

MASTERARBEIT / MASTER'S THESIS

Titel der Masterarbeit / Title of the Master's Thesis

„Einfluss von Iso- α -Säure auf die LTA-induzierte
Immun- und Entzündungsreaktion: Untersuchungen in
humanen Monozyten und im Zellkulturmodell“

verfasst von / submitted by

Klara Schoberleitner, BSc

angestrebter akademischer Grad / in partial fulfilment of the requirements for the degree
of

Master of Science (MSc)

Wien, 2023 / Vienna 2023

Studienkennzahl lt. Studienblatt /
degree programme code as it appears on
the student record sheet:

UA 066 838

Studienrichtung lt. Studienblatt /
degree programme as it appears on
the student record sheet:

Masterstudium Ernährungswissenschaften

Betreut von / Supervisor:

Univ.-Prof. Dr. Ina Bergheim

Inhalt

Abkürzungsverzeichnis	VI
Abbildungsverzeichnis	VIII
Tabellenverzeichnis	X
1 Einleitung	1
1.1 Iso- α -Säure: Vorkommen, Bioverfügbarkeit und physiologische Effekte	1
1.1.1 Vorkommen von Iso- α -Säure im Hopfen und Bioverfügbarkeit.....	1
1.1.2 Physiologische Effekte der Iso- α -Säure	3
1.2 Das angeborene Immunsystem des Menschen und bakterielle Infektionskrankheiten	4
1.2.1 Prävalenz von bakteriellen Infektionskrankheiten und Aufbau grampositiver Bakterien	4
1.2.2 Das angeborene Immunsystem und die Toll-like Rezeptoren.....	5
1.3 Hopfeninhaltsstoffe und das Immunsystem des Menschen	8
1.4 Zielsetzung und Fragestellungen der Arbeit	9
2 Materialien	10
2.1 Humanstudie	10
2.1.1 Studiengetränk	10
2.1.2 Blutabnahme	10
2.1.3 Isolation und Stimulation humaner Monozyten	11
2.2 Zellkulturmodell J774A.1	12
2.3 Nitrit Messung/Griess Assay	13
2.4 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)	14
2.5 Allgemeine Chemikalien, Geräte und Verbrauchsmaterial	16
2.6 Statistische Auswertung, sonstige Software	17
3 Methoden.....	18

3.1	Humanstudie	18
3.1.1	Studiendesign	18
3.1.2	Isolation humaner Monozyten.....	20
3.1.3	Stimulation humaner Monozyten.....	21
3.2	Zellkulturmodell J774A.1.....	22
3.2.1	J774A.1 Zellstimulation	24
3.3	Nitrit Messung/Griess Assay	26
3.4	Enzyme-linked Immunsorbent Assay (ELISA).....	27
3.5	Statistische Auswertung	28
4	Ergebnisse	30
4.1	Einfluss der einmaligen oralen Aufnahme eines IAA-reichen Extrakts in verschiedenen Dosen auf die LTA-vermittelte Stimulation von humanen Monozyten <i>ex vivo</i> zu verschiedenen Zeitpunkten nach der oralen Aufnahme: Konzentration von TNF- α und IL-6	30
4.2	Effekte unterschiedlicher Konzentrationen eines IAA-reichen Extrakts auf die LTA-induzierte Freisetzung von TNF- α und IL-6 sowie NOx im Zellkulturüberstand von J774A.1.....	32
4.3	Effekte unterschiedlicher Konzentrationen des p38 Aktivators Anisomycin und eines IAA-reichen Extrakts auf die LTA-induzierte Zytokin- und NOx-Synthese im Zellkulturüberstand von J774A.1	35
5	Diskussion.....	40
5.1	Einfluss der einmaligen oralen Aufnahme eines IAA-reichen Extrakts auf die LTA-vermittelte Stimulation von humanen Monozyten <i>ex vivo</i>	41
5.2	Antiinflammatorischer Effekt eines IAA-reichen Extrakts auf die LTA-induzierte Freisetzung von inflammatorischen Mediatoren in J774A.1.....	42
5.3	Effekte des p38 Aktivators Anisomycin und eines IAA-reichen Extrakts auf die LTA-induzierte Zytokin- und NOx-Synthese in J774A.1	44
6	Zusammenfassung.....	46
	Literaturverzeichnis.....	50
	Anhang	56

Eidesstaatliche Erklärung	60
---------------------------------	----

Abkürzungsverzeichnis

AA	α -Säure
AP-1	Activator protein-1
BSA	Bovines Serumalbumin
COPD	Chronic obstructive pulmonary disease
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DPBS	Dulbecco's phosphate buffered saline
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
FBS	Fetal bovine serum
Gamma-GT	Gamma-Glutamyl-Transferase
HCl	Salzsäure
IAA	Iso- α -Säure
iCOX-2	induzierbare Cyclooxygenase 2
IL-6	Interleukin-6
IRAK	Interleukin-1 Rezeptor assoziierte Kinase
I κ B	Inhibitor von NF κ B
JNK	c-Jun-N-terminalen Kinasen
KCl	Kaliumchlorid
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
LPS	Lipopolysaccharide
LTA	Lipoteichonsäure
MAPK	Mitogen-aktivierte Protein Kinase
MKK6	Mitogen-aktivierte Protein Kinase Kinase 6
MyD88	Myeloid differentiation primary-response gene 88
Na ₂ HPO ₄	di-Natriumhydrogenphosphat
NaOH	Natronlauge
NED	N-1-naphthylethylenediamine dihydrochloride
NF κ B	Nuclear factor κ B
p38	p38-mitogenaktivierte Proteinkinase
PAMP	Pathogen-associated molecular pattern
PBMCs	Peripheral Blood Mononuclear Cells
PBS	Phosphate buffered saline

PRR	Pattern recognition receptors
RD	Reagent diluent
RT	Raumtemperatur
SEM	Standardfehler (des Mittelwerts)
SGOT	Serum-Glutamat-Oxalacetat-Transaminase
SGPT	Serum-Glutamat-Pyruvat-Transaminase
Streptavidin-HRP	Streptavidin conjugated to horseradish-peroxidase
TAB2	TAK1-binding protein 2
TAK1	Transforming growth factor beta-activated kinase 1
THIAA	Tetrahydroiso- α -Säure
TLR	Toll-like Rezeptoren
TLR2	Toll-like Rezeptor 2
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
TRAF6	TNF receptor associated factor 6
US	unstimuliert

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Chemische Struktur der α -Säure und der transformierten Iso- α -Säure.	2
Abbildung 2: Intrazellulärer Signalweg des TLR2 nach Bindung eines Liganden (LTA).....	7
Abbildung 3: Grafische Darstellung des Studienablaufs und des Ablaufs eines Studientages.	19
Abbildung 4: Isolation und Stimulation von Monozyten aus humanem Vollblut.	22
Abbildung 5: Zellstimulation im J774A.1 Zellkulturmodell.	25
Abbildung 6: Plattenbelegung im J774A.1 Zellkulturmodell bei einer Zellstimulation.	26
Abbildung 7: Einfluss der oralen Aufnahme eines IAA-reichen Extrakts in unterschiedlichen Dosen und zu verschiedenen Zeitpunkten auf die TNF- α -Freisetzung im Zellüberstand isolierter humaner Monozyten nach LTA-Stimulation <i>ex vivo</i> bei Probandin A (7A) und Probandin B (7B).	31
Abbildung 8: Einfluss der oralen Aufnahme eines IAA-reichen Extrakts in unterschiedlichen Dosen und zu verschiedenen Zeitpunkten auf die IL-6-Freisetzung im Zellüberstand isolierter humaner Monozyten nach LTA-Stimulation <i>ex vivo</i> bei Probandin A (8A) und Probandin B (8B).	32
Abbildung 9: Einfluss eines IAA-reichen Extrakts auf die TNF- α -Konzentration im Zellkulturüberstand von J774A.1, die 6h bzw. 24h mit LTA stimuliert wurden.	33
Abbildung 10: Einfluss eines IAA-reichen Extrakts auf die IL-6-Konzentration im Zellkulturüberstand von J774A.1, die 6h bzw. 24h mit LTA stimuliert wurden.	34
Abbildung 11: Einfluss eines IAA-reichen Extrakts auf die Nitrit-Konzentration im Zellkulturüberstand von J774A.1, die 24h mit LTA stimuliert wurden.....	34
Abbildung 12: Einfluss eines IAA-reichen Extrakts auf die Nitrit-Konzentration im Zellkulturüberstand von J774A.1, die 48h mit LTA stimuliert wurden.....	35
Abbildung 13: Einfluss eines IAA-reichen Extrakts (1,562 μ g/ml (A) bzw. 6,25 μ g/ml (B)) auf die TNF- α -Konzentration im Zellkulturüberstand von J774A.1, die mit Anisomycin (1 ng/ml bzw. 5ng/ml) vorbehandelt und 6h mit LTA stimuliert wurden.	36
Abbildung 14: Einfluss eines IAA-reichen Extrakts (1,562 μ g/ml (A) bzw. 6,25 μ g/ml (B)) auf die TNF- α -Konzentration im Zellkulturüberstand J774A.1, die mit Anisomycin (1ng/ml) vorbehandelt und 24h mit LTA stimuliert wurden.....	37
Abbildung 15: Einfluss eines IAA-reichen Extrakts (1,562 μ g/ml (A) bzw. 6,25 μ g/ml (B)) auf die IL-6-Konzentration im Zellkulturüberstand J774A.1, die mit Anisomycin (1ng/ml bzw. 5ng/ml) vorbehandelt und 6h mit LTA stimuliert wurden.	38

Abbildung 16: Einfluss eines IAA-reichen Extrakts (1,562µg/ml) auf die IL-6-Konzentration im Zellkulturüberstand von J774A.1, die mit Anisomycin (1ng/ml) vorbehandelt und 24h mit LTA stimuliert wurden.	38
Abbildung 17: Einfluss eines IAA-reichen Extrakts (1,562µg/ml (A) bzw. 6,25µg/ml (B)) auf die Nitrit-Konzentration im Zellkulturüberstand von J774A.1, die mit Anisomycin (1ng/ml) vorbehandelt und 24h mit LTA stimuliert wurden.	39

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Charakteristika und klinische Parameter der Studienteilnehmer:innen	20
Tabelle 2: Zusammensetzung des Zellkulturmediums RPMI-1640 zur Kultivierung der isolierten humanen Monozyten	20
Tabelle 3: Zusammensetzung des Zellkulturmediums im J774A.1 Zellkulturmodell	23
Tabelle 4: Herstellung der Nitrit Standardverdünnungsreihe.....	27
Tabelle 5: Verdünnungen der humanen Monozyten Zellüberstände nach 6-stündiger LTA-Stimulation für den ELISA	28
Tabelle 6: Verdünnungen der J774A.1 Zellüberstände nach 6- bzw. 24-stündiger LTA-Stimulation für den ELISA	28
Tabelle 7: ELISA human: Verdünnungen und Konzentrationen des Capture Antibody	58
Tabelle 8: ELISA mouse: Verdünnungen und Konzentrationen des Capture Antibody	58
Tabelle 9: ELISA human: Verdünnungen und Konzentrationen des Standards	58
Tabelle 10: ELISA mouse: Verdünnungen und Konzentrationen des Standards.....	59

1 Einleitung

Sekundäre Pflanzenstoffe, einschließlich Inhaltsstoffe des Hopfens, sind hinsichtlich der Prävention von Krankheiten zunehmend in den Fokus der Forschung gerückt und stellen eine potenzielle Ergänzung in der Behandlung chronischer und entzündlicher Krankheiten dar [1,2].

1.1 Iso- α -Säure: Vorkommen, Bioverfügbarkeit und physiologische Effekte

1.1.1 Vorkommen von Iso- α -Säure im Hopfen und Bioverfügbarkeit

Hopfen (*Humulus lupulus L.*) ist eine mehrjährige Schlingpflanze [3] aus der Familie der Hanfgewächse (*Cannabaceae*), die weltweit kultiviert wird [4], vor allem aber in Europa, Deutschland und den USA. Die weiblichen Hopfenpflanzen produzieren Blütenstände, die sogenannten Dolden, in denen Lupulin gebildet wird [3]. Lupulin enthält Bittersäuren, Flavonoide und ätherische Öle, die teilweise geschmacksgebend sind und konservierend wirken [5,6]. Für einige Inhaltsstoffe des Hopfens, wie die Bittersäuren und das Flavonoid Xanthohumol, wurden physiologische Wirkungen in Zellen, Nagern und beim Menschen nachgewiesen [3].

Basierend auf der chemischen Struktur wird bei den Bittersäuren zwischen α -Säuren (AA) und β -Säuren differenziert, wobei beide Bittersäuren Derivate des Phloroglucinols sind. Den Hauptanteil der Bittersäuren im Hopfen stellen die AA, auch Humulone genannt, dar. Diese liegen in einem Gemisch aus den Kongeneren Cohumulon, Adhumulon und *n*-Humulon vor [3]. Die AA werden während des Brauvorgangs von Bier in sehr hydrophile Iso- α -Säuren (IAA) umgewandelt, wobei jeweils cis- und trans-Isomere entstehen (Abbildung 1) [7]. Hopfenbittersäuren machen etwa ein Viertel des Trockengewichts einer Hopfendolde aus [8].

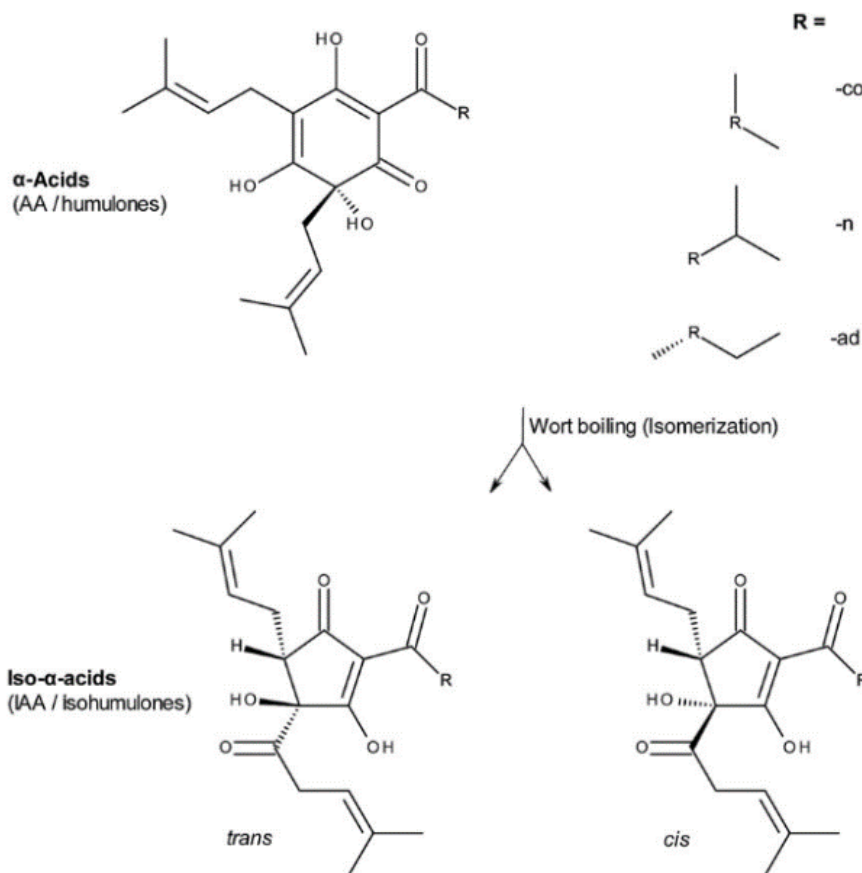


Abbildung 1: Chemische Struktur der α -Säure und der transformierten Iso- α -Säure. Kongenere unterscheiden sich in der Seitenkette R. Es entstehen jeweils die Diastereomere (cis / trans). Luke N. Rodda and others, Pharmacokinetics of Iso- α -Acids in Volunteers Following the Consumption of Beer, Journal of Analytical Toxicology, Volume 38, Issue 6, July/August 2014, Pages 354–359, <https://doi.org/10.1093/jat/bku038> [9] by Permission of Oxford University Press.

Die Aufnahme, Metabolisierung und Ausscheidung von IAA ist bislang nicht vollständig geklärt [7,9]. In Caco-2 Zellen, die häufig als Modell für die intestinale Barriere [10] verwendet werden, wurde eine lineare, zeitabhängige IAA-Aufnahme ohne einem Sättigungseffekt nachgewiesen, was darauf hinweist, dass IAA durch passive Diffusion transzellulär aufgenommen wird. Im Tierversuch mit New Zealand Kaninchen, denen oral oder intravenös 25mg/kg IAA verabreicht wurde, wurde eine Bioverfügbarkeit von unter 15% ermittelt. Minimale Mengen an intakter IAA konnten im Urin und Fäzes der Tiere nachgewiesen werden, was auf starke Verstoffwechselung bzw. erheblichen Abbau als Ausscheidungsweg von IAA hinweist und so die Bioverfügbarkeit maßgeblich beeinflusst [11]. Untersuchungen zum Metabolismus von IAA, in denen IAA mit humanen Lebermikrosomen sowie Mikrosomen, isoliert aus dem Lebergewebe von Kaninchen, 2h inkubiert wurde, zeigten eine erhebliche Verstoffwechselung der IAA (ca. 50% der applizierten 20 μ M IAA) [7]. Die Analyse der Metabolite deutete weiters darauf hin, dass

die Oxidation in der Leber durch CYP450-Enzyme einen Schritt in der Metabolisierung von IAA darstellen könnte, was Hinweise auf einen First-Pass-Effekt gibt [7]. Insgesamt weisen die Studienergebnisse der Autoren auf einen starken Einfluss der Phase-I/II-Enzyme in der Leber und dem Gastrointestinaltrakt auf die Bioverfügbarkeit der IAA hin [7,11].

Eine Studie mit 5 männlichen Teilnehmern konnte nachweisen, dass die IAA-Konzentration im Blut zweier Diastereomere nach Konsum von Bier einen Peak nach 30 Minuten erreicht, was im Einklang mit anderen Untersuchungen die rasche Absorption der IAA demonstriert [9]. Hall et al. konnten zeigen, dass nach oraler Aufnahme von 1000mg rho-Iso- α -Säure die Plasmakonzentration zweier n-Diastereomere 4h nach der Aufnahme 1,3 μ g/ml bzw. 3,3 μ g/ml betrug [12]. Nach Aufnahme von 940mg META060 (definierte Mischung aus Tetrahydroiso- α -Säure (THIAA) Verbindungen, die am 1,3-Cyclopentadion unterschiedlich substituiert sind) war dieses im Plasma von Probanden mindestens 6h nachweisbar; die gemessenen Konzentrationen im Plasma korrelierten mit den Konzentrationen, die im RAW 264.7 Zellmodell für den Nachweis einer antiinflammatorischen Aktivität des Extrakts verwendet wurden [13].

1.1.2 Physiologische Effekte der Iso- α -Säure

In Studien wurde bislang ein Effekt von IAA auf das Körpergewicht und die Glukosespiegel im Blut [14,15] sowie den Blutdruck nachgewiesen [15]. Unveröffentlichte Daten der Arbeitsgruppe Bergheim weisen auf eine antiinflammatorische Wirkung von 15mg IAA, die in Form eines IAA-reichen Extrakts aufgenommen wurden, in gesunden Personen hin. Die Bakterien-vermittelte Freisetzung entzündlicher Zytokine *ex vivo* war dabei in Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs), die nach der Aufnahme des IAA-reichen Extrakts aus dem Vollblut der Personen isoliert wurden, reduziert, verglichen mit der Freisetzung nach Aufnahme des Placebos. Studien deuten weiters darauf hin, dass Hopfenbittersäuren antimikrobiell durch die Zerstörung des Membranpotentials der Zellwand grampositiver Bakterien wirken [8,16].

IAA zeigte außerdem in mehreren *in vitro* und Tierstudien ein antiinflammatorisches Potential [2,12,13,17,18]. Versuche in der murinen Zelllinie L929sA zeigten, dass 50 μ M IAA die Expression des proinflammatorischen Zytokins Interleukin-6 (IL-6) dosisabhängig nach einer Tumornekrosefaktor- α (TNF- α)-Stimulation abschwächt [2]. Die Inkubation von J774A.1 Zellen mit 25 μ g/ml IAA in Form eines IAA-reichen Extrakts sowie die

Behandlung von RAW 264.7 Zellen mit 10-20µg/ml reduzierter IAA bzw. 1-20µg/ml META060 (definierte Mischung aus THIAA Verbindungen), senkte die Lipopolysaccharid (LPS)-vermittelte Stickstoffmonoxid (NO) Freisetzung in mehreren Studien [13,17,18]. Weiters konnte in Zellexperimenten eine verminderte Aktivierung der Transkriptionsfaktoren Nuklear factor kappa B (NFκB) [13,18] und activator protein-1 (AP-1) [2] durch die Inkubation von IAA (5-20µg/ml META060 bzw. 20µg/ml rho-IAA bzw. 10-200µM IAA bzw.) ermittelt werden, die eine Schlüsselrolle in der Antwort auf entzündliche Signale wie bakterielle Zellwandbestandteile oder proinflammatorische Zytokine haben [2]. In Mäusen reduzierte eine vorherige intraperitoneale Applikation von 250µg bzw. 1mg IAA die Schwellung nach subkutaner Zymosan Injektion [2].

