

Embryonale Stammzellen als Modellsystem für Infektion und Entzündung

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Zahnheilkunde

des Fachbereichs Medizin

der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Jennifer Scharmacher aus Höxter

Gießen 2024

Aus dem Fachbereich Medizin der Justus - Liebig - Universität Gießen

Physiologisches Institut

Gutachter: Prof. Dr. Heinrich Sauer

Gutachter: Prof. Dr. Dieter Glebe

Tag der Disputation: 10.06.2024

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Infektion und Inflammation	1
1.2	Das Lipopolysaccharid	2
1.2.1	Geschichte und Struktur	2
1.2.2	Wirkung von LPS	3
1.2.3	Toll-like-Rezeptor 4	6
1.3	Das Inflammasom	9
1.3.1	Das NLRP 3-Inflammasom	9
1.3.2	Aufbau und Signalweg von NLRP 3	10
1.4	Embryonale Stammzellen der Maus als Modellsystem	11
1.4.1	Kardiomyogenese von ES	13
1.4.2	Hämatopoetische Stammzellen	13
1.5	Zielsetzung	17
2.	Materialien und Methoden	18
2.1	Materialien	18
2.1.0	Geräte	18
2.1.1	Instrumente	20
2.1.2	Lösungen und Chemikalien	21
2.1.3	Zellkulturmedium und Komponenten	23
2.1.4	Inhibitoren	24
2.1.5	Medien und Pufferlösungen	24
2.2	Methoden	27
2.2.1	Zellkultur	27
2.2.2	Dissoziation der EBs in Einzelzellen	31
2.2.3	Western-Blot	31
2.2.4	Immunhistochemie	36
2.2.5	Kontraktionsfrequenz-Messungen und Untersuchung der α -Actinin Struktur der EBs	38
2.2.6	NO-Messung	39
2.2.7	ROS-Messung	40
2.2.8	Zytotoxizitätsmessung	40
2.2.9	Statistische Analyse	41
3	Resultate	42
3.1	Zytotoxizität von LPS	42
3.2	Einfluss von LPS auf die TLR 4 und IL 1 β Expression von EBs	43
3.3	Einfluss von LPS auf die Anzahl von CD 68 ⁺ und CD 69 ⁺ Zellen in EBs sowie die CD 68 und CD 69 Proteinexpression	45
3.4	Einfluss von LPS auf die Kontraktionsfrequenz kardialer Areale in EBs	47
3.5	Einfluss von LPS auf die NO-Generierung von EBs nach Behandlung mit LPS	50
3.6	Einfluss von LPS auf die ROS-Produktion von EBs	52
3.7	Einfluss von LPS auf das NLRP 3 Inflammasom in EBs	57
4	Diskussion	59

4.1 Einfluss von LPS auf die Schlagfrequenz und der EBs.....	61
4.2 NO-Produktion in LPS behandelten EBs.....	63
4.3 ROS-Produktion in LPS behandelten EBs.....	64
4.4 Inflammatorische Reaktion der EBs auf LPS.....	66
4.4.1 Aktivierung des TLR 4 Rezeptors.....	66
4.4.2 Aktivierung des NLRP 3-Inflammasoms.....	67
4.4.3 Freisetzung von IL 1 β innerhalb der EBs.....	69
4.5 Einfluss von LPS auf die Immunzellendifferenzierung der EBs.....	69
5 Zusammenfassung.....	71
6 Summary.....	72
7 Tabellenverzeichnis.....	73
8 Abbildungsverzeichnis.....	73
9 Abkürzungsverzeichnis.....	74
10 Literaturverzeichnis.....	78
11 Ehrenwörtliche Erklärung.....	88
12 Publikationsverzeichnis.....	89
13 Danksagung.....	90

1 Einleitung

1.1 Infektion und Inflammation

Der Begriff Infektion wurde in der Geschichte erstmalig von einem italienischen Arzt namens Girolamo Fracastano im Jahre 1546 versucht zu definieren. Seine Theorie zur Infektion setzte den Grundstein zur weiteren Forschung. 1917 wurde die wissenschaftliche Definition von Charles und Dorothea Singer niedergeschrieben (Singer and Singer 1917). Seither gilt eine Infektion eines Organismus als das Eindringen von Krankheitserregern. Diese können viraler, pilzlicher oder bakterieller Herkunft sein. Meist verbleiben sie im Wirtsorganismus, vermehren sich und induzieren somit eine Entzündungsreaktion (Inflammation) des Immunsystems (Gerabek, et al. 2005).

Die Inflammation oder auch klassisch als Entzündung bezeichnet, ist eine Anpassungsreaktion des angeborenen Immunsystems, die aufgrund von toxischen Reizen, wie beispielsweise einer bakteriellen Infektion mit Lipopolysaccharid (LPS) aus der Zellwand gramnegativer Bakterien entsteht (Majno and Joris 2004). Kommt es zu den eben erwähnten schädlichen Einflüssen, beginnen Makrophagen direkt mit der Phagozytose und dem Vernichten von Erregern. Erkannt werden diese durch sogenannte Mustererkennungsrezeptoren (PRRs), wie Toll-like-Rezeptoren (TLR) und NOD-like-Rezeptoren (nukleotidbindende Oligomerisierungsdomäne, NLR). Durch die Erkennung und Phagozytose infektiöser Partikel werden Signalkaskaden ausgelöst, die unter anderem mit der Aktivierung des kanonischen NF- κ B-Signalwegs (nukleären Faktor mit leichter κ -Kette von B-Lymphozyten) einhergehen (Ben-Neriah and Karin 2011). Dieser wiederum leitet die transkriptionelle Expression von Entzündungsmediatoren wie Zytokinen und Chemokinen ein. Deren Hauptaufgabe ist es, die Eliminierung von infizierten Zellen und Pathogenen zu koordinieren und andere Zellarten, wie z. B. Granulozyten, zu aktivieren und diese an die geforderten Stellen zu lotsen (Takeuchi and Akira 2010). Sezerniert werden die Mediatoren neben den inflammatorisch stimulierten Makrophagen auch von aktivierten Granulozyten. Sie dienen zur autokrinen und parakrinen Aktivierung und Stimulierung von Effektorzellen (Medzhitov 2008).

1.2 Das Lipopolysaccharid

1.2.1 Geschichte und Struktur

Das 18. Jahrhundert gilt als Startpunkt der Bakterienforschung. 1884 entwickelte Hans Christian Johann Gram die noch heute essenzielle Technik der Gramfärbung, die es ermöglichte, Bakterien in ihrem Aufbau zu unterscheiden (Gram 1884). Seit dieser Zeit nahm die Forschung in jegliche Richtungen an Fahrt auf. Man unterscheidet seit der Entdeckung Grams zwischen grampositiven und gramnegativen Bakterien (Gram 1884). Grampositive Bakterien haben nur eine einzelne äußere Membran, gramnegative hingegen besitzen sowohl eine innere als auch eine äußere Membran (Glauert and Thornley 1969). Es ist bekannt, dass sich LPS in der äußeren Membran gramnegativer Bakterien befindet und eine gemischte Doppelschicht mit Phospholipiden bildet (Rothfield and Horne 1967). Die Bezeichnung LPS ist Hartwell und M. J. Shear zu verdanken, denen es erstmalig gelang, Lipid und Polysaccharid zu isolieren und somit den Aufbau von LPS aufzuklären (Hartwell, et al. 1943). Zusätzlich fand man heraus, dass die Toxizität von LPS in der Lipid-A-Komponente liegt (Galanos, et al. 1969). Die Struktur des LPS kann im Detail je nach Bakterium variieren und ist ein erheblicher Faktor für die Virulenz eines Bakteriums. Es wurden eine Vielzahl von unterschiedlichen LPS-Strukturen gefunden und publiziert. Prinzipiell besteht es aus drei Einheiten, die kovalent verknüpft sind: Lipid-A, Kernpolysaccharid (Core) sowie O-Antigen-Wiederholungen (Wilkinson 1996).

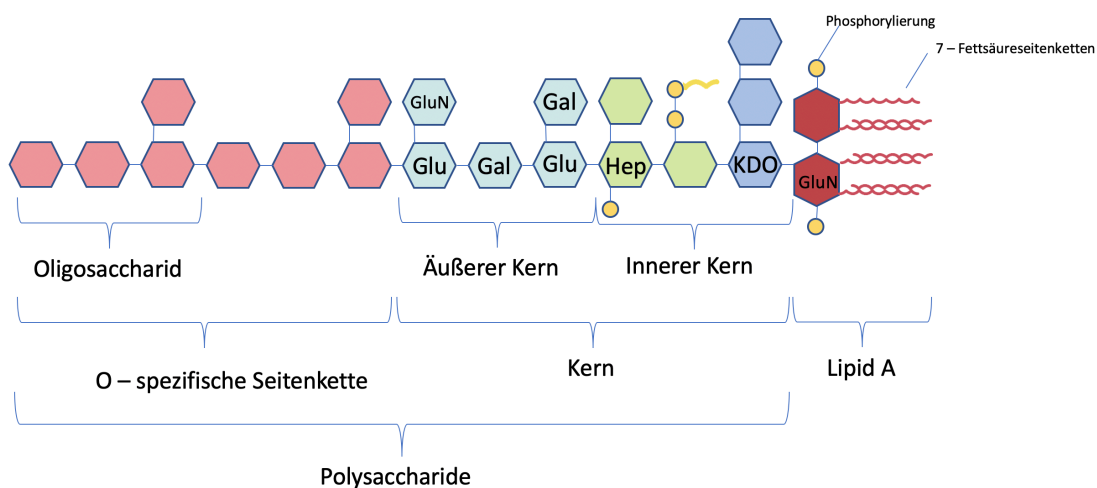


Abbildung 1: Schematischer Aufbau eines Lipopolysaccharids
(modifizierte Darstellung nach Kastowsky et al, 1992)

Das O-Antigen ist eine spezifische Kette, die aus mehrfachen Wiederholungen eines Oligosaccharids besteht. Ein Oligosaccharid kann aus maximal 8 Zuckerresten bestehen; der Aufbau des O-Antigens ist jeweils für einen Bakterienstamm charakterisierend. Weiterhin besteht eine hohe Anzahl an Kombinationsmöglichkeiten des O-Antigens, was mitunter ein Grund für die große Vielfalt an unterschiedlichen Bakterienarten ist. Zudem kann es zu Mutationen bei der Zellteilung kommen, die nicht nur für zusätzliche Varianz sorgen, sondern auch dafür, dass das O-Antigen nicht exprimiert wird. Dies wiederum hat zur Folge, dass sich die Bakterien morphologisch von glatt (smooth) zu rau ändern (Lowry, et al.). Demnach wird das LPS dann als S-LPS oder R-LPS bezeichnet (Helander, et al. 1988; Kastowsky, et al. 1992).

Das Kernpolysaccharid unterteilt sich in einen inneren und äußeren Kern. Es können ähnliche bis identische Kernregionen für Bakteriengruppen gefunden werden. Innen findet man eher die seltenen Zucker L-Glycero-D-manno-Heptose (Fallach, et al.) und den nahezu nur in LPS auftretenden Zucker 2-Keto-3-Desoxy-Octonsäure (Kdo). Kdo ist an Lipid-A gebunden und ist aufgrund seiner Seltenheit ein charakterisierendes Merkmal für LPS. Außen sind Zucker wie Glucose, Galactose, Glucosamin und Galactosamin enthalten (Helander, et al. 1988; Kastowsky, et al. 1992).

Das amphiphile Lipid-A ist ein Endotoxin und die Hauptursache für die toxische Wirkung von LPS. Die Struktur ist im LPS konserviert und besteht grundlegend aus einer Fettsäure, die an ein Glucosamin-Disaccharid gebunden ist (Helander, et al. 1988; Wiese, et al. 1999). Lipid A schützt vor Antibiotika- und Komplement- vermittelter Lyse und induziert in Makrophagen die Produktion von Entzündungsmediatoren wie Interleukin 1 β (IL 1 β) (Raetz, et al. 2007). Besonders die Lipid-A-Komponente in Bakterien sorgt mit ihrer Komplexität für ihre Überlebensfähigkeit (Zähringer, et al. 1994).

1.2.2 Wirkung von LPS

Man weiß schon seit längerer Zeit, dass biologische Substanzen über eine Wechselwirkung mit spezifischen Rezeptoren wirken, die in Verbindung mit Signalverstärkungssystemen stehen. Zuvor wurden bereits mikrobielle Komponenten gefunden, die der Wirkungsweise von LPS ähneln. Nach den ersten Erkenntnissen über LPS hat man dieses Wissen übertragen und die Existenz eines Endotoxin-Rezeptors vermutet und zeitnah auch bestätigen können (Watson and Riblet 1974; Watson and Riblet 1975). Man fand heraus, dass primär Makrophagen und Lymphozyten an der Antwort auf LPS beteiligt sind (Michalek, et al. 1980). Einer der ersten Schritte der

Signalkaskade ist, dass ein von der Leber produziertertes LPS-bindendes Protein (LBP) LPS bindet. LBP wird nach der Bindung mit LPS in der Expression hochreguliert und überträgt ein LPS-Monomer an „cluster of differentiation“ (CD) 14 (Schumann, et al. 1990; Tobias, et al. 1988; Wright, et al. 1989). CD 14 sorgt mit dem myeloiden Differenzierungsfaktor 2 (MD-2) für die LPS-spezifische Erkennung und Signalübertragung von TLR 4, einem Endotoxin-Rezeptor (Abb.2) (da Silva Correia, et al. 2001; Haziot, et al. 1998). MD-2 trägt zur intrazellulären Verteilung von TLR 4 und dessen Erkennungsspezifität bei (Nagai, et al. 2002).

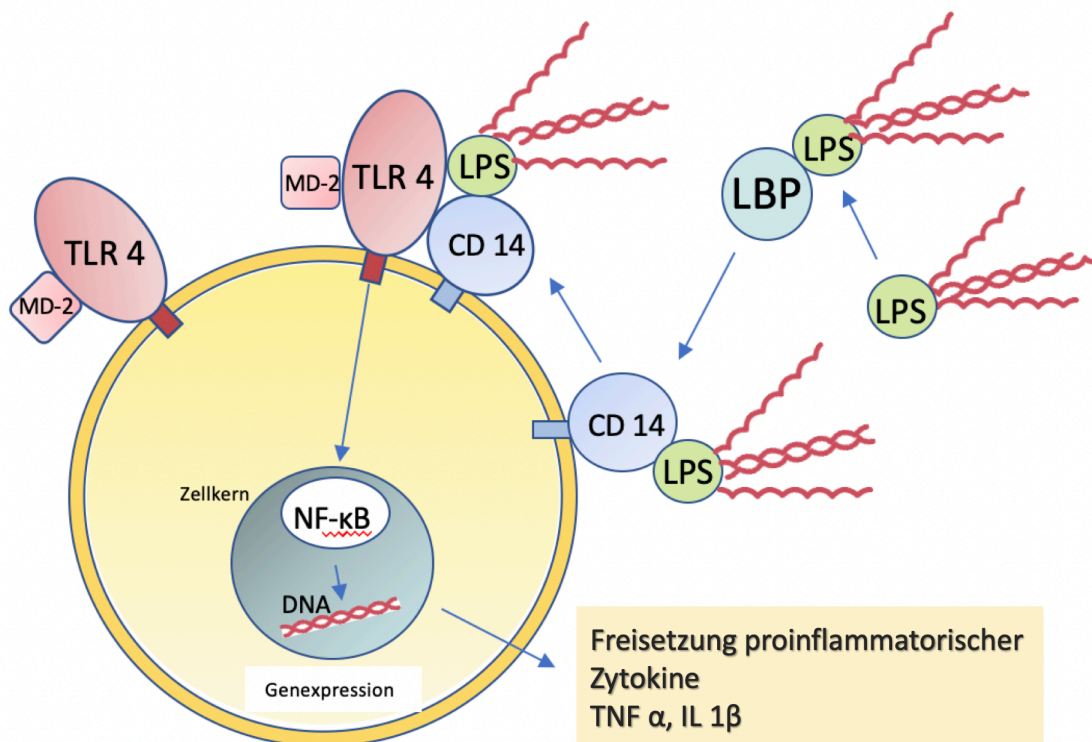


Abbildung 2: Schematische Darstellung des LPS – Signalweges
 modifizierte Abbildung nach (Beutler and Rietschel 2003)

1.2.2.1 LPS-induzierte reaktive Sauerstoffspezies und Stickstoffspezies

LPS verursacht neben der bereits erwähnten Signalkaskade eine Überproduktion von zytotoxischen freien Sauerstoffradikalen (ROS = reaktive Sauerstoffspezies) sowie von Stickstoffmonoxid (NO) (Iwai-Kanai, et al. 2002). Es ist bekannt, dass ROS und NO direkten Einfluss auf Kardiomyozyten haben (Massion, et al. 2003). Sie können sich dabei je nach Konzentration positiv oder negativ in Hinblick auf die Schlagfrequenz auswirken.

ROS besitzen mehrere freie Radikale, weshalb sie äußerst reaktiv und in der Lage sind, den Organismus zu schädigen. Sie entstehen hauptsächlich in den Mitochondrien innerhalb der Atmungskette (Komplex I und III) bei der Reduktion von Sauerstoff zu Wasser durch die NADPH-Oxidasen (Nikotinamidadenindinukleotidphosphat; NOX). Es gibt verschiedene Isoenzyme der NOX, die im Laufe der Jahre entdeckt und beschrieben worden sind. Startpunkt waren die späten 1980er Jahre, in denen das Gen für die katalytische Untereinheit der NOX 2 als gp91phox bezeichnet und später als NOX 2 definiert worden ist (Royer-Pokora, et al. 1986).

Es wurden weitere Homologe der NOX gefunden: NOX 1, NOX 3, NOX 4, NOX 5, duale Oxidase (DUOX) 1 und DUOX 2 (Vermot, et al. 2021). In dieser Arbeit wurde sich auf die Expression von NOX 1, NOX 2 und NOX 4 konzentriert.

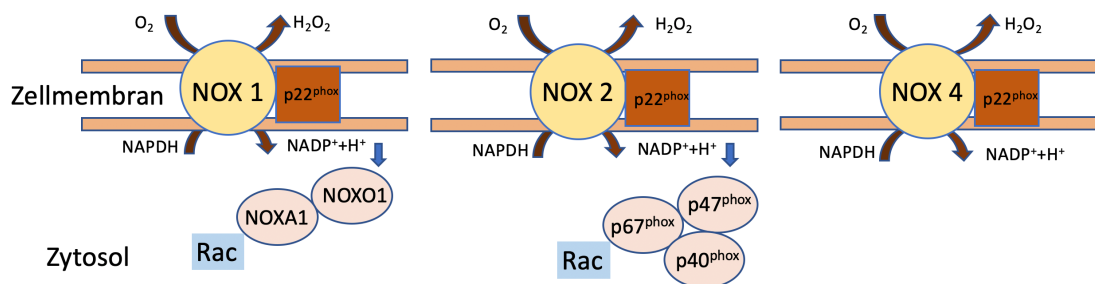


Abbildung 3: NOX Isoenzyme

Die modifizierte Abbildung nach Veith, Boots et al aus 2019 zeigt den schematischen Aufbau von NOX 1, NOX 2 und NOX 4. Diese sind im Grundaufbau gleich. P22^{phox} ist die einzige membrangebundene Untereinheit und sorgt für die Stabilität und Aktivierung der NOX (Brandes, et al. 2014). Unterschiede bestehen lediglich im Hinblick auf die zytosolischen Faktoren (Veith, et al. 2019).

LPS-aktivierte Makrophagen erzeugen ROS vor allem über die NOX 2. p47^{phox} wird zu p22^{phox} transloziert und sorgt für eine Rekrutierung der Komponenten p67^{phox}, p40^{phox} und Rac-GTPasen. NOX 2-abgeleitete ROS stimulieren Immunzellen zur Produktion von Zytokinen wie IL 1 β , die wiederum zur Aktivierung von Immunzellen führen.

Diese z. B. entzündlich aktivierten Makrophagen werden auch als M1 bezeichnet, wohingegen die Makrophagen, die über von T-Helferzellen sezernierte Zytokine aktiviert werden, als M2 bezeichnet werden (Kim, et al. 2017).

Zu den ROS zählen das Superoxid-Anion O₂^{·-}, das Hydroxyl-Radikal OH[•], das Peroxylradikal ROO[•] und stabile molekulare Oxidantien wie das Wasserstoffperoxid

H₂O₂ (Halliwell and Gutteridge 2015). NOX und die produzierten ROS haben einen wichtigen Einfluss auf mehrere physiologische Abläufe im Körper. Dazu zählt vor allem die Immunabwehr, die posttranslationale Modifikation von Proteinen sowie auch zelluläre Signalübertragungen (Vermot, Petit-Härtlein et al. 2021). Verstärkt gebildet werden sie von Makrophagen und neutrophilen Granulozyten. Diese sorgen mit dem sogenannten „oxidative burst“ für die Eliminierung von pathogenen Mikroorganismen (Babior 2000). Des Weiteren spielen LPS-induzierte ROS eine erhebliche Rolle bei der Regulation der IL 1 β -Genexpression. Diese findet unter anderem infolge der LPS-vermittelten Mitogen-aktivierten Proteinkinase (MAPK) Aktivität statt (Hsu and Wen 2002).

NO zählt zu den reaktiven Stickstoffspezies. Es ist ein kleines Molekül mit einer sehr geringen Halbwertszeit und muss daher stetig neu produziert werden. Es ist zudem ein wichtiges Signalmolekül bei der Neurotransmission, aber auch bei der Immunabwehr (Schmidt, et al. 1988). NO kann in niedrigen Konzentrationen eine schützende Rolle gegen den Entzündungsprozess einnehmen (Marion, et al. 2003). Produziert wird NO von homodimeren Stickstoffmonoxid-Synthasen (NOS) (Nathan and Xie 1994). Die Freisetzung von NO erfolgt hauptsächlich aus Gewebsmakrophagen und Endothelzellen (Hsu and Wen 2002). NOS werden in 3 Isoformen unterschieden: die endotheliale NO-Synthase (eNOS), die neuronale NOS (nNOS) und die in Makrophagen vorkommende induzierbare NOS (iNOS) (Alderton, et al. 2001). LPS stimuliert durch die Expression pro-inflammatorischer Zytokine, wie Tumornekrosefaktor (TNF) α oder IL 1 β , indirekt die Expression von NOS und die Produktion von NO (Kleinert, et al. 2003).

1.2.3 Toll-like-Rezeptor 4

1.2.3.1 Aufbau und Signalweg

TLRs sind ein wichtiger Teil der angeborenen und erworbenen Immunität und werden unter anderem von Immunzellen exprimiert. Auch in Zellen des kardiovaskulären Systems, z. B. in Kardiomyozyten, Endothelzellen und glatten Muskelzellen werden TLRs exprimiert (Mitchell, et al. 2007). Es wurden bisher 13 unterschiedliche TLRs identifiziert. Die Rezeptoren bestehen aus integralen Membranglykoproteinen, die sich in ihrem Aufbau der extrazellulären Domänen unterscheiden (Bowie and O'Neill 2000). Extrazellulär besitzen sie eine aminoterninale Region mit Leucin-reichen

Wiederholungen. Diese Region macht das Erkennen von pathogenassoziierten molekularen Mustern (PAMPs) möglich. Intrazellulär befindet sich eine carboxyterminale Toll/IL-R-Domäne (TIR-Domäne). Von dieser geht die weitere Initiierung intrazellulärer Signale aus (Kawai and Akira 2005). Generell aktivieren alle TLRs einen relativ ähnlichen Signalweg. Es kommt zum einen zur Induktion des NF- κ B-Weges und zur Aktivierung des NLRP 3-Inflammasoms (Nucleotid-binding domain leucine-rich repeat-containing receptor 3). Dieses wiederum führt zur übermäßigen Produktion von proinflammatorischen Zytokinen (Chaudhary, et al. 1998; Takeuchi, et al. 1999).

Jedoch ist hauptsächlich der TLR 4 in der Lage durch die Erkennung von Lipid-A, LPS zu binden und aktiviert zu werden (Poltorak, et al. 1998). Die Bindung von LPS an TLR 4 induziert dessen Dimerisierung und erzeugt somit die Liganden-abhängige Aktivierung des Rezeptors. Die Dimerisierung des Rezeptors durch LPS ist für den weiteren Signalweg essenziell (Lee, et al. 2001). Man kann ab hier zwei mögliche Wege, die eingeschlagen werden können, unterscheiden. Es gibt zum einen den myeloiden Differenzierungsfaktor 88 (MyD88) - abhängigen Weg und zum anderen den MyD88-unabhängigen Weg. Letztere Möglichkeit ist für diese Arbeit jedoch wenig relevant und wird daher nicht näher erläutert. Nachdem die Zellen von einem TLR-Liganden stimuliert worden sind, kommt es zur Rekrutierung von Adapterproteinen, die eine sogenannte TIR-Domäne enthalten. Das MyD88 enthält unter anderen solch eine Domäne und führt nach Bindung zu nachgeschalteten Signalkaskaden (Blander and Medzhitov 2004). Es kommt über MyD88 zur Aktivierung von NF- κ B. NF- κ B ist ein Transkriptionsfaktor, der an das Enhancer-Element der leichten Kette von Immunglobulin-Kappa von aktivierten B-Zellen bindet (Sen and Baltimore 1986). Diese Aktivierung führt zur Translokation in den Zellkern und dort zur Transkription von Zytokinen und Proteinen, wie Pro-IL 1 β und NLRP 3. Die Caspase 1 führt zur Umsetzung von Pro-IL 1 β in IL 1 β und dessen Freisetzung (Beutler and Rietschel 2003).

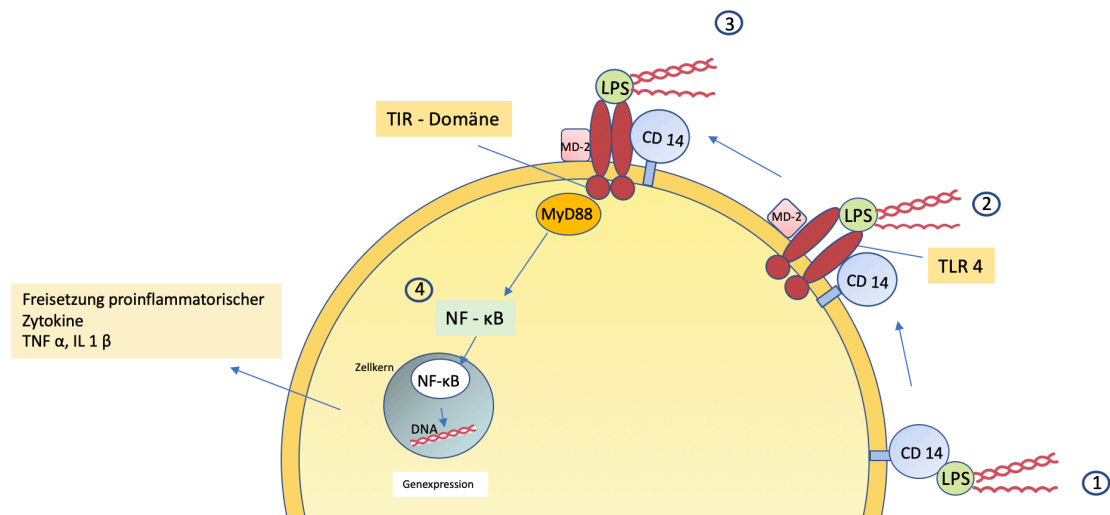


Abbildung 4: Schematische Darstellung der LPS - induzierten TLR 4 Dimerisierung
 Die Abbildung zeigt die Bindung von LPS beladenem CD 14 (1) an den noch nicht dimerisierten TLR 4 (2). MD-2 ist auf der Zelloberfläche mit TLR 4 assoziiert und ermöglicht die Reaktion auf LPS. Durch die Bindung des LPS an TLR 4 kommt es zur Dimerisierung (3). Die TIR-Domäne bindet MyD88 und es kommt durch weitere Signalkaskaden zur Translokation von NF-κB in den Zellkern (4). Dort kommt es zur besagten Genexpression und weiterhin der Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen (Zähringer, 1994).

1.2.3.2 Tak-242 ein TLR 4 Inhibitor

Tak-242 ist ein selektiver Inhibitor der TLR 4-Signalgebung. Ursprünglich diente das Molekül als Inhibitor für Mediatoren wie IL 6 und TNF α in LPS-stimulierten Makrophagen (Yamada, et al. 2005). Kawamoto et al. zeigten in ihrer Studie von 2008 die Wirkung des Inhibitors auf TLR Rezeptoren darunter auch TLR 4 (Kawamoto et al. 2008). Tak-242 inhibiert nicht die Bindung von LPS an TLR 4 und dessen Dimerisierung, sondern allein die ligandenunabhängige und ligandenabhängige intrazelluläre Signalgebung. Der Inhibitor zielt auf die intrazelluläre TIR-Domäne von TLR 4 ab und unterdrückt somit die intrazelluläre Funktion des TLR 4. MyD88 kann nicht an die TIR-Domäne andocken, es kommt nicht zur Aktivierung des NF-κB Transkriptionsfaktors und daher auch nicht zur Freisetzung der proinflammatorischen Zytokine über das NLRP 3-Inflammasom (Abb. 5). Auch hier hemmt Tak-242 nicht nur allein die ligandenabhängige Aktivierung des NF-κB Transkriptionsfaktors nach Bindung von LPS an TLR 4, sondern auch die ligandenunabhängige Aktivierung aufgrund von inflammatorisch- induzierter TLR 4 Überexpression. Zusätzlich wurde gezeigt, dass Tak-

242 in der Lage ist, die LPS- induzierte NO-Produktion fast vollständig zu eliminieren (Kawamoto, et al. 2008).

