

Aus der II. Medizinischen Klinik; Abteilung Molekulare Hepatologie
der Medizinischen Fakultät Mannheim
(Direktor: Prof. Dr. Matthias Ebert)

Der Einfluss von BMP-9 auf LPS induzierte pro-inflammatorische Effekte
in Makrophagen

Inauguraldissertation
zur Erlangung des medizinischen Doktorgrades
der
Medizinischen Fakultät Mannheim
der Ruprecht-Karls-Universität
zu
Heidelberg

vorgelegt von
Lena Anna Germann

aus
Innsbruck
2025

Dekan: Prof. Dr. med. Sergij Goerd
Referentin: Frau Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Katja Bretkopf-Heinlein

INHALTSVERZEICHNIS

Seite

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	6
1 EINLEITUNG	7
1.1 Leber.....	7
1.1.1. Funktion	7
1.1.2. Blutversorgung	8
1.1.3. Histologische Gliederung.....	8
1.1.4. Hepatozyten	9
1.1.5. Leber-Sternzellen (Ito-Zellen).....	10
1.1.6. Cholangiozyten.....	10
1.1.7. Sinusoidale Endothelzellen (LSEC).....	11
1.1.8. Kupfferzellen.....	11
1.1.8.1. Funktion	11
1.1.8.2. Abstammung.....	12
1.1.8.3. Polarisationszustände	13
1.2. BMP-9.....	13
1.2.1. Aufbau und Bildung	13
1.2.2. Signalweg	14
1.2.3. Wirkung	15
1.3. LPS	16
1.3.1. Aufbau und Bildung	16
1.3.2. Signalweg	16
1.3.3. Wirkung	17
1.4. Vorergebnisse.....	18
1.4.1. Rezeptorexpression in Leberzellen	18
1.4.2. BMP-9 und LPS Interaktion in LSEC.....	19
1.4.3. BMP-9 und LPS Interaktion in vivo in Mäusen	20

2 MATERIAL UND METHODEN	22
2.1. Material	22
2.1.1. Verbrauchsmaterial	22
2.1.2. Geräte	22
2.1.3. Reagenzien	23
2.1.4. Antikörper	24
2.2 Methoden	25
2.2.1. Murine Makrophagen	25
2.2.2. Humane Makrophagen	27
2.2.3. Methoden zur Untersuchung auf RNA-Ebene	29
2.2.4. Methoden zur Untersuchung auf Protein-Ebene	33
3 ERGEBNISSE	38
3.1. BMP-9 und LPS Interaktion in murinen Makrophagen	38
3.1.1. PCR-Ergebnisse	39
3.1.1.1. Stimulation mit BMP-9 für 24h und LPS für 1h	40
3.1.1.2. Stimulation mit BMP-9 für 48h und LPS für 24h	41
3.1.2. Western Blot Ergebnisse	42
3.1.2.1. 1h LPS	43
3.1.2.2. 24h LPS	45
3.2. BMP-9 und LPS Interaktion in humanen Makrophagen	46
3.2.1. PCR-Ergebnisse	46
3.2.1.1. Stimulation mit BMP-9 für 24h und LPS für 1h	47
3.2.1.2. Stimulation mit BMP-9 für 48h und LPS für 24h	49
3.2.2. Western Blot Ergebnisse	50
3.2.2.1. 1h und 24h LPS	50
4 DISKUSSION	52
4.1. BMP-9 und LPS Interaktion in murinen Makrophagen	53
4.2. BMP-9 und LPS Interaktion in humanen Makrophagen	54
4.3. Ergebnisse Tabelle	55
4.3. Murine Makrophagenzelllinie, humane Makrophagen und Kupfferzellen	56

5 ZUSAMMENFASSUNG.....	59
6 LITERATURVERZEICHNIS	60
7 ABBILDUNGSVERZEICHNIS	63
8 TABELLENVERZEICHNIS	63
9 LEBENSLAUF	64
10 DANKSAGUNG	67

Abkürzungsverzeichnis

BMP-9	Bone morphogenetic protein 9
BSA	Bovines Serumalbumin
BT	Bakterielle Translokation
CETP	Cholesterylester-Transferprotein
CSF1R	Koloniestimulierungsfaktor 1-Rezeptor
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothreitol
FBS	Fetales Kälberserum
GDF2	Growth and Differentiation Factor
HC	Hepatozyten
HSC	Leber-Sternzelle
ID1	Inhibitor of DNA binding protein-1
ID3	Inhibitor of DNA binding protein-3
IL-1RA	Interleukin-1 Rezeptor-Antagonist
KC	Kupfferzellen
LB	Lithiumborat-Puffer
LPS	Lipopolysaccharid
LSEC	Sinusoidale Endothelzellen
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinasen
miRNA	microRNA
MP	Makrophagen
NC	Nitrocellulose
PAMPs	Pathogen-assoziierte molekulare Muster
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
TBST	Tris-gepufferte Salzlösung mit Tween
TGF- β	Transforming growth factor- β
TLR4	Toll-like-Rezeptor 4
TLRs	Toll-like-Rezeptoren
UDP-GlcNAc	UDP-N-Acetylglucosamin

1. Einleitung

1.1. Die Leber

1.1.1. Funktion

Die Leber stellt die größte Drüse des menschlichen Körpers dar und übernimmt viele überlebenswichtige Aufgaben. Durch die anatomisch günstige Lage zwischen dem Kapillarbett des Magen-Darm-Traktes und der systemischen Zirkulation kann sie wichtige Funktionen wie die Entgiftung sowie die Ausscheidung von Abfallprodukten übernehmen.¹

Leberzellen sind in der Lage, Glykogen zu bilden und zu speichern sowie aus Laktat und Aminosäuren Glukoneogenese zu betreiben. Neben dem Abbau von Aminosäuren synthetisiert die Leber aus Fettzellen Ketonkörper wie Azetazetat und beta-Hydroxybutyrat, welche als Energielieferanten für das Gehirn verwertet werden können. Sie ist für die Synthese von Plasmaproteinen wie Albumin und Gerinnungsfaktoren sowie für die Speicherung von beispielsweise Eisen, Kupfer und Vitaminen verantwortlich. Neben der Produktion von 25(OH) Vitamin D3 und der Aktivierung von Schilddrüsenhormonen ist sie auch für die Abgabe von Hormonen wie Somatomedinen, Erythropoietin und Thrombopoietin ins Blut zuständig.²

Neben ihrer endogenen Funktion stellt die Leber die größte exokrine Drüse des Körpers dar. Die in der Leber produzierte Galle ist für die Absorption von Nahrungsfetten aus dem Darm aber auch für die Rezirkulation (enterohepatischer Kreislauf) von aus Cholesterol synthetisierten Gallensäuren verantwortlich.²

1.1.2. Blutversorgung

Die Leber erhält 80% ihrer Blutzufuhr aus der Pfortader, welche venösen Zufluss aus dem Magen-Darm-Trakt, Pankreas und Milz erhält. Über die Leberpforte münden neben Pfortader auch die Leberarterien in das Organ ein, welche den kleineren Anteil der hepatischen Blutzufuhr ausmachen. Über selbige Pforte verlässt der Gallengang die Leber, dessen Äste zuvor intrahepatisch parallel mit den Ästen der Pfortader und Leberarterien verlaufen (Glisson-Trias). Die venöse Entsorgung wird durch die drei großen Äste der Lebervenen gewährleistet, welche als Zentralvenen in den Leberläppchen verlaufen. Gegensätzlich zum Glisson-Trias verlaufen diese ohne Begleitung von anderen Gefäßen. Die Sinusoide stellen das Verbindungsstück zwischen den beiden zuführenden Blutgefäßen sowie der entsorgenden Zentralvenen dar. Über die Mündung der Lebervenen in die untere Hohlvene erfolgt die schlussendliche Anbindung an den systemischen Kreislauf.¹

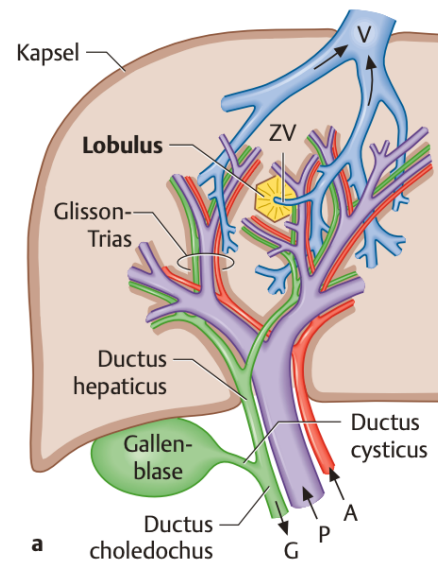


Abb. 1.: Leitungsbahnen der Leber mit Pfortader (P), Leberarterie (A), Lebervene (V) inklusive Zentralvene (ZV) und Gallengang (G) – Lüllmann-Rauch R, Asan E: Taschenlehrbuch Histologie. 6., vollständig überarbeitete Auflage. Stuttgart: Thieme

1.1.3. Histologische Gliederung

Die histologische Gliederung der Leber erfolgt in sogenannten Zentralvenen-Läppchen (*Lobulus*) bestehend aus Hepatozyten, Sinusoiden und einer Zentralvene. Die Leitungsbahnen des Glisson-Trias (Gallengang, Leberarterie und Pfortader) verlaufen entlang der Kanten des Läppchens in bindegewebigen Portalkanälen. Abgänge dieser Portalkanäle verlaufen zunächst zirkulär, somit also *interlobulär*, um das Läppchen herum. Im Anschluss gelangt das Blut der terminalen Zweige von Pfortader und Leberarterie in die *intra lobulär* gelegenen Sinusoide, welche in die in Längsrichtung verlaufende Zentralvene münden. Der Stoffaustausch mit den umliegenden, radiär angeordneten Hepatozyten (Hepatozyten-Balkchen) erfolgt während der Passage des Blutes durch die Sinusoide. Die von den Hepatozyten sekretierte Galle fließt über Gallenkanälchen zu den *interlobulär* gelegenen Gallengängen ab.

Zur Gliederung des Leberparenchyms existieren drei verschiedene Konzepte, die jeweils unterschiedliche Strukturen als Mittelpunkt der Funktionseinheit definieren. Das „klassische Leberläppchen“ gleicht dem oben beschriebenen Zentralvenen-Läppchen, zentriert somit also abführende Gefäße (Zentralvene), während zuführende Gefäße interlobulär verlaufen. Das Konzept des „Leberazinus“ fokussiert sich hingegen mehr auf die funktionelle Gliederung der Leber. Die Mittelachse eines Azinus wird durch die terminalen Zweige der Versorgung gebildet und beinhaltet alle Hepatozyten, die von einem solchen Gefäßbündel versorgt werden. Anhand von Zonen wird die Versorgung der Hepatozyten mit Sauerstoff und Nährstoffen berücksichtigt, die in Richtung Zentralvene immer schlechter wird (Zone 1 bis 3).¹

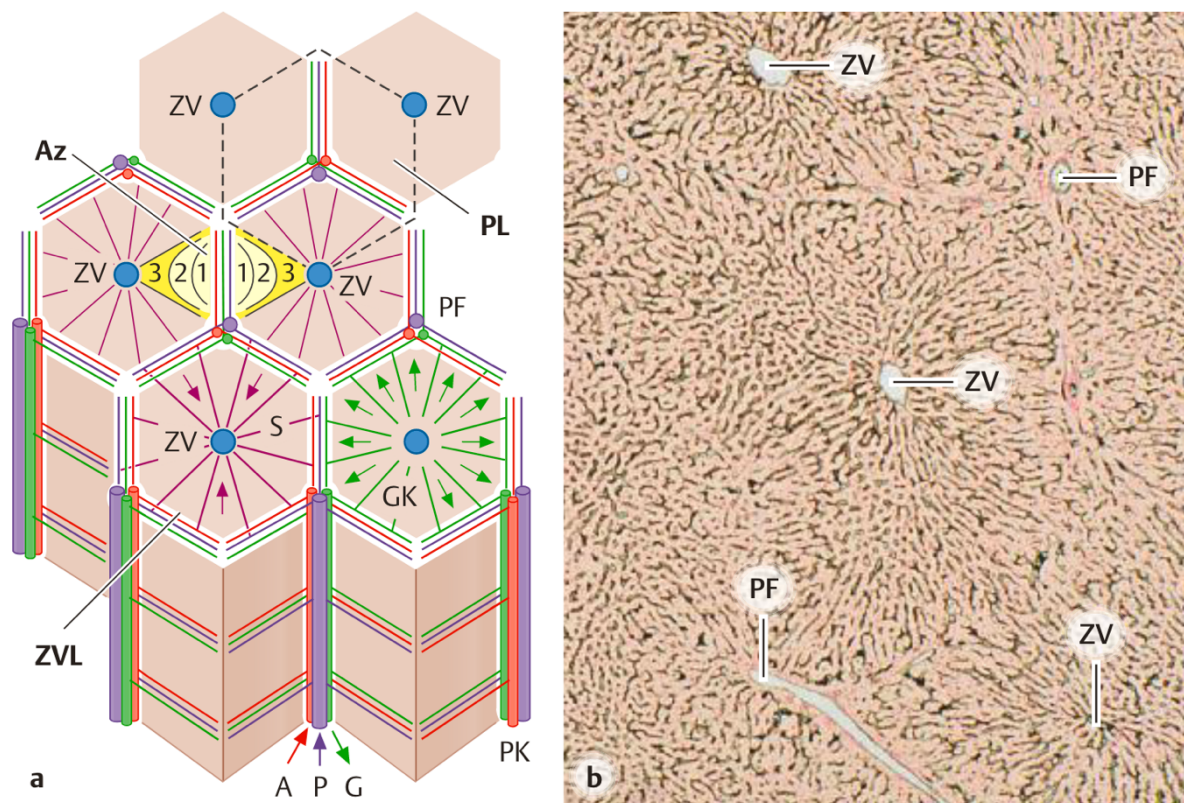


Abb. 2.: Histologische Gliederung der Leber - Zentralvenen-Läppchen (ZVL), Portalkanäle (PK) bzw. im Schnitt Portalfelder (PF) mit Glisson-Trias: Äste von Pfortader (P), Arterie (A) und Gallengang (G). Intralobuläre Sinusoiden (S), Zentralvene (ZV). Gallenkanälchen (GK), Leberazinus (Az) mit den Zonen 1, 2, 3 dargestellt. Portaltrien (PL) - Lüllmann-Rauch R, Asan E: Taschenlehrbuch Histologie. 6., vollständig überarbeitete Auflage. Stuttgart: Thieme

1.1.4. Hepatozyten

Den weitaus größten zellulären Anteil der Leber machen die Hepatozyten aus. Der basolaterale Teil eines Hepatozyten ist dem Blut zugewandt (Blutpol) und für die

Aufnahme bzw. Sekretion zahlreicher Stoffe wie Glucose und Proteinen verantwortlich. Die Galle wird hingegen über den apikalen Pol in die Gallenkanälchen abgegeben. Der Übergang zwischen basolateral und apikal wird durch Tight junctions begrenzt. Zusätzlich sind benachbarte Hepatozyten durch Gap junctions verbunden, um einen zellulären Austausch zu gewährleisten. Der sogenannte Dissé-Raum (oder perisinusoidaler Raum) ist ein anatomischer Spaltraum zwischen Hepatozyten und Sinusoiden. Über die Mikrovillus-besetzte Front der Hepatozyten erfolgt ein Stoffaustausch mit dem Blut. Da das Endothel der Sinusoide fenestriert ist, keine Basallamina besitzt und die Poren nicht durch ein Diaphragma verschlossen sind, gibt es einen weitgehend freien Zugang von Stoffen zum Dissé-Raum und von Hepatozyten sezernierte Proteine können ungehindert in die Blutbahn übergehen.¹

1.1.5. Leber-Sternzellen (Ito-Zellen)

Phänotypisch charakteristisch für Leber-Sternzellen (auch als Fettspeicherzellen, perisinusoidale Zellen oder HSC (hepatic stellate cells) genannt) sind große Lipidtropfen, die aus dem Darm resorbiertes Vitamin A speichern. Sie sind gleichmäßig im Dissé-Raum verteilt, kommunizieren sowohl mit dem Parenchym als auch mit dem Endothel und gelten nach ihrer Aktivierung (z.B. durch pro-inflammatorische Zytokine) und Differenzierung zu Myofibroblasten als Hauptproduzenten der intralobulären Bindegewebsfasern. Aktivierte Leber-Sternzellen sind kontraktile und spielen eine essentielle Rolle in der Pathogenese der Leberfibrose.¹

1.1.6. Cholangiozyten

Der hepatische Abflussweg der Galle ist in drei Abschnitte gegliedert: Intra- sowie interlobuläre Gallenkanälchen und sogenannte Hering-Kanälchen, welche als Bindeglied fungieren. Die Wände der intralobulären Gallenkanälchen werden allein durch die Hepatozyten gebildet, welche durch junctionale Komplexe miteinander verbunden sind. Die interlobulären Gallenkanälchen (auch Ductus biliferi genannt) werden hingegen durch Cholangiozyten ausgekleidet. Sie tragen zur Gallenbildung bei, indem durch Sekretion von HCO_3^- neben einer Beisetzung von Wasser und Muzinen auch eine Alkalisierung der Galle erfolgt.¹

1.1.7. Sinusoidale Endothelzellen (LSEC)

Die sinusoidalen Endothelzellen (auch LSEC genannt) bilden eine weitestgehend barrierefreie Diffusionsfläche welche sich zwischen den Sinusoiden und dem perisinusoidalen oder Dissé-Raum sowie den Hepatozyten befindet. Durch das Vorhandensein von sogenanntem „perforierendem Endothel“ (Poren sind nicht mit einem Diaphragma verschlossen) ist der Austausch zwischen Blutbahn und Leberzellen gewährleistet. Das Endothel der Leber-Sinusoide zeichnet sich dadurch aus, dass weder das Endothel noch die Hepatozyten eine Basallamina bilden, was in anderen epithelialen Geweben normalerweise der Fall ist. Sinusoide entwickeln sich in der Fetalzeit durch den Einfluss der Hepatozyten und Leber-Sternzellen, wobei sie zunächst Kapillaren ähneln und erst durch Kontakt mit Hepatozyten die typische Struktur ausbilden.¹

1.1.8. Kupfferzellen

Kupfferzellen (auch Kupffersche Sternzellen genannt) sind in der Leber residierende Makrophagen, die eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung der lokalen Homöostase spielen und in der Lage sind, sich selbst zu regenerieren. Sie stammen ursprünglich von erythromyeloiden Vorläuferzellen aus der fetalen Leber ab.^{1,3}

1.1.8.1. Funktion

Die Aufgaben der lokoregionären Kupfferzellen sind sehr vielfältig: Sie sind an der lumenwärtigen Fläche des Endothels situiert und unter anderem für den Eisen- und Bilirubinmetabolismus verantwortlich.^{1,3} Sie exprimieren Proteine wie das Cholesterylester-Transferprotein (CETP) und beeinflussen somit den Cholesterinhaushalt.³ Eine weitere Aufgabe ist die Phagozytose von defekten Erythrozyten, welche mithilfe von Fc- und Scavenger-Rezeptoren aus der Blutbahn entfernt werden. Als Regulatoren der Immunantwort bauen sie durch Ausschüttung von Zyto- und Chemokinen Bakterien und andere Fremdpartikel ab, welche die Leber via Portalvene aus dem Gastrointestinaltrakt erreichen. Die Erkennung dieser Strukturen erfolgt beispielsweise über sogenannte pathogen recognition receptors (PRRs), diese binden PAMPs (Pathogen-assoziierte molekulare Muster Moleküle) wie z.B. das bakterielle Toxin LPS (Lipopolysaccharid). Durch die anatomisch günstige

Position sind Kupfferzellen in der Lage mit Thrombozyten, nicht-parenchymalen Zellen (wie Neutrophilen, Endothelzellen etc.) und einer Vielzahl an patrouillierenden Immunzellen (wie natürliche Killerzellen oder T-Zellen) zu interagieren. Dies kann unter anderem zur Ausschüttung inflammatorischer Zytokine wie IL4, IL23 oder TGFβ führen was wiederum eine zentrale Rolle in der Pathogenese zahlreicher Krankheiten wie der Leberfibrose und -zirrhose bis hin zum hepatozellulärem Karzinom spielt.^{1,3}

1.1.8.2. Abstammung

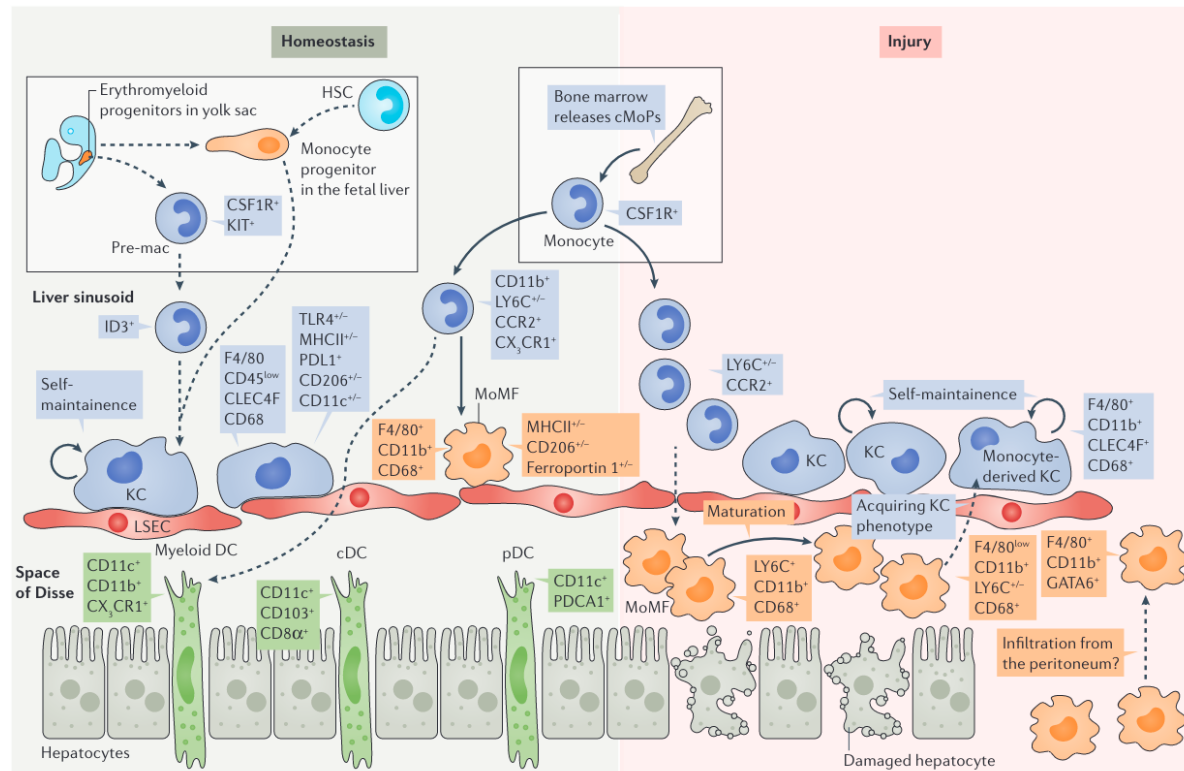


Abb. 3.: Der Ursprung der hepatischen Makrophagen-Untergruppen in Mäusen. Kupfferzellen (KCs), monozytär-abstammende Makrophagen (MoMF), myeloide dendritische Zellen (myeloid DC), konventionelle dendritische Zellen (cDC), plasmazytoide dendritische Zellen (pDC) - Krenkel O, Tacke F: Liver macrophages in tissue homeostasis and disease. *Nature Reviews Immunology* 17: 306–321, 2017

