 1 (6,25 %) |
| Ösophagusstenose | 1 (6,25 %) |
| ASA-Klassifikation | 2,5 (2 - 3) |
| Laborwerte präoperativ | |
| Leukozyten (Giga/l) | 6,8 (4,3 - 12,6) |
| Thrombozyten (Giga/l) | 258 (130 - 428) |
| Albumin (g/l) | 44,7 (32,2 - 47,6) |
| Cholinesterase (U/l) | 9367 (3258 - 16904) |
| C-reaktives Protein (mg/l) | 2,6 (0,5 - 36,1) |

Tabelle 10: Grundlegende intra- und postoperative Charakteristika der in die Studie eingeschlossenen Patienten (n = 16). Die Daten sind als Mediane mit Minimum bis Maximum, Anzahl (n) oder prozentual (%) dargestellt.

| | |
|--|----------------------|
| Operation (n / %) | |
| Gastrektomie | 1 (6,25 %) |
| Ösophagusresektion | 9 (56,25 %) |
| Partielle Duodenopankreatektomie | 6 (37,5 %) |
| Verweildauer Intensivstation (Tage) | 1,75 (1 - 28) |
| Krankenhausverweildauer (Tage) | 15 (8 - 54) |
| Laborwerte postoperativer Tag 2 | |
| Leukozyten (Giga/l) | 11,2 (6,5 - 24,8) |
| Thrombozyten (Giga/l) | 203 (70 - 439) |
| Albumin (g/l) | 32,9 (28,3 - 38,1) |
| Cholinesterase (U/l) | 5232 (1468 - 10254) |
| C-reaktives Protein (mg/l) | 172,6 (67,2 - 276,6) |
| Laborwerte postoperativer Tag 5 | |
| Leukozyten (Giga/l) | 8,1 (4,4 - 14,2) |
| Thrombozyten (Giga/l) | 234 (36 - 465) |
| Albumin (g/l) | 33,7 (26,7 - 42,3) |
| Cholinesterase (U/l) | 5084 (1949 - 11320) |
| C-reaktives Protein (mg/l) | 119 (8,5 - 380) |

2.2.2 BLUTENTNAHME

Bei gesunden Probanden wurde zur Isolierung humaner PBMCs Blut aus einer peripheren Vene in einer sterilen Einwegspritze mit frisch vorgelegter Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) (Endkonzentration: 1 μ mol EDTA pro ml Blut) entnommen.

In der Patientenkohorte wurden Blutentnahmen einen Tag vor der Operation sowie an den postoperativen Tagen zwei und fünf durchgeführt. Um eine Koagulation der Blutproben, die durch Punktion einer peripheren Vene gewonnen wurden, zu vermeiden, wurden Einwegspritzen (Injekt® Luer Solo, B. BRAUN) unter sterilen Bedingungen durch Vorlage von entweder EDTA (Endkonzentration: 1 μ mol EDTA pro ml Blut) oder Heparin-Natrium (Endkonzentration: 17,5 I.E. Heparin-Natrium pro ml Blut) vorbereitet.

2.2.3 GEWINNUNG VON BLUTPLASMEN

Die heparinisierten Blutproben (10 ml) der Patientenkohorte wurden bei Raumtemperatur für zwölf Minuten bei 800 x g zentrifugiert, die Blutplasmen aliquotiert und teilweise bei -20 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert. Weitere Aliquote der Blutplasmen wurden unmittelbar für die Immunpräzipitation von CRP-Liganden-Komplexen verwendet (vgl. Abschnitt 2.4.5) und die Blutzellen wurden direkt für IL-1 β -Freisetzungsexperimente eingesetzt (vgl. Abschnitt 2.3.2.1).

2.3 ZELLKULTUREXPERIMENTE

2.3.1 MONOZYTÄRE THP-1-ZELLEN

2.3.1.1 KULTIVIERUNG

Die humane Monozyten-Zelllinie THP-1 (ACC 16) wurde für Zellkulturexperimente verwendet. Diese Zelllinie wurde ursprünglich aus dem peripheren Blut eines einjährigen Jungen mit akuter monozytärer Leukämie etabliert und über das Leibniz-Institut DSMZ (DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GMBH) bezogen (Tsuchiya et al., 1980). Die Suspensionszellen wurden unter sterilen Bedingungen bei 37 °C und 5 % CO₂-Sättigung in *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI) 1640-Medium (CAPRICORN SCIENTIFIC; im Folgenden kurz „RPMI-Capricorn“ genannt) kultiviert. Das Medium wurde mit 10 % fötalem Rinderserum (englisch: *fetal bovine serum*, FBS) versetzt, welches zuvor bei 56 °C hitzeinaktiviert wurde. Die Zellen wurden zweimal wöchentlich passagiert. Dazu wurden die Zellen bei Raumtemperatur für acht Minuten

bei 500 x g zentrifugiert, in frischem RPMI-Capricorn mit 10 % FBS resuspendiert und die Zellzahl bestimmt. Für die hämozytometrische Zellzahlbestimmung wurden 10 µl der Zellsuspension im Verhältnis 1:10 mit Trypanblau-Lösung versetzt und mittels Neubauer-Zählkammer ausgezählt. Trypanblau ist ein Farbstoff, der lediglich tote Zellen anfärbt, da er intakte Zellmembranen nicht durchdringen kann (Strober, 2015). Dies ermöglicht es, die Zellviabilität bei der Zellzählung zu berücksichtigen. Das zur Aufrechterhaltung einer Zellzahl von 3 - 4 x 10⁶ Zellen benötigte Zellsuspensionsvolumen wurde in eine neue Zellkulturflasche überführt und mit RPMI-Capricorn mit 10 % FBS aufgefüllt.

2.3.1.2 IL-1β-FREISETZUNGSEXPERIMENTE

Alle Experimente mit THP-1-Zellen wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Zunächst wurde die Zellsuspension für acht Minuten bei 500 x g und Raumtemperatur zentrifugiert und das Zellpellet in FBS-freiem RPMI-Capricorn resuspendiert. Nach Bestimmung der Zellzahl wurde die Zellsuspension auf eine Konzentration von 1 x 10⁶ Zellen pro ml Lösung eingestellt. Für Experimente in 96-well-Zellkulturplatten wurde die Zellsuspension mit 1 µg/ml LPS (aus *Escherichia coli* O26:B6) versetzt und jeweils 2 x 10⁵ Zellen pro Ansatz ausgesät. Bei Versuchen in 48-well-Zellkulturplatten wurde LPS (Endkonzentration 1 µg/ml) in die Platte vorgelegt und jeweils 5 x 10⁵ Zellen ausgesät. Nach einer fünfstündigen Inkubation bei 37 °C und 5 % CO₂-Sättigung wurden je nach Experiment Substanzen oder Blutplasmen zugegeben und die Zellen mit 100 µM BzATP für weitere 40 Minuten bei 37 °C und 5 % CO₂-Sättigung inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen für acht Minuten bei 500 x g und 4 °C zentrifugiert, um die Zellen von den Zellkulturüberständen zu trennen. Die Überstände wurden abgenommen und bis zur weiteren Verwendung für die Analyse der IL-1β-Freisetzung mittels enzymgebundenem Immunadsorptions-Assay (englisch: *enzyme-linked immunosorbent assay*, ELISA) und zur Bestimmung der Laktatdehydrogenase (LDH)-Aktivität bei -20 °C gelagert. Die folgende Abbildung veranschaulicht schematisch den Versuchsablauf aller Experimente zur BzATP-induzierten IL-1β-Freisetzung aus THP-1-Zellen (Abbildung 1).

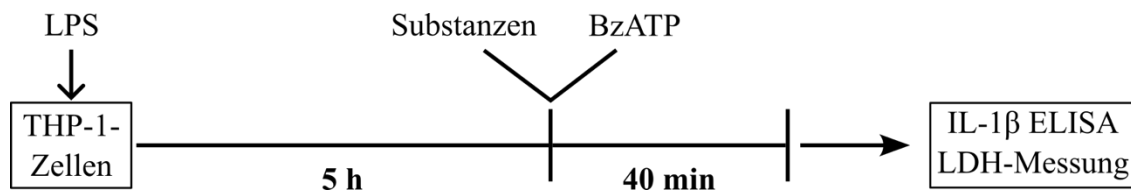


Abbildung 1: Schematische Darstellung des experimentellen Ablaufs zur Freisetzung von IL-1 β aus monozytären THP-1-Zellen. Für die Vorstimulation wurden 2×10^5 (96-well-Zellkulturplatte) bzw. 5×10^5 (48-well-Zellkulturplatte) THP-1-Zellen unter sterilen Bedingungen mit 1 $\mu\text{g/ml}$ Lipopolysaccharid (LPS) für fünf Stunden (h) bei 37 °C und 5 % CO_2 -Gehalt inkubiert. Im Anschluss wurden je nach Experiment Substanzen, Blutplasmen oder CRP-depletierte Blutplasmen zugegeben, mit 100 μM 2'(3')-O-(4-Benzoyl-benzoyl)adenosin-5'-triphosphat (BzATP) stimuliert und für weitere 40 Minuten (min) inkubiert. Nach der Abtrennung der Zellen von den Zellkulturüberständen mittels Zentrifugation wurden die Überstände zur Quantifizierung von Interleukin-1 β (IL-1 β) mittels *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) sowie zur Bestimmung der Laktatdehydrogenase (LDH)-Aktivität verwendet.

2.3.2 PRIMÄRE BLUTZELLEN

2.3.2.1 UNFRAKTIONIERTER BLUTZELLEN

Die Blutzellen der heparinisierten Blutproben chirurgischer Patienten wurden nach einer Zentrifugation und der Abnahme des Blutplasmas mit FBS-freiem RPMI 1640-Medium (MERCK SIGMA-ALDRICH; im Folgenden kurz als „RPMI-Sigma“ bezeichnet) gewaschen. Anschließend wurden die Zellen für zwölf Minuten bei 800 x g zentrifugiert, erneut in FBS-freiem RPMI-Sigma resuspendiert und mit 5 ng/ml LPS versetzt. Je 150 μl der Zellsuspension wurden in einer 96-well-Zellkulturplatte ausgesät und für drei Stunden bei 37 °C und 5 % CO_2 -Gehalt inkubiert. Im Anschluss wurden Substanzen, Blutplasmen oder CRP-depletierte Blutplasmen zugegeben, mit 100 μM BzATP stimuliert und für weitere 40 Minuten bei 37 °C und 5 % CO_2 -Gehalt inkubiert. Am Ende der Inkubationszeit wurden die Blutzellen durch Zentrifugation für acht Minuten bei 4 °C und 500 x g von den Zellkulturüberständen getrennt. Die Überstände wurden abgenommen und bis zur weiteren Verwendung zur Quantifizierung der IL-1 β -Konzentration mittels ELISA bei -20 °C gelagert. Der Versuchsablauf ist in der folgenden Abbildung schematisch dargestellt (Abbildung 2).

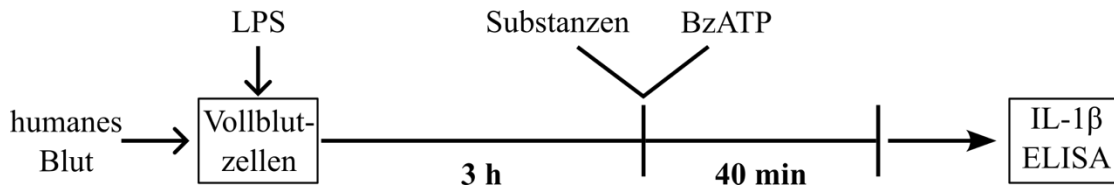


Abbildung 2: Schematische Darstellung des Ablaufs der Experimente zur IL-1 β -Freisetzung aus humanen Vollblutzellen chirurgischer Patienten. Nach Abnahme des Blutplasmas wurden Vollblutzellen mit 5 ng/ml Lipopolysaccharid (LPS) stimuliert und je 150 μ l pro Ansatz in einer 96-well-Zellkulturplatte für drei Stunden (h) bei 37 °C und 5 % CO₂-Sättigung inkubiert. Anschließend wurden Substanzen oder Blutplasmen hinzugegeben, mit 100 μ M 2'(3')-O-(4-Benzoyl-benzoyl)adenosin-5'-triphosphat (BzATP) stimuliert und für weitere 40 Minuten (min) inkubiert. Danach wurden Zellen und Zellkulturüberstände durch Zentrifugation getrennt. Die Zellkulturüberstände wurden abgenommen und zur Quantifizierung von Interleukin-1 β (IL-1 β) mittels *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) verwendet.

2.3.2.2 HUMANE PBMCs

Zur Isolierung humaner PBMCs wurden die mit EDTA versetzten Blutproben gesunder Probanden sowie chirurgischer Patienten im Verhältnis 1:2 mit Phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS)/0,1 % BSA verdünnt und mit 5 ng/ml LPS gepulst. Das Blut-PBS-Gemisch wurde in 50 ml LeucoSEP™ Röhrchen (GREINER BIOONE) überführt und für 25 Minuten bei Raumtemperatur und 800 x g ohne Bremse zentrifugiert. Die LeucoSEP™ Röhrchen enthalten eine Trennscheibe aus Polyethylen sowie ein Separationsmedium. Die Zentrifugation des Blutes resultiert dadurch in einer Abtrennung von Erythrozyten und Granulozyten sowie in einer Anreicherung von PBMCs in der Interphase. Nachdem der Plasmaüberstand verworfen wurde, wurde die Interphase abgenommen, mit PBS/0,1 % BSA auf ein Gesamtvolumen von 50 ml aufgefüllt und für acht Minuten bei 500 x g zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet mit PBS/0,1 % BSA resuspendiert. Bei Proben der Patientenkohorte wurden die Zellen über einem sterilen Zell-Sieb (THERMO FISHER SCIENTIFIC) mit einer Maschenweite von 40 μ m gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation für acht Minuten bei 500 x g wurde der Überstand verworfen. Zellen gesunder Probanden wurden in *Monocyte attachment* Medium (PROMOCCELL) aufgenommen, während Zellen der Patienten in FBS-freiem RPMI-Sigma resuspendiert wurden. Die Zellzahl der aufgereinigten PBMCs wurde hämozytometrisch mit Türks Lösung in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Zunächst wurde eine Verdünnung der Zellsuspension im Verhältnis 1:10 mit Türks Lösung vorgenommen und eine Inkubation für drei Minuten bei Raumtemperatur durchgeführt. Bei Patientenproben wurde die Zellsuspension nach Bestimmung der

Zellzahl auf eine Konzentration von 5×10^5 Zellen in $150 \mu\text{l}$ eingestellt. Anschließend wurden je 5×10^5 Zellen pro Ansatz in einer 96-well-Zellkulturplatte ausgesät und für drei Stunden bei 37°C und 5 % CO_2 -Sättigung inkubiert. Daraufhin wurde wie in Abschnitt 2.3.2.1 für Vollblutzellen beschrieben fortgefahren. Die Zellkulturüberstände wurden bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert, um die IL-1 β -Konzentration sowie die LDH-Aktivität zu bestimmen (Abbildung 3).

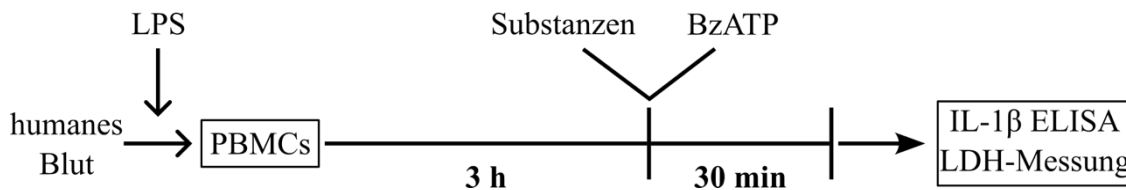


Abbildung 3: Schematische Darstellung des Ablaufs der Experimente zur IL-1 β -Freisetzung aus humanen PBMCs chirurgischer Patienten. Nach Pulsen von humanem Blut mit 5 ng/ml Lipopolysaccharid (LPS) wurden periphere mononukleäre Blutzellen (englisch: *peripheral blood mononuclear cells*, PBMCs) durch Dichtegradientenzentrifugation isoliert. Anschließend wurden 5×10^5 Zellen in einer 96-well-Zellkulturplatte ausgesät und für drei Stunden (h) bei 37°C und 5 % CO_2 -Sättigung inkubiert. Danach wurden Substanzen oder Blutplasmen hinzugegeben, mit $100 \mu\text{M}$ 2'(3')-O-(4-Benzoyl-benzoyl)adenosin-5'-triphosphat (BzATP) stimuliert und für weitere 30 Minuten (min) inkubiert. Anschließend wurden Zellen und Zellkulturüberstände durch Zentrifugation getrennt. Die Überstände wurden abgenommen und zur Quantifizierung von Interleukin-1 β (IL-1 β) mittels *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) sowie zur Bestimmung der Laktatdehydrogenase (LDH)-Aktivität verwendet.

Bei Proben gesunder Probanden wurde die Zellsuspension nach Bestimmung der Zellzahl auf eine Zellzahl von 1×10^6 Zellen pro ml Lösung eingestellt und je 5×10^5 Zellen pro Ansatz in einer 48-well-Zellkulturplatte ausgesät. Zur Adhärenz-Selektion wurde nach einer Inkubation von drei Stunden bei 37°C und 5 % CO_2 -Sättigung das Medium abgeschüttet. Anschließend wurden je $500 \mu\text{l}$ frisches RPMI-Sigma ohne FBS zugegeben und für weitere 20 Minuten bei 37°C und 5 % CO_2 -Gehalt inkubiert. Danach wurden zu untersuchende Substanzen zugegeben, mit $100 \mu\text{M}$ BzATP stimuliert und für weitere 30 Minuten bei 37°C und 5 % CO_2 -Gehalt inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Blutzellen durch Zentrifugation für acht Minuten bei 4°C und $500 \times g$ von den Überständen getrennt. Die Überstände wurden abgenommen und bei -20°C gelagert, um sie zur Quantifizierung von IL-1 β mittels ELISA und zur Bestimmung der LDH-Aktivität zu verwenden. Der Versuchsablauf ist in der folgenden Abbildung schematisch dargestellt (Abbildung 4).

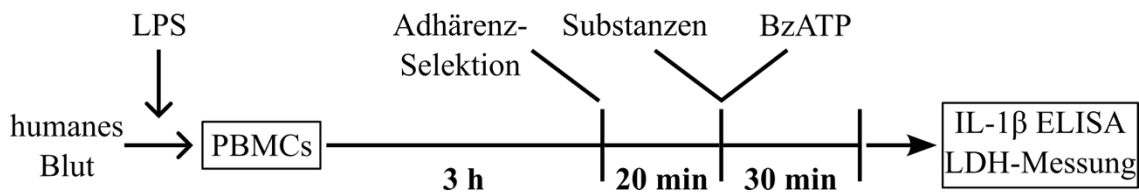


Abbildung 4: Schematische Darstellung des Ablaufs der Experimente zur Freisetzung von IL-1 β aus humanen PBMCs gesunder Probanden. Die peripheren mononukleären Blutzellen (englisch: *peripheral blood mononuclear cells*, PBMCs) wurden nach Pulsen von humanem Blut gesunder Probanden mit 5 ng/ml Lipopolysaccharid (LPS) durch Dichtegradientenzentrifugation isoliert. Anschließend wurden 5×10^5 Zellen in *Monocyte attachment Medium* in einer 48-*well*-Zellkulturplatte ausgesät und für drei Stunden (h) bei 37 °C und 5 % CO₂-Sättigung inkubiert. Im Rahmen einer Adhärenz-Selektion wurde das Medium anschließend abgeschüttet und frisches RPMI 1640-Medium (Sigma) ohne FBS zugegeben. Nach einer Inkubationszeit von 20 Minuten (min) wurden Substanzen hinzugegeben, mit 100 μ M 2'-(3')-O-(4-Benzoyl-benzoyl)adenosin-5'-triphosphat (BzATP) stimuliert und für weitere 30 Minuten (min) inkubiert. Anschließend wurden Zellen und Zellkulturüberstände durch Zentrifugation getrennt, die Überstände abgenommen und zur Quantifizierung von Interleukin-1 β (IL-1 β) mittels *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) sowie zur Bestimmung der Laktatdehydrogenase (LDH)-Aktivität verwendet.

2.4 PROTEINBIOCHEMISCHE METHODEN

2.4.1 QUANTIFIZIERUNG DER IL-1 β -FREISETZUNG MITTELS ELISA

Die Quantifizierung von IL-1 β in den Zellkulturüberständen erfolgte mittels des humanen IL-1 β /IL-1F2 DuoSet[®] ELISA (R&D SYSTEMS) gemäß den Anweisungen des Herstellers. Das Kit basiert auf dem Prinzip des Sandwich-ELISA. Zunächst wurde ein für humanes IL-1 β spezifischer Antikörper (Maus Anti-Human IL-1 β *capture*-Antikörper) auf der Oberfläche einer 96-*well*-Mikrotiterplatte immobilisiert und unspezifische Bindungsstellen mit 1 % BSA in PBS blockiert. Nach Waschen zur Entfernung von ungebundenem Protein wurden die Proben zugegeben und für zwei Stunden inkubiert. Währenddessen erfolgte die Bindung des in den Proben enthaltenen IL-1 β durch die Antikörper. Nach erneutem Waschen wurde der Detektionsantikörper (biotinylierter Ziege Anti-Human IL-1 β Detektionsantikörper) zugegeben und für zwei Stunden inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift wurde die Platte für 20 Minuten im Dunkeln mit Streptavidin-gekoppelter Meerrettich-Peroxidase (englisch: *horseradish peroxidase*, HRP) inkubiert, erneut gewaschen und nach Zugabe der Substratlösung nochmals für 20 Minuten im Dunkeln inkubiert. Hierbei kommt es zur enzymatischen Umsetzung des in der Substratlösung enthaltenen Tetramethylbenzidins. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 2 N Schwefelsäure gestoppt, was zu einem Farbumschlag, resultierend in einem Absorptionsmaximum bei 450 nm, führte. Die Quantifizierung erfolgte durch

Messung der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 450 nm in einem Spektrophotometer (FLUOStar Optima[®], BMG LABTECH) und anschließender Auswertung mit Hilfe einer Standardkurve, welche aus einer seriellen Verdünnung bekannter IL-1 β Konzentrationen erstellt wurde. Der Nachweisbereich für IL-1 β lag laut Hersteller-Datenblatt zwischen 3,9 und 250 pg/ml IL-1 β .

2.4.2 BESTIMMUNG DER LDH-AKTIVITÄT ZUR ABSCHÄTZUNG DES ANTEILS TOTER ZELLEN

Zur Bestimmung der zytotoxischen Wirkung der in den Experimenten eingesetzten Substanzen wurde der *CytoTox96[®] Non-Radioactive Cytotoxicity Assay* (PROMEGA) verwendet. Dieser Test misst die Aktivität der LDH über eine kolorimetrische Reaktion. Für jedes Experiment wurden vor Durchführung des Tests unbehandelte Kontrollzellen durch Zugabe von 1 x Lyse-Lösung für 45 Minuten lysiert (*total release*), um die maximale LDH-Aktivität der eingesetzten Zellen bestimmen zu können. Der Anteil toter Zellen wurde gemäß den Anweisungen des Herstellers durch die Messung der LDH-Aktivität in den Zellkulturüberständen bestimmt. Die Zellkulturüberstände wurden im Verhältnis 1:2 mit CytoTox 96[®] Reagens gemischt und bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Nachdem die Reaktion durch Zugabe von 1 N Essigsäure gestoppt wurde, wurde die Absorption bei 490 nm in einem Spektrophotometer (FLUOStar Optima[®], BMG LABTECH) gemessen. Im Anschluss wurde der prozentuale Zelltod aus dem Verhältnis der gemessenen LDH-Aktivität zur maximalen LDH-Aktivität (*total release*) berechnet.

2.4.3 DISSOZIATION VON CRP

Zur Dissoziation von pCRP in die monomeren Untereinheiten wurde 1 mg/ml nCRP (MERCK MILLIPORE) für eine Stunde bei 37 °C mit Dissoziationslösung inkubiert (Potempa et al., 1987). Im Anschluss wurde ein Puffer-Austausch zu Lagerpuffer mittels Ultrafiltration durchgeführt. Hierzu wurden Amicon[®] Ultra-Zentrifugalfiltereinheiten mit einem Cut-off von 3 kDa (MERCK MILLIPORE) eingesetzt. Die CRP-Lösung wurde zunächst für 30 Minuten bei 14000 x g zentrifugiert und das Filtrat verworfen. Im Anschluss wurde zweimal mit Lagerpuffer gewaschen und für jeweils 15 Minuten bei 14000 x g zentrifugiert. Nach Verwerfen des Filtrates wurden die Filtereinheiten umgedreht und für zwei Minuten bei 1000 x g zentrifugiert.

2.4.4 PROTEINQUANTIFIZIERUNG DURCH BCA-TEST

Um sicherzustellen, dass durch die Ultrafiltration kein Proteinverlust des dissoziierten CRPs vorlag, wurde im Anschluss die Proteinkonzentration mit Hilfe eines Bicinchoninsäure (englisch: *bicinchonic acid*, BCA)-Tests bestimmt. Hierzu wurde das Micro BCA™ Protein-Assay-Kit (THERMO FISHER SCIENTIFIC) verwendet. Bei dem Test wird eine Protein-abhängige Reduktion von Cu^{2+} zu Cu^{1+} genutzt, welche in Verbindung mit einer BCA-abhängigen Detektion von Cu^{1+} über eine kolorimetrische Reaktion steht. Der aus der Reaktion resultierende Komplex zeigt Absorption bei einer Wellenlänge von 580 nm, die proportional zur vorliegenden Proteinkonzentration ist. Mit Hilfe einer Standardkurve aus bekannten Proteinkonzentrationen kann somit schlussendlich die Proteinmenge in den untersuchten Proben berechnet werden. Abweichend zu den Herstelleranweisungen wurde für die Standardkurve eine Verdünnungsreihe aus einer BSA-Lösung (100 $\mu\text{g/ml}$) mit BSA-Konzentrationen im Bereich zwischen 50 $\mu\text{g/ml}$ und 1,25 $\mu\text{g/ml}$ erstellt. Die mit NaCl-Lösung verdünnten Proben bzw. der Standard (150 μl) wurden in eine 96-well-Mikrotiterplatte gegeben und mit je 150 μl BCA-Reagenzlösung versetzt. Die Absorption bei 580 nm wurde nach zweistündiger Inkubation bei 37 °C in einem Spektrophotometer (FLUOStar Optima®, BMG LABTECH) gemessen und die Proteinkonzentration berechnet.

2.4.5 IMMUNPRÄZIPITATION VON CRP-LIGANDEN-KOMPLEXEN AUS PATIENTENPLASMEN

Zur Aufreinigung der in postoperativen Patientenplasmen enthaltenen CRP-Liganden-Komplexe und der damit verbundenen Gewinnung CRP-depletierter Plasmen wurde das Prinzip der Immunpräzipitation unter sterilen Bedingungen angewandt. Hierfür wurde das DynaBeads™ *Antibody Coupling* Kit (INVITROGEN) gemäß den Anweisungen des Herstellers verwendet. Einen Tag vor der Immunpräzipitation wurden zunächst jeweils 12 mg magnetische Beads mit anti-CRP-Antikörpern oder IgG1-Isotyp-Kontrollantikörpern gekoppelt und über Nacht bei 37 °C in einem Inkubationsschüttler inkubiert. Am folgenden Tag wurde die Immunpräzipitation von CRP aus Patientenplasmen durchgeführt. Die mit Antikörpern gekoppelten DynaBeads wurden viermal mit PBS sowie viermal mit RPMI-Sigma ohne FBS gewaschen und anschließend für 30 Minuten bei 4 °C auf einem Rollenmischer mit Patientenplasma inkubiert. Um CRP vollständig aus dem Patientenplasma zu isolieren und CRP-depletierendes Plasma zu

gewinnen, wurde die Menge an CRP im Plasma anhand des aktuellen Laborwertes berechnet, der routinemäßig im Zentrallabor des UKGM Gießen mittels Turbidimetrie bestimmt wurde. Es konnten 4 µg CRP pro 3 mg Beads präzipitiert werden, was bei einer initialen Einwaage von 12 mg Beads die finale für die Immunpräzipitation einsetzbare CRP-Menge auf 16 µg limitierte. Für eine vollständige Depletion von CRP wurden demnach 16 µg CRP aus Plasma eingesetzt, welches zuvor im Verhältnis 2:5 mit FBS-freiem RPMI-Sigma verdünnt wurde. Nach einer 30-minütigen Inkubation wurde das CRP-depletierte Plasma abgenommen und bis zur weiteren Verwendung in den Experimenten zur IL-1 β -Freisetzung bei 4 °C zwischengelagert. Die DynaBeads mit gebundenen CRP-Liganden-Komplexen bzw. der Isotyp-Kontrolle wurden viermal mit *bath solution* (enthält 5 mM Ca²⁺) gewaschen. Die Beads wurden in NuncTM Kryoröhrchen überführt, die Waschlösung abgenommen und verworfen, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bei -80 °C für die massenspektrometrische Analyse gelagert. Je 10 µl verdünntes Plasma, CRP-depletiertes Plasma bzw. Plasma der Isotyp-Kontrolle sowie Beads mit gebundenen CRP-Liganden-Komplexen bzw. der Isotyp-Kontrolle wurden in einem Verhältnis von 1:2 mit 2 x Probenpuffer verdünnt und bei -20 °C bis zur weiteren Verwendung für die Analyse durch Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) sowie Western-Blot gelagert.

2.4.6 AFFINITÄTSREINIGUNG VON ENDOGENEM CRP

Neben der Immunpräzipitation wurde zur Aufreinigung von endogenem CRP aus postoperativem Patientenplasma außerdem das Prinzip der Affinitätsreinigung durch Bindung von CRP an PC angewandt. Hierzu wurde immobilisiertes *p*-Aminophenyl-PC-Gel (THERMO SCIENTIFIC; im Folgenden als PC-Agarose-Beads bezeichnet) verwendet, welches laut Hersteller-Datenblatt eine Bindungskapazität von ≥ 3 mg CRP pro ml Gel aufweist. Endogenes CRP wurde aus allen Plasmen aufgereinigt, in denen CRP mittels Massenspektrometrie untersucht wurde (postoperativer Tag 2: n = 7; postoperativer Tag 5: n = 5) und die CRP-Konzentration im Plasma bei ≥ 60 mg/l lag (Tag 2: n = 7; Tag 5: n = 3). Zur Aufreinigung wurden die Plasmen vom postoperativen Tag 2 oder vom postoperativen Tag 5 zunächst mit *bath solution* (enthält 2 mM Ca²⁺) auf eine CRP-Konzentration von circa 0,06 µg/µl verdünnt. Die gesamte Aufreinigung wurde bei Raumtemperatur unter sterilen Bedingungen durchgeführt.

Als Positivkontrolle wurde ein Teil des verdünnten Plasmas nochmals im Verhältnis 4:5 mit *bath solution* (enthält 2 mM Ca^{2+}) verdünnt und eine Stunde unter kontinuierlicher Rotation inkubiert. Anschließend wurden je 10 μl abgenommen und jeweils im Verhältnis 1:2 mit 2 x Probenpuffer bzw. 2 x NativePAGE™ Probenpuffer verdünnt und bei -20 °C bzw. 4 °C bis zur weiteren Analyse durch SDS-PAGE bzw. *blue native*-Polyacrylamidgelelektrophorese (BN-PAGE) aufbewahrt.

Für eine Negativkontrolle wurden 100 μl PC-Agarose-Beads im Verhältnis 1:2 mit 2 x Probenpuffer verdünnt und für fünf Minuten bei 70 °C inkubiert. Nach zweiminütiger Zentrifugation bei 4000 x g wurde der Überstand abgenommen, im Verhältnis 1:5 mit 2 x Probenpuffer verdünnt und bei -20 °C bis zur Analyse durch SDS-PAGE gelagert.

Zur CRP-Isolierung wurden 100 μl der PC-Agarose-Beads zweimal mit dem fünffachen Volumen *bath solution* (enthält 2 mM Ca^{2+}) gewaschen und bei 4000 x g für zwei Minuten zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand verworfen, 400 μl des verdünnten Plasmas zugegeben und für eine Stunde unter kontinuierlicher Rotation inkubiert. Nach zweiminütiger Zentrifugation bei 4000 x g wurde der Überstand abgenommen und für Zellkulturexperimente weiterverwendet. Außerdem wurden 10 μl abgenommen, im Verhältnis 1:2 mit 2 x Probenpuffer verdünnt und bei -20 °C für die nachfolgende Analyse durch SDS-PAGE gelagert. Die PC-Agarose-Beads wurden dreimal mit *bath solution* (enthält 2 mM Ca^{2+}) gewaschen und für jeweils zwei Minuten bei 4000 x g zentrifugiert. Von den Überständen wurden je 10 μl abgenommen, im Verhältnis 1:2 mit 2 x Probenpuffer verdünnt und bei -20 °C zur Analyse durch SDS-PAGE eingefroren. Nachdem der Überstand verworfen wurde, wurde das gebundene CRP viermal mit je 100 μl EDTA-haltigem Elutionspuffer fraktioniert eluiert. Hierzu erfolgte nach Zugabe des Elutionspuffers eine jeweils zehnminütige Inkubation vor Zentrifugation bei 4000 x g für zwei Minuten. Von den Fraktionen wurden zunächst je 10 μl abgenommen, im Verhältnis 1:2 mit Probenpuffer verdünnt und bis zur Analyse durch SDS-PAGE bei -20 °C gelagert. Anschließend wurden die Fraktionen vereinigt und ein Puffer-Austausch in *bath solution* (enthält 2 mM Ca^{2+}) mittels Ultrafiltration durchgeführt. Hierzu wurden Amicon® Ultra-Zentrifugalfiltereinheiten mit einem Cut-off von 3 kDa (MERCK MILLIPORE) verwendet. Das Eluat wurde zunächst für 30 Minuten bei 14000 x g zentrifugiert und das Filtrat verworfen. Im Anschluss wurde zweimal mit *bath solution* (enthält 2 mM Ca^{2+}) gewaschen und für jeweils 15 Minuten bei 14000 x g

zentrifugiert. Nach Verwerfen des Filtrates wurden die Filtereinheiten umgedreht und für zwei Minuten bei 1000 x g zur Rückgewinnung des Eluats zentrifugiert. Zur Kontrolle der Affinitätsreinigung durch SDS-PAGE wurden vom Gesamt-Eluat vor und nach Ultrafiltration erneut je 10 µl abgenommen, im Verhältnis 1:2 mit 2 x Probenpuffer verdünnt und bei -20 °C eingefroren. Außerdem wurden 10 µl vom Gesamt-Eluat nach Ultrafiltration im Verhältnis 1:2 mit 2 x NativePAGE™ Probenpuffer verdünnt und bei 4 °C zur Analyse durch BN-PAGE am Folgetag gelagert. Die für die Affinitätsreinigung eingesetzten PC-Agarose-Beads wurden nach Elution des gebundenen CRP im Verhältnis 1:2 mit 2 x Probenpuffer verdünnt. Nach Inkubation für fünf Minuten bei 70 °C folgte eine Zentrifugation für zwei Minuten bei 4000 x g. Der Überstand wurde abgenommen, im Verhältnis 1:5 mit 2 x Probenpuffer verdünnt und bei -20 °C zur Analyse durch SDS-PAGE gelagert.

2.4.7 BN-PAGE

Zur Auftrennung von Proteinen in ihrer nativen Konformation anhand ihrer molekularen Masse wurde eine eindimensionale nicht-denaturierende BN-PAGE durchgeführt. Für die BN-PAGE wurden vorgefertigte Gele des NativePAGE™ Novex® Bis-Tris Gel Systems (THERMO FISHER SCIENTIFIC) mit einer Polyacrylamid-Konzentration von 4 - 16 % verwendet (NativePAGE™ 4 - 16 %, Bis-Tris, 1,0 mm, Mini-Protein-Gele, THERMO FISHER SCIENTIFIC). Nach Entfernen des Kamms wurden die Probenaschen dreimal mit Kathodenpuffer gespült und befüllt. Die Gele wurden in den Mini-Gel-Tank (THERMO FISHER SCIENTIFIC) eingesetzt und die Probenaschen mit je 10 µl der zu analysierenden Proben bzw. 20 µl Proteinstandard (NativeMark™ ungefärbter Proteinstandard, INVITROGEN) beladen. Die Proben wurden zuvor mit Probenpuffer verdünnt, sodass jeweils 0,3 µg CRP auf das Gel geladen wurden. Außerdem wurden jeder Probe kurz vor Beladen des Gels 0,001 % SDS zugesetzt. Der Gel-Tank wurde mit Kathoden- und Anodenpuffer befüllt und die Elektrophorese für 90 Minuten bei 150 V durchgeführt.

2.4.8 SDS-PAGE

Für den Nachweis von CRP (23 kDa) mittels SDS-PAGE wurde in der vorliegenden Arbeit eine Acrylamid-Konzentration von 12 % verwendet. Die Herstellung des 12 %-igen Trenngels erfolgte gemäß der in der folgenden Tabelle aufgeführten Zusammensetzung (Tabelle 11).

Tabelle 11: Reagenzien zur Herstellung eines Trenngels mit 12 %-igem Acrylamid-Anteil für die Proteinseparation mittels Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE). APS, Ammoniumperoxodisulfat; dH₂O, destilliertes Wasser; TEMED, Tetramethylethyldiamin; v/v, englisch: *volume per volume*; w/v, englisch: *weight per volume*.

| Konzentration | Reagenzien |
|---------------|------------------------------|
| 24,65 % (v/v) | Trenngel-Puffer |
| 33,33 % (v/v) | Rotiphorese [®] Gel |
| 0,18 % (w/v) | APS |
| 0,07 % (v/v) | TEMED |
| 41,77 % (v/v) | dH ₂ O |

Nachdem die Gelkassette zusammengebaut wurde, wurden die Reagenzien gemischt, 3,75 ml der Lösung in die Kammer gegeben und mit Isopropanol überschichtet. Nach vollständiger Polymerisierung des Trenngels wurde das Isopropanol abgegossen und ein Sammelgel mit der im Folgenden aufgelisteten Zusammensetzung vorbereitet (Tabelle 12).

Tabelle 12: Reagenzien zur Herstellung eines Sammelgels für die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE). APS, Ammoniumperoxodisulfat; dH₂O, destilliertes Wasser; TEMED, Tetramethylethyldiamin; v/v, englisch: *volume per volume*; w/v, englisch: *weight per volume*.

| Konzentration | Reagenzien |
|---------------|------------------------------|
| 32,08 % (v/v) | Sammelgel-Puffer |
| 12,69 % (v/v) | Rotiphorese [®] Gel |
| 0,23 % (w/v) | APS |
| 0,18 % (v/v) | TEMED |
| 54,82 % (v/v) | dH ₂ O |

Das Trenngel wurde mit dem Sammelgel bis zur vollständigen Füllung der Gelkassette überschichtet. Zur Formung von Proben-Taschen während der Polymerisierung wurde ein Kamm eingesetzt. Nach vollständiger Polymerisierung wurde die Gelkassette in die Elektrophorese-Kammer eingesetzt, die Kammer mit Laufpuffer gefüllt und der Kamm entfernt. Anschließend wurden die Proben-Taschen gespült und dann mit den zu analysierenden Proben befüllt. Die aus der Immunpräzipitation sowie aus der Affinitätschromatographie gewonnenen und bereits mit 2 x Probenpuffer versetzten Proben wurden hierfür mit Probenpuffer I und Probenpuffer II nochmals verdünnt, sodass final jeweils circa 0,03 µg CRP für die SDS-PAGE eingesetzt wurden. Vor dem Auftragen auf das Polyacrylamid-Gel wurden die Proben für fünf Minuten bei 90 °C erhitzt und im Anschluss vier Minuten bei 28 °C und 7500 x g zentrifugiert. Die Elektrophorese wurde zunächst für zehn Minuten bei einer Spannung von 80 V gestartet. Anschließend wurde die Spannung für weitere 70 Minuten auf 120 V erhöht.

2.4.9 PROTEINTRANSFER UND -NACHWEIS MITTELS WESTERN BLOT

Um die zuvor durch SDS-PAGE bzw. BN-PAGE aufgetrennten Proteine nachzuweisen, wurde das Prinzip des Western Blot-Transfers verwendet. Dabei werden die Proteine zunächst vom Gel auf eine Membran übertragen. Anschließend kann der Proteinnachweis durch Immundetektion mit spezifischen Antikörpern erfolgen.

Für den Proteintransfer nach der SDS-PAGE wurde eine Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran zunächst für eine Minute in Methanol aktiviert und anschließend in Transferpuffer äquilibriert. Das Polyacrylamid-Gel wurde aus der Gelkammer entnommen und das Trenngel ebenfalls in Transferpuffer äquilibriert. Für den Transfer wurden im Transferpuffer zwei Schwämme, ein Filterpapier, das Polyacrylamid-Gel, die Membran, ein Filterpapier und ein Schwamm luftblasenfrei übereinandergeschichtet und so in die Blot-Kammer eingebaut, dass die Membran in Richtung Anode zeigte. Im Anschluss wurde die Kammer mit Transferpuffer befüllt und der Proteintransfer vom Trenngel auf die PVDF-Membran für 90 Minuten bei einer Stromstärke von 90 mA durchgeführt.

Für den Proteintransfer nach BN-PAGE wurde eine PVDF-Membran für 30 Sekunden in Methanol aktiviert, mit destilliertem Wasser (dH₂O) gewaschen und in 1 x NuPAGE™ Transferpuffer äquilibriert. Außerdem wurden zwei Schwämme und zwei Filterpapiere in 1 x NuPAGE™ Transferpuffer getränkt. Die Gelkassette wurde geöffnet, das NativePAGE™ Bis-Tris Mini-Protein-Gel zunächst fünf Minuten bei 95 °C in 1 x Gelpuffer aufgekocht und anschließend für maximal zehn Minuten in 1 x NuPAGE™ Transferpuffer äquilibriert. Die Kathodenseite des Mini-Blot-Moduls (THERMO FISHER SCIENTIFIC) wurde mit 10 ml 1 x NuPAGE™ Transferpuffer benetzt und ein Schwamm, ein Filterpapier, das Gel, die PVDF-Membran, ein Filterpapier und ein weiterer Schwamm luftblasenfrei übereinandergeschichtet. Das Mini-Blot-Modul wurde geschlossen und in den Mini-Gel-Tank eingebaut. Der Proteintransfer wurde für eine Stunde bei einer konstanten Spannung von 22 V durchgeführt. Im Anschluss wurde die PVDF-Membran für 15 Minuten in 8 % Essigsäure fixiert, mit dH₂O gewaschen und luftgetrocknet. Danach erfolgte die Rehydrierung für 30 Sekunden in Methanol, gefolgt von kurzem Waschen mit dH₂O.

Nach dem Transfer der durch SDS-PAGE bzw. BN-PAGE aufgetrennten Proteine auf eine PVDF-Membran wurden unspezifische Proteinbindungsstellen mit 5 % BSA in PBS für

eine Stunde blockiert. Anschließend wurde die Membran mit einem 1:100000 in PBS/5 % BSA verdünnten monoklonalen Maus-anti-CRP-Antikörper (MERCK SIGMA-ALDRICH) über Nacht bei 4 °C inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurde die Membran viermal für jeweils acht Minuten mit PBS-T gewaschen und anschließend der mit HRP-gekoppelte Sekundärantikörper (Kaninchen anti-Maus IgG, DAKO DENMARK) in einer Verdünnung von 1:5000 in PBS-T/2,5 % Milchpulver zugegeben. Nach einer Inkubationszeit von 90 Minuten bei Raumtemperatur wurde die Membran dreimal für je zehn Minuten mit PBS-T und einmal zehn Minuten mit PBS gewaschen. Für die Visualisierung der HRP-Aktivität wurde das SuperSignal™ West Dura Extended Substrat (THERMO FISHER SCIENTIFIC) gemäß den Herstellerangaben verwendet. Die beiden enthaltenen Lösungen wurden im Verhältnis 1:2 gemischt und für fünf Minuten auf die Membran gegeben.

Im Rahmen der Analyse während der Immunpräzipitation gewonnener Proben wurde die Membran anschließend eingeschweißt und es folgte die Bildgebung in einer Dunkelkammer. Dafür wurde ein Röntgenfilm (Amersham Hyperfilm™ ECL, GE HEALTHCARE) belichtet und anschließend in eine 20 %-ige Entwickler-Lösung (ADEFO-CHEMIE) eingetaucht. Nach kurzem Waschen mit Leitungswasser wurde der Film in einer 20 %-igen Fixier-Lösung (ADEFO-CHEMIE) fixiert, erneut mit Leitungswasser gewaschen und schließlich getrocknet. Die entwickelten Filme wurden mit einem Scanner (CANOSCAN 9000F MARK II, CANON) digitalisiert. Für alle weiteren Proben, die durch SDS-PAGE oder BN-PAGE aufgetrennt wurden, erfolgte die Analyse der Western Blot-Membranen durch digitale Bildgebung mit dem iBright™ CL1500 Bildgebungssystem (THERMO SCIENTIFIC).

Die PVDF-Membranen nach Auftrennung durch BN-PAGE wurden abschließend für 15 Minuten bei Raumtemperatur mit Coomassie-Färbelösung inkubiert, gefolgt von 15-minütiger Inkubation in Coomassie-Entfärbelösung, um den Proteinstandard zu visualisieren. Die Bildgebung erfolgte erneut mit dem iBright™ CL1500 Bildgebungssystem (THERMO SCIENTIFIC).

2.5 MASSENSPEKTROMETRISCHE ANALYSE ISOLIERTER CRP-LIGANDEN-KOMPLEXE

Durch Immunpräzipitation aus postoperativen Patientenplasmen isolierte endogene CRP-Liganden-Komplexe wurden in einem *untargeted Metabolomics*-Ansatz mittels Ultra-Performance-Flüssigchromatographie gekoppelt mit Tandem-Massenspektrometrie (UPLC-MS/MS) analysiert. Zusätzlich wurden Präzipitate nach Durchführung der Immunpräzipitation mit IgG1-Isotyp-Kontrollantikörpern massenspektrometrisch analysiert, um unspezifische Interaktionen der detektierten Substanzen mit den für die Immunpräzipitation eingesetzten DynaBeads auszuschließen. Die Massenspektrometrie wurde im Rahmen einer Kooperation von Herrn Dr. Stephan Klatt der *Metabolomics Core Facility* am Institut für Vaskuläre Signalgebung der Goethe-Universität Frankfurt durchgeführt. Die Daten wurden mit Hilfe der Analysesoftware *Compound DiscovererTM* (Version 3.3, THERMO FISHER SCIENTIFIC) ausgewertet und unspezifische Kontaminationen im Verlauf der Datenanalyse durch Abgleich mit Leerproben und Kontroll-Präzipitaten entfernt. Die verwendeten Filter-Einstellungen sind im Anhang dargestellt (Ergänzende Abbildung 1).

2.6 MOLEKULARES DOCKING VON LIGANDEN MIT CRP

Für das molekulare Docking wurde zunächst die Kristallstruktur von CRP ohne gebundene Liganden (PDB-ID: 1GNH) in UCSF Chimera (Version 1.17.3) geöffnet, die Proteinketten B - J entfernt und die verbliebene Kette A als separate Datei (CRP) im PDB-Dateiformat gespeichert. Um die Liganden-Strukturen zuzuweisen, wurden die *simplified molecular input line entry system* (SMILES)-Strukturcodes aus der PubChem-Datenbank bezogen (Tabelle 13). Der Zugriff auf alle Datenbanken erfolgte im Oktober 2024.

Tabelle 13: SMILES-Strukturcodes der analysierten Liganden aus der PubChem-Datenbank. SMILES, englisch: *simplified molecular input line entry system*.

| Ligand | PubChem-ID | SMILES-Strukturcode |
|---------------|------------|---|
| Koffein | 2519 | <chem>CN1C=NC2=C1C(=O)N(C(=O)N2C)C</chem> |
| Paracetamol | 1983 | <chem>CC(=O)NC1=CC=C(C=C1)O</chem> |
| Phosphocholin | 1014 | <chem>C[N+](C)(C)CCOP(=O)(O)O</chem> |

Für unvoreingenommenes Docking wurde zunächst DiffDock-Web (MASSACHUSETTS INSTITUTE OF TECHNOLOGY) verwendet. Hierzu wurde als Protein die zuvor generierte

PDB-Datei von CRP zugewiesen und als Liganden die SMILES-Strukturcodes der analysierten Substanzen (Tabelle 13) eingesetzt. Das Docking wurde im Anschluss mit den Standard-Einstellungen durchgeführt. Die Visualisierung von CRP mit den jeweiligen Liganden-Konformationen als 3D-Struktur erfolgte schließlich in UCSF Chimera (Version 1.17.3).

Nach dem unvoreingenommenen Docking wurde über den SwissDock-Webserver (SWISS INSTITUTE OF BIOINFORMATICS) gezieltes Docking durchgeführt. Als Liganden wurden erneut die jeweiligen SMILES-Strukturcodes (Tabelle 13) eingesetzt. Die zuvor generierte PDB-Datei von CRP wurde als Proteinstruktur zugewiesen. Im Bereich der PC-Bindungsstelle wurden die Gitterparameter des jeweiligen Suchraumes über die Kastenmitte ($x = 10 \text{ \AA}$, $y = 61 \text{ \AA}$, $z = 55 \text{ \AA}$) sowie die Kastengröße ($x = 15 \text{ \AA}$, $y = 17 \text{ \AA}$, $z = 20 \text{ \AA}$) definiert. Das Docking mit AutoDock Vina wurde daraufhin mit den Standard-Einstellungen durchgeführt, während für das Docking mit *Attracting Cavities* die *cavity prioritization* auf Medium geändert wurde. Die Visualisierung der resultierenden Protein-Liganden-Strukturen erfolgte im Anschluss ebenfalls mit UCSF Chimera (Version 1.17.3).

2.7 STATISTISCHE AUSWERTUNG UND DARSTELLUNG DER EXPERIMENTELL ERHOBENEN DATEN

Die statistische Analyse der im Rahmen der Experimente erhobenen Daten erfolgte mit der Statistik-Software *IBM SPSS Statistics* (Version 29, IBM) sowie der freien Statistik-Software R (Version 4.3.2). Sofern keine Normalverteilung der Daten vorlag, wurde für mehr als zwei abhängige Stichproben zunächst der Friedman-Test angewandt. Im Falle fehlender Einzelwerte innerhalb der Datenreihen wurde anstatt des Friedman-Tests der Skillings-Mack-Test eingesetzt. Bei einem signifikanten Ergebnis ($p \leq 0,05$) des Friedman- oder Skillings-Mack-Tests wurde im Anschluss der Wilcoxon-Rangsummentest als Post-hoc-Test durchgeführt. Ergebnisse mit einem p-Wert $\leq 0,05$ wurden als statistisch signifikant eingestuft während p-Werte über 0,05 als nicht signifikant betrachtet wurden. Die Darstellung der Daten erfolgte mit Hilfe des freien Vektor-Programms Inkscape (Version 1.3.2).

3 *ERGEBNISSE*

3.1 **UNTERSUCHUNGEN VON BLUTPLASMEN CHIRURGISCHER PATIENTEN**

3.1.1 DOSISABHÄNGIGER EFFEKT VON BLUTPLASMEN AUF DIE BzATP-INDUZIERTER IL-1 β -FREISETZUNG

Um zu untersuchen, ob Blutplasma einen Effekt auf die Freisetzung von IL-1 β aus autologen Blutzellen und monozytären Zellen hat, wurden periphere Blutproben von Patienten vor elektiven schweren viszeralchirurgischen Eingriffen entnommen. Das Blutplasma wurde isoliert und mit RPMI-Sigma im Verhältnis von 1:640 bis 1:5 (bezogen auf das Endvolumen in der Zellkulturplatte) verdünnt. Vollblutzellen (n = 16, Abbildung 5 A) und frisch isolierte PBMCs (n = 15, Abbildung 5 B) wurden mit LPS und BzATP stimuliert und das autologe Blutplasma kurz vor der Stimulation mit BzATP zu den Zellen gegeben. Der Effekt der Blutplasmen fünf zufällig ausgewählter Patienten wurde zusätzlich in mit LPS und BzATP stimulierten monozytären THP-1-Zellen analysiert (n = 5, Abbildung 5 C). In allen Zellkulturüberständen wurde IL-1 β mittels ELISA quantifiziert.

Nach Stimulation mit LPS und BzATP wurden im Median präoperativ in Vollblutzellen 10,9 $\mu\text{g/ml}$ (2,1 - 22,3 $\mu\text{g/ml}$, n = 16), in PBMCs 4,6 $\mu\text{g/ml}$ (0,7 - 11,9 $\mu\text{g/ml}$, n = 15) und in THP-1-Zellen 64 pg/ml (13 - 163 pg/ml , n = 5) IL-1 β gemessen. Die IL-1 β -Freisetzung am postoperativen Tag zwei betrug im Median 4,7 $\mu\text{g/ml}$ (1,0 - 11,6 $\mu\text{g/ml}$, n = 15) aus Vollblutzellen und 2,6 $\mu\text{g/ml}$ (0,7 - 9,9 $\mu\text{g/ml}$, n = 15) aus PBMCs. Am postoperativen Tag fünf wurden in Vollblutzellen im Median 6,5 $\mu\text{g/ml}$ (0,3 - 11,3 $\mu\text{g/ml}$, n = 13) und in PBMCs 3,2 $\mu\text{g/ml}$ (0,1 - 7,3 $\mu\text{g/ml}$, n = 14) IL-1 β gemessen. Die Absolutwerte wurden auf die IL-1 β -Konzentration im Zellkulturüberstand von Zellen nach Stimulation mit LPS und BzATP ohne Zugabe von Blutplasma normalisiert (Abbildung 5). Von der Gesamtzahl der untersuchten Plasmen abweichende Versuchszahlen bei einzelnen Konditionen ergaben sich aufgrund zu geringer Zellzahlen, nicht ausreichendem Plasma-Volumen oder technischen Fehlern bei der Versuchsdurchführung.

