

Aus dem Department für Medizinische Biochemie  
der Veterinärmedizinischen Universität Wien

Institut für Biochemie  
(Leitung: Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Florian Grebien)

**Modulation der Hämoxygenase-Aktivität durch Energiesubstrate in  
kultivierten Zellen der Makrophagenlinie J774A.1**

Diplomarbeit

Veterinärmedizinische Universität Wien

vorgelegt von  
Agnes Lutz

Wien, im März, 2023

Betreuerin: Dipl.-Biol. Dr.rer.nat. J. Catharina Duvigneau

Institut für medizinische Biochemie

Veterinärmedizinische Universität Wien

Begutachter: Ao.Univ.-Prof. Dr.rer.nat. Lars Gille

## INHALTSVERZEICHNIS

1.	EINLEITUNG UND FRAGESTELLUNG .....	2
	MAKROPHAGEN .....	2
1.1.1	Der pro-inflammatorische Makrophagentyp (M1).....	2
1.1.2	Der anti-inflammatorische Makrophagentyp (M2) .....	2
1.2	DIE HÄMOXYGENASE: .....	3
1.2.1	Häm .....	4
1.3	ROLLE DES ENERGIESTOFFWECHSELS AUF DIE POLARISIERUNG DER MAKROPHAGEN .....	4
1.3.1	Beta-Hydroxybutyrat (3HB): .....	5
1.4	FRAGESTELLUNG.....	6
1.5	HYPOTHESE .....	6
1.6	HERANGEHENSWEISE .....	6
2.	MATERIAL UND METHODEN.....	8
2.1	ZELLEN .....	8
2.1.1	Inkubation der Zellen .....	8
2.2	VORBEREITUNG DER ZELL-HOMOGENATE FÜR DIE BESTIMMUNG DER HO-AKTIVITÄT .....	10
2.3	HÄMOXYGENASE ASSAY .....	10
2.4	BILIRUBINBESTIMMUNG: .....	12
2.5	PROTEINBESTIMMUNG .....	12
2.6	DATENAUSWERTUNG UND STATISTIK: .....	13
3.	ERGEBNISSE .....	14
3.1	AUSWIRKUNGEN DER BEHANDLUNGEN AUF DIE PROTEINKONZENTRATION: .....	14
3.2	AUSWIRKUNGEN DER BEHANDLUNGEN AUF DIE HO-AKTIVITÄT DER J774A.1 ZELLEN: .....	17
3.2.1	Einfluss der Energiesubstrate im Inkubationsmedium auf die HO-Aktivität: .....	17
3.3	EINFLUSS DES iNOS-HEMMERS THIOCITRULLIN:.....	19
3.4	AUSWIRKUNGEN DER ENERGIESUBSTRATE AUF DIE STEIGERUNG DER HO-AKTIVITÄT DURCH HÄM	
	20	

4.	DISKUSSION .....	22
4.1	EINFLUSS DER BEHANDLUNGEN AUF DIE ZELLZAHL.....	23
4.2	MODULATION DER HO-AKTIVITÄT IN MAKROPHAGEN: .....	24
4.2.1	3HB hemmt die HO-Aktivität .....	24
4.2.2	Die Kapazität Häm zu degradieren wird durch die Energiesubstrate inhibiert.....	25
4.3	AUSBLICK.....	26
5.	CONCLUSIO .....	27
6.	ZUSAMMENFASSUNG .....	28
7.	SUMMARY .....	29
8.	LITERATURVERZEICHNIS .....	30
9.	ABBILDUNGS- UND TABELLENVERZEICHNIS .....	35

## Abkürzungen

3HB = Betahydroxybutyrat

BR = Bilirubin

BSA = Bovines Serum Albumin

BVR = Bilirubinreduktase

C<sub>6</sub>H<sub>6</sub> = Benzol

CO = Kohlenmonoxid

DMSO = Dimethylsulfoxid

E = Extinktion

EDTA = Ethylendiamintetraessigsäure

FCS = fetales Kälberserum

HO = Hämoxygenase

IL = Interleukin

iNOS = induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase

KD = ketogene Diät

LPS = Lipopolysaccharid

NADPH = Nicotinamidadenindinukleotidphosphat

NO = Stickstoffmonoxid

NLRP3 = Nod-like-Receptor Protein 3

PPR = Polypropylen Röhrchen

ROS = reaktive Sauerstoff Verbindungen (reactive Oxygen species)

TC = S-Methyl-Thiocitrullin

TGF- $\beta$  = transformierende Wachstumsfaktor (transforming growth factor  $\beta$ )

TNF- $\alpha$  = Tumornekrosefaktor-alpha (TNF $\alpha$ )

## 1. Einleitung und Fragestellung

### Makrophagen

Makrophagen sind Zellen des angeborenen Immunsystems, die überall im Körper zu finden sind. Bei Kontakt mit körperfremden Material initiieren sie eine Entzündungsreaktion, während sie bei Kontakt mit körpereigenem Material die Wiederherstellung der Homöostase und die Wundheilung fördern. Die Entzündungsphasen, sowie die Wiederherstellung der Homöostase regeln die Makrophagen durch die Ausschüttung pro-inflammatorischer oder anti-inflammatorischer Zytokine. Je nachdem welche Zytokine sie vermehrt exprimieren, werden sie in pro-inflammatorische (M1) oder anti-inflammatorische (M2) Makrophagen kategorisiert. Mittlerweile geht man davon aus, dass es Mischformen und Subtypen beider Phänotypen gibt, die durch pro-inflammatorische, oder anti-inflammatorische Stimuli der Umgebung beeinflusst werden können (Krzyszczyk et al. 2018). Da der Makrophagentyp nicht festgelegt ist, sondern auf die Umgebung reagieren kann, spricht man auch von einem dynamischen Phänotyp und einer Polarisierung der Makrophagen.

#### 1.1.1 Der pro-inflammatorische Makrophagentyp (M1)

Makrophagen werden nach Phagozytose einzigartiger molekularer Strukturen von potentiell pathogenen Mikroorganismen, wie beispielsweise des bakteriellen Lipopolysaccharids (LPS), zu pro-inflammatorischen Makrophagen (M1-Typ) polarisiert. M1-Makrophagen sind durch die Ausschüttung von Zytokinen, wie Interleukin (IL) 1- $\beta$ , IL-6, und Tumornekrosefaktor-alpha (TNF $\alpha$ ), welche als Signalmoleküle für die umliegenden Zellen dienen, charakterisiert. Des Weiteren produzieren M1-Makrophagen hohe Mengen an Sauerstoffradikalen (reactive oxygen species (ROS)) und Stickstoffmonoxid (NO) (Murray und Wynn 2011), die sie für ihre biozidale Aktivität benötigen. NO wird in M1-Makrophagen aus L-Arginin von der induzierbaren Stickstoffmonoxid Synthase (inducible nitric oxide synthase (iNOS) gebildet, und fördert eine vermehrte Bildung von ROS in den Mitochondrien (Mülleberner et al. 2017, Srisook und Cha 2004). NO ist als Signalmolekül ebenfalls ein Induktor der Hämooxygenase (HO), die über ein negatives Feedback einer längerfristigen NO Produktion entgegen wirkt (Immenschuh et al. 1999, Srisook und Cha 2004).

#### 1.1.2 Der anti-inflammatorische Makrophagentyp (M2)

Makrophagen, die durch anti-inflammatorische Stimuli, wie z.B. IL-4 und IL-13, stimuliert werden, polarisieren zu dem sogenannten alternativ-aktivierten Phänotyp (M2). M2-Makrophagen exprimieren Arginase 1 (Murray und Wynn 2011), welche L-Arginin, das

Substrat der iNOS, abbaut und so die weitere Ausschüttung von NO verhindert. Sie reduzieren bzw. verkürzen die Entzündungsreaktion, welche durch die M1-Makrophagen entstanden ist. M2-Makrophagen induzieren die Wiederherstellung der Gewebshomöostase über die Ausschüttung von anti-inflammatorischen Zytokinen, wie IL-10, oder der transformierende Wachstumsfaktor (Transforming growth factor  $\beta$ , TGF- $\beta$ ) und spielen außerdem eine große Rolle für die Wundheilung und das Wachstum neuer Blutgefäße. Sind Makrophagen in ihrer Funktion gestört, so kann dies zu nicht-heilenden, chronischen Wunden und einer vermehrten Narbenbildung führen (Wynn und Vannella 2016). Ein wichtiges Enzym für die Wiederherstellung der Gewebshomöostase und Wundheilung ist die unter anderem von den Makrophagen exprimierte HO. Knock-out Experimente zeigten, dass die induzierbare HO (HO-1) den M2-Phänotyp begünstigt (Zhang et al. 2018). Eine vermehrte Expression von HO-1, die durch Häm, das Substrat der HO, in primären Alveolarmakrophagen induziert werden konnte, verminderte die M1-Ausprägung und führte zu einer erhöhten Bildung von Arginase und IL-10 (Hualin et al. 2012, Ndisang und Mishra 2013, Zhang et al. 2018). Daher gilt HO-1 als Marker des alternativ-aktivierten M2 Phänotyps (Otterbein et al. 2000).

## 1.2 Die Hämoxygenase

Die HO ist ein mikrosomales Enzym, welches mit Hilfe von Nicotinamidadenindinukleotidphosphat (NADPH), Cytochrom P-450 und molekularem Sauerstoff Häm zu gleichen Teilen zu Eisen ( $\text{Fe}^{3+}$ ), Kohlenmonoxid (CO) und Biliverdin abbaut. In weiterer Folge wird Biliverdin mit Hilfe der Biliverdinreduktase (BVR) zu Bilirubin (BR) umgewandelt (Tenhunen et al. 1969). Mit Ausnahme von Eisen wirken die Produkte, welche beim Abbau von Häm entstehen, zellschützend aufgrund ihrer anti-oxidativen und anti-inflammatorischen Eigenschaften (Duvigneau et al. 2019).

Es sind drei Isoformen der HO beim Säugetier bekannt: die durch Stressoren induzierbare HO-1 (auch bekannt als Hitzeschockprotein 32), die in hohen Mengen vor allem im Gehirn und in den Hoden konstitutiv exprimierte HO-2, und die der HO-2 sehr ähnliche HO-3, welche jedoch nur eine geringe enzymatische Aktivität zeigt (Maines 2001, McCoubrey et al. 1997). Da es zur Zeit noch keine Isoform-spezifischen Inhibitoren gibt, umfasst die Messung der enzymatischen Aktivität die katalytische Aktivität aller HO-Isoformen zusammen.

Als Teil der Gruppe der Hitzeschockproteine wird die HO-1-Expression durch eine Vielzahl von Stimuli, wie unter anderem durch LPS, Hypoxie, UV-Strahlung, Schwermetalle, und viele

weitere, oxidativen Stress auslösende Substanzen, induziert (Abraham und Kappas 2008, Maines 1997, Maines 2001). Besonders Häm, als Substrat der HO, hat einen großen induzierenden Effekt auf die HO-1, besonders in den für die Erythrophagozytose zuständigen Makrophagen.

### 1.2.1 Häm

Häm ist ein Porphyrin-System, welches aus einer ringförmigen Anordnung von vier Pyrrolen über Methinbrücken besteht, in dem ein zentrales Eisenion in zweiwertiger Form ( $\text{Fe}^{2+}$ ) komplex gebundenen ist. Die häufigste Form des Häms beim Säugetier ist das Häm-b, welches als prosthetische Gruppe von Hämoglobin, Myoglobin oder Zytochromen für den Sauerstofftransport und Elektronenübertragungsreaktionen dient (Mense und Zhang 2006). Erhöhte Spiegel an freiem Häm führen, wegen der pro-oxidativen Eigenschaften, im Körper zu oxidativem Stress und zur Zellschädigung, weshalb der Abbau des Häms durch die HO von großer Bedeutung ist (Smith und McCulloh 2015). Liegt das zentrale Häm-Eisen jedoch in seiner 3-wertigen Form (also oxidiert) vor, so spricht man von Hämin. Es wird angenommen, dass Hämin gut geeignet ist, um in Makrophagen einen anti-inflammatorischen Phänotyp über eine erhöhte HO-1 Expression zu induzieren (Ndisang und Mishra 2013, Zhang et al. 2018).

