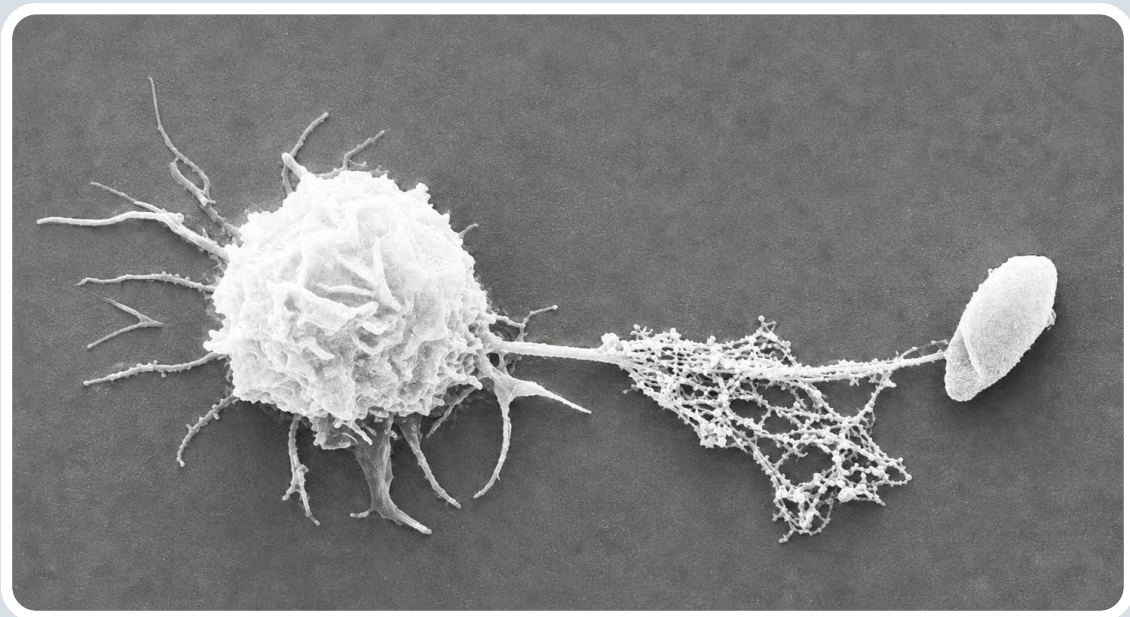


**Charakterisierung früher Immunreaktionen
gegen *Toxoplasma gondii*-Tachyzoiten in primären
Monozyten und THP-1-Zellphänotypen,
einschließlich Validierung eines THP-1-zellbasierten
mononukleären Phagozyten-Modells**



Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet.
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität
Gießen

Dominik Hanke

Bibliografische Informationen der Deutschen Bibliothek

Die Deutsche Bibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie;
detaillierte bibliografische Daten sind im Internet abrufbar über
<http://dnb.ddb.de>

Bild Titelseite

© D. Hanke

ISBN 978-3-86345-807-2

1. Auflage 2026

© 2026 by Verlag:

Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft Service GmbH, Gießen
Printed in Germany

Verlag

DVG Service GmbH
An der Alten Post 2
35390 Gießen
Tel.: 0641 984446-0
info@dvg.de
www.dvg.de

Aus dem Institut für Veterinär-Physiologie und -Biochemie
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Betreuerinnen: Prof. Dr. Sybille Mazurek

Prof. Dr. Anja Taubert

**Charakterisierung früher Immunreaktionen gegen
Toxoplasma gondii-Tachyzoiten in primären Monozyten und
THP-1-Zellphänotypen, einschließlich Validierung eines
THP-1-Zellen-basierten mononukleären Phagozyten-Modells**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines

Dr. med. vet.

beim Fachbereich Veterinärmedizin

der Justus-Liebig-Universität Gießen

Eingereicht von

Dominik Hanke

Tierarzt aus Rheine

Gießen 2026

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. Dr. Stephan Arnold

Gutachter:innen: Prof. Dr. Sybille Mazurek

Prof. Dr. Anja Taubert

Prof. Dr. Andreas Moritz

Prüferin: Prof. Dr. Christiane Herden

Tag der Disputation: 02.09.2026

*“Forschung bedeutet, zu sehen, was alle anderen gesehen haben,
und zu denken, was noch niemand gedacht hat.”*

Albert Szent-Györgyi (1893–1986)

Nobelpreisträger für Medizin/Physiologie des Jahres 1937

Abkürzungsverzeichnis:

3-PG	3-Phosphoglycerat
α -KG	α -Ketoglutarat
°C	Grad Celsius
ACh	Acetylcholin
ACOD	Aconitat-Decarboxylase
ACLY	ATP-Citrat-Lyase
AIDS	<i>Acquired Immunodeficiency Syndrome</i>
AML	akute myeloische Leukämie
ANOVA	<i>Analysis of Variance</i>
AP	<i>Activator Protein</i>
APC	<i>Antigen-Presenting Cell</i>
APP	Akute-Phase-Protein
ATP	Adenosintriphosphat
BzATP	2'(3')-O-(4-Benzoylbenzoyl) Adenosin 5'-Triphosphat
CARKL	<i>Carbohydrate Kinase-Like Protein</i>
CCL	CC-Chemokin-Ligand
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
CDK 6	Cyclin-abhängige Kinase 6
CG	Cathepsin G
CIC	<i>Citrate Carrier</i>
cM	<i>classical monocytes</i>
cMoP	<i>committed monocyte progenitor</i>
CMP	<i>common myeloid progenitor</i>
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CXCL	C-X-C-Chemokin-Ligand
DAMP	<i>damage-associated molecular pattern</i>
DC	<i>dendritic cell</i>

Abkürzungen

DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i>
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
dt.	deutsch
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
eCIRP	<i>cold inducible RNA binding protein</i>
engl.	englisch
ET	<i>extracellular trap</i>
ETC	<i>electron transport chain</i>
extDNA	extrazelluläre DNA, <i>extracellular DNA</i>
F-1,6-BP	Fruktose-1,6-bisphosphat
F-2,6-BP	Fruktose-2,6-bisphosphat
F-6-P	Fruktose-6-phosphat
FBPase2	Fruktose-2,6-bisphosphatase
FKS	fetales Kälberserum
G-3-P	Glycerinaldehyd-3-phosphat
GABA	γ -Aminobuttersäure
GATA	<i>GATA-Binding Protein</i>
GLUT	Glukosetransporter
GLS	Glutaminase
GMP	<i>Granulocyte-Macrophage Progenitor</i>
GPI	Glycosylphosphatidylinositol
GPR 91	G-Protein-gekoppelter Rezeptor 91
gr.	griechisch
GSH	Glutathion
GM-CSF	<i>Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor</i>
GS	Glutaminsynthetase
H ₂ O	Wasser
HFF	humane Vorhaut-Fibroblasten

Abkürzungen

HIF-1 α	<i>hypoxia-inducible factor-1α</i>
HIV	humanes Immundefizienz-Virus
HK	Hexokinase
HMGB1	<i>High-Mobility-Group-Protein B1</i>
HO-1	Hämoxygenase-1
HOCl	hypochlorige Säure
HSC	hämatopoetische Stammzelle
IDH	Isocitrat-Dehydrogenase
IDO	Indolamin-2,3-Dioxygenase
IFM	Immunfluoreszenzmikroskopie, <i>immunofluorescence microscopy</i>
IFN- γ	Interferon- γ
IL	Interleukin
iNOS	induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase
intM	<i>intermediate monocytes</i>
i.p.	intraperitoneal
JAK2	Janus-Kinase 2
JLU	Justus-Liebig-Universität
KI	künstliche Intelligenz
LC	<i>liquid chromatography</i>
LD ₅₀	mittlere letale Dosis
LDH	Laktat-Dehydrogenase, <i>lactate dehydrogenase</i>
LKT	Leukotoxin
LPS	Lipopolysaccharid, <i>lipopolysaccharide</i>
MARC	<i>Meat Animal Research Center</i>
M-CSF	<i>macrophage colony-stimulating factor</i>
MDP	<i>common macrophage and dendritic cell precursor</i>
MET	<i>monocyte/macrophage extracellular trap</i>
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
MOI	<i>multiplicity of infection</i>

Abkürzungen

MPO	Myeloperoxidase, <i>myeloperoxidase</i>
MPS	mononukleäres Phagozytensystem
MS	Massenspektrometrie
nAChR	nikotinischer Acetylcholinrezeptor
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NAE	<i>nuclear area expansion</i>
ncM	<i>non-classical monocytes</i>
NE	neutrophile Elastase
NET	<i>neutrophil extracellular trap</i>
NF- κ B	<i>nuclear factor κ-light-chain-enhancer of activated B cells</i>
NK-Zellen	natürliche Killerzellen
NLRP3	<i>NLR family pyrin domain containing 3</i>
NO	Stickoxide
non-ox. PPP	nicht-oxidativer Pentosephosphatweg
NOX	NADPH-Oxidase
OXPHOS	oxidative Phosphorylierung
ox. PPP	oxidativer Pentosephosphatweg
PAD4	Peptidyl-Arginin-Deiminase 4
PAMP	<i>pathogen-associated molecular pattern</i>
PBS	phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PBMC	<i>peripheral blood mononuclear cell</i>
PC	Phosphocholin
PDH	Pyruvat-Dehydrogenase
PDK1	Pyruvat-Dehydrogenase Kinase 1
PFKB3	6-Phosphofrukto-2-Kinase/Fruktose-2,6-Bisphosphatase 3
PFA	Paraformaldehyd
PFK	Phosphofruktokinase
PGD	6-Phosphogluconat-Dehydrogenase
PGE2	Prostaglandin E2

Abkürzungen

PHD	Prolylhydroxylase
PKM2	Pyruvatkinase-Isoenzym Typ M2
PKC	Proteinkinase C
PMA	Phorbol-Myristat-Acetat
PPAR	<i>Peroxisome proliferator-activated receptor</i>
PR3	Proteinase 3
PRR	<i>Pattern Recognition Receptors</i>
PV	parasitophore Vakuole
R-5-P	Ribose-5-phosphat
Ra	Rezeptorantagonist
RFLP	Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus
RT	Raumtemperatur
ROS	<i>reactive oxygen species</i>
S-7-P	Sedoheptulose-7-phosphat
SDH	Succinat-Dehydrogenase
SEM	<i>scanning electron microscopy</i>
SOCS	<i>suppressor of cytokine signaling</i>
STAT	<i>signal transducer and activator of transcription</i>
TAM	tumorassoziierte Makrophagen
TCA-Zyklus	<i>tricarboxylic acid cycle</i>
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie, <i>transmission electron microscopy</i>
TGF- β	<i>transforming growth factor-β</i>
<i>T. gondii</i>	<i>Toxoplasma gondii</i>
THP-1	<i>Tohoku Hospital Pediatrics-1</i>
THP-1-M0/M1/M2-Makrophagen	THP-1-Zellen abgeleitete M0/M1/M2-ähnliche Makrophagen
TH-Zellen	T-Helferzellen
TLR	Toll-like Rezeptor
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α

Abkürzungen

UDP-GlcNAc	Uridindiphosphat-N-Acetylglukosamin
USA	<i>United States of America</i>
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
ZNS	zentrales Nervensystem

INHALT

A. Einleitung	1
B. Literaturübersicht	5
1. <i>Toxoplasma gondii</i>	5
1.1. Taxonomische Einordnung von <i>Toxoplasma</i>	5
1.2. Lebenszyklus von <i>T. gondii</i>	8
1.3. <i>T. gondii</i> -Infektionen bei Mensch und Tier	11
2. Monozyten und Makrophagen	15
2.1. Monozyten: Charakterisierung und Bedeutung.....	15
2.2. Makrophagen: Charakterisierung und Bedeutung.....	18
2.3. Die THP-1-Zelllinie als <i>in vitro</i> -Modell für mononukleäre Phagozyten	21
2.4. <i>Extracellular traps</i> : Funktion und Relevanz in der Immunabwehr	23
2.5. Zytokin-Sekretion mit Fokus auf IL-1 β und IL-6: Funktion und Relevanz in der Immunabwehr	27
2.6. Metabolische Signatur von Makrophagen.....	31
2.7. Reaktion von Monozyten und Makrophagen auf <i>T. gondii</i> -Stadien	40
C. Veröffentlichungen	43
1. Publikation: “The ATP-mediated cytokine release by macrophages is down-modulated by unconventional $\alpha 9^*$ nicotinic acetylcholine receptors”	43
2. Publikation: “Early responses of primary human and bovine monocytes, monocytic THP-1 cells and THP-1 cell-derived macrophages to vital <i>Toxoplasma gondii</i> tachyzoites”	87
D. Unveröffentlichte Untersuchungen.....	122
1. Untersuchung zum Stoffwechselprofil der monozytären THP-1-Zellen sowie der THP-1-M0-, M1- und M2-Makrophagen nach Konfrontation mit <i>T. gondii</i> -Tachyzoiten	122
1.1. Material und Methoden	122

1.1.1.	THP-1-Zellkultur sowie Differenzierung und Polarisierung zu THP-1-M0-, M1- und M2-Makrophagen	122
1.1.2.	<i>In vitro</i> -Kultivierung von <i>T. gondii</i> -Tachyzoiten.....	124
1.1.3.	Messung von Stoffwechselumsatzraten	127
2.1	Ergebnisse	127
E.	Erweiterte Diskussion	129
1.	Validierung der THP-1-Zelllinie.....	131
2.	Phänotypische Veränderungen und MET-Freisetzung von primären Monozyten in Reaktion auf <i>T. gondii</i> -Tachyzoiten.....	139
3.	Monozytäre Sekretion der pro-inflammatorischen Zytokine IL-1 β und IL-6 in Reaktion auf <i>T. gondii</i> -Tachyzoiten.....	142
4.	Monozytäre Expression von Oberflächenrezeptoren (TLR2, TLR4) sowie von Zytoskelett- und Migrations-assoziierten Markern (F-Aktin, CD11b) während der frühen Immunantwort gegen <i>T. gondii</i> -Tachyzoiten.....	144
5.	Frühe Immunantwort des <i>in vitro</i> -THP-1-Zellmodells gegen <i>T. gondii</i> -Tachyzoiten	146
6.	Methodische Limitationen und zukünftige Perspektiven.....	151
F.	Zusammenfassung.....	154
G.	Summary	157
H.	Literatur.....	160
I.	Anhang.....	185
1.	Publikationsliste	185
1.1.	Originalarbeiten in Fachzeitschriften (<i>peer review</i>).....	185
1.2.	Zitierbare Kurzmitteilungen	185
1.3.	Beiträge bei wissenschaftlichen Konferenzen.....	186
2.	Danksagung.....	187
3.	Erklärung zur Dissertation	188

A. EINLEITUNG

Toxoplasma gondii (*T. gondii*) ist ein weltweit verbreiteter, intrazellulär lebender, apikomplexer Parasit, der alle warmblütigen Tiere, wie auch den Menschen, infizieren kann. Nach Einschätzung des Robert Koch-Instituts hat etwa ein Drittel der Weltbevölkerung eine Infektion mit *T. gondii* durchlaufen, wodurch diese Infektion zu den bedeutendsten parasitären Erkrankungen des Menschen zählt [1]. Endwirte sind ausschließlich Feliden, welche darüber hinaus auch als Zwischenwirte fungieren können. Von den Endwirten werden unsporulierte Oozysten mit dem Kot ausgeschieden, welche in der Außenwelt zu infektiösen, sporulierten Oozysten heranreifen. Werden diese sporulierten Oozysten von Zwischenwirten aufgenommen, kann sich der Parasit in diesen asexuell vermehren [2,3]. Das Spektrum der Zwischenwirte ist extrem breit und umfasst Land- und Meeressäuger sowie Vögel. Nach der oralen Aufnahme sporulierter Oozysten werden im Darm der Wirte Sporozoiten freigesetzt. Diese dringen in die Darmzellen des Wirtes ein und entwickeln sich dort in der akuten Infektionsphase rasch zu schnell teilenden Tachyzoiten und breiten sich über das Gefäß- und Lymphsystem im gesamten Organismus aus. Das Immunsystem reagiert unmittelbar auf die zirkulierenden Tachyzoiten, indem es eine Immunreaktion auslöst. Um der Immunabwehr zu entgehen, entwickelt sich ein Teil der Tachyzoiten im chronischen Infektionsverlauf zu Bradyzoiten, welche durch eine niedrige Teilungsfähigkeit gekennzeichnet sind und in Gewebezysten über mehrere Jahre im Wirt persistieren können [2,3]. Als bedeutendste Infektionsquellen für den Menschen gelten der Verzehr von unzureichend gegartem Fleisch, das infektiöse Gewebezysten enthält, sowie der Verzehr von Lebensmitteln (einschließlich Wasser), welche mit infektiösen, sporulierten Oozysten kontaminiert sind [1].

Im Rahmen der angeborenen Immunantwort von Säugetieren sind Monozyten und Makrophagen Teil der ersten Verteidigungslinie gegen eindringende Pathogene im Gefäßsystem sowie im Gewebe und spielen dabei eine zentrale Rolle in der Aktivierung der adaptiven Immunantwort [4,5]. Monozyten und Makrophagen besitzen auf ihrer Zelloberfläche charakteristische Immunrezeptoren, darunter Toll-like Rezeptoren (TLRs; z. B. TLR2, TLR4) sowie purinerge Rezeptoren wie den P2X7-Rezeptor. Über diese Rezeptoren erkennen Immunzellen die molekularen Strukturen von

Pathogenen, die als *pathogen-associated molecular patterns* (PAMPs) bezeichnet werden, sowie die molekularen Strukturen von geschädigten Zellen, die als *damage-associated molecular patterns* (DAMPs) bekannt sind. Die Aktivierung dieser Rezeptoren löst in Monozyten und Makrophagen intrazellulär spezifische Signalkaskaden aus, die in verschiedenen Effektormechanismen münden. Zu den Effektormechanismen der Monozyten und Makrophagen zählen die Phagozytose von Pathogenen, die Präsentation von Antigenen, die Sekretion pro-inflammatorischer Zytokine (z. B. Interleukin [IL]-1 β , IL-6) und Chemokinen (z. B. CC-Chemokin Ligand 2 [CCL2]) sowie die Produktion von antimikrobiellen Molekülen (z. B. reaktive Sauerstoffspezies [ROS, englisch (engl.) = *reactive oxygen species*]) [6–11].

Ein weiterer wichtiger Effektormechanismus des angeborenen Immunsystems ist die bei neutrophilen Granulozyten erstmals beschriebene Freisetzung von *extracellular traps* (ETs) [12]. Neben neutrophilen Granulozyten können weitere Immunzellen wie Mastzellen [13], basophile, eosinophile oder heterophile Granulozyten [14–16], Monozyten [17–23] und Makrophagen [17,24–26] ETs freisetzen. Die ETs von Monozyten und Makrophagen werden als *monocyte* bzw. *macrophage extracellular traps* (METs) bezeichnet. Zu Beginn der vorliegenden Arbeit war in der Literatur lediglich eine Veröffentlichung bekannt, in der die Freisetzung von METs aus Monozyten nach der Konfrontation mit *T. gondii*-Tachyzoiten beschrieben wurde. Diese Monozyten stammten von Seehunden (*Phoca vitulina*) [19].

Die humane THP-1-Zelllinie, welche aus dem Blut eines einjährigen Patienten mit akuter myeloischer Leukämie (AML) im namensgebenden *Tohoku Hospital Pediatrics* isoliert wurde, ist ein weitgenutztes *in vitro*-Zellkulturmodell zur Untersuchung immunologischer Prozesse, insbesondere der Phagozytose, der Freisetzung von METs sowie der Sekretion von Zytokinen [11,27,28]. Monozytäre THP-1-Zellen können in Zellkultur in M0/M1/M2-ähnliche Makrophagen (THP-1-M0/M1/M2-Makrophagen) differenziert bzw. polarisiert werden (M0 = unspezifischer Typ, M1 = pro-inflammatorischer Typ, M2 = anti-inflammatorischer Typ) [27]. Dies ermöglicht parallele, vergleichende *in vitro*-Untersuchungen zwischen Monozyten und Makrophagen, mit dem Ziel, verschiedene *in vivo*-ähnliche Immunreaktionen (z. B. pro- und anti-inflammatorische) bestmöglich nachzuahmen [27,29]. Obwohl es zahlreiche Protokolle zur Differenzierung und Polarisierung von THP-1-Makrophagen

(M0/M1/M2) in der Literatur gibt, unterscheiden sich diese stark voneinander, je nachdem, welche Stimuli in welcher Konzentration und Inkubationsdauer eingesetzt werden. Durch die Verwendung unterschiedlicher Stimuli entsteht eine hohe Heterogenität der *in vitro*-generierten THP-1-Makrophagen [29–31]. Daher wurden von unseren Kooperationspartnern gängige Differenzierungs- und Polarisierungsstimuli hinsichtlich ihrer Konzentration und Inkubationszeit auf Basis experimenteller Vortestungen optimiert, um ein modifiziertes *in vitro*-Differenzierungs- und Polarisierungsprotokoll zu etablieren [11,32,33]. Da sich die Reaktionsmuster und das Reaktionsspektrum von permanenten Zelllinien aufgrund ihrer Immortalisierung von denen der entsprechenden primären Zelltypen unterscheiden können, wurden die phänotypischen Merkmale der *in vitro*-generierten THP-1-Makrophagen (M0/M1/M2) im Rahmen dieser Arbeit mit den Befunden aus der Literatur abgeglichen. Ziel war es, die korrekte *in vitro*-Differenzierung und Polarisierung hinsichtlich folgender Parameter zu validieren:

- Morphologie
- Oberflächenexpression von pro-inflammatorischen Markern (*Cluster of Differentiation* [CD]38, CD83, CD80 und CD86) und anti-inflammatorischen Markern (CD163, CD206 und CD209)
- Funktionelle Sekretion von IL-1 β
- Metabolisches Profil von Umsatzraten der Glykolyse, Glutaminolyse und Serinolyse

Nach Validierung der differenzierten und polarisierten THP-1-Zellen wurde in der vorliegenden Arbeit erstmals untersucht, ob auch bei primären humanen und bovinen Monozyten eine MET-Freisetzung als Antwort auf eine Konfrontation mit *T. gondii*-Tachyzoiten auftritt. Darüber hinaus wurden in dieser Arbeit erstmals weitere wichtige Effektormechanismen untersucht, darunter die Effekte der Konfrontation mit *T. gondii*-Tachyzoiten auf die Morphologie, die pro-inflammatorische Zytokinsekretion (IL-1 β , IL-6) sowie die Expression der Immunrezeptoren TLR2 und TLR4, des Zytoskelett-assoziierten Markers F-Aktin und des Migrations-assoziierten Markers CD11b in denselben primären Zellpopulationen. Um die Frage der Übertragbarkeit von Ergebnissen aus immunologischen Zellkulturversuchen auf *in vivo*-Bedingungen zu beantworten, wurden die oben genannten Effektormechanismen parallel auch in *T. gondii*-Tachyzoiten-konfrontierten THP-1-Zellkulturen, getrennt nach monozytären

THP-1-Zellen, differenzierten THP-1-M0-Makrophagen und polarisierten THP-1-M1- und M2-Makrophagen, untersucht. Ergänzend wurde der Effekt der Konfrontation mit *T. gondii*-Tachyzoiten auf die Stoffwechselsignaturen von monozytären THP-1-Zellen und THP-1-Makrophagen (M0/M1/M2) in Zellkulturüberständen analysiert, wobei insbesondere die Glykolyse, Glutaminolyse und Serinolyse berücksichtigt wurden.

Für die Anfertigung dieser Dissertation wurden künstliche Intelligenz (KI)-basierte Systeme wie DeepL Write, das Justus-Liebig-Universität (JLU)-Tool „kiChat“ und Perplexity AI ausschließlich zur grammatikalischen und sprachlichen Optimierung einzelner Textabschnitte verwendet.

B. LITERATURÜBERSICHT

1. *Toxoplasma gondii*

1.1. Taxonomische Einordnung von *Toxoplasma*

Die Gattung *Toxoplasma* ist taxonomisch in die Familie Sarcocystidae, die Ordnung Eimeriida, in die Klasse der Apicomplexa einzuordnen und umfasst mit der im Jahr 1908 entdeckten Art *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*) nur eine einzige Spezies [34–36]. Zum Stamm Apicomplexa gehören mehr als 6.000 obligat intrazellulär lebende Arten, die in unterschiedlichsten Habitaten, wie Boden-, Süßwasser- und Meeresökosystemen, vorkommen [37]. In Europa, Nordamerika und Afrika weist *T. gondii* drei Hauptgenotypen (Typ-I, -II und -III) auf, während sich die Isolate aus Südamerika (Brasilien, Kolumbien) biologisch und genetisch davon unterscheiden [38,39]. Die drei klonalen Linien entstanden vor etwa 10.000 Jahren, parallel zur Ausbreitung der Landwirtschaft und der Domestizierung der Katze, wodurch sich im Laufe der Zeit die orale Infektiosität steigerte und die Ausbreitung durch asexuelle Vermehrung erleichterte [36,40]. Es wird angenommen, dass die drei dominanten klonalen Linien durch begrenzte, überwiegend asexuelle Rekombination aus wenigen ursprünglichen Linien entstanden, was die heutige, geografisch begrenzte genetische Vielfalt erklärt [39]. Klonale Linien dominieren anthropogen geprägte Lebensräume, die durch landwirtschaftliche Nutzung und Urbanisierung beeinflusst sind, während divergente Stämme überwiegend in sylvatischen Lebensräumen und damit in vom Menschen weitestgehend unbeeinflussten Habitaten vorkommen [41,42]. Die unterschiedlichen Verteilungsmuster der klonalen Linien und divergenten Stämme weisen auf die Koexistenz von zwei unabhängigen, ökologischen Lebenszyklen von *T. gondii* hin [36].

Natürliche Barrieren gegen eine *T. gondii*-Infektion stellen das Darmepithel, die Blut-Hirn-Schranke und die Plazenta dar [43]. Die Pathogenität des jeweiligen Parasitenstammes hängt maßgeblich von seiner Proliferationsrate ab und wird wissenschaftlich im Mausmodell anhand der mittleren letalen Dosis (LD₅₀) nach intraperitonealer (i.p.) Inokulation einer definierten Anzahl von Tachyzoiten bewertet

[43–45]: Typ-I-Isolate sind hochvirulent und führen innerhalb von < 10 Tagen zum Tod der Mäuse bei i.p.-Inokulation von < 10 Tachyzoiten ($LD_{100} \approx 1$), während die avirulenten Stämme Typ-II/III das Überleben nach i.p.-Verabreichung von > 103 Tachyzoiten ermöglichen ($LD_{50} > 103$) [43–45].

Systematische Genotypisierungen zwischen den Jahren 1995 und 2024 belegen, dass der Typ-II-Stamm der vorherrschende Genotyp der humanen Toxoplasmose ist [46,47]. Die Prävalenz von *T. gondii*-Genotypen variiert je nach Kontinent [46]: Typ-I-Stämme zeigen die höchste Prävalenz (19,6 %) in Amerika und die niedrigste Prävalenz (6,3 %) in Afrika. Typ-II-Stämme dominieren in Europa (69,4 %), Typ-III-Stämme in Amerika (12,4 %), während letztere in Europa am seltensten vorkommen (6,9 %). Atypische Typ-I-Isolate oder Typ-I-ähnliche Stämme verursachen beim Menschen meist eine schwere Retinochoroiditis und können bei immungeschwächten Personen akute oder disseminierte lebensbedrohliche Formen der Toxoplasmose auslösen [46]. Eine Studie aus dem Jahr 2019 identifizierte bei immungeschwächten Personen am häufigsten Stämme vom Typ-II (64,3 %), gefolgt von Typ-I mit 21,4 %, Typ-III mit 10,7 % und gemischten/rekombinanten Typen mit 3,6 % [46]. Die Dominanz von Typ-II-Stämmen in der immungeschwächten Personengruppe spiegelt möglicherweise deren hohe Prävalenz in der Allgemeinbevölkerung wider [46]. Im Laufe der Zeit wurden in den beiden größten wissenschaftlichen Sammlungen für *T. gondii*-Stämme, der genetischen Datenbank ToxoDB (verwaltet in den Vereinigten Staaten von Amerika [USA, englisch (engl.) = *United States of America*]) und der Stamm-Biobank ToxoCRB (verwaltet in Frankreich), ca. 1400–1500 *T. gondii*-Stämme charakterisiert bzw. hinterlegt, darunter Typ-I (ToxoDB#10), Typ-II (ToxoDB#1 klonal, ToxoDB#3 Variante) und Typ-III (ToxoDB#2) sowie atypische/exotische Varianten wie Chinese 1 (ToxoDB#9, 10), Typ-Br-I (ToxoDB#6), Typ-Br-II (ToxoDB#11), Typ-Br-III (ToxoDB#8), Typ-IV (ToxoDB#17) und Typ-12 (ToxoDB#4, 5) [46,48]. Die Genotypisierung der *T. gondii*-Stämme erfolgt mit zwei etablierten Verfahren: einer multiplex-nested Polymerase-Kettenreaktion mit Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus (RFLP)-Analyse sowie einer Mikrosatelliten (MS)-gestützten Typisierung. Beide Methoden identifizieren Typ-I/II/III-Genotypen zuverlässig, jedoch ermöglicht ausschließlich die MS-Typisierung die Differenzierung eng verwandter Stämme innerhalb eines Typs [48].

Die Genotypen im murinen System unterscheiden sich wie folgt: Typ-I-Stämme wie RH oder GT1 sind hochvirulent, verursachen akute, letale Infektionen bei Mäusen, und weisen ein geringes Potenzial zur Gewebezystenbildung auf. Typ-II-Stämme wie ME49 oder Prugniaud gelten als mehr oder weniger avirulent, führen überwiegend zu chronischen Infektionen und besitzen ein hohes Zystenbildungspotenzial. Typ-III-Stämme wie CTG oder VEG zeigen eine etwas höhere Pathogenität als Typ-II-Stämme, sind aber ebenfalls in der Lage Gewebezysten zu bilden [36,49].

Genotypisierungen von *Toxoplasma*-Isolaten aus Schweinen, Lämmern und Ziegen belegen, dass bei Nutztieren in den USA Typ-II-Stämme am häufigsten vorkommen, gefolgt von Typ-III- und atypischen Stämmen, während Typ-I-Stämme nur selten nachgewiesen wurden [39,50–53].

Die genetische Divergenz zwischen europäischen und nordamerikanischen Stämmen ist auf DNA-Ebene gering [38]. Im Gegensatz zu den genetisch homogenen *Toxoplasma*-Stämmen in Europa und Nordamerika weisen *Toxoplasma*-Isolate aus Südamerika, Afrika und Asien eine größere genetische Vielfalt auf [36,54]. Insbesondere in Brasilien gibt es zahlreiche atypische Genotypen, die sich biologisch und genetisch von den Typ-I/II/III-Stämmen unterscheiden [36,55,56]. In *T. gondii*-Isolaten von Hühnern, Katzen, Hunden, Ziegen, Schafen und Capybaras aus unterschiedlichsten geografischen Regionen Brasiliens, wurden am häufigsten die Genotypen Typ-Br-I (ToxoDB#6; 11 %), Typ-Br-II (ToxoDB#11; 5,5 %) und Typ-Br-III (ToxoDB#8; 3 %) nachgewiesen [56,57]. Südamerikanische Stämme ähneln in ihrer Pathogenität den Typ-I-Stämmen, besitzen jedoch ein erhöhtes Zystenbildungspotenzial und eine verringerte orale Infektiosität [36,58].

1.2. Lebenszyklus von *T. gondii*

T. gondii zeichnet sich durch ein extrem breites Zwischenwirtsspektrum aus, darunter Land- und Meeressäuger sowie Vögel, bei denen ausschließlich die asexuelle Entwicklung stattfindet. Katzen sowie andere Mitglieder der Familie Felidae fungieren als Endwirte, bei denen sich auch sexuelle Stadien entwickeln [59,60]. Der Lebenszyklus von *T. gondii* entspricht dem typischen Muster von Kokzidien und umfasst die Entwicklung von drei infektiösen Stadien (**Abb. 1** und **Abb. 2**) [2,35,59,61]: Tachyzoiten (griechisch [gr.] = *tachos*, deutsch [dt.] = schnell, **Abb. 1A**) stellen sich als schnell teilende Stadien dar, die charakteristischerweise bei akuten Infektionen auftreten. Bradyzoiten (gr. = *brady*, dt. = langsam, **Abb. 1B**) sind sich langsam teilende Stadien, die sich in Gewebezysten entwickeln und typischerweise bei chronischen Infektionen vorkommen. Sporozoiten (gr. = *sporos*, dt. = Keim, **Abb. 1C**) entstehen ausschließlich im Endwirt – den Feliden – während der Sporogonie im Oozysten-Stadium und werden über den Kot der Feliden in die Umwelt ausgeschieden.

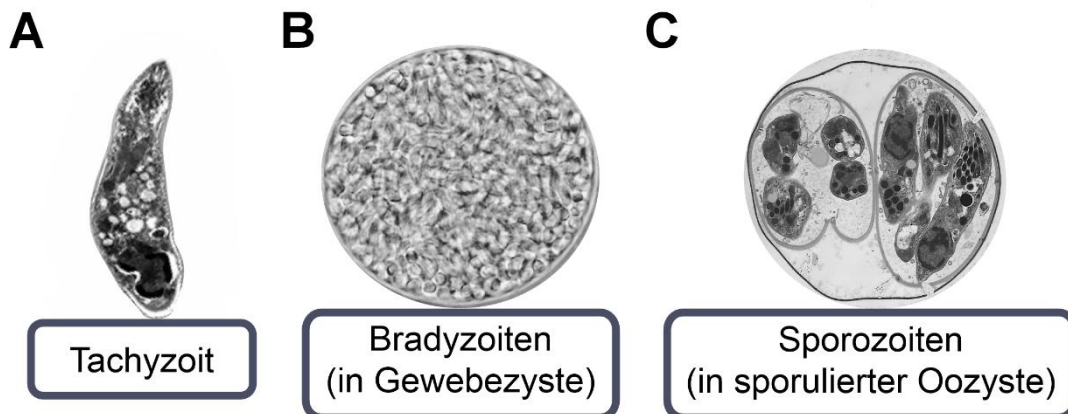


Abb. 1: Entwicklungsstadien von *Toxoplasma gondii* (eigene Abb., modifiziert nach Dubey et al. 1998 und Fernández-Escobar et al. 2022)

Gezeigt werden (A) die sich schnell teilenden, sichelförmigen Tachyzoiten (2 x 6 µm), (B) die sich langsam teilenden Bradyzoiten (1,5 x 7 µm) in Gewebezysten (Ø 5–100 µm) sowie (C) die in einer sporulierten Oozyste (10 x 12 µm) enthaltenen Sporozoiten (2 x 6–8 µm).

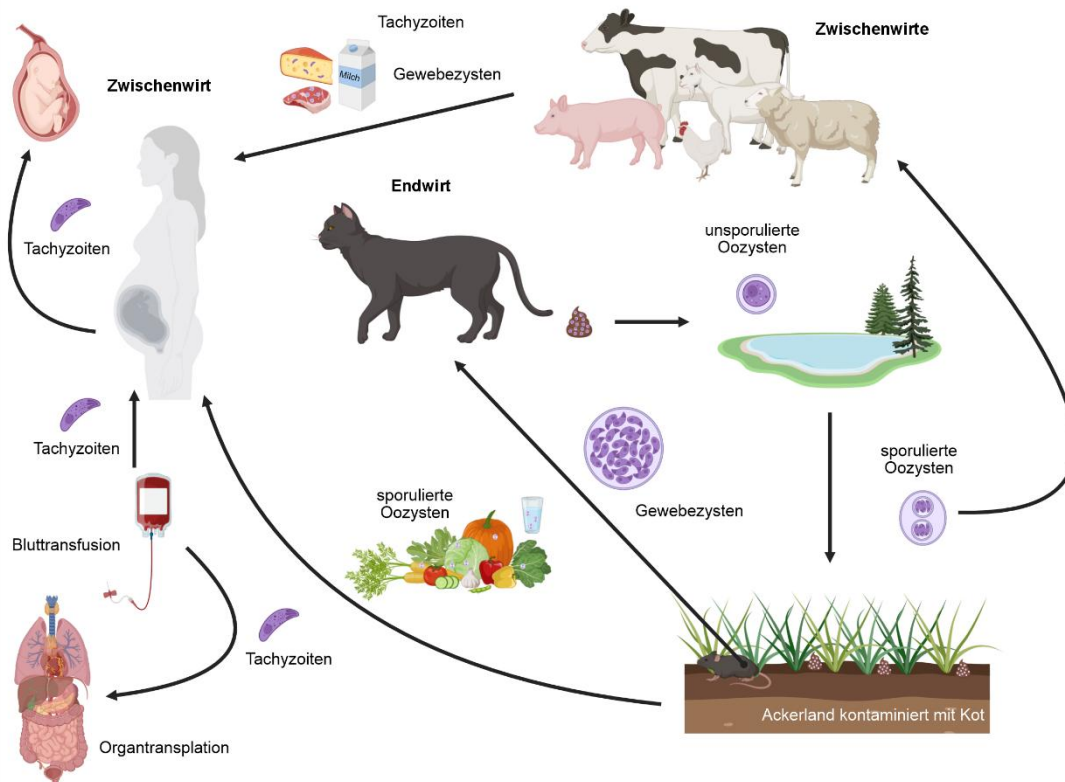


Abb. 2: Vereinfachter Entwicklungszyklus von *Toxoplasma gondii*

Schematische Darstellung des komplexen Entwicklungszyklus von *T. gondii* mit der Katze als Endwirt und verschiedenen warmblütigen Zwischenwirten (Mensch, Rind, Schwein, Huhn, Schaf, Ziege und Nagetiere). Nach Aufnahme infektiöser, sporulierter Oozysten oder Gewebezysten (mit darin enthaltenen Bradyzoiten) durch den Endwirt findet die sexuelle Vermehrung (Gamogonie) im Darmepithel der Katze statt, was zur Ausscheidung unsporulierter Oozysten mit dem Kot führt. In der Außenwelt sporulieren die Oozysten zum infektiösen Stadium und können Ackerflächen und Oberflächengewässer kontaminieren. Eine Infektion des Menschen erfolgt typischerweise durch den Verzehr von unzureichend gegartem, zystenhaltigem Fleisch, den Verzehr bzw. das Trinken von mit sporulierten Oozysten kontaminierten Lebensmitteln oder Wasser sowie durch die direkte Aufnahme von sporulierten Oozysten aus der Umwelt. Nach peroraler Aufnahme sporulierter Oozysten oder Gewebezysten mit Bradyzoiten durch Zwischenwirte werden Sporozoiten bzw. Bradyzoiten freigesetzt, die sich in Wirtszellen zu Tachyzoiten entwickeln und sich schnell asexuell in Wirtszellen vermehren. Durch Wirtszelllyse werden Tachyzoiten freigesetzt, die sich hämatogen und lymphogen in verschiedene Organe ausbreiten. Nach Einsetzen der Immunantwort kommt es zur Stadiumkonversion von Tachyzoiten zu Bradyzoiten, die Gewebezysten bilden, in welchen *T. gondii* über Jahre persistieren kann. Weitere Übertragungswege beim Menschen umfassen die transplazentare Transmission nach Erstinfektion während der Schwangerschaft sowie Bluttransfusionen und Organtransplantationen, bei denen Tachyzoiten oder Gewebezysten direkt auf den Fötus bzw. Empfänger übertragen werden können (erstellt mit BioRender).

Werden infektiöse Oozysten vom End- oder Zwischenwirt oral aufgenommen, kommt es zunächst zur Exzystierung, wobei Sporozoiten freigesetzt werden, die in Zellen der Lamina propria eindringen und sich dort in Tachyzoiten umwandeln. Innerhalb des Wirts vermehren sich die Tachyzoiten in der akuten Infektionsphase asexuell durch Endodyogenie (Merogonie) in nahezu allen kernhaltigen Zelltypen in parasitophoren Vakuolen (PV), wodurch es infolge wiederholter Merogoniezyklen zu einer ausgeprägten Wirtszelllyse kommt. Nach einer Präpatenz von 3–10 Tagen führt die sexuelle Entwicklung (Gamogonie) im Endwirt zur Bildung unsporulierter Oozysten, die sich bei ausreichender Feuchtigkeit und Temperaturen von 10–30 °C innerhalb von 1–5 Tagen zu infektiösen, sporulierten Oozysten mit jeweils acht enthaltenen Sporozoiten entwickeln [2,35,62]. Innerhalb der Endwirte kann ein Teil der Tachyzoiten in das Darmepithel zurückkehren und erneut die Gamogonie durchlaufen, sodass nach einer Präpatenz von 18–36 Tagen weitere Oozysten gebildet werden können. Über das Blut- und Lymphgefäßsystem breiten sich Tachyzoiten im gesamten Wirtsorganismus aus und dringen u. a. über infizierte Monozyten, die als „Trojanisches Pferd“ fungieren, in das zentrale Nervensystem (ZNS) ein [35,63].

In der chronischen Infektionsphase findet die Stadiumkonversion statt, in der sich Tachyzoiten unter Einfluss der zellulären Immunantwort, insbesondere durch Interferon- γ (IFN- γ) aus T-Helfer-Zellen-Subtyp 1 (TH1-Zellen) und natürlichen Killerzellen (NK-Zellen), zu Bradyzoiten umwandeln [35]. Die Stadiumkonversion zu Bradyzoiten wird durch die IFN- γ -vermittelte Induktion von Stickoxiden (NO) über induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase (iNOS) sowie von Indolamin-2,3-Dioxygenase (IDO) initiiert. Letztere fördert den Tryptophan-Abbau und löst so eine Reduktion des Tryptophans im Zytoplasma der Wirtszellen aus, wodurch das Wachstum des Tryptophan-auxotrophen Parasiten (Stoffwechsel-bedingt abhängig von externem Tryptophan) gehemmt wird [35,64,65]. Bradyzoiten bilden langlebige, meist wenig pathogene Gewebezysten, welche bevorzugt in Muskulatur, Gehirn, Auge aber seltener in Leber, Lunge und Niere lokalisiert sein können [2]. Bei oraler Aufnahme von zystenhaltigem Gewebe werden während der Magen-Darm-Trakt-Passage Bradyzoiten aus den Zysten freigesetzt, welche daraufhin das Dünndarmepithel (Jejunum, Ileum) infizieren. Dort wandeln sich Bradyzoiten in Tachyzoiten um, die sich schnell vermehren und anschließend im gesamten Organismus ausbreiten [35].

1.3. *T. gondii*-Infektionen bei Mensch und Tier

T. gondii zählt weltweit zu den häufigsten Zoonose-Parasiten: Etwa ein Drittel der Weltbevölkerung hat eine Infektion durchlaufen, wobei die Seroprävalenzraten regional von < 10 % bis > 70 % variieren [1,66]. Die klinische Bedeutung für den Menschen wurde erstmals im Jahr 1939 deutlich, als nach einer pränatalen Infektion im Gewebe eines Neugeborenen in New York (USA) *T. gondii* als Erreger nachgewiesen wurde [67,68]. Erst im Jahr 1957 bestätigte sich die veterinärmedizinische Relevanz von *T. gondii* als Ursache gehäufte Fehlgelbten bei Schafen in Neuseeland und gilt seither als einer der wichtigsten Aborterreger dieser Spezies [68–70].

Eine *T. gondii*-Infektion beim Menschen erfolgt hauptsächlich oral über den Verzehr von unzureichend erhitzten, mit sporulierten Oozysten kontaminierten Nahrungsmitteln (Wasser, Gemüse und Obst) oder zystenhaltigem Fleisch (Rind, Huhn und Schwein) sowie, wenn auch seltener, von mit Tachyzoiten kontaminierter Rohmilch bzw. Käse (Schaf, Ziege und Rind), wobei die Häufigkeit der Infektion naturgemäß von individuellen und regionalen Verbrauchergewohnheiten beeinflusst wird (**Abb. 2**) [68,71–73]. Ebenso ist eine kongenitale Übertragung von Tachyzoiten über die Plazenta sowie eine Übertragung von Gewebezysten und Tachyzoiten über Organtransplantation oder Bluttransfusion möglich (**Abb. 2**) [74]. Feliden infizieren sich primär durch die orale Aufnahme von Beutetieren, wie Nagetiere und Vögel, die Gewebezysten enthalten (**Abb. 2**) [39]. Ähnlich wie der Parasit *Dicrocoelium dendriticum* (Trematode) das Ameisenverhalten manipuliert, um seinen Lebenszyklus zu sichern, kann *T. gondii* die angeborene Katzenurin-Abneigung von chronisch infizierten Nagetieren in Anziehung umwandeln. Diese Verhaltensmanipulation erhöht die Prädationswahrscheinlichkeit durch den Endwirt [63,75]. Bereits nach Aufnahme nur eines Bradyzoiten oder einer Gewebezyste kann eine Katze im Verlauf der Infektion 100 Millionen unsporulierte Oozysten mit dem Kot ausscheiden [39]. Ähnlich wie Feliden infizieren sich wildlebende, fleischfressende Zwischenwirte wie z. B. Schwein, Bär, Fuchs, Waschbär und Stinktier über Gewebezysten oder sporulierte Oozysten [76]. Das Auftreten von *T. gondii*-Infektionen bei Meeressäugtieren deutet darauf hin, dass *T. gondii* über kontaminiertes Oberflächenwasser in die Meeresumwelt gelangen kann und dort im Oozysten-Stadium überlebt [39]. Die perorale Aufnahme von Oozysten gilt insgesamt als vorherrschender Übertragungsweg für *T. gondii*-Infektionen. Entsprechend lassen sich Infektionen bei

nicht-fleischfressenden Wiederkäuern, Vögeln, wildlebenden Pflanzenfressern sowie restriktiv gehaltenen Schweinen sehr wahrscheinlich auf Umweltkontamination mit Oozysten zurückführen [39,76].

Die klinischen Symptome der Toxoplasmose resultieren primär aus der Lyse-bedingten Zerstörung infizierter Wirtszellen während der akuten Infektionsphase, ausgelöst durch schnelle, intrazelluläre Tachyzoiten-Vermehrung sowie den daraus resultierenden Gewebeschädigungen, welche bis zur Nekrose führen können [77]. Die systemische Dissemination während der *T. gondii*-Infektion korreliert mit der Vielfalt klinischer Symptome [63]. Im Falle einer Primärinfektion während der Schwangerschaft bzw. Trächtigkeit seronegativer Individuen (Mensch, Schaf, Ziege und Nagetier) ist eine transplazentare Übertragung auf den Fötus möglich (**Abb. 2**) [35,63]. Mögliche Folgen einer kongenitalen Infektion sind Retinochoroiditis, Hydrozephalus, zerebrale Verkalkung und Abort des Fötus sowie nach der Geburt auftretende geistige Behinderung, Krampfanfälle etc. [78]. Kongenital infizierte Kinder sind nach der Geburt oft asymptomatisch, entwickeln jedoch später häufig Sehbeeinträchtigungen [79]. Der Zeitpunkt der Infektion während der Schwangerschaft bestimmt die Schwere des Verlaufs, wobei *T. gondii*-Infektionen in der Frühschwangerschaft (bis zur 12. Schwangerschaftswoche) i. d. R. gravierendere Auswirkungen haben als spätere Infektionen [78]. Eine Primärinfektion verläuft bei immunkompetenten Personen meist asymptomatisch. Gelegentlich treten unspezifische, grippeähnliche Symptome wie Lymphadenopathie oder Fieber, Kopf- und Gliederschmerzen auf [78]. Obwohl *T. gondii* eine Vielzahl von Geweben befällt, betreffen die meisten klinischen Manifestationen der Toxoplasmose das Gehirn und das Auge. Insbesondere bei Erwachsenen kann es bei Primärinfektion zu einer okulären Toxoplasmose kommen, welche weltweit die häufigste Ursache einer posterioren Uveitis darstellt und zur Erblindung der betroffenen Patienten führen kann [80]. Neben Feten gehören immungeschwächte Personen wie *Acquired Immunodeficiency Syndrome* (AIDS)-, Chemotherapie- oder Humane Immundefizienz-Virus (HIV)-Patienten sowie Organtransplantatempfänger ebenfalls zu Risikogruppen, bei denen *T. gondii* als opportunistischer Erreger klinisch bedeutsam ist. Bleibt eine latente Infektion hier unentdeckt, kann es durch die beeinträchtigte T-Zell-Funktion in diesen Personengruppen zu einer Reaktivierung von Gewebezysten im Gehirn kommen und im unbehandelten Fall eine lebensbedrohliche Toxoplasma-Enzephalitis (TE) verursachen [63,78,81]. Ebenso besteht eine statistische

Assoziation zwischen latenter *T. gondii*-Infektion und psychiatrischen Erkrankungen wie Schizophrenie sowie bipolaren Störungen, möglicherweise vermittelt durch parasiteninduzierte Veränderungen im Gehirn mit Dysregulation von Neurotransmittern wie Dopamin und Serotonin [82–84].

Bei Rindern wurde die Toxoplasmose erstmals im Jahr 1953 in Ohio (USA) dokumentiert [72,85,86]. In der Schweiz wurde *T. gondii* aus Rindern genotypisiert, wobei hauptsächlich Allele des Typ-II-Stamms sowie vereinzelt Typ-I- und Typ-III-Stämme nachgewiesen wurden, was auf eine genetische Vielfalt des Parasiten in dieser Tierpopulation hinweist [87]. Die *T. gondii*-Seroprävalenz beträgt bei Rindern in Mitteleuropa meist unter 10 % [35] und weltweit durchschnittlich 18 % [88]. Rinder gelten als suboptimale Wirte, da der Parasit nach der Infektion entweder eliminiert oder nur in geringen, schwer nachweisbaren Mengen im Gewebe verbleibt [68,89]. Dennoch stellt der Verzehr von rohem oder nicht ausreichend gegartem Rindfleisch ein Infektionsrisiko dar, sofern infektiöse Gewebezysten vorhanden sind [72,88,90]. Der Nachweis von *T. gondii*-DNA im Rindergewebe bestätigt dieses Infektionsrisiko [91], wobei Gewebezysten in der Skelettmuskulatur selten sind [92,93].

In Prävalenzstudien zu Lämmern aus den USA, die für den menschlichen Verzehr vorgesehen waren, wurden in 27,1 % von 383 getesteten Tieren Antikörper gegen *T. gondii* nachgewiesen, was auf eine hohe Prävalenz in dieser Spezies hinweist [39,51]. Hühner können in der *T. gondii*-Epidemiologie als Infektionsquelle für Feliden und Menschen eine bedeutende Rolle spielen, was die hohen Prävalenzraten bei privat gehaltenen Hühnern (bis zu 100 %) sowie bei Freilandhühnern (30–50 %) bestätigen [94]. Klinische und subklinische Toxoplasmose wurden bei wildlebenden Huftieren, Beuteltieren, Affen und Meeressäugern, insbesondere bei Populationen südlicher Seeotter, beobachtet [76].

Schweine-, Hühner- und Rindfleisch sind in Deutschland die am häufigsten konsumierten Fleischsorten und stellen ein potenzielles Übertragungsrisiko für *T. gondii* dar [95]. Eine Untersuchung aus dem Jahr 2005 von 2.094 Schweinefleischproben aus dem US-Einzelhandel ergab, dass 0,5 % der Proben lebensfähige *T. gondii*-Gewebezysten enthielten und dass Schweinefleisch das höchste Infektionsrisiko im Vergleich zu Hühner- oder Rindfleisch darstellte [93]. Freiland-Schweine weisen deutlich höhere Infektionsraten auf (50–90 %) als konventionell gehaltene Mastschweine [96,97].

Insbesondere bei Bio-Schweinen in den USA wurde eine hohe Prävalenz nachgewiesen, wodurch ein erhöhtes Gesundheitsrisiko beim Verzehr ökologischer Schweineprodukte besteht [39,97]. Im Laufe der vergangenen 20 Jahre sank jedoch die *T. gondii*-Prävalenz bei Stallschweinen in den USA vor allem durch verbesserte Biosicherheitsmaßnahmen (Zutrittsbeschränkung, Nagetierkontrolle, kontrollierte Fütterung und Katzenausschluss) von 23 % auf 2,7 % [39].

2. Monozyten und Makrophagen

2.1. Monozyten: Charakterisierung und Bedeutung

Monozyten (gr. = *monos*, dt. = allein/einzeln; gr. = *kýtos*, dt. = Zelle; auch „Fresszellen“ genannt) sind neben neutrophilen Granulozyten die wichtigsten Leukozyten des angeborenen Immunsystems und zirkulieren im Blut, im Knochenmark oder in der Milz [98]. Monozyten verbleiben etwa 1–2 Tage im Blutkreislauf, bevor sie entweder in das Gewebe migrieren oder durch Apoptose eliminiert werden [98]. Beim Menschen machen Monozyten etwa 10 % und bei Rindern rund 4 % der Gesamtzahl der Leukozyten aus [98–100]. Morphologisch sind Monozyten durch einen ovalen oder nierenförmigen Zellkern sowie durch ein hohes Zytoplasma-Zellkern-Verhältnis charakterisiert [98]. Die Differenzierung zu Monozyten erfolgt im Knochenmark aus hämatopoetischen Stammzellen (HSCs) über verschiedene Zwischenstufen wie myeloische Vorläufer (CMP, engl. = *common myeloid progenitor*), Granulozyten-Makrophagen-Vorläufer (GMP, engl. = *Granulocyte-Macrophage Progenitor*), Makrophagen-dendritische Zellen-Vorläufer (MDP, engl. = *common macrophage and dendritic cell precursor*) und Monozyten-Vorläufer (cMoP, engl. = *committed monocyte progenitor*) [98].

Monozyten zählen mit Makrophagen und dendritischen Zellen (DCs, engl. = *dendritic cells*) zum mononukleären Phagozytensystem (MPS) und zeichnen sich durch eine schnelle Rekrutierung bei Infektionen oder Gewebeschädigungen aus [100,101]. Zu den klassischen Effektorfunktionen von Monozyten zählen die Phagozytose von Pathogenen oder Fremdkörpern, die Sekretion von Zytokinen (z. B. Interleukin [IL]-1 β , IL-6) und Chemokinen (z. B. CC-Chemokin-Ligand [CCL]2), die Produktion von antimikrobiellen Molekülen wie NO, reaktiven Sauerstoffspezies (ROS, engl. = *reactive oxygen species*) und Myeloperoxidase (MPO) sowie die Freisetzung von *extracellular traps* (ETs). Darüber hinaus exprimieren sie verschiedene *Pattern Recognition Receptors* (PRRs) wie Toll-like Rezeptoren (TLRs; z. B. TLR2, TLR4), welche auf ihrer Zelloberfläche zur Erkennung von z. B. Pathogenen dienen sowie purinerge Rezeptoren (z. B. P2X7-Rezeptor), die u. a. durch extrazelluläres

Adenosintriphosphat (ATP) aktiviert werden und Gefahrensignale detektieren (**Abb. 3**) [6–11,21,98].

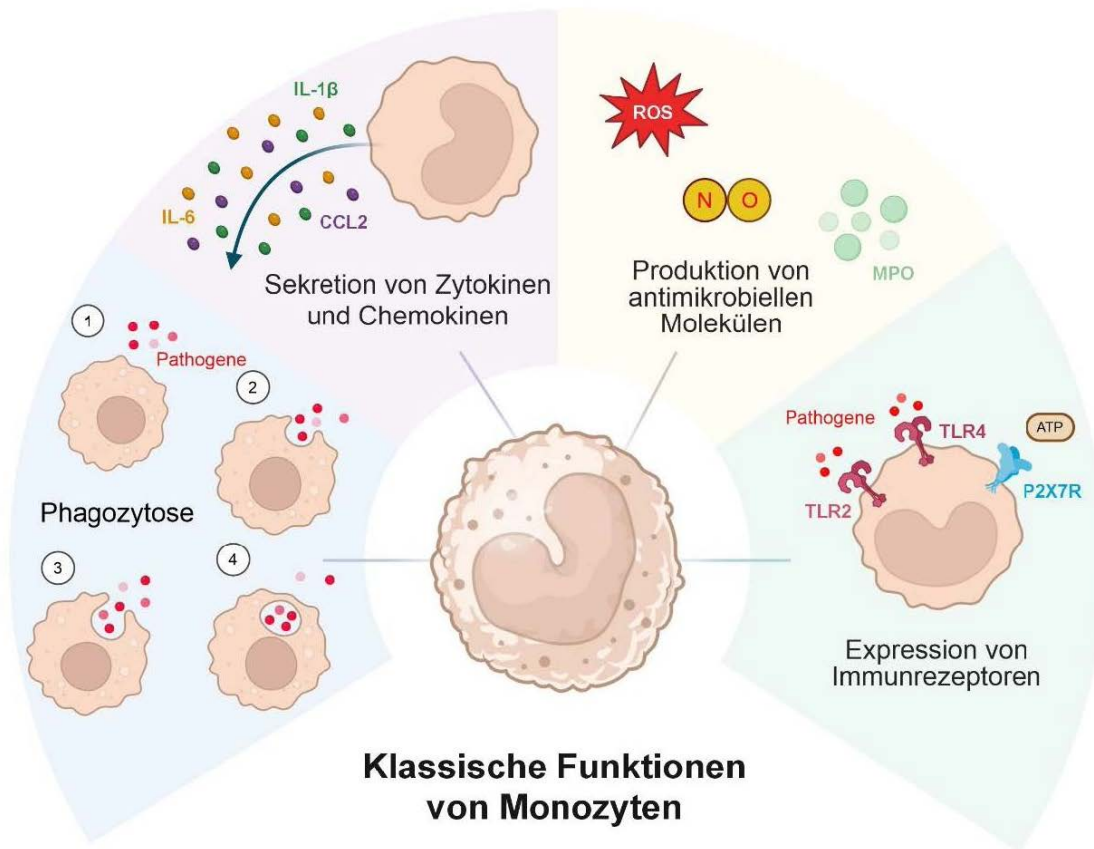


Abb. 3: Klassische Funktionen von Monozyten

Monozyten eliminieren Pathogene durch Phagozytose (1–4), sezernieren pro-inflammatorische Zytokine (Interleukin [IL]-1 β , IL-6) und Chemokine (CC-Chemokin Ligand [CCL]2), produzieren antimikrobielle Substanzen wie Stickoxide (NO), *reactive oxygen species* (ROS) sowie Myeloperoxidase (MPO) und exprimieren zur Pathogenerkennung verschiedene *Pattern Recognition Receptors* (PRRs) wie Toll-like Rezeptor (TLR)2 und TLR4 sowie zur Erkennung von Gefahrensignalen wie Adenosintriphosphat (ATP) purinerge Rezeptoren wie den P2X7-Rezeptor (erstellt mit BioRender).

Beim Menschen werden zirkulierende Monozyten über die Oberflächenmarker *Cluster of Differentiation* (CD)14 und CD16 in drei Subpopulationen eingeteilt [98,102,103]:

- klassische Monozyten (cM, engl. = *classical monocytes*):
CD14⁺⁺CD16⁻ (hohe CD14-, keine CD16-Expression)
- intermediäre Monozyten (intM, engl. = *intermediate monocytes*):
CD14⁺⁺CD16⁺ (hohe CD14-, niedrige CD16-Expression)
- nicht-klassische Monozyten (ncM, engl. = *non-classical monocytes*):
CD14⁺CD16⁺⁺ (niedrige CD14-, hohe CD16-Expression)

Bei Rindern erfolgt eine vergleichbare Einteilung [103]:

- cM: CD14⁺⁺CD16⁻ (hohe CD14-, keine CD16-Expression)
- intM: CD14⁺⁺CD16⁺ (hohe CD14-, niedrige CD16-Expression)
- ncM: CD14⁻CD16⁺⁺ (keine CD14-, hohe CD16-Expression)

Die Verteilung der Monozyten-Subpopulationen ist bei Menschen und Rindern ähnlich: cM machen etwa 90 % der zirkulierenden Monozyten aus, intM und ncM jeweils 5–10 % [98,103]. Beide Spezies zeigen vergleichbare Phänotypen mit ähnlichen Expressionsdichten von CD14, CD16, Haupthistokompatibilitätskomplex II (MHC-II, engl. = *major histocompatibility complex*) und CD163 [104]. Funktionell ähneln sich die Spezies in der Phagozytosekapazität von cM und in der Produktion von ROS und pro-inflammatorischen Zytokinen (Tumornekrosefaktor- α [TNF- α], IL-1 β) von intM. Bovine ncM zeigen im Vergleich zu humanen ncM eine geringere Phagozytosekapazität, reduzierte Produktion von ROS und pro-inflammatorischen Zytokinen sowie eine fehlende Messenger RNA-Expression von neutrophilen Granulozyten anlockenden Chemokinen [104].

2.2. Makrophagen: Charakterisierung und Bedeutung

Makrophagen (gr. = *makrós*, dt. = groß; auch „Riesenfresszellen“ genannt) zeichnen sich durch eine außergewöhnliche Plastizität aus, die es ihnen ermöglicht, je nach Stimuli, der Mikroumgebung sowie funktionellen Anforderungen des Gewebes unterschiedliche Phänotypen anzunehmen [105,106]. Zu Beginn einer angeborenen Immunantwort erkennen, phagozytieren und präsentieren Makrophagen Pathogene oder Fremdkörper. In späteren Phasen sind sie an der Entzündungsauflösung, Wundheilung, Gewebereparatur und Immunsuppression beteiligt [107–109]. Die sogenannten M0-Makrophagen sind inaktive Vorstufen, aus denen je nach Stimulus durch Polarisierung unterschiedlich funktionelle Phänotypen (M1 oder M2) entstehen können (Abb. 4) [106,110].

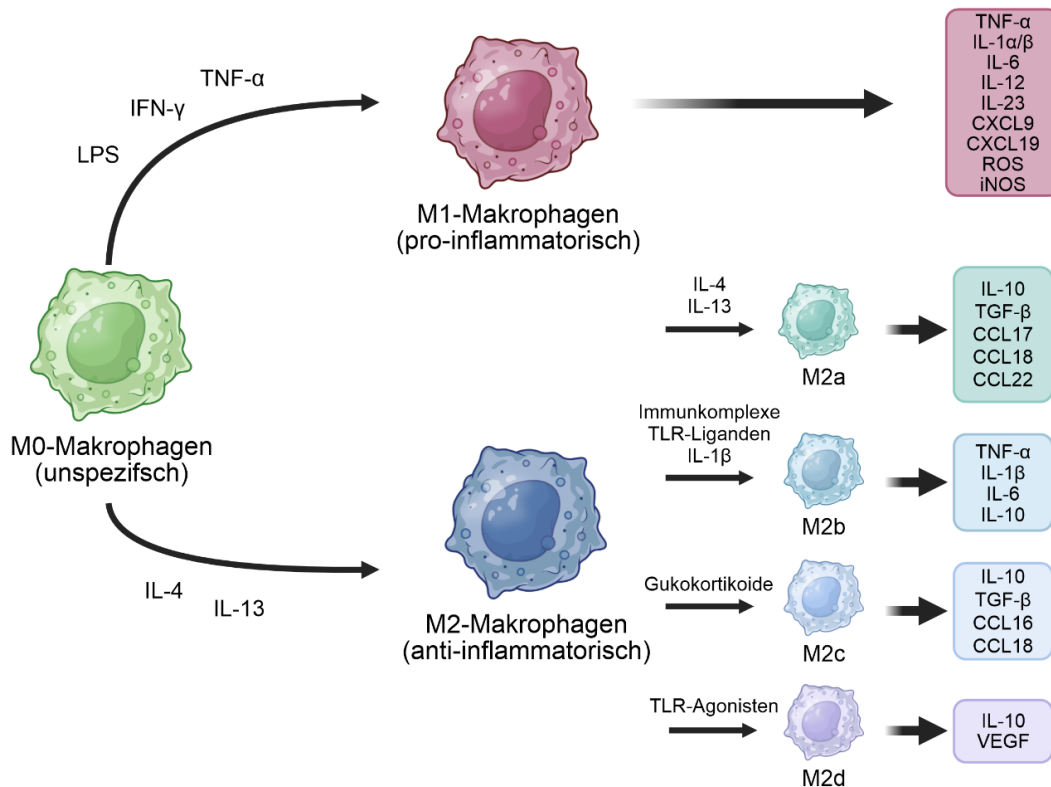


Abb. 4: Phänotypische M1- und M2-Makrophagen-Polarisierung und Mediatoren

Polarisierung von M0-Makrophagen durch verschiedene Stimuli zu pro-inflammatorischen M1-Makrophagen und anti-inflammatorischen M2-Makrophagen sowie deren Subtypen (M2a–d) mit der jeweils charakteristischen Freisetzung von Zytokinen, Chemokinen und weiteren Mediatoren. CCL = CC-Chemokin-Ligand; CXCL = C-X-C-Chemokin-Ligand; IFN- γ = Interferon- γ ; IL = Interleukin; LPS = Lipopolysaccharid; TGF- β = *transforming growth factor- β* ; TLR = Toll-like Rezeptor; TNF- α = Tumornekrosefaktor- α ; VEGF = *vascular endothelial growth factor* (erstellt mit BioRender).

Die klassisch aktivierten, pro-inflammatorischen M1-Makrophagen vermitteln die Immunabwehr gegen eine Vielzahl von Bakterien, Viren, Pilzen sowie Parasiten und spielen eine wichtige Rolle in der anti-tumoralen Immunität [107]. M1-Makrophagen werden u. a. über PRRs wie TLRs aktiviert, insbesondere durch Lipopolysaccharid (LPS), direkt als mikrobieller PAMP (PAMP, engl. = *pathogen-associated molecular pattern*) oder durch IFN- γ und TNF- α , wobei letztere von TH1- und NK-Zellen freigesetzt werden. M1-Makrophagen sezernieren pro-inflammatorische Zytokine (TNF- α , IL-1 α/β , IL-6, IL-12 und IL-23) sowie Chemokine (C-X-C-Chemokin-Ligand [CXCL]9, CXCL10) zur Verstärkung der Immunantwort und Rekrutierung von Immunzellen (z. B. TH-1-Zellen, NK-Zellen und neutrophile Granulozyten), produzieren ROS zur mikrobiziden Abwehr und exprimieren iNOS zur Produktion von antimikrobiellen NO (**Abb. 4**) [107,109,111,112]. Eine langanhaltende Aktivierung von M1-Makrophagen kann aufgrund der andauernden pro-inflammatorischen Wirkung Gewebeschäden verursachen und dadurch die Wundheilung verzögern [113–115].

M2-Makrophagen lassen sich in vier Subtypen (M2a, M2b, M2c und M2d) (**Abb. 4**) unterteilen, die auch als „regulatorische Makrophagen“ bezeichnet werden. Im Gegensatz zu M1-Makrophagen fördern sie primär die Entzündungsauflösung, Gewebereparatur, Wundheilung sowie Immunsuppression [107,109,112]. Die Subtypen werden durch spezifische Stimuli aktiviert und erfüllen verschiedene Funktionen innerhalb des regulatorischen Spektrums [107,109,111,112,116,117]: M2a-Makrophagen werden durch IL-4 und IL-13, welche vorwiegend von Mastzellen, basophilen Granulozyten und TH2-Zellen freigesetzt werden, aktiviert und setzen IL-10, *transforming growth factor- β* (TGF- β), CCL17, CCL18 und CCL22 frei. Der M2b-Subtyp wird durch Immunkomplexe, TLR-Liganden oder IL-1 β stimuliert und produziert sowohl pro- als auch anti-inflammatorische Zytokine (TNF- α , IL-1 β , IL-6 und IL-10). Der M2c-Subtyp ist ein stark anti-inflammatorischer Typ, wird aktiviert durch Glukokortikoide und setzt IL-10, TGF- β , CCL16 und CCL18 frei. M2d-Makrophagen, auch als „tumorassoziierte Makrophagen“ (TAM) bezeichnet, werden durch TLR-Antagonisten aktiviert, setzen IL-10 und *vascular endothelial growth factor* (VEGF) frei und fördern sowohl das Tumorwachstum, die Angiogenese als auch die Metastasierung.

Die Expression der über Makrophagen produzierten Zytokine und Chemokine wird durch spezifische Transkriptionsfaktoren gesteuert: Bei M1-Makrophagen dominieren *nuclear factor κ -light-chain-enhancer of activated B cells* (NF- κ B), *signal transducer and activator of transcription 1/3* (STAT1/3), *hypoxia-inducible factor-1 α* (HIF-1 α) und *Activator Protein-1* (AP-1), während bei M2-Makrophagen vor allem STAT6, *GATA-Binding Protein 3* (GATA3), *suppressor of cytokine signaling 1* (SOCS1) und *Peroxisome proliferator-activated receptor- γ* (PPAR- γ) die Expression regulieren [109,112].

2.3. Die THP-1-Zelllinie als *in vitro*-Modell für mononukleäre Phagozyten

Monozyten und Makrophagen sind essentielle Komponenten des angeborenen Immunsystems und spielen eine entscheidende Rolle bei der Regulation von Entzündungs- und Reparaturprozessen [118]. Als primäre Zelltypen von begrenzter Lebensdauer müssen Monozyten und Makrophagen für *ex vivo*-Untersuchungen immer kurz vor der Analyse aus dem Blut oder Gewebe (z. B. Knochenmark) der jeweiligen Individuen isoliert werden. Die Isolation ist mit einem erheblichen arbeits- und organisationstechnischen Aufwand verbunden. Zudem zeigen Primärzellen vielfache Donor-typische Variationen in ihren zellulären Reaktionsmustern, wodurch sich die Vergleichbarkeit experimenteller Daten erschwert. Um die komplexen Effektormechanismen von Monozyten und Makrophagen unter geringem Aufwand und standardisierten Bedingungen zu erforschen, sind *in vitro*-Modelle von zentraler Bedeutung. Der Einsatz eines solchen Modells überwindet die Limitierungen isolierter Primärzellen, ermöglicht reproduzierbare Experimente und trägt zur Vergleichbarkeit der Daten bei. Allerdings spiegeln diese nur eingeschränkt die natürliche sowie individuelle Variationsbreite biologischer Systeme wider. *In vitro*-Zellkulturmodelle sind somit ein vielseitiges Instrument für grundlegende und translationale Fragestellungen [119].

Die kommerziell erhältliche, humane, monozytäre THP-1-Zelllinie wurde im Jahr 1980 aus dem Blut eines einjährigen Patienten mit akuter myeloischer Leukämie (AML) im namensgebenden *Tohoku Hospital Pediatrics* isoliert [120] und wird seitdem in der Wissenschaft als *in vitro*-Modell zur Untersuchung verschiedenster immunologischer Fragestellungen eingesetzt [11,27,29]. Aus monozytären THP-1-Zellkulturen lassen sich unter geeigneten Zellkulturbedingungen THP-1-M0-Makrophagen differenzieren, welche ihrerseits sowohl zu pro-inflammatorischen THP-1-M1-Makrophagen als auch zu anti-inflammatorischen THP-1-M2-Makrophagen polarisiert werden können [11,27,107,121,122]. Da es bislang jedoch kein standardisiertes und reproduzierbares Protokoll zur Differenzierung und Polarisierung von THP-1-Makrophagen gibt, variieren die *in vitro*-generierten THP-1-Makrophagen je nach Art, Konzentration und Inkubationszeit der verwendeten Stimuli erheblich [29–31]. Neben der THP-1-Zelllinie werden auch die weiteren humanen monozytären Zelllinien U937, ML-2, HL-60 und Mono-Mac-6 als Modell für biomedizinische Fragestellungen eingesetzt [27].

Aufgrund ihres gemeinsamen neoplastischen Ursprungs (Leukämie) können sie unbegrenzt proliferieren und sind resistent gegen Apoptose [123]. Die humane U937-Zelllinie wurde aus dem Pleuraerguss eines 37-jährigen männlichen Patienten mit generalisiertem histiozytärem Lymphom isoliert [124] und zeigte im direkten Vergleich zu den THP-1-Zellen einen unreiferen Differenzierungsstatus, einen weniger ausgeprägten pro-inflammatorischen M1-Phänotyp sowie eine geringere Effizienz in der Differenzierung, Phagozytose-Aktivität und Produktion von ROS [27,123]. Die ML-2-Zelllinie wurde zwei Jahre vor der THP-1-Zelllinie isoliert (1978 gegenüber 1980), wird jedoch deutlich seltener in immunologischen Untersuchungen eingesetzt als das THP-1-Zellmodell [27,125]. Im Vergleich zu THP-1-Zellen zeigen die monoblastischen Mono-Mac-6-Zellen einen reiferen Monozytenstatus und eignen sich daher primär als robustes Monozytenmodell [27,126,127]. Die HL-60-Zellen sind dagegen promyelozytische Zellen, die sich je nach Stimulation zu Granulozyten, Monozyten oder Makrophagen differenzieren lassen [128]. Aufgrund dieser funktionellen Vorteile gegenüber den genannten alternativen Leukämie-Zelllinien sowie der Möglichkeit, THP-1-Makrophagen als nützliche Alternative zu primären Makrophagen zu generieren, ist die THP-1-Zelllinie ein vielseitig einsetzbares Modell für *in vitro*-generierte mononukleäre Phagozyten [29,129].

2.4. *Extracellular traps*: Funktion und Relevanz in der Immunabwehr

ETs wurden erstmals im Jahr 2004 bei neutrophilen Granulozyten beschrieben [12] und sind netzartige Strukturen aus dekodensierter DNA, die mit Histonen, MPO und weiteren antimikrobiellen Proteinen bestückt sind. Sie dienen dazu, Pathogene wie Bakterien, Viren, Pilze oder Parasiten einzufangen, zu immobilisieren und in manchen Fällen abzutöten (**Abb. 5**) [12,130,131]. Der Prozess der Freisetzung von ETs wird als „ETose“ bezeichnet.

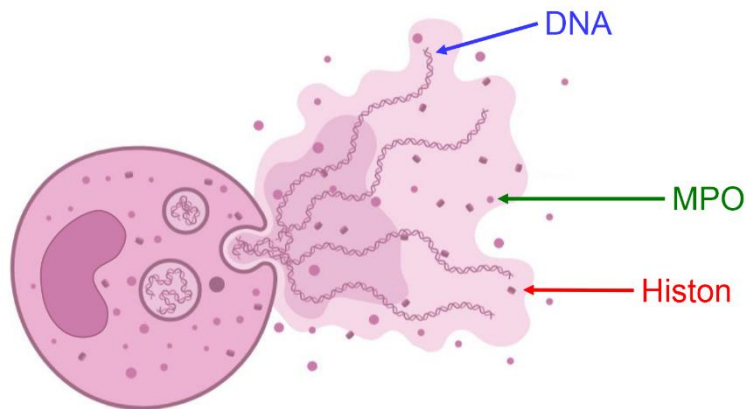


Abb. 5: Freisetzung von *extracellular traps* durch eine Immunzelle nach Stimulation

Schematische Darstellung der ETose: Freisetzung von DNA, Histon und Myeloperoxidase (MPO) aus einer aktivierten Immunzelle als Reaktion auf z. B. Pathogene wie Bakterien und Parasiten oder ET-Induktoren wie das Calcium-Ionophor A23187 oder das porenbildende Natriumsalz Nigericin (erstellt mit BioRender).

Die Freisetzung von *monocyte* bzw. *macrophage extracellular traps* (METs), ein Prozess der als METose bezeichnet wird, stellt einen weiteren Effektormechanismus von Monozyten und Makrophagen dar [21,26]. Aufgrund der bislang noch begrenzten Literaturlage zur METose werden die molekularen und funktionellen Abläufe der in der Literatur sehr gut untersuchten und charakteristisch vergleichbaren NETose, also dem Prozess der Freisetzung von *neutrophil extracellular traps* (NETs), als Referenz dargestellt.

Die NETose wird über G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, Fcγ-Rezeptoren, TLR4 und CD18 auf der Zelloberfläche der neutrophilen Granulozyten aktiviert [132].

Darauf folgt ein Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration, welcher entweder durch Freisetzung aus intrazellulären Calciumspeichern oder über Calcium-Aufnahme aus der extrazellulären Umgebung erreicht wird. Durch den Calcium-Anstieg werden zahlreiche Calcium-abhängige zelluläre Prozesse aktiviert, die für die NETose benötigt werden [132]. Der intrazelluläre Calcium-Anstieg führt zusammen mit Zytokinen wie IL-8 (aus Monozyten/Makrophagen) zur Aktivierung von Signal-Kinasen wie der Proteinkinase C (PKC), der Cyclin-abhängigen Kinase 6 (CDK6) oder der Janus-Kinase 2 (JAK2) [132–134]. Des Weiteren werden ROS, welche in neutrophilen Granulozyten hauptsächlich in der Nicotinamadenindinukleotidphosphat (NADPH)-Oxidase (NOX)-Reaktion und den Mitochondrien produziert werden, mit der NETose-Signalübertragung in Verbindung gebracht. Die ROS-abhängigen Mechanismen sind jedoch noch weitestgehend ungeklärt [132].

Für die Einleitung der umfangreich untersuchten NETose sind in der Literatur tiefgreifende zelluläre Umstrukturierungen beschrieben, wobei unklar ist, ob alle beobachteten morphologischen Veränderungen zwingend für den Prozess der NETose erforderlich sind [132]. Nach den Literaturbeschreibungen kommt es bei der Einleitung der NETose zunächst zu einer Zellausbreitung, die womöglich durch die Aktivierung von extrazellulären Matrix-Rezeptoren, wie z. B. Integrinen, induziert wird. Es folgt eine Freisetzung von Annexin V-positiven Plasmamembran-Mikrovesikeln, die zytosolische Komponenten einschließlich Granula, enthalten. Nach anfänglicher zellulärer Ausbreitung runden sich neutrophile Granulozyten ab, ähnlich wie adhärente Zellen in der Mitose, und verringern damit ihre effektive Zelloberfläche [132].

Das Hauptmerkmal der NETose ist die Dekondensation des Chromatins, die mit einem Verlust der Chromatinheterogenität und einer Ausdehnung des von DNA eingenommenen Zellraums einhergeht. Ein bekannter Calcium-vermittelter Signalweg, der zur Dekondensation des Chromatins führt, verläuft über die Peptidyl-Arginin-Deiminase 4 (PAD4). PAD4 katalysiert die Citrullinierung spezifischer Histone an Argininresten, woraufhin es zur Dissoziation der DNA kommt und die Dekondensation des Chromatins erfolgt [132]. Ergänzend können Proteasen, wie die neutrophile Elastase (NE), die Proteinase 3 (PR3) und Cathepsin G (CG) (alle sind in Primärgranula lokalisiert), sowie die zytosolische Protease Calpain, den proteolytischen Abbau von Histonen fördern und somit die Dekondensation des Chromatins begünstigen. Die ebenfalls in der Primärgranula lokalisierte MPO kann zur Dekondensation des

Chromatins beitragen, indem sie eine Wasserstoffperoxid-vermittelte Oxidation von Chloridionen vermittelt [132].

Da das Chromatin durch die Kernmembran vom Zytosol getrennten Zellkern liegt, ist für die Freisetzung des dekontensierten Chromatins eine Kernhüllenruptur erforderlich. Die Ruptur wird durch Umstrukturierungen der Kernmembran, die Bildung von Poren sowie dem Abbau des Lamin-Netzwerks unter der inneren Kernmembran ausgelöst. Nach Übertritt in das Zytosol muss von dem dekontensierten Chromatin zunächst das dichte Netzwerk aus Zytoskelettkomponenten (Aktin, Mikrotubuli und Vimentin-Intermediärfilamenten) und membranösen Zellorganellen überwunden werden, bevor die Plasmamembran erreicht werden kann. Es gibt Hinweise darauf, dass sich intrazelluläre Kompartimente wie das endoplasmatische Retikulum, die Granula und die Mitochondrien während der NETose tiefgreifend strukturell verändern [132]. Insbesondere Mitochondrien scheinen eine wichtige Rolle bei der NETose einzunehmen. Einerseits sind sie an der ROS-Produktion beteiligt, die neben der traditionellen Pathogenabtötung auch eine Stimulus-spezifische Signalübertragung bei der NETose vermitteln. Andererseits können sie mitochondriale DNA (mtDNA) freisetzen [132,135].

Im weiteren Prozess der NETose wird die Plasmamembran zunehmend für größere Moleküle permeabel, hält das in das Zytosol freigesetzte dekontensierte Chromatin aber zunächst zurück. Der vollständige Zerfall des Zytoskeletts ermöglicht schließlich die extrazelluläre Freisetzung des dekontensierten Chromatins und damit die NET-Freisetzung [132]. Die NETose ist meist ein zelllytischer Prozess (suizidale NETose), kann aber auch ohne einen Zelltod der neutrophilen Granulozyten erfolgen (vitale NETose) [131,136].