Die IL-1 β -Freisetzung nach Aktivierung mit LPS war statistisch signifikant geringer als nach zusätzlicher Stimulation mit BzATP und betrug 10 % aus Vollblutzellen (p = 0,0004, n = 16, Abbildung 5 A), 14 % aus PBMCs (p = 0,001, n = 15, Abbildung 5 B) und 8 %

aus monozytären THP-1-Zellen ($p = 0,043$, $n = 5$, Abbildung 5 C). Durch die Zugabe von präoperativen autologen Blutplasmen kam es zu einer dosisabhängigen Inhibition der BzATP-induzierten IL-1 β -Freisetzung aus Vollblutzellen (Abbildung 5 A), PBMCs (Abbildung 5 B) und monozytären THP-1-Zellen (Abbildung 5 C). In Vollblutzellen führte die Zugabe der präoperativen Blutplasmen zu einer statistisch signifikanten Reduktion der IL-1 β -Freisetzung auf 88 % (Verdünnung 1:160, $p = 0,013$, $n = 16$), 83 % (Verdünnung 1:80, $p = 0,006$, $n = 16$), 73 % (Verdünnung 1:40, $p = 0,002$, $n = 16$), 47 % (Verdünnung 1:20, $p = 0,001$, $n = 16$), 28 % (Verdünnung 1:10, $p = 0,001$, $n = 16$) und 17 % (Verdünnung 1:5, $p = 0,001$, $n = 16$) im Vergleich zu mit LPS und BzATP stimulierten Vollblutzellen (Abbildung 5 A). Die durch LPS und BzATP induzierte IL-1 β -Freisetzung aus PBMCs wurde durch die Zugabe von 1:40 verdünnten präoperativen autologen Plasmen statistisch signifikant auf 62 % reduziert ($p = 0,002$, $n = 15$), durch 1:20 verdünnte Plasmen auf 41 % ($p = 0,0003$, $n = 15$), durch 1:10 verdünnte Plasmen auf 24 % ($p = 0,0003$, $n = 15$) und durch 1:5 verdünnte Plasmen auf 19 % ($p = 0,001$, $n = 15$) (Abbildung 5 B). In monozytären THP-1-Zellen zeigte sich eine statistisch signifikante Inhibition der IL-1 β -Freisetzung auf 33 % bei Zugabe von 1:20 verdünnten präoperativen Blutplasmen ($p = 0,043$, $n = 5$) und auf 19 % bei Zugabe von 1:5 verdünnten Plasmen ($p = 0,043$, $n = 5$) (Abbildung 5 C).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die BzATP-induzierte IL-1 β -Freisetzung sowohl aus Blutzellen als auch aus monozytären THP-1-Zellen dosisabhängig durch präoperative Blutplasmen inhibiert wurde.

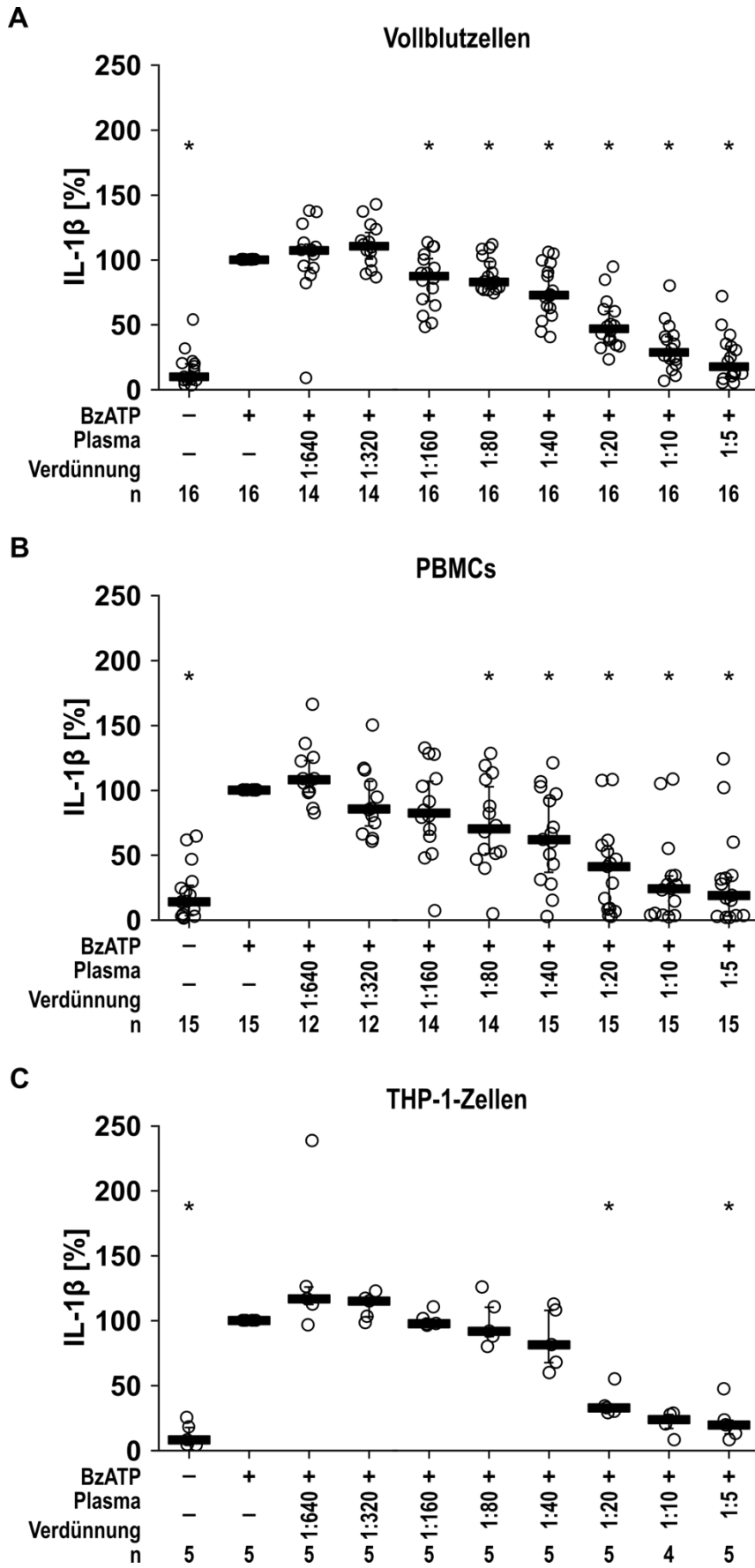


Abbildung 5: Blutplasma inhibiert dosisabhängig die BzATP-induzierte IL-1 β -Freisetzung aus autologen Blutzellen und monozytären THP-1-Zellen. Periphere Blutproben wurden präoperativ von Patienten vor elektiven viszeralchirurgischen Eingriffen gewonnen und das Blutplasma isoliert. **(A)** Vollblutzellen wurden mit Lipopolysaccharid (LPS; 5 ng/ml, 3 Stunden) voraktiviert und mit 2'(3')-O-(4-Benzoyl-benzoyl)adenosin-5'-triphosphat (BzATP; 100 μ M, 40 Minuten) inkubiert. **(B)** Frisch isolierte periphere mononukleäre Blutzellen (englisch: *peripheral blood mononuclear cells*, PBMCs; 5 x 10⁵ Zellen/0,15 ml) wurden mit LPS (5 ng/ml, 3 Stunden) stimuliert und mit BzATP (100 μ M, 30 Minuten) behandelt. **(C)** Monozytäre THP-1-Zellen (2 x 10⁵ Zellen/0,15 ml) wurden mit LPS (1 μ g/ml, 5 Stunden) voraktiviert und mit BzATP (100 μ M, 40 Minuten) behandelt. **(A - C)** Kurz vor der Stimulation mit BzATP wurden autologe Blutplasmen in verschiedenen Verdünnungen zu den Zellen gegeben. Interleukin (IL)-1 β im Zellkulturüberstand wurde mittels *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) quantifiziert. *p \leq 0,05 (verglichen zu mit LPS & BzATP behandelten Zellen), Skillings-Mack-Test gefolgt von Wilcoxon-Rangsummentest. Die gemessenen IL-1 β -Konzentrationen wurden auf mit LPS und BzATP stimulierte Zellen normalisiert. Die Daten individueller Patienten sind als einzelne Datenpunkte dargestellt, Balken zeigen den Median, Whisker die Perzentile 25 und 75. n, Anzahl einzelner Experimente.

Von präoperativ analysierten Patienten wurden postoperativ weitere Blutproben entnommen. Sowohl am zweiten (Ergänzende Abbildung 2) als auch am fünften postoperativen Tag (Ergänzende Abbildung 3) führte die Zugabe der autologen Blutplasmen zu einer dosisabhängigen Inhibition der BzATP-induzierten IL-1 β -Freisetzung aus Vollblutzellen, PBMCs und monozytären THP-1-Zellen.

In PBMCs wurde zusätzlich zur IL-1 β -Freisetzung auch die LDH-Aktivität in den Zellkulturüberständen bestimmt. Die LDH-Aktivität lag in allen Ansätzen im Median unter 10 % (Ergänzende Tabelle 1, Ergänzende Tabelle 2, Ergänzende Tabelle 3).

3.1.2 EINFLUSS CHIRURGISCHER TRAUMATA AUF DIE WIRKUNG VON BLUTPLASMEN IM RAHMEN BZATP-INDUZIRTER IL-1 β -FREISETZUNG

Der dosisabhängige inhibitorische Effekt von Blutplasmen auf die BzATP-induzierte IL-1 β -Freisetzung könnte durch die systemischen Auswirkungen einer schweren viszeralchirurgischen Operation verändert werden. Um diesen potentiellen Einfluss zu untersuchen, wurde eine vergleichende Analyse der inhibitorischen Wirkung prä- und postoperativer Blutplasmen durchgeführt. Im Hauptteil der vorliegenden Arbeit wurde der Fokus auf die Verdünnungsstufen 1:20 und 1:40 der Blutplasmen gelegt, da diese im Bereich der für die halbmaximale Inhibition der BzATP-induzierten IL-1 β -Freisetzung notwendigen Plasmakonzentration liegen (vgl. Abbildung 5).

Die Inhibition der BzATP-induzierten IL-1 β -Freisetzung, die durch die Zugabe von 1:40 (Abbildung 6 A) und 1:20 (Abbildung 6 B) verdünnten prä- (Tag 0) und postoperativen

(Tag 2, Tag 5) autologen Blutplasmen zu Vollblutzellen erzielt wurde, unterschied sich nicht signifikant zwischen den untersuchten Zeitpunkten. In PBMCs zeigte sich ein signifikanter Anstieg der BzATP-induzierten IL-1 β -Freisetzung bei Zugabe von 1:40 verdünnten postoperativen autologen Blutplasmen auf 91 % an Tag zwei ($p = 0,0215$, $n = 15$) sowie auf 93 % an Tag fünf ($p = 0,0023$, $n = 14$) verglichen mit der IL-1 β -Freisetzung von 62 % bei Zugabe von präoperativen autologen Plasmen (Tag 0, $n = 15$) (Abbildung 6 C). Die Zugabe von 1:20 verdünnten autologen Patientenplasmen zu PBMCs resultierte ebenfalls in einem signifikanten Anstieg der IL-1 β -Freisetzung bei Zugabe von postoperativen Plasmen auf 60 % an Tag zwei ($p = 0,0009$, $n = 15$) und auf 73 % an Tag fünf ($p = 0,0001$, $n = 14$) im Vergleich zur IL-1 β -Freisetzung von 41 % unter dem Einfluss präoperativer Plasmen (Tag 0, $n = 15$) (Abbildung 6 D). Der inhibitorische Effekt von 1:40 verdünnten präoperativen Blutplasmen auf die BzATP-induzierte IL-1 β -Freisetzung aus monozytären THP-1-Zellen änderte sich nicht signifikant bei Zugabe von Blutplasmen der postoperativen Tage zwei und fünf (Abbildung 6 E). Die Zugabe von 1:20 verdünnten präoperativen Blutplasmen zu monozytären THP-1-Zellen führte zu einer Inhibition der BzATP-induzierten IL-1 β -Freisetzung auf 33 % (Tag 0, $n = 5$). Im Vergleich dazu führte die Zugabe von Plasmen der gleichen Patienten an den postoperativen Tagen zwei und fünf nach chirurgischem Eingriff zu statistisch signifikant erhöhter BzATP-induzierter IL-1 β -Freisetzung in Höhe von 59 % (Tag 2, $p = 0,043$, $n = 5$) bzw. 58 % (Tag 5, $p = 0,043$, $n = 5$) (Abbildung 6 F).

Insgesamt lässt sich zusammenfassen, dass sich überwiegend keine Unterschiede zwischen dem inhibitorischen Effekt prä- und postoperativer Blutplasmen (1:40 und 1:20 verdünnt) auf die BzATP-induzierte IL-1 β -Freisetzung aus autologen Vollblutzellen und monozytären THP-1-Zellen zeigten. Die BzATP-induzierte IL-1 β -Freisetzung aus PBMCs war hingegen nach Zugabe postoperativer Blutplasmen signifikant höher als nach Zugabe von präoperativen Blutplasmen.

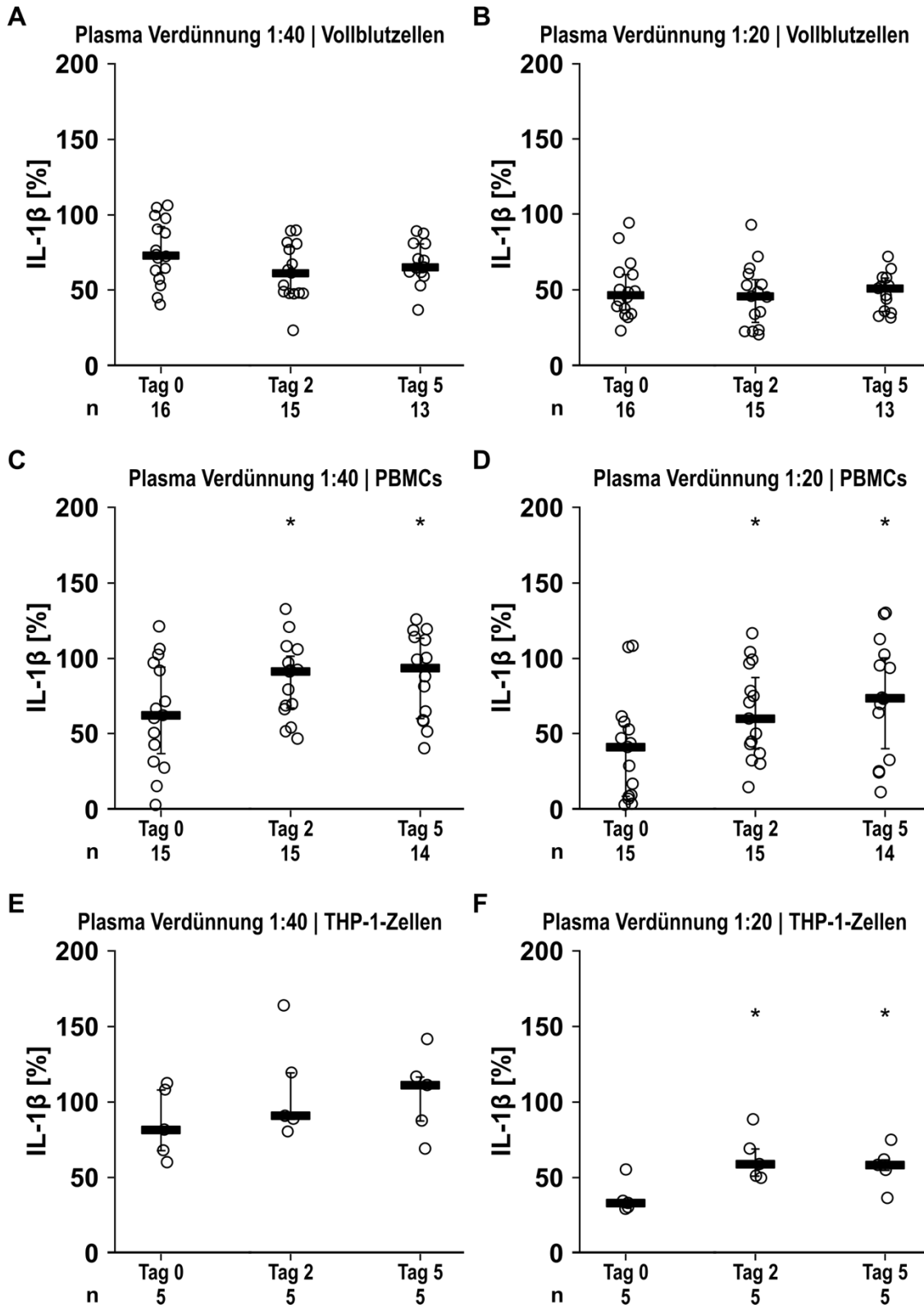


Abbildung 6: Der inhibitorische Effekt von Blutplasma auf die BzATP-induzierte IL-1 β -Freisetzung aus autologen Blutzellen und monozytären THP-1-Zellen wird nicht wesentlich durch schwere viszeralchirurgische Eingriffe beeinflusst. Periphere Blutproben wurden präoperativ (Tag 0) und postoperativ an den Tagen zwei und fünf von Patienten mit elektiver viszeralchirurgischer Operation gewonnen und das Blutplasma abgenommen. **(A, B)** Vollblutzellen wurden mit Lipopolysaccharid (LPS; 5 ng/ml, 3 Stunden) voraktiviert und mit 2'(3')-O-(4-Benzoyl-benzoyl)adenosin-5'-triphosphat (BzATP; 100 μ M, 40 Minuten) behandelt. **(C, D)** Frisch isolierte periphere mononukleäre Blutzellen (englisch: *peripheral blood mononuclear cells*, PBMCs; 5×10^5 Zellen/0,15 ml) wurden mit LPS (5 ng/ml, 3 Stunden) voraktiviert und mit BzATP (100 μ M, 30 Minuten) inkubiert. **(E, F)** Monozytäre THP-1-Zellen ($2 \times 10^5/0,15$ ml) wurden mit LPS (1 μ g/ml, 5 Stunden) voraktiviert und mit BzATP (100 μ M, 40 Minuten) inkubiert. Autologe Blutplasmen wurden kurz vor der Stimulation mit BzATP 1:40 **(A, C, E)** und 1:20 **(B, D, F)** verdünnt zugegeben. Die Interleukin (IL)-1 β -Freisetzung in den Zellkulturüberstand wurde mittels *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) analysiert. * $p \leq 0,05$ (verglichen mit Tag 0), Skillings-Mack- oder Friedman-Test gefolgt von Wilcoxon-Rangsummentest. Die gemessenen IL-1 β -Konzentrationen wurden auf mit LPS und BzATP stimulierte Zellen normalisiert. Die Daten individueller Patienten sind als einzelne Datenpunkte dargestellt, Balken zeigen den Median, Whisker die Perzentile 25 und 75. n, Anzahl einzelner Experimente.

Vergleichende Auswertungen der prä- und postoperativen Zeitpunkte weiterer Plasmaverdünnungen sind in den ergänzenden Abbildungen drei, vier und fünf dargestellt. Bei 1:640, 1:320 (Ergänzende Abbildung 4), 1:160 und 1:80 (Ergänzende Abbildung 5) verdünnten Plasmen zeigten sich keine statistisch signifikanten Unterschiede der inhibitorischen Wirkung auf die BzATP-induzierte IL-1 β -Freisetzung aus Vollblutzellen, PBMCs und THP-1-Zellen zwischen prä- und postoperativen Zeitpunkten. Bei 1:10 und 1:5 verdünnten Plasmen zeigten sich ebenfalls keine statistisch signifikanten Unterschiede bei der inhibitorischen Wirkung auf die BzATP-induzierte IL-1 β -Freisetzung aus Vollblutzellen und aus monozytären THP-1-Zellen (Ergänzende Abbildung 6 A - B & E - F). Die BzATP-induzierte IL-1 β -Freisetzung aus PBMCs war hingegen nach Zugabe präoperativer Plasmen statistisch signifikant geringer als nach Zugabe von Plasmen der postoperativen Tage zwei und fünf (Ergänzende Abbildung 6 C - D).

3.2 UNTERSUCHUNGEN AN ENDOGENEM CRP CHIRURGISCHER PATIENTEN

3.2.1 EINFLUSS EINER SCHWEREN VISZERALCHIRURGISCHEN OPERATION AUF DIE PLASMAKONZENTRATION VON ENDOGENEM CRP

Um beurteilen zu können, ob eine schwere viszeralchirurgische Operation die Plasmakonzentration des Akute-Phase-Proteins CRP beeinflusst, wurden die routinemäßig im Zentrallabor des UKGM Gießen bestimmten endogenen CRP-Plasmakonzentrationen von 16 Patienten an drei verschiedenen Zeitpunkten analysiert.

Die präoperative Ausgangskonzentration von CRP im Plasma lag im Median bei 2,6 mg/l, mit Einzelwerten zwischen 0,5 und 36,1 mg/l (Tag 0, Abbildung 7). Durch den chirurgischen Eingriff ergab sich am zweiten postoperativen Tag im Median ein statistisch signifikanter Anstieg der CRP-Plasmakonzentration auf 172,6 mg/l, mit Werten im Bereich von 67,2 bis 276,6 mg/l ($p = 0,001$, Tag 2, Abbildung 7). Am fünften postoperativen Tag zeigten sich nach wie vor signifikant erhöhte endogene CRP-Plasmakonzentrationen im Vergleich zum präoperativen Zeitpunkt bei einer Konzentration von 119 mg/l im Median und Werten zwischen 8,5 und 380 mg/l ($p = 0,001$, Tag 5, Abbildung 7). Zwischen den CRP-Plasmakonzentrationen am postoperativen Tag zwei und am postoperativen Tag fünf zeigte sich ebenfalls ein statistisch signifikanter Unterschied, mit geringeren CRP-Plasmakonzentrationen am Tag fünf (119 mg/l) im Vergleich zu Tag zwei (172,6 mg/l) ($p = 0,049$, Abbildung 7).

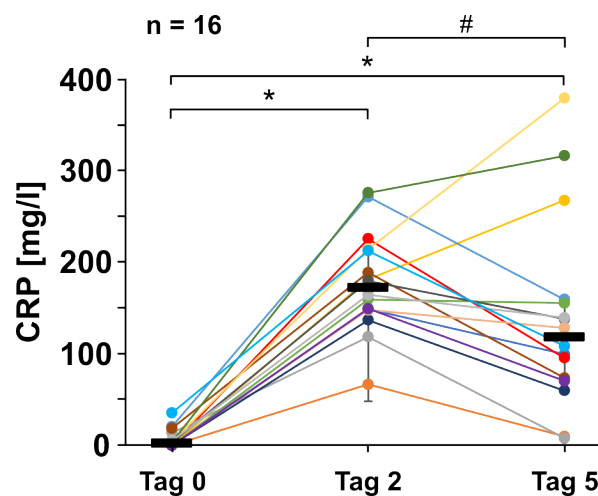


Abbildung 7: Schwere viszeralchirurgische Eingriffe führen zu einem postoperativen Anstieg der CRP-Konzentration im Blutplasma. Periphere Blutproben wurden präoperativ (Tag 0) sowie postoperativ an den Tagen zwei und fünf von Patienten mit elektiver viszeralchirurgischer Operation gewonnen. In Folge der Operation kam es bei allen Patienten zu einem Anstieg der Konzentration des C-reaktiven Proteins (CRP) im Plasma bis zum zweiten postoperativen Tag. *,# $p \leq 0,05$ (verglichen mit Tag 0), Friedman-Test gefolgt von Wilcoxon-Rangsummentest. Die Daten der individuellen Patienten ($n = 16$) sind als einzelne Datenpunkte dargestellt, Balken zeigen den Median, Whisker die Perzentile 25 und 75. n, Anzahl einzelner Experimente.

3.2.2 EFFEKT DER ANREICHERUNG VON PATIENTENPLASMEN MIT DEM CRP-LIGANDEN PC

Zur Analyse der Rolle von endogenem CRP, im Rahmen des zuvor beschriebenen inhibitorischen Effekts von Patientenplasma auf die BzATP-induzierte IL-1 β -Freisetzung, wurden Teile der prä- und postoperativ gewonnenen Blutplasmen vor der Zugabe zu autologen Blutzellen mit PC inkubiert. Bei PC handelt es sich um einen bekannten Liganden von CRP, der Ca²⁺-abhängig mit der B-Seite von CRP interagieren kann (Kaplan & Volanakis, 1974; Pepys & Hirschfield, 2003; Shrive et al., 1996). Durch Vorinkubation der Plasmen mit PC sollte untersucht werden, ob eine Beladung des endogenen CRP mit Liganden zu einer veränderten Wirkung auf die BzATP-induzierte IL-1 β -Freisetzung aus autologen Blutzellen führt.

Die Zugabe von 1:40 verdünnten präoperativen autologen Plasmen zu Vollblutzellen reduzierte die BzATP-induzierte IL-1 β -Freisetzung auf 73 % (Tag 0, $n = 16$, Abbildung 8 A). Im Vergleich dazu zeigte sich nach Vorinkubation der präoperativen Plasmen mit 1 μ M PC ein statistisch signifikanter Anstieg der IL-1 β -Freisetzung auf 85 % (Tag 0 + PC, $p = 0,007$, $n = 16$, Abbildung 8 A). Die IL-1 β -Freisetzung nach Zugabe von 1:40 verdünnten Plasmen des postoperativen Tages zwei (Tag 2, $n = 15$) wurde nicht signifikant durch vorherige Inkubation der Plasmen mit PC verändert (Tag 2 + PC, $n = 15$, Abbildung 8 A). 1:40 verdünnte autologe Patientenplasmen des postoperativen Tages fünf reduzierten die BzATP-induzierte IL-1 β -Freisetzung aus Vollblutzellen auf 65 % (Tag 5, $n = 13$, Abbildung 8 A). Durch Zugabe von PC zu den Plasmen ergab sich eine signifikante Änderung der IL-1 β -Freisetzung auf 80 % (Tag 5 + PC, $p = 0,016$, $n = 13$, Abbildung 8 A).

Die IL-1 β -Freisetzung von 47 % (Tag 0, $n = 16$, Abbildung 8 B) unter Zugabe von 1:20 verdünnten autologen Plasmen zu Vollblutzellen erhöhte sich durch Vorinkubation der

Plasmen mit PC statistisch signifikant auf 58 % (Tag 0 + PC, $p = 0,015$, $n = 16$, Abbildung 8 B). Bei Plasmen des zweiten postoperativen Tages zeigte sich keine signifikante Veränderung der IL-1 β -Freisetzung aus Vollblutzellen durch Vorinkubation der Plasmen mit PC (Abbildung 8 B). Bei 1:20 verdünnten Plasmen des fünften postoperativen Tages zeigte sich hingegen ein signifikanter Unterschied. Während die IL-1 β -Freisetzung aus Vollblutzellen durch postoperative autologe Plasmen von Tag fünf auf 51 % (Tag 5, $n = 13$, Abbildung 8 B) reduziert wurde, erhöhte sich im Vergleich dazu die IL-1 β -Freisetzung nach Vorinkubation der Plasmen mit PC statistisch signifikant auf 61 % (Tag 5 + PC, $p = 0,004$, $n = 13$, Abbildung 8 B).

Der Effekt der Zugabe von 1:40 verdünnten autologen Patientenplasmen zu isolierten PBMCs auf die BzATP-induzierte IL-1 β -Freisetzung wurde nicht signifikant durch vorherige Inkubation der Plasmen mit PC verändert (Abbildung 8 C). Wenn zu PBMCs im Verhältnis 1:20 verdünnte präoperative autologe Plasmen gegeben wurden, reduzierte sich die BzATP-induzierte IL-1 β -Freisetzung auf 41 % (Tag 0, $n = 15$, Abbildung 8 D). Im Vergleich dazu erhöhte die Vorinkubation der Plasmen mit PC die IL-1 β -Freisetzung minimal aber statistisch signifikant auf 45 % (Tag 0 + PC, $p = 0,007$, $n = 13$, Abbildung 8 D). Bei Zugabe von 1:20 verdünnten autologen Plasmen der postoperativen Tage zwei und fünf zeigten sich keine signifikanten Veränderungen bei Vorinkubation der Plasmen mit PC (Abbildung 8 D).

In der Summe zeigte sich, dass die Vorinkubation der Blutplasmen mit dem CRP-Liganden PC den inhibitorischen Effekt von Blutplasmen auf die BzATP-induzierte IL-1 β -Freisetzung größtenteils nicht beeinflusste. Nur vereinzelt wurde die inhibitorische Aktivität der Plasmen durch Vorinkubation mit PC statistisch signifikant herabgesetzt.

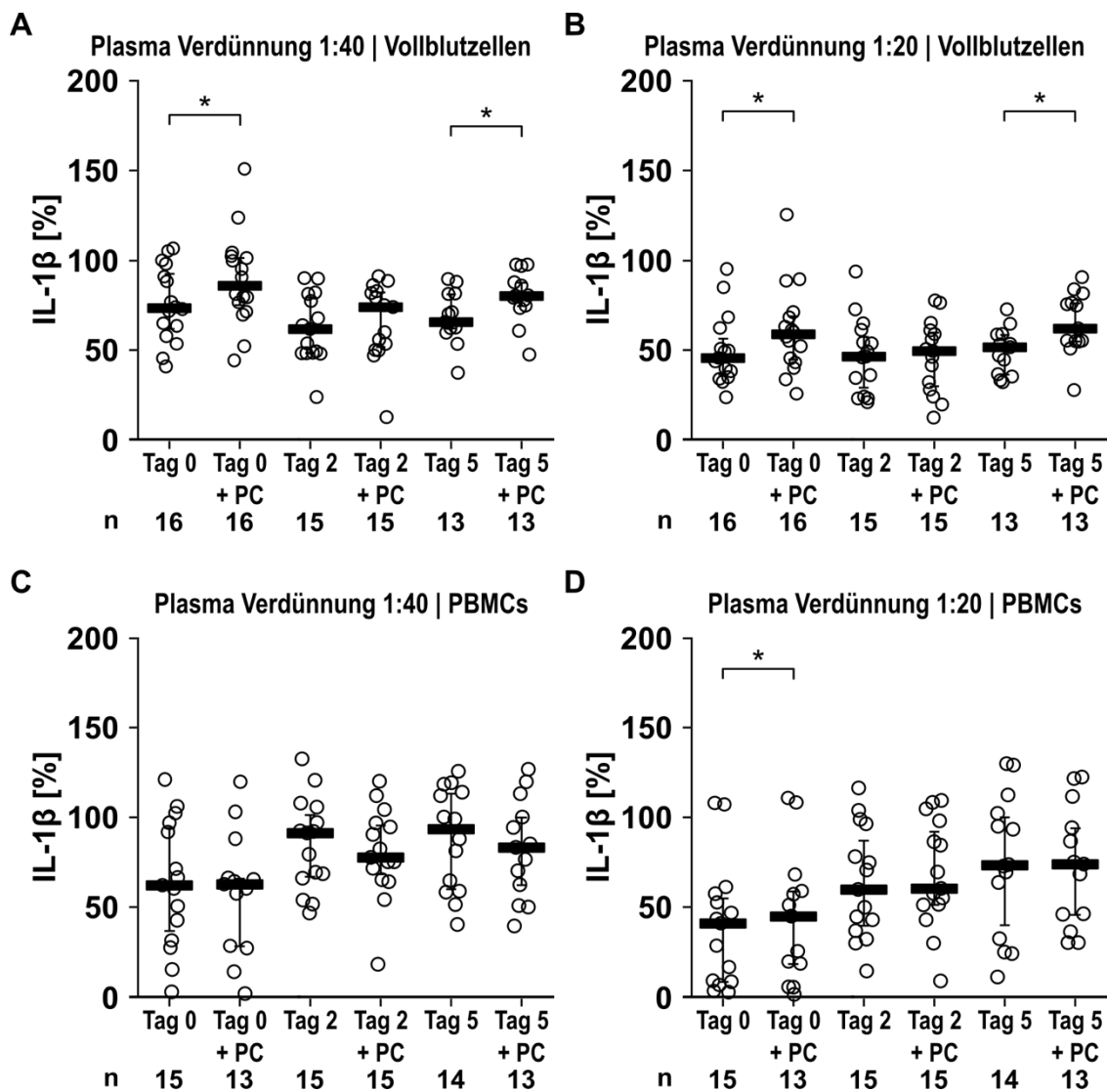


Abbildung 8: Einfluss der Zugabe des CRP-Liganden PC auf den inhibitorischen Effekt von Blutplasma im Rahmen der BzATP-induzierten IL-1 β -Freisetzung aus autologen Blutzellen. Periphere Blutproben wurden präoperativ (Tag 0) und an den postoperativen Tagen zwei und fünf von Patienten mit elektiver viszeralkirurgischer Operation gewonnen und das Blutplasma abgenommen. **(A, B)** Vollblutzellen wurden mit Lipopolysaccharid (LPS) (5 ng/ml, 3 Stunden) voraktiviert und mit 2'(3')-O-(4-Benzoyl-benzoyl)adenosin-5'-triphosphat (BzATP; 100 μ M, 40 Minuten) inkubiert. **(C, D)** Frisch isolierte periphere mononukleäre Blutzellen (englisch: *peripheral blood mononuclear cells*, PBMCs; 5×10^5 Zellen/0,15 ml) wurden mit LPS (5 ng/ml, 3 Stunden) voraktiviert und mit BzATP (100 μ M, 30 Minuten) aktiviert. Kurz vor der Stimulation mit BzATP wurden die autologen Blutplasmen 1:40 **(A, C)** oder 1:20 **(B, D)** verdünnt zugegeben, teilweise nach einer 30-minütigen Vorinkubation des Plasmas mit Phosphocholin (PC; 1 μ M). Die Interleukin (IL)-1 β -Konzentration im Zellkulturüberstand wurde mittels *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) bestimmt. * $p \leq 0,05$ (mit PC vorinkubiertes Plasma verglichen mit Plasma), Skillings-Mack-Test gefolgt von Wilcoxon-Rangsummentest. Die gemessenen IL-1 β -Konzentrationen wurden auf mit LPS und BzATP stimulierte Zellen normalisiert. Die Daten individueller Patienten sind als einzelne Datenpunkte dargestellt, Balken zeigen den Median, Whisker die Perzentile 25 und 75. n, Anzahl einzelner Experimente.

Die vergleichenden Analysen zwischen Plasmen und mit PC vorinkubierten Plasmen weiterer Verdünnungsstufen sind in den ergänzenden Abbildungen sechs bis acht dargestellt. Bei Plasmaverdünnungen von 1:640 und 1:320 (Ergänzende Abbildung 7), 1:80 (Ergänzende Abbildung 8), 1:10 und 1:5 (Ergänzende Abbildung 9) zeigten sich keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen dem inhibitorischen Effekt von Plasmen im Vergleich zu den mit PC angereicherten Plasmen. Lediglich bei Zugabe von 1:160 verdünnten Plasmen zu Vollblutzellen zeigten sich minimale aber statistisch signifikante Unterschiede bei präoperativen Plasmen sowie bei Plasmen des zweiten postoperativen Tages (Ergänzende Abbildung 8 A). Hierbei wurde bei beiden Zeitpunkten die inhibitorische Aktivität der Plasmen auf die BzATP-induzierte IL-1 β -Freisetzung durch Zugabe von PC zu den Plasmen herabgesetzt (Ergänzende Abbildung 8 A).

3.2.3 EINFLUSS DER DEPLETION VON ENDOGENEM CRP AUS PATIENTENPLASMEN

Um die potentielle Rolle von endogenem CRP beim inhibitorischen Effekt von Patientenplasma auf die BzATP-induzierte IL-1 β -Freisetzung weiter zu charakterisieren, wurde CRP mittels Immunpräzipitation aus postoperativen Patientenplasmen des zweiten und des fünften Tages nach Operation depletiert. Die Qualität der Immunpräzipitation wurde mittels Western Blot überprüft. Ein repräsentatives Beispiel der Immundetektion von CRP mit anti-CRP-Antikörpern ist in Abbildung 9 A gezeigt.

In zuvor im Verhältnis 2:5 mit RPMI 1640-Medium verdünntem Blutplasma (Spur 1) konnte CRP nachgewiesen werden, während nach Immunpräzipitation mit anti-CRP-Antikörpern kein CRP mehr im Plasma nachweisbar war (Spur 2) (Abbildung 9 A). An den für die Immunpräzipitation mit anti-CRP-Antikörpern eingesetzten magnetischen Beads konnte nach der Immunpräzipitation CRP nachgewiesen werden (Spur 4, circa 25 kDa, Abbildung 9 A). Zusätzlich zeigten sich in der Western Blot-Analyse zwei weitere Proteinbanden, davon eine mit einem ungefähren Molekulargewicht von 27 kDa und eine mit circa 50 kDa (Spur 4, Abbildung 9 A). Für weitere Kontrollen wurde die Immunpräzipitation aus Patientenplasmen zusätzlich mit IgG1-Isotyp-Kontrollantikörpern durchgeführt. Im Blutplasma war hiernach nach wie vor CRP nachweisbar (Spur 3, Abbildung 9 A). An den eingesetzten magnetischen Beads waren nach der Immunpräzipitation zwei Proteinbanden mit ungefähigem Molekulargewicht von 25 kDa bzw. 50 kDa in der Western Blot-Analyse nachweisbar (Spur 5, Abbildung 9 A).

Um die neben CRP zusätzlich aufgetretenen Proteinbanden zu kontrollieren, wurde ein Western Blot derselben Proben nicht mit anti-CRP-Primärantikörpern, sondern lediglich mit HRP-gekoppelten Kaninchen anti-Maus-IgG-Sekundärantikörpern inkubiert (n = 1, Abbildung 9 B). In den Plasmaproben wurden keine Proteinbanden detektiert (Spur 1 - 3, Abbildung 9 B). Im Präzipitat nach Immunpräzipitation mit anti-CRP-Antikörpern (Spur 4) wurden zwei Proteinbanden mit ungefährem Molekulargewicht von 25 kDa und 50 kDa detektiert, während im Präzipitat nach Immunpräzipitation mit IgG1-Isotyp-Kontrollantikörpern (Spur 5) zwei Proteinbanden mit ungefährem Molekulargewicht von 23 kDa und 50 kDa detektiert wurden (Abbildung 9 B).

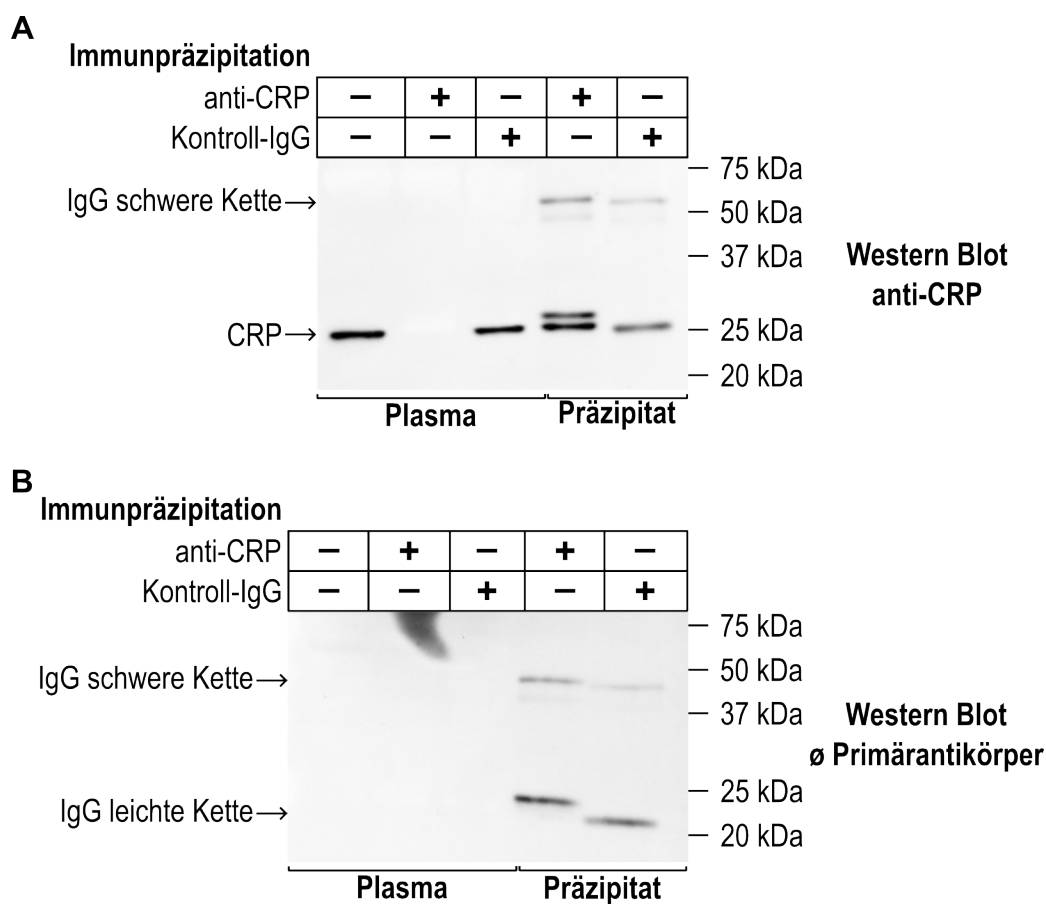


Abbildung 9: Die Immunpräzipitation von CRP aus Blutplasma ist effizient. Während und nach der Immunpräzipitation von C-reaktivem Protein (CRP) aus postoperativen Patientenplasmen gewonnene Proben wurden durch ein 12 %-iges Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgel aufgetrennt und mittels Western Blot analysiert. Von links nach rechts: Spur 1: im Verhältnis 2:5 mit RPMI 1640-Medium verdünntes Blutplasma, Spur 2: Plasma nach Immunpräzipitation mit anti-CRP-Antikörpern, Spur 3: Plasma nach Immunpräzipitation mit Immunglobulin G (IgG1)-Isotyp-Kontrollantikörpern, Spur 4: Präzipitat nach Immunpräzipitation mit anti-CRP-Antikörpern, Spur 5: Präzipitat nach Immunpräzipitation mit IgG1-Isotyp-Kontrollantikörpern. Proteinstandard rechts; kDa, Kilodalton. **(A)** Repräsentatives Beispiel der Detektion von CRP, n = 12. **(B)** Kontroll-Western Blot ohne Verwendung eines Primärantikörpers, n = 1. n, Anzahl einzelner Experimente.

Die Plasmaüberstände nach Immunpräzipitation mit anti-CRP-Antikörpern wurden in IL-1 β -Freisetzungsexperimenten mit autologen Vollblutzellen und monozytären THP-1-Zellen eingesetzt. Bei der IL-1 β -Freisetzung aus Vollblutzellen zeigten sich keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen der Zugabe von postoperativen autologen Blutplasmen (Tag 2, Tag 5) und der Zugabe der entsprechenden CRP-depletierten Plasmen bei Verdünnung der Plasmen von 1:40 (Abbildung 10 A). Bei 1:20 verdünnten Plasmen war die IL-1 β -Freisetzung aus Vollblutzellen nach Zugabe von Blutplasmen des postoperativen Tages fünf (51 %; n = 13) statistisch signifikant geringer als nach Zugabe der entsprechenden CRP-depletierten Plasmen (69 %; p = 0,003, n = 13) (Abbildung 10 B). Die Zugabe von postoperativen Blutplasmen (Tag 2, Tag 5) vor bzw. nach CRP-Depletion zu monozytären THP-1-Zellen in der Verdünnung 1:40 (Abbildung 10 C) und 1:20 (Abbildung 10 D) führte zu keinen statistisch signifikanten Unterschieden in der IL-1 β -Freisetzung.

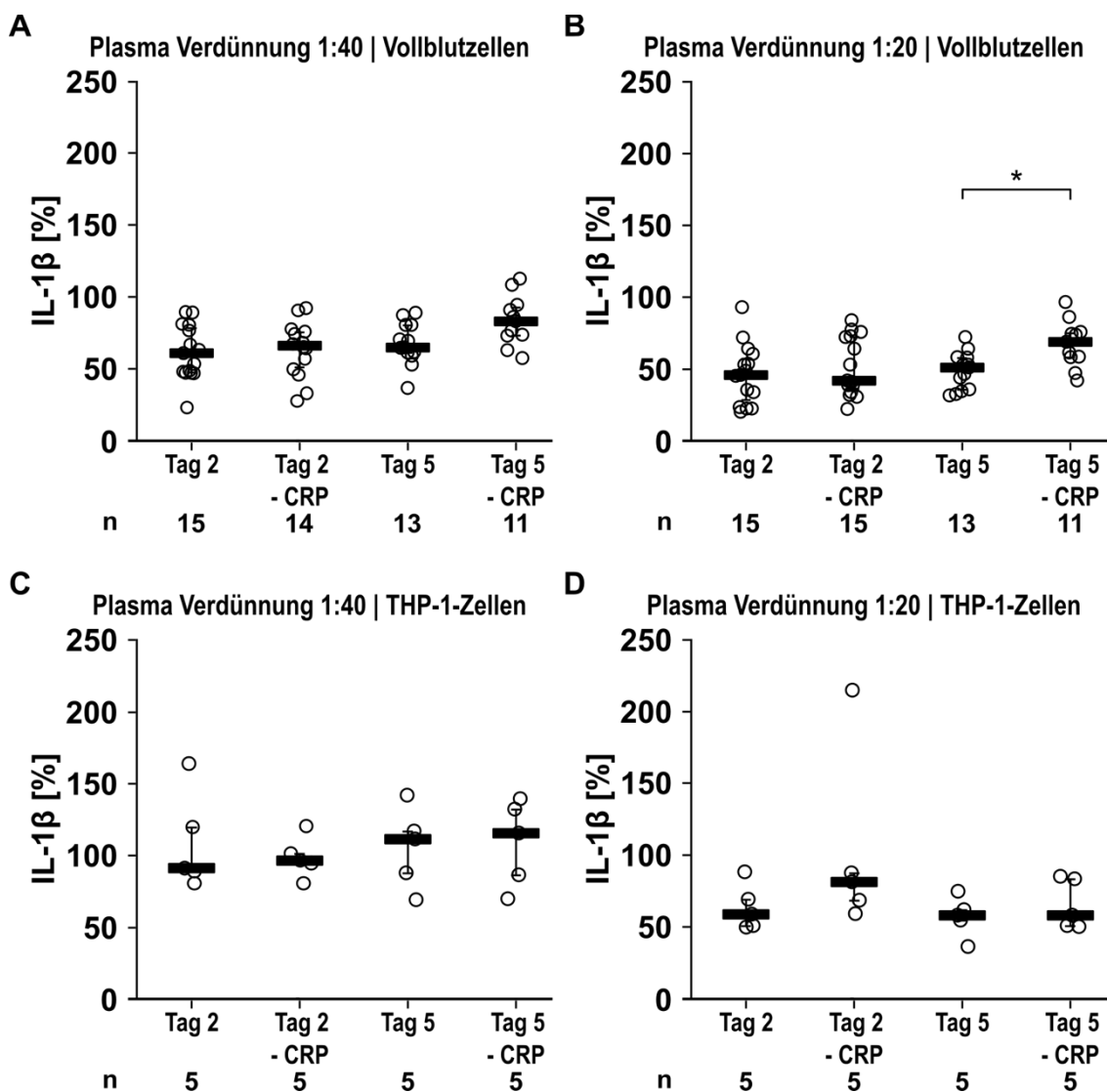


Abbildung 10: Der inhibitorische Effekt von postoperativem Patientenplasma wird nicht wesentlich durch die Depletion des endogenen CRP aus dem Plasma beeinflusst. Periphere Blutproben wurden an den postoperativen Tagen zwei und fünf von Patienten nach elektiver viszeralchirurgischer Operation gewonnen und das Blutplasma abgenommen. C-reaktives Protein (CRP) wurde mittels Immunpräzipitation aus dem Blutplasma depletiert. **(A, B)** Vollblutzellen wurden mit Lipopolysaccharid (LPS; 5 ng/ml, 3 Stunden) voraktiviert und mit 2'(3')-O-(4-Benzoyl-benzoyl)adenosin-5'-triphosphat (BzATP; 100 μ M, 40 Minuten) inkubiert. **(C, D)** Monozytäre THP-1-Zellen ($2 \times 10^5/0,15$ ml) wurden mit LPS (1 μ g/ml, 5 Stunden) voraktiviert und mit BzATP (100 μ M, 40 Minuten) inkubiert. Kurz vor der Stimulation mit BzATP wurden autologe Blutplasmen bzw. CRP-depletierte Plasmen (- CRP) 1:40 **(A, C)** oder 1:20 **(B, D)** verdünnt zugegeben. Interleukin (IL)-1 β im Zellkulturüberstand wurde mittels *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) quantifiziert. * $p \leq 0,05$ (CRP-depletiertes Plasma verglichen mit Plasma), Skillings-Mack- oder Friedman-Test gefolgt von Wilcoxon-Rangsummentest. Die gemessenen IL-1 β -Konzentrationen wurden auf mit LPS und BzATP stimulierte Zellen normalisiert. Die Daten individueller Patienten sind als einzelne Datenpunkte dargestellt, Balken zeigen den Median, Whisker die Perzentile 25 und 75. n, Anzahl einzelner Experimente.

Die vergleichenden Analysen der weiteren Plasmaverdünnungen sind im Anhang dargestellt (Ergänzende Abbildung 10, Ergänzende Abbildung 11, Ergänzende Abbildung 12). Hierbei zeigten sich ebenfalls überwiegend keine signifikanten Unterschiede zwischen der IL-1 β -Freisetzung nach Zugabe von postoperativen Blutplasmen verglichen zur Zugabe der jeweiligen CRP-depletierten Plasmen. Lediglich in monozytären THP-1-Zellen resultierte die Zugabe von 1:640 verdünnten CRP-depletierten Plasmen des postoperativen Tages fünf in einer signifikant reduzierten IL-1 β -Freisetzung von 104 % (Tag 5 - CRP, $p = 0,043$, $n = 5$, Ergänzende Abbildung 10 C) im Vergleich zur IL-1 β -Freisetzung von 140 % (Tag 5, $n = 5$, Ergänzende Abbildung 10 C) nach Zugabe von CRP-haltigen Plasmen des postoperativen Tages fünf.

3.2.4 CHARAKTERISIERUNG DER ENDOGENEN CRP-LIGANDEN-KOMPLEXE

Neben den CRP-depletierten Plasmen wurden auch die mittels Immunpräzipitation aus postoperativen Patientenplasmen isolierten CRP-Liganden-Komplexe für weitere Experimente eingesetzt. Zur Charakterisierung der Liganden wurden die endogenen CRP-Liganden-Komplexe über einen *untargeted Metabolomics*-Ansatz mittels Massenspektrometrie analysiert.

Nach Prozessierung der Daten in der *Compound DiscovererTM* Software (THERMO FISHER SCIENTIFIC) wurden verschiedene Filter angewandt, unter anderem um Substanzen, die auch in Proben der Kontroll-Immunpräzipitation mit IgG1-Isotyp-Kontrollantikörpern sowie in Leerproben detektiert werden konnten, auszuschließen. Die erhaltene Liste aus 21 detektierten Interaktionspartnern wurde nach der maximalen Peakfläche (Area (Max.))

sortiert. Die in den endogenen CRP-Liganden-Komplexen identifizierten Substanzen sind in Tabelle 14 gezeigt. Bei der Substanz mit der höchsten maximalen Peakfläche (2×10^{10} counts x seconds) handelt es sich um Koffein (Tabelle 14). Paracetamol wurde mit der zweithöchsten maximalen Peakfläche ($1,6 \times 10^{10}$ counts x seconds) detektiert (Tabelle 14).

Tabelle 14: Durch Massenspektrometrie identifizierte Interaktionspartner von endogenem CRP aus Patientenplasma nach schwerem viszeralkirurgischem Eingriff. Aus Patientenplasmen der postoperativen Tage zwei (n = 7) und fünf (n = 5) wurden mittels Immunpräzipitation endogene CRP-Liganden-Komplexe isoliert und die Liganden mittels Massenspektrometrie analysiert. Die erhaltenen Substanzen wurden nach der maximalen Peakfläche (Area (Max.)) in absteigender Reihenfolge sortiert. n, Anzahl einzelner Experimente.

| | Name | Formel | Area (Max.) [counts x seconds] |
|----|---|------------------|-----------------------------------|
| 1 | Koffein | C8 H10 N4 O2 | 20.183.023.844 |
| 2 | Paracetamol | C8 H9 N O2 | 16.072.612.783 |
| 3 | 4-Allyl-5(3,4-dimethoxybenzyl)-4H-1,2,4-triazole-3-thiol | C14 H17 N3 O2 S | 2.318.224.082 |
| 4 | 2-Methyl-1,2-dihydrophthalazin-1-one | C9 H8 N2 O | 1.036.532.763 |
| 5 | 5-Amino-3,3-dimethyl-6-[(1E)-2-(4-methylphenyl)diazen-1-yl]cyclohexa-1,5-dien-1-ol | C15 H19 N3 O | 867.103.052 |
| 6 | 1,2-Benzisothiazolin-3-one | C7 H5 N O S | 399.519.080 |
| 7 | 2-{1-[2-(2,1,3-Benzoxadiazol-4-ylamino)-2-oxoethyl]cyclohexyl}acetic acid | C16 H19 N3 O4 | 387.171.786 |
| 8 | N'1-Phenylpropanohydrazide | C9 H12 N2 O | 348.408.482 |
| 9 | Sulforidazine | C21 H26 N2 O2 S2 | 217.295.106 |
| 10 | 3-Chloro-4-methylquinolin-2-ol | C10 H8 Cl N O | 195.222.510 |
| 11 | α -Pyrrolidinopropiophenone | C13 H17 N O | 167.601.829 |
| 12 | 1-(3,4-Dimethoxyphenyl)ethan-1-one oxime | C10 H13 N O3 | 155.192.471 |
| 13 | 4-(Dimethylamino)benzophenone | C15 H15 N O | 119.584.471 |
| 14 | trans-2-Aminomethyl-1-cyclohexanol | C7 H15 N O | 108.486.768 |
| 15 | Zolpidem | C19 H21 N3 O | 90.885.058 |
| 16 | 3,3,5,5-Tetramethylpyrroline-N-oxide | C8 H15 N O | 71.090.908 |
| 17 | 2,5-Anhydro-4,6-dideoxy-6-[[1-(1-methyl-1H-pyrazol-4-yl)carbonyl]amino]-4-(4-phenyl-1-piperazinyl)-D-galactitol | C21 H29 N5 O4 | 66.783.848 |
| 18 | N'3-(3,4,5-Trimethoxybenzylidene)pyridine-3-carbohydrazide | C16 H17 N3 O4 | 54.643.254 |

| | | | |
|----|--|---------------|------------|
| 19 | 2-Hydroxybenzothiazole | C7 H5 N O S | 53.828.821 |
| 20 | 4-Morpholinobenzoic acid | C11 H13 N O3 | 52.362.794 |
| 21 | 5-{5-[(2S)-1-(Cyclopropylmethyl)-2-pyrrolidinyl]-1,2,4-oxadiazol-3-yl}-N-(2-methoxyethyl)-2-pyridinamine | C18 H25 N5 O2 | 18.308.653 |

Zur Analyse möglicher Unterschiede zwischen den CRP-Liganden in Patientenplasmen der postoperativen Tage zwei und fünf wurde der Logarithmus der Peakflächen der detektierten Interaktionspartner in einer Heatmap visualisiert (Abbildung 11). Die einzelnen Substanzen (1 - 21) sind entsprechend der Auflistung in Tabelle 14 nach maximaler Peakfläche geordnet. Die einzelnen Peakflächen der untersuchten Proben lagen dabei insgesamt in einem Bereich zwischen 63.867 und 20.183.023.844 *counts x seconds*. Der statistische Vergleich der Peakflächen der identifizierten Substanzen zwischen den postoperativen Tagen zwei und fünf ergab keinen signifikanten Unterschied ($p = 0,69$ (zweiseitiger t-Test, Heteroskedastizität)).

