



MASTERARBEIT | MASTER'S THESIS

Titel | Title

Untersuchung der Effekte einer oralen Aufnahme unterschiedlicher Dosen von Xanthohumol auf die durch einzelsträngige RNA-Fragmente des SARS-CoV-2 Genoms vermittelte Immunantwort

verfasst von | submitted by

Sanna Wirzenius BSc

angestrebter akademischer Grad | in partial fulfilment of the requirements for the degree of
Master of Science (MSc)

Wien | Vienna, 2024

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. Dipl. oec. troph. Dr. Ina Bergheim
Privatdoz.

Danksagung

Ich möchte mich in erster Linie sehr herzlich bei Frau Prof. Dr. Ina Bergheim für die Aufnahme in ihre Arbeitsgruppe und die Betreuung meiner Masterarbeit bedanken. Vielen Dank für das konstruktive Feedback, sowie die Unterstützung während der Erstellung meiner Arbeit.

Ein besonderer Dank geht an Anja Baumann für die Betreuung der Versuche im Labor und die vielen hilfreichen Tipps beim Verfassen meiner Arbeit. Außerdem möchte ich mich bei Katja Csarman für ihre Hilfestellung, sowie bei der gesamten Arbeitsgruppe für die tolle Arbeitsatmosphäre bedanken.

Ebenso möchte ich mich bei meinen Kommilitonen für die gemeinsame Zeit im Labor und die gegenseitige Motivation bedanken. Insbesondere bedanke ich mich auch bei meinen Mitbewohnerinnen, meinem Freund, Freunden und Familie, die mir jederzeit zur Seite gestanden sind.

Inhalt

Abkürzungsverzeichnis	IV
Abbildungsverzeichnis.....	VI
Tabellenverzeichnis	VII
1 Einleitung	1
1.1 Xanthohumol: Vorkommen, Bioverfügbarkeit und physiologische Wirkungen... 1	
1.1.1 Hopfen und seine Inhaltsstoffe: Xanthohumol..... 1	
1.1.2 Bioverfügbarkeit und physiologische Wirkungen von Xanthohumol 2	
1.2 Das Immunsystem des Menschen	5
1.2.1 Das angeborene Immunsystem: Monozyten und ihre Rolle in der Infektionsabwehr..... 5	
1.2.2 Toll-like Rezeptoren	6
1.3 Virale Infektionen und SARS-CoV-2	8
1.3.1 Virale Infektionen	8
1.3.2 Epidemiologie und Eigenschaften von SARS-CoV-2..... 9	
1.3.3 Rolle von Toll-like Rezeptoren, C-Jun-N-terminale Kinase und CD14 bei SARS-CoV-2	10
1.3.4 Mögliche Effekte von Xanthohumol auf eine SARS-CoV-2 Infektion	11
1.4 Zielsetzung und Fragestellungen der Arbeit	13
2 Materialien	14
2.1 Humanstudie	14
2.1.1 Studiengetränk..... 14	
2.1.2 Blutabnahme	15
2.1.3 Isolation und Stimulation humaner Monozyten..... 15	
2.2 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)	17
2.3 Allgemeine Chemikalien, Geräte und Verbrauchsmaterial	18
2.4 Statistische Auswertung, Software	20
3 Methodik	21
3.1 Humanstudie - Studiendesign	21
3.2 Isolation von Monozyten	23

3.3 Stimulation von Monozyten	25
3.4 ELISA.....	28
3.5 Statistik	29
4 Ergebnisse.....	30
4.1 Einfluss der oralen Aufnahme von Xanthohumol auf die Stimulation von Monozyten mit ssRNA Fragmenten von SCV2 ex vivo: Konzentration von TNF- α , IL-6 und IL-1 β nach 6 h, 24 h und 48 h Stimulation	30
4.2 Einfluss der oralen Aufnahme von verschiedenen Konzentrationen von Xanthohumol auf die Stimulation von Monozyten mit ssRNA Fragmenten von SCV2 ex vivo im Zeitverlauf: Konzentration von TNF- α , IL-6 und IL-1 β nach 6 h Stimulation	33
4.3 Effekte der Zugabe von JNK-Inhibitor und sCD14 auf die Stimulation von Monozyten mit ssRNA Fragmenten von SCV2 ex vivo zu verschiedenen Zeitpunkten: Konzentration von TNF- α , IL-6 und IL-1 β	36
5 Diskussion.....	39
5.1 Einfluss der oralen Aufnahme von Xanthohumol in unterschiedlichen Dosen auf die SCV2-induzierte Freisetzung proinflammatorischer Zytokine im Zellüberstand humaner Monozyten	40
5.2 Einfluss der Zugabe von JNK-Inhibitor und sCD14 auf die SCV2-induzierte Freisetzung proinflammatorischer Zytokine im Zellüberstand humaner Monozyten	42
6 Zusammenfassung.....	45
Summary	47
Literaturverzeichnis.....	49
Anhang	55

Abkürzungsverzeichnis

ACE2	Angiotensin-converting enzyme 2
APC	Antigenpräsentierende Zelle
BMI	Body Mass Index
COA	Certificate of Analysis
CRP	C-reaktives Protein
DPBS	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline
gGT	Gamma-Glutamyl-Transferase
HBS	Hepes-buffered saline
HCl	Salzsäure
HCoV	Humanpathogene Coronavirus-Spezies
HDL	High Density Lipoprotein
IFN β	Interferon β
IFN- γ	Interferon gamma
IL-1 β	Interleukin-1 β
IL-6	Interleukin-6
IRF	Interferon-Regulations-Faktoren
IX	Isoxanthohumol
JNK	C-Jun-N-terminale Kinase
LDL	Low Density Lipoprotein
LPS	Lipopolysaccharide
LTA	Lipoteichonsäure
Mal	MyD88 adapter-like
MAPK	Mitogen-activated protein Kinase
MERS	Middle East respiratory syndrome
MHC	Major Histocompatibility Complex
MyD88	Myeloid differentiation primary response gene 88
NaOH	Natriumhydroxid
NF- κ B	Nuclear factor kappa B
ORF	Open reading frames
PAMP	Pathogen-associated molecular pattern
PBMCs	Periphere mononukleäre Blutzellen

PBS	Phosphate buffered saline
PRR	Pattern recognition receptor
PRRSV	Porcine reproductive and respiratory syndrome virus
RD	Reagent Diluent
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
RT	Raumtemperatur
SARS	Severe acute respiratory syndrome
sCD14	Soluble Cluster of Differentiation 14
SCV2	SARS-CoV-2
SGOT	Serum-Glutamat-Oxalessigsäure-Transaminase
SGPT	Serum-Glutamat-Pyruvat-Transaminase
Streptavidin-HRP	Streptavidin horseradish peroxidase
TIR	Toll/Interleukin-1-Rezeptor
TLR	Toll-like Rezeptor
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
TRAM	Trif-related adaptor molecule
TRIF	TIR-domain-contatining adaptor inducing IFN β
US	Unstimuliert
Veh	Vehikel
XN	Xanthohumol