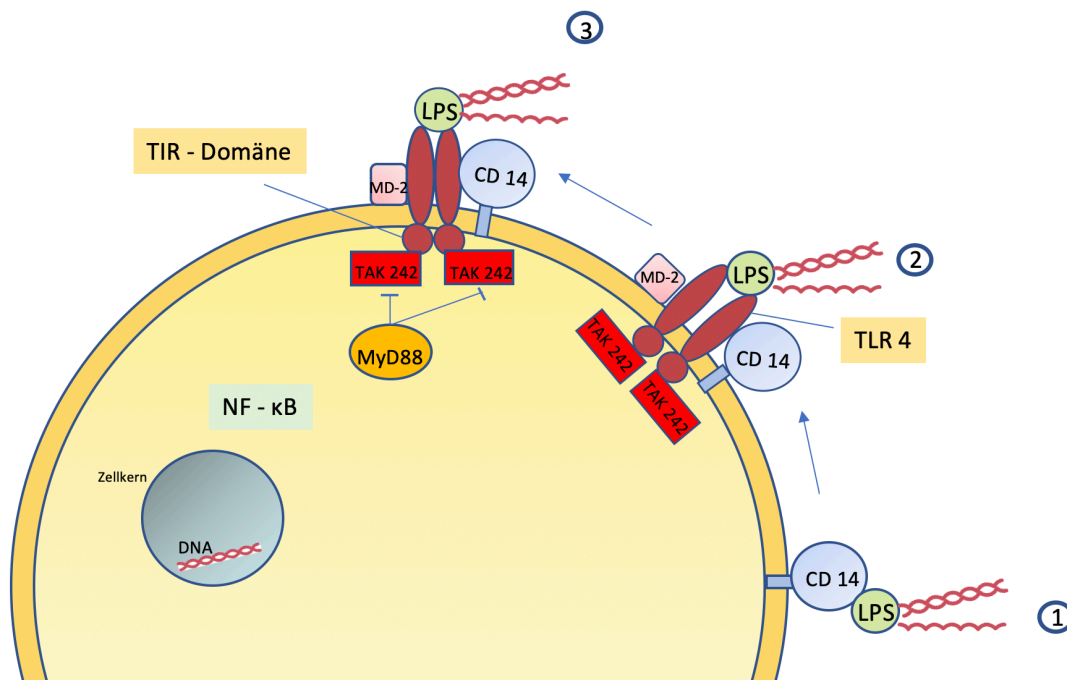


Abbildung 5: Tak-242 Wirkung am TLR 4

Tak-242 blockiert intrazellulär die TIR – Domäne des TLR 4. Das LPS wird wie gewohnt vom TLR 4 gebunden, es kommt jedoch zu keiner intrazellulären Weiterleitung der Signale. Verändert nach (Kawamoto, et al. 2008).

1.3 Das Inflammasom

Geprägt wurde der Begriff Inflammasom bereits im Jahr 2002 von Martinon und Mitarbeitern. Er beschrieb einen hochmolekularen Komplex, der im Zytosol inflammatorisch stimulierter Immunzellen, wie Makrophagen und neutrophilen Granulozyten, zu finden ist. Dieser ist verantwortlich für die Vermittlung Entzündungs-induzierter Caspasen. Es konnten Inflammasome unterschiedlicher Zusammensetzung abhängig von der Reaktion auf pathogenassoziierte molekulare Muster (PAMPs) durch Mustererkennungsrezeptoren (PRRs) nachgewiesen werden (Martinon, et al. 2002).

1.3.1 Das NLRP 3-Inflammasom

Eines der bereits bekannten Inflammasome ist das NLRP 3-Inflammasom. Es ist entscheidend bei der Immunabwehr gegen Bakterien, Pilze und Viren und von großer Bedeutung bei der Generierung von DAMPs (Damage-associated molecular patterns)

nach vorangegangenen PAMPs. DAMPs und PAMPs sind essentiell für die weitere Reaktion des Immunsystems (Thomas, et al. 2009).

1.3.2 Aufbau und Signalweg von NLRP 3

NLRP 3 ist ein dreiteiliges Protein, bestehend aus einer Pyrin-Domäne, einer NBS-Domäne (nucleotid-binding-site) und einer Leucin-reichen Wiederholungsdomäne (Franchi, et al. 2009).

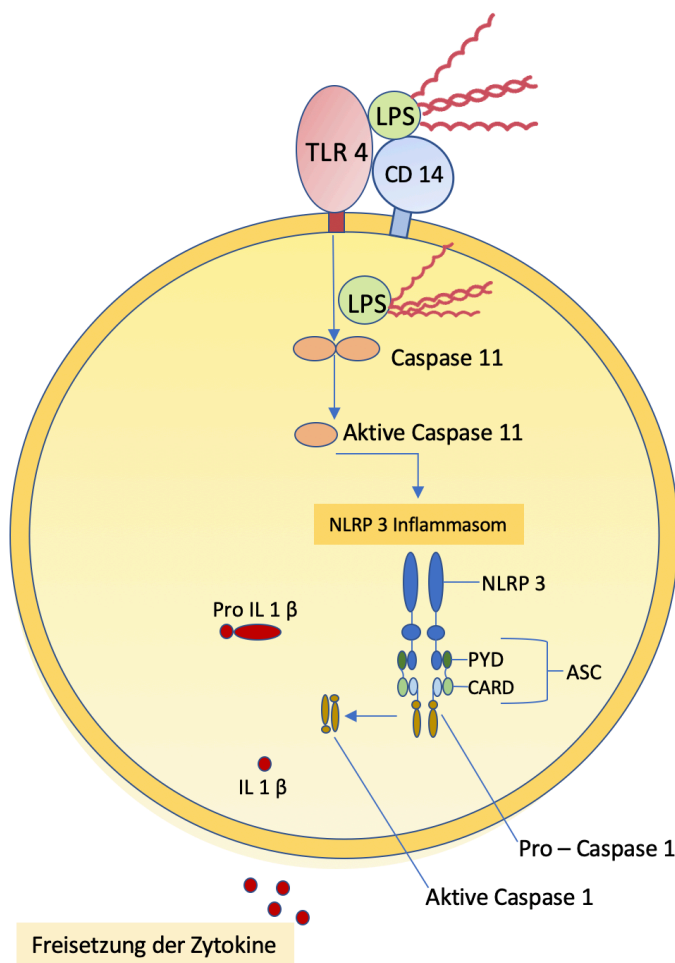


Abbildung 6: Schema zur Aktivierung des NLRP 3-Inflammasoms

LPS wird von Caspase 11 gebunden. Die aktivierte Caspase 11 induziert die Aktivierung von NLRP 3 und demnach den Zusammenbau des Inflammasoms. Letzteres aktiviert die Caspase 1 und somit die Umsetzung von Pro-IL 1β zu IL 1β. CARD = Caspase-Rekrutierungsdomäne; PYD = Pyrimidindomäne; ASC = Apoptose-assoziiertes fleckenähnliches Protein (Swanson, et al. 2019b).

Das NLRP 3-Inflammasom beinhaltet einen NLRP 3-Sensor, einen ASC-Adapter (Apoptose-assoziiertes fleckenähnliches Protein (Apoptosis-associated speck-like protein

containing a CARD)) und einem Effektor, bestehend aus der Pro-Caspase 1 (Swanson, et al. 2019a). Das ASC-Protein enthält eine C-terminale Caspase Rekrutierungsdomäne (CARD), welche vom PYCARD-Gen kodiert wird, sowie eine N-terminale Pyrindomäne (PYD). Beide Domänen gehören zu der Death-Fold Superfamilie, deren Mediatoren großen Anteil an inflammatorischen Prozessen haben. Das ASC Protein fungiert als Caspase 1-aktivierender Adapter, indem es über CARD-CARD interagiert und dessen Oligomerisierung induziert (Srinivasula, et al. 2002). Wird ein Entzündungsligand erkannt, kommt es zur Sensoraktivierung, Oligomerisierung sowie zur Rekrutierung des ASC-Proteins, welches zur Bildung der katalytisch aktiven Caspase 1 führt (Dinarello 1998). Letztere induziert die Bildung der pro-inflammatorischen Zytokine IL 1 β und IL 18, die wiederum die Bildung von akute-Phase-Proteinen anregen und neutrophile Granulozyten rekrutieren (von Moltke, et al. 2013).

Es gibt ein sogenanntes Zwei-Signal-Modell für die NLRP 3-Inflammasom-Aktivierung. Zuerst erfolgt das Priming des NLRP 3-Inflammasoms. Das erste Signal läuft über den bereits beschriebenen TLR 4-NF κ B-Weg ab. Dort kommt es zur Bereitstellung von Pro-IL 1 β und posttranslationaler Modifikation NLRP 3 (Agostini, et al. 2004). Letzteres ist das zweite Signal und sorgt letztendlich für die Aktivierung des NLRP 3. Das NLRP 3-Inflammasom wird über den TLR 4-Weg, wie es in Abbildung 5 gezeigt ist, aktiviert (Bauernfeind, et al. 2009). Pro-Caspase 1 geht nach Induktion des NLRP 3-Inflammasoms in die aktive Form über und spaltet Pro-IL 1 β in IL 1 β . Dessen Freisetzung erfolgt größtenteils durch Makrophagen (Dinarello 1998).

1.4 Embryonale Stammzellen der Maus als Modellsystem

Stammzellen allgemein besitzen die Eigenschaft sich stetig selbst zu erneuern, wohingegen sich von Stammzellen stammende Tochterzellen in einen irreversiblen Differenzierungsweg begeben (Beddington and Robertson 1989; Evans and Kaufman 1981; Toma, et al. 2001). Eine Stammzelle behält somit die Fähigkeit andere Zellen entstehen zu lassen, bleibt aber selber unverändert. Man unterscheidet zwischen toti-, pluri-, multi- und unipotenten Stammzellen. Totipotente Stammzellen sind in der Lage einen ganzen unabhängigen Organismus zu bilden (Yeom, et al. 1996), wobei pluripotente Stammzellen die Fähigkeit zur Eigenregeneration sowie zur Differenzierung in alle Zelltypen innerhalb eines Organismus besitzen (Beddington and Robertson 1989). Multipotente Stammzellen sind auf die Differenzierung zu definierten Geweben

beschränkt. Die Unipotenz steht für Differenzierungsfähigkeit zu nur einem definierten Zelltyp (Toma, et al. 2001).

Die embryonalen Stammzellen (ES) wurden erstmalig vor ca. 40 Jahren in vitro gezüchtet und stammen aus der inneren Zellmasse von Blastozysten der Maus (Evans and Kaufman 1981; Martin 1981a). Die Pluripotenz der ES kann in vitro erhalten bleiben, wenn dem Medium Leukämie-hemmender Faktor (LIF) hinzugegeben wird (Stewart, et al. 1992). Diese Eigenschaft kann man sich in der Zellkultur zunutze machen, um die Stammzellen über eine Vielzahl von Zellteilungs-Zyklen zu erhalten. LIF gehört zur IL 6-Zytokin-Familie und fördert die Selbsterneuerung der ES durch Aktivierung von Signalkaskaden, unter anderem durch die Januskinase-induzierte Signaltransduktion und Aktivierung der Transkription (JAK-STAT), die zur Förderung der Transkription von Stammzellgenen führt (Gearing, et al. 1992). Wird LIF nicht mehr beigefügt und die murinen ES in eine Spinnerflasche umgesetzt, differenzieren diese und bilden Embryoid Bodys (EBs), in denen sich Zellen aller drei Keimblätter entwickeln (Wobus and Boheler 2005).

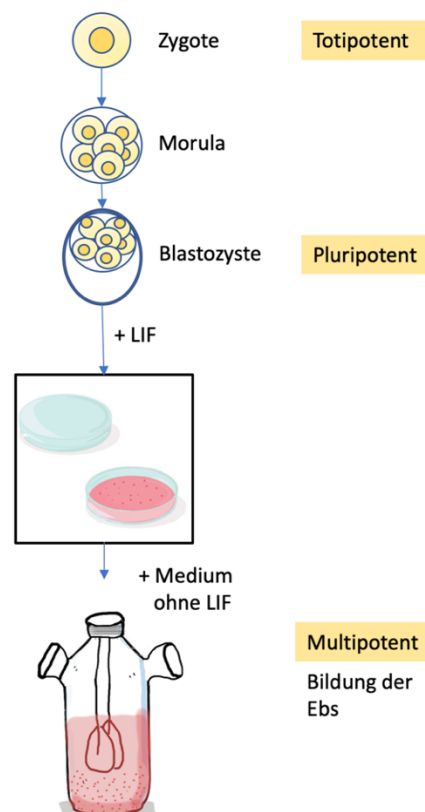


Abbildung 7: Gewinnung und Kultur von ES

Es werden pluripotente Stammzellen aus der Blastozyste entnommen und mittels LIF in der Differenzierung gehemmt. Die Stammzellen kommen ohne LIF in eine Spinnerflasche, in der sie zunehmend differenzieren und EBs bilden.

1.4.1 Kardiomyogenese von ES

Differenzieren pluripotente Stammzellen zu spezialisierten Zelltypen des Herzens, nennt man das Kardiomyogenese. Bevor es zur Kardiomyogenese kommen kann, findet der essentielle Schritt der Aggregation zu EBs statt. Zu den herzspezifischen Zellen zählen jene, die dem Vorhof, dem Ventrikel oder Zellen des Reizleitungssystems (z. B. Schrittmacherzellen des Sinusknotens) ähneln. Diese befinden sich innerhalb der EBs zwischen einer mesenchymalen Epithel- und Basalzellschicht. Die Kardiomyozyten innerhalb der EBs beginnen circa an Tag 7 zu kontrahieren. Die Kontraktionen können vereinzelt spontan oder als Synzytium in Herden auftreten. Im frühen Differenzierungsstadium sind die Kardiomyozyten innerhalb der EBs klein und rund. Die Myofibrillen erscheinen eher unorganisiert oder sind sogar fehlend. Später sind gut entwickelte Myofibrillen und Sarkomere erkennbar. Es werden herzspezifische Proteine, Gene und Rezeptoren innerhalb der EBs exprimiert (Sauer, et al. 2001).

1.4.2 Hämatopoetische Stammzellen

Die Fähigkeit der lebenslangen Produktion von Blutzellen basiert auf den reproduzierbaren hämatopoetischen Stammzellen (HSCs) (Weissman 2000).

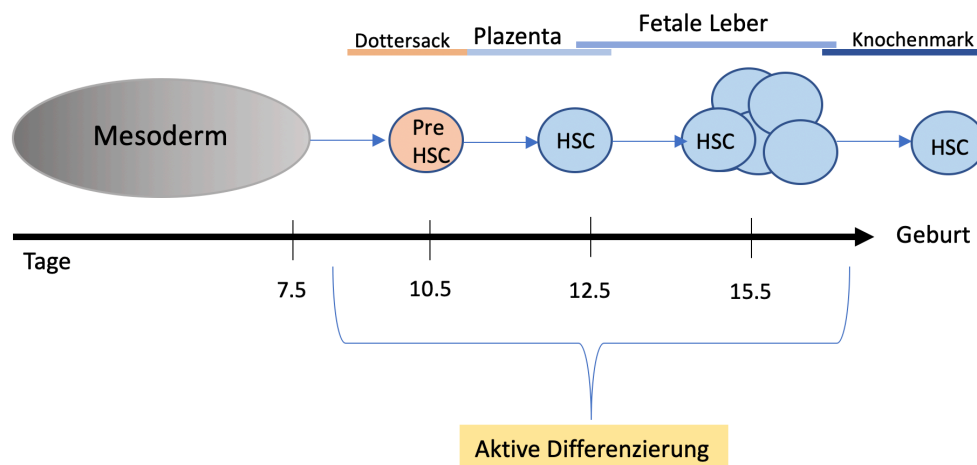


Abbildung 8: Bildungsweg hämatopoetischer Stammzellen der Maus

Die Abbildung zeigt, dass die mesodermalen HSCs innerhalb von ca. 7-10 Tagen eine Vorstufe (Pre HSC) im Dottersack durchlaufen, bevor sie zwischen Tag 12 und 15 in der Plazenta und fetalen Leber zu reifen HSCs differenzieren. Während der aktiven Differenzierung wirken einige Signale auf die HSCs, die deren Differenzierung vollenden. Erst wenige Tage vor der Geburt beginnt die Expansion und die letztendliche Lokalisation im Knochenmark vor allem in Röhren- und platten Knochen. Die Abbildung wurde modifiziert nach (Mikkola and Orkin 2006).

Ursprünglich entstammt der HSC-Pool aus der lateralen Platte in der nephrogenen Region des Mesoderms (Turpen, et al. 1981). Um die Fähigkeit der Reproduktion zu erhalten, müssen viele Prozesse durchlaufen werden, in denen die HSCs Signalen unterliegen, die sie zu funktionellen HSCs reifen lassen (Mikkola and Orkin 2006). Während der Embryogenese sind an der HSC-Reifung verschiedene anatomischen Strukturen, wie Dottersack, Plazenta und die fetale Leber beteiligt. Später, bei der Geburt, begrenzt sich das Auftreten der HSC auf das Knochenmark (Mikkola and Orkin 2006). Dort gibt es spezialisierte Nischen, in denen die Multipotenz der HSC durch Zellteilungen bewahrt wird, während die Nachkommen einen irreversiblen Differenzierungsweg zu terminal differenzierten Blutzellen einschlagen (Wilson and Trumpp 2006).

1.4.2.1 Zellen der Immunabwehr

Das Immunsystem ist täglich großen Herausforderungen gegenübergestellt, um den Organismus vor äußeren Noxen zu schützen. Es muss aus einer großen Auswahl an Antigenrezeptor-definierten Lymphozyten eine Population reifer Lymphozyten aufbauen, die nicht autoimmun, sondern in der Lage sind, auf fremdes Antigen zu reagieren. Antigenrezeptoren auf den Lymphozyten sind Zelloberflächenproteine, die eine Art Wegweiser darstellen, um z. B. Zellen und Entzündungsmediatoren an die richtigen Ziele zu lotsen und eine funktionelle Immunreaktion auszulösen. Diese müssen getestet und selektiert werden, da die Lymphozyten keinesfalls körpereigene Zellen attackieren dürfen. Das Immunsystem regelt ein Leben lang das Zusammenspiel zwischen B- und T-Zellen sowie spezialisierten Zellen, um eine primäre zelluläre und humorale Immunantwort zu implizieren (Butcher and Picker 1996). Die Zellen der Immunabwehr entstammen aus den HSC des Knochenmarks (Craddock, et al. 1956; Ehrlich 1879). Zu diesen gehören Erythrozyten, Thrombozyten und Leukozyten. Letztere beinhalten Lymphozyten, Makrophagen und Monozyten sowie neutrophile, basophile und eosinophile Granulozyten (Dzierzak and Speck 2008). Das Immunsystem ist in der Lage, die Homöostase von reifen Lymphozyten sowie deren Differenzierung zu kontrollieren und diese an die benötigten Stellen zu transportieren (Butcher and Picker 1996). Die Abbildung 9 zeigt den Werdegang der einzelnen Blutzellen. Zu Beginn steht die HSC. Von ihr aus bilden sich eine myeloide und eine lymphoide Vorläuferzelle. Erstere bringt den Megakaryozyt hervor, von dem die Blutplättchen und die roten Blutkörperchen stammen und einen Makrophagen-

Granulozyt. Aus diesem bilden sich Effektorzellen, wie Makrophagen und neutrophile, basophile und eosinophile Granulozyten. Von der lymphoiden Progenitorzelle bilden sich natürliche Killer-Zellen (NK-Zellen), dendritische Zellen, sowie B- und T-Zellen (Ikuta, et al. 1992).

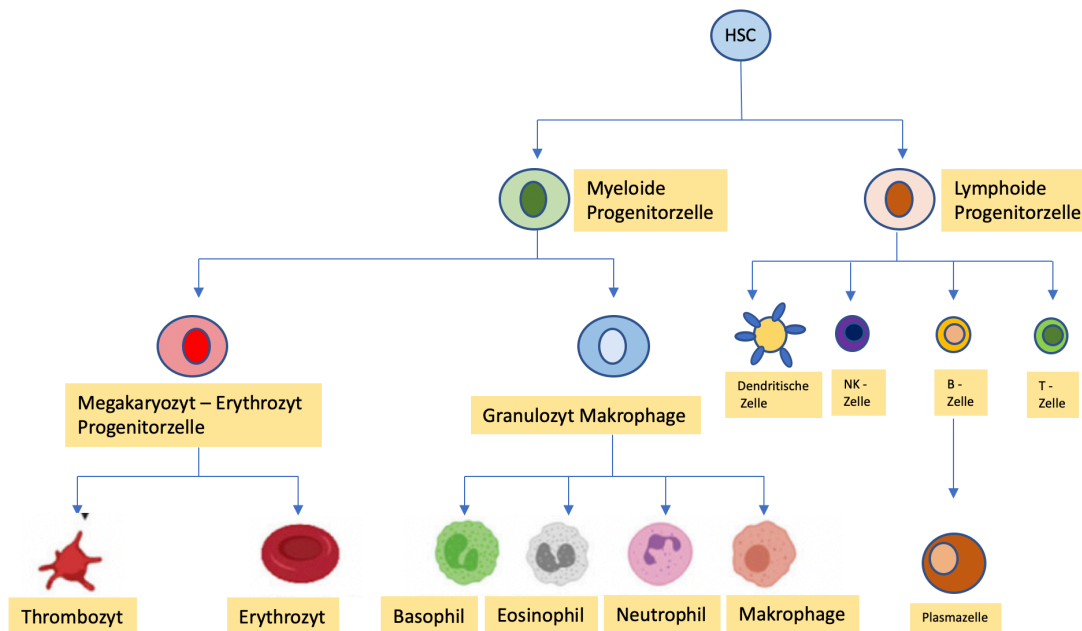


Abbildung 9: Mögliche Differenzierungswege von hämatopoetischen Stammzellen (Ikuta, et al. 1992)

Die Vorläufer der B-Lymphozyten verbleiben zunächst im Knochenmark und interagieren dort mit Stromazellen. Die unreifen T-Lymphozyten wandern in primäre lymphatische Organe wie den Thymus. Dort vermehren sie sich und differenzieren nach einer Reihe von Wechselwirkungen zu reifen T-Zellen (Ikuta, et al. 1992). Bevor sie jedoch den Thymus verlassen, werden sie einer Kontrolle unterzogen. Nur diejenigen, die mit dem eigenen „Major-Histokompatibilitätskomplex“ (MHC) auf fremde Antigene reagieren, dürfen in die Peripherie migrieren (Ikuta, et al. 1992). Das ist von großer Wichtigkeit, da autoimmune Zellen direkt eliminiert werden und somit der Schutz gegenüber Fremdantigenen gewährleistet werden kann.

Es gibt unterschiedliche Arten und Aufgaben von T-Zellen. T-Helferzellen (T_H -Zellen) reagieren auf dendritische Zellen und Makrophagen, die nach der Phagozytose Antigene präsentieren und daraufhin B-Zellen aktivieren. Zytotoxische T-Zellen (T_C -Zellen) töten alle Zellen auf denen Fremd-Antigene exponiert sind. Die reifen T_C - und T_H -Zellen

wandern daraufhin in T-Zell-Bereiche von sekundären lymphatischen Organen, wie Milz oder Lymphknoten (Sallusto, et al. 1999). Dort stoßen sie auf Antigene, die unter anderem von dendritischen Zellen und Makrophagen präsentiert werden. Daraufhin erfolgt ihre Aktivierung. Sie sind dann fähig sich zu vermehren, die Bildung von Effektorzellen zu induzieren und in infizierte Bereiche zu wandern (Banchereau and Steinman 1998).

Es wandern jedoch nicht alle aktivierten T-Zellen ab. Ein Teil bleibt als Gedächtniszellen in sekundär lymphatischen Organen zurück, um bei sekundärer Infektion schneller und qualitativer zu reagieren (Ahmed and Gray 1996; MacLennan, et al. 1997). Die Migration durch das Endothel in infiziertes Gewebe wird auch Diapedese genannt. Sie wird durch die proteolytische Zerstörung der Basalmembran durch inflammatorisch hochregulierte Enzyme kontrolliert (Luster 1998). Effektorzellen, wie neutrophile Granulozyten und Monozyten, sind die ersten Zellen, die in infiziertes Gewebe einwandern und dort durch TNF α zu Makrophagen differenzieren (Nathan, et al. 1989). Weiterhin sorgt TNF α durch Extravasation für die Rekrutierung weiterer antigenpräsentierenden Zellen und regt die Produktion von Proteinen an, die zur lokalen Blutgerinnung führen und die Infektion eindämmen (Bevilacqua, et al. 1986; Petrache, et al. 2003).

1.5 Zielsetzung

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss LPS-induzierter inflammatorischer Prozesse auf die Differenzierung von ES Zellen der Maus untersucht. Es wurde analysiert, ob sich das EB Modell embryonaler Stammzellen dafür eignet, Tierversuche zur Infektions- und Inflammationsforschung zu ersetzen. Folgende Fragestellungen sollten dabei berücksichtigt werden:

- 1) Welchen Einfluss hat LPS auf die kontraktile Aktivität von EBs?
- 2) Verändert sich die Struktur der Kardiomyozyten nach Inkubation mit LPS?
- 3) Kommt es durch LPS zur Apoptose von EBs?
- 4) Werden ROS generiert? Analyse der ROS Quellen mit NADPH-Oxidase Inhibitor Vas 2870, sowie Proteine NOX 1, NOX 2, NOX 4.
- 5) Wird NO produziert? Analyse der dazugehörigen NO-Synthasen.
- 6) Kommt es zur Aktivierung des Inflammasoms nach LPS?
- 7) Kommt es zu Expressionsveränderungen von TLR 4 nach LPS?
- 8) Wie verändert sich die Immunzellexpression?
- 9) Wie verändert sich die NO- und ROS Produktion nach Koinkubation mit LPS + Tak-242?
- 10) Kommt es zu einer vermehrten Expression von IL 1 β ?

2. Materialien und Methoden

2.1 Materialien

2.1.0 Geräte

Gerät	Firma
-20°C Gefrierschrank	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, Deutschland
Autoklav	Holzner GmbH, Nussloch, Deutschland
Bunsenbrenner (Fireboy)	Integra Biosciences, Fernwald, Deutschland
Chemielumineszenz Bildgebungssystem	PeQLab Biotechnologie GmbH, Chemi – Capt-5001, Erlangen, Deutschland
Eismaschine (Icematic F200)	Castel MAC, Castelfranco Veneto, Italien
Elektrophorese - Kammer (Xcell Surelock)	Invitrogen by Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, Deutschland
Gelelektrophorese Power Station	Invitrogen by Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, Deutschland
Heizplatte mit Magnetrührer (Hot Plate Stirrer)	IKA RH-KT/C, Staufen, Deutschland

Heizplatte für das Lichtmikroskop Trz 3700	Labexchange, Burladingen, Deutschland
Konfokales Lasermikroskop Sp2	Leica, Wetzlar, Deutschland
Lichtmikroskop	Zeiss, Jena, Deutschland
Magnetrührer für Spinnerflaschen	Integra Biosciences, Fernwald, Deutschland
Mikrotiterplattenleser Elisa, Infinite M200	Tecan Austria GmbH Model, Männedorf, Schweiz
PIPETMAN	Gilson, Limburg-Offheim, Deutschland
Schüttler	Heidolph Elektro GmbH, Schwabach, Deutschland
Sicherheitswerkbank Klasse 2 Sicherheit	Heraeus, Hanau, Deutschland
Tube Roller Mixer	Stuart, London, England
Vakuum Pumpe	HLC BioTech, Bovenden, Deutschland
Vortex	VWR, Darmstadt, Deutschland
Waagen (Te153s, Ab265s)	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland Mettler Toledo, Columbus, USA

Wasserbad	Lauda, Lauda – Königshofen, Deutschland
Zellkultur Inkubator (Heracell)	Heraeus, Hanau, Deutschland
Zentrifuge (Eppendorf 5417c)	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Zentrifuge (Multifuge 1s-R)	Heraeus, Hanau, Deutschland

Tabelle 1: Geräte

2.1.1 Instrumente

Instrument	Firma
24 Well Platte	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
96 Well Platte	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Cover Slips	Deckgläser, Menzel-Gläser, Darmstadt, Deutschland
Eppendorf Tubes	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Erlenmeyerkolben	Fischer Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland
Falcon Röhrchen 50ml, 15ml	Greiner Bio – One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Filterpapier für Western-Blot	Universal, Biotech Fischer, Reiskirchen, Deutschland
Glas-Scheiben	R. Langenbrinck GmbH, Emmendingen
Glaspipetten (Serological)	ISO Lab, Wertheim, Deutschland

Handschuhe	Paul Hartmann AG, Heidenheim, Deutschland
Öl für LSM	Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland
Pager Ex Mini – Gels	Lonza, Rockland, USA
Parafilm	Bemis Flexible Packaging, Neenah, USA
Pasteurpipetten Aus Glas	Brand GmbH, Wertheim, Deutschland
Pipetten Filter-Tips	Biozym Scientific, Hessisch Oldendorf
Plastik-Pipetten (Serological)	Greiner Bio – One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Pvdf Millipore Transfermembran	Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland
Schwämme für Western-Blot	Invitrogen by Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, Deutschland
Spinnerflasche (250ml)	Integra Biosciences, Fernwald, Deutschland
Zellkultur Platten (60mm, 150mm)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland

Tabelle 2: Instrumente

2.1.2 Lösungen und Chemikalien

Lösung	Firma
Cumarinsäure	Sigma – Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
DAF-FM Diacetat	Invitrogen by Life Technologies, Darmstadt, Deutschland
Dimethyl sulfoxide (DMSO)	Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland

DMEM	Bio&Sell GmbH, Nürnberg, Deutschland
Dulbecco's PBS ohne Ca²⁺ und Mg²⁺	PAA, Cölbe, Deutschland
Ethanol	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Lipopolysaccharid von Escherichia coli o111:b4	Sigma – Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Luminol	Sigma – Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Methanol	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Novex sharp vorgefärbte Proteinstandards	Life – Technologies, Darmstadt, Deutschland
NuPage Antioxidans	Invitrogen, Thermo Fisher Scientific Darmstadt, Deutschland
NuPage IDS Puffer (4x)	Invitrogen, Thermo Fisher Scientific Darmstadt, Deutschland
NuPage Reducing Agent (10x)	Invitrogen, Thermo Fisher Scientific Darmstadt, Deutschland
Phosphatase Inhibitor	Sigma – Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Protease Inhibitor	BioVision, Milpitas, USA
Restore plus western blot stripping Puffer	Thermo Fisher Scientific Darmstadt, Deutschland
Steriles destilliertes Wasser	Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Tween-20	Sigma – Aldrich, Taufkirchen, Deutschland

Table 3: Chemikalien

2.1.3 Zellkulturmedium und Komponenten

Medium	Firma
β-Mercaptoethanol	Sigma – Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Bio & Sell GmbH, Feucht, Deutschland
Fötales Kälber-Serum	Sigma – Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM)	Bio & Sell GmbH, Feucht, Deutschland
L-Glutamin 200mm (100x)	Bio & Sell GmbH, Feucht, Deutschland
LIF Medium	Chemicon, Hampshire, UK
Mitomycin-C	Merck, Millipore, Darmstadt, Deutschland
NEA Nicht-essentielle Aminosäuren	Bio & Sell GmbH, Feucht, Deutschland
Milchpulver (Fett-frei)	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Penicillin / Streptomycin (100x)	Bio & Sell GmbH, Feucht, Deutschland
Plasmocin Prophylactic	InvivoGen, California, USA
Trypsin EDTA 1x	Life Technologies, Darmstadt, Deutschland