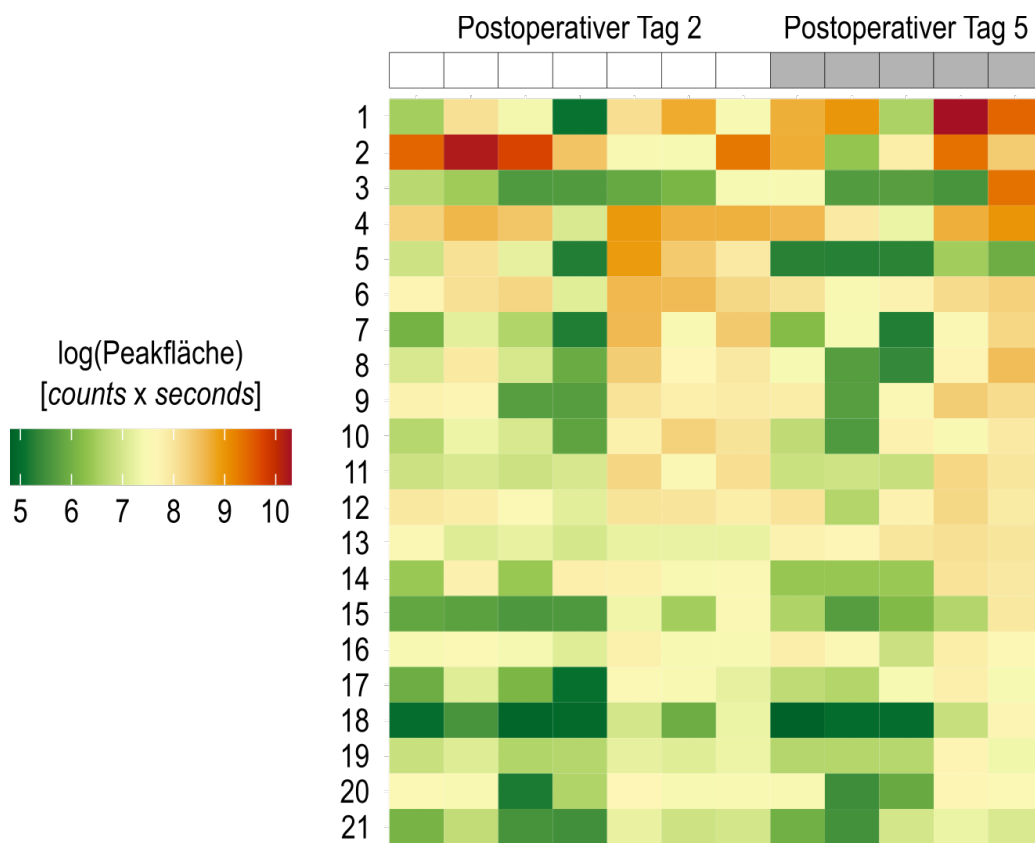


Abbildung 11: Das Auftreten verschiedener Interaktionspartner von endogenem CRP unterscheidet sich nicht statistisch signifikant zwischen postoperativem Tag zwei und Tag fünf. Endogene CRP-Liganden-Komplexe wurden mittels Immunpräzipitation aus Patientenplasmen der postoperativen Tage zwei ($n=7$) und fünf ($n=5$) nach schwerem viszeralchirurgischem Eingriff isoliert und durch Massenspektrometrie analysiert. Visualisierung des Logarithmus der chromatographischen Peakflächen (*counts x seconds*) der identifizierten Substanzen (1 - 21; s. Tabelle 14). n, Anzahl einzelner Experimente.

3.2.5 ANALYSE DER ENDOGENEN CRP-KONFORMATION MITTELS BN-PAGE

Da CRP unter anderem als Monomer, Pentamer oder als teilweise dissoziiertes Pentamer vorliegen kann und sich die Eigenschaften des Proteins im Rahmen von inflammatorischen Prozessen je nach vorliegender Form unterscheiden, sollte die Konformation des endogenen CRP in den untersuchten Patientenplasmen analysiert werden (Olson et al., 2023; Rizo-Téllez et al., 2023).

Über eine Affinitätsreinigung, die die Bindung von CRP an PC nutzt, wurde das eCRP zunächst aus den Plasmen aufgereinigt. Die Qualität der Affinitätsreinigung wurde mittels SDS-PAGE und Western Blot mit nachfolgender Immundetektion mit einem anti-CRP-Antikörper kontrolliert. Abbildung 12 zeigt ein repräsentatives Beispiel der Ergebnisse. In mit *bath solution* (enthält 2 mM Ca^{2+}) verdünntem Blutplasma, das im nächsten Schritt zur Affinitätsreinigung eingesetzt wurde, war CRP nachweisbar (P 1, Abbildung 12). Nach der Affinitätsreinigung war kein CRP mehr im Plasma vorhanden (P 2, Abbildung 12). In den Überständen der nachfolgenden drei Waschschriffe konnte kein CRP nachgewiesen werden (WF 1 - 3, Abbildung 12). Die Elution von CRP wurde in vier Teilschritten durchgeführt. Nach der ersten Zugabe von Elutionspuffer ließ sich kein CRP im Überstand nachweisen (EF 1, Abbildung 12). Die drei weiteren Elutionsfraktionen (EF 2 - 4) enthielten CRP, ebenso wie das Gesamt-Eluat (E 1, Abbildung 12). Nach Ultrafiltration des Gesamt-Eluats zum Austausch des Elutionspuffers in *bath solution* (enthält 2 mM Ca^{2+}) konnte nach wie vor CRP im Eluat nachgewiesen werden (E 2, Abbildung 12). An der PC-Agarose war nach der schrittweise durchgeführten Elution kein CRP mehr nachweisbar (RF, Abbildung 12). Die Negativkontrolle, reine PC-Agarose, enthielt ebenfalls kein CRP (NK, Abbildung 12).

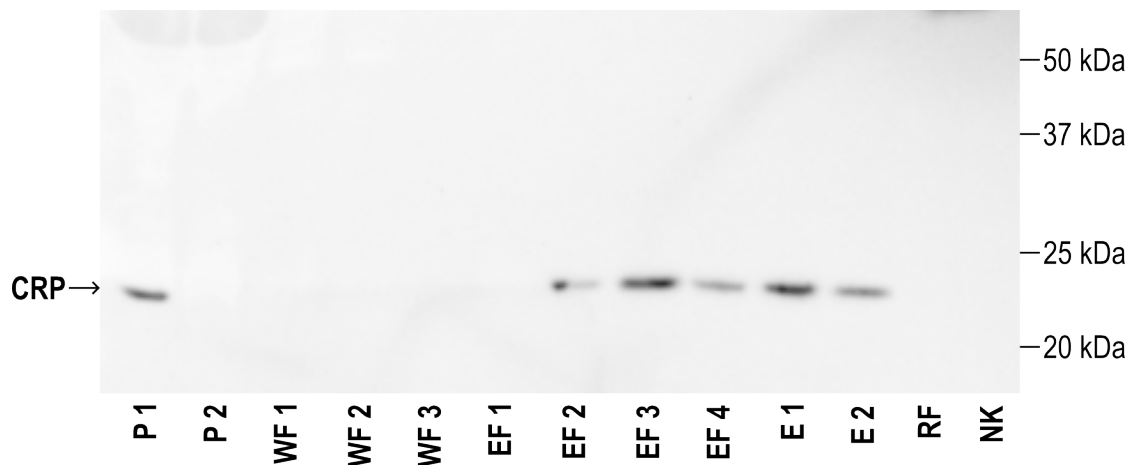


Abbildung 12: Kontrolle der Affinitätsreinigung von CRP aus Blutplasma. Repräsentatives Beispiel (aus $n = 10$) der Detektion von C-reaktivem Protein (CRP) mittels Western Blot in durch ein 12 %-iges Natriumdodecylsulfat (SDS)-Polyacrylamidgel aufgetrennten Proben nach Affinitätsreinigung von CRP. P 1: Ausgangsmaterial Blutplasma, P 2: Blutplasma nach Affinitätsreinigung, WF 1 - 3: Waschfraktionen 1 - 3, EF 1 - 4: Elutionsfraktionen 1 - 4, E 1: Eluat in Elutionspuffer, E 2: Eluat nach Pufferaustausch durch Ultrafiltration in *bath solution* (enthält 2 mM Ca^{2+}), RF: Regenerationsfraktion (PC-Agarose nach Elution), NK: Negativkontrolle (reine PC-Agarose). Proteinstandard rechts; kDa, Kilodalton.

Das durch Affinitätsreinigung isolierte eCRP wurde im Anschluss mittels nicht-denaturierender BN-PAGE analysiert. Nach dem Proteintransfer auf die Blottingmembran wurde die Immundetektion mittels anti-CRP-Antikörper durchgeführt. Die Ergebnisse sind repräsentativ in Abbildung 13 gezeigt. In postoperativen Patientenplasmen vor Affinitätsreinigung von CRP konnte CRP mit einem Molekulargewicht von circa 300 kDa nachgewiesen werden (Plasma P1 & Plasma P2, Abbildung 13 A). In den Eluaten nach Affinitätsreinigung, sowohl vor als auch nach Pufferaustausch durch Ultrafiltration von Elutionspuffer zu *bath solution* (enthält 2 mM Ca^{2+}), war CRP ebenfalls mit gleichem Molekulargewicht nachweisbar (Eluat P1, Eluat P2, Eluat + UF P1, Eluat + UF P2, Abbildung 13 A). Als Kontrollen dienten humanes CRP (MERCK MILLIPORE) im nativen Zustand (nCRP) und humanes CRP nach Dissoziation in die monomeren Untereinheiten (mCRP, Abbildung 13 A). Während nCRP ebenfalls mit einem Molekulargewicht von circa 300 kDa nachgewiesen werden konnte (nCRP), war mCRP nicht detektierbar (mCRP, Abbildung 13 A).

Bei Immundetektion von CRP in einem separaten Western Blot nach BN-PAGE, bei der lediglich mCRP und nCRP als Proben aufgetrennt wurden, war nCRP mit einem Molekulargewicht von circa 300 kDa detektierbar (nCRP), während mCRP mit einem ungefähren Molekulargewicht zwischen 40 und 66 kDa nachgewiesen werden konnte (mCRP, Abbildung 13 B).

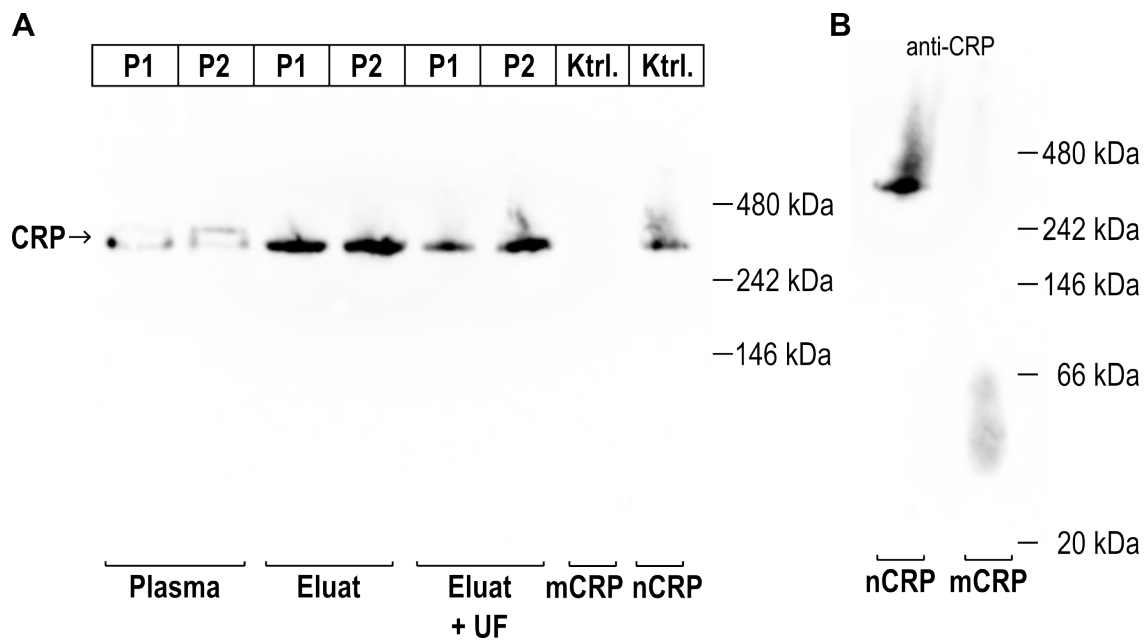


Abbildung 13: Endogenes CRP aus Patientenplasmen liegt nicht in der dissoziierten monomeren Form vor. Repräsentative Beispiele der Detektion von C-reaktivem Protein (CRP) mittels Western Blot in durch *blue native*-Polyacrylamidgelelektrophorese (BN-PAGE) aufgetrennten Proben. **(A)** Plasma: zur Affinitätsreinigung eingesetzte Plasmen zweier Patienten (P1 & P2), verdünnt mit *bath solution* (enthält 2 mM Ca^{2+}); Eluat: nach Affinitätsreinigung von CRP aus Patientenplasmen mittels PC-Agarose-Beads eluiertes CRP; Eluat + UF: Eluate nach Pufferaustausch von Elutionspuffer zu *bath solution* (enthält 2 mM Ca^{2+}) durch Ultrafiltration (UF); Kontrollen (Ktrl.); mCRP: humanes CRP (MERCK MILLIPORE), das durch Harnstoff und Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) in die monomeren Untereinheiten dissoziiert wurde; nCRP: humanes CRP im nativen Zustand (MERCK MILLIPORE). Proteinstandard rechts; kDa, Kilodalton. n = 5. **(B)** Kontrollen, nCRP: humanes CRP im nativen Zustand (MERCK MILLIPORE); mCRP: humanes CRP (MERCK MILLIPORE), durch Harnstoff und EDTA in die monomeren Untereinheiten dissoziiert. Proteinstandard rechts; kDa, Kilodalton. n = 1. n, Anzahl einzelner Experimente.

3.2.6 EINFLUSS VON MCRP AUF DIE BZATP-INDUZIERTE IL-1 β -FREISETZUNG

Um mögliche Unterschiede zwischen dem Effekt von mCRP und pCRP auf die BzATP-induzierte IL-1 β -Freisetzung zu evaluieren, wurden monozytäre THP-1-Zellen mit LPS und BzATP stimuliert und nCRP (MERCK MILLIPORE) bzw. mCRP kurz vor der Stimulation mit BzATP zugegeben. Um den Einfluss der Bindung von Liganden an CRP zu berücksichtigen, wurde mCRP vor Zugabe zu den Zellen für 30 Minuten bei 37 °C mit verschiedenen PC-Konzentrationen inkubiert.

Die IL-1 β -Freisetzung aus unstimulierten monozytären THP-1-Zellen (0 %; p = 0,024, n = 6) sowie aus mit LPS stimulierten Zellen (12 %; p = 0,028, n = 6) war im Median statistisch signifikant geringer als nach zusätzlicher Stimulation mit BzATP (Abbildung

14 A). Als Positivkontrolle wurde S 24795 (2-[2-(4-Bromphenyl)-2-oxoethyl]-1-methylpyridiniumiodid), ein synthetischer partieller $\alpha 7$ -nAChR-Agonist (Cecon et al., 2019), eingesetzt. Die geeignete Konzentration (100 μ M) für eine inhibitorische Wirkung wurde zuvor in separaten Dosis-Wirkungs-Experimenten ermittelt (Ergänzende Abbildung 13 A). Die BzATP-induzierte IL-1 β -Freisetzung wurde durch Zugabe von S 24795 (100 μ M) kurz vor Stimulation mit BzATP statistisch signifikant auf 63 % reduziert ($p = 0,046$, $n = 6$, Abbildung 14 A). Geringe PC-Konzentrationen (1 μ M, 10 μ M, jeweils $n = 6$) hatten keinen statistisch signifikanten Einfluss auf die BzATP-induzierte IL-1 β -Freisetzung aus monozytären THP-1-Zellen (Abbildung 14 A). Die Behandlung der Zellen mit 200 μ M PC kurz vor Stimulation mit BzATP führte hingegen zu einer statistisch signifikanten Reduktion der IL-1 β -Freisetzung auf 54 % ($p = 0,028$, $n = 6$, Abbildung 14 A). Die Zugabe von 10 μ g/ml nCRP ($n = 6$) bzw. 10 μ g/ml mCRP ($n = 6$) hatte keinen statistisch signifikanten Einfluss auf die BzATP-induzierte IL-1 β -Freisetzung (Abbildung 14 A). Die Vorinkubation von 10 μ g/ml mCRP mit 1 μ M PC veränderte die Freisetzung von IL-1 β ebenfalls nicht signifikant ($n = 6$, Abbildung 14 A). Jedoch wurde die BzATP-induzierte IL-1 β -Freisetzung durch die Zugabe von 10 μ g/ml mCRP, welches mit 10 μ M PC vorinkubiert wurde, statistisch signifikant auf 64 % reduziert ($p = 0,028$, $n = 6$, Abbildung 14 A).

In allen Zellkulturüberständen lag die LDH-Aktivität im Median unter 15 % ohne signifikante Unterschiede zur LDH-Aktivität nach Stimulation mit LPS und BzATP (Abbildung 14 B).

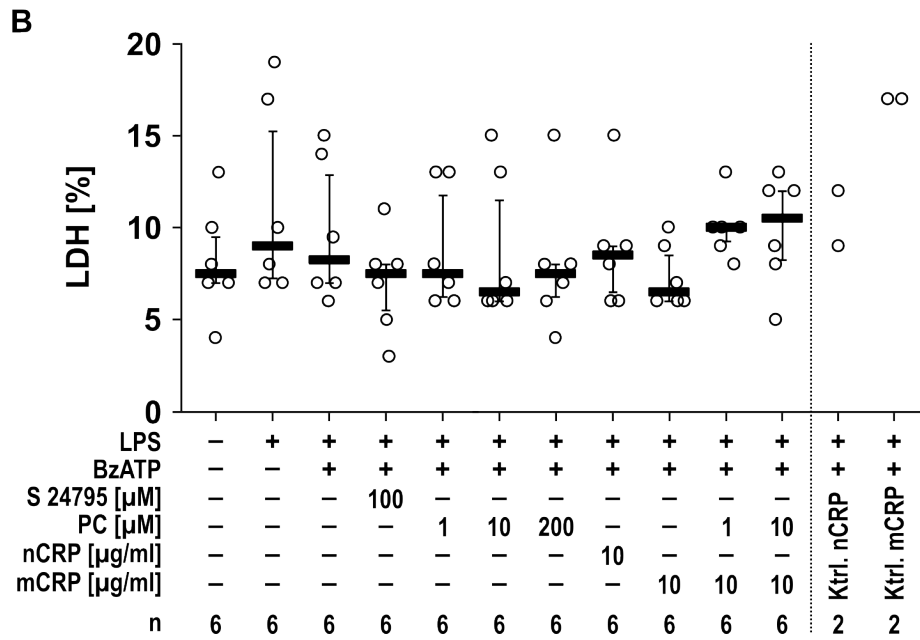
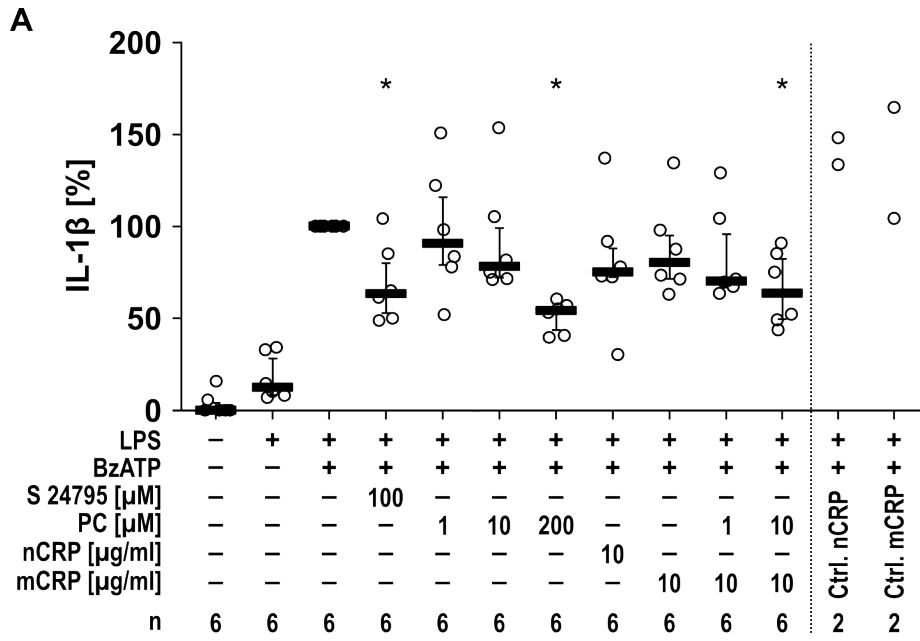


Abbildung 14: Einfluss von mCRP auf die BzATP-induzierte IL-1 β -Freisetzung aus monozytären THP-1-Zellen. Monozytäre THP-1 Zellen (5×10^5 Zellen/0,5 ml) wurden mit Lipopolysaccharid (LPS; 1 μ g/ml, 5 Stunden) voraktiviert und mit 2'(3')-O-(4-Benzoylbenzoyl)adenosin-5'-triphosphat (BzATP; 100 μ M, 40 Minuten) stimuliert. Die Zellkulturüberstände wurden abgenommen, Interleukin (IL)-1 β mittels *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) quantifiziert und die Laktatdehydrogenase (LDH)-Aktivität bestimmt. Monomeres C-reaktives Protein (mCRP) wurde durch Inkubation von humanem nativen CRP (nCRP) mit Harnstoff (8 M) und Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA, 10 mM) (1 Stunde, 37 °C) gebildet. mCRP wurde mit Phosphocholin (PC) für 30 Minuten bei 37 °C vorinkubiert. (n = 6) Als zusätzliche Kontrollen (Ktrl.) wurden der nCRP-Lagerpuffer und der mCRP-Lagerpuffer kurz vor Stimulation mit BzATP zu den Zellen gegeben (n = 2). **(A)** IL-1 β -Konzentration im Zellkulturüberstand. Die Daten wurden auf mit LPS und BzATP stimulierte Zellen normalisiert. **(B)** Zugehörige LDH-Aktivität im Zellkulturüberstand. * $p \leq 0,05$ (verglichen zu Zellen stimuliert mit LPS & BzATP), Friedman-Test gefolgt von Wilcoxon-Rangsummentest. Die Werte sind als einzelne Datenpunkte dargestellt, Balken zeigen den Median, Whisker die Perzentile 25 und 75. n, Anzahl einzelner Experimente.

3.3 UNTERSUCHUNGEN POTENTIELLER CRP-LIGANDEN

3.3.1 EFFEKT VON rCRP-PC-KOMPLEXEN AUF DIE BZATP-INDUZIERTER IL-1 β -FREISETZUNG

Da sich der Effekt von CRP im Rahmen der BzATP-induzierten IL-1 β -Freisetzung möglicherweise je nach gebundenen Liganden unterscheiden könnte, sollte ein *in vitro*-Testsystem in monozytären THP-1-Zellen zur Analyse der mittels Massenspektrometrie identifizierten CRP-Liganden etabliert werden.

Hierzu wurden zunächst CRP-Liganden-Komplexe aus rCRP mit dem bekannten CRP-Liganden PC gebildet und der Einfluss auf die BzATP-induzierte IL-1 β -Freisetzung aus monozytären THP-1-Zellen untersucht. Die CRP-Liganden-Komplexe wurden dabei durch 30-minütige Vorinkubation von rCRP mit PC in Anwesenheit von 5 mM Ca^{2+} bei 37 °C gebildet. Die mittels ELISA quantifizierten absoluten IL-1 β -Konzentrationen wurden zunächst auf die IL-1 β -Konzentration, die nach Stimulation mit LPS und BzATP freigesetzt wurde, normalisiert.

Die Ergebnisse zeigten, dass im Vergleich zur Stimulation mit LPS und BzATP sowohl unstimulierte monozytäre THP-1-Zellen mit 1 % ($p = 0,028$, $n = 6$) als auch nur mit LPS stimulierte Zellen mit 8 % ($p = 0,028$, $n = 6$) statistisch signifikant weniger IL-1 β freisetzen (Abbildung 15 A). Während die Zugabe von 1 μ M bzw. 10 μ M PC kurz vor Stimulation mit BzATP keine statistisch signifikante Veränderung der IL-1 β -Freisetzung bewirkte, führte die Zugabe von 200 μ M PC zu einer statistisch signifikanten Inhibition

der IL-1 β -Freisetzung auf 69 % ($p = 0,028$, $n = 6$, Abbildung 15 A). Bei der Zugabe verschiedener Konzentrationen von rCRP zeigte sich ebenfalls nur bei der höchsten zugegebenen rCRP-Konzentration (20 $\mu\text{g/ml}$) eine statistisch signifikante Inhibition der BzATP-induzierten IL-1 β -Freisetzung auf 82 % ($p = 0,046$, $n = 6$, Abbildung 15 A). Wenn vor der Stimulation mit BzATP 0,1 mM Ca^{2+} zu den THP-1-Zellen gegeben wurde (entsprechend der Ca^{2+} -Konzentration in Zellkulturansätzen nach Zugabe der rCRP-PC-Komplexe), resultierte dies in einer statistisch signifikanten Reduktion der IL-1 β -Freisetzung auf 86 % ($p = 0,028$, $n = 6$, Abbildung 15 A). Die Zugabe von Ca^{2+} -abhängig gebildeten rCRP-PC-Komplexen aus 5 $\mu\text{g/ml}$ rCRP mit 1 μM PC (Endkonzentrationen je Zellkulturansatz) (72 %; $p = 0,046$, $n = 6$), 10 $\mu\text{g/ml}$ rCRP mit 1 μM PC (68 %; $p = 0,028$, $n = 6$), 20 $\mu\text{g/ml}$ rCRP mit 1 μM PC (77 %; $p = 0,046$, $n = 6$), 10 $\mu\text{g/ml}$ rCRP mit 10 μM PC (82 %; $p = 0,028$, $n = 6$) und 20 $\mu\text{g/ml}$ rCRP mit 10 μM PC (79 %; $p = 0,046$, $n = 6$) führte jeweils zu einer statistisch signifikanten Inhibition der IL-1 β -Freisetzung aus monozytären THP-1-Zellen (Abbildung 15 A). Die IL-1 β -Freisetzung nach Zugabe von Ca^{2+} -abhängig gebildeten rCRP-PC-Komplexen aus 10 $\mu\text{g/ml}$ rCRP mit 1 μM PC (72 %; $p = 0,046$, $n = 6$) und 20 $\mu\text{g/ml}$ rCRP mit 1 μM PC (82 %; $p = 0,046$, $n = 6$) war darüber hinaus statistisch signifikant niedriger als nach Zugabe von 0,1 mM Ca^{2+} vor Stimulation mit BzATP (86 %; $n = 6$) (Abbildung 15).

Die Bestimmung der LDH-Aktivität in den Zellkulturüberständen ergab in allen Ansätzen im Median jeweils eine LDH-Aktivität unter 10 % (Abbildung 15 B). Im Vergleich zu mit LPS und BzATP stimulierten Zellen (9 %; $n = 6$) war die LDH-Aktivität in Überständen unstimulierter Zellen statistisch signifikant geringer (7 %; $p = 0,028$, $n = 6$) (Abbildung 15 B). Zusätzlich zeigten sich statistisch signifikant reduzierte LDH-Aktivitäten auf 7 % nach Zugabe von Komplexen aus 5 $\mu\text{g/ml}$ rCRP mit 10 μM PC ($p = 0,028$, $n = 6$) und auf 8 % nach Zugabe von Komplexen aus 10 $\mu\text{g/ml}$ rCRP mit 10 μM PC ($p = 0,028$, $n = 6$) (Abbildung 15 B) (angegeben sind die Endkonzentrationen je Zellkulturansatz).

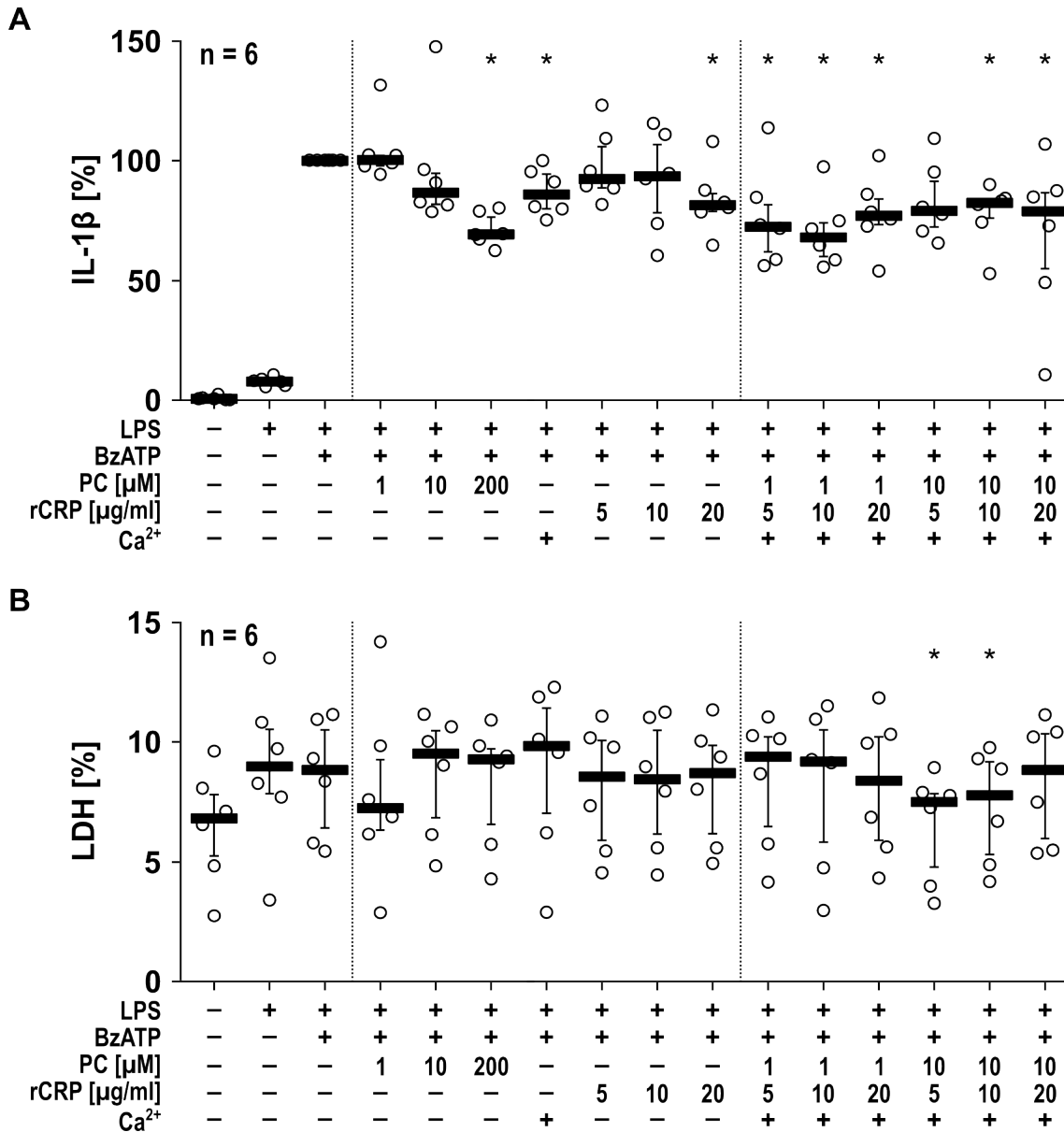


Abbildung 15: Einfluss von rCRP-PC-Komplexen auf die BzATP-induzierte IL-1 β -Freisetzung aus monozytären THP-1-Zellen. Monozytäre THP-1-Zellen (2×10^5 Zellen/0,2 ml) wurden mit Lipopolysaccharid (LPS; 1 μ g/ml, 5 Stunden) voraktiviert und mit 2'(3')-O-(4-Benzoyl-benzoyl)adenosin-5'-triphosphat (BzATP; 100 μ M, 40 Minuten) stimuliert. Die Zellkulturüberstände wurden abgenommen, Interleukin (IL)-1 β mittels *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) quantifiziert und die Laktatdehydrogenase (LDH)-Aktivität bestimmt. Komplexe aus rekombinantem C-reaktiven Protein (rCRP) mit Phosphocholin (PC) wurden durch 30-minütige Vorinkubation von rCRP mit PC in Anwesenheit von 5 mM Ca²⁺ bei 37 °C gebildet. **(A)** IL-1 β -Konzentration im Zellkulturüberstand. Die Daten wurden auf mit LPS und BzATP stimulierte Zellen normalisiert. **(B)** Zugehörige LDH-Aktivität im Zellkulturüberstand. * $p \leq 0,05$ (verglichen zu Zellen stimuliert mit LPS & BzATP), Friedman-Test gefolgt von Wilcoxon-Rangsummentest. Die Werte sind als einzelne Datenpunkte dargestellt, Balken zeigen den Median, Whisker die Perzentile 25 und 75. n, Anzahl einzelner Experimente.

3.3.2 EINFLUSS VON KOFFEIN AUF DIE BzATP-INDUZIERTER IL-1 β -FREISETZUNG

Aus den mittels Massenspektrometrie charakterisierten potentiellen CRP-Liganden wurde für weitere *in vitro*-Experimente zunächst der Fokus auf Koffein gelegt und die Wirkung von Koffein auf die BzATP-induzierte IL-1 β -Freisetzung aus monozytären THP-1-Zellen untersucht.

Die gemessenen IL-1 β -Konzentrationen wurden auf die IL-1 β -Konzentration normalisiert, die aus mit LPS und BzATP stimulierten Zellen freigesetzt wurde. Im Vergleich zu diesem Wert war die IL-1 β -Freisetzung in unstimulierten Zellen mit 1 % ($p = 0,027$, $n = 6$) und in nur mit LPS stimulierten Zellen mit 24 % ($p = 0,028$, $n = 6$) statistisch signifikant geringer (Abbildung 16 A). Die Behandlung monozytärer THP-1-Zellen mit dem synthetischen partiellen $\alpha 7$ -nAChR-Agonisten S 24795 (100 μ M) kurz vor der Stimulation mit BzATP führte zu einer statistisch signifikanten Reduktion der IL-1 β -Freisetzung auf 57 % ($p = 0,028$, $n = 6$, Abbildung 16 A). Die Zugabe von verschiedenen Koffein-Konzentrationen (1 - 1000 μ M) zu den THP-1-Zellen kurz vor der Stimulation mit BzATP führte überwiegend zu keiner statistisch signifikanten Veränderung der IL-1 β -Freisetzung (Abbildung 16 A). Lediglich die Zugabe von 1 mM Koffein resultierte in einem statistisch signifikanten Anstieg der IL-1 β -Freisetzung auf 137 % ($p = 0,028$, $n = 6$, Abbildung 16 A).

Die LDH-Aktivität lag in allen Ansätzen im Median unter 15 % (Abbildung 16 B). Im Vergleich zu mit LPS und BzATP stimulierten Zellen (13 %, $n = 6$) zeigte sich im Median eine statistisch signifikante Reduktion der LDH-Aktivität nach Zugabe von S 24795 (100 μ M) auf 10,6 % ($p = 0,028$, $n = 6$) sowie nach Zugabe von 1 mM Koffein auf 11,05 % ($p = 0,028$, $n = 6$) (Abbildung 16 B).

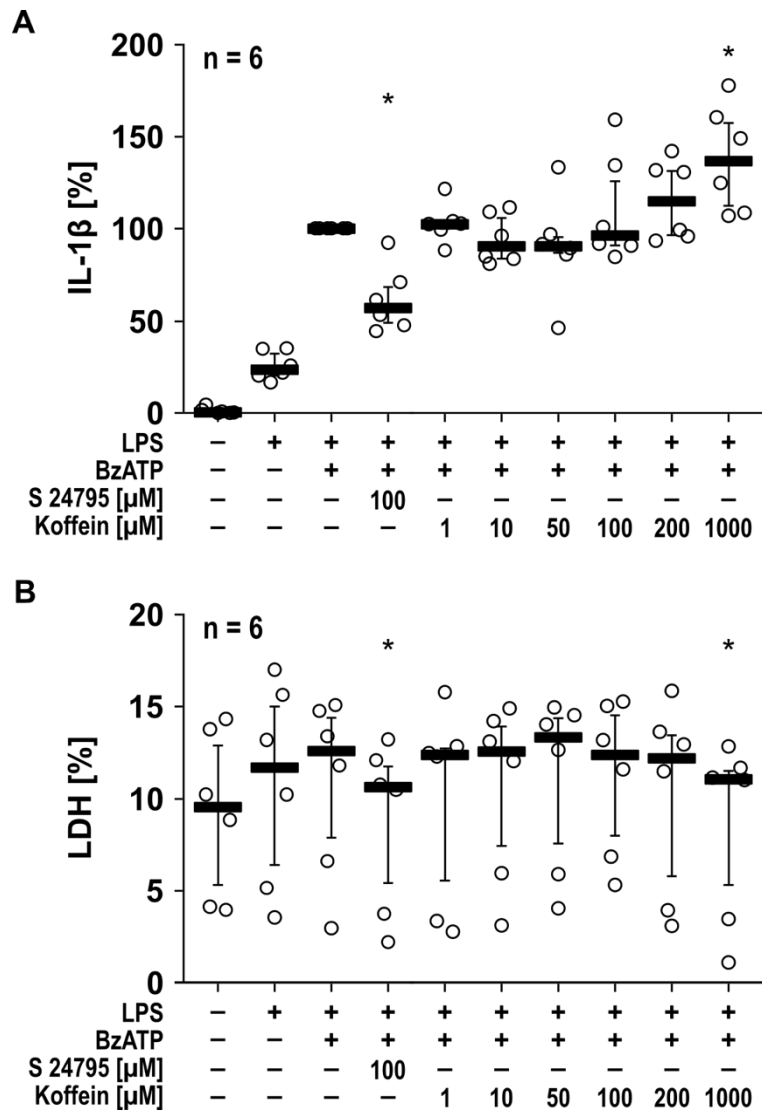


Abbildung 16: Die BzATP-induzierte IL-1β-Freisetzung aus monozytären THP-1-Zellen wird nicht durch Koffein beeinflusst. Monozytäre THP-1-Zellen ($5 \times 10^5/0,5$ ml) wurden mit Lipopolysaccharid (LPS; $1 \mu\text{g/ml}$, 5 Stunden) voraktiviert und im Anschluss mit 2'(3')-O-(4-Benzoyl-benzoyl)adenosin-5'-triphosphat (BzATP; $100 \mu\text{M}$, 40 Minuten) aktiviert. Interleukin (IL)-1β in den Zellkulturüberständen wurde mittels *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) quantifiziert und die Laktatdehydrogenase (LDH)-Aktivität gemessen. **(A)** IL-1β-Konzentration im Zellkulturüberstand nach Zugabe von S 24795 ($100 \mu\text{M}$) oder Koffein ($1 - 1000 \mu\text{M}$) kurz vor Stimulation mit BzATP. **(B)** Zugehörige LDH-Aktivität. * $p \leq 0,05$ (verglichen zu Zellen stimuliert mit LPS & BzATP), Friedman-Test gefolgt von Wilcoxon-Rangsummentest. Die Werte sind als einzelne Datenpunkte dargestellt, Balken zeigen den Median und Whisker die Perzentile 25 und 75. n, Anzahl einzelner Experimente.

Darüber hinaus sollte getestet werden, ob Koffein eine Aufhebung des inhibitorischen Effektes des partiellen $\alpha 7$ -nAChR-Agonisten S 24795 auf die BzATP-induzierte IL-1β-Freisetzung aus monozytären THP-1-Zellen bewirken kann.

Im Vergleich zu mit LPS und BzATP stimulierten Zellen zeigte sich in unstimulierten Zellen (2 %; $p = 0,028$, $n = 6$) sowie in nur mit LPS stimulierten Zellen (31 %; $p = 0,028$,

n = 6) eine signifikant geringere Freisetzung von IL-1 β (Abbildung 17 A). Die Zugabe von 100 μ M S 24795 als Positivkontrolle kurz vor Stimulation mit BzATP führte zu einer statistisch signifikanten Inhibition der IL-1 β -Freisetzung auf 56 % (p = 0,028, n = 6, Abbildung 17 A). Der inhibitorische Effekt von S 24795 auf die BzATP-induzierte IL-1 β -Freisetzung wurde nicht durch Koffein (1 - 200 μ M) beeinflusst (Abbildung 17 A). Die Zugabe der höchsten getesteten Koffein-Konzentration (1 mM) führte allerdings zu einer Aufhebung des inhibitorischen Effektes von S 24795, mit einer IL-1 β -Freisetzung von 93 % im Median (p = 0,046 (im Vergleich zu mit LPS und BzATP stimulierten Zellen nach Zugabe von S 24795), n = 6, Abbildung 17 A).

Die LDH-Aktivität lag in allen Ansätzen unter 10 % im Median (Abbildung 17 B). Statistisch signifikante Unterschiede im Vergleich zur LDH-Aktivität von mit LPS und BzATP stimulierten Zellen (7 %; n = 6) zeigten sich nach Zugabe von 100 μ M S 24795 (5 %; p = 0,017, n = 6), 100 μ M S 24795 und 50 μ M Koffein (6 %; p = 0,028, n = 6), 100 mM S 24795 und 200 μ M Koffein (4 %; p = 0,028, n = 6) und 100 μ M S 24795 und 1 mM Koffein (3 %; p = 0,028, n = 6) (Abbildung 17 B).

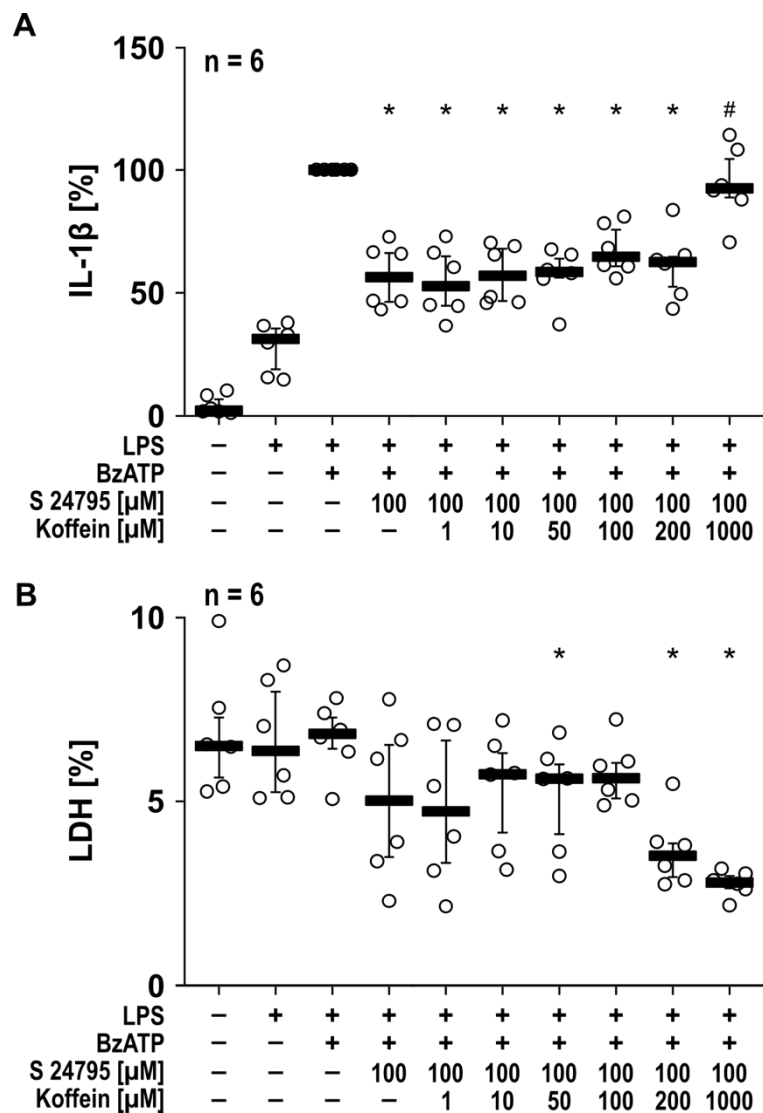


Abbildung 17: Dosisabhängiger Effekt von Koffein auf die inhibitorische Wirkung von S 24795 auf die BzATP-induzierte IL-1β-Freisetzung aus THP-1-Zellen. Monozytäre THP-1-Zellen ($5 \times 10^5/0,5$ ml) wurden mit Lipopolysaccharid (LPS; $1 \mu\text{g/ml}$, 5 Stunden) voraktiviert und im Anschluss mit 2'(3')-O-(4-Benzoyl-benzoyl)adenosin-5'-triphosphat (BzATP; $100 \mu\text{M}$, 40 Minuten) aktiviert. Interleukin (IL)-1β in den Zellkulturüberständen wurde mittels *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) quantifiziert und die Laktatdehydrogenase (LDH)-Aktivität gemessen. **(A)** IL-1β-Konzentration im Zellkulturüberstand nach Zugabe von Koffein ($1 - 1000 \mu\text{M}$) gefolgt von S 24795 ($100 \mu\text{M}$) kurz vor Stimulation mit BzATP. **(B)** Zugehörige LDH-Aktivität. * $p \leq 0,05$ (verglichen zu Zellen stimuliert mit LPS & BzATP), # $p \leq 0,05$ (verglichen zu Zellen stimuliert mit LPS, BzATP & S 24795), Friedman-Test gefolgt von Wilcoxon-Rangsummentest. Die Werte sind als einzelne Datenpunkte dargestellt, Balken zeigen den Median und Whisker die Perzentile 25 und 75. n, Anzahl einzelner Experimente.

Neben monozytären THP-1-Zellen wurde der Effekt von Koffein auf die BzATP-induzierte IL-1β-Freisetzung zusätzlich in frisch isolierten humanen PBMCs gesunder Spender getestet (Abbildung 18). Die mit LPS gepulsten PBMCs zeigten ohne Stimulation mit BzATP eine signifikant geringere IL-1β-Freisetzung von 8 % ($p = 0,043$, $n = 5$) im Vergleich zur Stimulation mit BzATP (Abbildung 18 A). Die Zugabe von

100 μM S 24795 führte zu keinem statistisch signifikanten Effekt auf die BzATP-induzierte IL-1 β -Freisetzung ($p = 0,225$, $n = 5$, Abbildung 18 A). Die Zugabe verschiedener Koffein-Konzentrationen (1 - 1000 μM) hatte ebenfalls keinen statistisch signifikanten Einfluss auf die BzATP-induzierte IL-1 β -Freisetzung aus humanen PBMCs (Abbildung 18 A).

Bei Behandlung der PBMCs mit 100 μM S 24795 und 10 μM Koffein vor Stimulation mit BzATP zeigte sich eine statistisch signifikante Reduktion der IL-1 β -Freisetzung auf 85 % ($p = 0,043$, $n = 5$), ebenso nach Zugabe von 100 μM S 24795 und 50 μM Koffein (88 %; $p = 0,043$, $n = 5$) (Abbildung 18 A). Die Zugabe von 100 μM S 24795 und 1 mM Koffein führte zu einer statistisch signifikanten Erhöhung der BzATP-induzierten IL-1 β -Freisetzung aus humanen PBMCs auf 133 % ($p = 0,043$, $n = 5$, Abbildung 18 A). Im Vergleich zur BzATP-induzierten IL-1 β -Freisetzung aus humanen PBMCs nach Behandlung mit 100 μM S 24795 (85 %; $n = 5$) zeigte sich eine statistisch signifikant erhöhte IL-1 β -Freisetzung nach Behandlung mit 100 μM S 24795 und 200 μM Koffein (112 %; $p = 0,043$, $n = 5$) sowie 100 μM S 24795 und 1 mM Koffein (133 %; $p = 0,043$, $n = 5$) (Abbildung 18 A).

Die LDH-Aktivität in allen Zellkulturüberständen lag im Median unter 5 % und es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zur LDH-Aktivität nach Stimulation der PBMCs mit LPS und BzATP (Abbildung 18 B).

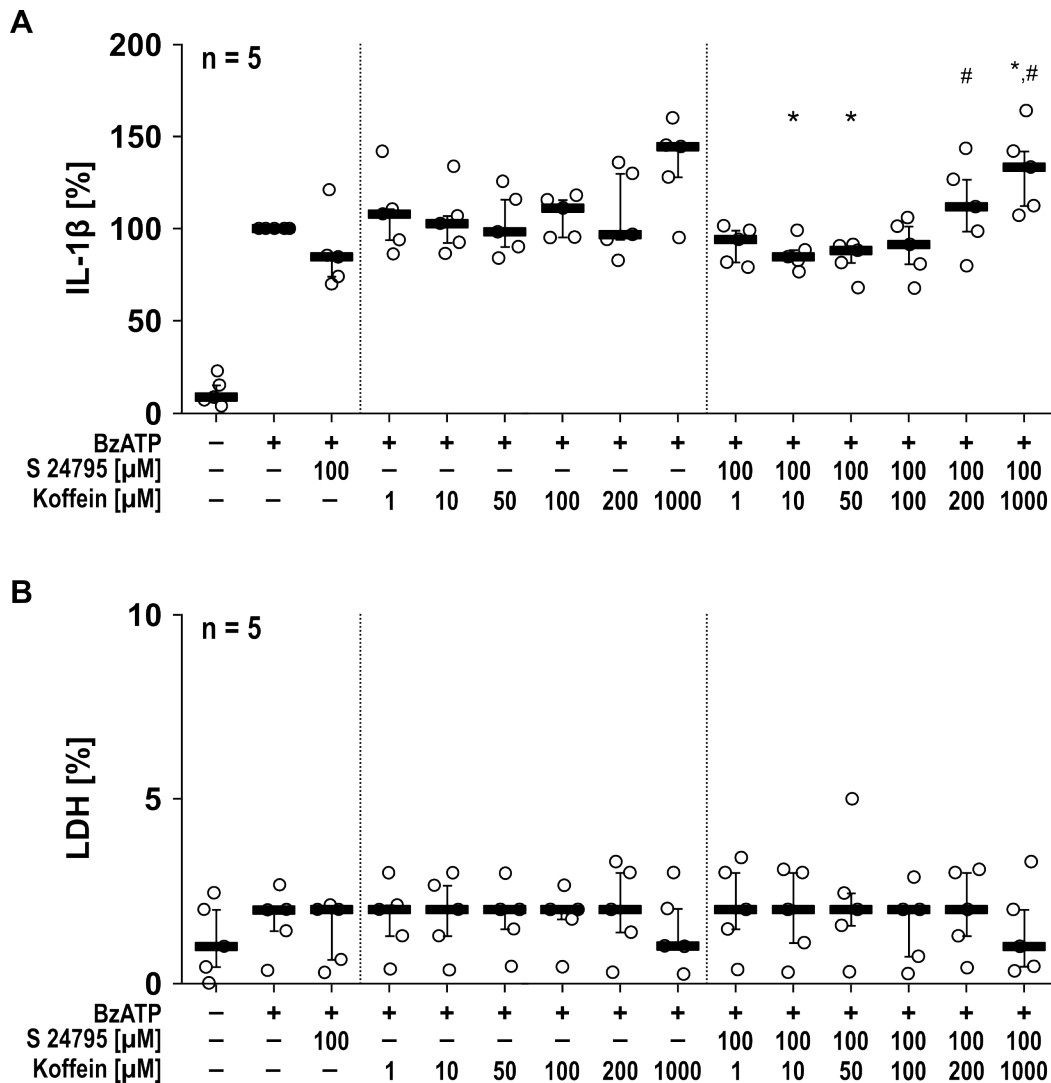


Abbildung 18: Dosisabhängiger Effekt von Koffein auf die BzATP-induzierte IL-1 β -Freisetzung aus humanen PBMCs gesunder Probanden. Humane periphere mononukleäre Blutzellen (englisch: *peripheral blood mononuclear cells*, PBMCs) wurden mit Lipopolysaccharid (LPS; 5 ng/ml, 3 Stunden) gepulst, eine Adhärenz-Selektion durchgeführt und im Anschluss mit 2'(3')-O-(4-Benzoyl-benzoyl)adenosin-5'-triphosphat (BzATP; 100 μ M, 30 Minuten) aktiviert. Interleukin (IL)-1 β in den Zellkulturüberständen wurde mittels *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) quantifiziert und die Laktatdehydrogenase (LDH)-Aktivität gemessen. **(A)** IL-1 β -Konzentration im Zellkulturüberstand nach Zugabe von Koffein (1 - 1000 μ M) bzw. Koffein gefolgt von S 24795 (100 μ M) kurz vor Stimulation mit BzATP. **(B)** Zugehörige LDH-Aktivität. * $p \leq 0,05$ (verglichen zu Zellen stimuliert mit LPS & BzATP), # $p \leq 0,05$ (verglichen zu Zellen stimuliert mit LPS, BzATP & S 24795), Friedman-Test gefolgt von Wilcoxon-Rangsummentest. Die Werte sind als einzelne Datenpunkte dargestellt, Balken zeigen den Median und Whisker die Perzentile 25 und 75. n, Anzahl einzelner Experimente.

3.3.3 EINFLUSS VON PARACETAMOL AUF DIE BzATP-INDUZIERTE IL-1 β -FREISETZUNG

An zweiter Stelle der mittels Massenspektrometrie identifizierten potentiellen CRP-Liganden stand Paracetamol (Tabelle 14), weshalb auch die Wirkung von Paracetamol auf die BzATP-induzierte IL-1 β -Freisetzung aus monozytären THP-1-Zellen untersucht wurde.

Nach Normalisierung der IL-1 β -Konzentrationen auf die aus mit LPS und BzATP stimulierten Zellen freigesetzte IL-1 β -Konzentration zeigte sich ein statistisch signifikanter Anstieg der IL-1 β -Freisetzung durch Stimulation mit LPS und BzATP im Vergleich zu unstimulierten Zellen (2 %; $p = 0,028$, $n = 6$) und nur mit LPS stimulierten Zellen (15 %; $p = 0,028$, $n = 6$, Abbildung 19 A). Die Zugabe des synthetischen partiellen $\alpha 7$ -nAChR-Agonisten S 24795 (100 μ M) kurz vor der Stimulation mit BzATP resultierte in einer statistisch signifikanten Reduktion der IL-1 β -Freisetzung auf 57 % ($p = 0,027$, $n = 6$, Abbildung 19 A). Die Zugabe verschiedener Paracetamol-Konzentrationen (1 - 200 μ g/ml) führte lediglich bei den beiden höchsten Konzentrationen zu einer statistisch signifikanten Reduktion der IL-1 β -Freisetzung auf 86 % bei 100 μ g/ml Paracetamol ($p = 0,028$, $n = 6$) und auf 62 % bei 200 μ g/ml Paracetamol ($p = 0,028$, $n = 6$, Abbildung 19 A). Die statistisch signifikante Reduktion der IL-1 β -Freisetzung durch S 24795 wurde durch Zugabe von 1 μ g/ml Paracetamol statistisch signifikant auf 60 % ($p = 0,046$, $n = 6$) erhöht und durch 200 μ g/ml Paracetamol statistisch signifikant auf 44 % ($p = 0,046$, $n = 6$) reduziert (Abbildung 19 A).

In allen Ansätzen lag die LDH-Aktivität im Median unter 10 % (Abbildung 19 B). Im Vergleich zu mit LPS und BzATP stimulierten Zellen (8 %; $n = 6$) zeigte sich eine statistisch signifikante Reduktion der LDH-Aktivität nach Zugabe von 100 μ g/ml Paracetamol (5 %; $p = 0,046$, $n = 6$), 200 μ g/ml Paracetamol (3 %; $p = 0,027$, $n = 6$), 100 μ g/ml Paracetamol mit 100 μ M S 24795 (6 %; $p = 0,028$, $n = 6$) und 200 μ g/ml Paracetamol mit 100 μ M S 24795 (3 %; $p = 0,028$, $n = 6$, Abbildung 19 B). Nach Zugabe von 10 μ g/ml Paracetamol mit 100 μ M S 24795 zeigt sich eine statistisch signifikante Erhöhung der LDH-Aktivität auf 9 % im Median ($p = 0,027$, $n = 6$, Abbildung 19 B).