### 1.3 Rolle des Energiestoffwechsels auf die Polarisierung der Makrophagen

Nicht-aktivierte und M2-Makrophagen nutzen hauptsächlich die oxidative Phosphorylierung zur Energiegewinnung. Es konnte gezeigt werden, dass sich mit der Polarisierung auch der Energiestoffwechsel der Makrophagen ändert und dass LPS-behandelte Makrophagen eine höhere Glykolyserate im Vergleich zu M2 Makrophagen aufweisen (Rodríguez-Prados et al. 2010). Es wird vermutet, dass M1 Makrophagen ihre Mitochondrien weniger für die Energiebereitstellung, sondern vornehmlich für die ROS Produktion benötigen (Caputa et al. 2019). Werden M2-Makrophagen zu M1 polarisiert, so stellen diese ihren Energiestoffwechsel von oxidativer Phosphorylierung um zu einer erhöhten Glykolyserate (Kelly und O'Neill 2015). Interessanterweise führt aber offensichtlich auch das Angebot an Energiesubstraten selbst zu einer Modulation des Phänotyps. Chronisch hohe Blutglukosespiegel durch langfristige Zufuhr von überschüssiger Energie aus der Nahrung konnten nachweislich einen M1-Makrophagentyp forcieren (Olefsky und Glass 2010). Makrophagen mit überexprimiertem Glukosetransporter 1 konnten mehr Glukose verstoffwechseln, zeigten eine höhere

Glykolyserate, eine erhöhte Produktion von pro-inflammatorischen Mediatoren und höhere Spiegel an Markern für oxidativen Stress (Freemerman et al. 2014). Auch konnte gezeigt werden, dass längerfristig erhöhte Spiegel an Glukose bei kultivierten Makrophagen zu einer stärkeren Ausprägung einer pro-inflammatorischen Antwort führten (Suzuki et al. 2021). Umgekehrt, konnte die pro-inflammatorische Aktivität von Makrophagen reduziert werden, wenn die Blutzuckerspiegel von übergewichtigen Patienten durch eine nachhaltige Kalorienreduktion wieder normalisiert wurden (Montefusco et al. 2021). Für diesen Effekt könnten aber neben den nachhaltig erniedrigten Glukosespiegel, auch Substanzen verantwortlich sein, die bei Nahrungskarenz vermehrt gebildet werden.

### 1.3.1 Beta-Hydroxybutyrat (3HB):

Bei Nahrungskarenz aber auch beim Diabetes kann im Blutplasma ein erhöhter Spiegel von sogenannten Ketonkörpern gemessen werden. Dazu gehören Acetoacetat, Aceton und beta-Hydroxybutyrat (3HB), welche vor Allem in den Mitochondrien der Hepatozyten, durch die Oxidation von Fettsäuren bei intrazellulärem Glukosemangel gebildet werden. 3HB kann als kurzkettige organische Säure frei zwischen den Zellmembranen diffundieren, und nach Aufnahme in die Zelle in den Mitochondrien zur Energiegewinnung genutzt werden (Laffel 1999, Rojas-Morales et al. 2020).

Die Rolle von 3HB auf den Metabolismus von Makrophagen wird kontrovers diskutiert. Einerseits gibt es Hinweise, dass 3HB in akuten entzündlichen Erkrankungen einen antioxidativen und anti-inflammatorischen Effekt auf Makrophagen hat (Huang et al. 2022). In einer Studie mit LPS-stimulierten primären Makrophagen aus Meeräschen konnte gezeigt werden, dass 3HB tatsächlich die ROS- und die NO-Produktion, sowie die Expression pro-inflammatorischer Gene zu reduzieren vermochte (Qiao et al. 2020) und somit einen anti-inflammatorischen Effekt hat. Im Gegensatz dazu wurde in einer Studie mit bovinen Makrophagen gezeigt, dass 3HB pro-inflammatorisch wirkt und die Produktion von ROS und oxidativen Stress erhöht (Dong et al. 2022), sowie die Expression von IL-1 $\alpha$  und IL-6 steigerte (Gao et al. 2023). Letzteres spricht dafür, dass 3HB selbst eine pro-inflammatorische Wirkung in Makrophagen haben kann und suggeriert, dass 3HB, möglicherweise über den Umweg des oxidativen Stresses, HO-1 induzieren könnte. Es ist aber nicht bekannt, ob 3HB auch die Aktivität der HO in Makrophagen zu modulieren vermag.

#### 1.4 Fragestellung

Der Einfluss von Energiesubstraten auf die HO-Aktivität von Makrophagen wurde bisher kaum untersucht. Es ist bekannt, dass Makrophagen ihre Polarisierung in Abhängigkeit des umgebenden Milieus ändern können (Dang et al. 2014) und eine vermehrte Expression der HO-1 auf eine Polarisierung in Richtung M2 hinweist (Otterbein et al. 2000). Eine höhere Kapazität Häm zu degradieren kann daher als Zeichen einer stärkeren M2-Polarisierung interpretiert werden. Ziel dieser Arbeit war es herauszufinden, welchen Einfluss die Energiesubstrate Glukose und 3HB auf die *in vitro* HO-Aktivität von kultivierten Makrophagen haben.

#### 1.5 Hypothese

Wenn die Energiesubstrate Glukose und 3HB eine pro-inflammatorische Wirkung auf Makrophagen haben, erwarten wir eine Verringerung, und bei einer anti-inflammatorischen Wirkung eine Erhöhung der zellulären HO-Aktivität.

Da hohe Glukosespiegel bekanntermaßen die Polarisierung zum M1-Phänotyp stimulieren können, erwarten wir jedenfalls eine Verringerung der HO-Aktivität bei der Behandlung mit erhöhter Glukosekonzentration.

Wenn die Energiesubstrate auch die Kapazität haben die induzierte Polarisierung der Makrophagen zu beeinflussen, erwarten wir außerdem diese modulierende Effekte auch in M1-polarisierten (LPS-behandelten), sowie in M2-polarisierten (Hämin-behandelten) Makrophagen nachweisen zu können.

#### 1.6 Herangehensweise

Makrophagen der Linie J774A.1 wurden durch Inkubation mit Kontroll- (5,6 mmol/L) und erhöhten (25 mmol/L) Glukosekonzentrationen in An- oder Abwesenheit von 3HB (20 mmol/L) für 44 h in 12-Well-Platten inkubiert. Eine 18-stündige Inkubation mit LPS (1 µg/ml) wurde eingesetzt, um eine M1-Polarisierung der J774A.1 Zellen zu bewirken, während die Inkubation mit Hämin (20 µmol/L) für 16 h zur M2-Polarisierung verwendet wurde. Bei den M1-polarisierten Makrophagen wurde außerdem Thiocitrullin (TC, 50 µmol/L) als NOS-Hemmer eingesetzt, um den Effekt der LPS-stimulierten NO-Bildung für die Modulation der HO-Aktivität zu eruieren. Als Maß für HO-Aktivität wurde die Kapazität des Zellhomogenates Hämin in Bilirubin umzuwandeln in einem gekoppelten biochemischen Assay *in vitro* bestimmt. Bilirubin

wurde aus dem Ansatz extrahiert und photometrisch quantifiziert. Zur Normalisierung wurde die Proteinmenge herangezogen, welche am Ende der Inkubationszeit je Well vorhanden war. Diese wurde mit Hilfe der Bradford-Methode bestimmt.

## 2. Material und Methoden

Alle verwendeten Salze und Substanzen, wurden, soweit nicht anders angegeben, von der Firma Merck bezogen. Sämtliche Konzentrationsangaben beziehen sich auf die finale Konzentration.

### 2.1 Zellen

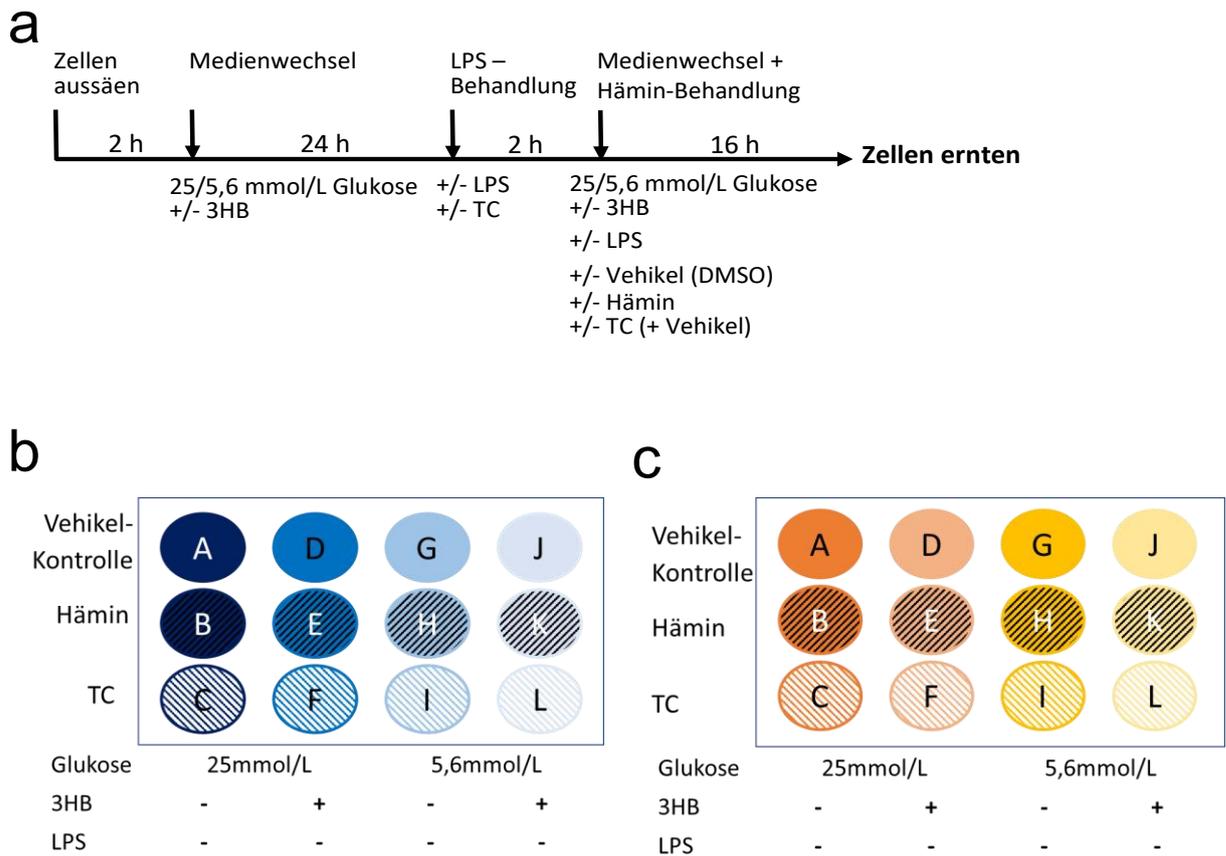
Für das Projekt wurden Maus-Makrophagen der Linie J774A.1 (TIB-67™; ATCC®, Manassas, VA, USA) verwendet. Die kultivierten Zellen wurden freundlicherweise von Andrea Mülleber, MSc. zur Verfügung gestellt. Als Zellkulturmedium wurde Dulbeccos Eagle's Medium (DMEM), mit unterschiedlichen Glukosekonzentrationen (25 mmol/L und 5,6 mmol/L) verwendet, welches mit Glutamin (4 mmol/L), Natriumpyruvat (1 mmol/L) und 10%igem fetalem Kälberserum (FCS) supplementiert wurde. Die Zellen wurden in einem CO<sub>2</sub>-Inkubator (HERAcell 150i, Thermo scientific) bei 95% Luft und 5% Kohlendioxid-Gehalt inkubiert.

#### 2.1.1 Inkubation der Zellen

Für die Versuche wurden J774A1 Makrophagen entsprechend dem Schema in **Abb. 1 c** behandelt. Im Detail wurden die Zellen in einer Dichte von  $0,15 \times 10^6$  Zellen/ml in 12 Well-Platten ausgesät und 2 Stunden anwachsen gelassen. Im Anschluss wurde das Zellkulturmedium abgenommen und durch die Inkubationsmedien für die ersten 24h Kultur ersetzt (**Abb. 1 b, c**). Für den Versuchsaufbau wurde eine Hälfte (A-F) der Zellkulturplatte mit Medium mit hohem Glukosegehalt (25 mmol/L) und die andere Hälfte (G-L) mit Medium mit niedrigem Glukosegehalt (5,6 mmol/L) versetzt. Bei beiden Medientypen wurden jeweils drei Wells (D-F und J-L) zusätzlich mit  $\beta$ -Hydroxybutyrat (3HB 20 mmol/L) versetzt. Nach 24h Inkubationszeit wurde die Hälfte der Zellkulturplatten mit DMSO (Kontrolle, **Abb. 1 b**), die andere mit LPS, finale Konzentration 1  $\mu$ g/ml (**Abb. 1 c**) versetzt. In ein Well pro Kondition wurde zusätzlich Thiocitrullin (TC, 50  $\mu$ mol/L) zur Hemmung der NO-Synthase (C,F,I,L) zugesetzt (**Abb. 1 b, c**).

Zwei Stunden später wurden bei allen Platten die Medien gemäß der Plattenbelegung durch frisches Medium, welches die Stimulantien wie vorher enthielt, ersetzt. Wobei in einige Wells zusätzlich mit Hämin (20  $\mu$ mol/L) als Substrat der Hämoxygenase, (B,E,H,K) oder dem entsprechenden Vehikel (A, D, G, J und C,F,I,L) supplementiert wurden.