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Thermische Isomerisierungsreaktion von Xanthohumol zu Isoxanthohumol.	2
Abbildung 2: Toll-like Rezeptor Signalkaskaden.....	7
Abbildung 3: Struktur von SARS-CoV-2.	10
Abbildung 4: Darstellung des Studienablaufs und eines Studientages.	22
Abbildung 5: Trennung des Vollbluts in unterschiedliche Phasen.	24
Abbildung 6: Bestimmung der Gesamtzellzahl der isolierten Monozyten.....	25
Abbildung 7: Stimulation von Monozyten.....	27
Abbildung 8: Pipettierschema für Stimulation von Monozyten.....	27
Abbildung 9: Proteinkonzentrationen von proinflammatorischen Zytokinen im Zellüberstand von humanen Monozyten, die für 6 h, 24 h und 48 h mit 2,5 µg ssRNA Fragmenten von SCV2 stimuliert wurden.....	31
Abbildung 10: Proteinkonzentrationen von proinflammatorischen Zytokinen im Zellüberstand von humanen Monozyten, die nach Aufnahme eines Studiengetränks mit Xanthohumol oder Placebo für 6 h, 24 h und 48 h mit 2,5 µg ssRNA Fragmenten von SCV2 stimuliert wurden.	32
Abbildung 11: Einfluss der oralen Aufnahme des xanthohumolhaltigen Extraktes in unterschiedlichen Dosen im Zeitverlauf auf die Zytokinfreisetzung im Zellüberstand humaner Monozyten, die für 6 h mit 2,5 µg ssRNA Fragmenten von SCV2 stimuliert wurden.	35
Abbildung 12: Proteinkonzentrationen von proinflammatorischen Zytokinen im Zellüberstand von humanen Monozyten, die für 6 h, 24 h und 48 h mit 2,5 µg ssRNA Fragmenten von SCV2 und 10 µM JNK-Inhibitor stimuliert wurden.....	37
Abbildung 13: Proteinkonzentrationen von proinflammatorischen Zytokinen im Zellüberstand von humanen Monozyten, die für 6 h, 24 h und 48 h mit 2,5 µg ssRNA Fragmenten von SCV2 und 500 ng/ml sCD14 stimuliert wurden.	38

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verdünnungen der Zellüberstände für den ELISA	28
Tabelle 2: Arbeitsschritte beim ELISA	29
Tabelle 3: Charakteristika und klinische Parameter der Studienteilnehmer*innen ..	33
Tabelle 4: Zusammensetzung des Studiengetränkes für die Humanstudie	55
Tabelle 5: Zusammensetzung von PBS für ELISA	56
Tabelle 6: Zusammensetzung des Waschpuffers für ELISA.....	56
Tabelle 7: Zusammensetzung des Reagent Diluents für ELISA.....	57
Tabelle 8: Verdünnungen des Capture Antibodys für ELISA TNF- α , IL-6 und IL-1 β ...	57
Tabelle 9: Verdünnungen des Detection Antibodys für ELISA TNF- α , IL-6 und IL-1 β . 58	
Tabelle 10: Verdünnungen und Konzentrationen der Standards für ELISA TNF- α , IL-6 und IL-1 β	58
Tabelle 11: Zusammensetzung des RPMI-1640 Zellkulturmediums.....	59
Tabelle 12: Zusammensetzung und Konzentration der SCV2-Lösung	59
Tabelle 13: Zusammensetzung und Konzentration von HBS	60
Tabelle 14: Zusammensetzung und Konzentrationen von JNK-Inhibitor und sCD14. 60	

1 Einleitung

1.1 Xanthohumol: Vorkommen, Bioverfügbarkeit und physiologische Wirkungen

1.1.1 Hopfen und seine Inhaltsstoffe: Xanthohumol

Im Hopfen vorkommende prenylierte Chalkone sind in den letzten Jahren vermehrt in den Vordergrund der Forschung gerückt, da sie verschiedene biologische Effekte auf den Menschen zu haben scheinen. Hopfen, der zur Familie der Cannabinaceae gehört, ist in Mitteleuropa weit verbreitet und wird außerdem in den gemäßigten Regionen der Welt (Nord- und Südamerika, Südafrika, Australien) angebaut. Vorwiegend findet Hopfen als Rohstoff in der Brauindustrie Anwendung, wobei die weiblichen Blütenstände zur Erzeugung des charakteristischen Aromas oder für die Konservierung von Bier eingesetzt werden. Des Weiteren wurde Hopfen schon lange für verschiedene medizinische Zwecke, wie Schlafstörungen oder als Bittermagenmittel verwendet [1].

Vor allem in den weiblichen Blütenständen werden aus den Lupulindrüsen Verbindungen abgesondert, die als Bitterstoffe, Polyphenole und flüchtige Öle klassifiziert werden können [2]. Zu den wichtigsten Verbindungen, die bereits in mehreren Studien bezüglich ihrer physiologischen Wirkungen untersucht wurde, gehört Xanthohumol (XN). XN kann durch thermische Behandlung und einen erhöhten pH-Wert in das Prenylflavonon Isoxanthohumol (IX), wie in Abbildung 1 dargestellt, umgewandelt werden [1].

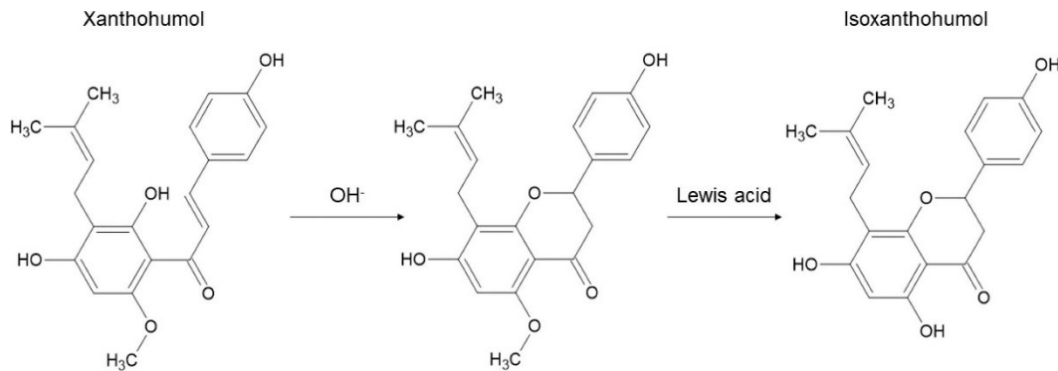


Abbildung 1: Thermische Isomerisierungsreaktion von Xanthohumol zu Isoxanthohumol.
Abbildung aus: Vicente de Andrade Silva et al., 2023 [3].