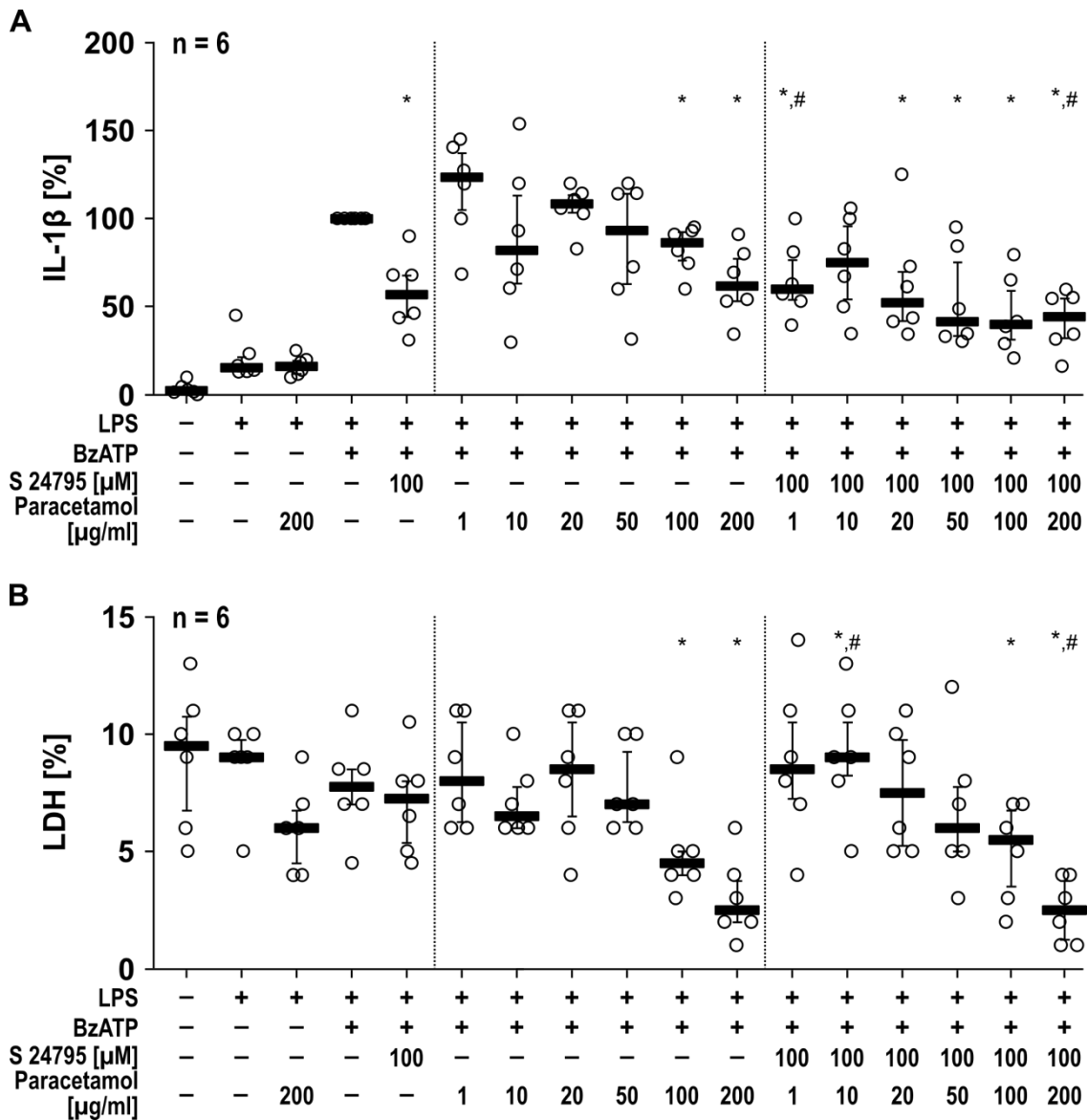


Abbildung 19: Dosisabhängiger Effekt von Paracetamol auf die BzATP-induzierte IL-1 β -Freisetzung aus monozytären THP-1-Zellen. Monozytäre THP-1-Zellen ($5 \times 10^5/0,5$ ml) wurden mit Lipopolysaccharid (LPS; 1 μ g/ml, 5 Stunden) voraktiviert und im Anschluss mit 2'(3')-O-(4-Benzoyl-benzoyl)adenosin-5'-triphosphat (BzATP; 100 μ M, 40 Minuten) aktiviert. Interleukin (IL)-1 β in den Zellkulturüberständen wurde mittels *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) quantifiziert und die Laktatdehydrogenase (LDH)-Aktivität gemessen. **(A)** IL-1 β -Konzentration im Zellkulturüberstand nach Zugabe von Paracetamol (1 - 200 μ M) bzw. Paracetamol gefolgt von S 24795 (100 μ M) kurz vor Stimulation mit BzATP. **(B)** Zugehörige LDH-Aktivität. * $p \leq 0,05$ (verglichen zu Zellen stimuliert mit LPS & BzATP), # $p \leq 0,05$ (verglichen zu Zellen stimuliert mit LPS, BzATP & S 24795), Friedman-Test gefolgt von Wilcoxon-Rangsummentest. Die Werte sind als einzelne Datenpunkte dargestellt, Balken zeigen den Median und Whisker die Perzentile 25 und 75. n, Anzahl einzelner Experimente.

3.3.4 *IN SILICO* DOCKING POTENTIELLER CRP-LIGANDEN

Um die Interaktion der identifizierten Liganden mit CRP vorauszusagen, wurde molekulares Docking *in silico* über drei verschiedene Docking-Programme durchgeführt.

Als Ausgangsprotein wurde die CRP-Struktur aus PDB (PDB-ID 1GNH) heruntergeladen und ein Protomer (*chain A*) als separate Datei gespeichert. Die ersten beiden Substanzen der aus der massenspektrometrischen Analyse erhaltenen Liste (Tabelle 14), Koffein und Paracetamol, wurden für das Docking eingesetzt. Zur Referenz wurde das Docking zusätzlich mit dem bekannten CRP-Liganden PC durchgeführt.

Docking über den DiffDock-Webserver ergab die höchsten *confidence* Scores für die vorhergesagte Interaktion von Paracetamol mit CRP (Rang 1: 0,24, Rang 2: 0,23, Rang 3: 0,23, Tabelle 15). Die niedrigsten Werte des *confidence* Scores resultierten aus der berechneten Wechselwirkung von Koffein mit CRP (Rang 1: -0,51, Rang 2: -0,51, Rang 3: -0,51, Tabelle 15). Mittlere *confidence* Scores ergaben sich bei der vorhergesagten Interaktion von PC mit CRP (Rang 1: 0,06, Rang 2: 0,02, Rang 3: -0,51, Tabelle 15).

Tabelle 15: *Confidence* Scores der durch DiffDock-Web vorhergesagten Interaktion von Liganden mit CRP. Für das Docking mittels DiffDock-Web wurde ein Protomer des C-reaktiven Proteins (CRP; PDB-Code 1GNH, *chain A*) sowie die *simplified molecular input line entry system* (SMILES)-Strukturcodes der jeweiligen Liganden (Phosphocholin: PubChem-ID 1014; Koffein: PubChem-ID 2519; Paracetamol (Acetaminophen): PubChem-ID 1983) eingesetzt.

| Ligand | Rang 1 | Rang 2 | Rang 3 |
|---------------|--------|--------|--------|
| Phosphocholin | 0,06 | 0,02 | -0,05 |
| Koffein | -0,51 | -0,51 | -0,51 |
| Paracetamol | 0,24 | 0,23 | 0,23 |

Die 3D-Strukturen der mittels DiffDock-Web vorhergesagten Interaktionen der Liganden mit CRP, mit dem jeweils höchsten *confidence* Score, sind in Abbildung 20 dargestellt. Die Vorhersage der Wechselwirkung von PC mit CRP (Abbildung 20 A) diente als Positivkontrolle, um die Qualität der Berechnungen zu überprüfen und wurde mit der bekannten CRP-PC-Interaktion (PDB-Code 1B09) verglichen (Ergänzende Abbildung 17). Während in der bekannten Struktur die Interaktion der PC-Kopfgruppe mit den Aminosäuren E 138, D 140 und Q 150 sowie mit beiden Ca²⁺-Ionen (CA 501, CA 502) in der PC-Bindungsstelle erfolgte (Ergänzende Abbildung 17 C), zeigte die mittels DiffDock-Web berechnete Vorhersage die mutmaßliche Interaktion der PC-Kopfgruppe ebenfalls in der PC-Bindungsstelle, mit den Aminosäuren N 61, E 138, D 140 und Q 150

sowie mit beiden Ca^{2+} -Ionen (CA 501, CA 502) (Abbildung 20 A). Das Docking von Koffein mit CRP ergab eine mögliche Interaktion ebenfalls an der PC-Bindungsstelle über ein Ca^{2+} -Ion (CA 501) sowie die Aminosäuren N 61, E 138, D 140 und Q 150 (Abbildung 20 B). Eine Interaktion von Paracetamol mit CRP wurde mit höheren *confidence* Scores als das Docking der bekannten CRP-PC Interaktion vorhergesagt (Tabelle 15). Die mögliche Interaktion erfolgte dabei über ein Ca^{2+} -Ion (CA 501) sowie die Aminosäuren N 61, E 138, D 140 und Q 150 (Abbildung 20 C).

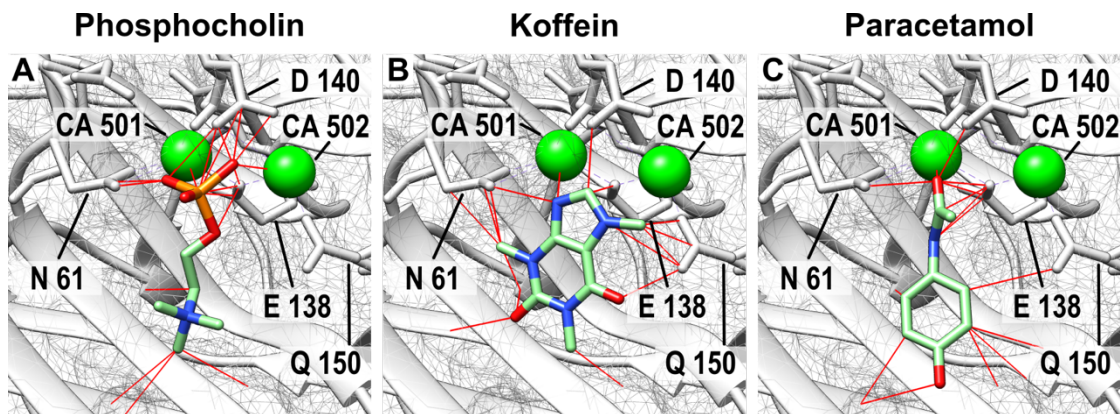


Abbildung 20: 3D-Darstellung des *in silico* Dockings von CRP mit Liganden mittels DiffDock-Web. Für das Docking mittels DiffDock-Web wurden ein Protomer des C-reaktiven Proteins (CRP; PDB-Code 1GNH, *chain A*) sowie die *simplified molecular input line entry system* (SMILES)-Strukturcodes der jeweiligen Liganden eingesetzt. Die Visualisierung der Docking-Ergebnisse mit dem besten *confidence* Score je Ligand erfolgte mit UCSF Chimera (Version 1.17.3). (A) Docking von CRP mit Phosphocholin (PC; PubChem-ID 1014). (B) Docking von CRP mit Koffein (PubChem-ID 2519). (C) Docking von CRP mit Paracetamol (Acetaminophen; PubChem-ID 1983).

Die 3D-Strukturen der mittels DiffDock-Web berechneten CRP-Liganden-Interaktionen mit den zweit- und dritthöchsten *confidence* Scores sind im Anhang dargestellt (Ergänzende Abbildung 14). Auch bei diesen Darstellungen zeigte sich in der Positivkontrolle die Orientierung von PC in der bekannten PC-Bindungsstelle mit möglichen Interaktionen zu beiden Ca^{2+} -Ionen (CA 501, CA 502) und den Aminosäuren N 61, E 138, D 140 und Q 150 (Ergänzende Abbildung 14 A und D). Die vorhergesagte Interaktion von Koffein mit CRP erfolgte ebenfalls über die Aminosäuren N 61, E 138, D 140 und Q 150 sowie beide Ca^{2+} -Ionen (CA 501, CA 502) in der PC-Bindungsstelle (Ergänzende Abbildung 14 B und E). Darüber hinaus war auch die berechnete Interaktion von Paracetamol mit CRP in der PC-Bindungsstelle anzuordnen – die möglichen Interaktionen erfolgten hier zu den Aminosäuren E 138, D 140 und Q 150 sowie zu beiden Ca^{2+} -Ionen (CA 501, CA 502) (zweithöchster *confidence* Score, Ergänzende

Abbildung 14 C) bzw. lediglich zu CA 501 (dritthöchster *confidence* Score, Ergänzende Abbildung 14 F).

Vergleichend wurde das Docking zudem über den SwissDock-Server mittels AutoDock Vina und *Attracting Cavities* durchgeführt (Ergänzende Tabelle 4, Ergänzende Abbildung 15, Ergänzende Abbildung 16). Docking mittels AutoDock Vina ergab die stärkste berechnete Bindungsaffinität zwischen Paracetamol und CRP (Rang 1: -4,53 kcal/mol, Ergänzende Tabelle 4, Ergänzende Abbildung 15 G). Die zweitstärksten vorhergesagten Bindungsaffinitäten zeigten sich zwischen Koffein und CRP (Rang 1: -4,32 kcal/mol, Ergänzende Tabelle 4, Ergänzende Abbildung 15 D). Die schwächsten Bindungsaffinitäten ergaben sich aus der berechneten Interaktion von PC mit CRP (Rang 1: -3,78 kcal/mol, Ergänzende Tabelle 4, Ergänzende Abbildung 15 A). Der Vergleich der 3D-Struktur der vorhergesagten Interaktion von PC mit CRP (Ergänzende Abbildung 15 A - C) mit der bekannten Struktur von CRP mit gebundenem PC (Ergänzende Abbildung 17 C) zeigte bei Rang eins der berechneten Bindungsaffinität eine fehlende Interaktion der PC-Kopfgruppe sowohl mit den Ca²⁺-Ionen (CA 501, CA 502) als auch mit den Aminosäuren E 138, D 140 und Q 150 (Ergänzende Abbildung 15 A). Die vorhergesagten Orientierungen von PC auf Rang zwei (Ergänzende Abbildung 15 B) und Rang drei (Ergänzende Abbildung 15 C) der berechneten Bindungsaffinitäten zeigten hingegen eine ähnliche Orientierung der PC-Kopfgruppe im Vergleich zur bekannten Struktur (Ergänzende Abbildung 17 C), mit möglichen Bindungen zu beiden Ca²⁺-Ionen (CA 501, CA 502) und zu den Aminosäuren N 61, E 138, D 140 und Q 150.

Das Docking mittels *Attracting Cavities* wurde über den *Attracting Cavities*-Score ausgewertet. Die besten *Attracting Cavities*-Scores ergaben sich für die vorhergesagte Interaktion von PC mit CRP (Rang 1: -145,42, Ergänzende Tabelle 4, Ergänzende Abbildung 16 A). Mittlere *Attracting Cavities*-Scores resultierten aus der berechneten Interaktion von Koffein mit CRP (Rang 1: -111,24, Ergänzende Tabelle 4, Ergänzende Abbildung 16 D). Das Docking von Paracetamol mit CRP mittels *Attracting Cavities* über den SwissDock-Server ergab hingegen die schwächsten AC-Scores (Rang 1: -29,04, Ergänzende Tabelle 4, Ergänzende Abbildung 16 G). Der Vergleich der 3D-Strukturen der vorhergesagten Interaktionen der Positivkontrolle (Ergänzende Abbildung 16 A - C) mit der bekannten CRP-PC-Struktur (Ergänzende Abbildung 17 C) zeigte keinerlei Übereinstimmung der Orientierung von PC in der PC-Bindungsstelle.

4 DISKUSSION

4.1 ERKENNTNISSE DER VORLIEGENDEN ARBEIT

Durch Vorarbeiten, die Hinweise auf eine mögliche antiinflammatorische Rolle von CRP lieferten (Meyer et al., 2020; Richter et al., 2018), wurden die der vorliegenden Arbeit zugrundeliegenden Hypothesen aufgestellt. Diese umfassen die Annahmen, dass (1) antiinflammatorische Effekte durch eCRP vermittelt werden können, (2) der Anstieg der CRP-Konzentration als Reaktion auf ein chirurgisches Trauma eine Veränderung des antiinflammatorischen Potentials von Blutplasmen bewirken kann und (3) die antiinflammatorische Kapazität von eCRP durch die Bindung und die Eigenschaften der Liganden beeinflusst werden. Durch die Untersuchung dieser Hypothesen sollen neue Erkenntnisse über die Rolle von CRP in pathophysiologischen Prozessen gewonnen werden.

Zur experimentellen Überprüfung der Hypothesen wurde eine Patientenkohorte von Patienten mit schwerem viszeralchirurgischem Eingriff untersucht. Um eine Trauma-induzierte sterile IL-1 β -vermittelte Entzündungsreaktion *in vitro* nachzustellen, wurden unfraktionierte humane Vollblutzellen, humane PBMCs und monozytäre THP-1-Zellen zunächst mit LPS voraktiviert und anschließend mit dem synthetischen ATP-Analogen BzATP stimuliert. Vor Zugabe von BzATP wurden verschiedene Agonisten, Antagonisten sowie autologe Blutplasmen zugegeben.

Sowohl prä- als auch postoperative Blutplasmen zeigen einen dosisabhängigen inhibitorischen Effekt auf die BzATP-induzierte IL-1 β -Freisetzung aus allen verwendeten Zelltypen. Obwohl postoperativ wie erwartet ein Anstieg der CRP-Konzentration im Blutplasma beobachtet werden kann, unterscheidet sich die inhibitorische Kapazität der prä- und postoperativen Blutplasmen nicht. Dies stellt einen ersten Widerspruch zu der vermuteten Beteiligung von CRP an der inhibitorischen Wirkung der Blutplasmen dar. Dieser Widerspruch wird durch weitere Ergebnisse gestützt, da entgegen den Erwartungen weder die Anreicherung der Plasmen mit dem CRP-Liganden PC noch die Depletion von CRP aus den Plasmen einen Einfluss auf den inhibitorischen Effekt der Blutplasmen im Rahmen BzATP-induzierter IL-1 β -Freisetzung haben.

Da CRP in verschiedenen Formen vorliegen kann, welche in unterschiedlichem Maße vermehrt pro- oder antiinflammatorische Effekte zeigen, wurde die im Blutplasma

vorliegende Form von CRP charakterisiert. Dabei zeigt sich wie erwartet, dass es sich bei eCRP nicht um die für ihre vermehrt proinflammatorischen Effekte bekannte monomere Form handelt. Somit lässt sich die unerwarteterweise fehlende Beteiligung von CRP an der inhibitorischen Wirkung der Blutplasmen allerdings nicht durch das Vorliegen in einer proinflammatorischen Form erklären. Um die am eCRP gebundenen Liganden zu charakterisieren, wurden die aus Patientenplasmen isolierten CRP-Liganden-Komplexe extrahiert und massenspektrometrisch analysiert. Hierbei zeigen sich verschiedene Substanzen, die mögliche Liganden des CRP sein können. Allerdings unterscheiden sich die nachgewiesenen Substanzen entgegen der Erwartung nicht signifikant zwischen postoperativem Tag zwei und postoperativem Tag fünf. Die Simulation der CRP-Liganden-Interaktion der beiden häufigsten nachgewiesenen Substanzen, Koffein und Paracetamol, mittels molekularen Dockings ergibt eine mögliche Interaktion beider Substanzen als CRP-Ligand in der bekannten PC-Bindungsstelle.

Um die *in silico* generierten Vorhersagen zu validieren, sollte die Ca^{2+} -abhängige Bildung von rCRP-Liganden-Komplexen *in vitro*, wie in Vorarbeiten an monozytären U937-Zellen gezeigt (Richter et al., 2018), genutzt werden. Wider Erwarten können die Ergebnisse allerdings nicht in monozytären THP-1-Zellen reproduziert werden, im Gegensatz zu den Vorarbeiten zeigen sich hier nur vereinzelt schwache inhibitorische Effekte der rCRP-PC-Komplexe auf die BzATP-induzierte IL-1 β -Freisetzung. Für die weitere Charakterisierung der möglichen CRP-Liganden Koffein und Paracetamol im Rahmen der BzATP-induzierten IL-1 β -Freisetzung wurden daher zunächst Dosis-Wirkungskurven der jeweiligen Substanzen erstellt. Dabei zeigt Koffein keinen dosisabhängigen Effekt auf die BzATP-induzierte IL-1 β -Freisetzung aus monozytären THP-1-Zellen und humanen PBMCs gesunder Probanden. Darüber hinaus kann Koffein den inhibitorischen Effekt des $\alpha 7$ -nAChR-Agonisten S 24795 auf die BzATP-induzierte IL-1 β -Freisetzung nicht antagonisieren. Für Paracetamol zeigt sich in monozytären THP-1-Zellen bei hohen Paracetamol-Konzentrationen (100 μM , 200 μM) ein inhibitorischer Effekt auf die BzATP-induzierte IL-1 β -Freisetzung und ebenfalls keine wesentliche Antagonisierung des inhibitorischen Effektes von S 24795. Die in der vorliegenden Arbeit gewonnenen Erkenntnisse sowie die dadurch entstandenen Aussagen in Bezug auf die im Vorfeld aufgestellten Hypothesen werden im Folgenden näher diskutiert.

4.2 INDUKTION DES AKUTE-PHASE-PROTEINS CRP DURCH EIN CHIRURGISCHES TRAUMA

Im Bereich der Viszeralchirurgie werden schwere chirurgische Eingriffe wie Pankreas-, Magen- und Ösophagusresektionen durchgeführt (Courtney et al., 2024; Plat et al., 2021). Aufgrund der Komplexität und der damit verbundenen hohen Komplikationsrate stellen diese Eingriffe für die betroffenen Patienten eine erhebliche physische Belastung dar, wodurch Aspekte wie die Länge des Krankenhausaufenthaltes und die postoperative Mortalitätsrate ungünstig beeinflusst werden (Lahiri et al., 2016; Plat et al., 2021; Verdonk et al., 2021). Ein hierbei maßgeblicher Faktor ist das Auftreten systemischer Entzündungen, welche unter anderem durch eine unverhältnismäßig hohe Freisetzung inflammatorischer Mediatoren wie dem proinflammatorischen Zytokin IL-1 β charakterisiert sind (Buttenschoen et al., 2010; Lahiri et al., 2016).

Die in dieser Arbeit untersuchte Patientenkohorte umfasst 16 Patienten mit einem Alter von 64,5 Jahren im Median und setzt sich zu 87,5 % aus männlichen Patienten zusammen (Tabelle 9). Bei allen Patienten wurde in der Klinik für Allgemein-, Viszeral- Thorax- und Transplantationschirurgie des UKGM Gießen eine elektive schwere viszeralchirurgische Operation durchgeführt (Tabelle 10). Während der perioperativen klinischen Versorgung der Patienten werden routinemäßig verschiedene Biomarker evaluiert, um präoperative Risikofaktoren sowie postoperative Komplikationen frühzeitig identifizieren zu können (Edwards et al., 2011). Einer dieser Biomarker ist CRP (Olson et al., 2023; Plat et al., 2021). In der Patientenkohorte der vorliegenden Arbeit zeigt die Analyse der routinemäßig bestimmten CRP-Plasmakonzentrationen wie erwartet einen statistisch signifikanten Anstieg als Reaktion auf das chirurgische Trauma (Abbildung 7). CRP wird den Akute-Phase-Proteinen zugeordnet und zählt somit zu den humoralen Bestandteilen der angeborenen Immunantwort (Mantovani & Garlanda, 2023; Riera Romo et al., 2016). Im physiologischen Zustand liegt die Plasmakonzentration unter 3 mg/l (Newling et al., 2019; Pepys & Hirschfield, 2003), was mit dem Median des präoperativen Ausgangswertes in der untersuchten Patientenkohorte dieser Arbeit übereinstimmt (2,6 mg/l, Abbildung 7). Durch einen initialen Stimulus, wie beispielsweise ein chirurgisches Trauma, wird unter anderem die vermehrte Expression des proinflammatorischen Zytokins IL-6 induziert, welches nachfolgend im Rahmen der Akute-Phase-Reaktion die hepatische Expression und Synthese von CRP hochreguliert (Cabrera-Rivera et al., 2022; Ngwa et al., 2022). Die CRP-Plasmakonzentrationen steigen

daraufhin nach circa vier bis sechs Stunden an und erreichen typischerweise nach etwa 48 Stunden den Höchstwert (Newling et al., 2019; Pepys & Hirschfield, 2003). Dies spiegelt sich auch in der Patientenkohorte der vorliegenden Arbeit wider, bei der sich am zweiten postoperativen Tag im Median der Höchstwert der CRP-Plasmakonzentration von 172,5 mg/l zeigt (Abbildung 7). Weiterhin zeigt sich im postoperativen Verlauf in der Patientenkohorte im Median ein statistisch signifikanter Rückgang der CRP-Plasmakonzentrationen vom postoperativen Tag zwei auf 119 mg/l bis zum postoperativen Tag fünf (Abbildung 7). Dies steht ebenfalls im Einklang mit in der Literatur beschriebenen Verläufen der CRP-Konzentrationen: Limitiert durch die 19-stündige Plasmahalbwertszeit wird das Erreichen der Peak-Konzentration von einem rapiden Rückgang der Plasmakonzentrationen gefolgt, sofern der initiale inflammatorische Stimulus aufgehoben ist (Pepys & Hirschfield, 2003; Rizo-Télez et al., 2023). Bei drei Patienten lässt sich allerdings ein anhaltender Anstieg der CRP-Konzentrationen im Blutplasma vom postoperativen Tag zwei bis zum postoperativen Tag fünf beobachten (Abbildung 7). Dies spricht für ein fortdauerndes Vorliegen entzündlicher Stimuli, was beispielsweise aus dem Auftreten postoperativer Komplikationen resultieren kann (Pepys & Hirschfield, 2003; Plat et al., 2021).

4.3 INHIBITION DER BZATP-INDUZIERTEN IL-1 β -FREISETZUNG

4.3.1 IL-1 β -FREISETZUNG ALS ZEICHEN TRAUMA-INDUZIERTER STERILER INFLAMMATION

Wie bereits erwähnt, wird durch die angeborene Immunantwort im Rahmen eines chirurgischen Traumas die Freisetzung proinflammatorischer Zytokine induziert (Buttenschoen et al., 2010; Lahiri et al., 2016). Die überschießende Freisetzung des proinflammatorischen Zytokins IL-1 β kann zu postoperativen Komplikationen wie SIRS führen. Es ist biologisch sinnvoll, dass die IL-1 β -Freisetzung streng durch einen zweistufigen Prozess kontrolliert wird (Buttenschoen et al., 2010; Dinarello, 2018). In diesem wird zunächst unter anderem die Expression von NLRP3, Caspase-1 und pro-IL-1 β durch Aktivierung des TLR4 erhöht (Banerjee et al., 2022; Swanson et al., 2019). Während einer Operation kommt es zu extensiven Zellschädigungen, wodurch ATP aus den Zellen freigesetzt wird (Bortolotti et al., 2018; Pelegrin, 2021). Das extrazelluläre ATP agiert daraufhin als DAMP, welches durch den P2RX7 detektiert wird (Banerjee et al., 2022; Pelegrin, 2021). Die nachfolgende Signaltransduktion durch den P2RX7

induziert die Assemblierung und Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms, was schließlich in der proteolytischen Spaltung und Freisetzung von IL-1 β resultiert (Banerjee et al., 2022; Pelegrin, 2021).

In der vorliegenden Arbeit wird dieser zweistufige Mechanismus der IL-1 β -Freisetzung, wie auch bereits in Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe, für *in vitro*-Experimente genutzt (Amati et al., 2017; Backhaus et al., 2017; Hecker et al., 2015; Hiller et al., 2018; Richter, Ascì, et al., 2023; Richter et al., 2016, 2018, 2020, 2022; Richter, Herz, et al., 2023; Siebers et al., 2018; Zakrzewicz et al., 2017, 2019). Für die Voraktivierung monozytärer Zellen wurden Vollblutzellen, humane PBMCs sowie monozytäre THP-1-Zellen zunächst mit LPS inkubiert, um den TLR4 zu aktivieren. Hierbei kann bereits die Freisetzung geringer Mengen IL-1 β in die Zellkulturüberstände beobachtet werden (Abbildung 5, Abbildung 14 - 20, Ergänzende Abbildung 2 - 2, Ergänzende Abbildung 13). Dies deckt sich mit Beobachtungen bei monozytären THP-1-Zellen sowie PBMCs in vorherigen Arbeiten unserer Arbeitsgruppe (Amati et al., 2017; Backhaus et al., 2017; Hecker et al., 2015; Hiller et al., 2018; Richter, Ascì, et al., 2023; Richter et al., 2016, 2018, 2020, 2022; Richter, Herz, et al., 2023; Siebers et al., 2018; Zakrzewicz et al., 2017, 2019). Obwohl unter diesen experimentellen Bedingungen kein zweiter Stimulus, der den P2RX7 aktivieren würde, vorliegt, ist diese Beobachtung erwartet. Der isolierte LPS-Stimulus kann über die nicht-kanonische Aktivierung von Caspase-4 oder Caspase-5 die proteolytische Prozessierung von Gasdermin-D und pro-IL-1 β vermitteln (Deets & Vance, 2021; Gaidt et al., 2016; Tran et al., 2019). Dies erklärt somit die beobachtete IL-1 β -Freisetzung nach alleiniger Stimulation der Zellen mit LPS. Eine zusätzliche Begründung findet sich in der für die IL-1 β -Quantifizierung verwendeten Methode. Herkömmliche ELISAs zur Detektion von IL-1 β , wie auch der hier eingesetzte IL-1 β /IL-1F2 DuoSet ELISA (R&D SYSTEMS), detektieren neben IL-1 β in geringem Maße auch das inaktive pro-IL-1 β , sodass hierdurch ebenfalls die geringfügige Erhöhung der in LPS-stimulierten Zellen gemessenen IL-1 β -Freisetzung erklärt werden kann (Herzyk et al., 1992).

Um die Aktivierung des P2RX7 durch die Freisetzung von DAMPs während eines chirurgischen Traumas widerzuspiegeln, wurden die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Zellen nach Voraktivierung durch LPS mit BzATP stimuliert. Bei BzATP handelt es sich um ein synthetisches ATP-Analogon, welches weit verbreitet Anwendung

in Untersuchungen des P2RX7 findet (Pelegrin, 2021). Während für die ATP-induzierte Aktivierung des P2RX7 Konzentrationen im Bereich von 0,1 - 2,5 mM erforderlich sind, reichen im Fall von BzATP deutlich geringere Konzentrationen aus (Pelegrin, 2021; Young et al., 2007). Im Vergleich zu ATP weist BzATP eine circa 30-fach höhere agonistische Potenz gegenüber des P2RX7 auf (Donnelly-Roberts et al., 2009; Surprenant et al., 1996). In vorherigen Arbeiten unserer Arbeitsgruppe wurde bereits gezeigt, dass die Stimulation von Zellen wie monozytären THP-1-Zellen, monozytären U937-Zellen oder PBMCs mit BzATP nach Voraktivierung mit LPS zu einer deutlichen Freisetzung von IL-1 β führt (Amati et al., 2017; Backhaus et al., 2017; Hecker et al., 2015; Hiller et al., 2018; Richter, Asci, et al., 2023; Richter et al., 2016, 2018, 2020, 2022; Richter, Herz, et al., 2023; Siebers et al., 2018; Zakrzewicz et al., 2017, 2019). Auch in dieser Arbeit führt die Stimulation mit LPS voraktivierter Zellen mit BzATP wie erwartet zu einem signifikanten Anstieg der IL-1 β -Freisetzung in die Zellkulturüberstände (Abbildung 5, Abbildung 14 - 20, Ergänzende Abbildung 2 - 2, Ergänzende Abbildung 13). Dies deckt sich außerdem mit weiterer Literatur, in der ebenfalls eine Verstärkung der LPS-induzierten IL-1 β -Freisetzung aus monozytären Zellen durch Stimulation mit ATP beschrieben wird (Ferrari et al., 1996; Tran et al., 2019). Die Signifikanzen wurden nicht in den Abbildungen gekennzeichnet, um eine übersichtlichere Darstellung der für die jeweilige Fragestellung relevanten signifikanten Unterschiede zu ermöglichen.

Aufgrund der hohen Schwankungsbreite der BzATP-induzierten IL-1 β -Freisetzung, nicht nur in humanen primären Blutzellen aufgrund interindividueller Unterschiede (Müller et al., 2024), sondern auch in der monozytären Zelllinie THP-1, werden die im Rahmen dieser Arbeit in den Zellkulturüberständen gemessenen IL-1 β -Konzentrationen für die weitere Auswertung auf die Ergebnisse der mit LPS und BzATP stimulierten Zellen normalisiert. Die Schwankungen wurden auch in früheren Arbeiten unserer Arbeitsgruppe beobachtet und auf dieser Grundlage ebenfalls eine Normalisierung der Daten auf mit LPS und BzATP stimulierte Zellen vorgenommen (Richter, Asci, et al., 2023; Richter et al., 2022; Richter, Herz, et al., 2023). Die Gründe für die hohen Schwankungen der IL-1 β -Freisetzung durch monozytäre THP-1-Zellen sind unklar. Sie traten auf, obwohl in unserem Labor größte Anstrengungen unternommen wurden, die Experimente unter standardisierten Bedingungen durchzuführen.

Durch die Verwendung verschiedener Zelltypen in den in dieser Arbeit beschriebenen Experimenten wird sichergestellt, dass ein möglichst breites Spektrum der zellspezifischen Einflussfaktoren in den Untersuchungen abgedeckt wird, wodurch die Aussagekraft der Ergebnisse massiv erhöht wird. Da das Ziel immer sein sollte, die experimentellen Bedingungen möglichst weit an den *in vivo* Zustand anzunähern, ist die Verwendung primärer Blutzellen ideal. Vollblutzellen bieten dabei eine Möglichkeit, die bereits vielfach zur Untersuchung von NLRP3-Inflammasom-vermittelter IL-1 β -Freisetzung genutzt wird (Thurm & Halsey, 2005; Tran et al., 2019; Yang et al., 2011). Die Verwendung von Vollblutzellen bietet den Vorteil, dass die Vorbereitung der Zellen für die Experimente nur minimalen Aufwand erfordert, was das Risiko einer unerwünschten Voraktivierung der Zellen so gering wie möglich hält und damit den physiologischen Zustand bestmöglich widerspiegelt (Thurm & Halsey, 2005; Tran et al., 2019). Der überwiegende Teil der IL-1 β -Produktion entfällt auf Monozyten und Neutrophile (Netea et al., 2008; Tran et al., 2019).

Im Gegensatz zu Vollblutzellen, die zusätzlich noch Bestandteile wie Granulozyten, Erythrozyten und Thrombozyten enthalten (Müller et al., 2024), finden sich in den aufgereinigten PBMCs fast nur mononukleäre Zellen wie Monozyten, Lymphozyten und dendritische Zellen (Bolen et al., 2011; Grievink et al., 2016). Die dadurch geringere Zelldiversität in PBMCs lässt zwar den Schluss zu, dass Vollblutzellen eine bessere Repräsentation des physiologischen Zustandes bieten (Müller et al., 2024; Tran et al., 2019), allerdings stellt die zusätzliche Untersuchung von aufgereinigten PBMCs in den Experimenten eine gute Ergänzung für die Beantwortung der Fragestellungen dieser Arbeit dar. Durch die Isolierung der mononukleären Zellen aus den Blutproben kann der zweistufige Mechanismus der IL-1 β -Freisetzung zellspezifisch untersucht werden, bedingt durch die Tatsache, dass der P2RX7 vorwiegend auf der Oberfläche mononukleärer Zellen zu finden ist (Al-Shukaili et al., 2008; Ferrari et al., 2006; Pelegrin, 2021). Allerdings kann die Isolierung der PBMCs mittels Dichtegradientenzentrifugation zu einer Voraktivierung oder vermehrter Apoptose der Zellen führen (Grievink et al., 2016; Hodge et al., 2000; Tran et al., 2019), was die Versuchsergebnisse beeinflussen und weiter vom Zustand *in vivo* entfernen kann.

Neben primären Blutzellen wurde in der vorliegenden Arbeit auch die humane monozytäre Zelllinie THP-1 (Tsuchiya et al., 1980) für die Zellkulturexperimente

eingesetzt. THP-1-Zellen werden weithin für die Untersuchung immunologischer Fragestellungen, insbesondere in der Inflammasom-Forschung, eingesetzt (Bockstiegel et al., 2023; Chanput et al., 2014). Einerseits bietet die Verwendung einer Zelllinie gegenüber Primärzellen den Vorteil, dass die Versuchsergebnisse typischerweise eine hohe Reproduzierbarkeit, bedingt durch die genetische Homogenität, aufweisen (Chanput et al., 2014; Joshi et al., 2022). Andererseits sind die in Zelllinien generierten Daten meist nur unter Einschränkungen auf die *in vivo* Situation übertragbar, da wichtige Faktoren wie die Interaktion zwischen verschiedenen Zelltypen nicht berücksichtigt werden (Chanput et al., 2014). Insgesamt bestätigt sich also, dass sich die Verwendung von sowohl primären Zellen wie Vollblutzellen und PBMCs als auch von monozytären THP-1-Zellen in dieser Arbeit gut ergänzt und vermutlich eine hohe Aussagekraft bezüglich der tatsächlichen Situation *in vivo* bietet.

Die Freisetzung von IL-1 β kann neben der zuvor diskutierten proteolytischen Prozessierung auch durch weitere Mechanismen erfolgen – einer dieser Mechanismen ist die Gasdermin-D-vermittelte Pyroptose, die nach Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms auftreten kann (Banerjee et al., 2022; Paik et al., 2021; Swanson et al., 2019). Währenddessen werden intrazelluläre Bestandteile, wie beispielsweise LDH, freigesetzt (Cummings & Schnellmann, 2021; Moran & Schnellmann, 1996). Die Messung der LDH-Aktivität wird weithin zur Quantifizierung des Zelltodes und damit auch zur Beurteilung der Zytotoxizität verwendeter Substanzen eingesetzt (Bockstiegel et al., 2023; Cummings & Schnellmann, 2021; Grievink et al., 2016). Um in den Experimenten der vorliegenden Arbeit sicherzustellen, dass die IL-1 β -Freisetzung hauptsächlich das Resultat der Caspase-1-vermittelten Prozessierung ist, wurde in Zellkulturüberständen von THP-1-Zellen (Abbildung 14 B, Abbildung 15 B, Abbildung 16 B, Abbildung 17 B, Abbildung 19 B, Ergänzende Abbildung 13 B) und PBMCs (Abbildung 18 B, Ergänzende Tabelle 1, Ergänzende Tabelle 2, Ergänzende Tabelle 3) zusätzlich die LDH-Aktivität quantifiziert. Die LDH-Aktivität lag in nahezu allen Versuchsansätzen im Median unter 15 %, woraus sich schlussfolgern lässt, dass die zugegebenen Substanzen ebenso wie die Blutplasmen keinen wesentlichen zytotoxischen Effekt auf die Zellen ausüben und die Effekte auf die BzATP-induzierte IL-1 β -Freisetzung innerhalb der zweistufigen proteolytischen Prozessierung begründet liegen. Die einzige Ausnahme bildet die Zugabe von 1 mM S 24795 zu THP-1-Zellen, was im Median zu einer LDH-Aktivität von 16,7 % im Zellkulturüberstand führte (Ergänzende

Abbildung 13 B). Hier kann daher angenommen werden, dass die hohe Konzentration des $\alpha 7$ -nAChR-Agonisten einen zytotoxischen Effekt auf die THP-1-Zellen hat und die Freisetzung von IL-1 β nicht ausschließlich durch die zweistufige proteolytische Prozessierung erfolgt. Da diese Konzentration von S 24795 lediglich Bestandteil der Dosis-Wirkungskurve ist und in weiteren Experimenten nicht eingesetzt wurde, ist dies für die Ergebnisse dieser Arbeit nicht weiter relevant.

4.3.2 ANTIINFLAMMATORISCHE EFFEKTE VON BLUTPLASMEN UND DER EINFLUSS CHIRURGISCHER TRAUMATA

Die an drei perioperativen Zeitpunkten (präoperativ, postoperativer Tag zwei und postoperativer Tag fünf) isolierten Blutplasmen der in der vorliegenden Arbeit untersuchten Patientenkohorte zeigen einen dosisabhängigen inhibitorischen Effekt auf die BzATP-induzierte IL-1 β -Freisetzung aus autologen Blutzellen und monozytären THP-1-Zellen (Abbildung 5, Ergänzende Abbildung 2, Ergänzende Abbildung 3). Dies deckt sich mit Erkenntnissen einer früheren Arbeit, in der Pott et al. zeigten, dass sich die Zytokin-Freisetzung aus humanen Vollblutzellen durch Verdünnung mit Zellkulturmedium erhöht, während die Verdünnung mit autologen Blutplasmen keinen Einfluss hat, wodurch die Schlussfolgerung getroffen wurde, dass im Blutplasma enthaltene Faktoren einen inhibitorischen Effekt auf die Freisetzung von Zytokinen haben (Pott et al., 2009). Humanes Blutplasma besteht zu etwa 92 % aus Wasser, ergänzt unter anderem mit anorganischen Salzen und einer Vielzahl von Proteinen (Benjamin & McLaughlin, 2012; Mathew et al., 2024). Den Hauptanteil der Plasmaproteine bilden Albumin sowie Immunglobuline, die zusammen circa 80 % der Gesamtproteine im humanen Blutplasma ausmachen (Benjamin & McLaughlin, 2012; Burnouf, 2007). Weitere im Plasma enthaltene Proteine umfassen beispielsweise Koagulationsfaktoren, Proteaseinhibitoren wie alpha-1-Antitrypsin (AAT) oder *secretory leukocyte protease inhibitor* (SLPI) sowie weitere Akute-Phase-Proteine wie CRP und SAP (Burnouf, 2007; Gabay & Kushner, 1999; Klimenkova et al., 2014). Somit kommt für die Vermittlung des beobachteten inhibitorischen Effektes der Blutplasmen auf die BzATP-induzierte IL-1 β -Freisetzung eine Vielzahl verschiedener Faktoren in Frage.

In vorherigen Arbeiten unserer Arbeitsgruppe wurde bereits die Wirkung von AAT im Rahmen steriler Inflammation untersucht (Agné et al., 2021; Siebers et al., 2018). Hierbei konnte gezeigt werden, dass AAT die BzATP-induzierte Freisetzung von IL-1 β unter

anderem aus monozytären U937-Zellen mit einer physiologisch relevanten IC_{50} von 0,2 mg/ml inhibiert (Agné et al., 2021; Siebers et al., 2018). Des Weiteren konnte ein antiinflammatorischer Effekt des Serinprotease-Inhibitors SLPI durch Inhibition der BzATP-induzierten IL-1 β -Freisetzung aus monozytären U937-Zellen, humanen sowie murinen PBMCs gezeigt werden (Zakrzewicz et al., 2019). Die inhibitorische Aktivität wird in den genannten Fällen über einen cholinergen Mechanismus auf Proteinebene vermittelt, welcher durch Aktivierung von nAChR-Untereinheiten die BzATP-induzierte Signaltransduktion des P2RX7 verhindert, sodass in der Folge die IL-1 β -Freisetzung inhibiert wird (Hecker et al., 2015; Richter & Grau, 2023). Für SLPI wurde darüber hinaus in der Literatur beschrieben, dass der Proteaseinhibitor unter anderem die Aktivierung von NF- κ B in Monozyten und darüber die Synthese von Zytokinen, wie die Bildung von pro-IL-1 β , inhibieren kann (Ding et al., 1999; Klimenkova et al., 2014). Außerdem konnte für AAT gezeigt werden, dass die antiinflammatorische Wirkung von Blutplasmen in Bezug auf die Freisetzung von Zytokinen bei Plasmen AAT-defizienter Patienten signifikant geringer ist (Pott et al., 2009). Diese beiden Beobachtungen zeigen allerdings antiinflammatorische Effekt auf der Ebene der Genexpression, während in der vorliegenden Arbeit akute Effekte auf Proteinebene betrachtet wurden. Dennoch zeigen sich hiermit beispielhaft bereits zwei Plasmaproteine, die möglicherweise zu der beobachteten inhibitorischen Wirkung der Blutplasmen im Rahmen BzATP-induzierter IL-1 β -Freisetzung beitragen könnten.

CRP, ein weiteres wichtiges Akute-Phase-Protein im humanen Blutplasma, ist vor allem für den Einsatz als Biomarker im Rahmen inflammatorischer Prozesse bekannt (Olson et al., 2023). Neben den mit CRP assoziierten proinflammatorischen Prozessen sammelten sich im Laufe der Zeit zunehmend Erkenntnisse über zusätzliche antiinflammatorische Funktionen des Proteins an (Olson et al., 2023; Rizo-Téllez et al., 2023). Neben der Vermittlung vermehrter Phagozytose und der Verringerung der Adhäsion von Neutrophilen ist insbesondere die Induktion antiinflammatorischer Zytokine wie IL-1RA und IL-10 relevant (Del Giudice & Gangestad, 2018; Olson et al., 2023; Rizo-Téllez et al., 2023). Auch unsere Arbeitsgruppe konnte in vorherigen Arbeiten eine antiinflammatorische Rolle von CRP im Rahmen steriler Inflammation zeigen: nCRP sowie Komplexe aus rCRP mit PC vermitteln über die Aktivierung von nAChRs eine Inhibition der BzATP-induzierten IL-1 β -Freisetzung aus monozytären U937-Zellen sowie aus humanen PBMCs (Richter et al., 2018). Sowohl die gezeigte direkte Inhibition

der IL-1 β -Freisetzung durch CRP (Richter et al., 2018) als auch die CRP-vermittelte Induktion von IL-1RA und IL-10 (Del Giudice & Gangestad, 2018), welche die Freisetzung und Aktivität von beispielsweise IL-1 β inhibieren können (Harvanová et al., 2023; Riera Romo et al., 2016), bieten eine Grundlage für die Vermutung, dass auch CRP als relevanter Faktor bei der Vermittlung des inhibitorischen Effektes der Blutplasmen auf die BzATP-induzierte IL-1 β -Freisetzung denkbar ist. Man muss jedoch erneut bedenken, dass ein Großteil der in der Literatur beschriebenen Effekte auf einer Regulation der Genexpression beruhen, während in der vorliegenden Arbeit der Fokus auf der Proteinebene liegt.

Durch ein schweres chirurgisches Trauma wird eine Vielzahl verschiedener Prozesse im Körper induziert, was einerseits die Heilung beschleunigen und Infektionen verhindern soll, aber andererseits bei überschießenden Reaktionen zu schweren Komplikationen führen kann (Bortolotti et al., 2018; Stoecklein et al., 2012). Während des postoperativen Verlaufes können sich starke Änderungen in verschiedenen Proteinkonzentrationen im Blutplasma, insbesondere bei Akute-Phase-Proteinen, wie bereits in Abschnitt 4.2 für CRP beschrieben, ergeben (Bortolotti et al., 2018; Mantovani & Garlanda, 2023; Pepys & Hirschfield, 2003). Da CRP ein für die Vermittlung der antiinflammatorischen Kapazität der Blutplasmen relevanter Faktor sein könnte, ist ein Einfluss chirurgischer Traumata auf die antiinflammatorischen Effekte der Blutplasmen zu erwarten. In der vorliegenden Arbeit wurde folglich der inhibitorische Effekt der Blutplasmen auf die BzATP-induzierte IL-1 β -Freisetzung zwischen prä- und postoperativen Zeitpunkten verglichen (Abbildung 6, Ergänzende Abbildung 4, Ergänzende Abbildung 5, Ergänzende Abbildung 6). Entgegen der Ausgangsüberlegung scheint die antiinflammatorische Kapazität der Blutplasmen nicht wesentlich durch chirurgische Traumata beeinflusst zu werden. Vereinzelt wird jedoch die inhibitorische Wirksamkeit in postoperativen Plasmen signifikant im Vergleich zu präoperativen Blutplasmen reduziert (Abbildung 6 C, Abbildung 6 D, Ergänzende Abbildung 6 C, Ergänzende Abbildung 6 D). Diese Beobachtung steht ebenfalls im Widerspruch zur Ursprungshypothese. Auf Grundlage der früheren Daten zur antiinflammatorischen Wirkung von CRP im Rahmen steriler Inflammation (Richter et al., 2018) wäre durch den Trauma-induzierten Anstieg der CRP-Konzentration eine Verstärkung der inhibitorischen Wirkung der Blutplasmen zu erwarten gewesen. Die unerwarteten Ergebnisse sprechen dafür, dass die für die Inhibition der IL-1 β -Freisetzung verantwortliche Komponente in Blutplasmen nicht zu

den Akute-Phase-Proteinen gehört, da durch die starken Änderungen der Plasmakonzentrationen eine deutliche Veränderung des inhibitorischen Effektes zu erwarten wäre. Andererseits kann eine potentielle Rolle von Akute-Phase-Proteinen möglicherweise durch andere Faktoren verändert und überlagert werden. Ein Aspekt ist dabei die Trauma-induzierte Veränderung der Glykosylierung von Plasmaproteinen (Gudelj et al., 2016), unter anderem auch von CRP (Gornik & Lauc, 2009), wodurch beispielsweise das Bindungsverhalten gegenüber verschiedener Liganden und damit auch die vermittelten Effekte beeinflusst werden könnten. Eine andere Erklärung könnte in der Zusammensetzung des Blutplasmas liegen. Es ist denkbar, dass der Effekt von Akute-Phase-Proteinen wie CRP durch andere Plasmabestandteile überlagert wird.

4.4 RELEVANZ VON CRP BEI DER INHIBITION DER IL-1 β -FREISETZUNG DURCH PATIENTENPLASMEN

4.4.1 AUSWIRKUNG DER DEPLETION VON CRP AUS BLUTPLASMEN

Um den für die Inhibition der BzATP-induzierten IL-1 β -Freisetzung ursächlichen Faktor im Blutplasma näher einzugrenzen, wurde der Fokus in der vorliegenden Arbeit auf CRP gelegt. Zur näheren Untersuchung der Rolle von CRP wurde eine Depletion von eCRP aus den postoperativen Blutplasmen der Patientenkohorte mittels Immunpräzipitation vorgenommen. Die Depletion wurde mittels Western Blot überprüft (Abbildung 9). CRP zeigt sich dabei wie erwartet mit einem ungefähren Molekulargewicht von 23 kDa (Taylor & van den Berg, 2007). Da im für die Immunpräzipitation eingesetzten Blutplasma CRP nachgewiesen werden kann, während nach Immunpräzipitation mit anti-CRP-Antikörpern kein CRP detektierbar ist (Abbildung 9 A), kann davon ausgegangen werden, dass durch die Immunpräzipitation CRP effizient aus den Patientenplasmen depletiert wird. Dies wird durch die Detektion von CRP im Präzipitat bestätigt (Abbildung 9 A). Da bei parallel erfolgter Immunpräzipitation mit IgG1-Isotyp-Kontrollantikörpern kein CRP im Präzipitat nachgewiesen werden kann (Abbildung 9 A), kann die angenommene Spezifität der Interaktion zwischen anti-CRP-Antikörpern und CRP bestätigt werden.

Es zeigen sich im Western Blot zusätzliche Banden, die sowohl im Präzipitat nach Immunpräzipitation mit anti-CRP-Antikörpern als auch nach Immunpräzipitation mit IgG1-Isotyp-Kontrollantikörpern detektiert werden können (Abbildung 9). Sowohl die

für die Immunpräzipitation verwendeten Antikörper als auch die im Western Blot eingesetzten Primärantikörper stammen alle aus der Wirtsspezies Maus (Tabelle 4). Die für den Western Blot verwendeten Sekundärantikörper reagieren laut Hersteller-Datenblatt (#P0260, DAKO DENMARK) mit allen Maus-IgG-Unterklassen. Daher kann davon ausgegangen werden, dass es sich bei den im Western Blot detektierten unspezifischen Proteinbanden um die schwere sowie die leichte Kette von IgG handelt. Die beobachteten Molekulargewichte von circa 25 und 50 kDa decken sich dabei mit in der Literatur beschriebenen Werten bei Analyse von IgG mittels SDS-PAGE, bei der die schwere Kette von IgG als Proteinbande mit circa 50 kDa und die leichte Kette mit circa 25 kDa detektiert wird (Kirley & Norman, 2018). Die geringen Abweichungen der Molekulargewichte der IgG-Banden zwischen den Präzipitaten nach Immunpräzipitation mit anti-CRP-Antikörpern und Immunpräzipitation mit IgG1-Isotyp-Kontrollantikörpern liegen in den verwendeten Antikörpern begründet. Es kann davon ausgegangen werden, dass verschiedene monoklonale Antikörper ein individuell leicht unterschiedliches Wanderungsverhalten in der SDS-PAGE zeigen (Lu et al., 2013).

In IL-1 β -Freisetzungsexperimenten mit Vollblutzellen und monozytären THP-1-Zellen zeigen die CRP-depletierten Blutplasmen der postoperativen Tage zwei und fünf keinen wesentlichen Unterschied in der inhibitorischen Wirkung im Vergleich zu Plasmen mit CRP (Abbildung 10, Ergänzende Abbildung 10, Ergänzende Abbildung 11, Ergänzende Abbildung 12). Vereinzelt treten allerdings statistisch signifikante Unterschiede auf – bei Zugabe von Plasmen des postoperativen Tages fünf in einer Verdünnung von 1:20 zu Vollblutzellen führt die Zugabe der CRP-depletierten Plasmen zu einer signifikant höheren Freisetzung von IL-1 β im Vergleich zur Zugabe der entsprechenden CRP-enthaltenden Blutplasmen (Abbildung 10 B). In THP-1-Zellen zeigt sich ein weiterer statistisch signifikanter Unterschied bei Zugabe von 1:640 verdünnten Plasmen des postoperativen Tages fünf. Hierbei wird unter dem Einfluss von CRP-depletierten Plasmen weniger IL-1 β freigesetzt als bei Plasmen mit CRP (Ergänzende Abbildung 10 C). Da die BzATP-induzierte IL-1 β -Freisetzung bei Letzterem allerdings über der Freisetzung aus Zellen ohne zugegebenes Blutplasma liegt, ist fraglich, ob es sich bei dieser Beobachtung um einen relevanten Effekt handelt. Darüber hinaus sind die statistisch signifikanten Unterschiede vermutlich wenig relevant, da die signifikanten Effekte jeweils nur in einem Zelltyp beobachtet werden können.