In Abbildung 3 ist die Abstammung der leberresidenten Makrophagen im Mausmodell dargestellt: Wie bereits erwähnt entwickeln sich Kupfferzellen zunächst aus erythromyeloiden Vorläuferzellen aus der fetalen Leber, welche den Koloniestimulierendefaktor 1-Rezeptor (CSF1R) exprimieren.^{3,4} Für die selbstregenerierenden Eigenschaften der Kupfferzellen ist unter anderem der Transkriptionsfaktor Inhibitor der DNA-Bindung 3 (ID3) verantwortlich.³

Wichtig zu betonen ist, dass es sich bei Kupfferzellen um nicht monozytär-abstammende, sich selbst regenerierende, Makrophagen handelt.³ Bei akuten und

chronischen Verletzungen werden Makrophagen zusätzlich aus zirkulierenden Monozyten rekrutiert und zu Kupfferzellen-ähnlichen Zellen differenziert.^{3,4} Insbesondere im Bereich der Glisson-Trias sind jedoch auch regulär von Monozyten abstammende Makrophagen aufzufinden. Eine weitere Subgruppe sind die noch wenig erforschten peritonealen Makrophagen.⁴ Andere monozytär-abstammende hepatisch-residierende Zellen beinhalten beispielsweise myeloide dendritische Zellen.³

1.1.8.3. Polarisationszustände

Zudem unterscheiden sich Makrophagen auch bezüglich ihrer „Polarisationszustände“, diese entsprechen nämlich einem pro- und einem antiinflammatorischen Phänotyp (auch als M1- und M2-Typ bezeichnet). Charakteristisch für M1-Phänotypen ist die Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine, während hingegen M2-Phänotypen sowohl pro- als auch antiinflammatorisch agieren können. Diese Einteilung wird in neueren Studien jedoch als eher veraltet dargestellt, da der Übergang zwischen entzündungs- und reparaturfördernd als eher fließend angesehen werden sollte und abhängig ist von verschiedenen Stimuli der Mikroumgebung (sogenanntes „Spektrummodell“).³

1.2. BMP-9

1.2.1. Aufbau und Bildung

Bone morphogenetic protein 9 (BMP-9), auch bekannt als Growth and Differentiation Factor (GDF) 2, gehört zur transforming growth factor- β (TGF- β) Superfamilie, deren Mitglieder eine zentrale Rolle in Zellwachstum und -differenzierung spielen.^{5–7} Bisher konnten über 20 verschiedene BMP Typen identifiziert werden.⁸ BMPs sind Proteindimere welche in zahlreichen Zellen, sowohl während der Embryogenese als auch im erwachsenen Alter, exprimiert werden.⁶ BMP-9 scheint hierbei vor allem in der Leber gebildet zu werden, wobei Breitkopf-Heinlein et al. insbesondere die Leber-Sternzellen als Hauptproduzenten identifizieren konnten.⁹

Zunächst erfolgt die Synthese eines Vorläuferproteins (pre-pro-BMP9) bestehend aus einem Signalpeptid, einer Prodomäne und einem reifen Proteinanteil. Das Prä-Pro-BMP9 homodimerisiert dann (Pro-BMP9) und wird anschließend von Serin-Endoproteasen gespalten.

Es entsteht eine kurze dimere Form (25 kDa) sowie eine Prodomäne, welche mit der reifen kurzen Form assoziiert bleiben kann (complexed form).^{7,10}

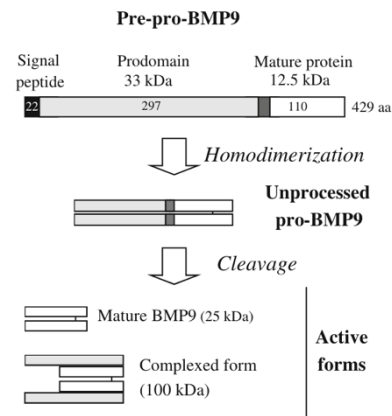


Abb. 4.: Bildung von BMP-9 – Bidart M, Ricard N, Levet S, Samson M, Mallet C, David L, et al.: BMP9 is produced by hepatocytes and circulates mainly in an

1.2.2. Signalweg

Bisher konnten zwei verschiedene Serin/Threonin Kinase-Rezeptortypen (Typ I und Typ II) identifiziert werden, die mit BMPs interagieren.¹¹ Bis dato sind insgesamt sieben verschiedene Typ I (ALK1-7) sowie fünf Typ II (ActRIIA, ActRIIB, BMPRII, TβRII, AMHRII) Rezeptoren bekannt. Hierbei zeigt BMP-9 die höchste Affinität für den ALK1-Rezeptor.^{10,12} Breitkopf-Heinlein et al. konnten zusätzlich zeigen, dass ALK1 in der Leber hauptsächlich in LSEC und Kupfferzellen exprimiert wird.⁹ In

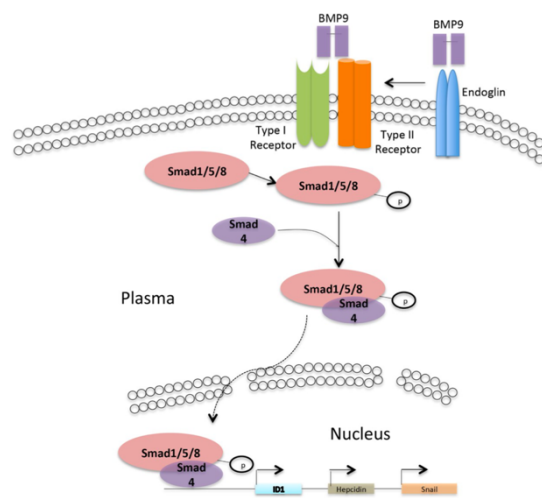


Abb. 5.: BMP9-induzierter Signalweg – Bi J, Ge S: Potential Roles of BMP9 in Liver Fibrosis. *Int. J. Mol. Sci.* 12, 2014

Hepatozyten, die kein ALK1 exprimieren, kann BMP-9 über alternative Typ I Rezeptoren, wie ALK2, signalisieren. Der Signalweg wurde durch Bi et al.¹⁰ veranschaulicht: Nach Bindung der BMPs an einen Typ II Rezeptor erfolgt die Bildung eines heterotetrameren Komplexes und die Aktivierung des Typ I Rezeptors mittels Phosphorylierung.¹¹ Dies wiederum aktiviert den Smad1/5/8-Komplex mit darauffolgender Bindung an Smad4 und Translokation in den Zellkern.^{10,12} ID1,

Hepcidin und Snail sind typische Zielgene von BMP-9.^{9,13,14} Als wichtigen Korezeptor ist des Weiteren Endoglin (CD105) zu nennen, welcher bei Anwesenheit vom BMP-9 an Typ I und II Rezeptoren binden und die Aktivität des Rezeptor-liganden Komplexes beeinflussen kann.

Neben Smad-abhängigen existieren auch Smad-unabhängige Signalwege, welche unter anderem Mitogen-aktivierte Proteinkinasen beinhalten (MAPK).¹⁰

1.2.3. Wirkung

Die Wirkung von BMP-9 ist sehr vielfältig und betrifft sowohl Osteo- als auch Angiogenese, ist unter anderem an der Pathogenese der Leberfibrose beteiligt und spielt auch eine zentrale Rolle bei zahlreichen Krebsarten.

BMP-9 gehört nachweislich zu den BMPs mit der höchsten osteogenen Aktivität.¹⁵ David et al. konnten zeigen, dass BMP-9 über den ALK1-Rezeptor zu einer Inhibition von Endothelzellen und somit zur Hemmung der Angiogenese führt.¹⁶ Auch auf die Lymphangiogenese scheint BMP-9 inhibitorische Effekte auszuüben.¹⁷

Wie bereits oben erwähnt scheinen Leber-Sternzellen die Hauptproduzenten von BMP-9 zu sein. Zudem stellen Leber-Sternzellen die Hauptquelle aktivierter Fibroblasten dar und spielen somit eine zentrale Rolle in der Pathogenese der Leberzirrhose.¹⁸ In dem 2017 publizierten Paper der Forschungsgruppe Breitkopf-Heinlein et al. konnte gezeigt werden, dass in Mäusen mit Leberfibrose sowohl BMP-9 als auch sein Targetgen ID1 verstärkt exprimiert waren. Da Mäuse mit neutralisiertem BMP-9 Signalweg nach CCl₄ Intoxikation weniger Fibrose entwickelten als die Gruppe mit intaktem BMP-9 Signal, kann man vermuten, dass BMP-9 pro-fibrogene Eigenschaften in der Leber hat. Diese beruhen jedoch offenbar nicht auf einer direkten Induktion der Leber-Sternzellen Aktivierung, da in vivo nach BMP-9 Applikation keine direkte Leber-Sternzellen Aktivierung nachgewiesen werden konnte.⁹ Es liegt die Vermutung nahe, dass die pro-fibrotischen Charakteristika des TGF- β Familienmitgliedes auf einer Interaktion zwischen mehreren Zelltypen (wie LSEC, Kupfferzellen etc.) beruht.^{9,19} Konträr dazu existieren jedoch auch Studien, die dem Protein eine anti-fibrotische Wirkung zuschreiben, die über eine Stabilisierung

des differenzierten LSEC-Phänotyps und so einen Schutz vor Kapillarisation vermittelt wird.²⁰

Auch in der Karzinogenese zahlreicher Tumore werden BMP-9 sowohl Eigenschaften als Tumorsuppressor als auch -promoter zugeschrieben. Hierbei werden unter anderem Studien zu Brustkrebs, Kolorektalkarzinom und nicht-kleinzelligem Lungenkarzinom aufgeführt.^{21–24}

1.3. LPS

1.3.1. Aufbau und Bildung

Lipopolysaccharid (LPS) ist ein Glykolipid, welches Bestandteil der äußeren Zellmembran gramnegativer Bakterien ist. Der genaue Aufbau variiert von Bakterium zu Bakterium, eine häufige Darstellung erfolgt gemäß Abbildung 6 basierend auf der Struktur in *Escherichia coli* (*E. coli*).^{25,26} Der Aufbau des Moleküls wird in drei Bestandteile unterteilt (von innen nach außen): Lipid A, Core-Polysaccharid und O-Antigen. Die Toxizität gramnegativer bakterieller Infektionen beruht vor allem auf der Wirkung von Lipid A. Das Core-Polysaccharid verbindet Lipid A und das O-Antigen. Die Bildung von LPS findet im Zyto- und Periplasma statt, anschließend erfolgt der Transport in die äußere Zellmembran des Bakteriums. Eingeleitet wird die Biosynthese zunächst durch das Molekül UDP-N-Acetylglucosamin (UDP-GlcNAc). Im Anschluss sind eine Kaskade verschiedener Enzyme involviert, welche UDP-GlcNAc schlussendlich in LPS umwandeln.^{26,27}

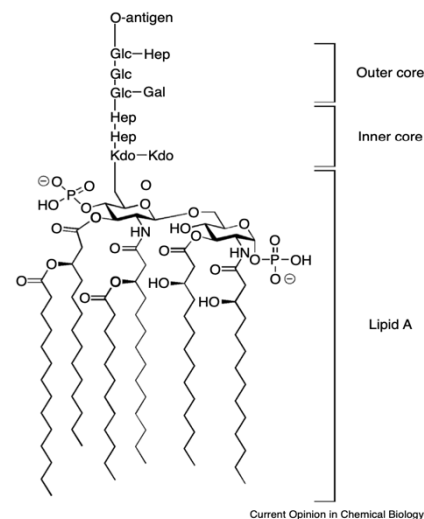


Abb. 6.: Allgemeine Struktur von Lipopolysaccharid (LPS), basierend auf der Struktur von *E. coli* – Sweeney RP, Lowary TL: New insights into lipopolysaccharide assembly and export. *Current Opinion in Chemical Biology* 53: 37–43, 2019

1.3.2. Signalweg

LPS bindet an den sogenannten Toll-like-Rezeptor 4 (TLR4).²⁵ Exprimiert wird die Gruppe der Toll-like-Rezeptoren (TLRs) auf Antigen-präsentierenden Zellen wie den Makrophagen oder beispielsweise dendritischen Zellen.²⁸ Bei den insgesamt 11 bis

dato bekannten humanen TLRs handelt es sich um Typ I Transmembranproteine mit einer zytosolischen Domäne, welche Ähnlichkeiten zum IL-1 Rezeptor besitzt, sowie einer Leucinreichen Ektodomäne. Letztere ist für die Erkennung sogenannter pathogenassoziierter molekularer Muster Moleküle (PAMPs) zuständig.²⁸ Nach Bindung von LPS an CD14 sowie MD2 und anschließend an den TLR4-Rezeptor (Abbildung 7) erfolgt die Induktion des Signalweges über zwei verschiedene Adapterproteine (MyD88 und TRAF6). Dies resultiert in der Aktivierung und Translokation

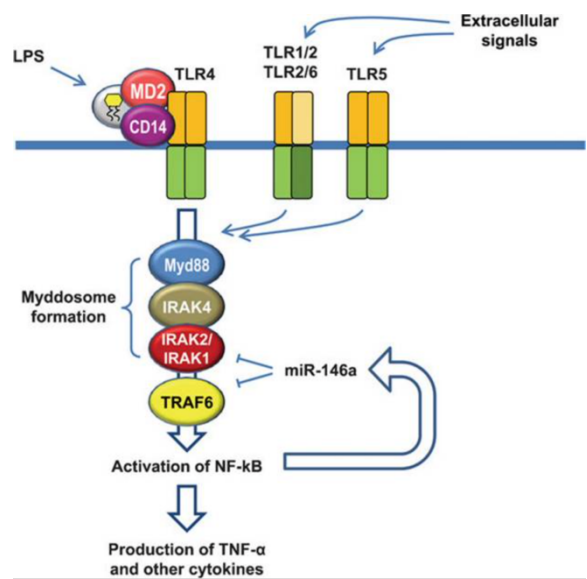


Abb. 7.: LPS-TLR4-induzierter Signalweg – Nahid MA, Satoh M, Chan EK: MicroRNA in TLR signaling and endotoxin tolerance. *Cell Mol Immunol* 8: 388–403, 2011

des Transkriptionsfaktors NFkB mit anschließender Produktion zahlreicher inflammatorisch wirkender Zytokine wie beispielsweise TNF-alpha.^{25,29} Auch autoregulatorische microRNA (miRNA) wird im Zuge der Bindung an den TLR-Rezeptor aktiviert, um einer überschießenden inflammatorischen Antwort entgegenzuwirken.²⁵

1.3.3. Wirkung

Eine zentrale Funktion von LPS besteht in der Stimulierung des angeborenen Immunsystems. Dies dient der Regulierung und Entgegenwirkung potenzieller Infektionen durch Keime. Zu hohe Konzentrationen von LPS können jedoch eine überschießende Immunantwort begünstigen, bis hin zum septischen Schock und Multiorganversagen. Auch kann ein chronisch hoher LPS-Spiegel in Krebs- und Autoimmunerkrankungen resultieren.^{25,27}

Ähnlich wie BMP-9 scheint LPS jedoch auch Einfluss auf die Pathogenese der Leberfibrose zu haben. Bei Leberschädigung kommt es durch eine Veränderung der Darmflora und -permeabilität zur sogenannten „bakteriellen Translokation“ (BT) mit Migration von Bakterien (somit auch u.a. von LPS), welche durch die sogenannte „Darm-Leber-Achse“ über das Pfortadersystem in die Leber gelangen. Die damit einhergehende Ausschüttung von TNF-alpha durch die TLR-Aktivierung auf den

Immunzellen der Leber (und somit vor allem auch Kupfferzellen) ist nachweislich an der Genese der Leberzirrhose beteiligt.^{30,31} Seki et al. konnten zeigen, dass die Aktivierung von TLR4 zu einer Modulation des TGF- β Signalweges führt, was wiederum proinflammatorisch und -fibrogen wirkt.^{19,32}

1.4. Vorergebnisse der Arbeitsgruppe

1.4.1. Rezeptorexpression in Leberzellen

Um zu ergründen, ob Makrophagen überhaupt empfänglich sind für die Stimulation mit BMP-9 und LPS, wurden in Vorversuchen unserer Forschungsgruppe zunächst primäre Zellen (LSEC, HSC, HC und KC) sowohl aus humaner als auch muriner Leber und aus dem Blut gesunder Spender (MP) isoliert.¹⁹

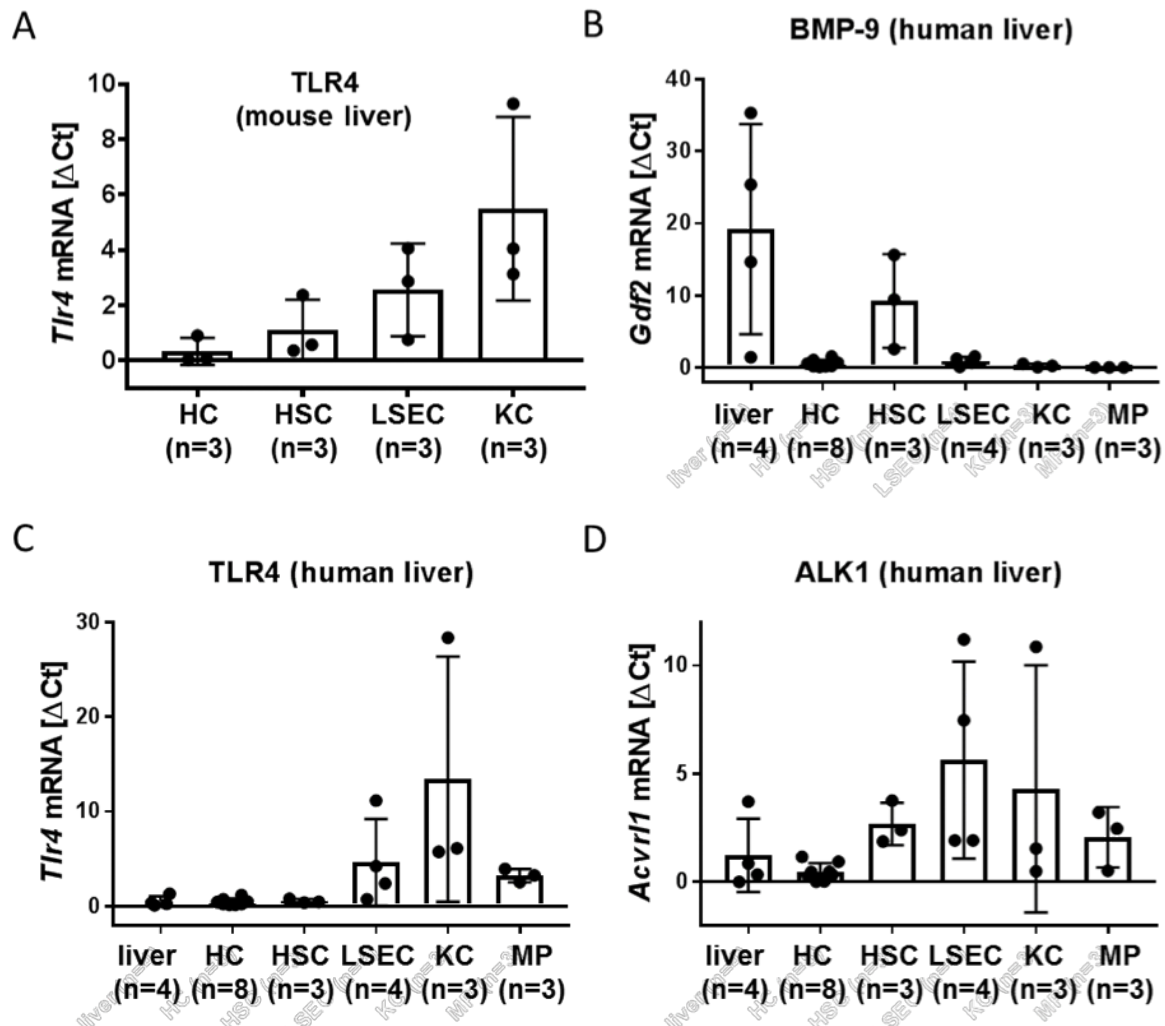


Abb. 8.: Expression ALK1 und TLR4 in unterschiedlichen Leberzelltypen (Abbildung entnommen aus dem bereits publizierten Paper Gaitantzi et al. - BMP-9 Modulates the Hepatic Responses to LPS) **A)** Vier unterschiedliche Leberzelltypen (Hepatozyten (HC), Leber-Sternzellen (HSC), sinusoidale Endothelzellen (LSEC) sowie Kupferzellen (KC)) wurden aus muriner Leber isoliert. Die Zellen wurden direkt lysiert und RNA isoliert. Die TLR4 Expression wurde mittels realtime-PCR analysiert. **B-D)** HC, HSC, LSEC und KC wurden aus nicht malignem Lebergewebe von Patienten mit kolorektalen Lebermetastasen isoliert. Makrophagen (MP) wurden aus dem Blut gesunder Spender isolierter Monozyten generiert, indem eine Kultivierung in serumhaltigem Medium für eine Woche erfolgte. Zusätzlich wurde zum Vergleich RNA aus gesamten Lebergewebe analysiert (liver). Expressionsanalyse von **B)** BMP-9 **C)** TLR4 sowie **D)** ALK1.

In Abbildung 8 sind die Ergebnisse der Forschungsgruppe Gaitantzi et al. veranschaulicht: Der BMP-9 Rezeptor ALK1 scheint hauptsächlich in LSEC und KC exprimiert zu werden.¹⁹ Breitkopf-Heinlein et al. konnten (wie oben schon erwähnt) bereits 2017 nachweisen, dass BMP-9 selbst hingegen fast ausschließlich in Leber-Sternzellen synthetisiert wird.⁹ HC und HSC machen nur einen geringen Anteil der ALK1 Expression aus. Die TLR4-Expression in menschlichen Leberzellen deckte sich ungefähr mit der von Maus-Leberzellen, die hauptsächlich durch KC und LSEC gewährleistet wird.¹⁹ Zusammenfassend sind somit KC bzw. MP grundsätzlich empfänglich für beide, LPS und BMP-9, was als Grundlage für meine anschließenden Experimente dient.