Die Menge an XN beträgt in trockenen Hopfendolden bis zu einem Prozent, aber aufgrund der thermischen Isomerisierungsreaktion kommt im Bier vorwiegend IX vor. Bier stellt trotzdem die Hauptquelle für XN in der menschlichen Ernährung dar, mit einer Konzentration von 0,3-3,0 mg/l abhängig von der Biersorte, weshalb für die vorliegende Arbeit ein XN-haltiges Hopfenextrakt verwendet wurde [4]. Inzwischen sind weitere Technologien im Bierbrauen entwickelt worden, wodurch auch deutliche höhere Konzentrationen möglich sind [3].

1.1.2 Bioverfügbarkeit und physiologische Wirkungen von Xanthohumol

Untersuchungen von Legette et al. (2014) haben gezeigt, dass bei oraler Aufnahme von XN in pharmakologischen Dosen im Bereich von 20-180 mg, die höchsten Konzentrationen im Plasma nach einer Stunde und zwischen vier und fünf Stunden vorliegen. Dabei waren XN- und IX-Konjugate die dominierenden zirkulierenden Metabolite [5]. In weiteren Studien wurde festgestellt, dass Mäuse, die eine Dosis von 1000 mg/kg Körpergewicht XN erhielten, das XN innerhalb von 48 h in Fäzes und Urin ausgeschieden haben, wovon etwa 89% aus unverändertem XN bestanden [6]. Die Ergebnisse von Tierexperimenten weisen darauf hin, dass die Bioverfügbarkeit von XN bei 33,1% für Dosen von 1,86 mg/kg Körpergewicht und bei 10,8% für höhere Dosen von 16,9 mg/kg Körpergewicht liegt [7]. Die geringe Bioverfügbarkeit stellt daher eine der größten Limitationen bei der Anwendung von XN dar.

Trotz der geringen Bioverfügbarkeit konnten bisher zahlreiche mögliche positive Effekte auf den menschlichen Organismus beobachtet werden. Zunächst könnte XN ein

potenzielles Mittel darstellen, um das metabolische Syndrom, wozu Risikofaktoren, wie Bluthochdruck, Hyperglykämie, Fettleibigkeit, niedrige HDL-Werte und hohe Triglyzeridwerte zählen, zu bekämpfen [8]. In Tiermodellen mit C57BL/6J Mäusen und Wistar-Ratten konnte durch die zusätzliche Gabe von 30-60 mg XN pro kg Körpergewicht zu einer high-fat Diät über 12 Tage bzw. einer high-fat Diät mit 1% XN über 41 Tage die Gewichtszunahme verringert werden [9], [10]. Des Weiteren konnte festgestellt werden, dass eine Dosis von 1,86-16,9 mg XN pro kg Körpergewicht die Plasmaglukosespiegel in Zucker (fa/fa) Ratten senkte und eine Dosis von 10 mg XN pro Liter einer high-fat Diät die Glukoseintoleranz sowie Insulinresistenz in C57BL/6 Mäusen reduzierte [11], [12]. Zusätzlich könnte XN bei der Verhinderung von Atherosklerose eine Rolle spielen, da in CETP-transgenen Mäusen die Cholesterinspiegel in den Arterien durch die Aufnahme einer cholestrolreichen Diät mit 0,05% XN im Vergleich zu einer reinen cholesterolreichen Diät gesenkt wurden [13].

Untersuchungen haben ebenfalls gezeigt, dass XN antiinflammatorische Effekte besitzt [8]. In Untersuchungen hat XN entzündungshemmend gewirkt, indem es die Aktivierung von Nuclear factor kappa B (NF- κ B) in RAW264.7 Makrophagen und in Mäusen, denen eine Dosis von 0,1 mg, 1 mg oder 10 mg XN pro kg Körpergewicht zugeführt wurde, gehemmt hat [14], [15]. Zudem wurde festgestellt, dass eine ex vivo Stimulation mit XN die Ausschüttung von Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) in murinen RAW264.7-Zellen und humanen U937 Monozyten reduziert [16]. In humanen peripheren mononukleären Blutzellen (PBMCs) konnte durch die orale Aufnahme von 0,125 mg XN in Form eines XN-haltigen Hopfenextrakts (75% XN) die Freisetzung weiterer proinflammatorischer Zytokine, wie Interleukin-6 (IL-6) oder Interleukin-1 β (IL-1 β) gedämpft werden [17]. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass XN ein mögliches therapeutisches Mittel für entzündliche Prozesse darstellt.

XN hat aber nicht nur antiinflammatorische Wirkungen, sondern wirkt zusätzlich auch antioxidativ und könnte daher zur Reduzierung von oxidativem Stress beitragen [18]. Die Hemmung von NF- κ B und die Aktivierung der Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) sind mitunter auch für die chemopräventive Wirkung von XN verantwortlich. Wei et al. (2018) konnte zeigen, dass XN in AGS-Zellen die NF- κ B

Signalübertragung hemmt und die ROS-Produktion induziert und somit antikanzerogene Effekte bei Magenkrebs haben könnte [19]. XN hat auch weitere chemopräventive Effekte. In Gliomazellen konnte XN Autophagie induzieren, sowie das Tumorstadium hemmen und in Magenkrebszellen Apoptose induzieren [20], [21].

Außerdem konnten XN auch antivirale Eigenschaften nachgewiesen werden. In vitro hat XN das Wachstum verschiedener RNA- und DNA-Viren, wie das Bovine Virusdiarrhoe-Virus, Cytomegalovirus und Herpes Simplex Virus Typ 1 und 2 eingedämmt [22]. In einer Studie zum PRRSV (Porcine reproductive and respiratory syndrome virus) konnte die Expression von IL-1, IL-6, IL-8 und TNF- α in PRRSV-infizierten oder mit Lipopolysaccharid (LPS) behandelten Alveolarmakrophagen durch XN in Dosen von 10-25 mg/kg Körpergewicht gehemmt werden. Weiters wurden klinische Symptome, die Lungenpathologie und Entzündungsreaktionen im Lungengewebe von PRRSV-infizierten Schweinen durch die Gabe von XN gelindert [23]. Inwiefern diese Ergebnisse jedoch auf den Menschen übertragen werden können und welche Dosen dafür notwendig sind, muss noch weiter untersucht werden.

Neben diesen Eigenschaften konnten bisher auch antiseptische, antibakterielle und thrombozytenaggregationshemmende Effekte ex vivo beobachtet werden [24], [25], [26]. Dies macht XN zu einer interessanten Substanz für die weitere Erforschung therapeutischer Anwendungen.