Die größtenteils fehlenden Unterschiede der inhibitorischen Effekte von CRP-depletierten Plasmen und Blutplasmen mit CRP stehen im Gegensatz zu der ursprünglichen Annahme, dass CRP der entscheidende Faktor der antiinflammatorischen Kapazität von Blutplasmen ist. Wie bereits in Abschnitt 4.3.2 beschrieben, enthält humanes Blutplasma eine Vielzahl verschiedener Komponenten, die potentiell die Inhibition der ATP-induzierten IL-1 β -Freisetzung vermitteln könnten. Daher ist einerseits denkbar, dass es sich bei CRP entgegen der Ursprungshypothese nicht um die dominierende inhibitorische Komponente im Blutplasma handelt. Dieser Annahme stehen allerdings die Ergebnisse vorheriger Arbeiten unserer Arbeitsgruppe entgegen, in denen zum einen *in vitro* eine inhibitorische Wirkung von Komplexen aus rCRP mit PC sowie von nCRP gezeigt wurde (Richter et al., 2018). Zum anderen kann man einen Widerspruch zu klinischen Studien sehen, in denen eine negative Korrelation zwischen CRP-Plasmakonzentrationen und der IL-1 β -Konzentration im Plasma des Folgetages (Richter et al., 2018) sowie eine negative Korrelation zwischen präoperativer CRP-Plasmakonzentration und dem Auftreten von postoperativem Fieber (Meyer et al., 2020) gezeigt wurden. Die genannten klinischen negativen Korrelationen zwischen CRP und Entzündungszeichen müssen jedoch nicht kausal sein.

Der wider Erwarten fehlende Effekt der CRP-Depletion auf die inhibitorische Kapazität der Blutplasmen kann möglicherweise dadurch begründet werden, dass andere Komponenten im Blutplasma eine stärkere Inhibition vermitteln und dadurch die antiinflammatorische Wirkung des CRP überlagert wird. Um diese Hypothese zu überprüfen, sind weitere Arbeiten notwendig, in denen entweder durch Fraktionierung der Blutplasmen eine Eingrenzung der stärker inhibitorisch wirksamen Komponente erfolgen oder der Effekt der Depletion einzelner Proteine mittels Immunpräzipitation untersucht werden könnte. Wie bereits in Abschnitt 4.3.2 dargestellt, sind mögliche Ansatzpunkte hierbei unter anderem Proteine wie AAT oder SLPI. Weiterhin muss beachtet werden, dass die antiinflammatorische Kapazität von CRP von der Interaktion mit geeigneten Liganden abhängt. Da bereits gezeigt werden konnte, dass sich die inhibitorische Wirksamkeit von PC (halbmaximale inhibitorische Konzentration (IC₅₀) ~ 10 μ M, Hecker et al., 2015) durch Bindung an rCRP um ein Vielfaches erhöht und andererseits inaktives rCRP dadurch einen inhibitorischen Effekt auf die BzATP-induzierte IL-1 β -Freisetzung vermitteln kann (Richter et al., 2018), ist es denkbar, dass im Patientenplasma zu wenig geeignete Liganden vorhanden sind. Dies könnte in der

veränderten Ernährungssituation im postoperativen Zustand begründet liegen, welche im Vergleich zur Vollkost in geringeren Plasmakonzentrationen geeigneter Liganden resultieren könnte.

4.4.2 EINFLUSS DER ZUGABE DES CRP-LIGANDEN PC

Die folgenden Experimente basieren auf der Annahme, dass eine Zugabe von PC zu den Patientenplasmen zu einer Beladung potentiell freier PC-Bindungsstellen am CRP führt und damit eine Aktivierung der antiinflammatorischen Aktivität von CRP erfolgt. Es wurden Teile der prä- und postoperativen Blutplasmen mit 1 μM PC angereichert und der Effekt auf die BzATP-induzierte IL-1 β -Freisetzung aus Vollblutzellen sowie aus PBMCs analysiert (Abbildung 8, Ergänzende Abbildung 7, Ergänzende Abbildung 8, Ergänzende Abbildung 9). Die verwendete PC-Konzentration von 1 μM liegt im Bereich physiologisch im Blutplasma vorkommender Konzentrationen, die typischerweise bei circa 2 μM liegen (Ilcol et al., 2005; Richter et al., 2018). Über die verschiedenen Plasmaverdünnungen hinweg zeigen sich nur vereinzelt signifikante Unterschiede zwischen der IL-1 β -Freisetzung nach Zugabe von prä- oder postoperativen Blutplasmen und mit PC versetzten Plasmen. Auf Grundlage der bereits genannten früheren Arbeiten unserer Arbeitsgruppe zur inhibitorischen Wirkung von rCRP-PC-Komplexen auf die BzATP-induzierte IL-1 β -Freisetzung (Richter et al., 2018) wäre in der vorliegenden Arbeit eine Erhöhung der antiinflammatorischen Kapazität von eCRP durch zusätzliche Beladung mit PC zu erwarten gewesen. Im Gegensatz dazu zeigt sich bei allen statistisch signifikanten Unterschieden eine geringere BzATP-induzierte IL-1 β -Freisetzung bei Zugabe der Patientenplasmen im Vergleich zur Zugabe der mit PC angereicherten Plasmen (Abbildung 8 A, B, D, Ergänzende Abbildung 8 A). Die Relevanz der beobachteten signifikanten Unterschiede ist fraglich, da diese nur vereinzelt und nicht reproduzierbar in sowohl Vollblutzellen als auch PBMCs auftreten.

Basierend auf den Ergebnissen sind zwei mögliche Schlussfolgerungen naheliegend. Einerseits können die Beobachtungen einen weiteren Hinweis darauf liefern, dass es sich bei CRP nicht um einen entscheidenden Faktor bei der Vermittlung der inhibitorischen Wirkung von Blutplasmen auf die BzATP-induzierte IL-1 β -Freisetzung handelt. Andererseits besteht die Möglichkeit, dass in den Patientenplasmen andere Liganden an eCRP gebunden sind, welche die Beladung von CRP mit PC und darüber eine Verstärkung der antiinflammatorischen Kapazität blockieren. Über die Beladung von CRP mit

Liganden *in vivo* gibt es allerdings bislang keine Studien, weshalb im weiteren Verlauf der vorliegenden Arbeit eine Identifizierung der mit zirkulierendem CRP chirurgischer Patienten interagierenden Liganden vorgenommen wurde.

4.5 CHARAKTERISTIKA ENDOGENER CRP-LIGANDEN-KOMPLEXE NACH CHIRURGISCHEM TRAUMA

4.5.1 KONFORMATION VON ENDOGENEM CRP IN PATIENTENPLASMEN

Humanes CRP kann neben der pentameren Form auch als Monomer oder als teilweise dissoziiertes Pentamer vorliegen (Eisenhardt et al., 2009; Zeller et al., 2022). Die native pentamere Form ist die überwiegend hepatisch freigesetzte gut lösliche Form, die im Plasma zirkuliert (Olson et al., 2023). Durch lokale Bindung an Membranoberflächen in inflammatorischen oder geschädigten Bereichen kommt es zur irreversiblen Dissoziation, bis schließlich das schlecht lösliche mCRP vorliegt (Olson et al., 2023; Zeller et al., 2022). Da sich die durch CRP vermittelten Effekte je nach vorliegender Form unterscheiden können (Olson et al., 2023; Rizo-Téllez et al., 2023) und dies möglicherweise eine Erklärung für den wider Erwarten fehlenden Einfluss von CRP auf die antiinflammatorische Kapazität der Blutplasmen liefern könnte, wurde in der vorliegenden Arbeit die Konformation des eCRP aus Blutplasmen näher untersucht.

Über eine Affinitätsreinigung an PC-Agarose-Beads wurde eCRP aus Blutplasmen der Patientenkohorte aufgereinigt und die Methode zunächst mittels SDS-PAGE und nachfolgendem Western Blot kontrolliert (Abbildung 12). Hierbei zeigt sich, dass vor der Affinitätsreinigung CRP im Blutplasma nachgewiesen werden kann, während im Plasma nach Affinitätsreinigung kein CRP vorhanden ist. Durch die Affinitätsreinigung scheint CRP ähnlich wie bei der zuvor diskutierten Immunpräzipitation effektiv aus den Blutplasmen aufgereinigt zu werden. Dies wird dadurch bestätigt, dass in der Abwesenheit von Ca^{2+} und der Anwesenheit von EDTA, wodurch die Ca^{2+} -abhängige Bindung von CRP an PC unterbunden wird, CRP von den PC-Agarose-Beads eluiert wird. Der Nachweis von CRP war dabei erst ab der zweiten Eluat-Fraktion möglich, was möglicherweise darin begründet liegt, dass bei der ersten Zugabe des Elutionspuffers noch Reste der Ca^{2+} -haltigen *bath solution* vorliegen können, sodass die Bindung von CRP an PC zu diesem Zeitpunkt noch nicht aufgehoben wird. Für die Verwendung des aufgereinigten eCRP in weiteren Experimenten wurde nach Elution ein Pufferaustausch

mittels Ultrafiltration durchgeführt. Auch hiernach ist CRP nachweisbar, sodass sichergestellt ist, dass das Protein nicht während der Filtration verloren geht. Die Vollständigkeit der Elution von CRP wird dadurch bestätigt, dass nach Elution kein CRP an den PC-Agarose-Beads nachgewiesen werden kann.

Um die Konformation des aus den Patientenplasmen aufgereinigten eCRP zu analysieren, wurde eine BN-PAGE mit anschließendem Western Blot durchgeführt (Abbildung 13). Die BN-PAGE wurde zum ersten Mal 1991 durch Schägger und von Jagow beschrieben und verwendet nicht-denaturierende Bedingungen unter Nutzung des Farbstoffes Coomassie Brilliantblau G-250, welches an die Proteine bindet und durch seine negative Ladung somit die elektrophoretische Auftrennung nach dem Molekulargewicht unabhängig von der eigenen Ladung der Proteine ermöglicht (Schägger & von Jagow, 1991; Swamy et al., 2006). In der vorliegenden Arbeit kann in den Blutplasmen sowie in den Eluaten der Affinitätsreinigung CRP mit dem gleichen Wanderungsverhalten wie nCRP (MERCK MILLIPORE) nachgewiesen werden. Somit kann man davon ausgehen, dass das in den Patientenplasmen vorliegende eCRP dieselbe pentamere Struktur aufweist wie nCRP.

Dieser Annahme steht jedoch entgegen, dass die Proteinbanden ein Molekulargewicht von circa 300 kDa aufweisen, was nicht mit dem erwarteten Molekulargewicht der pentameren Form von circa 115 kDa (Pepys & Hirschfield, 2003; Taylor & van den Berg, 2007) übereinstimmt. Grundsätzlich ist die BN-PAGE im Gegensatz zu anderen nativen Elektrophorese-Methoden zur Größenbestimmung von Proteinen geeignet, da die elektrophoretische Auftrennung hierbei unabhängig vom isoelektrischen Punkt erfolgt (Schägger et al., 1994; Swamy et al., 2006). Dennoch wurde bereits vielfach beschrieben, dass die unter nativen Elektrophorese-Bedingungen erhaltenen Molekulargewichte zum Teil immens von den tatsächlichen Werten abweichen können (Schägger et al., 1994; Swamy et al., 2006; Wittig et al., 2006). Auch für die Detektion von CRP wurden solche Abweichungen bereits beschrieben (Taylor & van den Berg, 2007).

Für eine bessere Eingrenzung der vorliegenden CRP-Konformation wurde nCRP, wie in anderen Arbeiten beschrieben, durch Inkubation mit Harnstoff und EDTA in die monomeren Untereinheiten dissoziiert (Braig et al., 2017; Potempa et al., 1987) und das resultierende mCRP als zusätzliche Kontrolle in der BN-PAGE eingesetzt. Taylor und van den Berg zeigten, dass mCRP unter nativen Bedingungen nicht detektiert werden

kann, was möglicherweise auf die schlechte Löslichkeit der monomeren Form zurückzuführen ist (Taylor & van den Berg, 2007). Diese Problematik wurde in früheren Studien durch die Zugabe von geringen Mengen SDS während der BN-PAGE behoben, wodurch die Detektion von sowohl pCRP als auch mCRP ermöglicht wird, aber die pentamere Form im Gegensatz zur klassischen SDS-PAGE dennoch erhalten wird (Braig et al., 2017; Rzychon et al., 2010; Taylor & van den Berg, 2007). Auf Grundlage dieser beschriebenen Beobachtungen wurde in der vorliegenden Arbeit kurz vor der BN-PAGE 0,001 % SDS zu den Proben gegeben, um sowohl pCRP als auch mCRP detektieren zu können. Zusätzlich wurde, wie von Braig et al. beschrieben, das Gel kurz vor dem Transfer in DTT und SDS aufgekocht, um einen gleichmäßigen Transfer der Proteine auf die Blottingmembran und eine Detektion aller CRP-Konformationen durch die verwendeten anti-CRP-Antikörper zu ermöglichen (Braig et al., 2017). Dennoch war eine Visualisierung der mCRP-Proteinbande nur vereinzelt möglich (Abbildung 13 B). Die detektierte Proteinbande erscheint vertikal verschmiert mit einem ungefähren Molekulargewicht zwischen 40 und 60 kDa. Dies stimmt ebenfalls nicht mit dem erwarteten Molekulargewicht von 23 kDa überein, deckt sich aber mit in der Literatur beschriebenen Werten, bei denen mCRP mit circa 50 kDa in der BN-PAGE detektiert werden konnte (Rzychon et al., 2010; Taylor & van den Berg, 2007). Auch wenn das ungefähre Molekulargewicht von nCRP und eCRP nicht mit dem erwarteten Molekulargewicht der pentameren Form übereinstimmt, kann auf Grundlage der erhaltenen Ergebnisse dennoch davon ausgegangen werden, dass es sich bei eCRP zumindest nicht um die für ihre vermehrt proinflammatorischen Effekte bekannte monomere Form handelt. Bei der im Blutplasma detektierten Form des eCRP handelt es sich entweder um Pentamere und das abweichende Molekulargewicht ergibt sich auf Grundlage methodischer Ungenauigkeiten im Rahmen der BN-PAGE, oder es kommt im Blutplasma zur Bildung von Multimer-Komplexen. So konnte beispielsweise bereits die Bildung von CRP-Dekameren gezeigt werden, die in einem NaCl-abhängigen Gleichgewicht mit der pentameren Form vorliegen (Okemefuna et al., 2009; Rizo-Télez et al., 2023).

Der Nachweis, dass es sich bei eCRP in den Patientenplasmen der analysierten Patientenkohorte nicht um mCRP handelt, deckt sich mit den Erwartungen. Aufgrund der schlechten Löslichkeit von mCRP wird die monomere Form bei inflammatorischen Prozessen eher lokal an den geschädigten Stellen erwartet als zirkulierend im Blutplasma.

Dennoch konnte mCRP mittels ELISA bereits in geringen Konzentrationen in Serumproben nachgewiesen werden (J. Wang et al., 2015; Zhang et al., 2018). Außerdem wäre eine Dissoziation des eCRP im Rahmen der Probengewinnung und -aufbereitung denkbar gewesen. Insgesamt zeigt die Analyse der eCRP-Konformation, dass der wider Erwarten fehlende Einfluss von CRP auf die antiinflammatorische Kapazität der Blutplasmen in der vorliegenden Arbeit nicht mit dem Vorliegen von eCRP in einer vermehrt proinflammatorisch wirksamen monomeren Form assoziiert ist.

Die Analyse der Effekte von pentameren und monomeren CRP-Formen im Rahmen steriler Inflammation zeigt, dass weder nCRP noch mCRP statistisch signifikante Effekte auf die BzATP-induzierte IL-1 β -Freisetzung aus monozytären THP-1-Zellen vermitteln (Abbildung 14 A). Nachdem in Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe gezeigt werden konnte, dass nCRP die BzATP-induzierte IL-1 β -Freisetzung aus U937-Zellen und aus PBMCs inhibiert (Richter et al., 2018), war ein ähnlicher Effekt auch in monozytären THP-1-Zellen zu erwarten. Die abweichenden Beobachtungen könnten einerseits durch Unterschiede zwischen den verwendeten Zelltypen erklärt werden. So befinden sich U937-Zellen durch ihren Ursprung aus einem histiozytären Lymphom in einer reiferen Zellform als THP-1-Zellen, welche aus dem peripheren Blut eines Patienten mit akuter monozytärer Leukämie stammen (Chanput et al., 2014, 2015; Nascimento et al., 2022; Sundström & Nilsson, 1976; Tsuchiya et al., 1980). Diese Vermutung wird allerdings durch eine weitere Studie unserer Arbeitsgruppe widerlegt, in der ein inhibitorischer Effekt von nCRP auch auf die BzATP-induzierte IL-1 β -Freisetzung aus monozytären THP-1-Zellen gezeigt werden konnte (Richter, Asci, et al., 2023).

Eine weitere mögliche Erklärung für den in der vorliegenden Arbeit fehlenden inhibitorischen Effekt von nCRP könnte andererseits in der Herkunft und Zusammensetzung des verwendeten nCRP liegen. nCRP (MERCK MILLIPORE) wird aus humaner Pleuraflüssigkeit isoliert, allerdings konnte nicht in Erfahrung gebracht werden, welche Methode für die Isolierung zum Einsatz kommt. Es ist daher zum einen denkbar, dass die Wirksamkeit von nCRP im Vergleich zu früheren Studien durch Änderungen im Herstellungsprozess verändert ist. Zum anderen könnten sich möglicherweise Unterschiede durch die Herkunft der Pleuraflüssigkeit aus verschiedenen Patienten ergeben. Hierbei könnten die durch nCRP vermittelten Effekte durch die Bindung verschiedener Liganden verändert werden. Um diese möglichen Einflüsse aus den

Beobachtungen zu eliminieren, sind weitere Experimente erforderlich, in denen beispielsweise frisch isoliertes CRP eingesetzt wird oder zunächst eine Charakterisierung der Eigenschaften des verwendeten CRP, wie beispielsweise gebundener Liganden, vorgenommen wird.

Zusätzlich ist die Beobachtung, dass mCRP keinen Einfluss auf die BzATP-induzierte IL-1 β -Freisetzung hat, unerwartet (Abbildung 14 A). In der Vergangenheit wurde der monomeren Form von CRP eine Vielzahl proinflammatorischer Effekte zugeschrieben. In Endothelzellen und monozytären THP-1-Zellen führt die Stimulation mit mCRP unter anderem zu einer erhöhten Expression des *monocyte chemoattractant protein-1* (MCP-1) (Han et al., 2004; Sproston & Ashworth, 2018; Yeh & Willerson, 2003). Darüber hinaus konnte eine Induktion der Freisetzung proinflammatorischer Zytokine wie IL-6, IL-1 β und TNF- α aus Monozyten und IL-8 aus Neutrophilen gezeigt werden (Ballou & Lozanski, 1992; Khreiss et al., 2005; Olson et al., 2023; Sproston & Ashworth, 2018). Auf Grundlage dieser Erkenntnisse wäre eine Verstärkung der BzATP-induzierten IL-1 β -Freisetzung aus monozytären THP-1-Zellen durch mCRP naheliegend gewesen. Die unerwarteten Beobachtungen könnten einerseits durch den Herstellungsprozess von mCRP erklärt werden. Hierbei könnte eine unvollständige Dissoziation des CRP stattgefunden haben. Dem steht allerdings entgegen, dass mCRP in der BN-PAGE mit zu den Literaturwerten identischem ungefährem Molekulargewicht detektiert werden kann. Zudem wurde die Proteinkonzentration nach Dissoziation und Ultrafiltration durch einen BCA-Test überprüft und somit sichergestellt, dass insbesondere während der Ultrafiltration kein Proteinverlust auftritt und die korrekte Proteinkonzentration in den Experimenten eingesetzt wird. Andererseits ist fraglich, ob mCRP in den IL-1 β -Freisetzungsexperimenten der vorliegenden Arbeit aufgrund der schlechten Löslichkeit wirksam ist. In früheren Studien wurden beispielsweise deutlich längere Inkubationszeiten verwendet, bei denen nach heutigen Erkenntnissen davon ausgegangen werden kann, dass CRP erst in Kultur dissoziiert ist und darüber proinflammatorische Effekte über die Induktion der Expression von Zytokin-Genen vermittelt hat (Ballou & Lozanski, 1992; Han et al., 2004; Sproston & Ashworth, 2018). Die Zugabe von bereits dissoziiertem mCRP für eine kurze Zeitspanne (40 Minuten) zu den monozytären THP-1-Zellen könnte daher unzureichend für eine effektive Stimulation der Monozyten sein.

Als Positivkontrollen, die zu einer Abschwächung der BzATP-vermittelten Ausschüttung von IL-1 β führen, wurden S 24795 sowie PC eingesetzt. Bei S 24795 handelt es sich um einen synthetischen partiellen $\alpha 7$ -nAChR-Agonisten (Cecon et al., 2019), der über die Aktivierung der $\alpha 7$ -nAChR-Untereinheit die ionotrope Funktion des P2RX7 inhibieren und folglich die IL-1 β -Freisetzung reduzieren sollte. Entsprechend zeigt sich bei Zugabe von 100 μ M S 24795 eine statistisch signifikante Inhibition der BzATP-induzierten IL-1 β -Freisetzung aus monozytären THP-1-Zellen (Abbildung 14 A). Auch für PC kann wie erwartet eine dosisabhängige Inhibition der BzATP-induzierten IL-1 β -Freisetzung aus monozytären THP-1-Zellen beobachtet werden (Abbildung 14 A). Die statistisch signifikante Inhibition der IL-1 β -Freisetzung aus monozytären THP-1-Zellen bei Zugabe von 200 μ M PC wurde bereits in früheren Studien unserer Arbeitsgruppe gezeigt (Richter, Ascì, et al., 2023; Richter et al., 2022; Richter, Herz, et al., 2023). Während eine Konzentration von 10 μ M freiem PC keinen statistisch signifikanten Effekt hat, resultiert die Vorinkubation von 10 μ M PC mit 10 μ g/ml mCRP in einer statistisch signifikanten Reduktion der BzATP-induzierten IL-1 β -Freisetzung aus monozytären THP-1-Zellen. Es ist bekannt, dass in die monomeren Untereinheiten dissoziiertes CRP nach wie vor Ca²⁺-abhängig PC binden kann (Singh et al., 2009; Williams et al., 2020). Da sich der beobachtete inhibitorische Effekt jedoch nicht signifikant von freiem PC ($p = 0,116$) oder von freiem mCRP (10 μ g/ml, $p = 0,075$, Abbildung 14 A) unterscheidet, ist diese Beobachtung irrelevant.

4.5.2 LIGANDEN DES ENDOGENEN CRP IN CHIRURGISCHEN PATIENTEN

Eine andere Erklärung für die wider Erwarten fehlenden antiinflammatorischen Effekte des eCRP aus Patientenplasmen könnte die Bindung unbekannter Liganden sein. Die massenspektrometrische Analyse der endogenen CRP-Liganden-Komplexe aus postoperativen Blutplasmen zeigt eine mögliche Interaktion mit 21 verschiedenen komplexen organischen Verbindungen (Tabelle 14). Die Häufigkeit der detektierten potentiellen CRP-Liganden verändert sich überraschenderweise nicht signifikant im postoperativen Verlauf (Abbildung 11). Auf Grundlage der bereits diskutierten Aspekte, wie Trauma-induzierten Veränderungen in der Plasmakonzentration von CRP (Mantovani & Garlanda, 2023; Pepys & Hirschfield, 2003) und der Trauma-induzierten Glykosylierung von Plasmaproteinen, wodurch unter anderem auch die Bindung von Liganden beeinflusst wird (Gudelj et al., 2016), wären Unterschiede der detektierten

Liganden zwischen postoperativem Tag zwei und postoperativem Tag fünf zu erwarten gewesen. Für eine bessere Beurteilung dieser Ergebnisse und des tatsächlichen Einflusses eines chirurgischen Traumas wird ein Vergleich mit einem präoperativen Zeitpunkt benötigt. Im Rahmen dieser Studie war dies nicht erreichbar, da aufgrund der im physiologischen Zustand geringen CRP-Konzentrationen eine adäquate Isolierung von CRP-Liganden-Komplexen mittels Immunpräzipitation nicht möglich war. Hier ist die Durchführung weiterer Arbeiten sinnvoll, in denen potentielle physiologisch vorliegende CRP-Liganden charakterisiert werden.

Für die Isolierung der CRP-Liganden-Komplexe wurde an dieser Stelle das Prinzip der Immunpräzipitation verwendet, da andere Methoden, wie beispielsweise die ebenfalls in dieser Arbeit verwendete Affinitätsreinigung, am eCRP gebundene Liganden gegebenenfalls während der Aufreinigung ablösen könnten. Der für die Massenspektrometrie verwendete *untargeted Metabolomics*-Ansatz detektiert Substanzen unabhängig von vorab festgelegten Stoffen (Cui et al., 2018; Di Minno et al., 2021; Gertsman & Barshop, 2018), sodass die Detektion aller vorhandenen Interaktionspartner von CRP erfolgen kann. Die detektierten Substanzen wurden durch den Vergleich mit internen Leerproben zum Ausschluss von Substanzen aus der finalen Probenaufbereitung für die Massenspektrometrie sowie durch den Vergleich mit Präzipitaten der Kontroll-Immunpräzipitation mit IgG1-Isotyp-Kontrollantikörper zum Ausschluss unspezifisch an die magnetischen Beads gebundener Substanzen gefiltert. Die Sortierung der potentiellen CRP-Liganden erfolgte nach der maximalen Fläche der chromatographischen Peaks, wodurch ein Rückschluss auf die Häufigkeit der identifizierten potentiellen CRP-Liganden gezogen werden kann (Tabelle 14). Hierdurch konnten in der vorliegenden Arbeit Koffein und Paracetamol als häufigste mögliche CRP-Liganden in chirurgischen Patienten identifiziert werden. Alle anderen Verbindungen schienen eine erheblich geringere Häufigkeit aufzuweisen. Ihre mögliche Bedeutung wird deswegen hier nicht weiter untersucht. Überraschenderweise zeigt sich in der massenspektrometrischen Analyse kein Nachweis des bekannten CRP-Liganden PC oder anderer PC-Derivate. Der Grund hierfür ist nicht bekannt und es bedarf weiterer Studien, um ausreichendes Wissen über die Bindung verschiedener Liganden an zirkulierendem CRP zu gewinnen.

Da sowohl Koffein als auch Paracetamol als potentielle CRP-Liganden eine hohe klinische Relevanz haben könnten, wurde deren Interaktion mit CRP näher untersucht. Für eine erste Beurteilung, ob eine direkte Interaktion mit CRP möglich ist, wurde molekulares Docking *in silico* als Vorhersage genutzt. Das unvoreingenommene Docking mittels DiffDock-Web zeigt in der berechneten Vorhersage, dass sowohl Koffein als auch Paracetamol an der PC-Bindungsstelle auf der B-Seite von CRP binden können (Abbildung 20 B, Abbildung 20 C). Die Bindungsstelle umfasst die Aminosäurereste E138, D140 und Q150 (Thompson et al., 1999). Die Übereinstimmung der interagierenden Aminosäuren (E138, D140, Q150) sowie beider Ca^{2+} -Ionen (CA 501, CA 502) zwischen der bekannten CRP-PC-Struktur (Ergänzende Abbildung 17 C) und der mittels DiffDock-Web vorhergesagten Interaktion von PC mit CRP (Abbildung 20 C) bestätigt die Aussagekraft der verwendeten Methode. Die Vorhersage zeigt, dass Paracetamol über die gleichen Aminosäurereste mit CRP interagieren kann, hierbei allerdings nur ein Ca^{2+} -Ion (CA 501) an der Interaktion beteiligt ist (Abbildung 20 C). Dies zeigt sich auch für die Interaktion von Koffein mit CRP (Abbildung 20 B). In früheren Arbeiten zur Struktur von CRP konnte kristallographisch gezeigt werden, dass die beiden Ca^{2+} -Ionen, über die die Bindung von PC an CRP stattfindet, durch diese Aminosäurereste koordiniert werden und damit zur Interaktion von CRP mit Liganden beitragen (Pathak & Agrawal, 2019; Shrive et al., 1996; Thompson et al., 1999). Dies liefert eine weitere Bestätigung für die Aussagekraft der *in silico*-Vorhersagen mittels DiffDock-Web. Dem Vorgehen wird grundsätzlich eine hohe Präzision der Vorhersagen im Vergleich mit anderen Docking-Methoden zugeschrieben (Corso et al., 2022).

Um die Ergebnisse weiter zu validieren, wurden zwei weitere Ansätze für die Durchführung des molekularen Dockings eingesetzt und diese für zusätzliches gezieltes Docking im Bereich der PC-Bindungsstelle genutzt. Die PC-Bindungsstelle wurde auf Grundlage der Ergebnisse des unvoreingenommenen Dockings mittels DiffDock-Web als Suchraum ausgewählt. Die Durchführung der Vorhersagen durch AutoDock Vina untermauert grundsätzlich die Interaktion sowohl von Koffein als auch von Paracetamol mit CRP. Allerdings zeigt sich in der Positivkontrolle bei der Orientierung von PC in der Bindungsstelle des CRP mit der höchsten berechneten Bindungsaffinität (Ergänzende Abbildung 15 A) keine Übereinstimmung mit der bekannten CRP-PC-Struktur, sodass die Ergebnisse nicht uneingeschränkt als Validierung der Interaktion zwischen CRP und Koffein sowie Paracetamol angesehen werden können. Bei gezieltem Docking mittels

Attracting Cavities ergeben die Vorhersagen keinerlei Interaktion von Koffein oder Paracetamol mit CRP. Da sich auch in der Positivkontrolle, dem Docking von PC mit CRP, keine Interaktion zeigt, liegt hier vermutlich ein methodisches Problem vor, sodass die Ergebnisse keine Aussage über die tatsächliche Interaktion zwischen CRP und Koffein oder Paracetamol liefern. Grundsätzlich wird der SwissDock-Webserver mit den Möglichkeiten des molekularen Dockings mittels AutoDock Vina oder *Attracting Cavities* weit verbreitet genutzt und ist insbesondere für die Validierung von Ergebnissen aus unvoreingenommenem Docking geeignet (Daina & Zoete, 2019). Dennoch sind zur Überprüfung der in dieser Studie erhaltenen Ergebnisse weitere Arbeiten sinnvoll, in denen zusätzlich komplexere Programme für die *in silico*-Analysen eingesetzt werden sollten.

In einer einzelnen früheren Studie zur Interaktion von CRP mit sekundären Pflanzenstoffen konnte mit Hilfe von molekularem Docking ebenfalls eine Interaktion von CRP mit Paracetamol gezeigt werden (Talapatra et al., 2017). In dieser Studie wurde, anders als in den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit, eine Interaktion mit den Aminosäureresten V91 und R116 im CRP vorhergesagt. Da in der Studie die bekannte CRP-Struktur mit gebundenem PC (PDB-ID 1B09) eingesetzt wurde, das gebundene PC aber nicht aus der Struktur entfernt wurde, kann davon ausgegangen werden, dass die beschriebenen Ergebnisse kritisch zu bewerten sind, da die PC-Bindungsstelle als eine mögliche Bindungsstelle für Paracetamol bei der Durchführung des molekularen Dockings bereits durch Liganden blockiert war. Außerdem wurde keine Positivkontrolle für das molekulare Docking eingesetzt. Somit sind diese publizierten Ergebnisse nicht als Widerspruch zu den Beobachtungen der vorliegenden Arbeit zu werten, da die Aussagekraft der Studie angezweifelt werden muss. Für die Interaktion von CRP mit Koffein lassen sich trotz ausgiebiger Literaturrecherche keine Studien finden, in denen eine Interaktion *in silico* untersucht wurde.

Interessanterweise sind *in vivo* Wechselwirkungen zwischen Koffein und Paracetamol bekannt, bei denen eine kombinierte Gabe von Paracetamol mit Koffein die analgetische Wirkung des Paracetamols erhöht (Derry et al., 2014; Palmer et al., 2010), sodass ein kompetitives Verhalten beider Substanzen an der Bindungsstelle des CRP denkbar ist. Typische Dosen der Substanzen sind 1000 mg für Paracetamol bzw. 130 mg für Koffein (Palmer et al., 2010). Bei einem Blutvolumen von circa 5 l (Sharma & Sharma, 2024)

wären demnach maximal 134 μM Koffein sowie 1,3 mM Paracetamol im Blut zu erwarten. Bei einer angenommenen CRP-Plasmakonzentration von 100 mg/l, welche im Rahmen systemischer Inflammation vorkommen (Newling et al., 2019), läge die Konzentration der CRP-Protomere bei 4 μM . Dies lässt den Schluss zu, dass die typischerweise zu erwartenden Konzentrationen von Paracetamol sowie Koffein im Blut weit über der für eine ausreichende Sättigung der CRP-Bindungsstellen benötigten Konzentrationen liegen, sodass eine Interaktion mit CRP möglich ist, ohne die Bioverfügbarkeit der Substanzen relevant zu beeinflussen.

4.5.3 EINFLUSS DER POTENTIELLEN CRP-LIGANDEN KOFFEIN UND PARACETAMOL AUF DIE BzATP-INDUZIERTER IL-1 β -FREISETZUNG

Da in der vorliegenden Arbeit entgegen den Erwartungen keine direkte Rolle von CRP bei der antiinflammatorischen Wirkung der Blutplasmen gezeigt werden konnte, ist es, wie zuvor erwähnt, denkbar, dass die antiinflammatorische Kapazität von CRP durch die Interaktion mit Liganden beeinflusst werden kann (vgl. Abschnitt 4.4.2). Auf Grundlage unserer Daten, kombiniert mit der physiologischen Relevanz, sind Koffein sowie Paracetamol dabei relevante mögliche Liganden. Zur weiteren Charakterisierung der potentiellen CRP-Liganden im Kontext steriler Inflammation wurde die dosisabhängige Wirkung von Koffein (Abbildung 16, Abbildung 17, Abbildung 18) sowie von Paracetamol (Abbildung 19) auf die BzATP-induzierte IL-1 β -Freisetzung aus monozytären THP-1-Zellen und humanen PBMCs gesunder Probanden untersucht.

Wie erwartet bewirkt die Zugabe des synthetischen partiellen $\alpha 7$ -nAChR-Agonisten S 24795 (100 μM) erneut eine statistisch signifikante Inhibition der BzATP-induzierten IL-1 β -Freisetzung aus monozytären THP-1-Zellen (Abbildung 16 A, Abbildung 17 A, Abbildung 19 A). Dies ist vermutlich auf eine Unterbrechung der P2RX7-vermittelten Signaltransduktion zurückzuführen (vgl. Abschnitt 4.5.1). In humanen PBMCs gesunder Probanden zeigt der inhibitorische Effekt von 100 μM S 24795 keine statistische Signifikanz (Abbildung 18 A). Da die Dosis-Wirkungskurve zur Ermittlung der geeigneten S 24795-Konzentration lediglich in monozytären THP-1-Zellen erstellt wurde (Ergänzende Abbildung 13), kann in Frage gestellt werden, ob die auf dieser Grundlage für die Experimente ausgewählte Konzentration auf PBMCs übertragbar ist. Hierzu sollte demnach zusätzlich eine Dosis-Wirkungskurve von S 24795 in humanen PBMCs erstellt werden. Der potentielle CRP-Ligand Koffein beeinflusst weder in monozytären THP-1-

Zellen (Abbildung 16 A) noch in humanen PBMCs (Abbildung 18 A) die BzATP-induzierte IL-1 β -Freisetzung, sodass davon ausgegangen werden kann, dass Koffein keinen direkten Effekt im Rahmen Trauma-induzierter sterile Inflammation vermittelt.

Da die Möglichkeit besteht, dass Koffein als nAChR-Antagonist wirkt, wurde getestet, ob Koffein die antiinflammatorische Wirkung von S 24795 im Rahmen steriler Inflammation beeinflussen kann. In monozytären THP-1-Zellen kann dies nicht beobachtet werden, die inhibitorische Wirkung von S 24795 auf die BzATP-induzierte IL-1 β -Freisetzung wird nicht signifikant durch Koffein beeinflusst (Abbildung 17 A). In humanen PBMCs können die erhaltenen Ergebnisse nicht ausreichend beurteilt werden, da, wie bereits beschrieben, keine signifikante Inhibition der BzATP-induzierten IL-1 β -Freisetzung durch den nAChR-Agonisten S 24795 gezeigt werden konnte (Abbildung 18 A). Einzig bei der Zugabe der höchsten getesteten Koffein-Konzentration von 1 mM können statistisch signifikante Effekte beobachtet werden: In monozytären THP-1-Zellen verstärkt die Zugabe von 1 mM Koffein signifikant die BzATP-induzierte IL-1 β -Freisetzung (Abbildung 16 A) und bewirkt darüber hinaus eine signifikante Aufhebung des inhibitorischen Effektes von S 24795 (Abbildung 17 A). Übliche Koffein-Konzentrationen liegen im Plasma unter 100 μ M und typischerweise zwischen 20 und 50 μ M (Fredholm, 1985; Graham, 2001). Plasmakonzentrationen über 200 μ M resultieren in toxischen Auswirkungen (Fredholm, 1985), womit die verwendete Koffein-Konzentration von 1 mM zum einen keine medizinische Relevanz hat und zum anderen die beobachteten Effekte vermutlich auf die Toxizität zurückzuführen sind.

Interessanterweise zeigt sich in den Zellkulturüberständen nach Stimulation mit 1 mM Koffein eine statistisch signifikante Reduktion der LDH-Aktivität (Abbildung 16 B, Abbildung 17 B). Aufgrund der angenommenen Toxizität wäre hier eine Erhöhung der LDH-Aktivität zu erwarten. Nachdem für andere Substanzen eine Interaktion mit LDH und daraus resultierende Reduktion der LDH-Aktivität beschrieben wurde (Kendig & Tarloff, 2007), könnte dies möglicherweise auch im Fall von Koffein eine Erklärung für die wider Erwarten reduzierte LDH-Aktivität bei Stimulation mit 1 mM Koffein sein.

Für Koffein konnten *in vitro* bereits diverse Effekte auf die immunologische Antwort gezeigt werden, darunter die Verringerung von TNF- α in LPS-stimuliertem humanem Vollblut (Horrigan et al., 2004). Außerdem konnten Zhao et al. eine dosisabhängige Inhibition der IL-1 β -Freisetzung aus mit LPS und BzATP stimulierten THP-1-

Makrophagen über Inhibition der Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms zeigen (Zhao et al., 2019). Dass diese Ergebnisse in der vorliegenden Arbeit an monozytären THP-1-Zellen sowie humanen PBMCs nicht bestätigt werden können, kann durch methodische Unterschiede der Studien erklärt werden. So nutzten Zhao et al. sehr hohe Koffein-Konzentrationen im nicht-physiologischen Bereich (100 - 800 μM) sowie THP-1-Makrophagen (Zhao et al., 2019), während in der vorliegenden Arbeit geringere und für viele Menschen relevante Koffein-Konzentrationen (1 - 1000 μM) getestet und dazu monozytäre THP-1-Zellen verwendet wurden.

Für Paracetamol, welches als zweithäufigster potentieller CRP-Ligand in chirurgischen Patienten identifiziert wurde, kann bei Zugabe hoher Konzentrationen (100 $\mu\text{g/ml}$, 200 $\mu\text{g/ml}$) eine statistisch signifikante Inhibition der BzATP-induzierten IL-1 β -Freisetzung aus monozytären THP-1-Zellen beobachtet werden (Abbildung 19 A). Typische therapeutische Dosen (1000 mg, Palmer et al., 2010) resultieren in Plasmakonzentrationen zwischen 5 $\mu\text{g/ml}$ und 20 $\mu\text{g/ml}$, während eine Plasmakonzentration über 150 $\mu\text{g/ml}$ als Schwelle für eine vermehrte toxische Wirkung erachtet wird (Jackson et al., 1984).

Darüber hinaus kann kein relevanter Einfluss von Paracetamol auf den inhibitorischen Effekt von S 24795 im Rahmen steriler Inflammation in monozytären THP-1-Zellen beobachtet werden (Abbildung 19 A). Wie bereits für Koffein beobachtet werden konnte, führt die Zugabe der Paracetamol-Konzentrationen im hohen bis toxischen Bereich (100 $\mu\text{g/ml}$, 200 $\mu\text{g/ml}$) zu monozytären THP-1-Zellen nicht wie erwartet zu einer Erhöhung der LDH-Aktivität, sondern zu einer statistisch signifikanten Reduktion (Abbildung 19 B). Hier könnte ebenfalls eine Interaktion von Paracetamol mit LDH stattfinden, wodurch die unerwartete Reduktion der LDH-Aktivität erklärt werden könnte (Kendig & Tarloff, 2007).

Im Kontext von Dengue-Fieber konnte *in vitro* in monozytären THP-1-Zellen ein inhibitorischer Effekt von Paracetamol auf die erhöhte Freisetzung von IL-6 sowie IL-4 gezeigt werden (Niranjan et al., 2019). Außerdem zeigten Low et al. einen inhibitorischen Effekt von Paracetamol auf die Freisetzung von Prostaglandin E2 (IC_{50} 7,73 μM) aus mit LPS und Interferon- γ stimulierten murinen RAW264.7-Makrophagen und darüber hinaus einen inhibitorischen Effekt von Paracetamol (IC_{50} 4362 μM) auf die IL-1 β -Freisetzung aus mit LPS stimulierten THP-1-Makrophagen (Low et al., 2024). Dies unterstreicht eine

grundsätzliche antiinflammatorische Wirkung von Paracetamol und bestätigt darüber hinaus, dass in der vorliegenden Arbeit kein inhibitorischer Effekt auf die IL-1 β -Freisetzung beobachtet werden konnte, da die hier eingesetzten Konzentrationen weit unter dem beschriebenen IC₅₀-Wert liegen. Dennoch könnte die Interaktion von Paracetamol mit CRP auch bei typischen Konzentrationen die antiinflammatorische Kapazität von CRP oder anderer Liganden beeinflussen.

4.5.4 ANALYSE MUTMAßLICHER CRP-LIGANDEN-KOMPLEXE *IN VITRO*

In Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe wurde die Ca²⁺-abhängige Komplexbildung von rCRP mit PC *in vitro* genutzt, um die Effekte der Komplexe im Rahmen steriler Inflammation in monozytären U937-Zellen zu untersuchen (Richter et al., 2018). Dieses experimentelle Vorgehen sollte in der vorliegenden Arbeit auf monozytäre THP-1-Zellen übertragen werden, um die Interaktion von CRP mit den identifizierten potentiellen CRP-Liganden und assoziierte Effekte auf die antiinflammatorische Kapazität von CRP zu untersuchen.

Überraschenderweise konnte in monozytären THP-1-Zellen der in U937-Zellen gezeigte eindeutige inhibitorische Effekt von rCRP-PC-Komplexen nicht reproduziert werden (Abbildung 15). Zwar zeigt sich eine statistisch signifikante Inhibition der IL-1 β -Freisetzung bei Zugabe von Komplexen aus verschiedenen rCRP-Konzentrationen (5, 10 und 20 μ g/ml) mit 1 μ M bzw. 10 μ M PC (Abbildung 15 A), jedoch ergeben sich durch die eingesetzten Kontrollbedingungen Einschränkungen dieser Beobachtung. Um signifikante inhibitorische Effekte der einzelnen Substanzen auszuschließen, wurde die isolierte Wirkung von PC, rCRP und Ca²⁺ auf die BzATP-induzierte IL-1 β -Freisetzung analysiert. Wie bereits zuvor beobachtet (vgl. Abbildung 14 A), können hohe Konzentrationen von freiem PC (200 μ M) über die Wirkung als nAChR-Agonist eine signifikante Inhibition der IL-1 β -Freisetzung vermitteln, während geringere Konzentrationen (1 μ M, 10 μ M) wie erwartet keinen signifikanten Effekt erzielen (Abbildung 15 A). Freies rCRP kann bei einer Konzentration von 20 μ g/ml bereits eine statistisch signifikante Inhibition bewirken, sodass die signifikanten Effekte von rCRP-PC-Komplexen mit 20 μ g/ml als irrelevant einzuordnen sind. Dennoch zeigen auch mit 5 μ g/ml bzw. 10 μ g/ml rCRP gebildete Komplexe eine signifikante Inhibition der BzATP-induzierten IL-1 β -Freisetzung.

Die Interaktion von CRP mit Liganden an der Bindungsstelle auf der B-Seite des Pentamers, bei der es sich auch um die bekannte Bindungsstelle für PC handelt, erfolgt Ca^{2+} -abhängig (Pepys & Hirschfield, 2003; Shrive et al., 1996). Aus diesem Grund wurde, wie bereits 2018 von unserer Arbeitsgruppe an U937-Zellen durchgeführt (Richter et al., 2018), die Komplexbildung von rCRP mit PC in Anwesenheit von 5 mM Ca^{2+} durchgeführt. Die Kontrolle der Ca^{2+} -Konzentration, die nach Zugabe der Komplexe in den Zellkulturansätzen vorliegt (0,1 mM), zeigt jedoch bereits einen statistisch signifikanten inhibitorischen Effekt auf die BzATP-induzierte IL-1 β -Freisetzung aus monozytären THP-1-Zellen. Da die humane physiologische Ca^{2+} -Konzentration bei circa 2,5 mM liegt (Hurwitz, 1996), ist diese Beobachtung unerwartet. Dennoch lassen sich in der Literatur Bestätigungen des beobachteten Effektes finden. So zeigten Lee et al., dass 1 mM Ca^{2+} , also ebenfalls eine physiologische Konzentration, in mit LPS und ATP stimulierten murinen Makrophagen die Freisetzung von IL-1 β inhibiert, wobei der Nachweis ausschließlich mittels Immunoblots erfolgte (Lee et al., 2012). Ca^{2+} scheint also zu einer Regulierung der Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms in der Lage zu sein, sodass die Wirkungsweise im Rahmen des in dieser Arbeit verwendeten experimentellen Vorgehens zur Simulierung Trauma-induzierter steriler Inflammation in weiteren Arbeiten näher analysiert werden muss. Auf Grundlage dieser Arbeiten kann dann im besten Fall eine Optimierung der Komplexbildung von CRP mit Liganden *in vitro* vorgenommen werden, sodass die Bindungseigenschaften der in dieser Arbeit massenspektrometrisch identifizierten potentiellen Liganden weiter charakterisiert werden können.

4.6 KLINISCHE RELEVANZ DER ERGEBNISSE

Insbesondere im Rahmen schwerer chirurgischer Eingriffe ist die Erforschung Trauma-induzierter inflammatorischer Prozesse von hoher Relevanz, um das postoperative Outcome der Patienten zukünftig zu verbessern. Wie bereits in dieser Arbeit verdeutlicht wurde, ist eine zentrale Problematik im postoperativen Verlauf die Entwicklung eines SIRS, welches die Morbidität sowie Mortalität der betroffenen Patienten erhöht (Lahiri et al., 2016). Einen wesentlichen Faktor eines SIRS stellt die übermäßige Freisetzung des proinflammatorischen Zytokins IL-1 β dar, welches durch DAMP- sowie PAMP-vermittelte Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms induziert wird (Chan & Schroder, 2019; Rai et al., 2022). Da IL-1 β auf der anderen Seite eine wichtige Rolle in der

Immunabwehr, insbesondere bei Infektionen, spielt (Chang et al., 2012; Harvanová et al., 2023), ist eine präzise Regulation der Menge von freigesetztem IL-1 β notwendig, um systemische Inflammation in der postoperativen Situation zu verhindern, ohne die Immunabwehr zu unterdrücken. Die von unserer Arbeitsgruppe identifizierte cholinerge Regulation der IL-1 β -Freisetzung im Rahmen steriler Inflammation (Hecker et al., 2015; Richter & Grau, 2023) bietet eine vielversprechende Grundlage zur Entwicklung therapeutischer Ansätze.

Ein interessanter Faktor zur Aktivierung des cholinergen Mechanismus ist das Akute-Phase-Protein CRP, welches im klinischen Umfeld überwiegend als inflammatorischer Biomarker eingesetzt wird (Olson et al., 2023). Zusätzlich wird die selektive Apherese von CRP im klinischen Kontext von akutem Myokardinfarkt und ischämischem Schlaganfall genutzt (Kayser et al., 2020). Die CAMI-1 Studie (englisch: *CRP apheresis in acute myocardial infarction study*) zeigte, dass eine Reduktion der CRP-Konzentration in Patienten mit akutem Myokardinfarkt durch selektive Apherese die Infarktgröße reduzieren kann (Ries et al., 2021). Weitere Anwendungsszenarien, beispielsweise im Rahmen von Covid-19 oder Pankreatitis werden ebenfalls in Betracht gezogen und geprüft (Kayser et al., 2020). In der vorliegenden Arbeit konnte ein antiinflammatorischer Effekt von Blutplasmen chirurgischer Patienten im Kontext steriler Inflammation gezeigt werden. Wider Erwarten weisen die Experimente nicht auf eine entscheidende Rolle von CRP bei der Vermittlung der antiinflammatorischen Effekte hin, womit vorherige Arbeiten unserer Arbeitsgruppe nicht bestätigt werden konnten. Dennoch könnte die antiinflammatorische Eigenschaft von Blutplasma aufgrund der guten Verfügbarkeit im klinischen Alltag zu therapeutischen Zwecken genutzt werden und bietet daher einen relevanten Ansatzpunkt für weitere Studien.

Die vorliegende Studie zeigt darüber hinaus die erstmalige Identifizierung von Koffein sowie Paracetamol als Liganden von zirkulierendem CRP in chirurgischen Patienten. Insbesondere im postoperativen Kontext ist Paracetamol ein häufig eingesetztes Medikament (Palmer et al., 2010), wodurch einer möglichen Interaktion mit CRP im postoperativen Kontext eine hohe Relevanz zuzuschreiben ist. Auch der Nachweis von Koffein hat einen hohen Stellenwert im Hinblick auf die klinische Relevanz der Ergebnisse. Neben der oralen Aufnahme von Koffein unter anderem durch Kaffee können Koffein-Metabolite im Blutplasma auch auf die medikamentöse Therapie zurückzuführen

sein. Ein Beispiel ist die intraoperative kombinierte Gabe von Cafedrin und Theodrenalin im Verhältnis von 20:1 zur Behandlung von arterieller Hypotonie (Bein et al., 2017; Heller et al., 2015). Da beide Substanzen Theophyllin enthalten, welches ein Metabolit von Koffein ist (Horrigan et al., 2006), ist auch hierbei eine Interaktion mit CRP und ein potentieller Einfluss auf die Wirkungen im Rahmen inflammatorischer Prozesse denkbar. Dies ist insbesondere bei chirurgischen Eingriffen relevant, da weitere Erkenntnisse möglicherweise die Verwendung des Medikamentes unter bestimmten Voraussetzungen indizieren oder kontraindizieren könnten. Darüber hinaus wird Koffein unter anderem zur Therapie von Apnoe und Vorbeugung bronchopulmonaler Dysplasie in Neugeborenen eingesetzt (Yuan et al., 2022).

Ein tiefergehendes Verständnis der Interaktion von CRP mit Koffein sowie Paracetamol und der Auswirkungen der Liganden-Bindung auf die antiinflammatorische Kapazität bietet daher weiterhin einen vielversprechenden Forschungsansatz zur Entwicklung von Medikamenten zur Prävention systemischer Inflammation, insbesondere im Zusammenhang mit schweren chirurgischen Eingriffen.

4.7 LIMITATIONEN UND AUSBLICK DER STUDIE

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit unterliegen einigen Limitationen, sodass zur Validierung der Erkenntnisse, insbesondere der Identifizierung von Koffein und Paracetamol als CRP-Liganden, weiterführende Studien notwendig sind.

Eine zentrale Limitation ist die geringe Anzahl der in die Studie eingeschlossenen Patienten ($n = 16$). Hierdurch wird einerseits die Verallgemeinerung der erhaltenen Erkenntnisse erschwert. Andererseits ist die für die Massenspektrometrie eingesetzte Probenanzahl (postoperativer Tag 2: $n = 7$; postoperativer Tag 5: $n = 5$) am Minimum der für *untargeted Metabolomics*-Methoden empfohlenen Anzahl biologischer Replikate einzuordnen (Di Minno et al., 2021; Sumner et al., 2007). In Folgeprojekten sollten weitere Proben der Patientenkohorte mittels Massenspektrometrie analysiert und somit die Anzahl der biologischen Replikate erhöht werden.

Darüber hinaus muss die Wahl der in den Experimenten verwendeten Zellen kritisch betrachtet werden. Durch die Verwendung von humanen Vollblutzellen, humanen PBMCs sowie monozytären THP-1-Zellen ist in dieser Studie eine große Bandbreite verschiedener Zellen abgedeckt. Hierdurch wird die Aussagekraft der Ergebnisse erhöht,

da die experimentellen Bedingungen in der Summe eine Vielzahl verschiedener Faktoren abdecken, die die Bedingungen *in vivo* widerspiegeln. Dennoch sind einige Aspekte kritisch zu bewerten. So ist die Probengewinnung für die primären Blutzellen durch die Verwendung von Spritzen gefolgt von Zentrifugationen mit mechanischem Stress für die Zellen verbunden. Hierdurch kann es zu einer zusätzlichen und unerwünschten Voraktivierung der Zellen vor Stimulation mit LPS kommen, was die Analyse der IL-1 β -Freisetzung beeinflussen kann. Dies trifft sowohl für Vollblutzellen als auch für PBMCs zu, allerdings ist die Gefahr einer Voraktivierung bei PBMCs durch den aufwändigen Isolationsprozess deutlich höher (Dörffel et al., 1999; Gmelig-Meyling & Waldmann, 1980).

Da der vorliegenden Arbeit die Erkenntnisse zur cholinergen Regulation BzATP-induzierter IL-1 β -Freisetzung über die Aktivierung von nAChRs zugrunde liegen, muss auch die Expression dieser Rezeptoren in den verwendeten Zellen berücksichtigt werden. Die $\alpha 7$ -Untereinheit von nAChRs wird von THP-1-Zellen exprimiert (van der Zanden et al., 2012). Dadurch könnten die in der vorliegenden Studie beobachteten Effekte auf die IL-1 β -Freisetzung bei Verwendung dieser Zelllinie grundsätzlich auf der Aktivierung von nAChRs beruhen. Humane primäre Monozyten exprimieren ebenfalls die $\alpha 7$ -Untereinheit, allerdings kann sich die Expression stark zwischen einzelnen Individuen unterscheiden (van der Zanden et al., 2012), sodass dies bei der Bewertung der experimentellen Ergebnisse miteinbezogen werden muss. Um die in dieser Studie gezeigten inhibitorischen Effekte auf eine Aktivierung der nAChRs zurückführen zu können, sind weitere Arbeiten erforderlich, die unter anderem die tatsächliche Aktivierung der Rezeptoren mit Methoden wie *small interfering ribonucleic acid* (siRNA)-vermitteltem Knockdown von nAChR-Untereinheiten oder Patch-Clamp-Techniken untersuchen sollten. Außerdem kann, abhängig von der Fragestellung, die vergleichende Verwendung anderer monozytärer Zelllinien wie HL-60-Zellen oder Mono-Mac-6-Zellen in Betracht gezogen werden (Chanput et al., 2014).