1.4.2. BMP-9 und LPS Interaktion in LSEC

Da unter anderem der Crosstalk zwischen LSEC und HSC maßgeblich an der Pathogenese der Leberfibrose beteiligt zu sein scheint, wurde zunächst das Zusammenspiel von BMP-9 und LPS in LSEC durch einen anderen Doktoranden unserer Forschungsgruppe analysiert.^{19,33} In Abbildung 9 sind einige Ergebnisse daraus dargestellt:

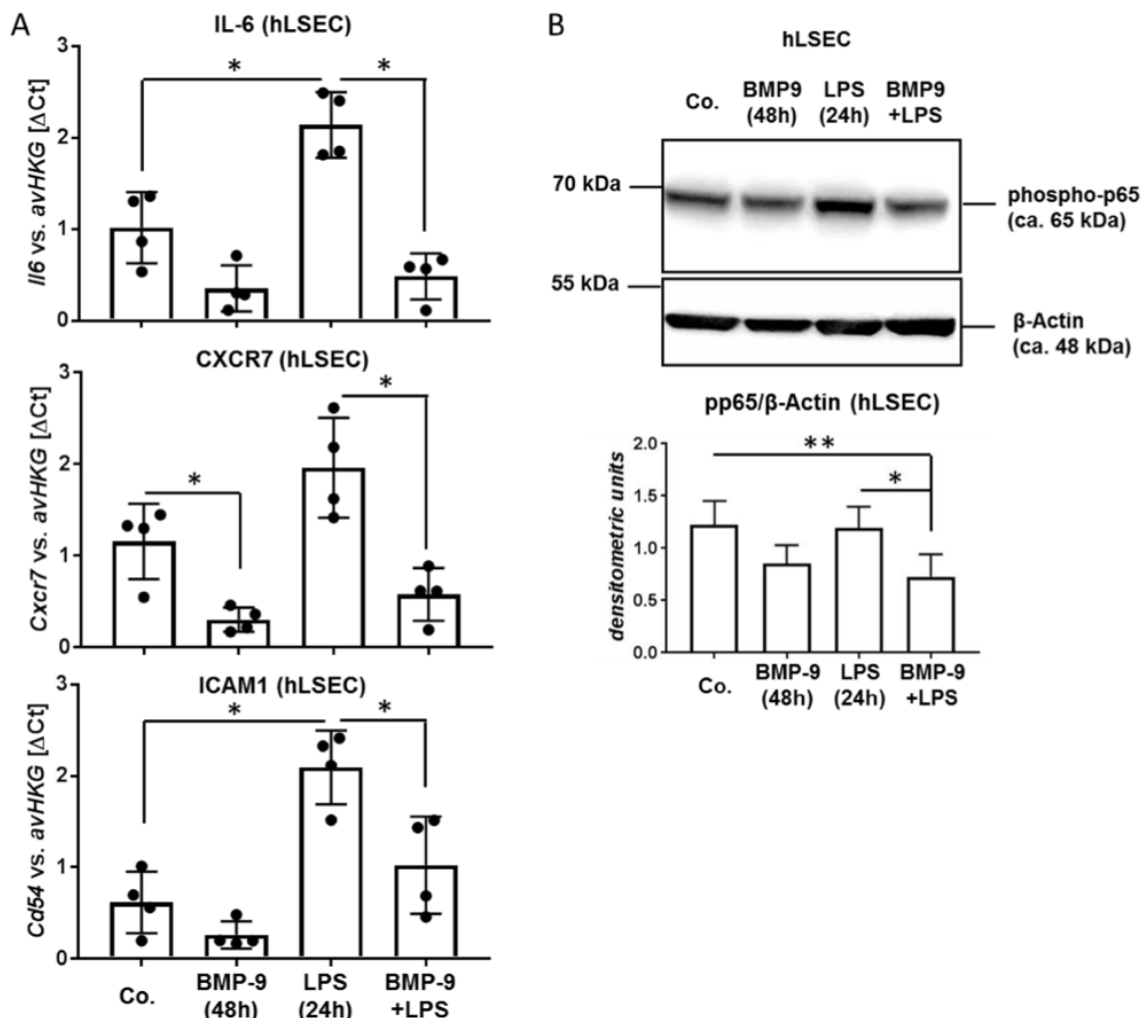


Abb. 9.: BMP-9 und LPS in humanen LSEC (Abbildung entnommen aus dem bereits publizierten Paper Gaitantzi et al. - BMP-9 Modulates the Hepatic Responses to LPS) – Humane LSEC wurden zunächst ohne oder mit BMP-9 Stimulation (5 ng/ml) für 24 Stunden kultiviert. Je nach Kondition erfolgte im Anschluss eine LPS Stimulation (100 ng/ml) für weitere 24 Stunden. **A)** RNA Lysate wurden asserviert und die Expressionslevel von IL-6, CXCR7 sowie ICAM1 mittels RT-qPCR ermittelt. Die Ct-Werte wurden auf das Housekeeping-Gen normalisiert und die Ergebnisse mittels T-Test ausgewertet und wie folgt klassifiziert: $p \leq 0,05$: *, $p \leq 0,01$: **. **B)** Protein Lysate wurden asserviert und mittels Western Blot analysiert. Untersucht wurde die Aktivierung des NF κ B Signalweges indem phospho-p65 detektiert wurde. Das Haushaltsgen beta-Actin dient als Ladekontrolle. Eine densitometrische Analyse (n=3) wurde durchgeführt und wie folgt klassifiziert: $p \leq 0,05$: *, $p \leq 0,01$: **.

In humanen LSEC schien BMP-9 sowohl auf RNA als auch Protein Ebene (Abbildung 9 A und B) die LPS induzierte pro-inflammatorische Antwort (hier am Beispiel von IL-6, CXCR7, ICAM1 und phospho-p65) zu inhibieren. BMP-9 induzierte Signalwege blieben jedoch unbeeinflusst durch LPS (nicht abgebildet).¹⁹

1.4.3. BMP-9 und LPS Interaktion in vivo in Mäusen

Auch im Zuge von Vorversuchen erfolgte die Analyse der BMP-9 und LPS Effekte in vivo in Mäusen. Hierfür wurde zunächst LPS und/oder BMP-9 intraperitoneal injiziert. Nach 2 oder 12 Stunden erfolgte die Isolierung von RNA und Protein mit konsekutiver PCR- (Abbildung 10 A) oder Western-Blot Analyse (Abbildung 10 B) der LPS induzierten inflammatorischen Antwort. Auf RNA-Ebene konnte bereits nach zwei Stunden eine Steigerung der LPS-induzierten inflammatorischen Antwort am Beispiel von TNF α nachgewiesen werden, die jedoch nach 12 Stunden wieder regredient war. Auch das antiinflammatorische Interleukin-10 wies eine ähnliche Entwicklung auf. Auf Protein-Ebene konnten dazu passende Tendenzen nachgewiesen werden, die jedoch statistisch nicht signifikant waren.¹⁹

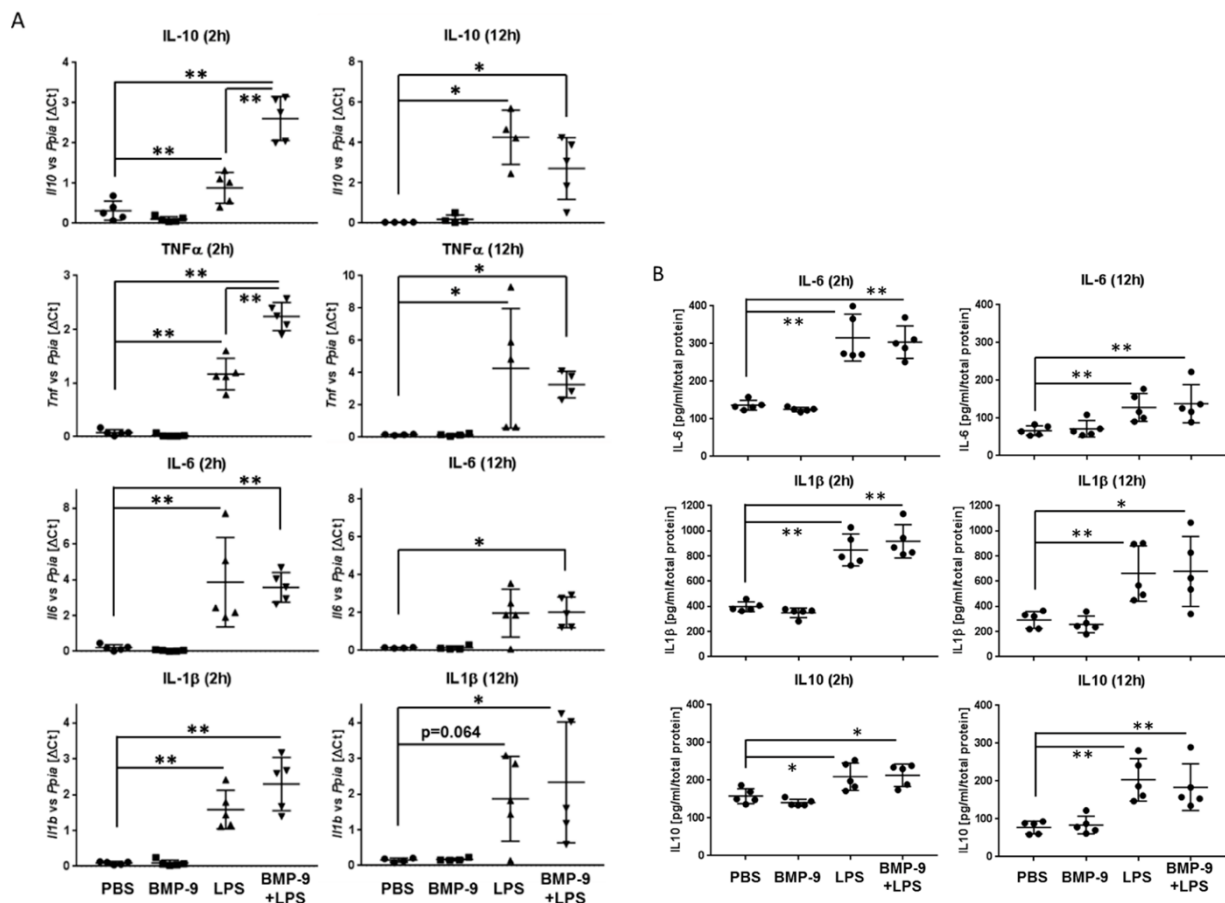


Abb. 10.: BMP-9 und LPS in vivo in Mäusen (Abbildung entnommen aus dem bereits publizierten Paper Gaitantzi et al. - BMP-9 Modulates the Hepatic Responses to LPS) – Intraperitoneale BMP-9 (100ng/Maus) und LPS (25µg/Maus) Injektion sowie Isolation von RNA (**A**) oder Protein (**B**) nach 2 und 12 Stunden. **A**) Messung der Expression von IL-10, TNFα, IL-6 sowie IL-1b mittels RT-qPCR. Die Ct-Werte wurden auf das Housekeeping Gen normalisiert. **B**) Messung der Expression von IL-6, IL-1b sowie IL-10 mittels ELISA.
p ≤ 0,05: *, p ≤ 0,01: **. Jeder Punkt steht für eine Mausleber.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Verbrauchsmaterial

<i>Verbrauchsmaterial</i>	<i>Herstellungsfirma</i>
CELLSTAR® Filter Cap Cell Culture Flasks 75 cm ²	Greiner bio-one
CELLSTAR® 6-Well-Plate, 9,6 cm ² sterile with lid	Greiner bio-one
CELLSTAR® 12-Well-Plate, 3,9 cm ² sterile with lid	Greiner bio-one
CELLSTAR® 96-Well-Plate, sterile with lid	Greiner bio-one
Serologische Pipette 5 ml	Greiner bio-one
Serologische Pipette 10 ml	Greiner bio-one
Serologische Pipette 25 ml	Greiner bio-one
Serologische Pipette 50 ml	Greiner bio-one
Pipettenspitzen 10 µl	Star Lab
Pipettenspitzen 200 µl	Star Lab
Pipettenspitzen 1000 µl	Star Lab
Falcons 50ml	Greiner bio-one
Falcons 25ml	Greiner bio-one
Eppendorf Safe-Lock 0,5 ml	Eppendorf
Eppendorf Safe-Lock 1,5 ml	Eppendorf
Eppendorf Safe-Lock 2 ml	Eppendorf
CRYO.S 2ml	Greiner bio-one
Handschuhe Star Guard Sensitive	Star Lab
Murine Makrophagen J774A.1	Sigma-Aldrich
Perfect Bind RNA Columns	VWR Life Science
DNA Removing Columns	VWR Life Science
Collection Tubes 2ml	VWR Life Science
Multiply®-µStrip Pro 8er Kette	Sarstedt
Antifect®N Liquid	Schülke
96 Well PCR Plate	VWR
Amersham™ Protran™ Nitrocellulose Blotting Membrane 0,2µm	GE Healthcare
NuPAGE™ 4-12% Bis-Tris Gel 1.5 mm x 15 well	Life Technologies
Filterpapier für Western Blot	BioRad
Schwämme Midi	Thermo Fisher (Invitrogen)
Parafilm Verschlussfolie	Häberle

2.1.2. Geräte

<i>Gerät</i>	<i>Herstellungsfirma</i>
Sicherheitswerkbank	HERAsafe
Inkubator	Thermo Scientific
Wasserbad 10°C – 100°C	GFL

10µl Pipette	Eppendorf
10µl Pipette	Gilson
20µl Pipette	Eppendorf
100µl Pipette	Labnet
100µl Pipette	Eppendorf
1000µl Pipette	Labnet
1000µl Pipette	Gilson
Tischzentrifuge Centrifuge 5415 D	Eppendorf
Reax top Vortex	Heidolph
Kühlschrank 4°	Liebherr
Kühlschrank -20°	Liebherr
Kühlschrank -40°	Bosch
Hera Freeze -80°C Heraeus	Thermo Scientific
Zählkammer Neubauer Improved	Blau Brand
Lichtmikroskop Leica DM IRB	Leica
Mr. Frosty Freezing Container	Thermo Scientific
Akku-betriebene Pipettierhilfe Pipetus®	Hirschmann
Cell Scraper 25cm	Sarstedt
Infinite M200 Microplate Reader	Tecan
Nanoquant™ Plate	Tecan
Mini Centrifuge GMC-060	LMS Co.
Primus Thermal Cycler	MWG-Biotech
PCR q-Tower ³	Analytikjena
Thermomixer Compact	Eppendorf
XCell SureLock™	Invitrogen
XCell™ Blot Module	Invitrogen
Novex® Mini Cell	Invitrogen
Electrophoresis Power Supply EV 231	Peqlab
IKA-VIBRAX-VXR	IKA Labortechnik
Rocky®	Fröbel Labortechnik GmbH
Fusion Solo Chemilumineszenzdetektor	Vilber Lourmat

2.1.3. Reagenzien

<i>Reagenz</i>	<i>Herstellungsfirma</i>
DMEM Dulbecco's modified Eagle Medium 500ml	Life Technologies
PBS Phosphate Buffered Saline pH7.4 1x 500ml	Life Technologies
FBS Fetal Calf Serum 500ml	Life Technologies
L-Glutamin	Sigma Aldrich
Penicillin/Streptomycin	Sigma Aldrich
DMSO Dimethylsulfoxid 10ml	Sigma Aldrich
Trypanblue Solution 0,4% 100 ml	Sigma Aldrich
LPS Lipopolysaccharide from <i>E.coli</i> 0111:B4 purified by gel-filtration chromatography L3012-5MG	Sigma Aldrich
Recombinant Human GDF-2/BMP-9	Peprtech

Ficoll-Plaque™ PLUS	GE Healthcare
RPMI Medium 1640	gibco
Ammoniumchlorid NH ₄ Cl	MERCK
Natriumhydrogencarbonat NaHCO ₃	Carl Roth
EDTA disodium salt	Biomol
D-Glucose	Carl Roth
HEPES	Life Technologies
RNA Lysis-Buffer T	VWR Life Science
RNA Wash Buffer I	VWR Life Science
RNA Wash Buffer II	VWR Life Science
RNase-free Water	VWR Life Science
DNase I Digestion Buffer	VWR Life Science
RNase-freie DNase (20Kunitz/μl)	VWR Life Science
TransAmp Buffer	BIOLINE
Reverse Transcriptase	BIOLINE
InnuMIX qPCR MasterMix SyGreen	Analytikjena
Phosphatase Inhibitor Cocktail 2 (5 ml)	Sigma Aldrich
Natriumchlorid NaCl	Carl Roth
Nonident P-40	Millipore (MERCK)
TRIS-Puffer (C ₄ H ₁₁ NO ₃)	Sigma Aldrich
cOmplete™, EDTA-freier Proteasehemmer - Cocktail	Roche/MERCK
DC™ Protein Assay Reagent A	Bio Rad
DC™ Protein Assay Reagent B	Bio Rad
DC™ Protein Assay Reagent S	Bio Rad
4X SDS Sample Loading Buffer	Invitrogen
Dithiothreitol DTT	Thermo Fisher
PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder 250μl	Thermo Scientific
NuPAGE® Transfer Buffer (20x) 125ml	Novex® by Life Technologies
NuPAGE® MOPS SDS Running Buffer (20x) 500ml	Novex® by Life Technologies
Bovine Serum Albumin	Carl Roth
TRIS-buffered saline TBS	Selbst angesetzt
Tween20	Bio Rad
Ponceau S Färbelösung	Thermo Fisher
Restore™ PLUS Western Blot Stripping Buffer	Thermo Fisher
Methanol 2,5l	Carl Roth
Ethanol	Carl Roth
Pierce™ ECL Western Blotting-Substrat	Thermo Fisher
Pierce™ BCA Protein Assay Kit	Thermo Fisher

2.1.4. Antikörper

Primärantikörper	Firma
Phospho NFκB p65(Ser536) (9H1) Rabbit mAb 20μl	Cell Signaling
NF-κB p65(D14E12) XP Rabbit mAb	Cell Signaling
Phospho Smad1/3	Cell Signaling

Total Smad 1/3	Cell Signaling
β -Actin (13E5) Rabbit mAb	Cell Signaling

<i>Sekundärantikörper</i>	<i>Firma</i>
Anti Rabbit IgG, HRP-linked Antibody	Cell Signaling
Anti-mouse IgG, HRP-linked Antibody	Cell Signaling

2.2. Methoden

2.2.1. Murine Makrophagen

Kultur und Passagieren der Zellen

Die murine Makrophagenzelllinie J774A.1 wurde von der Firma Sigma-Aldrich erworben. Hierbei handelt es sich um aus Mausblut gewonnene Makrophagen. Sie wurden in einer Zellkulturflasche in einem Brutschrank mit 5% CO₂ bei 37°C und 95% Luftfeuchtigkeit kultiviert. Die Zellen wuchsen semiadhärent und wurden alle drei bis vier Tage bei einer Konfluenz von 90% passagiert. Hierbei wurde zunächst mithilfe eines Scrapers der adhärenzte Zellrasen gelöst und dieser mit einer serologischen Pipette in ein 50 ml Falcon-Röhrchen überführt. Im Anschluss wurden die Zellen bei 300 g für 5 Minuten zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 15 ml (DMEM + 10% FBS) resuspendiert. Das Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) wurde zuvor mit 200 mM L-Glutamin, 1% Penicillin/Streptomycin und 10% FBS versehen und für 15-20 Minuten im Wasserbad erwärmt. Nach Bestimmung der Zellzahl wurden die Zellen mit einer Zelldichte von 1-3 x 10.000 Zellen/cm² ausplattiert und der Rest eingefroren.

Bestimmung der Zellzahl, Einfrieren und Auftauen der Zellen

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte mithilfe einer Neubauer-Zellzählkammer. Hierfür wurden 10 μ l der Zellsuspension mit 10 μ l Trypanblau in einem 0,5 ml Eppendorf® Gefäß vermischt, anschließend wurden 10 μ l davon auf die Zählkammer gegeben und die Zellen unter dem Mikroskop gezählt. Nur die gesunden Zellen wurden berücksichtigt, die im Gegensatz zu den blau-gefärbten toten Zellen kein Trypanblau aufnahmen und somit hell erschienen. Für die Bestimmung der Gesamtzahl wurde folgende Formel verwendet:

Zellzahl = (Summe aller Zellen in den Quadranten / 4) x 10^4 x 2 x Volumen der
gesamten Zelllösung

Eingefroren wurden die Zellen in Kryoröhrchen mit Freezing Medium bestehend aus 70% DMEM, 20% FBS und 10% Dimethylsulfoxid (DMSO), wobei jedes Röhrchen ungefähr 3 Millionen Zellen beinhaltete. Die Röhrchen wurden zunächst über Nacht in Mr. Frosty bei -80°C belassen und nach 24 Stunden in Boxen ebenfalls bei -80°C gelagert. Aufgetaut wurden die Zellen im Wasserbad bei 37°C für ungefähr zwei Minuten und danach in ein 50 ml Falconröhrchen mit 20 ml DMEM (10% FBS) überführt. Danach wurden die Zellen 5 Minuten bei einer Zentrifugalkraft von 300 g zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und abermals in 20 ml Medium resuspendiert. Nach Überführung in eine Zellkulturflasche (75cm²) (1 Kryo auf eine Zellkulturflasche) wurden die Zellen im Brutschrank kultiviert.

Versuchsaufbau

Zunächst wurden insgesamt 2 Millionen Zellen (500.000 Zellen in 2 ml Medium pro Well) auf 4 Wells einer 6-Well Platte ausplattiert. Die Zellen wurden anschließend mindestens 24 Stunden im Inkubator belassen und am nächsten Tag bei einer Konfluenz von etwa 90% für den Versuch verwendet. Des Weiteren wurde unter dem Mikroskop beurteilt, ob in allen Wells ungefähr gleich viel Zellen zu finden waren, um gleiche Konditionen zu gewährleisten.

Aushungern

Im Anschluss erfolgte ein Aushungern der Zellen: Hierfür wurde zunächst der Überstand der Wells abgenommen und verworfen. Im Anschluss wurde der Zellrasen drei Mal mit PBS (2 ml pro Well einer 6-Well Platte) gewaschen. Danach wurde das Starvation-Medium (DMEM) mit 0,5% FCS vorbereitet und davon 2 ml pro Well appliziert.

Behandlung mit BMP-9 und LPS

Nachdem die Zellen für 2 Stunden ausgehungert wurden, wurde auf Well 2 und 4 (s. Abbildung 11) 5 ng/ml BMP-9 appliziert. Im Anschluss wurde nach 24 Stunden 100 ng/ml LPS auf die Wells 3 und 4 gegeben und für weitere 24 Stunden inkubiert. Für die „1 Stunde“ Versuche wurden ebenfalls 100 ng/ml LPS appliziert und nach einer Stunde geerntet.