1.2 Das angeborene Immunsystem des Menschen und bakterielle Infektionskrankheiten

1.2.1 Prävalenz von bakteriellen Infektionskrankheiten und Aufbau grampositiver Bakterien

Bakterien spielen in der humanen Gesundheit eine ambivalente Rolle. Einerseits ist die Besiedlung des menschlichen Darms durch kommensale Bakterien wichtig, um intestinales Gleichgewicht zu erhalten [19]. Andererseits können pathogene Bakterien den menschlichen Organismus infizieren und zu ernsthaften Erkrankungen führen [20].

Prävalenz bakterieller Infektionskrankheiten

Bakterielle Infektionen sind ein globales Gesundheitsproblem; 2019 stellten Infektionen mit 33 bakteriellen Krankheitserregern die zweithäufigste Todesursache weltweit dar. Die altersstandardisierte Sterblichkeitsrate ist in einkommensschwachen Regionen wie Ländern südlich der Sahara am höchsten (230 Todesfälle / 100 000 Einwohner), in Ländern mit hohem Einkommen, beispielsweise Österreich (35 - <50 Todesfälle / 100 000 Einwohner), am niedrigsten. Ein Großteil der Infektionen sind dabei auf *Staphylococcus aureus*, ein grampositives Bakterium, zurückzuführen [21]. Die Behandlung bakterieller Infektionen erfolgt nach wie vor hauptsächlich mit Antibiotika [20]. Etwa 49 Millionen Menschen weltweit erlitten 2017 den schwerwiegenden Verlauf einer Infektion, eine Sepsis, die in vielen Fällen zum Tod führt [22]. Eine Sepsis entsteht durch die fehlregulierte Immunreaktion im Falle einer bakteriellen Infektion [23]. Eine überschießende Immunantwort des Organismus äußert sich unter anderem in einer exorbitanten Produktion

proinflammatorischer Faktoren, die weitere entzündliche Mechanismen auslösen und die Immunreaktion so selbst verstärken. Der entzündliche Zustand schädigt Gewebe und kann zu Organversagen und zum Tod führen [24].

Aufbau grampositiver Bakterien

Die Gramfärbung lässt eine Unterscheidung in grampositive und gramnegative Bakterien zu. [25]. Zu den grampositiven Bakterien zählen beispielsweise Staphylokokken und Enterokokken [26].

Die Basis der Bakterienzellwand bildet das Peptidoglykan, auch Murein genannt, über der zytoplasmatischen Membran, welches aus Einheiten des Disaccharids N-Acetylglukosamin verbunden mit N-Acetylmuraminsäure besteht. Die daran anknüpfenden Aminosäureketten bilden ein netzartiges Geflecht zwischen den Einheiten des Peptidoglykans. Grampositive Bakterien bilden eine dicke Schicht des Peptidoglykans. Darin eingelagert sind wesentliche Bestandteile der Zellwand, die Teichonsäuren, bestehend aus Polymeren aus Glycerolphosphat oder Ribitolphosphat. Es wird zwischen Lipoteichonsäure (LTA) und Wandteichonsäure differenziert: LTA ist mittels Glykolipid-Anker an die innere Membran fixiert, Wandteichonsäuren hingegen sind kovalent an das Peptidoglykan gebunden. [25]. LTA gilt als ein signifikanter Ligand für Rezeptoren des angeborenen Immunsystems und somit als wesentlicher Aktivator einer Entzündungsreaktion im Organismus [27].

Im Gegensatz dazu produzieren gramnegative Bakterien keine LTA [26], haben eine sehr dünne Peptidoglykanschicht und lagern auf einer äußeren Membran LPS auf [25].

1.2.2 Das angeborene Immunsystem und die Toll-like Rezeptoren

Das angeborene Immunsystem stellt die erste Verteidigungsstrategie des menschlichen Organismus gegen Pathogene dar. Zellen des angeborenen Immunsystems wie Monozyten, Makrophagen, Granulozyten, dendritische Zellen und natürliche Killerzellen, reagieren schnell und unspezifisch auf körperfremde Strukturmuster, die sogenannten Pathogen-associated molecular patterns (PAMP) [28], beispielsweise Zellwandkomponenten. Die PAMP werden durch Mustererkennungsrezeptoren (Pattern recognition receptors, PRR) detektiert, welche auf den Zellen des angeborenen Immunsystems exprimiert werden [26]. Eine Untergruppe der PRR stellen die Toll-like Rezeptoren (TLR) als Sensoren für pathogene Signale an der Plasma- und endosomalen Membran von Zellen des angeborenen Immunsystems dar. Die Erkennung von PAMP durch TLR induziert eine intrazelluläre Signalkaskade in Immunzellen, die in der Synthese proinflammatorischer Zytokine und

Chemokine resultiert und eine entzündliche Immunantwort hervorruft, die eingedrungene Erreger abtöten soll [29]. Makrophagen werden durch Pathogene wie bakterielle Zellwandbestandteile aktiviert und tragen neben der Ausschüttung von proinflammatorischen Zytokinen durch die Produktion von NO zu einer inflammatorischen Immunantwort bei [30]. Die TLR-Signalweiterleitung ist somit ein wichtiger Teil des angeborenen Immunsystems [26].

Toll-like Rezeptor 2

Bisher werden 10 TLR im Menschen unterschieden [26]. In der vorliegenden Arbeit wird in Versuchen zur Zellstimulation LTA verwendet; zahlreiche wissenschaftliche Untersuchungen weisen auf LTA, ein Zellwandbestandteil grampositiver Bakterien, als Ligand des Toll-like Rezeptor 2 (TLR2) hin [26,27,31]. Weitere prominente Liganden des TLR2 sind bakterielle Peptidoglykane und Lipoproteine, die in der Membran aller Bakterien zu finden sind [26].

TLR2 wird auf Immun-, Epithel- und Endothelzellen exprimiert. Die spezifische Ligandenbindung und die Signalweiterleitung erfolgt durch die Bildung eines Heterodimers von TLR2 mit TLR1 oder TLR6. Das Zusammenwirken von TLR2, der bei der LTA-Aktivierung als Heterodimer mit TLR6 vorkommt, mit Korezeptoren garantiert die Erkennung einer Vielzahl an PAMP [26].

Korezeptoren

Cluster of Differentiation 14 (CD14) fungiert als Korezeptor in der Zellantwort auf LTA. Membrangebunden übermittelt er die LTA-Bindung an TLR2 und steigert dessen Aktivierung, indem er die Ligandenbindung fördert und die Heterodimerisierung des TLR2/TLR6 erleichtert [31,32]. Als weitere Korezeptoren werden LPS-bindendes Protein (LBP) [33] und Cluster of Differentiation 36 (CD36) diskutiert [31].

LTA-induzierte Signalkaskade

Durch die Bindung von LTA an TLR2 wird eine MyD88-abhängige intrazelluläre Signalkaskade induziert, die eine Aktivierung mehrerer Transkriptionsfaktoren, unter anderem NF κ B und AP-1, auslöst und damit die Genexpression proinflammatorischer Mediatoren bewirkt (Abbildung 2) [26,34,35].

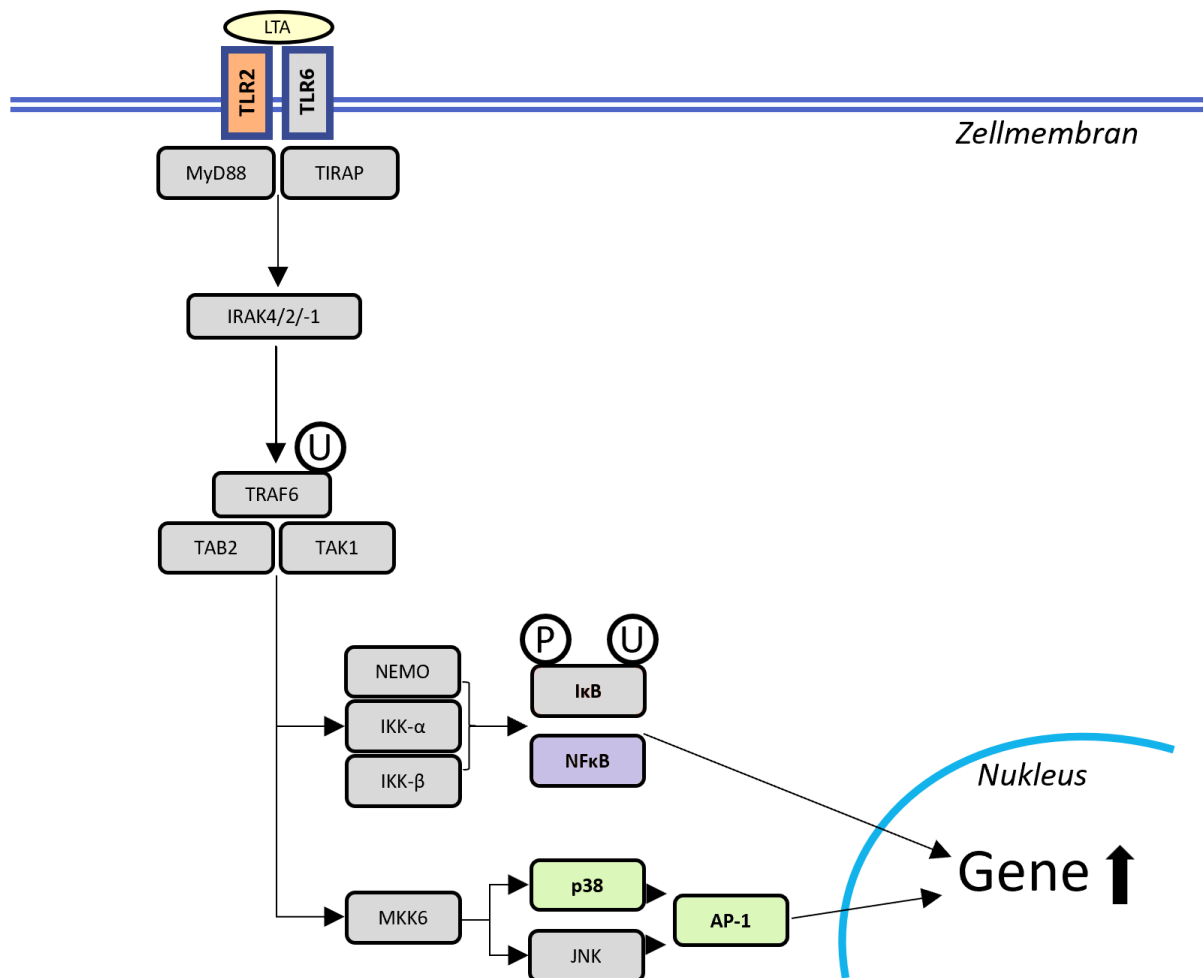


Abbildung 2: Intrazellulärer Signalweg des TLR2 nach Bindung eines Liganden (LTA). Farbliche Hervorhebung der für die vorliegende Arbeit relevanten Faktoren im TLR2 Signalweg. In Anlehnung an: Abbildung (Figure 1) aus Oliveira-Nascimento L, Massari P and Wetzler LM (2012) The role of TLR2 in infection and immunity. Front. Immun. 3:79. doi: 10.3389/fimmu.2012.00079 [26] <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2012.00079/full>. Copyright: © 2012 Oliveira-Nascimento, Massari and Wetzler. Diese Abbildung ist lizenziert unter Creative Commons Attribution Non Commercial License (CC BY-NC 3.0). <https://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>.

Nach Ligandenbindung interagiert das TIR-Adapterprotein (TIRAP) mit der zytoplasmatischen TIR-Dömane des TLR2, wodurch MyD88, ein weiteres Adapterprotein, bindet. Die MyD88-abhängige Anschaltung diverser Interleukin-1 Rezeptor assoziierten Kinasen (IRAK) löst die Aktivierung der Adapterproteine TNF receptor associated factor 6 (TRAF6) und TAK1-binding protein 2 (TAB2) sowie folglich transforming growth factor beta-activated kinase 1 (TAK1) aus. Dies bewirkt über den IKK Komplex (IκB-Kinasen Komplex) den Abbau von IκB (Inhibitor des NFκB) und die nukleare Translokation des Transkriptionsfaktors NFκB, was zur erhöhten Transkription proinflammatorischer Zytokine führt. TAK1 aktiviert nicht nur IKK, sondern interagiert auch mit einer Mitogen-aktivierten Protein Kinase (MAPK), MKK6. Über die Phosphorylierung von MKK6 und

p38 wird der Transkriptionsfaktor AP-1 aktiviert, was eine vermehrte Gentranskription entzündlicher Zytokine hervorruft [26,34,36].

Der MAPK-Signalweg stellt einen wichtigen Mechanismus von Zellen zur Reaktion auf Stimuli wie Stressfaktoren, Hormone und Zytokine dar und wird in p38 Kinasen, c-Jun-N-terminalen Kinasen (JNK) und extrazellulär regulierte Kinasen unterteilt. Die p38 Signalübertragung verläuft in drei Stufen: MAPK Kinasen Kinasen, u.a. TAK1, MAPK Kinasen, u.a. Mitogen-aktivierte Kinase Kinase 6 (MKK6) und MAPK, u.a. p38 α , β , γ . Die Phosphorylierung der p38 Kinase führt zur Aktivierung weiterer Kinasen bzw. auch zur Aktivierung von Transkriptionsfaktoren wie AP-1 [37]. AP-1 stellt eine Gruppe von Transkriptionsfaktoren dar, die aus homo- und heterodimeren Komplexen bestehen [38].

Sowohl AP-1 als auch NF κ B sind in die Genexpression von proinflammatorischen Mediatoren [2], beispielsweise Zytokine wie TNF- α und IL-6 [39,40], Enzyme wie die induzierbare Stickstoffmonoxid Synthase (iNOS) [30] oder Chemokine [38]. involviert. Die Transkriptionsfaktoren werden wiederum von proinflammatorischen Signalen aktiviert [2,38].

1.3 Hopfeninhaltsstoffe und das Immunsystem des Menschen

Hopfeninhaltsstoffe, konkret IAA, zeigen in *in vitro* Studien ein antiinflammatorisches Potential [2,17]; ob antientzündliche Effekte auch im Mensch durch die Aufnahme von ernährungsphysiologisch relevanten Dosen der IAA auftreten, ist bislang nicht geklärt. Mitglieder der Arbeitsgruppe Bergheim konnten in einer einfach verblindeten, randomisiert, placebokontrollierten Studie einen protektiven Effekt auf eine Bakterien-vermittelte Immunantwort *ex vivo* in humanen PBMCs nach einmaliger Aufnahme eines IAA-reichen Extrakts (15mg IAA) zeigen (Daten nicht veröffentlicht). In einer weiteren Studie wurde eine verminderte LPS-induzierte IL-6- und TNF- α -Freisetzung *ex vivo* in PBMCs, isoliert aus dem Blut eines Probanden nach Aufnahme von 940mg META060 (Mischung von unterschiedlich substituierten THIAA Verbindungen), nachgewiesen [13].

Die immunmodulierende Aktivität der IAA konnte bisher auf die reduzierte Aktivierung der induzierbaren Cyclooxygenase 2 (iCOX-2) [12,13], die reduzierte Genexpression proinflammatorischer Faktoren durch die Hemmung der Transkriptionsfaktoren NF κ B und AP-1 *in vitro* [2,13,18], sowie der Dämpfung des JNK-Signalwegs in murinen Hepatozyten [41] zurückgeführt werden.

1.4 Zielsetzung und Fragestellungen der Arbeit

Bakterielle Infektionen und die schwerwiegende Folgerscheinung Sepsis stellen ein globales Gesundheitsproblem dar, das jährlich ca. 13,7 Millionen Todesfälle zur Folge hat [21].

Eine überschießende Immunreaktion, die mit bakteriellen Infektionen assoziiert werden kann, resultiert in andauernden entzündlichen Bedingungen, die körpereigenes Gewebe schädigen [24]. Ein potenzieller Ansatzpunkt in Therapie und Krankheitsprävention ist die Modulation des menschlichen Immunsystems und eine wirksame Senkung von inflammatorischen Mediatoren, möglicherweise durch sekundäre Pflanzenstoffe [1,42].

Die Ergebnisse vieler *in vitro* und Tierstudien weisen auf eine antiinflammatorische Aktivität der IAA in hohen Dosen hin [2,12,13,17,18]. Bisher sind die genauen molekularen Mechanismen und die Frage, ob ähnliche Effekte auch bei der Aufnahme ernährungsphysiologisch relevanter Dosen auftreten, weitgehend ungeklärt. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, zu untersuchen, ob IAA in unterschiedlichen ernährungsphysiologisch relevanten Konzentrationen *in vivo* und im Zellmodell protektive Wirkungen auf die LTA-abhängige Stimulation immunkompetenter Zellen hat und welche molekularen Mechanismen dabei von Bedeutung sind.

Ausgehend von diesem Hintergrund werden folgende Fragestellungen in der vorliegenden Arbeit bearbeitet: 1) Welchen Einfluss hat die orale Aufnahme von IAA in verschiedenen Dosen auf die LTA-vermittelte Zytokinfreisetzung in humanen Monozyten *ex vivo* und wie verläuft die Wirkung im Zeitraum nach der Aufnahme? 2) Welcher molekulare Mechanismus liegt dem immunsuppressiven Potential der IAA zugrunde?

2 Materialien

2.1 Humanstudie

2.1.1 Studiengetränk

Chemikalien

Isohop®

Stilles Wasser

Staubzucker

Bindino, pflanzliches Bindemittel

Zitronensirup zuckerfrei, naturtrüb

Zitronensäure

Herstellfirma

BarthHaas GmbH & Co. KG, Nürnberg,
Deutschland

Vöslauer Mineralwasser GmbH, Wien,
Österreich

Wiener Zucker, AGRANA Sales &
Marketing GmbH, Wien, Österreich

Gewürzmühle Brecht GmbH, Eggenstein,
Deutschland

SodaStream Österreich GmbH,
Leopoldsdorf, Österreich

Haas Austria GmbH, Traun, Österreich

Geräte und Verbrauchsmaterial

Analysenwaage

Zentrifugenröhren, 50ml

Pipettierhilfe macro

Serologische Pipette, 25ml

Herstellfirma

VWR International GmbH, Radnor, USA

Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht,
Deutschland

BRAND GMBH + CO KG, Wertheim,
Deutschland

Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht,
Deutschland

2.1.2 Blutabnahme

Geräte und Verbrauchsmaterial

Multifly® Kanüle 21G 200 mm lang

Fixierverband für i. v. Kanülen, Cosmor®
I.V.