1.2 Das Immunsystem des Menschen

1.2.1 Das angeborene Immunsystem: Monozyten und ihre Rolle in der Infektionsabwehr

Das menschliche Immunsystem dient dazu den Organismus vor Krankheitserregern sowie körpereigenen pathologisch veränderten Zellen zu schützen. Es besteht aus zwei Hauptkomponenten: dem angeborenen und dem erworbenen Immunsystem [27]. Während das angeborene Immunsystem eine unspezifische Reaktion auf möglicherweise schädliche Fremdkörper auslöst, zeichnet sich das erworbene Immunsystem durch ein ausgeprägtes Gedächtnis und hohe Spezifität aus [28]. Im Folgenden soll das angeborene Immunsystem, sowie die Funktion von Monozyten beschrieben werden, da diese im Fokus der Arbeit stehen.

Das angeborene Immunsystem bildet die erste Schutzbarriere gegen eindringende Fremdkörper und besteht aus verschiedenen Arten von Barrieren. Dazu gehören anatomische Barrieren wie Haut und Schleimhäute, physiologische Barrieren wie Temperatur und pH-Wert, phagozytische Barrieren wie Monozyten und Neutrophile sowie entzündliche Barrieren wie Serumproteine [28]. Zu den Zellen des angeborenen Immunsystems gehören Mastzellen, Granulozyten, Makrophagen und dendritische Zellen [27]. Diese Zellen können Erreger über ihre charakteristischen Merkmale, sogenannte Pathogen-associated molecular patterns (PAMPs), mithilfe von Mustererkennungsrezeptoren (Pattern recognition receptors, PRRs) erkennen [29].

Viele dieser Immunzellen kommen im Blut vor, einschließlich der PBMCs. Unter PBMCs versteht man Blutzellen mit einem runden Zellkern, wozu Lymphozyten, Monozyten und dendritische Zellen gezählt werden. Lymphozyten machen mit 70-90% den größten Anteil aus, während Monozyten nur 10-20% und dendritische Zellen lediglich 1-2% ausmachen. PBMCs lassen sich leicht aus Vollblut isolieren und eignen sich daher zur Anwendung in der immunologischen Forschung [30]. Die zu den PBMCs gehörenden Blutmonozyten sind ursprünglich aus dem Knochenmark stammende Leukozyten und können sich in eigene Untergruppen sowie auch andere Zellen wie Makrophagen oder dendritische Zellen differenzieren. Sie können Phagozytose

durchführen, Zytokine produzieren und als antigenpräsentierende Zelle (APC) fungieren, weshalb sie wesentlich zur Immunabwehr im Menschen beitragen [31].

Andere Immunzellen, wie Mastzellen schütten bei Infektionen Histamin und Heparin aus, welche Inflammation und Wundheilung initiieren, während Granulozyten für die Auslösung einer Inflammation und die Blutgefäßerweiterung, sodass weitere Blutzellen einströmen können, verantwortlich sind [27]. Neutrophile machen die Hälfte der zirkulierenden Leukozyten aus und können Krankheitserreger phagozytieren und abtöten. Sie werden von Makrophagen angelockt, indem diese eine Inflammation durch Ausschüttung von Zytokinen auslösen [29]. Reife Makrophagen differenzieren sich aus zirkulierenden Monozyten und führen ebenfalls Phagozytose durch, sind aber langlebiger und kommen in allen Geweben des Körpers vor [27], [29]. Die antigenpräsentierende Funktion von Makrophagen wird durch interferon-gamma (IFN- γ), das von natürlichen Killerzellen produziert wird, induziert [29]. Ebenfalls zu den APCs gehören die dendritischen Zellen, die gemeinsam mit den Makrophagen die Aktivierung der Zellen des erworbenen Immunsystems auslösen [27].

1.2.2 Toll-like Rezeptoren

Der Organismus reagiert auf Infektionen mit einer Immunantwort, die sowohl das angeborene als auch das erworbene Immunsystem umfasst. Dabei werden Pathogene über PAMPs durch verschiedene Klassen von PRRs erkannt, wozu auch die Toll-like Rezeptoren (TLR) zählen [32].

Insgesamt wurden bisher zehn humane TLRs beschrieben, die entweder auf der Plasmamembran oder endosomal vorkommen können. Auf der Zelloberfläche werden PAMPs von TLR1, 2, 4, 5 und 6 detektiert, während diese im Endosom von TLR3, 7, 8 und 9 erkannt werden [33]. TLRs kommen verschiedenen Immunzellen vor, darunter auch Monozyten [34]. Alle TLRs besitzen extrazelluläre Leucin-reiche Sequenzen und eine Toll/Interleukin-1-Rezeptor (TIR) Domäne [35]. Für die Aktivierung der TLRs sind außerdem weitere Kofaktoren, wie Cluster of Differentiation 14 (CD14), die auf der Zelloberfläche, im endoplasmatischen Retikulum oder direkt mit den TLR-Liganden wirken notwendig [36]. Durch die Dimerisierung der Rezeptoren werden je nach TLR,

wie in Abbildung 2 zu sehen ist, die Adaptorproteine Myeloid differentiation primary response gene 88 (MyD88), MyD88 adapter-like (Mal), TIR-domain-containing adaptor inducing IFN β (TRIF) und Trif-related adaptor molecule (TRAM) rekrutiert. Dabei wird zwischen einem MyD88-abhängigen und MyD88-unabhängigen Weg unterschieden. Die Adaptorproteine starten Signalkaskaden, die zur Aktivierung von NF- κ B, Mitogen-activated protein Kinase (MAPK) und Interferon-Regulations-Faktoren (IRF) führen. Infolge dieser Aktivierung wird die Expression von Interferonen, Zytokinen und Chemokinen induziert [37]. Daher kann eine übermäßige Aktivierung zu einer Störung der Homöostase in Immunzellen führen und das Risiko für entzündliche Erkrankungen erhöhen [35].

Abhängig vom Pathogen werden PAMPs durch unterschiedliche TLRs erkannt. TLR2 und 4 sind vor allem für die Erkennung gram-positiver und -negativer Bakterien bekannt, da sie Lipoteichonsäure (LTA) und LPS erkennen. Dahingegen kann TLR6 nur als Heterodimer mit TLR2 oder 4 fungieren. Die endosomal vorkommenden TLRs sind vor allem für die Erkennung viraler PAMPs bedeutend. Während TLR3 von dsRNA aktiviert wird, werden TLR7/8 von viraler ssRNA und TLR9 von CpG DNA aktiviert [34].