Tabelle 4: Zellkulturmedien und Komponenten

2.1.4 Inhibitoren

Name	Firma	Konzentration
Tak -242	Cayman Chemical Company, Ann Arbor, Michigan, USA	10 mM in DMSO 0,5 µl / 5 ml
Vas 2870	Vasopharm, Würzburg, Deutschland	20 mM in DMSO 5 µl / 5 ml

Table 5: Verwendete Inhibitoren

2.1.5 Medien und Pufferlösungen

2.1.5.1 CCE-Medium

- IMDM hohes Glukose Medium 1 X
- Hitze-inaktiviertes fötales Kälber-Serum 16 %
- β – Mercaptoethanol 0.1 mM
- Natriumpyruvat (100 mM) 1.0 mM
- L - Glutamin (200 mM) 2.0 mM
- Nicht-essentielle-Aminosäuren (100 mM) 0.1 mM
- Penicillin / Streptomycin (10000 U/ml) 50 U/ml

2.1.5.2 EMFI-Medium

- DMEM 4,5 g/L Glukose 1 X
- Hitze-inaktiviertes fötales Kälber-Serum 10 %
- β – Mercaptoethanol 0.1 mM
- Natriumpyruvat (100 mM) 1.0 mM
- L - Glutamin (200 mM) 2.0 mM
- Nicht-essentielle-Aminosäuren (100 mM) 0.1 mM
- Penicillin / Streptomycin (10000 U/ml) 50 U/ml

2.1.5.3 LIF-Medium

- IMDM 4,5 g/L Glukose 1 X
- Hitze-inaktiviertes fötales Kälber-Serum 16 %
- β – Mercaptoethanol 0.1 mM
- Natriumpyruvat (100 mM) 1.0 mM

- L - Glutamin (200 mM) 2.0 mM
- Nicht – essentielle – Aminosäuren (100 mM) 0.1 mM
- ESGRO LIF 1000 U/ml

2.1.5.4 LIF-pLpro Medium

- LIF Medium 50 ml
- Plasmocin Prophylaxe 2,5 µg/ml

2.1.5.5 Einfrier-Medium CCE ES

- 50 % Komplett-Medium für CCE
- 40 % HiFCS
- 10 % DMSO

2.1.5.6 1x PBS

- KCl 2.7 mM
- KH₂PO₄ 1.8 mM
- NaCl 137 mM
- Na₂HPO₄ x 2H₂O 10 mM

An pH 7,4 anpassen

2.1.5.7 1% PBS-T

- 1x PBS 100 ml
- Triton X-100 1 ml

2.1.5.8 0.01% PBS

- 1x PBS-T 100 ml
- Triton X-100 10 µl

2.1.5.9 0.01% PBST Tween-20

- 1x PBS 100 ml
- Tween 20 10 µl

2.1.5.10 *B-Mercaptoethanol (10mM)*

- 1x PBS 100 ml
- B-Mercaptoethanol (14 mM) 35 µl

2.1.5.11 *ECL-Lösung (Enhanced Chemi-Luminescence)*

- Tris HCL, pH 8.5 5 ml
- H₂O₂ 1,5 µl
- Luminol 12,5 µl
- Cumarinsäure 25 µl

2.1.5.12 *Lowry-Lösungen*

- Lowry 1 Na-K-Tartrate 117 mM
- Lowry 2 Cu₂CO₄ 50 mM
- Lowry 3 Na₂CO₃ 2.4 M
- Lowry 4 NaOH 1 M
- Lowry 5 Folin-Ciocalteu's Phenolreagent (Merck 90001) ~0.5 N

2.1.5.13 *Lösung zum Blocken*

- **5 % Milch:**
2.5 g Milchpulver (Fett-frei) in 50 ml 0.01 % PBST
- **5% BSA:**
2.5 g BSA-Pulver in 50 ml 0.01 % PBST

2.1.5.14 *Paraformaldehyd (PFA) Fixierungslösung*

- 1x PBS 1 L
- PFA 40 g

An pH 6,9 anpassen mit 1N NaOH

2.1.5.15 *Protein – Extraktion Lyse – Lösung*

- RIPA-Puffer 1 x
- Protease Inhibitor 1 x

2.1.5.16 Protein-Extraktion Lyse-Lösung für Phosphoproteine

- RIPA-Puffer	1 x
- Protease Inhibitor	1 x
- Phosphatase Inhibitor	1 x
- Glycerophosphatase	1 mM
- EDTA, pH 8	1 mM

2.1.5.17 Ripa-Puffer

- Tris, pH 7,4	50 mM
- NaCl	150 mM
- Nonidet P – 40	1 %
- Sodium dodecyl Sulfat (SDS)	0.1 %
- Desoxycholat (ausgenommen bei Phospho-Protein Assays)	0.5 %

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

Im Zuge dieser experimentellen Doktorarbeit wurde ausschließlich die permanente Stammzelllinie CCE-S103 verwendet (Robertson, et al. 1986).

2.2.1.1 Auftauen von embryonalen Fibroblasten der Maus (MEFs)

MEFs sind für proliferierende embryonale Stammzellen (ES) essentiell, da diese durch das Sezernieren von Leukämie-hemmendem Faktor (LIF) die Differenzierung der ES hemmen (Martin 1981b).

Als ersten Schritt wurde das embryonale Fibroblastenmedium (EMFI) in einem Wasserbad auf 37 °C erwärmt und jeweils 5 ml Medium auf 60 mm Zellkulturschalen verteilt und im CO₂ Inkubator inkubiert. Die MEFs lagern tiefgefroren in flüssigem Stickstoff bei -196 °C. Diese wurden ebenfalls im Wasserbad bei 37 °C erwärmt. Nach dem Auftauen wurden die MEFs jeweils in 20 ml warmes EMFI-Medium überführt und für 5 min bei 209 g bei Raumtemperatur (RT) zentrifugiert. Der entstandene Überstand wurde abgesaugt und die Zellpellets mit EMFI-Medium resuspendiert und auf die bereits vorbereiteten 60 mm Zellkulturschalen in einer Dichte von 9×10^4 /ml ausgesät. Diese wurden dann im Inkubator bei 37 °C, einer Luftfeuchte von 95 % und 5 % CO₂ inkubiert. Die Inkubation erfolgte über mehrere Tage bis eine Konfluenz von ca. 80 % erreicht war.

Die nun notwendige mitotische Inaktivierung erfolgte durch eine dreistündige Inkubation in einem Medium, welches 10 µg/ml Mitomycin C enthielt. Letzteres ist ein antibiotisch wirkendes Zytostatikum und ist in der Lage, an DANN-Stränge zu binden, und somit die mitotische Teilung zu inhibieren (Verweij and Pinedo 1990). Im nächsten Schritt wurde 3-mal mit EMFI-Medium gewaschen und letztendlich mit 5 ml frischem EMFI-Medium inkubiert. Die inaktivierten MEFs konnten nun als Wachstumsgrundlage für die ES verwendet werden. Der weitere Mediumwechsel bis zur Aussaat von ES erfolgte alle 2 Tage mit EMFI Medium. Die ES sollten hierbei jedoch spätestens eine Woche nach Inaktivierung auf die MEFs gegeben werden, da diese sonst zu alt sind, um die ES gut mit LIF zu versorgen.

2.2.1.2 Auftauen und Einfrieren von embryonalen Stammzellen

Die ES lagern wie die MEFs in flüssigem Stickstoff. Sie werden bei 37 °C aufgetaut und in 20 ml warmes CCE gegeben. Darauf werden sie bei RT 5 min bei 209 g abzentrifugiert. Der Überstand wird abgesaugt und das Pellet mit 200 µl CCE Medium resuspendiert und in einer Dichte von 9×10^4 Zellen/ml auf 60 mm Zellkulturschalen mit semi-konfluenten inaktivierten MEFs ausgesät und im Inkubator mit 5 ml LIF-Medium inkubiert.

Um die ES einzufrieren, werden die ES zunächst wie beim Umsetzen (siehe 2.2.1.3) enzymatisch dissoziiert, jedoch wird nach der Zentrifugation das Zellpellet in Einfriermedium resuspendiert und in bereits gekühlten Kryoröhrchen bei -80 °C eingefroren. Um die ES längerfristig zu lagern werden diese nach 24 h in flüssigen Stickstoff überführt.

2.2.1.3 Umsetzen der ES und Bildung der EBs

Die ES wurden so lange kultiviert, bis sie eine 70 %-ige Konfluenz erreicht hatten. Das LIF-haltige Medium wurde dabei alle 24 h gewechselt. Alle 2-3 Tage wurden die ES anhand enzymatischer Dissoziation durch Trypsin auf frische inaktivierte MEFs passagiert. Die Stammzellen wachsen in Kolonien und wenn diese zu groß werden, kommt es durch die hohe Zell-Dichte zu Veränderungen des pH-Wertes und demzufolge zu Stress und ggf. ungewollten Differenzierungsprozessen. Um dies zu vermeiden, wurde das Medium abgesaugt und 1-mal mit Trypsin gewaschen und danach wurden 2 ml warmes Trypsin auf die Petri-Schalen gegeben und 2 min im Inkubator inkubiert. Danach wurden die ES vorsichtig mit einer 1 ml Pipette auf und ab pipettiert und dissoziiert. 150 µl Zellsuspension wurden auf 60 mm Petri-Schalen mit inaktivierten MEFs gegeben. Das

entspricht ca 6×10^6 /ml pro Schale. Die restlichen 1.850 μ l, ca. 12×10^6 /ml, wurden in eine Spinner-Flasche gegeben und mit 125 ml CCE aufgefüllt. Das Serumalbumin im CCE Medium sorgt dafür, dass das Trypsin inaktiviert wird. Durch das Rotieren in der Spinner-Flasche kommt es zur Bildung von dreidimensionalen EBs, da sich die adhären Zellen aneinander anlagern (Wartenberg, et al. 1998). Die Spinner-Flasche rührt die EBs mit Magnetrührarmen 20-mal pro Minute, wobei nach je 4 Umdrehungen ein Richtungswechsel erfolgt. Außerdem wird die Flasche vor dem Befüllen mit ES beschichtet, sodass die EBs nicht an der Flasche adhären wachsen. Am nächsten Tag erfolgt der Mediumwechsel, in dem sie auf 250 ml mit CCE-Medium aufgefüllt wird. In den folgenden Tagen werden jeweils 125 ml abgesaugt und wieder auf 250 ml Medium aufgefüllt.

2.2.1.4 Behandlung von EBs mit LPS und Inhibitoren Vas 2870 und TAK 242

Die EBs werden an Tag 3 aus der Spinner-Flasche entnommen und in eine 100 mm Suspensionsschale gegeben. Dort werden sie auf dem Schüttler bei einer Frequenz von 25/ min bis Tag 9 inkubiert und der Mediumwechsel erfolgte täglich mit 20 ml CCE- Medium. Werden adhären EBs benötigt, werden diese bereits an Tag 3 in adhären 60 mm Petri-Schalen oder auf gelatinisierte Deckgläschen in 24-Well-Platten überführt. In 60 mm Schalen werden jeweils 20-30 EBs überführt und täglich bis einschließlich Tag 8 mit 5 ml CCE-Medium versorgt. Auf die Deckgläschen in den 24-well Platten werden jeweils ca. 5 EBs gegeben und täglich erfolgte ein Mediumwechsel mit 1 ml CCE-Medium. An Tag 9 beginnt die Inkubation mit LPS. Die gewählten Konzentrationen waren 0,1 μ g/ml LPS, 1 μ g/ml LPS und 5 μ g/ml LPS.

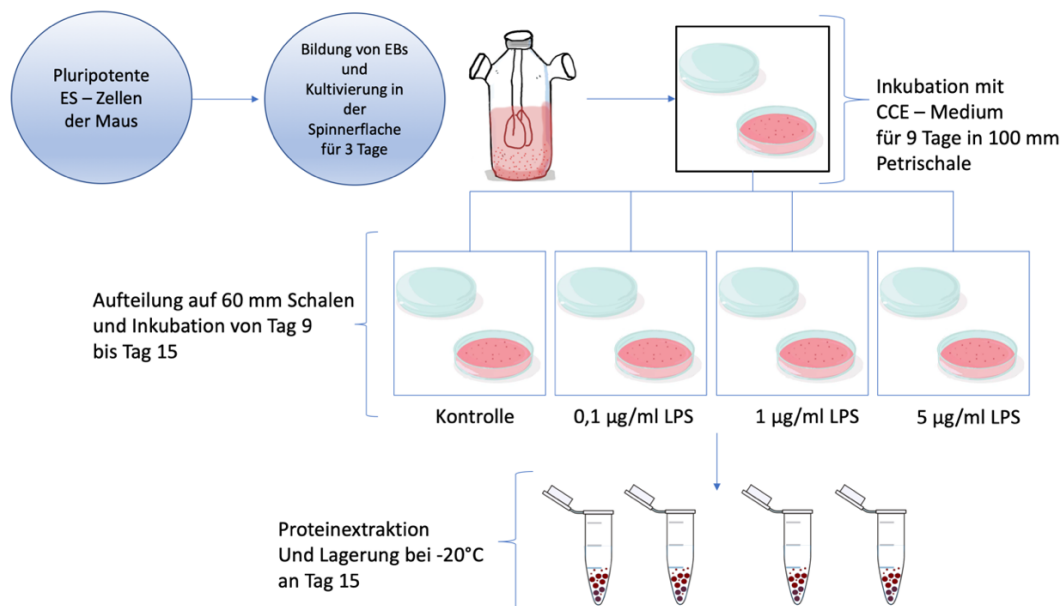


Abbildung 10: Abfolge der ES-Zellkultur und Inkubation mit LPS

Als Kontrolle dienen die Zellen in reinem CCE-Medium. Die Inkubation mit LPS lief von Tag 9 bis einschließlich Tag 15. Währenddessen wurden Experimente zu ROS (nach 48 h, zytoplasmatisch und mitochondrial), NO (nach 48 h) und täglich Messungen zur Kontraktionsfrequenz durchgeführt. Adhärenz EBs oder dissoziierte Einzelzellen in 24-Well-Platten wurden an Tag 15 mit PFA oder Methanol fixiert und immunhistochemisch weiter untersucht. Befanden sich die EBs in Suspension, wurden die Proteine an Tag 15 extrahiert, deren Konzentration mittels Lowry bestimmt und bei -20 °C gelagert. Die extrahierten Proteine wurden ausschließlich für Untersuchungen im Western-Blot-Verfahren genutzt.

Zusätzlich zu den angewandten LPS-Konzentrationen wurde ein Tag vor regulärer LPS Inkubation, also an Tag 8, ein Inhibitor hinzugefügt. Untersucht wurde der TLR 4- Antagonist Tak-242 (10 mM in DMSO, 0,5 µl/ 5 ml) sowie der NADPH-Oxidase-Inhibitor Vas 2870 (20 mM in DMSO, 5 µl/ 5 ml). Dabei wurde der jeweilige Inhibitor täglich frisch nach dem Mediumwechsel hinzugefügt. Es wurden folgende Konzentrationen berücksichtigt: CCE-Kontrolle, CCE-Kontrolle+Inhibitor, 5 µg/ml LPS, 5 µg/ml LPS+Inhibitor, 5 µg/ml LPS+LM (Vehikel). Mittels Tak-242 wurden Kontraktionsmessungen, ROS-Messungen, Western-Blot Analysen sowie immunhistochemische Untersuchungen durchgeführt. Mittels Vas 2870 wurden ausschließlich NO-Messungen nach Protokoll erhoben.

2.2.2 Dissoziation der EBs in Einzelzellen

Für die Untersuchung der ROS-Produktion in Mitochondrien sowie zur Beurteilung der α -Actinin Struktur wurden die in Suspension gehaltenen EBs zu adhärennten Einzelzellen dissoziiert. Dazu wurden die EBs an Tag 7 mit 2 ml PBS gewaschen und mit Collagenase B für 30 min auf dem Schüttler inkubiert. Dazu wurde eine Konzentration von 2 mg Collagenase B/ml DMEM gewählt. Damit die Collagenase B ihre Funktion ausüben kann, ist das Vorhandensein von Calcium im DMEM obligat. Nach 30 min wurden die EBs vorsichtig mittels Pipette auf und abpipettiert und für 5 min bei 209 g abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde daraufhin mit 4,3 ml CCE-Medium versetzt und 1-2-mal auf und ab pipettiert. Je 180 μ l der Zellsuspension, ca. 6×10^6 /ml pro Schale, wurde nun auf zuvor gelatinierte Deckgläschen in 24-Well Plates gegeben und mit 1 ml frischem CCE-Medium aufgefüllt.

2.2.3 Western-Blot

Der Western-Blot dient der Übertragung von extrahierten Proteinen auf eine Membran. Diese können anhand von Antikörpern detektiert und dargestellt werden (Verweij and Pinedo 1990).

2.2.3.1 Protein Extraktion

Die Proteine wurden nach 15 Tagen Inkubation aus nicht adhärennten EBs mittels Extraktionspuffer extrahiert. Dazu wurden die EBs 1-mal mit 1 x PBS gewaschen und in 1,5 ml Tubes für 5 min bei 4 °C und 1250 rpm abzentrifugiert. Danach wurden 100 μ l der Extraktionslösung zu jeder Probe hinzugegeben und für 20 min auf Eis gelagert. Alle 3 min wurde jede Probe für 10 s mittels Vortex stark vermengt. Nach den 20 min wurden die Reste der EBs für 10 min bei 4 °C und 15000 rpm abzentrifugiert. Der Überstand wurde in frische Tubes überführt und wurde bei -20 °C gelagert. Der Konzentration der Proteine wurde fotometrisch mit der Messmethode nach Lowry bestimmt (Lowry, et al. 1951). Hierbei wurde der Tecan Infinite M200 Microplate Reader verwendet (Tecan Group Ltd., Männedorf, Schweiz).

2.2.3.2 Gelelektrophorese

Es wurden für 30 μ g Protein pro Aliquot eingesetzt. Diese wurden mit 2,5 μ l 1x NuPAGE LDS Puffer und 1 μ l 1x NuPAGE Reducing Agent (Thermofisher Scientific, Darmstadt,

Deutschland) aliquotiert. Zum Auffüllen des Restvolumens von 10 µl wurde Aqua dest. verwendet. Dieses Verfahren wurde sowohl mit den Proteinproben von 0.1 µg/ml LPS, 1 µg/ml LPS und 5 µg/ml LPS als auch mit der Kontrolle ohne LPS durchgeführt. Um die Proteine zu denaturieren, wurden die frisch angesetzten Proben 10 min bei 70 °C inkubiert. Danach wurden die 10 µl Proben direkt in ein 4-12 % Gradient PAGE EX Precast polyacrylamide mini-Gel (Lonza, Rockland, USA) pipettiert. In der Mitte wurden 2 µl des Proteinleiters von Novex Sharp Standard pipettiert, um später die korrekten Proteinbanden anhand der Größen ausfindig zu machen. Die Gelelektrophorese lief bei 150 V 90 min in der Elektrophorese-Kammer von XCell SureLock (Invitrogen by Thermo Fisher Scientific, Darmstadt). Nach der Elektrophorese erfolgte der Transfer von der SDS-PAGE auf eine PVDF Membran für 90 min bei 180 mA.

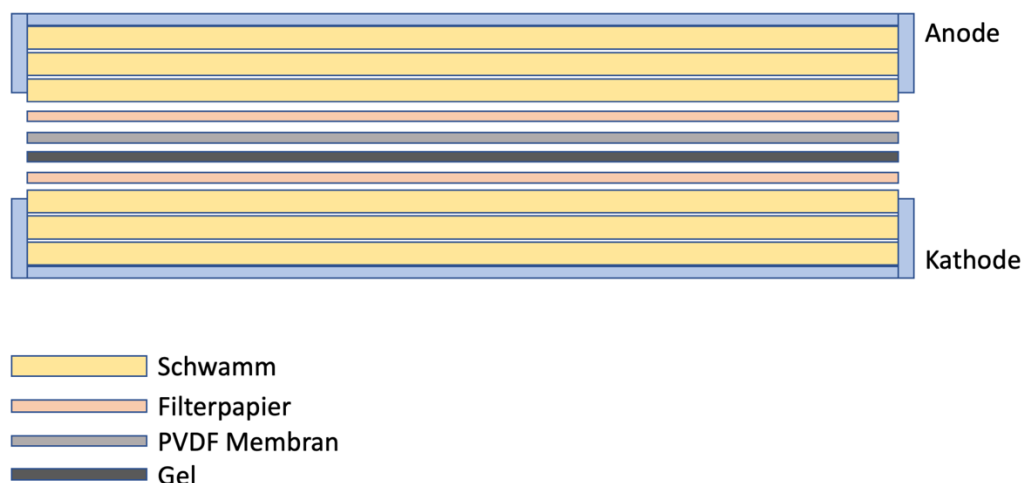


Abbildung 11: Schematische Abbildung zum Proteintransfer im Western-Blot Verfahren

Die Abbildung 11 zeigt den Aufbau der Apparatur, die für den Protein-Transfer vom Gel auf die Membran benötigt wurde. Schwämme sowie Filterpapiere wurden zuvor in Transfer-Puffer getränkt und bereitgestellt. Zuerst wurden drei Schwämme als Basis gestapelt. Es folgte 1 Filterpapier und darauf wurde nun das Gel gelegt. Das Gel wurde zuvor im Transfer-Puffer gewaschen. Auf das Gel wurde nun die Transfer-Membran platziert. Diese wurde vorher für 30 s in Methanol gelegt und ebenfalls im Transfer-Puffer gewaschen. Die PVDF-Membran ist sehr hydrophob und das Methanol aktiviert bestimmte chemische Gruppen auf der Membran, sodass diese in der Lage ist mit Proteinen zu interagieren. Als nächstes folgte zunächst wieder 1 Filterpapier, welches mit einer Rolle sanft auf die Membran mit dem darunterliegenden Gel gedrückt wurde.

Dieses diente zur Vermeidung von Luftblasen zwischen dem Gel und der Membran und gewährleistete einen barrierefreien Transfer vom Gel auf die Membran. Dieses Verfahren wurde für die nachfolgenden 3 Schwämme wiederholt. Der Transfer konnte nun in der mit Transfer-Puffer gefüllten XCell SureLock Kammer beginnen.

2.2.3.3 Antikörperinkubation und Analyse im Western-Blot Verfahren

Als erstes wurden die Banden der Proteinleiter mit einem Bleistift markiert, sodass diese trotz der mehrfachen Waschvorgänge erhalten blieben. Jegliche Waschvorgänge wurden 3-mal für jeweils 5 min mit 0,1 % TBS-Tween vorgenommen.

Die Membran wurde nach dem Transfer 3-mal sorgfältig nach Protokoll gewaschen und danach für 2 h mit 5 % BSA oder Milch in 0,1 % TBS-Tween geblockt. Letzteres ist notwendig, um das Vorkommen von unspezifischen Proteinbanden zu vermeiden. Bei phosphorylierten Proteinen wurde ausschließlich BSA, sowohl beim Blocken und der Verdünnung primärer Antikörper, als auch bei der Verdünnung der sekundären Antikörper, verwendet. Geblockt wurde bei 4 °C für 2 h im Kühlraum anschließend wurden die primären Antikörper in spezifischen Konzentrationen (Tab. 5) verdünnt in 5 % BSA oder Milch in 0,1 % TBS-Tween auf die Membran gegeben. Diese wurde über Nacht bei 4 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurde der primäre Antikörper abpipettiert und die Membran 3-mal sorgfältig mit 0,1 % TBS-Tween gewaschen. Nach diesem Schritt wurde der passende sekundäre Antikörper in einer Konzentration von 1:10000 in 5 % BSA oder Milch in 0,1 % TBS-Tween für eine Stunde bei RT auf die Membran gegeben. Danach erfolgte erneut ein Waschvorgang.

Um die Banden sichtbar zu machen wurde eine Lösung hergestellt (1.25 mM Luminol + 225 µM Cumarinsäure + 3 mM H₂O₂ in 100 mM Tris Puffer). Die sekundären Antikörper sind mit einer horseradish peroxidase (HRP) konjugiert. Das verwendete Luminol wird von HRP oxidiert und emittiert Licht, welches digital sichtbar gemacht wird. Detektiert und konvertiert wurden die Banden durch PEQLAB Gel Dokumentationssystem (VWR Part of Avantor, Erlangen, Deutschland) sowie dem Programm Chemi-Capt 5000 (Version 15.01a, Vilber Smart Imaging, Eberhardzell, Deutschland). Gemessen und berechnet wurden die Proteinbanden mit dem Programm ImageJ (Version 1.53, Wayne Rasband, National Institut of Health, USA) (Schindelin, et al. 2015). Der endgültige Wert eines jeden Proteins für jede Probe wurde erst nach Normalisierung mit dem Haushaltsprotein Vinculin, GAPDH oder β-Actin errechnet. Es wurden für jedes Protein

pro Probe 3 Durchläufe mit unterschiedlichen Zellpassagen gemacht und dessen Werte gemittelt. Diese Endwerte wurden mit den unbehandelten Proteinproben prozentual verrechnet und verglichen, um eine Veränderung der Proteinkonzentration darstellen zu können.

Um die Membran für weitere Proteine wiederzuverwenden, wurden nach dem üblichen Waschvorgang die Antikörper mit dem Stripping-Puffer von Restore Plus (Thermo Fisher Scientific, Darmstadt Deutschland) variierend nach Stärke der Proteinbanden 5-10 Minuten entfernt. Danach wurde die Membran 3-mal für 10 Minuten mit 0.1 % TBS-Tween gewaschen und erneut für zwei Stunden mit 5 % BSA oder Milch geblockt.

Folgende Antikörper wurden im Western-Blot untersucht:

Primäre Antikörper	Firma	Konzentration	Proteingröße (kDa)
α- Actinin Wirt: Maus	A5044 Sigma	1/1000	100 kDa
β-Actin Wirt: Hase	4970S Thermo Fisher, Scientific	1/2000	40 kDa
Cleaved Caspase 1 Wirt: Hase	PA5 – 38099 Thermo Fisher, Scientific	1/1000	26 kDa
Cleaved Caspase 3 Wirt: Hase	D175 5AIE Cell Signaling	1/1000	20 kDa
CD 68 Wirt: Hase	bs-0649R Bioss	1/1000	110 kDa
CD 69 Wirt: Hase	PA5-114989 Thermo Fisher, Scientific	1/1000	60 kDa
Enos	N13893	1/1000	135 kDa

Wirt: Hase	Sigma		
IL 1β	PA5-88078	1/1000	31 kDa
Wirt: Hase	Invitrogen		
NOX 1	NBP1-31546	1/3000	65 kDa
Wirt: Hase	Novus Biologicals		
NOX 2	19013-1-AP	1/10 000	55 kDa
Wirt: Hase	Proteintech		
NOX 4	ab109225	1/1000	64 kDa
Wirt: Hase	Abcam		
pEnos	ab215717	1/1000	133 kDa
Wirt: Hase	Abcam		
TLR 4	MA5-16216	1/1000	80 kDa
Wirt: Maus	Thermo Fisher, Scientific		
Vinculin	ab129002	1/10 000	124 kDa
Wirt: Hase	Abcam		
Sekundärer Antikörper	Firma	Konzentration	Proteingröße (kDa)
Esel Anti – Hase IgG H&L (HRP)	ab205722 Abcam	1/10 000	
Esel Anti – Maus IgG H&L (HRP)	Ab205724 Abcam	1/1000	

Table 6: Im Western - Blot verwendete Antikörper

2.2.4 Immunhistochemie

Mittels der Immunhistochemie (IHC) ist der Nachweis von Antigenen in Geweben durch spezifische Antikörper möglich. Zusätzlich zum Western-Blot kann man dem Vorhandensein des Antigens auch eine Position in der Zelle oder im Gewebe zuordnen (Ramos-Vara 2011).

2.2.4.1 Vorgehen IHC

Die adhärennten EBs auf Cover-Slips wurden nach Inkubation an Tag 15 mit 4 % PFA in PBS, pH 6,9 oder Methanol für mindestens 20 Minuten fixiert. Jeder Waschvorgang wurde 4-5-mal mit 0.01% PBS-Triton-X-100 durchgeführt.

Als Erstes wurde gewaschen und für gesteigerte Permeabilität mit 1 % PBS-Triton-X-100 10 min bei RT inkubiert. Danach wurde erneut gewaschen und 1 h mit hitzeinaktiviertem fetalem Rinderserum (HiFCS) oder 5 % Milch in 1x PBS bei RT geblockt. Als nächstes wurde erneut gewaschen und der Antikörper nach Literatur in HiFCS oder 5 % Milch in 1x PBS verdünnt. Es wurden 50 µl des verdünnten Antikörpers auf die Cover-Slips gegeben und über Nacht bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde zuerst gewaschen und dann der passende sekundäre Antikörper 1:100 verdünnt in HiFCS oder Milch 1 h bei RT auf die EBs gegeben. Als letztes wurde erneut gewaschen und dann die Zellkernfärbung mit DRAQ 5 1:2000 in PBS für 30 min durchgeführt. Zum Schluss wurde nochmal gewaschen und die Deckgläschen auf Objektträger mit Fluoromount G (Thermo Fisher Scientific) fixiert.