Nachdem die Fragestellungen dieser Arbeit auf den vorherigen Beobachtungen zur antiinflammatorischen Kapazität von CRP durch Aktivierung der nAChR-Untereinheiten $\alpha 7$, $\alpha 9$ und $\alpha 10$ (Richter et al., 2018) basieren, wurde der Fokus in der gesamten Studie auf CRP gelegt. Entgegen den Erwartungen deuten die Ergebnisse nicht auf eine relevante Rolle von CRP beim nachgewiesenen inhibitorischen Effekt von Patientenplasmen im

Rahmen steriler Inflammation hin. Da die antiinflammatorische Kapazität von Blutplasmen ein interessanter Ansatzpunkt für die Regulation postoperativer inflammatorischer Prozesse ist, ist eine weitere Eingrenzung der Faktoren, welche den inhibitorischen Effekt vermitteln, bedeutend. Die hierzu notwendigen Experimente würden über den Rahmen dieser Arbeit hinausgehen, sodass weitere nachfolgende Studien unter Berücksichtigung bereits veröffentlichter Arbeiten, unter anderem zu AAT und SLPI, notwendig sind. Außerdem ist unklar, ob die inhibitorische Wirkung der Patientenplasmen auf die IL-1 β -Freisetzung ebenfalls über eine Aktivierung von nAChR-Untereinheiten vermittelt wird, sodass diesem Aspekt ebenfalls in zukünftigen Arbeiten nachgegangen werden sollte.

Eine weiterer, kritisch zu betrachtender, Aspekt liegt bei den Untersuchungen zur eCRP-Form vor (vgl. Abschnitte 3.2.5 und 4.5.1). Anhand der durchgeführten BN-PAGE ist zwar eine Unterscheidung zwischen nCRP und mCRP möglich, allerdings kann die Form von nCRP und eCRP aufgrund der Abweichungen des Molekulargewichtes im Vergleich zu Literaturwerten nicht eindeutig der pentameren Form zugeordnet werden. Um eine präzise Identifizierung zu ermöglichen, sind weitere Arbeiten zur Unterscheidung der CRP-Formen notwendig. Die Identifizierung kann beispielsweise durch Analyse des Bindungsverhaltens in Ligandenbindungstests (Chang et al., 2002; Hörkkö et al., 1996) oder durch die Anwendung monoklonaler spezifischer Antikörper für mCRP und pCRP (Braig et al., 2017; Olson et al., 2023) ergänzt werden.

Final ist auch die in dieser Arbeit erfolgte Identifizierung einer direkten Bindung von Koffein sowie Paracetamol an CRP kritisch zu bewerten und bedarf weiterer Forschung, um diese Erkenntnis zu bestätigen. Das molekulare Docking, welches als *in silico*-Analyse eingesetzt wurde, resultiert lediglich in Vorhersagen möglicher Bindungen, sodass je nach verwendetem Programm die Präzision und damit die Verlässlichkeit der Vorhersagen nicht ausreichend sein kann (Paggi et al., 2024). Daher ist die experimentelle Bestätigung der Interaktion in zukünftigen Arbeiten *in vitro* sowie *in vivo* unabdingbar.

4.8 SCHLUSSFOLGERUNG

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass das Blutplasma von chirurgischen Patienten sowohl prä- als auch postoperativ einen antiinflammatorischen Effekt durch die dosisabhängige Inhibition BzATP-induzierter IL-1 β -Freisetzung vermitteln kann. Entgegen den zu Beginn formulierten Hypothesen ergeben sich keine Hinweise darauf, dass eCRP dabei der entscheidende Faktor ist. Darüber hinaus identifiziert die durchgeführte Studie zum ersten Mal Koffein sowie Paracetamol als potentielle Liganden von eCRP im Blutplasma chirurgischer Patienten. Den Ergebnissen kann insgesamt, trotz der diskutierten Limitationen, eine hohe klinische Relevanz zugeschrieben werden. Zur Validierung und zum besseren Verständnis der gewonnenen Erkenntnisse sind weiterführende Studien unerlässlich. Dennoch liefert die vorliegende Arbeit bereits einen relevanten Erkenntnisgewinn für das Verständnis der antiinflammatorischen Kapazität von CRP, was für die Entwicklung therapeutischer Ansatzpunkte bei systemischer Inflammation in chirurgischen Patienten eine wichtige Grundlage darstellt.

ZUSAMMENFASSUNG

Im Rahmen chirurgischer Eingriffe führen Zellschädigungen zur Freisetzung von Adenosintriphosphat (ATP), wodurch der purinerge Rezeptor P2RX7 aktiviert wird und die Inflammation-abhängige Freisetzung des proinflammatorischen Zytokins Interleukin (IL)-1 β induziert. Übermäßige IL-1 β -Freisetzung kann eine schwere systemische Inflammation auslösen. Unsere Arbeitsgruppe konnte einen cholinergen Mechanismus zur Regulation der IL-1 β -Freisetzung durch Aktivierung nikotinischer Acetylcholinrezeptoren (nAChRs) identifizieren. Die Aktivierung kann unter anderem durch Komplexe aus C-reaktivem Protein (CRP) mit Phosphocholin (PC) erfolgen.

Die vorliegende Arbeit sollte das antiinflammatorische Potential von endogenem CRP untersuchen und die CRP-Liganden in chirurgischen Patienten charakterisieren. Prä- und postoperative Blutproben wurden von Patienten, die sich einer schweren abdominalen Operation unterzogen, entnommen. Zur Untersuchung steriler Inflammation wurde die IL-1 β -Freisetzung aus humanen primären Vollblutzellen, peripheren mononukleären Blutzellen (PBMCs) sowie aus monozytären THP-1-Zellen durch Voraktivierung mit Lipopolysaccharid (LPS) und Stimulation mit ATP induziert und der Effekt von Blutplasmen, CRP-depletierten Blutplasmen sowie Blutplasmen nach Anreicherung mit PC analysiert. Zusätzlich wurden die am endogenen CRP vorliegenden Liganden mittels Massenspektrometrie identifiziert und die Interaktion mit molekularem Docking *in silico* untersucht.

Die Ergebnisse zeigten einen dosisabhängigen inhibitorischen Effekt von Blutplasmen auf die ATP-induzierte IL-1 β -Freisetzung, lieferten allerdings keinen Hinweis auf eine wesentliche Rolle von CRP bei diesem Effekt. Jedoch konnten in dieser Studie zum ersten Mal Koffein sowie Paracetamol als Liganden von endogenem CRP in Blutplasmen chirurgischer Patienten identifiziert werden. Die genaue Interaktion sowie die potentielle Auswirkung dieser Liganden auf die antiinflammatorische Kapazität von CRP sind noch unklar und bedürfen weiterer Forschung.

Die hier gewonnenen Erkenntnisse sind klinisch relevant und liefern einen weiteren Erkenntnisgewinn in der Erforschung möglicher therapeutischer Ansatzpunkte zur Kontrolle schwerer systemischer Inflammation, insbesondere im Kontext schwerer chirurgischer Eingriffe, mit dem Ziel der Reduktion assoziierter Mortalität.

ABSTRACT

During surgical procedures, cell damage results in the release of adenosine triphosphate (ATP) which activates the purinergic receptor P2RX7 and thereby induces the inflammasome-dependent release of the pro-inflammatory cytokine interleukin (IL)-1 β . Excessive IL-1 β release can trigger severe systemic inflammation. Our research group has identified a cholinergic mechanism for the regulation of IL-1 β release through activation of nicotinic acetylcholine receptors (nAChRs). Among other factors, this activation can be induced by complexes of C-reactive protein (CRP) with phosphocholine (PC).

The present study aimed to investigate the anti-inflammatory potential of endogenous CRP and to characterize the CRP ligands in surgical patients. Pre- and postoperative blood samples were collected from patients undergoing major abdominal surgery. To investigate sterile inflammation, IL-1 β release by human primary whole blood cells, peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) and monocytic THP-1 cells was induced by priming with lipopolysaccharide (LPS) and stimulation with ATP, and the effect of blood plasmas, CRP-depleted blood plasmas and blood plasmas after enrichment with PC was analyzed. Additionally, the ligands of endogenous CRP were identified by mass spectrometry and the interaction was analyzed *in silico* via molecular docking.

The results showed a dose-dependent inhibitory effect of blood plasmas on ATP-induced IL-1 β release but provided no evidence for a major role of CRP in this effect. However, in this study, caffeine and paracetamol were identified for the first time as ligands of endogenous CRP in blood plasmas of surgical patients. The exact interaction as well as the potential impact of these ligands on the anti-inflammatory capacity of CRP remain unclear and require further research.

The findings obtained in this study are clinically relevant and provide further insight into potential therapeutic approaches for the control of severe systemic inflammation, especially in the context of major surgery, with the aim of reducing associated mortality.

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

| | |
|------------------------|--|
| 1,6-bis-PC | 1,6-bis(phosphocholin)-hexan |
| AAT | alpha-1-Antitrypsin |
| ACh | Acetylcholin |
| APS | Ammoniumperoxodisulfat |
| ASA | englisch: <i>American Society of Anesthesiologists</i> |
| ASC | englisch: <i>apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD</i> |
| ATP | Adenosintriphosphat |
| BCA | englisch: <i>bicinchonic acid</i> |
| BMI | Body-Mass-Index |
| BN-PAGE | <i>blue native</i> -Polyacrylamidgelelektrophorese |
| BSA | Bovines Serumalbumin |
| BzATP | 2'(3')-O-(4-Benzoyl-benzoyl)adenosin-5'-triphosphat |
| C-Terminus | Carboxy-Terminus |
| CARD | englisch: <i>caspase recruitment domain</i> |
| CARS | englisch: <i>compensatory anti-inflammatory response syndrome</i> |
| CD14 | englisch: <i>cluster of differentiation 14</i> |
| CLR | englisch: <i>C-type lectin receptor</i> |
| COPD | englisch: <i>chronic obstructive pulmonary disease</i> |
| CRP | C-reaktives Protein |
| DAMP | englisch: <i>damage-associated molecular pattern</i> |
| DNA | englisch: <i>deoxyribonucleic acid</i> |
| DPPC | Dipalmitoylphosphatidylcholin |
| eCRP | endogenes CRP |
| EDTA | Ethylendiamintetraessigsäure |
| ELISA | englisch: <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i> |
| FBS | englisch: <i>fetal bovine serum</i> |
| FCAS | englisch: <i>familial cold autoinflammatory syndrome</i> |
| FcR | Fc-Rezeptor |
| GCS | englisch: <i>Glasgow Coma Scale</i> |
| GPC | Glycero-Phosphatidylcholin |
| HRP | englisch: <i>horseradish peroxidase</i> |
| IC₅₀ | halbmaximale inhibitorische Konzentration |
| IgG | Immunglobulin G |
| IL | Interleukin |
| IL-1R | IL-1-Rezeptor |
| IL-1RA | IL-1-Rezeptorantagonist |
| IgM | Immunglobulin M |
| LDH | Laktatdehydrogenase |
| LPC | Lysophosphatidylcholin |
| LPS | Lipopolysaccharid |

| | |
|--------------------------------|---|
| LRR | englisch: <i>leucine-rich repeat</i> |
| MAC | englisch: <i>membrane attack complex</i> |
| MARS | englisch: <i>mixed antagonist response syndrome</i> |
| MCP-1 | englisch: <i>monocyte chemoattractant protein-1</i> |
| mCRP | monomeres C-reaktives Protein |
| MD2 | englisch: <i>myeloid differentiation factor-2</i> |
| MODS | englisch: <i>multiple organ dysfunction syndrome</i> |
| MyD88 | englisch: <i>myeloid differentiation primary response 88</i> |
| n | Anzahl einzelner Experimente |
| N-Terminus | Amino-Terminus |
| nAChR | nikotinischer Acetylcholinrezeptor |
| NACHT | englisch: <i>neuronal apoptosis inhibitor protein, major histocompatibility complex class 2 transcription activator, heterokaryon incompatibility protein-E and telomerase-associated protein 1</i> |
| nCRP | humanes natives C-reaktives Protein |
| NF-κB | englisch: <i>nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i> |
| NLR | englisch: <i>nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor</i> |
| NLRP3 | englisch: <i>NLR family pyrin domain-containing protein 3</i> |
| NO | Stickstoffmonoxid |
| NOD | englisch: <i>nucleotide-binding oligomerization domain</i> |
| P2RX7 | englisch: <i>P2X purinoceptor 7</i> |
| PAF | englisch: <i>platelet-activating factor</i> |
| PAMP | englisch: <i>pathogen-associated molecular pattern</i> |
| PBMC | englisch: <i>peripheral blood mononuclear cell</i> |
| PBS | Phosphat-gepufferte Salzlösung |
| PC | Phosphocholin |
| pCRP | pentameres C-reaktives Protein |
| pCRP* | teilweise dissoziiertes pentameres C-reaktives Protein |
| PDB | englisch: <i>Protein Data Bank</i> |
| PRR | englisch: <i>pattern recognition receptor</i> |
| PVDF | Polyvinylidenfluorid |
| PYD | englisch: <i>pyrin domain</i> |
| qSOFA | englisch: <i>quick sequential organ failure assessment</i> |
| rCRP | rekombinantes CRP |
| RIG-1 | englisch: <i>retinoic acid inducible gene-1</i> |
| RLR | englisch: <i>retinoic acid inducible gene-1-like receptor</i> |
| RPMI | englisch: <i>Roswell Park Memorial Institute</i> |
| SAP | Serumamyloid-P-Komponente |
| SDS | Natriumdodecylsulfat |
| SDS-PAGE | Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese |
| siRNA | englisch: <i>small interfering ribonucleic acid</i> |
| SIRS | englisch: <i>systemic inflammatory response syndrome</i> |

| | |
|--------------------------------|--|
| SLPI | englisch: <i>secretory leukocyte protease inhibitor</i> |
| SMILES | englisch: <i>simplified molecular input line entry system</i> |
| SOFA | englisch: <i>sequential organ failure assessment</i> |
| STAT3 | englisch: <i>signal transducer and activator of transcription 3</i> |
| TEMED | Tetramethylethylendiamin |
| TIR | Toll/IL-1-Rezeptor |
| TIRAP | englisch: <i>Toll/interleukin-1 receptor domain-containing adapter protein</i> |
| TLR | englisch: <i>Toll-like receptor</i> |
| TNF-α | Tumornekrosefaktor- α |
| UF | Ultrafiltration |
| UKGM | Universitätsklinikum Gießen und Marburg |
| UPLC-MS/MS | Ultra-Performance-Flüssigchromatographie gekoppelt mit Tandem-Massenspektrometrie |

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

| | |
|---|----|
| Abbildung 1: Schematische Darstellung des experimentellen Ablaufs zur Freisetzung von IL-1 β aus monozytären THP-1-Zellen. | 34 |
| Abbildung 2: Schematische Darstellung des Ablaufs der Experimente zur IL-1 β -Freisetzung aus humanen Vollblutzellen chirurgischer Patienten. | 35 |
| Abbildung 3: Schematische Darstellung des Ablaufs der Experimente zur IL-1 β -Freisetzung aus humanen PBMCs chirurgischer Patienten. | 36 |
| Abbildung 4: Schematische Darstellung des Ablaufs der Experimente zur Freisetzung von IL-1 β aus humanen PBMCs gesunder Probanden. | 37 |
| Abbildung 5: Blutplasma inhibiert dosisabhängig die BzATP-induzierte IL-1 β -Freisetzung aus autologen Blutzellen und monozytären THP-1-Zellen. | 51 |
| Abbildung 6: Der inhibitorische Effekt von Blutplasma auf die BzATP-induzierte IL-1 β -Freisetzung aus autologen Blutzellen und monozytären THP-1-Zellen wird nicht wesentlich durch schwere viszeralchirurgische Eingriffe beeinflusst. | 54 |
| Abbildung 7: Schwere viszeralchirurgische Eingriffe führen zu einem postoperativen Anstieg der CRP-Konzentration im Blutplasma. | 56 |
| Abbildung 8: Einfluss der Zugabe des CRP-Liganden PC auf den inhibitorischen Effekt von Blutplasma im Rahmen der BzATP-induzierten IL-1 β -Freisetzung aus autologen Blutzellen. | 58 |
| Abbildung 9: Die Immunpräzipitation von CRP aus Blutplasma ist effizient. | 60 |
| Abbildung 10: Der inhibitorische Effekt von postoperativem Patientenplasma wird nicht wesentlich durch die Depletion des endogenen CRP aus dem Plasma beeinflusst. | 62 |
| Abbildung 11: Das Auftreten verschiedener Interaktionspartner von endogenem CRP unterscheidet sich nicht statistisch signifikant zwischen postoperativem Tag zwei und Tag fünf. | 65 |
| Abbildung 12: Kontrolle der Affinitätsreinigung von CRP aus Blutplasma. | 66 |
| Abbildung 13: Endogenes CRP aus Patientenplasmen liegt nicht in der dissoziierten monomeren Form vor. | 67 |
| Abbildung 14: Einfluss von mCRP auf die BzATP-induzierte IL-1 β -Freisetzung aus monozytären THP-1-Zellen. | 70 |
| Abbildung 15: Einfluss von rCRP-PC-Komplexen auf die BzATP-induzierte IL-1 β -Freisetzung aus monozytären THP-1-Zellen. | 72 |

| | |
|---|----|
| Abbildung 16: Die BzATP-induzierte IL-1 β -Freisetzung aus monozytären THP-1-Zellen wird nicht durch Koffein beeinflusst. | 74 |
| Abbildung 17: Dosisabhängiger Effekt von Koffein auf die inhibitorische Wirkung von S 24795 auf die BzATP-induzierte IL-1 β -Freisetzung aus THP-1-Zellen. | 76 |
| Abbildung 18: Dosisabhängiger Effekt von Koffein auf die BzATP-induzierte IL-1 β -Freisetzung aus humanen PBMCs gesunder Probanden. | 78 |
| Abbildung 19: Dosisabhängiger Effekt von Paracetamol auf die BzATP-induzierte IL-1 β -Freisetzung aus monozytären THP-1-Zellen. | 80 |
| Abbildung 20: 3D-Darstellung des <i>in silico</i> Dockings von CRP mit Liganden mittels DiffDock-Web. | 82 |

TABELLENVERZEICHNIS

| | |
|---|----|
| Tabelle 1: Verwendete Verbrauchsmaterialien und Herstellerangaben. | 23 |
| Tabelle 2: Verwendete Geräte und Herstellerangaben..... | 24 |
| Tabelle 3: Eingesetzte Zelllinien und Bezugsquellen..... | 25 |
| Tabelle 4: Für Western Blot und Immunpräzipitation verwendete Antikörper, Informationen zu Antigenen und Art der Antikörper sowie Herstellerangaben mit Katalognummern. | 25 |
| Tabelle 5: Verwendete Reagenzien und Herstellerangaben mit Katalognummern. | 25 |
| Tabelle 6: Eingesetzte Kits bzw. Assays und Herstellerangaben mit Katalognummern. | 27 |
| Tabelle 7: Zusammensetzungen der verwendeten Puffer und Lösungen. | 28 |
| Tabelle 8: Verwendete Software und Herstellerangaben..... | 29 |
| Tabelle 9: Grundlegende präoperative Charakteristika der in die Studie eingeschlossenen Patienten (n = 16). | 30 |
| Tabelle 10: Grundlegende intra- und postoperative Charakteristika der in die Studie eingeschlossenen Patienten (n = 16). | 31 |
| Tabelle 11: Reagenzien zur Herstellung eines Trenngels mit 12 %-igem Acrylamid- Anteil für die Proteinseparation mittels Natriumdodecylsulfat- Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)..... | 43 |
| Tabelle 12: Reagenzien zur Herstellung eines Sammelgels für die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)..... | 43 |
| Tabelle 13: SMILES-Strukturcodes der analysierten Liganden aus der PubChem- Datenbank..... | 46 |
| Tabelle 14: Durch Massenspektrometrie identifizierte Interaktionspartner von endogenem CRP aus Patientenplasma nach schwerem viszeralchirurgischem Eingriff. | 63 |
| Tabelle 15: <i>Confidence</i> Scores der durch DiffDock-Web vorhergesagten Interaktion von Liganden mit CRP. | 81 |

LITERATURVERZEICHNIS

- Abernethy, T. J., & Avery, O. T. (1941). The occurrence during acute infections of a protein not normally present in the blood: I. Distribution of the reactive protein in patients' sera and the effect of calcium on the flocculation reaction with C polysaccharide of pneumococcus. *Journal of Experimental Medicine*, 73(2), 173–182. <https://doi.org/10.1084/jem.73.2.173>
- Adinolfi, E., Giuliani, A. L., Marchi, E., Pegoraro, A., Orioli, E., & Di Virgilio, F. (2018). The P2X7 receptor: A main player in inflammation. *Biochemical Pharmacology*, 151, 234–244. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2017.12.021>
- Agné, A., Richter, K., Padberg, W., Janciauskiene, S., & Grau, V. (2021). Commercial α 1-antitrypsin preparations markedly differ in their potential to inhibit the ATP-induced release of monocytic interleukin-1 β . *Pulmonary Pharmacology & Therapeutics*, 68, 102020. <https://doi.org/10.1016/j.pupt.2021.102020>
- Agrawal, A., Shrive, A. K., Greenhough, T. J., & Volanakis, J. E. (2001). Topology and Structure of the C1q-Binding Site on C-Reactive Protein1. *The Journal of Immunology*, 166(6), 3998–4004. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.166.6.3998>
- Akbal, A., Dernst, A., Lovotti, M., Mangan, M. S. J., McManus, R. M., & Latz, E. (2022). How location and cellular signaling combine to activate the NLRP3 inflammasome. *Cellular & Molecular Immunology*, 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41423-022-00922-w>
- Al-Shukaili, A., Al-Kaabi, J., & Hassan, B. (2008). A Comparative Study of Interleukin-1 β Production and P2x7 Expression After Atp Stimulation by Peripheral Blood Mononuclear Cells Isolated From Rheumatoid Arthritis Patients and Normal Healthy Controls. *Inflammation*, 31(2), 84–90. <https://doi.org/10.1007/s10753-007-9052-0>
- 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. <https://doi.org/10.1155/2017/1434872>
- Austermann, J., Roth, J., & Barczyk-Kahlert, K. (2022). The Good and the Bad: Monocytes' and Macrophages' Diverse Functions in Inflammation. *Cells*, 11(12), 1979. <https://doi.org/10.3390/cells11121979>
- 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. <https://doi.org/10.1194/jlr.M071506>
- Ballou, S. P., & Lozanski, G. (1992). Induction of inflammatory cytokine release from cultured human monocytes by C-reactive protein. *Cytokine*, 4(5), 361–368. [https://doi.org/10.1016/1043-4666\(92\)90079-7](https://doi.org/10.1016/1043-4666(92)90079-7)
- Banait, T., Wanjari, A., Danade, V., Banait, S., & Jain, J. (2022). Role of High-Sensitivity

- C-reactive Protein (Hs-CRP) in Non-communicable Diseases: A Review. *Cureus*, *14*(10), e30225. <https://doi.org/10.7759/cureus.30225>
- Banerjee, S. K., Chatterjee, A., Gupta, S., & Nagar, A. (2022). Activation and Regulation of NLRP3 by Sterile and Infectious Insults. *Frontiers in Immunology*, *13*, 896353. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.896353>
- Bein, B., Christ, T., & Eberhart, L. H. J. (2017). Cafedrine/Theodrenaline (20:1) Is an Established Alternative for the Management of Arterial Hypotension in Germany—A Review Based on a Systematic Literature Search. *Frontiers in Pharmacology*, *8*, 68. <https://doi.org/10.3389/fphar.2017.00068>
- Benjamin, R. J., & McLaughlin, L. S. (2012). Plasma components: Properties, differences, and uses. *Transfusion*, *52*(s1), 9S-19S. <https://doi.org/10.1111/j.1537-2995.2012.03622.x>
- Bockstiegel, J., Engelhardt, J., & Weindl, G. (2023). P2X7 receptor activation leads to NLRP3-independent IL-1 β release by human macrophages. *Cell Communication and Signaling*, *21*(1), 335. <https://doi.org/10.1186/s12964-023-01356-1>
- Bolen, C. R., Uduman, M., & Kleinstein, S. H. (2011). Cell subset prediction for blood genomic studies. *BMC Bioinformatics*, *12*(1), 258. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-12-258>
- Bone, R. C., Balk, R. A., Cerra, F. B., Dellinger, R. P., Fein, A. M., Knaus, W. A., Schein, R. M., & Sibbald, W. J. (1992). Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. *Chest*, *101*(6), 1644–1655. <https://doi.org/10.1378/chest.101.6.1644>
- Bone, R. C., Grodzin, C. J., & Balk, R. A. (1997). Sepsis: A new hypothesis for pathogenesis of the disease process. *Chest*, *112*(1), 235–243. <https://doi.org/10.1378/chest.112.1.235>
- 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), Article 6785. <https://doi.org/10.1038/35013070>
- Bortolotti, P., Faure, E., & Kipnis, E. (2018). Inflammasomes in Tissue Damages and Immune Disorders After Trauma. *Frontiers in Immunology*, *9*, 1900. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01900>
- Braig, D., Nero, T. L., Koch, H.-G., Kaiser, B., Wang, X., Thiele, J. R., Morton, C. J., Zeller, J., Kiefer, J., Potempa, L. A., Mellett, N. A., Miles, L. A., Du, X.-J., Meikle, P. J., Huber-Lang, M., Stark, G. B., Parker, M. W., Peter, K., & Eisenhardt, S. U. (2017). Transitional changes in the CRP structure lead to the exposure of proinflammatory binding sites. *Nature Communications*, *8*, 14188. <https://doi.org/10.1038/ncomms14188>
- Brubaker, S. W., Bonham, K. S., Zanoni, I., & Kagan, J. C. (2015). Innate Immune Pattern Recognition: A Cell Biological Perspective. *Annual review of immunology*, *33*, 257–290. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-032414-112240>
- Burnouf, T. (2007). Modern Plasma Fractionation. *Transfusion Medicine Reviews*, *21*(2),

101. <https://doi.org/10.1016/j.tmr.2006.11.001>
- Burnstock, G. (1972). Purinergic nerves. *Pharmacological Reviews*, 24(3), 509–581.
- Buttenschoen, K., Fathimani, K., & Buttenschoen, D. C. (2010). Effect of major abdominal surgery on the host immune response to infection. *Current Opinion in Infectious Diseases*, 23(3), 259. <https://doi.org/10.1097/QCO.0b013e32833939cb>
- Cabrera-Rivera, G. L., Madera-Sandoval, R. L., León-Pedroza, J. I., Ferat-Osorio, E., Salazar-Rios, E., Hernández-Aceves, J. A., Guadarrama-Aranda, U., López-Macías, C., Wong-Baeza, I., & Arriaga-Pizano, L. A. (2022). Increased TNF- α production in response to IL-6 in patients with systemic inflammation without infection. *Clinical and Experimental Immunology*, uxac055. <https://doi.org/10.1093/cei/uxac055>
- Cassel, S. L., & Sutterwala, F. S. (2010). Sterile inflammatory responses mediated by the NLRP3 inflammasome. *European Journal of Immunology*, 40(3), 607–611. <https://doi.org/10.1002/eji.200940207>
- Cavalli, G., & Dinarello, C. A. (2018). Anakinra Therapy for Non-cancer Inflammatory Diseases. *Frontiers in Pharmacology*, 9, 1157. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.01157>
- Cecon, E., Dam, J., Luka, M., Gautier, C., Chollet, A., Delagrangé, P., Danober, L., & Jockers, R. (2019). Quantitative assessment of oligomeric amyloid β peptide binding to $\alpha 7$ nicotinic receptor. *British Journal of Pharmacology*, 176(18), 3475–3488. <https://doi.org/10.1111/bph.14688>
- Chakraborty, R. K., & Burns, B. (2022). Systemic Inflammatory Response Syndrome. In *StatPearls*. StatPearls Publishing. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK547669/>
- Chan, A. H., & Schroder, K. (2019). Inflammasome signaling and regulation of interleukin-1 family cytokines. *The Journal of Experimental Medicine*, 217(1), e20190314. <https://doi.org/10.1084/jem.20190314>
- Chang, M.-K., Binder, C. J., Torzewski, M., & Witztum, J. L. (2002). C-reactive protein binds to both oxidized LDL and apoptotic cells through recognition of a common ligand: Phosphorylcholine of oxidized phospholipids. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(20), 13043–13048. <https://doi.org/10.1073/pnas.192399699>
- Chang, M.-K., Hartvigsen, K., Ryu, J., Kim, Y., & Han, K. H. (2012). The pro-atherogenic effects of macrophages are reduced upon formation of a complex between C-reactive protein and lysophosphatidylcholine. *Journal of Inflammation*, 9(1), 42. <https://doi.org/10.1186/1476-9255-9-42>
- Chanput, W., Mes, J. J., & Wichers, H. J. (2014). THP-1 cell line: An in vitro cell model for immune modulation approach. *International Immunopharmacology*, 23(1), 37–45. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2014.08.002>
- Chanput, W., Peters, V., & Wichers, H. (2015). THP-1 and U937 Cells. In K. Verhoeckx, P. Cotter, I. López-Expósito, C. Kleiveland, T. Lea, A. Mackie, T. Requena, D. Swiatecka, & H. Wichers (Hrsg.), *The Impact of Food Bioactives on Health: In vitro and ex vivo models*. Springer. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK500159/>

- Ciesielska, A., Matyjek, M., & Kwiatkowska, K. (2021). TLR4 and CD14 trafficking and its influence on LPS-induced pro-inflammatory signaling. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 78(4), 1233–1261. <https://doi.org/10.1007/s00018-020-03656-y>
- Cogswell, J. P., Godlevski, M. M., Wisely, G. B., Clay, W. C., Leesnitzer, L. M., Ways, J. P., & Gray, J. G. (1994). NF-kappa B regulates IL-1 beta transcription through a consensus NF-kappa B binding site and a nonconsensus CRE-like site. *The Journal of Immunology*, 153(2), 712–723. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.153.2.712>
- Corso, G., Stärk, H., Jing, B., Barzilay, R., & Jaakkola, T. (2022, Oktober 4). *DiffDock: Diffusion Steps, Twists, and Turns for Molecular Docking*. arXiv.Org. <https://arxiv.org/abs/2210.01776v2>
- Courtney, A., Clymo, J., Dorudi, Y., Moonesinghe, S. R., & Dorudi, S. (2024). Scoping review: The terminology used to describe major abdominal surgical procedures. *World Journal of Surgery*, 48(3), 574–584. <https://doi.org/10.1002/wjs.12084>
- Cui, L., Lu, H., & Lee, Y. H. (2018). Challenges and emergent solutions for LC-MS/MS based untargeted metabolomics in diseases. *Mass Spectrometry Reviews*, 37(6), 772–792. <https://doi.org/10.1002/mas.21562>
- Cummings, B. S., & Schnellmann, R. G. (2021). Measurement of Cell Death in Mammalian Cells. *Current Protocols*, 1(8), e210. <https://doi.org/10.1002/cpz1.210>
- Daina, A., & Zoete, V. (2019). Application of the SwissDrugDesign Online Resources in Virtual Screening. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(18), 4612. <https://doi.org/10.3390/ijms20184612>
- Deets, K. A., & Vance, R. E. (2021). Inflammasomes and adaptive immune responses. *Nature Immunology*, 22(4), 412–422. <https://doi.org/10.1038/s41590-021-00869-6>
- Del Giudice, M., & Gangestad, S. W. (2018). Rethinking IL-6 and CRP: Why they are more than inflammatory biomarkers, and why it matters. *Brain, Behavior, and Immunity*, 70, 61–75. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2018.02.013>
- Deng, M., Brickey, W. J., Guo, H., Tam, J. W., Johnson, B. M., New, J. S., Koller, B. H., Kearney, J. F., & Ting, J. P.-Y. (2018). Platelet activating factor as a novel danger signal for activation of NLRP3 inflammasome. *The Journal of Immunology*, 200(1 Supplement), 115.13-115.13.
- Derry, C. J., Derry, S., & Moore, R. A. (2014). Caffeine as an analgesic adjuvant for acute pain in adults. *The Cochrane Database of Systematic Reviews*, 2014(12), CD009281. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD009281.pub3>
- Di Minno, A., Gelzo, M., Stornaiuolo, M., Ruoppolo, M., & Castaldo, G. (2021). The evolving landscape of untargeted metabolomics. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, 31(6), 1645–1652. <https://doi.org/10.1016/j.numecd.2021.01.008>
- Di Virgilio, F., Dal Ben, D., Sarti, A. C., Giuliani, A. L., & Falzoni, S. (2017). The P2X7 Receptor in Infection and Inflammation. *Immunity*, 47(1), 15–31. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2017.06.020>
- Dinarello, C. A. (2018). Overview of the IL-1 family in innate inflammation and acquired

- immunity. *Immunological Reviews*, 281(1), 8–27.
<https://doi.org/10.1111/imr.12621>
- Ding, A., Thieblemont, N., Zhu, J., Jin, F., Zhang, J., & Wright, S. (1999). Secretary Leukocyte Protease Inhibitor Interferes with Uptake of Lipopolysaccharide by Macrophages. *Infection and Immunity*, 67(9), 4485.
<https://doi.org/10.1128/iai.67.9.4485-4489.1999>
- Donnelly-Roberts, D. L., Namovic, M. T., Han, P., & Jarvis, M. F. (2009). Mammalian P2X7 receptor pharmacology: Comparison of recombinant mouse, rat and human P2X7 receptors. *British Journal of Pharmacology*, 157(7), 1203.
<https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2009.00233.x>
- Dörffel, Y., Lätsch, C., Stuhlmüller, B., Schreiber, S., Scholze, S., Burmester, G. R., & Scholze, J. (1999). Preactivated Peripheral Blood Monocytes in Patients With Essential Hypertension. *Hypertension*, 34(1), 113–117.
<https://doi.org/10.1161/01.HYP.34.1.113>
- Dunzendorfer, S., Lee, H.-K., Soldau, K., & Tobias, P. S. (2004). TLR4 is the signaling but not the lipopolysaccharide uptake receptor. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 173(2), 1166–1170.
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.173.2.1166>
- Edwards, M., Whittle, J., & Ackland, G. L. (2011). Biomarkers to guide perioperative management. *Postgraduate Medical Journal*, 87(1030), 542–549.
<https://doi.org/10.1136/pgmj.2010.107177>
- Eisenhardt, S. U., Habersberger, J., Murphy, A., Chen, Y.-C., Woollard, K. J., Bassler, N., Qian, H., von zur Muhlen, C., Hagemeyer, C. E., Ahrens, I., Chin-Dusting, J., Bobik, A., & Peter, K. (2009). Dissociation of Pentameric to Monomeric C-Reactive Protein on Activated Platelets Localizes Inflammation to Atherosclerotic Plaques. *Circulation Research*, 105(2), 128–137.
<https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.108.190611>
- Ferrari, D., Pizzirani, C., Adinolfi, E., Lemoli, R. M., Curti, A., Idzko, M., Panther, E., & Di Virgilio, F. (2006). The P2X7 Receptor: A Key Player in IL-1 Processing and Release1. *The Journal of Immunology*, 176(7), 3877–3883.
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.176.7.3877>
- Ferrari, D., Villalba, M., Chiozzi, P., Falzoni, S., Ricciardi-Castagnoli, P., & Di Virgilio, F. (1996). Mouse microglial cells express a plasma membrane pore gated by extracellular ATP. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 156(4), 1531–1539.
- Filep, J. G. (2022). Targeting conformational changes in C-reactive protein to inhibit pro-inflammatory actions. *EMBO Molecular Medicine*, n/a(n/a), e17003.
<https://doi.org/10.15252/emmm.202217003>
- Filep, J. G., Hermán, F., Kelemen, É., & Földes-Filep, É. (1991). C-reactive protein inhibits binding of platelet-activating factor to human platelets. *Thrombosis Research*, 61(4), 411–421. [https://doi.org/10.1016/0049-3848\(91\)90655-G](https://doi.org/10.1016/0049-3848(91)90655-G)
- Fitzgerald, K. A., & Kagan, J. C. (2020). Toll-like Receptors and the Control of Immunity. *Cell*, 180(6), 1044–1066. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.02.041>
- Fredholm, B. B. (1985). On the Mechanism of Action of Theophylline and Caffeine. *Acta*

- Medica Scandinavica*, 217(2), 149–153. <https://doi.org/10.1111/j.0954-6820.1985.tb01650.x>
- Fu, J., & Wu, H. (2023). Structural Mechanisms of NLRP3 Inflammasome Assembly and Activation. *Annual Review of Immunology*, 41, 301–316. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-081022-021207>
- Fujii, T., Mashimo, M., Moriwaki, Y., Misawa, H., Ono, S., Horiguchi, K., & Kawashima, K. (2017). Expression and Function of the Cholinergic System in Immune Cells. *Frontiers in Immunology*, 8, 1085. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01085>
- Gabay, C., & Kushner, I. (1999). Acute-Phase Proteins and Other Systemic Responses to Inflammation. *New England Journal of Medicine*, 340(6), 448–454. <https://doi.org/10.1056/NEJM199902113400607>
- Gaidt, M. M., Ebert, T. S., Chauhan, D., Schmidt, T., Schmid-Burgk, J. L., Rapino, F., Robertson, A. A. B., Cooper, M. A., Graf, T., & Hornung, V. (2016). Human Monocytes Engage an Alternative Inflammasome Pathway. *Immunity*, 44(4), 833–846. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2016.01.012>
- Gertsman, I., & Barshop, B. A. (2018). Promises and Pitfalls of Untargeted Metabolomics. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 41(3), 355. <https://doi.org/10.1007/s10545-017-0130-7>
- Geyer, C. E., Newling, M., Sritharan, L., Griffith, G. R., Chen, H.-J., Baeten, D. L. P., & den Dunnen, J. (2021). C-Reactive Protein Controls IL-23 Production by Human Monocytes. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(21), 11638. <https://doi.org/10.3390/ijms222111638>
- Gmelig-Meyling, F., & Waldmann, T. A. (1980). Separation of human blood monocytes and lymphocytes on a continuous percoll gradient. *Journal of Immunological Methods*, 33(1), 1–9. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(80\)90077-0](https://doi.org/10.1016/0022-1759(80)90077-0)
- Gornik, O., & Lauc, G. (2009). Glycosylation of Serum Proteins in Inflammatory Diseases. *Disease Markers*, 25(4–5), 267. <https://doi.org/10.1155/2008/493289>
- Graham, T. E. (2001). Caffeine and Exercise. *Sports Medicine*, 31(11), 785–807. <https://doi.org/10.2165/00007256-200131110-00002>
- Grievink, H. W., Luisman, T., Kluft, C., Moerland, M., & Malone, K. E. (2016). Comparison of Three Isolation Techniques for Human Peripheral Blood Mononuclear Cells: Cell Recovery and Viability, Population Composition, and Cell Functionality. *Biopreservation and Biobanking*, 14(5), 410–415. <https://doi.org/10.1089/bio.2015.0104>
- Gudelj, I., Baciarello, M., Ugrina, I., Gregori, M. D., Napolioni, V., Ingelmo, P. M., Bugada, D., Gregori, S. D., Đerek, L., Pučić-Baković, M., Novokmet, M., Gornik, O., Jotti, G. S., Meschi, T., Lauc, G., & Allegri, M. (2016). Changes in total plasma and serum N-glycome composition and patient-controlled analgesia after major abdominal surgery. *Scientific Reports*, 6, 31234. <https://doi.org/10.1038/srep31234>
- Haapasalo, K., & Meri, S. (2019). Regulation of the Complement System by Pentraxins. *Frontiers in Immunology*, 10. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2019.01750>
- Halder, N., & Lal, G. (2021). Cholinergic System and Its Therapeutic Importance in

- Inflammation and Autoimmunity. *Frontiers in Immunology*, 12, 660342. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.660342>
- Han, K. H., Hong, K.-H., Park, J.-H., Ko, J., Kang, D.-H., Choi, K.-J., Hong, M.-K., Park, S.-W., & Park, S.-J. (2004). C-Reactive Protein Promotes Monocyte Chemoattractant Protein-1—Mediated Chemotaxis Through Upregulating CC Chemokine Receptor 2 Expression in Human Monocytes. *Circulation*, 109(21), 2566–2571. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000131160.94926.6E>
- Harvanová, G., Duranková, S., & Bernasovská, J. (2023). The role of cytokines and chemokines in the inflammatory response. *Alergologia Polska - Polish Journal of Allergy*, 10(3), 210–219. <https://doi.org/10.5114/pja.2023.131708>
- Hecker, A., Küllmar, 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. *The Journal of Immunology*, 195(5), 2325–2334. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1400974>
- Heller, A. R., Heger, J., Gama de Abreu, M., & Müller, M. P. (2015). Cafedrine/theodrenaline in anaesthesia. *Der Anaesthetist*, 64(3), 190–196. <https://doi.org/10.1007/s00101-015-0005-y>
- Herzyk, D. J., Berger, A. E., Allen, J. N., & Wewers, M. D. (1992). Sandwich ELISA formats designed to detect 17 kDa IL-1 β significantly underestimate 35 kDa IL-1 β . *Journal of Immunological Methods*, 148(1), 243–254. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(92\)90178-V](https://doi.org/10.1016/0022-1759(92)90178-V)
- 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), 1126. <https://doi.org/10.3390/ijms19041126>
- Hodge, G., Hodge, S., & Han, P. (2000). Increased levels of apoptosis of leukocyte subsets in cultured PBMCs compared to whole blood as shown by Annexin V binding: Relevance to cytokine production. *Cytokine*, 12(12), 1763–1768. <https://doi.org/10.1006/cyto.2000.0790>
- 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. <https://doi.org/10.1038/ng756>
- Hokama, Y., & Nakamura, R. M. (1987). C-Reactive protein: Current status and future perspectives. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 1(1), 15–27. <https://doi.org/10.1002/jcla.1860010104>
- Hörkkö, S., Miller, E., Dudl, E., Reaven, P., Curtiss, L. K., Zvaifler, N. J., Terkeltaub, R., Pierangeli, S. S., Branch, D. W., Palinski, W., & Witztum, J. L. (1996). Antiphospholipid antibodies are directed against epitopes of oxidized phospholipids. Recognition of cardiolipin by monoclonal antibodies to epitopes

- of oxidized low density lipoprotein. *Journal of Clinical Investigation*, 98(3), 815–825.
- Horrigan, L. A., Kelly, J. P., & Connor, T. J. (2004). Caffeine suppresses TNF- α production via activation of the cyclic AMP/protein kinase A pathway. *International Immunopharmacology*, 4(10), 1409–1417. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2004.06.005>
- Horrigan, L. A., Kelly, J. P., & Connor, T. J. (2006). Immunomodulatory effects of caffeine: Friend or foe? *Pharmacology & Therapeutics*, 111(3), 877–892. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2006.02.002>
- Huang, Y., Xu, W., & Zhou, R. (2021). NLRP3 inflammasome activation and cell death. *Cellular and Molecular Immunology*, 18(9), 2114–2127. <https://doi.org/10.1038/s41423-021-00740-6>
- Hurwitz, S. (1996). Homeostatic Control of Plasma Calcium Concentration. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 31(1), 41–100. <https://doi.org/10.3109/10409239609110575>
- Ilcol, Y. O., Ozbek, R., Hamurtekin, E., & Ulus, I. H. (2005). Choline status in newborns, infants, children, breast-feeding women, breast-fed infants and human breast milk. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 16(8), 489–499. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2005.01.011>
- Jackson, C. H., MacDonald, N. C., & Cornett, J. W. (1984). Acetaminophen: A practical pharmacologic overview. *Canadian Medical Association Journal*, 131(1), 25–37.
- Janeway, C. A. (1989). Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 54 Pt 1, 1–13. <https://doi.org/10.1101/sqb.1989.054.01.003>
- Janeway, C. A., & Medzhitov, R. (2002). Innate immune recognition. *Annual Review of Immunology*, 20, 197–216. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.20.083001.084359>
- Jiang, L.-H., Caseley, E. A., Muench, S. P., & Roger, S. (2021). Structural basis for the functional properties of the P2X7 receptor for extracellular ATP. *Purinergic Signalling*, 17(3), 331–344. <https://doi.org/10.1007/s11302-021-09790-x>
- Joshi, A., Soni, A., & Acharya, S. (2022). In vitro models and ex vivo systems used in inflammatory bowel disease. *In Vitro Models*, 1(3), 213. <https://doi.org/10.1007/s44164-022-00017-w>
- Kabbani, N., & Nichols, R. A. (2018). Beyond the Channel: Metabotropic Signaling by Nicotinic Receptors. *Trends in Pharmacological Sciences*, 39(4), 354–366. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2018.01.002>
- Kanellopoulos, J. M., & Delarasse, C. (2019). Pleiotropic Roles of P2X7 in the Central Nervous System. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 13, 401. <https://doi.org/10.3389/fncel.2019.00401>
- Kaplan, M. H., & Volanakis, J. E. (1974). Interaction of C-reactive protein complexes with the complement system. I. Consumption of human complement associated with the reaction of C-reactive protein with pneumococcal C-polysaccharide and with the choline phosphatides, lecithin and sphingomyelin. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 112(6), 2135–2147.

- Kawai, T., & Akira, S. (2010). The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: Update on Toll-like receptors. *Nature Immunology*, *11*(5), Article 5. <https://doi.org/10.1038/ni.1863>
- Kayser, S., Brunner, P., Althaus, K., Dorst, J., & Sheriff, A. (2020). Selective Apheresis of C-Reactive Protein for Treatment of Indications with Elevated CRP Concentrations. *Journal of Clinical Medicine*, *9*(9), 2947. <https://doi.org/10.3390/jcm9092947>
- Kendig, D. M., & Tarloff, J. B. (2007). Inactivation of lactate dehydrogenase by several chemicals: Implications for in vitro toxicology studies. *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA*, *21*(1), 125–132. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2006.08.004>
- Khreiss, T., József, L., Potempa, L. A., & Filep, J. G. (2005). Loss of Pentameric Symmetry in C-Reactive Protein Induces Interleukin-8 Secretion Through Peroxynitrite Signaling in Human Neutrophils. *Circulation Research*, *97*(7), 690–697. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000183881.11739.CB>
- Kilpatrick, J. M., & Volanakis, J. E. (1991). Molecular genetics, structure, and function of C-reactive protein. *Immunologic Research*, *10*(1), 43–53. <https://doi.org/10.1007/BF02918166>
- Kimbrell, D. A., & Beutler, B. (2001). The evolution and genetics of innate immunity. *Nature Reviews Genetics*, *2*(4), Article 4. <https://doi.org/10.1038/35066006>
- Kirley, T. L., & Norman, A. B. (2018). Unfolding of IgG domains detected by non-reducing SDS-PAGE. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *503*(2), 944–949. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.06.100>
- Kirschfink, M. (2014). Komplementsystem und Komplementdefekte. *Pädiatrie*, 738–743. https://doi.org/10.1007/978-3-642-41866-2_77
- Klimenkova, O., Ellerbeck, W., Klimiankou, M., Ünal, M., Kandabarau, S., Gigina, A., Hussein, K., Zeidler, C., Welte, K., & Skokowa, J. (2014). A lack of secretory leukocyte protease inhibitor (SLPI) causes defects in granulocytic differentiation. *Blood*, *123*(8), 1239–1249. <https://doi.org/10.1182/blood-2013-06-508887>
- Kushner, I. (2023). C-reactive protein – My perspective on its first half century, 1930–1982. *Frontiers in Immunology*, *14*. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2023.1150103>
- Lahiri, R., Derwa, Y., Bashir, Z., Giles, E., Torrance, H. D. T., Owen, H. C., O’Dwyer, M. J., O’Brien, A., Stagg, A. J., Bhattacharya, S., Foster, G. R., & Alazawi, W. (2016). Systemic Inflammatory Response Syndrome After Major Abdominal Surgery Predicted by Early Upregulation of TLR4 and TLR5. *Annals of Surgery*, *263*(5), 1028. <https://doi.org/10.1097/SLA.0000000000001248>
- Lamkanfi, M., & Dixit, V. M. (2014). Mechanisms and functions of inflammasomes. *Cell*, *157*(5), 1013–1022. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.04.007>
- Lee, G.-S., Subramanian, N., Kim, A. I., Aksentijevich, I., Goldbach-Mansky, R., Sacks, D. B., Germain, R. N., Kastner, D. L., & Chae, J. J. (2012). The calcium-sensing receptor regulates the NLRP3 inflammasome through Ca²⁺ and cAMP. *Nature*, *492*(7427), 123–127. <https://doi.org/10.1038/nature11588>
- Li, Z., & Vance, D. E. (2008). Thematic Review Series: Glycerolipids.