BD Vacutainer®(Blutsammelröhren)

Herstellfirma

Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht,
Deutschland

Paul Hartmann AG, Heidenheim,
Deutschland

Becton Dickinson GmbH, Heidelberg,
Deutschland

BD Venflon™ Pro Safety (Venenverweilkanüle mit Nadelschutz) Luer-Lock-Kappe	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland
BD Posiflush™ SP	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland
BD Vacutainer® Luer Adapter	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland
Zentrifuge Z446 K/Z216MK	Hermle Labortechnik GmbH, Wehingen, Deutschland

2.1.3 Isolation und Stimulation humaner Monozyten

Chemikalien	Herstellfirma
Monocyte Spin Medium	pluriSelect Life Science UG & Co. KG, Leipzig, Deutschland
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS), w/o: calcium chloride and magnesium chloride	Merck Life Science UK Limited, Gillingham, Vereinigtes Königreich
RPMI-1640 Medium, w: L-glutamine and sodium bicarbonate	Merck Life Science UK Limited, Gillingham, Vereinigtes Königreich
FBS Good	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland
Penicillin-Streptomycin	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland
TRIidty G™ Trizol	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Lipoteichonsäure (LTA)	Merck Life Science UK Limited, Gillingham, Vereinigtes Königreich

Geräte und Verbrauchsmaterialien	Herstellfirma
Zentrifuge Z 446 K/Z216MK	Hermle Labortechnik GmbH, Wehingen, Deutschland
pluriMate® II Zentrifugenröhren, 15ml	pluriSelect Life Science UG & Co. KG,

Serologische Pipette, 10ml	Leipzig, Deutschland Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
Pipettierhilfe macro	BRAND GMBH + CO KG, Wertheim, Deutschland
96-Well Platte mit Deckel	BRAND GMBH + CO KG, Wertheim, Deutschland
CO ₂ Incubator MCO-17AIC-PE	PHC Holdings Corporation, Tokyo, Japan (zuvor: <i>Panasonic Healthcare Holdings Co., Ltd</i>)
HERAsafe Sicherheitswerkbank	Heraeus Holding GmbH, Hanau, Deutschland

2.2 Zellkulturmodell J774A.1

Chemikalien

Dulbecco's Modified Eagle's Medium
(DMEM), (w: glucose, L-glutamine, sodium
pyruvate, sodium bicarbonate)

FBS Good

Penicillin-Streptomycin

Isohop®

Anisomycin

Dimethylsulfoxid (DMSO)

Lipoteichonsäure

Herstellfirma

Merck Life Science UK Limited,
Gillingham, Vereinigtes Königreich

PAN-Biotech GmbH, Aidenbach,
Deutschland

PAN-Biotech GmbH, Aidenbach,
Deutschland

BarthHaas GmbH & Co. KG, Nürnberg,
Deutschland

Biomol GmbH, Hamburg, Deutschland

Merck Life Science UK Limited,
Gillingham, Vereinigtes Königreich

Merck Life Science UK Limited,
Gillingham, Vereinigtes Königreich

Geräte und Verbrauchsmaterial

TC-Zellkulturflasche, T-75, T-25

TC-Platte 6-Well

Herstellfirma

Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht,
Deutschland

Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht,

Levo ME Elektrische Pipette	Deutschland DLAB Scientific Co., Ltd. DLAB Scientific Inc., Peking, China
Serologische Pipette, 10ml	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
Vakuumpumpe SafeVac	DLAB Scientific Co., Ltd. DLAB Scientific Inc., Peking, China
Pasteurpipetten Glas	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Zellschaber	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Deckgläser	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Zählkammer	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen, Deutschland
Handzähler	Tamaco Industrial, Taichung, Taiwan
Inverses Lichtmikroskop	Carl Zeiss Microscopy Deutschland GmbH, Oberkochen, Deutschland
Wasserbad	Köttermann GmbH, Uetze, Deutschland
CO ₂ Incubator MCO-17AIC-PE	PHC Holdings Corporation, Tokyo, Japan (zuvor: <i>Panasonic Healthcare Holdings Co., Ltd</i>)
Scanlaf Mars Safety Bench perform® Flächendesinfektion	LaboGene A/S, Allerød, Dänemark Schülke & Mayr GmbH, Norderstedt, Deutschland
Akasolv Wasserbadkonservierer	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Zentrifuge Z446 K/Z216MK	Hermle Labortechnik GmbH, Wehingen, Deutschland

2.3 Nitrit Messung/Griess Assay

Chemikalien

Nitrit Standard (0,1M Natriumnitrit)

Herstellfirma

Promega Corporation, Madison, USA

Sulfanilamid Lösung	Promega Corporation, Madison, USA
NED Lösung	Promega Corporation, Madison, USA
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (w: glucose, L-glutamine, sodium pyruvate, sodium bicarbonate)	Merck Life Science UK Limited, Gillingham, Vereinigtes Königreich
FBS Good	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland
Penicillin-Streptomycin	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland
Geräte und Verbrauchsmaterial	Herstellfirma
96-Well Platte	BRAND GMBH + CO KG, Wertheim, Deutschland
Pufferwanne	Laborbestand
Eppendorf Pipette Research plus, 8-Kanal, 100µl	Eppendorf SE, Hamburg, Deutschland
Pipettenspitzen, 100µl	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
SpectraMax M3® Microplate Reader	Molecular Devices, LLC., San Jose, USA

2.4 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Chemikalien	Herstellfirma
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
di-Natriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Kaliumchlorid (KCl)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Tween® 20	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Albumin Fraktion V (BSA)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe,

	Deutschland
Goat Anti-Mouse Capture Antibody (TNF- α)	R&D Systems, Inc., Minneapolis, USA
Rat Anti-Mouse Capture Antibody (IL-6)	R&D Systems, Inc., Minneapolis, USA
Biotinylated Goat Anti-Mouse Detection Antibody (TNF- α , IL-6)	R&D Systems, Inc., Minneapolis, USA
Recombinant Mouse Standard (TNF- α , IL-6)	R&D Systems, Inc., Minneapolis, USA
Mouse Anti-Human Capture Antibody (TNF- α , IL-6)	R&D Systems, Inc., Minneapolis, USA
Biotinylated Goat Anti-Human Detection Antibody (TNF- α , IL-6)	R&D Systems, Inc., Minneapolis, USA
Recombinant Human Standard (TNF- α , IL-6)	R&D Systems, Inc., Minneapolis, USA
Streptavidin conjugated to horseradish-peroxidase (Streptavidin-HRP)	R&D Systems, Inc., Minneapolis, USA
Stabilisierte Peroxid (H ₂ O ₂) Lösung (Color Reagent A)	R&D Systems, Inc., Minneapolis, USA
Tetramethylbenzidin (Color Reagent B)	R&D Systems, Inc., Minneapolis, USA
2N Schwefelsäure (H ₂ SO ₄)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Geräte und Verbrauchsmaterial	Herstellfirma
Mikrotestplatte 96-Well	R&D Systems, Inc., Minneapolis, USA
Rotilabo®-Abdeckfolie für Mikrotestplatten (SealPlate)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Pufferwanne	Laborbestand
Eppendorf Research® plus, 8-Kanal Pipette, 100µl, 300µl	Eppendorf SE, Hamburg, Deutschland
Pipettenspitzen, 100µl, 300µl	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
SpectraMax M3® Microplate Reader	Molecular Devices, LLC., San Jose, USA

2.5 Allgemeine Chemikalien, Geräte und Verbrauchsmaterial

Ultratiefkühlgerät CryoCube F570h	Eppendorf SE, Hamburg, Deutschland
Kühlschrank/Tiefkühler Liebherr ProfiLine	Liebherr-International Deutschland GmbH, Biberach an der Riß, Deutschland
Kühlschrank Liebherr Premium	Liebherr-International Deutschland GmbH, Biberach an der Riß, Deutschland
Natronlauge (NaOH, 2N)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Salzsäure (HCl, 37% rauchend, reinst)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Labormarker	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
Labortücher	KIMBERLY-CLARK GmbH, Koblenz, Deutschland
Papierhandtücher Tork H3	Essity Aktiebolag (publ), Stockholm, Schweden
Rotiprotect® Nitril-Handschuhe	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
StarGuard® Nitril-Handschuhe	Starlab GmbH, Hamburg, Deutschland
Glasflasche Simax	Zeller GmbH, Hohenems, Österreich
Becherglas	Laborbestand
Magnetrührer PCE-MSR 100	PCE Deutschland GmbH, Meschede, Deutschland
Magnetrührstäbchen	Laborbestand
Magnetstab	Laborbestand
pH Meter Orion Model 420A	Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, USA
Omnifix Luer Lock Solo	B. Braun Austria GmbH, Maria Enzersdorf, Österreich
Syringe Filter, 0,22µm	Starlab GmbH, Hamburg, Deutschland
Messzylinder	BRAND GMBH + CO KG, Wertheim, Deutschland
Eppendorf Research® plus, 1-Kanal Pipette, 10µl, 100µl, 1000µl	Eppendorf SE, Hamburg, Deutschland

Pipettenspitzen, 1000µl, 200µl, 100µl, 20µl, 10µl	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
Vortex Laborschüttler	Phoenix Instrument GmbH, Garbsen, Deutschland
Eppiständer	Laborbestand
Röhrchengestell	Laborbestand
Zentrifugenröhren, 15ml, 50ml (Falcon)	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
Mikroreagiergefäß SafeSeal 0,5ml, 1,5ml, 2ml	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
Biosphere® SafeSeal Röhrchen 0,5ml, 2ml	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
Eisbereiter FM-120KE-50-HC	Hoshizaki Europe B.V. – HQ, Amsterdam, Niederlande
Zentrifuge Z446 K	Hermle Labortechnik GmbH, Wehingen, Deutschland
Ethanol 99,8% vergällt (Ethanol 70% Reinigung des Arbeitsplatzes)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Stoppuhr	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Analysenwaage	VWR International GmbH, Radnor, USA
Löffel zum Einwiegen der Substanzen	Laborbestand
Schälchen Plastik	Laborbestand

2.6 Statistische Auswertung, sonstige Software

Graphpad Prism 7	GraphPad Software, San Diego, USA
Microsoft Office 365	Microsoft Cooperation, Redmond, USA
SoftMax Pro 7.0	Molecular Devices, LLC., San Jose, USA

3 Methoden

Für die Bearbeitung der Fragestellungen der vorliegenden Arbeit wurde eine Humanstudie durchgeführt, im Rahmen derer Monozyten aus humanem Vollblut isoliert und stimuliert wurden. Weiters wurden Methoden der Zellkultur, Griess Assay und Enzyme-linked Immunosorbent Assay herangezogen.

3.1 Humanstudie

Die Studie (00848) wurde von der Ethikkommission der Universität Wien positiv begutachtet und ist im Einklang mit den in der medizinischen Forschung aktuell geltenden ethischen Grundsätzen (Deklaration von Helsinki) [43] durchgeführt worden. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit werden die Effekte von IAA auf die durch positive Bakterien -und hierbei vor allem LTA- vermittelte Immunantwort von Monozyten dargestellt; es wurde nur ein Teil des eigentlichen Studienprotokolls bearbeitet.

3.1.1 Studiendesign

Proband:innen der einfach verblindeten, placebokontrollierten Studie waren gesunde Personen (männlich, weiblich) zwischen 18-70 Jahren. Ausschlusskriterien für eine Teilnahme an der Studie stellten Fruktosemalabsorption, Nahrungsmittelunverträglichkeiten und/oder -intoleranzen sowie Lebensmittelallergien, besondere Ernährungsformen (beispielsweise vegane Ernährungsweise), instabiles Körpergewicht innerhalb der letzten 6 Monate (Schwankungen $> 5\%$), BMI $< 18,5 \text{ kg/m}^2$ oder $> 30 \text{ kg/m}^2$, bariatrische Operationen, chronische Erkrankungen des Gastrointestinaltrakts (beispielsweise Morbus Crohn), Lebererkrankungen, Niereninsuffizienz, rheumatoide Arthritis, COPD mit ≥ 2 Exazerbationen pro Jahr, chronische oder wiederkehrende akute Pankreatitis, Alkoholkonsum über 10g pro Tag (Frauen) oder 20g pro Tag (Männer), Schwangerschaft, Stillzeit, und virale oder bakterielle Infekte, die nicht länger als drei Wochen zurück liegen, dar.

Die Teilnehmer:innen wurden angehalten, zwei Wochen vor Studienbeginn sowie während der gesamten Studiendauer keine hopfenhaltigen Lebensmittel zu konsumieren. Vor Beginn der Studie wurden die Teilnehmer:innen durch den Studienarzt über Ziele der Studie und mögliche Risiken aufgeklärt, sowie schriftliche Einverständniserklärungen der Teilnehmer:innen eingeholt.

Am Studientag wurden die nüchternen Proband:innen nach einer initialen Blutabnahme gebeten, das Studiengetränk zu trinken und ein standardisiertes Frühstück (Laugenbreze +

10g Butter) innerhalb von 15 Minuten einzunehmen. Weitere Blutabnahmen erfolgten 1h, 2h, 3h und 6h nach Aufnahme des Studiengetränks. Während dieses Zeitraums erhielten die Teilnehmer:innen eine weitere standardisierte Mahlzeit (Pizza). Die Interventionen (Placebogetränk, Getränk + 15mg IAA / + 45mg IAA/ + 90mg IAA) erfolgten einmalig, einfach verblindet und randomisiert im Cross-over Design, wobei die Wash-Out Phase zwischen den Interventionen mindestens eine Woche betrug. Der Studienablauf sowie der Ablauf eines Studientages sind in Abbildung 3 dargestellt.

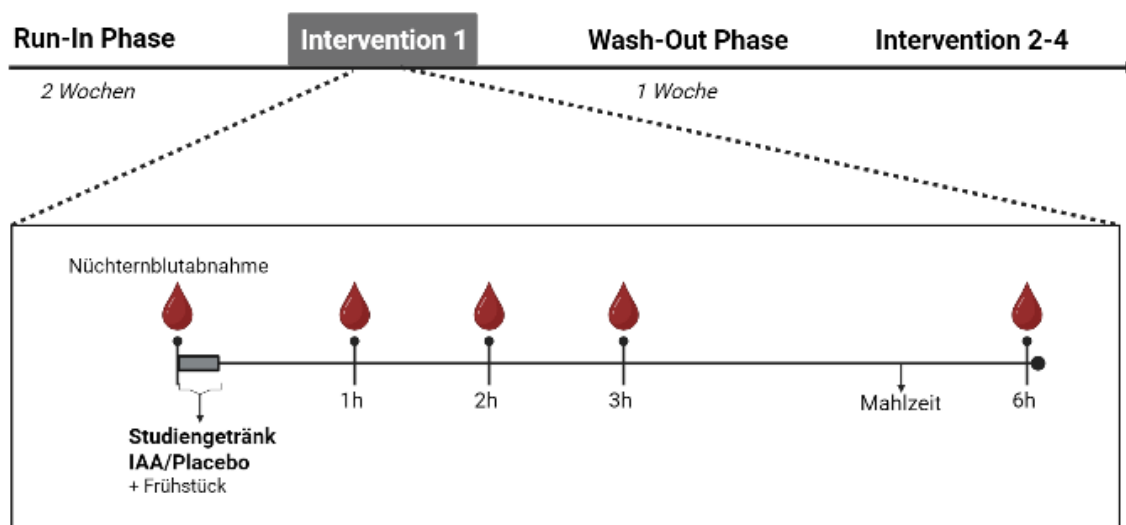


Abbildung 3: Grafische Darstellung des Studienablaufs und des Ablaufs eines Studientages. Interventionen 1-4 stellen die orale Aufnahme eines Studiengetränk mit 15mg, 45mg, 90mg IAA, Placebo dar und wurden in randomisierter Reihenfolge durchgeführt. IAA... Iso- α -Säure (verwendet in Form eines Iso- α -reichen Extrakts). Created with BioRender.com.

Zusätzlich wurden am ersten Interventionstag Geburtsdatum und anthropometrische Parameter (Gewicht, Größe, Bauchumfang) der Proband:innen erhoben (Tabelle 1). Zur Bestimmung klinisch-chemischer Parameter der Teilnehmer:innen wurden aus dem Vollblut Plasma und Serum gewonnen und ins Routinelabor Dr. Greiner (Wien, Österreich) übermittelt (Tabelle 1). Anhand der Charakteristika und der klinischen Parameter werden Ausschlusskriterien sowie der Gesundheitsstatus der Proband:innen überprüft. In der vorliegenden Arbeit werden die Ergebnisse zweier Probandinnen analysiert. Die anonymisierte Bezeichnung Probandin A bzw. Probandin B wurde von der Verfasserin dieser Arbeit selbst gewählt und soll zur übersichtlichen Darstellung der Ergebnisse dienen.

Tabelle 1: Charakteristika und klinische Parameter der Studienteilnehmer:innen

	Probandin A	Probandin B
Alter [Jahre]	26	25
Gewicht [kg]	55	59
Größe [cm]	170	171
BMI ¹ [kg/m ²]	19	20,2
Bauchumfang [cm]	66	65
Blutzucker [mg/dl]	97	91
Harnsäure [mg/dl]	3,7	2,9
SGOT [U/l]	15	16
SGPT [U/l]	7	18
Gamma-GT [U/l]	10	8
Cholesterin [mg/dl]	133	160
HDL-Cholesterin [mg/dl]	57	63
LDL-Cholesterin [mg/dl]	63	74
Triglyceride [mg/dl]	66	115
Cholesterin/HDL	2,3	2,5
C-reaktives Protein [mg/dl]	0,16	0,07

3.1.2 Isolation humaner Monozyten

Die Isolation der humanen Monozyten aus Vollblut wurde mittels Dichtegradientenzentrifugation und pluriSelect System durchgeführt. Das PluriSelect System besteht aus speziellen Zentrifugenröhrchen (pluriMate II) mit einer netzartigen Barriere im unteren Drittel des Röhrchens, die eine Vermischung des Blutmaterials und des Trennmediums verhindert und wurde entsprechend den Empfehlungen des Herstellers verwendet. Die Isolation von humanen Monozyten aus dem Vollblut wurde auf der Sicherheitswerkbank durchgeführt. Die benötigten Substanzen wurden vor Verwendung auf Raumtemperatur (RT) gebracht. Aufgereinigte Monozyten wurden in RPMI-1640 Medium kultiviert, welches sich entsprechend Tabelle 2 zusammensetzt.

Tabelle 2: Zusammensetzung des Zellkulturmediums RPMI-1640 zur Kultivierung der isolierten humanen Monozyten

Substanz	Volumen [ml]	% Volumen
RPMI-1640 Medium	445	89
FBS	50	10
Penicillin/Streptomycin	5	1

¹ BMI wurde durch $BMI = \text{Körpergewicht [kg]} / \text{Körpergröße}^2 \text{ [m]}$ ermittelt; gerundet auf eine Nachkommastelle

Ein pluriMate Zentrifugenröhrchen wurde mit 4,5ml Trennmedium (Monocyte Spin Medium) befüllt und bei 1000rcf, acell 9, decell 9, RT 10 Sekunden zentrifugiert, um das Trennmedium durch die netzartige Barriere an den Boden des Zentrifugenröhrchens zu befördern. 4ml Vollblut wurden vorsichtig aufgelagert. Nach Zentrifugation bei 800rcf, acell 9, decell 9, RT 15 Minuten konnte eine Trennung des Vollbluts in unterschiedliche Phasen bzw. Zellfraktionen gesehen werden (Abbildung 4); die netzartige Barriere verhindert dabei eine Rekontamination der angereicherten Zellen mit dem Trennmedium. 500µl Plasma wurden abgenommen, die für weitere Untersuchungen bei -80°C gelagert wurde. Die Monozyten als helle Phase unter dem Plasma wurden in ein neues Falcon überführt und mit DPBS auf 10ml aufgefüllt. Die Zellen wurden bei 300rcf, acell 9, decell 9, RT 10 Minuten abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Falcon wurde erneut mit DPBS auf 10ml aufgefüllt, abzentrifugiert (300rcf, acell 9, decell 9, RT 10 Minuten) und der Überstand noch einmal abgenommen. Das entstandene Zellpellet wurde in 2ml DPBS resuspendiert und 500µl davon in ein endotoxinfreies Mikroreagiergefäß abgenommen, die bei -80°C für weitere immunologische Untersuchungen gelagert wurden. Es folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt bei 300rcf, acell 9, decell 9, RT 10 Minuten sowie die Abnahme des DPBS Überstands. Das Zellpellet wurde in 1280µl RPMI-1640 Zellkulturmedium resuspendiert und 160µl der Zellsuspension wurden pro Well in eine 96-Well TC Platte gegeben.

3.1.3 Stimulation humaner Monozyten

Die Monozyten wurden vor der Stimulation für eine Stunde auf der 96-Well Platte bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert, um sie ruhen zu lassen. Um die Zellen zu stimulieren, wurden 40µl LTA (50µg/ml RPMI-1640 Medium) pro Well hinzugefügt. In die Wells, die unstimuliert (US) blieben, wurden 40µl RPMI-1640 Medium pipettiert (Abbildung 4). Nach der Inkubationszeit (6h) wurde der Zellüberstand abgenommen. Hierbei wurde der Zellkulturüberstand in ein Mikroreagiergefäß abgenommen und bei 4°C und maximaler Geschwindigkeit 15 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde dann in ein neues Mikroreagiergefäß überführt und bis zur Durchführung weiterer Analysen bei -80°C gelagert. Während des Zentrifugationsschritt wurden 300µl Trizol in jedes Well auf die Zellen pipettiert. Das Trizol wurde dann auf das entstandene Zellpellet des Überstandes überführt, abgenommen und bei -80°C gelagert.