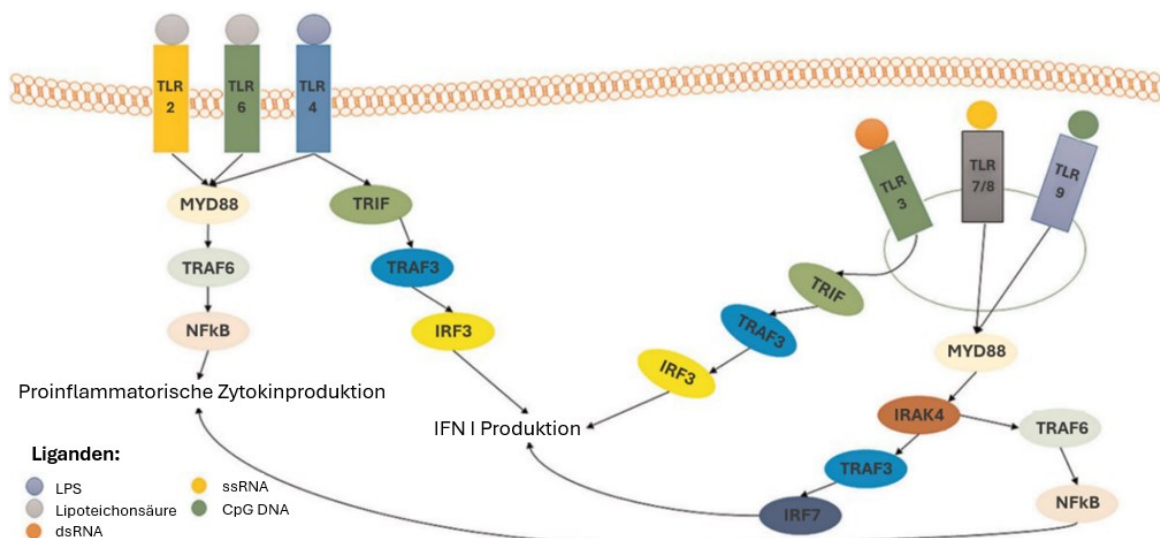


Abbildung 2: Toll-like Rezeptor Signalkaskaden. Die einzelnen TLRs erkennen unterschiedliche Liganden und lösen einen MyD88-abhängigen oder -unabhängigen Signalweg aus. LPS, Lipopolysaccharide; dsRNA, doppelsträngige RNA; ssRNA, einzelsträngige RNA. Modifiziert nach: Khanmohammadi & Rezaei, 2021 [38].

1.3 Virale Infektionen und SARS-CoV-2

1.3.1 Virale Infektionen

Virale Infektionen spielen in der Medizin eine große Rolle, da Viren verschiedenste Krankheitsbilder hervorrufen und epidemiologische Herausforderungen verursachen können. Dabei kommt es zum Eindringen und Vermehren von Viren, wodurch eine Immunantwort im Organismus ausgelöst wird [32].

Die Genome von Viren können sowohl aus DNA als auch aus RNA bestehen, wobei diese einzelsträngig oder doppelsträngig vorkommen können. Viren sind auf Wirtszellen angewiesen und nutzen deren zelluläre Systeme, um ihre eigene Replikation und die Synthese anderer viraler Komponenten zu steuern. Dabei werden Viruspartikel, die als Virionen bezeichnet werden, in der Wirtszelle gebildet. Diese dienen als Transportmittel für die Übertragung des Genoms auf eine neue Wirtszelle oder einen neuen Organismus. Die meisten Viren sind von einem Kapsid umhüllt. Es gibt aber auch Viren, bei denen das Kapsid von einer aus der Wirtszelle stammenden Lipiddoppelschicht umgeben und mit virus-spezifischen Glykoproteinen besetzt ist [32].

Der Replikationszyklus eines Virus beginnt mit dem Eintritt in die Wirtszelle, wobei sich das Virus an die Wirtszelle anheftet und dann in die Zelle eindringt, wo das Genom freigelassen wird. Daraufhin erfolgt die Replikation des viralen Genoms durch die Wirtszelle oder das virale Genom wird in das Erbgut der Wirtszelle eingebaut. Während DNA-Viren ihr Genom im Zellkern des Wirts replizieren und dabei die zelluläre RNA-Polymerase II für die Transkription verwenden, findet die Replikation bei RNA-Viren, wozu auch Coronaviren zählen, typischerweise im Zytoplasma unter Verwendung viraler RNA-abhängiger RNA-Polymerase statt. Die replizierten Genome dienen als Vorlage für die Bildung viraler Proteine, die sich zu Virionen assemblieren. Die Virionen werden anschließend durch Lysis oder Knospung aus der Wirtszelle freigesetzt, sodass weitere Zellen infiziert werden können. Durch die Infektion können zelluläre Schäden durch direkte Zerstörung der Zelle oder durch Veränderung der Zellmorphologie entstehen. Als charakteristisches Merkmal vieler Virusinfektionen gilt die Inaktivierung

der zellulären Proteinsynthese der Wirtszelle. Letztendlich kann die Zellschädigung zu einer klinischen Erkrankung führen [32].

1.3.2 Epidemiologie und Eigenschaften von SARS-CoV-2

Das neuartige Coronavirus, das erstmals 2019 in China auftauchte, hat eine weltweite Pandemie ausgelöst und daher weitreichende Auswirkungen auf Gesellschaft, Wirtschaft und Gesundheitswesen gehabt. Weltweit wurden seit dem Ausbruch bereits über 700 Millionen Fälle gemeldet und über 7 Millionen Todesfälle bestätigt [39].

Coronaviren zählen zu den positive-strängigen ssRNA-Viren. Sie gehören zu der Ordnung *Nidovirales* und zur Unterordnung *Coronavirinae*, wo sie in die Familie *Coronaviridae* eingeordnet sind [40]. Es gibt sieben bekannte humanpathogene Coronavirus-Spezies (HCoV), wobei einige davon weltweit endemisch zirkulieren und in erster Linie milde Erkältungskrankheiten verursachen [41]. Dahingegen sind SARS-CoV (severe acute respiratory syndrome), MERS-CoV (Middle East respiratory syndrome) und SARS-CoV-2 (SCV2) erst vor kurzer Zeit als Zoonosen auf den Menschen übergegangen. Diese Viren sind hochpathogen und können zu schweren Erkrankungen mit tödlichem Verlauf führen [40].

Das virale Genom besteht hauptsächlich aus open reading frames (ORFs), die für die Kodierung von nichtstrukturellen Proteinen für die RNA-Replikation verantwortlich sind. Außerdem kodiert SCV2 für die Strukturproteine Spike-Protein (S), Envelope-Protein (E), Membran-Protein (M) und Nukleokapsid-Protein (N), die in Abbildung 3 abgebildet sind. Das S-Protein wird von dem Virus für den Eintritt in die Wirtszelle genutzt, wobei das transmembranäre Enzym angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) als Rezeptor verwendet wird. SCV2 weist eine höhere Bindungsaffinität zu ACE2 auf als andere SARS-Viren, was eine schnellere Übertragung ermöglicht [42].