Folgende Antikörper wurden immunhistochemisch untersucht:

Primäre Antikörper	Konzentration	Fixierung	Sekundärer Antikörper
A-Actinin A5044 Sigma Wirt: Maus	1/500	Methanol	FITC Esel anti Maus IgG
CD 68 Bs-0649R Bioss Wirt: Hase	1/500	Methanol / PFA	Alexa 488 Esel anti Hase IgG

CD 69 PA5-114989 Thermo Fisher Scientific Wirt: Hase	1/400	Methanol	Cy 3 Ziege anti Hase IgG
NLRP 3 MA5-25318 Invitrogen Wirt: Ratte	1/100	PFA	Alexa 488 Esel anti Ratte IgG
TLR 4 Wirt: Maus Wirt: Hase	1/100	PFA	Alexa 488 Esel anti Hase IgG
Sekundäre Antikörper	Konzentration		Anregung - Emission
Alexa Flour 488 Esel anti Rat IgG Life Technologies, Darmstadt	1/100		495 / 519 nm
Alexa Flour 488 Esel anti Hase IgG Life Technologies	1/100		495 / 519 nm
Alexa Flour 488 Esel anti Maus IgG Life Technologies,	1/100		495 / 519 nm
Cy3-konjugiertes Ziege anti Hase IgG Thermofisher Scientific	1/100		552 / 565 nm

FITC Esel anti Maus IgG Thermofisher Scientific	1/100		498 / 597 nm
Kernfärbung	Konzentration		Anregung - Emission
DRAQ 5 Biolegend, USA	1/2000		633 / 655

Table 7: Immunhistochemisch untersuchte Antikörper und Kernfärbung

2.2.4.1.1 Auswertung IHC

Die IHC Auswertung der Anzahl Marker-positiver Zellen erfolgte für die Proteine NLRP3, IL 1 β , CD 68 und CD 69 in vergleichbarer Weise. Es erfolgte die Analyse mittels konfokaler Laserrastermikroskopie. Genutzt wurde das 40 x Objektiv mit 10-facher Okularvergrößerung, also erfolgte eine 400-fache Vergrößerung. Es wurden pro aufgenommenes Bild alle DRAQ 5 angefärbten Zellkerne durch die ImageJ Bildanalyse-Software und deren „Thresholding Funktion“ ausgezählt. Die IL 1 β -, CD 68- und CD 69-positiven Zellen wurden jeweils manuell ausgezählt und prozentual zur Gesamtzahl DRAQ 5-positiver Zellkernen errechnet. Es wurden dabei pro Experiment 12 512x512 pixel Bilder je Probe aufgenommen und das Ganze 3-mal mit unabhängigen Zell-Passagen wiederholt.

2.2.5 Kontraktionsfrequenz-Messungen und Untersuchung der α -Actinin Struktur der EBs

Die Kontraktionsfrequenz der EBs wurde an Tag 8 bis einschließlich Tag 13 gemessen. Dazu wurde jeder Ansatz täglich zur gleichen Zeit 1 h nach Mediumwechsel für maximal 10 min aus dem Inkubator genommen und auf einer 37 °C warmen Heizplatte (TRZ 3700) am Lichtmikroskop (Zeiss Axiovert 40), Vergrößerung 50x, untersucht. Dabei wurden die Kontraktionsfrequenzen von mindestens 10 EBs pro Schale für 30 s gemessen und auf eine min hochgerechnet. Das Experiment wurde 3mal mit jeweils unterschiedlichen,

unabhängigen Passagen durchgeführt. Die Frequenzen wurden gemittelt und statistisch im Vergleich zur Kontrolle dargestellt.

Zu Beginn erfolgte ein Experiment, in dem die EBs einzeln und individuell betrachtet wurden. Dazu wurden die EBs an Tag 3 auf adhärente Schalen gegeben. Am nächsten Tag wurde jede einzelne Schale fotografiert und die EBs von 1 bis 10 durchnummeriert. Am Deckel wurde ein Referenzpunkt festgelegt, sodass die Schale immer in gleicher Position am Lichtmikroskop untersucht werden konnte. So konnten Vertauschungen vermieden und jeder EB individuell untersucht werden. Es erfolgten Frequenzmessungen Tag 8 bis einschließlich Tag 15. Der Ablauf erfolgte wie oben bereits beschrieben.

Um die Struktur des α -Actinins zu untersuchen, wurden die EBs an Tag 4 zu Einzelzellen dissoziiert und adhärent auf gelatinierten Deckgläschen in einer 24-Well Platte bis Tag 15 kultiviert und mit den jeweiligen LPS Konzentrationen behandelt. An Tag 15 wurden die Einzelzellen mit Methanol fixiert, immunhistochemisch gefärbt und die Struktur des α -Actinins visuell mittels konfokaler Laserrastermikroskopie untersucht.

2.2.6 NO-Messung

Um NO darzustellen, wurde der Indikator DAF-FM Diacetat in DMSO gelöst, sodass eine Stammlösung von 5 mM entstand. Diese wurde dann wiederum in einer Konzentration von 0,4 μ l / ml in reinem DMEM gelöst und im Wasserbad auf 37 °C erwärmt. Die EBs wurden für dieses Experiment in Suspension auf dem Schüttler inkubiert. Die LPS-behandelten EBs wurden an Tag 11, also 48 h nach erster Behandlung mit LPS, jeweils mit 2 ml PBS gewaschen, in 2 ml des DAF-DMEM-Gemisches aufgenommen und für 30 min auf dem Schüttler bei einer Frequenz von 25/min und 37 °C im Inkubator inkubiert. Nach der DAF-Färbung wurde die Indikatorlösung durch CCE-Medium ersetzt und nach kurzer Nachinkubation von 20 min die DAF-Fluoreszenz bei einer Anregungswellenlänge von 488 nm und einer Emission bei >515 nm mittels konfokaler Laserrastermikroskopie mit 20-facher Vergrößerung gemessen. Als optische Schnittdicke wurde 444 μ m verwendet. Gemessen wurden ausschließlich die Oberflächen der EBs. Ausgewertet wurde die NO-Fluoreszenz von 10 EBs pro Probe via ImageJ, wobei von der gemessenen Fluoreszenz eines jeden EBs jeweils die Hintergrund-Fluoreszenz abgezogen wurde. Jedes Experiment wurde mindestens mit 3 verschiedenen Passagen durchgeführt. Die Werte der einzelnen Proben wurden gemittelt und dann prozentual zur Kontrolle verrechnet und in einem Diagramm dargestellt.

2.2.7 ROS-Messung

2.2.7.1 ROS im Zytoplasma

Um ROS in den EBs darzustellen wurde der ROS-Indikator H₂DCF (2',7'-Dichlordihydrofluorescein-diacetat) verwendet. Dieser ist ebenso wie DAF-FM zelldurchlässig. Gelöst wurde der ROS-Indikator in DMSO (Stammlösung, 20 mM). Der Indikator wurde dann in DMEM (Endkonzentration, 15 µM) verdünnt und bei 37 °C ins Wasserbad gestellt. Auf die EBs wurden nach Waschvorgang mit PBS 2 ml DMEM mit darin gelösten H₂DCF gegeben und für 30 min inkubiert. Die Zeit der Nachinkubation wurde möglichst kurzgehalten und belief sich auf maximal 10 min. Das weitere Vorgehen ist gleich der bereits beschriebenen NO-Messung. Die Fluoreszenzanregung von DCF erfolgte bei einer Anregungswellenlänge von 488 nm und einer Emission bei >515 nm.

2.2.7.2 ROS in den Mitochondrien (mtROS)

Um die mtROS darzustellen, wurden die EBs an Tag 7 zu Einzelzellen dissoziiert und nach 48 h Inkubation in LPS-supplementiertem Zellkulturmedium mit MitoSox Red angefärbt. Der Farbstoff wurde zuvor in DMSO (Stamm-Konzentration, 20 mM) gelöst. Diese Stammlösung wurde wiederum mit DMEM verdünnt (Endkonzentration, 8 µM) und die Einzelzellen für 30 min mit der Färbelösung bei 37 °C einer Luftfeuchte von 95 % und 5 % CO₂ im Inkubator inkubiert. Verwendet wurde hier der Argon-Laser des konfokalen Mikroskops (Anregung 495 nm, Emission 560 nm) und ein Objektiv 40-facher Vergrößerung und 10-facher Okularvergrößerung. Die Bildanalyse erfolgte ebenfalls mit ImageJ. Dabei wurde in jedem aufgenommenen 512x512 pixel Bild pro Probe die MitoSox Red-Fluoreszenz von Mitochondrien innerhalb von insgesamt 20 Zellen berücksichtigt. Ausgewertet wurden 10 Bilder pro Probe. Insgesamt wurde das Experiment mit 3 unabhängigen Passagen wiederholt.

2.2.8 Zytotoxizitätsmessung

Um eine Toxizität von der in dieser Studie verwendeten LPS Konzentrationen (0,1 µg/ml; 1 µg/ml und 5 µg/ml LPS) auszuschließen, wurden die von Tag 9 bis Tag 15 behandelten EBs mit Sytox Green (1 mM) in 1x PBS für 10 min bei 37 °C inkubiert. Eine Positiv-Kontrolle wurde mit -20 °C-kaltem Methanol für 5 min fixiert und ebenfalls mit Sytox Green inkubiert. Nach Abschluss der Inkubation wurden alle Proben 3-mal mit 1x

PBS gewaschen. Sytox Green färbt ausschließlich tote Zellen an. Um diese von lebenden Zellen zu unterscheiden, wurden die Zellen zusätzlich mit der Zellkernfärbung DRAQ 5 (Konzentration 1/2000 in 1 x PBS) für 30 min gefärbt. Die Anzahl Sytox Green-positiver Zellkerne wurde mit dem konfokalen Laser-Raster-Mikroskop bei einer Wellenlänge von 488 nm (Emission > 515 nm) analysiert.

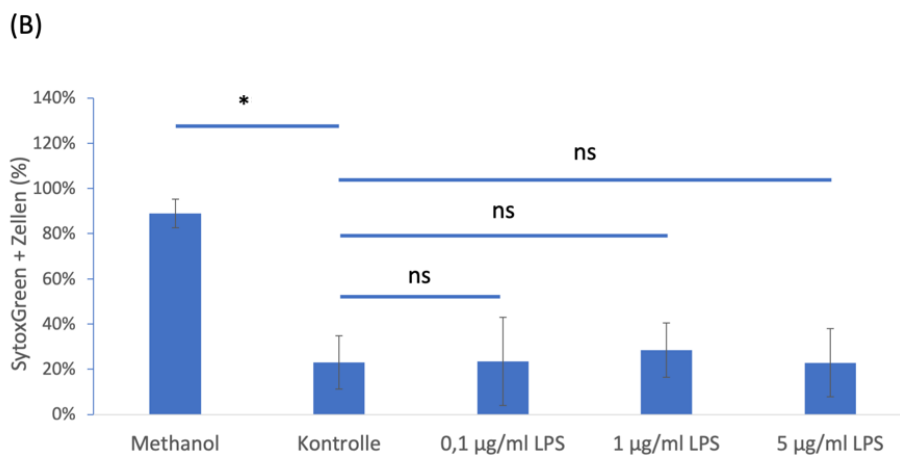
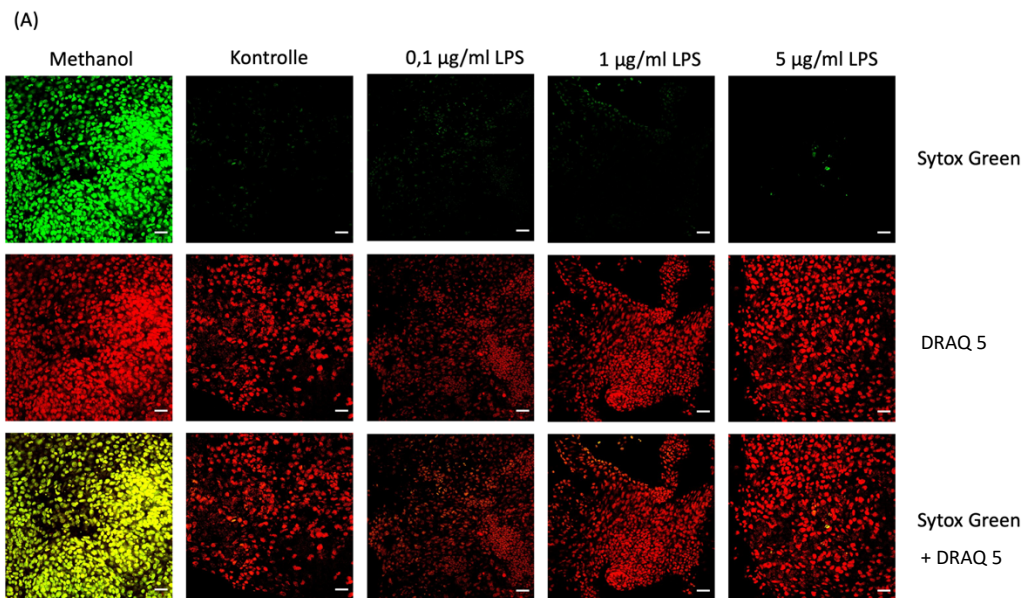
2.2.9 Statistische Analyse

Zur statistischen Analyse der Daten wurde die Statistik Funktion von Microsoft Excel und die GraphPad Instat Statistik Software verwendet. Die Anzahl der Experimente wurde mit n gekennzeichnet. Diese steht für jeweils eine individuelle Zellkultur-Passage. Für jedes Experiment wurden 20-30 EBs pro Probe analysiert; das Experiment wurde mindestens 3-mal wiederholt. Für jede Probe wurde ein Mittelwert \pm Standardabweichung aus den jeweiligen Experimenten errechnet. Unter Verwendung der Statistik-Software GraphPad Prism, Version 8.0.0 für MacOS (GraphPad Software, San Diego, Kalifornien, USA) wurde eine einfaktorielle Varianzanalyse (one-way ANOVA) und ein post hoc Test nach Dunnett durchgeführt Dabei steht * $P < 0.05$ für signifikant; ** $P < 0.01$ für sehr signifikant und *** $P < 0.001$ für sehr hoch signifikant.

3 Resultate

3.1 Zytotoxizität von LPS

Für die Bestimmung der Zytotoxizität von LPS in den für diese Studie verwendeten Konzentrationen wurde eine Sytox Green Kernfärbung durchgeführt. Der Zellkernmarker akkumuliert in Zellkernen von Zellen mit zerstörten Zellmembranen. In Abbildung 12 ist anhand der Kernfärbung von Sytox Green keine Toxizität bis zu einer Konzentration von 5 µg/ml LPS erkennbar. Ebenso gibt es keine verstärkte Expression des Apoptose-assoziierten Enzyms aktivierte Cleaved Caspase 3 (Abb. 12 C). Somit konnte ausgeschlossen werden, dass die verwendeten LPS Konzentrationen einen toxischen Einfluss auf die EBs haben.



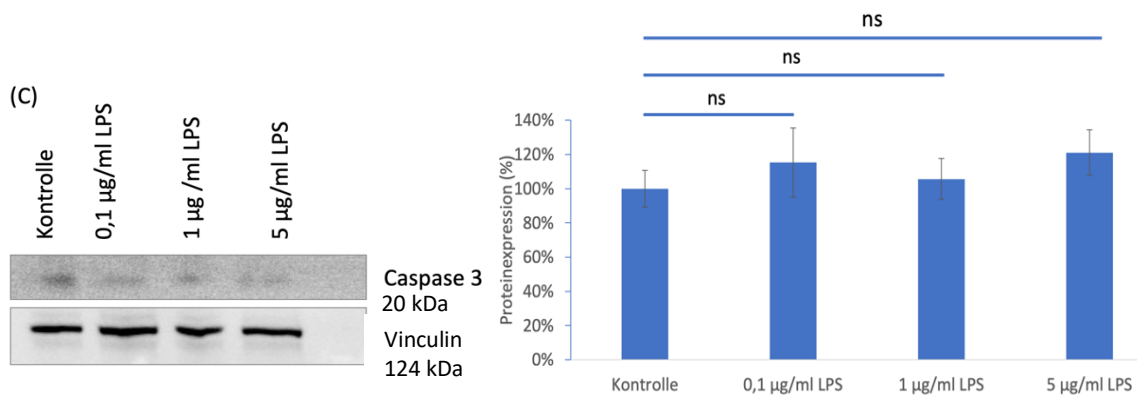


Abbildung 12: Zytotoxizität von LPS

(A) Darstellung der Zytotoxizität mittels Anfärbung der Zellkerne letaler Zellen mit dem Letalmarker Sytox Green und Zellkernfärbung DRAQ 5 in repräsentativen EBs nach Inkubation mit steigenden Konzentrationen von LPS. Als Positiv-Kontrolle wurden Methanol-fixierte EBs verwendet. Der Größen-Maßstab entspricht 30 µm.

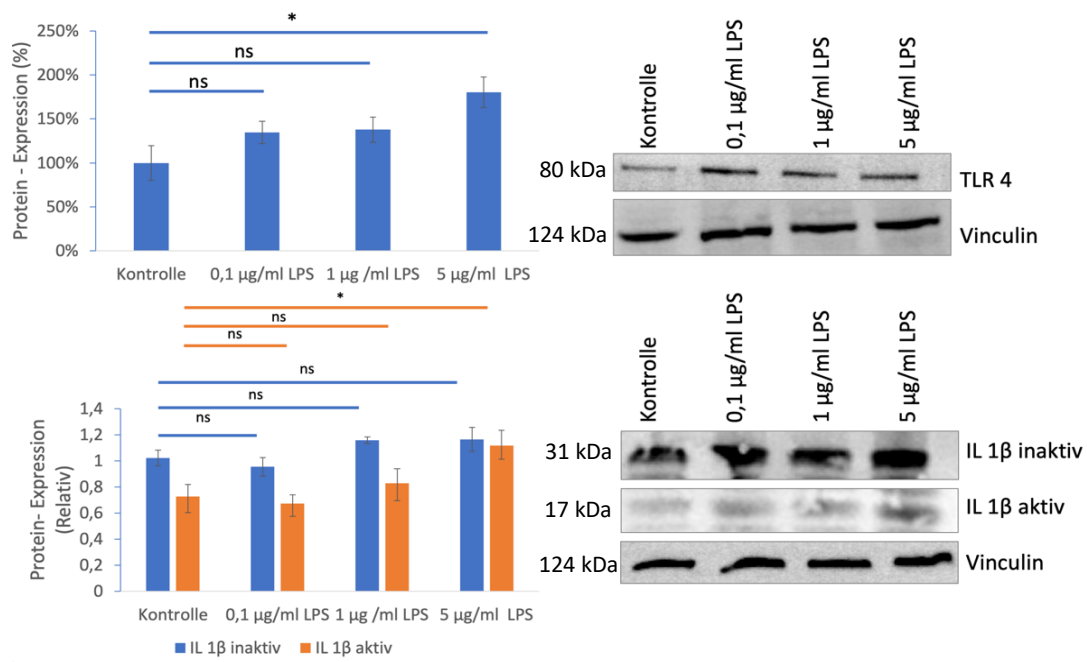
(B) Das Säulendiagramm zeigt die Anzahl Sytox Green⁺ Zellkerne in Prozent \pm SD in n = 3 Experimenten. (C) Western-Blot Analyse der aktivierten Caspase 3. Als Beladungskontrolle wurde Vinculin verwendet. Gezeigt ist ein repräsentativer Western-Blot. Das Säulendiagramm zeigt die prozentual zur Kontrolle berechneten Mittelwerte \pm SD von n = 3 Experimenten; * P < 0,05, statistisch signifikant nach einfaktorierter Anova-Varianzanalyse.

3.2 Einfluss von LPS auf die TLR 4 und IL 1 β Expression von EBs

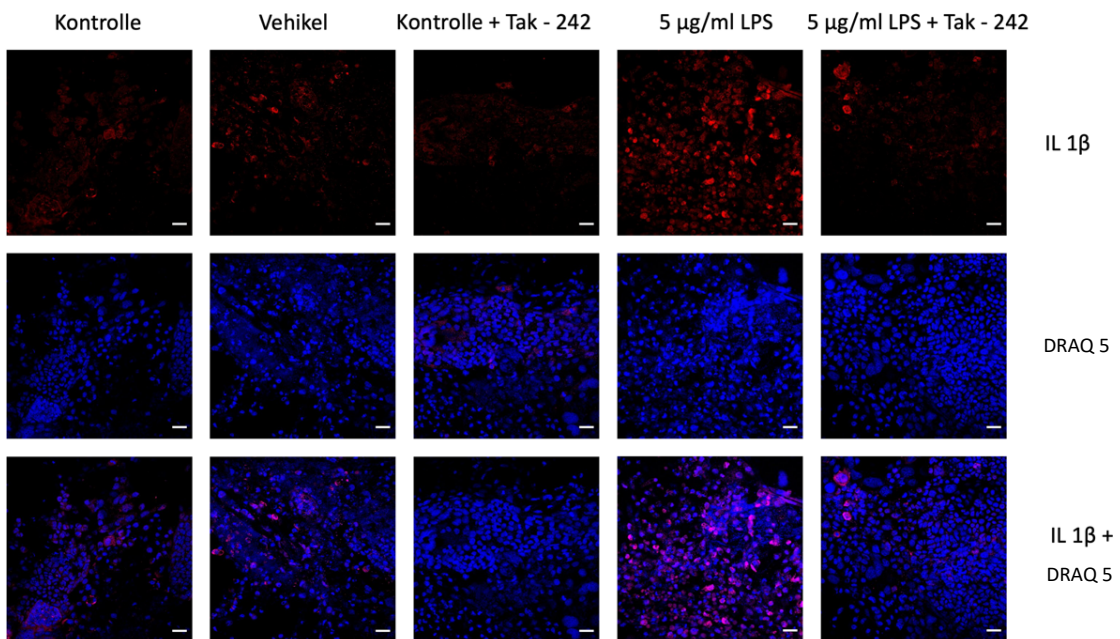
Es ist aus der Literatur bekannt, dass LPS den TLR 4 Signalweg aktiviert. Um zu erforschen, ob dieser Signalweg auch bei LPS-vermittelten, inflammatorischen Signalwegen in EBs eine Rolle spielt, wurden Western-Blot Analysen für TLR 4 und des pro-inflammatorischen Zytokins IL 1 β durchgeführt (Abb.13).

Die Abbildung 13 zeigt, dass LPS Dosis-abhängig die Hochregulation des TLR 4 induziert (Abb. 13A). Das Pro-IL 1 β , also die inaktive Form, ist in allen untersuchten Proben nahezu unverändert. Dagegen konnte ein Anstieg der Expression des aktiven IL 1 β beobachtet werden, der bei 5 µg / ml LPS signifikante Werte erreichte (Abb. 13B). Immunhistochemisch wurde mittels Koinkubation von LPS mit dem TLR 4 Inhibitor Tak-242 (1 µM) beobachtet, dass es zu einer verminderten Expression des IL 1 β im Vergleich zu Kontrolle und Vehikel-Kontrolle kommt (Abb. 13C). Dies beweist eine funktionelle Kopplung der IL 1 β Expression an den TLR 4 Signalweg.

(A)



(B)



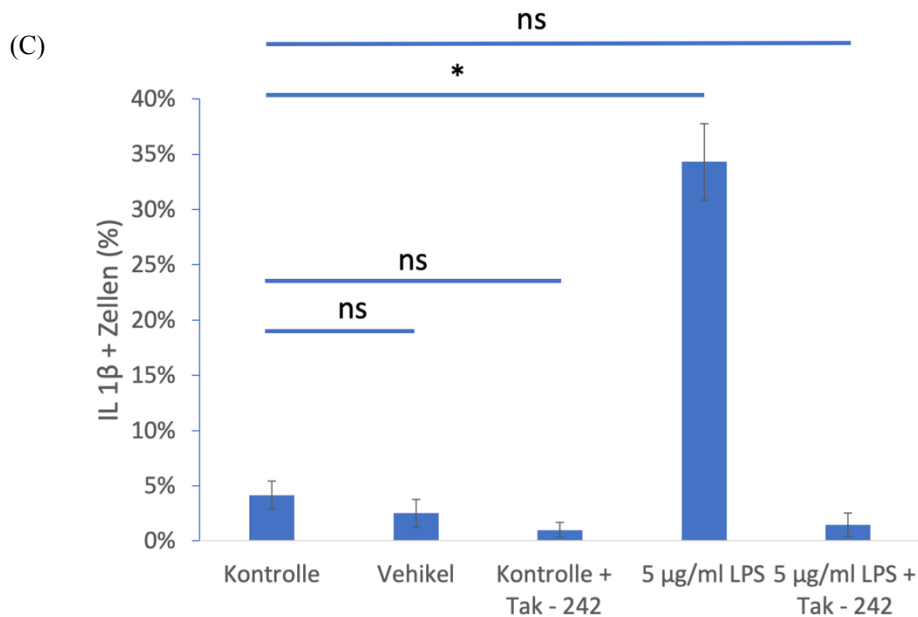
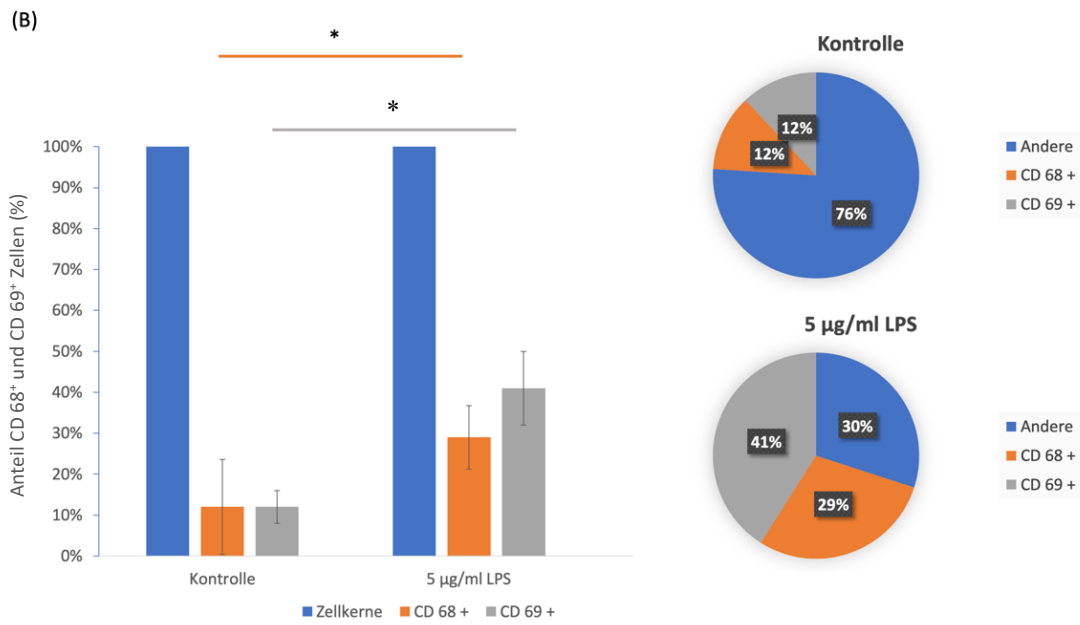
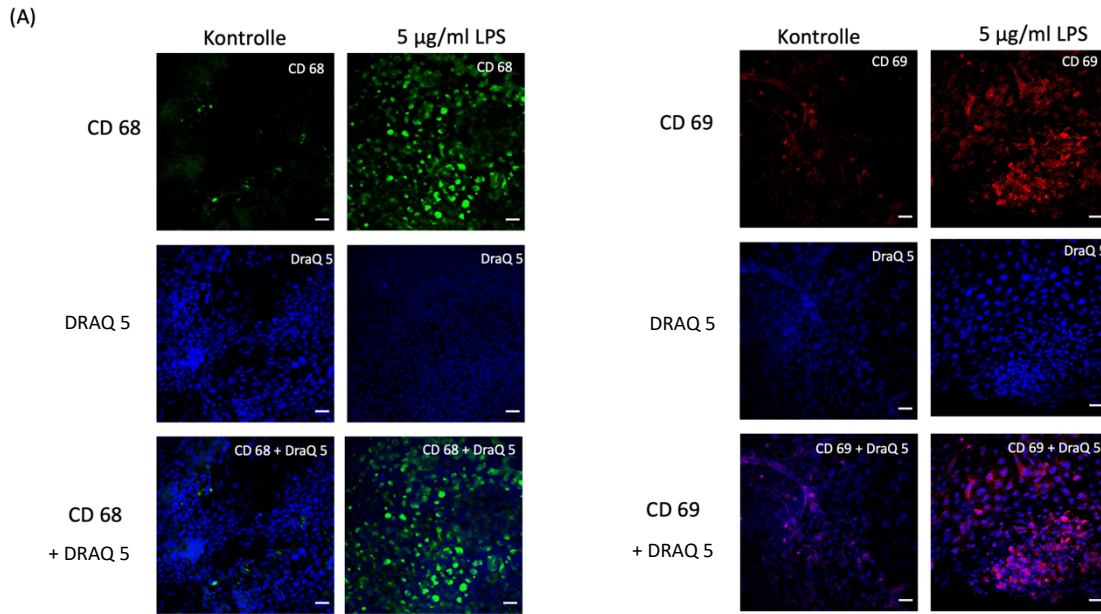


Abbildung 13: Auswirkung von LPS und LPS + Tak-242 auf die TLR 4 und IL 1β Expression und die Anzahl von IL 1β⁺ Zellen

(A) Western-Blot Analyse von TLR 4 (oben) und IL 1β in aktiver und inaktiver Form (unten). Als Beladungskontrolle wurde Vinculin verwendet. Gezeigt sind repräsentative Western-Blots. Das Säulendiagramm zeigt die prozentual zur Kontrolle berechneten Mittelwerte \pm SD von $n = 3$ Experimenten; * $P < 0,05$, statistisch signifikant nach einfaktorieller Anova-Varianzanalyse. (B) Darstellung der IL 1β⁺ Zellen mittels Immunfluoreszenzmikroskopie in repräsentativen EBs nach 7 Tagen Inkubation mit LPS (5 µg/ml) und Tak-242 (1 µM). Der Größenmaßstab entspricht 30 µm. (C) Das Säulendiagramm zeigt die Anzahl von IL 1β⁺ Zellen in Prozent \pm SD in $n = 3$ Experimenten; * $P < 0,05$, statistisch signifikant nach einfaktorieller Anova-Varianzanalyse.

3.3 Einfluss von LPS auf die Anzahl von CD 68⁺ und CD 69⁺ Zellen in EBs sowie die CD 68 und CD 69 Proteinexpression

Abbildung 14 zeigt, dass es in den EBs nach Zugabe von LPS (5µg/ml) zu einer Erhöhung der Anzahl von CD 68⁺ Zellen kommt. Ebenso stieg nach LPS Behandlung die Anzahl der CD 69⁺ Zellen an. CD 69 ist ein Marker für aktivierte T-Zellen, B-Zellen, neutrophile Granulozyten oder NK-Zellen. In der Kontrolle wurden jeweils 12 % CD 68⁺ und CD 69⁺ Zellen festgestellt, wogegen in der behandelten Probe (5 µg/ml LPS) 29 % CD 68⁺ und 41 % CD 69⁺ Zellen nachgewiesen werden konnten.