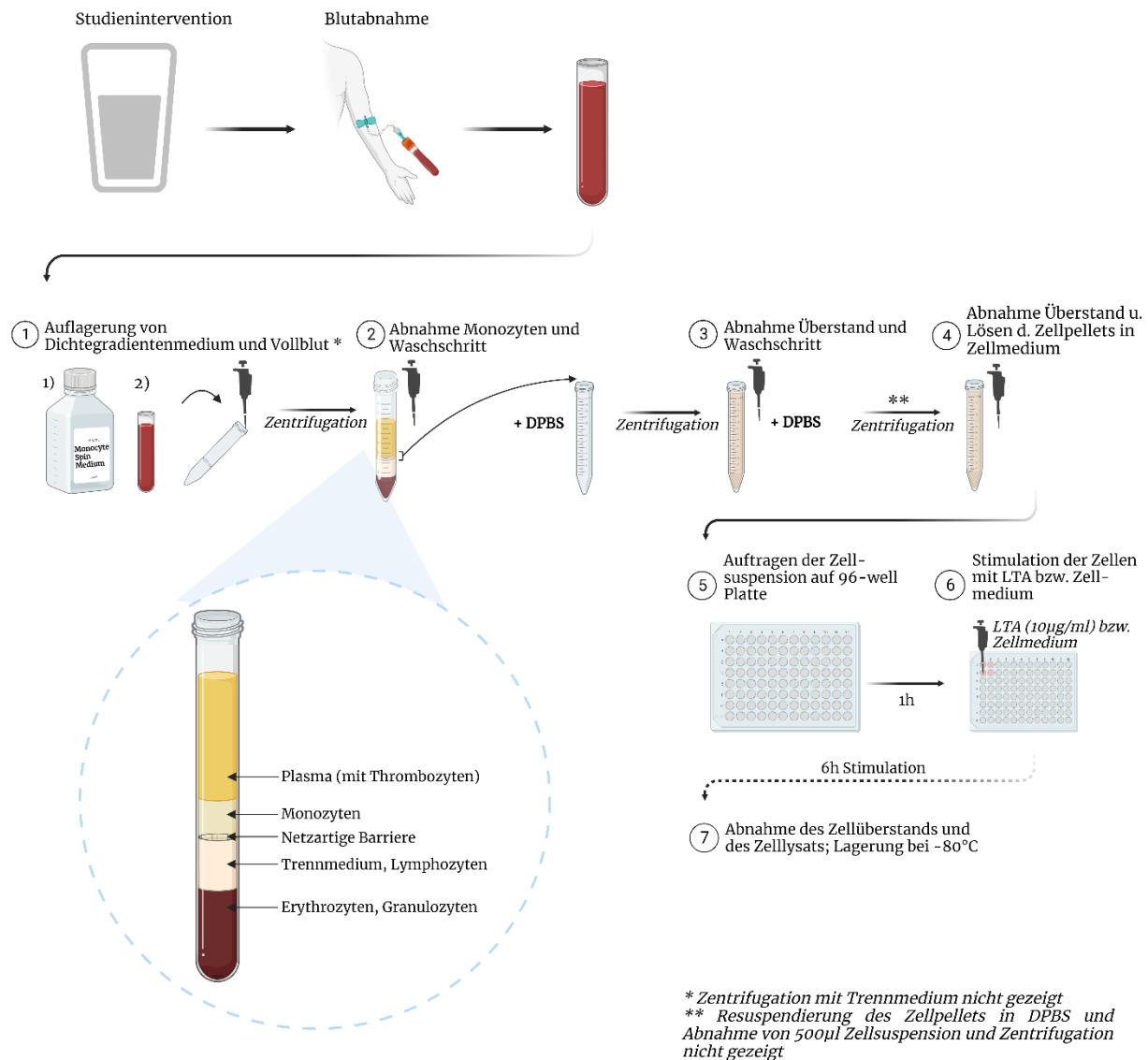


Abbildung 4: Isolation und Stimulation von Monozyten aus humanem Vollblut: Unterschiedliche Phasen und Zellfraktionen des Blutes nach der Zentrifugation mit Trennmedium (Monocyte Spin Medium) im Zentrifugenröhrchen mit netzartiger Barriere. Zentrifugation bei Raumtemperatur: 300rcf, acell 9, decell 9. DPBS...Dulbecco's Phosphate Buffered Saline, LTA... Lipoteichonsäure. Created with BioRender.com.

3.2 Zellkulturmodell J774A.1

J774A.1 Zellen stellen eine murine Makrophagen-ähnliche Zelllinie dar, die zum ersten Mal 1968 aus dem Aszites einer weiblichen BALB/c Maus mit Knochentumor isoliert wurde [42,44]. Nach Aktivierung durch Pathogene zeigen J774A.1 Zellen Makrophagentypische Eigenschaften wie die Produktion von NO und Zytokinen, Phagozytose [42] und die Ausschüttung von Lysozym [44], weshalb sie häufig als Modellorganismus in Untersuchungen zu immunologischen Fragestellungen eingesetzt werden [42].

Die semi-adhärenenten Zellen [42] wurden für die hier angeführten Experimente bei American Type Culture Collection (ATTC) erworben.

Zellkulturmedium

J774A.1 wurden in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) mit bovinem Serum (FBS) und Penicillin/Streptomycin kultiviert. Das Zellkulturmedium wurde an der Sicherheitswerkbank unter sterilen Bedingungen hergestellt und bei 4°C gelagert. Die Zusammensetzung des Zellkulturmediums ist in Tabelle 3 angeführt. Vor Verwendung wurde das Zellkulturmedium im Wasserbad auf 37°C erwärmt sowie makroskopisch auf Verunreinigungen oder Farbveränderungen überprüft.

Tabelle 3: Zusammensetzung des Zellkulturmediums im J774A.1 Zellkulturmodell

Substanz	Volumen [ml]	% Volumen
Dulbecco's Modified Eagle's Medium - high glucose	445	89
FBS	50	10
Penicillin/Streptomycin	5	1

Auftauen der J774A.1 und Kultivierung von J774A.1

Für das Auftauen der Zellen wurden die Kryovials, in denen die Zellen bei -196°C gelagert wurden, kurz erwärmt (Wasserbad 37°C) und die Zellen dann vorsichtig in das Falcon gekippt, in dem 10ml vorgewärmtes Zellmedium vorgelegt wurden. Die Zellen wurden bei 1200 rpm, RT 5 Minuten zentrifugiert, um das Einfriermedium abzutrennen. Nach dem Zentrifugationsschritt wurde der Überstand mit einer Pipette abgenommen, ohne dabei das Zellpellet zu berühren. Erst danach wurde das Zellpellet mit 5ml Zellkulturmedium einige Male resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in eine Zellflasche (T-25) überführt und eine Stunde inkubiert. Um besseres Wachstum der Zellen nach dem Auftauen zu ermöglichen, wurde für die erste längere Inkubation ein 35% Vol. FBS Zellkulturmedium verwendet. Dafür wurde in ein Falcon 3,6ml Medium pipettiert, mit 1,4ml FBS supplementiert und geschwenkt. Das Zellkulturmedium wurde mittels Vakuumpumpe aus der Zellflasche abgesaugt sowie 35% Vol. FBS Medium in die Zellflasche überführt. J774A.1 wurden bei 37°C und 5% CO₂ bis zur 80-85%-igen Konfluenz inkubiert.

Subkultivierung von J774A.1

Alle 2-3 Tage wurde ein Medienwechsel vorgenommen. Die Zelldichte in den Zellflaschen wurde jeden zweiten Tag mittels Lichtmikroskop überprüft. Sobald die Zellen eine Konfluenz von 80-85% erreicht haben (alle 3-4 Tage), wurden die Zellen passagiert. Bei Subkultivierung der J774A.1 Zellen wurden T-75 Zellkulturflasche verwendet und die

initiale Aussaat betrug $0,1 \cdot 10^7$ Zellen pro Zellkulturflasche. Beim Passagieren wurde das Medium abgesaugt und 10ml frisches Medium in die Zellflasche pipettiert. Mit einem Zellschaber wurden die Zellen vorsichtig vom Boden der Zellflasche gelöst und nach mehrmaligen Resuspendieren in ein Zentrifugenröhrchen abgenommen. Die Zellzählung erfolgte unter dem Mikroskop mit einer Zählkammer: Die Zellsuspension wurde 1:5 mit Zellkulturmedium in einem SafeSeal Reagiergefäß verdünnt und 10µl davon auf die Zählkammer aufgetragen. Im nächsten Schritt wurden 10ml frisches Medium in eine neue Zellflasche vorgelegt und die entsprechende Menge Zellsuspension (siehe Formel (1),(2)) transferriert. Durch vorsichtiges Schwenken wurde eine gleichmäßige Zellverteilung sichergestellt. Alle Zellarbeiten wurden an der Sicherheitswerkbank durchgeführt und sämtliche Medien vorab auf 37°C im Wasserbad erwärmt.

$$\text{relative Zellzahl} \left[\frac{\text{Zellen}}{\text{ml}} \right] = \frac{\text{Mittelwert der Zellzahl pro Eckquadrat} \cdot \text{Verdünnungsfaktor} \cdot 5 \cdot \text{Faktor für Kammervolumen } 10^4}{1} \quad (1)$$

$$\text{Zellsuspension bei Aussaat [ml]} = \frac{1}{\text{relative Zellzahl}} \cdot \text{initiale Zellzahl} \quad (2)$$

3.2.1 J774A.1 Zellstimulation

Als Vorbereitung für eine Zellstimulation wurde prinzipiell ident zur Subkultivierung (siehe 3.2 *Subkultivierung von J774A.1*) verfahren; nach Auszählen der Zellen mit einer Zählkammer wurden 2ml Zellkulturmedium pro Well sowie die entsprechende Menge Zellsuspension (siehe 3.2 Formel (1),(2)) in eine 6-Well Zellkulturplatte transferriert. Für eine Zellstimulation wurden $0,3 \cdot 10^6$ Zellen pro Well ausgesät. Nach mikroskopischer Begutachtung der Zelldichte in den Zellkulturplatten konnte im nächsten Schritt eine Stimulation der Zellen ausgeführt werden (Abbildung 5) – dafür musste eine Zellkonfluenz von 90-95% gegeben sein. Das Zellkulturmedium aus den Wells der 6-Well Zellkulturplatte wurde mittels Vakuumpumpe abgesaugt und durch 800µl frisches Medium ersetzt. Je nach Versuchsprotokoll wurde im ersten Schritt entweder a) ein IAA-reicher Extrakt (Isohop® 30% w/w, BarthHaas GmbH & Co. KG) mit Zellmedium 1:100 verdünnt und in unterschiedlichen Konzentrationen (50µg/ml, 25µg/ml, 12,5µg/ml, 6,25µg/ml IAA) den Zellen appliziert oder b) zunächst Anisomycin in Dimethylsulfoxid (DMSO) (10mg/ml) im Verhältnis 1:2000 mit Zellkulturmedium verdünnt und in unterschiedlichen Konzentrationen (5ng/ml bzw. 1ng/ml) den Zellen hinzugegeben; zusätzlich wurde die Kontrolle - DMSO in Zellmedium (Verdünnung 1:2000) mitgeführt (Abbildung 6). Die

Behandlung von J774A.1 mit Anisomycin vor der Inkubation mit einem IAA-reichen Extrakt stellt ein Pilotexperiment dar, um mögliche Auswirkungen von Anisomycin, ein Aktivator der p38 Kinase, auf den Effekt eines IAA-reichen Extrakts in einer LTA-vermittelten Entzündungsreaktion zu untersuchen. Erst im nächsten Schritt wurde hier nach einstündiger Inkubationszeit zu bereits genannten Standardbedingungen ein IAA-reicher Extrakt (Isohop® 30% w/w, BarthHaas GmbH & Co. KG; 1,562µg/ml bzw. 6,25µg/ml IAA) den Zellen appliziert. Dafür wurde der Extrakt 1:100 mit Zellmedium verdünnt.

Um die Zellen zu aktivieren wurde nach einer weiteren Stunde Inkubationszeit zu Standardbedingungen eine Stimulation mit LTA durchgeführt. Hierbei wurde LTA zunächst in DMEM gelöst und bei -20°C gelagert. Für eine Stimulation der Zellen wurden 200µl LTA (50µg/ml in DMEM) auf die Zellen pipettiert; auf die unstimulierten Zellen wurden 200µl Zellkulturmedium hinzugegeben. Die Zellen wurden unter den bereits genannten Bedingungen inkubiert. Nach 6h und 24h bzw. 48h wurden je 200µl bzw. 600µl Zellüberstand in ein Mikroreagiergefäß abgenommen und bei -20°C bis zu Durchführung weiterer Analysen gelagert.

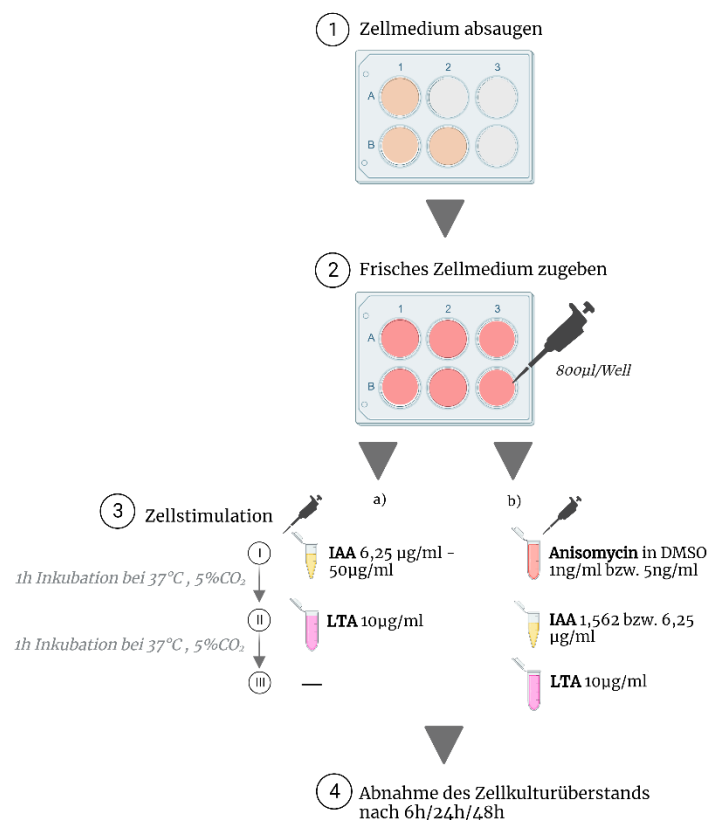


Abbildung 5: Zellstimulation im J774A.1 Zellkulturmodell. Je nach Versuchsprotokoll wurden die Zellen mit a) IAA oder b) Anisomycin und IAA inkubiert und LTA stimuliert. Konzentrationsangaben der Substanzen jeweils pro Well. DMSO... Dimethylsulfoxid, IAA... Iso- α -Säure (verwendet in Form eines Iso- α -Säure-reichen Extrakts), LTA... Lipoteichonsäure. Created with BioRender.com.

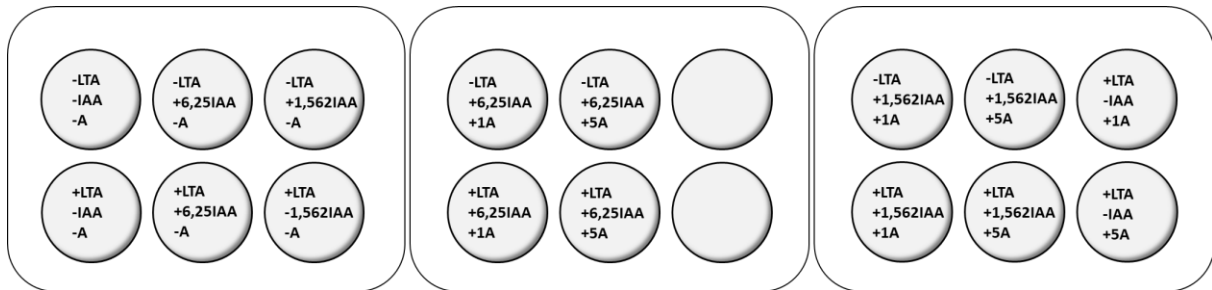


Abbildung 6: Plattenbelegung im J774A.1 Zellkulturmodell bei einer Zellstimulation: Die Zellen wurden mit Zellkulturmedium (unstimulierte Kontrolle), IAA (1,562µg/ml bzw. 6,25µg/ml), LTA (stimulierte Kontrolle; 10µg/ml), IAA + LTA, IAA + Anisomycin (1ng/ml bzw. 5ng/ml), IAA + LTA + Anisomycin, LTA + Anisomycin behandelt. Die LTA-Stimulation wurde für 6h und 24h durchgeführt. A...Anisomycin, IAA... Iso-α-Säure (verwendet in Form eines Iso-α-Säure-reichen Extrakts), LTA... Lipoteichonsäure.

3.3 Nitrit Messung/Griess Assay

Für die Nitrit Messung in den Zellkulturüberständen wurde ein kommerziell erhältliches Griess Assay Kit (Griess Reagent System, Promega Corporation) verwendet, welches entsprechend der Anleitung des Herstellers durchgeführt wurde. Basierend auf Bildung einer Azoreaktion im letzten Schritt der Griess Reaktion wird Nitrit durch eine Rosa-Rotfärbung identifizierbar gemacht [42].

In eine 96-Well Platte wurden in B1-3 bis H1-3 je 50µl Zellkulturmedium vorgelegt. Für Standard A wurde der Nitrit Standard 1:1000 mit Zellmedium verdünnt und in Dreifachbestimmung in A1-3 pipettiert (100µl pro Well). Die Standardverdünnungsreihe wurde durch serielle Verdünnung direkt in den Wells hergestellt (Tabelle 4). Je 50µl der Proben wurden in Einfachbestimmung auf die Platte aufgetragen; Unmittelbar danach werden 50µl Sulfanilamid Lösung pro Well zugegeben. Die Platte wurde 10 Minuten im Dunkeln inkubiert. Im letzten Schritt wurden 50µl der NED Lösung in jedes Well gegeben und lichtgeschützt 10 Minuten inkubiert (Rosa-Rot Färbung erkennbar). Die Absorption wurde im Photometer bei einer Wellenlänge von 530-550nm gemessen.

Tabelle 4: Herstellung der Nitrit Standardverdünnungsreihe

	0,1M Nitrit Standard [µl]	Zellkulturmedium [µl]	Konzentration Nitrit [µl]
Standard A	1	1999	100
Standard B	50 aus Standard A	50	50
Standard C	50 aus Standard B	50	25
Standard D	50 aus Standard C	50	12,5
Standard E	50 aus Standard D	50	6,25
Standard F	50 aus Standard E	50	3,125
Standard G	50 aus Standard F	50	1,563
Standard H (Blank)	-	50	0

3.4 Enzyme-linked Immunsorbent Assay (ELISA)

ELISA stellt eine routinemäßige Labormethode zum qualitativen und quantitativen Nachweis von Proteinen dar. Dabei wird die spezifische Antigen-Antikörper Bindung sowie die katalytische Aktivität eines Antikörper gebundenen Enzyms genutzt, um Proteine in Lösung sichtbar zu machen. [45]

Die Konzentrationen von TNF- α und IL-6 in den Zellüberständen der humanen Monozyten sowie in den Zellüberständen der J774A.1 wurden in der vorliegenden Arbeit mittels eines kommerziell erhältlichen ELISA ermittelt, der nach Anleitung des Herstellers durchgeführt wurde (Duoset® ELISA Development System Kit, R&D Systems). Die zusätzlich benötigten Chemikalien Phosphate buffered saline (PBS), Waschpuffer und Reagent Diluent (RD) wurden vor Durchführung des ELISA hergestellt (siehe Anhang I ELISA: A *Herstellung des PBS*, B *Herstellung des Waschpuffers*, C *Herstellung des Reagent Diluent*). Capture Antibody, Detection Antibody, Streptavidin-HRP und Standard wurden gemäß beiliegendem Certificate of Analysis (COA) mit PBS bzw. RD bzw. destilliertem Wasser verdünnt (siehe Anhang I ELISA: D *Verdünnung des Capture Antibody und des Detection Antibody*, E *Verdünnung des Standards*).

Die Zellüberstände der LTA-stimulierten humanen Monozyten wurden vor dem Auftragen auf die 96-Well Mikrottestplatte entsprechend Tabelle 5 mit RD verdünnt. Die Verdünnungsverhältnisse wurden aus vorigen Messungen der Arbeitsgruppe Bergheim übernommen.

Tabelle 5: Verdünnungen der humanen Monozyten Zellüberstände nach 6-stündiger LTA-Stimulation für den ELISA

Probe ELISA	TNF- α	IL-6
US	1:2	1:2
LTA	1:10	1:25

Stimulierte J774A.1 Überstände wurden vor der Durchführung des ELISA mit RD verdünnt; die Verdünnungen sind in Tabelle 6 dargestellt.

Tabelle 6: Verdünnungen der J774A.1 Zellüberstände nach 6- bzw. 24-stündiger LTA-Stimulation für den ELISA

Probe ELISA	TNF- α	IL-6
US	unverdünnt bzw. 1:3	unverdünnt bzw. 1:3
LTA 6h	1:50	1:8
LTA 24h	1:20	1:15

Zur Vorbereitung der ELISA Platte wurden 100 μ l des mit PBS verdünnten Capture Antibody in jedes Well pipettiert und über Nacht bei RT im Dunkel inkubiert. Nach Waschen der Platte mit Waschpuffer fand eine 1-stündige Blockierung der Wells mit 300 μ l RD pro Well im Dunkeln, bei RT statt. Nach einem zweiten Waschschrift wurden die Standards sowie die Proben (mit RD verdünnt bzw. unverdünnt; siehe Tabelle 5, Tabelle 6) für 2h aufgetragen (Einfachbestimmung, je 100 μ l pro Well). Die Platte wurde erneut gewaschen und 100 μ l Detection Antibody, verdünnt in RD, in jedes Well hinzugegeben. Nach 2h Inkubation im Dunkeln, bei RT folgte ein weiterer Waschschrift und die Applikation von Streptavidin-HRP für 20 Minuten (100 μ l pro Well; 1:40 mit RD verdünnt). Die Platte wurde noch einmal gewaschen und danach mit 100 μ l Substrat Lösung pro Well im Dunkeln, bei RT inkubiert. Nach 20 Minuten wurde pro Well 50 μ l 2N Schwefelsäure hinzugefügt und die Reaktion somit gestoppt; durch vorsichtiges Klopfen der Platte auf die Arbeitsfläche wurde die adäquate Vermischung der reagierenden Substanzen gewährt. Die Messung der Absorption im Photometer bei 450nm erfolgte unmittelbar danach.