Nach weiteren 16h Inkubation wurden die Zellkulturüberstände vollständig abgenommen und die Wells mit je 200 µl HO-Assay-Puffer (100 mmol/L Kaliumphosphatpuffer mit 1 mmol/L EDTA, pH 7.4) versetzt. Bis zur Analyse wurden die Platten bei -80 °C tiefgefroren. Um genügend Daten für eine aussagekräftige Statistik zu gewinnen, wurden jeweils sechs Kontrollplatten und sechs LPS-Platten aufgearbeitet.



**Abb. 1 Schematische Darstellung der Beschickung der 12-Well-Platten und das Inkubationschema für die Stimulation:**

**a:** Zeitliche Abfolge der Inkubation und des Medienwechsels: Die Inkubation wurde zunächst für 24 h ohne LPS-Zugabe in Anwesenheit der Energiesubstrate durchgeführt. Anschließend wurde Vehikel (DMSO), den Platten der LPS-Behandlung LPS, und/oder der NOS-Hemmer Thiocitrullin (TC, 50 µmol/L) zugefügt. 2h nach +/- LPS-Zugabe wurden die Medien gewechselt und gemäß der finalen Plattenbelegung mit Vehikel (DMSO), Hämin (20 µmol/L) oder TC (50 µmol/L) jeweils mit hohem oder niedrigem Glukosegehalt +/- 3HB (20 mmol/L) beschickt (b & c);

**b:** Farbkodierung der Plattenbelegung ohne LPS-Zugabe;

**c:** Farbkodierung der Plattenbelegung mit LPS-Zugabe (1 µg/ml).

**b & c:** Die Wells A-F kennzeichnen die Inkubation mit hohem Glukosegehalt (25 mmol/L), während die Wells G-H mit niedrigem Glukosegehalt (5,6 mmol/L) des Zellkulturmediums kultiviert wurden. Den Wells der Spalten D-F und J-L wurde zusätzlich β-Hydroxybutyrat (3HB, 20 mmol/L) als Ketonkörper zugesetzt.

## 2.2 Vorbereitung der Zell-Homogenate für die Bestimmung der HO-Aktivität

Die eingefrorenen 12-Well Platten wurden, wie in **Abb. 1** gezeigt, prozessiert. Dazu wurden die zuvor bei -80 °C eingefrorenen Platten auf Eis aufgetaut. Anschließend wurde jedem Well 75 µl des zuvor beschriebenen HO-Assay-Puffers zugesetzt und die Zellen durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren abgelöst und homogenisiert. Die Homogenate wurden in 1,5 ml Reaktionsgefäße auf Eis überführt und für die Durchführung des HO-Assays verwendet.

## 2.3 Hämoxygenase Assay

Der HO-Assay wurde in Polypropylenröhrchen auf Eis angesetzt. Dazu wurden 120 µl Zell-Homogenat mit 4 µL Hämin (1 mmol/L in Dimethylsulfoxid (DMSO)), 5 µL Deferoxamin (DFO, 100 mmol/L in H<sub>2</sub>O)) und 25 µL Nicotinamidadenindinukleotidphosphat (NADPH, 10 mmol/L), wie in **Tab. 2** zu sehen, versetzt.

Für die Negativkontrollen wurde anstelle von Hämin das gleiche Volumen DMSO, und statt NADPH wurden 25 µL des zuvor beschriebenen HO-Assay-Puffers zugesetzt. Das Gesamtvolumen der wässrigen Komponenten betrug 150 µL je Ansatz.

Alle Proben wurden darauffolgend im Schüttelwasserbad (Thermolab GFL® 1092, Schütteleinstellung: 195/min ) bei 37 °C für 30 min. inkubiert. Um die enzymatische Reaktion zu stoppen, wurden die Röhrchen nach Ablauf der 30 min. auf Eis transferiert.

Alle nachfolgenden Schritte wurden im abgedunkelten Raum durchgeführt, um das gebildete BR nicht durch Photooxidation zu verlieren. Anschließend wurden 50 µL Koffein-Lösung (25 mmol/L Koffein, 25 mmol/L Natriumbenzoat) und 50 µL gesättigte KCl-Lösung in die Röhrchen zugefügt, um die anschließende Extraktion des BRs zu erleichtern. Für die BR-Extraktion wurde den Proben 1 ml Benzol (C<sub>6</sub>H<sub>6</sub>) als Lösungsmittel zugesetzt und die Röhrchen nach einem definierten Vortex-Schema (3x für 4 s, 3x 1 s und wieder 3x für 4 s) bei max. Rotationsgeschwindigkeit gevortext. Anschließend wurden die Röhrchen zur Phasentrennung für 15 min bei 400 x g bei Raumtemperatur zentrifugiert (Sorvall RC 3C Plus). Die organische BR-haltige Phase wurde abgenommen und in 1,5 ml Reaktionsgefäße transferiert. Diese wurden bis zur photometrischen Messung, zumindest aber 30 min. bei -20 °C eingefroren, um mögliche Reste der wässrigen Phase abzutrennen und auf diese Weise die Kontamination der Proben zu minimieren.

**Tab. 2: Pipettierschema des HO-Assays**

NR	ID	HO- Puffer	Zell- Homogenat	Hämin 10mmol/L	DMSO	DFO 100mmol/L	NADPH 10mmol/L	Coffein- Lösung 25mol/L	KCl gesättigt	C6H6
		[ $\mu$ L]	[ $\mu$ L]	[ $\mu$ L]	[ $\mu$ L]	[ $\mu$ L]	[ $\mu$ L]	[ $\mu$ L]	[ $\mu$ L]	[ $\mu$ L]
1	A	-	120	4	-	5	25	50	50	1000
2	A	-	120	4	-	5	25	50	50	1000
3	B	-	120	4	-	5	25	50	50	1000
4	B	-	120	4	-	5	25	50	50	1000
5	C	-	120	4	-	5	25	50	50	1000
6	C	-	120	4	-	5	25	50	50	1000
7	D	-	120	4	-	5	25	50	50	1000
8	D	-	120	4	-	5	25	50	50	1000
9	E	-	120	4	-	5	25	50	50	1000
10	E	-	120	4	-	5	25	50	50	1000
11	F	-	120	4	-	5	25	50	50	1000
12	F	-	120	4	-	5	25	50	50	1000
13	G	-	120	4	-	5	25	50	50	1000
14	G	-	120	4	-	5	25	50	50	1000
15	H	-	120	4	-	5	25	50	50	1000
16	H	-	120	4	-	5	25	50	50	1000
17	I	-	120	4	-	5	25	50	50	1000
18	I	-	120	4	-	5	25	50	50	1000
19	J	-	120	4	-	5	25	50	50	1000
20	J	-	120	4	-	5	25	50	50	1000
21	K	-	120	4	-	5	25	50	50	1000
22	K	-	120	4	-	5	25	50	50	1000
23	L	-	120	4	-	5	25	50	50	1000
24	L	-	120	4	-	5	25	50	50	1000
25	Negativ Kontrolle	25	120	-	4	5	-	50	50	1000
26	Negativ Kontrolle	25	120	-	4	5	-	50	50	1000

#### 2.4 Bilirubinbestimmung:

Die BR-Konzentration der organischen Extrakte wurde mit Hilfe eines 2-Strahlphotometer (UV3900, Hitachi) gemessen. Das Photometer wurde mindestens 30 min vor Messbeginn zum Warmwerden aller Geräteteile gestartet. Die Messungen wurden als Wellenlängenscan (400-600 nm) mit den folgenden Einstellungen (slit: 5 nm; 120 nm/min; PMT(Photomultiplier): autogain, High Resolution) durchgeführt. Zu Beginn wurde eine Nulllinie mit  $C_6H_6$  aufgezeichnet. Die Extrakte wurden im Dunklen langsam aufgetaut und bis zur Adaptation an die Raumtemperatur äquilibrieren gelassen. Mit der Pipette wurde ein Teil des Extraktes vorsichtig von oben in eine Quarzküvette (High Precision Cell, Suprasil mit 10 mm Schichtdicke; Hellma Analytics, Müllheim, Germany) pipettiert. Dabei wurde darauf geachtet, eventuell vorhandene wässrige Kontaminationen nicht vom Boden des Reaktionsgefäßes mitzunehmen. Gemessen wurden erst die Negativkontrollen, dann je eines der Duplikate und im zweiten Durchgang anschließend die jeweiligen Duplikate. Nach etwa jeder zehnten Probe wurde  $C_6H_6$  zur Kontrolle der Nulllinie gemessen. Zur Berechnung der BR-Konzentration wurden die Extinktionen (E) bei 450 nm (Absorptionsmaximum von BR) und 520 nm (Referenzwellenlänge) protokolliert und die Differenz ( $E_{450nm} - E_{520nm}$ ) berechnet, um die BR-spezifische Extinktion zu erhalten. Mithilfe eines Proportionalitätsfaktors (wurde im Labor bereits hinterlegt (Wurm 2021)) wurde die BR-spezifische Extinktion in die BR-Konzentration (nmol/ml) umgerechnet. Aus diesen Werten ist direkt die Menge BR (nmol) abzuleiten, welche vom Zellhomogenat in den 30 Minuten hergestellt worden war. Diese Menge wurde mit der in 120  $\mu$ l Homogenat vorhandenen Proteinmenge normalisiert, um auf die HO-Aktivität in nmol BR/mg Protein in 30 Minuten zu schließen.

#### 2.5 Proteinbestimmung

Zur Normalisierung der gemessenen BR-Menge auf die im HO-Assay eingesetzte Menge Zellprotein, wurde eine Proteinbestimmung nach Bradford durchgeführt. Die Zellhomogenate wurden 1:20 verdünnt (1:5 Verdünnung A, 1:2 der Verdünnung A (Verdünnung B), 1:2 der Verdünnung B (Verdünnung C) mit (0,9%) NaCl). Als Bezug wurde eine Kalibrationsgerade aus bovinem Serum Albumin (BSA) verwendet. Dazu wurde ein BSA-Stammlösung (1 mg/ml in 0,9% NaCl) herangezogen, der in 5 Verdünnungsstufen mit NaCl (0,9%) verdünnt (100  $\mu$ g/ml, 75  $\mu$ g/ml, 50  $\mu$ g/ml, 25  $\mu$ g/ml, 10  $\mu$ g/ml) wurde. Alle Proben (Verdünnungsstufen B und C), die Standards und NaCl (0,9%) als Leerwert, wurden jeweils im Duplikat zu je 50  $\mu$ L

auf eine 96 Well-Platte übertragen. Mit Hilfe einer Multipipette wurden je 200  $\mu$ L Coomassie-Brillant Blue-Lösung hinzugefügt und die Extinktion mit einem Plattenlesegerät (Spark, Tecan) bei 597 nm gemessen. Die Proteinkonzentrationen wurde mit Hilfe der BSA-Kalibrationsgerade mit dem am Gerät installierten Programm (Magelan© Version 2.2, Tecan) ausgewertet. Die Proteinkonzentration der Homogenate wurde unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors berechnet.

## 2.6 Datenauswertung und Statistik:

Die Auswertung der Rohdaten und sämtliche Berechnungen sowie deren grafische Darstellung erfolgten mit einem Rechenprogramm (Microsoft Excel©, Version 2014). Die Platten wurde in aufeinanderfolgenden Experimenten mit Zellen von einem engen Passagen-Bereich (p24-p30) angesetzt (n=6 biologische Replikate). Die Ergebnisse aller ausgewerteten Platten (n=6) wurden als Mittelwerte +/- Standardabweichung (SD) dargestellt. Die Signifikanz der Unterschiede der experimentellen zur jeweiligen Kontrollgruppe wurde mit einem Student's t-Test (zweiseitig, gepaart) untersucht. Als signifikant galten alle Unterschiede, bei denen der p-Wert unter 0,05 lag. In den Abbildungen wurden signifikante Unterschiede wie folgt dargestellt: \*,  $p < 0,05$  und  $> 0,01$ ; \*\*,  $p < 0,01$  und  $> 0,005$ ; \*\*\*,  $p < 0,005$ .

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Auswirkungen der Behandlungen auf die Proteinkonzentration:

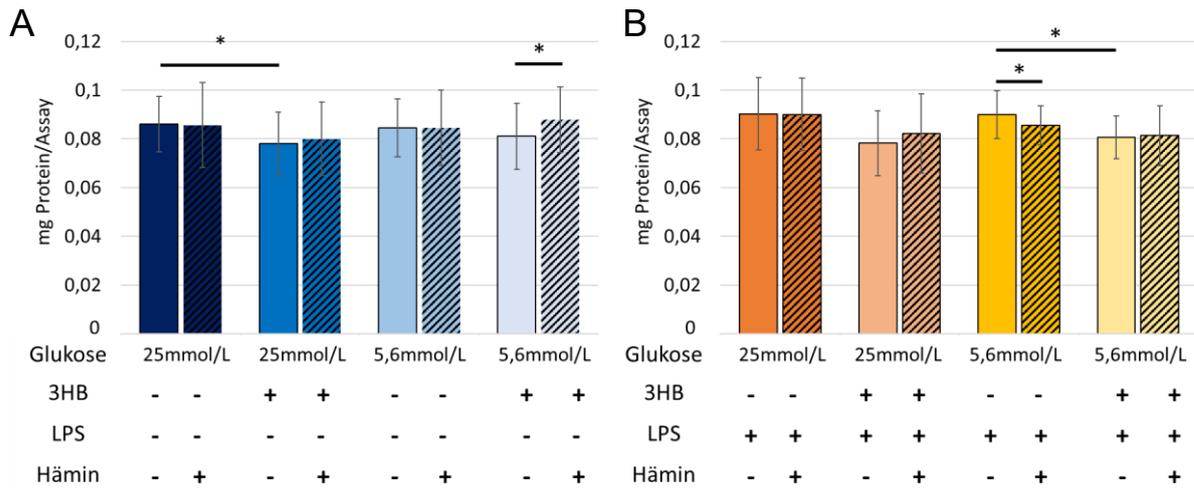
Da die Behandlungen den Metabolismus der J774A.1 Zellen modulieren, ist nicht auszuschließen, dass diese auch einen Einfluss auf die Zellteilungsrate genommen haben. Dies würde sich in einer entsprechenden Änderung der Proteinmenge pro Well niederschlagen.