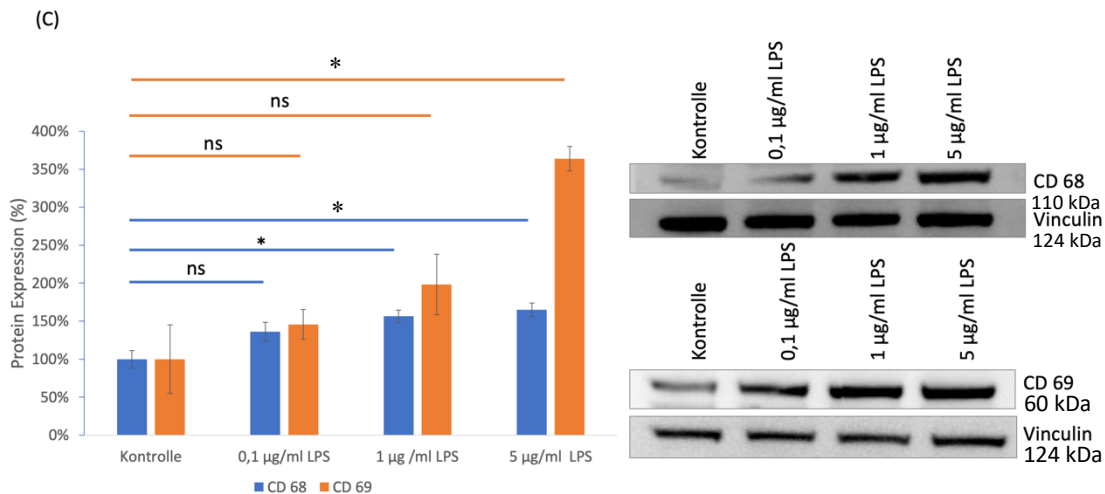


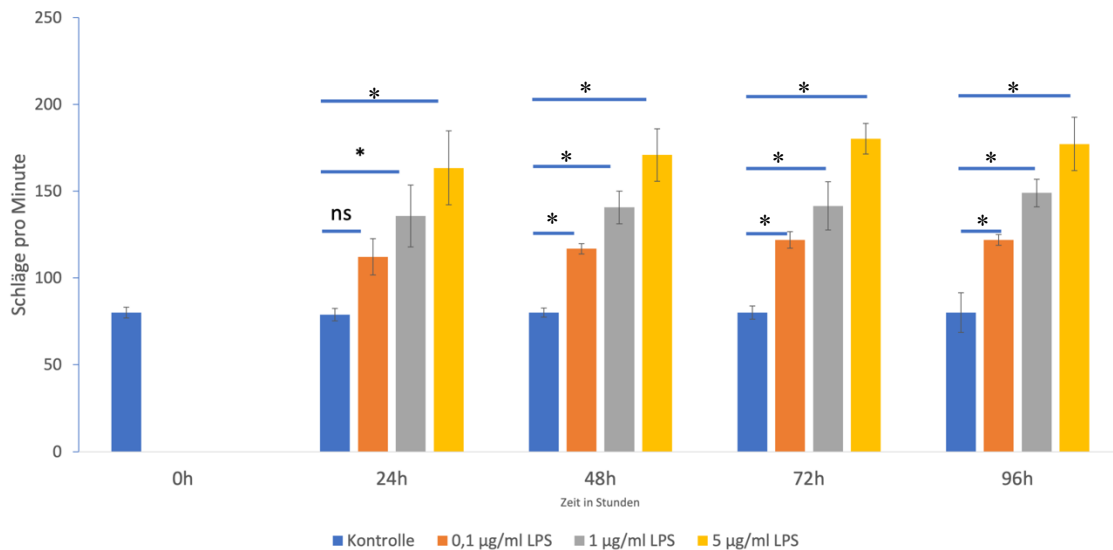
Abbildung 14: Einfluss von LPS auf die Anzahl von CD 68⁺ und CD 69⁺ Zellen in EBs sowie die CD 68 und CD 69 Proteinexpression

(A) Repräsentative Darstellung der CD 68⁺ und CD 69⁺ Zellen mittels Immunfluoreszenzmikroskopie in EBs nach 7 Tagen Inkubation mit LPS (5 µg/ml). Der Größenmaßstab entspricht 30 µm. (B) Das Säulendiagramm und das Kreisdiagramm zeigen den prozentualen Anteil von CD 68⁺ und CD 69⁺ Zellen, Mittelwert ± SD von n = 3 Experimenten; * P<0,05, statistisch signifikant nach einfaktorieller Anova-Varianzanalyse. (C) Western-Blot Analyse der CD 68 und CD 69 Proteinexpression nach Behandlung mit unterschiedlichen LPS-Konzentrationen. Gezeigt sind repräsentative Western-Blots. Als Beladungskontrolle wurde Vinculin verwendet. Das Säulendiagramm zeigt die prozentual zur Kontrolle berechneten Mittelwerte ± SD von n = 3 Experimenten; * P< 0,05 mittels einfaktorieller Anova-Varianzanalyse.

3.4 Einfluss von LPS auf die Kontraktionsfrequenz kardialer Areale in EBs

Es ist aus der Literatur bekannt, dass Entzündungsprozesse im Herzen zu Arrhythmien führen (Klein, 2000). Daher wurde in der vorliegenden Studie der Einfluss von LPS auf die Kontraktionsfrequenz der EBs untersucht. Abbildung 15 zeigt den Einfluss von LPS in steigenden Konzentrationen (0,1 µg/ml, 1 µg/ml, 5 µg/ml) auf die Kontraktionsfrequenz von EBs.

A)



B)

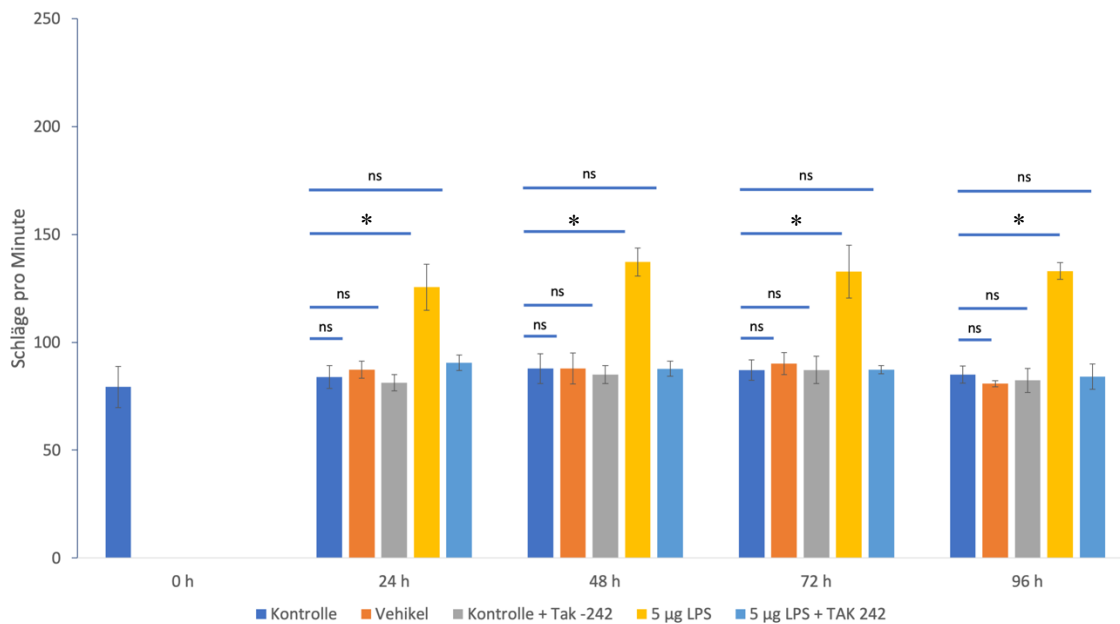


Abbildung 15: Auswirkung von LPS auf die Kontraktionsfrequenz von EBs

(A) Kontraktionsfrequenzen von ausplattierten EBs, die ab Tag 9 mit LPS (0,1 µg/ml, 1 µg/ml, 5 µg/ml) für 96 h behandelt wurden. Die Analyse der Kontraktionsfrequenz erfolgte alle 24 h. (B) Inhibition der LPS- (5 µg/ml) induzierten Erhöhung der Kontraktionsfrequenz durch den TLR 4 Antagonisten Tak-242 (1 µM). Dargestellt sind die Mittelwerte ± SD von n = 3 Experimenten; * P < 0,05 statistisch signifikant nach einfaktoriellem Anova Test.

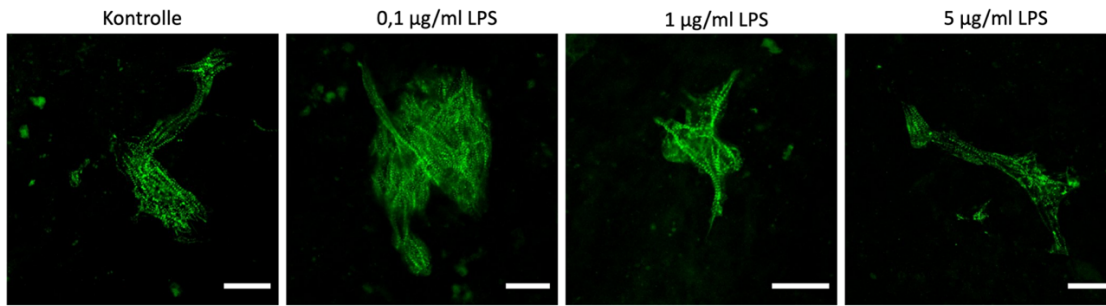


Abbildung 16: α -Actinin Struktur in unbehandelten und LPS-behandelten Kardiomyozyten

Die repräsentativen Bilder zeigen immunhistochemisch mit α -Actinin angefärbte Kardiomyozyten aus EBs, die von Tag 9 bis Tag 15 mit LPS behandelt wurden. Der Größenmaßstab entspricht 30 μ m.

Um mögliche LPS-induzierte Veränderungen der Sarkomerstruktur zu untersuchen wurde α -Actinin in isolierten Kardiomyozyten LPS- (0.1 μ g/ml - 5 μ g/ml) behandelte EBs immunhistochemisch untersucht. Wie aus Abbildung 16 ersichtlich, verändert die LPS nicht die sarkomere Struktur der Kardiomyozyten. Allerdings zeigten Western-Blot Analysen (Abb. 17) der α -Actinin Proteinexpression, dass LPS zu einer Dosis-abhängigen Induktion von α -Actinin führte, die bei LPS Konzentrationen von 1 μ g/ml und 5 μ g/ml statistische Signifikanz erreichte.

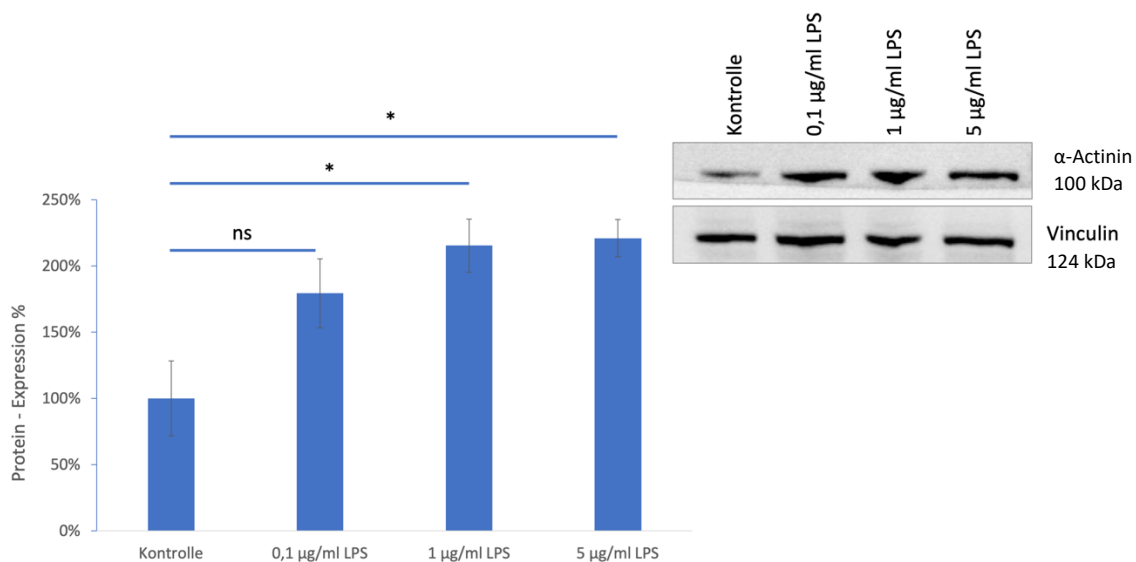


Abbildung 17: Auswirkungen von LPS auf die Proteinexpression von α -Actinin

Western-Blot-Analyse von α -Actinin. Als Beladungskontrolle wurde Vinculin verwendet. Das Säulendiagramm zeigt die prozentual zur Kontrolle berechneten Mittelwerte \pm SD von $n = 3$ Experimenten; * $P < 0,05$, statistisch signifikant nach einfaktorierter Anova – Varianzanalyse.

3.5 Einfluss von LPS auf die NO-Generierung von EBs nach Behandlung mit LPS

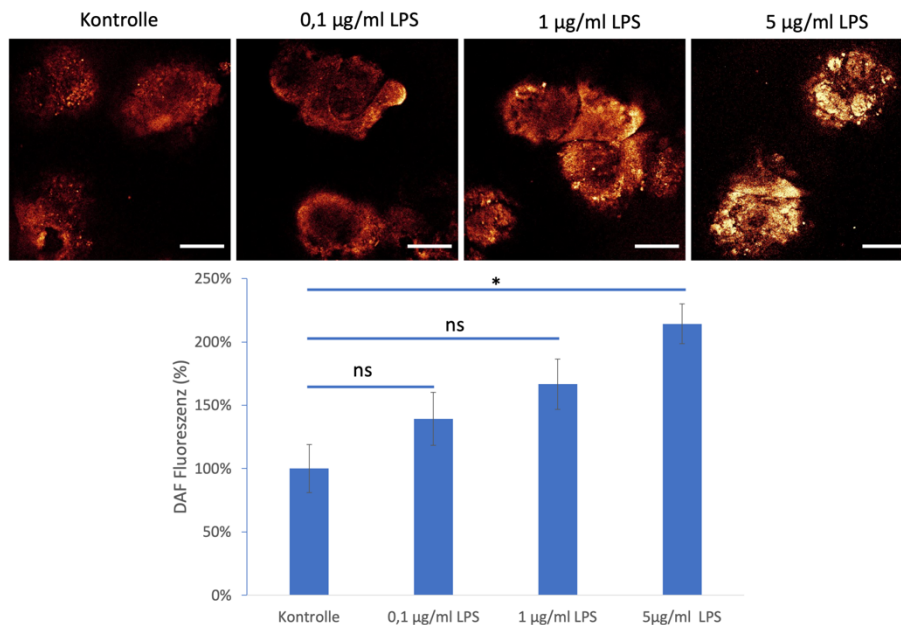


Abbildung 18: Auswirkung von LPS auf die NO-Generierung in EBs

Darstellung der NO-Generierung mittels mikrofluorometrischer Analyse des NO-Indikators DAF-FM in EBs nach Inkubation mit LPS (0,1, 1, 5 µg/ml) für 48 h (Tag 9+2). Gezeigt sind repräsentative EBs. Der Größenmaßstab entspricht 300 µm. Das Säulendiagramm zeigt die prozentual zur Kontrolle berechneten Mittelwerte \pm SD von $n = 3$ Experimenten; * $P < 0,05$, statistisch signifikant nach einfaktorierter Anova-Varianzanalyse.

Aus der Literatur ist bekannt, dass Entzündungsprozesse in Geweben oxidativen und nitrosativen Stress erzeugen können (Anaegoudari, 2015). In der vorliegenden Studie wurde daher zunächst anhand des fluoreszierenden NO Indikators DAF-FM die LPS-induzierte NO-Freisetzung in EBs untersucht (Abb. 19). Es wurde festgestellt, dass eine 48 h Inkubation mit LPS Dosis-abhängig zu einer erhöhten Produktion von NO führte. Ferner konnte gezeigt werden, dass es unter den genannten experimentellen Bedingungen zu einer gesteigerten Expression der NO Synthasen eNOS und phosphorylierter eNOS (p-eNOS) kam (Abb. 19). Der TLR 4 Inhibitor Tak-242 unterdrückte die LPS-induzierte NO-Produktion vollständig (Abb. 20). Auch in der unbehandelten Kontrolle führte Tak-242 zu einer Reduktion der DAF Fluoreszenz, was auf eine Involvierung des TLR 4 Signalwegs in die endogene NO-Generierung von EBs hinweist.

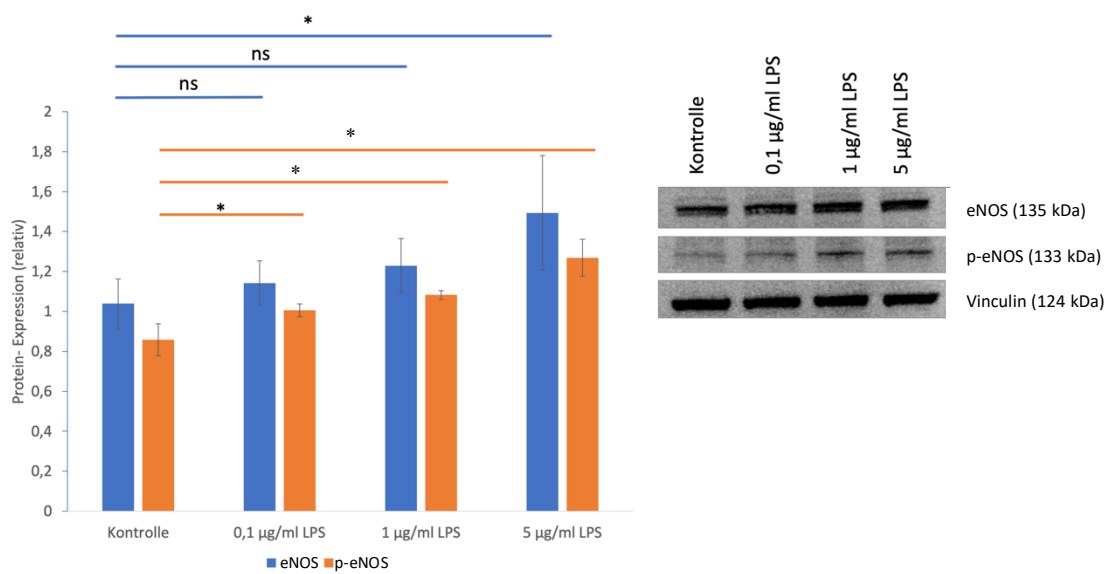
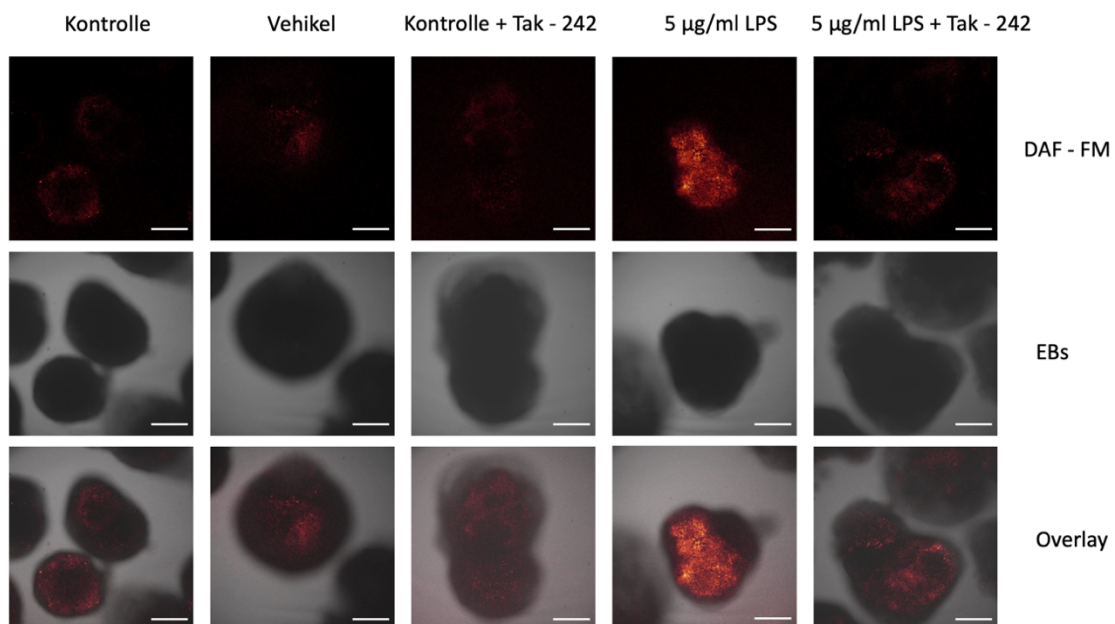


Abbildung 19: Auswirkung von LPS auf die eNOS und p-eNOS Expression in EBs
 Western-Blot-Analyse von eNOS und p-eNOS. Vinculin wurde als Beladungskontrolle herangezogen. Gezeigt sind repräsentative Western-Blots. Das Säulendiagramm zeigt die relativen Mittelwerte \pm SD von $n = 4$ Experimenten; * $P < 0,05$ statistisch signifikant nach einfaktorieller Anova – Varianzanalyse.

(A)



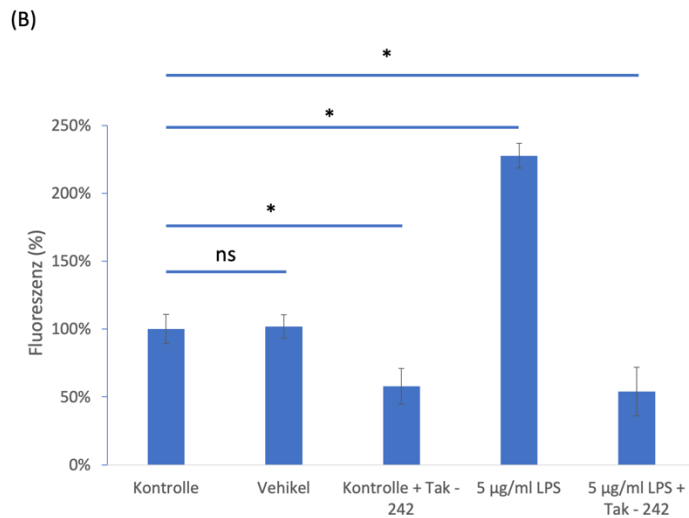


Abbildung 20: Einfluss des TLR 4 Inhibitors Tak-242 auf die LPS-induzierte NO Produktion

(A) Darstellung der NO-Produktion mittels Fluoreszenzmikroskopie in EBs nach Inkubation mit LPS und Tak-242. Gezeigt sind repräsentative EBs. Der Größenmaßstab entspricht 300 µm. (B) Das Balkendiagramm zeigt die prozentual mit der Kontrolle verrechneten Mittelwerte \pm SD von $n = 3$ Experimenten; * $P < 0,05$ mittels einfaktorieller Anova-Varianzanalyse.

3.6 Einfluss von LPS auf die ROS-Produktion von EBs

Inflammation kann das intrazelluläre Redoxmilieu in Geweben verändern. An Tag 11, nach 48 h Inkubation mit LPS, wurde H₂DCF, wie im Kapitel 2.2.7 beschrieben, auf die EBs gegeben und die DCF Fluoreszenz mittels Mikrofluorometrie gemessen. In Abbildung 22 wird gezeigt, dass die ROS Produktion in den EBs mit zunehmender LPS Konzentration zunimmt. Man erkennt, dass bereits eine Konzentration von 0,1 µg/ml LPS einen erkennbaren Unterschied zur Kontrolle aufweist; bei 5 µg/ml LPS wird statistische Signifikanz erreicht. Weiterhin wurde die Protein-Expression von NOX 1, NOX 2 und NOX 4 untersucht. Für alle 3 untersuchten NOX Isoformen konnte eine LPS-vermittelte Expressionssteigerung nachgewiesen werden. NOX 2 wurde bereits in der Kontrolle stark exprimiert und mit zunehmender LPS Konzentration weiter hochreguliert. Die Expression von NOX 1 und NOX 4 stieg im Vergleich zu NOX 2 weniger stark an, erreichte jedoch bei einer Konzentration von 5 µg/ml LPS statistische Signifikanz.

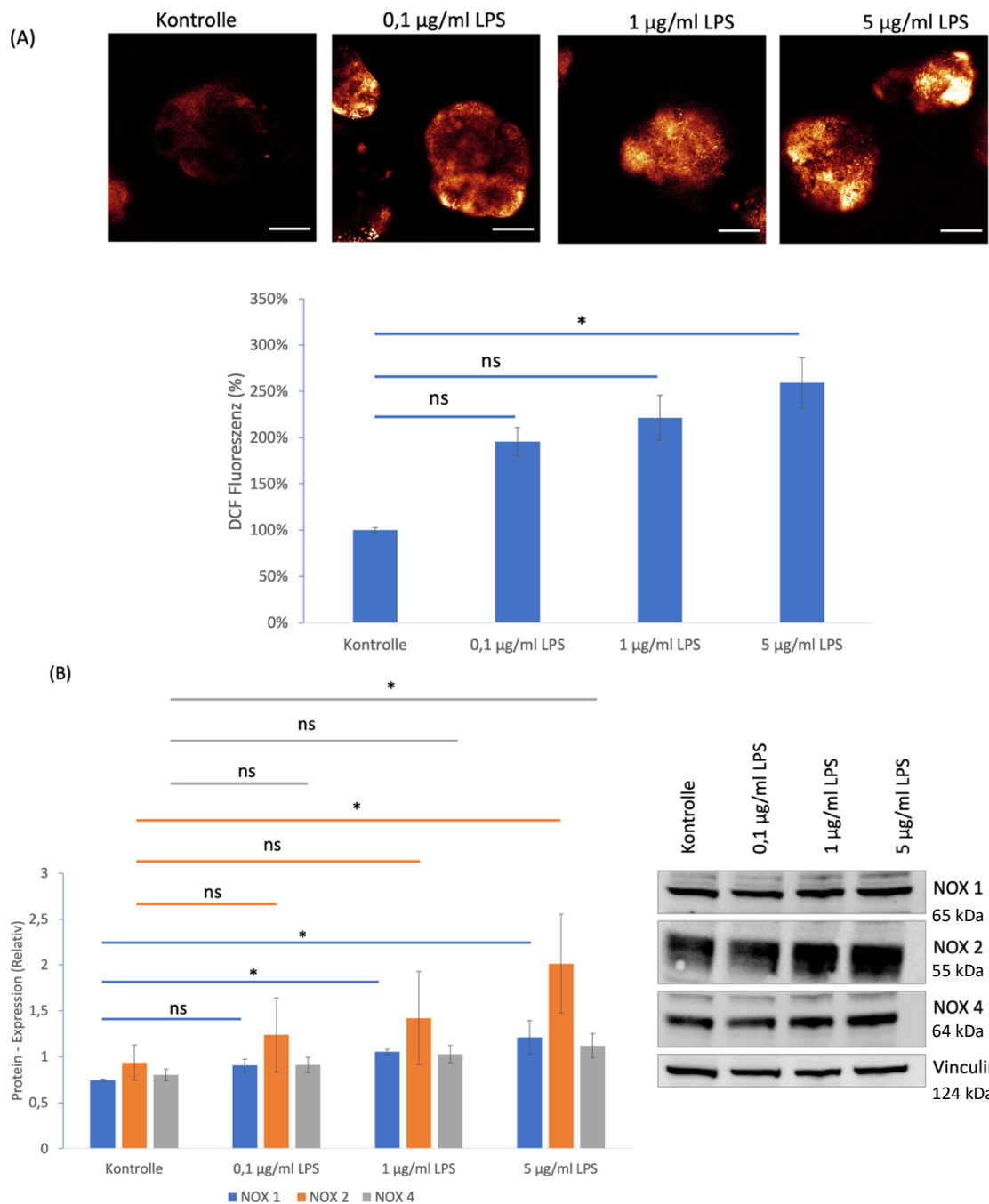


Abbildung 21: Auswirkung von LPS auf die ROS-Produktion in EBs

(A) Darstellung der ROS-Produktion mittels DCF Mikrofluorometrie in EBs nach Inkubation mit LPS. Gezeigt sind repräsentative EBs. Der Größenmaßstab entspricht 300 µm. Das Balkendiagramm zeigt die prozentual mit der Kontrolle verrechneten Mittelwerte \pm SD von n = 3 Experimenten; * P < 0,05 mittels einfaktorieller Anova-Varianzanalyse. (B) Western-Blot Analyse von NOX 1, NOX 2 und NOX 4. Vinculin wurde als Beladungskontrolle herangezogen. Gezeigt sind repräsentative Western-Blots. Das Säulendiagramm zeigt die relativen Mittelwerte \pm SD von n=3 Experimenten; * P < 0,05; mittels einfaktorieller Anova-Varianzanalyse.

Vas 2870 ist ein NADPH-Oxidase-Inhibitor und reduziert die Aktivität der NOX und somit die Bildung von ROS (Li, et al. 2020a). Wie bereits in der Western-Blot Analyse in Abb. 21 gezeigt, ist NOX 2 maßgeblicher Produzent LPS-induzierter ROS. Die signifikant verstärkte ROS-Produktion durch 5 µg/ml LPS wird durch die Ko-Inkubation mit Vas 2870 unter Kontrollniveau gesenkt.