Neben der NETose bei primären neutrophilen Granulozyten wurde die ET-Freisetzung auch bei basophilen, eosinophilen und heterophilen Granulozyten sowie bei Mastzellen beschrieben [13–16]. In der Literatur wurde die Freisetzung von METs bereits bei primären Monozyten [17–23] sowie bei primären Makrophagen [17,25,26,137–141] beschrieben. MET-Freisetzung von primären Monozyten ist in der Literatur durch verschiedene Stimuli wie das Calcium-Ionophor A23187, Paraformaldehyd (PFA), Phorbol-Myristat-Acetat (PMA) [21,142], Zymosan [18–21,143], Goldnanopartikel [17] sowie durch humane Spermien [22] beschrieben. In primären Makrophagen wurde MET-Freisetzung unter dem Einfluss von PMA [25], hypochlorige Säure (HOCl),

IL-8, TNF- α [140,144], Zymosan [139,141], *Mannheimia haemolytica*, *Mannheimia* Leukotoxin [25], *Escherichia coli* (*E. coli*), *Candida albicans* [138], *Strongyloides stercoralis* Larven [137] und *Mycobacterium tuberculosis* [139] beschrieben. Ebenso wurde MET-Freisetzung in primären Monozyten und Makrophagen durch Konfrontation mit Apikomplexa wie *Besnoitia besnoiti* [18], *Cryptosporidium parvum* [145], *Eimeria ninakohlyakimovae* [20] und *Neospora caninum* [141,143] beobachtet.

Als Alternative zu den Untersuchungen der MET-Freisetzung an Primärzellen sind in der Literatur Studien mit verschiedenen permanenten Zelllinien, wie die murinen RAW 264.7- und J774A.1-Zelllinien sowie die humane THP-1-Zelllinie, vorhanden [146]. Speziell für die in der hier vorliegenden Arbeit eingesetzten THP-1-Zellen ist die Induzierbarkeit einer MET-Freisetzung *i.* in monozytären THP-1-Zellen durch Tunicamycin [147], PMA [148], *Trichomonas vaginalis* oder Zymosan [149], *ii.* in THP-1-M0-Makrophagen durch A23187, HOCl, Nigericin, TNF- α [28], *extracellular cold inducible RNA binding protein* (eCIRP) [150], Aflatoxin B1 [151], *E. coli* Hämolysin [25], *Streptococcus agalactiae* [152] oder *Mycobacterium massiliense* [153], sowie *iii.* in THP-1-M1-Makrophagen durch HOCl, Nigericin oder TNF- α [28], beschrieben.

2.5. Zytokin-Sekretion mit Fokus auf IL-1 β und IL-6: Funktion und Relevanz in der Immunabwehr

Zytokine wurden in den 1960er- und 1970er-Jahren erstmals als potente Signalmoleküle neben den damals bereits bekannten Hormonen und Neurotransmittern beschrieben. Heute umfasst die Gruppe der bekannten Zytokine über 100 verschiedene Proteine, darunter Interferone, Interleukine, Chemokine, mesenchymale Wachstumsfaktoren, die TNF-Familie sowie die Adipokine [154–156]. Zytokine sind an der Immunregulation zahlreicher biologischer Prozesse beteiligt, fungieren als Botenstoffe zur Kommunikation zwischen Immunzellen und steuern vielfältige Mechanismen, die von der Infektionsabwehr bis zur Pathogenese verschiedenster Erkrankungen reichen. Aufgrund ihrer komplexen Wirkungen gelten Zytokine als zentrale Regulatoren in der angeborenen und adaptiven Immunantwort [154]. Die Sekretion von Zytokinen wird u. a. durch spezifische molekulare Signale stimuliert, die von molekularen Strukturen von Pathogenen (*pathogen-associated molecular patterns*; PAMPs) sowie von molekularen Strukturen geschädigter Zellen (*damage-associated molecular patterns*; DAMPs) ausgelöst werden. PAMPs sind hochkonservierte molekulare Strukturen von Mikroorganismen wie LPS aus der äußeren Membran Gram-negativer Bakterien. DAMPs sind endogene Moleküle wie extrazelluläres Adenosintriphosphat (ATP) oder *High-Mobility-Group-Protein B1* (HMGB1) [157–160]. PAMPs und DAMPs werden von den Immunzellen, insbesondere von Monozyten und Makrophagen, über sogenannte Mustererkennungsrezeptoren (PRRs) erkannt, welche zellmembranständig (z. B. TLR2/4), endosomal (z. B. TLR3/7) oder zytosolisch (z. B. *NLR family pyrin domain containing 3 inflammasome* [NLRP3-Inflammasom]) lokalisiert sind. Nach Bindung der PAMPs und DAMPs lösen diese Rezeptoren komplexe intrazelluläre Signalkaskaden aus, welche u. a. die Genexpression steuern und die Zytokinsekretion regulieren (**Abb. 6**) [155,161].

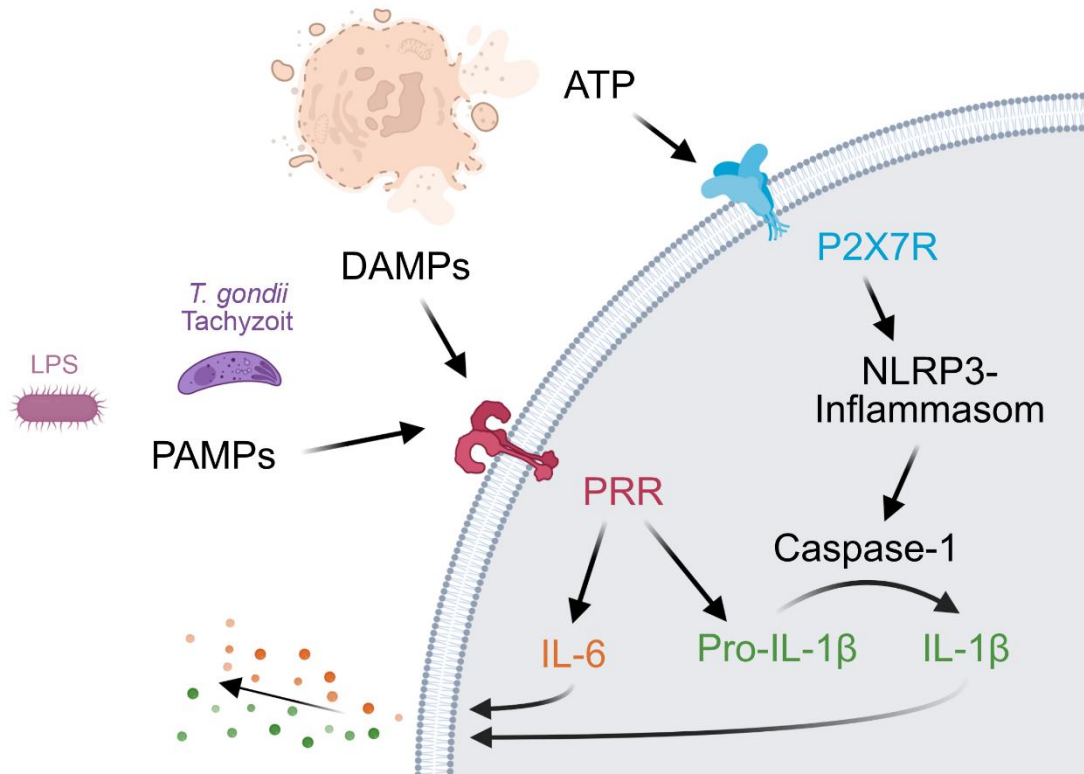


Abb. 6: Sekretion von IL-1 β und IL-6

Die Sekretion von IL-1 β und IL-6 aus mononukleären Phagozyten erfolgt nach Erkennung spezifischer molekularer Signale, den *pathogen-associated molecular patterns* (PAMPs), wie Lipopolysaccharid (LPS) von Bakterien und *T. gondii*-Tachyzoiten sowie *damage-associated molecular patterns* (DAMPs) aus geschädigten Zellen. PAMPs und DAMPs werden von *Pattern Recognition Receptors* (PRRs) in der Zellmembran der Phagozyten erfasst und führen zur Aktivierung pro-inflammatorischer Signalwege, welche in der Produktion von Interleukin (IL)-1 β oder IL-6 münden. Extrazelluläres Adenosintriphosphat (ATP) wird über den P2X7-Rezeptor (P2X7R) gebunden und vermittelt die Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms, wodurch es zur Caspase-1-vermittelten, proteolytischen Spaltung von Pro-IL-1 β zu reifem IL-1 β kommt, welches dann sezerniert wird (erstellt mit BioRender).

Das von mononukleären Phagozyten produzierte IL-1 β ist, neben IL-1 α und IL-1 Rezeptorantagonist (IL-1Ra), ein zentral wirkendes pro-inflammatorisches Zytokin, welches die angeborene Immunantwort zu einem früheren Zeitpunkt aktiviert. IL-1 β vermittelt Fieber, die Ausschüttung von Prostaglandin E2 (PGE2) und Histamin, die Chemotaxis, die Synthese von Akute-Phase-Proteinen (APPs) und die Proliferation und Differenzierung von CD4-T-Zellen sowie die Expression von Zelladhäsionsmolekülen [155,159]. Für die Sekretion von IL-1 β müssen zwei externe Signale auf mononukleäre Phagozyten einwirken. Signal 1 (PAMPs/DAMPs) wird über

PRRs erkennt und induziert die Synthese der bioinaktiven Vorstufe Pro-IL-1 β [159]. Signal 2 (z. B. extrazelluläres ATP von geschädigten Zellen) aktiviert den ATP-sensitiven P2X7-Rezeptor, wodurch ein Kalium-Efflux ausgelöst wird, welcher die NLRP3-Inflammasom-Aktivierung im Zytosol induziert [32,159,162]. Das NLRP3-Inflammasom aktiviert die Caspase-1, welche proteolytisch das Pro-IL-1 β zu reifem IL-1 β spaltet und gleichzeitig Gasdermin-D aktiviert. Gasdermin-D bildet Poren in der Plasmamembran, wodurch IL-1 β hauptsächlich sezerniert wird. Alternativ kann die IL-1 β -Sekretion auch Gasdermin-D-unabhängig über Mikrovesikel oder Exosomen erfolgen (**Abb. 6**) [159,162]. Die Zweistufigkeit (Signal 1+2) des Prozesses schützt vor einer überschießenden IL-1 β -Sekretion und vermeidet damit übermäßige Entzündungsreaktionen. Neben dem ATP und P2X7-Rezeptor-abhängigen Weg kann z. B. Nigericin, ein porenbildendes Natriumsalz, einen Kalium-Efflux auslösen, welcher unabhängig von Signal 2 eine Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms (bei vorhandenem Pro-IL-1 β) induzieren kann [163–166].

Neben IL-1 β ist IL-6 ein weiteres pro-inflammatorisches Zytokin, welches von mononukleären Phagozyten nach Erkennung von PAMPs und DAMPs über PRRs synthetisiert und freigesetzt wird (**Abb. 6**). Am intrazellulären Transport und der Exozytose von IL-6 sind neben klassischen sekretorischen Vesikeln auch Recycling-Endosome beteiligt [155,159,162]. IL-6 fördert die Entstehung von Fieber, die Produktion von APPs, die Differenzierung von B-Zellen zu Plasmazellen, die Aktivierung zytotoxischer T-Zellen, die Rekrutierung von Monozyten sowie die Balance zwischen pro- und anti-inflammatorischen Immunreaktionen [155]. Die abgestimmte Sekretion von IL-1 β , welche stark pro-inflammatorisch wirkt, und IL-6, welche eine balancierende Funktion zwischen pro- und anti-inflammatorischen Prozessen erfüllt, ermöglicht mononukleären Phagozyten, eine optimale Regulation und Anpassung der Immunantwort auf verschiedene Bedrohungen [157–160,162].

Nikotinische Acetylcholinrezeptoren (nAChRs) sind membranständige, pentamere, Liganden gesteuerte Ionenkanäle [167,168]. Während die nAChRs ursprünglich hauptsächlich aus dem Nervensystem bekannt sind, können sie in Form von verschiedenen Subtypen neben Nervenzellen auch in nicht-neuronalen Zellen wie Endothelzellen, Bronchialepithelzellen, Hautkeratinozyten, glatten Gefäßmuskulzellen sowie verschiedenen Immunzellen vorkommen [169,170]. Als pentamere Proteine können nAChRs aus neun verschiedenen Subtypen von α -Untereinheiten ($\alpha 2$ – $\alpha 10$) und

drei verschiedenen Subtypen von β -Untereinheiten ($\beta 2$ – $\beta 4$) in unterschiedlichen Kombinationen zusammengesetzt sein, wie z. B. als Homopentamere ($\alpha 7$ - oder $\alpha 9$ -Untereinheiten), Heteropentamere ($\alpha 7$ - und $\beta 2$ oder $\alpha 9$ - und $\alpha 10$ -Untereinheiten) oder Mischformen mit zwei oder drei α -Untereinheiten ($\alpha 2$ – $\alpha 4$ oder $\alpha 6$) und 2 oder 3 β -Untereinheiten ($\beta 2$ oder $\beta 4$) [170,171]. Das Vorkommen und die Dominanz von $\alpha 7$ -, $\alpha 9$ - oder $\beta 2$ -Untereinheiten in pentameren nAChRs führt zu einer transkriptionellen und post-transkriptionellen Hemmung der Synthese pro-inflammatorischer Zytokine (z. B. IL-1 β , IL-6 und TNF- α) [167,168,172–178]. Aufgrund ihrer hemmenden Wirkung auf die pro-inflammatorische Zytokinsynthese gilt die Aktivierung von nAChRs der Makrophagen und DCs als vielversprechender therapeutischer Ansatz [172,178,179]. Ergänzend konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung von unkonventionellen, nicht-neuronalen, nAChRs mit den evolutionär hoch konservierten Untereinheiten $\alpha 7$ und $\alpha 9$ und/oder $\alpha 10$ die NLRP3-Inflammasom-vermittelte IL-1 β -Sekretion aus humanen mononukleären Phagozyten durch Blockade des ATP-sensitiven P2X7-Rezeptors hemmt [163,180–183]. Diese cholinerge Hemmung der ATP-induzierten Zytokin-Sekretion der unkonventionellen nAChRs kann über klassische endogene und exogene Agonisten wie Acetylcholin (ACh), Nikotin und Cholin oder über endogene Liganden wie Phosphocholin (PC) erfolgen [163,180–183].

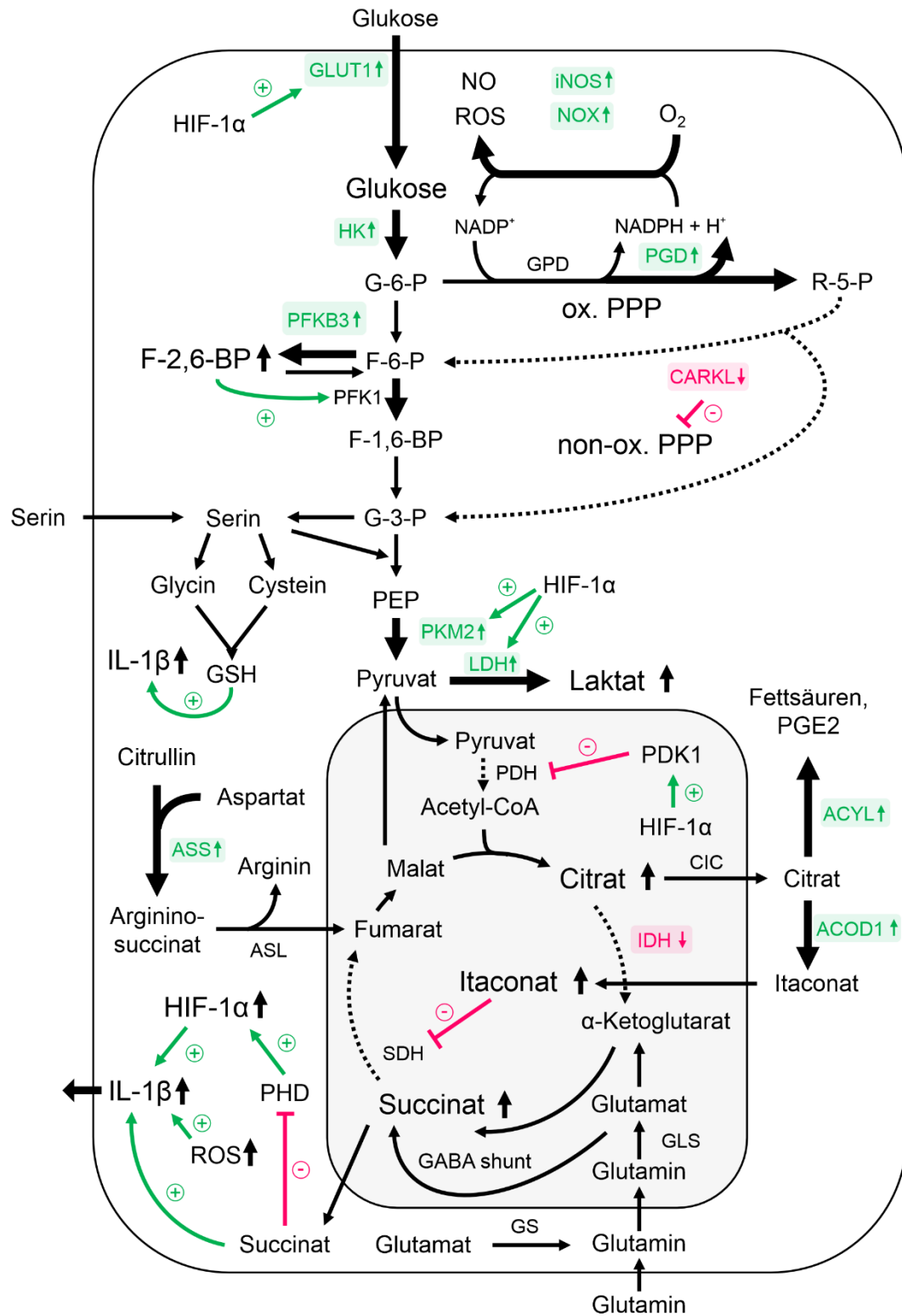
2.6. Metabolische Signatur von Makrophagen

Die in den vorherigen Kapiteln beschriebene Aktivierung der mononukleären Phagozyten und ihre Antworten auf körperfremde Moleküle sowie molekulare Strukturen von Pathogenen und geschädigten Zellen sind an bestimmte Stoffwechselleistungen gebunden. Somit sind diese Immunzellen sowohl vom Nährstoffangebot als auch von der Verstoffwechslung der Nährstoffe abhängig. Bei den in dieser Arbeit untersuchten pro-inflammatorischen M1- und anti-inflammatorischen M2-Makrophagen spielt die metabolische Reprogrammierung bei der Energiebereitstellung für die jeweiligen immunologischen Funktionen eine entscheidende Rolle. Hierzu gehören z. B. die Phagozytose, die ROS-Produktion und die Zytokin-Sekretion, insbesondere IL-1 β [112,184–186].

In der Literatur liegen Beschreibungen der charakteristischen Stoffwechseleigenschaften von M1- und M2-Makrophagen für humane und murine Primärzellen (*bone marrow-derived macrophages* [BMDMs], *human monocyte-derived macrophages* [MoDMs], Peritonealmakrophagen und Primärmakrophagen) sowie für M1- und M2-Makrophagen vor, welche unter *in vitro*-Bedingungen aus verschiedenen Zelllinien (J774A.1, THP-1, RAW264.7 und U937) differenziert und polarisiert wurden [112,114,187–189].

Aus diesen Stoffwechselcharakterisierungen ergeben sich nach dem gegenwärtigen Kenntnisstand die folgenden Stoffwechselprofile für M1- und M2-Makrophagen (zusammengefasst in **Abb. 7A,B**):

A M1-Makrophagen



B M2-Makrophagen

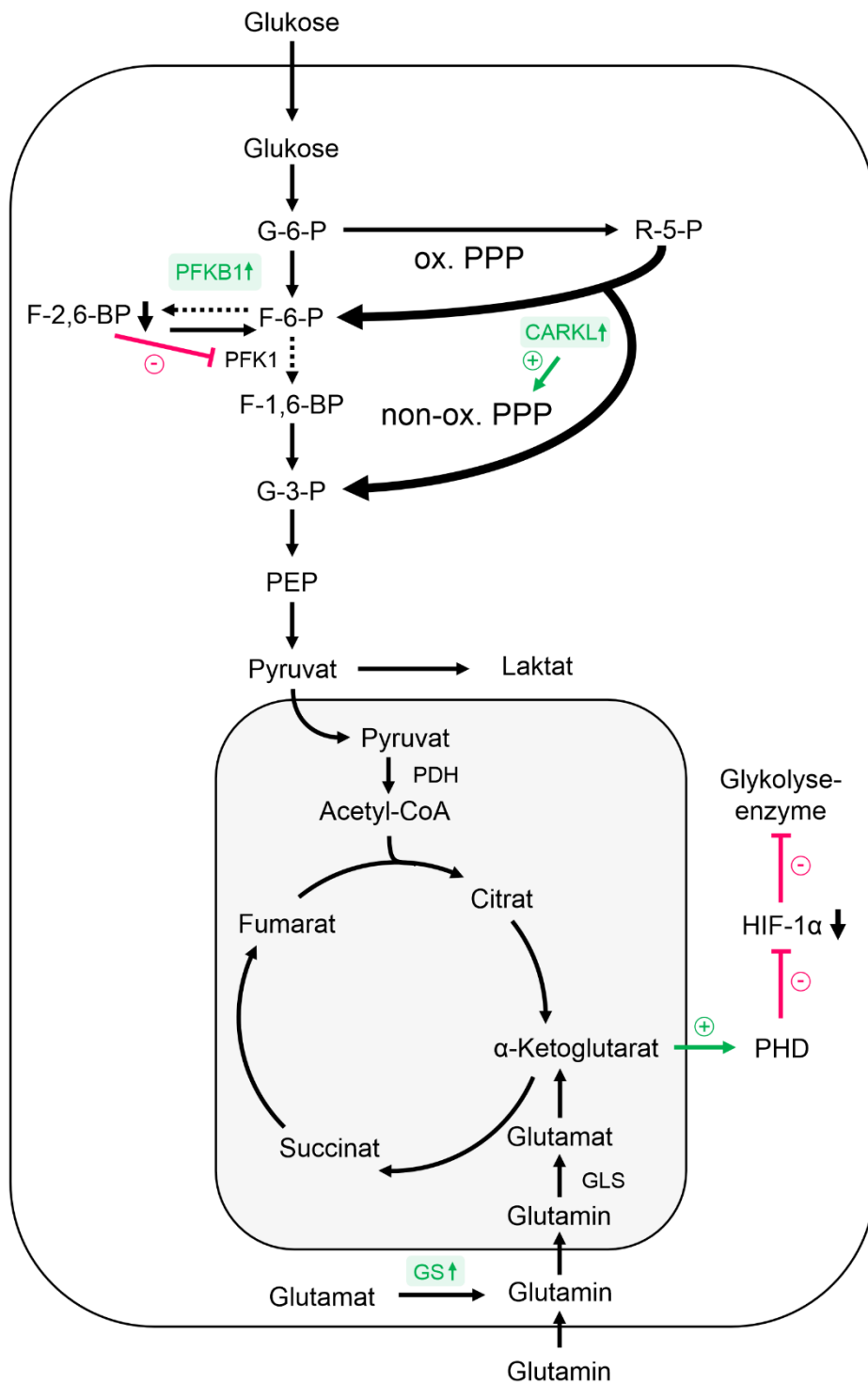


Abb. 7: Gegenüberstellung der veröffentlichten Stoffwechselcharakteristika von M1- (A) und M2-Makrophagen (B) (eigene Abb., modifiziert nach Wolf et al. 2025)

Es werden die Erkenntnisse aus den Übersichtsartikeln von Viola et al. (2019) und Liu et al. (2021) sowie des Artikels von Rodriguez et al. (2019) schematisch dargestellt. Fettgedruckte Pfeile = erhöhte Stoffwechselumwandlungsraten im Vergleich zum anderen Zelltyp; gepunktete Pfeile = verringerte Stoffwechselumwandlungsraten im Vergleich zum anderen Zelltyp; grüne Pfeile und Enzym-/Proteinnamen = Aktivierung oder Erhöhung des jeweiligen Enzyms/Proteins oder der jeweiligen Reaktion; rote Pfeile, T-Formen oder Enzym-/Proteinnamen = Hemmung oder Herunterregulierung des jeweiligen Enzyms/Proteins oder der jeweiligen Reaktion; Acetyl-CoA = Acetyl-Coenzym A; ACLY = Adenosintriphosphat-Citrat-Lyase; ACOD1 = Aconitat-Decarboxylase 1; ASL = Argininosuccinat-Lyase; ASS = Argininosuccinat-Synthetase; CARKL = *Carbohydrate Kinase-Like Protein*; CIC = *Citrate Carrier*; F-1,6-BP = Fructose-1,6-bisphosphat; F-2,6-BP = Fructose-2,6-bisphosphat; F-6-P = Fructose-6-phosphat; G-3-P = Glycerinaldehyd-3-phosphat; G-6-P = Glukose-6-phosphat; GABA = γ -Aminobuttersäure; GLS = Glutaminase; GLUT1 = Glukosetransporter 1; GPD = Glukose-6-phosphat-Dehydrogenase; GS = Glutaminsynthetase; GSH = Glutathion; HIF-1 α = *hypoxia-inducible factor-1 α* ; HK = Hexokinase; IDH = Isocitrat-Dehydrogenase; IL-1 β = Interleukin-1 β ; iNOS = induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase; LDH = Laktat-Dehydrogenase; NADPH = Nicotinamidadenindinucleotidphosphat; NO = Stickstoffmonoxid; non-ox. PPP = nicht-oxidativer Pentosephosphatweg; NOX = NADPH-Oxidase; ox. PPP = oxidativer Pentosephosphatweg; PDH = Pyruvat-Dehydrogenase; PDK1 = Pyruvat-Dehydrogenase-Kinase 1; PEP = Phosphoenolpyruvat; PFK1/2 = Phosphofruktokinase 1/2; PFKB1/3 = 6-Phosphofrukto-2-Kinase/Fructose-2,6-Bisphosphatase-Isoenzym 1/3; PGD = 6-Phosphoglukonat-Dehydrogenase; PGE2 = Prostaglandin E2; PHD = Prolylhydroxylase; PKM2 = Pyruvatkinase-Isoenzym Typ M2; R-5-P = Ribose-5-phosphat; ROS = *reactive oxygen species*; SDH = Succinat-Dehydrogenase

Ein besonders auffälliger metabolischer Unterschied zwischen M1- und M2-Makrophagen betrifft die Art der Energiegewinnung. M2-Makrophagen nutzen den intakten Tricarbonsäurezyklus (TCA-Zyklus, engl. = *tricarboxylic acid cycle*) sowie die oxidative Phosphorylierung (OXPHOS). Unter Einbeziehung der im Vergleich zu M1-Makrophagen niedrigeren Glykolyse-Aktivität wird Glukose vollständig zu Kohlenstoffdioxid (CO₂) und Wasser (H₂O) abgebaut, wobei 32 Mole ATP pro 1 Mol Glukose generiert werden. Im Unterschied zu den M2-Makrophagen ist der TCA-Zyklus in den M1-Makrophagen sowohl auf Ebene der Isocitrat-Dehydrogenase (IDH)-Reaktion als auch auf der Stufe der Succinat-Dehydrogenase (SDH)-Reaktion unterbrochen (trunkiert). In Folge dieser beiden Unterbrechungen kommt es zu den für M1-Makrophagen charakteristischen hohen intrazellulären Citrat- und Succinat-Konzentrationen (**Abb. 7A,B**) [112,114,188,189].

Über den in den M1-Makrophagen hochregulierten Citrattransporter (CIC, engl. = *Citrate Carrier*) wird das Citrat in das Zytosol transportiert. Infolgedessen wird über die ebenfalls hochregulierte ATP-Citrat-Lyase (ACLY) Acetyl-Coenzym A (Acetyl-CoA) freigesetzt. Das Acetyl-CoA spielt in den M1-Makrophagen eine wichtige Rolle für die Synthese von Fettsäuren und Prostaglandin E₂ (PGE₂) [114,188,190]. Das von den M1-Makrophagen freigesetzte PGE₂ verhindert eine überschießende pro-inflammatorische Reaktion, indem es die Expression von TNF- α in den M1-Makrophagen reduziert und die Expression von anti-inflammatorischen Genen, wie z. B. IL-10, fördert. Auf diese Weise wird über den zweifach trunkierten TCA-Zyklus sowie die Fettsäuren- und PGE₂-Synthese in den M1-Makrophagen der Übergang von einer pro-inflammatorischen M1-Antwort zu einer anti-inflammatorischen M2-Antwort eingeleitet (**Abb. 7A**) [191,192].

Darüber hinaus ist das in den M1-Makrophagen akkumulierende, mitochondriale und zytosolische Citrat Ausgangssubstrat für die Itaconat-Synthese. Itaconat hemmt die SDH und ist somit für die zweite Unterbrechung des TCA-Zyklus in M1-Makrophagen auf der Stufe der SDH-Reaktion verantwortlich. In der Folge der SDH-Hemmung kommt es in M1-Makrophagen zu einem Anstieg des Succinat-Spiegels. Succinat wird vermehrt in die extrazelluläre Matrix freigesetzt, wo es den membranständigen, G-Protein-gekoppelten Rezeptor 91 (GPR91) auf der Zelloberfläche von Makrophagen aktiviert. Dadurch werden autokrine und parakrine Signalwege induziert, welche die Produktion von IL-1 β fördern. Die für M1-Makrophagen charakteristischen, hohen intrazellulären Succinat-Spiegel stabilisieren die *hypoxia-inducible factor* (HIF)-1 α -Untereinheit des Transkriptionsfaktors HIF-1, indem Succinat den Abbau der HIF-1 α -Untereinheit durch Hemmung der Prolylhydroxylase (PHD) verhindert. Durch die Stabilisierung von HIF-1 α ist der Transkriptionsfaktor HIF-1 in den M1-Makrophagen aktiv. Dieser ist ein wichtiger Aktivator für die Expression verschiedener Glykolyse-Enzyme (s. u.) und bildet einen Komplex mit der im Zellkern lokalisierten, inaktiven, Dimer-Form des Glykolyse-Enzyms Pyruvatkinase-Isoenzym Typ M2 (PKM2). Der HIF-1/PKM2-Komplex bindet im Zellkern an den IL-1 β -Promotor und induziert so die Expression von IL-1 β , wodurch die M1-Polarisierung sowie die HIF-1 α -vermittelte Glykolyse-Aktivität gefördert wird (**Abb. 7 A**) [112,114,189,193–196].

Trotz der zweifachen Trunkierung des TCA-Zyklus in den M1-Makrophagen ist dieser nicht vollständig ausgeschaltet. Verantwortlich dafür ist der Arginin-Succinat-Shunt,

welcher in den M1-Makrophagen aus Citrullin und Aspartat Fumarat synthetisiert, sodass Fumarat in den TCA-Zyklus eingespeist werden kann [194]. Fumarat wird über Malat zu Pyruvat decarboxyliert. Bei der Malat-Enzym katalysierten Decarboxylierung von Malat entsteht NADPH + H, welches als Redoxpartner für die in M1-Makrophagen wichtigen NO- und ROS-Synthese über die Enzyme NOX und iNOS dient (**Abb. 7A**) [112,114,190].

Die für M1-Makrophagen charakteristisch hohe aerobe Glykolyse (die Umsetzung von Glukose zu Laktat, auch in Gegenwart von Sauerstoff) ist mit einer verringerten Umsetzung des glykolytischen Pyruvats in Acetyl-CoA (s. u.) sowie einer Hochregulierung der Expression von Glukosetransporters 1 (GLUT1) sowie den Glykolyse-Enzymen Hexokinase (HK), PKM2 (dynamische, inaktive Dimer-/aktive Tetramer-Form) und Laktat-Dehydrogenase (LDH) sowie des regulatorischen Enzyms 6-Phosphofrukto-2-Kinase/Fruktose-2,6-Bisphosphatase-Isoenzym 3 (PFKB3) in den M1-Makrophagen im Vergleich zu den M2-Makrophagen verbunden [112,114,189,197–199]. Sowohl die Hemmung der Pyruvat-Dehydrogenase (PDH) als auch die Hochregulierung des GLUT1, der PKM2 und der LDH erfolgen in den M1-Makrophagen unter der Kontrolle des stabilisierten Transkriptionsfaktors HIF (s. o.). Die PFKB3 ist eines von vier PFKB-Isoenzymen, welche als bifunktionelle Enzyme sowohl eine 6-Phosphofruktokinase 2 (PFK2)-Domäne als auch eine Fruktose-2,6-bisphosphatase (FBPase2)-Domäne besitzen. Während die PFK2-Domäne die Umwandlung von Fruktose-6-phosphat (Fruktose-6-P) zu Fruktose-2,6-bisphosphat (Fruktose-2,6-BP) katalysiert, wird durch die FBPase2-Domäne die umgekehrte Reaktion von Fruktose-2,6-BP zu Fruktose-6-P katalysiert. In den in M1-Makrophagen exprimierten PFKB3-Isoenzym dominiert die PFK2-Aktivität, wodurch vermehrt Fruktose-2,6-BP synthetisiert wird. Hohe Konzentrationen von Fruktose-2,6-BP aktivieren die PFK1, welche die Phosphorylierung von Fruktose-6-P zu Fruktose-1,6-bisphosphat (Fruktose-1,6-BP) katalysiert, und die FBPase1 hemmt, welche für die umgekehrte Reaktion von Fruktose-1,6-BP zu Fruktose-6-P verantwortlich ist. Im Gegensatz zu den M1-Makrophagen exprimieren M2-Makrophagen das PFKB1-Isoenzym, in welchem die Phosphatase-Aktivität des bifunktionellen Enzyms dominiert. Die Folge ist eine Abnahme des Fruktose-2,6-BP-Spiegels, eine Inaktivierung der PFK1 sowie das Entfallen der FBPase1-Hemmung (**Abb. 7A,B**) [112,114].

Studien zufolge korrelieren die hohen Umsatzraten der M1-Makrophagen im oxidativen Pentosephosphatweg (ox. PPP) mit hohen 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase (PGD)-Aktivitäten und einer Abnahme der Expression des Kohlenhydratkinase-like Proteins (CARKL, engl. = *Carbohydrate Kinase-Like Protein*) im Vergleich zu den M2-Makrophagen. In M2-Makrophagen ist eine Dominanz des nicht-oxidativen PPP (non-ox. PPP) beschrieben [112,200]. Über die hohen Umsatzraten im ox. PPP besitzen M1-Makrophagen in der Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase (GPD)- und PGD-Reaktion eine zweite wichtige Quelle zur Produktion von $\text{NADPH} + \text{H}^+$, welches der NOX und iNOS zur Generierung von NO und ROS zur Verfügung steht. CARKL katalysiert die Phosphorylierung von Sedoheptulose zu Sedoheptulose-7-phosphat (Sedoheptulose-7-P). Die für M1-Makrophagen typische geringe CARKL-Aktivität führt zu niedrigen Sedoheptulose-7-P-Konzentrationen und ist mit einer verminderten Umwandlung im non-ox. PPP verbunden. M2-Makrophagen hingegen, in welchen die Expression von CARKL hochreguliert ist, profitieren von einer erhöhten Rückführung von Ribose-5-phosphat (Ribose-5-P) zu den Glykolyse-Zwischenprodukten Fruktose-6-P und Glycerinaldehyd-3-phosphat (G-3-P) über den non-ox. PPP (**Abb. 7A,B**) [112,114,188,200].

Die oben erwähnte geringe Umsetzung des zytosolischen Pyruvats in Acetyl-CoA wird in den M1-Makrophagen über den Succinat-stabilisierten Transkriptionsfaktor HIF-1 reguliert. HIF-1 induziert die Expression der Pyruvat-Dehydrogenase Kinase 1 (PDK1), welche die Expression der PDH phosphoryliert und damit inaktiviert [114,201]. Die PDH ist für die Umwandlung von Pyruvat in Acetyl-CoA verantwortlich.

Die ausschließliche zytosolische Umsetzung von Glukose zu Laktat, die in den pro-inflammatorischen M1-Makrophagen dominiert, ist hinsichtlich der Energieausbeute mit 2 Molen ATP pro 1 Mol Glukose deutlich ineffizienter als die in den anti-inflammatorischen M2-Makrophagen dominierende komplette Umsetzung von Glukose zu CO_2 und H_2O über den TCA-Zyklus und die OXPHOS mit 32 Molen ATP pro 1 Mol Glukose. Allerdings läuft die kürzere Umsetzung von Glukose zu Laktat deutlich schneller ab. Zudem liefern Zwischenprodukte der Glykolyse Ausgangsstoffe für die Synthese von Zytokinen sowie von Zellbausteinen für die Zellproliferation. Im Unterschied zu den M1-Makrophagen sind in den anti-inflammatorischen M2-Makrophagen höhere Aktivitäten der PDH in der Literatur belegt.

Zusammen mit den Enzymen des TCA-Zyklus und der OXPHOS ermöglicht die hohe PDH-Aktivität eine sehr effiziente Energieregeneration (**Abb. 7A,B**) [112,114,188,189,192].

Ein weiterer wichtiger energieregenerierender Stoffwechselweg, welcher wie die Glykolyse mit dem TCA-Zyklus verknüpft ist, ist die Glutaminolyse (= Abbau der Aminosäure Glutamin zu Pyruvat, Laktat und Citrat). Die Glutaminolyse startet in den Mitochondrien mit der Desaminierung von Glutamin zu Glutamat über die Glutaminase (GLS). Das gebildete Glutamat kann anschließend über drei verschiedene Reaktionen zu α -Ketoglutarat (α -KG) umgewandelt und als solches in den TCA-Zyklus eingespeist werden. Die drei Reaktionen sind *i.* eine oxidative Desaminierung, katalysiert von der Glutamat-Dehydrogenase (GLDH), sowie *ii.* eine Transaminierung, katalysiert von der Alanin-Aminotransferase (ALT), und *iii.* eine Transaminierung, katalysiert von der Aspartat-Aminotransferase (AST). In M1-Makrophagen ist darüber hinaus der Abbau von Glutamat über den γ -Aminobuttersäure (GABA)-Shunt zu Succinat (Umwandlung von Glutamat zu Succinat-Semialdehyd, GABA und Succinat) von besonderer Bedeutung [112,114,193]. M2-Makrophagen sind durch eine ausgeprägte Glutaminolyse charakterisiert. Durch eine hohe Expression des Enzyms Glutaminsynthetase (GS), welches in M2-Makrophagen deutlich höher ist als in M1-Makrophagen, können die M2-Makrophagen zytosolisches Glutamat in Glutamin umwandeln und damit der mitochondrialen Glutaminolyse zur Verfügung stellen. Glutamin liefert in M2-Makrophagen über 50 % der Stickstoffatome für die Uridindiphosphat-N-Acetylglukosamin (UDP-GlcNAc) sowie etwa 30 % der Kohlenstoffatome zur Versorgung des TCA-Zyklus. UDP-GlcNAc spielt eine wichtige Rolle bei der Glykosylierung von Proteinen, zu denen auch der Mannose-Rezeptor CD206 gehört, welcher ein zentraler Oberflächenmarker auf alternativ aktivierten M2-Makrophagen ist (**Abb. 7A,B**) [112,114,189,194,202,203].

Die Aminosäure Serin kann einerseits im Zytosol aus dem Glykolyse-Zwischenprodukt 3-Phosphoglycerat (3-PG) synthetisiert und andererseits aus der extrazellulären Matrix aufgenommen werden. Aus Serin können wiederum die Aminosäuren Glycin und Cystein synthetisiert werden. Zusammen mit Glutamat sind diese die Bausteine des Tripeptids Glutathion (GSH). GSH spielt eine wichtige Rolle bei der Entgiftung von Sauerstoffradikalen und dem Schutz vor oxidativem Stress in der Zelle [187]. In M1-Makrophagen fördert GSH die Sekretion von IL-1 β , indem es

immunmodulatorische Signalwege wie NF- κ B aktiviert. Gleichzeitig erhält GSH die zelluläre Redoxbalance, indem es ROS unter der Katalyse der GSH-Peroxidase neutralisiert. Dadurch wird oxidativer Stress reduziert und der Transkriptionsfaktor *nuclear factor erythroid 2-related factor 2* (Nrf2) stabilisiert. Nrf2 induziert die Expression von Enzymen wie der Hämoxxygenase-1 (HO-1), welche antioxidativ wirken und ROS ebenfalls neutralisieren können (**Abb. 7A**) [187,204].

Zu hohen ROS-Produktionsraten kommt es in den M1-Makrophagen durch Funktionsstörungen in der OXPHOS. Hohe ROS-Konzentrationen aktivieren das NLRP3-Inflammasom und fördern auf diese Weise die Sekretion von IL-1 β (**Abb. 7A**) [114,205]. Neben ROS kann darüber hinaus das Glykolyse-Enzym HK in seiner Funktion als Mustererkennungsrezeptor für Peptidoglykane eine Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms mit nachfolgender IL-1 β -Sekretion induzieren [114,206].

Speziell zum Stoffwechsel der in dieser Arbeit untersuchten THP-1-Makrophagen (M1/M2) gab es zum Zeitpunkt der Abfassung dieser Arbeit in der Literatur nur eine einzige Studie von Abuwad et al. (2020) [207]. In dieser Studie wurden die intrazellulären Konzentrationen einzelner Metaboliten aus der Glykolyse (D-Glucose, D-Glyceraldehyd-3-phosphat), der Glutaminolyse (L-Glutamin), der Serinolyse (D-Serin), dem TCA-Zyklus (S-Malat, 2-Oxoglutarat, Citrat, Itaconat und Succinat) sowie der Aminosäuren L-Alanin und L-Aspartat über Flüssigchromatographie und Massenspektrometrie (LC-MS; LC, engl. = *liquid chromatography*) bestimmt. Im Vergleich zu den THP-1-M0-Makrophagen wurden signifikante Unterschiede in den Metaboliten von THP-1-M1- und THP-1-M2-Makrophagen festgestellt. Diese zeigten sich bei THP-1-M1-Makrophagen in einem Anstieg von L-Citrullin und einem Abfall von D-Serin, und bei THP-1-M2-Makrophagen hingegen in einem Anstieg von D-Glucose und L-Citrullin sowie einem Abfall von L-Aspartat und L-Glutamin [207]. Als mögliche Erklärung für die Abweichung der von Abuwad et al. (2020) gemessenen Stoffwechselcharakteristika der *in vitro*-generierten THP-1-M1 und THP-1-M2-Makrophagen von den typischen Stoffwechselmustern der M1- und M2-Makrophagen (s. o.) werden Unterschiede in Differenzierungs- und Polarisierungsprotokollen diskutiert [112,114,188,189,207].

2.7. Reaktion von Monozyten und Makrophagen auf *T. gondii*-Stadien

Als zentrale Komponenten des angeborenen Immunsystems werden Monozyten und Makrophagen während einer *T. gondii*-Infektion unmittelbar zu Infektionsherden rekrutiert und übernehmen dort Schlüsselfunktionen in der parasitären Abwehr. Dazu zählen u. a. die Freisetzung von pro-inflammatorischen Zytokinen (z. B. IL-1 β , IL-6) und ETs, die Phagozytose sowie die Aktivierung weiterer antimikrobieller Mechanismen [5,19,66,208–210]. Für die frühe Kontrolle der parasitären Infektion ist eine effektive Immunantwort gegen *T. gondii* entscheidend. So kann die Parasitenlast begrenzt und der Parasiten-induzierte Zelltod verringert werden [66].

Die *T. gondii* induzierte IL-1 β -Sekretion wird über die Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms gesteuert, welches die Caspase-1-abhängige Spaltung von Pro-IL-1 β in seine reife, biologisch aktive Form katalysiert [159,162]. Bekannt ist, dass *T. gondii* mit dem NLRP3-Inflammasom gezielt interagieren und in humanen Primärzellen in Abhängigkeit vom Immunzelltyp unterschiedliche Immunantworten induzieren kann [66]. So wurde eine Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms in Monozyten [211] sowie eine Hemmung des NLRP3-Inflammasoms in neutrophilen Granulozyten nach *T. gondii*-Infektion beschrieben [212], während das NLRP3-Inflammasom in Makrophagen nicht signifikant verändert war [213]. Neben dem NLRP3-Inflammasom ist auch das NLRP1-Inflammasom an der aktiven Immunantwort gegen *T. gondii* beteiligt, um die Vermehrung des Parasiten zu begrenzen und zu kontrollieren [66]. Insbesondere in Rattenmakrophagen führte eine *T. gondii*-Infektion zur Aktivierung bzw. Hochregulierung des NLRP1-Inflammasoms, wodurch möglicherweise die NLRP1-Inflammasom-induzierte Pyroptose der infizierten Zellen gefördert wird [5,214]. Witola et al. (2011) induzierten durch RNA-Interferenz die NLRP1-Inflammasom-Expression in der humanen monoblastischen Mono-Mac-6-Zelllinie und beobachteten eine Abschwächung des Fortschreitens der *T. gondii*-Infektion, die zu beschleunigtem Zelltod und Zellzerfall führte sowie die Hochregulation der pro-inflammatorischen Zytokine IL-1 β , IL-12 und IL-18 unterdrückte [215].

Für primäre humane Monozyten, monozytäre THP-1-Zellen und THP-1-M0-Makrophagen sind die IL-1 β - und IL-6-Antworten auf die *T. gondii*-Infektionen gut

dokumentiert [209,211,213,216]. IL-1 β fungiert als früher Regulator während der *T. gondii*-Infektion. Bereits 1 Stunde nach der Konfrontation mit *T. gondii*-Tachyzoiten war eine Hochregulation der IL-1 β mRNA nachweisbar, gefolgt von einer erhöhten Sekretion von IL-1 β nach 4, 16 und 24 Stunden [209,211,213,217]. Eine 16-stündige LPS-Behandlung von primären humanen Monozyten bewirkte im Zusammenspiel mit *T. gondii*-Tachyzoiten keine erhöhte Sekretion von IL-1 β gegenüber der alleinigen LPS-Behandlung [212]. Hinsichtlich der IL-6-Sekretion in primären humanen Monozyten ist die Datenlage uneinheitlich. Die IL-6-Sekretion blieb in primären humanen Monozyten nach 24-stündiger Konfrontation mit *T. gondii*-Tachyzoiten aus [218], während eine Behandlung der Zellen mit dem parasitären Oberflächenmolekül Profilin, einem immunaktivierenden, Aktin-bindenden Protein, einen Anstieg induzieren konnte [219], teils aber keinen Effekt zeigte [220]. In monozytären THP-1-Zellen und THP-1-M0-Makrophagen führte die Konfrontation mit *T. gondii*-Tachyzoiten nach 4, 8, 12 und 24 Stunden zur Sekretion von IL-1 β [209,213,216] und IL-6 [208,221].

IFN- γ und IL-18 sind zentrale Mediatoren der Immunabwehr gegen *T. gondii*-Infektionen, wobei IL-18 von Monozyten und Makrophagen stammt und IFN- γ innerhalb weniger Stunden nach der Infektion von NK- und TH1-Zellen freigesetzt wird [5,66,222]. Bei Mäusen hemmt insbesondere IL-18 die Parasitenvermehrung und steigert deren Überlebensrate entscheidend [66]. Über IFN- γ -vermittelte Signalwege werden verschiedene antiparasitäre Mechanismen u. a. in Phagozyten aktiviert, darunter die verstärkte Antigenpräsentation, die Induktion der IL-12-Produktion (essenziell für die protektive Immunabwehr gegen *T. gondii*), die Aktivierung antimikrobieller Signalwege sowie die Hochregulation von IDO (essenziell für den Tryptophanabbau), immunvermittelten GTPasen (IRGs, engl. = *immunity-related GTPases*) und Guanylat-bindenden Proteinen (GBPs, letztere essenziell für die Phagolyse der PV) [5,223–226]. Die Phagozytose von *T. gondii* durch Monozyten und Makrophagen stimuliert die IL-12-Produktion, wodurch TH1- und NK-Zellen aktiviert werden, vermehrt IFN- γ freisetzen und die TH1-typische zellvermittelte Immunantwort vorantreiben [5,226]. Ergänzend induziert IFN- γ in Monozyten eine vermehrte Expression von iNOS, wodurch die Produktion von antimikrobiellen NO gesteigert und die Replikation des Parasiten reduziert wird [5,227].

Bisher gibt es nur eine Veröffentlichung, in der eine durch *T. gondii*-induzierte MET-Freisetzung aus Monozyten beschrieben wurde: In Seehunden (*Phoca vitulina*), die

wie andere Meeressäuger über ein komplexes, hochentwickeltes Immunsystem verfügen [228], lösten *T. gondii*-Tachyzoiten die Freisetzung von METs aus [19].

C. VERÖFFENTLICHUNGEN

1. Publikation:

“The ATP-mediated cytokine release by macrophages is down-modulated by unconventional $\alpha 9^*$ nicotinic acetylcholine receptors”

Wolf P.M.K.[†], Hanke D.[†], Singh V.K.[†], Keller H.L.[†], Ettischer L.J., Teppe L., Amati A.-L., Hecker A., Husain-Syed F., Rohde M., Nuber U.A., Büttner K., McIntosh J.M., Liese J., Mazurek S., Grau V. and Richter K. Front. Immunol., 27 October 2025 Sec. Multiple Sclerosis and Neuroimmunology Volume 16 – 2025 <https://doi.org/10.3389/fimmu.2025.1661114>

[†]These authors have contributed equally to this work.



OPEN ACCESS

EDITED BY
Zhe Jin,
Uppsala University, SwedenREVIEWED BY
Maria F. Cano-Abad,
Autonomous University of Madrid, Spain
Javier E. Irazoqui,
University of Massachusetts Medical School,
United States
Franziska Dengler,
University of Hohenheim, Germany*CORRESPONDENCE
Katrin Richter
✉ Katrin.Richter@chiru.med.uni-giessen.de[†]These authors have contributed equally to
this workRECEIVED 07 July 2025
ACCEPTED 13 October 2025
PUBLISHED 27 October 2025CITATION
Wolf PMK, Hanke D, Singh VK, Keller HL,
Ettischer LJ, Teppe L, Amati A-L, Hecker A,
Husain-Syed F, Rohde M, Nuber UA,
Büttner K, McIntosh JM, Liese J, Mazurek S,
Grau V and Richter K (2025) The ATP-
mediated cytokine release by macrophages is
down-modulated by unconventional $\alpha 9^*$
nicotinic acetylcholine receptors.
Front. Immunol. 16:1661114.
doi: 10.3389/fimmu.2025.1661114COPYRIGHT
© 2025 Wolf, Hanke, Singh, Keller, Ettischer,
Teppe, Amati, Hecker, Husain-Syed, Rohde,
Nuber, Büttner, McIntosh, Liese, Mazurek, Grau
and Richter. This is an open-access article
distributed under the terms of the [Creative
Commons Attribution License \(CC BY\)](#). The
use, distribution or reproduction in other
forums is permitted, provided the original
author(s) and the copyright owner(s) are
credited and that the original publication in
this journal is cited, in accordance with
accepted academic practice. No use,
distribution or reproduction is permitted
which does not comply with these terms.

The ATP-mediated cytokine release by macrophages is down-modulated by unconventional $\alpha 9^*$ nicotinic acetylcholine receptors

Philipp M. K. Wolf^{1†}, Dominik Hanke^{2†}, Vijay K. Singh^{3†},
Hanno L. Keller^{1†}, Luca J. Ettischer¹, Laura Teppe^{1,4},
Anca-Laura Amati¹, Andreas Hecker¹, Faeq Husain-Syed⁵,
Marius Rohde³, Ulrike A. Nuber⁴, Kathrin Büttner⁶,
J. Michael McIntosh^{7,8,9}, Juliane Liese¹, Sybille Mazurek²,
Veronika Grau¹ and Katrin Richter^{1,10*}¹Laboratory of Experimental Surgery, Department of General and Thoracic Surgery, German Center for Lung Research (DZL), Justus Liebig University Giessen, Giessen, Germany, ²Institute of Veterinary Physiology and Biochemistry, Justus Liebig University of Giessen, Giessen, Germany, ³Department of Pediatric Hematology and Oncology, Justus-Liebig-University, Giessen, Giessen, Germany, ⁴Stem Cell and Developmental Biology, Technical University of Darmstadt, Darmstadt, Germany, ⁵Department of Internal Medicine II, University Hospital Giessen and Marburg, Justus-Liebig-University Giessen, Giessen, Germany, ⁶Unit for Biomathematics and Data Processing, Justus Liebig University of Giessen, Giessen, Germany, ⁷School of Biological Sciences, University of Utah, Salt Lake City, UT, United States, ⁸Department of Psychiatry, University of Utah, Salt Lake City, UT, United States, ⁹George E. Whalen Veterans Affairs Medical Center, Salt Lake City, UT, United States, ¹⁰Department of Natural Sciences, Bonn-Rhein-Sieg University of Applied Sciences, Rheinbach, Germany**Objective:** The clinical interest in mechanisms controlling the biosynthesis and release of the pro-inflammatory cytokine interleukin (IL)-1 β is outstanding, as IL-1 β is associated with life-threatening inflammatory diseases including hyperinflammation caused by extracellular ATP originating from damaged cells. Previously, we identified a cholinergic mechanism controlling ATP-dependent IL-1 β release via metabotropic signaling of unconventional nicotinic acetylcholine receptors (nAChRs) containing subunits $\alpha 7$ and $\alpha 9^*$ (denoting homomeric or heteromeric $\alpha 9$) in monocytes. This study examines whether this mechanism is active in human macrophages (THP-1 cell-derived, peripheral blood mononuclear cell-derived, and peritoneal macrophages).**Methods:** Expression of nAChR subtypes (*CHRNA7*, *CHRFAM7A*, *CHRNA9*, *CHRNA10*) was analyzed using real-time RT-PCR. The efficiency of the differentiation protocols used was assessed by surface markers and metabolic conversion rate analysis. Cholinergic control of ATP-induced IL-1 β , IL-18, and IL-1 α release was tested using nAChR agonists and conopeptides antagonizing $\alpha 7$ and $\alpha 9^*$ nAChRs.**Results:** All nAChR subunits were expressed by all cells analyzed. Activation of nAChRs efficiently inhibited the ATP-mediated IL-1 β release by macrophages, while ATP-independent release remained unaffected. Moreover, the nAChR agonists inhibited the release of IL-18 and IL-1 α . The inhibitory effect was reversed by subunit-specific conopeptides, indicating the involvement of unconventional nAChRs containing subunits $\alpha 7$ and $\alpha 9^*$.

Conclusion: We conclude that the cholinergic control of ATP-mediated IL-1 β release is active in human monocytes and in macrophages and that nAChR agonists can also regulate the release of IL-18 and IL-1 α . This mechanism specifically regulates the ATP-induced cytokine release, without suppressing ATP-independent cytokine release. Thus, unconventional $\alpha 9^*$ nAChRs are promising therapeutic targets for ATP-induced inflammatory diseases, including sterile hyperinflammation.

KEYWORDS

nicotinic acetylcholine receptors, non-neuronal cholinergic system, inflammation, interleukin-1 β , monocytes, macrophages

1 Introduction

Monocytes and macrophages play an important role in the innate immune defense against a variety of pathogens (1). The pro-inflammatory cytokine interleukin (IL)-1 β importantly contributes to the acute phase response, a systemic reaction to infections, autoimmune reactions, and tissue damage (2–4). Due to this potent, ubiquitous function, the synthesis and release of IL-1 β must be strictly regulated and usually depends on two “danger signals”. Unlike constitutively expressed IL-1 α and IL-18, the bio-inactive pro-form of IL-1 β (pro-IL-1 β) requires a priming phase for induction (5, 6). This priming can be induced by pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) that are perceived by different pattern recognition receptors (PRRs), e.g. toll-like receptors (TLRs) of immune cells (1, 6–8). For the release, pro-IL-1 β must first be proteolytically cleaved, which requires a second “danger signal”. A special subgroup of intracellular NOD-like receptors (nucleotide-binding oligomerization domain and leucine-rich repeat-containing receptors, NLRs) play an important role in this process (5, 7, 8). The activation of these NLRs initially leads to the formation of cytosolic multiprotein complexes, the so-called inflammasomes (5, 7, 8). The best studied inflammasome to date is the NLRP3 inflammasome. It is activated by a variety of different stimuli, from bacterial and viral nucleic acids and lipopolysaccharide (LPS) to various damage-associated molecular patterns (DAMPs) such as extracellular ATP (7, 9). The inflammasome then serves as a platform to activate caspase-1. Activated caspase-1 promotes proteolytically cleavage of pro-IL-1 β into mature IL-1 β , which is then released (1, 8).

Inflammatory reactions induced by trauma, ischemia-reperfusion damage or burns usually occur independent of infectious factors and are therefore referred to as “sterile inflammation” (10). Despite extensive research, polytrauma and major surgeries still result in life-threatening systemic hyperinflammation with high mortality, where sterile inflammation, the DAMP extracellular ATP and IL-1 β play a central role (10, 11). ATP released from activated or damaged cells is sensed by the ATP-sensitive P2X7 receptor (P2RX7) (5, 8, 12). The ATP-induced activation of the ionotropic P2RX7 then leads to changes in intracellular ion concentrations, formation of the NLRP3 inflammasome, activation of caspase-1 and finally release of IL-1 β (5,

8, 10, 12, 13). Several “biologicals” have been developed that target the IL-1 system to prevent an excessive inflammatory response, such as the recombinant IL-1 receptor antagonist Anakinra, anti-cytokine therapies such as antibodies to IL-1 β (Canakinumab) or recombinant IL-1 receptor fusion proteins (Rilonacept) (4, 10, 12–15). These therapies are used to treat inflammatory diseases such as gout, rheumatoid arthritis and cryopyrin-associated periodic syndromes (CAPS) (10, 13, 16). The use of these biologicals is however a double-edged sword, as while suppressing sterile inflammation, they potentially weaken the defense against infection.

Ion channels might represent attractive targets for the development of new anti-inflammatory therapies. The importance of nicotinic acetylcholine receptors (nAChR) in immune regulation was first highlighted over two decades ago. nAChRs were identified in the “anti-inflammatory cholinergic reflex” to be crucial targets for the attenuation of the synthesis of pro-inflammatory cytokines (e.g. IL-1 β , IL-18 and IL-6) by macrophages and dendritic cells (17–19). Almost in parallel, a new chapter in cholinergic research was written by the identification of the non-neuronal cholinergic system in humans (20). All components of the cholinergic system and receptor subtypes (high-affinity choline transporters, choline acetyltransferase, acetylcholine (ACh), nicotinic- and muscarinic AChR subtypes, esterases) used by cholinergic neurons have been demonstrated to be also used in mammalian non-neuronal cells to communicate among each other and to maintain their phenotypic functions and thus organ homeostasis (20). nAChR are involved in regulation of the immune system and their activation by ligands like ACh and nicotine can protect against inflammatory diseases such as inflammatory bowel disease or rheumatoid arthritis (18). Several studies have provided compelling evidence that nAChRs composed of subunit $\alpha 7$ but also $\alpha 9$ and $\beta 2$ control the synthesis of pro-inflammatory cytokines on the transcriptional and post-transcriptional level (17, 19, 21–26). The dup $\alpha 7$ protein (gene *CHRFAM7A*), a negative regulator of the $\alpha 7$ nAChRs, has emerged as a potential modulator of immune responses (18), adding another layer of complexity to the cholinergic regulation of inflammation.

Beside the cholinergic control of cytokines on the transcriptional and post-transcriptional level, a cholinergic

mechanism was identified that inhibits the NLRP3 inflammasome-mediated release of IL-1 β by human monocytes by activation of nAChRs containing the evolutionary highly conserved subunits $\alpha 7$ and $\alpha 9^*$ (*denotes homomeric $\alpha 9$ or $\alpha 9$ co-assembled with $\alpha 10$ subunits) (27–29). This cholinergic mechanism depends on activation of nAChRs by classical agonists like ACh, nicotine and choline that specifically inhibit the ATP-sensitive P2RX7 and thus, the inflammasome-mediated release of IL-1 β (27, 28). Interestingly, nAChRs of monocytic cells containing the subunits $\alpha 7$ and $\alpha 9^*$ may be considered “noncanonical nicotinic receptors” as they seem to function as metabotropic receptors (30). It is, however, an open question whether the nAChR subunits $\alpha 7$, $\alpha 9$ and/or $\alpha 10$ interact, form a classical pentameric receptor (homomeric or heteromeric) or if they independently trigger anti-inflammatory mechanisms. A panel of novel endogenous ligands of these monocytic nAChRs were identified such as phosphocholine (PC) and several molecules bearing a PC-head group, such as glycerophosphocholine (GPC), lysophosphatidylcholine (L-PC), dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC; main component of surfactant) (27–29, 31, 32). Notably, the ATP-independent mechanism of inflammasome activation remains unaffected by the cholinergic mechanism (27). Thus, the identified cholinergic mechanism is unlikely to down-modulate all aspects of immunity against infections, while at the same time may effectively protect the host against sterile hyperinflammation. Moreover, it was demonstrated that the acute-phase proteins C-reactive protein (CRP) (32), alpha-1 antitrypsin (AAT) (33), and secretory leukocyte protease inhibitor (SLPI) (34), potently activate nAChRs containing the subunits $\alpha 7$ and/or $\alpha 9^*$, thereby efficiently inhibiting the ATP-mediated, inflammasome-dependent IL-1 β release by human monocytic cells. Therefore, apart from other functions, CRP, AAT, and SLPI seem to be central elements of systemic negative feedback loops to protect the host against systemic hyperinflammation, barrier dysfunction, and death by multiple organ damage (35).

While most of our previous studies focused on monocytic cells, we investigate here whether this anti-inflammatory cholinergic mechanism is active in human macrophages. A general problem in nAChR research and investigations of their function in immune cells is the lack of powerful nAChR subunit specific tools (30, 36, 37). Many antibodies to nAChRs have a questionable reliability (30, 37–39). In addition, well-characterized and standardized *in vitro* systems are needed to investigate nAChR functions in mononuclear phagocytes. Here, we developed a protocol to differentiate human macrophages *in vitro* from monocytic THP-1 cells. The differentiated THP-1 cell-derived macrophage subtypes (M0-, M1- and M2-like) were characterized by flow cytometry, measurements of the metabolic conversion rates and cytokine release. The expression of nAChR subunits $\alpha 7$, $\alpha 9$, $\alpha 10$ and dup $\alpha 7$ was tested by real-time reverse transcription PCR (real-time RT-PCR). The involvement of unconventional nAChRs containing subunits $\alpha 7$ and $\alpha 9^*$ was investigated using the specific conopeptides [V11L;V16D]ArlB (specifically antagonizing $\alpha 7$ nAChR) (40–42) and RgIA4 (antagonizing nAChRs composed of subunits $\alpha 9$ and $\alpha 10$) (36, 43, 44). To substantiate the results obtained in the THP-1 cell-derived macrophages, we used

macrophages differentiated from human peripheral blood mononuclear cells (PBMCs), as well as primary peritoneal macrophages. We provide evidence that the cholinergic control of the ATP-mediated IL-1 β -release is active in both human monocytes and macrophages. Additionally, we show for the first time that this mechanism also controls the ATP-induced release of IL-1 α and IL-18.

2 Materials & methods

2.1 Chemicals and reagents

α -Ketoglutaric acid sodium salt (Cat# K1875), ACh chloride (Cat# A6625), apyrase (Cat# A6410), adenosine 5'-triphosphate disodium salt hydrate (Cat# A2383), bovine serum albumin (BSA, Cat# A9418), choline chloride (Cat# C7017), CRP (Cat# AG723-M), dimethyl sulfoxide (DMSO, Cat# D2650), glutamate-pyruvate transaminase (GPT, Cat# 10737127001), glutamic-oxalacetic transaminase (GOT, Cat# 10105554001), glutaminase grade V (Cat# G880), hydroxylamin hydrochloride (Cat# 159417), L-glutamic dehydrogenase (GLDH, Cat# G2626), L-lactate dehydrogenase (LDH, Cat# 10107085001), L-malate dehydrogenase (L-MDH, Cat# LMDH-RO), LPS (*E. coli* O111:B4, Cat# L2630; *E. coli* O26:B6, Cat# L2654), recombinant human macrophage colony-stimulating factor (M-CSF, Cat# SRP3110), mecamlamine hydrochloride (Cat# M9020), (meta)periodate (Cat# S1878), nicotine hydrogen tartrate salt (Cat# N5260), nigericin sodium salt (Cat# N7143), phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA, Cat# P1585), PC chloride calcium salt tetrahydrate (Cat# P0378), potassium hydroxide (KOH, Cat# 1.05033), and recombinant mouse interferon- γ (INF- γ , Cat# IF005) were purchased from Merck (Darmstadt, Germany). Gibco penicillin-streptomycin solution (Cat# 151401222) and L-glutamine solution were purchased from Thermo Fisher Scientific (Dreieich, Germany). Glycine (Cat# 3908.2), glycerol (Cat# 3783.2), hydrazinium sulphate (Cat# HN96.2), hydrochloric acid (HCl, Cat# P074.4), L-alanine (Cat# 3076.1), L-aspartic acid (Cat# 1690.1), L-glutamic acid (Cat# 1743.1), L-glutamine (Cat# HN08.1), ortho-phosphoric acid (H₃PO₄, Cat# 6366.1), pyruvic acid sodium salt (Cat# 8793.1), sodium hydroxide (NaOH, Cat# 6771.2), sodium L-serine (Cat# 1714.1) and TRIS (Cat# 4855.2) were from Carl Roth, Karlsruhe, Germany. Glucose hexokinase FS (Cat# 125119910920), TruCal U (Cat# 591009910064), TruLab N (Cat# 590009910061), TruLab P (Cat# 590509910061), Cleaner (Cat# 188309910885), Cleaner A (Cat# 186109910923), Cleaner B (Cat# 186509910923) were purchased from Diasys, Flachet, Germany. Acetic acid (Cat# 0820), β -nicotine amide adenine dinucleotide (NAD, Cat# A1124), β -nicotine amide adenine dinucleotide disodium salt (NADH, Cat# A1393), di-potassium hydrogen phosphate anhydrous (Cat# A1042), potassium di-hydrogen phosphate (Cat# A1043), and sodium acetate anhydrous (Cat# A1522), were purchased from AppliChem GmbH, Darmstadt, Germany. Adenosine 5'-diphosphate (ADP, Cat# BD18698) was obtained from BLDPharm, Reinbeck,

Germany. BzATP (2'(3')-O-(4-benzoyl-benzoyl)ATP triethylammonium salt) was purchased from Jena Bioscience (Jena, Germany), 0.5 M pyrogen-free ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) solution from bioWORLD (Dublin, OH, United States, Cat# 40520000), recombinant human INF- γ from R&D Systems (Minneapolis, MN, United States; Cat# 285-IF-100), and PNU-282987 (N-(3R)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-yl-4-chlorobenzamide, Cat# 2303) from Tocris (Bio-Techne GmbH, Wiesbaden-Nordenstadt, Germany). IL-4 (Cat#200-04) and IL-13 (Cat#200-13) were purchased from Preprotec, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA USA. PMA and PNU-282987 were dissolved in DMSO. Nigericin was dissolved in ethanol (EtOH). When appropriate, control experiments were performed with the corresponding concentrations of DMSO/EtOH without drugs. The conopeptides [V11L;V16D]Ar1B (specifically antagonizing $\alpha 7$ nACh) (40–42) and Rg1A4 (antagonizing nAChRs composed of subunits $\alpha 9$ and $\alpha 10$) (36, 43, 44) were produced and characterized as described previously (44, 45).

2.2 Monocytic THP-1 cells and THP-1 cell-derived macrophages

THP-1 cells (German Collection of Microorganisms and Cell Cultures, Cat# ACC16) were cultured for a maximum of 20 passages under 5% CO₂ atmosphere at 37°C using RPMI 1640 medium from Sigma (Merck, Cat# R8758) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) from Capricorn (Ebsdorfergrund, Germany, Cat# FBS-16A). For IL-1 β release experiments, monocytic THP-1 cells were spun down (500 g, 8 min, room temperature (RT)) and the cell pellet was resuspended in FBS-free RPMI medium. 0.5×10^6 cells/0.5 ml/well were seeded into 48-well plates (Greiner Bio-One Frickenhausen, Germany). Cells were left untreated or primed for 5 h with 1 μ g/ml LPS (*E. coli* O26:B6) (46–48). After priming, BzATP (100 μ M) (49, 50) or nigericin (50 μ M; added together with 0.5 U/ml apyrase) (51) was added for 40 min in the presence or absence of cholinergic agonists and antagonists. At the end of the experiments, cells were spun down (500 g, 8 min, 4°C) and the cell-free supernatants were collected and stored at 20°C for later cytokine measurements.

For generating THP-1 cell-derived macrophages, either 0.3×10^6 cells/ml and per well were seeded in 12-well plates (Greiner) or 6×10^6 cells were seeded in T75 cell culture flasks (Sarstedt, Nümbrecht, Germany) and incubated with 50 nM PMA for 24 h. Thereafter, a 24 h resting phase in fresh complete medium without PMA followed. To induce cell differentiation into M1-like macrophages, cells were cultured in fresh complete medium supplemented with 10 ng/ml human INF- γ and 10 ng/ml LPS (*E. coli* O111:B4) for 48 h. Differentiation into M2-like macrophages was induced by culturing the cells in fresh complete medium supplemented with 20 ng/ml IL-4 and 20 ng/ml IL-13 for 48 h. M0-like macrophages were differentiated with PMA in parallel to M1-like and M2-like macrophages followed by a 72 h resting phase in fresh complete medium without PMA.

To investigate IL-1 β release on day 5, the medium was replaced by fresh RPMI 1640 medium (Sigma) supplemented with 10% FBS.

The cells were stimulated with 1 μ g/ml LPS (*E. coli* O26:B6) for 5 h and handled as described for monocytic THP-1 cells. The identity of M0-like, M1-like and M2-like macrophages on day 5 was evaluated by flow cytometry (see below). Cells were washed once with Dulbecco's phosphate buffered saline without calcium and magnesium (PBS; Merck Cat# D8537) and detached using TrypLETM Express (Thermo Fisher Scientific, Cat# 12605010) according to the manufacturer's protocol. The cell number was determined, and cells were stored on ice until flow cytometry.

2.3 Human peripheral blood mononuclear cell-derived macrophages

Human PBMC were obtained from self-reported healthy non-smoking adult volunteers (male and female). All procedures were approved by the local ethics committee at the University of Giessen (approval No. 90/18 and No. 98/23). Blood was drawn into sterile syringes containing EDTA (final concentration 1 mM). PBMCs were separated on Leucosep gradients (Greiner Bio-One, Cat# 227261). Isolated PBMCs were washed twice with PBS + 1% BSA and finally resuspended in monocyte attachment medium (PromoCell, Heidelberg, Germany, Cat# C-28051). 0.5×10^6 cells per well were seeded in a 48-well plate and cultured for 2 h. Non-adherent cells were removed, and cell culture medium was replaced by RPMI 1640-medium (Sigma) + 10% FBS (Capricorn) + 50 U penicillin/ml + 50 μ g streptomycin/ml + 10 ng/ml M-CSF. The cells were cultured at 37°C, 5% CO₂. After 72 h, the medium was replaced by fresh RPMI 1640-Medium (Sigma) + 10% FBS (Capricorn) + 50 U penicillin/ml + 50 μ g streptomycin/ml + 10 ng/ml M-CSF to obtain a M0-like phenotype. To obtain a M1-like phenotype, 50 pg/ml LPS (*E. coli* O26:B6) + 20 ng/ml IFN- γ were added, or 40 ng/ml IL-4 for a M2-like phenotype and cultured for a further incubation time of 72 h. On day 6 of differentiation, cells were washed with and cultured in fresh RPMI 1640 medium + 10% FBS and used for IL-1 β release experiments as described above. For flow cytometry (see below), differentiated cells were washed once with PBS (Merck Cat# D8537) and detached using TrypLETM Express (Thermo Fisher Scientific, Cat# 12605010) according to the manufacturer's protocol. The cell number was determined, and cells were stored on ice until flow cytometry.

2.4 Human peritoneal macrophages

For the isolation of peritoneal macrophages, peritoneal dialysate from female and male patients (above the age of 18 years) admitted to the University hospital Giessen was used. All experiments were approved by the local ethics committee at the University of Giessen, Germany (approval No. AZ251/20). The privacy rights of the patients have been observed and written informed consent was given by each patient. Peritoneal dialysates were collected during planned peritoneal dialysis training 14 days after implantation of the peritoneal dialysis catheter required due to chronic renal insufficiency requiring dialysis. Exclusion criteria were chronic or

acute infectious diseases, increased inflammatory parameters (leukocytosis, CRP above 10 mg/l, procalcitonin levels above 0.5 ng/ml, fever), ongoing antibiotic therapy, immunosuppressive therapy, chemotherapy within the last 3 months, pregnancy, or lack of consent.

Dialysates were stored on ice and all isolation procedures were performed on ice or at 4°C. Cells were isolated by centrifugation at 200 x g, 20 min. The cell pellets were washed with cold PBS/0.1% BSA.

Contamination with erythrocytes were removed by using RBC lysis buffer (BioLegend, San Diego CA USA, Cat# 420301) according to the manufacturer's protocol. Isolated cells were resuspended in RPMI medium (Merck) plus 10% FBS (Capricorn) and 50 U penicillin/ml, 50 µg streptomycin/ml.

For cytokine release experiments, 1×10^6 cells per ml were seeded per well in a 12-well plate and cultured overnight at 37°C and 5% CO₂. On the next day, macrophages were enriched by adherence selection. Peritoneal macrophages were left untreated or primed for 5 h with 0.1 or 1 µg/ml LPS (*E. coli* O26:B6). After priming, BzATP (100 µM) was added for 40 min in the presence or absence of cholinergic agonists and antagonists. At the end of the experiments, cells were spun down (500 x g, 8 min, 4°C) and the cell-free supernatants were collected and stored at -20°C for later cytokine measurements.

To analyze the cell types present in the peritoneal dialysates before and after adherence selection, cytosots were generated using the CellSpin I centrifuge (28 x g, 4 min, RT). Cytosots were air dried and fixed using BD CytopermTM for 20 min on ice. Moreover, 0.1×10^6 cells were seeded in 10-well chamber-view slides (Greiner, Cat# 543079) and cultured overnight. On the next day, the RPMI medium was discarded, and cells were fixed using BD CytopermTM as described above. For immunocytochemical staining, cytosots and chamber-view slides were incubated with PBS plus 1% hydrogen peroxide on ice for 30 min, washed three times with PBS, and incubated with BD Perm WashTM plus 1% BSA for 30 min at RT. Samples were stained with murine monoclonal antibodies to human CD14 (BioLegend, Cat# 325602) and CD68 (Agilent Dako, Cat# GA613) for 1 h followed by 1 h incubation with horseradish-peroxidase (HRP)-conjugated anti-mouse Ig antibodies (from Agilent Dako, Cat# P0260 and Cat# K400311-2). Thereafter, all samples were washed three times with TBS-buffer (0.5 M TRIS, 1.54 mM NaCl, 5% (v/v) HCl; pH 7.6) followed by incubation with 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB; Merck, Cat# D5905) in PBS/0.015% hydrogen peroxide (0.5 mg/ml) for 10 min at RT. At the end, samples were stained with Mayer's Haematoxylin for 6 min and then cover-slipped with Glycergel mounting medium (Agilent Dako, Cat# C0563). Stained cells of 6–9 randomly selected areas per sample were counted using the microscope Leica DMILS (20 x objective) and the ZEN (blue edition) software (Zeiss). Cells were categorized in CD14⁺, CD14⁺, CD68⁺, and CD68⁺ cells. Granulocytes were identified by their endogenous myeloperoxidase activity resulting in dark-brown stained granules and their typical polymorphic nuclei. After counting, percentages of CD14⁺ and CD68⁺ macrophages before and after adherence selection were calculated and compared.

2.5 RNA isolation, cDNA synthesis and real-time reverse transcription PCR

Total RNA was isolated from monocytic THP-1 cells, THP-1 cell-derived M0- and M1-like macrophages, and peritoneal macrophages using the RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany Cat#74134) in combination with the RNase-Free DNase Set (Qiagen; Cat#79256) according to the manufacturer's instructions. The quantity and quality of the RNA were assessed using the NanoDrop2000 (Thermo Fisher Scientific). Ratios of absorbance at 260/280 (acceptable value range: 1.8 – 2.0) and 260/230 (acceptable value range: 2.0 – 2.2) were determined to confirm that all samples were suitable for further analysis. The obtained RNA (1 µg) was reversely transcribed using QuantiTect[®] Reverse Transcription Kit Qiagen; Cat# 205311) according to the manufacturer's instructions. Universal Human Reference RNA (Thermo Fisher Scientific; Cat# QS0639) was included as a positive control. Thereafter, real-time RT-PCR was performed (n = 5–6 biological replicates per experimental group, each sample was assessed in technical duplicates) using the Real-Time PCR Cycler StepOne Plus[®] (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA) and SsoAdvanced Universal SYBR Green Supermix (Bio Rad, Hercules, CA, USA). Primers were obtained from Thermo Fisher Scientific (Table 1). As a negative control, samples were run under the same conditions, using nuclease-free water instead of cDNA. For each cDNA sample and each primer pair, duplicate reactions were performed. The PCR protocol consisted of an initial activation of the polymerase at 95°C for 5 min, followed by 40 cycles of a denaturation step at 95°C for 5 s and an annealing step at 61°C for 10 s and extension step at 72°C for 30 s, followed by a melting curve analysis. The mRNA expression is given as cycle threshold (Ct) values. For mRNAs that were undetectable in these experiments, the Ct value was artificially set to the cut of value Ct = 40 and this value was included in further analyses. The mean Ct value of technical duplicates was further used to calculate the fold change gene expression level based on the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method (52) to compare the expression of the genes of interest (*CHRNA7*, *CHRNA9*, *CHRNA10*, *CHRFAM7A*; see Table 1) after normalization by geometric averaging of the three reference genes glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*GAPDH*), peptidylprolyl isomerase A (*PPIA*), and ribosomal protein L37a (*RPL37A*) (53–57).

The specificity of the RT-PCR was confirmed by separation of the PCR products in a 1.5% agarose gel and sequencing (Eurofins Genomics, Ebersberg, Germany). The sequencing results were then analyzed using the public interface of BLAST, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>, at the NCBI website at the NCBI website.

2.6 Pappenheim staining of THP-1 cell-derived macrophages and peritoneal macrophages

To assess the morphology of THP-1 cell-derived macrophages, 0.1×10^6 monocytic cells/0.5 ml RPMI 1640 medium (Merck)

TABLE 1 List of oligonucleotides (primers) used for real-time RT-PCR.

Gene	Gene accession number	Primer (5'-3')	Reference/source
<i>CHRFAM7A</i>	NM_148911.1	Fwd: CAATTGCTAATCCAGCATTGT Rev: CAATTGCTAATCCAGCATTGT	(27)
<i>CHRNA7</i>	NM_000746.5	Fwd: CAATGACTCGCAACCACTCA Rev: GTGATCTGTCCAAGACATTGC	(124)
<i>CHRNA9</i>	NM_017581.4	Fwd: CTAATGCTCTTCGTCCAGTGGAA Rev: GTGAGATAGGCATCGTCCAGA	Primer3 (125)
<i>CHRNA10</i>	NM_020402.4	Fwd: GACTCAGGCGAGAAGGTGTC Rev: GGATGGTGAGTGCTTTGAG	Primer3 (125)
<i>GAPDH</i>	NM_002046	Fwd: TCTCCTCTGACTTCAACAGCGAC Rev: CCTGTGTGCTGAGCCAAATTC	(53)
<i>PPIA</i>	NM_021130.5	Fwd: TCCTGGCATCTTGTCCAT Rev: TGTGGTCTTGCCATTCT	(126)
<i>RPL37A</i>	NM_000998.5	Fwd: AGCTGTGGGGATCTGGCACT Rev: CGTGACAGCGAAGTGGATTGTA	(54)

All pairs were received from Thermo Fisher Scientific. Fwd, forward; Rev, reverse.

supplemented with 10% FBS (Capricorn) were cultured in 8-well cell culture chambers (Sarstedt, Cat# 94.6170.802). THP-1 cell-derived M0-like, M1-like and M2-like macrophages were differentiated as described above. On day 5, cells were washed once with PBS, followed by fixation with BD Cytoperm™ (BD, Franklin Lakes, NJ, USA, Cat# 554722) for 20 min on ice. Thereafter, cells were washed with PBS and chambers were air-dried. Macrophages were stained with May-Grünwald's dye for 1–2 min, then incubated in double distilled water (ddH₂O) for 5 min, followed by Giemsa's staining for 4–10 min. After the staining, the chamber frames were removed, slides cleaned thoroughly with ddH₂O, dried and cover-slipped with Neo-Mount® (Merck, Cat# 1.09016) before microscopy (Leica DM1S, Leica Microsystems).