Das ist per se eine wichtige Information über die Wirkungsweise der Energiesubstrate und Enzymmodulatoren, die, in den eingesetzten Konzentrationen, nicht zu einem deutlichen Zellverlust führen sollten. Da aber auch die Menge BR von der Menge an Enzym und damit auch von der Zellzahl abhängt, ist es notwendig als Maß für die Zellzahl z.B die Proteinmenge heranzuziehen und zur Normalisierung zu verwenden. Die HO-Aktivität wurde deshalb als die vom Homogenat gebildete Menge an BR in nmol/mg Protein angegeben (Protein-normalisiert), und ermöglicht so, dass die HO-Aktivität der Zellen, die unter den verschiedenen Bedingungen kultiviert wurden, vergleichbar ist.

Tendenziell war die Proteinmenge der LPS-behandelten Zellen höher. Der Glukosegehalt selbst hatte keinen signifikanten Unterschied auf die Proteinmenge (**Abb. 3**).

Hingegen reduzierte die Anwesenheit von 3HB die Proteinmenge im Mittel um etwa 5%. Signifikant niedriger war die Proteinmenge durch die Zugabe von 3HB bei hohem Glukosegehalt in der Kontrollbedingung (10%; **Abb. 3 A**) und bei den LPS-behandelten Zellen bei niedrigem Glukosegehalt (11%; **Abb. 3 B**)

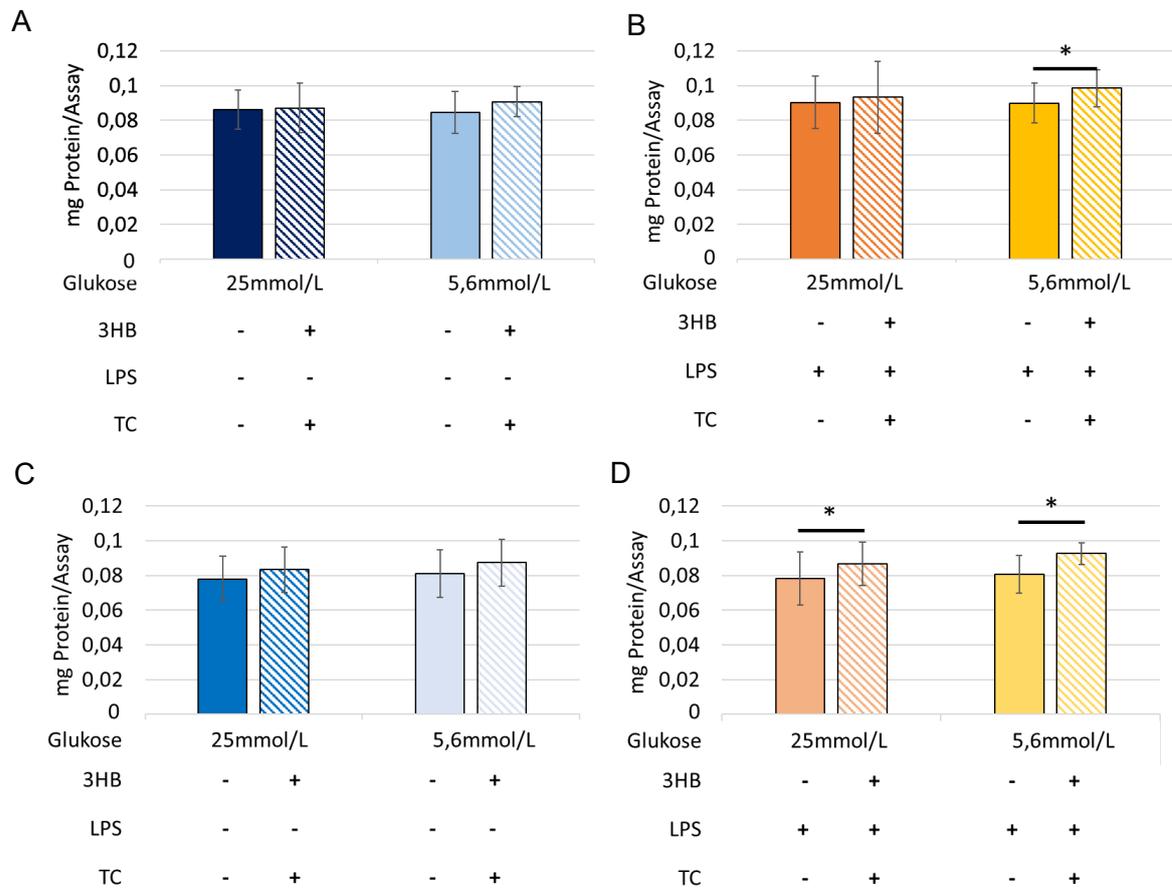
Die Zugabe von Hämin hatte nur einen geringen, aber nicht einheitlichen Effekt auf die Proteinkonzentration. Während Hämin die Proteinkonzentration bei niedrigem Glukosegehalt unter Anwesenheit von 3HB bei den Kontrollzellen signifikant um 7% erhöhte (**Abb. 3 A**), führte es bei den LPS-behandelten Zellen zu einer signifikanten Verringerung der Proteinkonzentration bei niedrigem Glukosegehalt ohne 3HB (5%; **Abb. 3 A & B**).



**Abb. 3 Auswirkungen der Inkubationsmedien auf die Proteinmenge:**

Die Proteinkonzentration des Homogenates wurde nach Ablauf der Inkubationszeit (44 h), wie in Material und Methoden (Kapitel 2.5) angegeben, bestimmt, und die erhaltene Proteinmenge auf das Volumen für den HO-Assay bezogen (mg/Assay). Dargestellt sind die Effekte der Hämin-Behandlung (20  $\mu\text{mol/L}$ , schraffierte Balken) im Vergleich zu jeweiligen Kontrolle unter den verschiedenen Energiesubstrat-Bedingungen: hoher Glukosegehalt (25 mmol/L), hoher Glukosegehalt mit  $\beta$ -Hydroxybutyrat (+ 3HB; 20 mmol/L), niedrigem Glukosegehalt (5,6 mmol/L) und niedriger Glukosegehalt mit  $\beta$ -Hydroxybutyrat (+ 3HB; 20 mmol/L). Jede Inkubationsbedingung gab es als Kontrolle (blau, A) und als LPS-Behandlung (1  $\mu\text{g/ml}$ , orange, B). Die Daten wurden in aufeinanderfolgenden Experimenten erhoben ( $n = 6$ ) und im Duplikat analysiert. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung. Signifikante Unterschiede im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle wurden mit einem Student's t-Test erhoben (2 seitig, gepaart) und sind gekennzeichnet (\*;  $p < 0,05$ ).

Besonders auffällig war, dass in Anwesenheit des NOS Hemmers TC die Proteinkonzentration in den Wells der LPS-behandelten Zellen bei fast allen Konditionen signifikant erhöht war (im Schnitt um etwa 9%, **Abb. 4**). Die Proteinkonzentration stieg bei niedrigem Glukosegehalt durch TC um 9% (**Abb. 4 B**). Bei zusätzlicher Anwesenheit von 3HB stieg der Proteingehalt bei hohem Glukosegehalt um 10% (**Abb. 4 D**) und bei niedrigem um 13% (**Abb. 4 D**). Keine signifikanten Effekte von TC auf die Proteinkonzentration wurden in den Kontrollzellen (kein LPS) gefunden (**Abb. 4 A,C**).



**Abb. 4 Inkubation mit dem NOS-Hemmer Thiocitrullin erhöht die Proteinkonzentration in den Wells der LPS-behandelten Zellen:**

Die Proteinkonzentration des Homogenates wurde nach Ablauf der Inkubationszeit (44 h), wie in Material und Methoden (Kapitel 2.5) angegeben, bestimmt, und die erhaltene Proteinmenge auf das Volumen für den HO-Assay bezogen (mg/Assay). Dargestellt sind die Effekte der Thiocitrullin-Behandlung (+ TC, 50  $\mu$ mol/L, hell schraffierte Balken) im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollen (Vehikel (+DMSO), ausgefüllte Balken). A, B) Effekt von TC auf die Zellen ohne LPS-Zugabe (A, blaue Balken) und mit LPS-Zugabe (1  $\mu$ g/ml; B, orange Balken) im Glukosemedium mit hohem Glukosegehalt (25 mmol/L) und niedrigem Glukosegehalt (5,6 mmol/L), ohne weiteren Zusatz (Kontrolle). C, D) Effekt von TC auf die Zellen unter gleichzeitiger Zugabe von  $\beta$ -Hydroxybutyrat (+ 3HB; 20 mmol/L) ohne LPS-Zugabe (C, blaue Balken) und mit LPS-Zugabe (D, orange Balken) im Glukosemedium bei hohem Glukosegehalt (25 mmol/L) und niedrigem Glukosegehalt (5,6 mmol/L). Die Daten wurden in aufeinanderfolgenden Experimenten erhoben (n = 6) und im Duplikat analysiert. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung. Signifikante Unterschiede im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle wurden mit einem Student's t-Test erhoben (2 seitig, gepaart) und sind gekennzeichnet (\*;  $p < 0,05$ ).

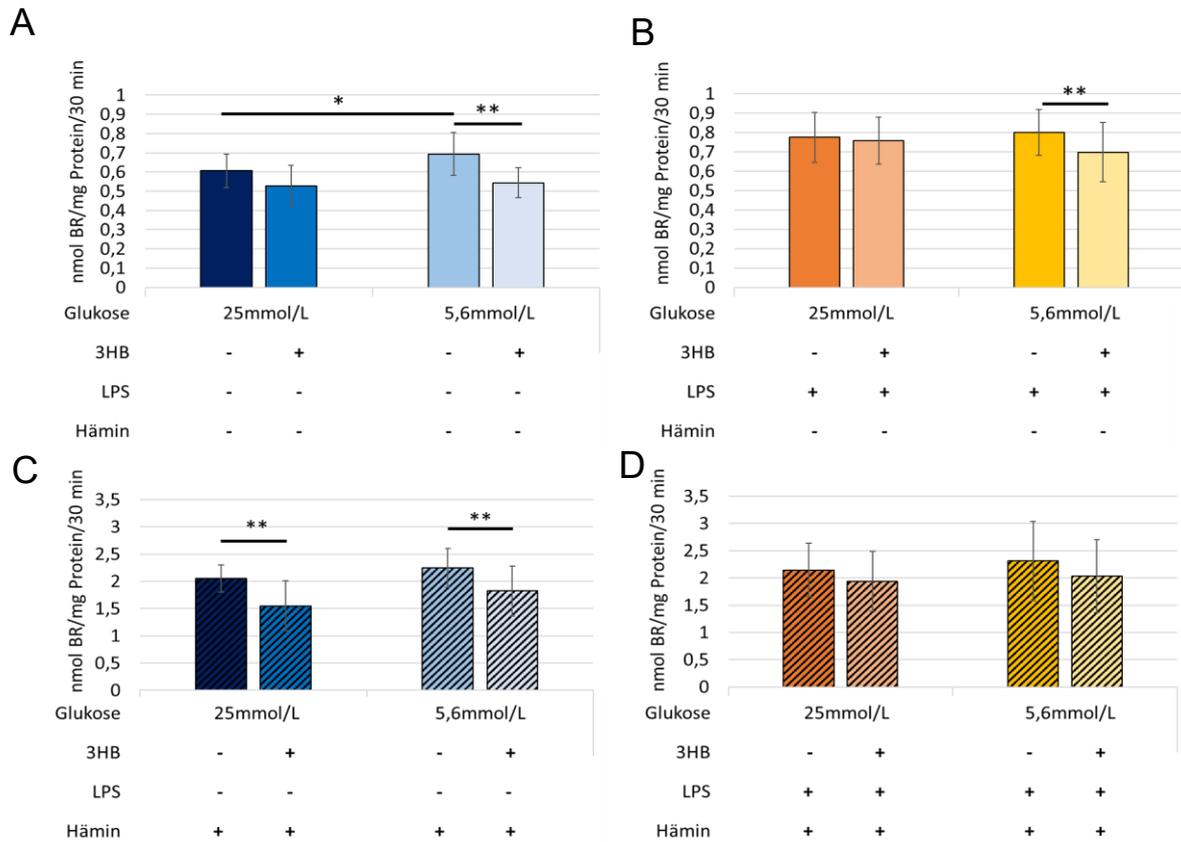
### 3.2 Auswirkungen der Behandlungen auf die HO-Aktivität der J774A.1 Zellen:

Da eine deutliche Steigerung (durchschnittlich etwa eine 3,3-fache Steigerung in den Kontrollzellen, und etwa 3-fache Steigerung in den LPS-behandelten Zellen) der HO-Aktivität durch die Behandlung mit Hämin, dem Substrat der HO, ersichtlich war, kann davon ausgegangen werden, dass der in Material und Methoden beschriebene Assay, wie erwartet, funktioniert hat. Auch die Zugabe von LPS hat, wie zu erwarten, die HO-Aktivität um etwa 16% gesteigert (**Abb. 5 B**). Im Folgenden werden die Auswirkungen der einzelnen Bedingungen auf die Aktivität der HO genauer erläutert.