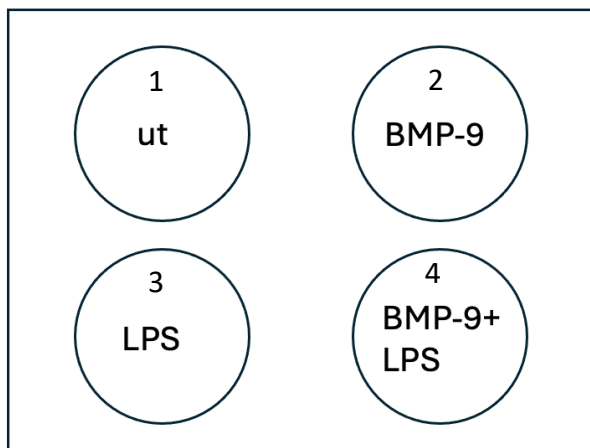


Abb. 11.: Behandlung mit BMP-9 und LPS auf der Zellkulturplatte – von links nach rechts: Well 1 unbehandelt (ut), Well 2 Behandlung mit BMP-9 für 24 - oder 48 - Stunden, Well 3 Behandlung mit LPS für eine oder 24 Stunden, Well 4 mit BMP-9 und LPS.

2.2.2. Humane Makrophagen

Isolation

Die Buffy Coats wurden beim Blutspendedienst des Deutschen Roten Kreuzes in Mannheim erworben. Zunächst wurde das Patientenblut in ein 50 ml Falconröhrchen überführt und mit einer Pipette durchmischt. Im Anschluss wurde ein Gradient erzeugt, indem zunächst 15 ml Ficoll (Dichte 1.077 ± 0.001 g/ml) in ein 50 ml Falconröhrchen gefüllt und 25 ml Blut mithilfe einer serologischen Pipette vorsichtig auf das Ficoll draufgeschichtet wurde. Hierbei ist möglichst darauf zu achten, dass Ficoll und Blut nicht durchmischt werden sondern zwei getrennte Phasen bilden. Das Falconröhrchen wurde 30 Minuten bei Raumtemperatur und 400 g mit geringer Bremsung zentrifugiert (Beschleunigung = 4, Dezeleration = 1). Danach wurde die erste Phase (s. Abbildung 12) soweit wie möglich entfernt, die Interphase entnommen und in ein neues Röhrchen überführt. Auf die Zellen wurden 35 ml PBS gegeben und bei Raumtemperatur und

300 g für 10 Minuten zentrifugiert, wobei der Waschschrift ein zweites Mal wiederholt wurde.

Im Falle von noch vorhandenen Erythrozyten (rotes Pellet), wurde ein Erythrolyse-Puffer hinzugefügt. Der Puffer beinhaltet 1.5 M NH_4Cl , 0.1 M NaHCO_3 , 0.01 M EDTA disodium salt und wurde bei 4°C gelagert. Bei Anwendung wurde der Puffer 1:10 verdünnt und 5 ml auf das Pellet gegeben. Nach einer Inkubationszeit von 5 Minuten wurden 15 ml PBS hinzugefügt und bei 300 g für 10 Minuten zentrifugiert. Im Anschluss erfolgten zwei weitere Waschschriffe. Das Zellpellet wurde dann in RPMI Medium 1640 ohne FCS resuspendiert und gezählt. Dem Medium wurde zuvor 4.5 g/l Glucose, 2.383 g/l HEPES Buffer, 1.5 g/l Sodium Bicarbonate und 0,1% Penicillin-Streptomycin beigefügt.

Im Anschluss wurden die Zellen auf einer 12-Well Platte ausplattiert (2×10^6 Zellen/Well) und für eine Stunde im Inkubator (37°C, 5% CO_2) belassen bis die Zellen adhärent waren. Danach wurde der Zellrasen zweimal mit PBS gewaschen und die Zellen mit RPMI Medium und 10% FBS versetzt (1ml pro Well).

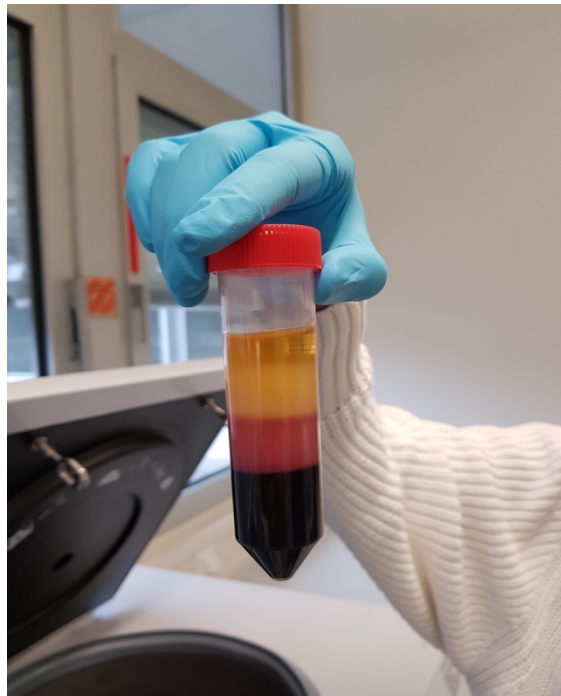


Abb. 12.: Primäre humane Monozyten isoliert aus dem Blut gesunder Spender. Die Phasen von oben nach unten beinhalten Plasma, Interphase mit mononukleären Zellen, Ficoll sowie als unterste Phase Granulozyten und Erythrozyten.

Kultur der Zellen und Versuchsaufbau

Alle 2-3 Tage erfolgte ein Mediumwechsel, wobei der Zellrasen zweimal mit PBS gewaschen wurde. Nach 7 Tagen konnten die Zellen für Versuche verwendet werden (Differenzierung der Monozyten zu Makrophagen). Die Zellen wurden ebenfalls 2 Stunden vor Versuchsbeginn ausgehungert, jedoch beinhaltete das Starvation Medium RPMI-Medium und 2% FCS, um ein frühzeitiges Absterben der Zellen zu verhindern.

Äquivalent zu den Versuchen mit murinen Makrophagen wurden die humanen Zellen mit LPS (24 Stunden und 1 Stunde) und BMP-9 stimuliert und sowohl Proteine als auch RNA isoliert.

2.2.3. Methoden zur Untersuchung auf RNA-Ebene

RNA-Isolierung

Für die RNA-Gewinnung wurde zunächst der Überstand der vier Wells entnommen und verworfen. Der Zellrasen wurde zweimal mit PBS gewaschen und im Anschluss RNA-Lysis-Buffer T (6-Well Platte: 300 µl/Well, 12-Well Platte: 200 µl/Well) appliziert und die Zellen mithilfe eines Scrapers gelöst. Der Puffer wurde dabei möglichst gleichmäßig über die gesamte Oberfläche verteilt. Das Lysat wurde in beschriftete Eppis überführt, welche bei -20°C gelagert wurden.

RNA-Aufreinigung

Die Lysate wurden auf DNA Removing Columns und Collection Tubes geladen und anschließend für 1 Minute bei 12.000 g zentrifugiert. Der dabei entstandene Säulendurchfluss wurde mit einem identischen Volumen aus 70 prozentigem Ethanol versehen und durch Vortexen sorgfältig gemischt. Im Anschluss wurden die Proben auf Perfect RNA Columns pipettiert und für 1 Minute bei 10.000 g zentrifugiert. Der Säulendurchfluss wurde verworfen und das Column in ein neues 2.0 ml Collection Tube gesteckt. Danach wurde 500 µl RNA Wash Buffer I auf die PerfectBind RNA Columns pipettiert und für 15 Sekunden bei 10.000 g zentrifugiert. Auch hier wurde

der Säulendurchfluss wieder verworfen, das Collection Tube jedoch im nächsten Schritt weiter verwendet.

Um einen vollständigen DNase-Verdau zu gewährleisten wurde ein DNase I Reaktionsmix vorbereitet. Hiervon wurden jeweils 80 µl bestehend aus 70 µl DNase I Digestion Buffer und 10 µl DNase I direkt auf die Membran der PerfectBind RNA Column pipettiert. Die Columns wurden bei Raumtemperatur (25-30°C) für 15 Minuten inkubiert. Im Anschluss wurden die PerfectBind RNA Columns in ein neues 2.0 ml Collection Tube gesteckt und 400 µl des RNA Wash Buffer I zugegeben. Nach einer Inkubationszeit von 5 Minuten wurden die Columns bei 10.000 g für 15 Sekunden zentrifugiert und der Durchfluss verworfen.

Als weiteren Waschschrift wurden 600 µl des RNA Was Buffers II (Pufferkonzentrat plus 4 Volumen 100% Ethanol) auf die PerfectBind RNA Columns pipettiert und für 15 Sekunden bei 10.000 g zentrifugiert. Dieser Waschgang wurde nochmals wiederholt und der Säulendurchfluss verworfen. Für den Trockenvorgang wurden die Columns in die geleerten 2.0 ml Collection Tubes gesteckt und durch zweiminütiges Zentrifugieren bei 10.000 g vollständig getrocknet. Als letzten Schritt wurden die PerfectBind RNA Columns in ein sauberes 1.5 ml Zentrifugenröhrchen gesteckt und die RNA mit einer 25 µl sterilem RNase-freiem dH₂O eluiert. Nach einer Inkubationszeit von 5 Minuten wurde bei 10.000 g für 2 Minuten zentrifugiert.

RNA Konzentrationsmessung

Nach einem Blanking mit Wasser wurde 1 µl der Probe auf eine Nanoquant™ Platte appliziert und die RNA Konzentration photometrisch mit einem Microplate Reader bestimmt.

cDNA Synthese

Für die cDNA-Synthese wurden 500ng RNA verwendet, wobei das benötigte Volumen mit folgender Formel berechnet wurde:

$$\text{Volumen RNA (}\mu\text{l)} = 500\text{ng} / \text{Konzentration (ng/}\mu\text{l)}$$

Die benötigte Menge RNase freien Wassers wurde mit folgender Formel bestimmt:

$$V \text{ H}_2\text{O} (\mu\text{l}) = 15 \mu\text{l} - V \text{ RNA} (\mu\text{l})$$

Zunächst wurden die Proben gevortext und mit einer Pipette durchmischt. Im Anschluss wurde zuerst das Wasser und dann die Probe in ein beschriftetes Eppi pipettiert. Zu den 15 μl Proben wurden 5 μl Mastermix hinzugegeben, bestehend aus 4 μl 5x TransAmp Buffer und 1 μl Reverser Transkriptase. Das Gemisch wurde zentrifugiert und in einen Thermal Cycler mit folgendem Programm gegeben:

25°C für 10 Minuten (Primer Anlage)

42°C für 15 Minuten (Reverse Transkription)

48°C für 15 Minuten (Optionaler Schritt für hochstrukturierte RNA)

85°C für 5 Minuten (Inaktivierung)

Das Endprodukt wurde mit 60 μl RNase-freiem Wasser diluiert, und das Gesamtvolumen von 80 μl bei -20°C gelagert.

Realtime PCR

Zunächst wurden die Primer Stocklösungen mit RNase-freiem Wasser diluiert (1:10). Es wurde ein Mastermix angefertigt, bestehend aus 600 μl SYBR-Green und 350 μl RNase-freiem Wasser. Die Menge des Mastermix pro diluierten Primer wurde mit folgender Formel errechnet:

$$V \text{ Mastermix} (\mu\text{l}) = 10,75 \times \text{Anzahl der Wells} - V \text{ Primer} (\mu\text{l})$$

Von jedem diluierten Primer wurden jeweils 0,5 μl des Forward- und 0,5 μl des Reverse-Primers pro Well berechnet. Aus dem daraus entstehenden Gemisch bestehend aus Primer und Mastermix wurden 10 μl pro Well einer 96-Well Platte pipettiert. Im Anschluss wurden 1,5 μl der cDNA hinzugefügt.

Die 96-Well Platte wurde sorgfältig mit einem dafür vorgesehen Cover beklebt und für 2 Minuten bei 2000 rpm zentrifugiert. Danach wurde die Platte in einen qTower³ der Firma Analytikjena gegeben, indem die Polymerase Kettenreaktion und fiberoptische Messung in 40 Zyklen stattfand.

Folgende Primer wurden verwendet:

<i>Murine Primer</i>	<i>Basensequenz 5' – 3'</i>	<i>Firma</i>
mIL10	For.: GCTCTTACTGACTGGCATGAG Rev.: CGCAGCTCTAGGAGCATGTG	Eurofins Genomics
mIL6	For.: TAGTCCTTCCTACCCCAATTTCC Rev.: TTGGTCCTTAGCCACTCCTTC	Eurofins Genomics
mIL1b	For.: CTGCTGGTGTGTGACGTTCCCAT Rev.: GGTCCGACAGCACGAGGCTTT	Eurofins Genomics
mTNFa	For.: TCCCAGGTTCTCCTTCAAGGGA Rev.: GGTGAGGAGCACGTAGTCGG	Eurofins Genomics
mHamp1	For.: ATACCAATGCAGAAGAGAAGG Rev.: AACAGATACCACACTGGGAA	Eurofins Genomics
mID1	For.: CTTCAGGAGGCAAGAGGAAA Rev.: CAAACCCTCTACCCACTGGA	Eurofins Genomics
mR16S	For.: AGATGATCGAGCCGCGC Rev.: GCTACCAGGGCCTTTGAGATGGA	Eurofins Genomics
<i>Humane Primer</i>		Eurofins Genomics
Albumin	For.: CTTGAATGTGCTGATGACAGG Rev.: GCAAGTCAGCAGGCATCTCAT	Eurofins Genomics
CD68	For.: GCTACTGGCAGCCCCAGGG Rev.: GCTCTTGGTAGTCCTGTGG	Eurofins Genomics
hLYVE	For.: AGGCTCTTTGCGTGACAGAA Rev.: GGTTGCGCTTTTGTCTACAA	Eurofins Genomics
Vimentin	For.: AGTCCACTGAGTACCGGAGAC Rev.: CATTTACGCATCTGGCGTTC	Eurofins Genomics
hFGF21	For.: ACCAGAGCCCCGAAAGTCT Rev.: CTTGACTCCCCAAGATTTGAATAACCTC	Eurofins Genomics
CYP2e1	For.: ATGTCTGCCCTCGGAGTCA Rev.: CGATGATGGGAAGCGGGAAA	Eurofins Genomics
haSma	For.: GTGTTGCCCTGAAGAGCAT Rev.: GCTGGGCATTGAAAGTCTCA	Eurofins Genomics
hCol1a1	For.: GTGCGATGACGTGATCTGTGA Rev.: CGGTGGTTTCTTGGTGGT	Eurofins Genomics
hICAM1	For.: ATGCCCAGACATCTGTGTCC Rev.: GGGGTCTCTATGCCCAACAA	Eurofins Genomics
hDesmin	For.: TCGGCTCTAAGGGCTCCTC Rev.: CGTGGTCAGAACTCCTGGTT	Eurofins Genomics
hAlk1	For.: CATCGCCTCAGACATGACCTC Rev.: GTTTGCCCTGTGTACCGAAGA	Eurofins Genomics

hAlk2	For.: TCTCTGTAGTGTTTCGCAGTATGT Rev.: CGTTCTTGGTTGCGCCTTT	Eurofins Genomics
hBMP9	For.: GGGCACAACAAGGCATGATT Rev.: AGAGCAGGCTCCCTTTCC	Eurofins Genomics
hHepcidin	For.: CTGACCAGTGGCTCTGTTTTTC Rev.: GAAGTGGGTGTCTCGCCTC	Eurofins Genomics
hIL1ra	For.: CATTGAGCCTCATGCTCTGTT Rev.: CGCTGTCTGAGCGGATGAA	Eurofins Genomics
hID1	For.: CTGCTCTACGACATGAACGG Rev.: GAAGGTCCCTGATGTAGTCGAT	Eurofins Genomics
hIL1b	For.: AGCTACGAATCTCCGACCAC Rev.: CGTTATCCCATGTGTCTGAAGAA	Eurofins Genomics
hTNFa	For.: CCTCTCTCTAATCAGCCCTCTG Rev.: GAGGACCTGGGAGTAGATGAG	Eurofins Genomics
hIL6	For.: ACTCACCTCTTCAGAACGAATTG Rev.: CCATCTTTGGAAGGTTTCAGGTTG	Eurofins Genomics
hIL10	For.: GACTTTAAGGGTTACCTGGGTTG Rev.: TCACATGCGCCTTGATGTCTG	Eurofins Genomics
hRS18	For.: CCATTCGAACGTCTGCCCTAT Rev.: TCACCCGTGGTCACCATG	Eurofins Genomics

2.2.4. Methoden zur Untersuchung auf Protein-Ebene

Isolation von Proteinen

Für die Protein-Gewinnung wurde zunächst der Überstand der vier Wells entnommen und der Zellrasen zweimal mit PBS (6-Well Platte 2 ml/well, 12-Well Platte 1 ml/well) gewaschen. Für die Proteinisolierung wurden 10 ml RIPA-Puffer hergestellt, bestehend aus 1.5 ml NaCl, 0,1 ml Nonident P-40 (1%), 0.05 mL SDS (0.1%), 5 ml Tris (50 mM, pH 7.4) und 10 ml destilliertem Wasser, welcher bei -20°C gelagert wurde. Zu dem Puffer wurde eine Tablette Proteaseinhibitor beigelegt. Auf 100 µl RIPA-Puffer wurde daraufhin 1 µl Phosphataseinhibitor hinzugefügt. Es wurden 60 µl pro Well einer 6-Well Platte und 20 µl pro Well einer 12-Well Platte appliziert. Das Lysat wurde mit einem Cell-Scraper gesammelt und in ein 1.5 ml Eppendorf Gefäß überführt. Die Proben wurden 10 Minuten bei 13.000 rpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues 1.5 ml Eppendorf Gefäß asserviert, das alte Eppi samt Pellet verworfen und die Proben bei -20°C gelagert.

Konzentrationsmessung

Die Proteinbestimmung erfolgte mithilfe eines Kits von BIO RAD. Zunächst wurde ein Mastermix aus dem DC™ Protein Assay Reagent A und dem DC™ Protein Assay Reagent S hergestellt (A:S = 50:1), wovon 25 µl pro Well einer 96-Well Platte appliziert wurde. Im Anschluss wurde 1 µl Wasser, der Standards mit steigender Proteinkonzentration und der Proben in jeweils zwei Wells aufgetragen. Zuletzt wurden 200 µl des Protein Assay Reagent B hinzugefügt. Die Platte wurde bei Raumtemperatur 15 Minuten auf einem Shaker belassen und im Anschluss die Proteinkonzentration photometrisch bei 690 nm mit einem Microplate Reader bestimmt.

Aus der Messung ergab sich eine gemittelte lineare Kurve der Proteinstandards der Formel $y = m \cdot x + n$

Aus den Daten der Proteinstandardkurve konnte die Proteinkonzentration der Probe in µg/µl wie folgt ermittelt werden:

$$c \text{ in } \mu\text{g}/\mu\text{l} = (\text{MW beider Wells} + n) / m \text{ (NOCH MAL NACHSCHAUEN)}$$

Vorbereitung der Proben

Je nach Konzentration der Proben wurde zwischen 20-50 µg Proteine für die anschließende Analyse verwendet. Dies wurde mit folgender Formel ermittelt:

$$V \text{ Protein } (\mu\text{l}) = 20\text{-}50 \mu\text{g} / c (\mu\text{g}/\mu\text{l})$$

Die benötigte Menge an destilliertem Wasser wurde mit folgender Formel bestimmt:

$$V \text{ H}_2\text{O } (\mu\text{l}) = 14 \mu\text{l} - V \text{ Protein } (\mu\text{l})$$

Zusätzlich wurde zu dem Gemisch aus Protein und destilliertem Wasser 6 µl eines Mastermixes bestehend aus Lithiumborat-Puffer (LB) und Diethioereitol (DTT) im Verhältnis 1:5 (LB:DTT) beigefügt. Das Endvolumen von 20 µl wurde gevortext und die Proteine auf einem Eppendorf Thermomixer für 5 Minuten bei 95°C denaturiert.

Gelelektrophorese

Die Invitrogen Elektrophorese Kammer als auch die Arbeitsfläche wurde zunächst mit destilliertem Wasser gespült. Die weiße Schutzfolie des Gels und der Kamm wurde durch vorsichtiges Ziehen entfernt und mit Laufpuffer ausgespült. Das neue Gel wurde eingespannt und die Kammer mit 500 ml Puffer befüllt (25 ml Laufpuffer + 475 ml destilliertes Wasser). Im Anschluss wurden die Taschen des Gels mit einer 200 µl Pipette und gelben Spitze ausgespült, bis keine Schlieren mehr zu sehen waren.

Zuerst wurden 3 µl einer Proteinleiter in die erste Tasche pipettiert, um eine Orientierung anhand von farbig dargestellten Proteinbanden mit spezifischem Gewicht (in kD) zu gewährleisten. Danach wurden die kompletten 20 µl der Proben vorsichtig in die Taschen pipettiert. Falls freie Taschen übrig waren, wurden zum Ausgleich je 5 µl eines Gemisches bestehend aus LB rein pipettiert.

Nach dem Befüllen aller Taschen wurde die Kammer an ein Power Supply angeschlossen und die Elektrophorese bei 150 V für ungefähr 90 Minuten gestartet. Da das Gewicht der detektierenden Proteine bereits im Voraus bekannt war, wurde die Elektrophorese dann gestoppt, wenn der Abstand zwischen den Banden und die Proteinlokalisierung am idealsten für den Antikörpernachweis war. Die Kammer wurde im Anschluss mit destilliertem Wasser ausgewaschen.

Blotting

Es wurden 50 ml des Transferpuffers mit 200 ml Methanol und 750 ml destilliertem Wasser vermischt. Für das Blotting-Sandwich wurden 6 Schwämme, 6 Filterpapiere und eine Nitrocellulose (NC) Membran zugeschnitten und in Transferpuffer getränkt. Zunächst wurden 3 Filterpapiere übereinandergelegt und mit einer 25 ml Pipette vorsichtig ausgerollt, um vorhandene Luftblasen rauszudrücken. Das Gel wurde mithilfe eines Werkzeuges aus der Vorrichtung herausgebrochen und der Kamm sowie der wulstige Rand abgetrennt. Danach wurde das Gel vorsichtig auf das Filterpapier gegeben. Es war darauf zu achten, dass der Proteinmarker rechts liegen musste und das Gel nicht hin- und hergeschoben wurde. Die NC Membran wurde ebenfalls in einer Schale mit Transferpuffer getränkt und auf das Gel gelegt. Wenn möglich sollte die Membran nur am Rand angefasst werden, um Verschmutzungen zu vermeiden. Im

Anschluss wurde abermals mit der 25 ml Pipette gleichmäßig, von der Mitte aus nach oben und unten, Luftblasen herausgedrückt. Danach wurden 3 Filterpapiere auf die NC Membran gegeben.