2.7 Flow cytometry

Flow cytometry was performed to evaluate the presence of cell surface markers of THP-1 cell-derived macrophages (M0-, M1- and M2-like) and hPBMC-derived macrophages using a panel of antibodies against cluster of differentiation (CD)38, CD80, CD83, CD86, CD163, CD206, CD209 and HLA-DR (see [Supplementary Table S1](#)). Macrophages were detached using TrypLE (see above) and resuspended in flow cytometry buffer (PBS, 2 mM EDTA, 5% FBS). Thereafter, $1 - 2 \times 10^5$ cells were incubated with appropriate antibodies for 30 min on ice. All antibodies ([Supplementary Table S1](#)) were used at the manufacturer's recommended dilution or titrated to determine the optimal staining concentrations (between 1:20 and 1:100). Cells were also incubated with the control isotype antibody corresponding to each primary antibody. Thereafter, cells were washed twice in flow cytometry buffer. Then, the cells were fixed with 1% freshly dissociated paraformaldehyde (PFA) before flow cytometry analysis. Cells were analyzed on a BD FACSVerse™ System (BD Biosciences) using the BD FACSuite™ software, recording at least 10,000 events for each sample. Forward scatter (FSC) files were exported and analyzed in FlowJo software

version 10.8.1 (FlowJo, LLC). First, macrophages were gated by FSC-area (FSC-A) and side scatter-area (SSC-A), followed by single cell gating by SSC-A and side scatter-width (SSC-W). Surface marker-positive cells were gated based on Fluorescence Minus One (FMO) or isotype controls and percentage of surface markers positive cells was measured and exported.

2.8 Quantification of metabolic conversion rates in the cell culture supernatants of monocytic THP-1 cells and THP-1 cell-derived macrophages

5×10^5 monocytic THP-1 cells were seeded in 12-well plates and divided into 4 groups. The monocytic THP-1 cell group was cultivated for 5 days without differentiation supplements. The three other cell groups were treated with differentiation factors as described above to yield M0-, M1- and M2-like macrophages. On day 5 of cultivation, the monocytic THP-1 cells were centrifuged and resuspended in fresh medium while in the wells of the adherent growing M0-, M1- and M2-like macrophages the medium was exchanged to fresh medium without supplementation of differentiation factors. After 6 h the supernatants of the individual wells were collected and stored at -80°C. In parallel, the number of cells were counted in the corresponding wells. The frozen medium supernatants were heated for 15 min at 95°C and subsequently centrifuged at 8000 x g for 5 min. Glucose, lactate, glutamine, glutamate, pyruvate, aspartate, alanine and serine concentrations were determined photometrically using a Respos® 920 bench top analyzer (DiaSys Diagnostic Systems GmbH, Holzheim, Germany), as previously described (58). The conversion rates of the metabolites were calculated in [nmol/(h*10⁵ cells)] relative to the respective metabolite concentrations in control medium samples without cells which were cultivated for 6 hours in parallel to the wells with cells. Medium used for the metabolic conversion rates: Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) without glucose, glutamine

and phenol red (Gibco™, Thermo Fisher Scientific, Cat# A1443001) supplemented with 10% FBS Xtra (Capricorn, Cat# FBS-16A), 11 mM D-glucose (Carl Roth, Karlsruhe, Germany, Cat# X997.1), 2 mM L-glutamine (Merck, Cat# G3126), 50 U/ml penicillin, and 50 µg/ml streptomycin (Gibco™, Thermo Fisher Scientific, Cat# 151401222).

2.9 Measurements of cytokine concentration and LDH activity

Cytokine concentrations of IL-1β, IL-1α and IL-18 were measured in the above-described cell-free supernatants using the human IL-1 beta/IL-1F2 DuoSet enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) from R&D Systems (Cat# DY201), human IL-1 alpha/IL-1F1 DuoSet ELISA (Cat# DY200-05), and human Total IL-18 DuoSet ELISA (Cat# DY318-05) according to the supplier's instructions.

To measure LDH activity, the CytoTox 96® Non-Radioactive Cytotoxicity Assay (Promega, Madison, WI, United States; Cat# G1780) was performed according to the manufacturer's instructions. LDH activities determined in cell-free supernatants are given as percentage of 100% cell lysis control.

2.10 Statistical analyses and data processing

With exception of the data obtained in metabolic conversion rate measurements, all data were analyzed using SPSS® (Version 29, IBM®, Armonk, NY, USA). Multiple independent data sets were first analyzed by the non-parametric Kruskal–Wallis test. In case of a $p \leq 0.05$, the non-parametric Mann–Whitney U test was performed and again, a $p \leq 0.05$ was considered as evidence for statistical significance. Dependent data sets were analyzed first by the Friedman test followed by the Wilcoxon signed-rank test.

All numbers (n) of the individual experiments (biological replicates) are indicated in the Results section and in the Figures. No outliers were excluded from the analyses. The free and open-source software Inkscape version 0.48.5 r10040 (licensed under the GPL) was used for visualization of the data.

Data obtained in metabolic conversion rate measurements are presented as mean $\pm$ standard deviation (SD) using GraphPad Prism® (version 10.2.3, GraphPad Software, Boston, Massachusetts, USA). Data analysis was performed using SAS® statistical software (version 9.4, Statistical Analysis System Institute, Cary, North Carolina, USA). A two-way analysis of variance (ANOVA) was conducted to quantify metabolic conversion rates of the mean values of 5 biological replicates of glucose, pyruvate, lactate, glutamine, glutamate, aspartate, alanine and serine, including interaction effects between monocytic THP-1 cells, THP-1 cell-derived M0-, M1- and M2-like macrophages. The normality of residuals was assessed to validate the model assumptions. *Post-hoc* pairwise comparisons were performed and adjusted for multiple testing using the Bonferroni correction.

3 Results

3.1 Characterization of THP-1 cell-derived macrophages

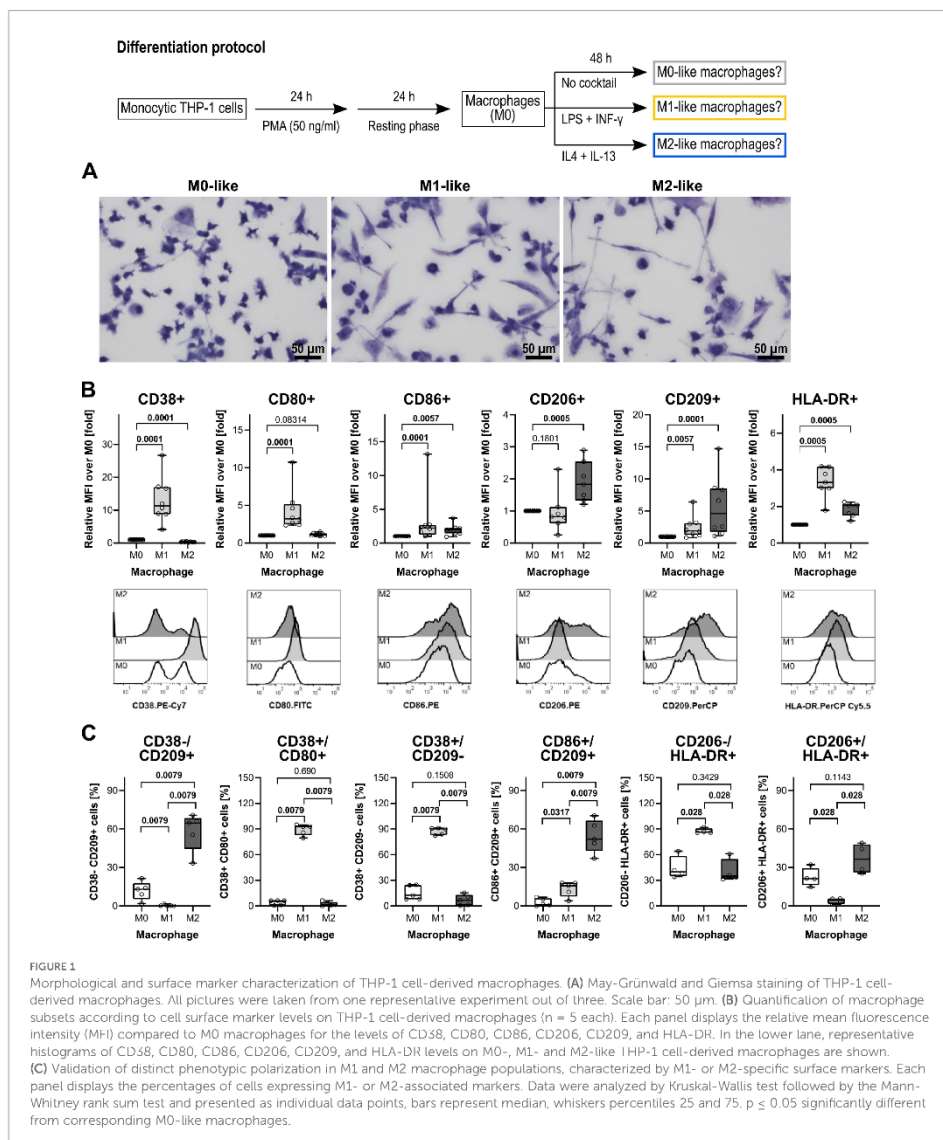
THP-1 cells develop a macrophage-like phenotype resembling primary human macrophages when exposed to PMA (59). A PubMed search in August 2025 using the search terms “THP-1” “macrophage” “differentiation” resulted in 1,211 hits. The published differentiation and characterization protocols of THP-1 cell-derived macrophages, however, vary largely between these publications and thus, may unknowingly affect the relevance of research output across research groups (60). In this study, THP-1 cell-derived macrophages were used to investigate the cholinergic control of the BzATP-mediated release of IL-1β. To test the efficiency of the differentiation protocols used, first the morphology of stained macrophages was assessed (Figure 1A). M0-like macrophages depicted a rounded or a spindle-shaped morphology, whereas a fibroblast-like, spindle-shaped morphology dominated in M1- and M2-like macrophages (Figure 1A). Moreover, M0-like macrophages appeared to be smaller compared to M1-like macrophages and THP-1 cell-derived M1-like macrophages possessed amoeboid protrusions.

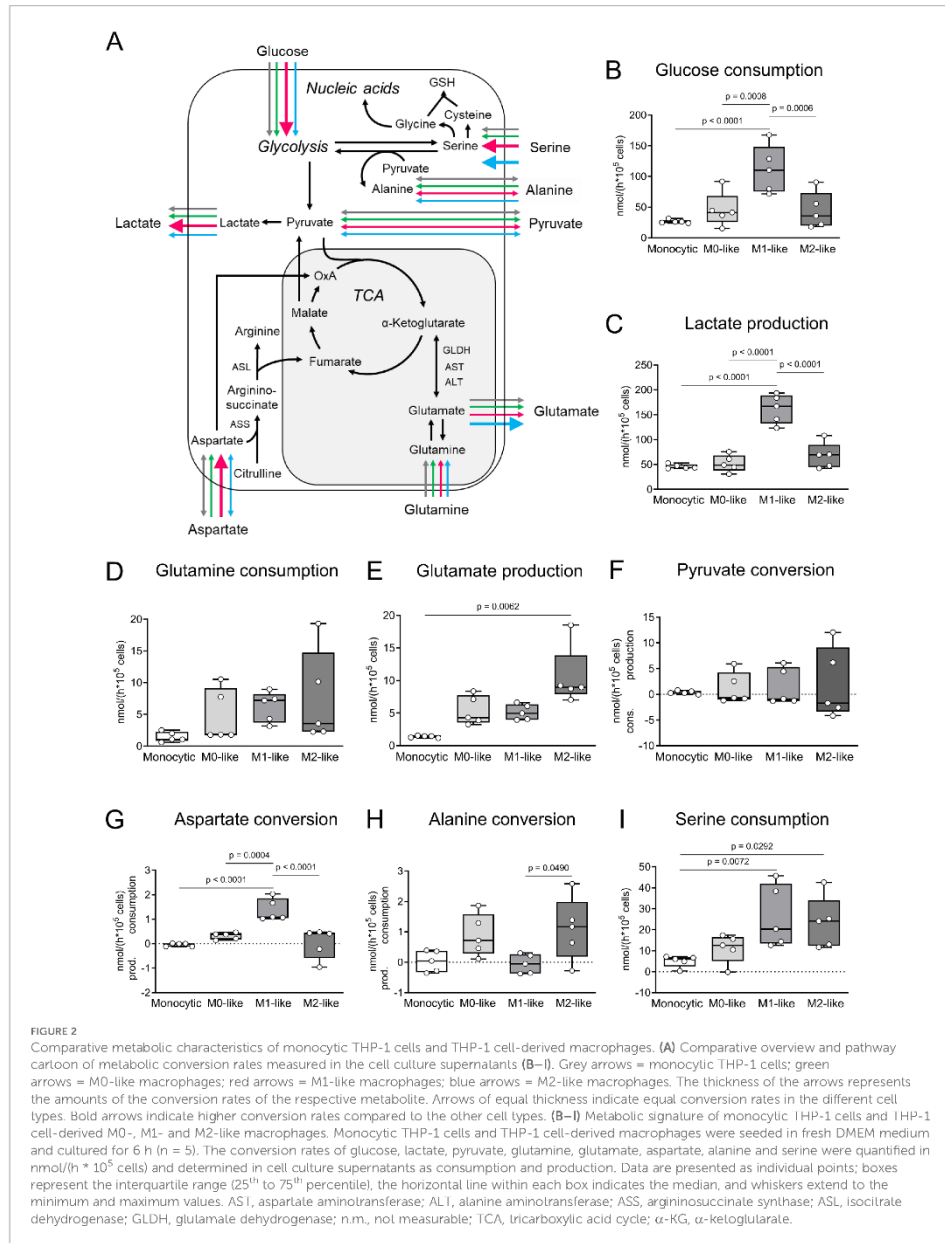
Flow cytometry was performed on differentiated THP-1 cells to assess cell surface markers typical for polarized macrophages (59, 61–63). A panel of antibodies was used against the following markers: the pro-inflammatory phenotype markers CD38 (64, 65), CD80, CD83 (66, 67) and CD86 (68, 69), the anti-inflammatory phenotype markers CD163 (61, 70) CD206 and CD209 (71, 72), and the human leukocyte antigen DR (HLA-DR) which is known to be abundantly expressed on human monocytes and macrophages (73). In comparison to THP-1 cell-derived M0-like macrophages, the M1-like differentiation protocol (Figure 1) resulted in an upregulation of CD38, CD80, and CD86 ($p \leq 0.05$; $n = 5$ each; Figure 1B,C). The typical cell surface markers of M2-like macrophages CD206 and CD209 were increased in the THP-1 cell-derived M2-like macrophages when compared to the M0-like ($p \leq 0.05$; $n = 5$ each; Figures 1B, C). Of note, CD83 was weakly expressed by all three macrophage populations and, thus, not useful to distinguish between the M0-, M1- and M2-like macrophages ($n = 5$; data not shown). In addition, the known M2-like macrophage surface marker CD163 was not upregulated by the used differentiation protocol for M2-like macrophages ($n = 5$; data not shown).

To further characterize the THP-1 cell-derived macrophages, metabolic conversion rates were analyzed (Figure 2). Even if cell passage-dependent minimal variations were detected within the 5 different cell batches used (Supplementary Figure S1), a direct comparison of the general metabolic conversion rates revealed phenotype-specific differences. In M1-like macrophages glucose consumption was 4-fold higher in comparison to monocytic THP-1 cells and 2-fold higher in comparison to M0- and M2-like macrophages. Lactate production was 3-fold higher in M1-like macrophages in comparison to monocytic THP-1 cells, M0-like as well as M2-like macrophages ($p \leq 0.05$; $n = 5$; Figures 2A–C). The

correlation analysis of glucose consumption and lactate production showed that in M1-like macrophages at least 25% of the glucose consumed was converted to lactate, while in monocytic THP-1 cells, M0-like and M2-like macrophages the conversion of glucose to lactate was not of great importance (Supplementary Figure S2; Supplementary Table S2). Aspartate conversion changed from

conversion rates close to the detection limit in monocytic THP-1 cells and spread conversion between consumption and production in M2-like macrophages to pronounced consumption in M1-like macrophages which was in addition 5-fold higher in comparison to M0-like macrophages ($p \leq 0.05$; $n = 5$; Figures 2A, G). In terms of serine conversion, M1- and M2-like macrophages were





characterized by 5-fold higher serine consumption rates compared to monocytic THP-1 cells ($p \leq 0.05$; $n = 5$; Figures 2A, I). Glutamine consumption and glutamate production were higher in all THP-1 cell-derived macrophages compared to monocytic THP-1 cells. However, only the difference in glutamate production between M2-like macrophages and monocytic THP-1 cells reached a significant level ($p \leq 0.05$; $n = 5$; Figures 2A, D, E). In M0- and M2-like macrophages, strong positive correlations between glutamine consumption and both lactate and glutamate production indicate a high glutaminolytic capacity with glutamate being released as part of the glutamine, whereas M1-like macrophages show inverse correlations (Supplementary Table S2). Alanine was consumed in M0- and M2-like macrophages while in monocytic THP-1 cells and M1-like macrophages alanine conversion spread between consumption and production (Figures 2A, H).

Next, the release of IL-1 β by LPS-primed THP-1 cell-derived M0-, M1- and M2-like macrophages in response to BzATP (100 μ M), ATP (2 mM) and nigericin (50 μ M) were compared (Supplementary Figure S3). Phenotype-specific responses were revealed. LPS-primed M0-like macrophages were found to release IL-1 β in response to BzATP from 71 to 282 pg/ml, ATP from 188 to 492 pg/ml, and nigericin from 20 to 1081 pg/ml ($n = 6$; $p \leq 0.05$; Supplementary Figure S3A). LPS-primed M1-like macrophages were found to release the highest amount of IL-1 β in response to BzATP (478 to 2351 pg/ml), ATP (577 to 1936 pg/ml) and nigericin (96 to 482 pg/ml; $n = 6$; $p \leq 0.05$; Supplementary Figure S3B). No BzATP- and ATP-mediated IL-1 β release was detected by LPS-primed THP-1 cell-derived M2-like macrophages ($n = 7 - 11$; Supplementary Figure S3C). In response to nigericin, however, LPS-primed THP-1 cell-derived M2-like macrophages released significant amounts of IL-1 β ranging from 4 to 181 pg/ml ($n = 10$; $p \leq 0.05$; Supplementary Figure S3C). Without LPS-priming, the cells did not release IL-1 β in response to nigericin ($n = 4$; Supplementary Figure S3C).

3.2 The nAChR subunits $\alpha 7$, $\alpha 9$ and $\alpha 10$ are expressed by monocytic cells and macrophages

First, transcript levels of human *CHRNA7*, *CHRNA9* and *CHRNA10* were determined in monocytic THP-1 cells ($n = 6$), THP-1 cell-derived M0- and M1-like macrophages ($n = 6$ each) and human peritoneal macrophages ($n = 5$). Moreover, the expression of the Dup $\alpha 7$ nAChR (*CHRFAM7A*), known as a dominant negative regulator of $\alpha 7$ nAChR functions, was analyzed. The cells were left untreated or primed with LPS for 5 h. The specificity of all primers used was validated by agarose gel electrophoresis (Supplementary Figure S4) and sequencing the PCR products. Transcripts of all genes of interest (*CHRNA7*, *CHRNA9*, *CHRNA10* and *CHRFAM7A*) were obtained (Supplementary Figure S4). The Ct values of all nAChR subunit genes of interest were above 30 (Supplementary Table S3; Supplementary Table S4). *CHRNA9* was often undetected (Ct $\geq$

40), for example in three out of five biological human peritoneal macrophages samples (Supplementary Table S4).

The relative expression of the genes of interest in LPS-primed THP-1 cells (monocytic, M0-like and M1-like) were further calculated by normalization to the three reference genes (*GAPDH*, *PPIA*, *RPL37A*) via the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method (Figure 3). Apart from *CHRFAM7A* in THP-1 cell-derived M0-like macrophages ($n = 6$; $p \leq 0.05$), no differences between the genes of interest in untreated and LPS-primed cells were found (Figure 3).

3.3 Cholinergic inhibition of the BzATP-mediated release of IL-1 β by monocytic THP-1 cells and THP-1 cell-derived M1-like macrophages

To test if classical and unconventional nAChR agonists inhibit the ATP-induced IL-1 β release, human monocytic THP-1 cells were primed for 5 h with LPS (1 μ g/ml) (Figure 4). Thereafter, 100 μ M BzATP, a P2RX7 agonist (74), was applied for 40 min in presence and absence of the cholinergic agonists (ACh, choline, nicotine, PC, CRP). To test for the involvement of nAChRs, the antagonist conopeptides [V111;V16D]ArlB (antagonizing $\alpha 7$ nAChRs (40–42)) and RgIA4 (antagonizing nAChRs containing subunits $\alpha 9$ and/or $\alpha 10$ (36, 43, 44)) were used. IL-1 β concentrations were measured in cell culture supernatants. As expected (46, 47), priming with LPS alone did not induce the release of relevant amounts of IL-1 β by monocytic THP-1 cells (untreated 1.8 ± 3.4 pg/ml; LPS 5.4 ± 10.2 pg/ml; $n = 34$). Stimulation of LPS-primed cells with BzATP resulted in elevated IL-1 β levels in supernatants of monocytic THP-1 cells in the range of 15 to 156 pg/ml ($n = 34$). The classical nAChR agonists ACh (Figure 4A; $n = 6$), choline and nicotine (Figure 4B; $n = 5$) significantly ($p \leq 0.05$) inhibited the BzATP-induced release of IL-1 β . Similar results were found for the unconventional endogenous agonists PC (Figure 4C; $n = 7$) and CRP in concentrations of 10 and 20 μ g/ml (Figure 4D; $n = 6 - 9$). The viability of the cells was not affected by the agonists as measured by LDH release (Supplementary Table S5). The inhibitory effect of all tested nAChR agonists was reverted by the conopeptides [V111;V16D]ArlB and RgIA4, suggesting that nAChR subunits $\alpha 7$ and $\alpha 9^*$ are involved in the cholinergic signaling (Figure 4).

Next, we tested if the BzATP-induced release of IL-1 β by LPS-primed THP-1 cell-derived M0-like and M1-like macrophages is controlled by nAChR agonists (Figure 5). Stimulation of LPS-primed THP-1 M0-like macrophages with BzATP resulted in elevated IL-1 β levels ranging from 75 to 397 pg/ml (Figure 5A; $n = 6$), whereas the BzATP-induced release of IL-1 β by M1-like macrophages was in the range of 110 to 1732.5 pg/ml (Figures 5B–D; $n = 17$). Similar to experiments with monocytic THP-1 cells (Figure 4), the classical nAChR agonists ACh, choline and nicotine as well as CRP significantly ($p \leq 0.05$) inhibited the BzATP-induced release of IL-1 β by both M0-like and M1-like macrophages (Figure 5). The inhibitory effect of PC on the BzATP-induced release of IL-1 β by THP-1 cell-derived M1-like

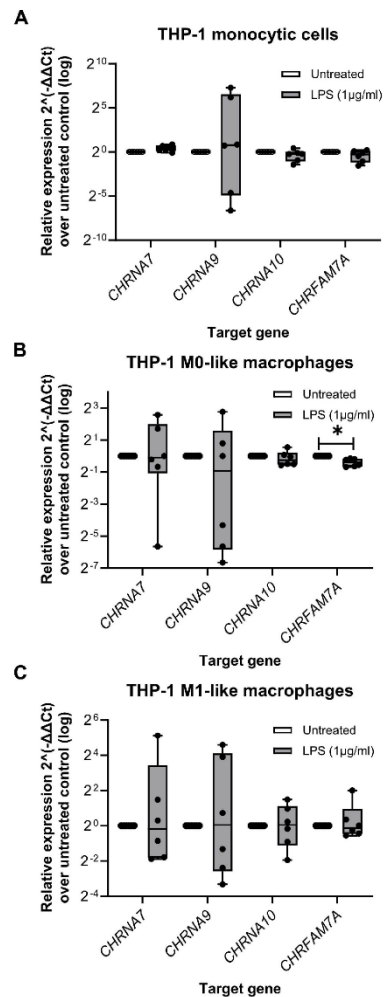
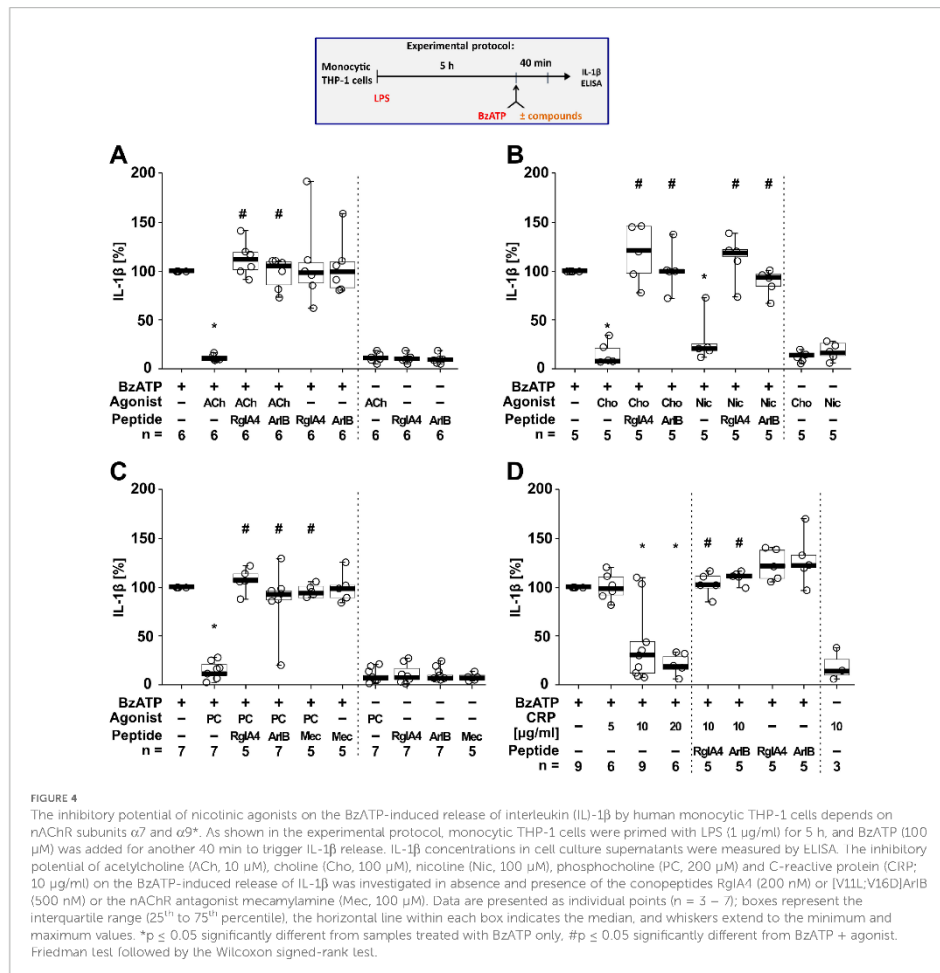


FIGURE 3

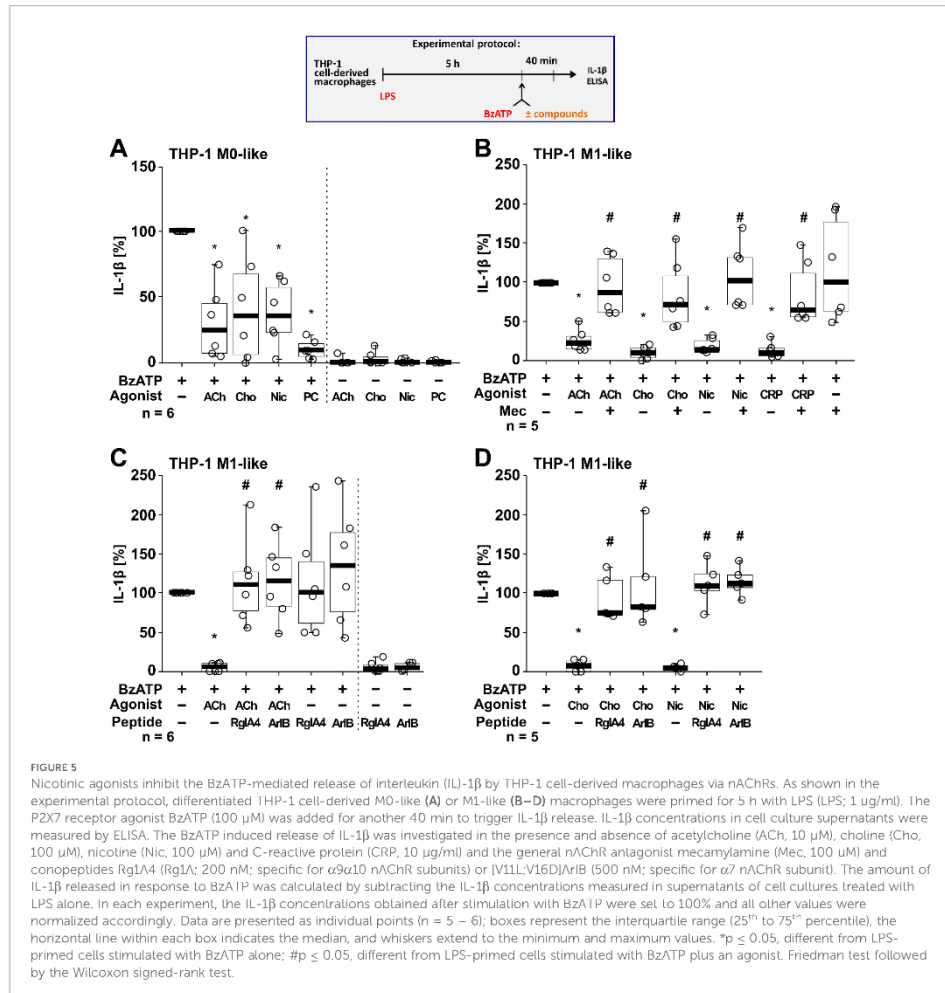
The relative expression of nicotinic acetylcholine receptors subunit genes in monocytic THP-1 cells and THP-1 cell-derived macrophages. Total RNA was isolated from monocytic THP-1 cells, and THP-1 cell-derived M0- and M1-like macrophages that were left untreated or treated for 5 h with lipopolysaccharide (LPS; 1 µg/ml). Real-time reverse transcription PCR (real-time R1-PCR) was performed to determine the mean cycle threshold (Ct) values. The relative expression in THP-1 cells (monocytic, M0-like and M1-like), compared to the untreated control, was calculated after normalizing the nicotinic subunit gene expression data of the genes of interest (*CHRNA7*, *CHRNA9*, *CHRNA10*, *CHRFA7A*) using geometric averaging of three reference genes (*GAPDH*, *PPIA*, *RPL37A*) via the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method. Data are presented as individual points (n = 6 biological replicates, each sample assessed in technical duplicates); boxes represent the interquartile range (25th to 75th percentile), the horizontal line within each box indicates the median, and whiskers extend to the minimum and maximum values. *p ≤ 0.05, different from LPS-primed cells. Friedman test followed by the Wilcoxon signed-rank test. *GAPDH*, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; *PPIA*, peptidylprolyl isomerase A; *RPL37A*, ribosomal protein L37a.



macrophages has been shown before (46). Again, the inhibitory effect of all tested nAChR agonists was reverted by mecamylamine (Figure 5B; n = 5) and the conopeptides [V11L; V16D]ArIB and RgIA4 (Figures 5C, D; n = 5 – 6), suggesting the involvement of nAChR subunits α7 and α9* (Figure 5). When using the selective α7 nAChR agonist PNU-282987 (75, 76), the same results were observed. PNU-282987 inhibited the BzATP-induced release of IL-1β by monocytic THP-1 cells and THP-1 cell-derived M1-like macrophages, and the inhibitory effect was reverted by the conopeptides [V11L; V16D]ArIB and RgIA4 (p ≤ 0.05; n = 6; Supplementary Figure S5). The viability of the cells was not affected by the agonists, conopeptides, and mecamylamine as measured by LDH activity in cell culture supernatants (Supplementary Table S4).

While LDH values of LPS-primed M0-like macrophages treated with BzATP were $8.2 \pm 3.7\%$ (n = 6), LPS-primed M1-like macrophages showed higher LDH values of $28.7 \pm 13.7\%$ in response to BzATP (n = 18; Supplementary Table S6).

To investigate if this cholinergic mechanism inhibits other pathways of NLRP3 inflammasome activation, we next tested for an ATP-independent mechanisms of inflammasome activation and IL-1β secretion. For this purpose, LPS-primed monocytic THP-1 cells (n = 5; Figure 6A) and THP-1 cell-derived M1-like macrophages (n = 5; Figure 6B) were treated with the pore-forming bacterial toxin nigericin (50 μM) instead of BzATP. In these experiments, the ATP-degrading enzyme apyrase (0.5 U/ml), was added together with nigericin to ensure that only ATP-

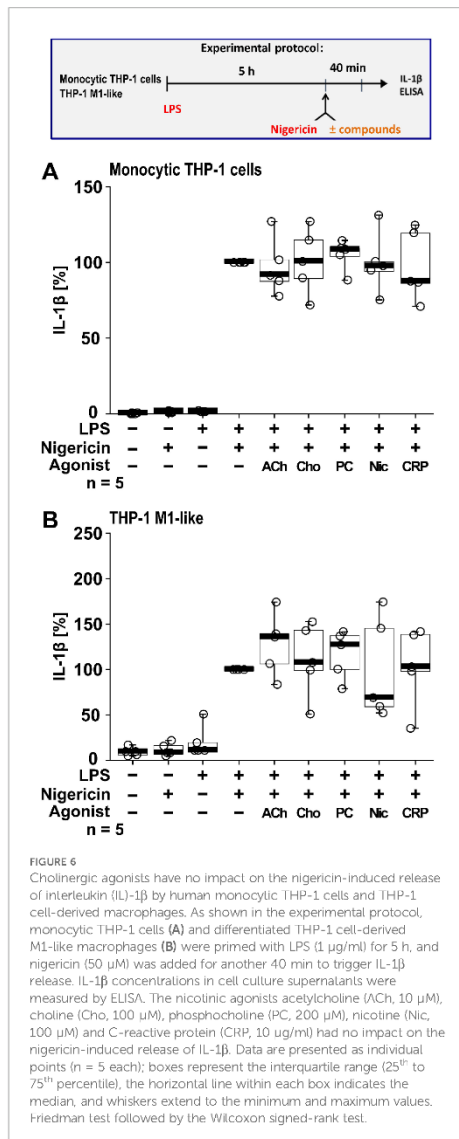


independent mechanisms are investigated. When IL-1β secretion was triggered by nigericin, the nAChR agonists ACh, choline, PC and nicotine had no impact on the release of IL-1β ($p \geq 0.05$; Figure 6).

3.4 The cholinergic control of IL-1β release is active in primary human macrophages

To confirm that the cholinergic mechanism inhibiting the BzATP-mediated release of IL-1β is active in primary human macrophages, freshly isolated PBMCs from blood samples of

healthy human volunteers were used. The PBMCs were differentiated into hPBMC-derived M0-like and M1-like macrophages. Differences in the levels of surface markers on day 6 of differentiation were detected when comparing the hPBMC-derived M0-like and M1-like macrophages by flow cytometry ($n = 3$; Supplementary Figure S6). On day 6 of differentiation, the cells were primed with LPS (1 μg/ml). Thereafter, BzATP (100 μM), was applied in presence and absence of the nAChR agonists (Figure 7). Priming with LPS alone did not induce the release of relevant amounts of IL-1β by hPBMC-derived M0-like (1 to 8 pg/ml) and M1-like macrophages (2 to 15 pg/ml). Stimulation of LPS-primed cells with BzATP resulted in elevated IL-1β levels in cell culture



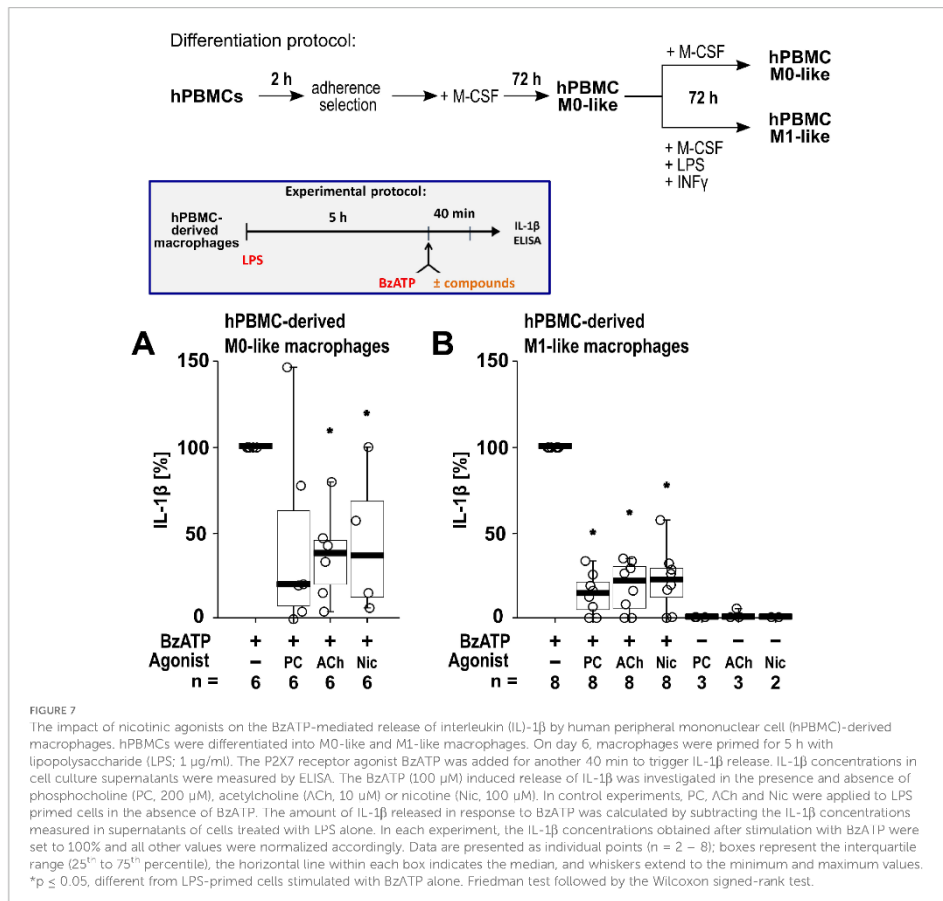
supernatants of hPBMC-derived M0-like macrophages in the range of 10 to 48 pg/ml and by hPBMC-derived M1-like in the range of 21 to 90 pg/ml. While hPBMC-derived M0-like macrophages showed mixed responses to the nAChR agonists PC, ACh and nicotine (Figure 7A), the agonists significantly inhibited the BzATP-induced release of IL-1β by hPBMC-derived M1-like macrophages

(Figure 7B). In control experiments, PC, ACh and nicotine showed no impact on the LPS-induced release of IL-1β in the absence of BzATP (Figure 7B). The viability of the cells was not affected by the agonists as measured by LDH activity in cell culture supernatants (Supplementary Table S7).

We further investigated human peritoneal macrophages (Figure 8) isolated from peritoneal dialysates. Macrophages were enriched via adherence selection and characterized by anti-CD14 and anti-CD68 staining (Supplementary Figure S7). Quantification of the CD14⁺ and CD68⁺ cells revealed a significant increase in the proportion of macrophages by adherence selection (n = 7 each, p ≤ 0.05; Supplementary Figure S7). The cells were primed with either 0.1 μg/ml (Figure 8A) or 1 μg/ml (Figure 8B) LPS for 5 h. Thereafter, BzATP (100 μM), was applied for 40 min in presence and absence of the nAChR agonists (Figure 8). Priming with 0.1 μg/ml LPS alone did not induce the release of relevant amounts of IL-1β by peritoneal macrophages (17 to 78 pg/ml), while additional stimulation with BzATP resulted in IL-1β levels in cell culture supernatants ranging from 768 to 3390 pg/ml (n = 7). Cell priming with 1 μg/ml LPS resulted in IL-1β levels ranging from 16 to 321 pg/ml, that were increased by BzATP to the range of 133 to 2898 pg/ml (n = 7). Interestingly, we detected nAChR agonist-specific responses of human peritoneal macrophages. The BzATP-induced release of IL-1β by peritoneal macrophages was insensitive to ACh (10 μM and 100 μM) and only slightly sensitive to CRP, whereas nicotine was effective in both, cells primed with 0.1 μg/ml or 1 μg/ml LPS (Figure 8). PC inhibited the BzATP-induced release of IL-1β in peritoneal macrophages primed with 0.1 μg/ml LPS (p ≤ 0.05; Figure 8A) while a tendency of inhibition was seen in peritoneal macrophages primed with 1 μg/ml (p = 0.063; Figure 8B). The LDH activity remained below 5% independent of the treatment (Supplementary Table S8).

3.5 nAChR agonists control the BzATP-mediated release of IL-1β, IL-1α and IL-18

In addition to IL-1β, the cytokines IL-1α and IL-18 were studied. In these experiments the cytokine concentrations of supernatants from the same samples were analyzed in parallel for all three cytokines by ELISA, with IL-1β levels serving as internal controls for the efficiency of the cholinergic agonists (PC, ACh, nicotine, choline) to control the BzATP-mediated IL-1β release. In LPS-primed monocytic THP-1 cells stimulation with BzATP resulted in elevated levels of IL-1β (ranging from 72 to 468 pg/ml; n = 6) and IL-18 (ranging from 67 to 199 pg/ml; n = 6), whereas the concentrations of IL-1α were below the detection levels of the ELISA (7.8 pg/ml). All tested nAChR ligands significantly (p ≤ 0.05; n = 6) reduced the BzATP-induced release of IL-1β and IL-18 (Figures 9A, B). LPS-primed THP-1 cell-derived M1-like macrophages responded to BzATP with elevated levels of IL-1β (ranging from 882 to 1621 pg/ml), IL-1α (ranging from 14 to 25 pg/ml), and IL-18 (ranging from 35 to 67 pg/ml; n = 6 each). The BzATP-induced release of IL-1β, IL-1α and IL-18 by THP-1 cell-derived M1-like macrophages was significantly reduced by all tested nAChR ligands (p ≤ 0.05; n = 6; Figures 9C-E).



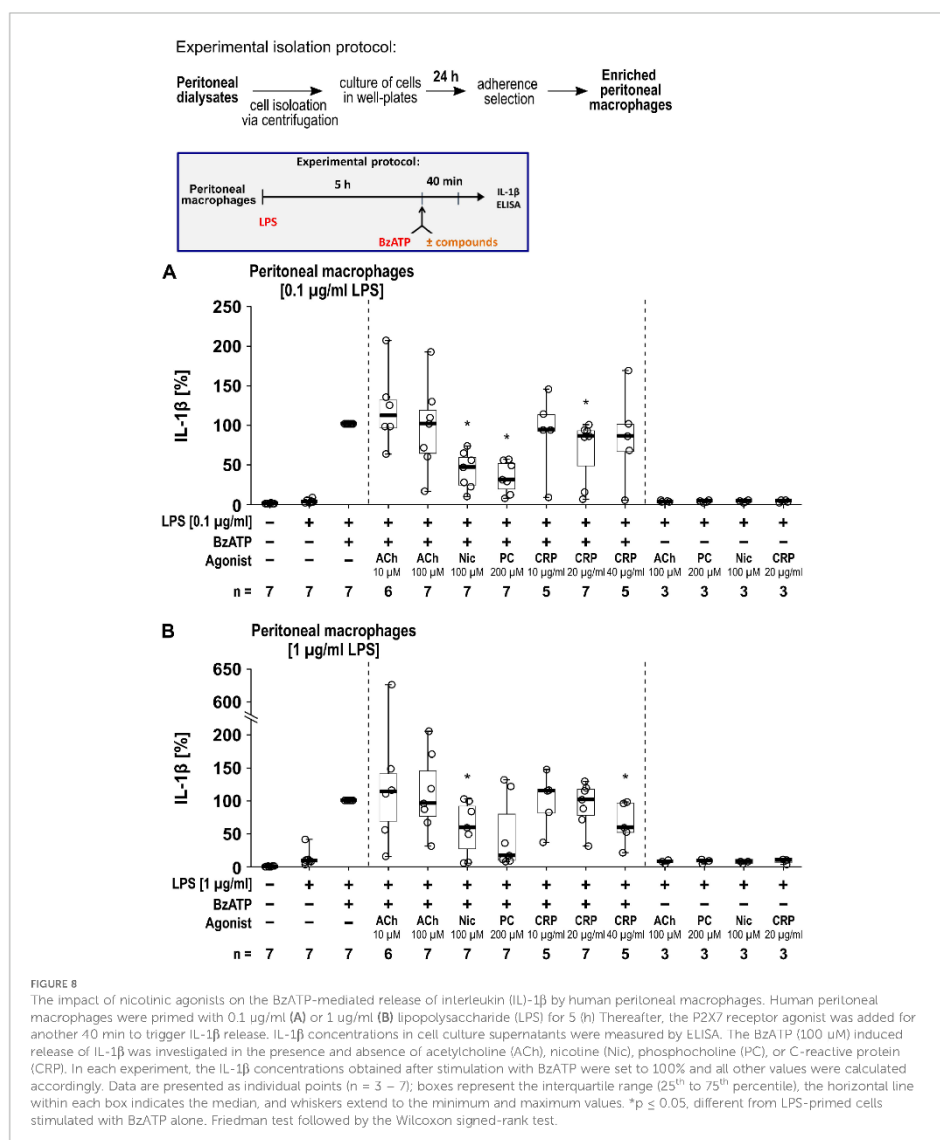
4 Discussion

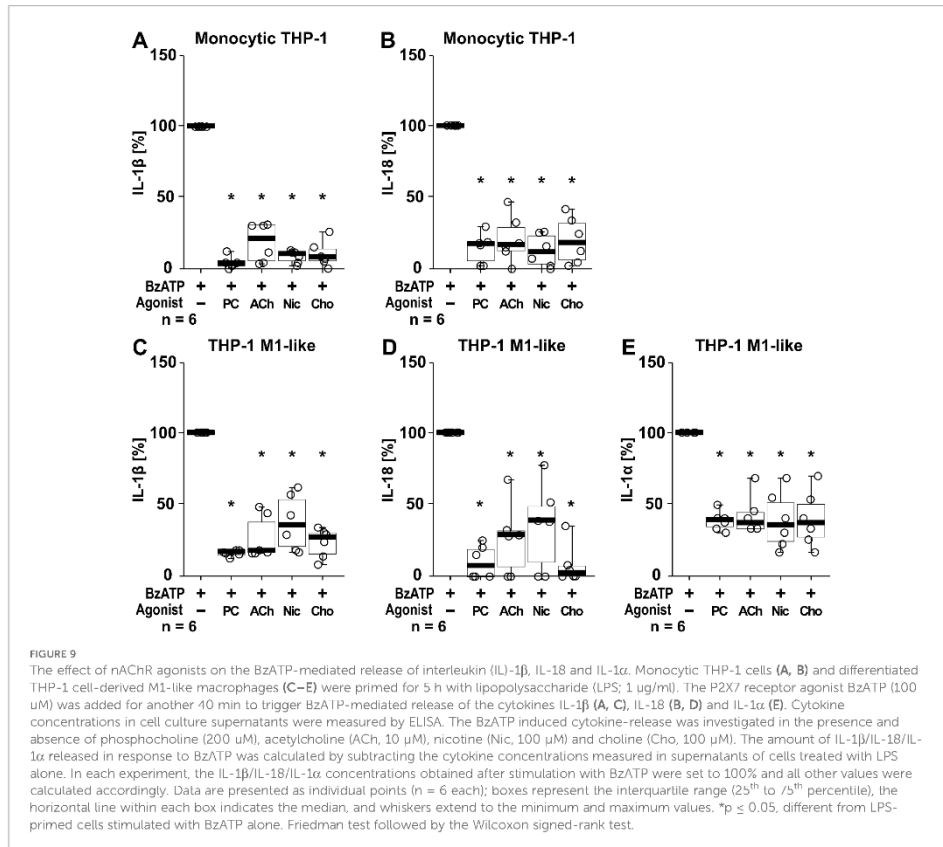
Several studies have provided compelling evidence that nAChRs are prominent players in the modulation of the synthesis of pro-inflammatory cytokines by immune cells (18, 19). We demonstrated before, that activation of a subset of nAChRs containing subunits $\alpha 7$, $\alpha 9$, and/or $\alpha 10$ in monocytic cells and epithelial cells down-regulates the response of the ATP-sensitive P2RX7, reduces NLRP3 inflammasome assembly and, consequently, the maturation as well as the release of IL-1 β (27–29, 31–34, 46–48, 77). Interestingly, the activation of these nAChRs induces a metabotropic signaling to inhibit the ionotropic function of the P2RX7 and, thus, the ATP-mediated release of IL-1 β (27, 28, 31–33, 48). In this study we developed and characterized protocols to generate human M0, M1 and M2 macrophages from different sources to investigate if the cholinergic mechanism is also exhibited by human macrophages.

It is already known that the expression of nAChRs in leukocytes in general is often weak, shows a high interindividual variety, and that there is no good correlation between mRNA and the respective expression of functional proteins (30, 78–83). Using the generated macrophage types, we established that transcripts of the nAChR subunits $\alpha 7$, $\alpha 9$, and $\alpha 10$ are expressed by human monocytic THP-1 cells, THP-1 cell-derived M0- and M1-like macrophages, and peritoneal macrophages. All used primer pairs and detected PCR products were carefully verified by primer efficiency tests, verification of the expected amplicon size in agarose gels and sequencing of the PCR products. When comparing unprimed and LPS-primed cells, there were no significant differences observed in the detection levels of all three subunits. We further investigated the expression levels of *CHRFAM7A*, a fusion gene that combines parts of the *CHRNA7* gene (which encodes the $\alpha 7$ nAChR subunit) and the *FAM7A* gene (84–86). Dup $\alpha 7$ can form heteromers with $\alpha 7$

nAChR subunits, thereby negatively modulating the $\alpha 7$ activity (18). Even if the exact role of *dup $\alpha 7$* in immune cells is still not completely understood, the *CHRFAM7A* gene is only expressed by humans and has been implicated in various neurological and immune disorders (87–92). Some studies suggest that *dup $\alpha 7$* modulates the activity of $\alpha 7$ nAChRs, affecting their role in

inflammation and immune regulation (18, 86, 92). Here, the nAChR subunit $\alpha 7$ and its negative regulator *dup $\alpha 7$* were almost equally detected in all tested THP-1 cells and peritoneal macrophages. The *CHRFAM7A* expression was slightly increased in LPS-primed THP-1 cell-derived M0-like macrophages. This is in contrast to a previous publication showing in monocytic THP-1





cells and human PBMC-derived macrophages challenged with LPS a decreased expression of *dupa7* on both mRNA and protein levels (82). In the study of Benfante et al. monocytic U937 and THP-1 cells were, however, completely devoid of the *CHRNA7* transcript (82). The reason for this might be the use of LPS from a different *E. coli* strain (055:B5) and the use of anti- $\alpha 7$ nAChR-antibodies that are still debated (30, 38, 39). These contradicting findings suggest that the expression of these nAChRs might differ among different states of differentiation of cells belonging to the family of mononuclear phagocytes. Later the same group provided evidence that the acetylcholinesterase inhibitor donepezil upregulates *CHRNA7* and *CHRFAM7A* expression in human macrophages (91). It was suggested that the immunomodulatory potential of the donepezil may be exerted by regulating the activation of cholinergic anti-inflammatory pathways through the modulation of the expression of *CHRNA7* and *CHRFAM7A* at transcriptional level (91). How changes in the expression level of *CHRFAM7A* may

modulate the cholinergic control of the ATP-induced release of IL-1 β is unknown and remains to be investigated.

Over the last years, various macrophage subtypes have been identified, attributed to their remarkable plasticity and functional versatility (93, 94). However, a streamlined and commonly adopted model conceptualizes macrophage polarization into two primary and opposing subtypes: the classically pro-inflammatory M1 macrophages and the alternatively anti-inflammatory M2 macrophages (94). THP-1 cells, a cell line that was derived from a patient suffering from acute monocytic leukemia, can be stimulated to differentiate into macrophages (61, 63, 95). There are countless differentiation protocols available to obtain a macrophage-like phenotype of THP-1 cells. The use of PMA at concentrations of 5–200 ng/ml for 24–72 h, followed by a culture in a differentiation medium with different additional stimuli for 2–5 days are the most common techniques (62, 96–99). However, various differentiation conditions, such as the concentration of stimulants and incubation

time are certainly critical factors causing a high heterogeneity among THP-1 derived macrophages used in different laboratories as nicely shown by Pinot et al. (62). We developed a THP-1 cell-derived M0-, M1- and M2-like macrophage differentiation protocol and characterized the cell phenotypes by combining cell staining, analysis of surface markers and measurements of the metabolic conversion rates. Typical surface markers of M0-, M1- and M2-like macrophages (59, 61–63) were detected in the generated macrophage types. Following previous research, a set of antibodies to target specific markers on pro-inflammatory M1-like macrophages were used. These markers include CD38 (64, 65), CD83 (66), and the two markers CD80 and CD86 that are typically found on activated antigen presenting cells (68, 69). While the precise role of CD38 in macrophages is not fully understood, it can serve as an inflammatory marker in macrophages (65). We observed that CD38, CD80 and CD86 were more abundant in THP-1 cell-derived M1-like macrophages compared to M0-like cells. CD83, a marker of activation typically transiently expressed upon stimulation with LPS or other activating agents (66, 67) was not useful in our hands to distinguish between the THP-1 cell-derived macrophage phenotypes. Furthermore, the known M2-like macrophage surface markers CD163, a member of the scavenger receptor cysteine-rich superfamily restricted to the monocyte/macrophage lineage (61, 70), CD206 (mannose receptor MRC1) and CD209 (C-type lectin receptor 4) (71, 72) were tested. While increased levels of CD206 and CD209 were found in the THP-1 cell-derived M2-like macrophages compared to the M0-like, CD163 was not useful to distinguish between the different THP-1-cell derived macrophage phenotypes. This is likely due to the differentiation protocol used, as CD163 is only increased in M2-like macrophages differentiated with IL-10, but not IL-4 (61, 100).

We further analyzed to which extent the metabolic characteristics of the generated THP-1 cell-derived macrophages match the published metabolic patterns of other monocytes and macrophages. A metabolic scheme summarizing the published metabolic characteristics of M1- and M2-like macrophages was created for a simplified illustration (Supplementary Figure S9) based on publications by Viola et al., 2019, Rodriguez et al., 2019 and Liu et al. 2021 (101–103). In the overall comparison of all examined cells, the THP-1-cell derived M1-like macrophages were characterized by the highest glucose consumption, lactate production and aspartate consumption rates. This metabolic pattern is consistent with the multiple activating enzyme regulations within glycolysis (glucose to lactate) and the metabolism of aspartate as well as the different inhibitory enzyme regulations in mitochondrial pyruvate dehydrogenase and the enzymes of the tricarboxylic acid (TCA) cycle described in the literature for various M1-like macrophages (101, 103) (Supplementary Figure S8A). In the M2-like macrophages, the significantly lower conversion rates of aspartate as well as glucose to lactate in comparison to the M1-like macrophages are consistent with published high importance of the TCA cycle for glucose degradation in M2-like macrophages (101, 103) (Supplementary Figure S8B). In both M0- and M2-like macrophages, the positive correlation between glutamine consumption and glutamate

production which was not detectable in monocytic THP-1 cells indicates that a part of the glutamine consumed was immediately released as glutamate as found in many proliferating cells, e.g. tumor cells (104). In contrast, in M1-like macrophages the negative correlations between glutamine consumption and glutamate production as well as between glutamine consumption and lactate production are consistent with the favored conversion of glutamate to succinate via the truncated TCA cycle or the GABA shunt described in the literature for various M1-like macrophages (101, 103). In M1-like macrophages, high succinate levels induce the stabilization of HIF-1 α , a key transcription factor for increasing the glycolytic conversion rate (101, 103). The increase in serine consumption measured in M1- and M2-like macrophages compared to monocytic THP-1 cells corresponds to the key role of serine for glutathione synthesis and thus the induction of IL-1 β production in LPS-stimulated murine peritoneal macrophages (102). Contradictory data come from a study of Abuawad et al. in which no significant differences between THP-1 cell-derived M1- and M2-like macrophages were found in glycolysis and the TCA cycle (98). These findings from Abuawad et al., however, differ from other studies (101, 103) and our own data (Supplementary Figure S8). An explanation for the different observations might be the variations in the differentiation protocol used. In summary, the assessment of cell morphology, subtype-specific surface markers, changes in metabolic conversion rates and potency to release the IL-1 β , underpin the efficiency of the developed differentiation protocols for THP-1 cell-derived macrophages. We provide evidence that THP-1 cell-derived macrophages are useful tools for research on nAChR functions in immune cells and could be also suitable for future research on their function in metabolism.

The present study also used two types of primary human macrophages: PBMC-derived and peritoneal macrophages. The successful differentiation towards M0-, M1-, and M2-like phenotypes of PBMC-derived macrophages was supported by differences in the surface markers detected by flow cytometry. Peritoneal macrophages were purified from peritoneal dialysate fluids by centrifugation, incubation with RBC lysis buffer to eliminate erythrocytes, and an overnight adherence. Immunocytochemical staining of the well-established macrophage markers CD14 and CD68 (105–108) showed a significant increase in the proportion of macrophages (CD14⁺ and CD68⁺) after macrophage enrichment, although the samples still contained around 10% of granulocytes and other unidentified cell types. We found donor-dependent variations in the BzATP-induced IL-1 β release by LPS-primed peritoneal macrophages. However, LPS alone did not induce relevant amounts of IL-1 β secretion suggesting that the cells were not pre-activated. Since using primary macrophages from healthy donors presents ethical challenges, the protocol developed in this study is a good option to investigate primary human macrophages.

While most research on the cholinergic anti-inflammatory system focused on the nAChR subunit $\alpha 7$ and modulation of cytokine release on the transcriptional level, we provide evidence that $\alpha 9^*$ nAChRs are important to control the ATP-induced NLRP3 inflammasome-mediated release of IL-1 β . Moreover, this

cholinergic control seems to be active in human macrophages. The nAChR agonists ACh, choline, nicotine, and PC significantly inhibited the BzATP-induced release of IL-1 β by LPS-primed THP-1 cell- and PBMC-derived macrophages. Based on our current results, the inhibition of BzATP-induced IL-1 β release was specifically mediated through nAChRs containing the subunits $\alpha 7$ and $\alpha 9^*$, since the specific conopeptides [V11L; V16D]Ar1B and RgIA4 reversed this effect. Similar results were obtained using the selective $\alpha 7$ nAChR agonist PNU-282987. While immunohistochemistry is a common tool used to sort out the expression of specific receptor subtypes, the use of antibodies against nAChRs in general and the subunits $\alpha 7$ and $\alpha 9$ in particular is difficult. The use of $\alpha 7$ knockout mice revealed that anti- $\alpha 7$ antibodies detect putative $\alpha 7$ protein signals in knockout animals (37, 38, 109). To the best of our knowledge no specific antibodies are available. To overcome this problem, we used the antagonistic conopeptides [V11L; V16D]Ar1B and RgIA4 that are powerful and sensitive tools in the research on nAChR subunits $\alpha 7$ and $\alpha 9^*$ (30, 36, 37). RgIA4 shows a high potency (IC₅₀ 1.5 nM) and selectivity for $\alpha 9\alpha 10$ with a 1200-fold lesser potency on the $\alpha 7$ nAChRs (IC₅₀ 1.8 μ M) and lacks activity on GABA receptors (36, 37, 44, 110). This study indicates that the cholinergic mechanism has the potential to modulate ATP-induced pro-inflammatory cytokine release by M1-like macrophages derived from the human THP-1 cells, PBMCs of healthy volunteers and peritoneal macrophages. We demonstrated before by using PBMCs from nAChR gene-deficient mice and siRNA to silence the expression of single subunits $\alpha 7$, $\alpha 9$ or $\alpha 10$ that the inhibition of ATP-dependent release of IL-1 β by ACh, PC, choline and nicotine essentially depends on the presence of all three subunits $\alpha 7$, $\alpha 9$ and $\alpha 10$ (27–29). Here, the inhibitory effect of PNU-282987 was sensitive to both conopeptides [V11L; V16D]Ar1B and RgIA4. These findings support our previous results and provide evidence for the involvement of $\alpha 7$ and $\alpha 9^*$ nAChR subunits in the cholinergic control mechanism in mononuclear phagocytes.

We observed differences in the sensitivity of peritoneal macrophages regarding their response to different nAChR agonists. While ACh (10 μ M and 100 μ M) failed to inhibit the BzATP-mediated IL-1 β release, it was efficiently inhibited by nicotine. PC inhibited the BzATP-mediated cytokine-release by peritoneal macrophages primed with 0.1 μ g/ml LPS, whereas the effects of CRP were concentration-dependent. These variations in the obtained effects might be due to the above-mentioned differences in the expression of nAChR subunits in mononuclear phagocytes. It is not surprising that nAChR expression levels are varying between different volunteers and patients. The intake of stimulants and addictive substances such as coffee and cigarettes (111) and diet (112–114) can have an influence on the cholinergic system, enzyme (e.g. cholinesterase) activity, and modulate the expression of nAChRs or other components of the cholinergic system. This also applies to phosphatidylcholines and their metabolites, which can be ingested (115) and which we identified before to function as endogenous agonists of monocytic nAChRs containing the subunits $\alpha 7$ and $\alpha 9^*$ (27–29, 31).

Importantly, the results obtained in the present study suggest that the cholinergic mechanism described here is not limited to

monocytic cells. While previous studies have established the role of the $\alpha 7$ nAChR in regulating the gene expression of pro-inflammatory cytokines by macrophages (17, 18, 116), the involvement of the $\alpha 9^*$ nAChR in the maturation of inflammasome-dependent cytokines is novel and of particular interest for the development of novel therapeutic options for inflammatory diseases including sterile hyperinflammation. The question remained if the here identified cholinergic mechanism inhibits either the function of the P2RX7 or down-stream mechanisms including the NLRP3 inflammasome. Therefore, we performed experiments, in which the pore-forming bacterial toxin nigericin (51) was given as an ATP-independent stimulus for inflammasome activation. Apyrase was added in these experiments to exclude possible effects of endogenous ATP. We here demonstrated that the ATP-independent NLRP3 inflammasome activation via nigericin is not under cholinergic control. This is in line with previous data on the monocytic U937 cell line, where nAChR agonists efficiently inhibited the ionotropic function of the P2RX7 (27). Like in monocytes, short term stimulation of nAChRs presumably inhibits the ATP-induced inflammasome activation that is typical for damage-induced inflammation. Activation of nAChRs expressed by monocytes and macrophages might spare other pathogen-induced mechanisms of inflammasome activation and thus enable a specific inhibition of damage-induced hyperinflammation without suppressing host defense against infection.

The question of whether other members of the IL-1 family might be controlled by this cholinergic mechanism remained underexplored. In previous studies on human PBMCs Western blotting revealed that BzATP reduced the cellular content of pro-IL-1 β and induced the activation of caspase-1 and this was attenuated by nicotinic agonists (27). Inflammasome activation can lead to the formation of large aggregates, so-called specks or pyroptosomes, that can be detected with antibodies directed to apoptosis-associated speck-like protein containing a caspase activation and recruitment domain (ASC) (8). The increase in ASC speck formation in response to BzATP was largely suppressed by concomitant application of nicotinic agonists (32). Here, we provide for the first time evidence that the unconventional nAChR agonists PC and a panel of classical agonists (ACh, nicotine and choline) in addition to IL-1 β can also control the BzATP-induced release of the NLRP3-dependent cytokine IL-18 and, interestingly, IL-1 α . The pathophysiological role of IL-1 α has remained relatively overlooked (117). In contrast to IL-1 β , both the precursor (pro-IL-1 α) and the cleaved form of IL-1 α are biologically active IL-1R1 ligands (117). Moreover, while some stimuli induce IL-1 α release via an NLRP3-dependent pathway, others trigger its release through NLRP3-independent mechanisms (117–119). However, since all three cytokines play an important role in host defense against infection as well as in the pathogenesis of autoimmune and inflammatory diseases (4, 12, 117, 120), a therapy that concomitantly targets the release of IL-1 α , IL-1 β and IL-18 is of high clinical interest. The selective cholinergic control by unconventional $\alpha 9^*$ nAChRs with no apparent impact on the nigericin-triggered response has crucial implications for

developing novel anti-inflammatory therapies. The development of $\alpha 9$ -selective ligands could be potentially useful for the cholinergic management of inflammatory diseases including damage-mediated sterile hyperinflammation and inflammatory pain (47, 121–123).

Our study has several limitations. Due to the lack of suitable antibodies, the nAChR subunits were only analyzed on the mRNA level. The metabolic characterization of THP-1 cells and the generated macrophage types was based on metabolite conversion rates of the respective nutrients and metabolic products in the cell culture supernatants. This initial approach provides a valuable overview of the metabolic pathways affected during THP-1 differentiation into macrophages. However, to obtain a more comprehensive understanding of glucose or glutamine metabolism, future studies should employ isotopically labeled glucose and glutamine in conjunction with mass spectrometric measurements. We did not investigate the signaling pathway(s) that links nAChR activation to the inhibition of the ATP-sensitive P2RX7 in macrophages. We previously provided evidence that agonists of unconventional nAChRs containing subunits $\alpha 7$ and $\alpha 9^*$ do not induce ion current changes in monocytic cells, but strongly inhibited the ionotropic function of the ATP-sensitive P2RX7 (27, 28, 32). We further demonstrated that this metabotropic mechanism involves the activation of endothelial NO synthases, which most probably results in the nitrosylation of the P2RX7 (48). These aspects need to be investigated in future studies using techniques such as electrophysiological patch-clamp measurements. In addition, to substantiate our findings on the cholinergic control of the ATP-mediated, NLRP3 inflammasome-dependent release of IL-1 α , IL-1 β and IL-18, other techniques like ASC speck formation assays and immunohistochemistry approaches need to be performed. Moreover, we still do not know the structure of nAChRs containing the subunits $\alpha 7$ and $\alpha 9^*$ subunits in mononuclear phagocytes. The findings provided here that all tested nAChR agonists were sensitive to [V11L;V16D]ArlB and RgIA4 indicate the involvement of an unconventional subset of nAChRs containing subunits $\alpha 7$, $\alpha 9$, and/or $\alpha 10$. Do these subunits form heteromeric pentamers, or homomers and do the subunits form classical pentameric ion channels at all? It is also unclear, if dup $\alpha 7$ can modulate the cholinergic control of the BzATP-induced release of IL-1 β . Obviously more experiments are needed including experiments on monocytes and macrophages from nAChR subunit gene-deficient mice and using the CRISPR-Cas 9 gene editing technique to generate single, double and triple nAChR subunit knockout THP-1 cells. The cholinergic control of the damage-mediated cytokine-release needs to be proven *in vivo*. We are just beginning to understand how cholinergic signaling in general and the role of the $\alpha 9^*$ nAChR subunit in particular impact the immune system. This study could serve as a basis to generate new hypotheses and to design future studies exploring the mysteries of the non-neuronal cholinergic system.

In conclusion, this study provides compelling evidence that the cholinergic anti-inflammatory system, mediated by nAChRs, plays a crucial role in modulating the NLRP3 inflammasome activation and the subsequent release of pro-inflammatory cytokines by

human macrophages. Our findings demonstrate that the nAChR subunits $\alpha 7$, $\alpha 9$, and $\alpha 10$ are expressed by human monocytic THP-1 cells, THP-1 cell-derived macrophages, and primary human peritoneal macrophages. Activation of these nAChRs, particularly those containing the $\alpha 9^*$ subunit, inhibits the ATP-induced, P2RX7-mediated release of IL-1 β , IL-18, and IL-1 α , suggesting a specific cholinergic control over damage-associated cytokine release. Our study contributes to the growing body of evidence supporting the important role of the non-neuronal cholinergic system and $\alpha 9^*$ nAChRs for immune cells. The developed THP-1 cell differentiation protocol, and the use of primary human macrophages allowed us to investigate the cholinergic mechanism in macrophages of different origins. Our results indicate that cholinergic control is active in macrophages and is tailored to dampen damage-associated, but not ATP-independent cytokine release. This selective control has important implications for developing novel therapies against damage-mediated systemic hyperinflammation. Future research should further investigate the potential of the cholinergic control of the release of IL-1 α , IL-1 β and IL-18 by unconventional $\alpha 9^*$ nAChRs for clinical use in preventing sterile inflammation.

Data availability statement

The original contributions presented in the study are included in the article/Supplementary Material. Further inquiries can be directed to the corresponding author.

Ethics statement

The studies involving humans were approved by Ethics Committee at the University of Giessen, Klinikstrasse 33, 35392 Giessen, Germany. The studies were conducted in accordance with the local legislation and institutional requirements. The participants provided their written informed consent to participate in this study.

Author contributions

PMKW: Formal Analysis, Writing – original draft, Data curation, Investigation. DH: Visualization, Conceptualization, Validation, Data curation, Investigation, Software, Writing – original draft. VKS: Conceptualization, Validation, Investigation, Supervision, Funding acquisition, Software, Writing – original draft, Resources, Data curation, Visualization. HLK: Data curation, Visualization, Formal Analysis, Investigation, Validation, Writing – original draft. LJE: Data curation, Writing – original draft, Investigation. LT: Data curation, Investigation, Writing – review & editing. A-LA: Supervision, Writing – review & editing, Conceptualization, Resources, Funding acquisition. AH: Writing – review & editing, Conceptualization, Resources, Funding acquisition. FH-S: Resources, Conceptualization, Writing – review

& editing. MR: Writing – review & editing, Conceptualization, Funding acquisition, Resources. UAN: Writing – review & editing, Supervision, Funding acquisition. KB: Data curation, Validation, Investigation, Writing – review & editing, Supervision. JMM: Resources, Supervision, Writing – review & editing. JL: Funding acquisition, Resources, Supervision, Conceptualization, Writing – review & editing. SM: Writing – original draft, Resources, Formal Analysis, Conceptualization, Validation, Supervision, Data curation. VG: Writing – review & editing, Resources, Funding acquisition, Conceptualization. KR: Formal Analysis, Visualization, Resources, Data curation, Validation, Project administration, Software, Supervision, Methodology, Writing – review & editing, Funding acquisition, Investigation, Writing – original draft, Conceptualization.

Funding

The author(s) declare financial support was received for the research and/or publication of this article. KR was funded by the Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG, German Research Foundation, Project-ID 515250365 and Project-ID 528562393-FIP 26). VKS and MR were supported by the Forschungshilfe Peiper and Elternverein für leukämie- und krebskranke Kinder Giessen. JMM is supported by a USA National Institutes of Health grant R35 GM136430. LT and UAN were funded by the Hessian research promotion program LOEWE (research cluster FLOW FOR LIFE). This work is based upon work from PRESTO COST (European Cooperation in Science and Technology) Action CA21130 (www.p2xcost.eu).

Acknowledgments

We are grateful to Gabriele Fuchs-Moll, Sabine Stumpf, Kathrin Petri, Simone Schwalm, Bianca Kulik and Sandra Rühl (University of Giessen, Giessen, Germany) for excellent technical support. During the preparation of this work the authors used Microsoft Copilot (<https://copilot.microsoft.com/>) in the writing process to improve the readability and language of the manuscript. After using this tool/service, the author(s) reviewed and edited the content as needed and take full responsibility for the content of the published article.

References

1. Vladimer GI, Marty-Roix R, Ghosh S, Weng D, Lien E. Inflammasomes and host defenses against bacterial infections. *Curr Opin Microbiol.* (2013) 16:23–31. doi: 10.1016/j.mib.2012.11.008
2. Dinarello CA. Interleukin-1. *Dig Dis Sci.* (1988) 33:255–355. doi: 10.1007/BF01538128
3. Gabay C, Kushner I. Acute phase proteins and other systemic responses to inflammation. *N Engl J Med.* (1999) 340:448–54. doi: 10.1056/NEJM199902113400607
4. Dinarello CA. Overview of the IL-1 family in innate inflammation and acquired immunity. *Immunol Rev.* (2018) 281:8–27. doi: 10.1111/imr.12621
5. Gross O, Thomas CJ, Guarda G, Tschopp J. The inflammasome: an integrated view. *Immunol Rev.* (2011) 243:136–51. doi: 10.1111/j.1600-065X.2011.01046.x
6. Piccoli P, Rubartelli A. The secretion of IL-1 β and options for release. *Semin Immunol.* (2013) 25:425–9. doi: 10.1016/j.smim.2013.10.007
7. Bauernfeind F, Ablasser A, Bartok E, Kim S, Schmid-Burgk I, Caviar T, et al. Inflammasomes: current understanding and open questions. *Cell Mol Life Sci.* (2011) 68:765–83. doi: 10.1007/s00018-010-0567-4
8. Broz P, Dixit VM. Inflammasomes: mechanism of assembly, regulation and signalling. *Nat Rev Immunol.* (2016) 16:407–20. doi: 10.1038/nri.2016.58

Conflict of interest

Certain conotoxins, including RgIA4 have been patented by the University of Utah; JM is an inventor on these patents.

The remaining authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

The author(s) declared that they were an editorial board member of Frontiers, at the time of submission. This had no impact on the peer review process and the final decision.

Generative AI statement

The author(s) declare that Generative AI was used in the creation of this manuscript. During the preparation of this work the authors used Microsoft Copilot (<https://copilot.microsoft.com/>) in the writing process to improve the readability and language of the manuscript. After using this tool/service, the author(s) reviewed and edited the content as needed and take full responsibility for the content of the published article.

Any alternative text (alt text) provided alongside figures in this article has been generated by Frontiers with the support of artificial intelligence and reasonable efforts have been made to ensure accuracy, including review by the authors wherever possible. If you identify any issues, please contact us.