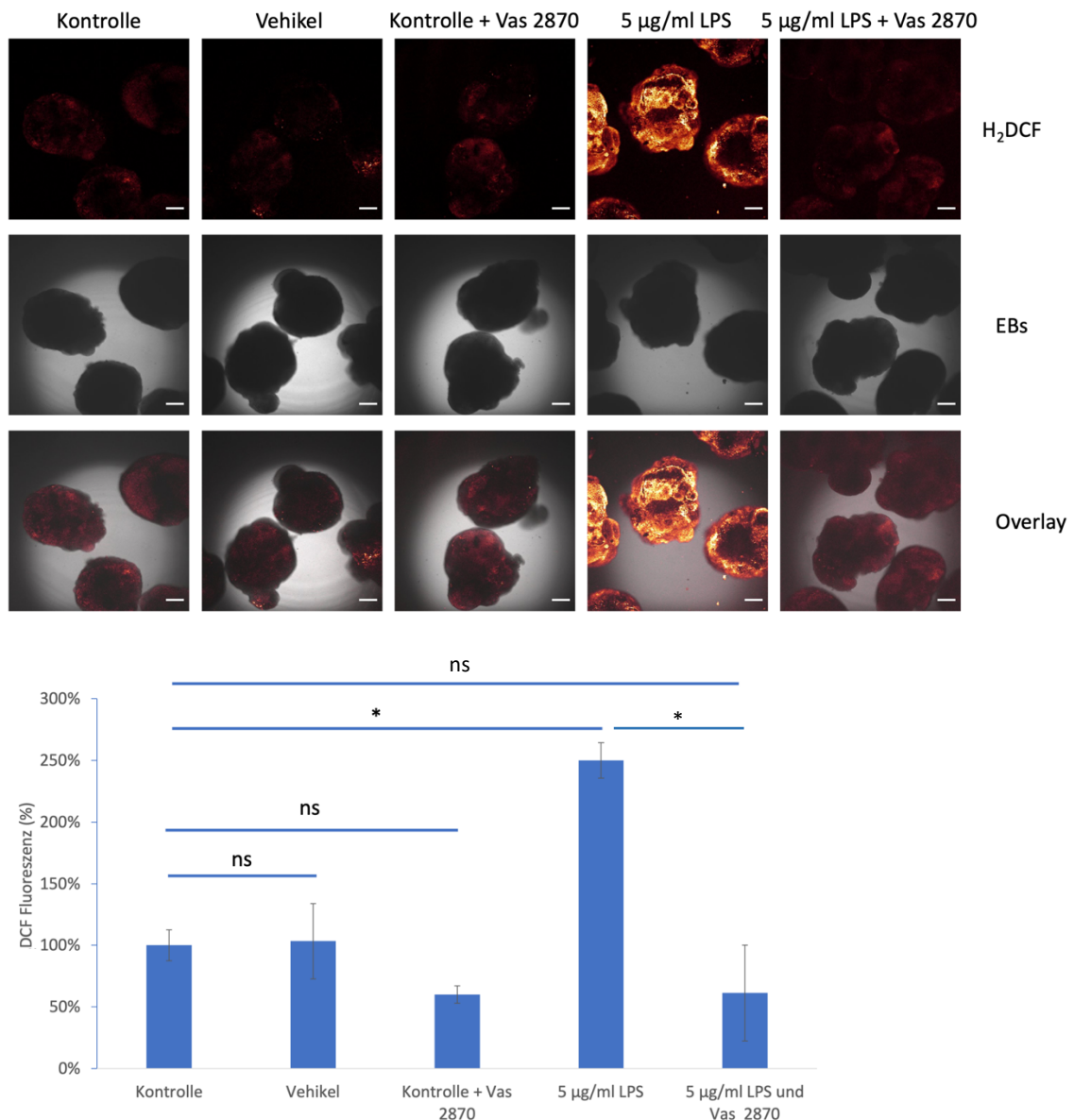


Abbildung 22: Einfluss des NADPH-Oxidase Inhibitors Vas 2870 auf die LPS-induzierte ROS Produktion

(A) Darstellung der ROS-Produktion mittels Mikrofluorometrie des ROS Indikators DCF in EBs nach Inkubation mit LPS und LPS + Vas 2870. Gezeigt sind repräsentative EBs. Der Größenmaßstab entspricht 300 µm. (B) Das Säulendiagramm zeigt die prozentual mit der Kontrolle verrechneten Mittelwerte \pm SD von $n = 3$ Experimenten; * $P < 0,05$ mittels einfaktorieller Anova-Varianzanalyse.

Um den Produktionsort der ROS besser nachvollziehen zu können, wurden mittels MitoSoxRed die ROS in den Mitochondrien dargestellt und anhand des konfokalen Laser-Raster-Mikroskops mikrofluorometrisch untersucht. Erkennbar in Abbildung 23 ist, dass die Fluoreszenz und die Anzahl der aktiven ROS produzierenden Mitochondrien mit steigender LPS-Konzentration zunahm und bei 1 und 5 µg/ml LPS statistische Signifikanz erreichten.

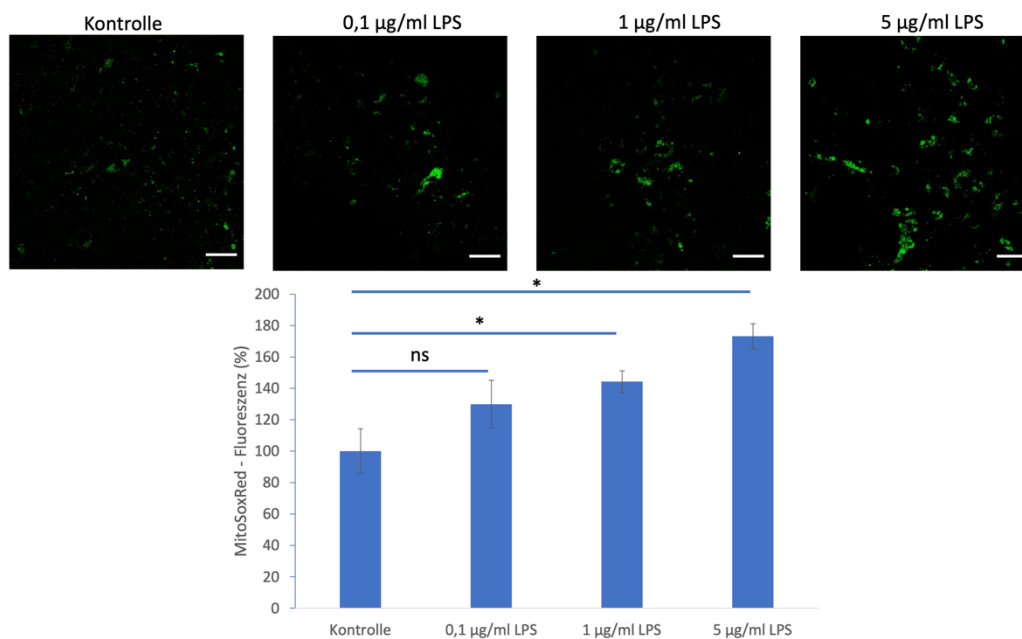


Abbildung 23: ROS Produktion der Mitochondrien in Einzelzellen via MitoSoxRed-Fluoreszenz

Darstellung der ROS-Produktion in Mitochondrien mittels Mikrofluorometrie in EBs nach Inkubation mit LPS. Gezeigt sind repräsentative MitoSoxRed-gefärbte Einzelzellen. Der Größenmaßstab entspricht 50 µm. Das Säulendiagramm zeigt die prozentual mit der Kontrolle verrechneten Mittelwerte \pm SD von n = 3 Experimenten; * P < 0,05 mittels einfaktorieller Anova-Varianzanalyse.

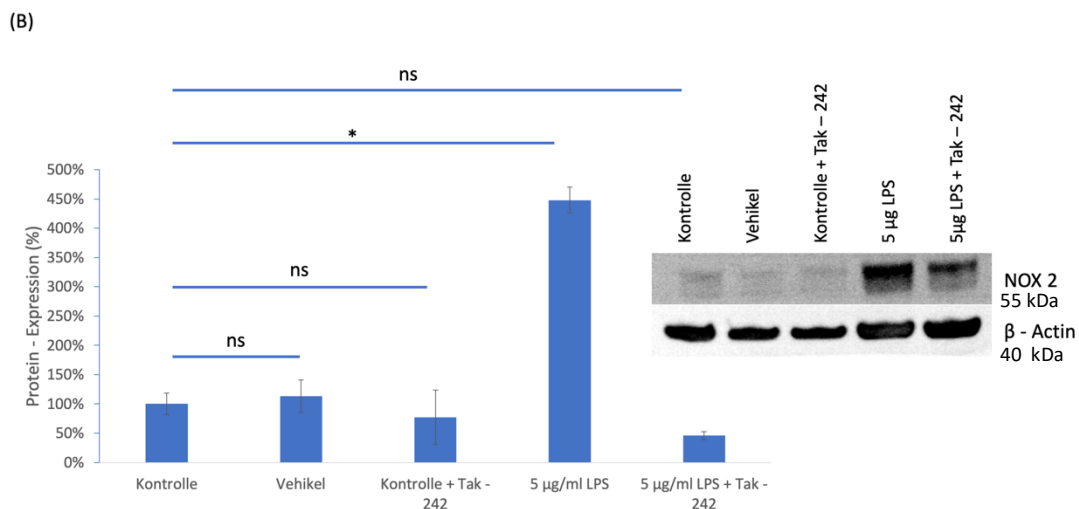
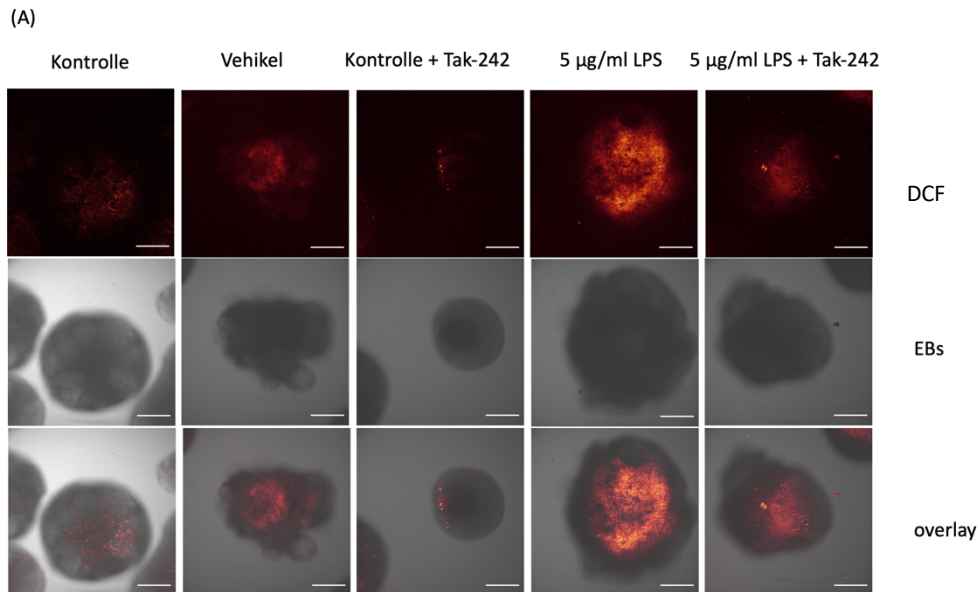


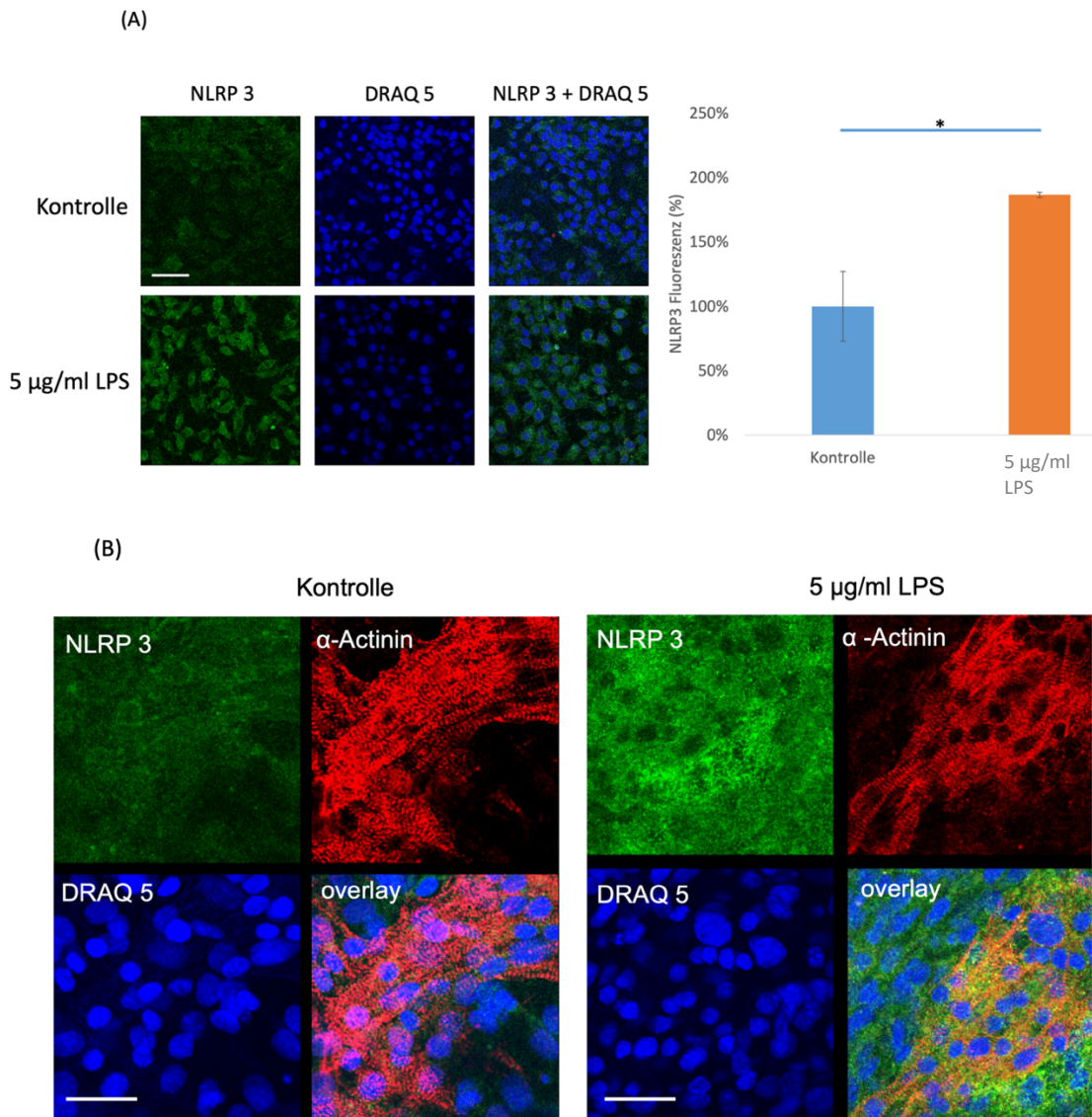
Abbildung 24: Auswirkung von des TLR 4 Inhibitors Tak-242 auf die LPS-induzierte ROS Produktion und NOX 2 Expression in EBs

Darstellung der ROS-Produktion mittels DCF Mikrofluorometrie in EBs nach Inkubation mit LPS + Tak-242. Gezeigt sind repräsentative EBs. Der Größenmaßstab entspricht 300 µm. Das Balkendiagramm zeigt die prozentual mit der Kontrolle verrechneten Mittelwerte \pm SD von $n = 3$ Experimenten; * $P < 0,05$ mittels einfaktorieller Anova-Varianzanalyse. (B) Western-Blot Analyse von NOX 2 nach Inkubation mit LPS + Tak-242. β -Actin wurde als Beladungskontrolle verwendet. Gezeigt ist ein repräsentativer Western-Blot. In der Vehikel-Kontrolle wurde das Lösungsmittel DMSO eingesetzt. Das Balkendiagramm zeigt die relativen Mittelwerte \pm SD von $n = 3$ Experimenten; * $P < 0,05$ mittels einfaktorieller Anova-Varianzanalyse.

Die Daten der vorliegenden Studie (Abb. 24B) zeigen, dass die Inkubation mit dem TLR 4 Inhibitor Tak-242 zu einer reduzierten Expression der NOX 2 in den EBs sowohl gegenüber der unbehandelten Kontrolle, als auch den LPS-behandelten Proben führte. Die Herunterregulation der NOX 2 spiegelte sich in einer unter diesen experimentellen Bedingungen reduzierten ROS Produktion wider (Abb. 24B).

3.7 Einfluss von LPS auf das NLRP 3 Inflammasom in EBs

LPS-induzierter Zellstress und die Aktivierung des TLR 4-Signalwegs wirken sich positiv auf die Induktion posttranslationaler Modifikationen von NLRP 3 aus (Bauernfeind, et al. 2009; Thomas, et al. 2009). In Abbildung 25 ist dargestellt, dass das intrazellulär befindliche NLRP 3 durch die Inkubation mit LPS signifikant stärker exprimiert wird. Dies gilt sowohl für die nicht kardialen als auch die kardialen Zell- Bereiche .



(C)

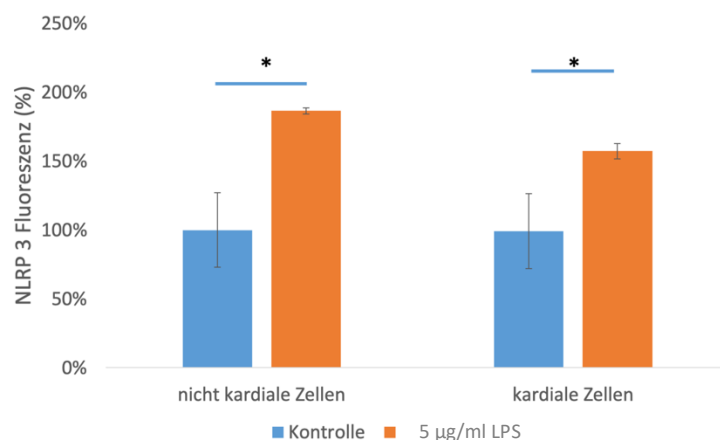


Abbildung 25: Einfluss von LPS auf die Expression des NLRP 3-Inflammasoms in EBs

(A) Immunhistochemische Analyse von NLRP 3 ohne Berücksichtigung der kardialen Zellen. Gezeigt sind repräsentative ausplattierte EBs, die mit einem gegen NLRP 3 gerichteten Antikörper (grün), einem Antikörper gegen α -Actinin (rot) sowie dem Kern-Farbstoff DRAQ 5 (blau) markiert wurden. Der Größenmaßstab entspricht 50 μ m. Das Balkendiagramm zeigt die prozentual zur Kontrolle berechneten Mittelwerte \pm SD von $n = 3$ Experimenten; * $P < 0,05$ mittels einfaktorieller Anova-Varianzanalyse. (B) Immunhistochemische Analyse von NLRP 3 mit Berücksichtigung der kardialen Zellen. Gezeigt sind repräsentative ausplattierte EBs. Der Größenmaßstab entspricht 50 μ m. (C) Das Balkendiagramm zeigt die prozentual zur Kontrolle berechneten Mittelwerte \pm SD von $n = 3$ Experimenten im direkten Vergleich von kardialen und nicht kardialen Zellen; * $P < 0,05$ mittels einfaktorieller Anova – Varianzanalyse.

Der Aufbau des NLRP 3-Inflammasoms und dessen Signaltransduktion ist in Abbildung 6 schematisch dargestellt. Im Zuge der Aktivierung des NLRP 3-Inflammasoms wird die inaktive Pro-Caspase 1 zur aktiven Form Cleaved Caspase 1 gespalten. Dies wurde in der vorliegenden Studie durch Western-Blot Analyse untersucht. Abbildung 26 zeigt anhand eines repräsentativen Western-Blots, dass es nach einer Inkubation mit steigenden Konzentrationen von LPS zu einer Zunahme der Cleaved Caspase 1 Expression kam, die vermutlich auf eine Aktivierung des NLRP 3-Inflammasoms zurückzuführen ist.

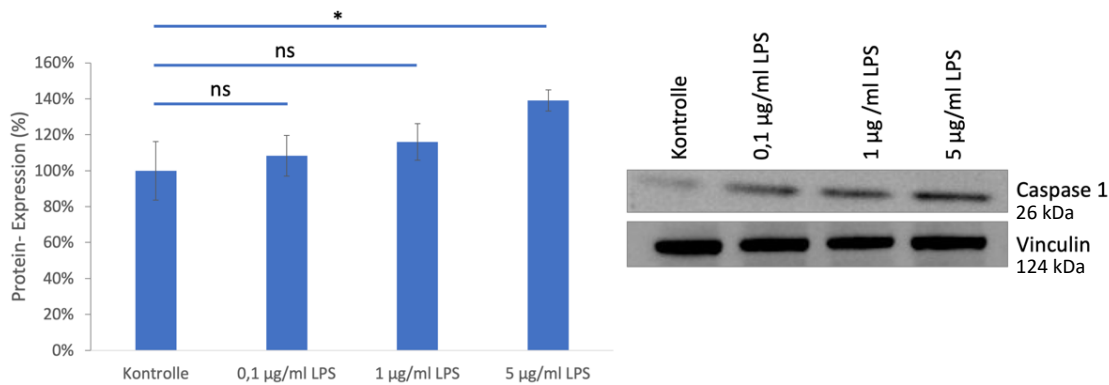


Abbildung 26: Auswirkung von LPS auf die Expression der cleaved Caspase 1
 Western-Blot Analyse der cleaved Caspase 1. Als Beladungskontrolle wurde Vinculin verwendet. Gezeigt ist ein repräsentativer Western-Blot. Das Balkendiagramm zeigt die prozentual zur Kontrolle berechneten Mittelwerte \pm SD von $n = 3$ Experimenten;
 * $P < 0,05$ mittels einfaktorieller Anova – Varianzanalyse.

4 Diskussion

Ziel dieser Arbeit war es, den Einfluss von LPS-induzierten inflammatorischen Prozessen auf die Funktion kardialer Zellen, die Differenzierung von Immunzellen aus embryonalen Stammzellen der Maus und die zugrunde liegenden Signalwege zu untersuchen. Hierbei sollte ein neues Tierversuchs-Ersatzmodell zur Untersuchung inflammatorischer und infektiöser Prozesse erstellt werden.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die CCE Stammzelllinie in der Lage ist, eine inflammatorische Antwort gegenüber der Exposition gegenüber LPS auszuüben. Das Zellmodell reagiert gegenüber LPS mit einem Anstieg der Schlagfrequenz kardialer Zellareale sowie Hochregulation von ROS, NO, Immunzellen und Zytokinen. Es wurden spezifische Marker wie CD 68, CD 69, TLR 4, NLRP 3 und der Zytokinmarker IL 1 β untersucht. Die vorliegende Studie konnte zeigen, dass das Modellsystem EB in der Lage ist, gezielt inflammatorische Prozesse einzuleiten.

In der vorliegenden Studie wurde LPS Konzentrationen zwischen 0,1 µg/ml und 5 µg/ml eingesetzt. In der Literatur werden in *in vivo* Maus Experimenten LPS Konzentrationen von bis zu 10 mg/kg Körpergewicht appliziert, um eine septische Reaktion auszulösen (Park, 2021). Generell sind Mäuse weniger sensitiv gegenüber der Exposition mit LPS im Vergleich zu Menschen, bei denen schon LPS Konzentrationen von 2-4 ng/kg Körpergewicht einen Zytokin-Sturm auslösen können (Preas II, et al. 2001). Kürzlich wurde gezeigt, dass schon sehr niedrige LPS Konzentrationen von 0.0025 und

0.005 ng/ml eine Induktion von TNF α und IL 6 in menschlichen Monozyten induzieren konnte (Chaiwut and Kasinrek 2022). In einer klinischen Studie an Patienten mit Peritonitis-induzierter Sepsis wurden LPS- Plasmakonzentrationen zwischen 20 und 120 pmol/ml mit einem Median von 37,7 pmol/ml beschrieben (Payen, et al. 2021). Hierbei wurde mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie, gekoppelt an ein Tandem Massenspektrometrisches Verfahren (HPLC-MS/MS), der Gehalt an 3-Hydroxymyristat (3HM) der Lipid A-Komponente von LPS bestimmt (Maitra, et al. 1978).

Zu Beginn der Experimente wurde mit dem Letalmarker SytoxGreen eine Zytotoxizität der verwendeten LPS-Konzentrationen auf die EBs ausgeschlossen. Zusätzlich zeigte die Western-Blot Analyse des Apoptose-Markers Caspase 3, dass es bei allen in dieser Studie verwendeten LPS Konzentrationen zu keinem signifikanten Zelltod durch Apoptoseprozesse kam. Prinzipiell scheinen niedrige LPS Konzentrationen das Immunsystem eher zu stimulieren, während hohe Blutkonzentrationen an LPS ein septisches Schocksyndrom auslösen (Virzi, et al. 2022).

In vergangenen Arbeiten wurde bereits die spontane Expression von Immunzellen in der CCE Zelllinie nach LPS Inkubation nachgewiesen (Finkensieper, et al. 2013; Keller, et al. 1993). In der Arbeit von Finkensieper und Bekhite et al. aus dem Jahr 2013 wurde jedoch erst an Tag 18 mit der LPS Inkubation begonnen. In der vorliegenden Arbeit wurden die EBs bereits an Tag 9 bis Tag 15 mit LPS in steigenden Konzentrationen (0,1 μ g/ml, 1 μ g/ml, 5 μ g/ml LPS) konfrontiert, um die zelluläre Immunantwort zu induzieren und zu untersuchen.

LPS ist ein oft verwendeter Entzündungsmediator in der experimentellen Inflammationsforschung. Die erstmalige Isolation und Beschreibung von LPS gelang Hartwell und Shear im Jahre 1943 (Hartwell, et al. 1943). Seither wurde LPS in einer Vielzahl von Studien erforscht und kann mittlerweile von mehreren Firmen isoliert und aufgereinigt erworben werden. Neuen Erkenntnissen zur Folge haben geringere LPS Konzentrationen eine unterschiedliche Immunantwort in Bezug auf die Zytokinexpression und NO-Produktion im Vergleich zu höher konzentriertem LPS (Chae 2018). Es konnte auch in dieser Arbeit nachgewiesen werden, dass die CCE Zelllinie je nach Höhe der zugeführten LPS Konzentration unterschiedlich starke inflammatorische Reaktionen zeigte.

4.1 Einfluss von LPS auf die Schlagfrequenz und der EBs

Die Differenzierung von Kardiomyozyten in EBs wurde bereits im Jahr 1997 von Hescheler et al demonstriert (Hescheler, Fleischmann et al. 1997). Es handelt sich dabei um spontan kontrahierende kardiale Areale, bestehend aus vielen einzelnen Myozyten. Mit der Entwicklung verändern sich diese Areale zu länglichen Kardiomyozyten mit ausgeprägten Myofibrillen (Hescheler, Fleischmann et al. 1997). Die EBs beginnen ab Tag 7 zu kontrahieren und es wurde in der vorliegenden Studie zunächst verglichen, inwiefern die Behandlung mit LPS die Schlagfrequenz und die sarkomere Struktur der Kardiomyozyten beeinflusst. Studien berichten, dass LPS die Herzfrequenz von Mäusen steigert (Takayama, et al. 2005). Tachykardie infolge septischer Ereignisse ist in der Literatur gut beschrieben (Virzi, et al. 2022). Der Signalweg des LPS ist bereits in der Einleitung erläutert worden. Zu den wichtigsten Mediatoren zählen die proinflammatorischen Zytokine, wie TNF α und IL 1 β . Durch sie kommt zu Symptomen wie beispielsweise Fieber und zur myokardialen Suppression. Neben einer Vielzahl von zeitgleich ablaufenden biochemischen Prozessen, steuert der Organismus gegen die proinflammatorischen Zytokine, indem neuronale Mediatoren wie Glukokortikoide, Acetylcholin und Adrenalin produziert werden. Kommt es zu einem septischen Schock, ist eine Verteilungsstörung des Blutvolumens die Folge. Dazu trägt vor allem die Zunahme des venösen Blutpools aufgrund von Vasodilatation im großen Kreislauf bei. Folglich kommt es zur Mikrozirkulationsstörung mit verringerter Perfusion und Sauerstoffaufnahme. Zeitgleich steigt jedoch der Sauerstoffbedarf. Um eine ausreichende Gewebeoxygenierung zu bewahren, folgt ein Anstieg des Herzzeitvolumens durch Katecholaminfreisetzung und eine Zunahme der Herzfrequenz (Hufnagel and Schmitt 2014).

Zusammenfassend von 3 experimentellen Durchläufen lag die Frequenz der EBs an Tag 8 im Schnitt bei ca. 80 Schlägen pro min. Das LPS wurde an Tag 9 mit den EBs koinkubiert. Bereits 24 h Inkubation mit LPS wurde ein signifikanter Anstieg zwischen der Kontrolle und der 1 $\mu\text{g/ml}$ LPS sowie 5 $\mu\text{g/ml}$ LPS Konzentration beobachtet. Im Schnitt schlugen die mit 1 $\mu\text{g/ml}$ LPS behandelten EBs nach 24 h Koinkubation mit LPS 130-mal pro min, das bedeutet eine ca. 60 %-ige Frequenzsteigerung im Vergleich zum Tag vor der LPS-Behandlung. Die EBs, die mit der höchsten Konzentration (5 $\mu\text{g/ml}$ LPS) inkubiert worden waren, zeigten - verglichen mit der Kontrolle - einen prozentualen Anstieg von nahezu 100 % mit einer durchschnittlichen Frequenz von 160 Schlägen pro min. Fairchild

und Saucerman et al zeigten 2009 dagegen anhand eines Endotoxinämie-Mausmodells, dass hochdosiertes LPS (10 mg/kg) bei einigen Mäusen eine Abnahme der Herzfrequenz verursachte (Fairchild, et al. 2009). Dies könnte an der dort verwendeten höheren LPS Konzentration liegen und, dass die Versuche von Fairchild und Saucerman et al. an Mäusen *in vivo* vorgenommen wurden; hier wird die Herzfrequenz zusätzlich durch vegetative Einflüsse reguliert. Weiterhin wurden kürzlich Studien durchgeführt, die zeigten, dass LPS konzentrationsabhängig differenzielle inflammatorische Antworten auslösen kann (Chae 2018). Vorliegende Ergebnisse zeigen ebenfalls konzentrationsabhängige inflammatorische Antworten. Die Schlagfrequenz der EBs, die mit einer Konzentration von 0,1 µg/ml LPS inkubiert wurden, nahm es erst nach 48 h Inkubation mit LPS signifikant zur Kontrolle zu. Man konnte jedoch bereits nach 24 h einen tendenziellen Anstieg erkennen. Dass es zunächst keine Signifikanz zwischen der Kontrolle und der 0,1 µg/ml Probe gab, kann daran liegen, dass die EBs sowohl eine Mindestkonzentration von LPS, als auch eine gewisse Zeit brauchen, um inflammatorisch zu antworten.