#### 3.2.1 Einfluss der Energiesubstrate im Inkubationsmedium auf die HO-Aktivität:

Ein hoher Glukosegehalt führte tendenziell zu einer erniedrigten HO-Aktivität. Im Durchschnitt war die HO-Aktivität der J774A.1 Zellen, die mit Medium mit hohem Glukosegehalt inkubiert worden sind um ca. 7% niedriger als bei denen, die mit Medium mit niedrigem Glukosegehalt behandelt wurden. Signifikant wurde der Unterschied im Glukosegehalt nur in der Kontrollbedingung ohne den Einfluss anderer Zusätze. Hier war die HO-Aktivität der J774A.1 Zellen mit niedrigem Glukosegehalt um 13% erhöht im Vergleich zum Medium hohem Glukosegehalt (**Abb. 5 A**).

Auch die Zugabe von 3HB senkte die HO-Aktivität. Bei den Kontroll-Zellen wurde durch Zugabe von 3HB die HO-Aktivität im Mittel um weitere 25% und um ca. 10% bei den LPS-behandelten Zellen gesenkt (**Abb. 5**). Bei den Makrophagen der Kontrollbehandlung war der Einfluss des 3HB bei niedrigem Glukosegehalt am stärksten ausgeprägt (33%; **Abb. 5 A**). Auch in den Hämin-behandelten Zellen sank die HO-Aktivität bei beiden Glukosegehalten durch die Inkubation mit 3HB (**Abb. 5 C**). Bei den LPS-behandelten Zellen sank die HO-Aktivität um etwa 28% durch Zugabe von 3HB, wenn die Zellen mit Medium mit niedrigem Glukosegehalt inkubiert wurden. Jedoch vermochte die Zugabe von 3HB keine weitere Erniedrigung der HO-Aktivität in den Zellen, die mit hohem Glukosegehalt inkubiert wurden, zu bewirken. Auch in den Hämin-behandelten LPS-Zellen war eine leichte Verminderung der HO-Aktivität durch die Zugabe von 3HB erkennbar, ohne allerdings signifikant zu werden (**Abb. 5 D**).



**Abb. 5: Abhängigkeit der HO-Aktivität von dem Gehalt an Energiesubstraten: Glukose und  $\beta$ -Hydroxybutyrat:**

Die Aktivität der Hämoxigenase (HO) wurde ermittelt, wie in Material und Methoden (Kap. 2.3) beschrieben. Dazu wurde die Menge an Bilirubin (BR), die in 30 min produziert wurde, photometrisch bestimmt und auf die im Assay vorhandene Menge Protein normalisiert (nmol BR/mg Protein/30 min). Verglichen wird der Effekt der Zugabe von  $\beta$ -Hydroxybutyrat (+ 3HB, 20 mmol/L; hellerer Farbton) zur jeweiligen Kontrolle des selbigen Mediums (hoher Glukosegehalt: 25 mmol/L, dunklerer Farbton; niedriger Glukosegehalt: 5,6 mmol/L, hellerer Farbton).

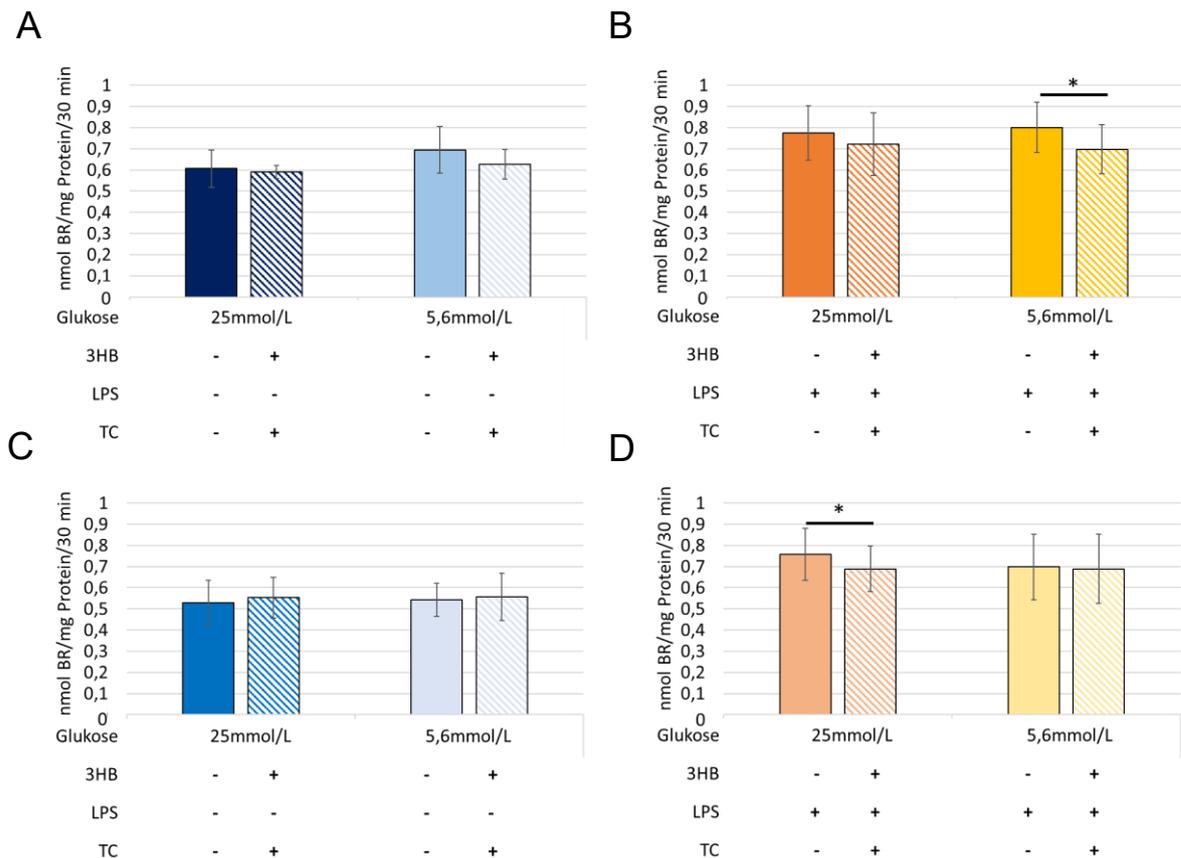
**A,B:** Effekt des Zusatzes 3HB ohne Zugabe von Häm (Vehikel (+DMSO), ausgefüllte Balken) auf die HO-Aktivität der Kontrollzellen (**A**, blaue Balken) und der LPS-behandelten Zellen (1  $\mu$ g/ml, **B**, orangene Balken).

**C,D:** Effekt von 3HB unter Zugabe von Hämin (20  $\mu$ mol/L, schwarze Schraffierung) auf die Kontrollzellen (**C**, blaue Balken) und die LPS-behandelten Zellen (1  $\mu$ g/ml, **D**, orangene Balken)

Die Daten wurden in aufeinanderfolgenden Experimenten erhoben (n = 6), im Duplikat analysiert und bereinigt mit der Negativ-Kontrolle. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung. Signifikante Unterschiede im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle wurden mit einem Student's t-Test erhoben (2 seitig, gepaart) und sind gekennzeichnet (\*;  $p < 0,05$ ; \*\*;  $p < 0,01$ ).

### 3.3 Einfluss des iNOS-Hemmers Thiocitrullin:

Die Zugabe von TC hatte keinen signifikanten Einfluss auf die HO-Aktivität der Makrophagen, die keine LPS-Behandlung erfahren hatten. Jedoch stieg tendenziell die HO-Aktivität der Kontrollzellen durch die Inkubation mit TC in den 3HB-behandelten Zellen an, ohne jedoch signifikant zu werden (**Abb. 6 C**). Bei den LPS-behandelten Zellen sank die HO-Aktivität bei allen Bedingungen durch Zugabe von TC (im Mittel um etwa 6%) (**Abb. 6 B,D**). Signifikante Unterschiede ergaben sich bei den LPS-behandelten Zellen nur bei den Makrophagen, die mit niedrigem Glukosegehalt behandelt wurden. Diese zeigten mit TC eine um 15% geringere HO-Aktivität (**Abb. 6 B**). Zellen, die mit hohem Glukosegehalt und gleichzeitiger Gabe von 3HB behandelt wurden zeigten eine um etwa 10% niedrigere HO-Aktivität (**Abb. 6 D**).



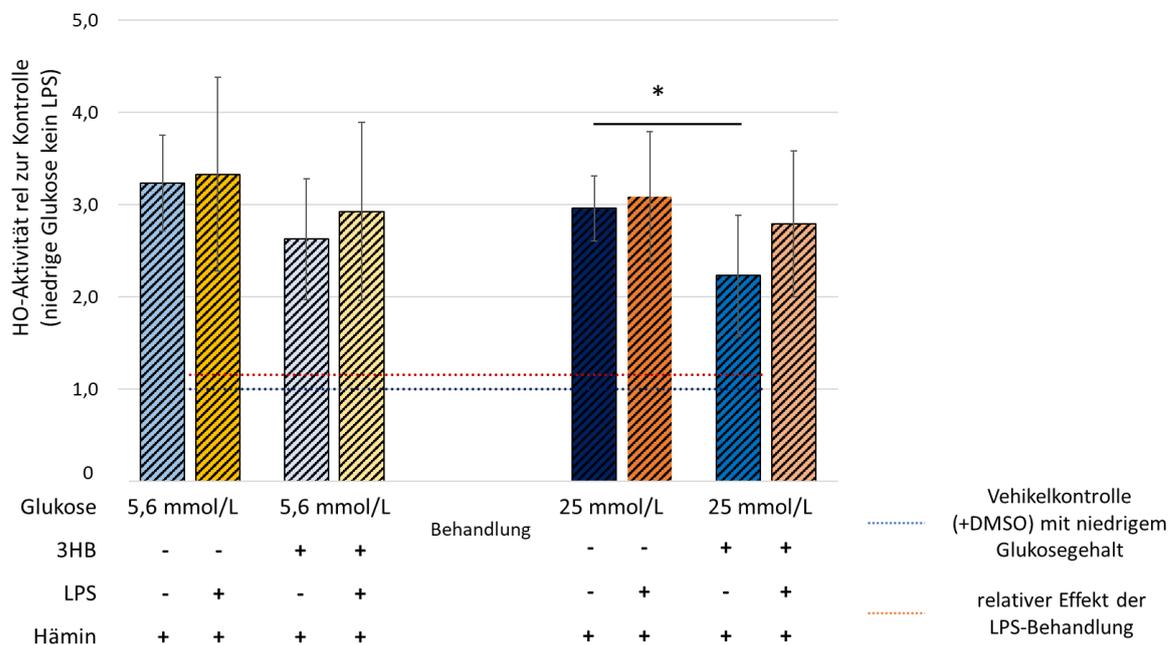
**Abb. 6 TC vermindert die HO-Aktivität in LPS-behandelten Makrophagen.**

Die HO-Aktivität wurde bestimmt, wie in der Legende zu **Abb. 3** beschrieben. Dargestellt sind die Effekte der Thiocitrullin (+ TC, 50  $\mu\text{mol/L}$ )-Behandlung (schraffierte Balken) im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollen (ausgefüllte Balken). **A, B**) Effekt von TC auf die Zellen ohne LPS-Zugabe (**A**, blaue Balken) und mit LPS-Zugabe (**B**, 1  $\mu\text{g/ml}$ , orange Balken) im Medium mit hohem Glukosegehalt (25 mmol/L, dunkler Farbton) und niedrigem Glukosegehalt (5,6 mmol/L, heller Farbton), ohne weiteren Zusatz (Kontrolle). **C, D**) Effekt von TC auf die Zellen unter gleichzeitiger Zugabe von  $\beta$ -Hydroxybutyrat (+ 3HB; 20 mmol/L) ohne LPS-Zugabe (**C**, blaue Balken) und mit LPS-Zugabe (**D**, orange Balken) im Medium mit hohem Glukosegehalt (25 mmol/L, dunkler Farbton) und niedrigem Glukosegehalt (5,6 mmol/L, heller Farbton). Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung ( $n = 6$ ). Signifikante Unterschiede im Vergleich zur Kontrolle sind gekennzeichnet (\*;  $p < 0,05$ ; Student's t-Test, 2 seitig, gepaart).