Publisher's note

All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

Supplementary material

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2025.1661114/full#supplementary-material>

9. Santana PT, Martel J, Lai H-C, Perfettini J-L, Kanellopoulos JM, Young JD, et al. Is the inflammasome relevant for epithelial cell function? *Microbes Infect.* (2016) 18:93–101. doi: 10.1016/j.micinf.2015.10.007
10. Bortolotti P, Faure E, Kipnis E. Inflammasomes in tissue damages and immune disorders after trauma. *Front Immunol.* (2018) 9:1900. doi: 10.3389/fimmu.2018.01900
11. Westphal M, Kampmeier T. The race against the "septic shark. *Crit Care.* (2015) 19 Suppl 3:S11. doi: 10.1186/cc14729
12. Mantovani A, Dinarello CA, Molgora M, Garlanda C. Interleukin-1 and related cytokines in the regulation of inflammation and immunity. *Immunity.* (2019) 50:778–95. doi: 10.1016/j.immuni.2019.03.012
13. Blevins HM, Xu Y, Biby S, Zhang S. The NLRP3 inflammasome pathway: A review of mechanisms and inhibitors for the treatment of inflammatory diseases. *Front Aging Neurosci.* (2022) 14:879021. doi: 10.3389/fnagi.2022.879021
14. Marchetti C, Swartzwelter B, Gamboni F, Neff CP, Richter K, Azam T, et al. OLT1177, a β -sulfonyl nitrile compound, safe in humans, inhibits the NLRP3 inflammasome and reverses the metabolic cost of inflammation. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* (2018) 115:E1530–9. doi: 10.1073/pnas.1716095115
15. Romano M, Arici ZS, Piskin D, Alehashemi S, Aletaha D, Barron KS, et al. The 2021 EULAR/American College of Rheumatology points to consider for diagnosis, management and monitoring of the interleukin-1 mediated autoinflammatory diseases: cryopyrin-associated periodic syndromes, tumour necrosis factor receptor-associated periodic syndrome, mevalonate kinase deficiency, and deficiency of the interleukin-1 receptor antagonist. *Ann Rheum Dis.* (2022) 81:907–21. doi: 10.1136/annrheumdis-2021-221801
16. López-Castejón G, Pelegrin P. Current status of inflammasome blockers as anti-inflammatory drugs. *Expert Opin Investig Drugs.* (2012) 21:995–1007. doi: 10.1517/13543784.2012.690032
17. Borovikova LV, Ivanova S, Zhang M, Yang H, Botchkina GI, Watkins LR, et al. Vagus nerve stimulation attenuates the systemic inflammatory response to endotoxin. *Nature.* (2000) 405:458–62. doi: 10.1038/35013070
18. Hoover DB. Cholinergic modulation of the immune system presents new approaches for treating inflammation. *Pharmacol Ther.* (2017) 179:1–16. doi: 10.1016/j.pharmthera.2017.05.002
19. Hone AJ, McIntosh JM. Nicotinic acetylcholine receptors: Therapeutic targets for novel ligands to treat pain and inflammation. *Pharmacol Res.* (2023) 190:106715. doi: 10.1016/j.phrs.2023.106715
20. Wessler I, Kirkpatrick CJ. Acetylcholine beyond neurons: the non-neuronal cholinergic system in humans. *Br J Pharmacol.* (2008) 154:1558–71. doi: 10.1038/bjp.2008.185
21. Olofsson PS, Rosas-Ballina M, Levine YA, Tracey KJ. Rethinking inflammation: neural circuits in the regulation of immunity. *Immunol Rev.* (2012) 248:188–204. doi: 10.1111/j.1600-065X.2012.01138.x
22. St-Pierre S, Jiang W, Roy P, Champigny C, LeBlanc É, Morley BJ, et al. Nicotinic acetylcholine receptors modulate bone marrow-derived pro-inflammatory monocyte production and survival. *PLoS One.* (2016) 11:e0150230. doi: 10.1371/journal.pone.0150230
23. Liu Q, Whiteaker P, Morley BJ, Shi F-D, Lukas RJ. Distinctive roles for $\alpha 7^{+}$ - and $\alpha 9^{+}$ -nicotinic acetylcholine receptors in inflammatory and autoimmune responses in the murine experimental autoimmune encephalomyelitis model of multiple sclerosis. *Front Cell Neurosci.* (2017) 11:287. doi: 10.3389/fncel.2017.00287
24. Fujii T, Mashimo M, Moriwaki Y, Misawa H, Ono S, Horiguchi K, et al. Expression and function of the cholinergic system in immune cells. *Front Immunol.* (2017) 8:1085. doi: 10.3389/fimmu.2017.01085
25. Fujii T, Mashimo M, Moriwaki Y, Misawa H, Ono S, Horiguchi K, et al. Physiological functions of the cholinergic system in immune cells. *J Pharmacol Sci.* (2017) 134:1–21. doi: 10.1016/j.jphs.2017.05.002
26. AlSharari SD, Toma W, Mahmood HM, Michael McIntosh J, Imad Damaj M. The $\alpha 9\alpha 10$ nicotinic acetylcholine receptors antagonist α -conotoxin RgIA reverses colitis signs in murine dextran sodium sulfate model. *Eur J Pharmacol.* (2020) 883:173320. doi: 10.1016/j.ejphar.2020.173320
27. Hecker A, Küllmar M, Wilker S, Richter K, Zakrzewicz A, Atanasova S, et al. Phosphocholine-modified macromolecules and canonical nicotinic agonists inhibit ATP-induced IL-1 β release. *J Immunol.* (2015) 195:2325–34. doi: 10.4049/jimmunol.1400974
28. Richter K, Mathes V, Fronius M, Althaus M, Hecker A, Krasteva-Christ G, et al. Phosphocholine - an agonist of metabotropic but not of ionotropic functions of $\alpha 9$ -containing nicotinic acetylcholine receptors. *Sci Rep.* (2016) 6:28660. doi: 10.1038/srep28660
29. Zakrzewicz A, Richter K, Agn  , Wilker S, Siebers K, Fink B, et al. Canonical and novel non-canonical cholinergic agonists inhibit ATP-induced release of monocyte interleukin-1 β via different combinations of nicotinic acetylcholine receptor subunits $\alpha 7$, $\alpha 9$ and $\alpha 10$. *Front Cell Neurosci.* (2017) 11:189. doi: 10.3389/fncel.2017.00189
30. Richter K, Grau V. Signaling of nicotinic acetylcholine receptors in mononuclear phagocytes. *Pharmacol Res.* (2023) 191:106727. doi: 10.1016/j.phrs.2023.106727
31. Backhaus S, Zakrzewicz A, Richter K, Damm J, Wilker S, Fuchs-Moll G, et al. Surfactant inhibits ATP-induced release of interleukin-1 β via nicotinic acetylcholine receptors. *J Lipid Res.* (2017) 58:1055–66. doi: 10.1194/jlr.m071506
32. Richter K, Sagawe S, Hecker A, Küllmar M, Askevold I, Damm J, et al. C-reactive protein stimulates nicotinic acetylcholine receptors to control ATP-mediated monocyte inflammasome activation. *Front Immunol.* (2018) 9:1604. doi: 10.3389/fimmu.2018.01604
33. Siebers K, Fink B, Zakrzewicz A, Agn  , Richter K, Konzok S, et al. Alpha-1 antitrypsin inhibits ATP-mediated release of interleukin-1 β via CD36 and nicotinic acetylcholine receptors. *Front Immunol.* (2018) 9:877. doi: 10.3389/fimmu.2018.00877
34. Zakrzewicz A, Richter K, Zakrzewicz D, Siebers K, Damm J, Agn  , et al. SLPI inhibits ATP-mediated maturation of IL-1 β in human monocyte leukocytes: a novel function of an old player. *Front Immunol.* (2019) 10:664. doi: 10.3389/fimmu.2019.00664
35. Richter K, Amati A-L, Padberg W, Grau V. Negative regulation of ATP-induced inflammasome activation and cytokine secretion by acute-phase proteins: A mini review. *Front Pharmacol.* (2022) 13:981276. doi: 10.3389/fphar.2022.981276
36. Grau V, Richter K, Hone AJ, McIntosh JM. Conopeptides V11L:V16D:Ar1B and RgIA4: powerful tools for the identification of novel nicotinic acetylcholine receptors in monocytes. *Front Pharmacol.* (2018) 9:1499. doi: 10.3389/fphar.2018.01499
37. Papke RL, Horenstein NA. Therapeutic targeting of $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptors. *Pharmacol Rev.* (2021) 73:1118–49. doi: 10.1124/pharmrev.120.00097
38. Herber DL, Severance EG, Cuevas J, Morgan D, Gordon MN. Biochemical and histochemical evidence of nonspecific binding of alpha7nAChR antibodies to mouse brain tissue. *J Histochem Cytochem.* (2004) 52:1367–76. doi: 10.1111/j.0022-1554.040405201013
39. Moser N, Mechawar N, Jones I, Gochberg-Sarver A, Orr-Urtreger A, Plomann M, et al. Evaluating the suitability of nicotinic acetylcholine receptor antibodies for standard immunodetection procedures. *J Neurochem.* (2007) 102:479–92. doi: 10.1111/j.1471-4159.2007.04498.x
40. Whiteaker P, Marks MJ, Christensen S, Dowell C, Collins AC, McIntosh JM. Synthesis and characterization of 125I-alpha-conotoxin Ar1BV11L:V16A, a selective alpha7 nicotinic acetylcholine receptor antagonist. *J Pharmacol Exp Ther.* (2008) 325:910–9. doi: 10.1124/jpet.108.136895
41. Hone AJ, Whiteaker P, Christensen S, Xiao Y, Meyer EL, McIntosh JM. A novel fluorescent alpha-conotoxin for the study of alpha7 nicotinic acetylcholine receptors. *J Neurochem.* (2009) 111:80–9. doi: 10.1111/j.1471-4159.2009.06299.x
42. Hone AJ, Whiteaker P, Mohn JL, Jacob MH, McIntosh JM. Alexa fluor 546-Ar1BV11L:V16A is a potent ligand for selectively labeling alpha 7 nicotinic acetylcholine receptors. *J Neurochem.* (2010) 114:994–1006. doi: 10.1111/j.1471-4159.2010.06819.x
43. Christensen SB, Hone AJ, Roux I, Kniazeff J, Pin J-P, Upret G, et al. RgIA4 potently blocks mouse $\alpha 9\alpha 10$ nAChRs and provides long lasting protection against oxaliplatin-induced cold allodynia. *Front Cell Neurosci.* (2017) 11:219. doi: 10.3389/fncel.2017.00219
44. Romero HK, Christensen SB, Di Cesare Mannelli L, Gajewiak J, Ramachandra R, Elmslie KS, et al. Inhibition of $\alpha 9\alpha 10$ nicotinic acetylcholine receptors prevents chemotherapy-induced neuropathic pain. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* (2017) 114:E1825–32. doi: 10.1073/pnas.1621433114
45. Innocent N, Livingstone PD, Hone A, Kimura A, Young T, Whiteaker P, et al. Alpha-conotoxin Arenatus IB[V11L:V16D] corrected is a potent and selective antagonist at rat and human native alpha7 nicotinic acetylcholine receptors. *J Pharmacol Exp Ther.* (2008) 327:529–37. doi: 10.1124/jpet.108.142943
46. Richter K, Papke RL, Stokes C, Roy DC, Espinosa ES, Wolf PM, et al. Comparison of the anti-inflammatory properties of two nicotinic acetylcholine receptor ligands, phosphocholine and pCF3-diEPP. *Front Cell Neurosci.* (2022) 16:779081. doi: 10.3389/fncel.2022.779081
47. Richter K, Herz SM, Stokes C, Damaj MI, Grau V, Papke RL. Pharmacological profiles and anti-inflammatory activity of pCN-diEPP and mCN-diEPP, new alpha9alpha10 nicotinic receptor ligands. *Neuropharmacology.* (2023) 240:109717. doi: 10.1016/j.neuropharm.2023.109717
48. Richter K, Asci N, Singh VK, Yakoob SH, Meixner M, Zakrzewicz A, et al. Activation of endothelial NO synthase and P2X7 receptor modification mediates the cholinergic control of ATP-induced interleukin-1 β release by mononuclear phagocytes. *Front Immunol.* (2023) 14:1140592. doi: 10.3389/fimmu.2023.1140592
49. Michel AD, Xing M, Humphrey PP. Serum constituents can affect 2'- & 3'-O-(4-benzoylbenzoyl)-ATP potency at P2X(7) receptors. *Br J Pharmacol.* (2001) 132:1501–8. doi: 10.1038/sj.bjp.0703968
50. Oken AC, Lisi NE, Krishnamurthy I, McCarthy AE, Godsey MH, Glasfeld A, et al. High-affinity agonism at the P2X7 receptor is mediated by three residues outside the orthosteric pocket. *Nat Commun.* (2024) 15:6662. doi: 10.1038/s41467-024-50771-6
51. Graven SN, Estrada-O S, Lardy HA. Alkali metal cation release and respiratory inhibition induced by Nigericin in rat liver mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* (1966) 56:654–8. doi: 10.1073/pnas.56.2.654
52. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(Delta Delta C(T)) Method. *Methods.* (2001) 25:402–8. doi: 10.1006/meth.2001.1262
53. Andersen CL, Jensen JL, Ørntoft TF. Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. *Cancer Res.* (2004) 64:5245–50. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-04-0496

54. Ren G, Juhl M, Peng Q, Fink T, Porsborg SR. Selection and validation of reference genes for qPCR analysis of differentiation and maturation of THP-1 cells into M1 macrophage-like cells. *Immunol Cell Biol.* (2022) 100:822–9. doi: 10.1111/imcb.12590
55. Cao X, Luo X, Liang J, Zhang C, Meng X, Guo D. Critical selection of internal control genes for quantitative real-time RT-PCR studies in lipopolysaccharide-stimulated human THP-1 and K562 cells. *Biochem Biophys Res Commun.* (2012) 427:366–72. doi: 10.1016/j.bbrc.2012.09.066
56. Radke L, Giese C, Lubitz A, Hinderlich S, Sandig G, Hummel M, et al. Reference gene stability in peripheral blood mononuclear cells determined by qPCR and NanoString. *Microchim Acta.* (2014) 181:1733–42. doi: 10.1007/s00604-014-1221-x
57. Diehl D, Friedmann A, Bachmann HS. Evidence-based selection of reference genes for RT-qPCR assays in periodontal research. *Clin Exp Dent Res.* (2022) 8:473–84. doi: 10.1002/cre2.525
58. Di Paola FJ, Cardoso LH, Nikitopoulou E, Kulik B, Rühl S, Eva A, et al. Impact of mtG3PDH inhibitors on proliferation and metabolism of androgen receptor-negative prostate cancer cells: Role of extracellular pyruvate. *PLoS One.* (2025) 20:e0325509. doi: 10.1371/journal.pone.0325509
59. Lund ME, To J, O'Brien BA, Donnelly S. The choice of phorbol 12-myristate 13-acetate differentiation protocol influences the response of THP-1 macrophages to a pro-inflammatory stimulus. *J Immunol Methods.* (2016) 430:64–70. doi: 10.1016/j.jim.2016.01.012
60. Mohd Yasin ZN, Mohd Idrus FN, Hoe CH, Yvonne-Tee GB. Macrophage polarization in THP-1 cell line and primary monocytes: A systematic review. *Differentiation.* (2022) 128:67–82. doi: 10.1016/j.diff.2022.10.001
61. Baxter EW, Graham AE, Re NA, Carr IM, Robinson JL, Mackie SL, et al. Standardized protocols for differentiation of THP-1 cells to macrophages with distinct M(IFN γ -LPS), M(IL-4) and M(IL-10) phenotypes. *J Immunol Methods.* (2020) 478:112721. doi: 10.1016/j.jim.2019.112721
62. Pinto SM, Kim H, Subbannaya Y, Giambelluca MS, Bösl K, Ryan L, et al. Comparative proteomic analysis reveals varying impact on immune responses in phorbol 12-myristate 13-acetate-mediated THP-1 monocyte-to-macrophage differentiation. *Front Immunol.* (2021) 12:679458. doi: 10.3389/fimmu.2021.679458
63. Chanput W, Mes JJ, Wichers HJ. THP-1 cell line: an *in vitro* cell model for immune modulation approach. *Int Immunopharmacol.* (2014) 23:37–45. doi: 10.1016/j.intimp.2014.08.002
64. Malavasi F, Deaglio S, Funaro A, Ferrero E, Horenstein AL, Ortolan E, et al. Evolution and function of the ADP ribosyl cyclase/CD38 gene family in physiology and pathology. *Physiol Rev.* (2008) 88:841–86. doi: 10.1152/physrev.00035.2007
65. Amici SA, Young NA, Narvaez-Miranda J, Jablonski KA, Arcos J, Rosas L, et al. CD38 is robustly induced in human macrophages and monocytes in inflammatory conditions. *Front Immunol.* (2018) 9:1593. doi: 10.3389/fimmu.2018.01593
66. Cao W, Lee SH, Lu J. CD83 is performed inside monocytes, macrophages and dendritic cells, but it is only stably expressed on activated dendritic cells. *Biochem J.* (2005) 385:85–93. doi: 10.1042/BJ20040741
67. Hölsen JM, Teusch N. The monocyte cell line THP-1 as a validated and robust surrogate model for human dendritic cells. *Int J Mol Sci.* (2023) 24(2):1452. doi: 10.3390/jms24021452
68. Paine A, Kirchner H, Immenschuh S, Oelke M, Blasczyk R, Eiz-Vesper B. IL-2 upregulates CD86 expression on human CD4(+) and CD8(+) T cells. *J Immunol.* (2012) 188:1620–9. doi: 10.1004/jimmunol.1100181
69. Soskic B, Jeffery LE, Kennedy A, Gardner DH, Hou TZ, Halliday N, et al. CD80 on human T cells is associated with FoxP3 expression and supports Treg homeostasis. *Front Immunol.* (2020) 11:577655. doi: 10.3389/fimmu.2020.577655
70. Komohara Y, Hirahara J, Horikawa T, Kawamura K, Kiyota E, Sakashita N, et al. AM-3K, an anti-macrophage antibody, recognizes CD163, a molecule associated with an anti-inflammatory macrophage phenotype. *J Histochem Cytochem.* (2006) 54:763–71. doi: 10.1369/jbc.5A6871.2006
71. Wang S, Wang J, Chen Z, Luo J, Guo W, Sun L, et al. Targeting M2-like tumor-associated macrophages is a potential therapeutic approach to overcome antitumor drug resistance. *NPJ Precis Oncol.* (2024) 8:31. doi: 10.1038/s41698-024-00522-z
72. Robinson MJ, Sancho D, Slack EC, LeibundGut-Landmann S, Reis e Sousa C. Myeloid C-type lectins in innate immunity. *Nat Immunol.* (2006) 7:1258–65. doi: 10.1038/nri1417
73. Bühlhng F, Ittenson A, Kaiser D, Thörlert G, Hoffmann B, Reinhold D, et al. MRP8/MRP14, CD11b and HLA-DR expression of alveolar macrophages in pneumonia. *Immunol Lett.* (2000) 71:185–90. doi: 10.1016/S0165-2478(00)00164-4
74. North RA. Molecular physiology of P2X receptors. *Physiol Rev.* (2002) 82:1013–67. doi: 10.1152/physrev.00015.2002
75. Bodnar AL, Cortes-Burgos LA, Cook KK, Dinh DM, Groppi VE, Hajos M, et al. Discovery and structure-activity relationship of quinuclidine benzamides as agonists of alpha7 nicotinic acetylcholine receptors. *J Med Chem.* (2005) 48:905–8. doi: 10.1021/jm049363q
76. Hajos M, Hurst RS, Hoffmann WE, Krause M, Wall TM, Higdon NR, et al. The selective alpha7 nicotinic acetylcholine receptor agonist PNU-282987 N-(3R)-1-Azabicyclo[2.2.2]oct-3-yl-4-chlorobenzenesulfonamide hydrochloride enhances GABAergic synaptic activity in brain slices and restores auditory gating deficits in anesthetized rats. *J Pharmacol Exp Ther.* (2005) 312:1213–22. doi: 10.1124/jpet.104.076968
77. Richter K, Koch C, Perniss A, Wolf PM, Schweda EK, Wichmann S, et al. Phosphocholine-modified lipopolysaccharides of *Haemophilus influenzae* inhibit ATP-induced IL-1 β release by pulmonary epithelial cells. *Molecules.* (2018) 23(8):1979. doi: 10.3390/molecules23081979
78. Zoli M, Pucci S, Vilella A, Gotti C. Neuronal and extraneuronal nicotinic acetylcholine receptors. *Curr Neuropharmacol.* (2018) 16:338–49. doi: 10.2174/1570159X15666170912110450
79. Kawashima K, Fujii T. Extraneuronal cholinergic system in lymphocytes. *Pharmacol Ther.* (2000) 86:29–48. doi: 10.1016/S0163-7258(99)00071-6
80. Kawashima K, Fujii T. Expression of non-neuronal acetylcholine in lymphocytes and its contribution to the regulation of immune function. *Front Biosci.* (2004) 9:2063–85. doi: 10.2741/1390
81. Mashimo M, Kawashima K, Fujii T. Non-neuronal cholinergic muscarinic acetylcholine receptors in the regulation of immune function. *Biol Pharm Bull.* (2022) 45:675–83. doi: 10.1248/bpb.b21-01005
82. Benfante R, Antonini RA, de PM, Gotti C, Clementi F, Locati M, et al. Expression of the $\alpha 7$ nAChR subunit duplicate form (CHRFAM7A) is down-regulated in the monocyte cell line THP-1 on treatment with LPS. *J Neuroimmunol.* (2011) 230:74–84. doi: 10.1016/j.jneuroim.2010.09.008
83. Wang H, Yu M, Ochani M, Amella CA, Tanovic M, Susarla S, et al. Nicotinic acetylcholine receptor alpha7 subunit is an essential regulator of inflammation. *Nature.* (2003) 421:384–8. doi: 10.1038/nature01339
84. Gault J, Robinson M, Berger R, Drebing C, Logel J, Hopkins J, et al. Genomic organization and partial duplication of the human alpha7 neuronal nicotinic acetylcholine receptor gene (CHRNA7). *Genomics.* (1998) 52:173–85. doi: 10.1006/geno.1998.5363
85. de Lucas-Cerrillo AM, Maldifassi MC, Arnalich F, Renart J, Atienza G, Serantes R, et al. Function of partially duplicated human $\alpha 7$ nicotinic receptor subunit CHRFAM7A gene: potential implications for the cholinergic anti-inflammatory response. *J Biol Chem.* (2011) 286:594–606. doi: 10.1074/jbc.M110.180067
86. Szigeti K, Ihnatovych I, Notari E, Dorn RP, Maly I, He M, et al. CHRFAM7A diversifies human immune adaption through Ca $^{2+}$ signalling and actin cytoskeleton reorganization. *EBioMedicine.* (2024) 103:105093. doi: 10.1016/j.ebiom.2024.105093
87. Taske NL, Williamson MP, Makoff A, Bate L, Curtis D, Kerr M, et al. Evaluation of the positional candidate gene CHRNA7 at the juvenile myoclonic epilepsy locus (EJM2) on chromosome 15q13-14. *Epilepsy Res.* (2002) 49:157–72. doi: 10.1016/S0920-1211(02)00027-X
88. Stefansson H, Rujescu D, Cichon S, Pietiläinen OP, Ingason A, Steinberg S, et al. Large recurrent microdeletions associated with schizophrenia. *Nature.* (2008) 455:232–6. doi: 10.1038/nature07229
89. Bacchelli E, Battaglia A, Cameli C, Lomartire S, Tancredi R, Thomson S, et al. Analysis of CHRNA7 rare variants in autism spectrum disorder susceptibility. *Am J Med Genet A.* (2015) 167A:715–23. doi: 10.1002/ajmg.a.36847
90. Maldifassi MC, Martín-Sánchez C, Atienza G, Cedillo JL, Arnalich F, Bordas A, et al. Interaction of the $\alpha 7$ -nicotinic subunit with its human-specific duplicated dup $\alpha 7$ isoform in mammalian cells: Relevance in human inflammatory responses. *J Biol Chem.* (2018) 293:13874–88. doi: 10.1074/jbc.RA118.003443
91. Maroli A, Di Lascio S, Drufula L, Cardani S, Setten E, Locati M, et al. Effect of donepezil on the expression and responsiveness to LPS of CHRNA7 and CHRFAM7A in macrophages: A possible link to the cholinergic anti-inflammatory pathway. *J Neuroimmunol.* (2019) 332:155–66. doi: 10.1016/j.jneuroim.2019.04.012
92. Di Lascio S, Fornasari D, Benfante R. The human-restricted isoform of the $\alpha 7$ nAChR, CHRFAM7A: a double-edged sword in neurological and inflammatory disorders. *Int J Mol Sci.* (2022) 23(7):3463. doi: 10.3390/jms23073463
93. Locati M, Curtale G, Mantovani A. Diversity, mechanisms, and significance of macrophage plasticity. *Annu Rev Pathol.* (2020) 15:123–47. doi: 10.1146/annurev-pathmechdis-012418-012718
94. Xue J-D, Gao J, Tang A-F, Feng C. Shaping the immune landscape: Multidimensional environmental stimuli refine macrophage polarization and foster revolutionary approaches in tissue regeneration. *Heliyon.* (2024) 10:e37192. doi: 10.1016/j.heliyon.2024.e37192
95. Auwerx J. The human leukemia cell line, THP-1: a multifaceted model for the study of monocyte-macrophage differentiation. *Experientia.* (1991) 47:22–31. doi: 10.1007/BF02041244
96. Starr T, Bauler TJ, Malik-Kale P, Steele-Mortimer O. The phorbol 12-myristate-13-acetate differentiation protocol is critical to the interaction of THP-1 macrophages with *Salmonella Typhimurium*. *PLoS One.* (2018) 13:e0193601. doi: 10.1371/journal.pone.0193601
97. Daigneault M, Preston JA, Marriott HM, Whyte MK, Dockrell DH. The identification of markers of macrophage differentiation in PMA-stimulated THP-1 cells and monocyte-derived macrophages. *PLoS One.* (2010) 5:e8668. doi: 10.1371/journal.pone.0008668
98. Abuawad A, Mbadugha C, Ghaemmaghami AM, Kim D-H. Metabolic characterisation of THP-1 macrophage polarisation using LC-MS-based metabolite profiling. *Metabolomics.* (2020) 16:33. doi: 10.1007/s11306-020-01656-4
99. Phuangbupha P, Thara S, Sriboonaid P, Saetan P, Tumnoi W, Charoenpanich A. Optimizing THP-1 macrophage culture for an immune-responsive human intestinal model. *Cells.* (2023) 12(10):1427. doi: 10.3390/cells12101427

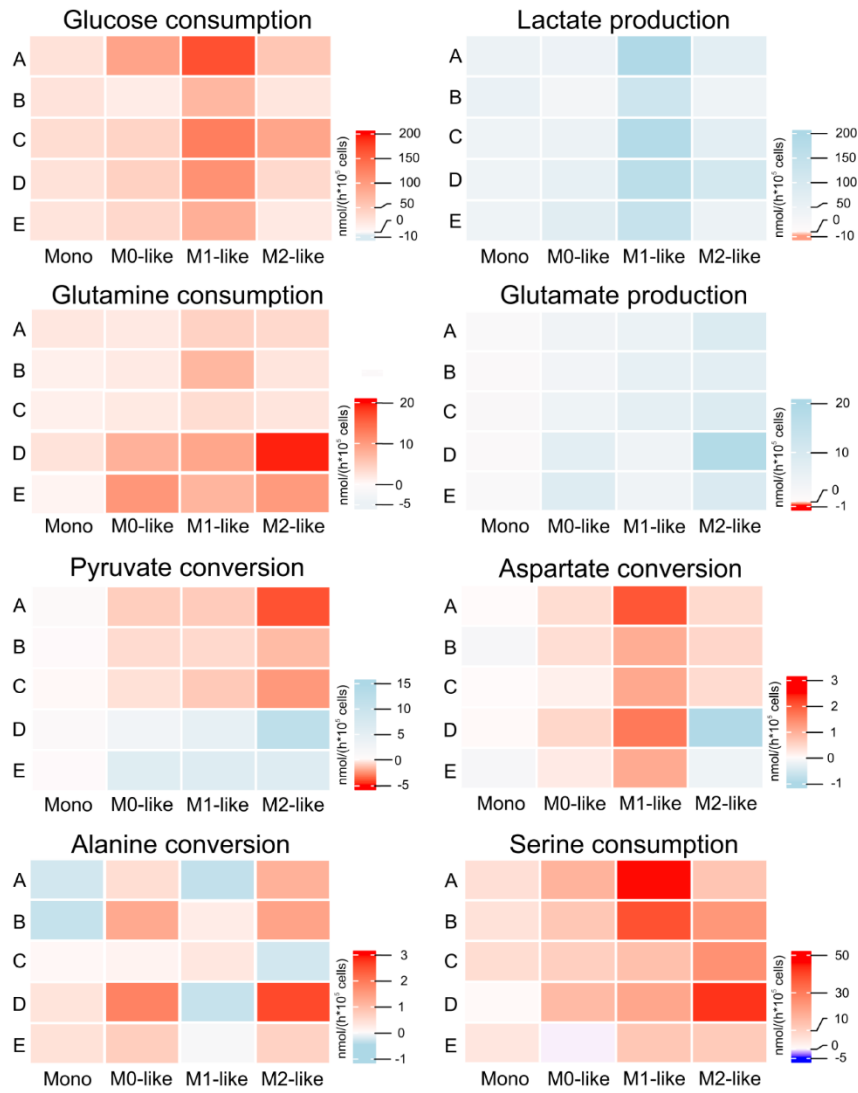
100. Lurier FB, Dalton D, Dantprier W, Raman P, Nassiri S, Ferraro NM, et al. Transcriptome analysis of IL-10 stimulated (M2c) macrophages by next generation sequencing. *Immunobiology*. (2017) 222:847–56. doi: 10.1016/j.imbio.2017.02.006
101. Viola A, Munari F, Sánchez-Rodríguez R, Scolari T, Castegna A. The metabolic signature of macrophage responses. *Front Immunol*. (2019) 10:1462. doi: 10.3389/fimmu.2019.01462
102. Rodriguez AE, Ducker GS, Billingham LK, Martinez CA, Mainolfi N, Suri V, et al. Serine metabolism supports macrophage IL-1 β production. *Cell Metab*. (2019) 29:1003–1011.e4. doi: 10.1016/j.cmet.2019.01.014
103. Liu Y, Xu R, Gu H, Zhang E, Qu J, Cao W, et al. Metabolic reprogramming in macrophage responses. *Biomark Res*. (2021) 9:1. doi: 10.1186/s40364-020-00251-y
104. Mazurek S, Zwerschke W, Jansen-Dürr P, Eigenbrodt E. Effects of the human papilloma virus HPV 16 E7 oncoprotein on glycolysis and glutaminolysis: role of pyruvate kinase type M2 and the glycolytic enzyme complex. *Biochem J*. (2001) 356:247–56. doi: 10.1042/0264-6021:3560247
105. Eischen A, Duclos B, Schmitt-Goguel M, Rouyer N, Bergerat JP, Hummel M, et al. Human resident peritoneal macrophages: phenotype and biology. *Br J Haematol*. (1994) 88:712–22. doi: 10.1111/j.1365-2141.1994.tb05109.x
106. Ruiz Alcaraz AJ, Tapia Abellán A, Fernández-Fernández MD, Tristán Manzano M, Hernández-Caselles T, Sánchez-Velasco E, et al. A novel CD14(high) CD16(high) subset of peritoneal macrophages from cirrhotic patients is associated to an increased response to LPS. *Mol Immunol*. (2016) 72:28–36. doi: 10.1016/j.molimm.2016.02.012
107. Ruiz-Alcaraz AJ, Carmona-Martínez V, Tristán-Manzano M, MaChado-Linde F, Sánchez-Ferrer ML, García-Peñarrubia P, et al. Characterization of human peritoneal monocyte/macrophage subsets in homeostasis: Phenotype, GATA6, phagocytic/oxidative activities and cytokines expression. *Sci Rep*. (2018) 8:12794. doi: 10.1038/s41598-018-30787-x
108. Shapouri Moghaddam A, Mohammadian S, Vazini H, Taghadosi M, Esmaili S-A, Mardani F, et al. Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease. *J Cell Physiol*. (2018) 233:6425–40. doi: 10.1002/jcp.26429
109. Garg BK, Loring RH. Evaluating commercially available antibodies for rat $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptors. *J Histochem Cytochem*. (2017) 65:499–512. doi: 10.1369/0022155417725304
110. Margiotta F, Micheli L, Ciampi C, Ghelardini C, McIntosh JM, Di Cesare Mannelli L. Conus regius-derived conotoxins: novel therapeutic opportunities from a marine organism. *Mar Drugs*. (2022) 20(12):773. doi: 10.3390/md20120773
111. Papke RL, Karaffa M, Horenstein NA, Stokes C. Coffee and cigarettes: Modulation of high and low sensitivity $\alpha 4\beta 2$ nicotinic acetylcholine receptors by n-MP, a biomarker of coffee consumption. *Neuropharmacology*. (2022) 216:109173. doi: 10.1016/j.neuropharm.2022.109173
112. Sharif M, Quik M, Holgate J, Morgan M, Patkar OL, Tam V, et al. Neuronal nicotinic acetylcholine receptor modulators reduce sugar intake. *PLoS One*. (2016) 11: e0150270. doi: 10.1371/journal.pone.0150270
113. Souza AC, Souza CM, Amaral CL, Lemes SF, Santucci LF, Milanski M, et al. Short-term high-fat diet consumption reduces hypothalamic expression of the nicotinic acetylcholine receptor $\alpha 7$ subunit ($\alpha 7$ nAChR) and affects the anti-inflammatory response in a mouse model of sepsis. *Front Immunol*. (2019) 10:565. doi: 10.3389/fimmu.2019.00565
114. Costa SO, Souza CM, Lanza PG, Sartori JO, Ignacio-Souza LM, Candreva T, et al. Maternal high fat diet consumption reduces liver $\alpha 7$ nicotinic cholinergic receptor expression and impairs insulin signalling in the offspring. *Sci Rep*. (2020) 10:48. doi: 10.1038/s41598-019-56880-3
115. van Parys A, Karlsson T, Vinkes KJ, Olsen T, Øyen J, Dierkes J, et al. Food sources contributing to intake of choline and individual choline forms in a Norwegian cohort of patients with stable angina pectoris. *Front Nutr*. (2021) 8:676026. doi: 10.3389/fnut.2021.676026
116. Tracey KJ. Reflex control of immunity. *Nat Rev Immunol*. (2009) 9:418–28. doi: 10.1038/nri2566
117. Cavalli G, Colafrancesco S, Emmi G, Imazio M, Lopako G, Maggio MC, et al. Interleukin 1 α : a comprehensive review on the role of IL-1 α in the pathogenesis and treatment of autoimmune and inflammatory diseases. *Autoimmun Rev*. (2021) 20:102763. doi: 10.1016/j.autrev.2021.102763
118. Gross O, Yazdi AS, Thomas CJ, Masin M, Heinz LX, Gnarda G, et al. Inflammasome activators induce interleukin-1 α secretion via distinct pathways with differential requirement for the protease function of caspase-1. *Immunity*. (2012) 36:388–400. doi: 10.1016/j.immuni.2012.01.018
119. Yazdi AS, Drexler SK. Regulation of interleukin 1 α secretion by inflammasomes. *Ann Rheum Dis*. (2013) 72 Suppl 2:i196–9. doi: 10.1136/annrheumdis-2012-202252
120. Dinarello CA, Kaplanski G. Indeed, IL-18 is more than an inducer of IFN- γ . *J Leukoc Biol*. (2018) 104:237–8. doi: 10.1002/JLB.CE0118-025RR
121. Papke RL, Andleeb H, Stokes C, Quadri M, Horenstein NA. Selective agonists and antagonists of $\alpha 9$ versus $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptors. *ACS Chem Neurosci*. (2022) 13:624–37. doi: 10.1021/acscchemneuro.1c00747
122. Dallanocce C, Richter K, Stokes C, Papotto C, Andleeb H, Thakur GA, et al. New $\alpha 9$ nAChR ligands based on a 5-(quinuclidin-3-ylmethyl)-1,2,4-oxadiazole scaffold. *ACS Chem Neurosci*. (2024) 15:827–43. doi: 10.1021/acscchemneuro.3c00720&ref=pdf
123. Andleeb H, Papke RL, Stokes C, Richter K, Herz SM, Chiang K, et al. Explorations of agonist selectivity for the $\alpha 9$ nAChR with novel substituted carbamoyl/amido/heteroaryl dialkylpiperazinium salts and their therapeutic implications in pain and inflammation. *J Med Chem*. (2024) 67:8642–66. doi: 10.1021/acs.jmedchem.3c02429
124. Diabasana Z, Perotin J-M, Belgacemi R, Ancel J, Mulet P, Delepine G, et al. Nicotinic receptor subunits atlas in the adult human lung. *Int J Mol Sci*. (2020) 21(20):7446. doi: 10.3390/ijms21207446
125. Ye J, Coulouris G, Zaretskaya I, Cutcutache I, Rozen S, Madden TL. Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinf*. (2012) 13:134. doi: 10.1186/1471-2105-13-134
126. Wang T, Liang Z-A, Sandford AJ, Xiong X-Y, Yang Y-Y, Ji Y-L, et al. Selection of suitable housekeeping genes for real-time quantitative PCR in CD4(+) lymphocytes from asthmatics with or without depression. *PLoS One*. (2012) 7:e48367. doi: 10.1371/journal.pone.0048367



Supplementary Material

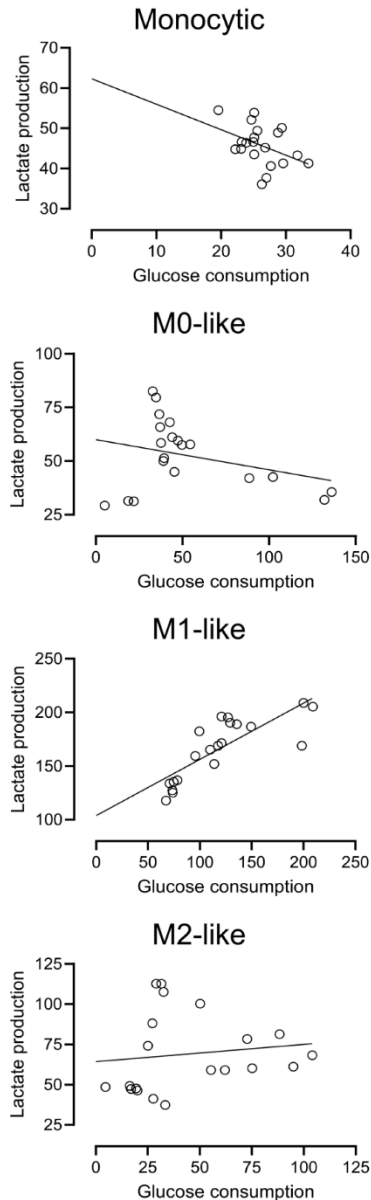
- 1 Supplementary Figures and Tables
- 1.1 Supplementary Figures

Supplementary Material

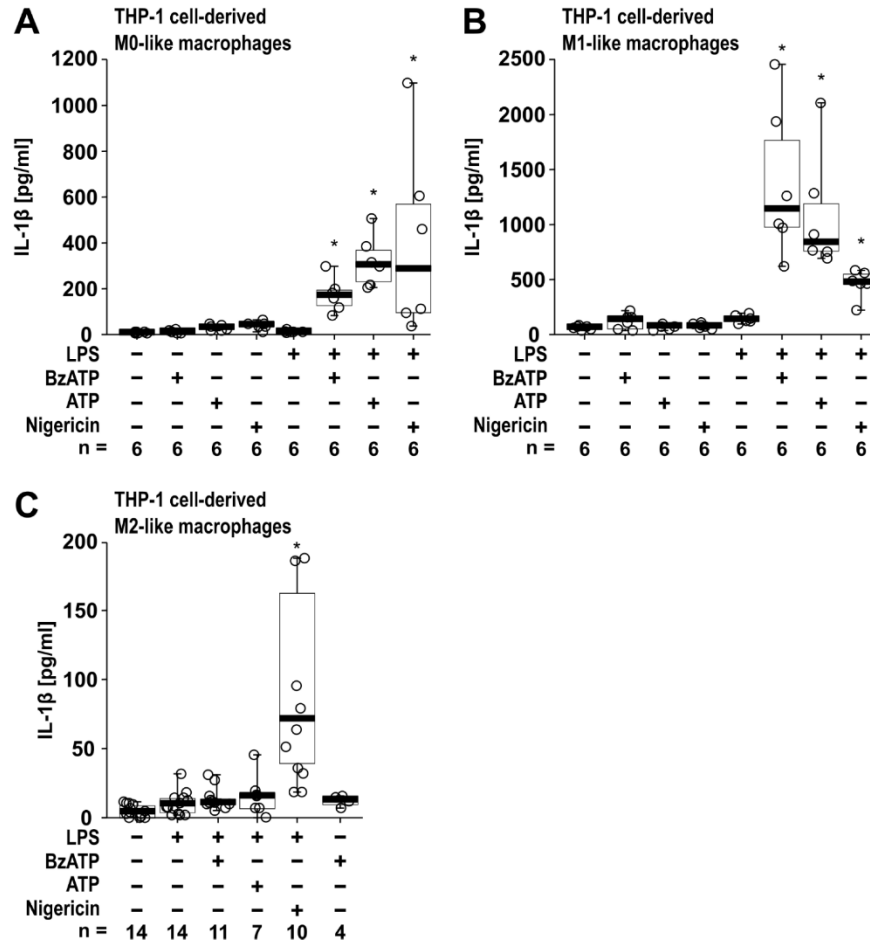


Supplementary Figure S1: Heatmap calculation reflecting the single biological replicates of the metabolic conversion rates from monocytic THP-1 cells and THP-1 cell-derived macrophages. Monocytic THP-1 cells (Mono) and THP-1 cell-derived M0-, M1- and M2-like macrophages (M0-, M1-, M2-like) were cultured for 6 h ($n = 5$). The conversion rates of glucose, lactate, pyruvate, glutamine, glutamate, aspartate, alanine and serine were quantified in $\text{nmol}/(\text{h} \times 10^5 \text{ cells})$ and determined in cell culture supernatants. A – E = $\bar{x}$ of the individual biological replicates which consisted of 3 - 6 technical replicates each. Red color = consumption of the respective metabolite; blue color = production of the respective metabolite. These data complement the experiments shown in **Figure 2**.

Supplementary Material

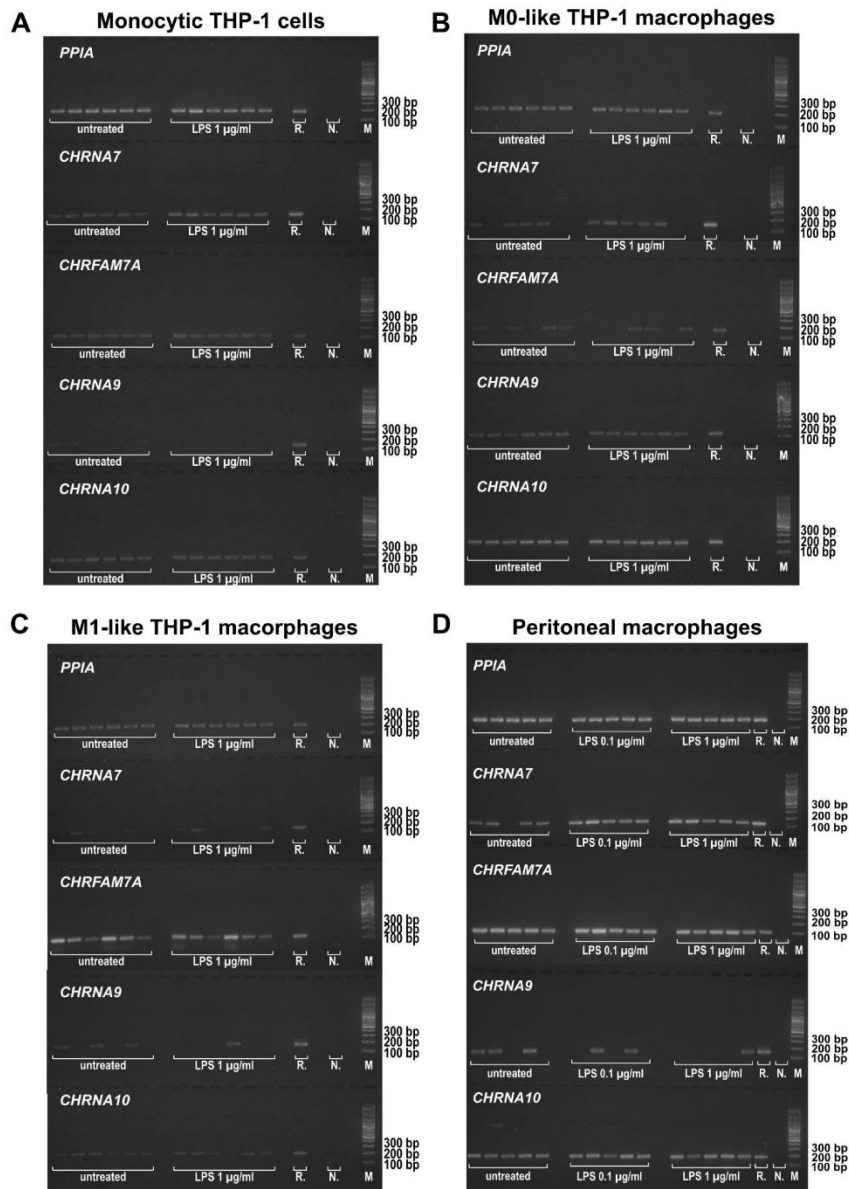


Supplementary Figure S2: Correlation of glucose consumption and lactate production in monocytic THP-1 cells and THP-1 cell-derived macrophages. For these calculations glucose consumption (abscissa, [nmol/(h*10⁵ cells)]) of all technical replicates within the 5 independent biological approaches was plotted versus lactate production (ordinate, [nmol/(h*10⁵ cells)]) of the same samples (compare **Supplementary Table S2**). The regression analysis was performed using Microsoft Excel (version Microsoft 365, Microsoft Corporation, Redmond, Washington, USA), and the graphs were created using GraphPad Prism® (version 10.2.3, GraphPad Software, Boston, Massachusetts, USA). The slopes of the regression line reflect the ratio between glucose consumption and lactate production. In glycolysis, one mole of glucose is converted into two moles of lactate. Accordingly, a slope of nearly two indicates that all lactate produced must be derived from glucose. A slope of 0.5 as calculated for M1-like macrophages (**Supplementary Table S2**) indicates that about 25% of the glucose consumed were released as lactate. The intercept of the regression line specifies lactate production without glucose consumption.

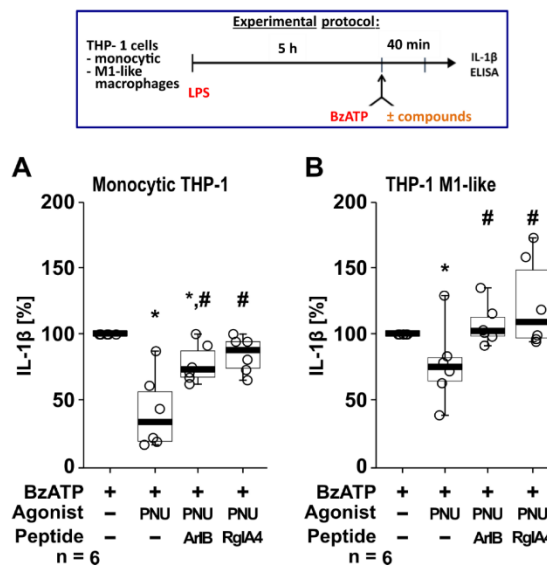


Supplementary Figure S3: Comparison of interleukin (IL)-1 β release levels induced by BzATP, ATP, and nigericin by THP-1 cell-derived M0- vs. M1- vs. M2-like macrophages. Monocytic THP-1 cells were differentiated into a M0-, M1- and M2-like macrophage phenotype. Thereafter, the cells were primed with LPS (1 μ g/ml) for 5 h, followed by stimulation with BzATP (100 μ M), ATP (2 mM) or nigericin (50 μ M) for another 40 min to trigger IL-1 β release. IL-1 β concentrations in cell culture supernatants were measured by ELISA. Data are presented as individual points (n = 4 – 14); boxes represent the interquartile range (25th to 75th percentile), the horizontal line within each box indicates the median, and whiskers extend to the minimum and maximum values. *p $\leq$ 0.05, different from LPS-primed cells. Friedman test followed by the Wilcoxon signed-rank test.

Supplementary Material

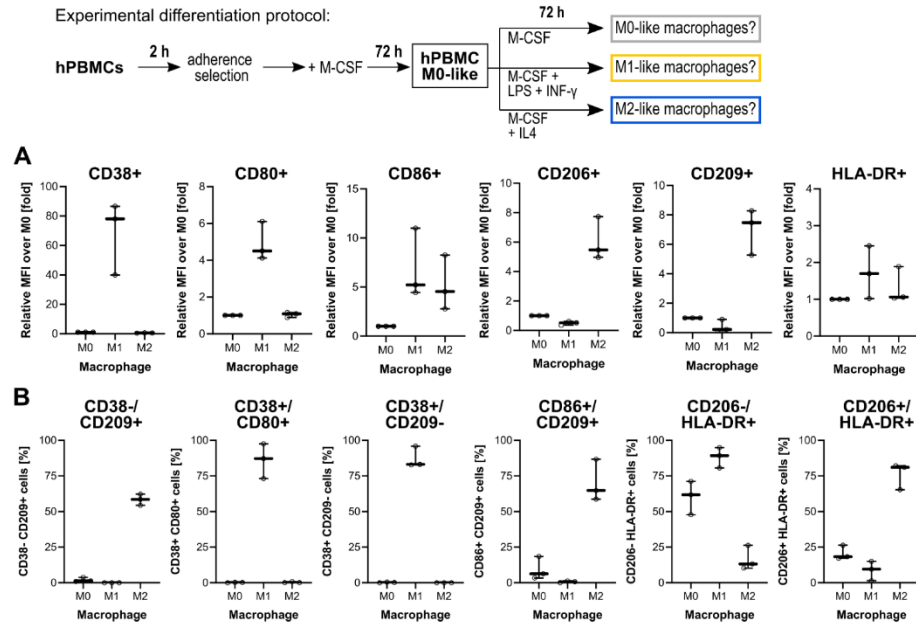


Supplementary Figure S4: cDNA amplicons of nicotinic acetylcholine receptor (nAChR) subtypes *CHRNA7*, *CHRFAM7A*, *CHRNA9* and *CHRNA10* by human monocytic THP-1 cells, THP-1 cell-derived M0-like and M1-like macrophages, and human peritoneal macrophages. Real-time reverse transcription PCR (real-time RT-PCR) products from untreated and lipopolysaccharide (LPS)-primed monocytic THP-1 cells (A), THP-1 cell-derived macrophages (B-C; n = 6 each) and human peritoneal macrophages (D; n = 5) were separated in agarose gels. The efficiency of RNA isolation and cDNA synthesis was verified by using peptidylprolyl isomerase A (*PPIA*)-specific primers. As positive control, Universal Human Reference RNA was used (R.), and water control without template cDNA as a negative control (N.).

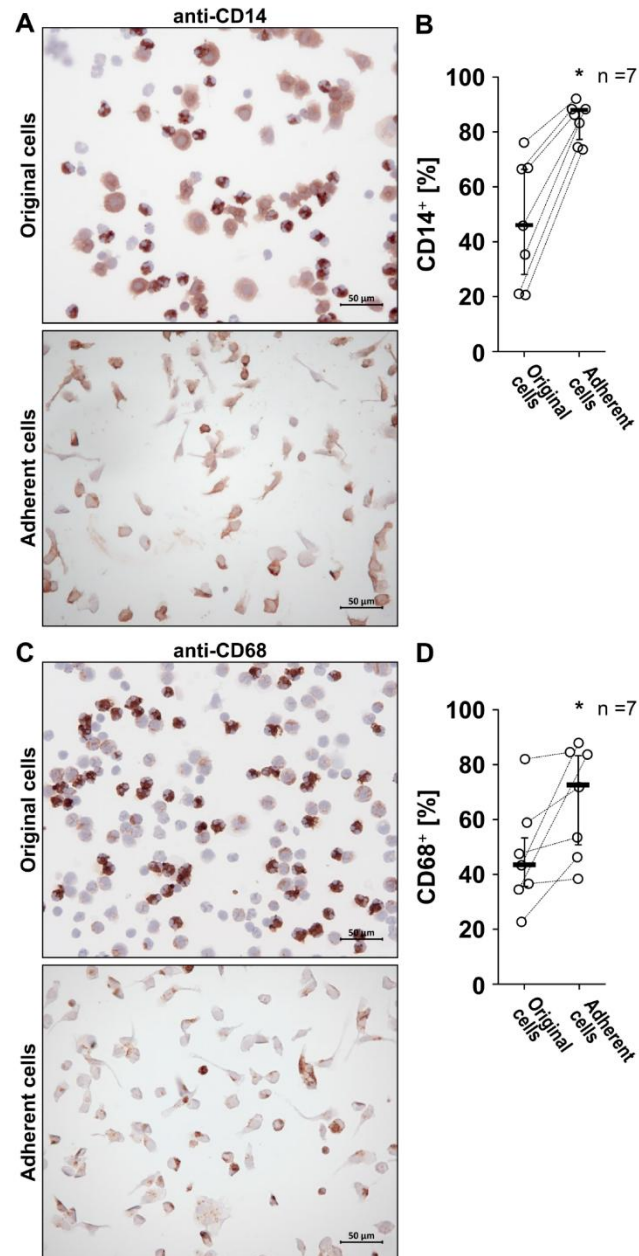


Supplementary Figure S5: The effect of the $\alpha 7$ nAChR agonists PNU-282987 (PNU) on the BzATP-mediated release of interleukin-1 β (IL-1 β) is sensitive to the conopeptides [V11L,V16D]Ar1B and RglA4. Monocytic THP-1 cells and THP-1 cell-derived M1-like macrophages were primed for 5 h with LPS (LPS; 1 μ g/ml). The P2X7 receptor agonist BzATP was added for another 40 min to trigger IL-1 β release, which was measured by ELISA. The BzATP (100 μ M) induced release of IL-1 β was investigated in the presence and absence of the $\alpha 7$ nAChR agonist PNU (10 μ M). To test for the involvement of nAChR subunits the conopeptides [V11L,V16D]Ar1B (500 nM) or RglA4 (RglA; 200 nM) were co-applied. The amount of IL-1 β released in response to BzATP was calculated by subtracting the IL-1 β concentrations measured in supernatants of cells treated with LPS alone. In each experiment, the IL-1 β concentrations obtained after stimulation with BzATP were set to 100% and all other values were calculated accordingly. Data are presented as individual points (n = 6); boxes represent the interquartile range (25th to 75th percentile), the horizontal line within each box indicates the median, and whiskers extend to the minimum and maximum values. *p $\leq$ 0.05, different from LPS-primed cells stimulated with BzATP alone; #p $\leq$ 0.05, different from LPS-primed cells stimulated with BzATP plus PNU. Friedman test followed by the Wilcoxon signed-rank test.

Supplementary Material

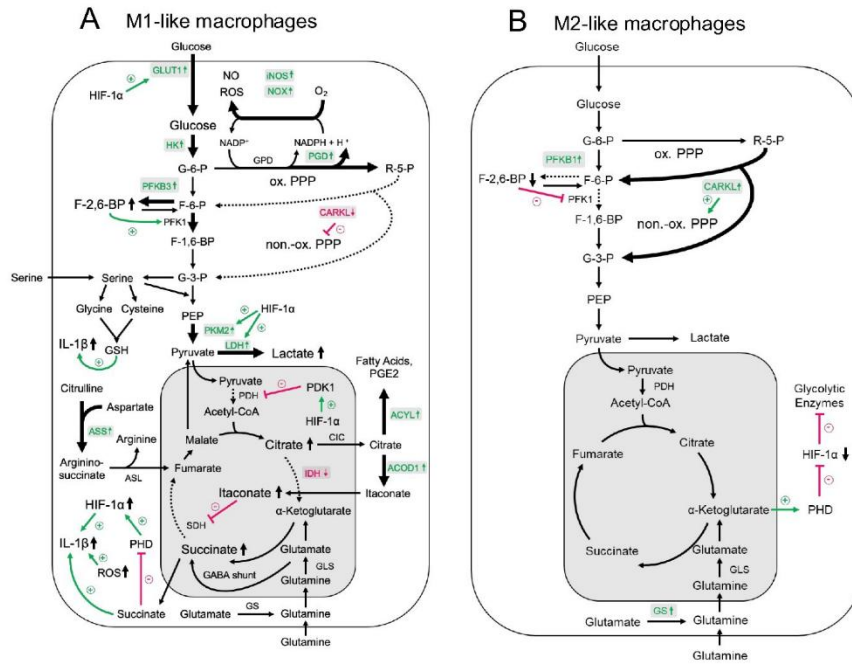


Supplementary Figure S6: Levels of surface proteins of human peripheral mononuclear cell (hPBMC)-derived macrophages analyzed by flow cytometry. hPBMCs were differentiated into M0-, M1-, and M2-like macrophages. On day 6, levels of cell surface markers was analyzed by flow cytometry. **A)** Each panel displays the relative mean fluorescence intensity (MFI) compared to M0 macrophages of antibody-labeled CD38, CD80, CD86, CD206, CD209, and HLA-DR. **B)** Validation of distinct phenotypic polarization in M1 and M2 macrophage populations, characterized by the presence of M1- or M2-specific surface markers. Each panel displays the percentages of cells with M1- or M2-associated markers. Data represent results from three independent experiments.



Supplementary Material

Supplementary Figure S7: Immunocytochemical staining of human peritoneal cells. Immunocytochemical detection of macrophage markers CD14 and CD68 before and after macrophage enrichment. **A)** Representative staining with anti-CD14 antibodies of the original crude peritoneal dialysate samples and the composition of adherent cell types. **B)** Percentages of CD14⁺ macrophages in the peritoneal dialysate and in the adherent cell populations (n = 7). **C)** Representative staining with anti-CD68 antibodies of the crude peritoneal dialysate and the composition of adherent cell types. **D)** Percentages of CD68⁺ macrophages in the peritoneal dialysate and in the adherent cell populations (n = 7). Scale bar: 50 μ m. All pictures were taken from one representative experiment out of 7. Data are presented as individual data points; data from the same patients are connected. Friedman test followed by Wilcoxon signed-rank test. *p $\leq$ 0.05 significantly different from original composition.



Supplementary Figure S8: Metabolic scheme summarizing the published metabolic characteristics of M1-like (A) and M2-like (B) macrophages. The schemes were created based on publications summarized in the article by Rodriguez et al. 2019 [100] and the review articles by Viola et al. 2019 [99] and Liu et al. 2021 [101]. Bold arrows = increased metabolic conversion rates in relation to the other cell types; dotted arrows = decreased metabolic conversion rates in comparison to the other cell types; green arrows and enzyme/protein names = activation or increase of the respective

enzyme/protein or reaction; red arrows, T-shapes or enzyme/protein names = inhibition or downregulation of the respective enzyme/protein or reaction. Acetyl-CoA = acetyl coenzyme A; ACLY = adenosine triphosphate citrate lyase; ACOD1 = aconitate decarboxylase 1; ASL = argininosuccinate lyase; ASS = argininosuccinate synthetase; CARKL = carbohydrate kinase like protein; CIC = citrate carrier; F-1,6-BP = fructose-1,6-bisphosphate; F-2,6-BP = fructose-2,6-bisphosphate; F-6-P = fructose-6-phosphate; G-3-P = glyceraldehyde-3-phosphate; G-6-P = glucose-6-phosphate; GABA shunt = γ -aminobutyric acid shunt; GLS = glutaminase; GLUT1 = glucose transporter 1; GPD = glucose-6-phosphate dehydrogenase; GS = glutamine synthetase; GSH = glutathione; HIF-1 α = hypoxia inducible factor-1 alpha; HK = hexokinase; IDH = isocitrate dehydrogenase; IL = interleukin; iNOS = inducible nitric oxide synthase; LDH = lactate dehydrogenase; NADP/H = nicotinamide adenine dinucleotide phosphate; NO = nitric oxide; non.-ox. PPP = non-oxidative pentose phosphate pathway; NOX = NADPH oxidase; ox. PPP = oxidative pentose phosphate pathway; PDH = pyruvate dehydrogenase; PDK1 = pyruvate dehydrogenase kinase isozyme 1; PEP = phosphoenolpyruvate; PFK1 = phosphofructokinase isozyme 1; PFK2 = 6-phosphofructo-2-kinase; PFKB1 = 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase 1; PFKB3 = 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase 3; PGD = 6-phosphogluconate dehydrogenase; PGE2 = prostaglandin E2; PHD = prolyl hydroxylase; PKM2 = pyruvate kinase isoenzyme isozyme M2; R-5-P = ribose-5-phosphate; ROS = reactive oxygen species; SDH = succinate dehydrogenase.

2. Supplementary Tables

Supplementary Table S1: Antibodies used for flow cytometry analyses of THP-1 cell-derived macrophages and human peripheral mononuclear cell (PBMC)-derived macrophages.

	Marker	Fluorochrome	Clone	Company
Marked	Human CD38	PE-Cy7	HIT2	BioLegend
	Human CD80	FITC	BB1	BD Pharmingen
	Human CD83	APC	HB15e	Becton Dickinson
	Human CD86	PE	FUN-1	Becton Dickinson
	Human CD206	PE	19.2	BD Pharmingen
	Human CD163	FITC	GH1/61	BioLegend
	Human CD209	PerCP-Cy5.5	DCN46	Becton Dickinson
	Human HLA-DR	PerCP-Cy5.5	L243	BD Biosciences
Isotype	Mouse-IgG1, κ	FITC	MOPC-21	BD Pharmingen
	Mouse-IgG1, κ	PE	X40	BD Biosciences
	Mouse-IgG1, κ	PE	MOPC-21	BD Pharmingen
	Mouse-IgG1, κ	APC	M1-14D12	eBioscience
	Mouse IgG1, κ	PE-Cy7	X40	BD Biosciences
	Mouse-IgG2a, κ	PerCP-Cy5.5	G155-178	BD Pharmingen
	Mouse-IgG2b, κ	PerCP-Cy5.5	27-35	BD Pharmingen

Supplementary Table S2: Correlations of selected metabolite conversion rates from monocytic THP-1 cells and THP-1 cell-derived macrophages.

X	Y	Monocytic			M0-like		
		slope	Intercept [nmol/ (hx10 ⁵ cells)]	r	slope	Intercept [nmol/ (hx10 ⁵ cells)]	r
Glucose cons.	Lactate prod.	-0.6	62.2	-0.42	-0.1	60.0	-0.30
Glucose cons.	Pyruvate prod.	0.0	1.3	-0.24	0.0	3.1	-0.45
Aspartate cons.	Lactate prod.	-1.0	45.7	-0.02	-1.6	53.1	-0.03
Serine cons.	Lactate prod.	0.2	44.6	0.16	-1.0	64.6	-0.51
Serine cons.	Pyruvate prod.	0.0	0.6	-0.22	-0.3	4.2	-0.70
Glutamine cons.	Lactate prod.	1.4	43.5	0.23	3.4	36.4	0.83
Glutamine cons.	Pyruvate prod.	0.4	-0.2	0.76	0.7	-2.1	0.90
Glutamine cons.	Glutamate prod.	0.0	1.4	-0.04	0.5	3.0	0.96
Alanine cons.	Lactate prod.	-6.4	45.9	-0.55	-0.7	53.2	-0.06
Alanine cons.	Pyruvate prod.	0.0	0.4	0.01	0.1	1.0	0.07
		M1-like			M2-like		
		slope	Intercept [nmol/ (hx10 ⁵ cells)]	r	slope	Intercept [nmol/ (hx10 ⁵ cells)]	r
Glucose cons.	Lactate prod.	0.5	103.8	0.80	0.1	64.3	0.13
Glucose cons.	Pyruvate prod.	-0.1	7.8	-0.61	-0.1	5.9	-0.42
Aspartate cons.	Lactate prod.	15.0	143.7	0.44	-14.0	69.4	-0.33
Serine cons.	Lactate prod.	0.5	150.7	0.29	1.0	46.1	0.59
Serine cons.	Pyruvate prod.	-0.1	5.4	-0.58	0.2	-3.7	0.52
Glutamine cons.	Lactate prod.	-4.7	194.6	-0.47	2.1	53.3	0.59
Glutamine cons.	Pyruvate prod.	0.9	-4.3	0.70	0.9	-4.9	0.91
Glutamine cons.	Glutamate prod.	-0.1	5.8	-0.31	0.5	6.5	0.90
Alanine cons.	Lactate prod.	-2.2	165.6	-0.11	2.6	66.0	0.23
Alanine cons.	Pyruvate prod.	-0.7	1.3	-0.25	0.6	1.1	0.20

The conversion rates of the individual technical replicates (n = 19 - 20) were plotted against each other in a x-/y-coordinate system indicated in columns one and two of the table (compare Supplementary Figure S3). The regression line was calculated using Microsoft Excel. cons. = consumption; prod. = production; r = Pearson correlation coefficient.

Supplementary Material

Supplementary Table S3: Cycle threshold (Ct) values of the genes of interest (*CHRNA7*, *CHRNA9*, *CHRNA10*, *CHRFAM7A*) and the reference genes ribosomal protein L37a (*RPL37A*), glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*GAPDH*) and peptidylprolyl isomerase A (*PPIA*) in monocytic THP-1 cells and THP-1 cell-derived M0- and M1-like macrophages.

THP-1 cells	Gene		Mean Ct $\pm$ standard deviation	Ct value range of lowest – highest
monocytic	<i>RPL37A</i>	untreated	16.04 $\pm$ 0.22	15.62 – 16.24
		LPS (1 μ g/ml)	15.97 $\pm$ 0.15	15.69 – 16.10
	<i>GAPDH</i>	untreated	16.81 $\pm$ 0.48	16.30 – 17.54
		LPS (1 μ g/ml)	16.86 $\pm$ 0.36	16.38 – 17.13
	<i>PPIA</i>	untreated	18.04 $\pm$ 0.65	17.40 – 18.99
		LPS (1 μ g/ml)	17.75 $\pm$ 0.41	17.21 – 18.34
	<i>CHRNA7</i>	untreated	34.38 $\pm$ 1.11	33.39 – 35.29
		LPS (1 μ g/ml)	33.88 $\pm$ 0.83	33.11 – 35.31
	<i>CHRNA9</i>	untreated	36.87 $\pm$ 3.13	32.69 – $\geq$ 40
		LPS (1 μ g/ml)	36.27 $\pm$ 3.50	32.52 – $\geq$ 40
	<i>CHRNA10</i>	untreated	30.79 $\pm$ 0.43	30.24 – 31.27
		LPS (1 μ g/ml)	31.11 $\pm$ 0.39	30.62 – 31.58
	<i>CHRFAM7A</i>	untreated	30.43 $\pm$ 0.73	29.20 – 31.10
		LPS (1 μ g/ml)	30.81 $\pm$ 0.10	30.65 – 30.91
M0-like macrophages	<i>RPL37A</i>	untreated	16.64 $\pm$ 0.40	16.42 – 17.38
		LPS (1 μ g/ml)	16.61 $\pm$ 0.30	16.38 – 17.07
	<i>GAPDH</i>	untreated	18.28 $\pm$ 0.34	17.94 – 18.82
		LPS (1 μ g/ml)	18.40 $\pm$ 0.28	18.07 – 18.74
	<i>PPIA</i>	untreated	19.76 $\pm$ 0.48	19.34 – 20.65
		LPS (1 μ g/ml)	19.69 $\pm$ 0.32	19.55 – 20.45
	<i>CHRNA7</i>	untreated	33.54 $\pm$ 1.15	31.98 – 34.81
		LPS (1 μ g/ml)	33.91 $\pm$ 3.00	32.24 – $\geq$ 40
	<i>CHRNA9</i>	untreated	33.88 $\pm$ 1.74	31.82 – 36.19
		LPS (1 μ g/ml)	35.95 $\pm$ 2.39	31.74 – 38.16
	<i>CHRNA10</i>	untreated	29.90 $\pm$ 0.58	29.35 – 30.73
		LPS (1 μ g/ml)	30.07 $\pm$ 0.63	29.32 – 30.81
	<i>CHRFAM7A</i>	untreated	33.91 $\pm$ 0.12	33.76 – 34.03
		LPS (1 μ g/ml)	34.33 $\pm$ 0.24	34.03 – 34.66
M1-like macrophages	<i>RPL37A</i>	untreated	20.88 $\pm$ 0.35	20.31 – 21.37
		LPS (1 μ g/ml)	21.45 $\pm$ 0.37	20.96 – 21.90
	<i>GAPDH</i>	untreated	20.30 $\pm$ 0.56	19.64 – 21.19
		LPS (1 μ g/ml)	21.25 $\pm$ 0.59	20.41 – 21.83
	<i>PPIA</i>	untreated	21.61 $\pm$ 0.50	21.02 – 22.53
		LPS (1 μ g/ml)	22.29 $\pm$ 0.46	21.63 – 22.89
	<i>CHRNA7</i>	untreated	34.37 $\pm$ 2.96	31.27 – $\geq$ 40
		LPS (1 μ g/ml)	34.71 $\pm$ 1.29	32.57 – 35.91
	<i>CHRNA9</i>	untreated	36.10 $\pm$ 2.88	32.60 – 39.09
		LPS (1 μ g/ml)	36.46 $\pm$ 2.48	32.69 – 38.02

	<i>CHRNA10</i>	untreated	32.90 ± 1.02	31.73 – 34.47
		LPS (1 µg/ml)	33.68 ± 1.12	33.28 – 35.81
	<i>CHRFAM7A</i>	untreated	33.38 ± 0.94	32.41 – 34.64
		LPS (1 µg/ml)	33.92 ± 0.89	33.41 – 35.65

Real-time reverse transcription PCR (real-time RT-PCR) analysis was performed on human monocytic THP-1 cells and THP-1 cell-derived M0- and M1-like macrophages that were left untreated or primed with lipopolysaccharide (LPS) for 5 h. For mRNAs that were undetectable in these experiments, the Ct value was artificially set to the cut of value $Ct \geq 40$. n = 6 biological replicates, each sample assessed in technical duplicates.

Supplementary Material

Supplementary Table S4: Cycle threshold (Ct) values of the genes of interest (*CHRNA7*, *CHRNA9*, *CHRNA10*, *CHRFAM7A*) and the reference genes ribosomal protein L37a (*RPL37A*), glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*GAPDH*) and peptidylprolyl isomerase A (*PPIA*) in human peritoneal macrophages.

Gene		Mean Ct $\pm$ standard deviation	Ct value range of lowest – highest
<i>PPIA</i>	untreated	23.52 $\pm$ 0.77	22.83 – 24.62
	LPS (1 μ g/ml)	24.46 $\pm$ 1.39	22.70 – 25.54
<i>CHRNA7</i>	untreated	33.77 $\pm$ 1.42	32.38 – 35.17
	LPS (1 μ g/ml)	34.18 $\pm$ 1.24	33.29 – 36.24
<i>CHRNA9</i>	untreated	38.05 $\pm$ 2.67	35.11 – $\geq$ 40
	LPS (1 μ g/ml)	38.06 $\pm$ 2.65	35.14 – $\geq$ 40
<i>CHRNA10</i>	untreated	31.13 $\pm$ 0.06	31.03 – 31.19
	LPS (1 μ g/ml)	31.91 $\pm$ 1.54	30.28 – 34.18
<i>CHRFAM7A</i>	untreated	31.45 $\pm$ 0.25	31.21 – 31.72
	LPS (1 μ g/ml)	33.63 $\pm$ 0.85	32.20 – 34.18

Human peritoneal macrophages were left untreated or primed with lipopolysaccharide (LPS) for 5 h. For mRNAs that were undetectable in these experiments, the Ct value was artificially set to the cut of value Ct $\geq$ 40. n = 5 biological replicates, each sample assessed in technical duplicates.

Supplementary Table S5: Cell death of monocytic THP-1 cells as estimated by the lactate dehydrogenase (LDH) activity in cell culture supernatants.

Treatment	Cell death [%] mean $\pm$ SD	n
-	6.1 $\pm$ 2.3	34
LPS	6.6 $\pm$ 2.9	34
LPS, BzATP	7.0 $\pm$ 3.5	34
LPS, BzATP, ACh 10 μ M	7.1 $\pm$ 1.6	13
LPS, BzATP, Cho 100 μ M	3.2 $\pm$ 0.5	5
LPS, BzATP, Nic 100 μ M	2.6 $\pm$ 0.6	5
LPS, BzATP, PC 200 μ M	5.4 $\pm$ 1.6	14
LPS, BzATP, CRP-PC 20 μ g/ml	7.3 $\pm$ 3.1	6
LPS, BzATP, RglA4 200 nM	7.3 $\pm$ 2.4	12
LPS, BzATP, ArIB 500 nM	7.2 $\pm$ 2.2	12
LPS, BzATP, Mec 100 μ M	5.0 $\pm$ 3.7	5

Monocytic THP-1 cells were primed with lipopolysaccharide (LPS, 1 μ g/ml, for 5 h) and further stimulated with 2'(3')-O-(4-benzoylbenzoyl)adenosine 5'-triphosphate triethylammonium salt (BzATP; 100 μ M). Cell death was estimated via measurement of the release of lactate dehydrogenase (LDH) into the cell culture medium at the end of the experiments. The data depicted in this table correspond to the experiments shown in the respective figures of the main part of this manuscript. The concentration of diverse compounds is indicated in the table. ACh, acetylcholine; Cho, choline; Nic, nicotine; PC, phosphocholine; CRP, C-reactive protein; Mec, mecamlamine.

Supplementary Table S6: Cell death of THP-1 cell-derived M0-like and M1-like macrophages as estimated by the lactate dehydrogenase (LDH) activity in cell culture supernatants.

THP-1 cell-derived macrophages	Treatment	Cell death [%] mean $\pm$ SD	n
M0-like	-	10.3 $\pm$ 5.7	6
	LPS	6.5 $\pm$ 5.4	6
	LPS, BzATP	8.2 $\pm$ 3.7	6
	LPS, BzATP, ACh 10 μ M	7.5 $\pm$ 3.1	6
	LPS, BzATP, Cho 100 μ M	7.8 $\pm$ 4.0	6
	LPS, BzATP, Nic 100 μ M	7.2 $\pm$ 3.2	6
	LPS, BzATP, PC 200 μ M	7.5 $\pm$ 3.6	6
M1-like	-	4.0 $\pm$ 3.7	18
	LPS	16.4 $\pm$ 9.7	18
	LPS, BzATP	28.7 $\pm$ 13.7	18
	LPS, BzATP, ACh 10 μ M	32.4 $\pm$ 15.6	12
	LPS, BzATP, Cho 100 μ M	25.2 $\pm$ 7.9	11
	LPS, BzATP, Nic 100 μ M	26.1 $\pm$ 8.5	11
	LPS, BzATP, CRP-PC 10 μ g/ml	26.3 $\pm$ 9.1	6
	LPS, BzATP, RgIA4 200 nM	21.6 $\pm$ 20.0	6
	LPS, BzATP, ArIB 500 nM	20.3 $\pm$ 17.7	7
	LPS, BzATP, Mec 100 μ M	33.0 $\pm$ 3.7	7

THP-1 cell-derived M0-like and M1-like macrophages were primed with lipopolysaccharide (LPS, 1 μ g/ml, for 5 h) and further stimulated with 2'(3')-O-(4-benzoylbenzoyl)adenosine 5'-triphosphate triethylammonium salt (BzATP; 100 μ M). Cell death was estimated via measurement of the release of lactate dehydrogenase (LDH) into the cell culture medium at the end of the experiments. The data depicted in this table correspond to the experiments shown in the respective figures of the main part of this manuscript. The concentration of diverse compounds is indicated in the table. ACh, acetylcholine; Cho, choline; Nic, nicotine; PC, phosphocholine.

Supplementary Material

Supplementary Table S7: Cell death of human peripheral blood mononuclear cell (PBMC)-derived M0-like and M1-like macrophages as estimated by the lactate dehydrogenase (LDH) activity in cell culture supernatants.

Human PBMC-derived macrophages	Treatment	Cell death [%] mean $\pm$ SD	n
M0-like	-	3.0 $\pm$ 3.0	6
	LPS	1.8 $\pm$ 1.8	6
	LPS, BzATP	2.7 $\pm$ 2.7	6
	LPS, BzATP, ACh 10 μ M	2.0 $\pm$ 2.4	6
	LPS, BzATP, Nic 100 μ M	2.3 $\pm$ 1.8	6
	LPS, BzATP, PC 200 μ M	3.3 $\pm$ 2.3	6
M1-like	-	3.3 $\pm$ 2.9	6
	LPS	4.2 $\pm$ 2.1	6
	LPS, BzATP	10.3 $\pm$ 7.1	6
	LPS, BzATP, ACh 10 μ M	6.2 $\pm$ 4.3	6
	LPS, BzATP, Nic 100 μ M	5.3 $\pm$ 5.2	6
	LPS, BzATP, PC 200 μ M	5.8 $\pm$ 4.3	6

Human PBMC-derived M0-like and M1-like macrophages were primed with lipopolysaccharide (LPS, 1 μ g/ml, for 5 h) and further stimulated with 2'(3')-O-(4-benzoylbenzoyl)adenosine 5'-triphosphate triethylammonium salt (BzATP; 100 μ M). Cell death was estimated via measurement of the release of lactate dehydrogenase (LDH) into the cell culture medium at the end of the experiments. The data depicted in this table correspond to the experiments shown in the respective figures of the main part of this manuscript. The concentration of diverse compounds is indicated in the table. ACh, acetylcholine; Nic, nicotine; PC, phosphocholine.

Supplementary Table S8: Cell death of human peritoneal macrophages as estimated by the lactate dehydrogenase (LDH) activity in cell culture supernatants.

Human peritoneal macrophages	Treatment	Cell death [%] mean $\pm$ SD	n
0.1 μg/ml LPS-priming	-	4.5 $\pm$ 11.8	7
	LPS	1.2 $\pm$ 3.1	7
	LPS, BzATP	3.2 $\pm$ 8.5	7
	LPS, BzATP, ACh 10 μ M	1.4 $\pm$ 3.4	6
	LPS, BzATP, ACh 100 μ M	1.4 $\pm$ 3.6	7
	LPS, BzATP, Nic 100 μ M	0.6 $\pm$ 1.5	7
	LPS, BzATP, PC 200 μ M	0.0 $\pm$ 0.0	7
	LPS, BzATP, CRP 10 μ g/ml	0.0 $\pm$ 0.0	5
	LPS, BzATP, CRP 20 μ g/ml	1.5 $\pm$ 4.0	7
	LPS, BzATP, CRP 40 μ g/ml	0.0 $\pm$ 0.0	5
1 μg/ml LPS-priming	-	4.2 $\pm$ 11.2	7
	LPS	2.9 $\pm$ 7.6	7
	LPS, BzATP	0.9 $\pm$ 2.3	7
	LPS, BzATP, ACh 10 μ M	0.0 $\pm$ 0.0	6
	LPS, BzATP, ACh 100 μ M	3.1 $\pm$ 8.2	7
	LPS, BzATP, Nic 100 μ M	1.3 $\pm$ 3.4	7
	LPS, BzATP, PC 200 μ M	2.8 $\pm$ 7.3	7
	LPS, BzATP, CRP 10 μ g/ml	0.0 $\pm$ 0.0	5
	LPS, BzATP, CRP 20 μ g/ml	2.7 $\pm$ 7.2	7
	LPS, BzATP, CRP 40 μ g/ml	0.0 $\pm$ 0.0	5

Human peritoneal macrophages were primed with lipopolysaccharide (LPS, 0.1 μ g/ml or 1 μ g/ml, for 5 h) and further stimulated with 2'(3')-O-(4-benzoylbenzoyl)adenosine 5'-triphosphate triethylammonium salt (BzATP; 100 μ M). Cell death was estimated via measurement of the release of lactate dehydrogenase (LDH) into the cell culture medium at the end of the experiments. The data depicted in this table correspond to the experiments shown in the respective figures of the main part of this manuscript. The concentration of diverse compounds is indicated in the table. ACh, acetylcholine; Nic, nicotine; PC, phosphocholine; CRP, C-reactive protein.



2. Publikation:

“Early responses of primary human and bovine monocytes, monocytic THP-1 cells and THP-1 cell-derived macrophages to vital *Toxoplasma gondii* tachyzoites”

Hanke D., Velasquez Z.D., Büttner K., Krueger A., Ross R., Hecker A., Mazurek S., Grau V., Taubert A., Hermosilla C., Richter K.[†] and Conejeros I.[†]
Front. Immunol., 30 October 2025, Sec. Parasite Immunology, Volume 16 – 2025
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2025.1683634>

[†]These authors have contributed equally to this work.



OPEN ACCESS

EDITED BY
Debanjan Mukhopadhyay,
Presidency University, IndiaREVIEWED BY
Arne Lucas ten Hoeve,
University Medical Center Freiburg, Germany
Louis-Philippe Leroux,
Université du Québec, Canada*CORRESPONDENCE
Dominik Hanke
✉ Dominik.Hanke@vetmed.uni-giessen.de†These authors have contributed
equally to this work and share
senior authorshipRECEIVED 11 August 2025
ACCEPTED 26 September 2025
PUBLISHED 30 October 2025CITATION
Hanke D, Velásquez ZD, Büttner K, Krueger A,
Ross R, Hecker A, Mazurek S, Grau V,
Taubert A, Hermosilla C, Richter K and
Conejeros I (2025) Early responses of
primary human and bovine monocytes,
monocytic THP-1 cells and THP-1
cell-derived macrophages to vital
Toxoplasma gondii tachyzoites.
Front. Immunol. 16:1683634.
doi: 10.3389/fimmu.2025.1683634COPYRIGHT
© 2025 Hanke, Velásquez, Büttner, Krueger,
Ross, Hecker, Mazurek, Grau, Taubert,
Hermosilla, Richter and Conejeros. This is an
open-access article distributed under the terms
of the [Creative Commons Attribution License](#)
(CC BY). The use, distribution or reproduction
in other forums is permitted, provided the
original author(s) and the copyright owner(s)
are credited and that the original publication
in this journal is cited, in accordance with
accepted academic practice. No use,
distribution or reproduction is permitted
which does not comply with these terms.

Early responses of primary human and bovine monocytes, monocytic THP-1 cells and THP-1 cell-derived macrophages to vital *Toxoplasma gondii* tachyzoites

Dominik Hanke^{1,2*}, Zahady D. Velásquez², Kathrin Büttner³,
Andreas Krueger⁴, Ralf Ross⁴, Andreas Hecker⁵,
Sybille Mazurek¹, Veronika Grau⁵, Anja Taubert²,
Carlos Hermosilla², Katrin Richter^{5,6†} and Iván Conejeros^{2†}¹Institute of Veterinary Physiology and Biochemistry, Justus Liebig University Giessen, Giessen, Germany, ²Institute of Parasitology, Biomedical Research Center Sellersberg, Justus Liebig University Giessen, Giessen, Germany, ³Unit for Biomathematics and Data Processing, Justus Liebig University Giessen, Giessen, Germany, ⁴Institute of Molecular Immunology, Biomedical Research Center Sellersberg, Justus Liebig University Giessen, Giessen, Germany, ⁵Laboratory of Experimental Surgery, Department of General and Thoracic Surgery, German Center for Lung Research (DZL), Cardiopulmonary Institute (CPI), Justus Liebig University Giessen, Giessen, Germany, ⁶Department of Natural Sciences, Bonn-Rhein-Sieg University of Applied Sciences, Rheinbach, Germany**Introduction:** Different innate immune cell types are known to release extracellular traps (ETs) in response to invasive pathogens, including parasites. These ETs function to trap, immobilize, and eventually kill pathogens. In line with this, monocytes and macrophages have been shown to release ETs, known as monocyte/macrophage extracellular traps (METs). *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*) is an apicomplexan zoonotic parasite that infects humans and homeothermic animals. While most studies have focused on prolonged exposure of immune cells to *T. gondii*, this study characterized the early innate immune reaction of mononuclear phagocytes to vital *T. gondii* tachyzoites.**Methods:** Primary human and bovine monocytes, monocytic THP-1 cells, and THP-1 cell-derived macrophages (M0-, M1-, and M2-like) were exposed to *T. gondii* tachyzoites for 4 h. Scanning electron microscopy (SEM), transmission electron microscopy (TEM), immunofluorescence microscopy, and confocal microscopy were used to visualize cell activation and the presence of METs. Additionally, the release of pro-inflammatory cytokines interleukin (IL)-1 β and IL-6, and expression of Toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4 were analyzed.**Results and discussion:** Microscopic analysis illustrated the activation of all cell types tested within 4 h of exposure to *T. gondii* tachyzoites. Numerous tachyzoites were found intracellularly in THP-1 cell-derived M1-like macrophages. Furthermore, the co-localization of extracellular DNA (extDNA) and histones in extracellular web-like fibers proved classical characteristics of extruded *T. gondii*-induced METs, although this was a rare event. In primary human monocytes, an increased release of IL-1 β and IL-6 was observed following exposure to *T. gondii* tachyzoites. When co-stimulated with lipopolysaccharide (LPS), primary human monocytes showed an enhanced

release of IL-1 β and IL-6 in response to *T. gondii*. In contrast to monocytic THP-1 cells, THP-1 cell-derived M1-like macrophages released IL-1 β in response to *T. gondii* tachyzoite exposure. When additionally stimulated by LPS, all THP-1 cell-derived macrophages showed an enhanced release of IL-1 β , and monocytic THP-1 cells an increased release of IL-6 in response to *T. gondii* tachyzoites. This study provides insights into the early innate immune response of human and bovine mononuclear phagocytes to *T. gondii*. While cytokine secretion was prominent, MET formation was rare in the early response (i.e. < 4 h of exposure) to *T. gondii* tachyzoites.

KEYWORDS

Toxoplasma gondii, mononuclear phagocytes, extracellular traps, cytokines, early innate immunity

Introduction

Toxoplasma gondii (*T. gondii*) is a polyxenous zoonotic apicomplexan parasite able to infect warm-blooded mammals and birds worldwide (1). *T. gondii* is the etiological agent of human toxoplasmosis and it is estimated that one-third of the global population is seropositive for *T. gondii* (2). In humans, toxoplasmosis is particularly problematic in children after congenital transmission (i.e. prenatal toxoplasmosis) and in opportunistic infections of immunocompromised patients (i.e. postnatal toxoplasmosis) (3, 4). *T. gondii* is the only representative species of its genus and belongs to the class Sporozoa (subclass Coccidia, family Sarcocystidae). The life cycle of *T. gondii* comprises distinct parasitic stages. Infective parasitic stages are sporozoites within sporulated oocysts found in felid feces. Moreover, male and female gametocytes (exclusively form in the intestine of felines, acting as definitive hosts), fast replicating tachyzoites and bradyzoites in tissue cysts of intermediate hosts are found. During the acute phase of toxoplasmosis, fast replicating tachyzoites proliferate within all nucleated cell types, whereas bradyzoites, i.e. the slow replicating stages, develop within cysts and are primarily found in muscles, spleen, liver and brain. These stages propagate the chronic persistence of *T. gondii*. The main transmission routes of *T. gondii* to humans are: *i*) ingestion of undercooked meat containing tissue cysts, *ii*) consumption of food- and/or water contaminated with sporulated oocysts, *iii*) congenital transmission, *iv*) administration of blood transfusions containing tachyzoites, and *v*) organ transplants containing either tissue cysts or tachyzoites (2, 5).

Within the mammalian host innate immune system, mononuclear phagocytes like monocytes and macrophages play a crucial role in the initiation of adaptive immunity by acting as first responders to infection in the vasculature and tissue (6, 7). After polymorphonuclear neutrophils (PMN), monocytes are the second most abundant phagocytes in the blood, comprising 10% of the peripheral white blood cells in humans and 4% in cattle (8, 9).