- Phosphatidylcholine and choline homeostasis. *Journal of Lipid Research*, 49(6), 1187–1194. <https://doi.org/10.1194/jlr.R700019-JLR200>
- Low, M., Suresh, H., Zhou, X., Bhuyan, D. J., Alsherbiny, M. A., Khoo, C., Münch, G., & Li, C. G. (2024). The wide spectrum anti-inflammatory activity of andrographolide in comparison to NSAIDs: A promising therapeutic compound against the cytokine storm. *PLOS ONE*, 19(7), e0299965. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0299965>
- Lu, C., Liu, D., Liu, H., & Motchnik, P. (2013). Characterization of monoclonal antibody size variants containing extra light chains. *mAbs*, 5(1), 102–113. <https://doi.org/10.4161/mabs.22965>
- Lubbers, R., van Essen, M. F., van Kooten, C., & Trouw, L. A. (2017). Production of complement components by cells of the immune system. *Clinical and Experimental Immunology*, 188(2), 183–194. <https://doi.org/10.1111/cei.12952>
- Luhulima, D. E. J., Ronny, ., & Amelia, R. (2022). Procalcitonin as a Marker of Sepsis Due to Bacterial Infection. *Journal of Complementary and Alternative Medical Research*, 66–76. <https://doi.org/10.9734/jocamr/2022/v18i230363>
- Luo, B., Liao, Q., Zheng, J., Hu, W., Yao, X., Li, Y., & Wang, J. (2022). The ratio of serum C-reactive protein level on postoperative day 3 to day 2 is a good marker to predict postoperative complications after laparoscopic radical gastrectomy for gastric cancer. *Langenbeck's Archives of Surgery*, 1–10. <https://doi.org/10.1007/s00423-022-02469-w>
- Mantovani, A., Dinarello, C. A., Molgora, M., & Garlanda, C. (2019). IL-1 and related cytokines in innate and adaptive immunity in health and disease. *Immunity*, 50(4), 778–795. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2019.03.012>
- Mantovani, A., & Garlanda, C. (2023). Humoral Innate Immunity and Acute-Phase Proteins. *The New England Journal of Medicine*, 388(5), 439–452. <https://doi.org/10.1056/NEJMra2206346>
- Mantovani, A., Garlanda, C., Doni, A., & Bottazzi, B. (2008). Pentraxins in Innate Immunity: From C-Reactive Protein to the Long Pentraxin PTX3. *Journal of Clinical Immunology*, 28(1), 1–13. <https://doi.org/10.1007/s10875-007-9126-7>
- Markiewski, M. M., DeAngelis, R. A., & Lambris, J. D. (2008). Complexity of complement activation in sepsis. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 12(6a), 2245–2254. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2008.00504.x>
- Martinon, F., Mayor, A., & Tschopp, J. (2009). The inflammasomes: Guardians of the body. *Annual review of immunology*, 27, 229–265. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.021908.132715>
- Mathew, J., Sankar, P., & Varacallo, M. (2024). Physiology, Blood Plasma. In *StatPearls*. StatPearls Publishing. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK531504/>
- Matzinger, P. (1994). Tolerance, danger, and the extended family. *Annual Review of Immunology*, 12, 991–1045. <https://doi.org/10.1146/annurev.iy.12.040194.005015>
- McCarthy, A. E., Yoshioka, C., & Mansoor, S. E. (2019). Full-Length P2X7 Structures Reveal How Palmitoylation Prevents Channel Desensitization. *Cell*, 179(3), 659–670.e13. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.09.017>

- Meyer, M. M., Brandenburg, L., Hudel, H., Agné, A., Padberg, W., Erdogan, A., Nef, H., Amati, A.-L., Dörr, O., Witte, B., & Grau, V. (2020). Who Is Afraid of CRP? Elevated Preoperative CRP Levels Might Attenuate the Increase in Inflammatory Parameters in Response to Lung Cancer Surgery. *Journal of Clinical Medicine*, *9*(10), 3340. <https://doi.org/10.3390/jcm9103340>
- Mold, C., Gewurz, H., & Du Clos, T. W. (1999). Regulation of complement activation by C-reactive protein. *Immunopharmacology*, *42*(1–3), 23–30. [https://doi.org/10.1016/S0162-3109\(99\)00007-7](https://doi.org/10.1016/S0162-3109(99)00007-7)
- Moran, J. H., & Schnellmann, R. G. (1996). A rapid beta-NADH-linked fluorescence assay for lactate dehydrogenase in cellular death. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, *36*(1), 41–44. [https://doi.org/10.1016/1056-8719\(96\)00071-8](https://doi.org/10.1016/1056-8719(96)00071-8)
- Müller, S., Kröger, C., Schultze, J. L., & Aschenbrenner, A. C. (2024). Whole blood stimulation as a tool for studying the human immune system. *European Journal of Immunology*, *54*(2), 2350519. <https://doi.org/10.1002/eji.202350519>
- Nascimento, C. R., Rodrigues Fernandes, N. A., Gonzalez Maldonado, L. A., & Rossa Junior, C. (2022). Comparison of monocytic cell lines U937 and THP-1 as macrophage models for in vitro studies. *Biochemistry and Biophysics Reports*, *32*, 101383. <https://doi.org/10.1016/j.bbrep.2022.101383>
- Netea, M. G., Nold-Petry, C. A., Nold, M. F., Joosten, L. A. B., Opitz, B., Meer, J. H. M. van der, Veerdonk, F. L. van de, Ferwerda, G., Heinhuis, B., Devesa, I., Funk, C. J., Mason, R. J., Kullberg, B. J., Rubartelli, A., Meer, J. W. M. van der, & Dinarello, C. A. (2008). Differential requirement for the activation of the inflammasome for processing and release of IL-1 β in monocytes and macrophages. *Blood*, *113*(10), 2324. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-03-146720>
- Newling, M., Sritharan, L., Ham, A. J. van der, Hoepel, W., Fiechter, R. H., Boer, L. de, Zaat, S. A. J., Bisoendial, R. J., Baeten, D. L. P., Everts, B., & Dunnen, J. den. (2019). C-Reactive Protein Promotes Inflammation through Fc γ R-Induced Glycolytic Reprogramming of Human Macrophages. *The Journal of Immunology*, *203*(1), 225–235. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1900172>
- Ngwa, D. N., Pathak, A., & Agrawal, A. (2022). IL-6 regulates induction of C-reactive protein gene expression by activating STAT3 isoforms. *Molecular Immunology*, *146*, 50–56. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2022.04.003>
- Niranjan, R., Sumitha, M. K., Sankari, T., Muthukumaravel, S., & Jambulingam, P. (2019). Nonstructural protein-1 (NS1) of dengue virus type-2 differentially stimulate expressions of matrix metalloproteinases in monocytes: Protective effect of paracetamol. *International Immunopharmacology*, *73*, 270–279. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2019.05.022>
- Noone, D. P., van der Velden, T. T., & Sharp, T. H. (2021). Cryo-Electron Microscopy and Biochemical Analysis Offer Insights Into the Effects of Acidic pH, Such as Occur During Acidosis, on the Complement Binding Properties of C-Reactive Protein. *Frontiers in Immunology*, *12*, 5279. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.757633>

- Okemefuna, A. I., Stach, L., Rana, S., Buetas, A. J. Z., Gor, J., & Perkins, S. J. (2009). C-reactive Protein Exists in an NaCl Concentration-dependent Pentamer-Decamer Equilibrium in Physiological Buffer. *The Journal of Biological Chemistry*, 285(2), 1041. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.044495>
- Olson, M. E., Hornick, M. G., Stefanski, A., Albanna, H. R., Gjoni, A., Hall, G. D., Hart, P. C., Rajab, I. M., & Potempa, L. A. (2023). A biofunctional review of C-reactive protein (CRP) as a mediator of inflammatory and immune responses: Differentiating pentameric and modified CRP isoform effects. *Frontiers in Immunology*, 14. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2023.1264383>
- Osmand, A. P., Friedenson, B., Gewurz, H., Painter, R. H., Hofmann, T., & Shelton, E. (1977). Characterization of C-reactive protein and the complement subcomponent C1t as homologous proteins displaying cyclic pentameric symmetry (pentraxins). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 74(2), 739–743. <https://doi.org/10.1073/pnas.74.2.739>
- Paggi, J. M., Pandit, A., & Dror, R. O. (2024). The Art and Science of Molecular Docking. *Annual Review of Biochemistry*, 93(1), 389–410. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-030222-120000>
- Paik, S., Kim, J. K., Silwal, P., Sasakawa, C., & Jo, E.-K. (2021). An update on the regulatory mechanisms of NLRP3 inflammasome activation. *Cellular & Molecular Immunology*, 18(5), Article 5. <https://doi.org/10.1038/s41423-021-00670-3>
- Palmer, H., Graham, G., Williams, K., & Day, R. (2010). A Risk-Benefit Assessment of Paracetamol (Acetaminophen) Combined with Caffeine. *Pain Medicine*, 11(6), 951–965. <https://doi.org/10.1111/j.1526-4637.2010.00867.x>
- Pathak, A., & Agrawal, A. (2019). Evolution of C-Reactive Protein. *Frontiers in Immunology*, 10. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2019.00943>
- Pelegriin, P. (2021). P2X7 receptor and the NLRP3 inflammasome: Partners in crime. *Biochemical Pharmacology*, 187, 114385. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2020.114385>
- Pepys, M. B., & Hirschfield, G. M. (2003). C-reactive protein: A critical update. *Journal of Clinical Investigation*, 111(12), 1805–1812. <https://doi.org/10.1172/JCI200318921>
- Pepys, M. B., Hirschfield, G. M., Tennent, G. A., Ruth Gallimore, J., Kahan, M. C., Bellotti, V., Hawkins, P. N., Myers, R. M., Smith, M. D., Polara, A., Cobb, A. J. A., Ley, S. V., Andrew Aquilina, J., Robinson, C. V., Sharif, I., Gray, G. A., Sabin, C. A., Jenvey, M. C., Kolstoe, S. E., ... Wood, S. P. (2006). Targeting C-reactive protein for the treatment of cardiovascular disease. *Nature*, 440(7088), Article 7088. <https://doi.org/10.1038/nature04672>
- Plat, V. D., Voeten, D. M., Daams, F., Peet, D. L. van der, & Straatman, J. (2021). C-reactive protein after major abdominal surgery in daily practice. *Surgery*, 170(4), 1131–1139. <https://doi.org/10.1016/j.surg.2021.04.025>
- Potempa, L. A., Siegel, J. N., Fiedel, B. A., Potempa, R. T., & Gewurz, H. (1987). Expression, detection and assay of a neoantigen (Neo-CRP) associated with a free,

- human C-reactive protein subunit. *Molecular Immunology*, 24(5), 531–541. [https://doi.org/10.1016/0161-5890\(87\)90028-9](https://doi.org/10.1016/0161-5890(87)90028-9)
- Pott, G. B., Chan, E. D., Dinarello, C. A., & Shapiro, L. (2009). α -1-Antitrypsin is an endogenous inhibitor of proinflammatory cytokine production in whole blood. *Journal of Leukocyte Biology*, 85(5), 886–895. <https://doi.org/10.1189/jlb.0208145>
- Rai, V., Mathews, G., & Agrawal, D. K. (2022). Translational and Clinical Significance of DAMPs, PAMPs, and PRRs in Trauma-induced Inflammation. *Archives of Clinical and Biomedical Research*, 6(5), 673–685.
- Richter, K., Asci, N., Singh, V. K., Yakoob, S. H., Meixner, M., Zakrzewicz, A., Liese, J., Hecker, A., Wilker, S., Stumpf, S., Schlüter, K.-D., Rohde, M., Gödecke, A., Padberg, W., Manzini, I., Schmalzing, G., & Grau, V. (2023). Activation of endothelial NO synthase and P2X7 receptor modification mediates the cholinergic control of ATP-induced interleukin-1 β release by mononuclear phagocytes. *Frontiers in Immunology*, 14, 1140592. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1140592>
- Richter, K., & Grau, V. (2023). Signaling of nicotinic acetylcholine receptors in mononuclear phagocytes. *Pharmacological Research*, 191, 106727. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2023.106727>
- Richter, K., Herz, S. M., Stokes, C., Damaj, M. I., Grau, V., & Papke, R. L. (2023). Pharmacological profiles and anti-inflammatory activity of pCN-diEPP and mCN-diEPP, new α 9 α 10 nicotinic receptor ligands. *Neuropharmacology*, 240, 109717. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2023.109717>
- 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(1), 28660. <https://doi.org/10.1038/srep28660>
- Richter, K., Ogiemwonyi-Schaefer, R., Wilker, S., Chaveiro, A. I., Agné, A., Hecker, M., Reichert, M., Amati, A.-L., Schlüter, K.-D., Manzini, I., Schmalzing, G., McIntosh, J. M., Padberg, W., Grau, V., & Hecker, A. (2020). Amyloid Beta Peptide (A β 1-42) Reverses the Cholinergic Control of Monocytic IL-1 β Release. *Journal of Clinical Medicine*, 9(9), 2887. <https://doi.org/10.3390/jcm9092887>
- Richter, K., Papke, R. L., Stokes, C., Roy, D. C., Espinosa, E. S., Wolf, P. M. K., Hecker, A., Liese, J., Singh, V. K., Padberg, W., Schlüter, K.-D., Rohde, M., McIntosh, J. M., Morley, B. J., Horenstein, N. A., Grau, V., & Simard, A. R. (2022). Comparison of the Anti-inflammatory Properties of Two Nicotinic Acetylcholine Receptor Ligands, Phosphocholine and pCF3-diEPP. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 16, 779081. <https://doi.org/10.3389/fncel.2022.779081>
- 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. (2018). C-Reactive Protein Stimulates Nicotinic Acetylcholine Receptors to Control ATP-Mediated Monocytic Inflammasome

- Activation. *Frontiers in Immunology*, 9, 1604. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01604>
- Riera Romo, M., Pérez-Martínez, D., & Castillo Ferrer, C. (2016). Innate immunity in vertebrates: An overview. *Immunology*, 148(2), 125–139. <https://doi.org/10.1111/imm.12597>
- Ries, W., Torzewski, J., Heigl, F., Pfluecke, C., Kelle, S., Darius, H., Ince, H., Mitzner, S., Nordbeck, P., Butter, C., Skarabis, H., Sheriff, A., & Garlich, C. D. (2021). C-Reactive Protein Apheresis as Anti-inflammatory Therapy in Acute Myocardial Infarction: Results of the CAMI-1 Study. *Frontiers in Cardiovascular Medicine*, 8, 591714. <https://doi.org/10.3389/fcvm.2021.591714>
- Rizo-Téllez, S. A., Sekheri, M., & Filep, J. G. (2023). C-reactive protein: A target for therapy to reduce inflammation. *Frontiers in Immunology*, 14. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2023.1237729>
- Rzychon, M., Zegers, I., & Schimmel, H. (2010). Analysis of the Physicochemical State of C-Reactive Protein in Different Preparations Including 2 Certified Reference Materials. *Clinical Chemistry*, 56(9), 1475–1482. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2010.147124>
- Sarma, J. V., & Ward, P. A. (2011). The complement system. *Cell and Tissue Research*, 343(1), 227–235. <https://doi.org/10.1007/s00441-010-1034-0>
- Schägger, H., Cramer, W. A., & von Jagow, G. (1994). Analysis of molecular masses and oligomeric states of protein complexes by blue native electrophoresis and isolation of membrane protein complexes by two-dimensional native electrophoresis. *Analytical Biochemistry*, 217(2), 220–230. <https://doi.org/10.1006/abio.1994.1112>
- Schägger, H., & von Jagow, G. (1991). Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form. *Analytical Biochemistry*, 199(2), 223–231. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(91\)90094-a](https://doi.org/10.1016/0003-2697(91)90094-a)
- Sharma, R., & Sharma, S. (2024). Physiology, Blood Volume. In *StatPearls*. StatPearls Publishing. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK526077/>
- Shrive, A. K., Gheetham, G. M. T., Holden, D., Myles, D. A. A., Turnell, W. G., Volanakis, J. E., Pepys, M. B., Bloomer, A. C., & Greenhough, T. J. (1996). Three dimensional structure of human C-reactive protein. *Nature Structural Biology*, 3(4), 346–354. <https://doi.org/10.1038/nsb0496-346>
- Siebers, K., Fink, B., Zakrzewicz, A., Agné, A., Richter, K., Konzok, S., Hecker, A., Zukunft, S., Küllmar, 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-1 β via CD36 and Nicotinic Acetylcholine Receptors. *Frontiers in Immunology*, 9, 877. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00877>
- Sikora, J. P., Karawani, J., & Sobczak, J. (2023). Neutrophils and the Systemic Inflammatory Response Syndrome (SIRS). *International Journal of Molecular Sciences*, 24(17), Article 17. <https://doi.org/10.3390/ijms241713469>
- Singer, M., Deutschman, C. S., Seymour, C. W., Shankar-Hari, M., Annane, D., Bauer, M., Bellomo, R., Bernard, G. R., Chiche, J.-D., Cooper-Smith, 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. <https://doi.org/10.1001/jama.2016.0287>
- Singh, S. K., Suresh, M. V., Hammond, D. J., Rusiñol, A. E., Potempa, L. A., & Agrawal, A. (2009). Binding of the monomeric form of C-reactive protein to enzymatically-modified low-density lipoprotein: Effects of phosphoethanolamine. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*, *406*(1–2), 151–155. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2009.06.018>
- Sproston, N. R., & Ashworth, J. J. (2018). Role of C-Reactive Protein at Sites of Inflammation and Infection. *Frontiers in Immunology*, *9*, 754. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00754>
- Stoecklein, V. M., Osuka, A., & Lederer, J. A. (2012). Trauma equals danger—Damage control by the immune system. *Journal of Leukocyte Biology*, *92*(3), 539–551. <https://doi.org/10.1189/jlb.0212072>
- Sumner, L. W., Amberg, A., Barrett, D., Beale, M. H., Berger, R., Daykin, C. A., Fan, T. W.-M., Fiehn, O., Goodacre, R., Griffin, J. L., Hankemeier, T., Hardy, N., Harnly, J., Higashi, R., Kopka, J., Lane, A. N., Lindon, J. C., Marriott, P., Nicholls, A. W., ... Viant, M. R. (2007). Proposed minimum reporting standards for chemical analysis. *Metabolomics*, *3*(3), 211–221. <https://doi.org/10.1007/s11306-007-0082-2>
- Sundström, C., & Nilsson, K. (1976). Establishment and characterization of a human histiocytic lymphoma cell line (U-937). *International Journal of Cancer*, *17*(5), 565–577. <https://doi.org/10.1002/ijc.2910170504>
- Surbatovic, M., Veljovic, M., Jevdjic, J., Popovic, N., Djordjevic, D., & Radakovic, S. (2013). Immunoinflammatory response in critically ill patients: Severe sepsis and/or trauma. *Mediators of Inflammation*, *2013*, 362793. <https://doi.org/10.1155/2013/362793>
- Surprenant, A., Rassendren, F., Kawashima, E., North, R. A., & Buell, G. (1996). The cytolytic P2Z receptor for extracellular ATP identified as a P2X receptor (P2X7). *Science (New York, N.Y.)*, *272*(5262), 735–738. <https://doi.org/10.1126/science.272.5262.735>
- Svanberg, C., Enocsson, H., Govender, M., Martinsson, K., Potempa, L. A., Rajab, I. M., Fernandez-Botran, R., Wetterö, J., Larsson, M., & Sjöwall, C. (2023). Conformational state of C-reactive protein is critical for reducing immune complex-triggered type I interferon response: Implications for pathogenic mechanisms in autoimmune diseases imprinted by type I interferon gene dysregulation. *Journal of Autoimmunity*, *135*, 102998. <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2023.102998>
- Swamy, M., Siegers, G. M., Minguet, S., Wollscheid, B., & Schamel, W. W. A. (2006). Blue native polyacrylamide gel electrophoresis (BN-PAGE) for the identification and analysis of multiprotein complexes. *Science's STKE: Signal Transduction Knowledge Environment*, *2006*(345), pl4. <https://doi.org/10.1126/stke.3452006pl4>

- Swanson, K. V., Deng, M., & Ting, J. P.-Y. (2019). The NLRP3 inflammasome: Molecular activation and regulation to therapeutics. *Nature Reviews Immunology*, *19*(8), 477–489. <https://doi.org/10.1038/s41577-019-0165-0>
- Talapatra, S. N., Talukdar, P., & Swarnakar, S. (2017). Interaction between C-Reactive Protein and Phytochemical(s) from *Calotropis procera*: An Approach on Molecular Docking. *International Letters of Natural Sciences*, *61*, 43–55. <https://doi.org/10.56431/p-t4u7rw>
- Taylor, K. E., & van den Berg, C. W. (2007). Structural and functional comparison of native pentameric, denatured monomeric and biotinylated C-reactive protein. *Immunology*, *120*(3), 404–411. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2006.02516.x>
- Thiele, J. R., Habersberger, J., Braig, D., Schmidt, Y., Goerendt, K., Maurer, V., Bannasch, H., Scheichl, A., Woollard, K. J., von Dobschütz, E., Kolodgie, F., Virmani, R., Stark, G. B., Peter, K., & Eisenhardt, S. U. (2014). Dissociation of Pentameric to Monomeric C-Reactive Protein Localizes and Aggravates Inflammation. *Circulation*, *130*(1), 35–50. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.113.007124>
- Thompson, D., Pepys, M. B., & Wood, S. P. (1999). The physiological structure of human C-reactive protein and its complex with phosphocholine. *Structure*, *7*(2), 169–177. [https://doi.org/10.1016/S0969-2126\(99\)80023-9](https://doi.org/10.1016/S0969-2126(99)80023-9)
- Thurm, C. W., & Halsey, J. F. (2005). Measurement of Cytokine Production Using Whole Blood. *Current Protocols in Immunology*, *66*(1), 7.18B.1-7.18B.12. <https://doi.org/10.1002/0471142735.im0718bs66>
- Tillett, W. S., & Francis, T. (1930). Serological reactions in pneumonia with a non-protein somatic fraction of *Pneumococcus*. *Journal of Experimental Medicine*, *52*(4), 561–571. <https://doi.org/10.1084/jem.52.4.561>
- Tran, T. A. T., Grievink, H. W., Lipinska, K., Kluft, C., Burggraaf, J., Moerland, M., Tasev, D., & Malone, K. E. (2019). Whole blood assay as a model for in vitro evaluation of inflammasome activation and subsequent caspase-mediated interleukin-1 beta release. *PLoS ONE*, *14*(4), e0214999. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0214999>
- Tsuchiya, S., Yamabe, M., Yamaguchi, Y., Kobayashi, Y., Konno, T., & Tada, K. (1980). Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1). *International journal of cancer*, *26*(2), 171–176. <https://doi.org/10.1002/ijc.2910260208>
- van der Zanden, E. P., Hilbers, F. W., Verseijden, C., van den Wijngaard, R. M., Skynner, M., Lee, K., Ulloa, L., Boeckxstaens, G. E., & de Jonge, W. J. (2012). Nicotinic Acetylcholine Receptor Expression and Susceptibility to Cholinergic Immunomodulation in Human Monocytes of Smoking Individuals. *Neuroimmunomodulation*, *19*(4), 255–265. <https://doi.org/10.1159/000335185>
- Verdonk, F., Einhaus, J., Tsai, A. S., Hedou, J., Choisy, B., Gaudilliere, D., Kin, C., Aghaeepour, N., Angst, M. S., & Gaudilliere, B. (2021). Measuring the human immune response to surgery: Multiomics for the prediction of postoperative outcomes. *Current Opinion in Critical Care*, *27*(6), 717. <https://doi.org/10.1097/MCC.0000000000000883>

- Vladimer, G. I., Marty-Roix, R., Ghosh, S., Weng, D., & Lien, E. (2013). Inflammasomes and host defenses against bacterial infections. *Current Opinion in Microbiology*, *16*(1), 23–31. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2012.11.008>
- Volanakis, J. E. (2001). Human C-reactive protein: Expression, structure, and function. *Molecular Immunology*, *38*(2), 189–197. [https://doi.org/10.1016/S0161-5890\(01\)00042-6](https://doi.org/10.1016/S0161-5890(01)00042-6)
- Volanakis, J. E., & Kaplan, M. H. (1971). Specificity of C-Reactive Protein for Choline Phosphate Residues of Pneumococcal C-Polysaccharide. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, *136*(2), 612–614. <https://doi.org/10.3181/00379727-136-35323>
- 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 $\alpha 7$ subunit is an essential regulator of inflammation. *Nature*, *421*(6921), Article 6921. <https://doi.org/10.1038/nature01339>
- Wang, J., Tang, B., Liu, X., Wu, X., Wang, H., Xu, D., & Guo, Y. (2015). Increased monomeric CRP levels in acute myocardial infarction: A possible new and specific biomarker for diagnosis and severity assessment of disease. *Atherosclerosis*, *239*(2), 343–349. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2015.01.024>
- Williams, R. D., Moran, J. A., Fryer, A. A., Littlejohn, J. R., Williams, H. M., Greenhough, T. J., & Shrive, A. K. (2020). Monomeric C-Reactive Protein in Serum With Markedly Elevated CRP Levels Shares Common Calcium-Dependent Ligand Binding Properties With an in vitro Dissociated Form of C-Reactive Protein. *Frontiers in Immunology*, *11*. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2020.00115>
- Wittig, I., Braun, H.-P., & Schägger, H. (2006). Blue native PAGE. *Nature Protocols*, *1*(1), 418–428. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.62>
- Yang, B., Pham, T.-H., Goldbach-Mansky, R., & Gadina, M. (2011). Accurate and Simple Measurement of the Pro-inflammatory Cytokine IL-1 β using a Whole Blood Stimulation Assay. *Journal of Visualized Experiments: JoVE*, *49*, 2662. <https://doi.org/10.3791/2662>
- Yeh, E. T. H., & Willerson, J. T. (2003). Coming of age of C-reactive protein: Using inflammation markers in cardiology. *Circulation*, *107*(3), 370–371. <https://doi.org/10.1161/01.cir.0000053731.05365.5a>
- Young, M. T., Pelegrin, P., & Surprenant, A. (2007). Amino Acid Residues in the P2X7 Receptor that Mediate Differential Sensitivity to ATP and BzATP. *Molecular Pharmacology*, *71*(1), 92–100. <https://doi.org/10.1124/mol.106.030163>
- Yuan, Y., Yang, Y., Lei, X., & Dong, W. (2022). Caffeine and bronchopulmonary dysplasia: Clinical benefits and the mechanisms involved. *Pediatric Pulmonology*, *57*(6), 1392–1400. <https://doi.org/10.1002/ppul.25898>
- 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 $\alpha 7$, $\alpha 9$ and $\alpha 10$. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, *11*, 189. <https://doi.org/10.3389/fncel.2017.00189>
- Zakrzewicz, A., Richter, K., Zakrzewicz, D., Siebers, K., Damm, J., Agn , 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. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00664>
- Zeller, J., Cheung Tung Shing, K. S., Nero, T. L., McFadyen, J. D., Krippner, G., Bogner, B., Kreuzaler, S., Kiefer, J., Horner, V. K., Braig, D., Danish, H., Baratchi, S., Fricke, M., Wang, X., Kather, M. G., Kammerer, B., Woollard, K. J., Sharma, P., Morton, C. J., ... Eisenhardt, S. U. (2022). A novel phosphocholine-mimetic inhibits a pro-inflammatory conformational change in C-reactive protein. *EMBO Molecular Medicine*, *n/a(n/a)*, e16236. <https://doi.org/10.15252/emmm.202216236>
- Zhang, L., Li, H.-Y., Li, W., Shen, Z.-Y., Wang, Y.-D., Ji, S.-R., & Wu, Y. (2018). An ELISA Assay for Quantifying Monomeric C-Reactive Protein in Plasma. *Frontiers in Immunology*, *9*, 511. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00511>
- Zhao, W., Ma, L., Cai, C., & Gong, X. (2019). Caffeine Inhibits NLRP3 Inflammasome Activation by Suppressing MAPK/NF- κ B and A2aR Signaling in LPS-Induced THP-1 Macrophages. *International Journal of Biological Sciences*, *15*(8), 1571. <https://doi.org/10.7150/ijbs.34211>
- Zoli, M., Pucci, S., Vilella, A., & Gotti, C. (2018). Neuronal and Extraneuronal Nicotinic Acetylcholine Receptors. *Current Neuropharmacology*, *16*(4), 338–349. <https://doi.org/10.2174/1570159X15666170912110450>

ANHANG**ERGÄNZENDE TABELLEN**

Ergänzende Tabelle 1: LDH-Aktivität [%] in Zellkulturüberständen humaner PBMCs aus präoperativen Patientenplasmen. Periphere Blutproben wurden präoperativ von Patienten vor elektiven viszeralchirurgischen Eingriffen gewonnen und das Blutplasma isoliert. Frisch isolierte periphere mononukleäre Blutzellen (englisch: *peripheral blood mononuclear cells*, PBMCs; 5×10^5 Zellen/0,15 ml) wurden mit Lipopolysaccharid (LPS; 5 ng/ml, 3 Stunden) voraktiviert und mit 2'(3')-O-4-Benzoyl-benzoyl)adenosin-5'-triphosphat (BzATP; 100 μ M, 40 Minuten) behandelt. Kurz vor der Stimulation mit BzATP wurden Substanzen zu den Zellen gegeben. Die Laktatdehydrogenase (LDH)-Aktivität wurde in den Zellkulturüberständen gemessen. n, Anzahl einzelner Experimente.

| Reagenzien | Median (Min - Max) [%] | n |
|---|------------------------|----|
| LPS | 3,0 (1,2 - 10,6) | 13 |
| LPS, BzATP | 4,5 (0,7 - 14,1) | 13 |
| LPS, BzATP, Plasma 1:640 | 3,7 (0,0 - 13,4) | 12 |
| LPS, BzATP, Plasma 1:320 | 2,8 (0,0 - 11,9) | 12 |
| LPS, BzATP, Plasma 1:160 | 1,3 (0,0 - 15,8) | 12 |
| LPS, BzATP, Plasma 1:80 | 2,5 (0,0 - 11,7) | 12 |
| LPS, BzATP, Plasma 1:40 | 0,9 (0,0 - 12,8) | 13 |
| LPS, BzATP, Plasma 1:20 | 2,6 (0,0 - 12,0) | 13 |
| LPS, BzATP, Plasma 1:10 | 2,2 (0,0 - 12,0) | 13 |
| LPS, BzATP, Plasma 1:5 | 0,0 (0,0 - 23,4) | 13 |
| LPS, BzATP, Plasma 1:640 + PC 1 μ M | 0,6 (0,0 - 9,7) | 11 |
| LPS, BzATP, Plasma 1:320 + PC 1 μ M | 1,3 (0,0 - 9,3) | 11 |
| LPS, BzATP, Plasma 1:160 + PC 1 μ M | 0,7 (0,0 - 10,6) | 11 |
| LPS, BzATP, Plasma 1:80 + PC 1 μ M | 0,8 (0,0 - 13,1) | 11 |
| LPS, BzATP, Plasma 1:40 + PC 1 μ M | 1,9 (0,0 - 11,9) | 11 |
| LPS, BzATP, Plasma 1:20 + PC 1 μ M | 0,0 (0,0 - 12,5) | 11 |
| LPS, BzATP, Plasma 1:10 + PC 1 μ M | 0,0 (0,0 - 10,3) | 11 |
| LPS, BzATP, Plasma 1:5 + PC 1 μ M | 0,0 (0,0 - 14,2) | 11 |

Ergänzende Tabelle 2: LDH-Aktivität [%] in Zellkulturüberständen humaner PBMCs aus Patientenplasmen am postoperativen Tag zwei. Periphere Blutproben wurden am postoperativen Tag 2 von Patienten nach elektiven viszeralchirurgischen Eingriffen gewonnen und das Blutplasma isoliert. Frisch isolierte periphere mononukleäre Blutzellen (englisch: *peripheral blood mononuclear cells*, PBMCs; 5×10^5 Zellen/0,15 ml) wurden mit Lipopolysaccharid (LPS; 5 ng/ml, 3 Stunden) voraktiviert und mit 2'(3')-O-4-Benzoylbenzoyl)adenosin-5'-triphosphat (BzATP; 100 μ M, 40 Minuten) behandelt. Kurz vor der Stimulation mit BzATP wurden Substanzen zu den Zellen gegeben. Die Laktatdehydrogenase (LDH)-Aktivität wurde in den Zellkulturüberständen gemessen. n, Anzahl einzelner Experimente.

| Reagenzien | Median (Min - Max) [%] | n |
|---|------------------------|----|
| LPS | 6,2 (1,6 - 18,3) | 13 |
| LPS, BzATP | 5,3 (0,3 - 13,0) | 13 |
| LPS, BzATP, Plasma 1:640 | 1,8 (0,0 - 14,2) | 13 |
| LPS, BzATP, Plasma 1:320 | 5,1 (0,0 - 15,9) | 13 |
| LPS, BzATP, Plasma 1:160 | 4,1 (0,0 - 12,1) | 14 |
| LPS, BzATP, Plasma 1:80 | 6,5 (0,0 - 18,6) | 14 |
| LPS, BzATP, Plasma 1:40 | 3,9 (0,0 - 31,1) | 14 |
| LPS, BzATP, Plasma 1:20 | 1,9 (0,0 - 24,1) | 14 |
| LPS, BzATP, Plasma 1:10 | 0,1 (0,0 - 10,9) | 14 |
| LPS, BzATP, Plasma 1:5 | 0,0 (0,0 - 18,0) | 14 |
| LPS, BzATP, Plasma 1:640 + PC 1 μ M | 2,5 (0,0 - 9,3) | 13 |
| LPS, BzATP, Plasma 1:320 + PC 1 μ M | 1,5 (0,0 - 13,2) | 13 |
| LPS, BzATP, Plasma 1:160 + PC 1 μ M | 4,6 (0,0 - 15,9) | 14 |
| LPS, BzATP, Plasma 1:80 + PC 1 μ M | 6,0 (0,0 - 23,6) | 14 |
| LPS, BzATP, Plasma 1:40 + PC 1 μ M | 5,5 (0,0 - 23,8) | 14 |
| LPS, BzATP, Plasma 1:20 + PC 1 μ M | 2,5 (0,0 - 14,5) | 14 |
| LPS, BzATP, Plasma 1:10 + PC 1 μ M | 0,0 (0,0 - 8,1) | 14 |
| LPS, BzATP, Plasma 1:5 + PC 1 μ M | 0,0 (0,0 - 15,6) | 14 |

Ergänzende Tabelle 3: LDH-Aktivität [%] in Zellkulturüberständen humaner PBMCs aus Patientenplasmen am postoperativen Tag fünf. Periphere Blutproben wurden am postoperativen Tag 5 von Patienten nach elektiven viszeralchirurgischen Eingriffen gewonnen und das Blutplasma isoliert. Frisch isolierte periphere mononukleäre Blutzellen (englisch: *peripheral blood mononuclear cells*, PBMCs; 5×10^5 Zellen/0,15 ml) wurden mit Lipopolysaccharid (LPS; 5 ng/ml, 3 Stunden) voraktiviert und mit 2'(3')-O-4-Benzoylbenzoyl)adenosin-5'-triphosphat (BzATP; 100 μ M, 40 Minuten) behandelt. Kurz vor der Stimulation mit BzATP wurden Substanzen zu den Zellen gegeben. Die Laktatdehydrogenase (LDH)-Aktivität wurde in den Zellkulturüberständen gemessen. n, Anzahl einzelner Experimente.

| Reagenzien | Median (Min - Max) [%] | n |
|---|------------------------|----|
| LPS | 3,7 (1,1 - 9,4) | 11 |
| LPS, BzATP | 4,6 (0,5 - 14,1) | 11 |
| LPS, BzATP, Plasma 1:640 | 2,7 (0,0 - 15,4) | 11 |
| LPS, BzATP, Plasma 1:320 | 3,5 (0,0 - 19,4) | 11 |
| LPS, BzATP, Plasma 1:160 | 7,3 (0,0 - 25,2) | 11 |
| LPS, BzATP, Plasma 1:80 | 2,9 (0,0 - 19,4) | 11 |
| LPS, BzATP, Plasma 1:40 | 7,1 (0,0 - 20,6) | 12 |
| LPS, BzATP, Plasma 1:20 | 3,7 (0,0 - 25,2) | 12 |
| LPS, BzATP, Plasma 1:10 | 1,8 (0,0 - 24,6) | 12 |
| LPS, BzATP, Plasma 1:5 | 0,0 (0,0 - 12,3) | 12 |
| LPS, BzATP, Plasma 1:640 + PC 1 μ M | 2,9 (0,0 - 11,4) | 11 |
| LPS, BzATP, Plasma 1:320 + PC 1 μ M | 1,2 (0,0 - 12,8) | 11 |
| LPS, BzATP, Plasma 1:160 + PC 1 μ M | 3,4 (0,0 - 21,7) | 11 |
| LPS, BzATP, Plasma 1:80 + PC 1 μ M | 1,7 (0,0 - 18,9) | 11 |
| LPS, BzATP, Plasma 1:40 + PC 1 μ M | 3,6 (0,0 - 18,3) | 11 |
| LPS, BzATP, Plasma 1:20 + PC 1 μ M | 3,0 (0,0 - 24,0) | 11 |
| LPS, BzATP, Plasma 1:10 + PC 1 μ M | 0,0 (0,0 - 12,7) | 11 |
| LPS, BzATP, Plasma 1:5 + PC 1 μ M | 0,0 (0,0 - 24,0) | 11 |

Ergänzende Tabelle 4: Docking-Scores der mittels AutoDock Vina und *Attracting Cavities* vorhergesagten Interaktion von Liganden mit CRP. Für das Docking mittels AutoDock Vina und *Attracting Cavities* über den SwissDock-Server wurden ein Protomer des C-reaktiven Proteins (CRP; PDB-Code 1GNH, *chain A*) sowie die *simplified molecular input line entry system* (SMILES)-Strukturcodes der jeweiligen Liganden (Phosphocholin: PubChem-ID 1014; Koffein: PubChem-ID 2519; Paracetamol (Acetaminophen): PubChem-ID 1983) eingesetzt.

| Docking-Programm | Substanz | Rang 1 | Rang 2 | Rang 3 |
|----------------------------|---------------|-----------------------------------|---------|---------|
| | | Berechnete Affinität [kcal/mol] | | |
| AutoDock Vina | Phosphocholin | -3,78 | -3,62 | -3,58 |
| | Koffein | -4,32 | -4,18 | -4,13 |
| | Paracetamol | -4,53 | -4,33 | -4,17 |
| | | <i>Attracting Cavities</i> -Score | | |
| <i>Attracting Cavities</i> | Phosphocholin | -145,42 | -140,47 | -137,19 |
| | Koffein | -111,24 | -111,19 | -111,14 |
| | Paracetamol | -29,04 | -28,58 | -28,46 |

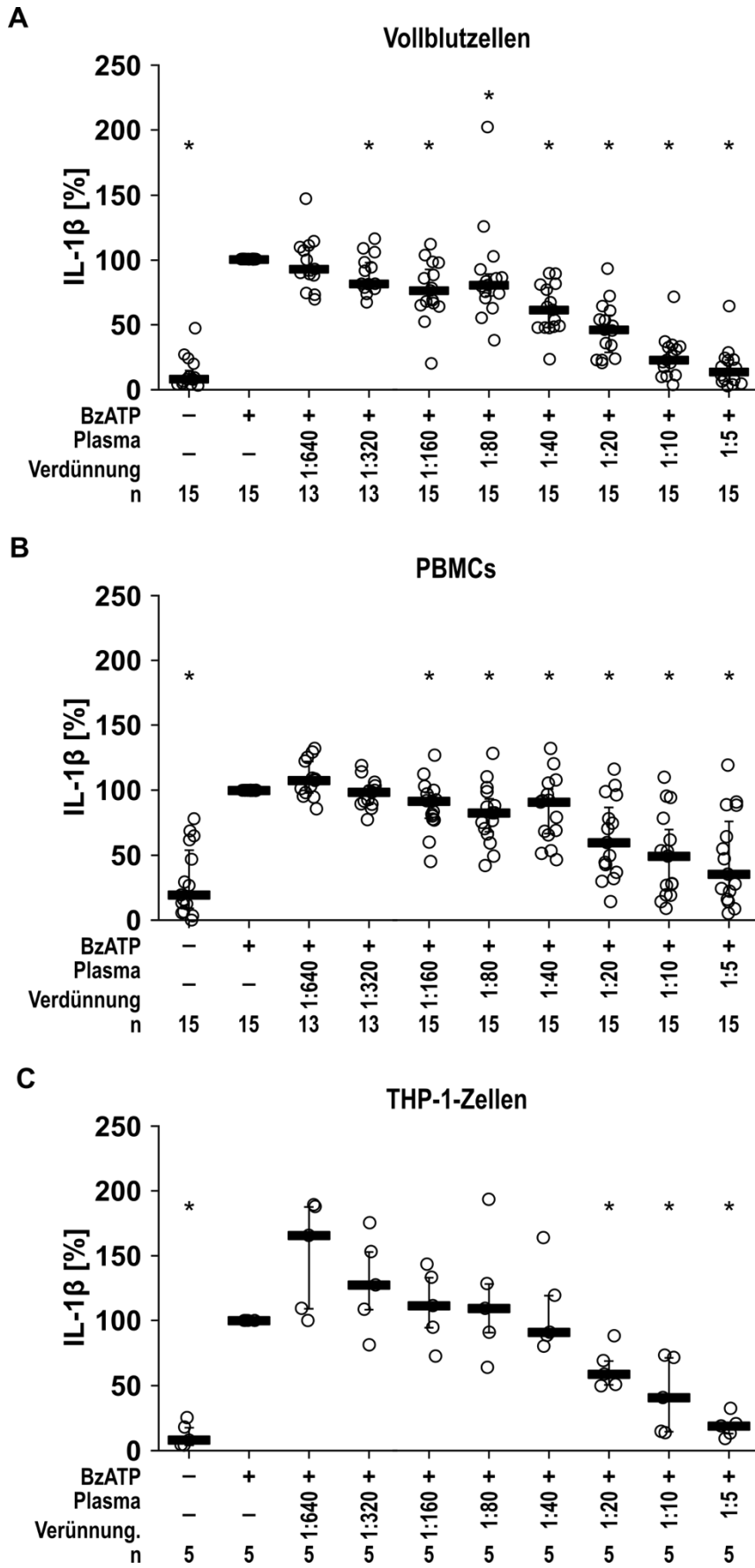
ERGÄNZENDE ABBILDUNGEN

The screenshot displays the 'Result Filters' window in Compound Discoverer 3.3. On the left, a sidebar lists various filter categories, all of which are currently turned off (indicated by 'ON' and a greyed-out toggle). The main area, titled 'Compounds', shows a hierarchical filter tree under an 'AND' group. The filters are as follows:

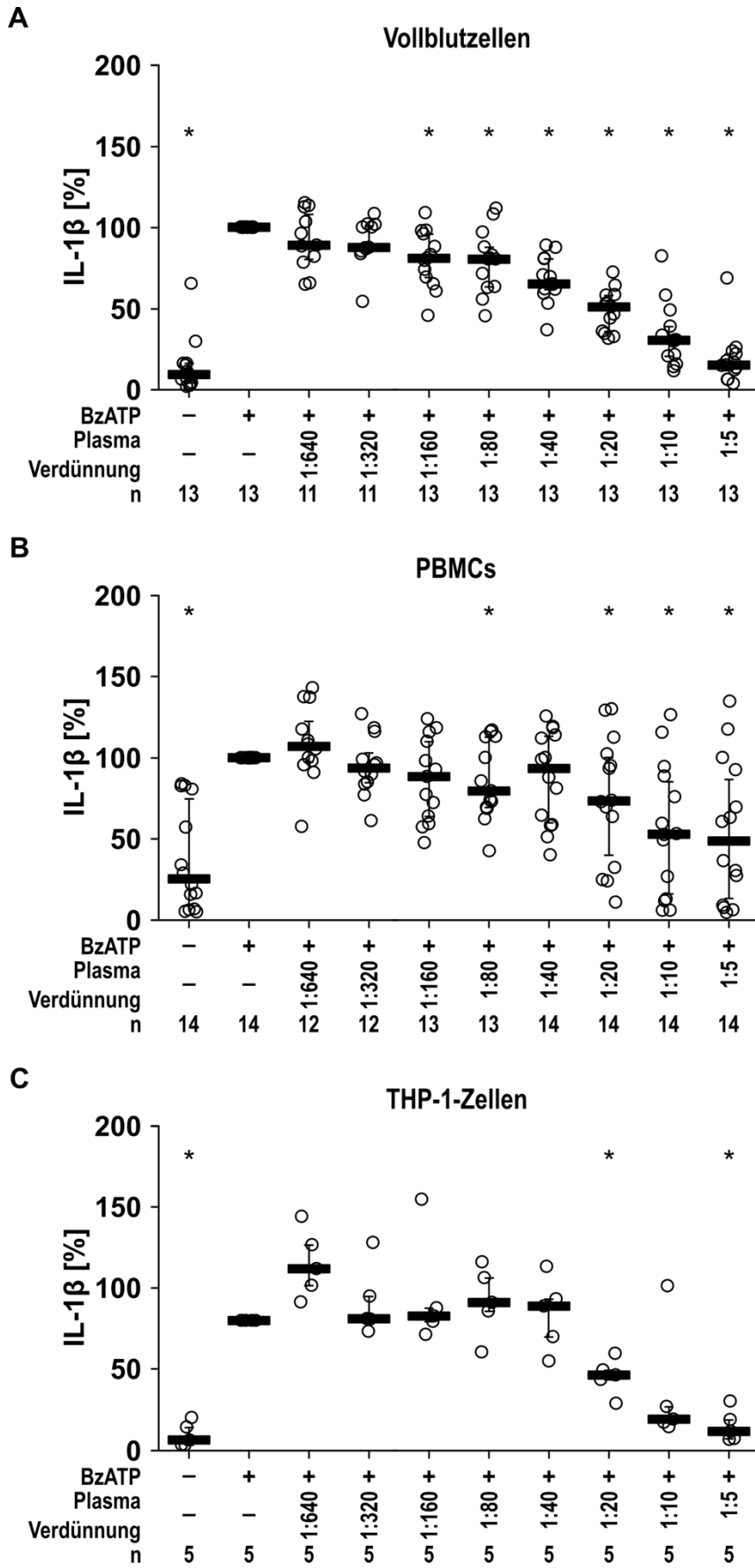
- Background is false
- MS2 is equal to DDA for preferred ion
- # mzCloud Results is not equal to 0
- Peak Rating has no value in sample 20221125_HF_LC1_GT_SKL_BLANK.raw (F13)
- Peak Rating is greater than or equal to 5.00 in at least 1 samples
- Annot. Source has status Full match in at least 2 sources
- Tags has no value in tag Compounds in Blank
- Tags has no value in tag Substance in Isotype Filtered
- Tags has no value in tag Substance in Isotype Ctrl Low Mass

At the bottom of the window, there are several control buttons: 'Show all tables' (unchecked), 'Load', 'Save', 'Save As...', 'Clear All', 'Clear', and 'Apply Filters'.

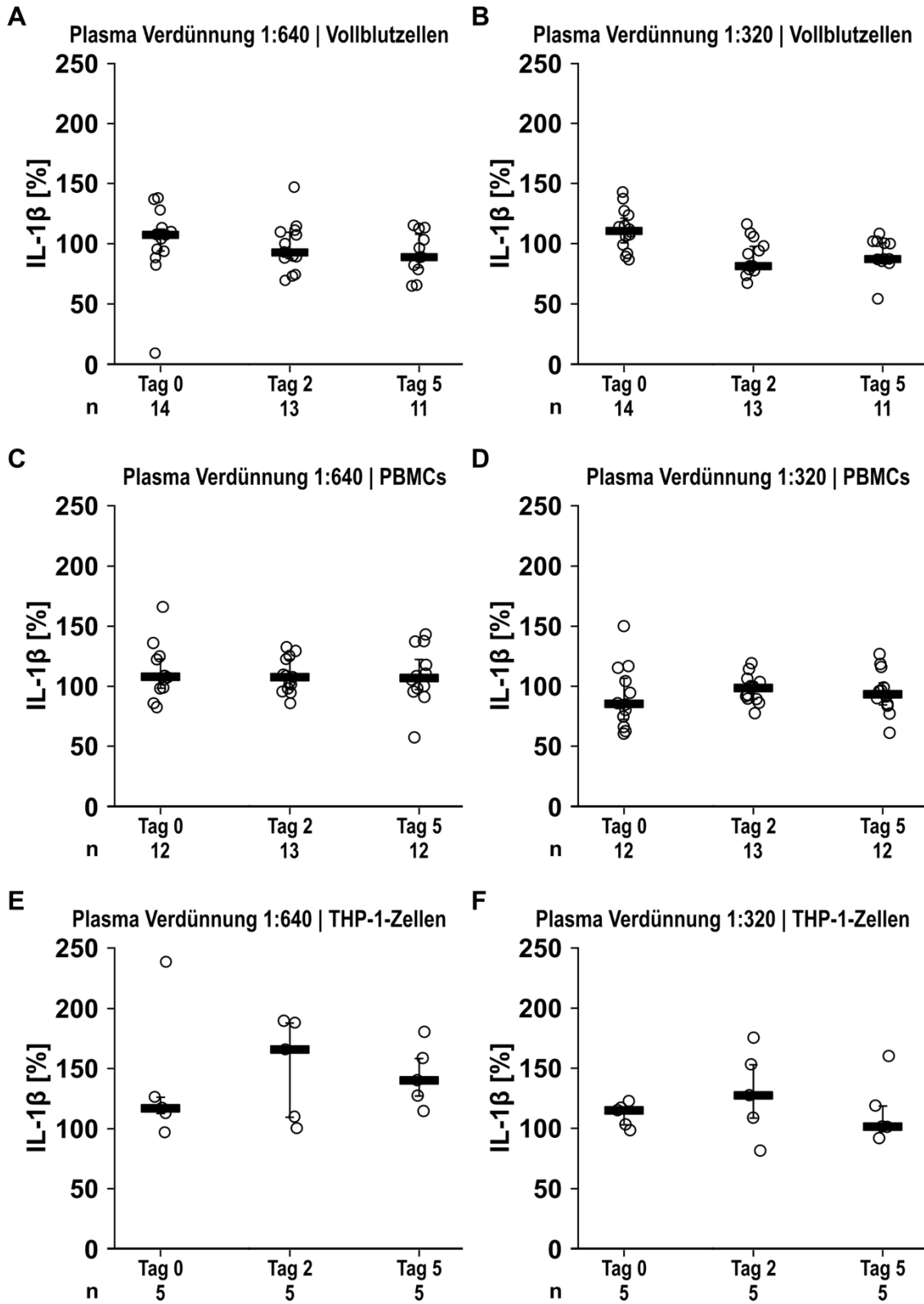
Ergänzende Abbildung 1: Filter-Einstellungen der Datenanalyse nach Massenspektrometrie mit Hilfe der Analysesoftware *Compound Discoverer*TM (Version 3.3, THERMO FISHER SCIENTIFIC).



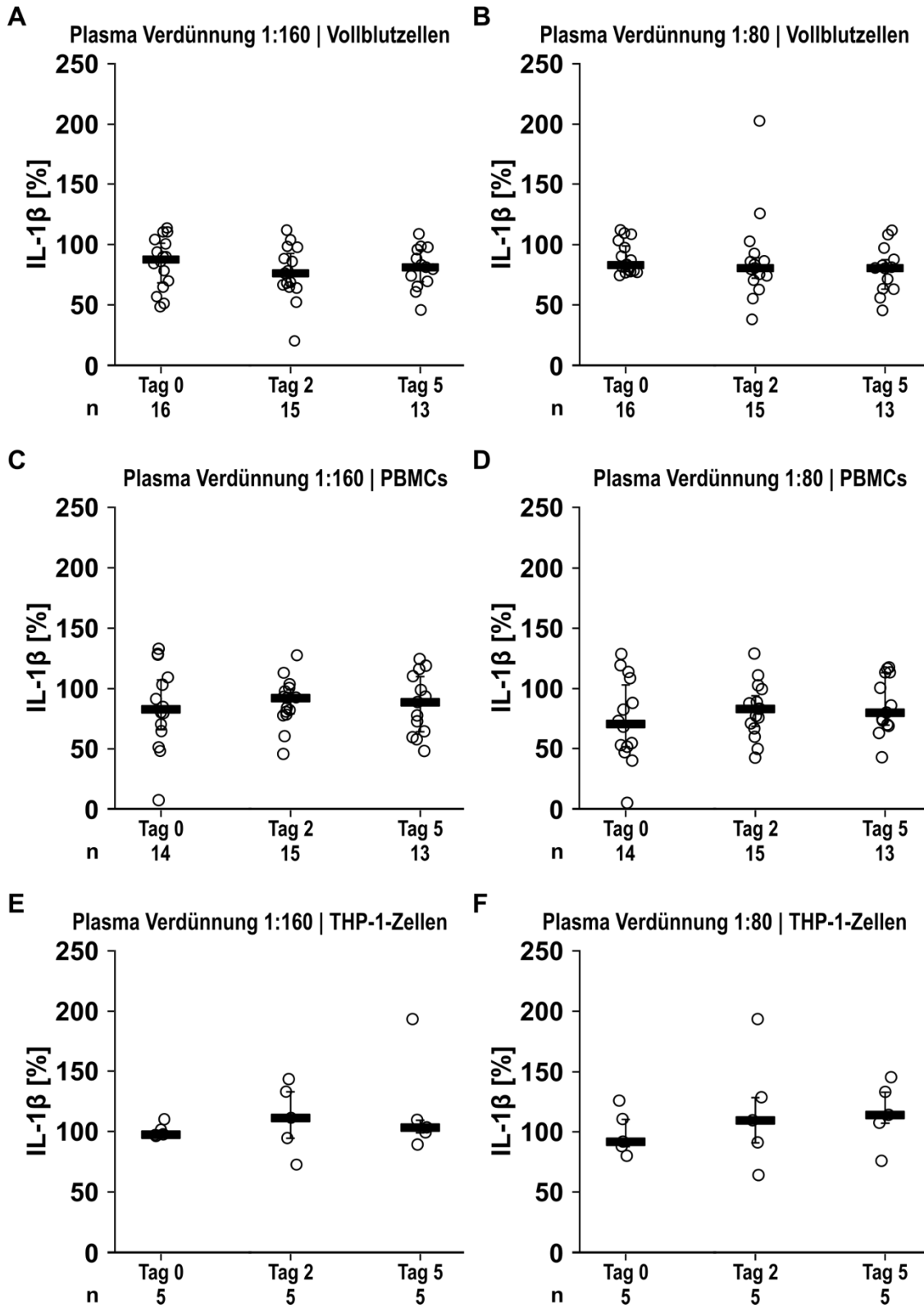
Ergänzende Abbildung 2: Blutplasma chirurgischer Patienten am postoperativen Tag 2 inhibiert dosisabhängig die BzATP-induzierte IL-1 β -Freisetzung aus autologen Blutzellen und monozytären THP-1-Zellen. Periphere Blutproben wurden am postoperativen Tag 2 von Patienten nach elektiven viszeralchirurgischen Eingriffen gewonnen und das Blutplasma isoliert. **(A)** Vollblutzellen wurden mit Lipopolysaccharid (LPS; 5 ng/ml, 3 Stunden) voraktiviert und mit 2'-(3'-O-(4-Benzoyl-benzoyl)adenosin-5'-triphosphat (BzATP; 100 μ M, 40 Minuten) inkubiert. **(B)** Frisch isolierte periphere mononukleäre Blutzellen (englisch: *peripheral blood mononuclear cells*, PBMCs; 5 x 10⁵ Zellen/0,15 ml) wurden mit LPS (5 ng/ml, 3 Stunden) stimuliert und mit BzATP (100 μ M, 30 Minuten) behandelt. **(C)** Monozytäre THP-1-Zellen (2 x 10⁵ Zellen/0,15 ml) wurden mit LPS (1 μ g/ml, 5 Stunden) voraktiviert und mit BzATP (100 μ M, 40 Minuten) behandelt. **(A - C)** Kurz vor der Stimulation mit BzATP wurde autologes Blutplasma in verschiedenen Verdünnungen zu den Zellen gegeben. Interleukin (IL)-1 β im Zellkulturüberstand wurde mittels *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) quantifiziert. * $p \leq 0,05$ (verglichen zu mit LPS & BzATP behandelten Zellen), Skillings-Mack- oder Friedman-Test gefolgt von Wilcoxon-Rangsummentest. Die gemessenen IL-1 β -Konzentrationen wurden auf mit LPS und BzATP stimulierte Zellen normalisiert. Die Daten individueller Patienten sind als einzelne Datenpunkte dargestellt, Balken zeigen den Median, Whisker die Perzentile 25 und 75. n, Anzahl einzelner Experimente.



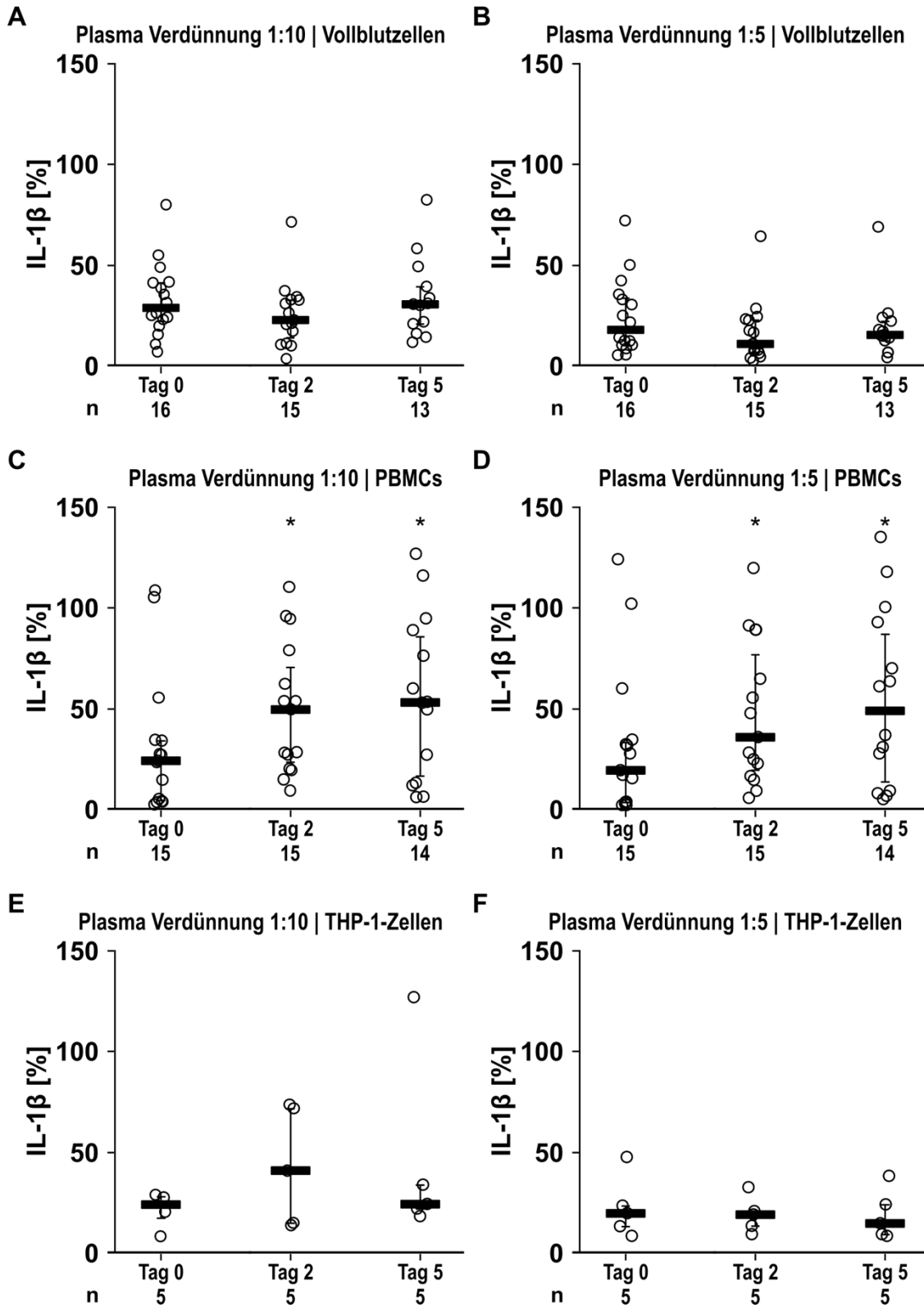
Ergänzende Abbildung 3: Blutplasma chirurgischer Patienten am postoperativen Tag 5 inhibiert dosisabhängig die BzATP-induzierte IL-1 β -Freisetzung aus autologen Blutzellen und monozytären THP-1-Zellen. Periphere Blutproben wurden am postoperativen Tag 5 von Patienten nach elektiven viszeralchirurgischen Eingriffen gewonnen und das Blutplasma isoliert. **(A)** Vollblutzellen wurden mit Lipopolysaccharid (LPS; 5 ng/ml, 3 Stunden) voraktiviert und mit 2'(3')-O-(4-Benzoyl-benzoyl)adenosin-5'-triphosphat (BzATP; 100 μ M, 40 Minuten) inkubiert. **(B)** Frisch isolierte periphere mononukleäre Blutzellen (englisch: *peripheral blood mononuclear cells*, PBMCs; 5 x 10⁵ Zellen/0,15 ml) wurden mit LPS (5 ng/ml, 3 Stunden) stimuliert und mit BzATP (100 μ M, 30 Minuten) behandelt. **(C)** Monozytäre THP-1-Zellen (2 x 10⁵ Zellen/0,15 ml) wurden mit LPS (1 μ g/ml, 5 Stunden) voraktiviert und mit BzATP (100 μ M, 40 Minuten) behandelt. **(A - C)** Kurz vor der Stimulation mit BzATP wurde autologes Blutplasma in verschiedenen Verdünnungen zu den Zellen gegeben. Interleukin (IL)-1 β im Zellkulturüberstand wurde mittels *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) quantifiziert. * $p \leq 0,05$ (verglichen zu mit LPS & BzATP behandelten Zellen), Skillings-Mack- oder Friedman-Test gefolgt von Wilcoxon-Rangsummentest. Die gemessenen IL-1 β -Konzentrationen wurden auf mit LPS und BzATP stimulierte Zellen normalisiert. Die Daten individueller Patienten sind als einzelne Datenpunkte dargestellt, Balken zeigen den Median, Whisker die Perzentile 25 und 75. n, Anzahl einzelner Experimente.