### 3.4 Auswirkungen der Energiesubstrate auf die Steigerung der HO-Aktivität durch Häm

Wie oben bereits erwähnt, führt die 44h-stündige Inkubation mit Häm zu einer deutlichen Steigerung der HO-Aktivität (mehr als dreifache HO-Aktivität im Vergleich zu den Zellen, die nur mit Vehikel behandelt wurden; von jetzt an als Häm-Effekt bezeichnet). Allerdings konnte beobachtet werden, dass die Energiesubstrate einen hemmenden Einfluss auf diese Steigerung hatten. Tendenziell wurden die höchsten Häm-Effekte in den Zellen, die mit

geringen Glukosegehalten inkubiert wurden, beobachtet. Je höher die Konzentration an Energiesubstraten war, desto geringer fiel der Häm-Effekt aus. Im Vergleich zum Häm-Effekt der Inkubation bei niedrigem Glukosegehalt war der Häm-Effekt bei den Kontrollzellen in Anwesenheit von hohem Glukosegehalt plus 3HB um etwa 1/3 verringert. Signifikant wurde der Unterschied in den Kontrollzellen nach Zugabe von 3HB in Anwesenheit der hohen Glukosespiegel (15%ige Verringerung des Häm-Effekts im Vergleich zur Kontrolle ohne 3BH (Abb. 7)).



**Abb. 7 relative Steigerung der HO-Aktivität durch Häm-Zugabe (Häm-Effekt) in Abhängigkeit des Gehalts an Energiesubstraten:**

Die Zuwächse der HO-Aktivität wurden auf die Vehikelkontrolle (niedriger Glukosegehalt, kein Häm, kein LPS) bezogen, welche gleich 1 gesetzt wurde (blau gepunktete Linie). Zum Vergleich wurde die HO-Aktivität der LPS-Behandlung (1 µg/ml) errechnet (1,15-fache Erhöhung der relativen HO-Aktivität durch LPS bei niedrigem Glukosegehalt, kein Häm; orange gepunktete Linie). Die relativ zur Vehikelkontrolle errechneten Häm-Effekte (schraffierte Balken) sind in Abhängigkeit des Glukosegehalts der Kontrollzellen (Glukosegehalt. 5,6 mmol/L, hellblaue Balken; 25 mmol/L dunkelblaue Balken), sowie der LPS-behandelten Zellen (orangene Balken) und unter dem Einfluss von 3HB-Zusatz (20 mmol/L, hellere Farbtöne) dargestellt (Mittelwerte +/-SD; n = 6). Signifikante Unterschiede wurden mit einem Student's T-Test erhoben (2 seitig, gepaart) und sind gekennzeichnet. (\*, p<0,05)

#### 4. Diskussion

Es konnte bereits gezeigt werden, dass die Häm-Degradation eine essentielle Rolle für den Metabolismus von Makrophagen und damit für deren Funktion darstellt (Bories et al. 2020). In einem HO-1-Knock-out-Modell wurde gezeigt, dass HO einen Einfluss auf die Polarisierung der Makrophagen nimmt. Bei vermehrter Expression von der HO-1 kommt es zu einer erhöhten Bildung von anti-inflammatorischen M2 Markern (Zhang et al. 2018). Dies suggeriert, dass eine erhöhte Enzymaktivität über die generierten Reaktionsprodukte mit der M2-Polarisierung kausal verknüpft ist. Die meisten Studien, in welchen eine Regulation der HO untersucht wurde, beschränken sich jedoch auf die Analyse von Veränderungen der mRNA und Protein-Spiegel von HO-1 oder HO-2, welche beide zur enzymatischen Aktivität beitragen. Der Einfluss von Energiesubstraten auf die Kapazität von Makrophagen Häm zu degradieren wurde jedoch bisher kaum untersucht. Letztlich können aber nur Untersuchungen zur Enzymaktivität Informationen zum Umfang der Produktbildung beitragen. Daher war es das Ziel dieser Arbeit den Effekt von Glukose in unterschiedlicher Konzentration und 3HB auf die *in vitro* HO-Aktivität von kultivierten Makrophagen der Linie J774A.1 zu untersuchen. Dabei wurde die Kapazität der Makrophagen Häm zu degradieren als Maß für die zelluläre HO-Aktivität gewertet.

Pimstone et al. (1971) zeigten bereits, dass die Zugabe von Hämin, oder Hämoglobin *in vivo* zu einer deutlichen (2,5-fachen) Steigerung der HO-Aktivität in alveolären und peritonealen Makrophagen führt. Daher haben wir zunächst verifiziert, dass die Zugabe von Hämin auch in den von uns verwendeten J774A.1 Zellen *in vitro* zu einer Erhöhung der HO-Aktivität führt. Wie zu erwarten, zeigte sich eine 2-3-fache Steigerung der HO-Aktivität nach der Zugabe von Hämin. Somit konnten wir annehmen, dass unser Inkubationsprotokoll geeignet ist, um einen modulierenden Effekt der HO-Aktivität durch die Stimulationsbedingungen zeigen zu können. Da bereits bekannt ist, dass eine hohe Glukosekonzentration zu einer M1 Polarisierung in Makrophagen führt (Wen et al. 2006), erwarteten wir bei einem Glukosegehalt von 25 mmol/L einen Abfall der HO-Aktivität. Ob, und wenn ja in welche Richtung die Zugabe von Ketonkörpern, wie 3HB (20 mM), die HO-Aktivität moduliert, sollte ebenfalls im Zuge dieser Arbeit herausgefunden werden, da die Literatur hierzu nur wenig und widersprüchliche Hinweise liefert (Gao et al. 2023, Qiao et al. 2020).

Unsere Daten zeigen, dass LPS-behandelte Makrophagen eine gesteigerte Kapazität aufweisen Häm zu degradieren, im Vergleich zu den unbehandelten, nicht-aktivierten Kontrollzellen, und bestätigen damit die bereits bekannten Effekte von LPS auf Makrophagen

(Srisook et al. 2006, Srisook und Cha 2004). Die erhöhte HO-Aktivität ist wahrscheinlich der gesteigerten NO-Produktion der M1-aktivierten Makrophagen geschuldet, da NO als Induktor der HO-1 wirkt, um der übermäßigen/anhaltenden ROS Produktion entgegen zu wirken (Srisook und Cha 2004). Dass NO tatsächlich einen Einfluss auf die J774A.1 Zellen hat und die NO-Bildung durch LPS offenbar deutlich erhöht wird, zeigen auch unsere Ergebnisse. In Anwesenheit des NOS-Hemmers TC, welcher die Bildung von NO unterbindet, konnten wir eine signifikante Erniedrigung der HO-Aktivität in den LPS-behandelten J774A.1 Zellen beobachten. Da Koike et al. (2015) zeigen konnten, dass NO in LPS-behandelten Makrophagen die HO-1-Expression induziert, ist die Erhöhung der HO-Aktivität bei LPS-behandelten J774A.1 Zellen höchstwahrscheinlich über die erhöhte NO-Produktion erklärbar. Aus diesen Ergebnissen können wir schließen, dass die J774A.1 Zellen für die Untersuchungen geeignet sind, da sich die Effekte der Hämin- und der LPS-Behandlung auf die HO-Aktivität ähnlich darstellen, wie aus den Daten der Literatur zu erwarten war (Koike et al. 2015, Pimstone et al. 1971, Srisook et al. 2006). Somit gehen wir davon aus, dass auch in unserem Zellsystem die LPS-Behandlung zur M1-Polarisierung und die Hämin-Behandlung zur M2-Polarisierung geführt hatte.

#### 4.1 Einfluss der Behandlungen auf die Zellzahl

Die Inkubationsbedingungen hatten eine moderate Auswirkung auf die zugrundeliegenden Proteinmengen pro Well und somit auf die zugrundeliegende Zellzahl. Der Proteingehalt wurde einerseits als Maß für die Zellzahl am Ende des Versuchs gewertet aber auch zur Normalisierung der Mengen an BR, die für die Bestimmung der HO-Aktivität benötigt wurde, herangezogen. Größere Änderungen der Proteinkonzentration sollten vermieden werden, da dies zu einer größeren Fehlerbehaftung der zu erhebenden Ergebnisse führen könnte. Alle Effekte der Behandlungen auf die Proteinmengen bewegten sich in einem Bereich von etwa +/- 10%, sodass wir daher davon ausgehen können, dass die Zellen die Inkubationsbedingungen unseres Protokolls gut toleriert haben und die Proteinmenge zur Normalisierung verwendet werden kann.

Die Konzentration der Glukose im Zellkulturmedium hatte keinen signifikanten Einfluss auf die Zellzahl. Jedoch konnten wir in Anwesenheit des NOS-Hemmers TC eine Erhöhung der Proteinkonzentration bemerken. Diese war für die meisten LPS-Konditionen auch signifikant, was dafürspricht, dass das NO einen hemmenden Einfluss auf die Zellzahl oder die Zellproliferation nimmt.

Einen überwiegend hemmenden Einfluss auf die Zellzahl zeigte sich auch durch Inkubation mit 3HB. Da tendenziell bei fast allen Bedingungen leichte Erniedrigungen der Proteinmenge durch die Zugabe von 3HB zu beobachten waren (**Abb. 3**), lässt dies die Vermutung zu, dass 3HB auch in unseren Zellen möglicherweise zu einer Veränderung der Zellteilungsrate oder des Metabolismus geführt hat. Da gezeigt wurde, dass 3HB einen Einfluss auf die Polarisierung von Makrophagen hat (Qiao et al. 2020), erwarteten wir dies auch für die J774A.1 Zellen. Je nach Wirkung von 3HB auf die J774A.1 Zellen, erwarteten wir eine Erhöhung bei einer Polarisierung zu M2 bzw. Erniedrigung HO-Aktivität bei einer Polarisierung zu M1. Da für Makrophagen bereits die pro-inflammatorische Wirkung bei hohen Glukosespiegeln gezeigt wurde, erwarteten wir bei dieser Kondition jedenfalls eine erniedrigte HO-Aktivität.

#### 4.2 Modulation der HO-Aktivität in Makrophagen:

In unseren Experimenten konnten wir wie erwartet zeigen, dass die HO-Aktivität der nicht-LPS-aktivierten J774A.1 Zellen bei hohen Glukosekonzentrationen (25 mmol/L) gehemmt wird. In vorherigen Studien wurde bereits gezeigt, dass hohe Glukosekonzentrationen bei der Inkubation von Makrophagen zu einer höheren Expression von pro-inflammatorischen Zytokinen führt (Suzuki et al. 2021). Unsere Daten der erniedrigten HO-Aktivität in Anwesenheit hoher Glukosespiegel können ebenfalls als ein Hinweis für eine Stimulation in Richtung des pro-inflammatorischen Phänotyps der J774A.1 Zellen gewertet werden.

##### 4.2.1 3HB hemmt die HO-Aktivität

Die Inkubation mit 3HB zeigte einen hemmenden Einfluss auf die HO-Aktivität der nicht-aktivierten Makrophagen. Vorherige Studien zeigen widersprüchliche Ergebnisse hinsichtlich des Einflusses von 3HB auf die Polarisierung von Makrophagen. In einer *in vitro*-Studie mit Makrophagen aus dem Knochenmark führte die Inkubation mit 3HB zu einer anti-inflammatorischen M2 Polarisierung der Makrophagen über einen STAT6 Signalweg (Huang et al. 2022). Bei bovinen Makrophagen und bei Monozyten, die *ex vivo* mit 3HB stimuliert worden sind, führte die Zugabe von 3HB zu einer vermehrten ROS Produktion und erhöhter Expression pro-inflammatorischer Gene (Gao et al. 2023), sowie zu einer verminderten Phagozytosekapazität über die Aktivierung der Nod-like-Rezeptors Protein3 (NLRP3; Nod-like Receptor Protein 3) (Dong et al. 2022). Eine Studie aus unserer Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass die HO-Aktivität die Phagozytose von J774A.1 Zellen unterstützt, indem Häm abgebaut

wird (Müllechner et al. 2017). Daraus lässt sich schließen, dass eine erniedrigte HO-Aktivität auch mit einer erniedrigten Phagozytosekapazität in diesen Zellen einhergeht. Somit unterstützen unsere Daten über die erniedrigte HO-Aktivität die Vermutung, dass 3HB die Funktion von Makrophagen verändert und eine Polarisierung in Richtung M1 stimuliert. Gehen wir davon aus, dass 3HB zu einer erhöhten ROS Produktion führt, so ist dies in Makrophagen mit einem erhöhten NADPH-Verbrauch für die NADPH-Oxidase verbunden. *In vivo* könnte es deshalb sein, dass nicht mehr genug NADPH für die Häm-Degradation zur Verfügung steht und so zusätzlich die HO-Produktbildung unterdrückt wird. Möglicherweise könnte über diesen Mechanismus auch die Wiederherstellung der Homöostase kompromittiert sein.