Zuletzt wurden insgesamt 6 nasse Schwämme auf das Sandwich gegeben und alles in die Transferkammer überführt. Zusammenfassend bestand das Sandwich aus folgenden Komponenten:

3 x Schwämme

3 x Filterpapier

1 x Gel

1 x NC Membran

3 x Filterpapier

3 x Schwämme

Im Anschluss wurde das Modul mitsamt dem zugehörigen Deckel in die Elektrophoresekammer gespannt. Die Kammer wurde vollständig mit Transferpuffer gefüllt und auf Eis gestellt. Nach dem Anschließen an eine Power Supply wurde das Blotten für 3 Stunden bei 300 mA durchgeführt.

Nach dem Blotten wurde das Sandwich auseinandergebaut und die NC Membran herausgeholt. Auch hier war wieder darauf zu achten, diese nicht mit den Fingern zu berühren. Mit einem Kugelschreiber wurden die einzelnen Banden für die spätere Orientierung markiert und im Anschluss wurde die Membran in Ponceau Rot angefärbt um alle aufgetrennten Proteine darauf zu detektieren. Nachdem die Membran mit destilliertem Wasser gespült wurde, wurde mit einem sauberen Skalpell und Lineal zurechtgeschnitten.

Blocken

Die Membran wurde mit 50 ml bestehend aus 5% Bovinem Serumalbumin (BSA) in Tris-gepufferter Salzlösung mit Tween (TBST) auf einem Schüttler geblockt. Hiermit wird einem unspezifischen Binden des Antikörpers entgegengewirkt, da unbesetzte Stellen der Membran mit Proteinen besetzt werden.

Antikörper

Die primären Antikörper wurden zuvor verdünnt (s. Tabelle) und bei -20°C gelagert. Bei Gebrauch wurden sie bei 4°C aufgetaut. Im Anschluss wurde die Membran mit dem Antikörper in eine Plastiktüte eingeschweißt und über Nacht bei 4 °C auf einen Shaker inkubiert.

Primärantikörper	Verdünnung
Phospho NFkB	1:1000
NF-kB	1:1000
Phospho Smad1/3	1:2000
Smad 1/3	1:1000
β-actin	1:1000

Am nächsten Tag wurde die Membran dreimal für 5 Minuten mit 20-30 ml TBST gewaschen. Im Anschluss wurde der sekundäre Antikörper angesetzt (s. Tabelle). Die Membran wurde dann mit dem sekundären Antikörper für eine Stunde bei Raumtemperatur auf einem Shaker inkubiert. Hierbei wurde darauf geachtet, dass primärer und sekundärer Antikörper von derselben Spezies stammen. Die Membran wurde danach wieder dreimal für 5 Minuten mit TBST gewaschen.

Sekundärantikörper	Verdünnung
Anti Rabbit IgG, HRP-linked Antibody	1:5000
Anti-mouse IgG, HRP-linked Antibody	1:5000

Vor dem Auftragen eines weiteren Antikörpers wurde die Membran mithilfe eines Stripping Puffers gestript. Hierbei wurde die Membran in eine Box gegeben, welche mit Parafilm verschlossen wurde, und 1 Stunde in einem Wasserbad (37°C) inkubiert wurde. Im Anschluss wurde die Membran wieder dreimal für 5 Minuten mit TBST gewaschen und geblockt.

Detektion

Die Detektion der Proteine erfolgte mithilfe eines Chemilumineszenzdetektors. Hierfür wurde zunächst die NC Membran auf eine Folie gegeben und ECL im Verhältnis 1:1 auf die Membran pipettiert. Nach einer Inkubationszeit von 1-5 Minuten wurde die Membran mit einer zweiten Folie abgedeckt und vorhandene Luftblasen entfernt. Die Proteinleiter wurde mit Fluoreszenzfarbe markiert um die Größe der detektierten Proteine zu ermitteln.

3. Ergebnisse

Ein Großteil der Ergebnisse trug zu folgender Veröffentlichung bei:

Gaitantzi H, Karch J, **Germann L**, Cai C, Rausch V, Birgin E, Rahbari N, Seitz T, Hellerbrand C, König C, Augustin HG, Mogler C, de la Torre C, Gretz N, Itzel T, Teufel A, Ebert MPA, Breitkopf-Heinlein K. BMP-9 Modulates the Hepatic Responses to LPS. Cells. 2020 Mar 4;9(3):617. doi: 10.3390/cells9030617.

3.1. BMP-9 und LPS Interaktion in murinen Makrophagen

Zunächst führte ich meine Experimente mit der murinen Makrophagenzelllinie J774A.1 durch (Abbildung 13). Die Entscheidung zur Verwendung dieser Zelllinie, beruhte darauf, dass sie sich im Zuge der Literaturrecherche als äußerst responsiv für LPS zeigte und somit ideal für meinen Versuchsaufbau schien.³⁴ Die Zellen wurden in vier verschiedenen Konditionen kultiviert: unbehandelt, reine LPS oder BMP-9 Stimulation sowie Ko-Stimulation mit LPS und BMP-9, wobei sich die LPS Inkubation entweder über 1 oder 24 Stunden erstreckte und die BMP-9 Stimulation über 24 bzw. 48h. Im Anschluss erfolgte die Lyse der Zellen mit konsekutiver RNA- oder Protein-Aufreinigung. Analysen erfolgten mithilfe von realtime-PCR bzw. Western-Blot.

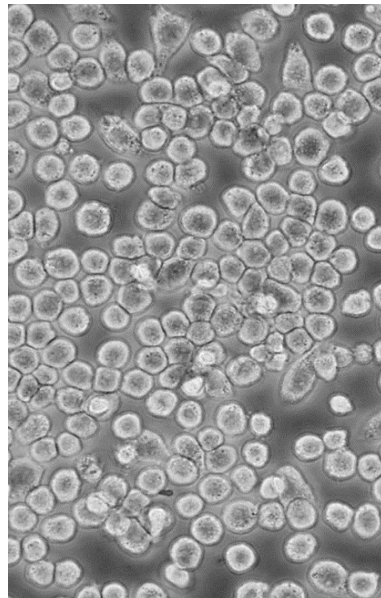


Abb. 13.: Murine Makrophagenzelllinie J774A.1

3.1.1. PCR-Ergebnisse

Um die Interaktion zwischen BMP-9 und LPS genauer zu beschreiben, untersuchten wir die Expression der proinflammatorischen Zytokine TNF α , IL-6 und IL-1 β , aber auch das antiinflammatorisch wirkende Interleukin 10 mithilfe von realtime-PCR. Neben diesen LPS-induzierten Mediatoren überprüften wir typische BMP-9 Targets wie ID1 und Hepcidin.

ID1 (Inhibitor of DNA binding protein-1) ist ein inhibitorischer Transkriptionsfaktor, welcher unter anderem Einfluss auf Differenzierung und Proliferation in zahlreichen Zelltypen hat. Bereits 2001 konnten Korchynskyi et al. nachweisen, dass die Expression von ID1 durch BMPs induziert wird.³⁵

Hepcidin ist ein Protein, welches hauptsächlich durch Hepatozyten, aber auch von Makrophagen und Adipozyten produziert wird und eine zentrale Rolle in der Regulation des körpereigenen Eisenhaushaltes spielt. Es steuert die Aufnahme und den Transfer von Eisen aus Zellen wie Enterozyten, Hepatozyten sowie Makrophagen ins Plasma, in dem es an das Transmembranprotein Ferroportin bindet. Zusätzlich ist Hepcidin in inflammatorischen Prozessen beteiligt.^{36,37} Unter den BMPs scheint insbesondere BMP-6 ein Schlüsselregulator von Hepcidin zu sein.^{38,39} Neben BMP-2 und -4 steuert aber vor allem auch BMP-9 die Hepcidin-Expression.¹³

3.1.1.1. Stimulation mit BMP-9 für 24h und mit LPS für 1h:

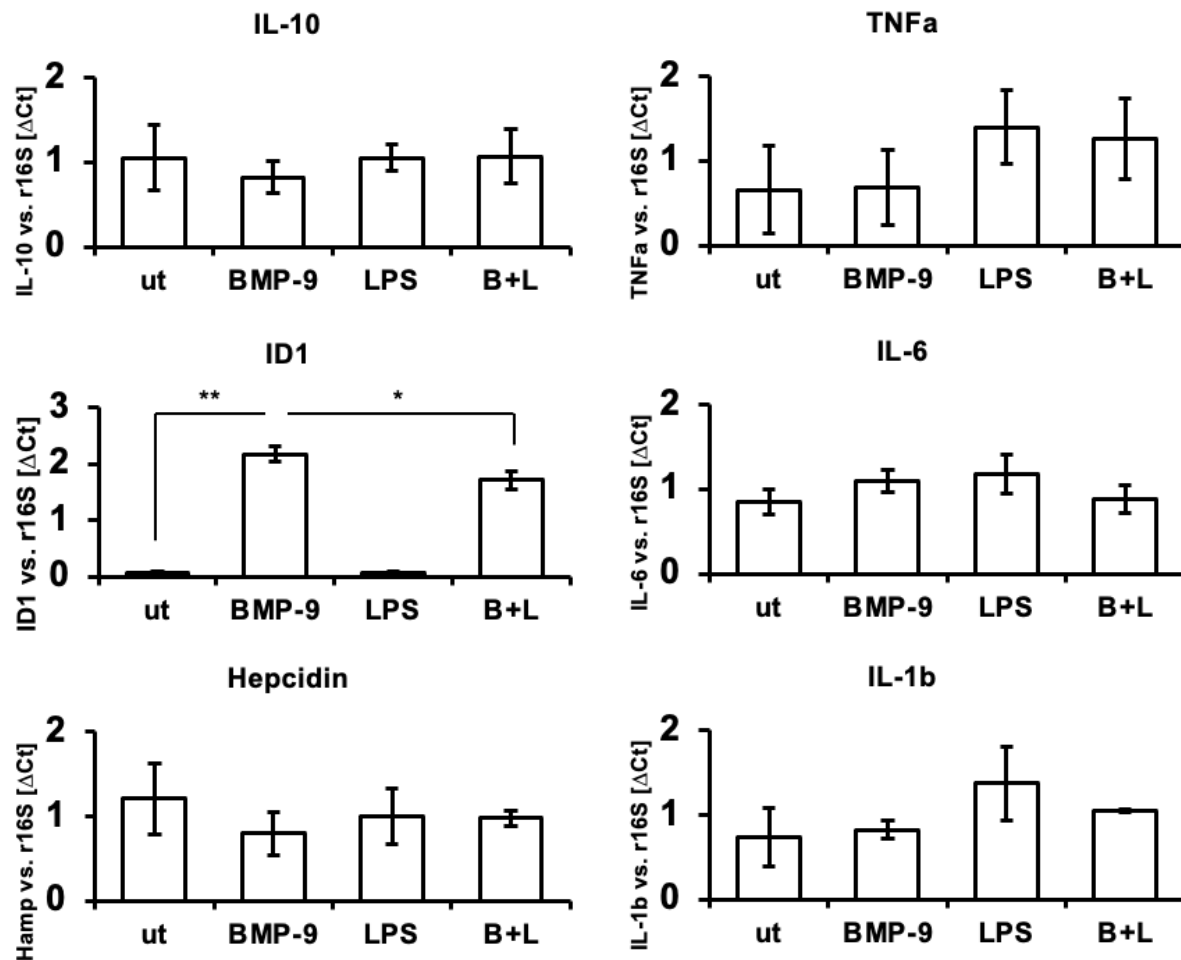


Abb. 14.: BMP-9 und 1h LPS in murinen Makrophagen (J774A.1) – Murine Makrophagen wurden zunächst ohne oder mit BMP-9 Stimulation (5 ng/ml) für 24 Stunden kultiviert. Je nach Kondition erfolgte im Anschluss eine LPS Stimulation (100 ng/ml) für eine Stunde. RNA Lysate wurden asserviert und die Expressionslevel von IL-10, TNFα, ID1, IL-6, Hepcidin sowie IL-1b mittels RT-qPCR ermittelt. Die Ct-Werte wurden auf r16S normalisiert und die Ergebnisse mittels T-Test ausgewertet und wie folgt klassifiziert: $p \leq 0,05$; *, $p \leq 0,01$; ** (n=3). Dargestellt ist jeweils der Mittelwert aus drei Versuchen $\pm$ SD.

In Abbildung 14 sind die Ergebnisse mit der murinen Makrophagenzelllinie J774A.1 nach einer einstündigen LPS-Inkubation zusammengefasst. Wie erwartet zeigte sich bereits nach 24h eine Induktion des BMP-9 Targets ID1. Interessanterweise führte die Kostimulation mit LPS und BMP-9 zu einer signifikanten Reduktion der ID1-Expression. Die Hepcidin-Expression zeigte sich generell unbeeinflusst. Leider konnte auch keine signifikante Induktion durch eine alleinige BMP-9 Stimulation nachgewiesen werden.

Ebenfalls unbeeinflusst zeigten sich sowohl die pro- als auch anti-inflammatorischen Zytokine TNFα, IL-6, IL-1b und IL-10. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte die zu kurze Inkubationszeit mit LPS von einer Stunde sein. Infolgedessen führten wir weitere Versuche mit einer längeren Inkubationszeit von 24 Stunden durch (s.u.).

Insgesamt fand sich also nach 24h BMP-9-Stimulation nur eine Induktion von ID1, die durch die Ko-Stimulation mit LPS für eine Stunde signifikant reduziert wurde. Nach nur einer Stunde Stimulation mit LPS fanden sich ansonsten noch keine Expressionsveränderungen.

3.1.1.2. Stimulation mit BMP-9 für 48h und mit LPS für 24h:

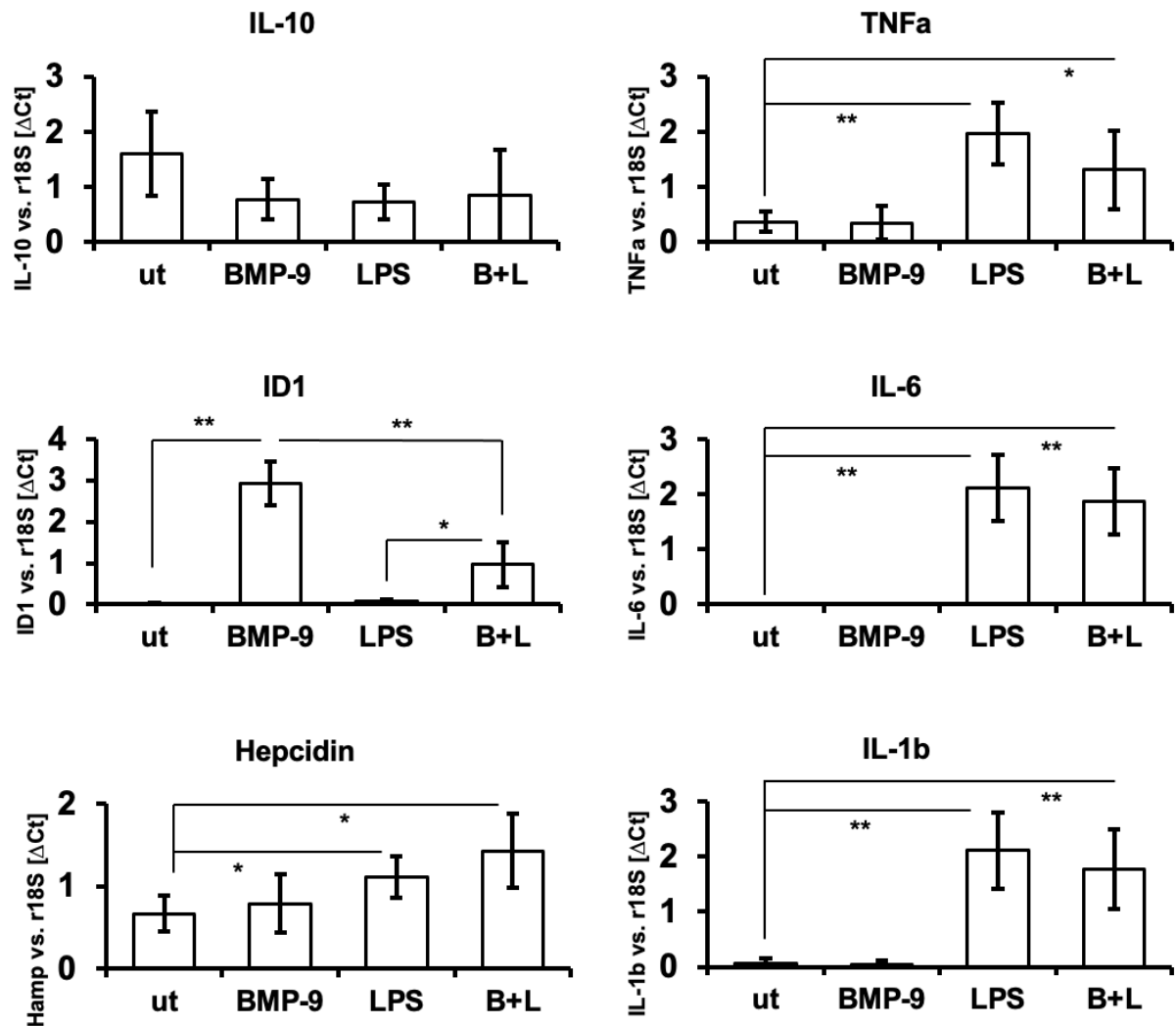


Abb. 15.: BMP-9 und 24h LPS in murinen Makrophagen (J774A.1) – Murine Makrophagen wurden zunächst ohne oder mit BMP-9 Stimulation (5 ng/ml) für 24 Stunden kultiviert. Je nach Kondition erfolgte im Anschluss eine LPS Stimulation (100 ng/ml) für weitere 24 Stunden. RNA Lysate wurden asserviert und die Expressionslevel von IL-10, TNFα, ID1, IL-6, Hepcidin sowie IL-1b mittels RT-qPCR ermittelt. Die Ct-Werte wurden auf r18S normalisiert und die Ergebnisse mittels T-Test ausgewertet und wie folgt klassifiziert: $p \leq 0,05$: *, $p \leq 0,01$: ** (n=4).

Auch bei Stimulation der Zellen mit BMP-9 für 48h konnten wir, wie zuvor schon bei 24 Stunden, eine Induktion von ID1 beobachten, die wieder signifikant durch die Kostimulation mit LPS (Stimulationszeit 24h) inhibiert wurde (Abbildung 15). Die Expression von Hepcidin hingegen zeigte wieder keine solch klare Tendenz. Die alleinige Stimulation mit LPS (24h) sowie die Kostimulation zeigte jedoch eine

signifikante Erhöhung der Expression. Hier scheint also der direkte LPS-Effekt stärker zu sein als der BMP-9 Effekt.

Im Gegensatz zu den ein Stunden Versuchen konnte nach 24 Stunden LPS eine klare Induktion der proinflammatorischen Zytokinen TNFa, IL-6 sowie IL1b beobachtet werden. BMP-9 zeigte wenig Einfluss auf diese durch LPS induzierte inflammatorische Antwort, obwohl eine tendenziell verringerte Induktion vorliegen könnte. So war die Induktion von TNFa bei Kostimulation weniger signifikant als bei alleiniger LPS-Stimulation.

Führende Hypothese nach diesen Experimenten war nun also, dass das Endotoxin LPS in Makrophagen möglicherweise BMP-9 induzierte Signalwege hemmen kann. Umgekehrt könnte auch BMP-9 seinerseits die LPS induzierte inflammatorische Antwort beeinflussen.

3.1.2. Western Blot Ergebnisse

Nächstes Ziel war es nun, diese Hypothese auch auf Proteinebene zu untersuchen. Wir führten denselben Versuchsaufbau durch und im Anschluss erfolgte die Lyse der Zellen mit konsekutiver Protein-Gewinnung sowie Analyse mithilfe von Western-Blot. Um den BMP-9 Signalweg zu beleuchten, untersuchten wir das phosphorylierte Smad-Protein 1. Wie in der Einleitung bereits erwähnt, bindet BMP-9 zunächst an einen Typ II oder I Rezeptor. Nach Bildung eines Rezeptor-Liganden Komplexes kommt es zur Phosphorylierung und damit zur Aktivierung der Smads -1, -5 und -8. Diese können dann einen Komplex mit Smad4 ausbilden und als Transkriptionsfaktor in den Zellkern translozieren.^{10,12} Zusätzlich detektierten wir „total-Smad1“, welches sowohl phosphoryliertes als auch unphosphoryliertes Smad1 beinhaltete.