Besides macrophages and dendritic cells (DC), monocytes form part of the mononuclear phagocyte system (MPS) and are characterized by their rapid recruitment in response to pathogen infection or tissue injury (9, 10). Classical monocyte- or macrophage-derived effector mechanisms, include phagocytosis, chemokine- [e.g. chemoattractant protein-1 (CCL2)] and cytokine secretion [e.g. interleukin (IL)-1 β and IL-6]), reactive oxygen species (ROS) production, and expression of a wide range of Toll-like receptors (TLRs) and purinergic receptors (e.g. P2X7) (11–16). Additionally, mammalian monocytes and macrophages are capable to release extracellular traps (NETs) (17–24), an early defense mechanism which was first observed in PMN and named neutrophil extracellular traps (NETs) (25). As shown for extruded NETs, METs are mainly composed of extracellular DNA (extDNA) and proteins like citrullinated histones (H1, H2A/H2B, H3, H4) and myeloperoxidase (MPO). METs function to trap, immobilize, and eventually kill pathogens, including parasites such as *Besnoitia besnoiti* (26), *Cryptosporidium parvum* (23), *Eimeria ninakohlyakimovae* (19) and *Neospora caninum* (21). In addition, the release of METs has been described in response to human sperm *in vitro* and *ex vivo* in male patients with leukocytospermia (27). Nonetheless, only one study so far reported on *T. gondii*-induced MET release, namely in monocytes of harbour seals (*Phoca vitulina*) (18), thereby proving that this defense mechanism seems to be highly conserved, as also assumed for NET formation (28). MET release is also induced by chemical activators like A23187 (calcium ionophore), phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA), platelet activating factor (PAF) (20, 24), zymosan (18–21, 26), or gold nanoparticles (29).

Monocytic THP-1 cells and THP-1 cell-derived-macrophages are a widely accepted model for human mononuclear phagocytes to study immunological mechanisms *in vitro* (30). THP-1 cells were originally isolated from a patient with acute myeloid leukemia (30–32). Monocytic THP-1 cells can be differentiated into non-polarized M0-like macrophages, pro-inflammatory M1-like macrophages and anti-inflammatory M2-like macrophages, providing the

opportunity to directly compare all four cell types *in vitro* (16, 30, 33).

Monocytic THP-1 cells and THP-1 cell-derived macrophages have been shown to release METs in response to a variety of chemical activators and stimuli [e.g. tunicamycin (34), PMA (35), A23187, HOCl, nigericin, tumor necrosis factor (TNF)- α (36), zymosan (37), murine extracellular cold-inducible RNA-binding protein (eCIRP) (38), and aflatoxin B1 (39)] as well as parasite [e.g. *Trichomonas vaginalis* (37)] and bacteria [e.g. *Escherichia coli* (17), *Streptococcus agalactiae* (40), and *Mycobacterium massiliense* (41)].

An important function of mononuclear phagocytes is the release of cytokines like IL-1 β and IL-6 in response to diverse danger- or pathogen-associated molecular patterns (DAMPs, PAMPs) (42–45). IL-1 β and IL-6 have distinct roles in the inflammatory process. IL-1 β is a primary initiator of innate immune reaction and key player in host defense against infections, while the pro- and anti-inflammatory IL-6 amplifies and modulates inflammatory responses (44). IL-1 β is processed from a precursor by caspase cleavage to become biologically active and is then secreted. The mere induction of pro-IL-1 β expression (priming step) is inefficient to induce secretion (44, 46). Consecutive second PAMPs or DAMPs are required to induce the NOD- LRR- and pyrin domain-containing protein 3 (NLRP3) inflammasome-dependent processing, and secretion of mature IL-1 β (45). IL-6 is secreted by mononuclear phagocytes in response to PAMPs (44, 46). These PAMPs bind to pattern recognition receptors (PRRs) such as TLR2.

In mammals, 13 TLRs are known. These are located on the plasma membrane and in intracellular compartments, where they activate signaling cascades to produce molecules and cytokines to fight against pathogens including *T. gondii* (47, 48). TLR2 and TLR4 have been shown to be involved in immune responses against *T. gondii*, with TLR2 recognizing the parasitic surface profilin or glycosylphosphatidylinositol (GPI) proteins, and stimulating the production of IL-12, while TLR4 plays a supportive role, especially at high infectious doses, as shown for several mouse models (47).

The role of IL-1 β and IL-6 in *T. gondii*-induced immune responses is controversial, possibly due to the use of different parasite strains (e.g. type I [RH], type II [Prugnnaud, ME49], type III [CEP], or atypical strains such as TgChBrUD2), reflecting the considerable genetic variability of *T. gondii*. This strain diversity is reflected in pronounced differences in virulence and immune modulation among strains (49, 50), which may explain the inconsistent findings. A key factor contributing to this variability is partly driven by strain-specific polymorphic effector proteins that differentially modulate host immune signaling pathways, thereby influencing cytokine responses (51, 52). In line with this, Gov et al., 2013 and Guimaraes Gois et al., 2022 demonstrated strain-specific cytokine profiles (53, 54). While some studies on primary human monocytes showed a *T. gondii* tachyzoite-induced increased release of IL-1 β after 4, 16 and 24 h (53, 55–58), Liam et al., 2018 found no impact of tachyzoite exposure on lipopolysaccharide (LPS)-induced IL-1 β release (56). The same applies for IL-6. Pelloux et al., 1994 and Tombácz et al., 2018 found no impact of *T. gondii* tachyzoites or profilin on the release of IL-6 by primary monocytes after 24 h

exposure (59, 60), whereas Salazar Gonzalez et al., 2014 have found an impact of *T. gondii* profilin (61). Further studies provide evidence for a parasite-induced release of macrophage migration inhibitory factor (MIF), IL-1 β , IL-6 and IL-12 by monocytic THP-1 cells (53, 55, 62, 63), and a fostered IL-1 β and MIF secretion by M0-like macrophages (54, 64).

Of note, the above described studies either focused on the release of METs (18), production of IL-1 β and IL-6 (53–61, 63, 64) or the expression of TLR2 and TLR4 (47, 48).

Here we studied in a comprehensive systematic manner the effect of *T. gondii* tachyzoites on the acute and early phase response of primary human and bovine monocytes as well as monocytic THP-1 cells and THP-1 cell-derived macrophages, including the release of METs, the production of pro-inflammatory cytokines IL-1 β and IL-6, and the expression of the surface receptors TLR2 and TLR4.

Materials and methods

THP-1 cell culture

Monocytic THP-1 cells (Leibniz Institute, DSMZ-German Collection of Microorganisms and Cell Cultures GmbH, Braunschweig, Germany, Cat#ACC16) were cultured in T-75 cell culture flasks (Sarstedt, Nümbrecht, Germany, Cat#83.3911.002) in Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 medium (Sigma-Aldrich, Merck, Darmstadt, Germany, Cat#R8758) supplemented with 10% fetal calf serum (FCS) Xtra (Capricorn Scientific, Ebsdorfergrund, Germany, Cat#FBS-16A), 1% penicillin-streptomycin [50 U/ml penicillin, 50 μ g/ml streptomycin] (Gibco™, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA, Cat#151401222), and transferred to 12-well plates (Greiner Bio-One, Kremsmünster, Austria, Cat#655180) or 96-well plates (Greiner Bio-One, Cat#655180) on the day of the experiment. To generate THP-1 cell-derived macrophages of M0-, M1-, and M2-like phenotypes, cells were seeded in T-75 cell culture flasks (6 x 10⁶ cells/flask) with RPMI-1640 medium. Cells were differentiated using 50 nM PMA (Thermo Fisher Scientific, Cat#P1585) according to a previously described protocol (16) resulting in cells with macrophage-like properties, such as increased cell adherence and a reduced proliferation rate compared to monocytic THP-1 cells (65). The protocol for the polarization to M1-like macrophages has also been published (16). Briefly, cells were cultured in medium supplemented with 10 ng/ml LPS (*Escherichia coli*, O111:B4, Sigma-Aldrich, Merck, Cat#L2630) and 10 ng/ml interferon (IFN)- γ (R&D Systems, Minneapolis, USA, Cat#285-IF) for 48 h (16). For polarization to M2-like macrophages, the medium was supplemented with 20 ng/ml IL-4 (Preprotec, Thermo Fisher Scientific, Cat#200-04) and 20 ng/ml IL-13 (Gibco™, Preprotec, Thermo Fisher Scientific, Cat#200-13). On day 5 of differentiation, cells in T-75 cell culture flasks were washed with Dulbecco's phosphate buffered saline (PBS, Sigma-Aldrich, Merck, Cat#D8537), detached using TrypLE™ Express (Gibco™, Thermo Fisher Scientific, Cat#12605010) according to the

manufacturer's protocol, transferred to Eppendorf tubes (Sarstedt, Cat#72.691), 8-well cell culture chambers (Sarstedt, Cat#94.6170.802), 12-well plates or 96-well plates and cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) without glucose, glutamine and phenol red (Gibco™, Thermo Fisher Scientific, Cat#A1443001) supplemented with 10% heat-inactivated FCS Xtra, 2 mM D-glucose (Carl Roth, Karlsruhe, Germany, Cat#X997.1), 1 mM L-glutamine (Sigma-Aldrich, Merck, Cat#G3126), 1% penicillin-streptomycin. For all experiments the same batch of FCS Xtra was used and heat-inactivation was done according to the manufacturer's protocol, as FCS contains active deoxyribonuclease (DNases) that can degrade extracellular traps (66).

Isolation of primary human and bovine monocytes

Primary human monocytes were obtained by positive and negative selection protocols. For positive selection, buffy coats from healthy female and male donors ($n = 6$) of the Center of Transfusion Medicine and Hemotherapy (JLU Giessen) and the University Hospital of Giessen and Marburg (UKGM), were used. The protocol for positive selection of primary human monocytes was based on a previously published method (67). Briefly, 15 ml of buffy coats were diluted 1:1 with RPMI-1640 medium (Sigma-Aldrich, Cat#R5886), supplemented with 5% FCS (Biochrom GmbH, Berlin, Germany, Cat#S0115), 2 mM L-glutamine (Sigma-Aldrich, Merck, Darmstadt, Germany, Cat#G7513), 1 mM sodium pyruvate (Sigma-Aldrich, Merck, Cat#S8636), 1 mM minimum essential medium (MEM) non-essential amino acid solution (Sigma-Aldrich, Merck, Cat#M7145) and 1% penicillin-streptomycin (Sigma-Aldrich, Merck, Cat#P1333), transferred to 15 ml Biocoll® separation solution (Biochrom GmbH, Cat#L6115, density: 1.077 g/ml), and centrifuged [2500 $\times$ g, without brake, 30 min, room temperature (RT)]. The ring containing peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) was carefully collected and cells were washed three times by filling up to a volume of 30 ml with MACS® separation buffer (Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Germany, Cat#130-091-222) containing 2% bovine serum albumin (BSA; Miltenyi Biotec GmbH, Cat#130-091-376) followed by centrifugation (1500 $\times$ g, 7 min, 4 °C). The supernatant was discarded and the PBMC pellet was resuspended in 5 ml MACS® separation buffer containing 2% BSA and subjected to positive selection for CD14⁺ monocytes using immunomagnetic human CD14⁺ MicroBeads® (Miltenyi Biotec GmbH, Cat#130-050-201). Briefly, 2.5×10^6 PBMCs and 500 μ l CD14⁺ MicroBeads® were incubated in a total volume of 2.5 ml MACS® separation buffer containing 2% BSA for 15 min at 4 °C. CD14⁺ monocytes were isolated using LS® columns (Miltenyi Biotec GmbH, Cat#130-042-401) and QuadroMACS™ separators (Miltenyi Biotec GmbH, Cat#130-090-976) according to the manufacturer's protocol.

Isolated human monocytes were resuspended in cold RPMI-1640 medium, supplemented with 5% FCS, 2 mM L-glutamine, 1 mM sodium pyruvate, 1 mM MEM non-essential amino acid solution and 1% penicillin-streptomycin (all Sigma-Aldrich) and stored on ice until experiments.

For negative selection, human peripheral blood was obtained from healthy female and male adult donors ($n = 6$) via antecubital venipuncture and collected in a heparinized syringe (Heparin-Natrium-5000-ratiopharm®, ratiopharm, Ulm, Germany) containing 1 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA; Applichem, Darmstadt, Germany, Cat#A-1105) per one ml blood. Monocytes were isolated from whole blood using the RosetteSep™ human Monocyte Enrichment Cocktail (Stemcell Technologies, Cologne, Germany, Cat#15068) and Lymphoprep™ density gradient (Stemcell Technologies, Cat#18060), following to the manufacturer's protocol. Monocytes were resuspended in cold RPMI-1640 medium (Capricorn Scientific, Cat#RPMI-ADV), supplemented with 1% penicillin-streptomycin (Gibco™, Thermo Fisher Scientific, Cat#15140-122) and stored on ice until performing experiments. The purity of monocytes was confirmed to be > 70% by flow cytometry analysis (FCA) as previously described (16).

For the isolation of primary bovine monocytes, healthy adult dairy cows ($n = 6$) served as blood donors. Peripheral blood was obtained by jugular venipuncture and collected in heparinized tubes (Kabe Labortechnik GmbH, Nümbrecht-Elsenroth, Germany, Cat#041551). The modified protocol for the isolation of primary bovine monocytes was based on previously published methods (23, 68, 69). In brief, 50 ml blood was centrifuged (1260 $\times$ g, without brake, 30 min, RT). Then 10 ml plasma plus the ring containing PBMCs was collected. The plasma phase was filtered through a 0.45 μ m filter (Sarstedt, Cat#83.1826) and incubated for 1 h in a 2% gelatin-coated T-75 flask at 37 °C and 5% CO₂. For gelatin coating, the T-75 flask was incubated the day before with 2% gelatin solution (Sigma-Aldrich, Merck, Cat#G1890) for 2 h at 37 °C and 5% CO₂, the supernatant was removed, and the T-75 flask was dried overnight in the same conditions. The PBMCs were resuspended in 30 ml PBS containing 0.02% EDTA, transferred to 15 ml Histopaque®-1077 separation solution (Sigma-Aldrich, Merck, Cat#10771, density: 1.077 g/ml) and centrifuged (1500 $\times$ g, without brake, 30 min, 4 °C). The ring containing PBMCs was collected, and cells were washed two times by filling up to a volume of 50 ml with PBS containing 0.02% EDTA followed by centrifugation (400 $\times$ g, 7 min, 4 °C). The supernatant was discarded and PBMCs were resuspended in 10 ml of pre-warmed RPMI-1640 medium (Sigma-Aldrich, Merck, Cat#R8758) supplemented with 1% penicillin and streptomycin (Gibco™, Thermo Fisher Scientific, Cat#151401222). The supernatant of incubated plasma in the T-75 flask was removed and the T-75 flask was washed once with pre-warmed RPMI-1640 medium supplemented with 1% penicillin-streptomycin. The PBMC suspension was transferred to the washed T-75 flask and incubated for 1 h at 37 °C and 5% CO₂. Non-adherent cells were removed by

rinsing the flask once with pre-warmed RPMI-1640 medium supplemented with 1% penicillin-streptomycin. Monocytes were detached by addition of 10 ml 10 mM EDTA suspended in Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS) without sodium bicarbonate, calcium and magnesium (Corning®, USA, New York, Cat#20-021-CVR) for 10 min at 37 °C and 5% CO₂, centrifuged (400 x g, 10 min, 4°C), resuspended in cold RPMI-1640 medium supplemented with 1% penicillin-streptomycin, and stored on ice. A commercially available mouse anti-bovine CD172a antibody (Bio-Rad Laboratories, Feldkirchen, Germany, Cat#MCA2041GA) was used to stain primary bovine monocytes, resulting in a purity of > 90% for CD172⁺ monocytes (Supplementary Figure S1).

In vitro culture of *Toxoplasma gondii* tachyzoites

Vital tachyzoites of *T. gondii* (RH strain) were isolated from continuous passages on African green monkey kidney epithelial (MARC)-145 cells using DMEM (Sigma-Aldrich, Merck, Cat#D6429) supplemented with 5% FCS, 1% penicillin-streptomycin (Gibco™, Thermo Fisher Scientific, Cat#151401222). *T. gondii* tachyzoites released from host cell cultures were separated from cell detritus by centrifugation (460 x g, 1 min, RT). Supernatants containing *T. gondii* tachyzoites, were filtered (5 µm pore sized filters, Satorius, Göttingen, Germany, Minisart®, Cat#17594-K) and pelleted (460 x g, 5 min, RT). The harvested *T. gondii* tachyzoites were counted in a Neubauer chamber, suspended in medium, and used for co-incubation with primary human or bovine monocytes as well as monocytic THP-1 cells or THP-1 cell-derived M0-, M1-, and M2-like macrophages. All experiments were performed at 37 °C and 5% CO₂ atmosphere, with a multiplicity of infection (MOI) of 1:4 (cells: parasites), and a co-incubation period of 4 h.

Scanning electron microscopy

In total, 2.5×10^5 primary human or bovine monocytes as well as monocytic THP-1 cells or THP-1 cell-derived M0-, M1-, and M2-like macrophages were either left untreated or co-cultured for 4 h with 1×10^6 *T. gondii* tachyzoites on 10 mm coverslips (Carl Roth, Cat#KH4.1) pre-coated with 0.01% poly-L-lysine (Sigma-Aldrich, Cat#4707) in 12-well plates. After incubation, cells were fixed in 2.5% glutaraldehyde (Sigma-Aldrich, Merck, Cat#G6257), post-fixed in 1% osmium tetroxide (Polysciences Inc., Warrington, Pennsylvania, USA, Cat#0223B-10), washed in purified water critical point-dried using CO₂ treatment, and sputtered with gold particles. The samples were analyzed using a Philips XL30 microscope (Amsterdam, Netherlands) at the Institute of Anatomy and Cell Biology (JLU Giessen). Brightness and contrast were processed in a standardized way using Image J software, Fiji 1s Just ImageJ (Fiji) version (70). The percentage of protrusion positive cells was calculated for each primary monocyte donor, using a cell range of 282 to 796 for human cells and 465 to 1871 for

bovine cells. Cells were classified as protrusion positive by the presence of filopodia and cytonemes.

Pappenheim staining

1×10^5 THP-1 cell-derived M0-, M1-, and M2-like macrophages were either left untreated or co-cultured with 4×10^5 *T. gondii* tachyzoites in 8-well cell culture chambers for 4 h and fixed with 4% formaldehyde (Carl Roth, Cat#CP10.4) diluted in PBS for 15 min at RT. Samples were gently washed three times with PBS. For staining, the cells were treated with May-Grünwald's eosine-methylene blue solution (Sigma-Aldrich, Merck, Cat#1.01424) for 2 min, distilled water for 5 min, Giemsa's azur eosin methylene blue solution (1:20, Sigma-Aldrich, Merck, Cat#1.09204) for 15 min, distilled water for 10 min, and air dried at RT. Specimens were documented using a Leica DM IL LED microscope equipped with a Leica Flexcam C3 (Wetzlar, Germany). Brightness and contrast were processed in a standardized way using Image J software, Fiji version (70).

Transmission electron microscopy

1×10^7 M1-like macrophages were either left untreated or co-cultured with 4×10^7 *T. gondii* tachyzoites in an Eppendorf tube for 4 h and centrifuged (1000 x g, 10 min, RT). The cell pellet was fixed in 2.5% glutaraldehyde and 1.5% formaldehyde diluted in 0.3 M 4-(2-hydroxyethyl)piperazine-1-ethanesulfonic acid buffer (HEPES, pH 7.35, Sigma-Aldrich, Merck, Cat#H4034) and stored at 4 °C according to Brinkmann et al., 2004 and Behrendt et al., 2008 (25, 71). The cell pellet was washed and post-fixed in 0.15 M HEPES buffer containing 1% osmium tetroxide. After thorough washing in distilled water, the samples were incubated overnight in 2% aqueous uranyl acetate dihydrate (Merck, Cat#8473) at RT, dehydrated in ethanol (Sigma-Aldrich, Merck, Cat#32205-M), and embedded in an epoxy resin using the Agar 100 Resin Kit (Agar Scientific, Essex, UK Cat#AGRI031). Ultrathin sections were mounted on grids and examined using a TEM Zeiss 902 (Oberkochen, Germany) at the Institute of Anatomy and Cell Biology (JLU Giessen). Brightness and contrast were processed in a standardized way using Image J software, Fiji version (70).

Visualization of monocyte/macrophage extracellular traps via conventional and confocal immunofluorescence microscopy

1.5×10^5 primary human or bovine monocytes as well as monocytic THP-1 cells or THP-1 cell-derived M0-, M1-, and M2-like macrophages were either left untreated, co-cultured for 4 h with 6×10^5 *T. gondii* tachyzoites or stimulated with A23187 [5 µM] (Sigma-Aldrich, Merck, Cat#C7522) or nigericin [0.5 µM] (sodium salt, Sigma-Aldrich, Merck, Cat#N7143) on 15 mm coverslips (Carl

Roth, Cat#P232.1) pre-coated with 0.01% poly-L-lysine in 12-well plates, fixed in 4% formaldehyde diluted in PBS, and stored at 4°C until further use. The fixed samples were washed three times with PBS, blocked in blocking/permeabilization solution [PBS containing 3% BSA (Sigma-Aldrich, Merck, Cat#A7906) and 0.3% Triton X-100 (Sigma-Aldrich, Merck, Cat#T8787)] for 1 h at RT and reacted with primary antibodies in blocking/permeabilization solution overnight at 4 °C. Anti-histone antibodies (clone H11-4, Sigma-Aldrich, Merck, Cat#MAB3422) and anti-myeloperoxidase (MPO) antibodies (Biorbyt, Cambridge, UK, Cat#orb16003) were used to detect corresponding proteins on extruded METs. After three washings with PBS, samples were incubated in a secondary antibody blocking/permeabilization solution (Alexa Fluor 594 goat anti-mouse IgG, Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific, Cat#A11005) for 30 min at RT. Finally, the samples were washed three times with PBS. Coverslips were mounted on microscope slides (Glaswarenfabrik KarlHecht GmbH & Co. KG, Sondheim, Germany, Cat#42400010) with Fluoromount-G™ (Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific, Cat#00-4959-52) to stain DNA with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) and incubated for 48 h at RT. To visualize METs, specimens were analyzed using an Olympus IX81 microscope (Tokyo, Japan) equipped with an Excelitas X-Cite 120PC Q fluorescence illuminator (Pittsburgh, Pennsylvania, USA) and an Olympus XM-10-R digital camera. Confocal microscopy was performed using a Nikon Eclipse Ti2-A microscope (Tokyo, Japan) equipped with a ReScan® confocal unit (RCM 1.1 Visible, Confocal.nl, Amsterdam, Netherlands). The confocal microscope was equipped with a 50 µm pinhole, a Nikon motorized Z-stage (D11500), and a Topica CLE laser (Graefelfing, Germany) with the following excitation modes: blue/DAPI/405 nm, green/fluorescein-5-isothiocyanate (FITC)/488 nm, and red/AlexaFluor594/561 nm. An Excelitas sCMOS® camera (PCO edge) was used for documentation and the instrument was operated using NIS-Elements software (version 5.11, Nikon). Z-series were displayed as maximum z-projections and gamma, brightness and contrast were processed in a standardized way using Image J software, FIJI version (70).

Quantification of extracellular DNA

5×10^4 primary human or bovine monocytes as well as 1×10^5 monocytic THP-1 cells or THP-1 cell-derived M0-, M1-, and M2-like macrophages were either left untreated, co-cultured for 4 h with 2×10^5 or 4×10^5 *T. gondii* tachyzoites or stimulated with A23187 [5 µM] or nigericin [0.5 µM] in 96-well plates (Greiner Bio-One, Cat#655180). After incubation, Sytox Green [5 µM] (Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific, Cat#S7020) was added to all samples to stain extDNA followed by centrifugation (400 x g, 5 min, RT). The supernatants were collected carefully to fresh 96-well plates and measured at an excitation wavelength of 488 nm using a Clariostar Plus plate reader and MARS data analysis software (version 4.20, both BMG Labtech, Ortenberg, Germany).

Quantification of nuclear area expansion and MET positive cells

1.5×10^5 primary human or bovine monocytes as well as monocytic THP-1 cells or THP-1 cell-derived M0-, M1-, and M2-like macrophages were either left untreated, co-cultured for 4 h with 6×10^5 *T. gondii* tachyzoites or stimulated with A23187 [5 µM] or nigericin [0.5 µM] on 15 mm coverslips pre-coated with 0.01% poly-L-lysine in 12-well plates, fixed in 4% formaldehyde in PBS, and stored at 4 °C until further use. Fixed samples were washed three times with PBS, blocked in blocking/permeabilization solution for 1 h at RT, and washed three times with PBS. Coverslips were mounted on microscope slides with Fluoromount-G™ to stain DNA with DAPI and incubated for 48 h at RT. Cell nuclei were visualized using a Keyence BZ-X800 microscope (Osaka, Japan) and measurements were performed using the Keyence BZ-X800 analyzer software (version 1.1.2.4). The average nuclear area of DAPI-stained DNA was calculated for each cell donor/passage using a field of 5.290×3.968 mm. The percentage of MET positive cells was determined by analyzing 1250 cells per condition. Cells were classified as MET positive by the presence of extracellular, fibre-like DNA structures outside the cell area.

Measurement of cytokine release via ELISA

1×10^5 primary human or bovine monocytes as well as monocytic THP-1 cells or THP-1 cell-derived M0-, M1-, and M2-like macrophages were seeded into 96-well plates. Cells were either left untreated, co-cultured with 4×10^5 *T. gondii* tachyzoites in the presence or absence of LPS [1 µg/ml] or treated with the known chemical activators of MET release A23187 [5 µM] or nigericin [0.5 µM] for 4 h. To proof that the used cells responded with IL-1β release to classical NLRP3 activation stimuli, cells were first primed with LPS for 3.5 h followed by exposure for 40 min to 2'/3'-O-(4-benzoylbenzoyl)adenosine-5'-triphosphate, tri(triethylammonium) salt (BzATP) [200 µM] (Jena Bioscience, Jena, Germany, Cat#NU-1620) or nigericin [25 µM] in the absence of *T. gondii* tachyzoites. Thereafter, the cells were centrifuged (500 x g, 8 min, 4 °C) and the cell-free supernatants were collected and stored at -20 °C for further use. IL-1β and IL-6 concentrations were measured in cell supernatants using the human IL-1 beta/IL-1F2 DuoSet enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA; R&D Systems, Cat#DY201; assay range: 3.9 – 250 pg/ml) and the human IL-6 DuoSet ELISA (R&D Systems, Cat#DY206; assay range: 9.4 – 600 pg/ml) or the bovine IL-1 beta Uncoated ELISA Kit (Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific, Cat#ESS0027) and the bovine IL-6 Uncoated ELISA Kit (Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific, Cat#ESS0029).

To estimate the proportion of dead primary human or bovine monocytes as well as monocytic THP-1 cells or THP-1 cell-derived M0-, M1-, and M2-like macrophages, lactate dehydrogenase (LDH) activity was measured in the cell culture supernatants according to the supplier's instructions of the CytoTox 96® Non-Radioactive

Cytotoxicity Assay (Promega, Madison, Wisconsin, USA; Cat#G1780) using a EpochTM Microplate Spectrophotometer (BioTek Instruments, Inc., Vermont, USA). The LDH activities determined in the cell-free supernatants are expressed as a percentage of the total LDH activity of the lysed control cells.

Detection of monocytic TLR2, TLR4, CD11b and F-actin by flow cytometry

5×10^5 primary human and bovine monocytes were left in plain medium or co-cultured for 4 h with 2×10^6 *T. gondii* tachyzoites in cell culture Petri dishes (Sarstedt, Cat#83.3902.500) (primary human monocytes) or in Eppendorf tubes (primary bovine monocytes), and thereafter fixed in 0.7% formaldehyde (primary human monocytes) or BD Cytotfix (Franklin Lakes, New Jersey, USA, Cat#554722) (primary bovine monocytes). In case of primary human monocytes, the samples were washed in PBS containing 2% FCS and incubated for 10 min on ice with 10% heat-inactivated human serum to block Fc-receptors. Samples were washed with PBS containing 2% FCS and labelled with antibodies raised against CD11b (1:50, ImmunoTools GmbH, Friesoythe, Germany, Cat#21279116X3), TLR2 (1:10, BioLegend[®], San Diego, USA, Cat#309708) or TLR4 (1:10, BioLegend[®], Cat#312806) according to the manufacturer's protocol. F-actin was detected by phalloidin coupled with Alexa 488 (abcam[®], Cambridge, UK, Cat#ab176753). The stained cells were washed twice in PBS containing 2% FCS, centrifuged ($1500 \times g$, 7 min, 4°C), resuspended in 0.5 ml PBS containing 2% FCS, and analyzed using a BD AccuriTM C6 flow cytometer (BD Biosciences, Heidelberg, Germany). In case of primary bovine monocytes, the samples were washed in PBS containing 1% BSA and labelled with antibodies raised against CD11b (BD, Cat#553312), TLR2 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, California, USA, Cat#HCA152A647) or TLR4 (Bio-Rad Laboratories, Cat#MCA2061A647) in a dilution of 1:100 according to the manufacturer's protocol. F-actin was detected by phalloidin coupled with Alexa 488. The stained cells were washed in PBS containing 1% BSA, centrifuged ($600 \times g$, 10 min, 4°C), resuspended in 0.4 ml PBS containing 1% BSA, analyzed using a BD AccuriTM C6 flow cytometer. In the cell/parasite suspension, no discrimination between infected cells vs. uninfected cells was performed. The gating strategy and fluorescence intensity profiles for primary human and bovine monocytes are shown in [Supplementary Figure S2](#) and [Supplementary Figure S3](#).

Statistical analyses

Data were presented as mean $\pm$ standard deviation (SD) or median $\pm$ interquartile range (75th and 25th percentiles) using GraphPad Prism[®] (version 10.2.3, GraphPad Software, Boston, Massachusetts, USA). Data analysis was performed using SAS[®] statistical software (version 9.4, Statistical Analysis System Institute, Cary, North Carolina, USA). For all experiments, the

number (n) refers to independent experiments performed on different days and different cell passages/blood donors. Outliers were not excluded from the analyses. The statistical tests used for individual data sets are indicated in the legends of the respective figures.

Results

Differential microscopic analyses illustrate activation of mononuclear phagocytes within 4 h of exposure to *T. gondii* tachyzoites

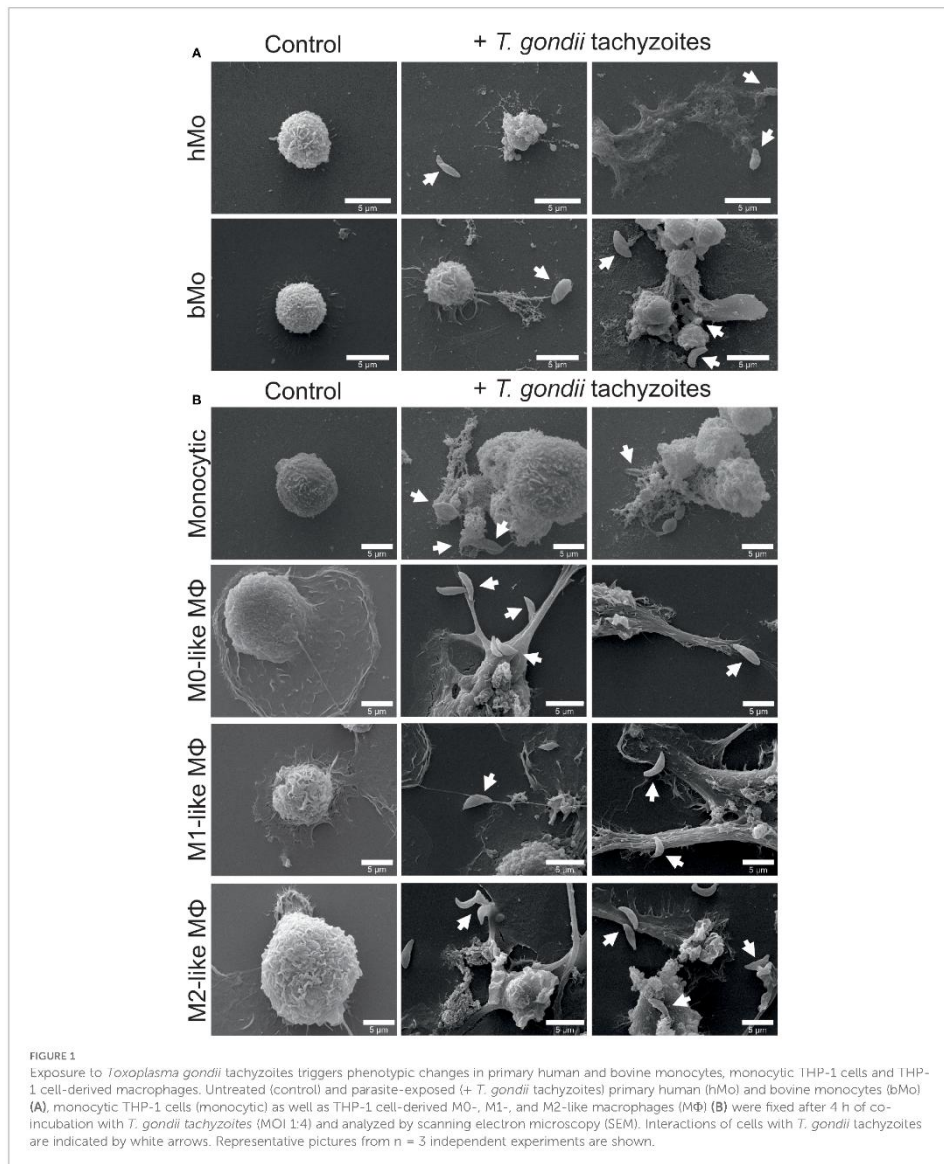
A panel of microscopic analyses was performed to investigate early responses of mononuclear phagocytes to *T. gondii* tachyzoites. To compare findings obtained from primary human and bovine monocytes, the human monocytic THP-1 cell line was analyzed in parallel.

In SEM analyses, primary untreated (control) human and bovine monocytes revealed typical spherical shapes and surfaces with little cytoplasmic spreading and ruffling ([26, 72](#)) ([Figure 1A](#)).

SEM images show that both primary human and bovine monocytes exhibit morphological changes (e.g. protrusion) upon exposure to the parasite, similar to those observed in other mononuclear phagocytes ([Figure 1A](#), [Supplementary Figure S4](#)) ([73–75](#)). Compared with non-stimulated primary human and bovine monocytes, *T. gondii* tachyzoites induced cytoplasmic spreading, cell surface ruffling, formation of membrane protrusions by filopodia and cytonemes, and MET formation. The release of METs was accompanied by an extrusion of a large amount of cell debris as well as parasite entrapment, thereby probably corresponding to 'suicidal METosis' ([Figure 1A](#)). Untreated monocytic THP-1 cells presented a round-shaped and loosely attached phenotype, while THP-1 cell-derived macrophages had an irregular expanded surface and showed pronounced adhesion capacity ([Figure 1B](#)). Exposure to *T. gondii* tachyzoites induced membrane protrusions, mainly consisting of filopodia ([Figure 1B](#)). Similar results were found in Pappenheim-stained THP-1 cell-derived macrophages ([Supplementary Figure S5](#)).

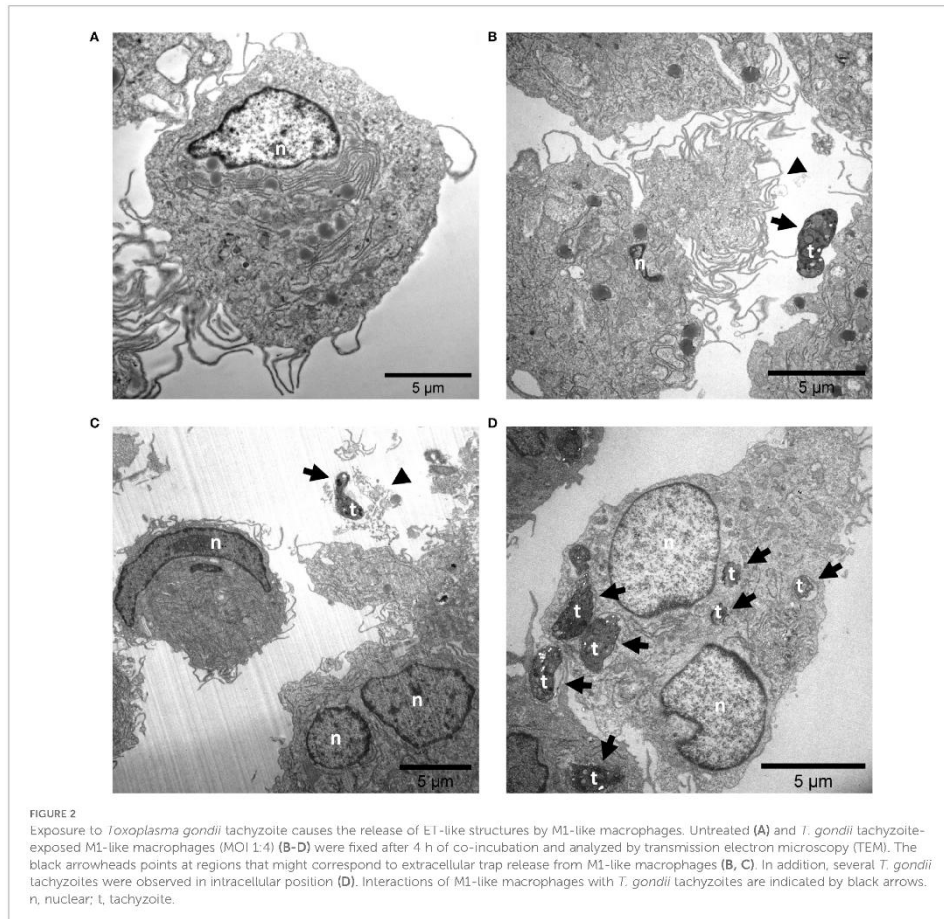
In addition, TEM analyses were performed and confirmed the typical ultrastructure of THP-1 cell-derived macrophages ([Figure 2](#)) ([76](#)). THP-1 cell-derived M1-like control macrophages exhibited an amoeboid shape and a large number of cytoplasmic granules, vesicles and vacuoles ([Figure 2A](#)). *T. gondii* exposure induced cell protrusions ([Figure 2B](#)). Moreover, ET-like structures, which contained and eventually trapped *T. gondii* tachyzoites, were observed in juxtaposition to M1-like macrophages ([Figures 2B, C](#)). Besides, several intracellular *T. gondii* tachyzoites were found, partially enclosed by a distinct membrane, resembling that of phagolysosomes or parasitophorous vacuoles (PV) ([Figure 2D](#)).

Immunofluorescence microscopy illustrated filamentous structures showing the co-localization of extDNA with classical ET markers like histone and MPO and thereby confirmed METs



being released in response to *T. gondii* tachyzoites from all, primary human and bovine monocytes, monocytic THP-1 cells, and THP-1 cell-derived macrophages (Figures 3A, B; Supplementary Figure S6; Supplementary Figures S7A, B). When quantifying % of MET

positive cells, only minor tachyzoite-driven effects were detected (Figures 3A, B). The weak or lack of a significant induction of parasite-driven METs indicated that MET release from primary human and bovine monocytes as well as all kinds of THP-1 cells,

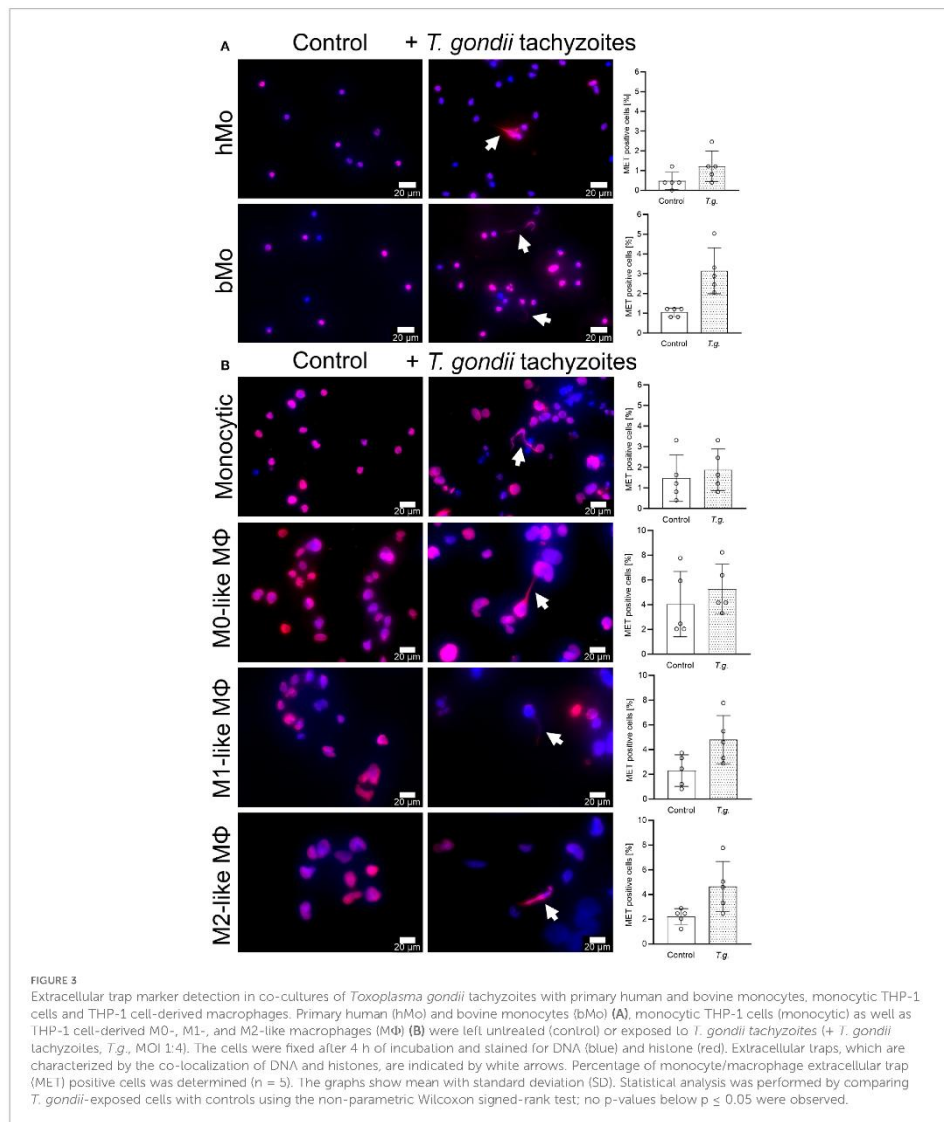


was a rare event (Figures 3A, B). Similar results were obtained by using the MET inducers A23187 (5 µM, 4 h) and nigericin (0.5 µM, 4 h) (Supplementary Figures S8A, B) (20, 36).

In line with the fluorescence microscopic data, neither nuclear area expansion (NAE) estimation (Supplementary Figure S9) nor fluorometric determination and quantification of extDNA (Figure 4) showed a tachyzoite-driven upregulation of METosis in primary human and bovine monocytes, monocytic THP-1 cells, and THP-1 cell-derived macrophages. As expected, stimulation with the positive controls A23187 [5 µM] and nigericin [0.5 µM] (20, 36) significantly induced extDNA release by monocytic THP-1 cells and THP-1 cell-derived macrophages ($p \leq 0.05$; $n = 5$; Figures 4C–F).

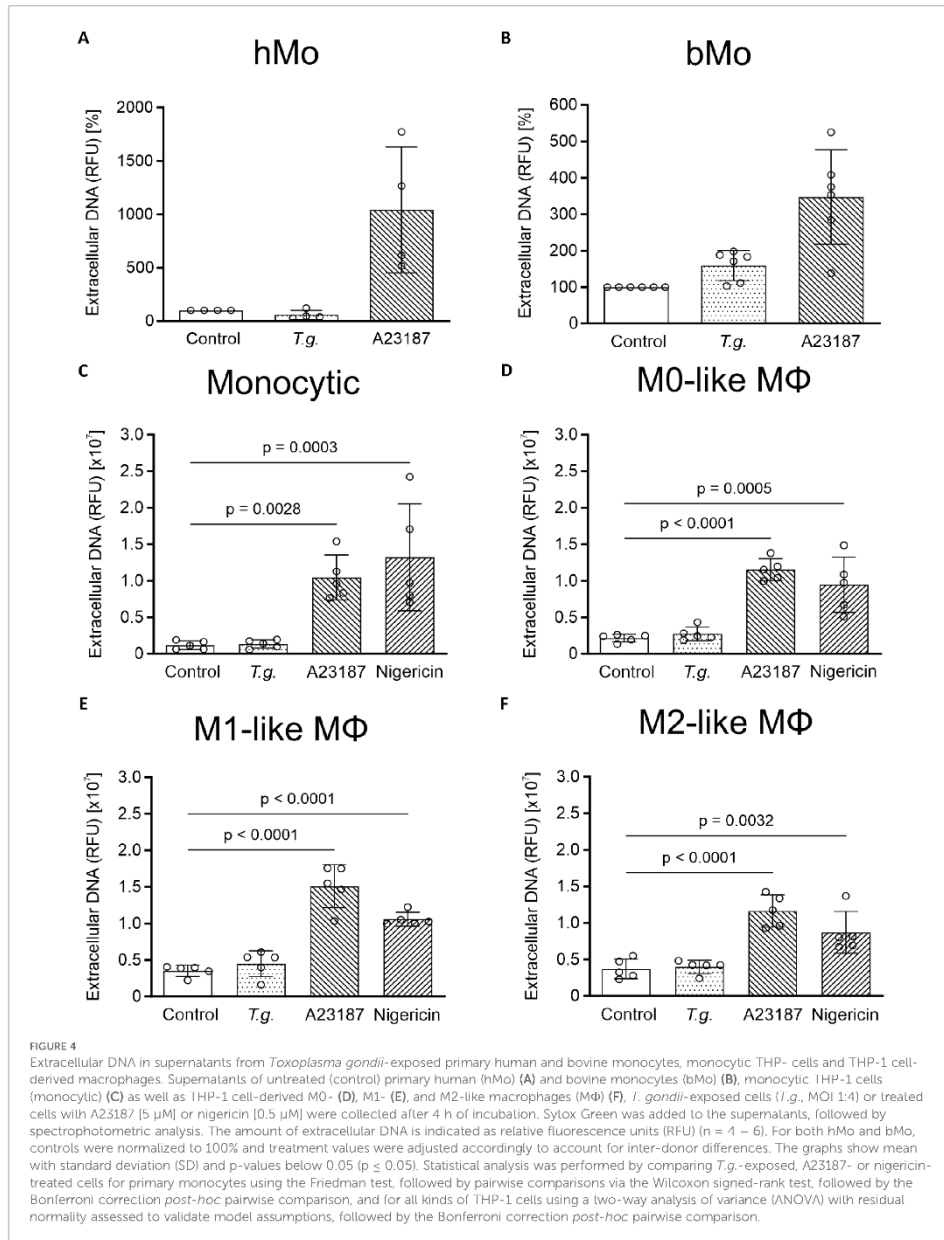
Effects of *T. gondii* tachyzoite exposure on release of IL-1 β and IL-6

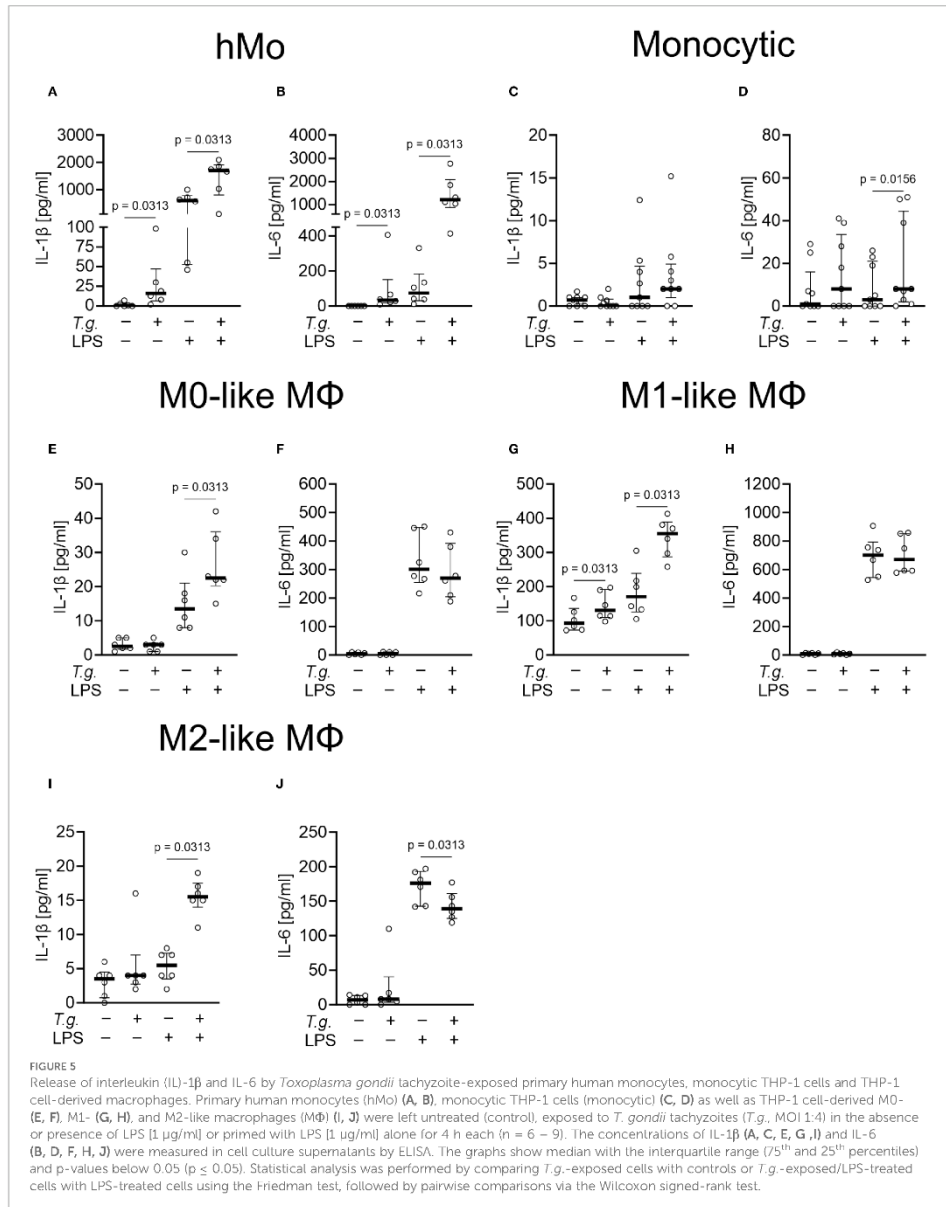
Activation of mononuclear phagocytes by pathogens can lead to the release of pro-inflammatory cytokines (13). Here, we investigated if the early response of monocytes and macrophages involves secretion of pro-inflammatory cytokines. To determine the release of the pro-inflammatory cytokines IL-1 β and IL-6 by primary human monocytes, monocytic THP-1 cells, and THP-1 cell-derived M0-, M1-, and M2-like macrophages were exposed to *T. gondii* tachyzoites in absence or presence of LPS (Figure 5). We here focused on human mononuclear phagocytes, since commercial



ELISAs for the bovine system did not produce plausible results and were therefore discarded (data not shown). Untreated primary human monocytes released low amounts of IL-1 β ranging from < 3.9 to 7 pg/ml and IL-6 < 9.4 pg/ml (n = 6) (Figures 5A, B). Similar results were found for untreated monocyctic THP-1 cells with IL-1 β levels from < 3.9 pg/ml and IL-6 from < 9.4 to 29 pg/ml (n = 9) (Figures 5C, D). *T. gondii* tachyzoites enhanced the release of IL-1 β

(from < 3.9 to 98 pg/ml) and of IL-6 (from < 9.4 to 406 pg/ml) by primary human monocytes ($p \leq 0.05$; n = 6) (Figures 5A, B) but had no effect on IL-1 β and IL-6 secretion by monocyctic THP-1 cells (Figures 5C, D). Only in M1-like macrophages, exposure to *T. gondii* tachyzoites enhanced the release of IL-1 β ranging from 13 to 125 pg/ml ($p \leq 0.05$; n = 6) but had no effect on IL-6 release (Figures 5G, H).





Interestingly, exposure to *T. gondii* tachyzoites induced additive effects in LPS-primed cells. While LPS-primed primary human monocytes released IL-1 β ranging from 46 to 996 pg/ml and IL-6 ranging from 11 to 331 pg/ml, *T. gondii* tachyzoites exposure increased IL-1 β release (from 105 to 2087 pg/ml) and IL-6 (from 413 to 2772 pg/ml) ($p \leq 0.05$; $n = 6$) (Figures 5A, B). Similarly, the LPS-induced release of IL-1 β by THP-1 cell-derived macrophages (M0-like: ranging from 8 to 30 pg/ml; M1-like: ranging from 105 to 305 pg/ml; M2-like: ranging from < 3.9 to 8 pg/ml) was increased by tachyzoites exposure with the highest levels detected in supernatants of M1-like macrophages (ranging from 156 to 329 pg/ml; $p \leq 0.05$; $n = 6$) (Figures 5E, G, I). Interestingly, no impact of *T. gondii* tachyzoites exposure was detected on LPS-induced IL-6 release by M0- and M1-like macrophages (Figures 5F, H). A moderate increase of IL-6 release was detected in LPS-primed monocytic THP-1 cells (ranging from < 9.4 to 26 pg/ml; $p \leq 0.05$; $n = 9$) (Figure 5D), whereas a diminished IL-6 secretion was detected in LPS-primed M2-like macrophages ($p \leq 0.05$; $n = 6$) (Figure 5J). Of note, the parasite-driven enhancement of IL-1 β release was not due to monocyte or macrophage cell death since LDH values remained low (< 10% increase) in all experimental settings ($n = 6 - 9$) Supplementary Table S1).

To prove that the used cells responded with IL-1 β release to classical NLRP3 activation, stimuli BzATP [200 μ M] or nigericin [25 μ M] were used as positive controls. For this purpose, the cells were first primed with LPS for 3.5 h followed by exposure for 40 min to BzATP [200 μ M] or nigericin [25 μ M]. As expected (77), all tested human mononuclear phagocytes responded with an increased release of IL-1 β with the highest levels detected in supernatants of M1-like macrophages (ranging from 427.0 to 2899.0 pg/ml; $n = 6$) (Supplementary Table S2). In addition, we tested the effects of the MET inducers A23187 [1 μ M] and nigericin [0.5 μ M] after 4 h of incubation (Supplementary Table S2). Of note, high values of cell death were estimated in the presence of A23187 and nigericin with a maximum of 80% cell death in M1-like macrophages treated with A23187 (Supplementary Table S2).

Taken together, the current data suggest that exposure to *T. gondii* tachyzoites activates primary human monocytes and fosters the release of pro-inflammatory cytokines. We found subtype-specific differences in the THP-1 cells, with THP-1 cell-derived M0- and M1-like macrophages as responding cells to *T. gondii* tachyzoites exposure.

Tachyzoite exposure does not affect TLR2, TLR4, F-actin, and CD11b expression in primary human and bovine monocytes

It was shown before, that TLR2 and TLR4 expression on bovine neutrophils increased when confronted with the apicomplexan parasite *Eimeria bovis* (78). In addition, *T. gondii*-derived GPI proteins showed TNF- α production dependent on TLR2 and TLR4 on mice macrophages (79). Thus, we here evaluated the changes in TLR2 and TLR4 in primary human- and bovine monocytes exposed to *T. gondii* tachyzoites for 4 h. The results showed no significant differences ($p \geq 0.05$, $n = 4 - 6$) when

compared with the unexposed controls (Supplementary Figure S10). In addition, the cellular membrane expression of CD11b and F-actin polymerization, known factors involved in parasite phagocytosis and immune cell migration was analyzed (80). In the context of primary human and bovine monocyte activation by *T. gondii* exposure no significant changes were observed between the unexposed and the *T. gondii*-exposed cells ($p \geq 0.05$; $n = 4 - 6$) (Supplementary Figure S10).

Discussion

In the present study, we focused on early immune responses of human and bovine mononuclear phagocytes against vital *T. gondii* tachyzoites on the level of morphological changes, MET release, pro-inflammatory cytokine secretion and surface receptor expression. In addition to freshly isolated primary human and bovine monocytes, we used monocytic THP-1 cells and THP-1 cell-derived macrophages, that are widely used in research and represent well-accepted *in vitro* models for human mononuclear phagocytes (30, 32). Despite the critical role of monocytes and macrophages in early innate reactions, investigation on monocyte-derived immune response against protozoan and metazoan parasites is still an understudied topic in both human and veterinary medicine. Thus, their role in the context of toxoplasmosis remains unclear (81). Of note, one report on *T. gondii* tachyzoite-driven MET formation in harbour seal (*Phoca vitulina*) exists (18).

Exposure to *T. gondii* tachyzoites induced morphological changes in investigated monocytes and macrophages, including cytoplasmic spreading, cell surface ruffling, and the formation of membrane protrusions by filopodia and cytonemes, as well as MET formation.

These findings are in line with previous research showing that *T. gondii* infection triggers significant morphological and functional changes in various mononuclear phagocytes. Across different cell types, including dendritic cells, microglia, and macrophages, tachyzoite invasion consistently induces rapid cytoskeletal remodeling, characterized by podosome loss, cytoplasmic spreading, and the formation of membrane protrusions, which collectively contribute to a hypermigratory phenotype (73–75). The parasite effector TgWIP has been identified as a central mediator of these processes by modulating host cell migration (82), suggesting a conserved strategy by which *T. gondii* manipulates host immune cell behavior.

Like NETosis (83), the ability of primary monocytes to release METs in response to a variety of stimuli is a well-established effector mechanism (18–21, 23, 24, 26, 27, 29). As key players in the immune defense against toxoplasmosis, macrophages influence the host's ability to control the infection through their functional polarization (54, 84, 85). MET formation was already reported for monocytic THP-1 cells and THP-1 cell-derived M0-, and M1-like macrophages in response to a range of different stimuli e.g. chemicals, parasite and bacteria (17, 34–41). This is in principle in line with our findings in microscopic analyses (SEM, TEM, and

Pappenheim-staining), where amorphous extracellular material was associated with *T. gondii* tachyzoites exposure, eventually corresponding to MET formation. However, the nuclear membranes of *T. gondii*-exposed M1-like macrophages remained intact, suggesting that MET formation did not occur in the majority of these cells (86, 87). THP-1 cell-derived macrophages are capable of phagocytosis (30, 88–91) and we found beside extracellular presence, several tachyzoites also intracellularly in M1-like macrophages. However, our analyses cannot distinguish between phagocytosis and active tachyzoite infection. In future studies heat-inactivated *T. gondii* tachyzoites could be useful to further clarify this.

To unambiguously identify MET formation, we stained extracellular structures in immune cell-parasite co-cultures for classical ET markers e.g. DNA, histones and MPO. For positive controls, the ET-inducing stimulants A23187 and nigericin (20, 36) were used. Immunostaining experiments confirmed the presence of MET positive cells but in contrast to previous findings (20), this was an extremely rare event, even when the known MET inducers A23187 or nigericin were used as positive controls. By using another established spectrofluorometric method for measuring extDNA in cell culture supernatants (92), exposure to *T. gondii* showed no changes in all tested cells. Furthermore, A23187 treatment resulted in elevated levels of cell death, as indicated by increased LDH activity in the corresponding cell-free supernatants. Consequently, it is not possible to clearly distinguish between the effects attributable to MET formation and those resulting from cell death. In this context, Matsubara et al., 1994 have shown in six human leukemia cell lines that exposure to A23187 [1 μ M] induced cell apoptosis within 3 h (93), indicating that at least A23187 should be used as a positive control for MET formation with caution. We and others (20, 24, 36) used even higher concentrations and a longer exposure time. To further substantiate our findings, we next measured NAE, an established method to estimate the very early phase of ETosis (61, 94). Again, neither *T. gondii* exposure nor stimulation with A23187 or nigericin enhanced NAE and, thus, no significant induction of METosis was quantifiable.

In summary, our findings indicate that MET formation is a rather rare event and therefore most probably of minor importance in the early response of mononuclear phagocytes to *T. gondii* tachyzoites. Obviously, these data underline immune cell type-specific responses, since *T. gondii* tachyzoites were recently proven as potent ET inducers in primary neutrophils of human, bovine, murine, cat, dog, sheep, goat, bottlenose dolphin, and harbour seal origin (18, 87, 95–99).

As mentioned above, the role of IL-1 β and IL-6 in *T. gondii*-driven immune responses is controversial. In previous reports, the exposure of primary human monocytes to *T. gondii* tachyzoites after 4, 16 and 24 h induced the release of IL-1 β (53, 55, 57, 58) but not of IL-6 (59). *T. gondii* tachyzoite-induced release of IL-1 β (53, 55, 64) or IL-6 (62, 63) after 4, 8, 12, 24 h by monocytic THP-1 cells and THP-1 cell-derived M0-like macrophages was consistently demonstrated.

To gain further insights into monocyte- and macrophage-mediated immune responses during early *T. gondii* infection, we next examined the release of IL-1 β and IL-6. In addition to primary

human monocytes, we performed experiments on the THP-1 cell line, allowing controlled culture and treatment conditions. In line with previous studies (53, 55, 62–64), we found that exposure to *T. gondii* tachyzoites activates human mononuclear phagocytes and fosters the release of pro-inflammatory cytokines. Importantly, we found differences within the THP-1 cell subtypes. The THP-1 cell-derived M1-like macrophages reacted by an increased release of IL-1 β following exposure to *T. gondii*, and this effect was enhanced by addition of LPS. These data might indicate that parasite phagocytosis may result in a more pronounced cytokine response in M1-like macrophages, which is in accordance to previous studies (100, 101). In LPS-primed M2-like macrophages, a subtle but statistically significant decrease in IL-6 release was observed. A similar effect was described before for LPS-primed M0-like macrophages after stimulation with *T. gondii* lysate (102). Moreover, Salazar Gonzalez et al., 2014 showed that *T. gondii* profilin induced the release of IL-6 by primary human monocytes (61). A possible explanation for the contrasting findings could be the different experiment conditions (e.g. exposure times and MOI) used in different studies.

In line with previous studies (64, 98), here, we investigated the early responses of mononuclear phagocytes after 4 h of parasite exposure applying MOI of 1:4. Other studies observed an increased release of IL-1 β by monocytic THP-1 cells after 12 h (MOI 1:2) and 18 h (MOI 1:3) (53, 55) or by M0-like macrophages after 4 h (MOI 1:10) (64) exposure to the parasite. The use of different parasite strains is not expected to account for these differences, as the same *T. gondii* RH strain was used (55, 64). Investigating higher MOIs in combination with variable exposure times could, however, in future studies provide more comprehensive insight into innate host responses. As mentioned before, the release of IL-1 β typically requires a priming phase (to induce pro-IL-1 β expression) followed by a second stimulus (DAMPs, PAMPs) for cleavage and release of the mature IL-1 β (42–45). This could be an explanation for the observed enhanced IL-1 β release in LPS-primed M1-like macrophages. Studies using longer exposure times (53, 55) or higher infection rates (64) might favor the release of other DAMPs, which eventually results in activated IL-1 β secretion. Contamination of mononuclear phagocytes with LPS or damage-induced priming during the isolation process of primary cells might also pre-activate mononuclear phagocytes (103) and, thus, result in differences in their sensitivity to *T. gondii* tachyzoites. To validate the immunological activity of mononuclear phagocytes, we here included control experiments that assessed their responsiveness to well-characterized stimuli. By priming cells with LPS and subsequently treating them with a second stimulus (BzATP or nigericin), we induced cytokine secretion and evaluated the functional capacity of the cells. One of the key control experiments involved the use of the P2X7 receptor agonist BzATP and the pore-forming reagent nigericin to induce NLRP3 inflammasome activation. The NLRP3 inflammasome is a multi-protein complex that plays a crucial role in the innate immune response by promoting the maturation and secretion of pro-inflammatory cytokines, such as IL-1 β (104). Activation of the

NLRP3 inflammasome requires two signals: a priming signal, typically provided by PRRs agonists like LPS, and a second signal, which can be delivered by various DAMPs or PAMPs (42–45). BzATP, a stable adenosine triphosphate (ATP) analog, acts as an agonist for the P2X7 receptor, which is known to mediate NLRP3 inflammasome activation through potassium efflux (105). Nigericin, on the other hand, is a potassium ionophore that disrupts intracellular potassium homeostasis, leading to NLRP3 inflammasome assembly and activation (106). In current control experiments, both BzATP and nigericin reliably induced NLRP3 inflammasome-dependent IL-1 β release, demonstrating the functional integrity of the mononuclear phagocytes used in our study. The successful induction of IL-1 β secretion by LPS and BzATP thereby confirmed the immunological activity of the cells and the validity of the current experimental approach. Furthermore, in all experiments LDH levels were determined to test for cell death.

TLR2 and TLR4 were both shown to be involved in the immune response against *T. gondii*. While TLR2 was shown to recognize the parasitic surface profilin or GPI proteins and stimulating the production of IL-12, TLR4 rather plays a supportive role, especially at high infectious doses, as summarized for several mouse models (47, 48, 79). We further determined the expression levels of F-actin and CD11b. F-actin is part of the cytoskeleton and known to be involved in phagocytosis (106). CD11b plays a critical role in the migration and adhesion of immune cells, including monocytes (80). In *T. gondii*-infected primary human monocytes, a significant increase in the expression of CD11b in the high-affinity form of macrophage-1 antigen (Mac-1) was observed, which promotes increased crawling distance and transmigration across endothelial barriers, thus supporting the spread of the parasite in the host (80). In the current study, we did, however, not find any effects of *T. gondii* tachyzoite exposure on TLR2, TLR4, F-actin or CD11b expression by primary human and bovine monocytes. However, the lack of distinction between infected and uninfected cells complicates the interpretation of surface marker expression and represents a limitation of this study.

Taken together, we here characterized the early innate immune responses of human and bovine mononuclear phagocytes to vital *T. gondii* tachyzoites, providing valuable insights into the initial interactions between this zoonotic parasite and professional phagocytes. Our findings demonstrate that exposure to *T. gondii* tachyzoites very early activates monocytes and macrophages, leading to the release of pro-inflammatory cytokines IL-1 β and IL-6, particularly when co-stimulated with LPS. This cytokine response appeared more important than the formation of METs, which was observed as a rare event. The absence of significant changes in the expression of key markers (TLR2, TLR4, F-actin, and CD11b) by primary monocytes upon exposure to *T. gondii* suggests that the early immune response is primarily mediated through cytokine secretion rather than by changes on cell surface receptor expression or cytoskeletal rearrangements. These results highlight the importance of cytokine signaling in the early innate immune response to *T. gondii* and provide a foundation for further investigations into the molecular mechanisms underlying this

response. Future studies should focus on elucidating the signaling pathways involved in cytokine production and exploring the potential therapeutic targeting of these pathways to modulate the immune response against *T. gondii* infection. Further studies using standardized methods are needed to clarify the role of METs in advanced toxoplasmosis and their possible contribution to immune-related tissue damage *in vivo*, as reported for NET extrusion.

Data availability statement

The raw data supporting the conclusions of this article will be made available by the authors, without undue reservation.

Ethics statement

All procedures on primary human cells were performed in accordance with the Helsinki Declaration and in compliance with relevant laws and institutional guidelines and have been approved by the local ethics committee at the Justus Liebig University (JLU) Giessen (Giessen, Germany, approval No. 90/18, No. 98/23 and No. 05/2000). The privacy rights of the volunteers have been observed and written informed consent was given by each volunteer. Regarding cattle blood sampling, all procedures were conducted following the guidelines of the JLU Giessen Animal Care Committee. Protocols were approved by the Ethics Commission for Experimental Animal Studies of the Federal State of Hesse (Regierungspräsidium Giessen; GI 18/10 Nr. V 2/2022; JLU-No. 0002_V) and are in accordance with European Animal Welfare Legislation: ART13TFEU, and currently applicable German Animal Protection Laws.

Author contributions

DH: Investigation, Methodology, Writing – original draft, Visualization, Formal analysis, Data curation. ZV: Writing – review & editing, Visualization, Methodology. KB: Validation, Writing – review & editing, Formal analysis. AK: Writing – review & editing, Resources. RR: Writing – review & editing, Visualization, Validation, Methodology. AH: Writing – review & editing, Resources. SM: Funding acquisition, Supervision, Writing – review & editing. VG: Writing – review & editing, Resources, Conceptualization. AT: Conceptualization, Supervision, Writing – review & editing, Resources, Funding acquisition. CH: Supervision, Conceptualization, Writing – review & editing, Resources, Funding acquisition. KR: Formal analysis, Visualization, Data curation, Validation, Methodology, Supervision, Conceptualization, Investigation, Writing – original draft. IC: Visualization, Data curation, Writing – original draft, Formal analysis, Conceptualization, Methodology, Validation, Investigation, Supervision.

Funding

The author(s) declare financial support was received for the research and/or publication of this article. KR was funded by the Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG, German Research Foundation, Project-ID 515250365 and Project-ID 528562393-FIP 26).

Acknowledgments

We are grateful to Bianca Kulik, Gabriele Fuchs-Moll, Hannah Salecker, Sabine Stumpf, Sandra Ruehl, Stefan Scheldt and Kathrin Petri (Justus Liebig University Giessen, Giessen, Germany) for excellent technical support; Annika Seipp and Ulrich Gaertner (Justus Liebig University Giessen, Giessen, Germany) for their excellent technical support in scanning- and transmission electron microscopic analyses; Ulrich J. Sachs (Institute of Clinical Immunology, Transfusion Medicine, and Hemostasis, Justus Liebig University Giessen, Giessen, Germany) for providing buffy coats from healthy blood donors; and to Jens Arne Bodenbender as well as the staff of the Upper Hardthof Livestock Teaching and Research Facility (Justus Liebig University Giessen, Germany) for their diligent routine dairy cattle maintenance.

Conflict of interest

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

References

- Hill DE, Dubey JP. *Toxoplasma gondii* as a parasite in food: analysis and control. *Microbiol Spectr*. (2016) 4. doi: 10.1128/microbiolspec.PFS-0011-2015
- Dubey JP. Outbreaks of clinical toxoplasmosis in humans: five decades of personal experience, perspectives and lessons learned. *Parasit Vectors*. (2021) 14:263. doi: 10.1186/s13071-021-04769-4
- Dubey JP, Lindsay DS, Speer CA. Structures of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, bradyzoites, and sporozoites and biology and development of tissue cysts. *Clin Microbiol Rev*. (1998) 11:267–99. doi: 10.1128/CMR.11.2.267
- Ehmen HG, Lüder CGK. Long term impact of *Toxoplasma gondii* infection on human monocytes. *Front Cell Infect Microbiol*. (2019) 9:235. doi: 10.3389/fcimb.2019.00235
- Attias M, Teixeira DE, Benchimol M, Vommaro RC, Crepaldi PH, De Souza W. The life cycle of *Toxoplasma gondii* reviewed using animations. *Parasit Vectors*. (2020) 13:588. doi: 10.1186/s13071-020-04445-z
- Masek KS, Hunter CA. Pro-inflammatory responses in macrophages during *Toxoplasma gondii* infection. In: *Madame Curie Bioscience Database*. Austin, TX, USA: Landes Bioscience (2013). Available online at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK5976/>.
- Orchanian SB, Lodoen MB. Monocytes as primary defenders against *Toxoplasma gondii* infection. *Trends Parasitol*. (2023) 39:837–49. doi: 10.1016/j.pt.2023.07.007
- Bitzmann D. *Ultrastrukturelle, immunzytochemische und glykohistochemische Untersuchungen am Blut des Rindes (Bos taurus)*. München, Germany: Ludwig Maximilians-Universität München (2009).
- Guilliams M, Mildner A, Yona S. Developmental and functional heterogeneity of monocytes. *Immunity*. (2018) 49:595–613. doi: 10.1016/j.immuni.2018.10.005
- Guilliams M, Ginhoux F, Jakubzik C, Naik SH, Onai N, Schraml BU, et al. Dendritic cells, monocytes and macrophages: a unified nomenclature based on ontogeny. *Nat Rev Immunol*. (2014) 14:571–8. doi: 10.1038/nri3712
- Deshmane SL, Kremlev S, Amini S, Sawaya BE. Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): an overview. *J Interferon Cytokine Res*. (2009) 29:313–26. doi: 10.1089/jir.2008.0027
- Jiang W, Gilkeson G. Sex differences in monocytes and TLR4 associated immune responses; implications for systemic lupus erythematosus (SLE). *J Immunother Appl*. (2014) 1:1. doi: 10.7243/2055-2394-1-1
- Chiu S, Bharat A. Role of monocytes and macrophages in regulating immune response following lung transplantation. *Curr Opin Organ Transplant*. (2016) 21:239–45. doi: 10.1097/MOT.0000000000000313
- Jiménez-Dalmaroni M, Gerswhin ME, Adamopoulos IE. The critical role of Toll-like receptors - from microbial recognition to autoimmunity: a comprehensive review. *Autoimmun Rev*. (2016) 15:1–8. doi: 10.1016/j.autrev.2015.08.009
- Torres Ruiz J, Carrillo Vazquez DA, Padilla Ortiz DM, Vazquez Rodriguez R, Nuñez-Alvarez C, Juárez-Vega G, et al. TLR expression in peripheral monocyte subsets of patients with idiopathic inflammatory myopathies: association with clinical and immunological features. *J Transl Med*. (2020) 18:125. doi: 10.1186/s12967-020-02290-3
- Richter K, Asci N, Singh VK, Yakoob SH, Meixner M, Zakrzewicz A, et al. Activation of endothelial NO synthase and P2X7 receptor modification mediates the cholinergic control of ATP induced interleukin 1 β release by mononuclear phagocytes. *Front Immunol*. (2023) 14:1140592. doi: 10.3389/fimmu.2023.1140592

The author(s) declared that they were an editorial board member of Frontiers, at the time of submission. This had no impact on the peer review process and the final decision.

Generative AI statement

The author(s) declare that no Generative AI was used in the creation of this manuscript.

Any alternative text (alt text) provided alongside figures in this article has been generated by Frontiers with the support of artificial intelligence and reasonable efforts have been made to ensure accuracy, including review by the authors wherever possible. If you identify any issues, please contact us.