#### 4.2.2 Die Kapazität Häm zu degradieren wird durch die Energiesubstrate inhibiert

Um zu untersuchen, ob Glukose und 3HB auch die Polarisierungs-Effekte nach Hämin-Gabe, also die M2-Polarisierung, modulieren kann, wurde den J774A.1 Zellen 24h nach Gabe der Energiesubstrate zusätzlich Hämin verabreicht. Hierbei zeigte sich, dass die Hämin-vermittelte Erhöhung der HO-Aktivität durch 3HB und die hohe Glukosekonzentration um etwa 30% niedriger war (**Abb. 7**). Daraus lässt sich schließen, dass Häm schlechter abgebaut werden kann, je mehr Energiesubstrate bereit stehen, und somit mehr freies, pro-oxidativ-wirkendes Häm überbleibt. Freies Häm entsteht im Körper vor allem beim Abbau von roten Blutkörperchen, wie beispielsweise bei Verletzungen, aber auch bei hämolytischen-wirkenden Prozessen, wie Hypoxie, Ischämie oder systemischen Entzündungsreaktionen (Haines und Tosaki 2020). Es ist bekannt, dass viel freies Häm zu einer vermehrten Bildung von ROS, sowie oxidativem Stress und in weiterer Folge zu Zellschädigungen und Entzündungsreaktionen im Körper führt (Wagener et al. 2001). Ist aber durch hohe Glukosegehalte und 3HB die HO-Aktivität, wie in unseren Experimenten gezeigt, herabgesetzt, kann das freie Häm in nicht-ausreichendem Umfang abgebaut werden, wodurch es zu weiterer Zellschädigung kommt. Da Makrophagen die wichtigste Quelle für HO-1 bei der Wundheilung darstellen (Kämpfer et al. 2001), könnte dies eine Erklärung dafür sein, warum Patienten mit Diabetes eine schlechtere Wundheilung mit chronischer Entzündung zeigen. Denn auch bei schlecht eingestelltem Diabetes können hohe Glukosegehalte zusammen mit 3HB im Blut auftreten (Laffel 1999). In einem Ratten-Modell mit experimenteller Diabetes konnte jedoch gezeigt werden, dass die Induktion der HO durch Hämin zu einer verbesserten Wundheilung führt (Grochot-Przeczek et al. 2009). Somit suggerieren unsere Daten, dass die M2 Stimuli in Anwesenheit der Energiesubstrate auf die Polarisierung der Makrophagen weniger effektiv

sind für eine M2 Polarisierung und somit eine verminderte zytoprotektive Wirkung entfalten können, aber eine Verstärkung des M2 Stimulus könnte ein therapeutischer Ansatz sein.

#### 4.3 Ausblick

Wir können durch die Messung der HO-Aktivität nicht sicher sagen, ob es durch die Zugabe von den Energiesubstraten tatsächlich zu einer Änderung des Phänotyps kam, da wir keine Polarisierungsmarker gemessen haben. Wir können durch die Vorarbeit anderer davon ausgehen, dass LPS eher zu einem M1 Phänotyp (Rossol et al. 2011) und die gesteigerte HO-Aktivität bei Zugabe von Häm in eher zu einer M2 Polarisierung geführt hat, wie in anderen Modellen gezeigt wurde (Zhang et al. 2018). Bei der Zugabe von 3HB wiederum gibt es bisher wenige, widersprüchliche Daten in welcher Weise 3HB Einfluss auf die Polarisierung der Makrophagen nimmt. Deswegen wäre es spannend den Effekt von 3HB auf die Expression von M1-Polarisierungsmarker z.B durch eine Messung von Zytokinen oder anderer Polarisierungsmarker in weiteren Experimenten genauer zu untersuchen. Es muss außerdem berücksichtigt werden, dass die Bedingungen unter denen die HO-Assays hier durchgeführt wurden, die Häm-abbauende Kapazität des Zellhomogenates widerspiegeln, also bei maximalem Substratumsatz, ohne Limitierung der Ausgangsprodukte stattfanden. Ob unter *in vivo* Bedingungen ähnliche Effekte durch die Energiesubstrate auf die HO-Produktbildung zu beobachten sind, könnte durch Tierversuche geklärt werden.

## 5. Conclusio

Unsere Daten zeigen, dass sowohl hohe Glukosekonzentrationen, als auch 3HB die HO-Aktivität von Makrophagen verringern. Da bekannt ist, dass erhöhte Glukosespiegel eine M1-Polarisierung der Makrophagen fördern, unterstützen unsere Daten indirekt die Annahme, dass eine hohe HO-Aktivität, aufgrund der gebildeten Endprodukte, einen anti-inflammatorischen/zytoprotektiven M2-Phänotyp vermittelt. Unsere Daten suggerieren weiterhin, dass unter hyperglykämischen Bedingungen und/oder in der Ketose weniger zytoprotektiv wirkende HO-Produkte gebildet werden. Zusätzlich bleibt wegen der geringeren HO-Aktivität mehr Häm über, welches in weiterer Folge pro-inflammatorisch wirken kann. Unsere Daten suggerieren außerdem, dass die Stimulation in Richtung eines M2-Phänotyps in Anwesenheit der Energiesubstrate (hohe Glukose und 3HB) weniger effektiv ist, bzw. eine M2-Stimmlation eine geringere zytoprotektive Wirkung haben dürfte, da unter diesen metabolischen Bedingungen die Polarisierung der Makrophagen Richtung M1 favorisiert wird.

## 6. Zusammenfassung

Makrophagen sind Zellen des angeborenen Immunsystems, die sowohl für Entzündungsreaktionen, als auch für die Wiederherstellung der Gewebshomöostase wichtig sind. Je nach Funktion werden sie in pro-inflammatorische (M1) und anti-inflammatorische Makrophagen (M2) unterteilt und können ihre Eigenschaften je nach umgebenden Milieu ändern. Es ist bekannt, dass erhöhte Glukosespiegel einen pro-inflammatorischen Einfluss auf Makrophagen haben. Für den bei Nahrungskarenz gebildeten Ketonkörpern beta-Hydroxybutyrat (3HB) gibt es kontroverse Ergebnisse auf die Polarisierung von Makrophagen. Mit der Polarisierung der Makrophagen ist auch das Enzym Hämoxxygenase-1 (HO-1) assoziiert, welches als Marker-Enzym des M2 Phänotyps angesehen wird. Die HO degradiert Häm zu Eisen ( $\text{Fe}^{3+}$ ), Kohlenmonoxid und Biliverdin, welches durch Biliverdinreduktase zu Bilirubin (BR) umgewandelt wird. Man glaubt, dass die Hämdegradation, auch wegen ihrer Endprodukte, eine wichtige Rolle für die anti-inflammatorische Wirkung von Makrophagen hat. Der Einfluss von Energiesubstraten auf die HO-Aktivität von Makrophagen wurde bisher kaum untersucht. Das Ziel dieser Arbeit war es den Einfluss von Glukose und 3HB auf die HO-Aktivität von Makrophagen herauszufinden.

Makrophagen der Linie J774A.1 wurden durch die Inkubation mit moderaten (5,6 mmol/L) und erhöhten (25 mmol/L) Glukosekonzentrationen in Ab- oder Anwesenheit von 3HB (20 mmol/L) vorbehandelt. Im Anschluss wurden die Zellen mit LPS (1  $\mu\text{g/ml}$ ) für eine pro-inflammatorische Polarisierung oder mit Hämin (20  $\mu\text{mol/L}$ ) für eine anti-inflammatorische Polarisierung inkubiert. Thiocitrullin (TC, 50  $\mu\text{mol/L}$ ), ein NO-Synthase Hemmer, wurde eingesetzt, um den Effekt der LPS-stimulierten NO-Bildung auf die HO-Aktivität zu untersuchen. Als Maß für die HO-Aktivität wurde die Kapazität des Zellhomogenates Häm in BR umzuwandeln unter Berücksichtigung der zugrundeliegenden Proteinmenge herangezogen.

Unsere Daten zeigen, dass 3HB und die erhöhte Glukosekonzentration einen hemmenden Einfluss auf die HO-Aktivität hatten. Außerdem zeigte sich, dass die Hämin-Behandlung in Anwesenheit der Energiesubstrate weniger effektiv für die Erhöhung der HO-Aktivität war. Daraus lässt sich schließen, dass die Energiesubstrate eine pro-inflammatorische Wirkung auf Makrophagen haben und die Ausprägung eines anti-inflammatorischen Phänotyps hemmen. Da eine verminderte HO-Aktivität mit einer reduzierten Häm-Beseitigung und Entzündungsprozessen assoziiert sein dürfte, könnte dies eine Erklärung für die schlechtere Wundheilung bei Diabetes sein.

## 7. Summary

Macrophages are cells of the innate immune system that are important for defence and for the restoration of tissue homeostasis. Depending on their function they are divided into pro-inflammatory (M1) and anti-inflammatory (M2) macrophages and can change their polarisation state depending on the surrounding environment. It is known that elevated glucose levels have a pro-inflammatory effect on macrophages. For beta-hydroxybutyrate (3HB), which is synthesized in the liver during food deprivation, there are controversial results on macrophage polarization. However, associated with macrophage polarization is the enzyme heme oxygenase-1 (HO-1), which is considered as a marker enzyme of the M2 phenotype. HO itself degrades heme yielding iron( $\text{Fe}^{2+}$ ), carbon monoxide, and biliverdin, which is then converted to bilirubin (BR) by biliverdin reductase. It is believed that heme degradation has an important role on the anti-inflammatory effect of macrophages. However, the influence of energy substrates on the HO activity of macrophages has hardly been studied. The aim of this diploma thesis was to find out if glucose and 3HB have an influence on the HO activity of macrophages.

Macrophages of the cell line J774A.1 were incubated with moderate (5.6 mmol/l) and increased (25 mmol/l) glucose concentrations in the absence or presence of 3HB (20 mmol/l). Subsequently, cells were incubated with LPS (1  $\mu\text{g/ml}$ ) for pro-inflammatory polarization or with hemin (20  $\mu\text{mol/l}$ ) for anti-inflammatory polarization. Thiocitrulline (TC, 50  $\mu\text{mol/l}$ ), an NO synthase inhibitor was used to study the effect of LPS-stimulated NO formation on HO activity. To measure the HO-activity, the capacity of the cell homogenate to convert heme to bilirubin was quantified photometrically via a coupled biochemical assay. The amount of protein present per well at the end of the incubation period was determined using the Bradford method and used for normalization.

Our data show that 3HB, and an increased glucose concentration had an inhibitory effect on HO activity. It also showed that the hemin treatment was less effective to increase the HO activity in the presence of the energy substrates. This suggests that the energy substrates have a pro-inflammatory effect on macrophages in addition to inhibiting the expression of an anti-inflammatory phenotype. Since decreased HO activity is likely to be associated with reduced heme removal and persistent inflammatory processes, this could explain the poorer wound healing in diabetes.

## 8. Literaturverzeichnis

Abraham NG, Kappas A. 2008. Pharmacological and clinical aspects of heme oxygenase. *Pharmacological Reviews*, 60 (1): 79–127. DOI 10.1124/pr.107.07104.

Bories GFP, Yeudall S, Serbulea V, Fox TE, Isakson BE, Leitinger N. 2020. Macrophage metabolic adaptation to heme detoxification involves CO-dependent activation of the pentose phosphate pathway. *Blood*, 136 (13): 1535–1548. DOI 10.1182/blood.2020004964.

Caputa G, Flachsmann LJ, Cameron AM. 2019. Macrophage metabolism: a wound-healing perspective. *Immunology and cell biology*, 97 (3): 268–278. DOI 10.1111/imcb.12237.

Dang MA, Batra A, Freise I, Kühl A, Erben U, Siegmund B. 2014. Polarisierte Makrophagen verändern ihren Phänotyp entsprechend des lokalen Zytokin-Milieus. *Zeitschrift für Gastroenterologie*, 52 (08). DOI 10.1055/s-0034-1386043.

Dong Z, Sun X, Tang Y, Luo S, Jia H, Xu Q, Jiang Q, Loo JJ, Xu W, Xu C. 2022.  $\beta$ -hydroxybutyrate impairs monocyte function via the ROS-NLR family pyrin domain-containing three inflammasome (NLRP3) pathway in ketotic cows. *Frontiers in veterinary science*, 9: 925900. DOI 10.3389/fvets.2022.925900.

Duvigneau JC, Esterbauer H, Kozlov AV. 2019. Role of Heme Oxygenase as a Modulator of Heme-Mediated Pathways. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, 8 (10); 475. DOI 10.3390/antiox8100475.