3.1.2.1. 1h LPS

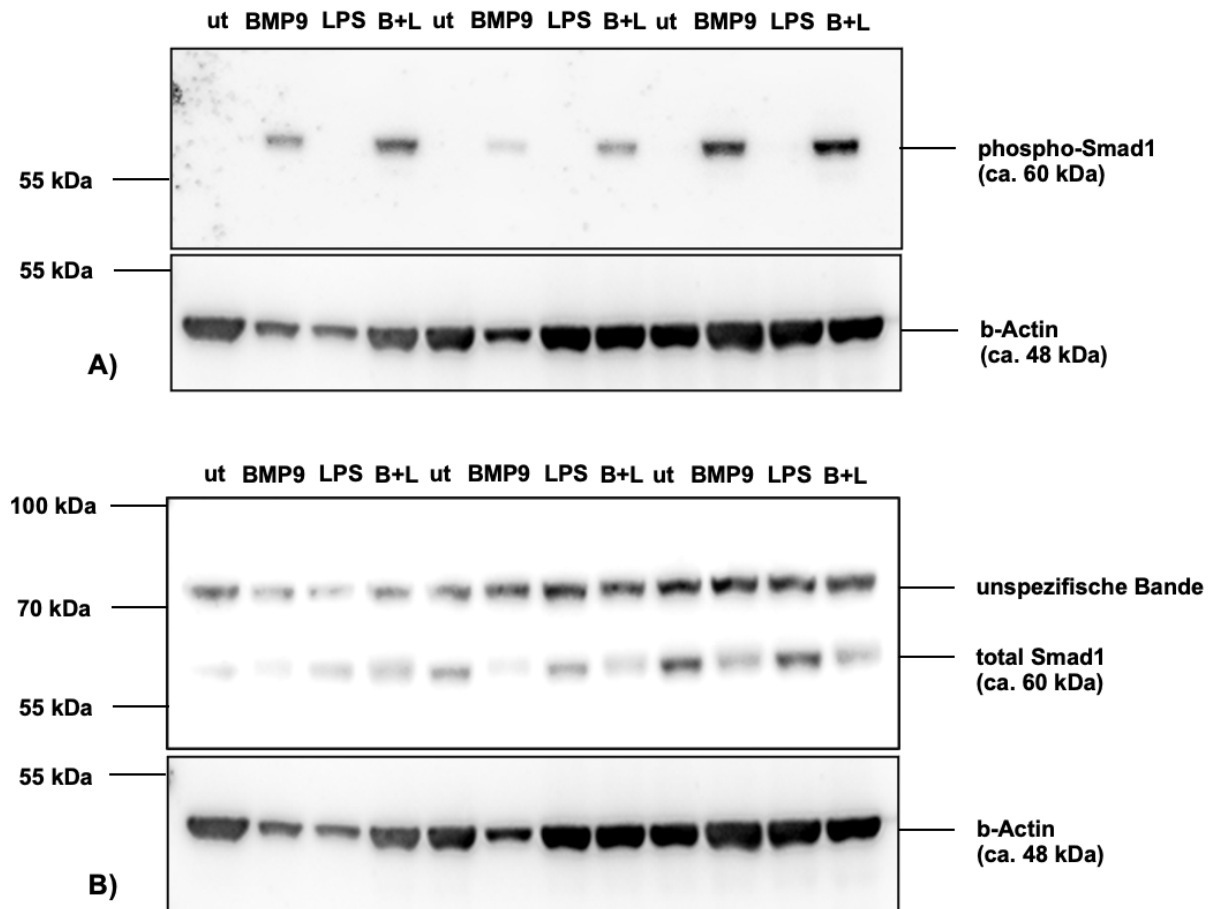


Abb. 16.: BMP-9 und 1h LPS in murinen Makrophagen (J774A.1) – Murine Makrophagen wurden zunächst ohne oder mit BMP-9 Stimulation (5 ng/ml) für 24 Stunden kultiviert. Je nach Kondition erfolgte im Anschluss eine LPS Stimulation (100 ng/ml) für eine weitere Stunde. Protein-Lysate wurden asserviert und mittels Western Blot analysiert (n=3). Untersucht wurde die Aktivierung des Smad1/5/8 Signalweges indem phospho-Smad1 (A) sowie total Smad1 (B) detektiert wurde. Das Haushaltsgen beta-Actin dient als Ladekontrolle.

In den PCR-Analysen konnte bereits nach einstündiger LPS Inkubation eine Reduktion der BMP-9 vermittelten Induktion von ID1 in murinen Makrophagen beobachtet werden. Auch auf Protein-Ebene konnten wir die zu erwartende Induktion von phospho-Smad1 durch BMP-9 darstellen (Abbildung 16 A). Überraschenderweise blieb jedoch die Reduktion des phosphorylierten Smad-Proteins durch die Kostimulation mit LPS aus.

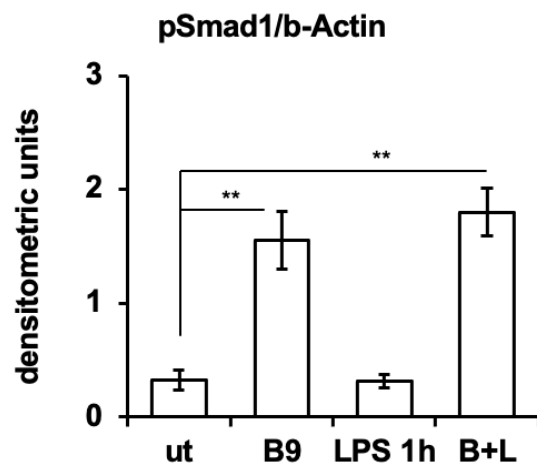


Abb. 17.: BMP-9 und 1h LPS in murinen Makrophagen (J774A.1) – Densitometrische Auswertung der Experimente nach einstündiger LPS Inkubation und Western-Blot Analyse (n=3).

Die oben gezeigte Grafik (Abbildung 17) stellt die densitometrische Auswertung dieser Ergebnisse dar. Da sich total Smad1 in der oben gezeigten Western Blot Analyse umgekehrt zu phospho-Smad1 zu verhalten scheint, normalisierten wir auf b-Actin und nicht auf total Smad1. Vermutlich handelt es sich hierbei um ein technisches Problem: durch das inkomplette Strippen des phospho-Smad1 Antikörpers wird eine Bindung des total Smad1 Antikörpers teilweise verhindert. Aufgrund unzureichender Proteinmengen war die Herstellung eines zweiten, komplett frischen Blots jedoch nicht möglich, sodass eine Normalisierung auf b-Actin erfolgte.

Die quantitative Auswertung des Western Blots mittels Densitometrie verdeutlicht, dass die Kostimulation nicht zu einer reduzierten BMP-9 vermittelten Smad-1 Phosphorylierung führt.

3.1.2.2. 24h LPS

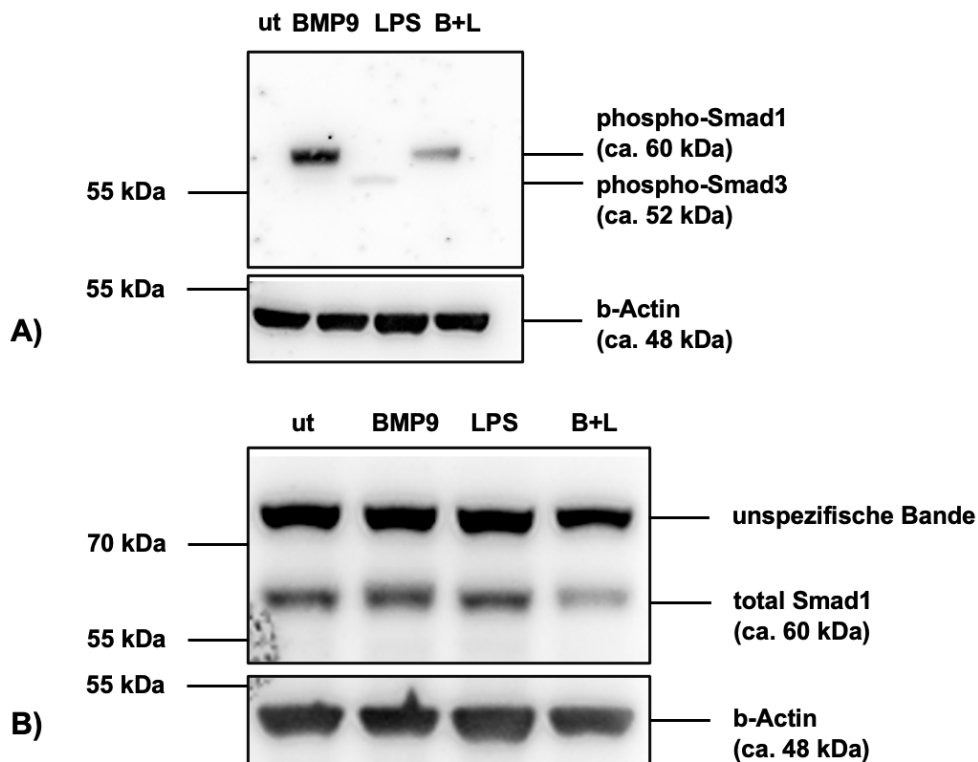


Abb. 18.: BMP-9 und 24h LPS in murinen Makrophagen (J774A.1) – Murine Makrophagen wurden zunächst ohne oder mit BMP-9 Stimulation (5 ng/ml) für 24 Stunden kultiviert. Je nach Kondition erfolgte im Anschluss eine LPS Stimulation (100 ng/ml) für weitere 24 Stunden. Protein-Lysate wurden asserviert und mittels Western Blot analysiert. Untersucht wurde die Aktivierung des Smad1/5/8 Signalweges indem phospho-Smad1 (hier exemplarisch ein Versuch dargestellt) (A) sowie total Smad1 (B) detektiert wurde. Das Haushaltsgen b-Actin dient als Ladekontrolle.

Um weitere Klarheit zu schaffen, untersuchten wir auch die 24h Versuche auf Protein-Ebene. Hierbei konnten wir nicht nur die Induktion von phospho-Smad1 durch BMP-9 darstellen, sondern (Abbildung 18 A) auch die zuvor auf RNA-Ebene beobachtete Inhibition des BMP-9 induzierten Signalweges durch LPS.

Für einen der drei Versuche gelang es, auch einen Blot für total Smad1 herzustellen (Abbildung 18 B). Die Gesamtmenge an Smad1 Protein scheint hierbei unbeeinflusst von sowohl BMP-9 als auch LPS zu sein. Die letzte Spur (Abbildung 18 B) zeigt sich zwar leicht abgeschwächt, dies ist jedoch am ehesten auf eine insgesamt geringere Menge von Protein zurückzuführen.

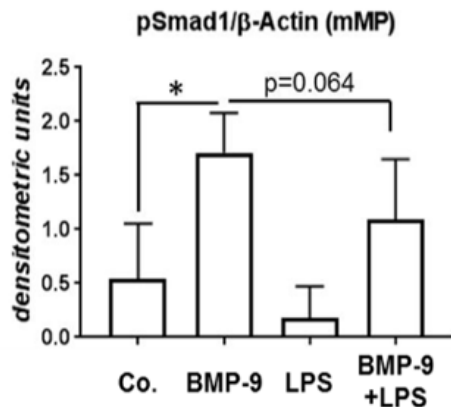


Abb. 19.: BMP-9 und 24h LPS in murinen Makrophagen (J774A.1) (Abbildung entnommen aus dem bereits publizierten Paper Gaitantzi et al. - BMP-9 Modulates the Hepatic Responses to LPS) – Densitometrische Auswertung der Experimente nach 24-stündiger LPS Inkubation und Western-Blot Analyse.

In der densitometrischen Auswertung (Abbildung 19) zeigte sich die Reduktion des BMP-9 vermittelten Effekts durch LPS als fast signifikante Tendenz ($p=0.064$).

Der Versuch den LPS induzierten Signalweg anhand von NFκB sowie phospho-NFκB darzustellen, misslang uns leider. Möglicherweise war die Aktivierung dieses Signalwegs in der murinen Zelllinie einfach zu schwach um mit den uns verfügbaren Antikörpern mittels Western blot dargestellt werden zu können.

3.2. BMP-9 und LPS Interaktion in humanen Makrophagen

Unser nächstes Ziel war es, die Experimente auch an humanen Zellen durchzuführen. Dafür isolierten wir primäre humane Monozyten aus dem Spenderblut (Buffy Coats) gesunder Donoren. Wir führten denselben Versuchsaufbau wie bei der murinen Makrophagenzelllinie durch, also mit zwei unterschiedlichen LPS Inkubationszeiten (1 h und 24 h). Auch hier erfolgte im Anschluss die Lyse der Zellen mit konsekutiver RNA- oder Protein-Gewinnung sowie Analyse mithilfe von realtime-PCR und Western-Blot.

3.2.1. PCR Ergebnisse

Um die Ergebnisse mit denen der murinen Zelllinie zu vergleichen, analysierten wir auch dieses Mal typische BMP-9 Targets wie ID1 und Hepcidin. Zur Veranschaulichung der LPS induzierten Signalwege untersuchten wir abermals pro- und antiinflammatorische Zytokine wie TNFα, IL-10, IL-6, IL-1β sowie den Interleukin-1 Rezeptor-Antagonisten (IL-1RA).

3.2.1.1. Stimulation mit BMP-9 für 24h und LPS für 1h

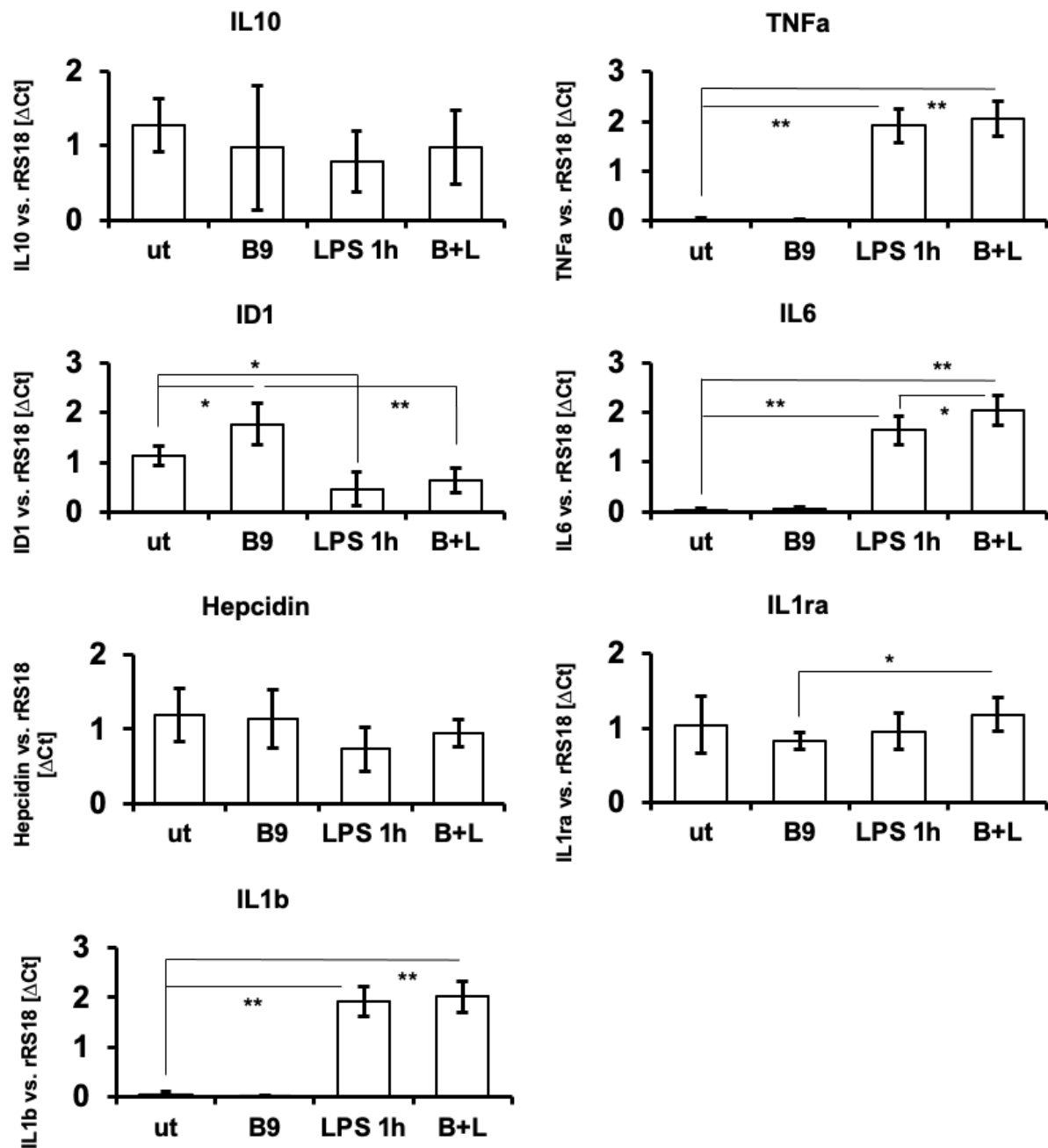


Abb. 20.: BMP-9 und 1h LPS in primären humanen Makrophagen isoliert aus Spenderblut – Monozyten wurden aus Buffy Coats gesunder Spender isoliert. Nach Kultivierung für sieben Tage in serumhaltigem Medium erfolgte eine Differenzierung in Makrophagen. Die humanen Makrophagen wurden zunächst ohne oder mit BMP-9 Stimulation (5 ng/ml) für 24 Stunden kultiviert. Je nach Kondition erfolgte im Anschluss eine LPS Stimulation (100 ng/ml) für eine weitere Stunde. RNA Lysate wurden asserviert und die Expressionslevel von IL-10, TNFa, ID1, IL-6, Hepcidin, IL-1ra sowie IL-1b mittels RT-qPCR ermittelt. Die Ct-Werte wurden auf r18S normalisiert und die Ergebnisse mittels T-Test ausgewertet und wie folgt klassifiziert: $p \leq 0,05$: *, $p \leq 0,01$: ** (n=4).

In Abbildung 20 sind die Ergebnisse der einstündigen LPS Inkubation in humanen Makrophagen zusammengefasst. Wir konnten, wie zuvor bei der murinen Makrophagenzelllinie, eine Induktion von ID1 durch BMP-9 sowie eine signifikante Inhibition durch die Kostimulation beobachten. Interessanterweise zeigte LPS allein

bereits einen inhibitorischen Effekt. Hepcidin zeigte auch in diesen Experimenten leider keine klare Tendenz.

Was die LPS induzierte inflammatorische Antwort anbelangt, konnten wir zuvor in der murinen Makrophagenzelllinie keine klare Modulation durch BMP-9 beobachten. Gegensätzlich dazu zeigte sich bei den humanen Makrophagen jedoch eine Steigerung der LPS-vermittelten Induktion durch die Kostimulation, wobei allerdings nur für IL-6 Signifikanzniveau erreicht wurde. Auch IL-1RA verhielt sich ähnlich indem es nur bei Kostimulation, nicht jedoch bei alleiniger LPS-Stimulation, zu einer signifikant erhöhten Expression kam. Um zu ergründen, ob sich dies bei längeren Inkubationszeiten replizieren ließ, führten wir weitere Experimente durch.

3.2.1.2. Stimulation mit BMP-9 für 48h und LPS für 24h

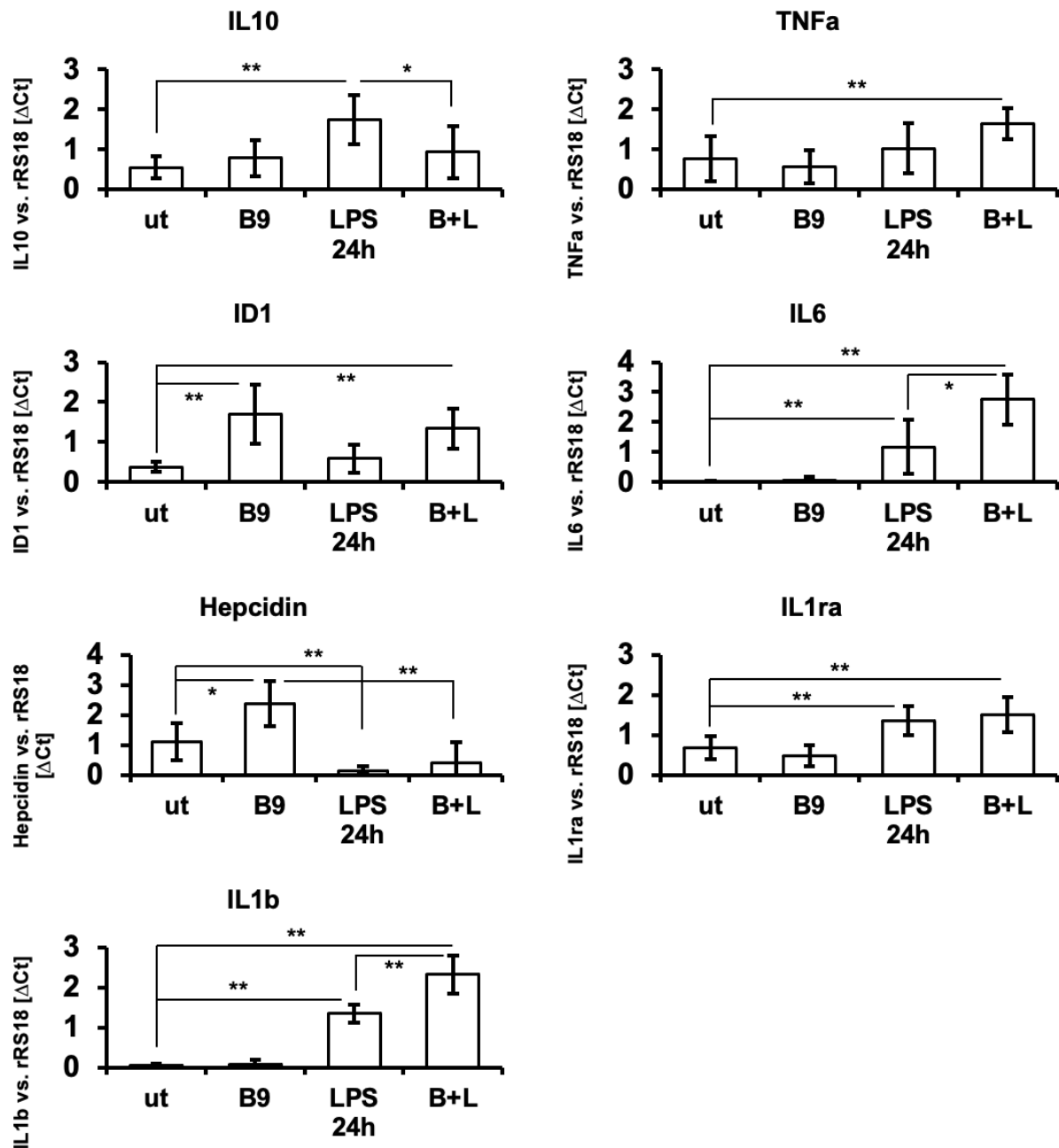


Abb. 21.: BMP-9 und 24h LPS in primären humanen Makrophagen isoliert aus Spenderblut – Monozyten wurden aus Buffy Coats gesunder Spender isoliert. Nach Kultivierung für sieben Tage in serumhaltigem Medium erfolgte eine Differenzierung in Makrophagen. Die humanen Makrophagen wurden zunächst ohne oder mit BMP-9 Stimulation (5 ng/ml) für 24 Stunden kultiviert. Je nach Kondition erfolgte im Anschluss eine LPS Stimulation (100 ng/ml) für weitere 24 Stunden. RNA Lysate wurden asserviert und die Expressionslevel von IL-10, TNFa, ID1, IL-6, Hepcidin, IL-1ra sowie IL-1b mittels RT-qPCR ermittelt. Die Ct-Werte wurden auf Rs18 normalisiert und die Ergebnisse mittels T-Test ausgewertet und wie folgt klassifiziert: $p \leq 0,05$; *, $p \leq 0,01$; ** (n=6).

In den 24 Stunden Versuchen validierte sich die zuvor beobachtete Tendenz einer gesteigerten inflammatorischen Antwort in humanen Makrophagen. Die Zytokine IL-6 sowie IL-1b zeigten eine gesteigerte Expression durch die Kostimulation mit BMP-9. Auch TNFa wies eine ähnliche Tendenz auf. Das antiinflammatorische wirksame Interleukin-10 wurde durch die Kostimulation inhibiert, was die proinflammatorische Wirkung unterstreicht.

Erfreulicherweise zeigte Hepcidin dieses Mal die zu erwartende Induktion durch BMP-9. Wie bei den Vorergebnissen schon bei ID1 beobachtet, wurde dieses BMP-9 Target durch die Kostimulation mit LPS inhibiert. Auch hier zeigte LPS allein bereits einen inhibitorischen Effekt.