3.5 Statistische Auswertung

Die statistische Verarbeitung und Auswertung der Daten sowie deren grafische Darstellung wurde mit Graphpad Prism 7 und Microsoft Excel durchgeführt. Die Daten wurden mittels

Grubbs Test auf Ausreißer geprüft und gegebenenfalls aus der weiteren Verarbeitung exkludiert. Es erfolgte eine Überprüfung der Daten auf Normalverteilung mittels Shapiro-Wilk Test sowie auf Varianzhomogenität mittels One-way ANOVA. Bei signifikant unterschiedlichen Varianzen wurden die Werte durch Logarithmieren transformiert. In den J774A.1 Versuchen wurden die Gruppen (Stimulationsbedingungen) mittels einer One-way ANOVA (multipler Mittelwertvergleich, Tukey-Test) verglichen. Das Niveau für signifikante Unterschiede wurde mit einem p-Wert $<0,05$ festgelegt. Werte in den Abbildungen werden als Mittelwert $\pm$ Standardfehler (SEM, abgebildet als Fehlerbalken) dargestellt.

4 Ergebnisse

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss verschiedener Dosen eines IAA-reichen Extrakts auf eine LTA-vermittelten Entzündungsreaktion beim Menschen und im Zellkulturmodell (J774A.1) untersucht. Hierfür wurde ein Teil des Studienprotokolls einer Humanstudie durchgeführt; es wurden die Ergebnisse zweier Probandinnen ausgewertet.

4.1 Einfluss der einmaligen oralen Aufnahme eines IAA-reichen Extrakts in verschiedenen Dosen auf die LTA-vermittelte Stimulation von humanen Monozyten *ex vivo* zu verschiedenen Zeitpunkten nach der oralen Aufnahme: Konzentration von TNF- α und IL-6

Die folgenden Untersuchungen fanden im Rahmen einer größeren Humanstudie (siehe 3.1.1 Studiendesign) statt und umfassten zwei Probandinnen. Die Aufnahme von IAA erfolgte in Form eines IAA-reichen Extrakts in verschiedenen Dosen (15mg IAA, 45mg IAA, 90mg IAA, siehe *Anhang I. Herstellung des Studiengetränks*), die auch durch moderaten Konsum von Bier aufgenommen werden können. Die Blutabnahmen fanden nüchtern vor (T0), sowie 1h, 2h, 3h und 6h nach der jeweiligen Intervention statt (T1, T2, T3, T6). Nach der Zellisolation aus dem Vollblut wurden die Monozyten 6h mit LTA stimuliert und anschließend die Zytokinkonzentrationen in den Zellüberständen mittels ELISA gemessen. Die Werte werden jeweils im Vergleich zum Ausgangswert (Konzentration zum Zeitpunkt T0 = 100%) der jeweiligen Intervention dargestellt. Aufgrund technischer Schwierigkeiten in den ELISA Messungen konnten bei der Placebo-Intervention der Probandin B zwei Konzentrationen (T0, T1) nicht ermittelt werden, weswegen die Behandlung mit Placebo bei dieser Probandin nicht gezeigt wird; es werden somit alle Werte in % über T0 dargestellt.

TNF- α

Wie in Abbildung 7 zusammengefasst, hatte die Aufnahme von 15mg den größten Effekt auf die Freisetzung von TNF- α bei Probandin A. 1h nach Aufnahme von 15mg IAA sank die TNF- α -Freisetzung der LTA-stimulierten Zellen auf 33% der initialen Konzentration. 2h bis 6h nach der IAA-Aufnahme war eine kontinuierliche Zunahme der TNF- α -Freisetzung feststellbar, wobei die TNF- α -Konzentration 6h nach der Aufnahme niedriger als der Ausgangswert war (69% von T0), was einen immunsuppressiven Effekt auch 6h nach einer IAA-Aufnahme zeigt. Nach der Aufnahme der höchsten IAA-Dosis (90mg IAA) wurde eine Senkung der TNF- α -Konzentration in LTA-stimulierten Zellen 1h nach

der IAA-Aufnahme auf 70% des Ausgangswerts erreicht. Auch bei dieser Intervention wurde ab diesem Zeitpunkt eine steigende LTA-induzierte TNF- α -Freisetzung festgestellt. Nach der Aufnahme von 45mg IAA kam es zu keiner Verminderung der LTA-induzierten TNF- α -Freisetzung im Vergleich zum Ausgangswert.

Bei Probandin B (Abbildung 7B) konnte kein dämpfender Effekt auf die TNF- α -Freisetzung in Monozyten nach der Aufnahme von 90mg IAA bzw. 15mg IAA festgestellt werden. Ein vergleichsweise hoher Ausgangswert der TNF- α -Freisetzung wurde vor der Aufnahme von 45mg IAA gemessen; die Betrachtung der Messwerte in % über T0 sind in dieser Intervention möglicherweise nicht aussagekräftig.

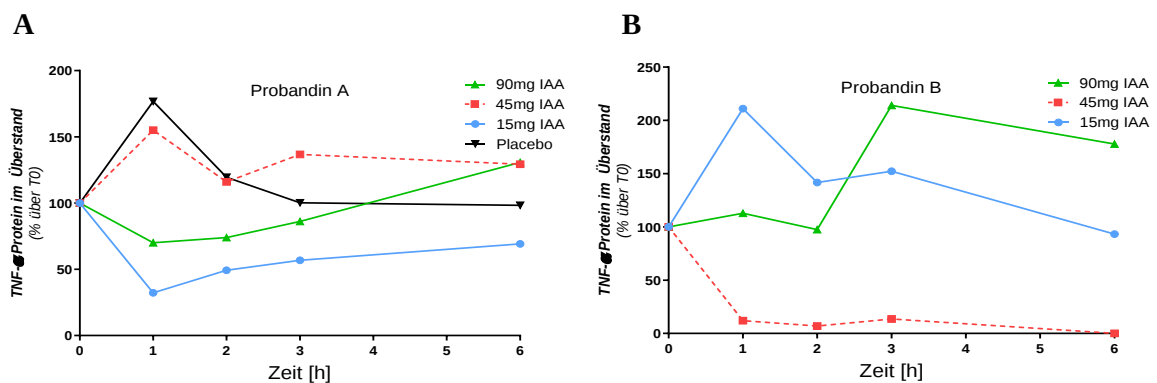


Abbildung 7: Einfluss der oralen Aufnahme eines IAA-reichen Extrakts in unterschiedlichen Dosen und zu verschiedenen Zeitpunkten auf die TNF- α -Freisetzung im Zellüberstand isolierter humaner Monozyten nach LTA-Stimulation *ex vivo* bei Probandin A (7A) und Probandin B (7B). Die Zellen wurden aus Vollblut isoliert und 6h mit LTA stimuliert. 7B: Die TNF- α -Konzentration in der 45mg IAA-Intervention konnte zum Zeitpunkt 6 aufgrund einer technischen Schwierigkeit nicht detektiert werden. Werte dargestellt in % über T0 (Ausgangswert - Blutabnahme nüchtern), Interventionen der Humanstudie: Placebo, 15mg IAA, 45mg IAA, 90mg IAA. IAA: Iso- α -Säure, LTA: Lipoteichonsäure, TNF- α : Tumornekrosefaktor- α

IL-6

Nach der Aufnahme von 15mg IAA war die LTA-vermittelte Freisetzung von IL-6 deutlich geringer als zum Zeitpunkt 0 (Abbildung 8A). Der Effekt war auch nach 2h noch nachweisbar. Die IL-6-Konzentration im Überstand nahm bis 6h nach der IAA-Aufnahme zu, blieb jedoch zu jedem gemessenen Zeitpunkt unter dem Ausgangsniveau (80% bzw. 90% von T0). Durch die Aufnahme der höchsten IAA-Dosis wurde ebenfalls 1h nach der Aufnahme eine Abschwächung der LTA-induzierten IL-6-Freisetzung festgestellt (56% von T0). Die IL-6-Konzentration erreichte zu keinem Zeitpunkt das Ausgangsniveau. Durch die Aufnahme der höchsten sowie der niedrigsten IAA-Dosis konnte bei Probandin A somit ein immunmodulierender Effekt zu verschiedenen Zeitpunkten in der LTA-

induzierten IL-6 sowie TNF- α -Freisetzung ermittelt werden (Abbildung 7A und Abbildung 8A). Die mittlere IAA-Dosis zeigte keinen suppressiven Effekt auf die IL-6-Freisetzung humaner Monozyten bei Probandin A.

Bei Probandin B (Abbildung 8B) war die IL-6-Freisetzung in LTA-stimulierten Zellen 2h nach der Aufnahme von 45mg IAA bzw. 90mg IAA vermindert. Dieser Effekt war im Zeitraum 3h bis 6h nicht mehr nachweisbar. Die niedrigste IAA-Dosis reduzierte die IL-6-Konzentration im Zellüberstand bei Probandin B zum Zeitpunkt 6 auf 69% des Ausgangswerts. Zu den Zeitpunkten davor zeigte IAA (15mg) keinen wesentlichen Einfluss auf die LTA-vermittelte IL-6-Freisetzung in Monozyten.

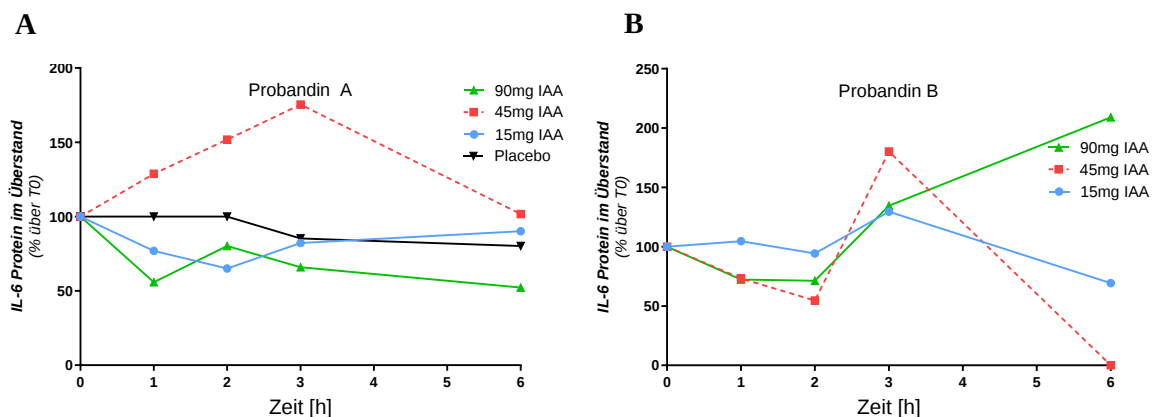


Abbildung 8: Einfluss der oralen Aufnahme eines IAA-reichen Extrakts in unterschiedlichen Dosen und zu verschiedenen Zeitpunkten auf die IL-6-Freisetzung im Zellüberstand isolierter humaner Monozyten nach LTA-Stimulation *ex vivo* bei Probandin A (8A) und Probandin B (8B). Die Zellen wurden aus Vollblut isoliert und 6h mit LTA stimuliert. 8B: Die IL-6-Konzentration in der 45mg IAA-Intervention konnte zum Zeitpunkt 6 aufgrund einer technischen Schwierigkeit nicht detektiert werden. Werte dargestellt in % über T0 (Ausgangswert - Blutabnahme nüchtern), Interventionen der Humanstudie: Placebo, 15mg IAA, 45mg IAA, 90mg IAA. IAA: Iso- α -Säure, IL-6: Interleukin-6, LTA: Lipoteichonsäure

4.2 Effekte unterschiedlicher Konzentrationen eines IAA-reichen Extrakts auf die LTA-induzierte Freisetzung von TNF- α und IL-6 sowie NOx im Zellkulturüberstand von J774A.1

Um zu untersuchen, ob ein IAA-reicher Extrakt auch *in vitro* die LTA-vermittelte Stimulation beeinflusst, wurde zunächst eine *Dose-Response* Studie durchgeführt.

TNF- α

Die Inkubation mit einem IAA-reichen Extrakt senkte die TNF- α -Konzentration im Überstand der Zellen verglichen mit LTA-stimulierten Zellen dosisabhängig 6h nach der LTA-Behandlung, wohingegen nach 24h die Konzentration bei allen IAA-Dosen gleich

um ca. 40% vermindert war. Aufgrund der Streuung innerhalb der Gruppen erreichte nur die Konzentration 25µg/ml (6h) und 6,25µg/ml (24h) das Signifikanzniveau (Abbildung 9A/B).

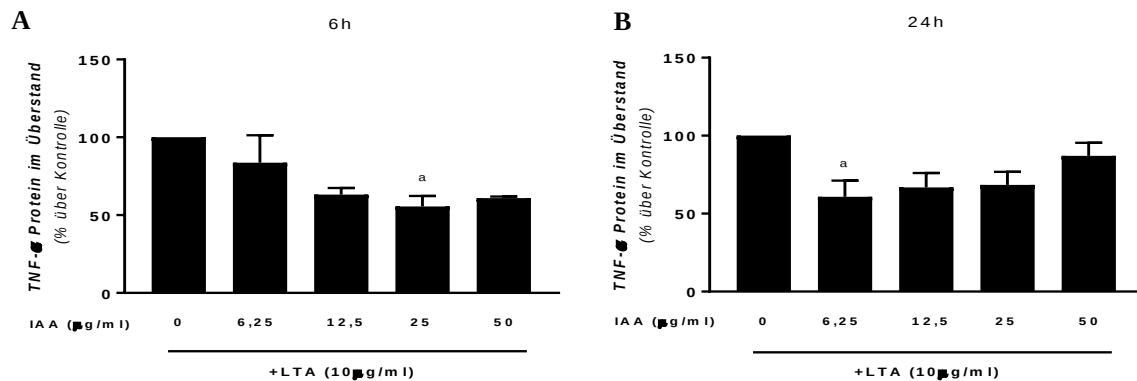


Abbildung 9: Einfluss eines IAA-reichen Extrakts auf die TNF-α-Konzentration im Zellkulturüberstand von J774A.1, die 6h bzw. 24h mit LTA stimuliert wurden. Die Vorbehandlung mit dem IAA-reichen Extrakt fand eine Stunde vor der Stimulation mit LTA statt. Werte dargestellt als Mittelwerte ± SEM und in % über Kontrolle; a: $p < 0,05$ im Vergleich zu LTA-stimulierten Zellen; $n = 3$
IAA: Iso-α-Säure, LTA: Lipoteichonsäure, TNF-α: Tumornekrosefaktor-α

IL-6

Die Inkubation mit einem IAA-reichen Extrakt reduzierte die IL-6-Freisetzung der Zellen im Vergleich zu LTA-stimulierten Zellen dosisabhängig 6h und 24h nach der LTA-Behandlung. Aufgrund der Streuung innerhalb der Gruppen erreichten nur die Konzentrationen 25 µg/ml bzw. 50 µg/ml das Signifikanzniveau. Nach 24-stündiger LTA-Stimulation konnte zusätzlich ein signifikanter Effekt auf die IL-6-Freisetzung bei Applikation von 12,5µg/ml IAA festgestellt werden (Abbildung 10A,B).

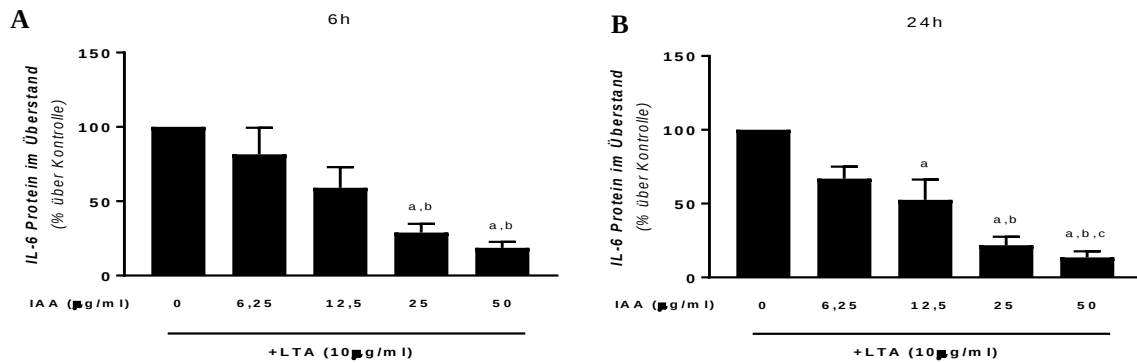


Abbildung 10: Einfluss eines IAA-reichen Extrakts auf die IL-6-Konzentration im Zellkulturüberstand von J774A.1, die 6h bzw. 24h mit LTA stimuliert wurden. Die Vorbehandlung mit dem IAA-reichen Extrakt fand eine Stunde vor der Stimulation mit LTA statt. Werte dargestellt als Mittelwerte $\pm$ SEM und in % über Kontrolle; a: $p < 0,05$ im Vergleich zu LTA-stimulierten Zellen, b: $p < 0,05$ im Vergleich zu 6,25µg/ml IAA inkubierten, LTA-stimulierten Zellen, c: $p < 0,05$ im Vergleich zu 12,5µg/ml IAA inkubierten, LTA-stimulierten Zellen; $n = 4$ bzw. 3
IAA: Iso- α -Säure, IL-6: Interleukin-6, LTA: Lipoteichonsäure

Nitrit

Es konnte kein Effekt eines IAA-reichen Extrakts (6,25µg/ml IAA - 50µg/ml IAA) auf die NO_x-Freisetzung in J774A.1 Zellen festgestellt werden, die 6h mit LTA stimuliert wurden (Daten nicht gezeigt). Aufgrund der geringen Anzahl an Versuchsdurchführungen können keine statistischen Aussagen zu den Nitrit-Konzentrationen nach 24-stündiger LTA-Stimulation getroffen werden. Es ist jedoch eine Tendenz zur Verminderung der NO_x-Freisetzung in Zellen durch IAA ist erkennbar (Abbildung 11).

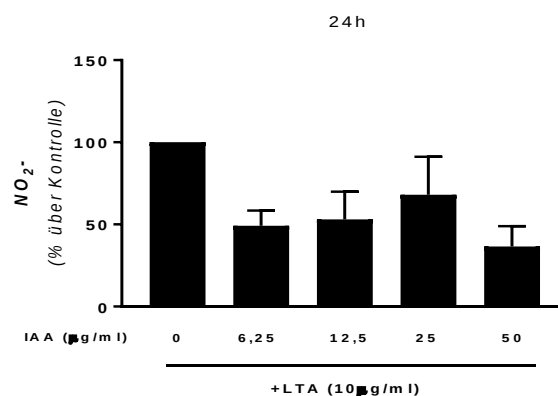


Abbildung 11: Einfluss eines IAA-reichen Extrakts auf die Nitrit-Konzentration im Zellkulturüberstand von J774A.1, die 24h mit LTA stimuliert wurden. Die Vorbehandlung mit dem IAA-reichen Extrakt fand eine Stunde vor der Stimulation mit LTA statt. Werte dargestellt als Mittelwerte $\pm$ SEM und in % über Kontrolle; $n = 2$
IAA: Iso- α -Säure, LTA: Lipoteichonsäure, NO₂⁻: Nitrit

In Abbildung 12 sind die Nitrit-Konzentrationen in J774A.1 Zellüberständen nach 48-stündiger LTA-Stimulation dargestellt. Es konnte eine dosisabhängige Reduktion der LTA-

vermittelten NO_x-Freisetzung in J774A.1 Zellen, denen ein IAA-reicher Extrakt in steigenden Konzentrationen (12 bzw. 25 bzw. 50 µg/ml IAA) appliziert wurde, festgestellt werden, wobei die Inkubation mit der niedrigsten Konzentration des IAA-reichen Extrakts (6,25 µg/ml IAA) die NO_x-Freisetzung auf etwa ein Drittel der LTA-stimulierten Kontrolle (35,75%) reduzierte. Eine signifikante Abnahme der Nitrit-Konzentration konnte durch die Inkubation mit IAA-reichen Extrakt der beiden höchsten Konzentrationen (25 µg/ml bzw. 50 µg/ml IAA) ermittelt werden, verglichen mit LTA-stimulierten Zellen bzw. LTA-stimulierten, 12,5 µg/ml IAA-inkubierten Zellen.

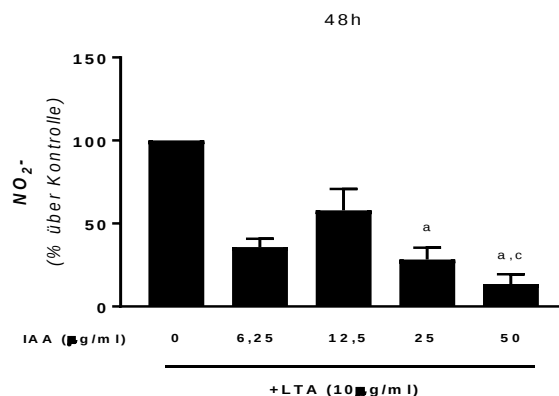


Abbildung 12: Einfluss eines IAA-reichen Extrakts auf die Nitrit-Konzentration im Zellkulturüberstand von J774A.1, die 48h mit LTA stimuliert wurden. Die Vorbehandlung mit dem IAA-reichen Extrakt fand eine Stunde vor der Stimulation mit LTA statt. Werte dargestellt als Mittelwerte ± SEM und in % über Kontrolle; a: p<0,05 im Vergleich zu LTA-stimulierten Zellen, c: p<0,05 im Vergleich zu LTA-stimulierten, 12,5 µg/ml IAA inkubierten Zellen; n= 4

IAA: Iso-α-Säure, LTA: Lipoteichonsäure, NO₂⁻: Nitrit

4.3 Effekte unterschiedlicher Konzentrationen des p38 Aktivators Anisomycin und eines IAA-reichen Extrakts auf die LTA-induzierte Zytokin- und NO_x-Synthese im Zellkulturüberstand von J774A.1

Um den molekularen Mechanismus, der dem immunmodulierenden Potential der IAA zugrundeliege könnte, näher zu untersuchen, wurden die Zellen vor der Behandlung mit einem IAA-reichen Extrakt und LTA mit dem p38 Aktivator Anisomycin behandelt. Basierend auf den in Abbildung 9B dargestellten Ergebnissen wurde 1,562 µg/ml und 6,25 µg/ml IAA als Dosis gewählt.