Publisher's note

All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

Supplementary material

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2025.1683634/full#supplementary-material>

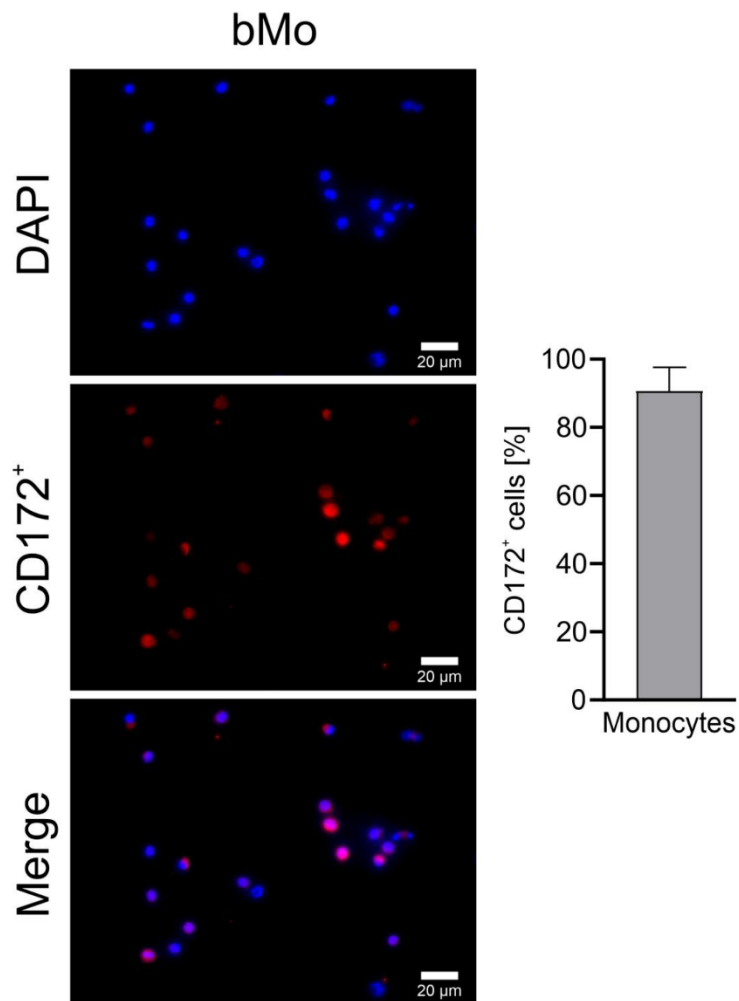
17. Aulik NA, Hellenbrand KM, Czuprynski CJ. *Mannheimia haemolytica* and its leukotoxin cause macrophage extracellular trap formation by bovine macrophages. *Infect Immun*. (2012) 80:1923–33. doi: 10.1128/IAI.06120-11
18. Reichel M, Muñoz-Caro T, Sanchez Contreras G, Rubio Garcia A, Magdowski G, Gärtner U, et al. Harbour seal (*Phoca vitulina*) PMN and monocytes release extracellular traps to capture the apicomplexan parasite *Toxoplasma gondii*. *Dev Comp Immunol*. (2015) 50:106–15. doi: 10.1016/j.devcom.2015.02.002
19. Pérez D, Muñoz MC, Molina JM, Muñoz-Caro T, Silva LMR, Taubert A, et al. *Eimeria ninakohlyakimovae* induces NADPH oxidase-dependent monocyte extracellular trap formation and upregulates IL-12 and TNF- α , IL-6 and CCL2 gene transcription. *Vet Parasitol*. (2016) 227:143–50. doi: 10.1016/j.vetpar.2016.07.028
20. Granger V, Faillie D, Marani V, Noël B, Gallais Y, Szely N, et al. Human blood monocytes are able to form extracellular traps. *J Leukoc Biol*. (2017) 102:775–81. doi: 10.1189/jlb.3MA0916-411R
21. Yang Z, Wei Z, Hermosilla C, Taubert A, He X, Wang X, et al. Caprine monocytes release extracellular traps against *Neospora caninum* in vitro. *Front Immunol*. (2018) 8:2016. doi: 10.3389/fimmu.2017.02016
22. Weng W, Hu Z, Pan Y. Macrophage extracellular traps: current opinions and the state of research regarding various diseases. *J Immunol Res*. (2022) 2022:7050807. doi: 10.1155/2022/7050807
23. Hasheminasab SS, Conejeros I, Gärtner U, Kamena F, Taubert A, Hermosilla CR. MCT-dependent *Cryptosporidium parvum*-induced bovine monocyte extracellular traps (METs) under physioxia. *Biology*. (2023) 12:961. doi: 10.3390/biology12070961
24. Ibrahim N, Knöbl V, Hayden H, Bauer WM, Worel N, Neumayer C, et al. Human monocyte subsets differ in their capacity to form extracellular traps. *Cell Death Discov*. (2024) 10:1–3. doi: 10.1038/s41420-024-02034-y
25. Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss DS, et al. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science*. (2004) 303:1532–5. doi: 10.1126/science.1092385
26. Muñoz-Caro T, Silva LMR, Ritter C, Taubert A, Hermosilla C. *Besnoitia besnoiti* tachyzoites induce monocyte extracellular trap formation. *Parasitol Res*. (2014) 113:4189–97. doi: 10.1007/s00436-014-4094-3
27. Schulz M, Zanbrano F, Schuppe H-C, Wagenlehner F, Taubert A, Gaertner U, et al. Monocyte-derived extracellular trap (MET) formation induces aggregation and affects motility of human spermatozoa. *in vitro Syst Biol Reprod Med*. (2019) 65:357–66. doi: 10.1080/19396368.2019.1624873
28. Neumann A, Brogden G, von Köckritz-Blickwede M. Extracellular traps: an ancient weapon of multiple kingdoms. *Biology*. (2020) 9:34. doi: 10.3390/biology9020034
29. Bartneck M, Keul HA, Zwadlo-Klarwasser G, Groll J. Phagocytosis independent extracellular nanoparticle clearance by human immune cells. *Nano Lett*. (2010) 10:59–63. doi: 10.1021/nl902830x
30. Chanput W, Mes JJ, Wichers HJ. THP-1 cell line: an *in vitro* cell model for immune modulation approach. *Int Immunopharmacol*. (2014) 23:37–45. doi: 10.1016/j.intimp.2014.08.002
31. Genin M, Clement F, Fattaccioni A, Raes M, Michiels C. M1 and M2 macrophages derived from THP-1 cells differentially modulate the response of cancer cells to etoposide. *BMC Cancer*. (2015) 15:577. doi: 10.1186/s12885-015-1546-9
32. Mohd Yasin ZN, Mohd Idris FN, Hoe CH, Yvonne-Tee GB. Macrophage polarization in THP-1 cell line and primary monocytes: a systematic review. *Differentiation*. (2022) 128:67–82. doi: 10.1016/j.diff.2022.10.001
33. Murray PJ, Wynn TA. Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. *Nat Rev Immunol*. (2011) 11:723. doi: 10.1038/nri3073
34. Nakayama T, Saitoh H. Tunicamycin-induced neutrophil extracellular trap (NET)-like structures in cultured human myeloid cell lines. *Cell Biol Int*. (2015) 39:355–9. doi: 10.1002/cbin.10396
35. Henthorn CR, Chris Minion F, Sahin O. Utilization of macrophage extracellular trap nucleotides by *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Microbiol Read Engl*. (2018) 164:1394–404. doi: 10.1099/mic.0.000717
36. Jensen M, Thorsen NW, Hallberg LAE, Hägglund P, Hawkins CL. New insight into the composition of extracellular traps released by macrophages exposed to different types of inducers. *Free Radic Biol Med*. (2023) 202:97–109. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2023.03.025
37. Fei L, Zhengkai W, Weina J, Lili C, Yuhang G, Zhengtao Y, et al. *Trichomonas vaginalis* triggers the release of THP-1 extracellular traps. *Parasitol Res*. (2019) 118:267–74. doi: 10.1007/s00436-018-6139-5
38. Lee Y, Reilly B, Tan C, Wang P, Aziz M. Extracellular CIRP induces macrophage extracellular trap formation via gasdermin D activation. *Front Immunol*. (2021) 12:780210. doi: 10.3389/fimmu.2021.780210
39. An Y, Shi X, Tang X, Wang Y, Shen F, Zhang Q, et al. Aflatoxin B1 induces reactive oxygen species-mediated autophagy and extracellular trap formation in macrophages. *Front Cell Infect Microbiol*. (2017) 7:53. doi: 10.3389/fcimb.2017.00053
40. Doster RS, Sutton JA, Rogers LM, Aronoff DM, Gaddy JA. *Streptococcus agalactiae* induces placental macrophages to release extracellular traps loaded with tissue remodeling enzymes via an oxidative burst-dependent mechanism. *mBio*. (2018) 9:e02084–18. doi: 10.1128/mBio.02084-18
41. Je S, Quan H, Yoon Y, Na Y, Kim B-J, Seok SH. *Mycobacterium massiliense* induces macrophage extracellular traps with facilitating bacterial growth. *PLoS One*. (2016) 11:e0155685. doi: 10.1371/journal.pone.0155685
42. Beurel E, Jope RS. Lipopolysaccharide-induced interleukin-6 production is controlled by glycogen synthase kinase-3 and STAT3 in the brain. *J Neuroinflamm*. (2009) 6:9. doi: 10.1186/1742-2094-6-9
43. Kawai T, Akira S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Immunol*. (2010) 11:373–84. doi: 10.1038/ni.1863
44. Dinarello CA. Overview of the IL-1 family in innate inflammation and acquired immunity. *Immunol Rev*. (2018) 281:8–27. doi: 10.1111/imr.12621
45. Mantovani A, Dinarello CA, Molgora M, Garlanda C. Interleukin-1 and related cytokines in the regulation of inflammation and immunity. *Immunity*. (2019) 50:778–95. doi: 10.1016/j.immuni.2019.03.012
46. Brox P, Dixit VM. Inflammasomes: mechanism of assembly, regulation and signalling. *Nat Rev Immunol*. (2016) 16:407–20. doi: 10.1038/nri.2016.58
47. Yarovinsky F, Sher A. Toll-like receptor recognition of *Toxoplasma gondii*. *Int J Parasitol*. (2006) 36:255–9. doi: 10.1016/j.ijpara.2005.12.003
48. Walseng E, Furuta K, Goldszmid RS, Weih KA, Sher A, Roche PA. Dendritic cell activation prevents MHC class II ubiquitination and promotes MHC class II survival regardless of the activation stimulus. *J Biol Chem*. (2010) 285:41749–54. doi: 10.1074/jbc.M110.157586
49. Saeij JJP, Boyle JP, Boothroyd JC. Differences among the three major strains of *Toxoplasma gondii* and their specific interactions with the infected host. *Trends Parasitol*. (2005) 21:476–81. doi: 10.1016/j.pt.2005.08.001
50. Sanchez SG, Besteiro S. The pathogenicity and virulence of *Toxoplasma gondii*. *Virulence*. (2021) 12:3095–114. doi: 10.1080/21505594.2021.2012346
51. Saeij JJP, Collier S, Boyle JP, Jerome ME, White MW, Boothroyd JC. *Toxoplasma* co-opts host gene expression by injection of a polymorphic kinase homologue. *Nature*. (2007) 445:324–7. doi: 10.1038/nature05395
52. Rosowski EE, Lu D, Julien L, Rodda L, Gaiser RA, Jensen KDC, et al. Strain-specific activation of the NF- κ B pathway by GRA15, a novel *Toxoplasma gondii* dense granule protein. *J Exp Med*. (2011) 208:195–212. doi: 10.1084/jem.20100717
53. Gov L, Karimzadeh A, Ueno N, Lodoen MB. Human innate immunity to *Toxoplasma gondii* is mediated by host caspase-1 and ASC and parasite GRA15. *mBio*. (2013) 4:e00255–13. doi: 10.1128/mBio.00255-13
54. Guimarães Gois PS, Franco PS, Cota Teixeira S, Guirelli PM, de Araújo TE, da Fonseca Batista DW, et al. Polarisation of human macrophages towards an M1 subtype triggered by an atypical Brazilian strain of *Toxoplasma gondii* results in a reduction in parasite burden. *Folia Parasitol (Praha)*. (2022) 69:2022.020. doi: 10.14411/fp.2022.020
55. Gov L, Schneider CA, Lima TS, Pandori W, Lodoen MB. NLRP3 and potassium efflux drive rapid IL-1 β release from primary human monocytes during *Toxoplasma gondii* infection. *J Immunol Baltim Md 1950*. (2017) 199:2855. doi: 10.4049/jimmunol.1700245
56. Lima TS, Gov L, Lodoen MB. Evasion of human neutrophil-mediated host defense during *Toxoplasma gondii* infection. *mBio*. (2018) 9:e02027–17. doi: 10.1128/mBio.02027-17
57. Pandori WJ, Lima TS, Mallya S, Kao TH, Gov L, Lodoen MB. *Toxoplasma gondii* activates a Syk-CARD9-NF- κ B signaling axis and gasdermin D-independent release of IL-1 β during infection of primary human monocytes. *PLoS Pathog*. (2019) 15:e1007923. doi: 10.1371/journal.ppat.1007923
58. Pandori WJ, Matsuno SY, Shin J-H, Kim SC, Kao TH, Mallya S, et al. Role for caspase-8 in the release of IL-1 β and active caspase-1 from viable human monocytes during *Toxoplasma gondii* infection. *J Immunol*. (2024) 212:1161–71. doi: 10.4049/jimmunol.2200513
59. Pelloux H, Pernod G, Ricard J, Renversez TC, Ambroise-Thomas P. Interleukin-6 is secreted by human monocytes after stimulation with anti-*Toxoplasma gondii* sera. *J Infect Dis*. (1994) 169:1181–2. doi: 10.1093/infdis/169.5.1181
60. Tombácz K, Burgess G, Holder A, Werners A, Werling D. *Toxoplasma gondii* profilin does not stimulate an innate immune response through bovine or human TLR5. *Innate Immun*. (2018) 24:422–9. doi: 10.1177/1753425918798450
61. Salazar Gonzalez RM, Shehata H, O'Connell MJ, Yang Y, Moreno-Fernandez ME, Choungnet CA, et al. *Toxoplasma gondii*-derived profilin triggers human Toll-like receptor 5-dependent cytokine production. *J Innate Immun*. (2014) 6:685–94. doi: 10.1159/000362367
62. Friedland JS, Shattock RJ, Johnson JD, Remick DG, Holliman RE, Griffin GE. Differential cytokine gene expression and secretion after phagocytosis by a human monocytic cell line of *Toxoplasma gondii* compared with *Mycobacterium tuberculosis*. *Clin Exp Immunol*. (1993) 91:282–6. doi: 10.1111/j.1365-2249.1993.tb05896.x
63. Castro AS, Alves CMOS, Angeloni MB, Gomes AO, Barbosa BF, Franco PS, et al. Trophoblast cells are able to regulate monocyte activity to control *Toxoplasma gondii* infection. *Placenta*. (2013) 34:240–7. doi: 10.1016/j.placenta.2012.12.006
64. Chu J-Q, Shi G, Fan Y-M, Choi I-W, Cha G-H, Zhou Y, et al. Production of IL-1 β and inflammasome with up-regulated expressions of NOD-like receptor related genes in *Toxoplasma gondii*-infected THP-1 macrophages. *Korean J Parasitol*. (2016) 54:711–7. doi: 10.3347/kjp.2016.54.6.711

65. Daigneault M, Preston JA, Marriott HM, Whyte MKB, Dockrell DH. The identification of markers of macrophage differentiation in PMA-stimulated THP-1 cells and monocyte-derived macrophages. *PLoS One*. (2010) 5:e8668. doi: 10.1371/journal.pone.0008668
66. Neubert E, Senger-Sander SN, Mancke VS, Busse J, Polo E, Scheidmann SEF, et al. Serum and serum albumin inhibit *in vitro* formation of neutrophil extracellular traps (NETs). *Front Immunol*. (2019) 10:12. doi: 10.3389/fimmu.2019.00012
67. Ross R, Hasheminasab SS, Conejeros I, Gärtner U, Kamena F, Krueger A, et al. Human dendritic cell interactions with the zoonotic parasite *Cryptosporidium parvum* result in activation and maturation. *Front Immunol*. (2024) 15:1388366. doi: 10.3389/fimmu.2024.1388366
68. Goddeeris BM, Baldwin CL, ole-MoiYoi O, Morrison WI. Improved methods for purification and depletion of monocytes from bovine peripheral blood mononuclear cells. Functional evaluation of monocytes in responses to lectins. *J Immunol Methods*. (1986) 89:165–73. doi: 10.1016/0022-1759(86)90354-6
69. Ceciliani F, Ávila Morales G, De Matteis G, Grandoni F, Furioso Ferreira R, Roccabianca P, et al. Methods in isolation and characterization of bovine monocytes and macrophages. *Methods San Diego Calif*. (2021) 186:22–41. doi: 10.1016/j.jmeth.2020.06.017
70. Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, Pietzsch T, et al. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods*. (2012) 9:676–82. doi: 10.1038/nmeth.2019
71. Behrendt JH, Hermosilla C, Hardt M, Failing K, Zahner H, Taubert A. PMN-mediated immune reactions against *Elmeria bovis*. *Vet Parasitol*. (2008) 151:97–109. doi: 10.1016/j.vetpar.2007.11.013
72. Bumol TF, Douglas SD. Human monocyte cytoplasmic spreading *in vitro*: early kinetics and scanning electron microscopy. *Cell Immunol*. (1977) 34:70–8. doi: 10.1016/0008-8749(77)90230-1
73. Weidner JM, Kanatani S, Hernández-Castañeda MA, Fuks JM, Rethi B, Wallin RPA, et al. Rapid cytoskeleton remodeling in dendritic cells following invasion by *Toxoplasma gondii* coincides with the onset of a hypermigratory phenotype. *Cell Microbiol*. (2013) 15:1735–52. doi: 10.1111/cmi.12145
74. Bhandage AK, Kanatani S, Barragan A. *Toxoplasma*-induced hypermigration of primary cortical microglia implicates GABAergic signaling. *Front Cell Infect Microbiol*. (2019) 9:73. doi: 10.3389/fcimb.2019.00073
75. García-Sánchez M, Jiménez-Pelayo L, Horcajo P, Regidor-Cerrillo J, Ólafsson EB, Bhandage AK, et al. Differential responses of bovine monocyte-derived macrophages to infection by *Neospora caninum* isolates of high and low virulence. *Front Immunol*. (2019) 10:915. doi: 10.3389/fimmu.2019.00915
76. Perrotta I, Carito V, Russo E, Tripepi S, Aquila S, Donato G. Macrophage autophagy and oxidative stress: an ultrastructural and immunoelectron microscopical study. *Oxid Med Cell Longev*. (2011) 2011:282739. doi: 10.1155/2011/282739
77. Murray RZ, Stow JL. Cytokine secretion in macrophages: SNAREs, Rab, and membrane trafficking. *Front Immunol*. (2014) 5:538. doi: 10.3389/fimmu.2014.00538
78. Muñoz-Caro T, Gibson AJ, Conejeros I, Werling D, Taubert A, Hermosilla C. The role of TLR2 and TLR4 in recognition and uptake of the apicomplexan parasite *Eimeria bovis* and their effects on NET formation. *Pathogens*. (2021) 10:118. doi: 10.3390/pathogens10020118
79. Debierre-Grocke F, Campos MA, Azzouz N, Schmidt J, Bieker U, Resende MG, et al. Activation of TLR2 and TLR4 by glycosylphosphatidylinositols derived from *Toxoplasma gondii*. *J Immunol Baltim Md 1950*. (2007) 179:1129–37. doi: 10.4049/jimmunol.179.2.1129
80. Ueno N, Harker KS, Clarke EV, McWhorter FY, Liu WF, Tenner AJ, et al. Real-time imaging of *Toxoplasma*-infected human monocytes under fluidic shear stress reveals rapid translocation of intracellular parasites across endothelial barriers. *Cell Microbiol*. (2014) 16:580–95. doi: 10.1111/cmi.12239
81. Geissmann F, Manz MG, Jung S, Sieweke MH, Merad M, Ley K. Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. *Science*. (2010) 327:656–61. doi: 10.1126/science.1178331
82. Sangaré LO, Ólafsson EB, Wang Y, Yang N, Julien L, Camejo A, et al. *In vivo* CRISPR screen identifies TgWIP as a *Toxoplasma* modulator of dendritic cell migration. *Cell Host Microbe*. (2019) 26:478–492.e8. doi: 10.1016/j.chom.2019.09.008
83. Silva LMR, Muñoz-Caro T, Burgos RA, Hidalgo MA, Taubert A, Hermosilla C. Far beyond phagocytosis: phagocyte-derived extracellular traps act efficiently against protozoan parasites *in vitro* and *in vivo*. *Mediators Inflammation*. (2016) 2016:5898074. doi: 10.1155/2016/5898074
84. Jensen KDC, Wang Y, Wojno EDT, Shastri AJ, Hu K, Cornel L, et al. *Toxoplasma* polymorphic effectors determine macrophage polarization and intestinal inflammation. *Cell Host Microbe*. (2011) 9:472–83. doi: 10.1016/j.chom.2011.04.015
85. Park J, Hunter CA. The role of macrophages in protective and pathological responses to *Toxoplasma gondii*. *Parasite Immunol*. (2020) 42:e12712. doi: 10.1111/pim.12712
86. von Köckritz-Blickwede M, Goldmann O, Thulin P, Heinemann K, Norrby-Teglund A, Rohde M, et al. Phagocytosis-independent antimicrobial activity of mast cells by means of extracellular trap formation. *Blood*. (2008) 111:3070–80. doi: 10.1182/blood-2007-07-104018
87. Velásquez ZD, Peixoto R, Gärtner U, Hermosilla C, Taubert A, Conejeros I. Dynamics of cell cycle proteins involved in *Toxoplasma gondii*-induced bovine NET formation. *Front Immunol*. (2023) 14:1125667. doi: 10.3389/fimmu.2023.1125667
88. Kuryina AV, Erokhina MV, Makarevich OA, Syssoeva VY, Lepekha LN, Kuznetsov SA, et al. Plasticity of human THP-1 cell phagocytic activity during macrophagic differentiation. *Biochem Biokhimiia*. (2018) 83:200–14. doi: 10.1134/S0006297918030021
89. Herdoiza Padilla E, Crauwels P, Bergner T, Wiederspohn N, Förstner S, Rinas R, et al. mir-124-5p regulates phagocytosis of human macrophages by targeting the actin cytoskeleton via the ARP2/3 complex. *Front Immunol*. (2019) 10:2210. doi: 10.3389/fimmu.2019.02210
90. Liu T, Huang T, Li J, Li A, Li C, Huang X, et al. Optimization of differentiation and transcriptomic profile of THP-1 cells into macrophage by PMA. *PLoS One*. (2023) 18:e0286056. doi: 10.1371/journal.pone.0286056
91. Lu C, Wu Z, Gao H, Li H, Deng R, Luo N, et al. Sperm induce macrophage extracellular trap formation via phagocytosis-dependent mechanism. *Biol Reprod*. (2023) 109:319–29. doi: 10.1093/biolre/biad068
92. von Köckritz-Blickwede M, Chow O, Ghochani M, Nizet V. Visualization and functional evaluation of phagocyte extracellular traps. San Diego (CA, USA): *Methods in Microbiology*. Immunol Infect. (2010) 37:139–60. doi: 10.1016/S0580-9517(10)37007-3
93. Matsubara K, Kubota M, Adachi S, Kuwakado K, Hirota H, Wakazono Y, et al. Different mode of cell death induced by calcium ionophore in human leukemia cell lines: possible role of constitutive endonuclease. *Exp Cell Res*. (1994) 210:19–25. doi: 10.1006/excr.1994.1003
94. Grob D, Conejeros I, Velásquez ZD, Preufser C, Gärtner U, Alarcón P, et al. *Trypanosoma brucei* induces polymorphonuclear neutrophil activation and neutrophil extracellular traps release. *Front Immunol*. (2020) 11:559561. doi: 10.3389/fimmu.2020.559561
95. Abi Abdallah DS, Lin C, Ball CJ, King MR, Duhamel GE, Denkers EY. *Toxoplasma gondii* triggers release of human and mouse neutrophil extracellular traps. *Infect Immun*. (2012) 80:768–77. doi: 10.1128/IAI.05730-11
96. Yildiz K, Gokpinar S, Gayyagci AN, Babur C, Sursal N, Azkur AK. Role of NETs in the difference in host susceptibility to *Toxoplasma gondii* between sheep and cattle. *Vet Immunol Immunopathol*. (2017) 189:1–10. doi: 10.1016/j.jvetimm.2017.05.005
97. Lacerda LC, dos Santos JL, Wardini AB, da Silva AN, Santos AG, Silva Freire HP, et al. *Toxoplasma gondii* induces extracellular traps release in cat neutrophils. *Exp Parasitol*. (2019) 207:107770. doi: 10.1016/j.exppara.2019.107770
98. Imlau M, Conejeros I, Muñoz-Caro T, Zhou E, Gärtner U, Ternes K, et al. Dolphin-derived NETosis results in rapid *Toxoplasma gondii* tachyzoite ensnarement and different phenotypes of NETs. *Dev Comp Immunol*. (2020) 103:103527. doi: 10.1016/j.dci.2019.103527
99. Wei Z, Wang Z, Liu X, Wang C, Han Z, Wu D, et al. *Toxoplasma gondii* triggers neutrophil extracellular traps release in dogs. *Front Cell Infect Microbiol*. (2020) 10:429. doi: 10.3389/fcimb.2020.00429
100. Wu T-T, Chen T-L, Chen R-M. Lipopolysaccharide triggers macrophage activation of inflammatory cytokine expression, chemotaxis, phagocytosis, and oxidative ability via a Toll-like receptor 4-dependent pathway: validated by RNA interference. *Toxicol Lett*. (2009) 191:195–202. doi: 10.1016/j.toxlet.2009.08.025
101. Tosh KW, Mittereder L, Bonne-Annee S, Hieny S, Nutman TB, Singer SM, et al. The IL-12 response of primary human dendritic cells and monocytes to *Toxoplasma gondii* is stimulated by phagocytosis of live parasites rather than host cell invasion. *J Immunol Baltim Md 1950*. (2016) 196:345–56. doi: 10.4049/jimmunol.1501558
102. Lee E-J, Heo Y-M, Choi J-H, Song H-O, Ryu J-S, Ahn M-H. Suppressed production of pro-inflammatory cytokines by LPS-activated macrophages after treatment with *Toxoplasma gondii* lysate. *Korean J Parasitol*. (2008) 46:145. doi: 10.3347/kjp.2008.46.3.145
103. Botting RA, Bertram KM, Baharlou H, Sandgren KJ, Fletcher J, Rhodes JW, et al. Phenotypic and functional consequences of different isolation protocols on skin mononuclear phagocytes. *J Leukoc Biol*. (2017) 101:1393–403. doi: 10.1189/jlb.4A116-496R
104. He Y, Hara H, Núñez G. Mechanism and regulation of NLRP3 inflammasome activation. *Trends Biochem Sci*. (2016) 41:1012–21. doi: 10.1016/j.tibs.2016.09.002
105. Oken AC, Lisi NE, Krishnamurthy I, McCarthy AE, Godsey MH, Glasfeld A, et al. High-affinity agonism at the P2X7 receptor is mediated by three residues outside the orthosteric pocket. *Nat Commun*. (2024) 15:6662. doi: 10.1038/s41467-024-50771-6
106. Muñoz-Planillo R, Kuffa P, Martínez-Colón G, Smith BL, Rajendiran TM, Núñez G. K⁺ efflux is the common trigger of NLRP3 inflammasome activation by bacterial toxins and particulate matter. *Immunity*. (2013) 38:142–53. doi: 10.1016/j.immuni.2013.05.016



Supplementary Material

Supplementary Material

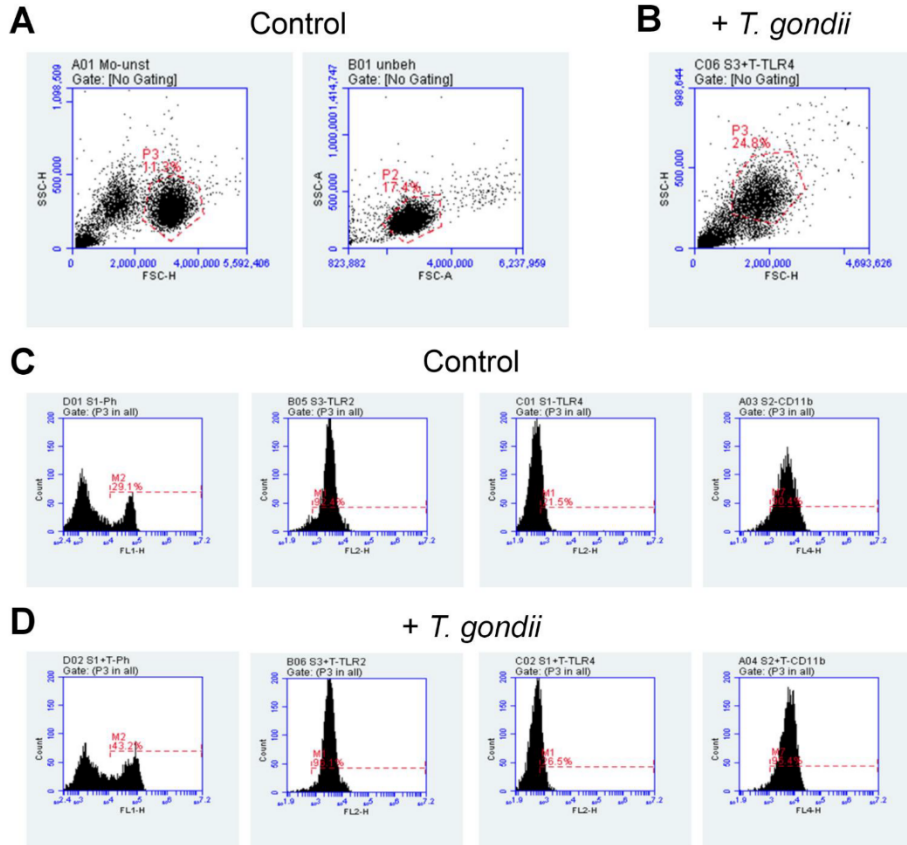


Supplementary Figure S1: Purity of isolated primary bovine monocytes.

Primary bovine monocytes (bMo) were fixed after adherence selection and stained for DNA (DAPI, blue) and with fluorescently labelled antibody to CD172a⁺ (red). DNA-stained and CD172a⁺ cells were counted (n = 3 animals) and expressed as the percentage of all cells. The graph shows the mean with standard deviation (SD).

Supplementary Material

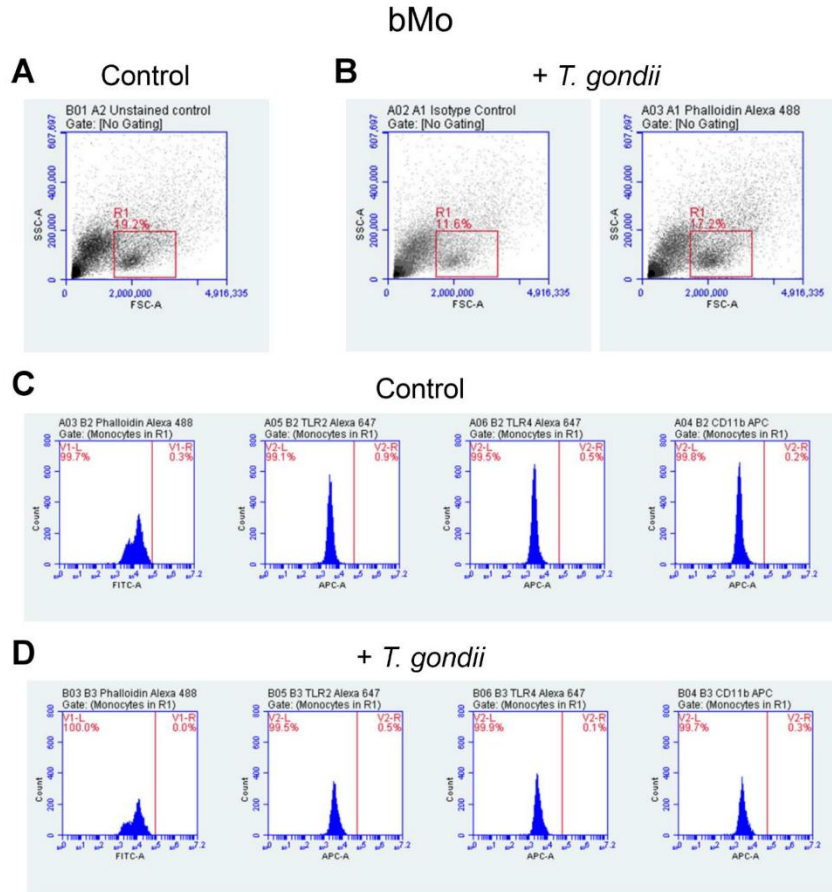
hMo



Supplementary Figure S2: Detailed gating strategy and fluorescence intensity for flow cytometry analysis of primary human monocytes (hMo).

Representative images of the gating strategy for primary hMo pre- and post-selection using immunomagnetic human CD14⁺ microbeads in untreated (control) (A) and *T. gondii* tachyzoite-exposed (*T. gondii*, MOI 1:4) cells (B). The lower panels show representative images of the fluorescence intensities of the used markers (F-actin (phalloidin, PH), Toll-like receptor (TLR) 2, TLR4 and CD11b) in control (C) and *T. gondii*-exposed cells (D). These that complement Supplementary Figure S10.

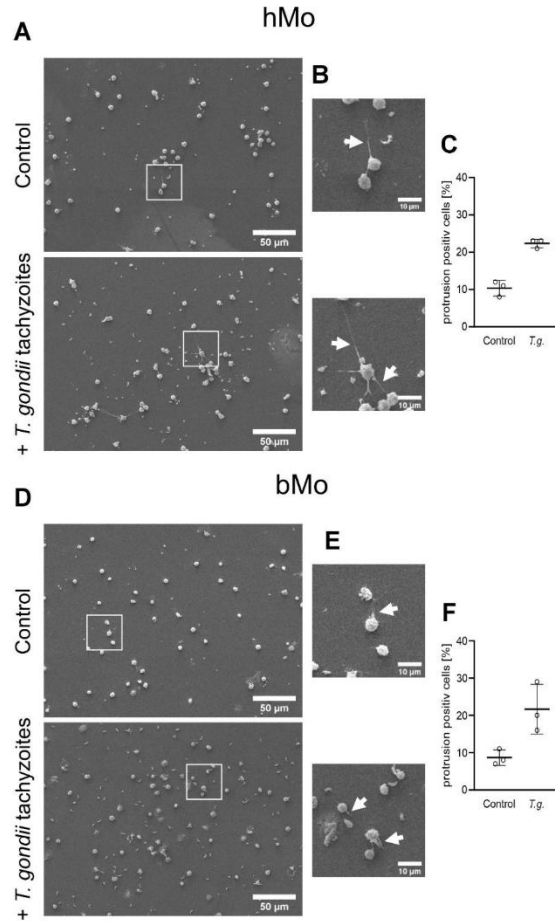
Supplementary Material



Supplementary Figure S3: Detailed gating strategy and fluorescence intensity for flow cytometry analysis of primary bovine monocytes (bMo).

Representative images of the gating strategy for primary bMo in untreated (control) (A) and *T. gondii* tachyzoite-exposed (*T. gondii*, MOI 1:4) cells (B). The lower panels show representative images of the fluorescence intensities of the used markers F-actin (phalloidin), Toll-like receptor (TLR) 2, TLR4 and CD11b in untreated (C) and *T. gondii*-exposed cells (D). These data complement **Supplementary Figure S10**.

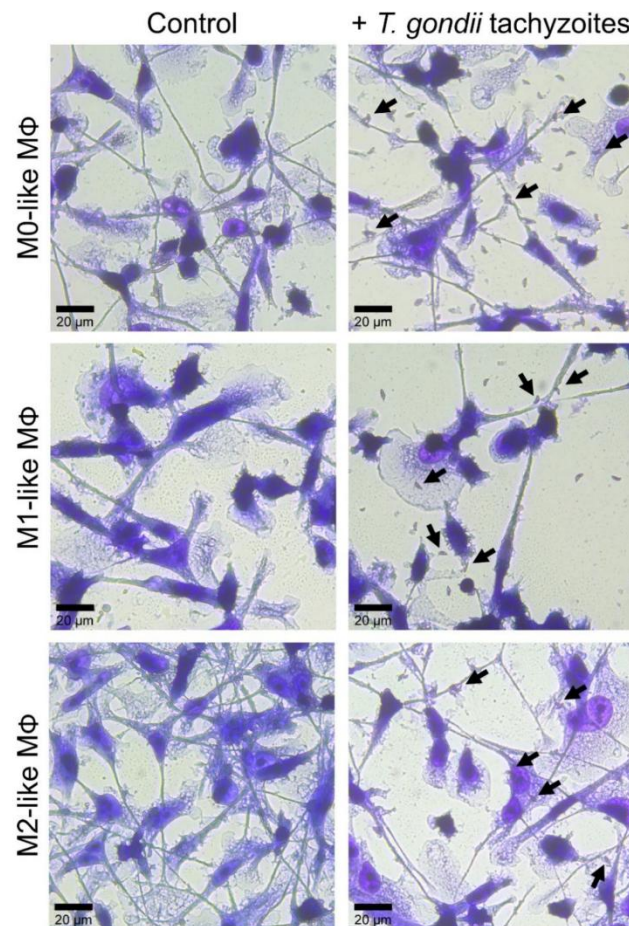
Supplementary Material



Supplementary Figure S4: Formation of cell protrusion (cytonemes, filopodia) in primary human and bovine monocytes exposed to *Toxoplasma gondii* tachyzoites.

Untreated (control) and parasite-exposed [4 h of co-incubation with *T. gondii* tachyzoites (MOI 1:4)] primary human (hMo) (A–C) and bovine monocytes (bMo) (D–F) were fixed after incubation and analyzed by scanning electron microscopy (SEM). Percentage of protrusion positive cells was determined from 5 – 10 overview images per condition (n = 3). Representative images of control and parasite-exposed cells with transparent boxes highlighting the counted structures (A,D), magnified crop examples of the transparent boxes with white arrows pointing to the protrusions (B,E), and mean percentage of protrusion positive cells and standard deviation (SD) (C,F) are shown. This Supplementary Figure S4 complements **Figure 1** in the main manuscript.

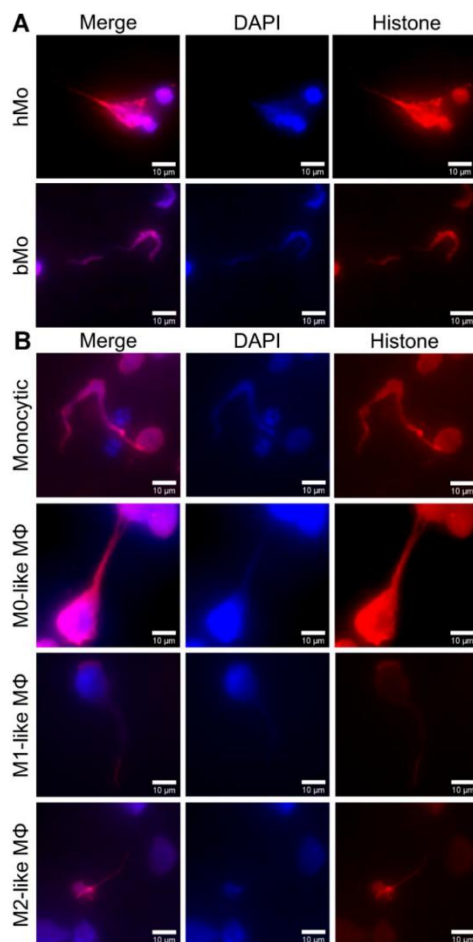
Supplementary Material



Supplementary Figure S5: Interaction of THP-1 cell-derived macrophages with *Toxoplasma gondii* tachyzoites.

Untreated (control) and parasite-exposed THP-1 cell-derived M0-, M1-, and M2-like macrophages (MΦ) were fixed after 4 h of co-incubation with *T. gondii* tachyzoites (+ *T. gondii* tachyzoites, MOI 1:4), stained by the Papanheim method, and analysed by light microscopy. Interactions of THP-1 cell-derived macrophages with *T. gondii* tachyzoites are indicated by black arrows. Representative pictures from n = 3 independent experiments are shown.

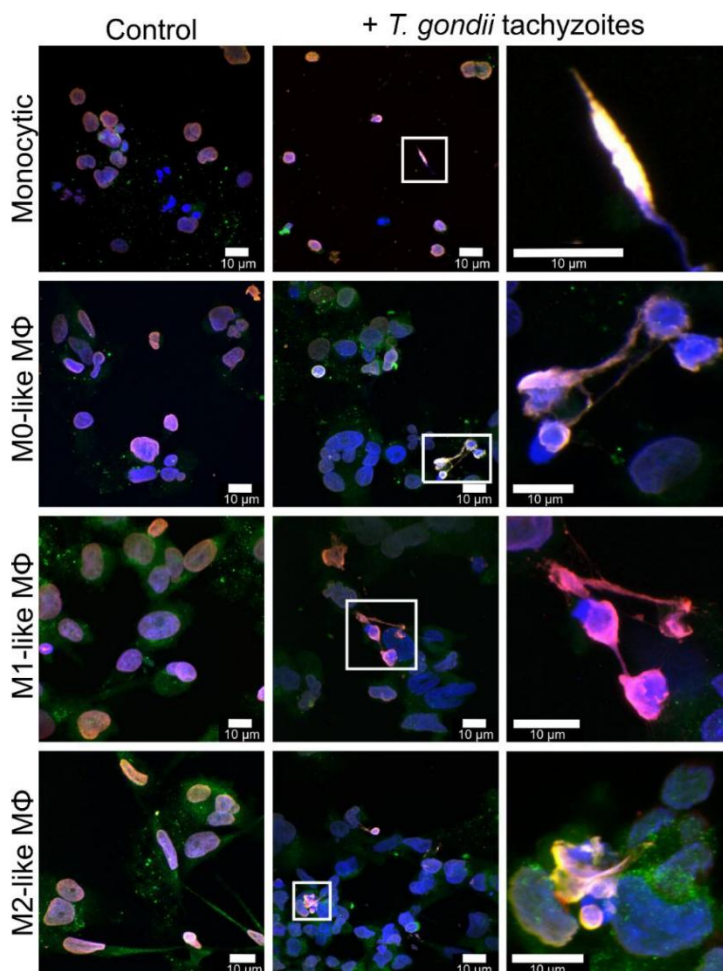
Supplementary Material



Supplementary Figure S6: Cropped and magnified images of the arrow-marked parasite-induced METs from Figure 3, showing individual and merged immunofluorescence channels.

Parasite-exposed primary human (hMo) and bovine monocytes (bMo) (A), monocytic THP-1 cells (monocytic) and THP-1 cell-derived M0-, M1-, and M2-like macrophages (MΦ) (B) were fixed after 4 h of co-incubation with *T. gondii* tachyzoites (MOI 1:4) and stained for DNA (DAPI, blue) and histone (red). Extracellular trap structure is shown in individual channels (DAPI, Histone); colocalization of DNA and histone in merged images (Merge) confirms monocyte/macrophage extracellular trap (MET) formation. This Supplementary Figure S6 complements **Figure 3** in the main manuscript.

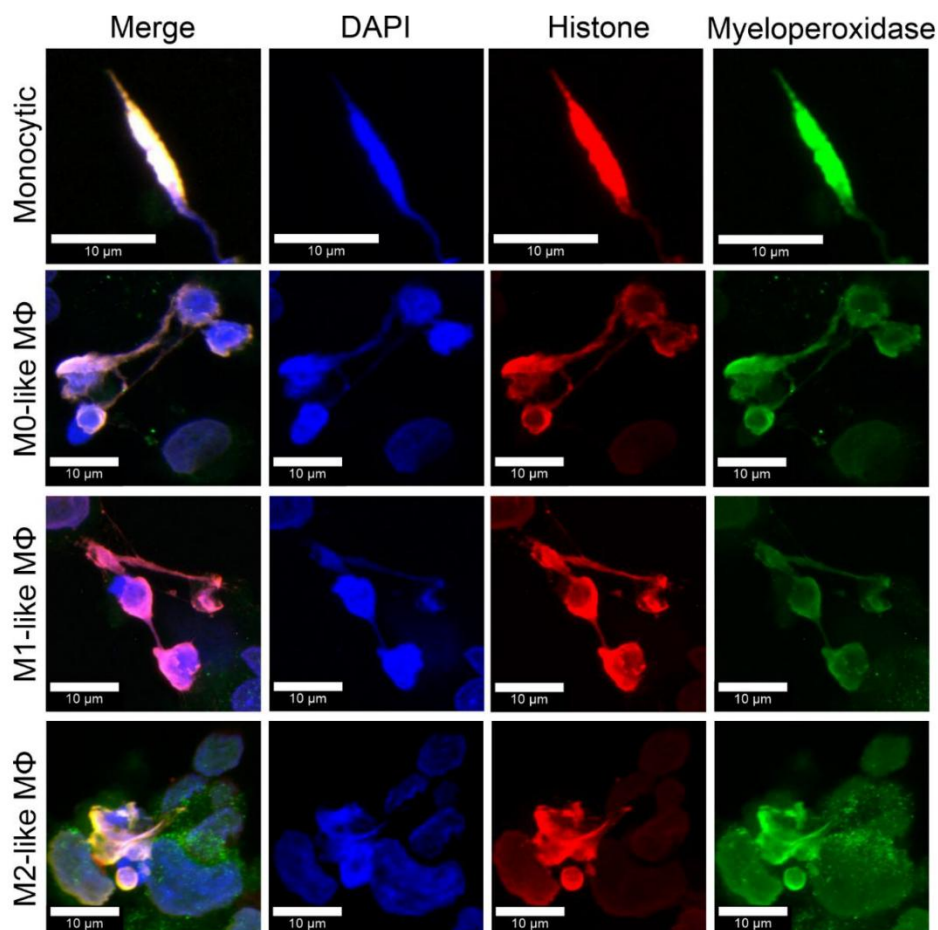
Supplementary Material



Supplementary Figure S7 (A): Extracellular trap marker detection in co-culture of *Toxoplasma gondii* tachyzoites with monocytic THP-1 cells and THP-1 cell-derived macrophages.

Untreated (control) and parasite-exposed monocytic THP-1 cells (monocytic) and THP-1 cell-derived M0-, M1-, and M2-like macrophages (MΦ) were fixed after 4 h of co-incubation with *T. gondii* tachyzoites (+ *T. gondii* tachyzoites, MOI 1:4) and stained for DNA (blue), histone (red), and myeloperoxidase (MPO, green). Extracellular traps, characterized by the co-localization of DNA, histone and MPO, are indicated by transparent boxes and magnified in the pictures shown on the right side. Representative pictures from n = 3 independent experiments are shown.

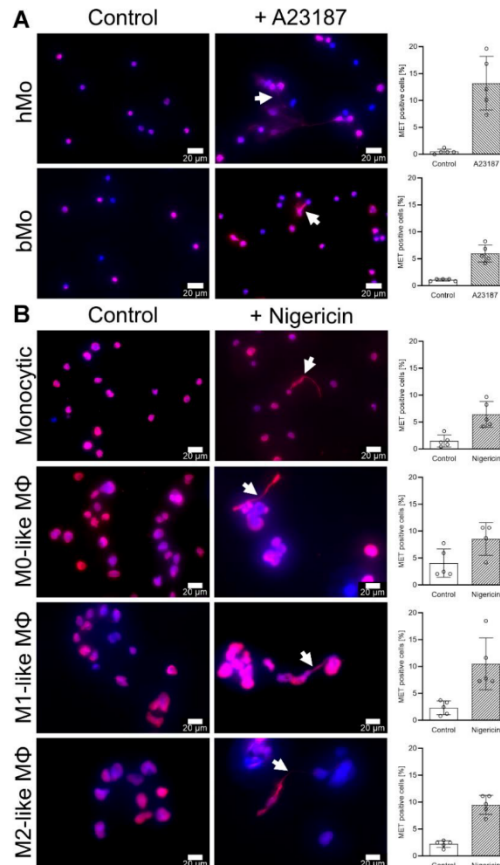
Supplementary Material



Supplementary Figure S7 (B): Cropped and magnified images of the transparent boxes marked parasite-induced extracellular traps from Supplementary Figure S7A, showing individual and merged immunofluorescence channels.

Parasite-exposed monocytic THP-1 cells (monocytic) and THP-1 cell-derived M0-, M1-, and M2-like macrophages (MΦ) were fixed after 4 h of co-incubation with *T. gondii* tachyzoites (MOI 1:4) and stained for DNA (DAPI, blue), histone (red), and myeloperoxidase (green). Extracellular trap structure is shown in individual channels (DAPI, Histone, myeloperoxidase); co-localization of DNA, histone and myeloperoxidase in merged images (Merge) confirms monocyte/macrophage extracellular trap (MET) formation.

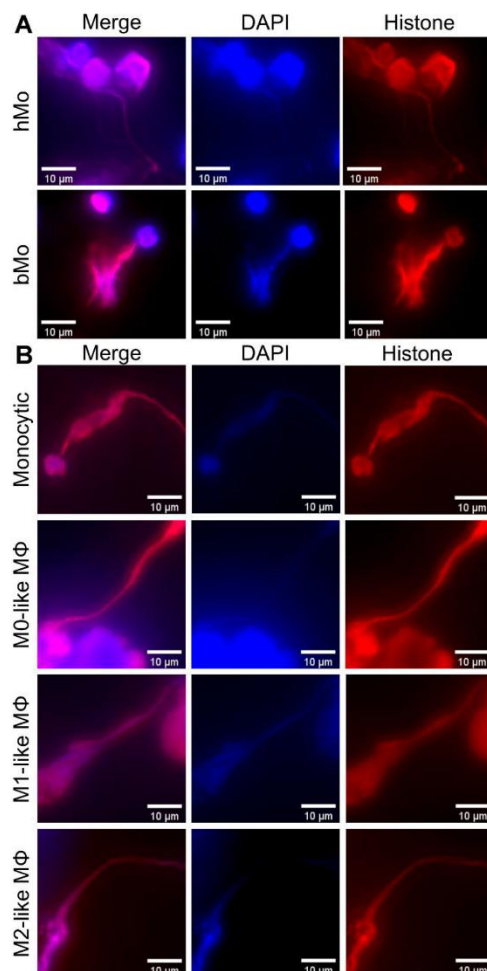
Supplementary Material



Supplementary Figure S8 (A): Extracellular trap marker detection in A23187- or nigericin-stimulated primary human and bovine monocytes, monocyctic THP-1 cells and THP-1 cell-derived macrophages.

Primary human (hMo) and bovine monocytes (bMo) (**A**), monocyctic THP-1 cells (monocyctic) as well as THP-1 cell-derived M0-, M1-, and M2-like macrophages (MΦ) (**B**) were left untreated (control) or stimulated with A23187 [5 μM] (+ A23187) or nigericin [0.5 μM] (+ nigericin). The cells were fixed after 4 h of incubation and stained for DNA (blue) and histone (red). Extracellular traps, which are characterized by the co-localization of DNA and histones, are indicated by white arrows. Percentage of monocyte/macrophage extracellular trap (MET) positive cells was determined (n = 4 – 5). The graphs show mean with standard deviation (SD). Statistical analysis was performed by comparing A23187/nigericin-treated cells with controls using the non-parametric Wilcoxon signed-rank test; no p-values below p ≤ 0.05 were observed.

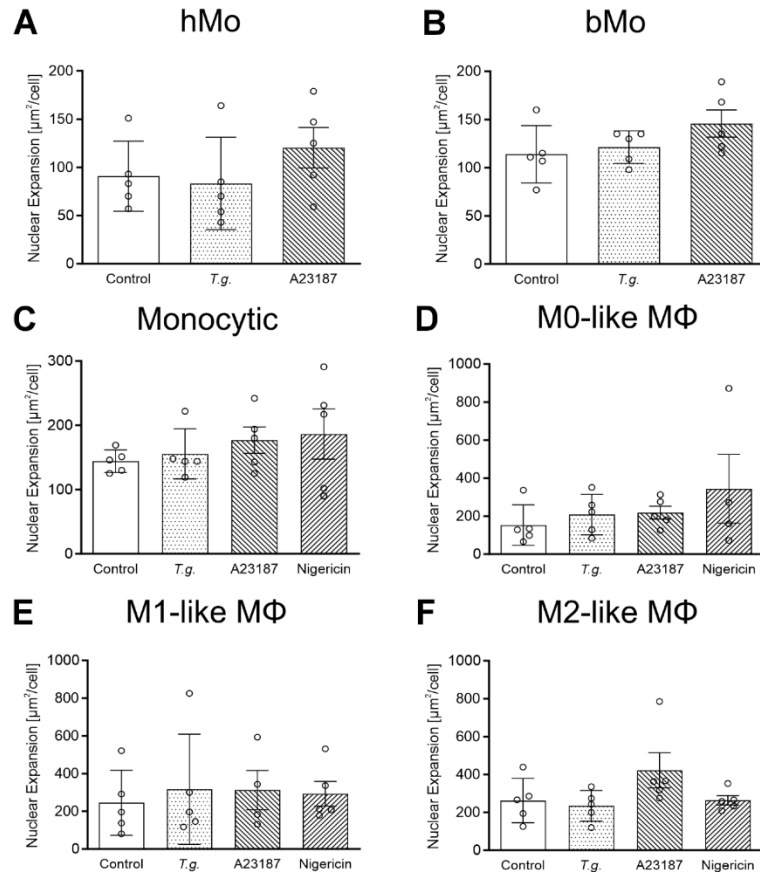
Supplementary Material



Supplementary Figure S8 (B): Cropped, magnified images from Supplementary Figure S8A displaying A23187- or nigericin-induced extracellular traps, with individual and merged immunofluorescence channels.

A23187 [5 μM]-treated primary human and bovine monocytes (A) and nigericin [0.5 μM]-treated monocytic THP-1 cells (monocytic) and THP-1 cell-derived M0-, M1-, and M2-like macrophages (MΦ) (B) were fixed after 4 h of incubation and stained for DNA (DAPI, blue) and histone (red). Extracellular trap structure is shown in individual channels (DAPI, Histone); co-localization of DNA and histone in merged images (Merge).

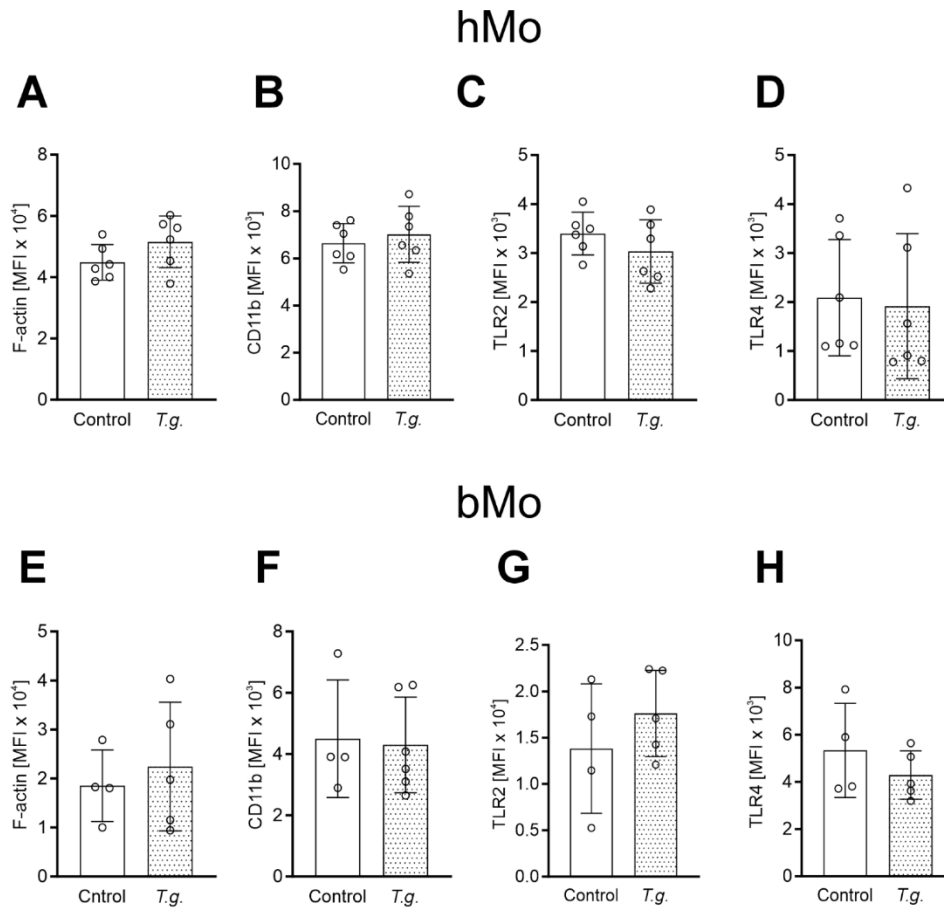
Supplementary Material



Supplementary Figure S9: Nuclear expansion of *Toxoplasma gondii*-exposed primary human and bovine monocytes, monocytic THP-1 cells and THP-1 cell-derived macrophages.

Primary human (hMo) (A) and bovine monocytes (bMo) (B), monocytic THP-1 cells (monocytic) (C) as well as THP-1 cell-derived M0- (D), M1- (E), and M2-like macrophages (MΦ) (F) were left untreated (control), exposed to *T. gondii* tachyzoites (*T.g.*, MOI 1:4) or treated with A23187 [5 µM] or nigericin [0.5 µM]. The cells were fixed after 4 h of incubation and stained for DNA. Nuclear expansion was calculated as the average of the DNA area per cell ($n = 4 - 5$). The graphs show the mean with standard deviation (SD). Statistical analysis was performed by comparing *T.g.*-exposed, A23187-treated or nigericin-treated cells, in each case compared to controls, using a two-way analysis of variance (ANOVA) with residual normality assessed to validate model assumptions, followed by the Bonferroni correction post-hoc pairwise comparison; no p -values $p \leq 0.05$ were observed.

Supplementary Material



Supplementary Figure S10: Expression of F-actin, CD11b, Toll-like receptor (TLR) 2, and TLR4 by primary human and bovine monocytes.

Primary human (hMo) (A – D) and bovine monocytes (bMo) (E – H) were left untreated (control) or exposed to *Toxoplasma gondii* tachyzoites (T.g., MOI 1:4) for 4 h each (n = 4 – 6). The expression of was analyzed using flow cytometry and is given as mean fluorescence intensity (MFI). The graphs show the mean with standard deviation (SD). Statistical analysis was performed by comparing T.g.-exposed cells with controls using the non-parametric Wilcoxon signed-rank test; no p-values below $p \leq 0.05$ were observed.

Supplementary Material

Supplementary Table S1: Estimation of cell death of primary human monocytes, monocytic THP-1 cells and THP-1 cell-derived macrophages.

Figure	Cells, treatment	Cell death [%] mean $\pm$ SD	n
Figure 5A,B	hMo, -	2 $\pm$ 1	6
	hMo, <i>T.g.</i>	4 $\pm$ 2	6
	hMo, LPS	5 $\pm$ 6	6
	hMo, LPS, <i>T.g.</i>	3 $\pm$ 2	6
Figure 5C,D	Monocytic, -	2 $\pm$ 2	9
	Monocytic, <i>T.g.</i>	3 $\pm$ 2	9
	Monocytic, LPS	1 $\pm$ 1	9
	Monocytic, LPS, <i>T.g.</i>	2 $\pm$ 1	9
Figure 5E,F	M0-like MΦ, -	5 $\pm$ 3	6
	M0-like MΦ, <i>T.g.</i>	5 $\pm$ 4	6
	M0-like MΦ, LPS	4 $\pm$ 3	6
	M0-like MΦ, LPS, <i>T.g.</i>	5 $\pm$ 4	6
Figure 5G,H	M1-like MΦ, -	7 $\pm$ 6	6
	M1-like MΦ, <i>T.g.</i>	9 $\pm$ 7	6
	M1-like MΦ, LPS	5 $\pm$ 5	6
	M1-like MΦ, LPS, <i>T.g.</i>	5 $\pm$ 3	6
Figure 5I,J	M2-like MΦ, -	8 $\pm$ 5	6
	M2-like MΦ, <i>T.g.</i>	8 $\pm$ 5	6
	M2-like MΦ, LPS	6 $\pm$ 4	6
	M2-like MΦ, LPS, <i>T.g.</i>	5 $\pm$ 3	6

Primary human monocytes (hMo), monocytic THP-1 cells (monocytic) as well as THP-1 cell-derived M0-, M1-, and M2-like macrophages (MΦ) were left untreated (-), exposed to *T. gondii* tachyzoites (*T.g.*, MOI 1:4) or primed with lipopolysaccharide (LPS) [1 µg/ml] for 4 h each (n = 6 – 9). The cell death via lactate dehydrogenase (LDH) activity was quantified in cell culture supernatants. These data complement the experiments shown in **Figure 5**.

Supplementary Material

Supplementary Table S2: Measurements of the cytokines interleukin (IL)-1 β and IL-6 as well as estimation of cell death in cell culture supernatants of primary human monocytes, monocytic THP-1 cells and THP-1 cell-derived macrophages.

Cells, treatment	IL-1 β [pg/ml] mean $\pm$ SD	IL-6 [pg/ml] mean $\pm$ SD	Cell death [%] mean $\pm$ SD
hMo, -	2 $\pm$ 3, n = 6	0 $\pm$ 0, n = 6	2 $\pm$ 1, n = 5
hMo, A23187	34 $\pm$ 58, n = 6	0 $\pm$ 0, n = 6	26 $\pm$ 15, n = 5
hMo, LPS, BzATP	6994 $\pm$ 3682, n = 6	1209 $\pm$ 497, n = 6	1 $\pm$ 0, n = 5
hMo, LPS, nigericin [#]	7136 $\pm$ 4756, n = 6	450 $\pm$ 261, n = 6	13 $\pm$ 10, n = 2
Monocytic, -	1 $\pm$ 1, n = 9	8 $\pm$ 11, n = 9	2 $\pm$ 2, n = 9
Monocytic, A23187	4 $\pm$ 2, n = 9	9 $\pm$ 12, n = 9	40 $\pm$ 27, n = 9
Monocytic, nigericin [*]	2 $\pm$ 1, n = 9	5 $\pm$ 6, n = 9	29 $\pm$ 39, n = 6
Monocytic, LPS, BzATP	55 $\pm$ 56, n = 9	11 $\pm$ 11, n = 9	2 $\pm$ 3, n = 9
Monocytic, LPS, nigericin [#]	74 $\pm$ 94, n = 9	11 $\pm$ 11, n = 9	78 $\pm$ 23, n = 3
M0-like M Φ , -	3 $\pm$ 2, n = 6	5 $\pm$ 4, n = 6	5 $\pm$ 3, n = 6
M0-like M Φ , A23187	7 $\pm$ 2, n = 6	5 $\pm$ 5, n = 6	67 $\pm$ 24, n = 6
M0-like M Φ , nigericin [*]	4 $\pm$ 1, n = 6	4 $\pm$ 3, n = 6	18 $\pm$ 13, n = 3
M0-like, LPS M Φ , BzATP	91 $\pm$ 46, n = 6	329 $\pm$ 67, n = 6	3 $\pm$ 3, n = 6
M0-like M Φ , LPS, nigericin [#]	452 $\pm$ 414, n = 6	138 $\pm$ 121, n = 6	40 $\pm$ 29, n = 3
M1-like M Φ , -	104 $\pm$ 34, n = 6	8 $\pm$ 6, n = 6	7 $\pm$ 6, n = 6
M1-like M Φ , A23187	671 $\pm$ 110, n = 6	11 $\pm$ 8, n = 6	80 $\pm$ 26, n = 6
M1-like M Φ , nigericin [*]	270 $\pm$ 111, n = 6	8 $\pm$ 6, n = 6	27 $\pm$ 24, n = 3
M1-like M Φ , LPS, BzATP	1171 $\pm$ 414, n = 6	649 $\pm$ 128, n = 6	9 $\pm$ 8, n = 6
M1-like M Φ , LPS, nigericin [#]	1746 $\pm$ 978, n = 6	366 $\pm$ 318, n = 6	34 $\pm$ 24, n = 3
M2-like M Φ , -	3 $\pm$ 2, n = 6	7 $\pm$ 6, n = 6	8 $\pm$ 5, n = 6
M2-like M Φ , A23187	9 $\pm$ 3, n = 6	7 $\pm$ 6, n = 6	60 $\pm$ 36, n = 6
M2-like M Φ , nigericin [*]	5 $\pm$ 2, n = 6	7 $\pm$ 4, n = 6	16 $\pm$ 11, n = 3
M2-like M Φ , LPS, BzATP	64 $\pm$ 51, n = 6	150 $\pm$ 58, n = 6	6 $\pm$ 3, n = 6
M2-like M Φ , LPS, nigericin [#]	142 $\pm$ 111, n = 6	78 $\pm$ 58, n = 6	17 $\pm$ 15, n = 3

Primary human monocytes (hMo), monocytic THP-1 cells (monocytic) as well as THP-1 cell-derived M0-, M1-, and M2-like macrophages (M Φ) were left untreated (-), treated with A23187 [5 μ M] or nigericin [0.5 μ M] ([#]) for 4 h, or primed with lipopolysaccharide (LPS) [1 μ g/ml] for 3.5 h followed by treatment with 2'/3'-O-(4-benzoylbenzoyl)adenosine-5'-triphosphate, tri(ethylammonium) salt (BzATP) [200 μ M] or nigericin [25 μ M] (^{*}) for 40 min each (n = 6 – 9). The concentrations of IL-1 β and IL-6 were measured in cell culture supernatants via ELISA. Cell death was estimated via measurement of the release of lactate dehydrogenase (LDH) into the cell culture medium. These data complement the experiments shown in **Figure 5**.

Supplementary Material



D. UNVERÖFFENTLICHTE UNTERSUCHUNGEN

1. Untersuchung zum Stoffwechselprofil der monozytären THP-1-Zellen sowie der THP-1-M0-, M1- und M2-Makrophagen nach Konfrontation mit *T. gondii*-Tachyzoiten

1.1 Material und Methoden

Die im Folgenden beschriebenen Methoden, einschließlich der Zellkultur bzw. Tachyzoiten-Kultur, der Versuchsdurchführung und der Datenanalyse, wurden wie im Kapitel „*Materials and Methods*“ der **Publikationen I** und **II** (vgl. **Kapitel C**) beschrieben, durchgeführt [229,230]. Die statistische Analyse der erhobenen Daten erfolgte mit der SAS® Statistik Software (Version 9.4, SAS® Statistical Analysis System Institute, Cary, North Carolina, USA) in der Arbeitsgruppe Biomathematik und Datenverarbeitung des Fachbereichs Veterinärmedizin der JLU Gießen (Frau PD Dr. Kathrin Büttner und Herr Andreas Schaubmar). Die Grafiken wurden mit der Software GraphPad Prism® (Version 10.2.3, GraphPad Software, Boston, Massachusetts, USA) erstellt.

1.1.1. THP-1-Zellkultur sowie Differenzierung und Polarisierung zu THP-1-M0-, M1- und M2-Makrophagen

Zur Stammhaltung wurden monozytäre THP-1-Zellen (engl. = *Tohoku Hospital Pediatrics-I*; Leibniz-Institut, Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen [DSMZ], Braunschweig, Deutschland, Katalognummer [Kat.-Nr.] ACC 16) in T-75-Zellkulturflaschen (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland, Kat.-Nr. 83.3911.002) mit Nährmedium I (vgl. **Tabelle 1**) für 5 Tage ohne Differenzierungsfaktoren bei 37 °C und 5 % Kohlenstoffdioxid (CO₂) kultiviert (**Abb. 8**).

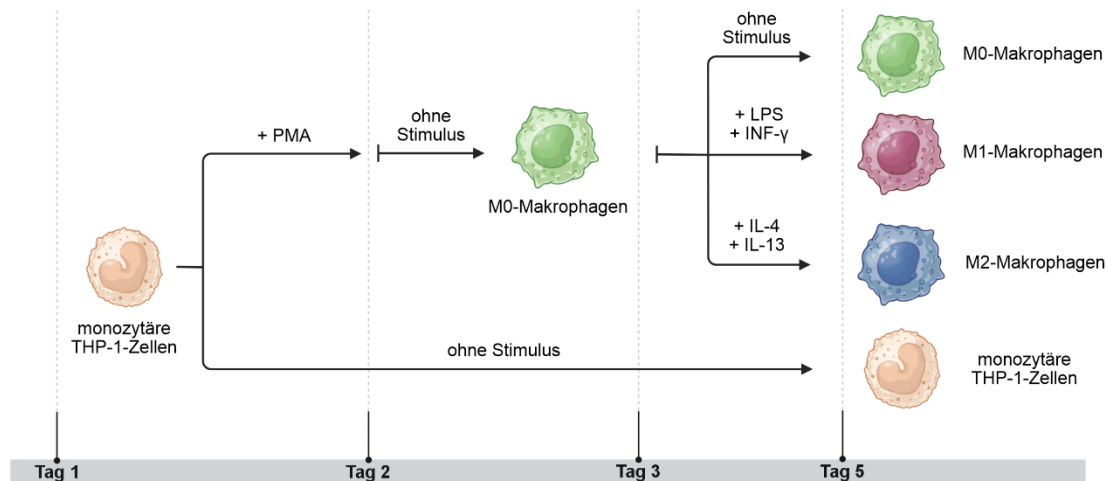


Abb. 8: Schematische Darstellung der Kultivierung, Differenzierung und Polarisierung von THP-1-Zellen.

Monozytäre THP-1-Zellen, welche in THP-1-M0-, M1- und M2-ähnliche Makrophagen (M0/M1/M2-Makrophagen) differenziert werden sollten, wurden am Tag 1 unter Zusatz von Phorbol-Myristat-Acetat (PMA) in das Nährmedium auspassagiert und am darauffolgenden Tag mit frischem Nährmedium gewaschen (Tag 2), gefolgt von einer Ruhephase ohne weitere Stimulation zur Ausreifung zu nicht-polarisierten THP-1-M0-Makrophagen. Am Tag 3 wurden die Zellen entweder für 48 Stunden unter Erhalt des M0-Phänotyps ohne weitere Stimulation kultiviert oder für 48 Stunden durch Stimulation mit Lipopolysaccharid (LPS) und Interferon- γ (IFN- γ) in THP-1-M1-Makrophagen bzw. unter Verwendung von Interleukin (IL)-4 und IL-13 in THP-1-M2-Makrophagen polarisiert. Monozytäre THP-1-Zellen wurden von Tag 1–Tag 5 kontinuierlich bei 37 °C und 5 % Kohlenstoffdioxid (CO₂) ohne Differenzierungsfaktoren kultiviert (Tag 1–5) (erstellt mit BioRender).

Für die Differenzierung und Polarisierung wurden in 12-Well-Platten (Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich, Kat.-Nr. 655180) die geplanten Differenzierungsansätze entsprechende Anzahl von Wells mit je 3×10^5 monozytären THP-1-Zellen pro Well in je 1 ml Nährmedium I, supplementiert mit 50 nM Phorbol-Myristat-Acetat (PMA; Thermo Fisher Scientific, Kat.-Nr. P1585), gemäß einem zuvor modifizierten Differenzierungsprotokoll (**Abb. 8**) [11,32,33], ausgesät. Nach 24 Stunden wurde das Nährmedium I mit PMA mit frischem Nährmedium I ausgetauscht. Nach weiteren 24 Stunden waren die Zellen zu adhärenen THP-1-M0-ähnlichen Makrophagen (THP-1-M0-Makrophagen) differenziert. Die Polarisierung erfolgte im Anschluss gemäß einem zuvor modifizierten Protokoll für THP-1-M1- und M2-Makrophagen [11,32,33]: Die M1-Polarisierung erfolgte durch eine 48-stündige Kultivierung in Nährmedium I, supplementiert mit 10 ng/ml Lipopolysaccharid (LPS; *E. coli* O111:B4, Sigma-Aldrich, Merck, Kat.-Nr. L2630) und 10 ng/ml Interferon- γ (IFN- γ ; R&D Systems, Minneapolis,

USA, Kat.-Nr. 285-IF). Für die M2-Polarisierung wurden die Zellen 48 Stunden in Nährmedium I kultiviert, welches mit 20 ng/ml Interleukin (IL)-4 (PeproTech®, Thermo Fisher Scientific, Kat.-Nr. 200-04) und 20 ng/ml IL-13 (Gibco™, PeproTech®, Thermo Fisher Scientific, Kat.-Nr. 200-13) supplementiert war (**Abb. 8**).

An Tag 5 der Kultivierung wurden die in Suspension wachsenden monozytären THP-1-Zellen bei 500 x g, 8 Minuten, Raumtemperatur (RT) abzentrifugiert, in Nährmedium II (vgl. **Tabelle 1**) resuspendiert, in einer Neubauer-Zählkammer (Glaswarenfabrik Karl Hecht, Sondheim vor der Rhön, Deutschland, Kat.-Nr. 40441001) gezählt und in einer Dichte von 5×10^5 Zellen/Well in 12-Well-Platten neu ausgesät. An Tag 5 wurden zudem die differenzierten THP-1-M0-, M1- und M2-Makrophagen für einen Nährmediumwechsel zunächst mit Dulbecco's phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS, Sigma-Aldrich, Merck, Kat.-Nr. D8537) gewaschen und anschließend mit 500 µl Nährmedium II überschichtet. Um die Zellzahl nach der Differenzierung und Polarisierung zu bestimmen, wurden in parallel kultivierten 12-Well-Platten die THP-1-M0-, M1- und M2-Makrophagen gemäß den Herstellerangaben mit TrypLE™ Express (Gibco™, Thermo Fisher Scientific, Kat.-Nr. 12605010) abgelöst und in einer Neubauer-Zählkammer gezählt.

1.1.2. *In vitro*-Kultivierung von *T. gondii*-Tachyzoiten

Allgemeiner Hintergrund:

Toxoplasma gondii (*T. gondii*) weist ein außerordentlich breites Wirtsspektrum auf und kann nahezu jede kernhaltige Zelle warmblütiger Organismen infizieren [231]. Die erste erfolgreiche Kultivierung von *T. gondii*-Tachyzoiten (damals noch nicht als eigenständiges Stadium benannt) gelang im Jahr 1929 durch Inokulation in embryonierte Hühnereier, gefolgt im Jahr 1937 von der Etablierung der ersten Gewebekultur in explantiertem Gewebe aus Hühnerembryonen [232–235]. Während Tachyzoiten bei der *in vitro*-Kultivierung eine geringe Zelltypspezifität zeigen, gestaltet sich die Kultivierung langsam teilender Bradyzoiten sowie die sexuelle Vermehrung deutlich schwieriger. Bradyzoiten sind auf nicht-teilungsfähige Zellen wie Nerven- und Muskelzellen angewiesen um ihre weitere Entwicklung in Gewebezysten zu durchlaufen [235]. Die sexuelle Entwicklung von *T. gondii* erfolgt ausschließlich im Darmepithel von

Feliden, wodurch die Übertragung des sexuellen Entwicklungsabschnitts auf ein *in vitro*-Modell erheblich erschwert wird [235]. Für die *in vitro*-Kultivierung von *T. gondii* ist daher das schnell proliferierende, sich asexuell vermehrende Tachyzoiten-Stadium geeignet [235]. Über die Isolierung des RH-Stamms in den 1940er-Jahren wurde ein weltweit etabliertes Standardmodell für die Kultivierung von *T. gondii*-Tachyzoiten verfügbar [235,236]. Zur Vermehrung und langfristigen Kultivierung von Tachyzoiten bieten zahlreiche Zelltypen und Zelllinien effiziente Wachstumsbedingungen für den Parasiten, darunter humane Vorhaut-Fibroblasten (HFF-Zelllinie) oder Nierenepithelzellen des afrikanischen Grünen Affen (MARC-145-Zelllinie, engl. = *Meat Animal Research Center*) [235,237]. Nach der Infektion der Wirtszellen mit Tachyzoiten und der intrazellulären Vermehrung des Parasiten kommt es zur Lyse der Wirtszelle und der Freisetzung von Tachyzoiten (Abb. 9), wodurch eine kontinuierliche Erhaltung des Parasitenstadiums über mehrere Passagen ermöglicht wird.

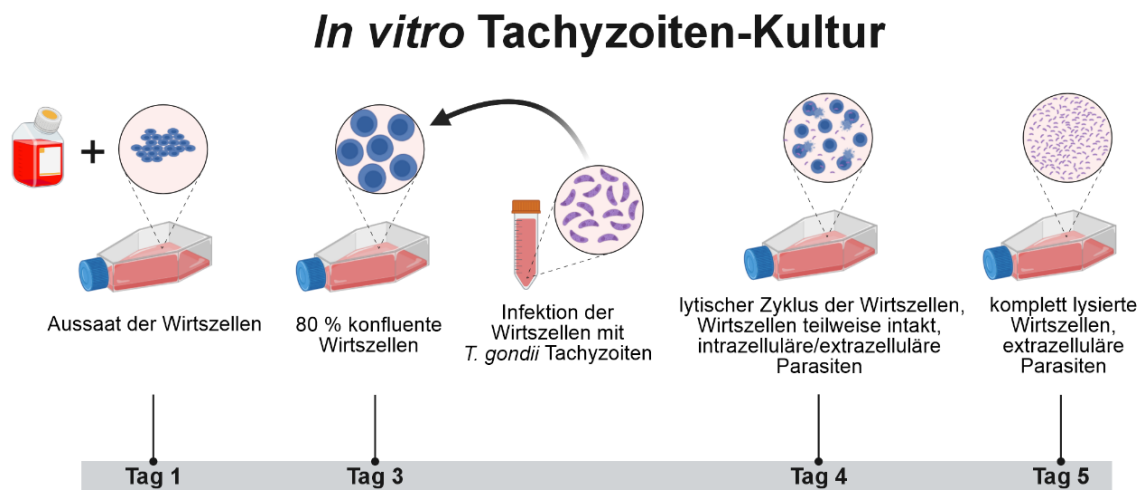


Abb. 9: Schematische Darstellung der *in vitro*-Kultur von *T. gondii*-Tachyzoiten

Propagierung von *T. gondii*-Tachyzoiten: Aussaat der Wirtszellen (Tag 1), Erreichen von 80 % Konfluenz der Wirtszellen und Infektion mit *T. gondii*-Tachyzoiten (Tag 3), Ablauf des lytischen Zyklus in Wirtszellen (Tag 4) und vollständige Lyse der Wirtszellen mit freigesetzten, extrazellulär freigesetzten Tachyzoiten (Tag 5) (erstellt mit BioRender).

Im Verlauf der immer wiederkehrenden *in vitro*-Kultivierung von Tachyzoiten wurde eine zunehmende Wirtsunabhängigkeit, erhöhte Virulenz und eine schnellere Lyse der Wirtszellen beobachtet [77,235,238,239]. Die Anpassungen der Tachyzoiten an die Kultivierungsbedingungen basieren u. a. auf einer Veränderung der Genexpression (transkriptionelle Reprogrammierung), die als Reaktion auf Veränderungen des extrazellulären Milieus erfolgt [235,240]. Trotz der Einschränkung, dass Tachyzoiten nur

das akute Infektionsstadium darstellen, sind Tachyzoiten-basierte Zellkultursysteme von zentraler Bedeutung für das Verständnis der Zellbiologie, Pathogenese und Entwicklungsregulation von *T. gondii*. Darüber hinaus werden sie auch als Referenzmodelle für andere Apicomplexa, wie z. B. *Plasmodium*, *Eimeria*, *Neospora*, *Babesia*, *Theileria* oder *Cryptosporidium*, verwendet [235,241].

Methodisches Vorgehen in der vorliegenden Arbeit:

Die käuflichen, vitalen Tachyzoiten von *T. gondii* (RH-Stamm) wurden aus kontinuierlichen Passagen in MARC-145-Zellen unter Verwendung von Nährmedium-Toxo (vgl. **Tabelle 1**) isoliert (**Abb. 9**). Die aus den Zellen freigesetzten Tachyzoiten wurden durch Zentrifugation (460 x g, 1 Minute) von Zelltrümmern getrennt. Die Tachyzoiten enthaltenden, zellfreien Nährmediumüberstände wurden filtriert (5 µm Porengröße, Satorius, Göttingen, Deutschland, Minisart®, Kat.-Nr. 17594-K) und pelletiert (460 x g, 5 Minuten, RT). Die Tachyzoiten wurden in Nährmedium II resuspendiert und nach Auszählung in einer Neubauer-Zählkammer zur Konfrontation von THP-1-Zellen verwendet. Die Konfrontation erfolgte bei 37 °C und 5 % CO₂-Atmosphäre über 6 Stunden bei einer Multiplizität der Infektion (MOI, *multiplicity of infection*) von 1:4 (Zellen:Parasiten).

Tabelle 1: Zusammensetzung der eingesetzten Zellkulturnährmedien

Die Tabelle zeigt die Zusammensetzung der verwendeten Zellkulturmedien für die Kultur der THP-1-Zellen und *T. gondii*-Tachyzoiten. DMEM = *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*; FKS = fetales Kälberserum (FKS); Kat.-Nr. = Katalognummer.

Bezeichnung	Zusammensetzung
Nährmedium I	Glukose- und Glutamin-freies DMEM; Gibco™, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA, Kat.-Nr. A1443001); 11 mM D-Glucose (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland, Kat.-Nr. X997.1); 2 mM L-Glutamin (Sigma-Aldrich, Merck, Kat.-Nr. G3126); 10 % FKS Xtra (Capricorn Scientific, Ebsdorfergrund, Deutschland, Kat.-Nr. FBS-16A); 50 U/ml Penicillin und 50 µg/ml Streptomycin (Gibco™, Thermo Fisher Scientific, Kat.-Nr. 151401222)
Nährmedium II	Glukose- und Glutamin-freies DMEM (Gibco™, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA, Kat.-Nr. A1443001); 2 mM D-Glucose (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland, Kat.-Nr. X997.1); 1 mM L-Glutamin (Sigma-Aldrich, Merck, Kat.-Nr. G3126); 10 % hitzeinaktiviertem FKS Xtra (Capricorn Scientific, Ebsdorfergrund, Deutschland, Kat.-Nr. FBS-16A); 50 U/ml Penicillin und 50 µg/ml Streptomycin (Gibco™, Thermo Fisher Scientific, Kat.-Nr. 151401222)
Nährmedium-Toxo	DMEM (Sigma-Aldrich, Merck, Kat.-Nr. D64299; 5 % FKS Xtra (Capricorn Scientific, Ebsdorfergrund, Deutschland, Kat.-Nr. FBS-16A); 50 U/ml Penicillin und 50 µg/ml Streptomycin (Gibco™, Thermo Fisher Scientific, Kat.-Nr. 151401222)

1.1.3. Messung von Stoffwechselumsatzraten

Die Kultivierung der monozytären THP-1-Zellen und der THP-1-M0-, M1- und M2-Makrophagen sowie die Gewinnung der *T. gondii*-Tachyzoiten und die Konfrontation der THP-1-Zellen erfolgte gemäß den **Kapiteln D.1.1.1** und **D.1.1.2** und der **Abb. 8** und **Abb. 9**. Nach der 6-stündigen Konfrontation wurden die Zellkulturüberstände der THP-1-Zellen gesammelt, zur Entfernung der Zellen und *T. gondii*-Tachyzoiten bei RT zentrifugiert (820 x g, 8 Minuten) und 15 Minuten bei 95 °C erhitzt. Nach erneuter Zentrifugation (8000 x g, 10 Minuten) wurden die Überstände in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C bis zu den Messungen gelagert. Die Konzentrationen von Glukose, Pyruvat, Laktat, Glutamin, Glutamat, Aspartat, Alanin und Serin wurden mit einem Respons[®] 920 Klinischen Analysegerät (DiaSys Diagnostic Systems GmbH, Holzheim, Deutschland) bestimmt. Die Stoffwechselumsatzraten wurden in nmol/(h x 10⁵ Zellen) in Relation zu parallel inkubierten, zellfreien Nährmediumkontrollen berechnet [242].

2.1 Ergebnisse

Die Messung der Stoffwechselumsatzraten von Glukose, Laktat, Glutamin, Glutamat, Pyruvat, Aspartat, Alanin und Serin von monozytären THP-1-Zellen und THP-1-M0-, M1- und M2-Makrophagen nach 6-stündiger *T. gondii*-Tachyzoiten-Konfrontation ergab ausschließlich bei den THP-1-M2-Makrophagen einen signifikanten Effekt der *T. gondii*-Konfrontation, welcher in einer Umkehr im Alanin-Stoffwechsel von Alanin-Aufnahme aus dem Nährmedium in den Kontrollzellen zu Alanin-Abgabe in das Nährmedium der *T. gondii* konfrontierten THP-1-M2-Makrophagen bestand. Alle anderen Umsatzraten waren unabhängig vom Zelltyp (Monozytär, M0, M1 oder M2) unter der Parasitenkonfrontation im Vergleich zu den nicht konfrontierten Kontrollen nicht signifikant verändert (**Abb. 10**).

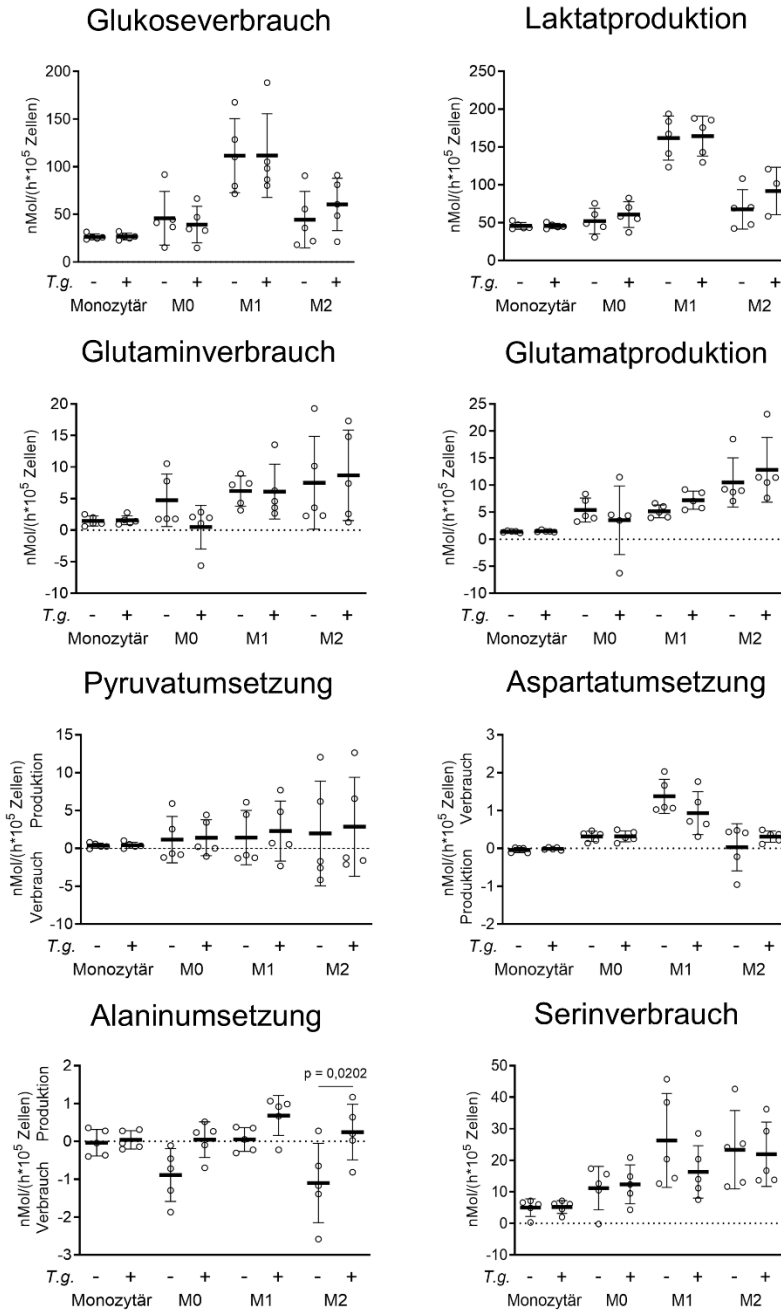


Abb. 10: Metabolische Signaturen von monozytären THP-1-Zellen und THP-1-Makrophagen nach Konfrontation mit *T. gondii*-Tachyzoiten

Monozytäre THP-1-Zellen (Monozytär) und THP-1-M0-, M1- und M2-Makrophagen verblieben entweder unbehandelt (-) oder wurden über 6 Stunden mit *T. gondii*-Tachyzoiten (T.g.; +; MOI 1:4) konfrontiert (n = 5). Die Umsatzraten von Glukose, Laktat, Pyruvat, Glutamin, Glutamat, Aspartat, Alanin und Serin wurden als Verbrauch oder Produktion in nmol/(h x 10⁵ Zellen) berechnet. Die Grafiken zeigen den Mittelwert mit der Standardabweichung (SD) und p-Wert = < 0,05. Für die Statistik wurde eine zweifaktorielle Varianzanalyse (ANOVA, *Analysis of Variance*) der Mittelwerte von 5 biologischen Replikaten der Umsatzraten durchgeführt. Die Normalverteilung der Residuen wurde überprüft, um die Modellannahmen zu validieren. Die nachfolgenden paarweisen Vergleiche wurden mit Bonferroni-Korrektur zur Anpassung an multiples Testen durchgeführt.