3.2.2. Western Blot Ergebnisse

Wir versuchten erneut die Ergebnisse auch auf Protein-Ebene darzustellen. Auch hierbei untersuchten wir wieder das BMP-9 Target phospho-Smad1. Zusätzlich versuchten wir den LPS Signalweg mithilfe von phospho-p65 darzustellen.

3.2.2.1. 1h und 24h LPS

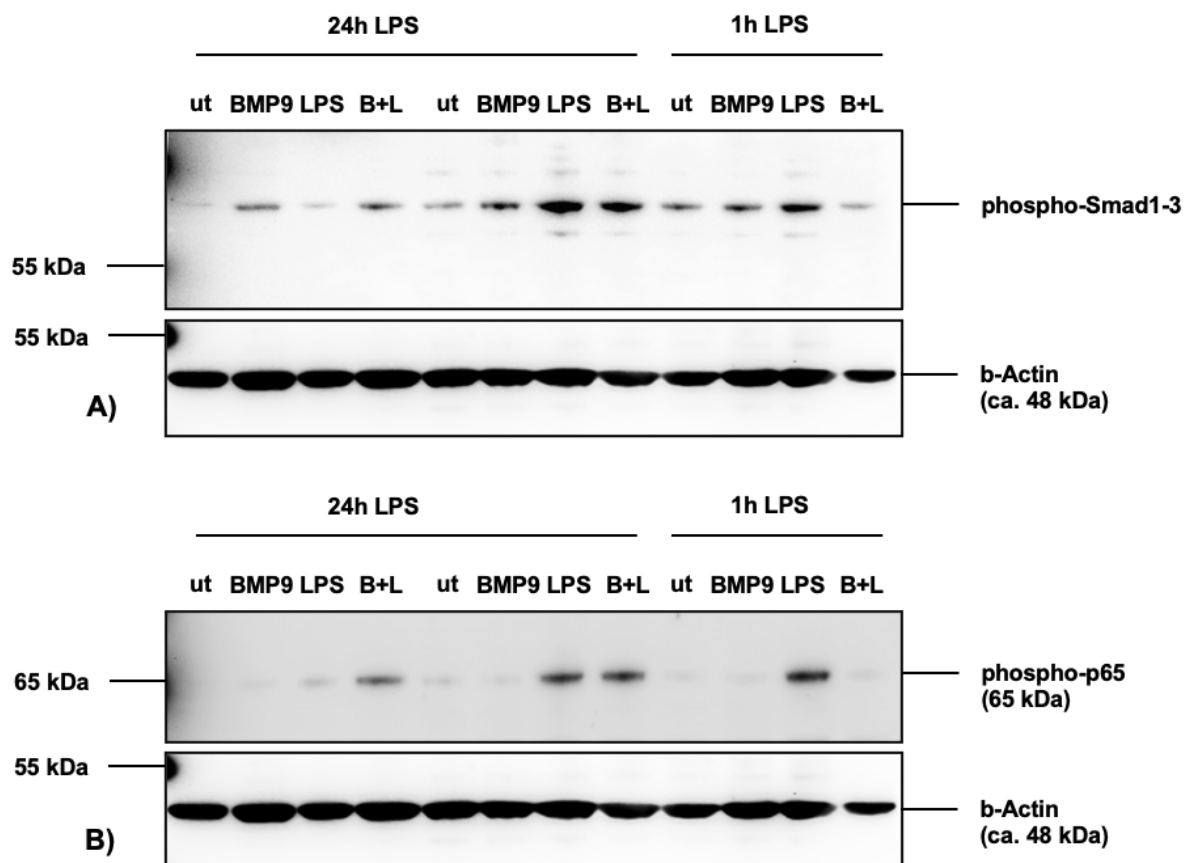


Abb. 22.: BMP-9 und 1h sowie 24h LPS primären humanen Makrophagen isoliert aus Spenderblut – Monozyten wurden aus Buffy Coats gesunder Spender isoliert. Nach Kultivierung für sieben Tage in serumhaltigem Medium erfolgte eine Differenzierung in Makrophagen. Die humanen Makrophagen wurden zunächst ohne oder mit BMP-9 Stimulation (5 ng/ml) für 24 Stunden kultiviert. Je nach Kondition erfolgte im Anschluss eine LPS Stimulation (100 ng/ml) für eine weitere oder 24 Stunde/n. Protein-Lysate wurden asserviert und mittels Western Blot analysiert. Untersucht wurde die Aktivierung des BMP-9 und LPS Signalweges indem phospho-Smad1-3 (24h n=2, 1h n=1) (A) sowie phospho-p65 (24h n=2, 1h n=1) (B) detektiert wurde. Das Haushaltsgen b-Actin dient als Ladekontrolle.

Die Western Blot Analyse der primären humanen Makrophagen erwies sich als anspruchsvoller, da wir deutlich weniger Protein generieren konnten. In Abbildung 22

sind aufgrund dessen auch nur eine Wiederholung für die einstündigen LPS und zwei Wiederholungen für die 24 Stunden Versuche dargestellt. Zuvor konnten wir auf RNA-Ebene eine Inhibition des BMP-9 induzierten Signalweges (ID1, Hecpudin) beobachten. In der Western-Blot Analyse zeigte phospho-Smad1-3 (Abbildung 22 A) jedoch keine solch klare Tendenz, wobei dies vermutlich auf die zu geringe Proteinkonzentration zurückzuführen ist.

Was den LPS induzierten Signalweg anbelangt, hier am Beispiel von phospho-p65 dargestellt (Abbildung 22 B), konnte ebenfalls keine klare Tendenz nachgewiesen werden. Dies ist vermutlich wieder der zu geringen Proteinkonzentrationen geschuldet. Lediglich der erste 24 Stunden Versuch lässt eine gesteigerte inflammatorische Antwort durch die Kostimulation vermuten und deckt sich somit mit den Ergebnissen der humanen Makrophagen auf RNA-Ebene.

Zusammenfassend konnten wir im Zuge dieser Experimente somit nachweisen, dass die murine Makrophagenzelllinie J774A.1 als auch primäre humane Makrophagen isoliert aus Spenderblut ähnlich, jedoch nicht identisch auf die Stimulation mit LPS und BMP-9 reagieren. Auf RNA-Ebene zeigten beide Zelltypen eine Inhibition BMP-9 induzierter Signalwege durch die Kostimulation mit LPS. Dies konnte auf Protein-Ebene, zumindest bei der murinen Makrophagenzelllinie, als Tendenz bestätigt werden. Unterschiede offenbarten sich jedoch bei der LPS induzierten inflammatorischen Antwort: Während BMP-9 in der murinen Makrophagenzelllinie keinerlei Einfluss zu haben schien, konnte in den humanen Makrophagen eine Steigerung der inflammatorischen Antwort beobachtet werden.

4. Diskussion

Ziel meiner Doktorarbeit war es, die Interaktion zwischen LPS und BMP-9 in Makrophagen zu veranschaulichen. Ein Teil der Ergebnisse unserer Forschungsgruppe wurde bereits in dem Journal „Cells“ unter dem Titel „*BMP-9 modulates the hepatic response to LPS*“ von Gaitantzi et al.¹⁹ publiziert.

Das TGF- β Familienmitglied BMP-9 wurde erstmalig 1994 entdeckt.³⁹ Seitdem wurden zahlreiche Studien publiziert, welche sich mit der sehr vielfältigen Funktion des Proteins beschäftigen. Es beeinflusst nicht nur Osteo- und Angiogenese, sondern ist an der Karzinogenese zahlreicher Tumorentitäten beteiligt und scheint auch eine zentrale Rolle in der Pathogenese der Leberzirrhose zu spielen.^{15,16,18,21-24} Seine Wirkung entfaltet es vor allem über die Bindung an Serin/Threonin-Kinase Rezeptoren (insbesondere ALK1) mit anschließender Aktivierung von sowohl Smad-abhängigen als auch Smad-unabhängigen Signalwegen.^{10,11,12}

Lipopolysaccharid (LPS) ist ein Glykolipid in der äußeren Zellmembran gramnegativer Bakterien, welches aus Lipid A, Core-Polysaccharid und O-Antigen besteht. Es wird im Zytoplasma gebildet und durch eine Enzymkaskade synthetisiert. LPS aktiviert das Immunsystem, indem es über den Toll-like-Rezeptor 4 (TLR4) an Zellen wie Makrophagen bindet, was zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF κ B und der Produktion entzündlicher Zytokine führt. LPS spielt eine Rolle bei der Stimulierung des Immunsystems, kann aber auch überschießende Reaktionen auslösen, die zu septischem Schock oder chronischen Erkrankungen wie Leberzirrhose führen.^{19,25-31}

Neben BMP-9 und LPS scheint in der Pathogenese der Leberzirrhose jedoch auch die Interaktion der in der Leber vertretenen unterschiedlichen Zelltypen wichtig zu sein. Dementsprechend war es Ziel unserer Forschungsgruppe, diese zunächst einzeln zu untersuchen, um im Anschluss auf deren Zusammenwirken schließen zu können. Zunächst wurden daher verschiedene Leberzellen, darunter Kupfferzellen (KC) und sinusoidale Endothelzellen (LSEC), auf ihre Rezeptorexpression von ALK1 (BMP-9-Rezeptor) und TLR4 untersucht. ALK1 wurde hierbei vor allem in LSEC und KC exprimiert, während BMP-9 selbst scheinbar hauptsächlich in hepatischen Sternzellen (HSC) produziert wird. Die TLR4-Expression wird hauptsächlich durch KC und LSEC gewährleistet. Diese Ergebnisse legen nahe, dass KC und Makrophagen grundsätzlich

auf LPS und BMP-9 ansprechen können. Weitere Experimente zeigten, dass BMP-9 in menschlichen LSEC die durch LPS induzierte pro-inflammatorische Antwort (IL-6, CXCR7, ICAM1) hemmt, aber selbst nicht von LPS beeinflusst wird. In Mausmodellen wurde eine kurzfristige Verstärkung der LPS-induzierten Entzündungsreaktion nach BMP-9-Injektion beobachtet, die jedoch nach 12 Stunden abnahm.^{9,19,32}

4.1. BMP-9 und LPS Interaktion in murinen Makrophagen

Auf RNA-Ebene zeigte sich sowohl nach einer ein- und 24-stündigen Inkubationszeit von LPS eine signifikante Inhibition des BMP-9 induzierten Signalweges (ID1 Induktion).

In murinen Makrophagen kann daher zunächst auf eine antagonistische Interaktion zwischen den beiden Signalwegen geschlossen werden. Dies könnte beispielsweise auf autoregulatorische Mechanismen zurückzuführen sein. Auf Protein-Ebene konnte durch die Stimulation von BMP-9 eine zu erwartende Induktion von phospho-Smad 1 beobachtet werden. Konträr zu den real time PCR Ergebnissen blieb jedoch eine Inhibition durch die Kostimulation von BMP-9 und LPS aus. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte sein, dass die Inkubationszeit von 1h zwar lang genug ist, um auf RNA-Ebene einen Effekt zu erzielen, diese jedoch auf Proteinebene noch nicht ausreichend ist. Eine weitere Möglichkeit ist, dass ID1 zusätzlich über andere (Smad-unabhängige) Signalwege moduliert wird, welche noch rapider durch LPS inhibiert werden.¹⁹ Wie bereits in der Einleitung erwähnt gibt es zahlreiche andere potenziell involvierte Signalwege die beispielsweise Mitogen-aktivierte Proteinkinasen beinhalten (MAPK).¹⁰

LPS induzierte Targets zeigten sich nach einstündigem Einwirken nicht signifikant verändert. Auch hierfür scheint die naheliegendste Erklärung eine unzureichende Inkubationszeit zu sein. Xaus et al. konnten beispielsweise zeigen, dass das Zytokin TNFa zwar bereits eine halbe Stunde nach Stimulation von LPS in Makrophagen nachweisbar ist, ein Maximum zeigte sich jedoch erst nach 120 Minuten.⁴⁰ Umgekehrt zu dem Einfluss von LPS auf BMP-9 zeigten sich LPS-induzierte Signalwege durch das TGF- β Familienmitglied BMP-9 in den hier untersuchten Targets sowohl auf PCR- als auch Western Blot Ebene unbeeinflusst. Somit also konträr zu den im Vorfeld erhobenen Ergebnissen in LSEC.¹⁹

4.2. BMP-9 und LPS Interaktion in humanen Makrophagen

Auf RNA-Ebene wurde, ähnlich wie bei der murinen Makrophagen-Zelllinie, sowohl nach einer einstündigen als auch nach einer 24-stündigen Inkubation eine Induktion von ID1 durch BMP-9 beobachtet, die durch die Kostimulation signifikant gehemmt wurde. Im Vergleich zur Zelllinie fiel die Induktion von ID1 jedoch insgesamt schwächer aus. Bemerkenswert ist, dass LPS in meinen Experimenten allein bereits eine inhibierende Wirkung auf ID1 zeigte, sowohl nach einer als auch nach 24 Stunden. Dies deutet darauf hin, dass die primären Zellen im Gegensatz zur murinen Makrophagen-Zelllinie empfindlicher auf die Stimulation reagieren könnten. LPS-Targets werden bereits nach einer einstündigen Inkubation induziert, was die Hypothese eines vergleichsweisen stärkeren Ansprechens noch weiter untermauert.

Sowohl in meinen Experimenten mit der murinen Makrophagen-Zelllinie als auch mit den primären Zellen war Hepcidin nur ein schwach induzierbares Zielgen von BMP-9. Wie bereits in der Einleitung erwähnt, handelt es sich bei Hepcidin um einen Schlüsselregulator unter anderem des Eisenhaushaltes in Makrophagen.^{35,36} Truska et al. konnten eine BMP-9 induzierte Hochregulation von Hepcidin nachweisen, bei den untersuchten Zellen handelte es sich jedoch um Hepatozyten.¹³ Xinggang et al. konnten in Makrophagen zwar eine BMP-induzierte Hepcidin Expression nachweisen, diese war jedoch vor allem BMP-6 und -4 induziert.⁴¹ Interessanterweise konnte dieser Effekt nur durch die Kostimulation mit LPS induziert werden.⁴¹ Somit zeigte BMP unter basalen Bedingungen keinen Effekt, ähnlich wie in den von mir durchgeführten Experimenten: Aussagekräftige signifikante Ergebnisse konnten erst in den 24-Stunden Experimenten mit den primären Makrophagen produziert werden. Hierbei konnte jedoch die bereits zuvor erhobene Hypothese bestätigt werden, dass BMP-9 Targets durch die Kostimulation mit LPS inhibiert werden. LPS allein zeigte schon einen inhibitorischen Effekt auf die Expression von Hepcidin, welcher sogar stärker als der induzierende Effekt von BMP-9 allein war. Diese Ergebnisse widersprechen der allgemeinen Literatur, die eine durch LPS induzierte Erhöhung der Hepcidinproduktion betont. Der zugrunde liegende Gedanke hierbei ist, dass die Reduktion der Eisenverfügbarkeit für Krankheitserreger eine wesentliche antimikrobielle Abwehrstrategie darstellt.⁴² Zusammenfassend scheint BMP-9 Einfluss auf die Hepcidin-Expression in Makrophagen zu haben, jedoch insgesamt in geringerer Ausprägung. Diese Wirkung wird durch die gleichzeitige LPS-Stimulation

moduliert, was die dynamische Regulierung des Eisenstoffwechsels als Reaktion auf Entzündungssignale widerspiegelt. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass das Zusammenspiel zwischen dem NF- κ B-Signalweg und dem Smad-Signalweg für die Funktionen der Makrophagen wichtig sein könnte.

Eine weitere wichtige Erkenntnis war der Nachweis der gesteigerten LPS-induzierten pro-inflammatorischen Antwort sowie eine Inhibition der anti-inflammatorischen Antwort (am Beispiel von IL-10 gezeigt). Bereits in den im Vorfeld durchgeführten Experimenten *in vivo* in Mäusen konnte eine ähnliche Tendenz nachgewiesen werden. Dies deutet darauf hin, dass BMP-9 unter bestimmten Bedingungen das Entzündungsmilieu verstärken könnte. Selbige Thematik wurde von einem weiteren Doktoranden unserer Forschungsgruppe aufgenommen. Auch hierbei konnte eine gesteigerte LPS-induzierte inflammatorische Antwort durch die Kostimulation mit BMP-9 gezeigt werden.⁴⁴

4.3. Ergebnisse Tabelle

Zur besseren Übersicht anbei die PCR und Western Blot Ergebnisse der Experimente an humanen und murinen Makrophagen in der Zusammenfassung.

PCR-Ergebnisse in der Übersicht:

In Rot: Zielgene, deren Regulation in Gegenwart von BMP-9 entzündungsverstärkend sein dürfte.

In Grün: BMP-9 regulierte Gene, deren Induktion durch LPS antagonisiert wird.

	Murine MP 1h LPS 24h B9	24h LPS 48h B9	Humane MP 1h LPS 24h B9	24h LPS 48h B9
IL-10	ns	ns	ns	LPS $\uparrow$ ** LPS vs both $\downarrow$ *
TNFα	ns	LPS $\uparrow$ ** both $\uparrow$ * LPS vs both $\leftrightarrow$	LPS $\uparrow$ ** both $\uparrow$ ** LPS vs both $\leftrightarrow$	both $\uparrow$ **
ID1	B9 $\uparrow$ ** B9 vs both $\downarrow$ *	B9 $\uparrow$ ** B9 vs both $\downarrow$ ** LPS vs both $\uparrow$ *	B9 $\uparrow$ * LPS $\downarrow$ * B9 vs both $\downarrow$ **	B9 $\uparrow$ ** both $\uparrow$ ** LPS vs both $\leftrightarrow$
IL-6	ns	LPS $\uparrow$ ** both $\uparrow$ ** LPS vs both $\leftrightarrow$	LPS $\uparrow$ ** both $\uparrow$ ** LPS vs both $\uparrow$ *	LPS $\uparrow$ ** both $\uparrow$ ** LPS vs both $\uparrow$ *

Hepcidin	ns	LPS ↑ * both ↑ * LPS vs both ↔	ns	B9 ↑ * LPS ↓ ** B9 vs both ↓ **
IL-1b	ns	LPS ↑ ** both ↑ ** LPS vs both ↔	LPS ↑ ** both ↑ ** LPS vs both ↔	LPS ↑ ** both ↑ ** LPS vs both ↑ **
IL1ra			B9 vs. both ↑ *	LPS ↑ ** both ↑ ** LPS vs both ↔

Western Blot Ergebnisse in der Übersicht:

	Murine MP 1h LPS 24h B9	24h LPS 48h B9	Humane MP 1h LPS 24h B9	24h LPS 48h B9
Phospho-smad1/ b-Actin	B9 ↑ ** both ↑ ** B9 vs both ↔	B9 ↑ * B9 vs both ↓ (p=0.064)	?	?
Phospho-p65/ b-Actin			?	LPS vs both ↑ ***

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass BMP-9 als Modulator der durch LPS ausgelösten Entzündung in Makrophagen wirken kann, wobei es je nach Kontext und Zelltyp meistens die entzündungsfördernden Signale verstärkt. Die Kombination von BMP-9 und LPS führt also zu einer komplexen Modulation, die möglicherweise die Balance zwischen pro- und anti-inflammatorischen Reaktionen beeinflusst und weitere tiefere Untersuchungen verdient. Dies könnte Hinweise auf die Regulierung der Immunantwort geben, die für die Entwicklung therapeutischer Strategien bei beispielsweise der Leberzirrhose relevant sein könnten.

4.4. Murine Makrophagenzelllinie, humane Makrophagen und Kupfferzellen

Um eine genaue Interpretation der Ergebnisse zu ermöglichen, ist es sinnvoll, die Unterschiede der verschiedenen Zelltypen aufzuführen. Bei der Zelllinie J774A.1 handelt es sich um murine Makrophagen, gewonnen aus Aszites von weiblichen Mäusen mit Retikulumzell-Karzinom (Tumorzelllinie).⁴³ Die Hauptvorteile der Verwendung einer Zelllinie liegen in ihrer deutlich einfacheren Handhabung, was zu

einer hohen Reproduzierbarkeit der Experimente und kostengünstigeren Kultivierung führt.⁴⁴ Ein Nachteil ist jedoch sicherlich die eingeschränkte Übertragbarkeit der Ergebnisse auf den menschlichen Körper. Im Gegensatz zu humanen Makrophagen ist die Zelllinie J774A.1 durch eine genetische Homogenität charakterisiert mit damit einhergehendem unterschiedlichen Genexpressionsmuster.⁴³ Pengfei et al. untersuchten die unterschiedlichen Proteinexpressionsprofile in humanen Makrophagen und einer murinen Zelllinie (RAW264.7): Hierbei zeigten sich deutliche Unterschiede in den Expressionsmustern von aktivierten humanen und murinen Makrophagen, welche auch LPS-induzierte Signalwege betraf.⁴⁵ Daraus resultiert auch eine Rezeptorvariabilität (daher unterschiedliche Expression und Funktion von Rezeptoren), was zu unterschiedlichen Signaltransduktionskaskaden und zellulären Antworten führen kann.⁴⁶

Dass eine Übertragung von Mausmodellen auf die klinische Situation beim Menschen nur eingeschränkt möglich ist (sogenannte „Translationslücke“) wurde von McCarron et al. thematisiert: Es wurde unter anderem festgestellt, dass humanen und murinen Makrophagen artspezifische Unterschiede in ihrer Reaktion auf LPS aufweisen. So konnte beispielsweise nachgewiesen werden, dass die murine Zelllinie für die Aktivierung des NF- κ B Signalweges eine höhere LPS-Dosis als menschliche Zellen benötigt und somit weniger sensibel auf die Stimulation reagieren. Dies deckt sich mit meinen Ergebnissen.⁴⁷ Zudem unterscheidet sich die Mikroumgebung der Leber in Mausmodellen deutlich von der bei menschlichen Erkrankungen.⁴

Des Weiteren stellen humane Makrophagen eine sehr heterogene Zellpopulation dar. Wie bereits zuvor erwähnt, wird die klare Einteilung bzw. Unterscheidung in einen pro- und antiinflammatorischen Phänotyp (auch M1- und M2-Typ bezeichnet) mittlerweile als veraltet angesehen.³ Nichtsdestotrotz ist es sinnvoll genauer zu eruieren, welche Art von Makrophagen in meinen Experimenten isoliert worden sind. Nach Isolation der Monozyten erfolgte die Inkubation mit 10% FBS-haltigen RPMI Medium. Dies resultierte am ehesten in einer Makrophagen-Zellpopulation mit unterschiedlichen Polarisierungseigenschaften, daher sowohl pro- als auch antiinflammatorischen Attributen und daher am ehesten zu einem gemischten Immunprofil.⁴⁸ Unserer Meinung nach eignet sich diese Grundvoraussetzung sehr gut für die darauffolgenden Experimente mit LPS und BMP-9, da sie eine physiologisch relevante Zellpopulation

mit einer sowohl pro- als auch antiinflammatorischen Polarisierung ermöglicht und somit die Untersuchung der komplexen Reaktionen auf beide Stimuli in einem realistischen In-vitro-Modell unterstützt.