Takayama et al zeigten 2005 anhand von isolierten Atrien der Maus, dass LPS-induzierte Zytokine der Grund für einen Anstieg der Schlagfrequenz sind (Takayama, et al. 2005). Es ist bekannt, dass die Kardiomyozyten innerhalb der EBs von einer diskontinuierlichen Basallamina umgeben sind und daher eine zelluläre Verbindung innerhalb der Myozyten und eine elektrische Kopplung aufweisen. Es besteht also eine strukturelle und funktionelle Beziehung zu anderen Zellen sowie extrazellulären Matrixproteinen (Hescheler, et al. 1997). Das wiederum bedeutet, dass eine direkte Kommunikation zwischen den Kardiomyozyten sowie den gebildeten Immunzellen und Zytokinen möglich ist. Zytokine, wie IL 1β, sollen bei der Immunabwehr helfen und zur Eliminierung von möglichen Erregern beitragen. Sie wirken sich aber auch auf die Herzfrequenz aus (Takayama, et al. 2005). Die zunehmende Präsenz von Zytokinen innerhalb der EBs wurde durch Untersuchung der IL 1β Expression experimentell belegt. Einen Hinweis darauf, dass IL 1β, welches in der TLR 4 Signalkaskade generiert wird, in den EBs Ursache für den Anstieg der Herzfrequenz sein könnte, zeigte das Experiment einer Koinkubation von Tak-242 mit LPS. Durch den TLR 4 Inhibitor wurde die Schlagfrequenz der EBs mit der höchsten LPS Konzentration auf Kontrollniveau abgesenkt. Durch das Unterbinden des TLR 4 Signalweges kam es zu einer verminderten Expression von Zytokinen wie IL 1β. In zukünftigen Experimenten sollte daher untersucht werden, ob eine direkte Inkubation der EBs mit IL 1β zu einer Erhöhung der

Kontraktionsfrequenz führt. In der Literatur ist eine Erhöhung der Herzfrequenz bei Ratten *in vivo* nach IL 1 β Infusion beschrieben (Bataillard and Sassard 1994) (Watanabe, et al. 1996).

Weiterhin konnte anhand immunhistochemischer Untersuchung der α -Actinin Lokalisation in sarkomeren Strukturen gezeigt werden, dass das LPS sowohl in niedriger, als auch in höherer Konzentration keinen Einfluss auf die kardiomyokardiale Struktur hat. Allerdings wird in der Literatur beschrieben, dass sich LPS negativ auf die Struktur von Myofibrillen auswirkt (Li, et al. 2013). Auch in den Experimenten von Nežić, Škrbić et al. aus dem Jahr 2018 wurde anhand von Wistar Ratten gezeigt, dass LPS eine strukturelle Desorganisation der Myofibrillen hervorruft (Nežić, et al. 2018). Dagegen zeigte eine Studie, die anhand eines Ratten-Sepsis Modells durchgeführt wurde, dass selbst in einem späten, hypodynamischen Stadium keine auffälligen Veränderungen der kardialen Zellstruktur vorhanden sind (Wang, et al. 1998). Das α -Actinin wird in den Z-Streifen der Sarkomere exprimiert und bildet innerhalb der kardialen Muskelzellen eine gitterartige Struktur, die somit den Muskelapparat stabilisiert (Sjöblom, et al. 2008). Es kann also als Marker verwendet zu werden, um die Struktur von Kardiomyozyten zu untersuchen. In den vorliegenden Versuchen konnte nicht bestätigt werden, dass das LPS eine strukturelle Desorganisation verursacht. Dieses kann unter anderem daran liegen kann, dass die LPS Konzentrationen für dieses Modellsystem zu niedrig waren, um die Struktur der Kardiomyozyten zu beeinflussen. Zusätzlich konnte anhand der Western-Blot Analyse des α -Actinins gezeigt werden, dass es zu einem Anstieg der Proteinexpression kam. Dieses könnte im Zusammenhang damit stehen, dass das LPS in den EBs eventuell eine Größenzunahme an kontraktile Arealen induziert. Ein hypertrophes Zellwachstum von Kardiomyozyten nach LPS Exposition wurde in der Literatur beschrieben (Magi, 2015, Lu, 2015). Kürzlich konnte auch ein Zusammenhang zwischen IL 1 β , dem NLRP 3-Inflammasom und einem hypertrophen Herzen nach Belastung mit mechanischem Stress nachgewiesen werden (Higashikuni, et al. 2023).

4.2 NO-Produktion in LPS behandelten EBs

NO hat bekanntlich eine sehr geringe Halbwertszeit und wird daher stetig neu produziert. In geringen Konzentrationen nimmt es sogar eine schützende Rolle bei Entzündungsprozessen ein (Marion, Coëffier et al. 2003). Die Freisetzung erfolgt unter anderem aus Endothelzellen und wirkt parakrin durch Diffusion. Die kardiovaskuläre Differenzierung der EBs ist bereits gut erforscht (Hannig, et al. 2010; Sauer, et al. 1999);

eine Expression von eNOS wurde in Kardiomyozyten der Maus und aus ES differenzierten Kardiomyozyten nachgewiesen (Bloch, 1999). Weitere NO-Freisetzung erfolgt neben den Endothelzellen zusätzlich über Gewebsmakrophagen (Hsu and Wen 2002). Kleinert und Schwarz fanden im Jahre 2003 heraus, dass LPS über die Expression von Zytokinen, wie IL 1 β , indirekt eine verstärkte Expression von iNOS und Produktion von NO induziert (Kleinert, et al. 2003).

In der vorliegenden Studie wurde untersucht, ob LPS innerhalb der EBs eine gesteigerte eNOS-Expression und NO-Produktion hervorruft (Abb. 18/19). Es konnte gezeigt werden, dass LPS (5 μ g/ml) eine signifikante Zunahme des NOs zur Folge hatte. Ursächlich dafür können sowohl die in dieser Studie beobachtete, LPS-induzierte erhöhte Anzahl von Makrophagen, als auch die verstärkte Expression von Zytokinen sein. Offensichtlich wird die NO-Produktion über den TLR 4 Signalweg reguliert, da der TLR 4 Antagonist Tak-242 hier inhibierend wirkte. Auch wurde durch Tak-242 die Expression des pro-inflammatorischen IL 1 β gehemmt. Über eine Inhibition der Freisetzung von Zytokinen durch Tak-242 wurde zuvor in der Literatur berichtet (Kawamoto, et al. 2008).

4.3 ROS-Produktion in LPS behandelten EBs

ROS werden von NADPH-Oxidasen bei der Reduktion von Sauerstoff zu Wasserstoff gebildet. Hauptproduzenten der ROS sind unter anderem Makrophagen und neutrophile Granulozyten (Babior 2000). NADPH-Oxidasen interagieren mit den Mitochondrien und regulieren so den intrazellulären Redoxstatus. Hierbei können ROS, die innerhalb der mitochondrialen Atmungskette generiert werden, zu einer Aktivierung der NADPH-Oxidasen in der Plasmamembran führen (Dikalov, 2011). LPS stimuliert die NADPH-Oxidasen, sodass ROS vermehrt produziert werden. Hier spielen vor allen Dingen NOX 2 in Endothelzellen (Gandhirajan, et al. 2013, Tu, et al. 2023), aber auch NOX 4 in Makrophagen eine bedeutsame Rolle (Moon, et al. 2016). ROS gelten als entzündungsfördernde Moleküle und sind über den „oxidative burst“ aktiv an der Immunantwort beteiligt. Ebenso gelten die mitochondrialen ROS als wichtige Regulatoren der Entzündungsreaktion des angeborenen Immunsystems (Park, et al. 2015). LPS-induzierte ROS sind zudem wichtig bei der Regulation der IL 1 β Genexpression (Hsu and Wen 2002) sowie bei IL-1 β -vermittelten Signalkaskaden (Javali, 2023).

In neueren Studien von Li und Wang et al. wird vermehrt vorkommendes freies Eisen in Kardiomyozyten auf Grund erhöhter, LPS-induzierter, ROS-Produktion beschrieben (Li, et al. 2020b). Sie zeigten in ihren Versuchen, dass LPS (10 mg/kg) an *in vivo* injizierten Mäusen eine Zunahme der ROS-Produktion zur Folge hatte. In den Versuchen der vorliegenden Arbeit wurde die ROS-Produktion nach 48 h Inkubation mit LPS untersucht und festgestellt, dass bereits nach kurzer Zeit eine gesteigerte Expression der NADPH-Oxidasen zu verzeichnen war. Die Western-Blot Analyse ergab, dass im verwendeten Zellmodell vermutlich die NOX 2 einen großen Anteil der ROS Produktion übernimmt. NOX 4 und NOX 1 hatten gegenüber der NOX 2 nur einen leichten Anstieg in der Proteinexpression. Die Hochregulierung der NOX 2 gilt als ein bekannter Schlüsselregulator der unspezifischen Wirtsabwehr in EBs (Berger, et al. 2010). Darüber hinaus wurde in einer Studie von Finkensieper et al. aus dem Jahr 2013 die antibakterielle Wirkung von EBs durch NOX 2 in knock-down Experimenten bewiesen (Finkensieper, et al. 2013). Mit Vas 2870, einem NOX Inhibitor, wurde die Vermutung, dass NOX Enzyme in den EBs an der Generierung von ROS beteiligt sind, bestätigt. Dieses Experiment zeigte, dass die Koinkubation von LPS mit Vas 2870 eine signifikant reduzierte ROS Produktion nach sich zog.

Die H₂DCF-Messungen analysierten die zytoplasmatischen ROS im Gewebe. Um hier noch weiter ins Detail zu gehen, wurde zusätzlich ein Experiment mit dem mitochondrialen ROS Indikator MitoSoxRed in Einzelzellen der EBs durchgeführt. Diese Färbung macht es möglich, nur die aus Mitochondrien stammenden ROS (mtROS) zu untersuchen. Es wurde eine Zunahme von mtROS mit steigender LPS Konzentration festgestellt. Dies weist darauf hin, dass sowohl NADPH-Oxidasen, als auch Mitochondrien an der LPS-induzierten ROS Generierung beteiligt sind und legen eine funktionelle Interaktion zwischen Mitochondrien und NADPH Oxidasen nahe. Es sollte hier erwähnt werden, dass die ROS Analyse in der vorliegenden Studie nicht zwischen Kardiomyozyten und Nicht-Myozyten unterschieden konnte.

Weiterhin wurde eine Western-Blot Analyse der NOX 2 nach Inkubation mit LPS + Tak-242 durchgeführt. Der TLR 4 Inhibitor unterdrückte den inflammatorischen Prozess in den EBs und führte zu einer reduzierten Expression der NOX 2. Da die ROS auch zu einem großen Teil von Makrophagen und neutrophilen Granulozyten gebildet werden, kann vermutet werden, dass es durch Tak-242 zu einer verminderten Bildung dieser Immunzellen kommt. LPS-induzierte ROS spielen auch bei der Genregulation des IL 1 β und seiner Funktion eine große Rolle (González-Carnicero, 2023, Liu, 2023). In der

immunhistochemischen Analyse des IL 1 β Zytokins zeigte sich in der vorliegenden Studie nach Tak-242 Inkubation eine signifikante Abnahme der IL 1 β Expression. Dies weist auf eine schon in der Literatur beschriebene Regulation der IL 1 β Expression durch den TLR 4 Signalweg hin (Sha, et al. 2007). Die parallel beobachtete reduzierte NOX 2 Expression und die verringerte Produktion der ROS spielen dagegen wahrscheinlich eine untergeordnete Rolle.

4.4 Inflammatorische Reaktion der EBs auf LPS

In den Experimenten von Hannig et al aus dem Jahre 2010 wurden EBs von Tag 8 bis Tag 10 mit 0,01; 0,1; 1; 10 und 100 ng/ml LPS inkubiert (Hannig, et al. 2010). Hier wurde bestätigt, dass die mRNA Expression für CD 14, eines LPS-Rezeptors, mit steigender LPS Konzentration zunimmt. In Abb. 4 der vorliegenden Studie ist die Einbindung des CD 14 Rezeptors in den LPS-induzierten und TLR 4 vermittelten Signalweg schematisch aufgezeigt. In dieser Arbeit wurde das CD 14 nicht explizit untersucht. Bezogen wurde sich hier auf die CD 14 nachgeschaltete Signalkaskade über TLR 4, der Aktivierung des NLRP 3-Inflammasoms und letztendlich auf die Freisetzung des Zytokins IL 1 β .

4.4.1 Aktivierung des TLR 4 Rezeptors

Der TLR 4 ist einer der Hauptrezeptoren, die in der Lage sind, LPS über die Erkennung der Lipid – A Komponente zu binden (Poltorak, et al. 1998). Neueste Studien befassen sich mit der Internalisierung und dem intrazellulären Transport von TLR 4 und CD 14 nach Infektion mit LPS (Ciesielska, et al. 2021). Am häufigsten exprimiert ist TLR 4 auf Makrophagen und dendritischen Zellen, aber auch in einigen Nicht-Immunzellen wie Endothelzellen (Kawai and Akira 2005) und Herzzellen (Theobald, 2023). CD 14 erleichtert die Aktivierung des TLR 4 durch LPS und wird von den meisten myeloischen Zellen exprimiert (Mahnke, et al. 1997).

Taylor und Kim et al konnten keine TLR 4 Expression in den ES Zelllinien CGR8, E14 und R1 nachweisen (Taylor, et al. 2010). Dagegen konnte in der vorliegenden Arbeit anhand einer Western-Blot Analyse eine TLR 4 Proteinbande in der CCE ES Zelllinie lokalisiert werden (Abb. 13).

Wie bereits erwähnt wird TLR 4 auch auf Kardiomyozyten exprimiert. Fallach et al. zeigten 2010 anhand von Wildtyp Mäusen, dass LPS eine reduzierte Herzfunktion und

eine gesteigerte TNF α und IL 1 β Expression auslöste. Außerdem wurde in TLR 4 Knockout Mäusen eine abgeschwächte Entzündungsreaktion nachgewiesen (Mian, et al. 2019). Zu erwähnen ist hier, dass in den Studien von Mian, He et al. von 2019 eine sehr viel höhere Konzentration an LPS im Vergleich zur vorliegenden Studie verwendet wurde. In den EBs führte die verwendete maximale LPS Konzentration von 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ zu keiner reduzierten Kontraktilität in den Kardiomyozyten, ein Anstieg der IL 1 β Expression konnte jedoch ebenfalls in den EBs festgestellt werden (Abb. 17).

4.4.2 Aktivierung des NLRP 3-Inflammasoms

Die Aktivierung des NLRP 3-Inflammasoms trägt zu Wirtsabwehr gegen mikrobielle Infektionen bei. Es ist sehr bedeutend, dass dieser Signalweg genau reguliert wird, da eine Fehlregulation an der Pathogenese mehrerer entzündlicher Erkrankungen beteiligt ist (Swanson, et al. 2019b). Das NLRP 3, ein intrazellulärer Sensor für endogene Gefahrensignale, sorgt mit der Caspase 1-abhängigen Freisetzung von IL 1 β für eine proinflammatorische Antwort innerhalb der EBs. Die vorliegende Studie zeigt, dass das intrazelluläre NLRP 3 nach Inkubation mit LPS sowohl in nicht kardialen als auch in kardialen Bereichen signifikant zunahm. Die Aktivierung des NLRP 3-Inflammasoms wird vermutlich größtenteils durch den TLR 4 Signalweg aktiviert (Biasucci, et al. 2017) Zuvor wurde von Swanson und Deng et al aufgezeigt, dass das NLRP 3-Inflammasom auch von mtROS aktiviert wird (Swanson, et al. 2019b). In den EBs kommt es nach Inkubation mit LPS auch zu einer Zunahme an mtROS; diese könnten daher Mitauslöser der Inflammasom-Aktivierung sein. Jedoch ist die Rolle der mtROS in Hinblick auf das NLRP 3-Inflammasom bisher noch umstritten. Eine kürzlich erschienene Studie weist allerdings darauf hin, dass die mitochondriale Atmungskette für die Aktivierung des NLRP 3-Inflammasoms mitverantwortlich ist, da die Inflammasom Aktivierung durch Komplex I, II, III und V Inhibitoren verhindert werden konnte (Billingham, 2022). Mehrere Studien belegen, dass die NLRP 3-Inflammasom Aktivierung in der Maus nicht durch genetische oder pharmakologische Hemmung der NADPH-Oxidasen beeinflusst wird (Hornung, et al. 2008; Zhong, et al. 2013). Andere Studien wiederum zeigen, dass ROS bei der NLRP 3 Aktivierung unentbehrlich sind (Muñoz-Planillo, et al. 2013). Das NLRP 3-Inflammasom wird zunächst durch das sogenannte Priming über den TLR 4 Signalweg aktiviert. Bestandteile des NLRP 3 Komplexes wie PYCARD, Caspase 1 sowie Pro-IL 1 β werden nach TLR 4 Aktivierung hochreguliert (Fu, 2023). Durch das Priming wird auch der Makrophagenstoffwechsel von der oxidativen Phosphorylierung

zur Glykolyse verschoben und es folgt eine Erhöhung der IL 1 β Gentranskription. Die Mitochondrien produzieren jedoch kontinuierlich ROS als Nebenprodukt der oxidativen Phosphorylierung (Swanson, et al. 2019b). Swanson, Deng et al. zeigten anhand von Mitophagie-Inhibitoren, welche die natürliche Eliminierung von hochaktiven Mitochondrien unterbrechen, dass die gesteigerten mtROS eine Aktivierung des NLRP 3-Inflammasoms hervorrufen (Swanson, et al. 2019b). In den EBs führte der LPS-induzierte zelluläre Stress ebenfalls zu einer Zunahme der mtROS und es kam zu einem Anstieg der aktivierten Caspase 1 und der IL 1 β Expression (Abb. 25/26). Ob nun die mtROS verantwortlich sind, lässt sich an dieser Stelle nur vermuten und muss in zukünftigen Studien untersucht werden.

Andere Studien, in denen mit mtROS – Inhibitoren gearbeitet wurde, zeigten wiederum, dass diese zwar den Priming – Schritt blockierten, aber nicht die Aktivierung des NLRP 3-Inflammasoms (Bauernfeind, et al. 2011). Ähnliches zeigten Childers und Perry et al. 2021. Mitotoxine störten zwar die transkriptionelle Reaktion von Makrophagen der Maus auf LPS; es kam aber dennoch zu einer inflammatorischen Aktivierung des NLRP 3. Offensichtlich führen unterschiedliche Reaktionsmuster zu funktionellen Veränderungen in der Entzündungsreaktion und zu einer zeitlich verlängerten Entzündungsreaktion (Childers, et al. 2021). Einen anderen Ansatz hatten Zhong et al im Jahr 2018. Sie zeigten, dass durch TLR Signale neu synthetisierte mitochondriale DNA (mtDNA) oxidiert wird und dieses für die Aktivierung des NLRP 3-Inflammasoms benötigt wird (Zhong, et al. 2018).

Es ist wahrscheinlich, dass die mtROS und mtDNA die NLRP 3 Expression in den EBs positiv beeinflussen, jedoch nicht obligat für die Hochregulation des NLRP 3 Komplexes sind. Über die genaue Funktion der mtROS und mtDNA in Bezug auf das NLRP 3-Inflammasom wird derzeit in viele Richtungen geforscht; die involvierten Signalwege sind jedoch noch nicht abschließend aufgeklärt. Es ist jedoch zu bemerken, dass vor allem mtROS einen positiven Einfluss auf den Verlauf einer Entzündung haben. Fakt ist, dass das Zellmodell der CCE-Stammzelllinie fähig ist auf das LPS mit einer Aktivierung des NLRP 3-Inflammasoms zu reagieren. Dabei scheint es keine signifikant höhere Expression des NLRP 3 innerhalb von Kardiomyozyten im Vergleich zu den übrigen benachbarten Zellen zu geben (Abb. 23). Es kommt sowohl in kardialen als auch nicht kardialen Bereichen zu einem signifikanten Anstieg des NLRP 3-Inflammasoms.

4.4.3 Freisetzung von IL 1 β innerhalb der EBs

Die Expression des Zytokins IL 1 β wurde immunhistochemisch untersucht. Es konnte eine signifikante Zunahme der Expression des Zytokins gezeigt werden. Im Western-Blot wurde eine Bande für die aktive und inaktive Form des IL 1 β dargestellt, wobei die inaktive Form in allen Konzentrationen vergleichbar stark exprimiert ist. Die aktive Form stieg jedoch mit zunehmender Konzentration von LPS an (Palsson-McDermott, 2015).

4.5 Einfluss von LPS auf die Immunzellendifferenzierung der EBs

Wartenberg et al zeigten 2013 anhand von lebenden E. coli, die an Tag 18 mit den EBs koinkubiert worden waren, dass diese in den EBs eine zelluläre Immunantwort auslösten (Finkensieper, et al. 2013). In früheren Experimenten von Hannig und Figulla wurde aufgezeigt, dass die EBs durch Inkubation mit LPS funktionelle Makrophagen, also CD 68⁺ Zellen, exprimierten (Hannig, et al. 2010). In den neuesten Studien wurde untersucht, inwiefern Makrophagen Neutrophile und T – Zellen modulieren und inwieweit dies Folgen für Gesundheit und Krankheit haben kann (Schulz, Petzold et al. 2021). Innerhalb der EBs kam es in der vorliegenden Studie nach der Behandlung mit LPS zu einer gesteigerten Produktion an ROS, die unter anderem auch von Makrophagen produziert werden. Dieser „oxidative burst“ sorgt dafür, dass Neutrophile aktiviert werden. Zusätzlich steigt die Zytokinproduktion des IL 1 β , was wiederum für eine Aktivierung von weiteren Immunzellen sorgt. Da gerade mtROS in allen lebenden Zellen generiert werden und ROS Zellmembranen durchdringen können, kann aus den Daten der vorliegenden Studie nicht geschlossen werden, dass die ROS ausschließlich in Immunzellen entstehen. Auch wäre es möglich, dass das LPS-induzierte, veränderte Redox-Milieu des Gewebes, zu einer Induktion der Differenzierung bzw. Proliferation von Immunzellen beiträgt (Gostner, 2013, (Kesarwani, et al. 2013).

Die Resultate dieser vorliegenden Arbeit zeigen, dass die von Tag 9 bis Tag 9 + 6 behandelten EBs bereits im frühen Stadium Immunzellen, wie Makrophagen und aktivierte T-Zellen exprimierten. Die Inkubation der EBs mit LPS führte zu einer signifikanten Steigerung der CD 68 und CD 69 Proteinexpression und der Anzahl CD 68⁺ und CD 69⁺ Zellen. CD 68 ist ein etablierter Zellmarker für Monozyten und Makrophagen. CD 69 ist unter anderem ein früher Aktivierungsmarker für T-Zellen und NK-Zellen. In früheren Studien wurde gezeigt, dass es bei LPS-Behandlung in

Makrophagen des Knochenmarks von Mäusen zu einer Induktion von CD 69 kam, während eine konstitutive Expression nicht gezeigt werden konnte (Marzio, et al. 1997). Die Daten der vorliegenden Studie können daher nicht mit Sicherheit beweisen, dass es sich bei den CD 68⁺ und CD 69⁺ Zellen um unterschiedliche Zellpopulationen handelt. Um die Differenzierung/Proliferation von T-Zellen bzw. NK-Zellen detaillierter zu untersuchen, müssten zusätzliche CD Marker in die Analyse mit einbezogen werden, z. B. CD 3 und CD 8 für zytotoxische T-Zellen, CD 8 und CD 28 für zytotoxisch aktive T-Zellen sowie CD 16 und CD 56 für NK Zellen (Wieland and Shipkova 2016). Diese Untersuchungen bleiben jedoch zukünftigen Studien vorbehalten.

5 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde der Einfluss von LPS auf inflammatorische Prozesse in Geweben aus ES der Maus untersucht. LPS sorgt innerhalb der EBs für eine signifikante Zunahme der Schlagfrequenz, ohne dabei die muskuläre Struktur der Kardiomyozyten zu verändern.

Es konnte gezeigt werden, dass durch Inkubation mit LPS, Parameter wie ROS und NO in den EBs hochreguliert wurden. Anhand des NADPH-Oxidase Inhibitors Vas 2870 und Western-Blot Analyse konnte nachgewiesen werden, dass die ROS Quelle hauptsächlich die NOX 2 Isoform der NADPH-Oxidase ist. NOX 1 und NOX 4 wurden zwar auch verstärkt exprimiert, scheinen aber eine eher untergeordnete Rolle zu spielen. Durch den TLR 4 Inhibitor Tak-242 konnte gezeigt werden, dass NOX 2 in den LPS behandelten EBs signifikant zur Kontrolle herunterreguliert wird. Dies beweist eine Involvierung des TLR 4 Signalwegs in die LPS-induzierten Veränderungen des intrazellulären Redoxmilieus.

Es ist bekannt, dass LPS über verschiedene Signalwege auch die NO-Synthasen stimuliert. In den EBs zeigte sich LPS-vermittelt eine erhöhte NO-Produktion. Eine gesteigerte Expression der p-eNOS und eNOS in den EBs wurde via Western-Blot nachgewiesen. Durch die Koinkubation mit Tak-242 wurde die NO-Generierung in den EBs nahezu gänzlich inhibiert.

Weiterhin wurden durch die Koinkubation mit LPS, Makrophagen und andere aktivierte Immunzellen signifikant stärker differenziert. Es konnte zudem eine gesteigerte Expression des NLRP 3-Inflammasoms gezeigt werden, jedoch wurde hier kein signifikanter Unterschied zwischen kardialen und nicht kardialen Bereichen der EBs gefunden. Weiterhin kam es zu einer signifikant höheren Expression des proinflammatorischen Zytokins IL 1 β . Tak-242 inhibierte die IL 1 β -Expression in den LPS behandelten EBs, außerdem die LPS-induzierte Kontraktionsfrequenz der kardialen Zellen. Dies beweist die Involvierung des TLR 4 Signalwegs in die beobachteten inflammatorischen Vorgänge in EBs und die Veränderungen der Kardiomyozytenfunktion.

6 Summary

In this study, the influence of LPS on inflammatory processes in tissues derived from mouse ES cells was investigated. Within EBs, LPS led to a significant increase in beating frequency without altering the muscular structure of cardiomyocytes.

It was demonstrated that incubation with LPS upregulated parameters such as ROS and NO in the EBs. Using the NADPH oxidase inhibitor Vas 2870 and Western-Blot analysis, it was confirmed that the ROS source was primarily the NOX 2 isoform of NADPH oxidase. While NOX 1 and NOX 4 were also upregulated, they appeared to play a relatively subordinate role. The TLR 4 inhibitor Tak-242 revealed a significant downregulation of NOX 2 in LPS-treated EBs, providing evidence of the involvement of the TLR 4 signaling pathway in LPS-induced changes in the intracellular redox milieu.

LPS is known to stimulate NOS through various signaling pathways. In EBs, LPS-mediated increased NO production was observed, accompanied by elevated expression of phosphorylated p-eNOS and eNOS as confirmed by Western-Blot analysis. Co-incubation with Tak-242 nearly completely inhibited NO generation in the EBs.

Furthermore, co-incubation with LPS resulted in significantly enhanced differentiation of macrophages and other activated immune cells. An increased expression of the NLRP3 inflammasome was demonstrated, with no significant difference between cardiac and non-cardiac regions of the EBs. Additionally, a significantly higher expression of the proinflammatory cytokine IL 1 β was observed. Tak-242 inhibited IL 1 β expression in LPS-treated EBs, as well as the LPS-induced contraction frequency of cardiac cells. This provides evidence for the involvement of the TLR 4 signaling pathway in the observed inflammatory processes in EBs and the alterations in cardiomyocyte function.