E. ERWEITERTE DISKUSSION

Die in den Abschnitten C und D dargestellten Ergebnisse lassen sich wie folgt zusammenfassen:

1. Validierung der THP-1 (engl. = *Tohoku Hospital Pediatrics-1*)-Zelllinie:

- Die Morphologie der differenzierten bzw. polarisierten THP-1-M0-, M1- und M2-ähnlichen Makrophagen (THP-1-M0/M1/M2-Makrophagen) entsprach in allen Makrophagen-Typen (M0/M1/M2) den jeweiligen phänotypischen Charakteristika.
- Die THP-1-M1-Makrophagen exprimierten vermehrt pro-inflammatorische Marker (*Cluster of Differentiation* [CD]38, CD80 und CD86), während die THP-1-M2-Makrophagen verstärkt anti-inflammatorische Marker (CD206, CD209) exprimierten.
- Die THP-1-M0- und M1-Makrophagen reagierten mit einer vermehrten Sekretion von Interleukin (IL)-1 β auf die Stimuli 2'(3')-O-(4-Benzoylbenzoyl) Adenosin 5'-Triphosphat (BzATP) bzw. Adenosintriphosphat (ATP), welche mit einer *family pyrin domain containing 3* (NLRP3)-Inflammasom-abhängigen Sekretion gleichzusetzen ist, während die THP-1-M2-Makrophagen ausschließlich auf Nigericin reagierten (P2X7-Rezeptor/NLRP3-Inflammasom-unabhängig).
- Die THP-1-M1- und M2-Makrophagen zeigten hinsichtlich der Umsatzraten in der Glykolyse, Glutaminolyse und Serinolyse ein differenzielles Stoffwechselprofil, welches mit den in veröffentlichten Studien beschriebenen Eigenschaften für M1- und M2-Makrophagen übereinstimmte.

2. Effekt von *T. gondii*-Tachyzoiten auf die Morphologie und MET-Freisetzung:

- Die 4-stündige Konfrontation mit *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*)-Tachyzoiten induzierte in primären humanen und bovinen Monozyten, monozytären THP-1-Zellen sowie THP-1-Makrophagen eine Zellaktivierung.

- Die Konfrontation mit *T. gondii*-Tachyzoiten führte grundsätzlich zur Freisetzung von METs in den genannten Zelltypen. Die Quantifizierungsrate war dabei tendenziell höher, erreichte jedoch kein Signifikanzniveau.

3. Effekt von *T. gondii*-Tachyzoiten auf die IL-1 β - und IL-6-Sekretion:

- In primären humanen Monozyten induzierte die 4-stündige Konfrontation mit *T. gondii*-Tachyzoiten die Sekretion von IL-1 β und IL-6.
- In THP-1-M1-Makrophagen wurde nur die Sekretion von IL-1 β durch die Konfrontation mit *T. gondii*-Tachyzoiten gesteigert.
- Eine kombinierte Behandlung mit *T. gondii*-Tachyzoiten und Lipopolysaccharid (LPS) führte im Vergleich zur alleinigen LPS-Behandlung in allen THP-1-Makrophagen (M0/M1/M2) zu einer erhöhten IL-1 β -Sekretion, in monozytären THP-1-Zellen zu einer erhöhten IL-6-Sekretion sowie in primären humanen Monozyten zu einer erhöhten Sekretion von IL-1 β und IL-6.

4. Effekt von *T. gondii*-Tachyzoiten auf die Expression von Oberflächenmarkern:

- Die 4-stündige Konfrontation mit *T. gondii*-Tachyzoiten hatte in primären humanen und bovinen Monozyten keinen Einfluss auf die Expression von Toll-like Rezeptor (TLR)2 , TLR4, CD11b und F-Aktin nicht.

5. Effekt von *T. gondii*-Tachyzoiten auf die metabolische Signatur:

- Die 6-stündige Konfrontation mit *T. gondii*-Tachyzoiten führte in monozytären THP-1-Zellen sowie in THP-1-M0- und M1-Makrophagen zu keinen Veränderungen in den Metaboliten der Glykolyse, Glutaminolyse und Serinolyse. Bei THP-1-M2-Makrophagen kam es hingegen zu einer Umkehr im Alanin-Stoffwechsel.

1. Validierung der THP-1-Zelllinie

Neben der Erfassung der frühen Immunantwort primärer humaner und boviner Monozyten auf eine Konfrontation mit vitalen *T. gondii*-Tachyzoiten (vgl. **Publikation II**) lag bei dieser Arbeit ein weiterer Schwerpunkt auf der Untersuchung der Frage, inwieweit die humane THP-1-Zelllinie als ergänzendes Zellkulturmodell zu Primärzellen geeignet ist. Hierbei wurden *in vitro*-differenzierte THP-1-M0-Makrophagen und *in vitro*-polarisierte THP-1-M1- und M2-Makrophagen in die Analyse einbezogen, um ihre Eignung für die konkrete Fragestellung dieser Arbeit sowie für immunologische Untersuchungen im Allgemeinen zu validieren (vgl. **Publikation I**). Der Prozess zur Differenzierung und Polarisierung von THP-1-Makrophagen (M0/M1/M2) gemäß dem von Kooperationspartnern erarbeiteten Protokoll ist in **Kapitel D.1.1.1** beschrieben.

In **Publikation I** wurde die cholinerge Modulation der BzATP-induzierten Interleukin (IL)-1 β -Sekretion in humanen, peripheren mononukleären Blutzellen (PBMCs, engl. = *peripheral blood mononuclear cells*) abgeleiteten M0/M1-ähnlichen Makrophagen und humanen Peritonealmakrophagen aus Dialysaten sowie in monozytären THP-1-Zellen und THP-1-M0- und M1-Makrophagen untersucht. Dabei wurde gezeigt, dass:

- nikotinische Acetylcholinrezeptor (nAChR)-Agonisten (wie Acetylcholin [ACh], Cholin, Nikotin und Phosphocholin [PC]) die BzATP-induzierte IL-1 β -Sekretion in allen untersuchten Zelltypen hemmen.
- nAChR mit den Untereinheiten $\alpha 7$ - sowie $\alpha 9$ - und/oder $\alpha 10$ die Hemmung der BzATP-induzierten IL-1 β -Sekretion vermitteln (nachgewiesen durch antagonistische Hemmung mit spezifischen Conopeptiden: [V11L; V16D]ArIB (selektiv für $\alpha 7$ -nAChR) und RgIA4 (selektiv für $\alpha 9$ -/ $\alpha 10$ -nAChR).
- die cholinerge Kontrolle selektiv auf die BzATP bzw. ATP (P2X7-Rezeptor/ NLRP3-Inflammasom-abhängig) IL-1 β -Sekretion wirkt, nicht jedoch auf die Nigericin-induzierte, ATP-unabhängige Sekretion von IL-1 β .
- nAChR-Agonisten zudem die BzATP-induzierte Sekretion der Zytokine IL-1 α und IL-18 hemmen.

Ergänzend zur funktionellen Charakterisierung der cholinergen Modulation enthielt **Publikation I** eine Validierung der THP-1-Zelllinie als funktionelles *in vitro*-Modell für

mononukleäre Phagozyten hinsichtlich der Morphologie, der IL-1 β -Sekretion, der Oberflächenmarkerexpression sowie des Stoffwechselprofils. In der vorliegenden Arbeit werden diese Validierungsdaten detailliert dargestellt und diskutiert, um zu klären, ob die verwendeten THP-1-Zellen ein geeignetes Modell für die Untersuchung der frühen Immunantwort gegen *T. gondii*-Tachyzoiten ist.

Martinez et al. (2008) fassen zusammen, dass die phänotypischen Ausprägungen polarisierter *in vitro*-Makrophagen maßgeblich durch die Wahl der Polarisationsstimuli beeinflusst werden [30]. Eine im Dezember 2025 durchgeführte Pub-Med-Suche mit den kombinierten Suchbegriffen „THP-1“, „macrophage“ und „differentiation“ listete 3.163 Veröffentlichungen auf und verdeutlicht, dass es eine Vielzahl von Differenzierungs- und Polarisierungsprotokollen zur Generierung von THP-1-M0-, M1- und M2-ähnliche Makrophagen (THP-1-M0/M1/M2-Makrophagen) gibt. Die veröffentlichten Differenzierungs-, Polarisierungs- und Charakterisierungsprotokolle für THP-1-Makrophagen variierten erheblich, was die Vergleichbarkeit der Forschungsergebnisse signifikant beeinträchtigt [29]. Die in der Literatur angewandten Protokolle zur Differenzierung und Polarisierung von monozytären THP-1-Zellen zu THP-1-M0-, M1- und M2-Makrophagen beruhen zunächst auf einer Differenzierung mit Phorbol-Myristat-Acetat (PMA; 3–325 nM) für 24–72 Stunden zu THP-1-M0-Makrophagen. Anschließend erfolgt eine Polarisierung in spezifischen Polarisierungsmedien mit zusätzlichen Stimuli wie LPS, Interferon- γ (IFN- γ) und *Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor* (GM-CSF) für THP-1-M1-Makrophagen bzw. IL-4, IL-13 und *macrophage colony-stimulating factor* (M-CSF) für THP-1-M2-Makrophagen für 2–5 Tage [29,31,207,243–245]. Variationen in den Kulturbedingungen, wie die Konzentrationen der zur Polarisierung eingesetzten Substanzen und die Inkubationszeiten, bedingen eine starke Heterogenität der generierten THP-1-Makrophagen [31]. Trotz der systematischen Analyse von 85 Protokollen zur Differenzierung und Polarisierung monozytärer THP-1-Zellen zu THP-1-Makrophagen (M0/M1/M2), welche in einer Übersichtsarbeit von Mohd Yasin et al. (2022) zusammengefasst sind, existiert kein standardisiertes, reproduzierbares Differenzierungs- und Polarisierungsprotokoll [29]. Auf Basis experimenteller Vortestungen der Arbeitsgruppe Grau (Experimentalchirurgie, Justus-Liebig-Universität, Co-Autoren der **Publikationen I** und **II**) wurden die gängigen Stimuli, welche für die Differenzierung bzw. Polarisierung verwendet werden (PMA, IFN- γ , LPS, IL-4 und IL-13), hinsichtlich

Konzentration und Inkubationszeit getestet und deren Einsatz optimiert [11,32,33]. Ziel war es, ein modifiziertes Protokoll zu etablieren, das für immunologische Fragestellungen, insbesondere für die Untersuchungen der Zytokin-Sekretion und des Stoffwechselprofils, geeignet ist, sowie ein valides *in vitro*-Modell zu schaffen. Das von den Kooperationspartnern erarbeitete Protokoll sah vor *i.* für die Differenzierung zu THP-1-M0-Makrophagen 50 nM PMA über 24 Stunden, *ii.* für die Polarisierung zu THP-1-M1-Makrophagen IFN- γ und LPS (je 10 ng/ml) über 48 Stunden, sowie *iii.* für die Polarisierung zu THP-1-M2-Makrophagen IL-4 und IL-13 (je 20 ng/ml) über 48 Stunden einzusetzen (vgl. **Kapitel D.1.1.1**).

Morphologie:

Die Morphologie der *in vitro*-differenzierten und polarisierten THP-1-Makrophagen (morphologische Analysen durch Co-Autoren; Daten aus **Publikation I**) wies nach der Pappenheim-Färbung für die THP-1-M0-Makrophagen eine runde bis spindelförmige, adhärente Zellform auf, während die THP-1-M1- und M2-Makrophagen dagegen eine adhärente, ausgeprägte, spindelförmige, Fibroblasten- und DC-ähnliche Gestalt aufwiesen [246,247]. THP-1-M0-Makrophagen waren im Vergleich zu THP-1-M1-Makrophagen insgesamt kleiner und bildeten häufig amöboide Zellfortsätze aus. Diese phänotypischen Befunde stimmen mit bereits veröffentlichten Daten überein. Für THP-1-M0-Makrophagen wurde eine runde, unregelmäßige und adhärente Zellform beschrieben, für THP-1-M1- und M2-Makrophagen eine unregelmäßige Morphologie, einschließlich der Ausbildung von Pseudopodien [245,248,249]. Zusammenfassend bestätigten die vorliegenden morphologischen Ergebnisse die in der Literatur beschriebenen charakteristischen Phänotypen der M0-, M1- und M2-Makrophagen.

Oberflächenmarker:

In Analysen von Oberflächenmarkern (durchgeführt von Co-Autoren; Daten aus **Publikation I**) wurden die pro-inflammatorischen Marker CD38 (eine zyklische ADP-Ribose-Hydrolase) [250,251], CD83 [252] sowie die Ko-Stimulatoren CD80 und CD86 (letztere drei: Mitglieder der Immunoglobulin-Superfamilie) untersucht, welche typischerweise auf aktivierten Antigen-präsentierenden Zellen (APCs, engl. = *Antigen-Presenting Cells*) exprimiert werden [253,254]. CD38 ist ein etablierter Marker pro-inflammatorischer M1-Makrophagen, dessen genaue Rolle in der Immunregulation jedoch nicht abschließend geklärt ist [250]. Ergänzend wurden die typischen anti-

inflammatorischen Marker CD163 (einem Mitglied der cysteinreichen Superfamilie der Scavenger-Rezeptoren der Monozyten- und Makrophagen-Linie) [255,256], CD206 (Mannose-Rezeptor, MRC1) und CD209 (C-Typ-Lektin-Rezeptor 4) bestimmt [203,257]. Im Vergleich zu THP-1-M0-Makrophagen führte die Polarisierung zu THP-1-M1-Makrophagen zu einer Hochregulation der pro-inflammatorischen Marker CD38, CD80 und CD86. Die Expression des transienten Aktivierungsmarkers CD83, welcher typischerweise durch LPS-Stimulation induziert wird [252,258], variierte nicht zwischen THP-1-M0-, M1- und M2-Makrophagen. Die anti-inflammatorischen Marker CD206 und CD209 wurden dagegen in THP-1-M2-Makrophagen im Vergleich zu THP-1-M0-Makrophagen vermehrt exprimiert. Zu CD163 konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den drei Phänotypen nachgewiesen werden. Dies könnte auf das hier verwendete IL-4-basierte Polarisierungsprotokoll zurückzuführen sein, da CD163 vornehmlich bei IL-10-induzierten M2-Makrophagen induziert wird [256,259]. Die vorliegenden Ergebnisse stimmen insgesamt mit den in der Literatur beschriebenen typischen Expressionsmustern pro- und anti-inflammatorischer Oberflächenmarker für M1- und M2-Makrophagen überein.

IL-1 β -Sekretion:

Die IL-1 β -Sekretion LPS-stimulierter Zellen als Reaktion auf die Behandlung mit BzATP oder ATP (beides P2X7-Rezeptoragonisten) sowie mit Nigericin (welches als porenbildende Substanz unabhängig vom P2X7-Rezeptor einen Kalium-Efflux auslöst) wurde von Co-Autoren untersucht (Daten aus **Publikation I**). THP-1-M0- und THP-1-M1-Makrophagen zeigten eine starke IL-1 β -Antwort auf alle Stimuli. THP-1-M1-Makrophagen setzten dabei nach BzATP- und ATP-Stimulation die höchsten Mengen von IL-1 β frei. Dies deckt sich mit einer in der Literatur beschriebenen, ausgeprägten P2X7-Rezeptor/NLRP3-Inflammasom-vermittelten IL-1 β -Sekretion in M1-polarisierten Makrophagen [11,260,261]. In THP-1-M2-Makrophagen wurde dagegen keine BzATP/ATP-induzierte IL-1 β -Sekretion beobachtet. Stattdessen wurde eine verstärkte IL-1 β -Sekretion nur nach Stimulation mit Nigericin gemessen. Diese Ergebnisse sind in Übereinstimmung mit veröffentlichten Daten, die eine reduzierte P2X7-Rezeptor/NLRP3-Inflammasom-Antwort und eine abgeschwächte Caspase-1-Aktivität für M2-polarisierte Makrophagen belegen [262]. Insgesamt lassen die Ergebnisse eine P2X7-Rezeptor-unabhängige NLRP3-Aktivierung über Kalium-Efflux in M2-Makrophagen vermuten [263,264]. Damit bestätigen die vorliegenden

funktionellen Daten die erfolgreiche funktionelle Polarisierung der THP-1-Makrophagen, wie sie für polarisierte M1- und M2-Makrophagen in der Literatur beschrieben ist.

Stoffwechselprofil:

Die Analyse der glykolytischen, glutaminolytischen und serinolytischen Umsatzraten in den Nährmediumüberständen von monozytären THP-1-Zellen und THP-1-M0-Makrophagen ergab keine signifikanten metabolischen Unterschiede. Insgesamt waren die Umsatzraten im Glukose-, Glutamin- und Serin-Verbrauch sowie in der Laktat- und Glutamat-Produktion in den monozytären THP-1-Zellen im Vergleich zu den differenzierten und polarisierten THP-1-M1- und M2-Makrophagen signifikant niedriger.

Im Gesamtvergleich aller hier untersuchten THP-1-Zellsubtypen wiesen die THP-1-M1-Makrophagen die höchsten Umsatzraten im Glukose- und Aspartat-Verbrauch sowie der Laktat-Produktion auf. Dieses Stoffwechselmuster der THP-1-M1-Makrophagen steht in der Glykolyse (Metabolisierung von Glukose zu Laktat) im Einklang mit der in der Literatur für M1-polarisierte Makrophagen beschriebenen Hochregulierung der Expression des Glukosetransporters 1 (GLUT1) sowie der Enzyme Hexokinase (HK), 6-Phosphofrukto-2-Kinase/Fruktose-2,6-Bisphosphatase Isoenzym 3 (PFKB3), Pyruvatkinase-Isoenzym Typ M2 (PKM2) und Laktat-Dehydrogenase (LDH) [112,114,197–199,201]. Die Hochregulierung der 6-Phosphofruktokinase 1 (PFK1) erfolgt über einen in M1-Makrophagen beobachteten Anstieg des PFKB-Isoenzym 3. Die Hochregulierung von GLUT1, PKM2 und LDH wurde in M1-Makrophagen mit der Stabilisierung der α -Untereinheit des *hypoxia-inducible factor-1* (HIF-1) in Verbindung gebracht [112,114,189,197–199]. Die Stabilisierung der HIF-1 α -Untereinheit beruht auf der Hemmung der für deren Abbau verantwortlichen Prolylhydroxylase (PHD) durch das Citrat-Zwischenprodukt Succinat [193]. Als Ursache für den Anstieg der Succinat-Spiegel wird die zweifache Unterbrechung (Trunkierung) des Tricarbonsäurezyklus (TCA-Zyklus, engl. = *tricarboxylic acid cycle*) auf der Reaktionsstufe der Isocitrat-Dehydrogenase (IDH) und der Succinat-Dehydrogenase (SDH) in M1-Makrophagen verantwortlich gemacht [112,114,194]. In der Folge der reduzierten Umsetzung von Aconitat zu α -Ketoglutarat (α -KG) durch die niedrige IDH-Aktivität wird Aconitat in den M1-Makrophagen zur Synthese von Itaconat verwendet. Itaconat spielt eine wichtige Rolle für die Regulation der entzündlichen Prozesse in M1-

Makrophagen [114,194]. Durch die Itaconat-induzierte Hemmung der SDH kommt es zu einem Anstieg des Succinat-Spiegels, wodurch die HIF-1 α -Untereinheit stabilisiert und die pro-inflammatorische IL-1 β -Sekretion gefördert wird. Gleichzeitig aktiviert Itaconat über den *nuclear factor erythroid 2-related factor 2* (Nrf2) die antimikrobielle NO- und ROS-Produktion und wirkt als negativer Feedback-Regulator, indem es den Transkriptionsfaktor *nuclear factor κ -light-chain-enhancer of activated B cells* (NF- κ B) und das NLRP3-Inflammasom hemmt, um die Entzündung zu kontrollieren [114,193,196,265]. Trotz der SDH-Hemmung kann der TCA-Zyklus über den Arginin-Succinat-Shunt aus Citrullin und Aspartat auf Fumarat-Ebene wieder aufgefüllt werden [194].

In THP-1-M2-Makrophagen sind die Umwandlungsraten von Aspartat sowie von Glukose zu Laktat im Vergleich zu THP-1-M1-Makrophagen signifikant niedriger. Dies entspricht der bereits beschriebenen, hohen Bedeutung des TCA-Zyklus für den Glukoseabbau in M2-Makrophagen. Parallel dazu zeigen die gemessenen Umwandlungsraten in THP-1-M2-Makrophagen einen hohen Glutamin-Verbrauch und eine signifikant erhöhte Glutamat-Produktion im Vergleich zu monozytären THP-1-Zellen (positive Korrelation = wenn die Glutamin-Aufnahme steigt, steigt auch die Glutamat-Abgabe). Dies stimmt mit der effizienten Glutaminolyse in den M2-Makrophagen überein, die Stickstoffatome für die Uridindiphosphat-N-Acetylglukosamin (UDP-GlcNAc)-Synthese und Kohlenstoffatome zur Versorgung des intakten TCA-Zyklus liefert [112,114,188,189]. Im Kontrast dazu weisen die gemessenen Umwandlungsraten in THP-1-M1-Makrophagen keine Korrelation zwischen dem Glutamin-Verbrauch und der Glutamat-Produktion auf. Dies deutet auf zwei Wege der Succinat-Umwandlung hin: *i.* Umwandlung von Glutamat zu α -KG mit anschließender Einspeisung in den trunkierten TCA-Zyklus oder *ii.* Umwandlung von Glutamat zu Succinat-Semialdehyd, γ -Aminobuttersäure (GABA) und Succinat über den GABA-Shunt, wie für M1-Makrophagen beschrieben [112,114,194].

Der Anstieg des Serin-Verbrauchs, welcher in THP-1-M1- und M2-Makrophagen im Vergleich zu monozytären THP-1-Zellen gemessen wurde, spiegelt die beschriebene Schlüsselrolle von Serin für die Glutathion (GSH)-Synthese wider. Insbesondere in M1-Makrophagen fördert GSH über immunmodulatorische Signalwege (u. a. NF- κ B) die IL-1 β -Sekretion [187,204].

Den Messergebnissen zu den Stoffwechselumsatzraten in den Nährmediumüberständen der monozytären THP-1-Zellen sowie der THP-1-M0-, M1- und M2-Makrophagen lagen 3–5 technische Replikate aus 5 unabhängigen Zellkulturansätzen (= biologische Replikate) zugrunde. Unabhängige Zellkulturansätze bedeuten, dass die monozytären THP-1-Zellen für jedes biologische Replikat in den jeweiligen Makrophagen-Phänotyp (M0/M1/M2) differenziert und polarisiert wurden. Die Heatmap-Auswertung, in welcher die Mittelwerte der technischen Replikate jedes einzelnen biologischen Replikats vergleichend gegenübergestellt wurden, ergab, dass die gemessenen Stoffwechselumsatzraten von Glukose und Laktat über die verschiedenen biologischen Replikate hinweg sehr reproduzierbar waren. Die mittleren Stoffwechselumsatzraten wiesen dabei nur geringe Schwankungen zwischen den biologischen Replikaten auf. Im Gegensatz dazu zeigten die gemessenen Stoffwechselumsatzraten von Pyruvat und Alanin eine deutlich höhere Variabilität. Bei diesen beiden Umsatzraten kam es sogar vor, dass die beiden Metabolite in einigen biologischen Replikaten als Substrate aus dem Nährmedium aufgenommen wurden, während andere biologische Replikate die beiden Metabolite als Stoffwechselprodukte in das Medium abgaben. Für Aspartat zeigten insbesondere die monozytären THP-1-Zellen und die THP-1-M2-Makrophagen ein ähnliches heterogenes Verhalten in einigen biologischen Replikaten. Diese Bewertung verdeutlicht, dass die monozytären THP-1-Zellen und die THP-1-Makrophagen trotz standardisierter Kultur-, Differenzierungs- und Polarisierungsprotokolle immer noch eine gewisse Variabilität zwischen den Zellpassagen aufweisen und ihre metabolische Anpassung offensichtlich auch über verschiedene Passagen hinweg dynamisch bleibt.

Schlussfolgerung:

Da es an einem standardisierten, reproduzierbaren Protokoll zur validen Differenzierung und Polarisierung von THP-1-Makrophagen in die Phänotypen M0, M1 und M2 mangelte [29], wurde ein von Kooperationspartnern modifiziertes Differenzierungs- und Polarisierungsprotokoll erarbeitet [11,32,33] und in der vorliegenden Arbeit validiert. Das Protokoll umfasste eine M0-Differenzierung mit 50 nM PMA über 24 Stunden, eine M1-Polarisierung mit 10 ng/ml IFN- γ + 10 ng/ml LPS über 48 Stunden und eine M2-Polarisierung mit 20 ng/ml IL-4 + 20 ng/ml IL-13 über 48 Stunden. Die Validierung dieses modifizierten Protokolls führte zur Generierung differenzierter und polarisierter THP-1-Makrophagen mit jeweils charakteristischer Morphologie,

Oberflächenmarkerexpression und P2X7-Rezeptor/NLRP3-Inflammasom-vermittelter IL-1 β -Sekretion sowie charakteristischen Stoffwechselprofilen, welche eine gute bis sehr gute Übereinstimmung mit den Literaturdaten aufwiesen. Damit bestätigen die vorliegenden Ergebnisse das THP-1-Zellmodell als geeignetes *in vitro*-Modellsystem zur Erforschung von Effektormechanismen in monozytären Immunzellen. Es steht nun für weitere immunologische Untersuchungen zur Verfügung und rechtfertigt seinen Einsatz für weiterführende Untersuchungen zur frühen Immunantwort gegen *T. gondii*-Tachyzoiten.

2. Phänotypische Veränderungen und MET-Freisetzung von primären Monozyten in Reaktion auf *T. gondii*-Tachyzoiten

Schwerpunkt dieser Arbeit war die Erfassung der frühen Immunantwort primärer humaner und boviner Monozyten gegen vitale *T. gondii*-Tachyzoiten (vgl. **Publikation II**). Im Vordergrund der Untersuchung der frühen Immunantwort standen morphologische Veränderungen und die Freisetzung von *monocyte/macrophage extracellular traps* (METs) in Reaktion auf die Parasitenkonfrontation. Die Isolierung primärer humaner Monozyten erfolgte in der vorliegenden Arbeit in Anlehnung an etablierte und standardisierte Methoden unter Verwendung zelltyp-spezifischer Antikörper und resultierte in einer Reinheit von über 76 % [11,266]. Im Gegensatz zur Isolierung primärer humaner Monozyten wurden primäre bovine Monozyten in der vorliegenden Arbeit aus PBMCs unter Verwendung einer Antikörper-unabhängigen, modifizierten Isolationstechnik gewonnen [18,23,267,268], wobei eine Reinheit von über 90 % erreicht wurde.

In der vorliegenden Arbeit zeigten unbehandelte primäre humane und bovine Monozyten, also Zellen, welche ohne jegliche Stimulation inkubiert wurden, keine phänotypischen Anzeichen einer Aktivierung und wiesen entsprechend einen sphärischen Zelltypus auf. Durch die Konfrontation mit *T. gondii*-Tachyzoiten ergaben sich sowohl bei den primären humanen Monozyten als auch bei den primären bovinen Monozyten deutliche morphologische Anzeichen einer Zellaktivierung. Entsprechend zeigten die primären Monozyten beider Spezies eine eher breitflächige Adhärenz an die Matrix sowie eine Ausdehnung des Zytoplasmas und eine gesteigerte Rauigkeit der Oberfläche mit Bildung von membranösen Zellfortsätzen. Teilweise waren diese Zellfortsätze, darunter Filopodien und Zytonemen, in Richtung der Tachyzoiten orientiert.

Diese Beobachtung stimmt mit früheren Studien überein, in denen die Konfrontation mononukleärer Phagozyten mit *T. gondii*-Tachyzoiten eine Vielzahl morphologischer und funktioneller Veränderungen in verschiedenen mononukleären Phagozyten hervorrief. So führte die Invasion von Tachyzoiten in humanen dendritischen Zellen (DCs, engl. = *dendritic cells*), murinen Mikroglia und bovinen Makrophagen zu einer

raschen Umgestaltung des Zytoskeletts, welche sich im Verlust von Podosomen, vermehrter Zytoplasmaausdehnung und verstärkten Membranausstülpungen manifestierte und mit einem hypermigrativen Phänotyp einherging [269–271].

Die generelle Fähigkeit von primären Monozyten, als Reaktion auf diverse Stimuli wie Bakterien oder Parasiten METs freizusetzen, ist ein relativ gut untersuchter Effektormechanismus [17–23,142,143] und ähnelt der ET-Freisetzung bei neutrophilen Granulozyten, der NETose [272]. Zum Zeitpunkt der Erstellung der vorliegenden Arbeit lag nur eine Veröffentlichung zur *T. gondii*-Tachyzoiten-induzierten MET-Freisetzung bei primären Monozyten vor, in welcher primäre Monozyten von Seehunden (*Phoca vitulina*) untersucht wurden [19]. Grundsätzlich stimmen die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse zur Freisetzung von METs aus primären und bovinen Monozyten mit den veröffentlichten Ergebnissen von Reichel et al. (2015) in dem Sinne überein, dass nach Konfrontation primärer Monozyten beider Spezies mit *T. gondii*-Tachyzoiten extrazellulär freigesetzte Strukturen nachgewiesen wurden, welche sich als positiv für klassische ET-Marker wie DNA und Histon erwiesen. Anders als in einer früheren Studie von Granger et al. (2017), in der die MET-Freisetzung in primären humanen Monozyten durch A23187, Paraformaldehyd (PFA) und PMA signifikant induziert wurde, trat das Auftreten MET-positiver Zellen in den hier untersuchten primären humanen und bovinen Monozyten sowohl nach *T. gondii*-Tachyzoiten-Konfrontation, ein tendenziell seltenes Ereignis, als auch nach Verwendung des eigentlich potenten MET-Induktors A23187, einer etablierten Positivkontrolle zur ET-Freisetzung, auf [21,273]. Um die in der Mikroskopie beobachtete, Parasiten-induzierte METose trotz ihrer Seltenheit in primären humanen und bovinen Monozyten quantitativ zu belegen, wurden neben der Auszählung MET-positiver Zellen zusätzliche, etablierte Verfahren zur MET-Quantifizierung eingesetzt, darunter die Messung der extrazellulären DNA (extDNA) Freisetzung in Zellkulturüberständen [274] und der Ausdehnung der Zellkernfläche (NAE, engl. = *nuclear area expansion*; Test für die frühe Phase der ETose) [219,275]. Allerdings war keine der genannten Methoden sensitiv genug, um quantitativ nachvollziehbare Reaktionen der *T. gondii*-Tachyzoiten-konfrontierten oder A23187-behandelten Zellen aufzuzeigen, obwohl Einzelereignisse der MET-Freisetzung mikroskopisch belegbar waren und tendenziell vermehrt auftraten. Zur Beurteilung der Zellviabilität wurde die LDH-Aktivität in den zellfreien Zellkulturüberständen der konfrontierten primären humanen Monozyten bestimmt, wobei ein Anstieg dieses intrazellulären Enzyms im

Nährmediumüberstand von Zellkulturen auf Zellschädigung oder Zelllyse hinweist [276]. Die hier durchgeführten Messungen der LDH-Aktivität zeigten keinen erhöhten Zelltod bei den primären humanen Monozyten durch die Konfrontation mit *T. gondii*-Tachyzoiten (mittlere LDH-Aktivität: Kontrolle: 2 %, +*T. gondii*: 4 %), sodass von intakten Zellpopulationen ausgegangen werden konnte. Im Gegensatz zu der *T. gondii*-Tachyzoiten-Konfrontation führte die Behandlung mit dem MET-Induktor A23187 zu einer deutlichen Erhöhung der LDH-Aktivität in den Nährmediumüberständen der primären humanen Monozyten (mittlere LDH-Aktivität: Kontrolle: 2 %, +A23187: 26 %), wodurch die Differenzierung zwischen MET-Freisetzung und Induktor-induzierter Zelltoxizität erschwert wurde. Eine erhöhte LDH-Freisetzung in A23187-behandelten Zellen steht jedoch im Einklang mit veröffentlichten Daten, die belegten, dass eine 3-stündige Behandlung humaner Leukämiezelllinien mit A23187 [1 mM] eine ausgeprägte Induktion von Apoptose verursacht [277]. Verglichen mit dieser Arbeit wurden in bisher veröffentlichten Studien jedoch i. d. R. deutlich höhere A23187-Konzentrationen (bis zu 12,5 µM; hier 1 µM) und längere Konfrontationszeiten (5, 16 oder 24 Stunden; hier 4 Stunden) verwendet [28,142], wodurch sowohl die Vergleichbarkeit als auch die eindeutige Bewertung der Ergebnisse erschwert wird. Die Erkenntnisse aus der vorliegenden Arbeit stellen die Eignung von A23187 als MET-Positivkontrolle bei primären Monozyten grundsätzlich in Frage und legen nahe, dass zukünftige Untersuchungen auf den Einsatz anderer, geeigneterer Positivkontrollen setzen sollten.

Zusammenfassend zeigen die vorliegenden Ergebnisse, dass die Freisetzung von METs aus primären humanen und bovinen Monozyten während der frühen Immunantwort auf die Konfrontation mit *T. gondii*-Tachyzoiten zwar grundsätzlich stattfindet, jedoch ein seltenes Ereignis darstellt und somit nur eine untergeordnete Rolle zu spielen scheint. Diese Einschätzung wird indirekt durch die geringere Zahl MET-assoziiierter verfügbarer Studien (Suchbegriff: „*monocyte extracellular traps*“; 412 Veröffentlichungen) im Vergleich zu NET-assoziierten Studien (Suchbegriff: „*neutrophil extracellular traps*“; 7.595 Veröffentlichungen; beides PubMed-Suchen im Dezember 2025) gestützt. Ergänzend wurde das *T. gondii*-Tachyzoiten-Stadium in zahlreichen Arbeiten als starker ET-Induktor bei primären neutrophilen Granulozyten zahlreicher Spezies identifiziert, darunter Menschen [278], Rinder [237], Mäuse [278], Katzen [279], Hunde [280], Schafe [281], Ziegen [281], Tümmler sowie Seehunde [282].

3. Monozytäre Sekretion der pro-inflammatorischen Zytokine IL-1 β und IL-6 in Reaktion auf *T. gondii*-Tachyzoiten

Mononukleäre Phagozyten stellen einen sehr sensiblen Zelltyp dar. Insbesondere bei der Aufreinigung können behandlungsbedingte Irritationen dazu führen, dass die Zellen aktiviert werden und im schlimmsten Fall die eine oder andere Form des Zelltods, z. B. Apoptose oder Nekrose, erfahren [283,284]. Daher ist es essenziell, in Studien mit isolierten mononukleären Phagozyten geeignete Kontrollexperimente durchzuführen, welche einen Rückschluss auf den Erhalt der zellulären Funktionalität nach der Isolation erlauben. Um die generelle Funktionalität der hier isolierten mononukleären Phagozyten zu prüfen, erfolgte in dieser Arbeit in Kontrollexperimenten eine sukzessive kombinierte Behandlung der Zellen mit LPS (zur Induktion der Pro-IL-1 β -Synthese) gefolgt von einem zweiten Gefahrenstimulus in Form von dem P2X7-Rezeptoragonisten BzATP oder dem Porenbildner Nigericin. Wie erwartet [11,32,33], resultierten diese Behandlungen zuverlässig in einer ATP-induzierten bzw. Nigericin-induzierten IL-1 β -Sekretion, womit die grundsätzliche Funktionalität der isolierten Zellen bestätigt wurde.

Die in der vorliegenden Arbeit ermittelte Zytokin-Sekretion in primären humanen Monozyten nach 4-stündiger Ko-Kultur mit *T. gondii*-Tachyzoiten (*multiplicity of infection* [MOI] von 1:4 [Zellen:Tachyzoiten]) zeigte eine *T. gondii*-induzierte signifikante Steigerung der IL-1 β - (mittlere IL-1 β -Sekretion: Kontrolle: 2 μ g/ml; +*T. gondii*: 28 μ g/ml; p-Wert = 0,0313) und IL-6-Sekretion (mittlere IL-6-Sekretion: Kontrolle: 0 pg/ml; +*T. gondii*: 95 pg/ml; p-Wert = 0,0313). Während die Ergebnisse zur *T. gondii*-induzierten IL-1 β -Sekretion in primären humanen Monozyten in Übereinstimmung mit veröffentlichten Daten [209,211,213,217] sind, wurde eine erhöhte IL-6-Sekretion bisher nicht beschrieben. Selbst nach einer *T. gondii*-Konfrontation über einen längeren Zeitraum von 24 Stunden konnten Pelloux et al. (1994) keine erhöhte Sekretion von IL-6 in primären humanen Monozyten nachweisen, wobei die verwendete MOI nicht genannt wurde [218]. Interessanterweise zeigten Salazar Gonzalez et al. (2014) eine gesteigerte IL-6-Sekretion nach Behandlung primärer humaner Monozyten mit dem *T. gondii*-spezifischen Oberflächenmolekül Profilin [219], die jedoch in einer anderen Studie nicht bestätigt werden konnte [220]. In der vorliegenden Arbeit führte die Tachyzoiten-Supplementierung zu LPS-stimulierten

primären humanen Monozyten zu signifikanten additiven Reaktionen bezüglich der IL-1 β - (mittlere IL-1 β -Sekretion: +LPS: 501 μ g/ml; +LPS/*T. gondii*: 1415 μ g/ml; p-Wert = 0,0313) und IL-6-Sekretion (mittlere IL-6-Sekretion: +LPS: 110 μ g/ml, +LPS/*T. gondii*: 1419 μ g/ml; p-Wert = 0,0313). Dieser Effekt wurde dagegen bei Lima et al. (2018) nicht beobachtet [212]. Dies könnte in unterschiedlichen experimentellen Bedingungen begründet sein: Lima et al. (2018) verwendeten denselben *T. gondii*-Stamm (RH), jedoch unterschieden sich die Experimente auf Ebene der LPS-Konzentration (500 ng/ml; hier: 1 μ g/ml), der MOI (1:2; hier: 1:4) und der Konfrontationszeit (16 Stunden; hier: 4 Stunden) [212]. Interessanterweise zeigten Lima et al. (2020), dass die Präsenz von *T. gondii*-Tachyzoiten die LPS-induzierte IL-1 β -Sekretion in primären humanen neutrophilen Granulozyten hemmt [212]. Bezugnehmend auf die in der vorliegenden Arbeit gefundene erhöhte IL-1 β -Sekretion in primären humanen Monozyten und den verfügbaren Daten von Lima et al. (2020) könnte dies insgesamt auf eine immunzelltyp-spezifische Zytokinregulation hinweisen.

4. Monozytäre Expression von Oberflächenrezeptoren (TLR2, TLR4) sowie von Zytoskelett- und Migrations-assoziierten Markern (F-Aktin, CD11b) während der frühen Immunantwort gegen *T. gondii*-Tachyzoiten

TLRs gehören zu einer hoch konservierten Familie von Transmembranproteinen, welche auf APCs, wie mononukleäre Phagozyten, exprimiert werden. Über diese Rezeptoren erkennen APCs invasive Krankheitserreger anhand von *pathogen-associated molecular patterns* (PAMPs). Die Bindung von PAMPs an TLRs aktiviert intrazelluläre Signalwege, welche weitergehende Immunreaktionen vermitteln [285]. In Säugetieren sind bisher 13 verschiedene TLRs beschrieben, die sowohl plasmamembrangebunden als auch in intrazellulären Kompartimenten vorkommen und über spezifische Signalkaskaden eine pro-inflammatorische Zytokinsekretion sowie eine Hochregulation kostimulatorischer Moleküle wie CD40 und CD80 bewirken [286]. In immunologischen Therapien gelten TLR-Agonisten aufgrund ihrer ausgeprägten immunmodulierenden Eigenschaften als vielversprechende Ansätze, um die Aktivierung der angeborenen Immunantwort gezielt zu steuern [285]. Für die in der vorliegenden Arbeit untersuchte *T. gondii*-Tachyzoiten-Konfrontation ist eine Beteiligung von TLR2 und TLR4 an der angeborenen Immunantwort in verschiedenen murinen Modellen während einer *T. gondii*-Infektion belegt, wobei *T. gondii*-Oberflächenmoleküle, wie Profilin oder Glycosylphosphatidylinositol (GPI), über TLR2 erkannt werden und nachfolgend die Zytokinproduktion in Makrophagen stimulieren [287,288]. In TLR2-defizienten Mäusen führten moderate *T. gondii*-Infektionsdosen zur effektiven Wirtsabwehr gegenüber dem Parasiten, während sich allerdings bei erhöhter Parasitenlast eine verstärkte Suszeptibilität der Tiere zeigte. Zusammengefasst sprechen diese Beobachtungen für eine unterstützende Rolle von TLR2 bei der Infektionskontrolle [288–290].

Im Gegensatz zu den oben beschriebenen murinen Modellen konnte in der vorliegenden Arbeit keine veränderte Expression von TLR2 und TLR4 in der frühen Phase der *T. gondii*-Konfrontation in primären humanen und bovinen Monozyten nachgewiesen werden. Mögliche Gründe für unterschiedliche Immunantworten sind *i.* Wirtsspezies-abhängige Unterschiede im Reaktionsmuster auf *T. gondii* [291], *ii.* zu geringe Parasitenlast und/oder Konfrontationszeit, sowie *iii.* abhängige

Immunreaktion von *T. gondii*-Stadien und den jeweiligen Antigenmustern. So konnte z. B. in der Studie von Muñoz-Caro et al. (2021) in bovinen Monozyten eine Hochregulation von TLR2 und TLR4 nach Konfrontation mit Sporozoiten des Apikomplexa *Eimeria bovis* nachgewiesen werden [292].

Neben TLR2 und TLR4 wurden in der vorliegenden Arbeit weiterhin Effekte einer *T. gondii*-Tachyzoiten-Konfrontation auf die Marker F-Aktin und CD11b in den primären humanen und bovinen Monozyten untersucht. F-Aktin ist Bestandteil des Zytoskeletts, welches u. a. an der Freisetzung von ETs und am Phagozytoseprozess beteiligt ist [145,293]. CD11b ist in Immunzellen ein für die Migration zentrales Integrin, dessen Hochregulation die Überwindung von Endothelbarrieren erleichtert und einen Hinweis auf veränderte Transmigrationsprozesse liefert [294]. Im Gegensatz zu Ueno et al. (2014), die eine Förderung der *T. gondii*-Dissemination durch gesteigerte CD11b-Expression in primären humanen Monozyten fanden [294], konnte in der vorliegenden Arbeit weder für F-Aktin noch für CD11b ein Anstieg der Expression in primären humanen und bovinen Monozyten nach *T. gondii*-Konfrontation nachgewiesen werden. Mögliche Gründe für die abweichenden Ergebnisse können, wie bereits zuvor erwähnt, eine zu geringe Parasitenlast und/oder Konfrontationszeit sein. Unter den vorliegenden *in vitro*-Bedingungen konnte somit kein über CD11b- und F-Aktin-vermittelter Disseminationsvorteil für *T. gondii*-Tachyzoiten festgestellt werden, obwohl diese Stadien über infizierte Monozyten als „Trojanisches Pferd“ über Blut- und Lymphgefäße in das zentrale Nervensystem (ZNS) gelangen können [35,63].

5. Frühe Immunantwort des *in vitro*-THP-1-Zellmodells gegen *T. gondii*-Tachyzoiten

Hintergrund:

Die Isolation primärer Immunzellen ist ein aufwendiges Verfahren. Zudem sind bei Untersuchungen an Primärzellen stets Donor-abhängige Variationsbreiten zu berücksichtigen. Diese sind einerseits genetisch bedingt, andererseits aber auch von umweltbedingten Faktoren abhängig, die auf das Individuum einwirken, wie Krankheiten, Infektionen und Lebenssituationen [295]. Um die komplexen Immunreaktionen im menschlichen und tierischen Organismus unter standardisierten Bedingungen gezielt zu untersuchen, sind *in vitro*-Modell von großer Bedeutung [27,119,146]. Nachdem in **Kapitel E.1** die Validierung des THP-1-Zellkulturmodells, insbesondere der daraus abgeleiteten differenzierten THP-1-M0-Makrophagen sowie differenzierten und polarisierten THP-1-M1- und M2-Makrophagen, in Hinblick auf die Morphologie, die Oberflächenmarkerexpression, die Zytokin-Sekretion und das Stoffwechselprofil, gute bis sehr gute Übereinstimmungen mit veröffentlichten Eigenschaften von M0-, M1- und M2-Makrophagen ergeben hatten, wurde im Anschluss untersucht, wie THP-1-Zellen auf eine Konfrontation mit *T. gondii*-Tachyzoiten reagieren. Dabei wurden die zuvor in primären humanen und bovinen Monozyten beobachteten frühen immunologischen Reaktionen auf eine *T. gondii*-Tachyzoiten-Konfrontation in den monozytären THP-1-Zellen und THP-1-Makrophagen (M0/M1/M2) untersucht.

Morphologie:

Nach Konfrontation mit *T. gondii*-Tachyzoiten zeigten die monozytären THP-1-Zellen sowie die THP-1-M0-, M1- und M2-Makrophagen phänotypisch eine Filopodien-basierte Orientierung in Richtung der Parasiten. Insbesondere bei den THP-1-M1-Makrophagen wurde eine ausgeprägte Zellausdehnung mit Bildung von Zellfortsätzen wie Lamellipodien und Pseudopodien beobachtet, welche bevorzugt, aber nicht ausschließlich, mit *T. gondii*-Tachyzoiten interagierten. Neben extrazellulär vorkommenden Tachyzoiten konnten viele dieser Stadien intrazellulär in THP-1-M1-Makrophagen nachgewiesen werden. Wie bereits in mehreren Studien gezeigt, sind

THP-1-Makrophagen, die aus monozytären THP-1-Zellen differenziert und polarisiert wurden, grundsätzlich in der Lage zu phagozytieren [27,296–299]. Da in Experimenten der vorliegenden Arbeit ausschließlich vitale *T. gondii*-Tachyzoiten für die Konfrontation der Zellen verwendet wurden, konnte nicht unterschieden werden, ob die intrazellulär lokalisierten Parasiten durch Phagozytose aufgenommen wurden oder ob die vitalen Tachyzoiten die Zellen aktiv invadiert hatten.

MET-Freisetzung:

In der Literatur ist die Freisetzung von METs im *in vitro*-Modellsystem der THP-1-Zellen (monozytäre THP-1-Zellen, THP-1-M0- und M1-Makrophagen) dokumentiert und konnte durch verschiedene Stimuli beobachtet werden [25,28,147,149,150,153]. In den Untersuchungen der vorliegenden Arbeit waren in allen vier THP-1-Zelltypen klassische ET-Marker wie DNA, Histon und Myeloperoxidase (MPO) in extrazellulären Strukturen nachweisbar, wenn diese mit *T. gondii*-Tachyzoiten konfrontiert oder mit bekannten MET-Induktoren (A23187, Nigericin) behandelt wurden [21,28]. Das Auftreten MET-positiver Zellen konnte in *T. gondii*-konfrontierten THP-1-Zellen grundsätzlich nachgewiesen werden. Dieses Phänomen trat jedoch in Analogie zu primären humanen und bovinen Monozyten tendenziell nur selten auf. Trotzdem ließ sich die MET-Freisetzung mithilfe verschiedener Methoden wie die Quantifizierung MET-positiver Zellen, extDNA und NAE zuverlässig quantifizieren, jedoch ohne, dass die *T. gondii*-Konfrontation einen signifikanten Effekt auf die MET-Freisetzung der Zellen zeigte. Die Messungen der LDH-Aktivitäten analog zu den Experimenten der Primärzellen belegten bei der Konfrontation mit *T. gondii*-Tachyzoiten keinen Einfluss des Parasiten auf die Zellviabilität in den untersuchten THP-1-Zellen (mittlere LDH-Aktivität: Monozytär: Kontrolle: 2 %, +*T. gondii*: 3 %; M0: Kontrolle/+*T. gondii*: 5 %; M1: Kontrolle: 7 %, +*T. gondii*: 9 %; M2: Kontrolle/+*T. gondii*: 8 %). Entgegen der Erwartungen aus veröffentlichten Arbeiten [21,28], induzierten auch die ET-Induktoren A23187 und Nigericin tendenziell nur selten eine METose. Dies bestätigte sich ebenfalls über die mikroskopische Quantifizierung MET-positiver Zellen als auch über die NAE, während die einfache Erfassung der extDNA auf deutlich höhere Werte hinwies. Diese Diskrepanz unterstreicht die Notwendigkeit, bei der ETose-Diagnose mindestens ein bildgebendes Verfahren parallel zur einfachen DNA-Quantifizierung zu verwenden, um ET-Strukturen verlässlich nachzuweisen und Verfälschungen über anderweitig freigesetzte DNA zu vermeiden. Parallel dazu zeigten Messungen der LDH-Aktivität in

Nährmediumüberständen von ET-Induktor-behandelten Zelltypen (insbesondere A23187) stark erhöhte Werte (mittlere LDH-Aktivität: Monozytär: Kontrolle: 2 %, +A23187: 40 %; M0: Kontrolle: 5 %, +A23187: 67 %; M1: Kontrolle: 7 %, +A23187: 80 %; M2: Kontrolle: 8 %, +A23187: 60 %), was auf toxische Effekte bzw. vermehrten Zelltod hindeutete und aller Wahrscheinlichkeit deshalb Ursache für die erhöhten extDNA-Werte war.

Zytokin-Sekretion:

Ergänzend zur MET-Freisetzung wurde in der vorliegenden Arbeit die Sekretion der pro-inflammatorischen Zytokine IL-1 β und IL-6 aus THP-1-Zellen untersucht. Bisher ist deren *T. gondii*-Tachyzoiten-vermittelte Sekretion in der Literatur nur für monozytäre THP-1-Zellen und THP-1-M0-Makrophagen beschrieben [208,209,213,216]. Analog zu den primären humanen Monozyten zeigten alle vier untersuchten THP-1-Zellen (Monozytär, M0, M1 und M2) eine zuverlässige, NLRP3-abhängige IL-1 β -Sekretion nach kombinierter LPS/BzATP- oder LPS/Nigericin-Behandlung, wobei THP-1-M2-Makrophagen im Vergleich zu THP-1-M1-Makrophagen phänotypisch schwächer reagierten (mittlere IL-1 β -Sekretion: M1: Kontrolle: 2 pg/ml, +LPS/BzATP: 1171 pg/ml; M2: Kontrolle: 3 pg/ml, +LPS/BzATP: 64 pg/ml) [262]. Unter den hier verwendeten experimentellen Bedingungen (4 Stunden, MOI 1:4) induzierten *T. gondii*-Tachyzoiten ausschließlich in THP-1-M1-Makrophagen eine signifikant erhöhte IL-1 β -Sekretion (mittlere IL-1 β -Sekretion: Kontrolle: 74 μ g/ml; +*T. gondii*: 114 μ g/ml; p-Wert = 0,0313). Die Tachyzoiten-Supplementierung zu LPS-stimulierten THP-1-Zellen führte in THP-1-M0-, M1, und M2-Makrophagen zu signifikant additiver IL-1 β -Sekretion, mit dem stärksten Effekt in THP-1-M1-Makrophagen (mittlere IL-1 β -Sekretion: +LPS: 143 pg/ml; +LPS/*T. gondii*: 370 μ g/ml; p-Wert = 0,0313) sowie in monozytären THP-1-Zellen zu erhöhter IL-6-Sekretion (mittlere IL-6-Sekretion: +LPS: 110 pg/ml; +LPS/*T. gondii*: 1419 μ g/ml; p-Wert = 0,0156). Im Gegensatz dazu fanden Gov et al. (2013, 2017) nach *T. gondii*-Tachyzoiten-Konfrontation eine erhöhte IL-1 β -Sekretion in monozytären THP-1-Zellen nach 12/18 Stunden (MOI 1:2/1:3) [209,213], Chu et al. (2016) eine erhöhte IL-1 β -Sekretion in THP-1-M0-Makrophagen nach 4 Stunden (MOI 1:10) [216] und Castro et al. (2013) eine erhöhte IL-6-Sekretion in monozytären THP-1-Zellen nach 24 Stunden (MOI 1:3) [208]. Die unterschiedlichen Befunde könnten auf Bedingungs-abhängige Effekte (MOI, Konfrontationszeit) oder Phagozytose-abhängige Mechanismen

zurückzuführen sein. Letztere Mechanismen beschreiben Tosh et al. (2016) für humane Monozyten und murine DCs, wonach die Zytokin-Sekretion primär von der aktiven Aufnahme der *T. gondii*-Tachyzoiten abhängt [210].

Stoffwechsel:

In der vorliegenden Arbeit wurde das Stoffwechselprofil der monozytären THP-1-Zellen und THP-1-M0-, M1- und M2-Makrophagen nach 6-stündiger *T. gondii*-Tachyzoiten-Konfrontation untersucht. Primäre Monozyten wurden aufgrund limitierter Verfügbarkeit, hoher Anforderungen an die Zellkulturbedingungen sowie ethischer Einschränkungen nicht einbezogen [300]. Die 6-stündige Inkubationszeit wurde gewählt, da sie zum einen bei vergleichbaren Analysen anderer Apikomplexa wie *Eimeria bovis* bereits erfolgreich eingesetzt wurde [301], und sich zum anderen in Vorversuchen als optimale Bedingung für präzise Umsatzratenmessung der THP-1-Zellen herausstellte (**Kapitel E.1**). Die Umsatzraten werden als Differenz der Metabolitkonzentrationen in Nährmediumüberständen nach Inkubation mit Zellen im Vergleich zu zellfreien Kontrollen berechnet. Für verlässliche Messungen war daher eine 6-stündige Inkubation erforderlich. Die vorliegenden Stoffwechselanalysen zeigten, dass eine 6-stündige Konfrontation mit *T. gondii*-Tachyzoiten ausschließlich in THP-1-M2-Makrophagen zu einer Umkehr des Alanin-Stoffwechsels (von Verbrauch zu Produktion) führte. Wie die Auswertung in **Kapitel E.1** zeigte, schwanken die Alanin-Umwandlungsraten jedoch stark über die fünf biologischen Replikate hinweg, weshalb weitere Untersuchungen für valide Aussagen erforderlich sind.

Schlussfolgerung:

Zusammenfassend kann Folgendes konstatiert werden: Die in der vorliegenden Arbeit eingesetzte THP-1-Zelllinie erwies sich grundsätzlich als geeignetes *in vitro*-Modell zur detaillierten Untersuchung der frühen Immunantwort von mononukleären Phagozyten auf eine *T. gondii*-Tachyzoiten-Konfrontation. In Analogie zu den primären humanen und bovinen Monozyten führte die Konfrontation zu morphologischen Veränderungen, wie sie für aktivierte Immunzellen charakteristisch sind, während die Freisetzung von METs eine eher untergeordnete Rolle in der angeborenen Immunantwort der THP-1-Zellen gegen *T. gondii* spielte. Die Sekretion der pro-inflammatorischen Zytokine IL-1 β und IL-6 nach *T. gondii*-Tachyzoiten-Konfrontation war in den primären humanen Monozyten um das 70-Fache höher als in den monozytären THP-1-Zellen.

Innerhalb der THP-1-Makrophagen (M0/M1/M2) war die *T. gondii*-induzierte IL-1 β -Sekretion ausschließlich bei den THP-1-M1-Makrophagen signifikant, was darauf hindeutet, dass neben primären Monozyten auch pro-inflammatorische Makrophagen eine zentrale Rolle in der frühen angeborenen Immunantwort gegen *T. gondii* spielen könnten. Das Ergebnis, dass THP-1-M0-, M1- und M2-Makrophagen ähnlich wie primäre humane Monozyten auf eine kombinierte Stimulation mit LPS und *T. gondii*-Tachyzoiten mit einer signifikanten Steigerung der IL-1 β -Sekretion im Vergleich zur alleinigen LPS-Behandlung reagierten, lässt vermuten, dass Monozyten und Makrophagen in ähnlicher Weise über dieses Parasitenstadium aktiviert werden.

6. Methodische Limitationen und zukünftige Perspektiven

In der vorliegenden Arbeit wurde der Effekt einer *T. gondii*-Tachyzoiten-Konfrontation auf die frühe Immunantwort von primären humanen und bovinen Monozyten sowie monozytären THP-1-Zellen und ihren abgeleiteten M0-, M1- und M2-Makrophagen vergleichend untersucht.

THP-1 ist eine humane, monozytäre Leukämie-Zelllinie mit nachgewiesenen genetischen Mutationen. Zum Zeitpunkt dieser Arbeit waren 435 Mutationen in der Harmonizome-Datenbank des Ma'ayan Laboratory of Computational Systems Biology hinterlegt [302,303]. Es ist davon auszugehen, dass diese Mutationen Schlüsselfunktionen der Zellen beeinflussen, was zu signifikanten Unterschieden in Signalwegen und Stoffwechselregulationen zwischen monozytären THP-1-Zellen und nicht tumorös entarteten, primären Monozyten führt [27]. Die *in vitro*-Differenzierung der monozytären THP-1-Zellen zu THP-1-M0-Makrophagen durch PMA-Behandlung für 24 Stunden sowie die darauffolgende Polarisierung zu THP-1-M1-Makrophagen durch IFN- γ /LPS bzw. zu THP-1-M2-Makrophagen durch IL-4/IL-13 für 48 Stunden stellt einen vereinfachten, artifiziell herbeigeführten Prozess dar, welcher sich vom komplexen Ablauf der Makrophagen-Generierung im lebenden Organismus unterscheidet. *In vivo* wird die Differenzierung und Polarisierung von Makrophagen durch diverse Mediatoren wie M-CSF, GM-CSF und IL-34 sowie durch gewebespezifische Bedingungen wie Hypoxie und pH-Wert-Veränderungen gesteuert [300,304]. Nicht auszuschließen ist daher, dass Unterschiede zwischen der *in vivo*- und *in vitro*-Makrophagen-Generierung die Zellfunktion beeinflussen. Um die Modellierung der Differenzierung und Polarisierung von *in vitro*-Makrophagen zukünftig zu optimieren, ist es entscheidend, die vorhandenen experimentellen Daten kritisch zu hinterfragen, die Definition der Phänotypen zu präzisieren, die komplexen Zell- und Gewebeinteraktionen intensiver zu berücksichtigen sowie die Ergebnisse im *in vitro*-System kontinuierlich zu validieren [98].

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte erstmals eine über vitale *T. gondii*-Tachyzoiten ausgelöste, tendenzielle, jedoch statistisch nicht signifikante MET-Freisetzung (p-Wert = > 0,05) für primäre humane und bovine Monozyten sowie für monozytäre THP-1-Zellen und THP-1-M0-, M1- und M2-Makrophagen

nachgewiesen werden. Die nur vereinzelt beobachtete METose in allen untersuchten Zelltypen deutet darauf hin, dass dieser Effektormechanismus im Vergleich zur NETose bei der angeborenen Immunabwehr gegen *T. gondii*-Tachyzoiten eine eher untergeordnete Rolle spielt. Signifikante Effekte der *T. gondii*-Konfrontation zeigten sich dagegen in der vorliegenden Arbeit bei der Sekretion der pro-inflammatorischen Zytokine IL-1 β und IL-6 in beiden untersuchten Modellen (Primärzellen, THP-1-Zellen).

Auf der Basis von eigenen Voruntersuchungen (vgl. **Kapitel E.1**) sowie veröffentlichten Studien [216,282,301] erfolgte die *T. gondii*-Tachyzoiten-Konfrontation in der vorliegenden Arbeit bei primären humanen und bovinen Monozyten sowie THP-1-Zellen unter Verwendung eines MOI (1:4) und eines definierten Beobachtungszeitpunkts (4 bzw. 6 Stunden). Die gewählten Konfrontationszeiten sollten insbesondere die frühe, angeborene Immunantwort erfassen. Aufgrund der begrenzten Verfügbarkeit von humanen und bovinen Primärzellen war eine Ausdehnung der Experimente auf mehr denkbare Szenarien nicht möglich. Durchaus denkbar und in zukünftigen Studien zu überprüfen ist jedoch, ob MOI-abhängige Unterschiede bei der Konfrontation mit *T. gondii*-Tachyzoiten bestehen und ob eine höhere Parasitenzahl die beobachteten Effekte hinsichtlich morphologischer Veränderung, MET-Freisetzung, Zytokinsekretion, Expression von TLR2, TLR4, F-Aktin und CD11b sowie Stoffwechselumsatzraten in den untersuchten Zellen verstärkt. Ergänzend könnte geklärt werden, inwiefern kürzere oder längere Konfrontationszeiten die Ausprägung der zellulären Reaktionen beeinflussen.

Bei Bestimmung der Zytokinsekretion wurde in der vorliegenden Arbeit routinemäßig die LDH-Aktivität in den zugehörigen Nährmediumüberständen als Maß für die Zellviabilität gemessen, um sicherzustellen, dass die gemessenen Zytokine von lebenden Zellen und nicht über Zelltod oder Zelllyse freigesetzt werden. Überraschenderweise zeigten die Zellen, welche mit gängigen Konzentrationen der häufig verwendeten MET-Induktoren A23187 oder Nigericin [21,28] behandelt wurden, erhöhte LDH-Aktivitäten (Anstieg um bis zu 73 %), was auf eine gewisse Toxizität der Substanzen hinweist. Dies unterstreicht die Notwendigkeit einer sorgfältigen Interpretation der erzielten Ergebnisse sowie einer kritischen Neubewertung der genannten ET-Stimuli bzw. ihrer Konzentrationen in weiterführenden Untersuchungen.

Eine offene Frage der vorliegenden Arbeit bleibt, inwieweit die in THP-1-M1-Makrophagen beobachteten intrazellulären Parasiten auf Phagozytose oder auf aktive

Infektion zurückzuführen sind. Ein direkter Vergleich zwischen hitzeinaktivierten und vitalen Tachyzoiten könnte hierzu zukünftig Aufschluss geben sowie klären, ob beide Stadien unterschiedliche Immunantworten induzieren.

Tabelle 2: Zusammenfassung der Effekte nach *T. gondii*-Tachyzoiten-Konfrontation

Die Tabelle fasst die Effekte der Konfrontation mit *Toxoplasma gondii*-Tachyzoiten (*T.g.*) auf verschiedene Parameter der frühen Immunantwort in primären humanen (Human) und bovinen Monozyten (Bovin) sowie monozytären THP-1-Zellen (Monozytär) und THP-1-Makrophagen (M0-, M1- und M2-Makrophagen) zusammen. ↑/↓ = signifikante Erhöhung bzw. Abnahme im Vergleich zu nicht-konfrontierten Kontrollzellen bzw. LPS-behandelten Zellen ($p \leq 0,05$); ↓↑Alanin = Umkehr des Alanin-Stoffwechsels (von Verbrauch zu Produktion) im Vergleich zu nicht-konfrontierten Kontrollzellen; × = nicht untersucht; CD = *Cluster of Differentiation*; exDNA = extrazelluläre DNA; IL = Interleukin; LPS = Lipopolysaccharid; MET = *monocyte/macrophage extracellular trap*; NAE = *nuclear area expansion*; n.s. = nicht signifikant ($p > 0,05$); TLR = Toll-like Rezeptor.

<i>T. g.</i> -Effekt in Parameter	Primäre Monozyten		THP-1-Zellen			
	Human	Bovin	Monozytär	M0-Makrophagen	M1-Makrophagen	M2-Makrophagen
Zellaktivierung	ja	ja	ja	ja	ja	ja
MET-Freisetzung	ja	ja	ja	ja	ja	ja
MET-positive Zellen	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
exDNA-Freisetzung	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
NAE	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
IL-1β-Sekretion	↑ ^{+T.g.} ↑ ^{+LPS/T.g.}	×	n.s.	↑ ^{+LPS/T.g.}	↑ ^{+T.g.} ↑ ^{+LPS/T.g.}	↑ ^{+LPS/T.g.}
IL-6-Sekretion	↑ ^{+T.g.} ↑ ^{+LPS/T.g.}	×	↑ ^{+LPS/T.g.}	n.s.	n.s.	↓ ^{+LPS/T.g.}
TLR2/4-, CD11b-, F-Aktin-Expression	n.s.	n.s.	×	×	×	×
Stoffwechselprofil	×	×	n.s.	n.s.	n.s.	↓↑Alanin

F. ZUSAMMENFASSUNG

Die Zellen des angeborenen Immunsystems stellen die entscheidende erste Abwehr gegen invasive Pathogene dar. Zu ihren klassischen Effektormechanismen gehören die Phagozytose von Pathogenen, die Produktion antimikrobieller Moleküle sowie die Sekretion von immunmodulierenden Zytokinen und Chemokinen. Im Jahr 2004 wurde zum ersten Mal beschrieben, dass neutrophile Granulozyten als Reaktion auf Gram-positive oder Gram-negative Bakterien *extracellular traps* (ETs) freisetzen können, welche aus DNA und antimikrobiellen Proteinen wie Histonen und dem Enzym Myeloperoxidase (MPO) bestehen. In den darauffolgenden Jahren wurde gezeigt, dass andere Zellen des angeborenen Immunsystems wie Monozyten und Makrophagen ETs freisetzen, welche als *monocyte* bzw. *macrophage extracellular traps* (METs) bezeichnet werden. Zu den Funktionen von ETs gehören das Einfangen, die Immobilisierung und in manchen Fällen auch die Abtötung von Pathogenen. Zu Beginn dieser Arbeit gab es nur einen Bericht über die *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*)-induzierte MET-Freisetzung, die von Monozyten von Seehunden stammten.

T. gondii, der Erreger der Toxoplasmose, ist ein obligat intrazellulärer Parasit aus dem Stamm der Apikomplexa, welcher alle warmblütigen Lebewesen als Zwischenwirt sowie Katzen (Felidae) als Endwirt infiziert. In diesen Wirten lösen sich schnell teilende Tachyzoiten während der systemischen Ausbreitung eine angeborene und adaptive Immunantwort aus. Einige Tachyzoiten wandeln sich in Gewebezysten in Bradyzoiten um. In diesen können Bradyzoiten viele Jahre persistieren und im Falle einer Immunschwäche reaktiviert werden.

Die vorliegende Arbeit untersuchte frühe (< 4 Stunden) angeborene Immunantworten mononukleärer Phagozyten gegen vitale *T. gondii*-Tachyzoiten in primären humanen und bovinen Monozyten sowie in der humanen monozytären Leukämie-Zelllinie THP-1 (engl. = *Tohoku Hospital Pediatrics-I*). Dabei wurde eine 4-stündige Ko-Kultur von Immunzellen und *T. gondii*-Tachyzoiten unter Verwendung einer Multiplizität der Infektion (MOI, engl. = *multiplicity of infection*) von 1:4 (Zelle:Parasit) verwendet (mit Ausnahme der Stoffwechselanalysen mit einer verlängerten Konfrontationszeit von 6 Stunden).

Die *in vitro*-Differenzierung von monozytären THP-1-Zellen zu unspezifischen M0-Makrophagen sowie die *in vitro*-Polarisierung von M0-Makrophagen zu pro-inflammatorischen M1- und anti-inflammatorischen M2-Makrophagen ermöglichte es, den aktuellen Forschungsfokus auch auf verschiedene Makrophagen-Typen auszuweiten. Darüber hinaus ermöglichte die vergleichende Untersuchung von primären Immunzellen und den entsprechenden THP-1-Zelltypen der grundlegenden Frage nachzugehen, ob eine permanente Zelllinie für die Erforschung der immunologischen Aspekte in dieser Arbeit geeignet ist. Zu Beginn dieser Arbeit fehlten zuverlässige und standardisierte Protokolle zur Differenzierung und Polarisation von M0/M1/M2-ähnlichen Makrophagen (THP-1-M0/M1/M2-Makrophagen), welche zunächst von den Kooperationspartnern etabliert werden mussten. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die korrekte Differenzierung und Polarisation von THP-1-M0/M1/M2-Makrophagen anhand der Morphologie, der IL-1 β -Sekretion, der Expression von pro- und anti-inflammatorischen Oberflächenmarkern sowie anhand der Stoffwechselprofile (Glykolyse, Glutaminolyse und Serinolyse) verifiziert und bestätigt.

Mikroskopische Analysen unter Verwendung von Rasterelektronenmikroskopie (SEM, engl. = *scanning electron microscopy*), Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) und Immunfluoreszenzmikroskopie (IFM) bestätigten die Aktivierung von primären humanen und bovinen Monozyten sowie von monozytären THP-1-Zellen und THP-1-Makrophagen (M0/M1/M2) nach Konfrontation mit *T. gondii*-Tachyzoiten. Das grundsätzliche Vorhandensein von METs nach der Parasitenkonfrontation wurde durch den Nachweis der Ko-Lokalisation von Histonen, MPO in den DNA-reichen Strukturen bestätigt, die von mononukleären Phagozyten freigesetzt wurden. Quantitative Analysen, welche auf der Bestimmung der Anzahl MET-positiver Zellen, der Freisetzung von extrazellulärer DNA (extDNA) und der Ausdehnung der Zellkernfläche (NAE, engl. = *nuclear area expansion*) in Immunzellen basierten, schlugen jedoch bei primären humanen und bovinen Monozyten, monozytären THP-1-Zellen und THP-1-Makrophagen (M0/M1/M2) fehl. Ebenso erreichte die durch MET-Induktoren A23187 und Nigericin induzierte MET-Freisetzung bei Primärzellen und THP-1-Zellen im Vergleich zu unbehandelten Zellen keine statistische Signifikanz. In den letztgenannten Fällen deuteten signifikant erhöhte Laktat-Dehydrogenase (LDH)-Aktivitäten, die in Zellkulturüberständen nachgewiesen wurden, auf eine hohe Rate an Zelltod und Zelllyse hin.

Die vorliegenden Analysen der Zytokin-Sekretion zeigten einen signifikanten Anstieg der IL-1 β -Sekretion durch primäre, humane Monozyten, die mit *T. gondii*-Tachyzoiten allein oder in Kombination mit Lipopolysaccharid (LPS) konfrontiert wurden. In THP-1-Makrophagen (M0/M1/M2) induzierte jedoch nur die kombinierte Konfrontation mit *T. gondii*-Tachyzoiten und LPS die IL-1 β -Sekretion. Im Gegensatz dazu hatten in monozytären THP-1-Zellen weder Tachyzoiten, allein noch in Kombination mit LPS, einen Einfluss auf die IL-1 β -Sekretion. Im Falle von IL-6 wurde in primären humanen Monozyten nach Konfrontation mit *T. gondii*-Tachyzoiten allein oder in Kombination mit LPS eine signifikant verstärkte Sekretion beobachtet. In monozytären THP-1-Zellen stieg die IL-6-Sekretion nur bei einer kombinierten Behandlung mit *T. gondii*-Tachyzoiten und LPS an, während THP-1-Makrophagen (M0/M1/M2) nicht mit einer signifikanten IL-6-Sekretion reagierten.

Zudem beeinflusste die Konfrontation primärer humaner und boviner Monozyten mit *T. gondii*-Tachyzoiten weder die Expression der Immunrezeptoren TLR2 und TLR4 noch den Zytoskelett-assoziierten Marker F-Aktin oder den Migrations-assoziierten Marker CD11b. Ebenso wurden keine Parasiten-bedingten Veränderungen der Umsatzraten von Substraten und Metaboliten der Glykolyse, Glutaminolyse und Serinolyse in Zellkulturüberständen von THP-1-Zellen festgestellt.

Zusammenfassend deuten die vorliegenden Ergebnisse darauf hin, dass die Sekretion von IL-1 β und nicht die Freisetzung von METs entscheidend für die Auslösung der angeborenen Immunantwort in den ersten 4 Stunden nach Kontakt zwischen primären humanen und bovinen Monozyten mit *T. gondii*-Tachyzoiten ist. Darüber hinaus zeigte die Validierung des für die THP-1-Zelllinie entwickelten *in vitro*-Differenzierungs- und Polarisierungsprotokolls zur Generierung von THP-1-Makrophagen eine gute Übereinstimmung mit den in der Literatur beschriebenen Merkmalen primärer und *in vitro*-generierter M1- und M2-Makrophagen. Dies betrifft die Expression pro- und anti-inflammatorischer Oberflächenmarker, die Sekretion von IL-1 β und das Glykolyse-, Glutaminolyse-, Serinolyse- und energiebezogene Stoffwechselprofil. Das neuartige Differenzierungs- und Polarisierungsprotokoll steht nun für weitere immunologische Untersuchungen zur Verfügung.

G. SUMMARY

Cells of the innate immune system form the first critical line of defense against invasive pathogens. Their key effector mechanisms include phagocytosis of pathogens, production of antimicrobial molecules, and secretion of immunomodulatory cytokines and chemokines. In 2004, it was first demonstrated that neutrophils release extracellular traps (ETs) in response to Gram-positive or Gram-negative bacteria. These ETs consist of DNA and antimicrobial proteins, such as histones and the enzyme myeloperoxidase (MPO). Meanwhile, other innate immune cells like monocytes and macrophages were also reported to release ETs, which were termed monocyte or macrophage extracellular traps (METs). The function of ETs includes pathogen trapping, immobilization and, in some cases, pathogen killing. At the outset of this work, only one report existed on *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*)-induced METs being formed by harbor seal monocytes.

T. gondii represents the causative agent of toxoplasmosis and is an obligate intracellular parasite of the phylum Apicomplexa, which infects all warm-blooded organisms as intermediate hosts, as well as cats (Felidae) as definitive hosts. In these hosts, rapidly dividing tachyzoites trigger innate and adaptive immune responses during systemic dissemination. Some tachyzoites convert into bradyzoites in tissue cysts, where they can persist for many years, and may be reactivated in the case of host immunodeficiency.

The current work examined early (< 4 hours) innate immune responses of mononuclear phagocytes against viable *T. gondii* tachyzoites in primary human and bovine monocytes, as well as in the human monocytic leukemia cell line THP-1 (Tohoku Hospital Pediatrics-1). Therefore, a 4-hour co-culture of immune cells and *T. gondii* tachyzoites, applying a multiplicity of infection (MOI) of 1:4 (cell:parasite), was used (except for metabolic analyses, with a prolonged exposure of 6 hours).

In vitro differentiation of monocytic THP-1 cells into non-specific M0 macrophages, as well as the *in vitro* polarization of M0 macrophages into pro-inflammatory M1 and anti-inflammatory M2 macrophages, allowed us to expand the current research focus also to different macrophage types. Moreover, the comparative study of primary immune cells and related THP-1 cell types enabled us to follow the fundamental question of whether permanent cell line are suitable for exploring the immunological aspects of this work. At the onset of this study, reliable, standardized protocols for differentiation and

polarization of THP-1-M0/M1/M2-like macrophages were lacking and needed to be established by the collaborative partners first. As part of this work, the correct differentiation and polarization of THP-1-M0/M1/M2-like macrophages was verified and confirmed based on morphology, IL-1 β secretion, the expression of pro- and anti-inflammatory surface markers, and metabolic profiles (glycolysis, glutaminolysis, and serinolysis).

Microscopic analyses using scanning electron microscopy (SEM), transmission electron microscopy (TEM), and immunofluorescence microscopy (IFM) confirmed the activation of primary human and bovine monocytes, as well as monocytic THP-1 cells and THP-1 macrophages (M0/M1/M2), upon *T. gondii* tachyzoites exposure. The principal presence of METs after parasite exposure was confirmed by showing the co-localization of histones and MPO in DNA-rich structures released by mononuclear phagocytes. However, quantitative analyses based on the assessment of the number of MET-positive cells, extracellular DNA (extDNA) release, and nuclear area expansion (NAE) in immune cells failed for primary human and bovine monocytes, monocytic THP-1 cells, and THP-1 macrophages (M0/M1/M2). Similarly, MET release by primary cells and THP-1 cells, driven by the MET inducers A23187 and nigericin, did not reach statistical significance when compared to untreated cells. In the latter cases, significantly increased lactate dehydrogenase (LDH) activities, detected in cell culture supernatants, indicated a high rate of cell death and lysis.

Current analyses of cytokine secretion revealed a significant increase in IL-1 β secretion by primary human monocytes exposed to *T. gondii* tachyzoites, alone or in combination with lipopolysaccharide (LPS). However, in THP-1 macrophages (M0/M1/M2), only the combined exposure to *T. gondii* tachyzoites and LPS fostered IL-1 β secretion. In contrast, in monocytic THP-1 cells, neither tachyzoites alone nor in combination with LPS influenced IL-1 β secretion. In the case of IL-6, a significantly enhanced secretion was observed in primary human monocytes after exposure to *T. gondii* tachyzoites alone or in combination with LPS. In monocytic THP-1 cells, IL-6 secretion increased only upon combinatory treatment with *T. gondii* tachyzoites and LPS, while THP-1 macrophages (M0/M1/M2) did not react by significant IL-6 secretion.

Moreover, *T. gondii* tachyzoite exposure of primary human and bovine monocytes neither affected the expression of the immune receptors Toll-like receptor (TLR)2 and

TLR4, nor of the cytoskeletal marker F-actin and the migration marker *Cluster of Differentiation* (CD)11b, when compared to untreated controls. Similarly, no parasite-driven changes in the conversion rates of substrates and metabolites of glycolysis, glutaminolysis, and serinolysis, as detected in THP-1 cell culture supernatants, were stated.

Taken together, the current results suggest that the secretion of IL-1 β , rather than the release of METs, is crucial for initiating the innate immune response during the first 4 hours of primary human and bovine monocytes and *T. gondii* tachyzoites encounter. Moreover, the validation of the *in vitro* differentiation and polarization protocol, developed for the THP-1 cell line to generate THP-1 cell-derived macrophages, revealed a good agreement with the characteristics of primary and *in vitro* generated M1 and M2 macrophages, described in the literature, when considering morphology, pro- and anti-inflammatory surface marker expression, IL-1 β secretion, and glycolysis, glutaminolysis, serinolysis, and energy-related metabolic profiles. The novel differentiation and polarization protocol is now available for other immunological investigations.