Im Rahmen dieser Diskussion ebenfalls erneut hervorzuheben ist die besondere Stellung der leberresidenten Makrophagen, der Kupfferzellen. Unser Versuch der Isolation von Kupfferzellen aus menschlicher Leber misslang leider mehrfach. Eine Übertragung der von mir erhobenen Ergebnisse (und daher insbesondere von humanen Makrophagen isoliert aus Blut) auf Kupfferzellen und somit auf das leberspezifische immunologische Milieu ist sicherlich nur eingeschränkt möglich. Guillot et al.⁴ unterscheiden hierbei zwischen einer „Sentinel- bzw. Wächter-Funktion“ (dh. Erhalt der lokalen Homöostase) der Kupfferzellen und einem „Emergency Response Team“ bestehend aus von Monozyten abgeleiteten Makrophagen (dh. Reaktion bei akuten und chronischen Verletzungen). In einer Studie von Movita et al. konnte beispielsweise gezeigt werden, dass Kupfferzellen eine besonders hohe Fähigkeit zur Phagozytose besitzen und verstärkt Moleküle exprimieren, die die TLR-Aktivierung hemmen.^{4,49} Studien suggerieren jedoch auch, dass unter bestimmten Umständen aus Monozyten selbsterneuernde gewebsresidente Makrophagen generiert werden können.^{4,50–53} Zusammenfassend sind Kupfferzellen somit perfekt auf das Mikromilieu der Leber angepasst, was möglicherweise auch in einer unterschiedlichen Reaktion auf Stimuli wie BMP-9 und LPS resultiert. Wie stark diese Reaktion von den von mir erhobenen Ergebnissen in Makrophagen aus dem Blut, bzw. in der murinen Zelllinie divergiert, muss in weiteren Studien untersucht werden.

5. Zusammenfassung

Ziel der Dissertation war es, die Wechselwirkungen zwischen dem Protein BMP-9 und Lipopolysaccharid (LPS) in Makrophagen zu untersuchen, um deren Rolle in entzündlichen Prozessen wie beispielsweise der Pathogenese der Leberzirrhose zu verstehen.

In meinen Experimenten mit murinen und humanen Makrophagen wurde sowohl eine agonistische als auch eine antagonistische Wechselwirkung zwischen BMP-9 und LPS festgestellt. In murinen Makrophagen führte die Kostimulation mit LPS zu einer Inhibition des BMP-9-induzierten Signalweges auf RNA-Ebene. Auf Proteinebene konnte dies zumindest teilweise als fast signifikante Tendenz bestätigt werden. In humanen Makrophagen war die Inhibition von ID1 durch LPS stärker ausgeprägt, was auf eine höhere Empfindlichkeit der primären Zellen auf LPS im Vergleich zur Zelllinie hindeutet. Weitere Untersuchungen zeigten zudem, dass BMP-9 die pro-inflammatorische Antwort in humanen Makrophagen verstärkte und die anti-inflammatorische Antwort hemmte. Dies deutet darauf hin, dass BMP-9 je nach Kontext das Entzündungsumfeld in Makrophagen modulieren kann. Im weiteren Verlauf wurde dies durch weitere Experimente in unserer Forschungsgruppe auch bestätigt.

Zusammenfassend zeigt die Dissertation, dass BMP-9 die durch LPS ausgelöste Entzündung in Makrophagen beeinflussen kann. Je nach Kontext und Zelltyp kann BMP-9 sowohl entzündungsfördernde als auch entzündungshemmende Reaktionen modulieren. Diese komplexen Interaktionen zwischen BMP-9 und LPS könnten wichtige Hinweise auf die Regulierung der Immunantwort liefern und damit potenzielle therapeutische Ziele für die Behandlung von entzündlichen Erkrankungen wie der Leberzirrhose darstellen.

6. Literaturverzeichnis

1. Lüllmann-Rauch R, Asan E: Taschenlehrbuch Histologie. 6., vollständig überarbeitete Auflage. Stuttgart: Thieme;
2. Brandes R, Lang F, Schmidt RF: Physiologie des Menschen: mit Pathophysiologie.
3. Krenkel O, Tacke F: Liver macrophages in tissue homeostasis and disease. *Nature Reviews Immunology* 17: 306–321, 2017
4. Guillot A, Tacke F: Liver Macrophages: Old Dogmas and New Insights. *Hepatology* 3: 730–743, 2019
5. Wakefield LM, Hill CS: Beyond TGF β : roles of other TGF β superfamily members in cancer. *Nat Rev Cancer* 13: 328–341, 2013
6. Miller AF, Harvey SAK, Thies RS, Olson MS: Bone Morphogenetic Protein-9. *Journal of Biological Chemistry* 275: 17937–17945, 2000
7. Bidart M, Ricard N, Levet S, Samson M, Mallet C, David L, et al.: BMP9 is produced by hepatocytes and circulates mainly in an active mature form complexed to its prodomain. 12
8. Katagiri T, Watabe T: Bone Morphogenetic Proteins. *Bone Morphogenetic Proteins* 27
9. Breitkopf-Heinlein K, Meyer C, König C, Gaitantzi H, Addante A, Thomas M, et al.: BMP-9 interferes with liver regeneration and promotes liver fibrosis. *Gut* 66: 939–954, 2017
10. Bi J, Ge S: Potential Roles of BMP9 in Liver Fibrosis. *Int. J. Mol. Sci.* 12, 2014
11. Bach D-H, Park HJ, Lee SK: The Dual Role of Bone Morphogenetic Proteins in Cancer. *Molecular Therapy - Oncolytics* 8: 1–13, 2018
12. Cao J, Wei Y, Lian J, Yang L, Zhang X, Xie J, et al.: Notch signaling pathway promotes osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells by enhancing BMP9/Smad signaling. *International Journal of Molecular Medicine* 40: 378–388, 2017
13. Truksa J, Peng H, Lee P, Beutler E: Bone morphogenetic proteins 2, 4, and 9 stimulate murine hepcidin 1 expression independently of Hfe, transferrin receptor 2 (Tfr2), and IL-6. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103: 10289–10293, 2006
14. Li Q, Gu X, Weng H, Ghafoory S, Liu Y, Feng T, et al.: Bone morphogenetic protein-9 induces epithelial to mesenchymal transition in hepatocellular carcinoma cells. *Cancer Sci* 104: 398–408, 2013
15. Luu HH, Song W-X, Luo X, Manning D, Luo J, Deng Z-L, et al.: Distinct roles of bone morphogenetic proteins in osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *J. Orthop. Res.* 25: 665–677, 2007
16. David L, Mallet C, Mazerbourg S, Feige J-J, Bailly S: Identification of BMP9 and BMP10 as functional activators of the orphan activin receptor-like kinase 1 (ALK1) in endothelial cells. *Blood* 109: 1953–1961, 2007
17. Yoshimatsu Y, Lee YG, Akatsu Y, Taguchi L, Suzuki HI, Cunha SI, et al.: Bone morphogenetic protein-9 inhibits lymphatic vessel formation via activin receptor-like kinase 1 during development and cancer progression. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110: 18940–18945, 2013
18. Zhang C-Y, Yuan W-G, He P, Lei J-H, Wang C-X: Liver fibrosis and hepatic stellate cells: Etiology, pathological hallmarks and therapeutic targets. *WJG* 22: 10512, 2016
19. Gaitantzi H, Karch J, Germann L, Cai C, Rausch V, Birgin E, et al.: BMP-9 Modulates the Hepatic Responses to LPS. *Cells* 9: 617, 2020

20. Desroches-Castan A, Tillet E, Ricard N, Ouarné M, Mallet C, Belmudes L, et al.: Bone Morphogenetic Protein 9 Is a Paracrine Factor Controlling Liver Sinusoidal Endothelial Cell Fenestration and Protecting Against Hepatic Fibrosis. *Hepatology* 70: 1392–1408, 2019
21. Guo D, Huang J, Gong J: Bone morphogenetic protein 4 (BMP4) is required for migration and invasion of breast cancer. *Molecular and Cellular Biochemistry* 363: 179–190, 2012
22. Wang T, Zhang Z, Wang K, Wang J, Jiang Y, Xia J, et al.: Inhibitory effects of BMP9 on breast cancer cells by regulating their interaction with pre-adipocytes/adipocytes. *Oncotarget* 8: 35890–35901, 2017
23. Hou X, Peng Y, Liu J, Zhong Q, Yu Z, Zhang L: Bone morphogenetic protein-9 promotes the proliferation of non-small cell lung cancer cells by activating PI3K/Akt and Smad1/5 pathways. *RSC Adv.* 10: 7214–7220, 2020
24. Cai C, Itzel T, Gaitantzi H, Torre C, Birgin E, Betge J, et al.: Identification of liver-derived bone morphogenetic protein (BMP)-9 as a potential new candidate for treatment of colorectal cancer. *J Cellular Molecular Medi* 26: 343–353, 2022
25. Nahid MA, Satoh M, Chan EK: MicroRNA in TLR signaling and endotoxin tolerance. *Cell Mol Immunol* 8: 388–403, 2011
26. Sweeney RP, Lowary TL: New insights into lipopolysaccharide assembly and export. *Current Opinion in Chemical Biology* 53: 37–43, 2019
27. Wang X, Quinn PJ: Lipopolysaccharide: Biosynthetic pathway and structure modification. *Progress in Lipid Research* 49: 97–107, 2010
28. Kawai T, Akira S: TLR signaling. *Seminars in Immunology* 19: 24–32, 2007
29. Biswas SK, Lopez-Collazo E: Endotoxin tolerance: new mechanisms, molecules and clinical significance. *Trends in Immunology* 30: 475–487, 2009
30. Wiest R, Garcia-Tsao G: Bacterial translocation (BT) in cirrhosis. *Hepatology* 41: 422–433, 2005
31. An L, Wirth U, Koch D, Schirren M, Drefs M, Koliogiannis D, et al.: The Role of Gut-Derived Lipopolysaccharides and the Intestinal Barrier in Fatty Liver Diseases. *Journal of Gastrointestinal Surgery* 26: 671–683, 2022
32. Seki E, De Minicis S, Österreicher CH, Kluwe J, Osawa Y, Brenner DA, et al.: TLR4 enhances TGF- β signaling and hepatic fibrosis. *Nat Med* 13: 1324–1332, 2007
33. DeLeve LD: Liver Sinusoidal Endothelial Cells in Hepatic Fibrosis. 13, 2016
34. Cho H, Park J-H, Ahn E-K, Oh JS: Kobophenol A Isolated from Roots of *Caragana sinica* (Buc'hoz) Rehder Exhibits Anti-inflammatory Activity by Regulating NF- κ B Nuclear Translocation in J774A.1 Cells. *Toxicology Reports* 5: 647–653, 2018
35. Korchynskiy O, ten Dijke P: Identification and Functional Characterization of Distinct Critically Important Bone Morphogenetic Protein-specific Response Elements in the Id1 Promoter. *Journal of Biological Chemistry* 277: 4883–4891, 2002
36. Ganz T: Systemic Iron Homeostasis. *Physiological Reviews* 93: 1721–1741, 2013
37. Finberg KE: Regulation of systemic iron homeostasis: *Current Opinion in Hematology* 20: 208–214, 2013
38. Andriopoulos Jr B, Corradini E, Xia Y, Faasse SA, Chen S, Grgurevic L, et al.: BMP6 is a key endogenous regulator of hepcidin expression and iron metabolism. *Nat Genet* 41: 482–487, 2009
39. Arndt S, Maegdefrau U, Dorn C, Schardt K, Hellerbrand C, Bosserhoff A: Iron-Induced Expression of Bone Morphogenic Protein 6 in Intestinal Cells Is the Main Regulator of Hepatic Hepcidin Expression In Vivo. *Gastroenterology* 138: 372–382, 2010
40. Song JJ, Celeste AJ, Kong FM, Jirtle RL, Rosen V, Thies RS: Bone

- morphogenetic protein-9 binds to liver cells and stimulates proliferation. *Endo* . 1995
41. Xaus J: LPS induces apoptosis in macrophages mostly through the autocrine production of TNF- α . 95: 2000
 42. Wu X, Yung L-M, Cheng W-H, Yu PB, Babitt JL, Lin HY, et al.: Hepcidin Regulation by BMP Signaling in Macrophages Is Lipopolysaccharide Dependent. *PLoS ONE* 7: e44622, 2012
 43. Kowdley KV, Gochanour EM, Sundaram V, Shah RA, Handa P: Hepcidin Signaling in Health and Disease: Ironing Out the Details. *Hepatology Communications* 5: 723–735, 2021
 44. Jiang Q, Li Q, Liu B, Li G, Riedemann G, Gaitantzi H, et al.: BMP9 promotes methionine- and choline-deficient diet-induced nonalcoholic steatohepatitis in non-obese mice by enhancing NF- κ B dependent macrophage polarization. *International Immunopharmacology* 96: 107591, 2021
 45. J774A.1 TIB-67 TM [Internet]. Available from: <https://www.atcc.org/products/tib-67>
 46. Kaur G, Dufour JM: Cell lines: Valuable tools or useless artifacts. *Spermatogenesis* 2: 1–5, 2012
 47. Li P, Hao Z, Wu J, Ma C, Xu Y, Li J, et al.: Comparative Proteomic Analysis of Polarized Human THP-1 and Mouse RAW264.7 Macrophages. *Front. Immunol.* 12: 700009, 2021
 48. Mestas J, Hughes CCW: Of Mice and Not Men: Differences between Mouse and Human Immunology. *The Journal of Immunology* 172: 2731–2738, 2004
 49. McCarron E, Welters I, Williams D, Antoine D, Kipar A, Lemm, et al.: Exploring the translational disconnect between the murine and human inflammatory response: analysis of LPS dose–response relationship in murine versus human cell lines and implications for translation into murine models of sepsis. *JIR* 201, 2015
 50. Rios FJ, Touyz RM, Montezano AC: Isolation and Differentiation of Human Macrophages [Internet]. In: *Hypertension*, edited by Touyz RM, Schiffrin EL, pp 311–320, 2017 Available from: http://link.springer.com/10.1007/978-1-4939-6625-7_24 [cited 2024 Nov 16]
 51. Movita D, Kreefft K, Biesta P, Van Oudenaren A, Leenen PJM, Janssen HLA, et al.: Kupffer cells express a unique combination of phenotypic and functional characteristics compared with splenic and peritoneal macrophages. *Journal of Leukocyte Biology* 92: 723–733, 2012
 52. Scott CL, Zheng F, De Baetselier P, Martens L, Saeys Y, De Prijck S, et al.: Bone marrow-derived monocytes give rise to self-renewing and fully differentiated Kupffer cells. *Nat Commun* 7: 10321, 2016
 53. Blériot C, Dupuis T, Jouvion G, Eberl G, Disson O, Lecuit M: Liver-Resident Macrophage Necroptosis Orchestrates Type 1 Microbicidal Inflammation and Type-2-Mediated Tissue Repair during Bacterial Infection. *Immunity* 42: 145–158, 2015
 54. Beattie L, Sawtell A, Mann J, Frame TCM, Teal B, De Labastida Rivera F, et al.: Bone marrow-derived and resident liver macrophages display unique transcriptomic signatures but similar biological functions. *Journal of Hepatology* 65: 758–768, 2016
 55. David BA, Rezende RM, Antunes MM, Santos MM, Freitas Lopes MA, Diniz AB, et al.: Combination of Mass Cytometry and Imaging Analysis Reveals Origin, Location, and Functional Repopulation of Liver Myeloid Cells in Mice. *Gastroenterology* 151: 1176–1191, 2016

8. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1 Leitungsbahnen der Leber	8
Abb. 2 Histologische Gliederung der Leber	9
Abb. 3 Der Ursprung der hepatischen Makrophagen-Untergruppen in Mäusen	12
Abb. 4 Bildung von BMP-9	14
Abb. 5 BMP-9 induzierter Singalweg	14
Abb. 6 Allgemeine Struktur von Lipopolysaccharid (LPS).....	16
Abb. 7 LPS-TLR4-induzierter Singalweg	17
Abb. 8 Expression ALK1 und TLR4 in unterschiedlichen Leberzelltypen	18
Abb. 9 BMP-9 und LPS in humanen LSEC	20
Abb. 10 BMP-9 und LPS in vivo in Mäusen	21
Abb. 11 Behandlung mit BMP-9 und LPS auf der Zellkulturplatte	27
Abb. 12 Primäre humane Monozyten isoliert aus dem Blut gesunder Spender.....	28
Abb. 13 Murine Makrophagenzelllinie J774A.1	38
Abb. 14 BMP-9 und 1h LPS in murinen Makrophagen (J774A.1) PCR	40
Abb. 15 BMP-9 und 24h LPS in murinen Makrophagen (J774A.1) PCR	41
Abb. 16 BMP-9 und 1h LPS in murinen Makrophagen (J774A.1) Western Blot	43
Abb. 17 BMP-9 und 1h LPS in murinen Makrophagen (J774A.1) Densitometrische Auswertung.....	44
Abb. 18 BMP-9 und 24h LPS in murinen Makrophagen (J774A.1) Western Blot	45
Abb. 19 BMP-9 und 1h LPS in murinen Makrophagen (J774A.1) Densitometrische Auswertung.....	46
Abb. 20 BMP-9 und 1h LPS in primären humanen Makrophagen isoliert aus Spenderblut, PCR.....	47
Abb. 21 BMP-9 und 24h LPS in primären humanen Makrophagen isoliert aus Spenderblut, PCR.....	49
Abb. 22 BMP-9 und 1h sowie 24h LPS primären humanen Makrophagen isoliert aus Spenderblut, Western Blot.....	50

9. Tabellenverzeichnis

Tab. 1 Verbrauchsmaterial	22
Tab. 2 Geräte	22
Tab. 3 Reagenzien	23
Tab. 4 Antikörper.....	24
Tab. 5 Primer	32
Tab. 6 Antikörper.....	37
Tab. 7 Sekundärantikörper.....	37
Tab. 8 Ergebnisse Tabelle PCR.....	55
Tab. 9 Ergebnisse Tabelle Western Blot.....	56

10. Lebenslauf



Lena Anna Germann

18.12.1994
Maria Theresa Alle 71d
52064 Aachen

T +49 176 812 419 14 E lenagermann@gmx.at

Berufserfahrung

01.10.2022 bis dato

Assistenzarztstelle, Dermatologie und Allergologie

Universitätsklinikum Aachen, Deutschland

Bisherige Rotationen: Station, Tagesklinik, Poliklinik, Onkologie,
Dermatochirurgie (aktuell)

Nächste Rotation: Allergologie

01.10.2021 – 30.08.2022

Assistenzarztstelle, Dermatologie und Allergologie

Universitätsklinikum Erlangen, Deutschland

07.12.2020 – 28.02.2021

PJ Quartal Abteilung für Dermatologie (Wahlfach)

Universitätsklinikum Mannheim, Deutschland

21.09.2020 – 06.12.2020

PJ Quartal Abteilung für Innere Medizin

Universitätsklinikum Basel, Schweiz

06.07.2020 – 20.09.2020

PJ Quartal Abteilung für Chirurgie

Stadtspital Waid Zürich, Schweiz

20.04.2020 – 05.07.2020

PJ Quartal Dermatologische Ambulanz

Universitätsklinikum Mannheim, Deutschland

25.02.2019 – 10.03.2019

Famulatur Abteilung für Gynäkologie

Landeskrankenhaus Feldkirch, Österreich

08.08.2018 – 26.09.2018

Famulatur Abteilung für Gynäkologie

Nsawam Government Hospital, Ghana

28.08.2017 – 26.09.2017

Famulatur Dr. Colin Blume

Hausarzt Düsseldorf, Deutschland

13.03.2017 – 11.04.2017

Famulatur Abteilung für Anästhesie und Intensivbehandlung

Landeskrankenhaus Feldkirch, Österreich

31.08.2015 – 29.09.2015

Krankenpflegepraktikum

Klinikum Friedrichshafen, Deutschland

02.03.2015 – 31.03.2015

Krankenpflegepraktikum

Krankenhaus Dornbirn, Österreich

19.08.2013 – 06.09.2013

Freiwilliges Praktikum radiologische Praxis Dr. Hollenstein

Bludenz, Österreich

Ausbildung

10/2014 – 05/2021

Medizinische Fakultät Mannheim der Universität Heidelberg

Gesamtnote: Gut

07/2010 – 12/2012

Sunshine Beach State High School (Noosaville, Australien)

Exchange year

09/2005 – 06/2013

Bundesrealgymnasium Rebberggasse (Feldkirch, Österreich)

Matura mit ausgezeichnetem Erfolg

Sprachen

Deutsch (Muttersprache), Englisch (C1, Cambridge Certificate),
Französisch (B2), Italienisch (B1), Spanisch (Principante Alto)

Kompetenzen

Soziale Kompetenzen

2014: Aushilfe in einer Grundschule in Costa Rica (Montezuma)
mit Unterricht der Schüler

2015: Teilnahme am Teddybärenkrankenhaus Mannheim
2018: Mitglied des Planungskomitees der MediMeisterschaften
Mannheim

Künstl. Kompetenzen
Sonstige

2002 - 2010: Musikschule Tisis (Gitarre, Hackbrett)
1 Jahr Informations- und Kommunikationstechnik sowie
Daktylographie (Freifach Realgymnasium)

11. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die mich während meiner Doktorarbeit unterstützt haben.

Mein besonderer Dank gilt meiner Doktormutter Katja Breitskopf-Heinlein, für ihre fachliche Betreuung, ihre konstruktiven Rückmeldungen und ihre Unterstützung während des gesamten Prozesses. Ihre Expertise und ihr Engagement haben maßgeblich zum Erfolg dieser Arbeit beigetragen.

Ebenso danke ich meiner Betreuerin Haristi Gaitantzi, für ihre wertvollen Anregungen und ihre kritische Begleitung. Ihre Unterweisungen bei der praktischen Durchführung meiner Experimente haben die Qualität dieser Arbeit entscheidend beeinflusst.

Ein herzlicher Dank geht an meine Eltern, Reinhard und Irmgard Germann, für ihre unaufhörliche Unterstützung und ihre Bestärkung. Mein besonderer Dank gilt auch meinem Verlobten, Stephan Drexler, für seine stetig motivierenden Impulse, ohne die ich diese Doktorarbeit sicherlich nicht fertiggestellt hätte.

Ich danke zudem allen anderen, die durch hilfreiche Gespräche, praktische Unterstützung oder Feedback zu dieser Arbeit beigetragen haben.