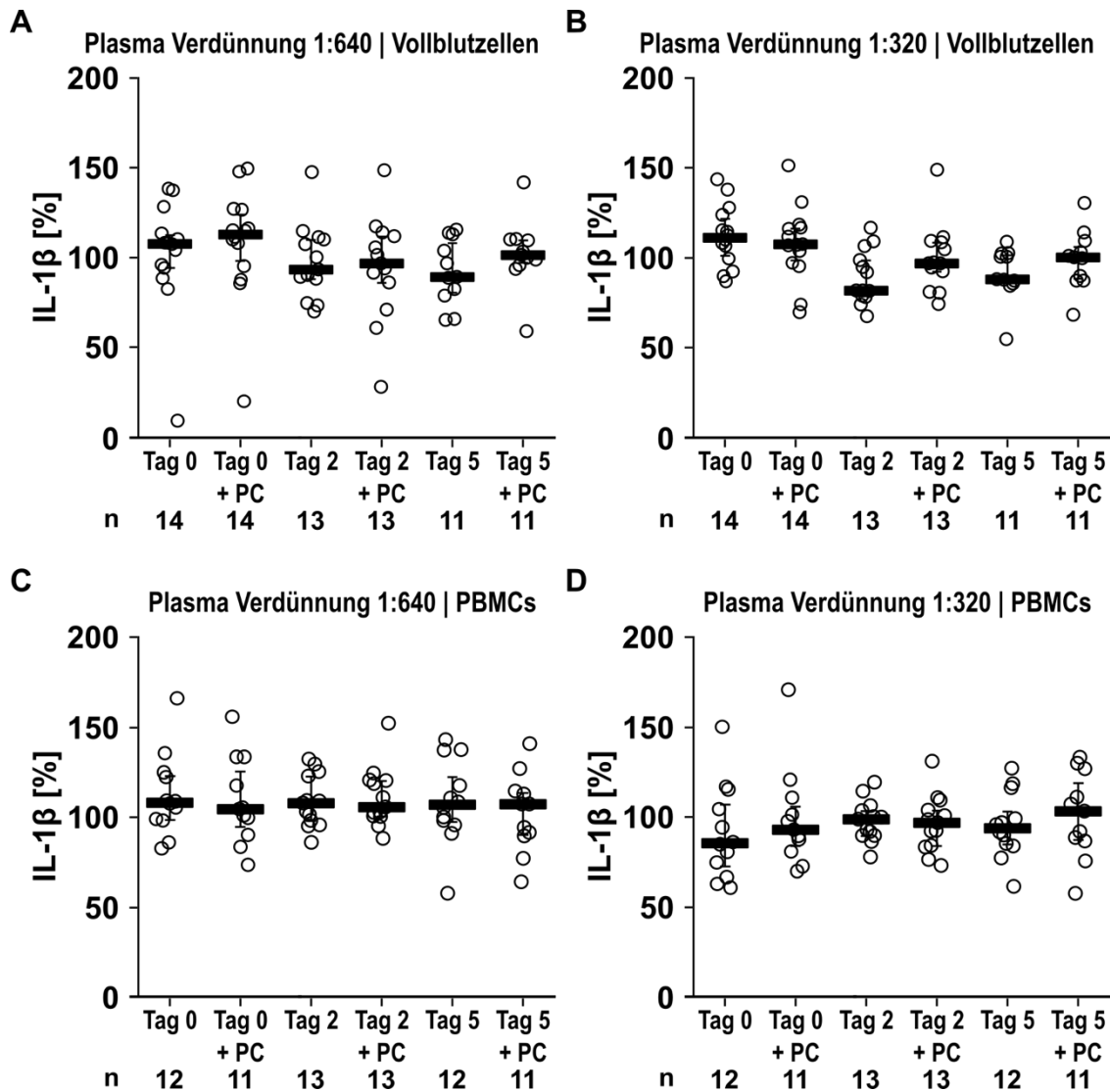
Ergänzende Abbildung 4: Der inhibitorische Effekt von Blutplasma auf die BzATP-induzierte IL-1 β -Freisetzung aus autologen Blutzellen und monozytären THP-1-Zellen wird nicht durch schwere viszeralchirurgische Eingriffe beeinflusst. Periphere Blutproben wurden präoperativ (Tag 0) und postoperativ an den Tagen 2 und 5 von Patienten mit elektiver viszeralchirurgischer Operation gewonnen und das Blutplasma abgenommen. **(A, B)** Vollblutzellen wurden mit Lipopolysaccharid (LPS; 5 ng/ml, 3 Stunden) voraktiviert und mit 2'(3')-O-(4-Benzoyl-benzoyl)adenosin-5'-triphosphat (BzATP; 100 μ M, 40 Minuten) behandelt. **(C, D)** Frisch isolierte periphere mononukleäre Blutzellen (englisch: *peripheral blood mononuclear cells*, PBMCs; 5×10^5 Zellen/0,15 ml) wurden mit LPS (5 ng/ml, 3 Stunden) voraktiviert und mit BzATP (100 μ M, 30 Minuten) inkubiert. **(E, F)** Monozytäre THP-1-Zellen (2×10^5 /0,15 ml) wurden mit LPS (1 μ g/ml, 5 Stunden) voraktiviert und mit BzATP (100 μ M, 40 Minuten) inkubiert. Autologes Blutplasma wurde kurz vor der Stimulation mit BzATP 1:640 **(A, C, E)** und 1:320 **(B, D, F)** verdünnt zugegeben. Die Interleukin (IL)-1 β -Freisetzung in den Zellkulturüberstand wurde mittels *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) analysiert. * $p \leq 0,05$ (verglichen mit Tag 0), Skillings-Mack- oder Friedman-Test gefolgt von Wilcoxon-Rangsummentest. Die gemessenen IL-1 β -Konzentrationen wurden auf mit LPS und BzATP stimulierte Zellen normalisiert. Die Daten individueller Patienten sind als einzelne Datenpunkte dargestellt, Balken zeigen den Median, Whisker die Perzentile 25 und 75. n, Anzahl einzelner Experimente.



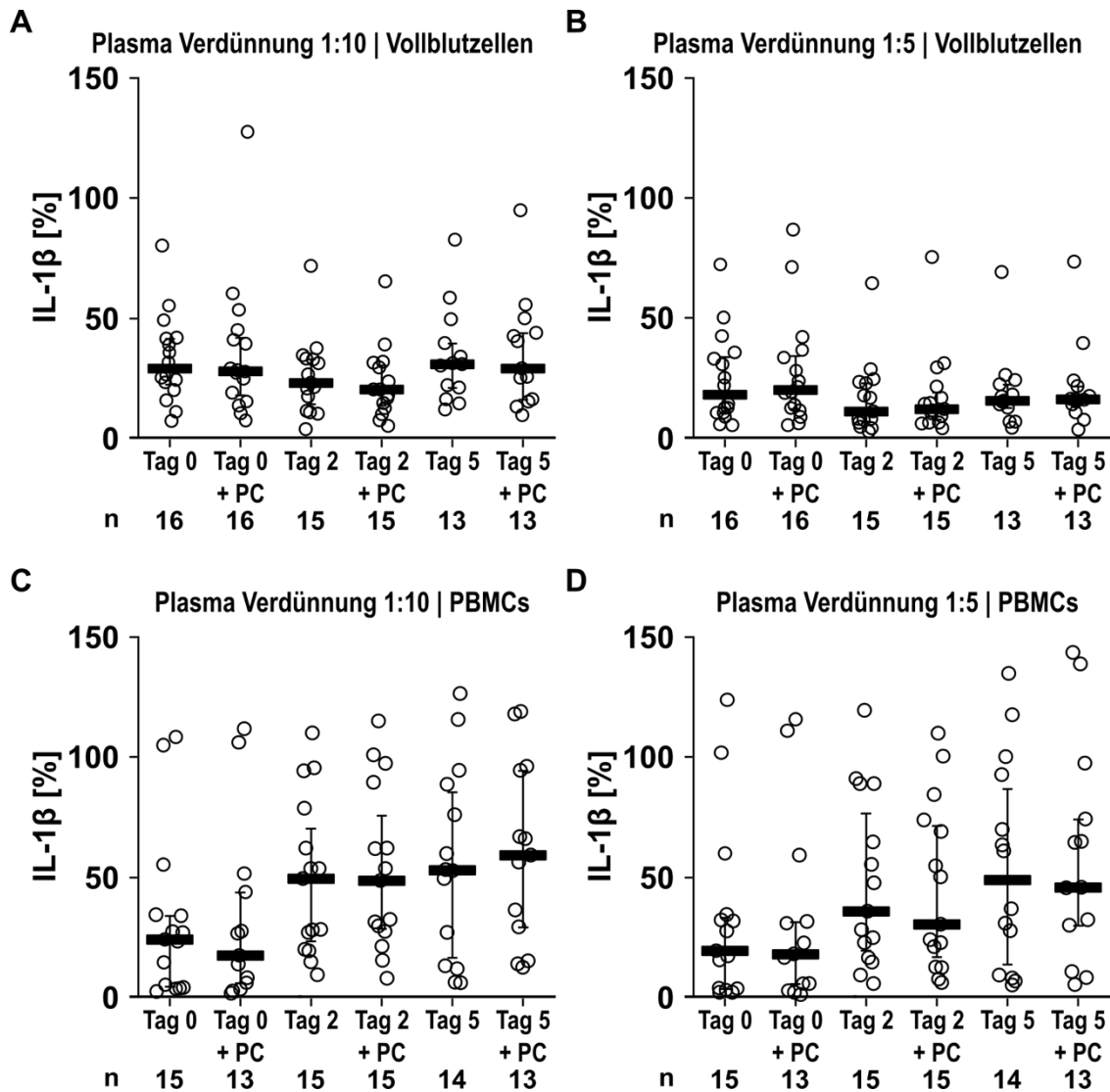
Ergänzende Abbildung 5: Der inhibitorische Effekt von Blutplasma auf die BzATP-induzierte IL-1 β -Freisetzung aus autologen Blutzellen und monozytären THP-1-Zellen wird nicht durch schwere viszeralchirurgische Eingriffe beeinflusst. Periphere Blutproben wurden präoperativ (Tag 0) und postoperativ an den Tagen 2 und 5 von Patienten mit elektiver viszeralchirurgischer Operation gewonnen und das Blutplasma abgenommen. **(A, B)** Vollblutzellen wurden mit Lipopolysaccharid (LPS; 5 ng/ml, 3 Stunden) voraktiviert und mit 2'(3')-O-(4-Benzoyl-benzoyl)adenosin-5'-triphosphat (BzATP; 100 μ M, 40 Minuten) behandelt. **(C, D)** Frisch isolierte periphere mononukleäre Blutzellen (englisch: *peripheral blood mononuclear cells*, PBMCs; 5×10^5 Zellen/0,15 ml) wurden mit LPS (5 ng/ml, 3 Stunden) voraktiviert und mit BzATP (100 μ M, 30 Minuten) inkubiert. **(E, F)** Monozytäre THP-1-Zellen (2×10^5 /0,15 ml) wurden mit LPS (1 μ g/ml, 5 Stunden) voraktiviert und mit BzATP (100 μ M, 40 Minuten) inkubiert. Autologes Blutplasma wurde kurz vor der Stimulation mit BzATP 1:160 **(A, C, E)** und 1:80 **(B, D, F)** verdünnt zugegeben. Die Interleukin (IL)-1 β -Freisetzung in den Zellkulturüberstand wurde mittels *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) analysiert. * $p \leq 0,05$ (verglichen mit Tag 0), Skillings-Mack- oder Friedman-Test gefolgt von Wilcoxon-Rangsummentest. Die gemessenen IL-1 β -Konzentrationen wurden auf mit LPS und BzATP stimulierte Zellen normalisiert. Die Daten individueller Patienten sind als einzelne Datenpunkte dargestellt, Balken zeigen den Median, Whisker die Perzentile 25 und 75. n, Anzahl einzelner Experimente.



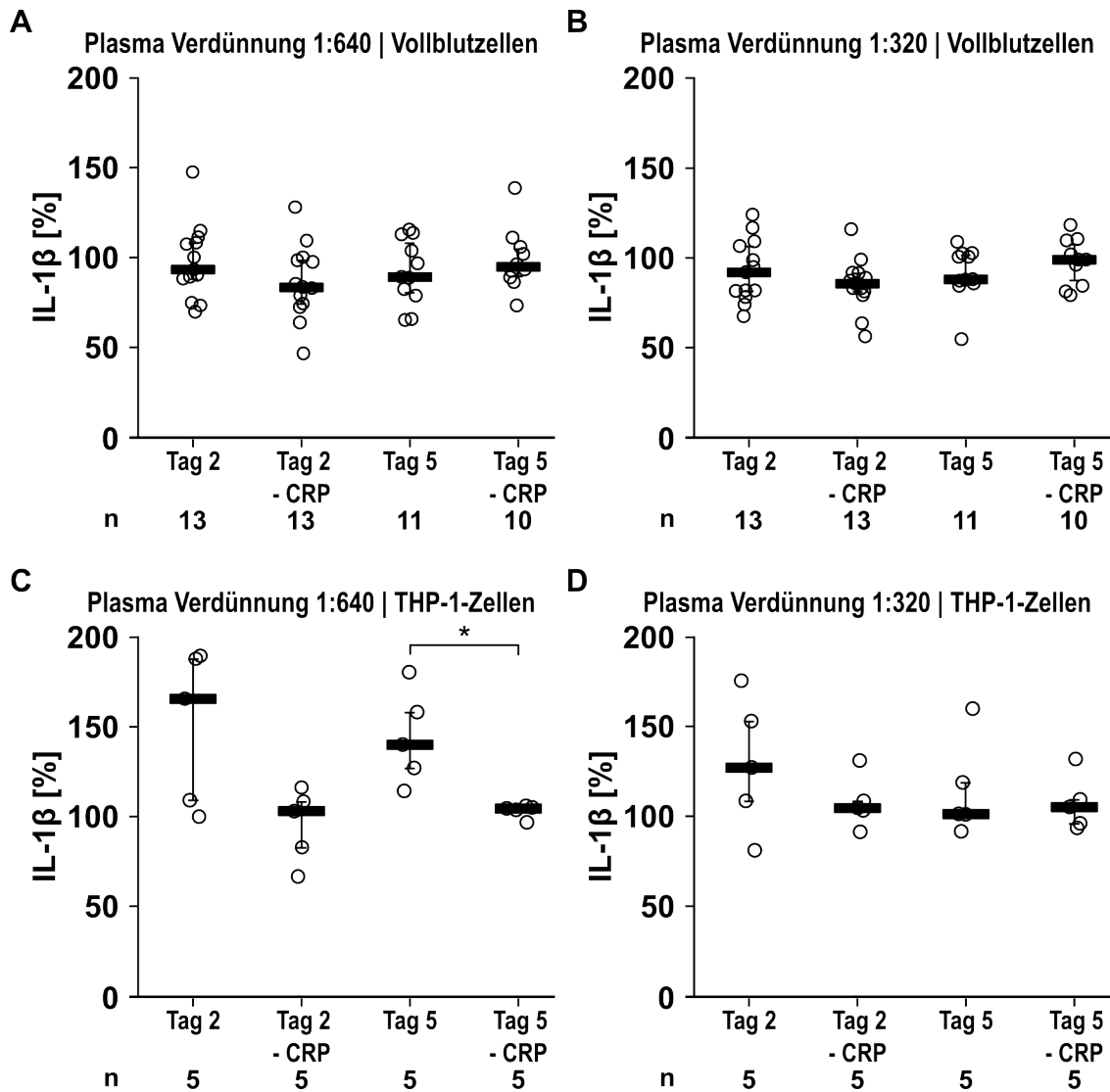
Ergänzende Abbildung 6: Der inhibitorische Effekt von Blutplasma auf die BzATP-induzierte IL-1 β -Freisetzung aus autologen Blutzellen und monozytären THP-1-Zellen wird nicht wesentlich durch schwere viszeralchirurgische Eingriffe beeinflusst. Periphere Blutproben wurden präoperativ (Tag 0) und postoperativ an den Tagen 2 und 5 von Patienten mit elektiver viszeralchirurgischer Operation gewonnen und das Blutplasma abgenommen. **(A, B)** Vollblutzellen wurden mit Lipopolysaccharid (LPS; 5 ng/ml, 3 Stunden) voraktiviert und mit 2'(3')-O-(4-Benzoyl-benzoyl)adenosin-5'-triphosphat (BzATP; 100 μ M, 40 Minuten) behandelt. **(C, D)** Frisch isolierte periphere mononukleäre Blutzellen (englisch: *peripheral blood mononuclear cells*, PBMCs; 5×10^5 Zellen/0,15 ml) wurden mit LPS (5 ng/ml, 3 Stunden) voraktiviert und mit BzATP (100 μ M, 30 Minuten) inkubiert. **(E, F)** Monozytäre THP-1-Zellen (2×10^5 /0,15 ml) wurden mit LPS (1 μ g/ml, 5 Stunden) voraktiviert und mit BzATP (100 μ M, 40 Minuten) inkubiert. Autologes Blutplasma wurde kurz vor der Stimulation mit BzATP 1:10 **(A, C, E)** und 1:5 **(B, D, F)** verdünnt zugegeben. Die Interleukin (IL)-1 β -Freisetzung in den Zellkulturüberstand wurde mittels *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) analysiert. * $p \leq 0,05$ (verglichen mit Tag 0), Skillings-Mack- oder Friedman-Test gefolgt von Wilcoxon-Rangsummentest. Die gemessenen IL-1 β -Konzentrationen wurden auf mit LPS und BzATP stimulierte Zellen normalisiert. Die Daten individueller Patienten sind als einzelne Datenpunkte dargestellt, Balken zeigen den Median, Whisker die Perzentile 25 und 75. n, Anzahl einzelner Experimente.



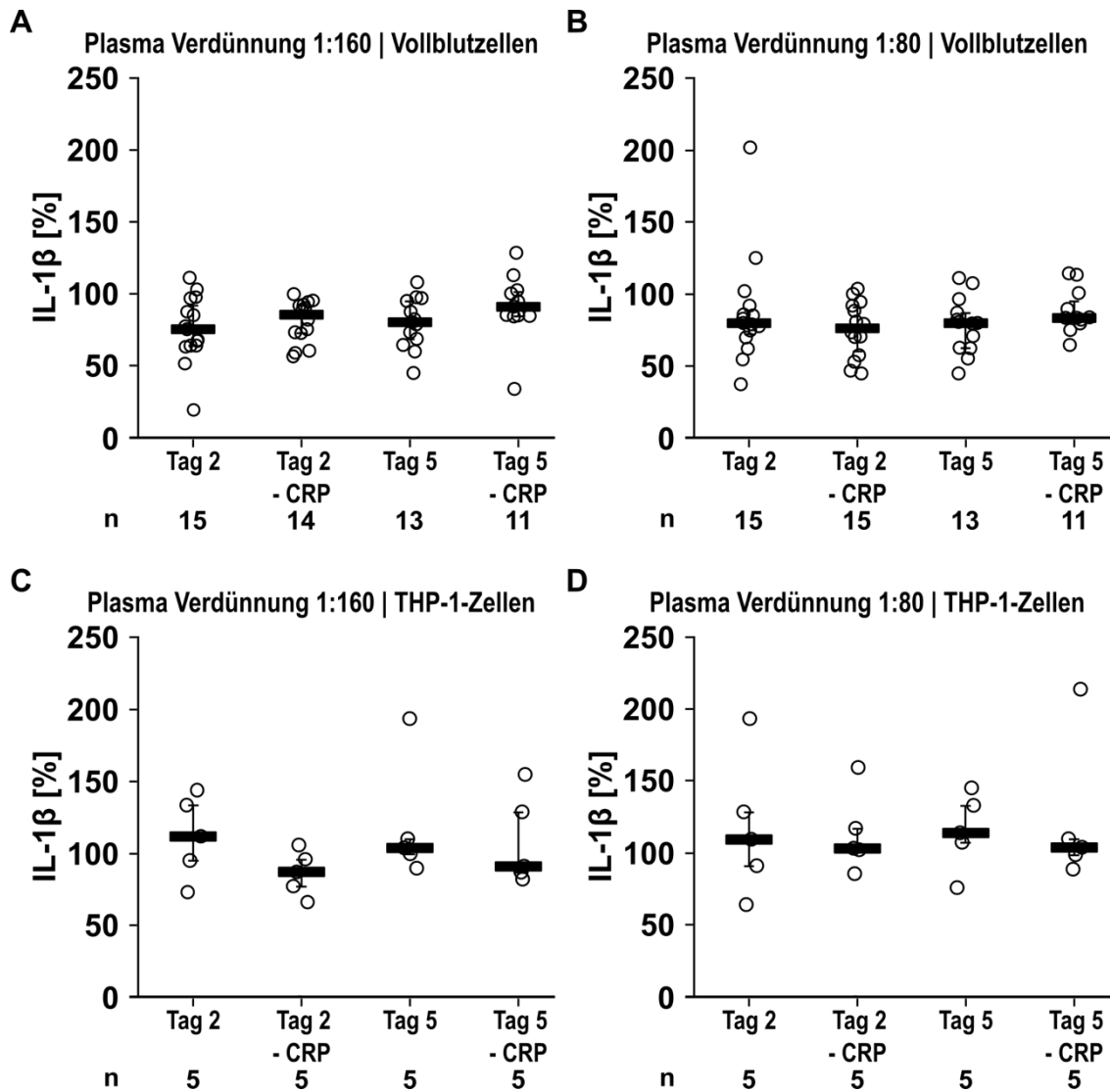
Ergänzende Abbildung 7: Einfluss der Zugabe des CRP-Liganden PC auf den inhibitorischen Effekt von Blutplasma im Rahmen der BzATP-induzierten IL-1 β -Freisetzung aus autologen Blutzellen. Periphere Blutproben wurden präoperativ (Tag 0) und an den postoperativen Tagen 2 und 5 von Patienten mit elektiver viszeralchirurgischer Operation gewonnen und das Blutplasma abgenommen. **(A, B)** Vollblutzellen wurden mit Lipopolysaccharid (LPS; 5 ng/ml, 3 Stunden) voraktiviert und mit 2'(3')-O-(4-Benzoylbenzoyl)adenosin-5'-triphosphat (BzATP; 100 μ M, 40 Minuten) inkubiert. **(C, D)** Frisch isolierte periphere mononukleäre Blutzellen (englisch: *peripheral blood mononuclear cells*, PBMCs; 5×10^5 Zellen/0,15 ml) wurden mit LPS (5 ng/ml, 3 Stunden) voraktiviert und mit BzATP (100 μ M, 30 Minuten) aktiviert. Kurz vor der Stimulation mit BzATP wurde das autologe Blutplasma 1:640 **(A, C)** oder 1:320 **(B, D)** verdünnt zugegeben, teilweise nach einer 30-minütigen Vorinkubation des Plasmas mit Phosphocholin (PC; 1 μ M). Interleukin (IL)-1 β im Zellkulturüberstand wurde mittels *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) quantifiziert. * $p \leq 0,05$ (mit PC vorinkubiertes Plasma verglichen mit Plasma), Skillings-Mack-Test gefolgt von Wilcoxon-Rangsummentest. Die gemessenen IL-1 β -Konzentrationen wurden auf mit LPS und BzATP stimulierte Zellen normalisiert. Die Daten individueller Patienten sind als einzelne Datenpunkte dargestellt, Balken zeigen den Median, Whisker die Perzentile 25 und 75. n, Anzahl einzelner Experimente.



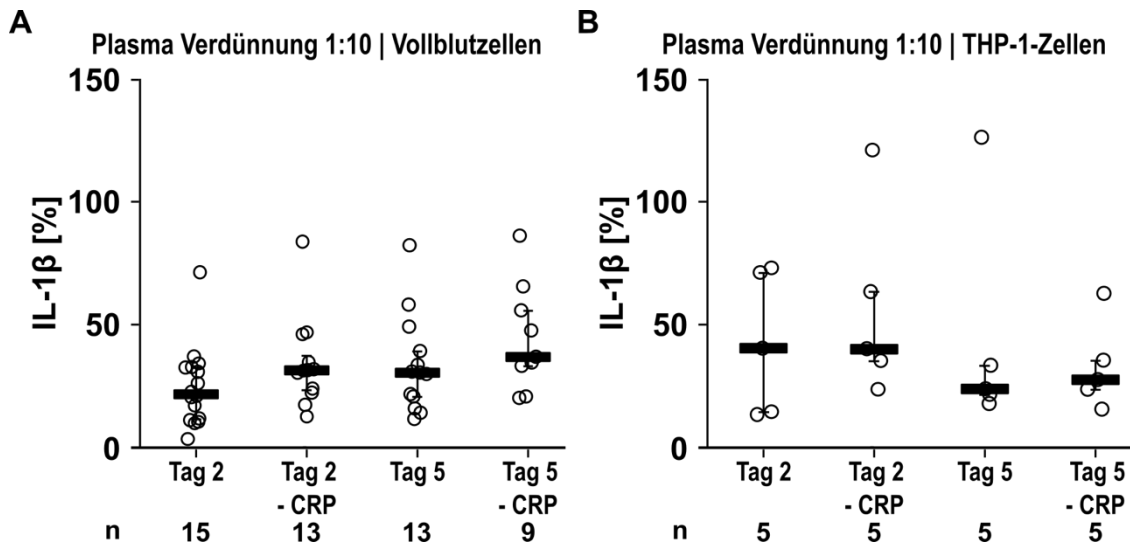
Ergänzende Abbildung 9: Einfluss der Zugabe des CRP-Liganden PC auf den inhibitorischen Effekt von Blutplasma im Rahmen der BzATP-induzierten IL-1 β -Freisetzung aus autologen Blutzellen. Periphere Blutproben wurden präoperativ (Tag 0) und an den postoperativen Tagen 2 und 5 von Patienten mit elektiver viszeralchirurgischer Operation gewonnen und das Blutplasma abgenommen. (**A**, **B**) Vollblutzellen wurden mit Lipopolysaccharid (LPS; 5 ng/ml, 3 Stunden) voraktiviert und mit 2'(3')-O-(4-Benzoylbenzoyl)adenosin-5'-triphosphat (BzATP; 100 μ M, 40 Minuten) inkubiert. (**C**, **D**) Frisch isolierte periphere mononukleäre Blutzellen (englisch: *peripheral blood mononuclear cells*, PBMCs; 5×10^5 Zellen/0,15 ml) wurden mit LPS (5 ng/ml, 3 Stunden) voraktiviert und mit BzATP (100 μ M, 30 Minuten) aktiviert. Kurz vor der Stimulation mit BzATP wurde das autologe Blutplasma 1:10 (**A**, **C**) oder 1:5 (**B**, **D**) verdünnt zugegeben, teilweise nach einer 30-minütigen Vorinkubation des Plasmas mit Phosphocholin (PC; 1 μ M). Interleukin (IL)-1 β im Zellkulturüberstand wurde mittels *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) quantifiziert. * $p \leq 0,05$ (mit PC vorinkubiertes Plasma verglichen mit Plasma), Skillings-Mack-Test gefolgt von Wilcoxon-Rangsummentest. Die gemessenen IL-1 β -Konzentrationen wurden auf mit LPS und BzATP stimulierte Zellen normalisiert. Die Daten individueller Patienten sind als einzelne Datenpunkte dargestellt, Balken zeigen den Median, Whisker die Perzentile 25 und 75. n, Anzahl einzelner Experimente.



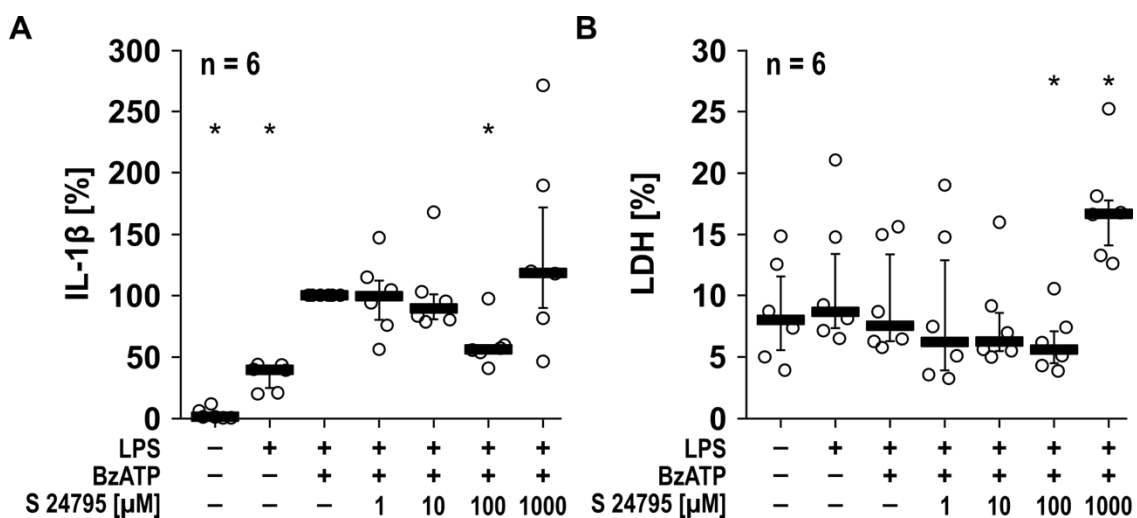
Ergänzende Abbildung 10: Der inhibitorische Effekt von postoperativem Patientenplasma wird nicht wesentlich durch die Depletion des endogenen CRP aus dem Plasma beeinflusst. Periphere Blutproben wurden an den postoperativen Tagen 2 und 5 von Patienten nach elektiver viszeralchirurgischer Operation gewonnen und das Blutplasma abgenommen. C-reaktives Protein (CRP) wurde mittels Immunpräzipitation aus dem Blutplasma depletiert. **(A, B)** Vollblutzellen wurden mit Lipopolysaccharid (LPS; 5 ng/ml, 3 Stunden) voraktiviert und mit 2'(3')-O-(4-Benzoyl-benzoyl)adenosin-5'-triphosphat (BzATP; 100 μ M, 40 Minuten) inkubiert. **(C, D)** Monozytäre THP-1-Zellen ($2 \times 10^5/0,15$ ml) wurden mit LPS (1 μ g/ml, 5 Stunden) voraktiviert und mit BzATP (100 μ M, 40 Minuten) inkubiert. Kurz vor der Stimulation mit BzATP wurde autologes Blutplasma bzw. CRP-depletiertes Plasma (-CRP) 1:640 **(A, C)** oder 1:320 **(B, D)** verdünnt zugegeben. Die Interleukin (IL)-1 β -Freisetzung in den Zellkulturüberstand wurde mittels *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) analysiert. * $p \leq 0,05$ (CRP-depletiertes Plasma verglichen mit Plasma), Skillings-Mack oder Friedman-Test gefolgt von Wilcoxon-Rangsummentest. Die gemessenen IL-1 β -Konzentrationen wurden auf mit LPS und BzATP stimulierte Zellen normalisiert. Die Daten individueller Patienten sind als einzelne Datenpunkte dargestellt, Balken zeigen den Median, Whisker die Perzentile 25 und 75. n, Anzahl einzelner Experimente.



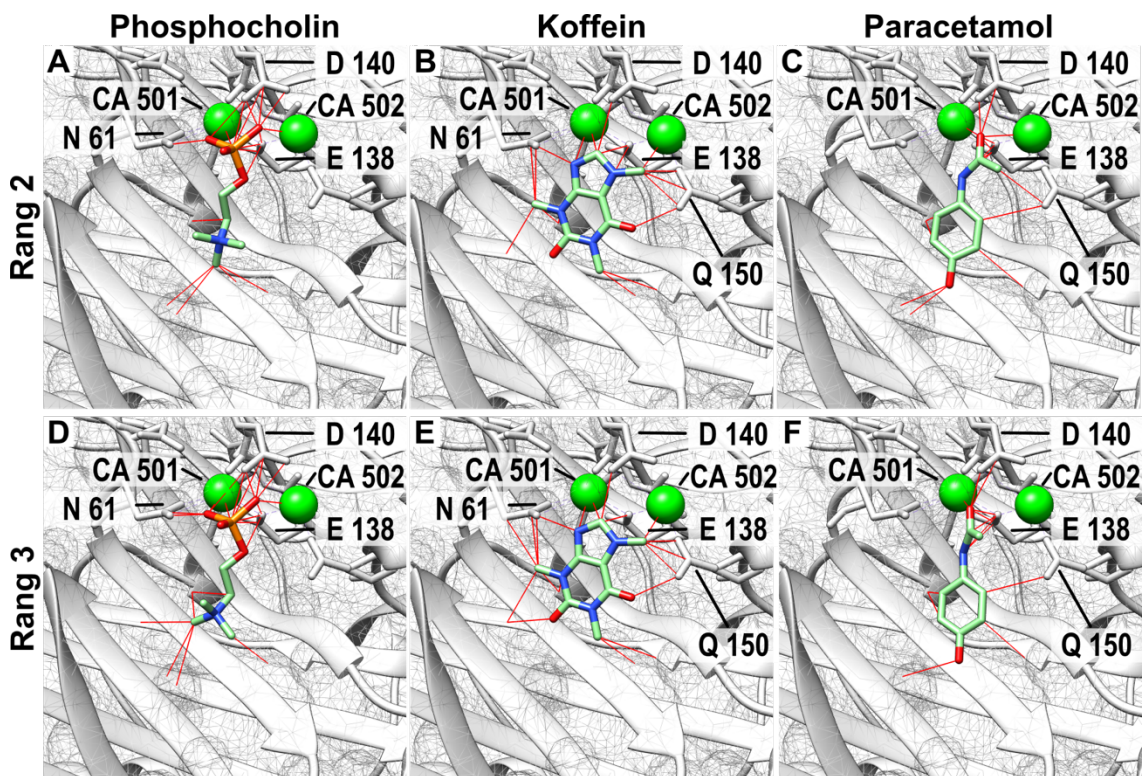
Ergänzende Abbildung 11: Der inhibitorische Effekt von postoperativem Patientenplasma wird nicht durch die Depletion des endogenen CRP aus dem Plasma beeinflusst. Periphere Blutproben wurden an den postoperativen Tagen 2 und 5 von Patienten nach elektiver viszeralchirurgischer Operation gewonnen und das Blutplasma abgenommen. C-reaktives Protein (CRP) wurde mittels Immunpräzipitation aus dem Blutplasma depletiert. **(A, B)** Vollblutzellen wurden mit Lipopolysaccharid (LPS; 5 ng/ml, 3 Stunden) voraktiviert und mit 2'(3')-O-(4-Benzoyl-benzoyl)adenosin-5'-triphosphat (BzATP; 100 µM, 40 Minuten) inkubiert. **(C, D)** Monozytäre THP-1-Zellen ($2 \times 10^5/0,15$ ml) wurden mit LPS (1 µg/ml, 5 Stunden) voraktiviert und mit BzATP (100 µM, 40 Minuten) inkubiert. Kurz vor der Stimulation mit BzATP wurde autologes Blutplasma bzw. CRP-depletiertes Plasma (-CRP) 1:160 **(A, C)** oder 1:80 **(B, D)** verdünnt zugegeben. Die Interleukin (IL)-1β-Freisetzung in den Zellkulturüberstand wurde mittels *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) analysiert. * $p \leq 0,05$ (CRP-depletiertes Plasma verglichen mit Plasma), Skillings-Mack oder Friedman-Test gefolgt von Wilcoxon-Rangsummentest. Die gemessenen IL-1β-Konzentrationen wurden auf mit LPS und BzATP stimulierte Zellen normalisiert. Die Daten individueller Patienten sind als einzelne Datenpunkte dargestellt, Balken zeigen den Median, Whisker die Perzentile 25 und 75. n, Anzahl einzelner Experimente.



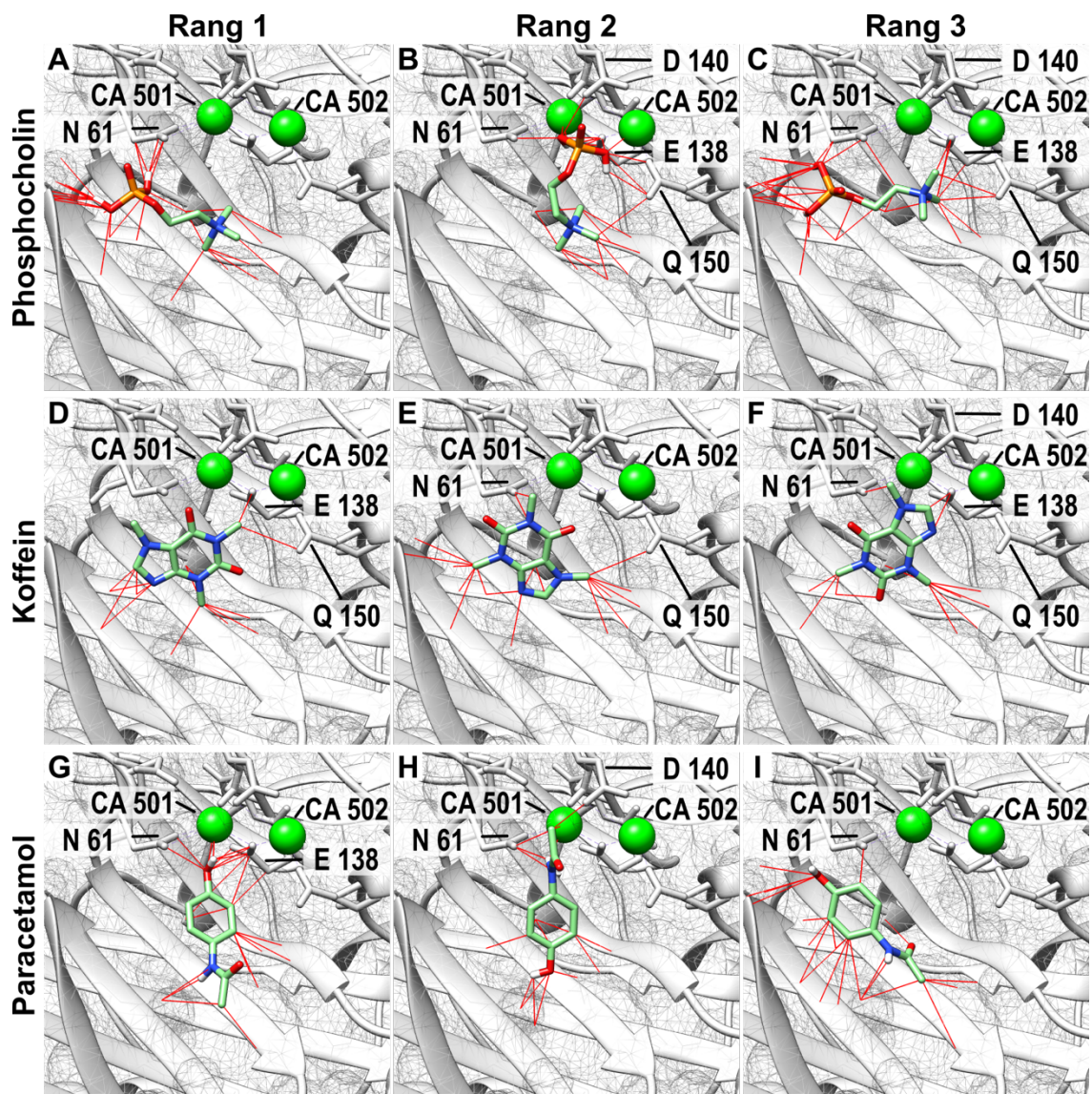
Ergänzende Abbildung 12: Der inhibitorische Effekt von postoperativem Patientenplasma wird nicht durch die Depletion des endogenen CRP aus dem Plasma beeinflusst. Periphere Blutproben wurden an den postoperativen Tagen 2 und 5 von Patienten nach elektiver viszeralchirurgischer Operation gewonnen und das Blutplasma abgenommen. C-reaktives Protein (CRP) wurde mittels Immunpräzipitation aus dem Blutplasma depletiert. **(A)** Vollblutzellen wurden mit Lipopolysaccharid (LPS; 5 ng/ml, 3 Stunden) voraktiviert und mit 2'(3')-O-(4-Benzoyl-benzoyl)adenosin-5'-triphosphat (BzATP; 100 µM, 40 Minuten) inkubiert. **(B)** Monozytäre THP-1-Zellen (2 x 10⁵/0,15 ml) wurden mit LPS (1 µg/ml, 5 Stunden) voraktiviert und mit BzATP (100 µM, 40 Minuten) inkubiert. Kurz vor der Stimulation mit BzATP wurde autologes Blutplasma bzw. CRP-depletiertes Plasma (- CRP) 1:10 **(A, B)** verdünnt zugegeben. Die Interleukin (IL)-1β-Freisetzung in den Zellkulturüberstand wurde mittels *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) analysiert. *p ≤ 0,05 (CRP-depletiertes Plasma verglichen mit Plasma), Skillings-Mack oder Friedman-Test gefolgt von Wilcoxon-Rangsummentest. Die gemessenen IL-1β-Konzentrationen wurden auf mit LPS und BzATP stimulierte Zellen normalisiert. Die Daten individueller Patienten sind als einzelne Datenpunkte dargestellt, Balken zeigen den Median, Whisker die Perzentile 25 und 75. n, Anzahl einzelner Experimente.



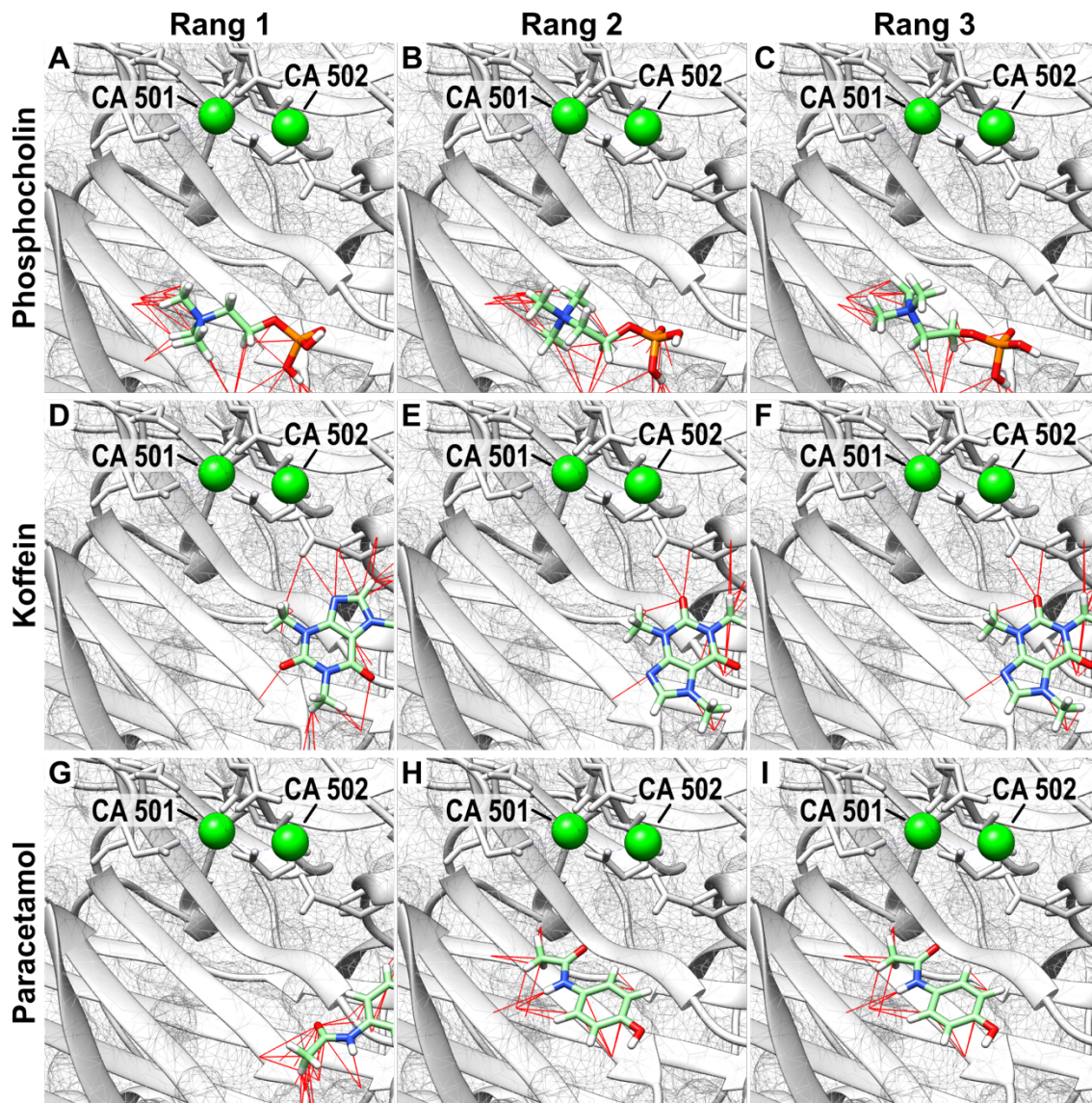
Ergänzende Abbildung 13: Dosisabhängiger Effekt von S 24795 auf die BzATP-induzierte IL-1 β -Freisetzung aus THP-1-Zellen. Monozytäre THP-1-Zellen ($5 \times 10^5/0,5$ ml) wurden mit Lipopolysaccharid (LPS; $1 \mu\text{g/ml}$, 5 Stunden) voraktiviert und im Anschluss mit 2'(3')-O-(4-Benzoyl-benzoyl)adenosin-5'-triphosphat (BzATP; $100 \mu\text{M}$, 40 Minuten) aktiviert. Interleukin (IL)-1 β in den Zellkulturüberständen wurde mittels *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) quantifiziert und die Laktatdehydrogenase (LDH)-Aktivität gemessen. (A) IL-1 β -Konzentration im Zellkulturüberstand nach Zugabe von S 24795 (1 - $1000 \mu\text{M}$) kurz vor Stimulation mit BzATP. (B) Zugehörige LDH-Aktivität. * $p \leq 0,05$ (verglichen zu Zellen stimuliert mit LPS & BzATP), Friedman-Test gefolgt von Wilcoxon-Rangsummentest. Die Werte sind als einzelne Datenpunkte dargestellt, Balken zeigen den Median und Whisker die Perzentile 25 und 75. n, Anzahl einzelner Experimente.



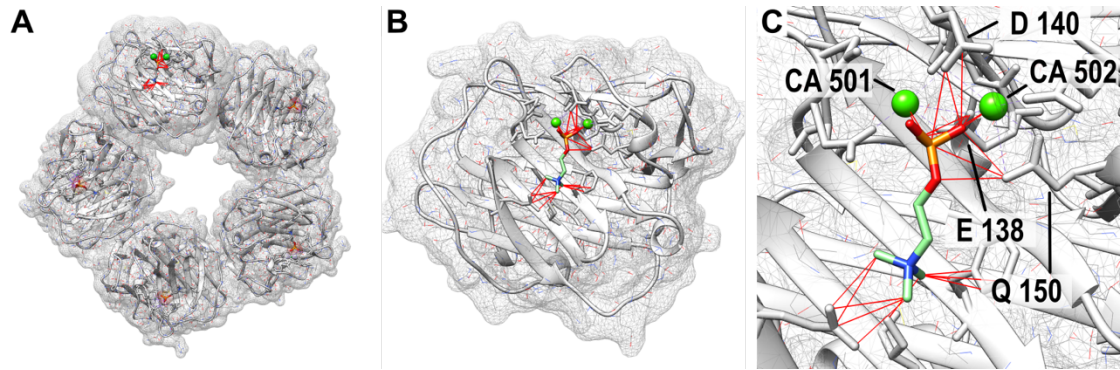
Ergänzende Abbildung 14: 3D-Darstellung des *in silico* Dockings von CRP mit Liganden mittels DiffDock-Web. Für das Docking mittels DiffDock-Web wurden ein Protomer des C-reaktiven Proteins (CRP; PDB-Code 1GNH, *chain A*) sowie die *simplified molecular input line entry system* (SMILES)-Strukturcodes der jeweiligen Liganden eingesetzt. Die Visualisierung der Docking-Ergebnisse erfolgte mit UCSF Chimera (Version 1.17.3). (A - C) Ligandenkonformationen mit dem zweitbesten (Rang 2) *confidence* Score je Ligand. (D - F) Ligandenkonformationen mit dem drittbesten (Rang 3) *confidence* Score je Ligand. (A, D) Docking von CRP mit Phosphocholin (PC; PubChem-ID 1014). (B, E) Docking von CRP mit Koffein (PubChem-ID 2519). (C, F) Docking von CRP mit Paracetamol (Acetaminophen; PubChem-ID 1983).



Ergänzende Abbildung 15: 3D-Darstellung des *in silico* Dockings von CRP mit Liganden mittels AutoDock Vina. Für das Docking mittels AutoDock Vina (über SwissDock-Server) wurden ein Protomer des C-reaktiven Proteins (CRP; PDB-Code 1GNH, *chain A*) sowie die *simplified molecular input line entry system* (SMILES)-Strukturcodes der jeweiligen Liganden eingesetzt. Die Visualisierung der Docking-Ergebnisse erfolgte mit UCSF Chimera (Version 1.17.3). (A, D, F) Liganden-Konformationen mit dem besten (Rang 1) *confidence* Score je Ligand. (B, E, H) Liganden-Konformationen mit dem zweitbesten (Rang 2) *confidence* Score je Ligand. (C, F, I) Liganden-Konformationen mit dem drittbesten (Rang 3) *confidence* Score je Ligand. (A - C) Docking von CRP mit Phosphocholin (PC; PubChem-ID 1014). (D - F) Docking von CRP mit Koffein (PubChem-ID 2519). (G - I) Docking von CRP mit Paracetamol (Acetaminophen; PubChem-ID 1983).



Ergänzende Abbildung 16: 3D-Darstellung des *in silico* Dockings von CRP mit Liganden mittels *Attracting Cavities*. Für das Docking mittels *Attracting Cavities* (über SwissDock-Server) wurden ein Protomer des C-reaktiven Proteins (CRP; PDB-Code 1GNH, *chain A*) sowie die *simplified molecular input line entry system* (SMILES)-Strukturcodes der jeweiligen Liganden eingesetzt. Die Visualisierung der Docking-Ergebnisse erfolgte mit UCSF Chimera (Version 1.17.3). (A, D, F) Liganden-Konformationen mit dem besten (Rang 1) *confidence* Score je Ligand. (B, E, H) Liganden-Konformationen mit dem zweitbesten (Rang 2) *confidence* Score je Ligand. (C, F, I) Liganden-Konformationen mit dem drittbesten (Rang 3) *confidence* Score je Ligand. (A - C) Docking von CRP mit Phosphocholin (PC; PubChem-ID 1014). (D - F) Docking von CRP mit Koffein (PubChem-ID 2519). (G - I) Docking von CRP mit Paracetamol (Acetaminophen; PubChem-ID 1983).



Ergänzende Abbildung 17: 3D-Darstellung der bekannten Struktur von humanem CRP im Komplex mit PC. Die Visualisierung des humanen C-reaktiven Proteins (CRP) im Komplex mit Phosphocholin (PC) (PDB-Code 1B09) erfolgte mit UCSF Chimera (Version 1.17.3). **(A)** Pentamere CRP-Struktur, **(B)** Protomer, **(C)** Interaktion zwischen CRP und dem Liganden PC.

PUBLIKATIONSVERZEICHNIS

KONGRESSBEITRÄGE

Buschhaus C., Grau V., Amati AL. *Impact of C-reactive protein on the immunological response of mononuclear leukocytes after severe surgical trauma.*

International Giessen Graduate Centre of the Life Sciences, 2022 (**Poster**).

Deutsche Gesellschaft für Immunologie, 2022 (**Poster**).

Buschhaus C., Grau V., Amati AL. *Anti-inflammatory potential of C-reactive protein (CRP) after severe surgical trauma.*

Fachbereich Medizin, Justus-Liebig-Universität Gießen, 2022 (**Poster**).

Buschhaus C., Grau V., Amati AL. *Does plasma CRP induced by major surgery inhibit the ATP-mediated monocytic IL-1 β release?*

Cardio-Pulmonary Institute, 2023 (**Poster**).

International Giessen Graduate Centre of the Life Sciences, 2023 (**Poster**).

Fachbereich Medizin, Justus-Liebig-Universität Gießen, 2023 (**Poster**).

Buschhaus C., Klatt S., Grau V., Amati AL. *Does caffeine limit the anti-inflammatory potential of C-reactive protein in the context of major surgery?*

International Giessen Graduate Centre of the Life Sciences, 2024 (**Poster**).

Deutsche Gesellschaft für Chirurgie, 2024 (**Vortrag**).

Fachbereich Medizin, Justus-Liebig-Universität Gießen, 2024 (**Vortrag**).

EHRENWÖRTLICHE ERKLÄRUNG

„Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, und dass die vorgelegte Arbeit weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt wurde. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

Ort/Datum

Unterschrift

DANKSAGUNG

Zum Abschluss möchte ich mich von Herzen bei allen bedanken, die mich während der Erstellung dieser Arbeit begleitet und unterstützt haben.

Zuerst geht ein herzliches Dankeschön an Veronika Grau, dafür, dass du stets an deiner optimistischen Sicht auf dieses Projekt festgehalten hast und mir immer mit gutem Rat zur Seite standest. Besonders danke ich dir für deine unermüdliche Unterstützung und dein Verständnis in den letzten Jahren – ohne das wäre mir diese Arbeit so nicht möglich gewesen.

Ebenso danke ich Anca-Laura Amati ganz herzlich für dein Vertrauen bei der Überlassung des Projektes, die hervorragende Einarbeitung und das gemeinsame Freuen und Verzweifeln über die verschiedensten Ergebnisse. Vielen Dank, dass du es immer möglich gemacht hast, mich sowohl fachlich als auch menschlich zu unterstützen.

Ebenfalls möchte ich mich beim gesamten Team der Experimentellen Chirurgie für die schöne gemeinsame Zeit bedanken. Vielen Dank an Katrin Richter für die hilfreichen Ratschläge bei Problemen und die motivierenden Worte zwischendurch. Vielen Dank an Gabi Fuchs-Moll, Kathrin Petri und Sabine Stumpf für die technische und fachliche Unterstützung. Vielen Dank an Marie Dippel für die Freundschaft, die trotz des erschwerten Sichtkontaktes entstanden ist (aber der größere Bildschirm war wirklich nicht nötig...).

Stephan Klatt danke ich für die Durchführung der Massenspektrometrie und die gute Zusammenarbeit.

Ein weiterer Dank gilt Alfredo Cabrera-Orefice für die fachliche Unterstützung beim molekularen Docking und seine Hilfsbereitschaft.

Abschließend möchte ich mich von Herzen bei meiner Familie, insbesondere bei meinen Eltern und meinen Schwestern, bedanken. Annika und Susanne, danke, dass ihr immer für mich da seid und mich durch alle Höhen und Tiefen begleitet habt. Jetzt kann ich euch endlich recht geben – ja, ihr habt es mir schon immer gesagt... Ein besonders großer Dank geht an meine Eltern. Danke für eure bedingungslose Unterstützung, den beständigen Rückhalt in allen Lebenslagen und die stetige Ermutigung, meinen Weg zu gehen.