H. LITERATUR

1. Dubey JP. Outbreaks of clinical toxoplasmosis in humans: five decades of personal experience, perspectives and lessons learned. *Parasit Vectors*. 2021;14(1):263. doi:10.1186/s13071-021-04769-4
2. Dubey JP, Lindsay DS, Speer CA. Structures of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, bradyzoites, and sporozoites and biology and development of tissue cysts. *Clin Microbiol Rev*. 1998;11(2):267-299. doi:10.1128/CMR.11.2.267
3. Sasai M, Yamamoto M. Innate, adaptive, and cell-autonomous immunity against *Toxoplasma gondii* infection. *Exp Mol Med*. 2019;51(12):1-10. doi:10.1038/s12276-019-0353-9
4. Masek KS, Hunter CA. Pro-Inflammatory Responses in Macrophages during *Toxoplasma gondii* Infection. In: *Madame Curie Bioscience Database*. Landes Bioscience; 2013. Accessed November 12, 2024. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK5976/>
5. Orchanian SB, Lodoen MB. Monocytes as primary defenders against *Toxoplasma gondii* infection. *Trends Parasitol*. 2023;39(10):837-849. doi:10.1016/j.pt.2023.07.007
6. Deshmane SL, Kremlev S, Amini S, Sawaya BE. Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1): An Overview. *J Interferon Cytokine Res*. 2009;29(6):313-326. doi:10.1089/jir.2008.0027
7. Jiang W, Gilkeson G. Sex Differences in monocytes and TLR4 associated immune responses; implications for systemic lupus erythematosus (SLE). *J Immunother Appl*. 2014;1:1. doi:10.7243/2055-2394-1-1
8. Chiu S, Bharat A. Role of monocytes and macrophages in regulating immune response following lung transplantation. *Curr Opin Organ Transplant*. 2016;21(3):239-245. doi:10.1097/MOT.0000000000000313
9. Jiménez-Dalmaroni MJ, Gerswhin ME, Adamopoulos IE. The critical role of toll-like receptors -From microbial recognition to autoimmunity: A comprehensive review. *Autoimmun Rev*. 2016;15(1):1-8. doi:10.1016/j.autrev.2015.08.009
10. Torres-Ruiz J, Carrillo-Vazquez DA, Padilla-Ortiz DM, et al. TLR expression in peripheral monocyte subsets of patients with idiopathic inflammatory myopathies: association with clinical and immunological features. *J Transl Med*. 2020;18(1):125. doi:10.1186/s12967-020-02290-3
11. Richter K, Asci N, Singh VK, et al. Activation of endothelial NO synthase and P2X7 receptor modification mediates the cholinergic control of ATP-induced interleukin-1 β release by mononuclear phagocytes. *Front Immunol*. 2023;14. doi:10.3389/fimmu.2023.1140592

12. Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, et al. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science*. 2004;303(5663):1532-1535. doi:10.1126/science.1092385
13. Elieh Ali Komi D, Kuebler WM. Significance of Mast Cell Formed Extracellular Traps in Microbial Defense. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2022;62(1):160-179. doi:10.1007/s12016-021-08861-6
14. Schorn C, Janko C, Latzko M, Chaurio R, Schett G, Herrmann M. Monosodium urate crystals induce extracellular DNA traps in neutrophils, eosinophils, and basophils but not in mononuclear cells. *Front Immunol*. 2012;3. doi:10.3389/fimmu.2012.00277
15. Chen M, Jin Z, Jin Q, et al. *Toxoplasma gondii* triggers heterophil extracellular traps via NADPH oxidase, ERK1/2 and P38 signalling pathways, glycolysis and autophagy in chickens. *Parasite Immunol*. 2023;45(8):e13001. doi:10.1111/pim.13001
16. Caruso R, Caruso V, Rigoli L. Eosinophil ETosis and Cancer: Ultrastructural Evidence and Oncological Implications. *Cancers*. 2025;17(19):3250. doi:10.3390/cancers17193250
17. Bartneck M, Keul HA, Zwadlo-Klarwasser G, Groll J. Phagocytosis Independent Extracellular Nanoparticle Clearance by Human Immune Cells. *Nano Lett*. 2010;10(1):59-63. doi:10.1021/nl902830x
18. Muñoz-Caro T, Silva LMR, Ritter C, Taubert A, Hermosilla C. *Besnoitia besnoiti* tachyzoites induce monocyte extracellular trap formation. *Parasitol Res*. 2014;113(11):4189-4197. doi:10.1007/s00436-014-4094-3
19. Reichel M, Muñoz-Caro T, Sanchez Contreras G, et al. Harbour seal (*Phoca vitulina*) PMN and monocytes release extracellular traps to capture the apicomplexan parasite *Toxoplasma gondii*. *Dev Comp Immunol*. 2015;50(2):106-115. doi:10.1016/j.dci.2015.02.002
20. Pérez D, Muñoz MC, Molina JM, et al. *Eimeria ninakohlyakimovae* induces NADPH oxidase-dependent monocyte extracellular trap formation and upregulates IL-12 and TNF- α , IL-6 and CCL2 gene transcription. *Vet Parasitol*. 2016;227:143-150. doi:10.1016/j.vetpar.2016.07.028
21. Granger V, Faille D, Marani V, et al. Human blood monocytes are able to form extracellular traps. *J Leukoc Biol*. 2017;102(3):775-781. doi:10.1189/jlb.3MA0916-411R
22. Schulz M, Zambrano F, Schuppe HC, et al. Monocyte-derived extracellular trap (MET) formation induces aggregation and affects motility of human spermatozoa *in vitro*. *Syst Biol Reprod Med*. 2019;65(5):357-366. doi:10.1080/19396368.2019.1624873
23. Hasheminasab SS, Conejeros I, Gärtner U, Kamena F, Taubert A, Hermosilla CR. MCT-Dependent *Cryptosporidium parvum*-Induced Bovine Monocyte Extracellular Traps (METs) under Physioxia. *Biology*. 2023;12(7):7. doi:10.3390/biology12070961

24. Chow OA, von Köckritz-Blickwede M, Bright AT, et al. Statins enhance formation of phagocyte extracellular traps. *Cell Host Microbe*. 2010;8(5):445-454. doi:10.1016/j.chom.2010.10.005
25. Aulik NA, Hellenbrand KM, Czuprynski CJ. *Mannheimia haemolytica* and its leukotoxin cause macrophage extracellular trap formation by bovine macrophages. *Infect Immun*. 2012;80(5):1923-1933. doi:10.1128/IAI.06120-11
26. Weng W, Hu Z, Pan Y. Macrophage Extracellular Traps: Current Opinions and the State of Research regarding Various Diseases. *J Immunol Res*. 2022;2022:7050807. doi:10.1155/2022/7050807
27. Chanput W, Mes JJ, Wichers HJ. THP-1 cell line: an *in vitro* cell model for immune modulation approach. *Int Immunopharmacol*. 2014;23(1):37-45. doi:10.1016/j.intimp.2014.08.002
28. Jensen M, Thorsen NW, Hallberg LAE, Hägglund P, Hawkins CL. New insight into the composition of extracellular traps released by macrophages exposed to different types of inducers. *Free Radic Biol Med*. 2023;202:97-109. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2023.03.025
29. Mohd Yasin ZN, Mohd Idrus FN, Hoe CH, Yvonne-Tee GB. Macrophage polarization in THP-1 cell line and primary monocytes: A systematic review. *Differentiation*. 2022;128:67-82. doi:10.1016/j.diff.2022.10.001
30. Martinez FO, Sica A, Mantovani A, Locati M. Macrophage activation and polarization. *Front Biosci J Virtual Libr*. 2008;13:453-461. doi:10.2741/2692
31. Pinto SM, Kim H, Subbannayya Y, et al. Comparative Proteomic Analysis Reveals Varying Impact on Immune Responses in Phorbol 12-Myristate-13-Acetate-Mediated THP-1 Monocyte-to-Macrophage Differentiation. *Front Immunol*. 2021;12:679458. doi:10.3389/fimmu.2021.679458
32. Richter K, Papke RL, Stokes C, et al. Comparison of the Anti-inflammatory Properties of Two Nicotinic Acetylcholine Receptor Ligands, Phosphocholine and pCF3-diEPP. *Front Cell Neurosci*. 2022;16. doi:10.3389/fncel.2022.779081
33. Reichert M, Massambo B, Amati AL, Grau V, Richter K, Hecker A. Acute inflammation triggered by two lightweight hernia meshes: a comparative *in vitro* and retrospective cohort study. *Hernia J Hernias Abdom Wall Surg*. 2025;29(1):205. doi:10.1007/s10029-025-03391-y
34. Ferguson DJP. *Toxoplasma gondii*: 1908-2008, homage to Nicolle, Manceaux and Splendore. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2009;104:133-148. doi:https://doi.org/10.1590/S0074-02762009000200003
35. Deplazes P, Joachim A, Mathis A, et al. *Parasitologie für die Tiermedizin*. 4th ed. Georg Thieme Verlag KG; 2021:b-006-163221. doi:10.1055/b-006-163221
36. Delgado ILS, Zúquete S, Santos D, Basto AP, Leitão A, Nolasco S. The Apicomplexan Parasite *Toxoplasma gondii*. *Encyclopedia*. 2022;2(1):1. doi:10.3390/encyclopedia2010012

37. Rojas-Pirela M, Medina L, Rojas MV, et al. Congenital Transmission of Apicomplexan Parasites: A Review. *Front Microbiol.* 2021;12. doi:10.3389/fmicb.2021.751648
38. Howe DK, Sibley LD. *Toxoplasma gondii* Comprises Three Clonal Lineages: Correlation of Parasite Genotype with Human Disease. *J Infect Dis.* 1995;172(6):1561-1566. doi:10.1093/infdis/172.6.1561
39. Hill DE, Dubey JP. *Toxoplasma gondii* as a Parasite in Food: Analysis and Control. *Microbiol Spectr.* 2016;4(4). doi:10.1128/microbiolspec.PFS-0011-2015
40. Su C, Evans D, Cole RH, Kissinger JC, Ajioka JW, Sibley LD. Recent expansion of *Toxoplasma* through enhanced oral transmission. *Science.* 2003;299(5605):414-416. doi:10.1126/science.1078035
41. Mercier A, Ajzenberg D, Devillard S, et al. Human impact on genetic diversity of *Toxoplasma gondii*: Example of the anthropized environment from French Guiana. *Infect Genet Evol.* 2011;11(6):1378-1387. doi:10.1016/j.meegid.2011.05.003
42. Khan A, Ajzenberg D, Mercier A, et al. Geographic separation of domestic and wild strains of *Toxoplasma gondii* in French Guiana correlates with a monomorphic version of chromosomela. *PLoS Negl Trop Dis.* 2014;8(9):e3182. doi:10.1371/journal.pntd.0003182
43. Saeij JPJ, Boyle JP, Boothroyd JC. Differences among the three major strains of *Toxoplasma gondii* and their specific interactions with the infected host. *Trends Parasitol.* 2005;21(10):476-481. doi:10.1016/j.pt.2005.08.001
44. Diffley P, Scott JO, Mama K, Tsen TN. The rate of proliferation among African trypanosomes is a stable trait that is directly related to virulence. *Am J Trop Med Hyg.* 1987;36(3):533-540. doi:10.4269/ajtmh.1987.36.533
45. Dardé ML. *Toxoplasma gondii* , “new” genotypes and virulence. *Parasite.* 2008;15(3):366-371. doi:10.1051/parasite/2008153366
46. Hosseini SA, Amouei A, Sharif M, et al. Human toxoplasmosis: a systematic review for genetic diversity of *Toxoplasma gondii* in clinical samples. *Epidemiol Infect.* 2019;147:e36. doi:10.1017/S0950268818002947
47. Fernandes FD, Bräunig P, Machado DWN, et al. Genotyping of human isolates from human toxoplasmosis outbreak: Restriction Fragment Length Polymorphism and Sanger Sequencing. *Braz J Microbiol.* 2024;56(1):395-402. doi:10.1007/s42770-024-01561-1
48. Uzelac A, Djurković-Djaković O. Isolation, genotyping and phenotyping *Toxoplasma gondii* in Europe – A critical perspective. *Food Waterborne Parasitol.* 2025;40:e00279. doi:10.1016/j.fawpar.2025.e00279
49. Robert-Gangneux F, Dardé ML. Epidemiology of and Diagnostic Strategies for Toxoplasmosis. *Clin Microbiol Rev.* 2012;25(2):264-296. doi:10.1128/cmr.05013-11

50. Dubey JP, Hill DE, Sundar N, et al. Endemic toxoplasmosis in pigs on a farm in Maryland: isolation and genetic characterization of *Toxoplasma gondii*. *J Parasitol*. 2008;94(1):36-41. doi:10.1645/GE-1312.1
51. Dubey JP, Sundar N, Hill D, et al. High prevalence and abundant atypical genotypes of *Toxoplasma gondii* isolated from lambs destined for human consumption in the USA. *Int J Parasitol*. 2008;38(8-9):999-1006. doi:10.1016/j.ijpara.2007.11.012
52. Velmurugan GV, Su C, Dubey JP. Isolate designation and characterization of *Toxoplasma gondii* isolates from pigs in the United States. *J Parasitol*. 2009;95(1):95-99. doi:10.1645/GE-1746.1
53. Dubey JP, Rajendran C, Ferreira LR, et al. High prevalence and genotypes of *Toxoplasma gondii* isolated from goats, from a retail meat store, destined for human consumption in the USA. *Int J Parasitol*. 2011;41(8):827-833. doi:10.1016/j.ijpara.2011.03.006
54. Khan A, Fux B, Su C, et al. Recent transcontinental sweep of *Toxoplasma gondii* driven by a single monomorphic chromosome. *Proc Natl Acad Sci*. 2007;104(37):14872-14877. doi:10.1073/pnas.0702356104
55. Pena HFJ, Marvulo MFV, Horta MC, et al. Isolation and genetic characterisation of *Toxoplasma gondii* from a red-handed howler monkey (*Alouatta belzebul*), a jaguarundi (*Puma yagouaroundi*), and a black-eared opossum (*Didelphis aurita*) from Brazil. *Vet Parasitol*. 2011;175(3):377-381. doi:10.1016/j.vetpar.2010.10.015
56. Dubey JP, Lago EG, Gennari SM, Su C, Jones JL. Toxoplasmosis in humans and animals in Brazil: high prevalence, high burden of disease, and epidemiology. *Parasitology*. 2012;139(11):1375-1424. doi:10.1017/S0031182012000765
57. Pena HFJ, Gennari SM, Dubey JP, Su C. Population structure and mouse-virulence of *Toxoplasma gondii* in Brazil. *Int J Parasitol*. 2008;38(5):561-569. doi:10.1016/j.ijpara.2007.09.004
58. Fux B, Nawas J, Khan A, Gill DB, Su C, Sibley LD. *Toxoplasma gondii* strains defective in oral transmission are also defective in developmental stage differentiation. *Infect Immun*. 2007;75(5):2580-2590. doi:10.1128/IAI.00085-07
59. Attias M, Teixeira DE, Benchimol M, Vommaro RC, Crepaldi PH, De Souza W. The life-cycle of *Toxoplasma gondii* reviewed using animations. *Parasit Vectors*. 2020;13(1):588. doi:10.1186/s13071-020-04445-z
60. S Al-Malki E. Toxoplasmosis: stages of the protozoan life cycle and risk assessment in humans and animals for an enhanced awareness and an improved socio-economic status. *Saudi J Biol Sci*. 2021;28(1):962-969. doi:10.1016/j.sjbs.2020.11.007
61. Blader IJ, Coleman BI, Chen CT, Gubbels MJ. Lytic Cycle of *Toxoplasma gondii*: 15 Years Later. *Annu Rev Microbiol*. 2015;69:463-485. doi:10.1146/annurev-micro-091014-104100
62. Hofer U. The cat is out the bag about *Toxoplasma* host range. *Nat Rev Microbiol*. 2019;17(11):646-647. doi:10.1038/s41579-019-0266-6

63. Randall LM, Hunter CA. Parasite dissemination and the pathogenesis of toxoplasmosis. *Eur J Microbiol Immunol.* 2011;1(1):3-9. doi:10.1556/EuJMI.1.2011.1.3
64. Lüder CGK. IFNs in host defence and parasite immune evasion during *Toxoplasma gondii* infections. *Front Immunol.* 2024;15. doi:10.3389/fimmu.2024.1356216
65. Adeyemi OS, Murata Y, Sugi T, Han Y, Kato K. Modulation of host HIF-1 α activity and the tryptophan pathway contributes to the anti-*Toxoplasma gondii* potential of nanoparticles. *Biochem Biophys Rep.* 2017;11:84-92. doi:10.1016/j.bbrep.2017.07.004
66. Wang ZX, Jiao WJ, Yang Y, Liu HL, Wang HL. Role of inflammasomes in *Toxoplasma* and *Plasmodium* infections. *Parasit Vectors.* 2024;17(1):466. doi:10.1186/s13071-024-06529-6
67. Wolf A, Cowen D, Paige B. Human Toxoplasmosis: Occurrence in Infants as an Encephalomyelitis Verification by Transmission to Animals. *Science.* 1939;89(2306):226-227. doi:10.1126/science.89.2306.226
68. Dubey JP, Jones JL. *Toxoplasma gondii* infection in humans and animals in the United States. *Int J Parasitol.* 2008;38(11):1257-1278. doi:10.1016/j.ijpara.2008.03.007
69. Hartley WJ, Marshall SC. Toxoplasmosis as a cause of ovine perinatal mortality. *N Z Vet J.* 1957;5(4):119-124. doi:10.1080/00480169.1957.33275
70. Henker LC, Silveira Flores Vogel F, Santana de Cecco B, et al. Abortion outbreak in a sheep flock caused by *Toxoplasma gondii* clonal type III. *Parasitol Res.* 2022;121(9):2633-2639. doi:10.1007/s00436-022-07581-w
71. Tenter AM. *Toxoplasma gondii* in animals used for human consumption. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2009;104:364-369. doi:https://doi.org/10.1590/S0074-02762009000200033
72. Costa GHN, Costa AJ da, Lopes WDZ, et al. *Toxoplasma gondii*: Infection natural congenital in cattle and an experimental inoculation of gestating cows with oocysts. *Exp Parasitol.* 2011;127(1):277-281. doi:10.1016/j.exppara.2010.08.005
73. Çulbasan V, Gungor C, Gundog DA, Koskeroglu K, Onmaz NE. Molecular surveillance of *Toxoplasma gondii* in raw milk and Artisan cheese of sheep, goat, cow and water buffalo origin. *Int J Dairy Technol.* 2023;76(4):948-954. doi:10.1111/1471-0307.12988
74. Wesołowski R, Pawłowska M, Mila-Kierzenkowska C. The Medical Relevance of *Toxoplasma* Infections in Terms of the Safety of Blood Recipients under Immunosuppression—A Meta-Analysis. *Microorganisms.* 2023;11(8):1980. doi:10.3390/microorganisms11081980
75. Vyas A, Kim SK, Giacomini N, Boothroyd JC, Sapolsky RM. Behavioral changes induced by *Toxoplasma* infection of rodents are highly specific to aversion of cat

- odors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(15):6442-6447. doi:10.1073/pnas.0608310104
76. Hill DE, Chirukandoth S, Dubey JP. Biology and epidemiology of *Toxoplasma gondii* in man and animals. *Anim Health Res Rev*. 2005;6(1):41-61. doi:10.1079/AHR2005100
77. Calero-Bernal R, Fernández-Escobar M, Katzer F, Su C, Ortega-Mora LM. Unifying Virulence Evaluation in *Toxoplasma gondii*: A Timely Task. *Front Cell Infect Microbiol*. 2022;12:868727. doi:10.3389/fcimb.2022.868727
78. Saadatnia G, Golkar M. A review on human toxoplasmosis. *Scand J Infect Dis*. 2012;44(11):805-814. doi:10.3109/00365548.2012.693197
79. Peyron F, Garweg JG, Wallon M, Descloux E, Rolland M, Barth J. Long-term impact of treated congenital toxoplasmosis on quality of life and visual performance. *Pediatr Infect Dis J*. 2011;30(7):597-600. doi:10.1097/INF.0b013e31820bb5f3
80. Pleyer U, Heußen F. Toxoplasmose Retinochoroiditis. *Der Augenspiegel*. Published online February 2013.
81. Montoya J, Liesenfeld O. Toxoplasmosis. *The Lancet*. 2004;363(9425):1965-1976. doi:10.1016/S0140-6736(04)16412-X
82. Flegr J. Influence of latent *Toxoplasma* infection on human personality, physiology and morphology: pros and cons of the *Toxoplasma*–human model in studying the manipulation hypothesis. *J Exp Biol*. 2013;216(1):127-133. doi:10.1242/jeb.073635
83. Lori A, Avramopoulos D, Wang AW, et al. Polygenic risk scores differentiate schizophrenia patients with *Toxoplasma gondii* compared to toxoplasma seronegative patients. *Compr Psychiatry*. 2021;107:152236. doi:10.1016/j.comppsy.2021.152236
84. Andreou D, Steen NE, Jørgensen KN, et al. *Toxoplasma gondii* associated with psychotic symptom load and cortisol in severe mental illness. *Schizophrenia*. 2025;11(1):80. doi:10.1038/s41537-025-00630-0
85. Sanger VL, Chamberlain DM, Chamberlain KW, Cole CR, Farrell RL. Toxoplasmosis. V. Isolation of *Toxoplasma* from cattle. *J Am Vet Med Assoc*. 1953;123(917):87-91.
86. Čatár G, Bergendi L, Holková R. Isolation of *Toxoplasma gondii* from Swine and Cattle. *J Parasitol*. 1969;55(5):952-955. doi:10.2307/3277157
87. Frey FC, Berger-Schoch EA, Herrmann CD, et al. Vorkommen und Genotypen von *Toxoplasma gondii* in der Muskulatur von Schaf, Rind und Schwein sowie im Katzenkot in der Schweiz. *Schweiz Arch Für Tierheilkd*. 2012;154(6):251-255. doi:10.1024/0036-7281/a000341
88. Cook AJ, Gilbert RE, Buffolano W, et al. Sources of *Toxoplasma* infection in pregnant women: European multicentre case-control study. European Research

- Network on Congenital Toxoplasmosis. *BMJ*. 2000;321(7254):142-147. doi:10.1136/bmj.321.7254.142
89. Esteban-Redondo I, Innes EA. *Toxoplasma gondii* infection in sheep and cattle. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*. 1997;20(2):191-196. doi:10.1016/S0147-9571(96)00039-2
90. Belluco S, Simonato ,Giulia, Mancin ,Marzia, Pietrobelli ,Mario, and Ricci A. *Toxoplasma gondii* infection and food consumption: A systematic review and meta-analysis of case-controlled studies. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2018;58(18):3085-3096. doi:10.1080/10408398.2017.1352563
91. Santos SL, de Souza Costa K, Gondim LQ, et al. Investigation of *Neospora caninum*, *Hammondia* sp., and *Toxoplasma gondii* in tissues from slaughtered beef cattle in Bahia, Brazil. *Parasitol Res*. 2010;106(2):457-461. doi:10.1007/s00436-009-1686-4
92. Tenter AM, Heckeroth AR, Weiss LM. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. *Int J Parasitol*. 2000;30(12-13):1217-1258. doi:10.1016/s0020-7519(00)00124-7
93. Dubey JP, Hill DE, Jones JL, et al. Prevalence of viable *Toxoplasma gondii* in beef, chicken, and pork from retail meat stores in the United States: risk assessment to consumers. *J Parasitol*. 2005;91(5):1082-1093. doi:10.1645/GE-683.1
94. Dubey JP. *Toxoplasma gondii* Infections in Chickens (*Gallus domesticus*): Prevalence, Clinical Disease, Diagnosis and Public Health Significance. *Zoonoses Public Health*. 2010;57(1):60-73. doi:10.1111/j.1863-2378.2009.01274.x
95. Thies AJ, Efken J, Sönnichsen M. How much Meat do we eat? Estimating per Capita Meat Consumption in Germany based on a Market Balance Approach. *Ger J Agric Econ*. 2022;71(2). doi:10.30430/gjae.2022.0182
96. Gamble HR, Brady RC, Dubey JP. Prevalence of *Toxoplasma gondii* infection in domestic pigs in the New England states. *Vet Parasitol*. 1999;82(2):129-136. doi:10.1016/s0304-4017(99)00004-7
97. Dubey JP, Gamble HR, Hill D, Sreekumar C, Romand S, Thuilliez P. High prevalence of viable *Toxoplasma gondii* infection in market weight pigs from a farm in Massachusetts. *J Parasitol*. 2002;88(6):1234-1238. doi:10.1645/0022-3395(2002)088%5B1234:HPOVTG%5D2.0.CO;2
98. Italiani P, Boraschi D. From Monocytes to M1/M2 Macrophages: Phenotypical vs. Functional Differentiation. *Front Immunol*. 2014;5. doi:10.3389/fimmu.2014.00514
99. Bitzmann D. *Ultrastrukturelle, immunzytochemische und glykohistochemische Untersuchungen am Blut des Rindes (Bos taurus)*. Text.PhDThesis. Ludwig-Maximilians-Universität München; 2009. Accessed January 14, 2025. <https://edoc.ub.uni-muenchen.de/10702/>
100. Guiliams M, Mildner A, Yona S. Developmental and Functional Heterogeneity of Monocytes. *Immunity*. 2018;49(4):595-613. doi:10.1016/j.immuni.2018.10.005

101. Williams M, Ginhoux F, Jakubzick C, et al. Dendritic cells, monocytes and macrophages: a unified nomenclature based on ontogeny. *Nat Rev Immunol.* 2014;14(8):571-578. doi:10.1038/nri3712
102. Ziegler-Heitbrock L, Ancuta P, Crowe S, et al. Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. *Blood.* 2010;116(16):e74-e80. doi:10.1182/blood-2010-02-258558
103. Hussen J, Schuberth HJ. Heterogeneity of Bovine Peripheral Blood Monocytes. *Front Immunol.* 2017;8:1875. doi:10.3389/fimmu.2017.01875
104. Hussen J, Düvel A, Sandra O, et al. Phenotypic and Functional Heterogeneity of Bovine Blood Monocytes. *PLOS ONE.* 2013;8(8):e71502. doi:10.1371/journal.pone.0071502
105. Ginhoux F, Schultze JL, Murray PJ, Ochando J, Biswas SK. New insights into the multidimensional concept of macrophage ontogeny, activation and function. *Nat Immunol.* 2016;17(1):34-40. doi:10.1038/ni.3324
106. Shapouri-Moghaddam A, Mohammadian S, Vazini H, et al. Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease. *J Cell Physiol.* 2018;233(9):6425-6440. doi:10.1002/jcp.26429
107. Murray PJ, Wynn TA. Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. *Nat Rev Immunol.* 2011;11(11):723. doi:10.1038/nri3073
108. De Palma M, Lewis CE. Macrophage Regulation of Tumor Responses to Anticancer Therapies. *Cancer Cell.* 2013;23(3):277-286. doi:10.1016/j.ccr.2013.02.013
109. Marrocco A, Ortiz LA. Role of metabolic reprogramming in pro-inflammatory cytokine secretion from LPS or silica-activated macrophages. *Front Immunol.* 2022;13. doi:10.3389/fimmu.2022.936167
110. Dash SP, Gupta S, Sarangi PP. Monocytes and macrophages: Origin, homing, differentiation, and functionality during inflammation. *Heliyon.* 2024;10(8):e29686. doi:10.1016/j.heliyon.2024.e29686
111. Gordon S. Alternative activation of macrophages. *Nat Rev Immunol.* 2003;3(1):23-35. doi:10.1038/nri978
112. Viola A, Munari F, Sánchez-Rodríguez R, Scolaro T, Castegna A. The Metabolic Signature of Macrophage Responses. *Front Immunol.* 2019;10. doi:10.3389/fimmu.2019.01462
113. Wynn TA, Vannella KM. Macrophages in tissue repair, regeneration, and fibrosis. *Immunity.* 2016;44(3):450-462. doi:10.1016/j.immuni.2016.02.015
114. Liu Y, Xu R, Gu H, et al. Metabolic reprogramming in macrophage responses. *Biomark Res.* 2021;9(1):1. doi:10.1186/s40364-020-00251-y

115. LI P, MA C, LI J, et al. Proteomic characterization of four subtypes of M2 macrophages derived from human THP-1 cells. *J Zhejiang Univ Sci B*. 2022;23(5):407-422. doi:10.1631/jzus.B2100930
116. Ferrante CJ, Leibovich SJ. Regulation of Macrophage Polarization and Wound Healing. *Adv Wound Care*. 2012;1(1):10-16. doi:10.1089/wound.2011.0307
117. Orecchioni M, Ghosheh Y, Pramod AB, Ley K. Macrophage Polarization: Different Gene Signatures in M1(LPS+) vs. Classically and M2(LPS-) vs. Alternatively Activated Macrophages. *Front Immunol*. 2019;10:1084. doi:10.3389/fimmu.2019.01084
118. Chanput W, Peters V, Wichers H. THP-1 and U937 Cells. In: Verhoeckx K, Cotter P, López-Expósito I, et al., eds. *The Impact of Food Bioactives on Health: In Vitro and Ex Vivo Models*. Springer; 2015. Accessed May 26, 2025. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK500159/>
119. Segeritz CP, Vallier L. Cell Culture. *Basic Sci Methods Clin Res*. Published online 2017:151-172. doi:10.1016/B978-0-12-803077-6.00009-6
120. Tsuchiya S, Yamabe M, Yamaguchi Y, Kobayashi Y, Konno T, Tada K. Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1). *Int J Cancer*. 1980;26(2):171-176. doi:10.1002/ijc.2910260208
121. Mantovani A, Sozzani S, Locati M, Allavena P, Sica A. Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends Immunol*. 2002;23(11):549-555. doi:10.1016/s1471-4906(02)02302-5
122. Genin M, Clement F, Fattaccioli A, Raes M, Michiels C. M1 and M2 macrophages derived from THP-1 cells differentially modulate the response of cancer cells to etoposide. *BMC Cancer*. 2015;15:577. doi:10.1186/s12885-015-1546-9
123. Nascimento CR, Rodrigues Fernandes NA, Gonzalez Maldonado LA, Rossa Junior C. Comparison of monocytic cell lines U937 and THP-1 as macrophage models for *in vitro* studies. *Biochem Biophys Rep*. 2022;32:101383. doi:10.1016/j.bbrep.2022.101383
124. Sundström C, Nilsson K. Establishment and characterization of a human histiocytic lymphoma cell line (U-937). *Int J Cancer*. 1976;17(5):565-577. doi:10.1002/ijc.2910170504
125. Qin Z. The use of THP-1 cells as a model for mimicking the function and regulation of monocytes and macrophages in the vasculature. *Atherosclerosis*. 2012;221(1):2-11. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2011.09.003
126. Ziegler-Heitbroc HWL, Thiel E, Futterer A, Herzog V, Wirtz A, Riethmüller G. Establishment of a human cell line (mono mac 6) with characteristics of mature monocytes. *Int J Cancer*. 1988;41(3):456-461. doi:10.1002/ijc.2910410324

127. Ziegler-Heitbrock HW, Schraut W, Wendelgass P, et al. Distinct patterns of differentiation induced in the monocytic cell line Mono Mac 6. *J Leukoc Biol.* 1994;55(1):73-80. doi:10.1002/jlb.55.1.73
128. Collins S. The HL-60 promyelocytic leukemia cell line: proliferation, differentiation, and cellular oncogene expression. *Blood.* 1987;70(5):1233-1244. doi:10.1182/blood.V70.5.1233.1233
129. Aldo PB, Craveiro V, Guller S, Mor G. Effect of Culture Conditions on the Phenotype of THP-1 Monocyte Cell Line. *Am J Reprod Immunol.* 2013;70(1):80-86. doi:10.1111/aji.12129
130. Burgener SS, Schroder K. Neutrophil Extracellular Traps in Host Defense. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2020;12(7):a037028. doi:10.1101/cshperspect.a037028
131. Wigerblad G, Kaplan MJ. Neutrophil extracellular traps in systemic autoimmune and autoinflammatory diseases. *Nat Rev Immunol.* 2023;23(5):274-288. doi:10.1038/s41577-022-00787-0
132. Thiam HR, Wong SL, Wagner DD, Waterman CM. Cellular Mechanisms of NETosis. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2020;36(Volume 36, 2020):191-218. doi:10.1146/annurev-cellbio-020520-111016
133. Hébert CA, Baker JB. Interleukin-8: A Review. *Cancer Invest.* 1993;11(6):743-750. doi:10.3109/07357909309046949
134. Teixeira A, Garasa S, Ochoa M del C, et al. Differential Interleukin-8 thresholds for chemotaxis and netosis in human neutrophils. *Eur J Immunol.* 2021;51(9):2274-2280. doi:10.1002/eji.202049029
135. Stoiber W, Obermayer A, Steinbacher P, Krautgartner WD. The Role of Reactive Oxygen Species (ROS) in the Formation of Extracellular Traps (ETs) in Humans. *Biomolecules.* 2015;5(2):702-723. doi:10.3390/biom5020702
136. Yipp BG, Kubes P. NETosis: how vital is it? *Blood.* 2013;122(16):2784-2794. doi:10.1182/blood-2013-04-457671
137. Bonne-Année S, Kerepesi LA, Hess JA, et al. Extracellular traps are associated with human and mouse neutrophil and macrophage mediated killing of larval *Strongyloides stercoralis*. *Microbes Infect.* 2014;16(6):502-511. doi:10.1016/j.micinf.2014.02.012
138. Liu P, Wu X, Liao C, et al. *Escherichia coli* and *Candida albicans* Induced Macrophage Extracellular Trap-Like Structures with Limited Microbicidal Activity. *PLoS ONE.* 2014;9(2):e90042. doi:10.1371/journal.pone.0090042
139. Kalsum S, Braian C, Koeken VACM, et al. The Cording Phenotype of *Mycobacterium tuberculosis* Induces the Formation of Extracellular Traps in Human Macrophages. *Front Cell Infect Microbiol.* 2017;7. doi:10.3389/fcimb.2017.00278

140. Rayner BS, Zhang Y, Brown BE, Reyes L, Cogger VC, Hawkins CL. Role of hypochlorous acid (HOCl) and other inflammatory mediators in the induction of macrophage extracellular trap formation. *Free Radic Biol Med.* 2018;129:25-34. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2018.09.001
141. Wei Z, Wang Y, Zhang X, et al. Bovine macrophage-derived extracellular traps act as early effectors against the abortive parasite *Neospora caninum*. *Vet Parasitol.* 2018;258:1-7. doi:10.1016/j.vetpar.2018.06.002
142. Ibrahim N, Knöbl V, Hayden H, et al. Human monocyte subsets differ in their capacity to form extracellular traps. *Cell Death Discov.* 2024;10(1):1-3. doi:10.1038/s41420-024-02034-y
143. Yang Z, Wei Z, Hermosilla C, et al. Caprine Monocytes Release Extracellular Traps against *Neospora caninum* *In Vitro*. *Front Immunol.* 2018;8:2016. doi:10.3389/fimmu.2017.02016
144. Proust A, Lévesque JC, Barat C, Sato S, Tremblay MJ. A new tool for detection of extracellular traps. *Methods Appl Fluoresc.* 2018;6(3):037002. doi:10.1088/2050-6120/aac51b
145. Grabbe M, Conejeros I, Velásquez ZD, et al. *Cryptosporidium parvum*-induced neutrophil extracellular traps in neonatal calves is a stage-independent process. *Front Vet Sci.* 2023;10:1256726. doi:10.3389/fvets.2023.1256726
146. Doster RS, Rogers LM, Gaddy JA, Aronoff DM. Macrophage Extracellular Traps: A Scoping Review. *J Innate Immun.* 2018;10(1):3-13. doi:10.1159/000480373
147. Nakayama T, Saitoh H. Tunicamycin-induced neutrophil extracellular trap (NET)-like structures in cultured human myeloid cell lines. *Cell Biol Int.* 2015;39(3):355-359. doi:10.1002/cbin.10396
148. Henthorn CR, Chris Minion F, Sahin O. Utilization of macrophage extracellular trap nucleotides by *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Microbiol Read Engl.* 2018;164(11):1394-1404. doi:10.1099/mic.0.000717
149. Fei L, Zhengkai W, Weina J, et al. *Trichomonas vaginalis* triggers the release of THP-1 extracellular traps. *Parasitol Res.* 2019;118(1):267-274. doi:10.1007/s00436-018-6139-5
150. Lee Y, Reilly B, Tan C, Wang P, Aziz M. Extracellular CIRP Induces Macrophage Extracellular Trap Formation Via Gasdermin D Activation. *Front Immunol.* 2021;12:780210. doi:10.3389/fimmu.2021.780210
151. An Y, Shi X, Tang X, et al. Aflatoxin B1 Induces Reactive Oxygen Species-Mediated Autophagy and Extracellular Trap Formation in Macrophages. *Front Cell Infect Microbiol.* 2017;7:53. doi:10.3389/fcimb.2017.00053
152. Doster RS, Sutton JA, Rogers LM, Aronoff DM, Gaddy JA. *Streptococcus agalactiae* Induces Placental Macrophages To Release Extracellular Traps Loaded with Tissue Remodeling Enzymes via an Oxidative Burst-Dependent Mechanism. *mBio.* 2018;9(6):e02084-18. doi:10.1128/mBio.02084-18

153. Je S, Quan H, Yoon Y, Na Y, Kim BJ, Seok SH. *Mycobacterium massiliense* Induces Macrophage Extracellular Traps with Facilitating Bacterial Growth. *PloS One*. 2016;11(5):e0155685. doi:10.1371/journal.pone.0155685
154. Dinarello CA. Historical insights into cytokines. *Eur J Immunol*. 2007;37 Suppl 1(Suppl 1):S34-45. doi:10.1002/eji.200737772
155. Arango Duque G, Descoteaux A. Macrophage Cytokines: Involvement in Immunity and Infectious Diseases. *Front Immunol*. 2014;5:491. doi:10.3389/fimmu.2014.00491
156. Cui A, Huang T, Li S, et al. Dictionary of immune responses to cytokines at single-cell resolution. *Nature*. 2024;625(7994):377-384. doi:10.1038/s41586-023-06816-9
157. Beurel E, Jope RS. Lipopolysaccharide-induced interleukin-6 production is controlled by glycogen synthase kinase-3 and STAT3 in the brain. *J Neuroinflammation*. 2009;6(1):9. doi:10.1186/1742-2094-6-9
158. Kawai T, Akira S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Immunol*. 2010;11(5):373-384. doi:10.1038/ni.1863
159. Dinarello CA. Overview of the IL-1 family in innate inflammation and acquired immunity. *Immunol Rev*. 2018;281(1):8-27. doi:10.1111/imr.12621
160. Mantovani A, Dinarello CA, Molgora M, Garlanda C. Interleukin-1 and Related Cytokines in the Regulation of Inflammation and Immunity. *Immunity*. 2019;50(4):778-795. doi:10.1016/j.immuni.2019.03.012
161. Takeuchi O, Akira S. Pattern Recognition Receptors and Inflammation. *Cell*. 2010;140(6):805-820. doi:10.1016/j.cell.2010.01.022
162. Broz P, Dixit VM. Inflammasomes: mechanism of assembly, regulation and signalling. *Nat Rev Immunol*. 2016;16(7):407-420. doi:10.1038/nri.2016.58
163. Richter K, Sagawe S, Hecker A, et al. C-Reactive Protein Stimulates Nicotinic Acetylcholine Receptors to Control ATP-Mediated Monocytic Inflammasome Activation. *Front Immunol*. 2018;9:1604. doi:10.3389/fimmu.2018.01604
164. Siebers K, Fink B, Zakrzewicz A, et al. Alpha-1 Antitrypsin Inhibits ATP-Mediated Release of Interleukin-1 β via CD36 and Nicotinic Acetylcholine Receptors. *Front Immunol*. 2018;9:877. doi:10.3389/fimmu.2018.00877
165. Zakrzewicz A, Richter K, Zakrzewicz D, et al. SLPI Inhibits ATP-Mediated Maturation of IL-1 β in Human Monocytic Leukocytes: A Novel Function of an Old Player. *Front Immunol*. 2019;10:664. doi:10.3389/fimmu.2019.00664
166. Richter K, Amati AL, Padberg W, Grau V. Negative regulation of ATP-induced inflammasome activation and cytokine secretion by acute-phase proteins: A mini review. *Front Pharmacol*. 2022;13:981276. doi:10.3389/fphar.2022.981276

167. Pavlov VA, Wang H, Czura CJ, Friedman SG, Tracey KJ. The Cholinergic Anti-inflammatory Pathway: A Missing Link in Neuroimmunomodulation. *Mol Med.* 2003;9(5-8):125-134.
168. Roa-Vidal N, Rodríguez-Aponte AS, Lasalde-Dominicci JA, Capó-Vélez CM, Delgado-Vélez M. Cholinergic Polarization of Human Macrophages. *Int J Mol Sci.* 2023;24(21):15732. doi:10.3390/ijms242115732
169. Li XW, Wang H. Non-neuronal nicotinic alpha 7 receptor, a new endothelial target for revascularization. *Life Sci.* 2006;78(16):1863-1870. doi:10.1016/j.lfs.2005.08.031
170. Shelukhina I, Siniavin A, Kasheverov I, Ojomoko L, Tsetlin V, Utkin Y. α 7- and α 9-Containing Nicotinic Acetylcholine Receptors in the Functioning of Immune System and in Pain. *Int J Mol Sci.* 2023;24(7):6524. doi:10.3390/ijms24076524
171. Zoli M, Pucci S, Vilella A, Gotti C. Neuronal and Extraneuronal Nicotinic Acetylcholine Receptors. *Curr Neuroparmacol.* 2018;16(4):338-349. doi:10.2174/1570159X15666170912110450
172. Borovikova LV, Ivanova S, Zhang M, et al. Vagus nerve stimulation attenuates the systemic inflammatory response to endotoxin. *Nature.* 2000;405(6785):458-462. doi:10.1038/35013070
173. Olofsson PS, Rosas-Ballina M, Levine YA, Tracey KJ. Rethinking inflammation: neural circuits in the regulation of immunity. *Immunol Rev.* 2012;248(1):188-204. doi:10.1111/j.1600-065X.2012.01138.x
174. St-Pierre S, Jiang W, Roy P, et al. Nicotinic Acetylcholine Receptors Modulate Bone Marrow-Derived Pro-Inflammatory Monocyte Production and Survival. *PloS One.* 2016;11(2):e0150230. doi:10.1371/journal.pone.0150230
175. Fujii T, Mashimo M, Moriwaki Y, et al. Expression and Function of the Cholinergic System in Immune Cells. *Front Immunol.* 2017;8:1085. doi:10.3389/fimmu.2017.01085
176. Liu Q, Whiteaker P, Morley BJ, Shi FD, Lukas RJ. Distinctive Roles for α 7*- and α 9*-Nicotinic Acetylcholine Receptors in Inflammatory and Autoimmune Responses in the Murine Experimental Autoimmune Encephalomyelitis Model of Multiple Sclerosis. *Front Cell Neurosci.* 2017;11:287. doi:10.3389/fncel.2017.00287
177. AlSharari SD, Toma W, Mahmood HM, Michael McIntosh J, Imad Damaj M. The α 9 α 10 nicotinic acetylcholine receptors antagonist α -conotoxin RgIA reverses colitis signs in murine dextran sodium sulfate model. *Eur J Pharmacol.* 2020;883:173320. doi:10.1016/j.ejphar.2020.173320
178. Hone AJ, McIntosh JM. Nicotinic acetylcholine receptors: Therapeutic targets for novel ligands to treat pain and inflammation. *Pharmacol Res.* 2023;190:106715. doi:10.1016/j.phrs.2023.106715

179. Hoover DB. Cholinergic modulation of the immune system presents new approaches for treating inflammation. *Pharmacol Ther.* 2017;179:1-16. doi:10.1016/j.pharmthera.2017.05.002
180. Hecker A, Küllmar M, Wilker S, et al. Phosphocholine-Modified Macromolecules and Canonical Nicotinic Agonists Inhibit ATP-Induced IL-1 β Release. *J Immunol Baltim Md 1950.* 2015;195(5):2325-2334. doi:10.4049/jimmunol.1400974
181. Richter K, Mathes V, Fronius M, et al. Phosphocholine - an agonist of metabotropic but not of ionotropic functions of α 9-containing nicotinic acetylcholine receptors. *Sci Rep.* 2016;6:28660. doi:10.1038/srep28660
182. Backhaus S, Zakrzewicz A, Richter K, et al. Surfactant inhibits ATP-induced release of interleukin-1 β via nicotinic acetylcholine receptors. *J Lipid Res.* 2017;58(6):1055-1066. doi:10.1194/jlr.M071506
183. Zakrzewicz A, Richter K, Agné A, et al. Canonical and Novel Non-Canonical Cholinergic Agonists Inhibit ATP-Induced Release of Monocytic Interleukin-1 β via Different Combinations of Nicotinic Acetylcholine Receptor Subunits α 7, α 9 and α 10. *Front Cell Neurosci.* 2017;11:189. doi:10.3389/fncel.2017.00189
184. Michl J, Ohlbaum DJ, Silverstein SC. 2-Deoxyglucose selectively inhibits Fc and complement receptor-mediated phagocytosis in mouse peritoneal macrophages II. Dissociation of the inhibitory effects of 2-deoxyglucose on phagocytosis and ATP generation. *J Exp Med.* 1976;144(6):1484-1493. doi:10.1084/jem.144.6.1484
185. Freerman AJ, Johnson AR, Sacks GN, et al. Metabolic Reprogramming of Macrophages: GLUCOSE TRANSPORTER 1 (GLUT1)-MEDIATED GLUCOSE METABOLISM DRIVES A PROINFLAMMATORY PHENOTYPE*. *J Biol Chem.* 2014;289(11):7884-7896. doi:10.1074/jbc.M113.522037
186. Pavlou S, Wang L, Xu H, Chen M. Higher phagocytic activity of thioglycollate-elicited peritoneal macrophages is related to metabolic status of the cells. *J Inflamm.* 2017;14(1):4. doi:10.1186/s12950-017-0151-x
187. Rodriguez AE, Ducker GS, Billingham LK, et al. Serine Metabolism Supports Macrophage IL-1 β Production. *Cell Metab.* 2019;29(4):1003-1011.e4. doi:10.1016/j.cmet.2019.01.014
188. Zhang K, Jagannath C. Crosstalk between metabolism and epigenetics during macrophage polarization. *Epigenetics Chromatin.* 2025;18(1):16. doi:10.1186/s13072-025-00575-9
189. Zhou S, Zhu Y, Wu Y, et al. New insights on metabolic reprogramming in macrophage plasticity. *Int Immunopharmacol.* 2025;157:114797. doi:10.1016/j.intimp.2025.114797
190. Infantino V, Iacobazzi V, Palmieri F, Menga A. ATP-citrate lyase is essential for macrophage inflammatory response. *Biochem Biophys Res Commun.* 2013;440(1):105-111. doi:10.1016/j.bbrc.2013.09.037

191. MacKenzie KF, Clark K, Naqvi S, et al. PGE2 Induces Macrophage IL-10 Production and a Regulatory-like Phenotype via a Protein Kinase A–SIK–CRTC3 Pathway. *J Immunol Author Choice*. 2013;190(2):565-577. doi:10.4049/jimmunol.1202462
192. Wang J, He Y, Hu F, et al. Metabolic Reprogramming of Immune Cells in the Tumor Microenvironment. *Int J Mol Sci*. 2024;25(22):12223. doi:10.3390/ijms252212223
193. Tannahill GM, Curtis AM, Adamik J, et al. Succinate is an inflammatory signal that induces IL-1 β through HIF-1 α . *Nature*. 2013;496(7444):238-242. doi:10.1038/nature11986
194. Jha AK, Huang SCC, Sergushichev A, et al. Network Integration of Parallel Metabolic and Transcriptional Data Reveals Metabolic Modules that Regulate Macrophage Polarization. *Immunity*. 2015;42(3):419-430. doi:10.1016/j.immuni.2015.02.005
195. Palsson-McDermott EM, Curtis AM, Goel G, et al. Pyruvate Kinase M2 regulates Hif-1 α activity and IL-1 β induction, and is a critical determinant of the Warburg Effect in LPS-activated macrophages. *Cell Metab*. 2015;21(1):65-80. doi:10.1016/j.cmet.2014.12.005
196. Littlewood-Evans A, Sarret S, Apfel V, et al. GPR91 senses extracellular succinate released from inflammatory macrophages and exacerbates rheumatoid arthritis. *J Exp Med*. 2016;213(9):1655-1662. doi:10.1084/jem.20160061
197. Semenza GL, Jiang BH, Leung SW, et al. Hypoxia Response Elements in the Aldolase A, Enolase 1, and Lactate Dehydrogenase A Gene Promoters Contain Essential Binding Sites for Hypoxia-inducible Factor 1*. *J Biol Chem*. 1996;271(51):32529-32537. doi:10.1074/jbc.271.51.32529
198. Kim J whan, Tchernyshyov I, Semenza GL, Dang CV. HIF-1-mediated expression of pyruvate dehydrogenase kinase: A metabolic switch required for cellular adaptation to hypoxia. *Cell Metab*. 2006;3(3):177-185. doi:10.1016/j.cmet.2006.02.002
199. Wang T, Liu H, Lian G, Zhang SY, Wang X, Jiang C. HIF1 α -Induced Glycolysis Metabolism Is Essential to the Activation of Inflammatory Macrophages. *Mediators Inflamm*. 2017;2017(1):9029327. doi:10.1155/2017/9029327
200. Haschemi A, Kosma P, Gille L, et al. The Sedoheptulose Kinase CARKL Directs Macrophage Polarization through Control of Glucose Metabolism. *Cell Metab*. 2012;15(6):813-826. doi:10.1016/j.cmet.2012.04.023
201. Semba H, Takeda N, Isagawa T, et al. HIF-1 α -PDK1 axis-induced active glycolysis plays an essential role in macrophage migratory capacity. *Nat Commun*. 2016;7:11635. doi:10.1038/ncomms11635
202. Palmieri EM, Menga A, Martín-Pérez R, et al. Pharmacologic or Genetic Targeting of Glutamine Synthetase Skews Macrophages toward an M1-like Phenotype and Inhibits Tumor Metastasis. *Cell Rep*. 2017;20(7):1654-1666. doi:10.1016/j.celrep.2017.07.054

203. Wang S, Wang J, Chen Z, et al. Targeting M2-like tumor-associated macrophages is a potential therapeutic approach to overcome antitumor drug resistance. *NPJ Precis Oncol.* 2024;8(1):31. doi:10.1038/s41698-024-00522-z
204. Kwon DH, Lee H, Park C, et al. Glutathione Induced Immune-Stimulatory Activity by Promoting M1-Like Macrophages Polarization via Potential ROS Scavenging Capacity. *Antioxidants.* 2019;8(9):413. doi:10.3390/antiox8090413
205. Zhou R, Yazdi AS, Menu P, Tschopp J. A role for mitochondria in NLRP3 inflammasome activation. *Nature.* 2011;469(7329):221-225. doi:10.1038/nature09663
206. Wolf AJ, Reyes CN, Liang W, et al. Hexokinase Is an Innate Immune Receptor for the Detection of Bacterial Peptidoglycan. *Cell.* 2016;166(3):624-636. doi:10.1016/j.cell.2016.05.076
207. Abuawad A, Mbadugha C, Ghaemmaghami AM, Kim DH. Metabolic characterisation of THP-1 macrophage polarisation using LC-MS-based metabolite profiling. *Metabolomics Off J Metabolomic Soc.* 2020;16(3):33. doi:10.1007/s11306-020-01656-4
208. Castro AS, Alves CMOS, Angeloni MB, et al. Trophoblast cells are able to regulate monocyte activity to control *Toxoplasma gondii* infection. *Placenta.* 2013;34(3):240-247. doi:10.1016/j.placenta.2012.12.006
209. Gov L, Karimzadeh A, Ueno N, Lodoen MB. Human Innate Immunity to *Toxoplasma gondii* Is Mediated by Host Caspase-1 and ASC and Parasite GRA15. *mBio.* 2013;4(4):e00255-13. doi:10.1128/mBio.00255-13
210. Tosh KW, Mittereder L, Bonne-Annee S, et al. The IL-12 Response of Primary Human Dendritic Cells and Monocytes to *Toxoplasma gondii* Is Stimulated by Phagocytosis of Live Parasites Rather Than Host Cell Invasion. *J Immunol Baltim Md 1950.* 2016;196(1):345-356. doi:10.4049/jimmunol.1501558
211. Pandori WJ, Lima TS, Mallya S, Kao TH, Gov L, Lodoen MB. *Toxoplasma gondii* activates a Syk-CARD9-NF- κ B signaling axis and gasdermin D-independent release of IL-1 β during infection of primary human monocytes. *PLoS Pathog.* 2019;15(8):e1007923. doi:10.1371/journal.ppat.1007923
212. Lima TS, Gov L, Lodoen MB. Evasion of Human Neutrophil-Mediated Host Defense during *Toxoplasma gondii* Infection. *mBio.* 2018;9(1):e02027-17. doi:10.1128/mBio.02027-17
213. Gov L, Schneider CA, Lima TS, Pandori W, Lodoen MB. NLRP3 and Potassium Efflux Drive Rapid IL-1 β Release from Primary Human Monocytes during *Toxoplasma gondii* Infection. *J Immunol Baltim Md 1950.* 2017;199(8):2855-2864. doi:10.4049/jimmunol.1700245
214. Cirelli KM, Gorfu G, Hassan MA, et al. Inflammasome Sensor NLRP1 Controls Rat Macrophage Susceptibility to *Toxoplasma gondii*. *PLOS Pathog.* 2014;10(3):e1003927. doi:10.1371/journal.ppat.1003927

215. Witola WH, Mui E, Hargrave A, et al. NALP1 Influences Susceptibility to Human Congenital Toxoplasmosis, Proinflammatory Cytokine Response, and Fate of *Toxoplasma gondii*-Infected Monocytic Cells. *Infect Immun*. 2011;79(2):756-766. doi:10.1128/iai.00898-10
216. Chu JQ, Shi G, Fan YM, et al. Production of IL-1 β and Inflammasome with Up-Regulated Expressions of NOD-Like Receptor Related Genes in *Toxoplasma gondii*-Infected THP-1 Macrophages. *Korean J Parasitol*. 2016;54(6):711-717. doi:10.3347/kjp.2016.54.6.711
217. Pandori WJ, Matsuno SY, Shin JH, et al. Role for Caspase-8 in the Release of IL-1 β and Active Caspase-1 from Viable Human Monocytes during *Toxoplasma gondii* Infection. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2024;212(7):1161-1171. doi:10.4049/jimmunol.2200513
218. Pelloux H, Pernod G, Ricard J, Renversez TC, Ambroise-Thomas P. Interleukin-6 is secreted by human monocytes after stimulation with anti-*Toxoplasma gondii* sera. *J Infect Dis*. 1994;169(5):1181-1182. doi:10.1093/infdis/169.5.1181
219. Salazar Gonzalez RM, Shehata H, O'Connell MJ, et al. *Toxoplasma gondii*-Derived Profilin Triggers Human Toll-Like Receptor 5-Dependent Cytokine Production. *J Innate Immun*. 2014;6(5):685-694. doi:10.1159/000362367
220. Tombácz K, Burgess G, Holder A, Werners A, Werling D. *Toxoplasma gondii* profilin does not stimulate an innate immune response through bovine or human TLR5. *Innate Immun*. 2018;24(7):422-429. doi:10.1177/1753425918798450
221. Friedland JS, Shattock RJ, Johnson JD, Remick DG, Holliman RE, Griffin GE. Differential cytokine gene expression and secretion after phagocytosis by a human monocytic cell line of *Toxoplasma gondii* compared with *Mycobacterium tuberculosis*. *Clin Exp Immunol*. 1993;91(2):282-286. doi:10.1111/j.1365-2249.1993.tb05896.x
222. Korbel DS, Finney OC, Riley EM. Natural killer cells and innate immunity to protozoan pathogens. *Int J Parasitol*. 2004;34(13):1517-1528. doi:10.1016/j.ijpara.2004.10.006
223. Könen-Waisman S, Howard JC. Cell-autonomous immunity to *Toxoplasma gondii* in mouse and man. *Microbes Infect*. 2007;9(14-15):1652-1661. doi:10.1016/j.micinf.2007.09.005
224. Howard JC, Hunn JP, Steinfeldt T. The IRG protein-based resistance mechanism in mice and its relation to virulence in *Toxoplasma gondii*. *Curr Opin Microbiol*. 2011;14(4):414-421. doi:10.1016/j.mib.2011.07.002
225. Fisch D, Clough B, Khan R, Healy L, Frickel EM. *Toxoplasma*-proximal and distal control by GBPs in human macrophages. *Pathog Dis*. 2021;79(9):ftab058. doi:10.1093/femspd/ftab058
226. Mahmoudzadeh S, Nozad Charoudeh H, Marques CS, Bahadory S, Ahmadpour E. The role of IL-12 in stimulating NK cells against *Toxoplasma gondii* infection: a

- mini-review. *Parasitol Res.* 2021;120(7):2303-2309. doi:10.1007/s00436-021-07204-w
227. Ruiz-Rosado J de D, Olguín JE, Juárez-Avelar I, et al. MIF Promotes Classical Activation and Conversion of Inflammatory Ly6Chigh Monocytes into TipDCs during Murine Toxoplasmosis. *Mediators Inflamm.* 2016;2016(1):9101762. doi:10.1155/2016/9101762
228. Neumann A, Brogden G, von Köckritz-Blickwede M. Extracellular Traps: An Ancient Weapon of Multiple Kingdoms. *Biology.* 2020;9(2):34. doi:10.3390/biology9020034
229. Wolf PMK, Hanke D, Singh VK, et al. The ATP-mediated cytokine release by macrophages is down-modulated by unconventional $\alpha 9^*$ nicotinic acetylcholine receptors. *Front Immunol.* 2025;16. doi:10.3389/fimmu.2025.1661114
230. Hanke D, Velásquez ZD, Buettner K, et al. Early responses of primary human-and bovine monocytes, monocytic THP-1 cells and THP-1 cell-derived macrophages to vital *Toxoplasma gondii* tachyzoites. *Front Immunol.* 2025;16. doi:10.3389/fimmu.2025.1683634
231. Denkers EY, Gazzinelli RT. Regulation and Function of T-Cell-Mediated Immunity during *Toxoplasma gondii* Infection. *Clin Microbiol Rev.* 1998;11(4):569-588. doi:10.1128/cmr.11.4.569
232. Levaditi C et alied, Sanchis-Bayarri V, Lepine P, Schoen R. Etude sur l'encephalomyelite provoquee par le *Toxoplasma cuniculi*. *Ann Inst Pasteur.* 1929;43(673):1063.
233. Sabin AB, Olitsky PK. *Toxoplasma* and Obligate Intracellular Parasitism. *Science.* 1937;85(2205):336-338. doi:10.1126/science.85.2205.336
234. Morrisette NS, Ajioka JW. The early years of *Toxoplasma* research: What's past is prologue. *Int J Parasitol.* 2009;39(8):865-869. doi:10.1016/j.ijpara.2009.02.010
235. Warschkau D, Seeber F. Advances towards the complete in vitro life cycle of *Toxoplasma gondii*. *Fac Rev.* 2023;12:1. doi:10.12703/r/12-1
236. Sabin AB. Toxoplasma encephalitis in children. *J Am Med Assoc.* 1941;116(9):801-807. doi:10.1001/jama.1941.02820090001001
237. Velásquez ZD, Peixoto R, Gärtner U, Hermosilla C, Taubert A, Conejeros I. Dynamics of cell cycle proteins involved in *Toxoplasma gondii*-induced bovine NET formation. *Front Immunol.* 2023;14:1125667. doi:10.3389/fimmu.2023.1125667
238. Frenkel JK, Ambroise-Thomas P. Genomic drift of *Toxoplasma gondii*. *Parasitol Res.* 1997;83(1):1-5. doi:10.1007/s004360050197
239. Saraf P, Shwab EK, Dubey JP, Su C. On the determination of *Toxoplasma gondii* virulence in mice. *Exp Parasitol.* 2017;174:25-30. doi:10.1016/j.exppara.2017.01.009

240. Primo VA, Rezvani Y, Farrell A, et al. The Extracellular Milieu of Toxoplasma's Lytic Cycle Drives Lab Adaptation, Primarily by Transcriptional Reprogramming. *mSystems*. 2021;6(6):e0119621. doi:10.1128/mSystems.01196-21
241. Kim K, Weiss LM. *Toxoplasma gondii*: the model apicomplexan. *Int J Parasitol*. 2004;34(3):423-432. doi:10.1016/j.ijpara.2003.12.009
242. Di Paola FJ, Cardoso LH, Nikitopoulou E, et al. Impact of mtG3PDH inhibitors on proliferation and metabolism of androgen receptor-negative prostate cancer cells: Role of extracellular pyruvate. *PloS One*. 2025;20(6):e0325509. doi:10.1371/journal.pone.0325509
243. Daigneault M, Preston JA, Marriott HM, Whyte MKB, Dockrell DH. The identification of markers of macrophage differentiation in PMA-stimulated THP-1 cells and monocyte-derived macrophages. *PloS One*. 2010;5(1):e8668. doi:10.1371/journal.pone.0008668
244. Starr T, Bauler TJ, Malik-Kale P, Steele-Mortimer O. The phorbol 12-myristate-13-acetate differentiation protocol is critical to the interaction of THP-1 macrophages with *Salmonella typhimurium*. *PloS One*. 2018;13(3):e0193601. doi:10.1371/journal.pone.0193601
245. Phuangbubpha P, Thara S, Sriboonai P, Saetan P, Tumnoi W, Charoenpanich A. Optimizing THP-1 Macrophage Culture for an Immune-Responsive Human Intestinal Model. *Cells*. 2023;12(10):1427. doi:10.3390/cells12101427
246. Patterson S, Gross J, Bedford P, Knight SC. Morphology and phenotype of dendritic cells from peripheral blood and their productive and non-productive infection with human immunodeficiency virus type 1. *Immunology*. 1991;72(3):361-367.
247. Patil R, Kale AD, Mane DR, Patil D. Isolation, culture and characterization of primary cell lines of human buccal mucosal fibroblasts: A combination of explant enzymatic technique. *J Oral Maxillofac Pathol JOMFP*. 2020;24(1):68-75. doi:10.4103/jomfp.JOMFP_282_19
248. Oh MH, Jang J, Lee JH. Polarization of THP-1-Derived Macrophage by Magnesium and MAGT1 Inhibition in Wound Healing. *Arch Plast Surg*. 2023;50(4):432-442. doi:10.1055/s-0043-1770114
249. Bianconi S, Leppik L, Oppermann E, Marzi I, Henrich D. Direct Current Electrical Stimulation Shifts THP-1-Derived Macrophage Polarization towards Pro-Regenerative M2 Phenotype. *Int J Mol Sci*. 2024;25(13):7272. doi:10.3390/ijms25137272
250. Malavasi F, Deaglio S, Funaro A, et al. Evolution and function of the ADP ribosyl cyclase/CD38 gene family in physiology and pathology. *Physiol Rev*. 2008;88(3):841-886. doi:10.1152/physrev.00035.2007
251. Amici SA, Young NA, Narvaez-Miranda J, et al. CD38 Is Robustly Induced in Human Macrophages and Monocytes in Inflammatory Conditions. *Front Immunol*. 2018;9:1593. doi:10.3389/fimmu.2018.01593

252. Cao W, Lee SH, Lu J. CD83 is preformed inside monocytes, macrophages and dendritic cells, but it is only stably expressed on activated dendritic cells. *Biochem J*. 2005;385(Pt 1):85-93. doi:10.1042/BJ20040741
253. Paine A, Kirchner H, Immenschuh S, Oelke M, Blasczyk R, Eiz-Vesper B. IL-2 upregulates CD86 expression on human CD4(+) and CD8(+) T cells. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2012;188(4):1620-1629. doi:10.4049/jimmunol.1100181
254. Soskic B, Jeffery LE, Kennedy A, et al. CD80 on Human T Cells Is Associated With FoxP3 Expression and Supports Treg Homeostasis. *Front Immunol*. 2020;11:577655. doi:10.3389/fimmu.2020.577655
255. Komohara Y, Hirahara J, Horikawa T, et al. AM-3K, an anti-macrophage antibody, recognizes CD163, a molecule associated with an anti-inflammatory macrophage phenotype. *J Histochem Cytochem Off J Histochem Soc*. 2006;54(7):763-771. doi:10.1369/jhc.5A6871.2006
256. Baxter EW, Graham AE, Re NA, et al. Standardized protocols for differentiation of THP-1 cells to macrophages with distinct M(IFN γ +LPS), M(IL-4) and M(IL-10) phenotypes. *J Immunol Methods*. 2020;478:112721. doi:10.1016/j.jim.2019.112721
257. Robinson MJ, Sancho D, Slack EC, LeibundGut-Landmann S, Reis e Sousa C. Myeloid C-type lectins in innate immunity. *Nat Immunol*. 2006;7(12):1258-1265. doi:10.1038/ni1417
258. Hölken JM, Teusch N. The Monocytic Cell Line THP-1 as a Validated and Robust Surrogate Model for Human Dendritic Cells. *Int J Mol Sci*. 2023;24(2):1452. doi:10.3390/ijms24021452
259. Lurier EB, Dalton D, Dampier W, et al. Transcriptome analysis of IL-10-stimulated (M2c) macrophages by next-generation sequencing. *Immunobiology*. 2017;222(7):847-856. doi:10.1016/j.imbio.2017.02.006
260. Lopez-Castejon G, Brough D. Understanding the mechanism of IL-1 β secretion. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2011;22(4):189-195. doi:10.1016/j.cytogfr.2011.10.001
261. de Torre-Minguela C, Barberà-Cremades M, Gómez AI, Martín-Sánchez F, Pelegrín P. Macrophage activation and polarization modify P2X7 receptor secretome influencing the inflammatory process. *Sci Rep*. 2016;6(1):22586. doi:10.1038/srep22586
262. Pelegrin P, Surprenant A. Dynamics of macrophage polarization reveal new mechanism to inhibit IL-1 β release through pyrophosphates. *EMBO J*. 2009;28(14):2114-2127. doi:10.1038/emboj.2009.163
263. Perregaux D, Barberia J, Lanzetti AJ, Geoghegan KF, Carty TJ, Gabel CA. IL-1 beta maturation: evidence that mature cytokine formation can be induced specifically by nigericin. *J Immunol Baltim Md 1950*. 1992;149(4):1294-1303.
264. Wewers MD, Sarkar A. P2X7 receptor and macrophage function. *Purinergic Signal*. 2009;5(2):189-195. doi:10.1007/s11302-009-9131-9

265. Li R, Zhang P, Wang Y, Tao K. Itaconate: A Metabolite Regulates Inflammation Response and Oxidative Stress. *Oxid Med Cell Longev*. 2020;2020:5404780. doi:10.1155/2020/5404780
266. Ross R, Hasheminasab SS, Conejeros I, et al. Human dendritic cell interactions with the zoonotic parasite *Cryptosporidium parvum* result in activation and maturation. *Front Immunol*. 2024;15:1388366. doi:10.3389/fimmu.2024.1388366
267. Goddeeris BM, Baldwin CL, ole-MoiYoi O, Morrison WI. Improved methods for purification and depletion of monocytes from bovine peripheral blood mononuclear cells. Functional evaluation of monocytes in responses to lectins. *J Immunol Methods*. 1986;89(2):165-173. doi:10.1016/0022-1759(86)90354-6
268. Cecilian F, Ávila Morales G, De Matteis G, et al. Methods in isolation and characterization of bovine monocytes and macrophages. *Methods San Diego Calif*. 2021;186:22-41. doi:10.1016/j.ymeth.2020.06.017
269. Weidner JM, Kanatani S, Hernández-Castañeda MA, et al. Rapid cytoskeleton remodelling in dendritic cells following invasion by *Toxoplasma gondii* coincides with the onset of a hypermigratory phenotype. *Cell Microbiol*. 2013;15(10):1735-1752. doi:10.1111/cmi.12145
270. Bhandage AK, Kanatani S, Barragan A. *Toxoplasma*-Induced Hypermigration of Primary Cortical Microglia Implicates GABAergic Signaling. *Front Cell Infect Microbiol*. 2019;9:73. doi:10.3389/fcimb.2019.00073
271. García-Sánchez M, Jiménez-Pelayo L, Horcajo P, et al. Differential Responses of Bovine Monocyte-Derived Macrophages to Infection by *Neospora caninum* Isolates of High and Low Virulence. *Front Immunol*. 2019;10:915. doi:10.3389/fimmu.2019.00915
272. Silva LMR, Muñoz-Caro T, Burgos RA, Hidalgo MA, Taubert A, Hermosilla C. Far beyond Phagocytosis: Phagocyte-Derived Extracellular Traps Act Efficiently against Protozoan Parasites *In Vitro* and *In Vivo*. *Mediators Inflamm*. 2016;2016(1):5898074. doi:10.1155/2016/5898074
273. Kenny EF, Herzig A, Krüger R, et al. Diverse stimuli engage different neutrophil extracellular trap pathways. *eLife*. 6:e24437. doi:10.7554/eLife.24437
274. von Köckritz-Blickwede M von, Chow O, Ghochani M, Nizet V. 7 - Visualization and Functional Evaluation of Phagocyte Extracellular Traps. In: Kabelitz D, Kaufmann SHE, eds. *Methods in Microbiology*. Vol 37. Immunology of Infection. Academic Press; 2010:139-160. doi:10.1016/S0580-9517(10)37007-3
275. Grob D, Conejeros I, Velásquez ZD, et al. *Trypanosoma brucei brucei* Induces Polymorphonuclear Neutrophil Activation and Neutrophil Extracellular Traps Release. *Front Immunol*. 2020;11. doi:10.3389/fimmu.2020.559561
276. Kumar P, Nagarajan A, Uchil PD. Analysis of Cell Viability by the Lactate Dehydrogenase Assay. *Cold Spring Harb Protoc*. 2018;2018(6). doi:10.1101/pdb.prot095497

277. Matsubara K, Kubota M, Adachi S, et al. Different Mode of Cell Death Induced by Calcium Ionophore in Human Leukemia Cell Lines: Possible Role of Constitutive Endonuclease. *Exp Cell Res.* 1994;210(1):19-25. doi:10.1006/excr.1994.1003
278. Abi Abdallah DS, Lin C, Ball CJ, King MR, Duhamel GE, Denkers EY. *Toxoplasma gondii* triggers release of human and mouse neutrophil extracellular traps. *Infect Immun.* 2012;80(2):768-777. doi:10.1128/IAI.05730-11
279. Lacerda LC, dos Santos JL, Wardini AB, et al. *Toxoplasma gondii* induces extracellular traps release in cat neutrophils. *Exp Parasitol.* 2019;207:107770. doi:10.1016/j.exppara.2019.107770
280. Wei Z, Wang Z, Liu X, et al. *Toxoplasma gondii* Triggers Neutrophil Extracellular Traps Release in Dogs. *Front Cell Infect Microbiol.* 2020;10:429. doi:10.3389/fcimb.2020.00429
281. Yildiz K, Gokpinar S, Gazyagci AN, Babur C, Sursal N, Azkur AK. Role of NETs in the difference in host susceptibility to *Toxoplasma gondii* between sheep and cattle. *Vet Immunol Immunopathol.* 2017;189:1-10. doi:10.1016/j.vetimm.2017.05.005
282. Imlau M, Conejeros I, Muñoz-Caro T, et al. Dolphin-derived NETosis results in rapid *Toxoplasma gondii* tachyzoite ensnarement and different phenotypes of NETs. *Dev Comp Immunol.* 2020;103:103527. doi:10.1016/j.dci.2019.103527
283. Lund PK, Westvik ÅB, Joø GB, Øvstebø R, Haug KBF, Kierulf P. Flow cytometric evaluation of apoptosis, necrosis and recovery when culturing monocytes. *J Immunol Methods.* 2001;252(1):45-55. doi:10.1016/S0022-1759(01)00330-1
284. Nielsen MC, Andersen MN, Møller HJ. Monocyte isolation techniques significantly impact the phenotype of both isolated monocytes and derived macrophages in vitro. *Immunology.* 2020;159(1):63-74. doi:10.1111/imm.13125
285. Kaisho T, Akira S. Toll-like receptor function and signaling. *J Allergy Clin Immunol.* 2006;117(5):979-987. doi:10.1016/j.jaci.2006.02.023
286. Walseng E, Furuta K, Goldszmid RS, Weih KA, Sher A, Roche PA. Dendritic Cell Activation Prevents MHC Class II Ubiquitination and Promotes MHC Class II Survival Regardless of the Activation Stimulus*. *J Biol Chem.* 2010;285(53):41749-41754. doi:10.1074/jbc.M110.157586
287. Debierre-Grockiego F, Azzouz N, Schmidt J, et al. Roles of glycosylphosphatidylinositols of *Toxoplasma gondii*. Induction of tumor necrosis factor-alpha production in macrophages. *J Biol Chem.* 2003;278(35):32987-32993. doi:10.1074/jbc.M304791200
288. Yarovinsky F, Sher A. Toll-like receptor recognition of *Toxoplasma gondii*. *Int J Parasitol.* 2006;36(3):255-259. doi:10.1016/j.ijpara.2005.12.003
289. Scanga CA, Aliberti J, Jankovic D, et al. Cutting edge: MyD88 is required for resistance to *Toxoplasma gondii* infection and regulates parasite-induced IL-12

- production by dendritic cells. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2002;168(12):5997-6001. doi:10.4049/jimmunol.168.12.5997
290. Mun HS, Aosai F, Norose K, et al. TLR2 as an essential molecule for protective immunity against *Toxoplasma gondii* infection. *Int Immunol*. 2003;15(9):1081-1087. doi:10.1093/intimm/dxg108
291. Frölich S, Entzeroth R, Wallach M. Comparison of Protective Immune Responses to Apicomplexan Parasites. *J Parasitol Res*. 2012;2012:852591. doi:10.1155/2012/852591
292. Muñoz-Caro T, Gibson AJ, Conejeros I, Werling D, Taubert A, Hermosilla C. The Role of TLR2 and TLR4 in Recognition and Uptake of the Apicomplexan Parasite *Eimeria bovis* and Their Effects on NET Formation. *Pathogens*. 2021;10(2):118. doi:10.3390/pathogens10020118
293. May RC, Machesky LM. Phagocytosis and the actin cytoskeleton. *J Cell Sci*. 2001;114(6):1061-1077. doi:10.1242/jcs.114.6.1061
294. Ueno N, Harker KS, Clarke EV, et al. Real-time imaging of *Toxoplasma*-infected human monocytes under fluidic shear stress reveals rapid translocation of intracellular parasites across endothelial barriers. *Cell Microbiol*. 2014;16(4):580-595. doi:10.1111/cmi.12239
295. Brodin P, Davis MM. Human immune system variation. *Nat Rev Immunol*. 2017;17(1):21-29. doi:10.1038/nri.2016.125
296. Kurygina AV, Erokhina MV, Makarevich OA, et al. Plasticity of Human THP-1 Cell Phagocytic Activity during Macrophagic Differentiation. *Biochem Biokhimiia*. 2018;83(3):200-214. doi:10.1134/S0006297918030021
297. Herdoiza Padilla E, Crauwels P, Bergner T, et al. mir-124-5p Regulates Phagocytosis of Human Macrophages by Targeting the Actin Cytoskeleton via the ARP2/3 Complex. *Front Immunol*. 2019;10:2210. doi:10.3389/fimmu.2019.02210
298. Liu T, Huang T, Li J, et al. Optimization of differentiation and transcriptomic profile of THP-1 cells into macrophage by PMA. *PloS One*. 2023;18(7):e0286056. doi:10.1371/journal.pone.0286056
299. Lu C, Wu Z, Gao H, et al. Sperm induce macrophage extracellular trap formation via phagocytosis-dependent mechanism. *Biol Reprod*. 2023;109(3):319-329. doi:10.1093/biolre/ioad068
300. Luque-Martin R, Mander PK, Leenen PJM, Winther MPJ. Classic and new mediators for *in vitro* modelling of human macrophages. *J Leukoc Biol*. 2021;109(3):549-560. doi:10.1002/JLB.1RU0620-018R
301. Zhou E, Conejeros I, Gärtner U, Mazurek S, Hermosilla C, Taubert A. Metabolic requirements of *Besnoitia besnoiti* tachyzoite-triggered NETosis. *Parasitol Res*. 2020;119(2):545-557. doi:10.1007/s00436-019-06543-z

302. Rouillard AD, Gunderson GW, Fernandez NF, et al. The harmonizome: a collection of processed datasets gathered to serve and mine knowledge about genes and proteins. *Database*. 2016;2016:baw100. doi:10.1093/database/baw100
303. Diamant I, Clarke DJB, Evangelista JE, Lingam N, Ma'ayan A. Harmonizome 3.0: integrated knowledge about genes and proteins from diverse multi-omics resources. *Nucleic Acids Res*. 2025;53(D1):D1016-D1028. doi:10.1093/nar/gkae1080
304. Guan F, Wang R, Yi Z, et al. Tissue macrophages: origin, heterogeneity, biological functions, diseases and therapeutic targets. *Signal Transduct Target Ther*. 2025;10(1):93. doi:10.1038/s41392-025-02124-y

I. ANHANG

1. Publikationsliste

1.1. Originalarbeiten in Fachzeitschriften (*peer review*)

Hanke D., Velasquez Z.D., Büttner K., Krueger A., Ross R., Hecker A., Mazurek S., Grau V., Taubert A., Hermosilla C., Richter K. and Conejeros I. (2025) Early responses of primary human- and bovine monocytes, monocytic THP-1 cells and THP-1 cell-derived macrophages to vital *Toxoplasma gondii* tachyzoites. *Frontiers in Immunology - Parasite Immunology*

Wolf P.M.K., Hanke D., Singh V.K., Keller H.L., Ettischer L.J., Teppe L., Amati A.-L., Hecker A., Husain-Syed F., Rohde M., Nuber U.A., Büttner K., McIntosh J.M., Liese J., Mazurek S., Grau V. and Richter K. (2025) The ATP-mediated cytokine release by macrophages is down-modulated by unconventional $\alpha 9^*$ nicotinic acetylcholine receptors. *Frontiers in Neurology - Multiple Sclerosis and Neuroimmunology*

Ampama M.N., Hanke D., Velásquez Z.D., Wäber N.B., Hermosilla C., Taubert A. and Mazurek S. (2025) *In vitro* inhibition of *Cryptosporidium parvum* infection by the olive oil component oleocanthal. *Pathogens*

1.2. Zitierbare Kurzmitteilungen

Hanke D., Conejeros I., Richter K., Grau V., Mazurek S., Taubert A. and Hermosilla C. (2024) Characterization of extracellular traps induced by *Toxoplasma gondii* tachyzoites in monocytes and macrophages. *European Journal of Immunology*

1.3. Beiträge bei wissenschaftlichen Konferenzen

März 2024	European Phagocyte Workshop, Visegrád, Ungarn	Poster: “Characterization of extracellular traps induced by <i>Toxoplasma gondii</i> tachyzoites in monocytes and macrophages” Travel Grant: Financial support from the Congress Committee (250€).
Juni 2024	Tagung der DVG- Fachgruppe Physiologie und Biochemie, Hannover, Deutschland	Vortrag: “Characterization of extracellular traps induced by <i>Toxoplasma gondii</i> tachyzoites in monocytes and macrophages”
März 2025	Joint Parasitology Spring Meeting, Würzburg, Deutschland	Poster: “Early responses of monocytes and macrophages to <i>Toxoplasma gondii</i> tachyzoites”
Juni/Juli 2025	Tagung der DVG- Parasitologie & parasitäre Krankheiten, Gießen, Deutschland	Vortrag: “Early responses of monocytes and macrophages to <i>Toxoplasma gondii</i> tachyzoites”
November 2025	Science Day, Gießen, Deutschland	Poster: “Early responses of monocytes and macrophages to <i>Toxoplasma gondii</i> tachyzoites”
März 2026	Tagung der DVG- Fachgruppe Physiologie und Biochemie, Leipzig, Deutschland	Vortrag: „Vergleichende Charakterisierung der frühen Immunantwort gegen <i>Toxoplasma gondii</i> in primären humanen und bovinen Monozyten sowie monozytären THP-1- Zellen und ihren abgeleiteten Makrophagen” Poster: „Hemmung der <i>Cryptosporidium parvum</i> Infektion durch das Olivenöl-Polyphenol Oleocanthal in HCT-8-Zellkulturen“

2. Danksagung

Ich möchte mich herzlich bei allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Institute, bei meiner Familie sowie bei meinen Freundinnen und Freunden für die stetige Unterstützung im Rahmen meiner Dissertation bedanken.

Mein erster Dank gilt meinen Doktormüttern, Prof. Dr. Sybille Mazurek und Prof. Dr. Anja Taubert, für ihre Betreuung, ihr Vertrauen und ihre stetige Unterstützung. Ebenso möchte ich mich bei Prof. Dr. Carlos Hermosilla für seine tatkräftige Unterstützung bedanken sowie bei Prof. Dr. Veronika Grau und PD Dr. Ralf Ross.

Ein herzlicher Dank gilt Ivan und Katrin, die mich stets tatkräftig unterstützt haben.

Ganz besonders möchte ich mich bei unseren Technischen Assistentinnen in der Biochemie, Parasitologie, Experimentellen Chirurgie, Immunologie und Anatomie bedanken. Bianca, Sandra, Alex, Hannah, Sabine, Gabi, Stefan und Anika haben mit ihrem Engagement und ihrer tatkräftigen Unterstützung zum Gelingen meiner Dissertation beigetragen.

Mein Dank gilt außerdem allen Kolleginnen und Kollegen des Instituts für die großartige Zusammenarbeit und die vielen schönen Momente während und außerhalb der Arbeitszeit. Auch den Kolleginnen und Kollegen aus der Parasitologie und der Experimentellen Chirurgie danke ich für die Unterstützung.

Ein ganz besonderer Dank gebührt schließlich meiner Familie. Besonders danke ich meiner Frau, die mich während der gesamten Zeit mit ihrer Geduld, Unterstützung und Motivation begleitet und bestärkt hat. Ebenso danke ich meinen Eltern für ihre Unterstützung, ihren Rückhalt und ihre Begleitung auf meinem gesamten Lebensweg. Ebenso danke ich meiner Schwester und meinen Schwiegereltern für ihre Unterstützung. Auch gilt mein Dank unserer Hündin Mary sowie den lieben Vierbeinern aus der Heimat, die mir als treue Weggefährten stets zur Seite standen.

Nicht vergessen möchte ich meine Freundinnen und Freunde, die mich auf meinem bisherigen Weg begleitet haben und stets für den nötigen Ausgleich sowie für Motivation und gute Laune gesorgt haben.

3. Erklärung zur Dissertation

„Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten 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 der "Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis" niedergelegt sind, eingehalten.“

Dominik Hanke

ISBN: 978-3-86345-807-2



Verlag der DVG Service GmbH

An der Alten Post 2 • 35390 Gießen

Tel.: 0641 984446-0 • Fax: 0641 984446-25

E-Mail: info@dvg.de • Web: www.dvg.de