Freemerman AJ, Johnson AR, Sacks GN, Milner JJ, Kirk EL, Troester MA, Macintyre AN, Goraksha-Hicks P, Rathmell JC, Makowski L. 2014. Metabolic reprogramming of macrophages: glucose transporter 1 (GLUT1)-mediated glucose metabolism drives a proinflammatory phenotype. *The Journal of biological chemistry*, 289 (11): 7884–7896. DOI 10.1074/jbc.M113.522037.

Gao X, Zhang X, Jiang L, Xu J, Liu W, Qian Y, Jiang Y, Jin Q, Hong H, Chen M, Jin Z, Wei Z, Yang Z, Zhang H. 2023. Forsythin inhibits  $\beta$ -hydroxybutyrate-induced oxidative stress in bovine macrophages by regulating p38/ERK, PI3K/Akt, and Nrf2/HO-1 signaling pathways. *Research in veterinary science*, 154: 59–65. DOI 10.1016/j.rvsc.2022.11.009.

Grochot-Przeczek A, Lach R, Mis J, Skrzypek K, Gozdecka M, Sroczynska P, Dubiel M, Rutkowski A, Kozakowska M, Zagorska A, Walczynski J, Was H, Kotlinowski J, Drukala J, Kurowski K, Kieda C, Herault Y, Dulak J, Jozkowicz A. 2009. Heme oxygenase-1 accelerates

cutaneous wound healing in mice. *PloS one*, 4 (6): e5803.

DOI 10.1371/journal.pone.0005803.

Haines DD, Tosaki A. 2020. Heme Degradation in Pathophysiology of and Countermeasures to Inflammation-Associated Disease. *International journal of molecular sciences*, 21 (24): 9698. DOI 10.3390/ijms21249698.

Hualin C, Wenli X, Dapeng L, Xijing L, Xiuhua P, Qingfeng P. 2012. The anti-inflammatory mechanism of heme oxygenase-1 induced by hemin in primary rat alveolar macrophages. *Inflammation*, 35 (3): 1087–1093. DOI 10.1007/s10753-011-9415-4.

Huang C, Wang J, Liu H, Huang R, Yan X, Song M, Tan G, Zhi F. 2022. Ketone body  $\beta$ -hydroxybutyrate ameliorates colitis by promoting M2 macrophage polarization through the STAT6-dependent signaling pathway. *BMC Medicine*, 20 (1): 148. DOI 10.1186/s12916-022-02352-x.

Immenschuh S, Tan M, Ramadori G. 1999. Nitric oxide mediates the lipopolysaccharide dependent upregulation of the heme oxygenase-1 gene expression in cultured rat Kupffer cells. *Journal of Hepatology*, 30 (1): 61–69. DOI 10.1016/S0168-8278(99)80008-7.

Kämpfer H, Kolb N, Manderscheid M, Wetzler C, Pfeilschifter J, Frank S. 2001. Macrophage-derived heme-oxygenase-1: expression, regulation, and possible functions in skin repair. *Molecular Medicine*, 7 (7): 488–498.

Kelly B, O'Neill LAJ. 2015. Metabolic reprogramming in macrophages and dendritic cells in innate immunity. *Cell research*, 25 (7): 771–784. DOI 10.1038/cr.2015.68.

Koike A, Minamiguchi I, Fujimori K, Amano F. 2015. Nitric oxide is an important regulator of heme oxygenase-1 expression in the lipopolysaccharide and interferon- $\gamma$ -treated murine macrophage-like cell line J774.1/JA-4. *Biological & pharmaceutical bulletin*, 38 (1): 7–16. DOI 10.1248/bpb.b14-00405.

Krzyszczczyk P, Schloss R, Palmer A, Berthiaume F. 2018. The Role of Macrophages in Acute and Chronic Wound Healing and Interventions to Promote Pro-wound Healing Phenotypes. *Frontiers in physiology*, 9: 419. DOI 10.3389/fphys.2018.00419.

Laffel L. 1999. Ketone bodies: a review of physiology, pathophysiology and application of monitoring to diabetes. *Diabetes/metabolism research and reviews*, 15 (6): 412–426.

DOI 10.1002/(sici)1520-7560(199911/12)15:6<412::aid-dmrr72>3.0.co;2-8.

Maines MD. 1997. THE HEME OXYGENASE SYSTEM: A Regulator of Second Messenger Gases. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 37 (1): 517–554.

DOI 10.1146/annurev.pharmtox.37.1.517.

Maines MD. 2001. Overview of heme degradation pathway. *Current protocols in toxicology*, Chapter 9: Unit 9.1. DOI 10.1002/0471140856.tx0901s00.

McCoubrey WK, Huang TJ, Maines MD. 1997. Isolation and characterization of a cDNA from the rat brain that encodes hemoprotein heme oxygenase-3. *European journal of biochemistry*, 247 (2): 725–732. DOI 10.1111/j.1432-1033.1997.00725.x.

Mense SM, Zhang L. 2006. Heme: a versatile signaling molecule controlling the activities of diverse regulators ranging from transcription factors to MAP kinases. *Cell research*, 16 (8): 681–692. DOI 10.1038/sj.cr.7310086.

Montefusco L, D'Addio F, Loretelli C, Ben Nasr M, Garziano M, Rossi A, Pastore I, Plebani L, Lunati ME, Bolla AM, Porta MD, Piuri G, Rocchio F, Abdelsalam A, Assi E, Barichella M, Maestroni A, Usuelli V, Loreggian L, Muzio F, Zuccotti GV, Cazzola R, Fiorina P. 2021. Anti-inflammatory effects of diet and caloric restriction in metabolic syndrome. *Journal of endocrinological investigation*, 44 (11): 2407–2415. DOI 10.1007/s40618-021-01547-y.

Müllebnner A, Dorighello GG, Kozlov AV, Duvigneau JC. 2017. Interaction between Mitochondrial Reactive Oxygen Species, Heme Oxygenase, and Nitric Oxide Synthase Stimulates Phagocytosis in Macrophages. *Frontiers in medicine*, 4: 252. DOI 10.3389/fmed.2017.00252.

Murray PJ, Wynn TA. 2011. Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. *Nature Reviews Immunology*, 11 (11): 723–737. DOI 10.1038/nri3073.

Ndisang JF, Mishra M. 2013. The heme oxygenase system selectively suppresses the proinflammatory macrophage m1 phenotype and potentiates insulin signaling in spontaneously hypertensive rats. *American Journal of Hypertension*, 26 (9): 1123–1131. DOI 10.1093/ajh/hpt082.

Olefsky JM, Glass CK. 2010. Macrophages, inflammation, and insulin resistance. *Annual review of physiology*, 72: 219–246. DOI 10.1146/annurev-physiol-021909-135846.

Otterbein LE, Bach FH, Alam J, Soares M, Tao Lu H, Wysk M, Davis RJ, Flavell RA, Choi AM. 2000. Carbon monoxide has anti-inflammatory effects involving the mitogen-activated protein kinase pathway. *Nature medicine*, 6 (4): 422–428. DOI 10.1038/74680.

- Pimstone NR, Tenhunen R, Seitz PT, Marver HS, Schmid R. 1971. The enzymatic degradation of hemoglobin to bile pigments by macrophages. *The Journal of experimental medicine*, 133 (6): 1264–1281. DOI 10.1084/jem.133.6.1264.
- Qiao G, Lv T, Zhang M, Chen P, Sun Q, Zhang J, Li Q. 2020.  $\beta$ -hydroxybutyrate ( $\beta$ -HB) exerts anti-inflammatory and antioxidant effects in lipopolysaccharide (LPS)-stimulated macrophages in *Liza haematocheila*. *Fish & shellfish immunology*, 107 (Pt B): 444–451. DOI 10.1016/j.fsi.2020.11.005.
- Rodríguez-Prados J-C, Través PG, Cuenca J, Rico D, Aragonés J, Martín-Sanz P, Cascante M, Boscá L. 2010. Substrate fate in activated macrophages: a comparison between innate, classic, and alternative activation. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 185 (1): 605–614. DOI 10.4049/jimmunol.0901698.
- Rojas-Morales P, Pedraza-Chaverri J, Tapia E. 2020. Ketone bodies, stress response, and redox homeostasis. *Redox biology*, 29: 101395. DOI 10.1016/j.redox.2019.101395.
- Rossol M, Heine H, Meusch U, Quandt D, Klein C, Sweet MJ, Hauschildt S. 2011. LPS-induced cytokine production in human monocytes and macrophages. *Critical reviews in immunology*, 31 (5): 379–446. DOI 10.1615/critrevimmunol.v31.i5.20.
- Smith A, McCulloh RJ. 2015. Hemopexin and haptoglobin: allies against heme toxicity from hemoglobin not contenders. *Frontiers in physiology*, 6: 187. DOI 10.3389/fphys.2015.00187.
- Srisook K, Cha Y-N. 2004. Biphasic induction of heme oxygenase-1 expression in macrophages stimulated with lipopolysaccharide. *Biochemical pharmacology*, 68 (9): 1709–1720. DOI 10.1016/j.bcp.2004.07.001.
- Srisook K, Han S-S, Choi H-S, Li M-H, Ueda H, Kim C, Cha Y-N. 2006. CO from enhanced HO activity or from CORM-2 inhibits both O<sub>2</sub>- and NO production and downregulates HO-1 expression in LPS-stimulated macrophages. *Biochemical pharmacology*, 71 (3): 307–318. DOI 10.1016/j.bcp.2005.10.042.
- Suzuki T, Yamashita S, Hattori K, Matsuda N, Hattori Y. 2021. Impact of a long-term high-glucose environment on pro-inflammatory responses in macrophages stimulated with lipopolysaccharide. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 394 (10): 2129–2139. DOI 10.1007/s00210-021-02137-8.
- Tenhunen R, Marver HS, Schmid R. 1969. The enzymatic conversion of hemoglobin to bilirubin. *Transactions of the Association of American Physicians*, 82: 363–371.

Wagener FA, Eggert A, Boerman OC, Oyen WJ, Verhofstad A, Abraham NG, Adema G, van Kooyk Y, Witte T de, Figdor CG. 2001. Heme is a potent inducer of inflammation in mice and is counteracted by heme oxygenase. *Blood*, 98 (6): 1802–1811.

DOI 10.1182/blood.v98.6.1802.

Wen Y, Gu J, Li S-L, Reddy MA, Natarajan R, Nadler JL. 2006. Elevated glucose and diabetes promote interleukin-12 cytokine gene expression in mouse macrophages.

*Endocrinology*, 147 (5): 2518–2525. DOI 10.1210/en.2005-0519.

Wurm T. Untersuchung der Hämoxygenaseaktivität in Geweben ketogen ernährter Mäuse mit experimentell implantierten Tumoren nach Chemotherapie.

Zhang M, Nakamura K, Kageyama S, Lawal AO, Gong KW, Bhetraratana M, Fujii T, Sulaiman D, Hirao H, Bolisetty S, Kupiec-Weglinski JW, Araujo JA. 2018. Myeloid HO-1 modulates macrophage polarization and protects against ischemia-reperfusion injury. *JCI insight*, 3 (19): e120596. DOI 10.1172/jci.insight.120596.

## 9. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abb. 1 Schematische Darstellung der Beschickung der 12-Well-Platten und das Inkubationschema für die Stimulation:.....	9
Tab. 2: Pipettierschema des HO-Assays .....	11
Abb. 3 Auswirkungen der Inkubationsmedien auf die Proteinmenge: .....	15
Abb. 4 Inkubation mit dem NOS-Hemmer Thiocitrullin erhöht die Proteinkonzentration in den Wells der LPS-behandelten Zellen: .....	16
Abb. 5: Abhängigkeit der HO-Aktivität von dem Gehalt an Energiesubstraten: Glukose und $\beta$ -Hydroxybutyrat:.....	18
Abb. 6 TC vermindert die HO-Aktivität in LPS-behandelten Makrophagen. ....	20
Abb. 7 relative Steigerung der HO-Aktivität durch Häm-Zugabe (Häm-Effekt) in Abhängigkeit des Gehalts an Energiesubstraten: .....	21

### **Danksagung**

Ich möchte mich an dieser Stelle ganz herzlich bei allen bedanken, die mich an meinem Weg unterstützt und begleitet haben:

Zuerst gebührt mein Dank meiner Betreuerin Dipl.-Biol. Dr.rer.nat. J. Catharina Duvigneau, die meine Arbeit betreut und begutachtet hat. Für die hilfreichen Anregungen, die konstruktive Kritik und das große Engagement, mit dem sie mich bei dieser Arbeit begleitet hat, möchte ich mich herzlich bedanken.

Ein ganz besonderer Dank gilt Andrea Mühlebner, MSc., ohne die diese Arbeit nicht hätte entstehen können. Sie ermöglichte diese Arbeit nicht nur durch die Vorarbeit mit den Zellen, sondern auch durch konstruktives Feedback und Korrekturlesen – Vielen Dank.

Ein herzliches Dankeschön gilt auch meinem Freund und meinen Freunden und auch meinen Studienkollegen, die mich beim Erstellen und Fertigstellen dieser Arbeit unterstützt und ermutigt haben.

Zuletzt möchte ich mich bei meinen Eltern und meiner Familie bedanken, die mich stets unterstützt haben.