TNF-α

Die Inkubation mit einem IAA-reichen Extrakt (1,56 µg/ml bzw. 6,25 µg/ml IAA) resultiert nach 6-stündiger LTA-Stimulation in einer verminderten TNF-α-Expression im Vergleich

zu LTA-stimulierten Zellen, jedoch konnte hier das Signifikanzniveau von 0,05 nicht erreicht werden (Abbildung 13A,B).

Die TNF- α -Konzentration ist nach primärer Inkubation der Zellen mit 1ng/ml Anisomycin geringfügig höher als bei Zellen, die mit LTA und IAA-reichem Extrakt (6,25 μ g/ml IAA) behandelt wurden (Abbildung 13B). Dieser Effekt konnte nicht bei einer Inkubation mit einer geringeren IAA-Konzentration (1,56 μ g/ml) gezeigt werden. Eine Inkubation mit 5ng/ml Anisomycin steigerte die TNF- α -Expression signifikant im Vergleich zu den Zellen, die nicht oder mit 1ng/ml Anisomycin inkubiert wurden.

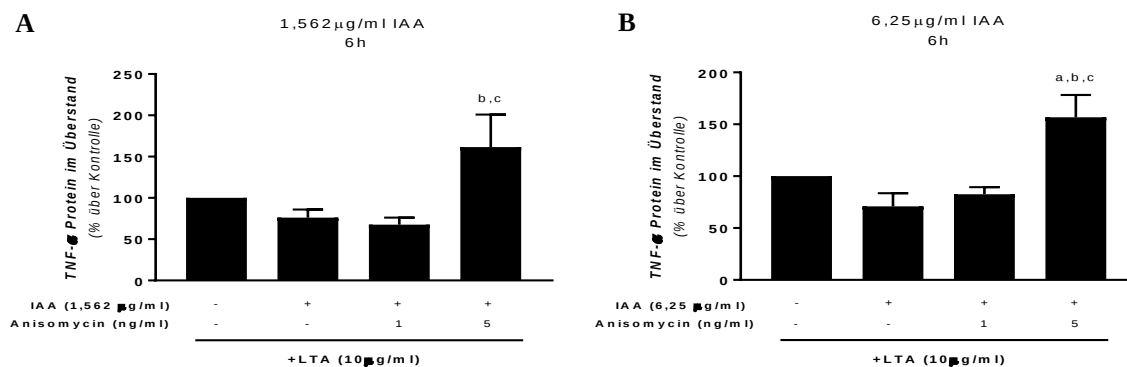


Abbildung 13: Einfluss eines IAA-reichen Extrakts (1,562 μ g/ml (A) bzw. 6,25 μ g/ml (B)) auf die TNF- α -Konzentration im Zellkulturüberstand von J774A.1, die mit Anisomycin (1 ng/ml bzw. 5ng/ml) vorbehandelt und 6h mit LTA stimuliert wurden. Die Vorbehandlung mit Anisomycin und dem IAA-reichen Extrakt fand eine Stunde vor der Stimulation mit LTA statt. Werte dargestellt als Mittelwerte $\pm$ SEM und in % über Kontrolle. a: $p < 0,05$ im Vergleich zu LTA-stimulierten Zellen, b: $p < 0,05$ im Vergleich zu IAA inkubierten, LTA-stimulierten Zellen c: $p < 0,05$ im Vergleich zu IAA + 1 ng/ml Anisomycin inkubierten, LTA-stimulierten Zellen; $n = 4$

IAA: Iso- α -Säure, LTA: Lipoteichonsäure, TNF- α : Tumornekrosefaktor- α

Nach 24-stündiger LTA-Stimulation war die TNF- α -Konzentration im Überstand der Zellen, die mit IAA-reichem Extrakt und LTA behandelt wurden, im Trend niedriger als bei Zellen, die nur mit LTA aktiviert wurden ($p = 0,093$, Abbildung 14A). Bei einer IAA-Konzentration von 6,25 μ g/ml (Abbildung 14B) war eine signifikante TNF- α Reduktion nachzuweisen, die in mit Anisomycin vorbehandelten Zellen nicht nachweisbar war. Eine weitere Steigerung der TNF- α -Proteinkonzentration im Überstand durch eine höhere Anisomycin Konzentration (5ng/ml) konnte nach 24h nicht beobachtet werden (Daten nicht gezeigt).

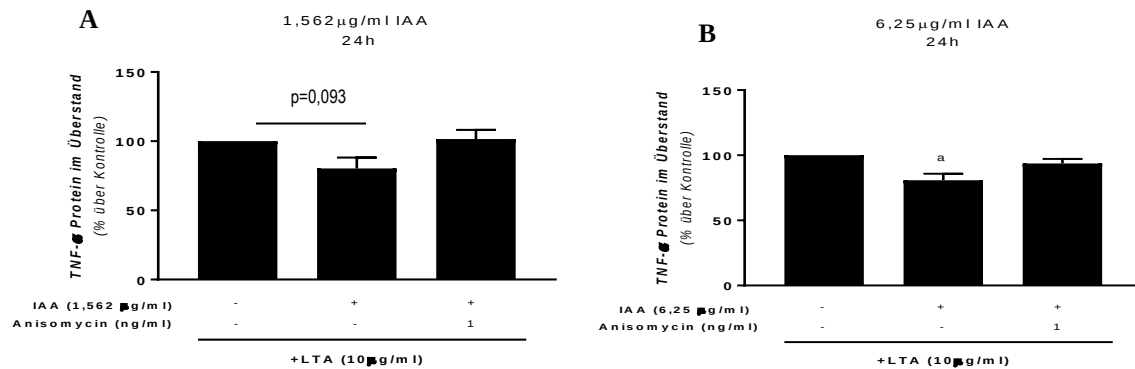


Abbildung 14: Einfluss eines IAA-reichen Extrakts (1,562µg/ml (A) bzw. 6,25µg/ml (B)) auf die TNF-α-Konzentration im Zellkulturüberstand J774A.1, die mit Anisomycin (1ng/ml) vorbehandelt und 24h mit LTA stimuliert wurden. Die Vorbehandlung mit Anisomycin und dem IAA-reichen Extrakt fand eine Stunde vor der Stimulation mit LTA statt. Werte dargestellt als Mittelwerte ± SEM und in % über Kontrolle; a: $p < 0,05$ im Vergleich zu LTA-stimulierten Zellen; $n = 4$ bzw. 5
IAA: Iso-α-Säure, LTA: Lipoteichonsäure, TNF-α: Tumornekrosefaktor-α

IL-6

Die IL-6-Konzentration im Überstand war nach 6-stündiger LTA-Stimulation tendenziell verringert in Zellen, die zuvor mit IAA-reichem Extrakt inkubiert wurden, verglichen mit Zellen, die lediglich mit LTA stimuliert wurden. Diese Tendenz ist bei beiden IAA-Konzentrationen sichtbar (Abbildung 15A,B); das Signifikanzniveau von $p < 0,05$ wird im statistischen Vergleich jedoch nicht erreicht. Die Inkubation mit Anisomycin vor Behandlung mit einer niedrigen IAA-Konzentration erhöht die IL-6-Freisetzung in den Zellüberstand gegenüber Zellen, die keiner Anisomycin Inkubation unterlaufen sind. Diese Zunahme ist sowohl bei geringerer als auch höherer Anisomycin Konzentration (1ng/ml bzw. 5ng/ml) zu sehen (Abbildung 15A). Aufgrund einer niedrigen Anzahl an Versuchswiederholungen ($n=2$) besteht eine relativ hohe Streuung der Werte, weswegen eine Trenderkennung hier nicht aussagekräftig wäre.

Die Inkubation von Zellen mit 1ng/ml Anisomycin und 6,25µg/ml IAA zeigte nur eine minimale Erhöhung der IL-6-Konzentration im Zellkulturüberstand nach 6-stündiger LTA Stimulation. Bei Erhöhung der Anisomycin Konzentration (5ng/ml) war eine signifikante Zunahme der IL-6-Konzentration feststellbar, verglichen mit Zellen, denen ein IAA-reicher Extrakt und LTA appliziert wurde (Abbildung 15B).

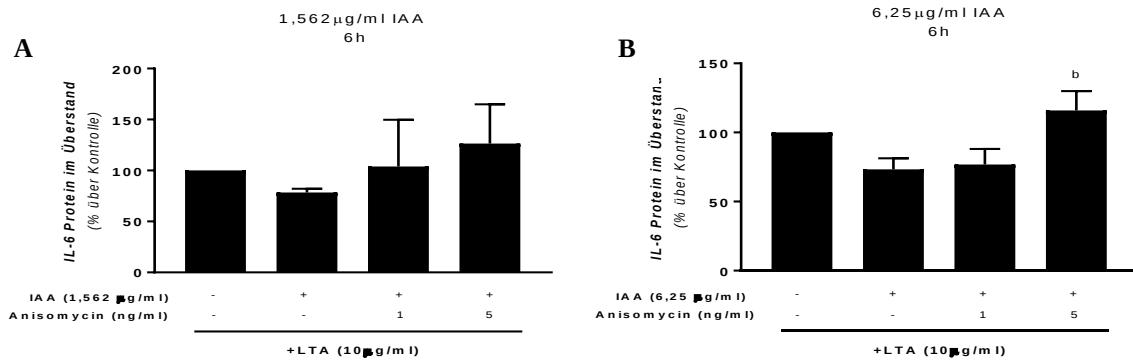


Abbildung 15: Einfluss eines IAA-reichen Extrakts (1,562µg/ml (A) bzw. 6,25µg/ml (B)) auf die IL-6-Konzentration im Zellkulturüberstand J774A.1, die mit Anisomycin (1ng/ml bzw. 5ng/ml) vorbehandelt und 6h mit LTA stimuliert wurden. Die Vorbehandlung mit Anisomycin und dem IAA-reichen Extrakt fand eine Stunde vor der Stimulation mit LTA statt. Werte dargestellt als Mittelwerte $\pm$ SEM und in % über Kontrolle; b: $p < 0,05$ im Vergleich zu 6,25µg/ml IAA-inkubierten, LTA-stimulierten Zellen; n=2 bzw.4

IAA: Iso- α -Säure, IL-6: Interleukin-6, LTA: Lipoteichonsäure

Nach 24-stündiger LTA-Stimulation ist nur eine minimale Abnahme der IL-6-Konzentration im Überstand von Zellen, die mit einem IAA-reichen Extrakt (1,56µg/ml IAA) inkubiert wurden, verglichen mit Zellen, die lediglich mit LTA aktiviert wurden, festzustellen (Abbildung 16). Die Inkubation mit Anisomycin zeigte keinen Einfluss auf die IL-6-Konzentration in den Zellüberständen verglichen mit der alleinigen IAA-Extrakt Inkubation. Eine höhere IAA-Konzentration (6,25µg/ml) sowie eine höhere Anisomycin Konzentration (5ng/ml) zeigten keinen Effekt auf die IL-6-Konzentration im Zellüberstand (Daten nicht gezeigt).

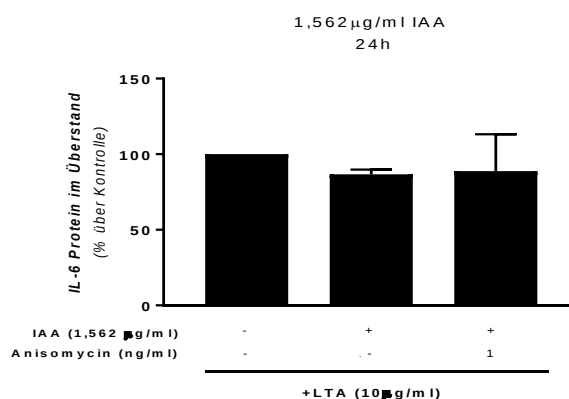


Abbildung 16: Einfluss eines IAA-reichen Extrakts (1,562µg/ml) auf die IL-6-Konzentration im Zellkulturüberstand von J774A.1, die mit Anisomycin (1ng/ml) vorbehandelt und 24h mit LTA stimuliert wurden. Die Vorbehandlung mit Anisomycin und dem IAA-reichen Extrakt fand eine Stunde vor der Stimulation mit LTA statt. Werte dargestellt als Mittelwerte $\pm$ SEM und in % über Kontrolle; n=5

IAA: Iso- α -Säure, IL-6: Interleukin-6, LTA: Lipoteichonsäure

Nitrit

Die Behandlung der Zellen mit einem IAA-reichem Extrakt (1,562µl bzw. 6,25µg/ml IAA) resultierte in einer verminderten LTA-vermittelten NO_x-Freisetzung, wobei bei einer Inkubation mit der höheren IAA-Konzentration eine signifikante Reduktion beobachtet wurde (Abbildung 17A,B). Die Behandlung mit Anisomycin hob den dämpfenden Effekt des IAA-reichen Extrakts auf: die Nitrit- Konzentration erreichte bzw. überstieg das Niveau der Kontrolle. Die Zunahme der Nitrit-Konzentration durch die Anisomycin Behandlung verglichen mit den LTA-stimulierten Zellen konnte als signifikant beurteilt werden (Abbildung 17B).

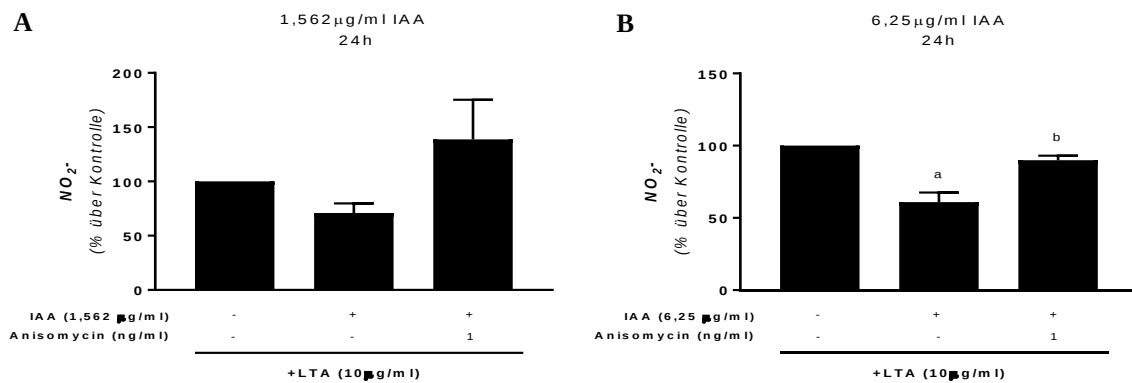


Abbildung 17: Einfluss eines IAA-reichen Extrakts (1,562µg/ml (A) bzw. 6,25µg/ml (B)) auf die Nitrit-Konzentration im Zellkulturüberstand von J774A.1, die mit Anisomycin (1ng/ml) vorbehandelt und 24h mit LTA stimuliert wurden. Die Vorbehandlung mit Anisomycin und IAA-reichem Extrakt fand eine Stunde vor der Stimulation mit LTA statt. Werte dargestellt als Mittelwerte ± SEM und in % über Kontrolle; a: p<0,05 im Vergleich zu LTA-stimulierten Zellen, b: p<0,05 im Vergleich zu 6,25µg/ml IAA-inkubierten, LTA-stimulierten Zellen; n=5 bzw. 4

IAA: Iso-α-Säure, LTA: Lipoteichonsäure, NO₂⁻: Nitrit

5 Diskussion

Die Senkung der globalen Krankheitslast bakterieller Infektionen stellt ein elementares Ziel der Gesundheitssysteme dar. 2019 konnten über 7 Millionen Todesfälle weltweit auf Infektionen mit 33 bakteriellen Krankheitserregern zurückgeführt werden, wobei die Mortalitätsrate in einkommensschwachen Regionen der Welt am höchsten ist [21]. Als Komplikation der Infektion kann eine Sepsis auftreten, in deren Anfangsphase sich eine hyperinflammatorische Immunantwort einstellt [46] und die im weiteren Verlauf oftmals tödlich endet [22]. Die Behandlungsmaßnahme der Wahl bei bakteriellen Infektionen sowie einer Sepsis ist nach wie vor der Einsatz von Antibiotika, welcher jedoch auf die Eliminierung des Erregers abzielt [21,24] und sich hinsichtlich entwickelnder Resistenzen der Bakterienstämme als problematisch herausstellen könnte [47]. LTA, ein Zellwandbestandteil grampositiver Bakterien, induziert als Ligand von TLR2 und CD14 intrazelluläre Signalkaskaden, die Transkriptionsfaktoren aktivieren und dadurch eine verstärkte Produktion von proinflammatorischen Zytokinen und NO auslösen [27]. LTA ist als wichtiger Ligand des TLR2 durch Studien bereits etabliert [33,48], jedoch gibt es auch Untersuchungen, die dies in Frage stellen [49,50].

Die Modulation einer Bakterien-vermittelten Entzündungsreaktion, ohne die Immunantwort zur Bekämpfung des Krankheitserregers zu beeinträchtigen, könnte eine ergänzende Behandlungsmöglichkeit darstellen [27,46], wofür bioaktive Pflanzeninhaltsstoffe mehr in den Fokus geraten sind [2]. Die Ergebnisse zahlreicher Studien zeigen ein antiinflammatorisches Potential von Hopfeninhaltsstoffen wie der IAA [2,12,13,17,18]. IAA entsteht durch Isomerisierung der AA während des Bierbrauprozesses. Die Bioverfügbarkeit der AA könnte relevant sein, da der Isomerisierungsschritt zu IAA auch durch mikrosomale Enzyme katalysiert werden könnte [7].

Untersuchungen zu immunmodulierenden Eigenschaften von Hopfeninhaltsstoffen im menschlichen Organismus zeigten bislang einen suppressiven Effekt auf die Bakterien-vermittelte Freisetzung proinflammatorischer Parameter in Immunzellen [13, unveröffentlichte Daten].

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss von IAA in Form eines IAA-reichen Extrakts auf die LTA-induzierte Immunreaktion in Monozyten, isoliert aus dem Vollblut von gesunden Personen, die zuvor IAA aufgenommen haben, *ex vivo* sowie auf die LTA-vermittelte Entzündungsreaktion im J774A.1 Zellkulturmodell untersucht. In allen

Versuchen, die im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführt wurden, wurde IAA in Form eines IAA-reichen Extrakts (Isohop® 30% w/w) verwendet.

5.1 Einfluss der einmaligen oralen Aufnahme eines IAA-reichen Extrakts auf die LTA-vermittelte Stimulation von humanen Monozyten *ex vivo*

In der vorliegenden Masterarbeit führt die einmalige, orale Aufnahme eines IAA-reichen Extrakts zu einer verminderten Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen in mit LTA-stimulierten Monozyten *ex vivo*. Durch die Aufnahme von 15mg bzw. 90mg IAA, was auch durch moderaten Konsum von gängigen Biersorten (250ml - 1000ml) erreicht wird, wurde sowohl die TNF- α als auch die IL-6-Freisetzung in einer Probandin reduziert. Ein immunsuppressiver Effekt von 15mg bzw. 90mg IAA konnte auch nach 6h noch nachgewiesen werden.

Unveröffentlichte Daten der Arbeitsgruppe Bergheim zeigten ebenfalls eine verminderte Synthese proinflammatorischer Zytokine in isolierten, humanen Immunzellen *ex vivo* nach einer einmaligen, oralen Aufnahme eines IAA-reichen Extrakts und LTA bzw. LPS-Stimulation. Nach Aufnahme von 15mg IAA in Form eines IAA-reichen Extrakts wurde eine gesenkte LTA bzw. LPS-vermittelte IL-6 und Interleukin-1 β -Freisetzung in isolierten PBMCs gesunder Proband:innen ermittelt, verglichen mit der Freisetzung nach Aufnahme des Placebos. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass bereits eine einmalige Aufnahme eines IAA-reichen Extrakts die Bakterien-vermittelte Immunantwort in isolierten PBMCs abschwächt.

Weiters zeigten Ergebnisse von Desai et al. eine immunsuppressive Wirkung von META060 in PBMCs eines Probanden [13]. META060 ist eine definierte Mischung aus THIAA Verbindungen, die am 1,3-Cyclopentadion unterschiedlich substituiert sind. 2h, 4h und 6h nach der Aufnahme von 940mg META060 wurde eine reduzierte LPS-vermittelte TNF- α und IL-6-Synthese *ex vivo* in isolierten PBMC eines Probanden festgestellt [13]. In der Interpretation des Studienergebnis von Desai et al. im vorliegenden Kontext muss der Unterschied in der Studienintervention - IAA-reicher Extrakt und META060 - berücksichtigt werden. Im Unterschied zu eigenen Untersuchungen wurde LPS als Zellstimulans verwendet; LTA und LPS zeigen jedoch ähnliche pathogene Eigenschaften [27] und teilen sich bis auf den TLR den Signalweg [36].