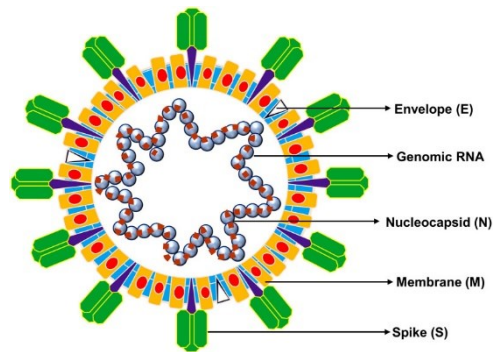


Abbildung 3: Struktur von SARS-CoV-2. Das Genom von SARS-CoV-2 kodiert für die Strukturproteine Spike-Protein (S), Envelope-Protein (E), Membran-Protein (M) und Nukleokapsid-Protein (N). Abbildung aus: Kirtipal et al., 2020 [61].

SCV2 wird von Mensch zu Mensch übertragen, wobei die Übertragung durch Kontakt mit Nasen-, Mund- und Augenschleimhautsekreten der infizierten Person und durch das Einatmen von Viruspartikeln, die bei Husten oder Niesen in die Umgebung gelangen, stattfindet [42]. Bei Infektion sind die am häufigsten vorkommenden Symptome Fieber, Husten, Myalgie und Müdigkeit. Etwas seltener können auch Kopfschmerzen, Hämoptysie und Durchfall auftreten. Weiters wurden auch Dyspnoe, Lymphopenie und Lungenentzündungen, sowie das Auftreten von Komplikationen wie akutes Atemnotsyndrom, akute Herzschädigung und Sekundärinfektionen beobachtet [43]. Das Virus kann im Organismus zu einer dysregulierten überschießenden Immunreaktion, bei dem es zu niedrigen Spiegeln von Interferon Typ I und III sowie erhöhter Chemokin- und Zytokinfreisetzung kommt führen. Somit sind eine reduzierte antivirale Immunabwehr sowie eine übermäßige Produktion inflammatorischer Zytokine wesentliche Merkmale bei einer schweren SCV2 Infektion [40], [44].

1.3.3 Rolle von Toll-like Rezeptoren, C-Jun-N-terminale Kinase und CD14 bei SARS-CoV-2

Nachdem die TLR-vermittelte Aktivierung von NF- κ B und MAPK zur Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine und Interferone führt, könnten TLRs ein bedeutender Angriffspunkt sein, um die Infektion mit SCV2 im frühen Stadium zu bekämpfen [38].

Bei der Entstehung von Zytokinstürmen, die bei einer SCV2 Infektion häufig vorkommen, spielen verschiedene TLRs eine wichtige Rolle [45], [46]. In einer Studie konnte festgestellt werden, dass TLR2 das S Protein von SCV2 erkennt. In humanen

und murinen Makrophagen und Lungenepithelzellen wurde durch das S Protein die Ausschüttung von inflammatorischen Zytokinen und Chemokinen induziert, indem TLR2 mit TLR1 oder TLR6 dimerisierte und somit NF- κ B aktivierte [47]. Des Weiteren konnten Shirato et al. (2021) feststellen, dass TLR4 ebenfalls das S Protein von SCV2 erkennt und in weiterer Folge NF- κ B und C-Jun-N-terminale Kinase (JNK) Signalwege aktiviert [48]. Durch die Aktivierung von JNK werden nukleäre Transkriptionsfaktoren phosphoryliert und mehrere Zielgene transkribiert, wodurch es unter anderem zu weiterer Inflammation durch Ausschüttung von Zytokinen kommt [49]. In anderen Untersuchungen konnten mehrere Fragmente des viralen Genoms von SCV2, die TLR7/8 aktivieren könnten, identifiziert werden. Diese Fragmente führten in vivo zu MyD88-abhängiger Inflammation in der Lunge, was vermutlich auf die Erkennung von ssRNA durch TLR7 und 8 zurückzuführen ist [50]. Ähnliche Ergebnisse wurden auch von Bortolotti et al. (2021) in Calu-3/MRC-5 multizellulären Sphäroiden erzielt, die mit einem klinischen SARS-CoV-2-Isolat infiziert wurden. Hierbei aktivierten PAMPs von SCV2 zusätzlich zu TLR7 auch TLR3, wodurch Zytokine induziert wurden [51].

Eine weitere bedeutende Rolle spielen die Kofaktoren, die direkt auf die TLR-Liganden wirken. Dazu gehört unter anderem CD14, das membrangebunden z.B. auf Monozyten oder gelöst vorkommen kann. Bisher konnte gezeigt werden, dass CD14 insbesondere zur Sensibilisierung von Zellen auf LPS dient, indem es LPS-Moleküle auf TLR4 überträgt [52]. Weitere Untersuchungen haben gezeigt, dass eine Interaktion von CD14 mit TLR7 und 8, durch die ssRNA-Viren erkannt werden, in HEK293T-Zellen stattfand. Dies deutet auf eine mögliche Rolle von CD14 bei viralen Infektionen mit ssRNA-Viren hin [53].

1.3.4 Mögliche Effekte von Xanthohumol auf eine SARS-CoV-2 Infektion

XN wurde bereits als mögliches therapeutisches Mittel gegen SCV2 untersucht und hat in Vero-E6-Zellen mit einem IC-50 Wert von 1,53 μ M zu einer Hemmung der Protease M^{pro}, welches entscheidend für die virale Replikation und Transkription ist, geführt [54]. In einer Humanstudie hat die 7-tägige enterale Aufnahme einer Dosis von 4,5 mg XN

pro kg Körpergewicht bei Covid-19 Patient*innen unter anderem die Mortalitätsrate, Klinikaufenthaltsdauer und die IL-6 Konzentration im Plasma reduziert [55].

Da beim PRRSV, das ähnliche Lungenentzündungen wie SCV2 hervorruft, eine verminderte Zytokinausschüttung und gelinderte Inflammation der Lunge durch Dosen von 10-25 mg XN pro kg Körpergewicht erreicht wurde, könnten womöglich ähnliche Effekte bei SCV2 erzielt werden [23]. Eine weitere Studie zeigte, dass nach oraler Aufnahme von 0,125 mg XN aus einem XN-haltigem Hopfenextrakt die LPS-abhängige Stimulation von humanen PBMCs unterdrückt wird, was auf die Interaktion von XN mit dem CD14/TLR4 Signalweg zurückzuführen sein könnte [17]. Ebenfalls konnte nach oraler Aufnahme der gleichen XN-Dosis, eine Interaktion von XN mit dem CD14/TLR2 Signalweg bei LTA-abhängiger Stimulation von humanen PBMCs festgestellt werden [56]. In weiteren Untersuchungen wurden Verbindungen, die auf der Struktur von XN basieren, verwendet. Dabei konnte die Bindung einiger Fragmente an MD-2, ein Kofaktor von TLR4, in LPS-stimulierten murinen Makrophagen festgestellt werden, wodurch die Zytokinfreisetzung gehemmt wurde [26]. Allerdings konnte dies in einer Studie von Jung et al. (2022) nicht beobachtet werden [17].