7 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Geräte	20
Tabelle 2: Instrumente	21
Tabelle 3: Chemikalien	22
Tabelle 4: Zellkulturmedien und Komponenten	23
Tabelle 5: Verwendete Inhibitoren	24
Tabelle 6: Im Western-Blot verwendete Antikörper	35
Tabelle 7: Immunhistochemisch untersuchte Antikörper und Kernfärbung	38

8 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematischer Aufbau eines Lipopolysaccharids	2
Abbildung 2: Schematische Darstellung des LPS – Signalweges	4
Abbildung 3: NOX Isoenzyme	5
Abbildung 4: Schematische Darstellung der LPS - induzierten TLR 4 Dimerisierung	8
Abbildung 5: Tak-242 Wirkung am TLR 4	9
Abbildung 6: Schema zur Aktivierung des NLRP 3-Inflammasoms	10
Abbildung 7: Gewinnung und Kultur von ES Zellen	12
Abbildung 8: Bildungsweg hämatopoetischer Stammzellen der Maus	13
Abbildung 9: Mögliche Differenzierungswege von hämatopoetischen Stammzellen	15
Abbildung 10: Abfolge der ES-Zellkultur und Inkubation mit LPS	30
Abbildung 11: Schematische Abbildung zum Proteintransfer im Western-Blot Verfahren	32
Abbildung 12: Zytotoxizität von LPS	43
Abbildung 13: Auswirkung von LPS und LPS + Tak-242 auf die TLR 4 und IL 1β Expression und die Anzahl von IL 1β⁺ Zellen	45
Abbildung 14: Einfluss von LPS auf die Anzahl von CD 68⁺ und CD 69⁺ Zellen in EBs sowie die CD 68 und CD 69 Proteinexpression	47
Abbildung 15: Auswirkung von LPS auf die Kontraktionsfrequenz von EBs	47
Abbildung 16: α-Actinin Struktur in unbehandelten und LPS-behandelten Kardiomyozyten	49
Abbildung 17: Auswirkungen von LPS auf die Proteinexpression von α-Actinin	49
Abbildung 18: Auswirkung von LPS auf die NO-Generierung in EBs	49
Abbildung 19: Auswirkung von LPS auf die eNOS und p-eNOS Expression in EBs	50
Abbildung 20: Einfluss des TLR 4 Inhibitors Tak-242 auf die LPS-induzierte NO Produktion	51
Abbildung 21: Auswirkung von LPS auf die ROS Produktion in EBs	52
Abbildung 22: Einfluss des NADPH Oxidase Inhibitors VAS 2870 auf die LPS-induzierte ROS Produktion	53
Abbildung 23: ROS Produktion der Mitochondrien in Einzelzellen via MitoSoxRed-Fluoreszenz	54
Abbildung 24: Auswirkung von des TLR 4 Inhibitors TAK-242 auf die LPS-induzierte ROS Produktion und NOX 2 Expression in EBs	55
Abbildung 25: Einfluss von LPS auf die Expression des NLRP 3 Inflammasoms in EBs	57
Abbildung 26: Auswirkung von LPS auf die Expression der cleaved Caspase 1	59

9 Abkürzungsverzeichnis

ASC	Apoptose-assoziiertes fleckenähnliches Protein
BSA	Bovines-Serum-Albumin
°C	Grad Celsius
ca.	circa
CARD	Caspase-Rekrutierungsdomäne
CD	cluster of differentiation
CD 68	intrazelluläres Glykoprotein in Makrophagen
CD 69	Rezeptorprotein von aktivierten Leukozyten wie T-Zellen, Thymozyten, B-Zellen, NK-Zellen, Neutrophile und Eosinophile
CO ₂	Kohlendioxid
Cy 3	Indocarbocyanin 3
Cy 5	Indodicarbocyanin 5
BSA	bovines Serumalbumin
d. h.	das heißt
DAF	3 – Amino – 4 – Aminomethyl – 2',7' – Difluoroflorescein Diacetat
DAMPs	Schadenassoziierte molekulare Muster
DMEM	Dulbecco's Modified Eagles Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DRAQ 5	1,5-bis {[2-(Di-Methylamino)ethyl]amino}-4,8-Dihydroxyanthracene – 9, 10 Diano
DUOX	Duale Oxidase
EB	Embryonalkörperchen (Embryoid Body)
Enos	Endothiale Stickstoffmonoxid – Synthase

ECL	verstärkte (enhanced) Chemilumineszenz
EMFI	Embryonales – Fibroblasten – Medium
eNOS	endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase
ES	Embryonale Stammzellen
FCS	Fetales Kälber - Serum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
g	Beschleunigung 1 g = 9,81 m/s ²
ggf	gegebenenfalls
h	Stunde
H ₂ DCF	fluoreszierendes 2', 7'-Dichlorofluoreszein
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HiFCS	hitzeinaktiviertes FCS
HRP	Meerrettich – Peroxidase
HSC	Hämatopoetische Stammzellen
IgG	Immunglobulin der Klasse G
IHC	Immunhistochemie
IL 1 β	Interleukin 1 β
IMDM	Iscoves Modified Dulbecco's Medium
iNOS	induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase
JAK-STAT	Januskinase-Signal Transducers and Activators of Transcription
kDa	Kilodalton
Kdo	Zucker 2-Keto-3-Desoxy-Octonsäure
LBP	LPS-bindendes Protein

LIF	Leukämiehemmender Faktor
LPS	Lipopolysaccharid
MHC	major histocompatibility complex
MEFs	Mouse Embryonic Fibroblasts
min	Minute
μl	Mikroliter
ml	Milliliter
mM	millimolar
mmol	Millimol
MitoSOXRed	mitochondrialer Superoxid Indikator
mtROS	mitochondriale ROS
NaCl	Natriumchlorid
NADPH	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat
NF-κB	nukleärer Faktor mit leichter κ-Kette von B-Lymphozyten
NLR	NOD-like-receptor
NLRP	Nukleotidbindende Oligomerisierungsdomäne
nm	Nanometer
nNOS	neuronale-Stickstoffmonoxid-Synthase
MAPK	mitogen-aktivierte Proteinkinase
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	Stickstoffmonoxid-Synthasen
NOX	NADPH Oxidase Untereinheit
O ₂ ^{•-}	Superoxid – Anion
P22 ^{phox}	„phox homolog, cytochrome b-245 alpha polypeptide“

PAMPs	Pathogenassoziierte molekulare Muster
PBS-T	Phosphat-gepufferte Salzlösung (mit Triton oder Tween)
PFA	Paraformaldehyd
PRR	pattern-recognition-receptor (Mustererkennungsrezeptor)
PVDF	Polyvinylidenfluorid
PYD	Pyrimidomäne
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat (sodium dodecyl sulfate)
SF	Schlagfrequenz
TIR-Domäne	Toll/IL-R-Domäne
TLR	Toll-Like-Rezeptor
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
Tris	Tris (Hydroxyethyl) Aminomethan
WB	Western-Blot
z. B.	zum Beispiel

- Agostini, L., et al.
2004 NALP3 forms an IL-1beta-processing inflammasome with increased activity in Muckle-Wells autoinflammatory disorder. *Immunity* 20(3):319-25.
- Ahmed, R., and D. Gray
1996 Immunological memory and protective immunity: understanding their relation. *Science* 272(5258):54-60.
- Alderton, W. K., C. E. Cooper, and R. G. Knowles
2001 Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem J* 357(Pt 3):593-615.
- Babior, B. M.
2000 Phagocytes and oxidative stress. *Am J Med* 109(1):33-44.
- Banchereau, J., and R. M. Steinman
1998 Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 392(6673):245-52.
- Bataillard, A., and J. Sassard
1994 Cardiovascular effects of human recombinant interleukin-1 beta in conscious rats. *Am J Physiol* 266(4 Pt 2):R1148-53.
- Bauernfeind, F., et al.
2011 Cutting edge: reactive oxygen species inhibitors block priming, but not activation, of the NLRP3 inflammasome. *J Immunol* 187(2):613-7.
- Bauernfeind, F. G., et al.
2009 Cutting edge: NF-kappaB activating pattern recognition and cytokine receptors license NLRP3 inflammasome activation by regulating NLRP3 expression. *J Immunol* 183(2):787-91.
- Beddington, R. S., and E. J. Robertson
1989 An assessment of the developmental potential of embryonic stem cells in the midgestation mouse embryo. *Development* 105(4):733-7.
- Ben-Neriah, Y., and M. Karin
2011 Inflammation meets cancer, with NF- κ B as the matchmaker. *Nat Immunol* 12(8):715-23.
- Berger, S. B., et al.
2010 SLAM is a microbial sensor that regulates bacterial phagosome functions in macrophages. *Nat Immunol* 11(10):920-7.
- Beutler, B., and E. T. Rietschel
2003 Innate immune sensing and its roots: the story of endotoxin. *Nat Rev Immunol* 3(2):169-76.
- Bevilacqua, M. P., et al.
1986 Recombinant tumor necrosis factor induces procoagulant activity in cultured human vascular endothelium: characterization and comparison with the actions of interleukin 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83(12):4533-7.
- Biasucci, L. M., et al.
2017 Where Does Inflammation Fit? *Curr Cardiol Rep* 19(9):84.
- Blander, J. M., and R. Medzhitov
2004 Regulation of phagosome maturation by signals from toll-like receptors. *Science* 304(5673):1014-8.
- Bowie, A., and L. A. O'Neill
2000 The interleukin-1 receptor/Toll-like receptor superfamily: signal generators for pro-inflammatory interleukins and microbial products. *J Leukoc Biol* 67(4):508-14.

- Brandes, R. P., N. Weissmann, and K. Schröder
2014 Nox family NADPH oxidases: Molecular mechanisms of activation. *Free Radic Biol Med* 76:208-26.
- Butcher, E. C., and L. J. Picker
1996 Lymphocyte homing and homeostasis. *Science* 272(5258):60-6.
- Chae, B. S.
2018 Pretreatment of Low-Dose and Super-Low-Dose LPS on the Production of In Vitro LPS-Induced Inflammatory Mediators. *Toxicol Res* 34(1):65-73.
- Chaiwut, Ratthakorn, and Watchara Kasinrerak
2022 Very low concentration of lipopolysaccharide can induce the production of various cytokines and chemokines in human primary monocytes. *BMC Research Notes* 15(1):42.
- Chaudhary, P. M., et al.
1998 Cloning and characterization of two Toll/Interleukin-1 receptor-like genes TIL3 and TIL4: evidence for a multi-gene receptor family in humans. *Blood* 91(11):4020-7.
- Childers, G. M., et al.
2021 Assessing the Association of Mitochondrial Function and Inflammasome Activation in Murine Macrophages Exposed to Select Mitotoxic Tri-Organotin Compounds. *Environ Health Perspect* 129(4):47015.
- Ciesielska, Anna, Marta Matyjek, and Katarzyna Kwiatkowska
2021 TLR4 and CD14 trafficking and its influence on LPS-induced pro-inflammatory signaling. *Cellular and Molecular Life Sciences* 78(4):1233-1261.
- Craddock, C. G., Jr., S. Perry, and J. S. Lawrence
1956 The dynamics of leukopoiesis and leukocytosis, as studied by leukopheresis and isotopic techniques. *J Clin Invest* 35(3):285-96.
- da Silva Correia, J., et al.
2001 Lipopolysaccharide is in close proximity to each of the proteins in its membrane receptor complex. transfer from CD14 to TLR4 and MD-2. *J Biol Chem* 276(24):21129-35.
- Dinarello, C. A.
1998 Interleukin-1 beta, interleukin-18, and the interleukin-1 beta converting enzyme. *Ann N Y Acad Sci* 856:1-11.
- Dzierzak, E., and N. A. Speck
2008 Of lineage and legacy: the development of mammalian hematopoietic stem cells. *Nat Immunol* 9(2):129-36.
- Ehrlich, Paul
1879 Über die spezifischen Granulationen des Blutes. *Arch Anat Physiol*. 571.
- Evans, M. J., and M. H. Kaufman
1981 Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 292(5819):154-156.
- Fairchild, K. D., et al.
2009 Endotoxin depresses heart rate variability in mice: cytokine and steroid effects. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 297(4):R1019-27.
- Fallach, Reut, et al.
2010 Cardiomyocyte Toll-like receptor 4 is involved in heart dysfunction following septic shock or myocardial ischemia. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 48(6):1236-1244.
- Finkensieper, Andreas, et al.

- 2013 Antibacterial capacity of differentiated murine embryonic stem cells during defined in vitro inflammatory conditions. *Stem Cells and Development* 22(14):1977-1990.
- Franchi, L., et al.
2009 Function of Nod-like receptors in microbial recognition and host defense. *Immunol Rev* 227(1):106-28.
- Galanos, C., O. Lüderitz, and O. Westphal
1969 A new method for the extraction of R lipopolysaccharides. *Eur J Biochem* 9(2):245-9.
- Gandhirajan, R. K., et al.
2013 Blockade of NOX2 and STIM1 signaling limits lipopolysaccharide-induced vascular inflammation. *J Clin Invest* 123(2):887-902.
- Gearing, D. P., et al.
1992 The IL-6 signal transducer, gp130: an oncostatin M receptor and affinity converter for the LIF receptor. *Science* 255(5050):1434-7.
- Gerabek, Werner E., et al.
2005 Enzyklop%odie Medizingeschichte. *Dtsch Arztebl International* 102(34-35):2307-.
- Glauert, A. M., and M. J. Thornley
1969 The topography of the bacterial cell wall. *Annu Rev Microbiol* 23:159-98.
- Gram, Hans Christian Joachim Friedlaender Carl
1884 Ueber die isolirte F??rbung der Schizomyceten : in Schnitt-und Trockenpr??paraten. Berlin: Theodor Fischer's medicinischer Buchhandlung.
- Halliwell, Barry, and John M. C. Gutteridge
2015 *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford: Oxford University Press.
- Hannig, M., et al.
2010 Control of leucocyte differentiation from embryonic stem cells upon vasculogenesis and confrontation with tumour tissue. *J Cell Mol Med* 14(1-2):303-12.
- Hartwell, JL, et al.
1943 Chemical treatment of tumors. VII. Nature of the hemorrhage-producing fraction from *Serratia marcescens* (*Bacillus prodigiosus*) culture filtrate. *Journal of the National Cancer Institute* 4(1):107-122.
- Haziot, A., et al.
1998 The induction of acute phase proteins by lipopolysaccharide uses a novel pathway that is CD14-independent. *J Immunol* 160(6):2570-2.
- Helander, I. M., et al.
1988 Chemical structure of the lipopolysaccharide of *Haemophilus influenzae* strain I-69 Rd-/b+. Description of a novel deep-rough chemotype. *Eur J Biochem* 177(3):483-92.
- Hescheler, J., et al.
1997 Embryonic stem cells: a model to study structural and functional properties in cardiomyogenesis. *Cardiovasc Res* 36(2):149-62.
- Higashikuni, Y., et al.
2023 NLRP3 Inflammasome Activation Through Heart-Brain Interaction Initiates Cardiac Inflammation and Hypertrophy During Pressure Overload. *Circulation* 147(4):338-355.

- Hornung, V., et al.
2008 Silica crystals and aluminum salts activate the NALP3 inflammasome through phagosomal destabilization. *Nat Immunol* 9(8):847-56.
- Hsu, Hsien-Yeh, and Meng-Hsuan Wen
2002 Lipopolysaccharide-mediated Reactive Oxygen Species and Signal Transduction in the Regulation of Interleukin-1 Gene Expression*. *Journal of Biological Chemistry* 277(25):22131-22139.
- Hufnagel, Markus, and Heinz-Josef Schmitt
2014 Sepsis. *In Pädiatrie: Grundlagen und Praxis*. G.F. Hoffmann, M.J. Lentze, J. Spranger, and F. Zepp, eds. Pp. 842-848. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- Ikuta, K., et al.
1992 Lymphocyte development from stem cells. *Annu Rev Immunol* 10:759-83.
- Iwai-Kanai, E., et al.
2002 Basic fibroblast growth factor protects cardiac myocytes from iNOS-mediated apoptosis. *J Cell Physiol* 190(1):54-62.
- Kastowsky, M, T Gutberlet, and H Bradaczek
1992 Molecular modelling of the three-dimensional structure and conformational flexibility of bacterial lipopolysaccharide. *Journal of Bacteriology* 174(14):4798-4806.
- Kawai, T., and S. Akira
2005 Pathogen recognition with Toll-like receptors. *Curr Opin Immunol* 17(4):338-44.
- Kawamoto, T., et al.
2008 TAK-242 selectively suppresses Toll-like receptor 4-signaling mediated by the intracellular domain. *Eur J Pharmacol* 584(1):40-8.
- Keller, G, et al.
1993 Hematopoietic commitment during embryonic stem cell differentiation in culture. *Molecular and Cellular Biology* 13(1):473-486.
- Kesarwani, P., et al.
2013 Redox regulation of T-cell function: from molecular mechanisms to significance in human health and disease. *Antioxid Redox Signal* 18(12):1497-534.
- Kim, So Yeon, et al.
2017 Pro-inflammatory hepatic macrophages generate ROS through NADPH oxidase 2 via endocytosis of monomeric TLR4–MD2 complex. *Nature Communications* 8(1):2247.
- Kleinert, H., P. M. Schwarz, and U. Förstermann
2003 Regulation of the expression of inducible nitric oxide synthase. *Biol Chem* 384(10-11):1343-64.
- Lee, J. Y., et al.
2001 Saturated fatty acids, but not unsaturated fatty acids, induce the expression of cyclooxygenase-2 mediated through Toll-like receptor 4. *J Biol Chem* 276(20):16683-9.
- Li, D., et al.
2020a Inhibition of LPS-induced Nox2 activation by VAS2870 protects alveolar epithelial cells through eliminating ROS and restoring tight junctions. *Biochem Biophys Res Commun* 524(3):575-581.

- Li, Ning, et al.
2020b Ferritinophagy-mediated ferroptosis is involved in sepsis-induced cardiac injury. *Free Radical Biology and Medicine* 160:303-318.
- Li, Ying, et al.
2013 Inflammation and cardiac dysfunction during sepsis, muscular dystrophy, and myocarditis. *Burns & Trauma* 1(3).
- Lowry, O. H., et al.
1951 Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193(1):265-75.
- Luster, A. D.
1998 Chemokines--chemotactic cytokines that mediate inflammation. *N Engl J Med* 338(7):436-45.
- MacLennan, I. C., et al.
1997 The changing preference of T and B cells for partners as T-dependent antibody responses develop. *Immunol Rev* 156:53-66.
- Mahnke, K., et al.
1997 CD14 is expressed by subsets of murine dendritic cells and upregulated by lipopolysaccharide. *Adv Exp Med Biol* 417:145-59.
- Maitra, Shyamal K, et al.
1978 Determination of lipid A and endotoxin in serum by mass spectroscopy. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 75(8):3993-3997.
- Majno, Guido, and Isabelle Joris
2004 *Cells, tissues, and disease: principles of general pathology*: Oxford University Press.
- Marion, R., et al.
2003 Cytokine-stimulated nitric oxide production and inducible NO-synthase mRNA level in human intestinal cells: lack of modulation by glutamine. *Clin Nutr* 22(6):523-8.
- Martin, G. R.
1981a Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78(12):7634-8.
- Martin, Gail R
1981b Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 78(12):7634-7638.
- Martinon, Fabio, Kimberly Burns, and Jürg Tschopp
2002 The Inflammasome: A Molecular Platform Triggering Activation of Inflammatory Caspases and Processing of proIL- β . *Molecular Cell* 10(2):417-426.
- Marzio, R., et al.
1997 Expression and function of the early activation antigen CD69 in murine macrophages. *J Leukoc Biol* 62(3):349-55.
- Massion, P. B., et al.
2003 Nitric oxide and cardiac function: ten years after, and continuing. *Circ Res* 93(5):388-98.
- Medzhitov, Ruslan
2008 Origin and physiological roles of inflammation. *Nature* 454(7203):428-435.

- Mian, M. O. R., et al.
2019 TLR (Toll-Like Receptor) 4 Antagonism Prevents Left Ventricular Hypertrophy and Dysfunction Caused by Neonatal Hyperoxia Exposure in Rats. *Hypertension* 74(4):843-853.
- Michalek, S. M., et al.
1980 The primary role of lymphoreticular cells in the mediation of host responses to bacterial endotoxin. *J Infect Dis* 141(1):55-63.
- Mikkola, H. K., and S. H. Orkin
2006 The journey of developing hematopoietic stem cells. *Development* 133(19):3733-44.
- Mitchell, J. A., et al.
2007 Role of pattern-recognition receptors in cardiovascular health and disease. *Biochem Soc Trans* 35(Pt 6):1449-52.
- Moon, J. S., et al.
2016 NOX4-dependent fatty acid oxidation promotes NLRP3 inflammasome activation in macrophages. *Nat Med* 22(9):1002-12.
- Muñoz-Planillo, R., et al.
2013 K⁺ efflux is the common trigger of NLRP3 inflammasome activation by bacterial toxins and particulate matter. *Immunity* 38(6):1142-53.
- Nagai, Yoshinori, et al.
2002 Essential role of MD-2 in LPS responsiveness and TLR4 distribution. *Nature Immunology* 3(7):667-672.
- Nathan, C., et al.
1989 Cytokine-induced respiratory burst of human neutrophils: dependence on extracellular matrix proteins and CD11/CD18 integrins. *J Cell Biol* 109(3):1341-9.
- Nathan, C., and Q. W. Xie
1994 Nitric oxide synthases: roles, tolls, and controls. *Cell* 78(6):915-8.
- Nežić, Lana, et al.
2018 Simvastatin Protects Cardiomyocytes Against Endotoxin-induced Apoptosis and Up-regulates Survivin/NF-κB/p65 Expression. *Scientific Reports* 8(1):14652.
- Park, J., et al.
2015 Mitochondrial ROS govern the LPS-induced pro-inflammatory response in microglia cells by regulating MAPK and NF-κB pathways. *Neurosci Lett* 584:191-6.
- Payen, D., et al.
2021 Endotoxin Mass Concentration in Plasma Is Associated With Mortality in a Multicentric Cohort of Peritonitis-Induced Shock. *Front Med (Lausanne)* 8:749405.
- Petrache, I., et al.
2003 The role of the microtubules in tumor necrosis factor-alpha-induced endothelial cell permeability. *Am J Respir Cell Mol Biol* 28(5):574-81.
- Poltorak, A., et al.
1998 Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science* 282(5396):2085-8.
- Preas II, Hugh L, et al.
2001 Effects of anti-inflammatory agents on serum levels of calcitonin precursors during human experimental endotoxemia. *The Journal of infectious diseases* 184(3):373-376.

- Raetz, C. R., et al.
2007 Lipid A modification systems in gram-negative bacteria. *Annu Rev Biochem* 76:295-329.
- Ramos-Vara, J. A.
2011 Principles and methods of immunohistochemistry. *Methods Mol Biol* 691:83-96.
- Robertson, Elizabeth, et al.
1986 Germ-line transmission of genes introduced into cultured pluripotential cells by retroviral vector. *Nature* 323(6087):445-448.
- Rothfield, L., and R. W. Horne
1967 Reassociation of purified lipopolysaccharide and phospholipid of the bacterial cell envelope: electron microscopic and monolayer studies. *J Bacteriol* 93(5):1705-21.
- Royer-Pokora, B., et al.
1986 Cloning the gene for an inherited human disorder--chronic granulomatous disease--on the basis of its chromosomal location. *Nature* 322(6074):32-8.
- Sallusto, F., et al.
1999 Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature* 401(6754):708-12.
- Sauer, H., et al.
2001 Characteristics of calcium sparks in cardiomyocytes derived from embryonic stem cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 281(1):H411-21.
- Sauer, Heinrich, et al.
1999 Effects of electrical fields on cardiomyocyte differentiation of embryonic stem cells. *Journal of cellular biochemistry* 75(4):710-723.
- Schindelin, Johannes E., et al.
2015 The ImageJ ecosystem: An open platform for biomedical image analysis. *Molecular Reproduction and Development* 82.
- Schmidt, H. H., et al.
1988 Arginine is a physiological precursor of endothelium-derived nitric oxide. *Eur J Pharmacol* 154(2):213-6.
- Schumann, Ralf R, et al.
1990 Structure and function of lipopolysaccharide binding protein. *Science* 249(4975):1429-1431.
- Sen, R., and D. Baltimore
1986 Multiple nuclear factors interact with the immunoglobulin enhancer sequences. *Cell* 46(5):705-16.
- Sha, T., et al.
2007 Therapeutic effects of TAK-242, a novel selective Toll-like receptor 4 signal transduction inhibitor, in mouse endotoxin shock model. *Eur J Pharmacol* 571(2-3):231-9.
- Singer, C., and D. Singer
1917 The Scientific Position of Girolamo Fracastoro 1478?-1553 with Especial Reference to the Source, Character and Influence of His Theory of Infection. *Ann Med Hist* 1(1):1-34.
- Sjöblom, B., A. Salmazo, and K. Djinović-Carugo
2008 Alpha-actinin structure and regulation. *Cell Mol Life Sci* 65(17):2688-701.

- Srinivasula, Srinivasa M., et al.
2002 The PYRIN-CARD Protein ASC Is an Activating Adaptor for Caspase-1*. *Journal of Biological Chemistry* 277(24):21119-21122.
- Stewart, C. L., et al.
1992 Blastocyst implantation depends on maternal expression of leukaemia inhibitory factor. *Nature* 359(6390):76-9.
- Swanson, Karen V., Meng Deng, and Jenny P. Y. Ting
2019a The NLRP3 inflammasome: molecular activation and regulation to therapeutics. *Nature reviews. Immunology* 19(8):477-489.
- 2019b The NLRP3 inflammasome: molecular activation and regulation to therapeutics. *Nature Reviews Immunology* 19(8):477-489.
- Takayama, K., et al.
2005 Thromboxane A2 and prostaglandin F2alpha mediate inflammatory tachycardia. *Nat Med* 11(5):562-6.
- Takeuchi, O., et al.
1999 TLR6: A novel member of an expanding toll-like receptor family. *Gene* 231(1-2):59-65.
- Takeuchi, Osamu, and Shizuo Akira
2010 Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell* 140(6):805-820.
- Taylor, T., et al.
2010 Toll-like receptor 2 mediates proliferation, survival, NF-kappaB translocation, and cytokine mRNA expression in LIF-maintained mouse embryonic stem cells. *Stem Cells Dev* 19(9):1333-41.
- Thomas, P. G., et al.
2009 The intracellular sensor NLRP3 mediates key innate and healing responses to influenza A virus via the regulation of caspase-1. *Immunity* 30(4):566-75.
- Tobias, Peter S, JC Mathison, and RJ Ulevitch
1988 A family of lipopolysaccharide binding proteins involved in responses to gram-negative sepsis. *Journal of Biological Chemistry* 263(27):13479-13481.
- Toma, J. G., et al.
2001 Isolation of multipotent adult stem cells from the dermis of mammalian skin. *Nat Cell Biol* 3(9):778-84.
- Tu, D., et al.
2023 Activation of neuronal NADPH oxidase NOX2 promotes inflammatory neurodegeneration. *Free Radic Biol Med* 200:47-58.
- Turpen, J. B., C. M. Knudson, and P. S. Hoefen
1981 The early ontogeny of hematopoietic cells studied by grafting cytogenetically labeled tissue anlagen: localization of a prospective stem cell compartment. *Dev Biol* 85(1):99-112.
- Veith, Carmen, et al.
2019 Redox Imbalance in Idiopathic Pulmonary Fibrosis: A Role for Oxidant Cross-Talk Between NOX Enzymes and Mitochondria. *Antioxidants & Redox Signaling* 31.
- Vermot, A., et al.
2021 NADPH Oxidases (NOX): An Overview from Discovery, Molecular Mechanisms to Physiology and Pathology. *Antioxidants (Basel)* 10(6).

- Verweij, J., and H. M. Pinedo
1990 Mitomycin C: mechanism of action, usefulness and limitations. *Anticancer Drugs* 1(1):5-13.
- Virzi, Grazia Maria, et al.
2022 Endotoxin in Sepsis: Methods for LPS Detection and the Use of Omics Techniques. *Diagnostics* 13(1):79.
- von Moltke, J., et al.
2013 Recognition of bacteria by inflammasomes. *Annu Rev Immunol* 31:73-106.
- Wang, P., et al.
1998 Up-regulation of a novel potent vasodilatory peptide adrenomedullin during polymicrobial sepsis. *Shock* 10(2):118-22.
- Wartenberg, Maria, et al.
1998 The embryoid body as a novel in vitro assay system for antiangiogenic agents. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 78(10):1301-1314.
- Watanabe, T., et al.
1996 Possible involvement of glucocorticoids in the modulation of interleukin-1-induced cardiovascular responses in rats. *J Physiol* 491 (Pt 1)(Pt 1):231-9.
- Watson, J., and R. Riblet
1974 Genetic control of responses to bacterial lipopolysaccharides in mice. I. Evidence for a single gene that influences mitogenic and immunogenic responses to lipopolysaccharides. *J Exp Med* 140(5):1147-61.
1975 Genetic control of responses to bacterial lipopolysaccharides in mice. II. A gene that influences a membrane component involved in the activation of bone marrow-derived lymphocytes by lipopolysaccharides. *J Immunol* 114(5):1462-8.
- Weissman, I. L.
2000 Stem cells: units of development, units of regeneration, and units in evolution. *Cell* 100(1):157-68.
- Wieland, E., and M. Shipkova
2016 Lymphocyte surface molecules as immune activation biomarkers. *Clin Biochem* 49(4-5):347-54.
- Wiese, A., et al.
1999 The Dual Role of Lipopolysaccharide as Effector and Target Molecule. *380(7-8):767-784.*
- Wilkinson, S. G.
1996 Bacterial lipopolysaccharides--themes and variations. *Prog Lipid Res* 35(3):283-343.
- Wilson, A., and A. Trumpp
2006 Bone-marrow haematopoietic-stem-cell niches. *Nat Rev Immunol* 6(2):93-106.
- Wobus, A. M., and K. R. Boheler
2005 Embryonic stem cells: prospects for developmental biology and cell therapy. *Physiol Rev* 85(2):635-78.
- Wright, SAMUEL D, et al.
1989 Lipopolysaccharide (LPS) binding protein opsonizes LPS-bearing particles for recognition by a novel receptor on macrophages. *The Journal of experimental medicine* 170(4):1231-1241.

- Yamada, M., et al.
2005 Discovery of novel and potent small-molecule inhibitors of NO and cytokine production as antisepsis agents: synthesis and biological activity of alkyl 6-(N-substituted sulfamoyl)cyclohex-1-ene-1-carboxylate. *J Med Chem* 48(23):7457-67.
- Yeom, Y. I., et al.
1996 Germline regulatory element of Oct-4 specific for the totipotent cycle of embryonal cells. *Development* 122(3):881-94.
- Zähringer, U., B. Lindner, and E. T. Rietschel
1994 Molecular structure of lipid A, the endotoxic center of bacterial lipopolysaccharides. *Adv Carbohydr Chem Biochem* 50:211-76.
- Zhong, Z., et al.
2018 New mitochondrial DNA synthesis enables NLRP3 inflammasome activation. *Nature* 560(7717):198-203.
- Zhong, Z., et al.
2013 TRPM2 links oxidative stress to NLRP3 inflammasome activation. *Nat Commun* 4:1611.

11 Ehrenwörtliche Erklärung

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

Gießen, den 10.06.2024,

Ort/Datum Unterschrift

12 [Publikationsverzeichnis](#)

- Scharmacher J., Wartenberg, M., Sauer, H. The pro-inflammatory signature of lipopolysaccharide in spontaneous contracting embryoid bodies differentiated from mouse embryonic stem cells. *J Cell Mol Med.* 2023 Jul;27(14): 2045-2058.doi: 10.1111/jcmm.17805.
- DPG 2023 (Berlin, 21. – 23.09.2023): Poster - Präsentation, A08-11, Scharmacher J., Wartenberg, M., Sauer, H. The pro-inflammatory signature of lipopolysaccharide in spontaneous contracting embryoid bodies differentiated from mouse embryonic stem cells.

13 Danksagung

Hiermit möchte ich meine aufrichtige Dankbarkeit für die erfolgreiche Fertigstellung dieser Doktorarbeit zum Ausdruck bringen. Dieses Projekt war eine anspruchsvolle Reise, die ohne die Unterstützung und Ermutigung vieler Personen nicht möglich gewesen wäre.

Ein besonderer Dank gilt meinem Betreuer Prof. Dr. Heinrich Sauer, der mich mit fachkundigem Rat, Inspiration und Geduld während des gesamten Forschungsprozesses unterstützt hat. Die wertvollen Einblicke und konstruktiven Rückmeldungen haben maßgeblich zur Qualität dieser Arbeit beigetragen.

Weiterhin möchte ich besonders meinem geliebten Lebensgefährten, Michael Tessin, danken. Er bemühte sich täglich, um mich in meiner gesamten Studienzeit zu unterstützen. Mit seiner Liebe und Unterstützung habe ich es geschafft die Doktorarbeit während des Studiums weitestgehend fertigzustellen. Dafür bin ich ihm unendlich dankbar.

Ein herzlicher Dank geht an meine gesamte Familie, besonders an meine Eltern, Andrea und Rüdiger Scharmacher und an meine herzensguten Schwestern Jana Scharmacher und Sandra Jansen. Ihr habt mich stets ermutigt, meinen Ambitionen nachzugehen. Eure bedingungslose Unterstützung und Liebe haben mir die nötige Kraft gegeben, das Studium und diese Doktorarbeit erfolgreich abzuschließen. Ich bin sehr stolz sagen zu können, dass ihr meine Familie seid.

Ich möchte mich auch bei meinen Freunden, im Besonderen bei Sydney Degenkolb und Leopold Stabbauer, bedanken, die mich in den intensiven Phasen der Forschung und des Schreibens ermutigt haben. Ihre moralische Unterstützung war für mich von unschätzbarem Wert. Ohne euch wäre die Reise nur halb so schön gewesen.

Zuletzt, aber keineswegs am wenigsten, danke ich allen, die nicht namentlich genannt wurden, aber dennoch einen Beitrag zu meinem akademischen Weg geleistet haben.

Diese Doktorarbeit ist das Ergebnis gemeinsamer Anstrengungen, und ich bin zutiefst dankbar für die Vielzahl von Menschen, die mich auf diesem Weg begleitet haben.

Herzlichen Dank.