Insgesamt geben die vorliegenden Ergebnisse weitere Hinweise auf einen Teil der immunsuppressiven Wirkung von IAA im menschlichen Organismus. Zwar kann die übermäßige Hemmung einer Immunantwort die Krankheitsschwere bzw. den Genesungsverlauf möglicherweise negativ beeinflussen [51], jedoch könnte eine gezielte Verminderung der Immunreaktion als Ansatzpunkt in der Prävention und Behandlung inflammatorischer Erkrankungen genutzt werden [42].

Basierend auf den eigenen Ergebnissen lässt sich eine mehrstündige Wirkung des IAA-reichen Extrakts im menschlichen Organismus vermuten; die Wirkungsdauer muss in weiteren Studien mit einer größeren Teilnehmer:innenanzahl weiter untersucht werden. Der immunsuppressive Effekt konnte in der zweiten Probandin nur teilweise gezeigt werden. Der Einfluss von oraler IAA-Aufnahme in verschiedenen Dosen auf eine LTA-vermittelte Immunantwort in Monozyten zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Aufnahme sollte mit einer größeren Teilnehmer:innenanzahl wiederholt werden, um genauere Aussagen treffen zu können sowie Hinweise zu unterschiedlich starken protektiven Wirkungen der verschiedenen IAA-Dosen zu untersuchen. Weiters sollte der Effekt von wiederholtem Konsum des IAA-reichen Extrakts ermittelt werden. Die Stimulation mit bakteriellen Bestandteilen fand in der durchgeführten Humanstudie *ex vivo* statt; inwiefern sich ein protektiver Effekt von IAA in der Immunreaktion auch in Personen, die bereits an einer (grampositiven) bakteriellen Infektion leiden, zeigt, sollte in weiteren Studien untersucht werden.

5.2 Antiinflammatorischer Effekt eines IAA-reichen Extrakts auf die LTA-induzierte Freisetzung von inflammatorischen Mediatoren in J774A.1

Ausgehend von der ermittelten antiinflammatorischen Aktivität der IAA in humanen Immunzellen *ex vivo* nach Aufnahme von IAA in Form eines IAA-reichen Extrakts (15mg, 45mg, 90mg IAA), wurde überprüft, ob eine antientzündliche Wirkung auch *in vitro* feststellbar ist. Die Ergebnisse eigener Untersuchungen im J774A.1 Zellkulturmodell zeigten größtenteils eine dosisabhängige Senkung der LTA-vermittelten Freisetzung der proinflammatorischen Zytokine TNF- α und IL-6 durch eine Behandlung mit 6,25 μ g/ml-50 μ g/ml IAA. Neben der verminderten LTA-induzierten Freisetzung der Zytokine TNF- α und IL-6 konnte in den eigenen Untersuchungen eine reduzierte NOx-Produktion in J774A.1 Zellen nach IAA-Behandlung und 48-stündiger LTA-Stimulation festgestellt werden.

Die reduzierte Synthese von IL-6 nach Behandlung von Zellen mit IAA konnte bereits in einer Studie von van Cleemput et al. nachgewiesen werden. L929sA Fibroblasten sezernierten nach einer 1-stündigen Behandlung mit 50µM IAA und Stimulation mit TNF- α weniger IL-6 verglichen mit Zellen, die nur mit TNF- α stimuliert wurden [2]. Van Cleemput et al. konnten weiters zeigen, dass die Reduktion inflammatorischer Parameter auf Ebene der Transkription stattfindet; die mRNA Expression von IL-6 sowie TNF- α wurde nach IAA-Inkubation in L929sA Fibroblasten dosisabhängig inhibiert [2].

Die verminderte NO_x-Freisetzung in J774A.1 Zellen gibt Hinweise auf eine reduzierte Aktivierung der murinen Makrophagen durch LTA nach einer IAA-Behandlung [30]. Die Reduktion der NO_x-Freisetzung in J774A.1 Zellen nach Inkubation mit einem IAA-reichen Extrakt wurde bereits in Hege et al., allerdings für LPS, beschrieben [17]. Ergebnisse von Hege et al. zeigten geringere Nitritkonzentrationen in den Zellüberständen von J774A.1 nach Inkubation mit einem IAA-reichen Extrakt (25µg/ml IAA) und 18-stündiger LPS-Stimulation im Vergleich zu Zellen, die nur mit LPS stimuliert wurden [17]. Zwar wurde als Zellstimulans dabei LPS und nicht - wie in der vorliegenden Arbeit LTA – verwendet, jedoch zeigen LPS und LTA ähnliche pathogene Eigenschaften [27] und teilen sich bis auf den TLR den Signalweg [36]. Untersuchungen von Desai et al. [13] sowie Konda et al. [18] zeigten eine Reduktion der Nitritkonzentration in Zellüberständen auch mit reduzierter IAA. Nach einer 1-stündigen Inkubation mit 1-20µg/ml META060, einer definierten Mischung unterschiedlich substituierter THIAA Verbindungen, und LPS-Stimulation, konnte eine dosisabhängige, signifikante Reduktion der Nitritkonzentration in Zellüberständen von RAW 264.7 Makrophagen gemessen werden [13]. Auch die 1-stündige Inkubation mit 10µg/ml bzw. 20µg/ml reduzierter IAA und LPS-Stimulation von RAW 264.7 Makrophagen senkte die Nitritkonzentration dosisabhängig und signifikant [18].

Bisherige Untersuchungen [2,12,13,17,18] und eigene Versuchsergebnisse deuten insgesamt auf einen antiinflammatorischen Effekt der IAA, hier verwendet in Form eines IAA-reichen Extrakts, in einer Bakterien-vermittelten Entzündungsreaktion im Zellkulturmodell hin.

5.3 Effekte des p38 Aktivators Anisomycin und eines IAA-reichen Extrakts auf die LTA-induzierte Zytokin- und NOx-Synthese in J774A.1

Um den zugrundeliegenden molekularen Mechanismus, durch den die IAA antiinflammatorische Aktivität bewirkt, zu untersuchen, wurde der Effekt einer primären Anisomycin Behandlung vor IAA-Inkubation und LTA-Stimulation auf die Immunantwort im J774A.1 Zellkulturmodell ermittelt. Anisomycin ist ein Aktivator der p38 Kinase im MAPK-Signalweg. MAPK, inklusive p38, sind in die Expression proinflammatorischer Mediatoren, u.a. durch Aktivierung des Transkriptionsfaktor AP-1, involviert [26]; ein antiinflammatorischer Effekt der IAA durch Beeinflussung der MAPK-Kaskade wurde bislang nur wenig untersucht.

Die antiinflammatorische Aktivität der IAA konnte in Studien bisher auf die Hemmung einer NFκB-abhängigen sowie AP-1-abhängigen Genexpression zurückgeführt werden [2,13]. Die Transkriptionsfaktoren NFκB und AP-1 aktivieren eine Vielzahl an Genen, die in einer Immunreaktion integriert sind. NFκB beeinflusst die Genexpression proinflammatorischer Parameter wie die Zytokine TNF-α, IL-6 und die Enzyme iNOS und COX-2 [52–54]. AP-1 wird durch die MAPK-Kaskade aktiviert und reguliert die Expression zahlreicher Gene, unter anderem die Expression von Chemokinen und Zytokinen [38] wie IL-6 [40]. Durch Stimuli wie bakterielle Toxine, oxidativen Stress und proinflammatorische Zytokine werden die Transkriptionsfaktoren aktiviert; proinflammatorische Mediatoren haben wiederum Einfluss auf die Translokation ebendieser Transkriptionsfaktoren [2,38]. Möglicherweise gibt es eine gegenseitige Beeinflussung von NFκB und AP-1 [38]. Weitere Mechanismen, die im Zusammenhang mit einer antiinflammatorischen Aktivität der IAA beschrieben wurden, sind die Hemmung der iCOX-2 [12,13] sowie die Inhibition des JNK-Signalwegs [41].

Desai et al. konnten zeigen, dass die META060, eine definierte Mischung unterschiedlich substituierter THIAA Verbindungen, die Aktivierung des Transkriptionsfaktor NFκB hemmt, was eine inhibierte Expression NFκB-abhängiger Gene, zur Folge hat [13]. Weiters wurde gezeigt, dass META060 keinen Einfluss auf Kinasen (IRAK1, IRAK4, TAK1, TAB), die mit dem NFκB Signalweg assoziiert sind, hat, jedoch Kinasen der Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K)-Kaskade, die ebenfalls in der Aktivierung von NFκB resultiert, dosisabhängig hemmt [13]. Hinweise für die Reduktion proinflammatorischer Parameter aufgrund der Hemmung NFκB-abhängiger Genexpression durch Hopfenbittersäuren werden auch in einer Studie von van Cleemput et al. dargestellt [2].

Die Involvierung des Transkriptionsfaktor AP-1 im Wirkmechanismus der IAA konnte in einer Studie von van Cleemput et al. nachgewiesen werden. Durch Behandlung von Zellen mit IAA konnte eine dosisabhängige Hemmung der Genexpression AP-1-gesteuerter Gene gezeigt werden [2]. Weiters konnte im THP-1 Zellmodell eine Aktivierung der Transkriptionsfaktoren AP-1 und NF κ B durch Stimulation mit LPS bzw. TNF- α nachgewiesen werden; die Aktivierung der Transkriptionsfaktoren war nach einer Vorbehandlung der Zellen mit 20 μ g/ml META060 vergleichsweise reduziert [55]. In einer weiteren Studie wurde nach Inkubation mit Humulon eine stark gehemmte DNA-Bindung von AP-1 sowie eine dosisabhängige Reduktion der p38 Phosphorylierung in Hautzellen von Mäusen gezeigt [56].

Die Ergebnisse eigener Untersuchungen zeigen die Aufhebung des antiinflammatorischen Effekts der IAA durch die Vorbehandlung der Zellen mit einem p38 Aktivator. Die Vorbehandlung von J774A.1 Zellen mit 5ng/ml Anisomycin machte den Effekt von IAA (1,562 μ g/ml; 6,25 μ g/ml) auf die TNF- α -Freisetzung nach 6-stündiger LTA-Stimulation rückgängig. Ähnliche Ergebnisse konnten auch in der Freisetzung von IL-6 ermittelt werden. Anisomycin in niedriger Konzentration hob weiters den dämpfenden Effekt von IAA (6,25 μ g/ml) auf die NO-Synthese auf. Diese Ergebnisse könnten als Hinweis für einen antiinflammatorischen Effekt der IAA durch die Beeinflussung der p38-Kinase im MAPK-Signalweg, unabhängig der NF κ B Kaskade, gesehen werden. Die Suppression der Transkriptionsfaktoren AP-1 [38], NF κ B sowie der MAPK könnte ein sinnvoller Ansatz in der Therapie inflammatorischer Prozesse sein, da dadurch eine Senkung entzündlicher Zytokinen erreicht werden könnte [54,57]. Durch welche konkreten Mechanismen eine p38 Aktivierung möglicherweise den antiinflammatorischen Effekt der IAA aufheben kann, sollte in weiteren Studien untersucht werden.

Insgesamt weisen die Ergebnisse der Humanstudie sowie Untersuchungen im J774A.1 Zellkulturmodell auf eine immunsuppressive Wirkung von IAA in ernährungsphysiologisch relevanten Dosen hin. Ergebnisse der Humanstudie geben Hinweise auf die Wirkung der IAA für einige Stunden. Ein antiinflammatorischer Effekt der IAA, der die LTA-vermittelte Freisetzung proinflammatorischer Zytokine und NO $_x$ reduzierte, wurde in J774A.1 Zellen nachgewiesen; der dämpfende Effekt wurde durch Anisomycin, ein Aktivator der MAPK p38, weitgehend aufgehoben.

6 Zusammenfassung

Bakterielle Infektionen und die schwerwiegende Komplikation Sepsis zählen zu den häufigsten Todesursachen weltweit. Die Pathogenese einer Sepsis konnte zwar bisher nicht vollständig geklärt werden, bekannt ist jedoch, dass es zu einer Fehlregulation der Immunantwort und einem sogenannten Zytokinsturm (übermäßige Produktion von Zytokinen) kommt, was zur Schädigung des körpereigenen Gewebes führen kann. Grampositive Bakterien lösen eine Entzündungsreaktion aus, indem Toll-like Rezeptoren 2 auf den Zellen des angeborenen Immunsystems einen Zellwandbestandteil der Bakterien, die Lipoteichonsäure (LTA), detektieren. Die Modulation einer Immunreaktion stellt einen Angriffspunkt in der Behandlung und Prävention inflammatorischer Erkrankungen dar. Iso- α -Säure (IAA), eine aus dem Hopfen gewonnene Bittersäure, zeigte in Studien eine antiinflammatorische Wirkung, wobei bislang nur wenige Untersuchungen im menschlichen Organismus, vor allem mit ernährungsphysiologisch relevanten Mengen, durchgeführt wurden. Der molekulare Wirkmechanismus von IAA sowie die Wirkungsdauer sind bislang ebenfalls nicht vollständig geklärt.

Ziel der Arbeit war es zu untersuchen, ob IAA in Dosen, wie sie auch in 250ml – 1000ml Bier vorkommen, einen Einfluss auf eine LTA-induzierte Entzündungsreaktion hat und welche Mechanismen hierbei von Bedeutung sein könnten. Hierzu wurde eine Pilotstudie bei gesunden, jungen Personen durchgeführt, die einmalig IAA in Form eines IAA-reichen Extrakts aufnahmen (15mg IAA, 45mg IAA, 90mg IAA, Placebo) und aus deren Vollblut anschließend Monozyten isoliert und mit LTA stimuliert wurden. Der Einfluss eines IAA-reichen Extrakts in der LTA-vermittelten Entzündungsreaktion wurde darüber hinaus im J774A.1 Zellkulturmodell untersucht.

Effekte des IAA-reichen Extrakts auf eine Entzündungsreaktion wurden durch die Messung der proinflammatorischen Zytokine Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) und Interleukin-6 (IL-6) sowie Nitrit in den Zellüberständen der humanen Monozyten und der J774A.1 Zellen mittels ELISA bzw. Griess Assay beurteilt.

Insgesamt weisen die Ergebnisse der Humanstudie darauf hin, dass eine einmalige orale Aufnahme von IAA (15mg bzw. 90mg) in Form eines IAA-reichen Extrakts die LTA-induzierte TNF- α und IL-6-Freisetzung in Monozyten für einige Stunden mindern kann, was Hinweise für eine immunsuppressive Wirkung über einige Stunden bei gesunden Probandinnen gibt. Weiters wurde in J774A.1 Zellen eine verminderte LTA-induzierte TNF- α , IL-6 sowie NO $_x$ -Freisetzung nach der Inkubation mit 6,25-50 μ g/ml IAA

nachgewiesen. Durch die Vorbehandlung der J774A.1 Zellen mit einem Aktivator der p38 Kinase konnte der antiinflammatorische Effekt der IAA teilweise aufgehoben werden.

Im Rahmen weiterer Untersuchungen sollte die Wirkung einer längerfristigen bzw. wiederholten oralen Aufnahme von IAA auf inflammatorische Mediatoren ermittelt sowie weitere Untersuchungen zum molekularen Mechanismus der IAA durchgeführt werden.

Summary

Bacterial infections and sepsis, a severe complication of bacterial infections, are still leading causes in regard to mortality worldwide. It is known that sepsis is a dysregulation of the immune response, but its pathogenesis has not yet been elucidated thoroughly. Due to this dysregulation, there is a so-called cytokine storm, an excessive release of proinflammatory cytokines, which possibly leads to tissue damage. Gram-positive bacteria trigger an inflammatory response by Toll-like receptors 2 on cells of the innate immune system binding a cell wall component, lipoteichoic acid (LTA). A modulation of the immune response could impose new results to treat or even prevent inflammatory diseases. Iso- α -acid (IAA), a hop-derived bitter acid, is considered to show anti-inflammatory effects, although only a few investigations, especially with nutritionally relevant quantities, have been carried out in the human organism to date. The underlying molecular mechanism and the duration of action have also not been fully clarified.

The aim of the present work was to investigate whether IAA in doses such as those found in 250ml – 1000ml beer, affect an LTA-induced inflammatory response and which mechanisms might be of importance. For this purpose, a pilot study was conducted in healthy, young subjects who ingested a single dose of IAA in the form of an IAA-rich extract (15mg IAA, 45mg IAA, 90mg IAA, placebo) and from whose whole blood monocytes were subsequently isolated and stimulated with LTA. The influence of an IAA-rich extract in the LTA-mediated inflammatory response was further investigated in the J774A.1 cell culture model.

Effects of an IAA-rich extract on the inflammatory response were assessed by measuring the proinflammatory cytokines tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interleukin-6 (IL-6) as well as NO_x in cell supernatants of human monocytes and J774A.1 cells by ELISA and Griess assay, respectively.

Overall, the results of the human study indicate that a single oral intake of IAA (15mg or 90mg) in the form of an IAA-rich extract can attenuate LTA-induced TNF- α and IL-6 release in monocytes for several hours, providing evidence for an immunosuppressive effect for several hours in healthy subjects. Furthermore, decreased LTA-induced TNF- α , IL-6 and NO_x release was detected in J774A.1 cells after an incubation with 6,25-50 μ g/ml IAA. Pretreatment of J774A.1 cells with an activator of p38 kinase partially abrogated the anti-inflammatory effect of IAA.

Further studies should determine the effect of prolonged or repeated oral ingestion of IAA on inflammatory mediators. Additional inquiries into the molecular mechanism of IAA are needed.

Literaturverzeichnis

- [1] M. Ponticelli, D. Russo, I. Faraone, C. Sinisgalli, F. Labanca, L. Lela, L. Milella, The Promising Ability of *Humulus lupulus* L. Iso- α -acids vs. Diabetes, Inflammation, and Metabolic Syndrome: A Systematic Review, *Molecules*. 26 (2021) 954. <https://doi.org/10.3390/molecules26040954>.
- [2] M. Van Cleemput, A. Heyerick, C. Libert, K. Swerts, J. Philippé, D. De Keukeleire, G. Haegeman, K. De Bosscher, Hop bitter acids efficiently block inflammation independent of GR α , PPAR α , or PPAR γ , *Mol. Nutr. Food Res.* 53 (2009) 1143–1155. <https://doi.org/10.1002/mnfr.200800493>.
- [3] M. Lin, D. Xiang, X. Chen, H. Huo, Role of Characteristic Components of *Humulus lupulus* in Promoting Human Health, *J. Agric. Food Chem.* 67 (2019) 8291–8302. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b03780>.
- [4] M.D. Flythe, I.A. Kagan, Y. Wang, N. Narvaez, Hops (*Humulus lupulus* L.) Bitter Acids: Modulation of Rumen Fermentation and Potential As an Alternative Growth Promoter, *Front. Vet. Sci.* 4 (2017) 131. <https://doi.org/10.3389/fvets.2017.00131>.
- [5] J.I. Alonso-Esteban, J. Pinela, L. Barros, A. Ćirić, M. Soković, R.C. Calhelha, E. Torija-Isasa, M. De Cortes Sánchez-Mata, I.C.F.R. Ferreira, Phenolic composition and antioxidant, antimicrobial and cytotoxic properties of hop (*Humulus lupulus* L.) Seeds, *Ind. Crops Prod.* 134 (2019) 154–159. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.04.001>.
- [6] J. Patzak, A. Henychová, J. Matoušek, Developmental regulation of lupulin gland-associated genes in aromatic and bitter hops (*Humulus lupulus* L.), *BMC Plant Biol.* 21 (2021) 534. <https://doi.org/10.1186/s12870-021-03292-z>.
- [7] K. Cattoor, M. Dresel, L. De Bock, K. Boussery, J. Van Bocxlaer, J.-P. Remon, D. De Keukeleire, D. Deforce, T. Hofmann, A. Heyerick, Metabolism of Hop-Derived Bitter Acids, *J. Agric. Food Chem.* 61 (2013) 7916–7924. <https://doi.org/10.1021/jf300018s>.
- [8] D. De Keukeleire, Fundamentals of beer and hop chemistry, *Quím. Nova*. 23 (2000) 108–112. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422000000100019>.
- [9] L.N. Rodda, D. Gerostamoulos, O.H. Drummer, Pharmacokinetics of Iso- α -Acids in Volunteers Following the Consumption of Beer, *J. Anal. Toxicol.* 38 (2014) 354–359. <https://doi.org/10.1093/jat/bku038>.
- [10] T. Lea, Caco-2 Cell Line, in: K. Verhoeckx, P. Cotter, I. López-Expósito, C. Kleiveland, T. Lea, A. Mackie, T. Requena, D. Swiatecka, H. Wichers (Eds.), *Impact Food Bioact. Health*, Springer International Publishing, Cham, 2015: pp. 103–111. https://doi.org/10.1007/978-3-319-16104-4_10.

- [11] K. Cattoor, J.-P. Remon, K. Boussery, J. Van Bocxlaer, M. Bracke, D. De Keukeleire, D. Deforce, A. Heyerick, Bioavailability of hop-derived iso- α -acids and reduced derivatives, *Food Funct.* 2 (2011) 412. <https://doi.org/10.1039/c1fo10009b>.
- [12] A.J. Hall, J.G. Babish, G.K. Darland, B.J. Carroll, V.R. Konda, R.H. Lerman, J.S. Bland, M.L. Tripp, Safety, efficacy and anti-inflammatory activity of rho iso-alpha-acids from hops, *Phytochemistry*. 69 (2008) 1534–1547. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2008.02.001>.
- [13] A. Desai, V.R. Konda, G. Darland, M. Austin, K.S. Prabhu, J.S. Bland, B.J. Carroll, M.L. Tripp, META060 inhibits multiple kinases in the NF- κ B pathway and suppresses LPS – mediated inflammation in vitro and ex vivo, *Inflamm. Res.* 58 (2009) 229–234. <https://doi.org/10.1007/s00011-008-8162-y>.
- [14] K. Obara, M. Mizutani, Y. Hitomi, H. Yajima, K. Kondo, Isohumulones, the bitter component of beer, improve hyperglycemia and decrease body fat in Japanese subjects with prediabetes, *Clin. Nutr.* 28 (2009) 278–284. <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2009.03.012>.
- [15] H. Yajima, E. Ikeshima, M. Shiraki, T. Kanaya, D. Fujiwara, H. Odai, N. Tsuboyama-Kasaoka, O. Ezaki, S. Oikawa, K. Kondo, Isohumulones, Bitter Acids Derived from Hops, Activate Both Peroxisome Proliferator-activated Receptor α and γ and Reduce Insulin Resistance, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 33456–33462. <https://doi.org/10.1074/jbc.M403456200>.
- [16] G.R. Siragusa, G.J. Haas, P.D. Matthews, R.J. Smith, R.J. Buhr, N.M. Dale, M.G. Wise, Antimicrobial activity of lupulone against *Clostridium perfringens* in the chicken intestinal tract jejunum and caecum, *J. Antimicrob. Chemother.* 61 (2008) 853–858. <https://doi.org/10.1093/jac/dkn024>.
- [17] M. Hege, F. Jung, C. Sellmann, C. Jin, D. Ziegenhardt, C. Hellerbrand, I. Bergheim, An iso- α -acid-rich extract from hops (*Humulus lupulus*) attenuates acute alcohol-induced liver steatosis in mice, *Nutrition*. 45 (2018) 68–75. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2017.07.010>.
- [18] V.R. Konda, A. Desai, G. Darland, J.S. Bland, M.L. Tripp, Rho iso-alpha acids from hops inhibit the GSK-3/NF-kappaB pathway and reduce inflammatory markers associated with bone and cartilage degradation, *J. Inflamm. Lond. Engl.* 6 (2009) 26. <https://doi.org/10.1186/1476-9255-6-26>.
- [19] Y. Chen, W. Cui, X. Li, H. Yang, Interaction Between Commensal Bacteria, Immune Response and the Intestinal Barrier in Inflammatory Bowel Disease, *Front. Immunol.* 12 (2021) 761981. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.761981>.

- [20] J.M. Kwiecinski, A.R. Horswill, Staphylococcus aureus bloodstream infections: pathogenesis and regulatory mechanisms, *Curr. Opin. Microbiol.* 53 (2020) 51–60. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2020.02.005>.
- [21] K.S. Ikuta, L.R. Swetschinski, G. Robles Aguilar, F. Sharara, T. Mestrovic et al, Global mortality associated with 33 bacterial pathogens in 2019: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019, *The Lancet.* 400 (2022) 2221–2248. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(22\)02185-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(22)02185-7).
- [22] K.E. Rudd, S.C. Johnson, K.M. Agesa, K.A. Shackelford, D. Tsoi, D.R. Kievlan, D.V. Colombara, K.S. Ikuta, N. Kissoon, S. Finfer, C. Fleischmann-Struzek, F.R. Machado, K.K. Reinhart, K. Rowan, C.W. Seymour, R.S. Watson, T.E. West, F. Marinho, S.I. Hay, R. Lozano, A.D. Lopez, D.C. Angus, C.J.L. Murray, M. Naghavi, Global, regional, and national sepsis incidence and mortality, 1990–2017: analysis for the Global Burden of Disease Study, *The Lancet.* 395 (2020) 200–211. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(19\)32989-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(19)32989-7).
- [23] M. Singer, C.S. Deutschman, C.W. Seymour, M. Shankar-Hari, D. Annane, M. Bauer, R. Bellomo, G.R. Bernard, J.-D. Chiche, C.M. Coopersmith, R.S. Hotchkiss, M.M. Levy, J.C. Marshall, G.S. Martin, S.M. Opal, G.D. Rubenfeld, T. Van Der Poll, J.-L. Vincent, D.C. Angus, The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3), *JAMA.* 315 (2016) 801. <https://doi.org/10.1001/jama.2016.0287>.
- [24] X. Wang, Z. Xia, H. Wang, D. Wang, T. Sun, E. Hossain, X. Pang, Y. Liu, Cell-membrane-coated nanoparticles for the fight against pathogenic bacteria, toxins, and inflammatory cytokines associated with sepsis, *Theranostics.* 13 (2023) 3224–3244. <https://doi.org/10.7150/thno.81520>.
- [25] M. Rohde, The Gram-Positive Bacterial Cell Wall, *Microbiol Spectr.* 7 (2019). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.GPP3-0044-2018>.
- [26] L. Oliveira-Nascimento, P. Massari, L.M. Wetzler, The Role of TLR2 in Infection and Immunity, *Front. Immunol.* 3 (2012). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2012.00079>.
- [27] I. Ginsburg, Role of lipoteichoic acid in infection and inflammation, *Lancet Infect. Dis.* 2 (2002) 171–179. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(02\)00226-8](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(02)00226-8).
- [28] D.D. Chaplin, Overview of the immune response, *J. Allergy Clin. Immunol.* 125 (2010) S3–S23. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2009.12.980>.
- [29] K.R. Balka, D. De Nardo, Understanding early TLR signaling through the Myddosome, *J. Leukoc. Biol.* 105 (2019) 339–351. <https://doi.org/10.1002/JLB.MR0318-096R>.
- [30] T. Jayakumar, C.-J. Huang, T.-L. Yen, C.-W. Hsia, J.-R. Sheu, P.S. Bhavan, W.-C. Huang, C.-Y. Hsieh, C.-H. Hsia, Activation of Nrf2 by Esculetin Mitigates

Inflammatory Responses through Suppression of NF- κ B Signaling Cascade in RAW 264.7 Cells, *Molecules*. 27 (2022) 5143. <https://doi.org/10.3390/molecules27165143>.

[31] S.V. Zubova, N.I. Kosyakova, S.V. Grachev, I.R. Prokhorenko, *Rhodobacter capsulatus* PG Lipopolysaccharide Blocks the Effects of a Lipoteichoic Acid, a Toll-Like Receptor 2 Agonist, *Acta Naturae*. 14 (2023) 69–74. <https://doi.org/10.32607/actanaturae.11747>.

[32] C. Behm, A. Blufstein, J. Gahn, N. Noroozkhan, A. Moritz, X. Rausch-Fan, O. Andrukhov, Soluble CD14 Enhances the Response of Periodontal Ligament Stem Cells to Toll-Like Receptor 2 Agonists, *Mediators Inflamm*. 2019 (2019) 1–13. <https://doi.org/10.1155/2019/8127301>.

[33] N.W.J. Schröder, S. Morath, C. Alexander, L. Hamann, T. Hartung, U. Zähringer, U.B. Göbel, J.R. Weber, R.R. Schumann, Lipoteichoic Acid (LTA) of *Streptococcus pneumoniae* and *Staphylococcus aureus* Activates Immune Cells via Toll-like Receptor (TLR)-2, Lipopolysaccharide-binding Protein (LBP), and CD14, whereas TLR-4 and MD-2 Are Not Involved, *J. Biol. Chem*. 278 (2003) 15587–15594. <https://doi.org/10.1074/jbc.M212829200>.

[34] S. Rajpoot, K.K. Wary, R. Ibbott, D. Liu, U. Saqib, T.L.M. Thurston, M.S. Baig, TIRAP in the Mechanism of Inflammation, *Front. Immunol*. 12 (2021) 697588. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.697588>.

[35] I. Belhaouane, E. Hoffmann, M. Chamaillard, P. Brodin, A. Machelart, Paradoxical Roles of the MAL/Tirap Adaptor in Pathologies, *Front. Immunol*. 11 (2020) 569127. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.569127>.

[36] V. Wahn, Defekte von IRAK-1 und TIRAP, *Pädiatr. Allergol*. 2 (2020) 27–29.

[37] L. Zeyen, O.M. Seternes, I. Mikkola, Crosstalk between p38 MAPK and GR Signaling, *Int. J. Mol. Sci*. 23 (2022) 3322. <https://doi.org/10.3390/ijms23063322>.

[38] P.B. Bhosale, H.H. Kim, A. Abusaliya, P. Vetrivel, S.E. Ha, M.Y. Park, H.J. Lee, G.S. Kim, Structural and Functional Properties of Activator Protein-1 in Cancer and Inflammation, *Evid. Based Complement. Alternat. Med*. (2022) 1–8. <https://doi.org/10.1155/2022/9797929>.

[39] Y. Liang, Y. Zhou, P. Shen, NF- κ B and its regulation on the immune system, *Cell. Mol. Immunol*. 1 (2004) 343–350.

[40] W. Vanden Berghe, L. Vermeulen, G. De Wilde, K. De Bosscher, E. Boone, G. Haegeman, Signal transduction by tumor necrosis factor and gene regulation of the inflammatory cytokine interleukin-6, *Biochem. Pharmacol*. 60 (2000) 1185–1195. [https://doi.org/10.1016/S0006-2952\(00\)00412-3](https://doi.org/10.1016/S0006-2952(00)00412-3).

- [41] A. Mahli, A. Koch, K. Fresse, T. Schiergens, W.E. Thasler, C. Schönberger, I. Bergheim, A. Bosserhoff, C. Hellerbrand, Iso-alpha acids from hops (*Humulus lupulus*) inhibit hepatic steatosis, inflammation, and fibrosis, *Lab. Invest.* 98 (2018) 1614–1626. <https://doi.org/10.1038/s41374-018-0112-x>.
- [42] S. Khatua, J. Simal-Gandara, K. Acharya, Understanding immune-modulatory efficacy in vitro, *Chem. Biol. Interact.* 352 (2022) 109776. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2021.109776>.
- [43] World Medical Association, World Medical Association Declaration of Helsinki: Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects, *JAMA.* 310 (2013) 2191. <https://doi.org/10.1001/jama.2013.281053>.
- [44] P. Ralph, M.A. Moore, K. Nilsson, Lysozyme synthesis by established human and murine histiocytic lymphoma cell lines., *J. Exp. Med.* 143 (1976) 1528–1533. <https://doi.org/10.1084/jem.143.6.1528>.
- [45] S.D. Gan, K.R. Patel, Enzyme Immunoassay and Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, *J. Invest. Dermatol.* 133 (2013) 1–3. <https://doi.org/10.1038/jid.2013.287>.
- [46] M. Garzón-Tituaña, M.A. Arias, J.L. Sierra-Monzón, E. Morte-Romea, L. Santiago, A. Ramirez-Labrada, L. Martinez-Lostao, J.R. Paño-Pardo, E.M. Galvez, J. Pardo, The Multifaceted Function of Granzymes in Sepsis: Some Facts and a Lot to Discover, *Front. Immunol.* 11 (2020) 1054. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01054>.
- [47] C.J.L. Murray, K.S. Ikuta, F. Sharara, L. Swetschinski et al, Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis, *The Lancet.* 399 (2022) 629–655. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)02724-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)02724-0).
- [48] M.J. Jimenez-Dalmaroni, N. Xiao, A.L. Corper, P. Verdino, G.D. Ainge, D.S. Larsen, G.F. Painter, P.M. Rudd, R.A. Dwek, K. Hoebe, B. Beutler, I.A. Wilson, Soluble CD36 Ectodomain Binds Negatively Charged Diacylglycerol Ligands and Acts as a Co-Receptor for TLR2, *PLoS ONE.* 4 (2009) e7411. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0007411>.
- [49] M.T. Nguyen, F. Götz, Lipoproteins of Gram-Positive Bacteria: Key Players in the Immune Response and Virulence, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 80 (2016) 891–903. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00028-16>.
- [50] M. Hashimoto, K. Tawaratsumida, H. Kariya, A. Kiyohara, Y. Suda, F. Krikae, T. Kirikae, F. Götz, Not Lipoteichoic Acid but Lipoproteins Appear to Be the Dominant Immunobiologically Active Compounds in *Staphylococcus aureus*, *J. Immunol.* 177 (2006) 3162–3169. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.177.5.3162>.
- [51] F. Bouchard-Boivin, O. Désy, S. Béland, I. Houde, S.A. De Serres, TNF- α Production by Monocytes Stimulated With Epstein-Barr Virus–Peptides as a Marker of

Immunosuppression-Related Adverse Events in Kidney Transplant Recipients, *Kidney Int. Rep.* 4 (2019) 1446–1453. <https://doi.org/10.1016/j.ekir.2019.07.007>.

[52] J.I. Beier, C.J. McClain, Mechanisms and cell signaling in alcoholic liver disease, *Biol. Chem.* 391 (2010). <https://doi.org/10.1515/bc.2010.137>.

[53] T.A. Libermann, D. Baltimore, Activation of Interleukin-6 Gene Expression through the NF- κ B Transcription Factor, *Mol. Cell. Biol.* 10 (1990) 2327–2334. <https://doi.org/10.1128/mcb.10.5.2327-2334.1990>.

[54] J.-B. Kim, A.-R. Han, E.-Y. Park, J.-Y. Kim, W. Cho, J. Lee, E.-K. Seo, K.-T. Lee, Inhibition of LPS-Induced iNOS, COX-2 and Cytokines Expression by Poncirin through the NF- κ B Inactivation in RAW 264.7 Macrophage Cells, *Biol. Pharm. Bull.* 30 (2007) 2345–2351. <https://doi.org/10.1248/bpb.30.2345>.

[55] A. Desai, G. Darland, J.S. Bland, M.L. Tripp, V.R. Konda, META060 attenuates TNF- α -activated inflammation, endothelial–monocyte interactions, and matrix metalloproteinase-9 expression, and inhibits NF- κ B and AP-1 in THP-1 monocytes, *Atherosclerosis*. 223 (2012) 130–136. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2012.05.004>.

[56] J.-C. Lee, J.K. Kundu, D.-M. Hwang, H.-K. Na, Y.-J. Surh, Humulone inhibits phorbol ester-induced COX-2 expression in mouse skin by blocking activation of NF- κ B and AP-1: I κ B kinase and c-Jun-N-terminal kinase as respective potential upstream targets, *Carcinogenesis*. 28 (2007) 1491–1498. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgm054>.

[57] W. Zhong, Y. Wu, X. Xie, X. Zhou, M. Wei, L.-W. Soromou, X. Ci, D. Wang, Phillyrin attenuates LPS-induced pulmonary inflammation via suppression of MAPK and NF- κ B activation in acute lung injury mice, *Fitoterapia*. 90 (2013) 132–139. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2013.06.003>.

Anhang

I. Herstellung des Studiengetränks

Materialien: siehe auch 2.1. Studiengetränk

- Isohop®
- Stilles Wasser
- Staubzucker
- Bindino, pflanzliches Bindemittel
- Zitronensirup zuckerfrei, naturtrüb
- Zitronensäure
- Analysenwaage
- Zentrifugenröhren,
- Pipettierhilfe macro
- Serologische Pipette, 25ml

500ml stillem Wasser wurden 10ml Zitronensirup beigelegt. Für das Placebogetränk wurden 16g Staubzucker, 1g Zitronensäure eingewogen, sowie mit 2 Löffeln Bindino ergänzt. Das Gemenge wurde gründlich vermischt; davon wurden 2,45g in ein Falcon überführt. Im nächsten Schritt wurden 50ml stilles Wasser hinzugelegt und das Falcon geschwenkt, bis sich die Substanzen in Lösung befanden. Für die Interventionen mit IAA wurden je nach Intervention 47µl, 139µl, 279µl IAA-reicher Extrakt (Isohop®) zum Placebogetränk supplementiert.

II. ELISA

A. Herstellung des PBS (1L)

1,149876g Na_2HPO_4 (di-Natriumhydrogenphosphat)

0,2013g KCl (Kaliumchlorid)

8,00628g NaCl (Natriumchlorid)

0,204135g KH_2PO_4 (Kaliumdihydrogenphosphat)

Sämtliche Substanzen werden an der Analysenwaage in ein Becherglas eingewogen. Das Becherglas wird mit destilliertem Wasser unter das Endvolumen befüllt und mit einem Magnetührstäbchen auf den Magnetrührer gestellt, bis die Substanzen vollständig gelöst sind. Die Lösung wird mit destilliertem Wasser auf das Endvolumen gebracht. Mittels pH-Meter wird der pH-Wert der Lösung (7,2 – 7,4) überprüft und gegebenenfalls mit Salzsäure (HCl) bzw. Natriumlauge (NaOH) adjustiert. Anschließend wird die Lösung auf der Sicherheitswerkbank unter sterilen Bedingungen gefiltert (0,22 μm). PBS wird bei 4°C gelagert.

B. Herstellung des Waschpuffers

Für die Herstellung des Waschpuffers werden einer gegebenen Menge PBS 0,05% Vol. Tween®20 hinzugefügt und der Puffer dann geschwenkt. Der Waschpuffer wird bei 4°C gelagert.

C. Herstellung des RD

Für die Herstellung des RD werden einer gegebenen Menge PBS 1% Vol. BSA hinzugefügt. Die Lösung wird mit einem Magnetührstäbchen auf den Magnetrührer bis zur vollständigen Lösung des BSA in PBS gestellt. RD wird bei 4°C gelagert.

D. Verdünnungen des Capture Antibody und des Detection Antibody

Der jeweilige Capture Antibody wird in 0,5ml PBS gelöst und zu je 50 μl aliquotiert. Capture Antibody Aliquots lagern bei -20°C. Für die Durchführung eines ELISA wird die Stocklösung des Capture Antibody auf die Arbeitskonzentration (laut COA) verdünnt (Tabelle 7/Tabelle 8).

Tabelle 7: ELISA human: Verdünnungen und Konzentrationen des Capture Antibody

ELISA	Arbeitskonzentration [µg/ml]	Verdünnung Stocklösung
TNF- α	4	1:120
IL-6	2	1:120

Tabelle 8: ELISA mouse: Verdünnungen und Konzentrationen des Capture Antibody

ELISA	Arbeitskonzentration [µg/ml]	Verdünnung Stocklösung
TNF- α	0,8	1:125
IL-6	2	1:120

Der jeweilige Detection Antibody wird in 1ml RD gelöst und zu je 100µl aliquotiert. Detection Antibody Aliquots lagern bei -20°C. Für die Durchführung eines ELISA wird die Stocklösung des Detection Antibody auf die Arbeitskonzentration laut COA (1:60) verdünnt.

E. Verdünnung des Standards

Der jeweilige Standard wird in 0,5ml RD bzw. destilliertem Wasser gelöst und zu je 50µl aliquotiert. Standard Aliquots lagern bei -80°C. Für 1ml Standard A wird die Stocklösung auf die Arbeitskonzentration (laut COA) verdünnt. Für die Standards B-G werden je 500µl RD bzw. destilliertes Wasser in Mikroreagiergefäße vorgelegt und Standard A seriell 1:2 weiter verdünnt. Die Verdünnung und Konzentrationen der Standards sind Tabelle 9/Tabelle 10 aufgelistet.

Tabelle 9: ELISA human: Verdünnungen und Konzentrationen des Standards

ELISA	Verdünnung Stocklösung	Konzentrationen Standard [pg/ml]							
TNF- α	1:220	A	B	C	D	E	F	G	H
		1000	500	250	125	62,5	31,3	15,6	0
IL-6	1:333	A	B	C	D	E	F	G	H
		600	300	150	75	37,5	18,75	9,38	0

Tabelle 10: ELISA mouse: Verdünnungen und Konzentrationen des Standards

ELISA	Verdünnung Stocklösung	Konzentrationen Standard [pg/ml]							
TNF- α	1:130	A	B	C	D	E	F	G	H
		2000	1000	500	250	125	62,5	31,2	0
IL-6	1:85	A	B	C	D	E	F	G	H
		1000	500	250	125	62,5	31,1	15,6	0

Eidesstaatliche Erklärung

Hiermit bestätige ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel benutzt habe. Alle Ausführungen, die fremden Quellen wörtlich oder sinngemäß entnommen wurden, sind kenntlich gemacht.

Ich erkläre weiterhin, dass die vorliegende Arbeit nur bei der Universität Wien als Prüfarbeit eingereicht wurde und dass die von mir eingereichten Exemplare (ausgedruckt und elektronisch) identisch sind.

Datum: 8. September 2023

Unterschrift: 