Auf Grundlage dieser Studien wird ersichtlich, dass XN die mit SCV2 in Verbindung stehenden TLR-Signalkaskaden möglicherweise beeinflussen kann und somit entzündungsreduzierend bei Infektionen mit dem Virus wirken könnte. Ob jedoch eine orale Aufnahme von niedrigen XN-Dosen die Immunantwort auf eine SARS-CoV-2 Infektion abschwächt, ist nicht abschließend geklärt.

1.4 Zielsetzung und Fragestellungen der Arbeit

Durch SCV2 wurde eine weltweite Pandemie verursacht, die mit teilweise schweren Erkrankungen und auch Todesfällen einherging. In Folge einer Infektion mit SCV2 kommt es zu Entzündungsreaktionen, die auch zu einer überschießenden Immunreaktion und bis hin zum respiratorischen Versagen führen können [42]. Bisher stehen für die Behandlung von viralen Infektionen und insbesondere der Infektionen mit SCV2 nur wenige Möglichkeiten zur Verfügung.

Insbesondere durch die Verminderung der Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine könnten Entzündungen gelindert und somit ein milderer Verlauf erzielt werden [44]. In einigen tierischen und humanen Modellen konnte die entzündungshemmende Funktion durch Verminderung der Zytokinfreisetzung von XN, vor allem in pharmakologischen Dosen, bereits nachgewiesen werden [14-17], [23], [56]. In welcher Hinsicht sich die Aufnahme von XN in ernährungsphysiologisch relevanten Dosen auf die virus-induzierte Immunantwort auswirkt, wurde bisher nicht geklärt. Daher wurde in der vorliegenden Arbeit im Rahmen einer Humanstudie untersucht, wie sich die orale Aufnahme von XN in unterschiedlichen ernährungsphysiologisch relevanten Konzentrationen auf die Stimulation von Monozyten mit einzelsträngigen RNA Fragmenten von SCV2 auswirkt und welche Signalwege dabei involviert sind.

Dafür wurden folgende Fragestellungen bearbeitet:

- 1) Wie beeinflusst die orale Aufnahme von XN in unterschiedlichen ernährungsphysiologisch relevanten Dosen (0,125 mg, 0,375 mg und 0,75 mg) die Zytokinfreisetzung in humanen Monozyten nach Stimulation mit viralen Komponenten im Zeitverlauf?
- 2) Welche molekularen Signalwege sind bei der Stimulation von humanen Monozyten mit viralen Komponenten involviert?

2 Materialien

2.1 Humanstudie

2.1.1 Studiengetränk

Substanzen und Chemikalien

Bindino, pflanzliches Bindemittel

Puderzucker

Stilles Wasser

XanthoFlav™

Zitronensäure

Zitronensirup zuckerfrei, naturtrüb

Hersteller

Gewürzmühle Brecht GmbH,

Eggenstein, Deutschland

Wiener Zucker, AGRANA Sales &

Marketing GmbH, Wien, Österreich

Vöslauer Mineralwasser GmbH, Wien,
Österreich

Hopsteiner GmbH, Mainburg,
Deutschland

Haas Austria GmbH, Traun, Österreich

SodaStream Österreich GmbH,
Leopoldsdorf, Österreich

Geräte und Verbrauchsmaterial

Zentrifugenröhrchen 50 ml

Serologische Pipette 25 ml

Pipettierhilfe macro

Mörser

Hersteller

Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht,
Deutschland

Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht,
Deutschland

BRAND GMBH + CO KG, Wertheim,
Deutschland

Laborbestand

2.1.2 Blutabnahme

Geräte und Verbrauchsmaterial	Hersteller
BD Venflon™ Pro Safety Sicherheits - venenverweilkatheter	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland
Fixierverband für i. v. Kanülen, Cosmopor® I.V.	Paul Hartmann AG, Heidenheim, Deutschland
BD Vacutainer® Einmalhalter	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland
BD Posiflush™ SP Injektionsspritze	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland
Luer Lock Kappe	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland
BD Vacutainer® SST™ II Advance Serum- Trennröhrchen	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland
BD Vacutainer® (K3E 7,2 mg) Blutentnahmeröhrchen	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland
kodan® Tinktur forte farblos	Schülke & Mayr GmbH, Norderstedt, Deutschland

2.1.3 Isolation und Stimulation humaner Monozyten

Substanzen und Chemikalien	Hersteller
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 KGaA, Darmstadt, Deutschland
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 (10 000 U/ml Penicillin, 10 mg/ml Streptomycin)	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland
SP600125 JNK Inhibitor	InvivoGen, San Diego, USA
Humanes sCD14	Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, USA
SCV2-RNA1	Integrated DNA Technologies, Inc., Coralville, USA
SCV2-RNA2	Integrated DNA Technologies, Inc., Coralville, USA
DOTAP Liposomal Transfection Reagent	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
HEPES PUFFERAN® ≥99,5 %, p.a.	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
TRItdy G™ Trizol	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland

Geräte und Verbrauchsmaterial

Hersteller

pluriMate® II Zentrifugenröhren, 15ml	pluriSelect Life Science UG & Co. KG, Leipzig, Deutschland
Zentrifugenröhrchen 15ml	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
Serologische Pipette, 10ml	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
Pipettierhilfe macro	BRAND GMBH + CO KG, Wertheim, Deutschland
CO ₂ Incubator MCO-170AIC-PE	PHC Holdings Corporation, Tokyo, Japan
96-Well Platte mit Deckel	BRAND GMBH + CO KG, Wertheim, Deutschland
HERAsafe Sicherheitswerkbank	Heraeus Holding GmbH, Hanau, Deutschland

Zentrifuge Z 446 K/Z216MK	Hermle Labortechnik GmbH, Wehingen, Deutschland
Neubauerzählkammer	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Deckglas 22x22mm	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Mikroskop	Carl Zeiss Microscopy Deutschland GmbH
Handzähler	Laborbestand
TC-Platte 24 Well für Suspensionszellen	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland

2.2 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Substanzen und Chemikalien	Hersteller
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
di-Natriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Kaliumchlorid	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Tween® 20	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Bovines Serumalbumin (BSA) Fraktion V, NZ-Origin	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Human TNF-alpha DuoSet ELISA	R&D Systems, Inc., Minneapolis, USA
Human IL-6 DuoSet ELISA	R&D Systems, Inc., Minneapolis, USA
Human IL-6 DuoSet ELISA	R&D Systems, Inc., Minneapolis, USA

Stabilisiertes Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂) Lösung (Color Reagent A)	R&D Systems, Inc., Minneapolis, USA
Stabilisiertes 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

Hersteller

Clear Strip-well Microplate	R&D Systems, Inc., Minneapolis, USA
Abdeckfolie SealPlate® 100-SEAL-PLT	Excel Scientific Inc., Victorville, USA
Pufferwanne	Laborbestand
Eppendorf Research® plus, 8-Kanal Pipette, 100µl, 300µl	Eppendorf SE, Hamburg, Deutschland
iMark™ Microplate Absorbance Reader	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, USA
Heratherm™ Incubator	Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, USA

2.3 Allgemeine Chemikalien, Geräte und Verbrauchsmaterial

Chemikalien, Geräte und Verbrauchsmaterial

Hersteller

Kühlschrank Liebherr ProfiLine	Liebherr-International Deutschland GmbH, Biberach an der Riß, Deutschland
Tiefkühler Liebherr ProfiLine	Liebherr-International Deutschland GmbH, Biberach an der Riß, Deutschland
Ultratiefkühlgerät CryoCube F570h	Eppendorf SE, Hamburg, Deutschland
Natronlauge (NaOH 2N)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland

Salzsäure (HCl 2N)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Labormarker	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
Einmal-Wischtücher KIMTECH® Science Labortücher	KIMBERLY-CLARK GmbH, Koblenz, Deutschland
VWR® Nitrile Light, Nitrilhandschuhe	VWR International GmbH (Avantor), Darmstadt, Deutschland
Becherglas 1000mL	Laborbestand
Magnetrührer PCE-MSR 100	PCE Deutschland GmbH, Meschede, Deutschland
Magnetrührstäbchen	Laborbestand
Magnetstab	Laborbestand
pH Meter FiveEasy	Mettler-Toledo GmbH, Wien, Österreich
Omnifix Luer Lock Solo	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Sterile Syringe Filter (0,22µm)	Starlab GmbH, Hamburg, Deutschland
Messzylinder 1000ml, 250ml	
Eppendorf Research® plus, 1-Kanal Pipette, 2.5µl, 10µl, 100µl, 200 µl, 1000µl	Eppendorf SE, Hamburg, Deutschland
Pipettenspitzen, 1000µl, 200µl, 100µl, 10µl	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
Vortex Laborschüttler	Phoenix Instrument GmbH, Garbsen, Deutschland
Eppiständer	Laborbestand
Röhrchengestell	Laborbestand
Zentrifugenröhrchen 15ml, 50ml	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland

Mikroreagiergefäß SafeSeal 0.5ml, 1.5ml	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
Eisbereiter FM-120KE-50-HC	Hoshizaki Europe B.V. – HQ, Amsterdam, Niederlande
Analysenwaage	VWR International GmbH, Radnor, USA
Spatel zum Einwiegen	Laborbestand
Plastikschälchen	Laborbestand

2.4 Statistische Auswertung, Software

Programm/Software	Firma
Graphpad Prism	GraphPad Software, San Diego, USA
Microsoft Office 365	Microsoft Cooperation, Redmond, USA
Microplate Manager® Software	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, USA

3 Methodik

3.1 Humanstudie - Studiendesign

Alle Untersuchungen wurden gemäß den aktuellen ethischen Grundsätzen laut der Deklaration von Helsinki durchgeführt [57]. Die Humanstudie (00848) wurde von der Ethikkommission der Universität Wien genehmigt und bei Clinical Trials (NCT06286644) registriert.

Die vorliegende Interventionsstudie erfolgte verblindet, randomisiert und placebokontrolliert. Das Studienkollektiv setzte sich aus gesunden, normalgewichtigen weiblichen und männlichen Personen im Alter zwischen 18-70 Jahren zusammen. Folgende Ausschlusskriterien wurden definiert: Fruktosemalabsorption, Nahrungsmittelunverträglichkeiten und/oder -intoleranzen sowie Lebensmittelallergien, besondere Ernährungsformen, instabiles Körpergewicht innerhalb der letzten 6 Monate (Schwankungen von $> 5\%$), BMI $< 18,5 \text{ kg/m}^2$ oder $> 30 \text{ kg/m}^2$, bariatrische Operationen, chronische Erkrankungen des Gastrointestinaltraktes, Lebererkrankungen, Niereninsuffizienz, rheumatoide Arthritis, COPD mit ≥ 2 Exazerbationen pro Jahr, chronische Pankreatitis oder wiederkehrende akute Pankreatitis, Alkoholkonsum über 10 g/d für Frauen und über 20 g/d für Männer, Schwangerschaft und Stillzeit und nicht länger als 3 Wochen zurückliegende virale oder bakterielle Infekte.

Nach einem ärztlichen Aufklärungsgespräch und einer schriftlichen und mündlichen Einverständniserklärung zur Teilnahme an der Studie, führten die Studienteilnehmer*innen vor Beginn der Studie eine zweiwöchige „Run-in-Phase“ durch, während der sie auf hopfenhaltige Getränke oder Lebensmittel verzichten sollten. Am ersten Studientag wurden die anthropometrischen Werte Gewicht, Größe und Bauchumfang der Studienteilnehmer*innen erfasst, um sicherzustellen, dass die Einschlusskriterien erfüllt waren. Zusätzlich wurden klinisch-chemische Parameter aus dem Serum bestimmt. Den Proband*innen wurde nüchtern Blut abgenommen, wonach sie innerhalb von 15 min ein standardisiertes Frühstück, bestehend aus zwei

Brezeln mit 30 g Butter, sowie dem Studiengetränk, das 0-0,75 mg XN aus einem XN-haltigen Hopfenextrakt (75% XN) enthält (siehe Anhang I Herstellung des Studiengetränks), zu sich nahmen. Anschließend fanden 1, 2, 3, 4 und 6 h nach Aufnahme des Studiengetränks weitere Blutabnahmen statt. Zusätzlich erhielten ein Teil der Personen nur Placebo oder das Studiengetränk mit 0,75 mg XN des XN-haltigen Extrakts. Bei diesen Personen fanden nur zwei Blutabnahmen statt, einmal nüchtern und erneut 1 h danach. Die anderen Proband*innen verzehrten zwischen der Blutabnahme nach 4 und 6 h eine weitere standardisierte Mahlzeit, bestehend aus einer Pizza. Aus den Blutproben wurden Monozyten isoliert und im Serum klinisch-chemische Parameter bestimmt.

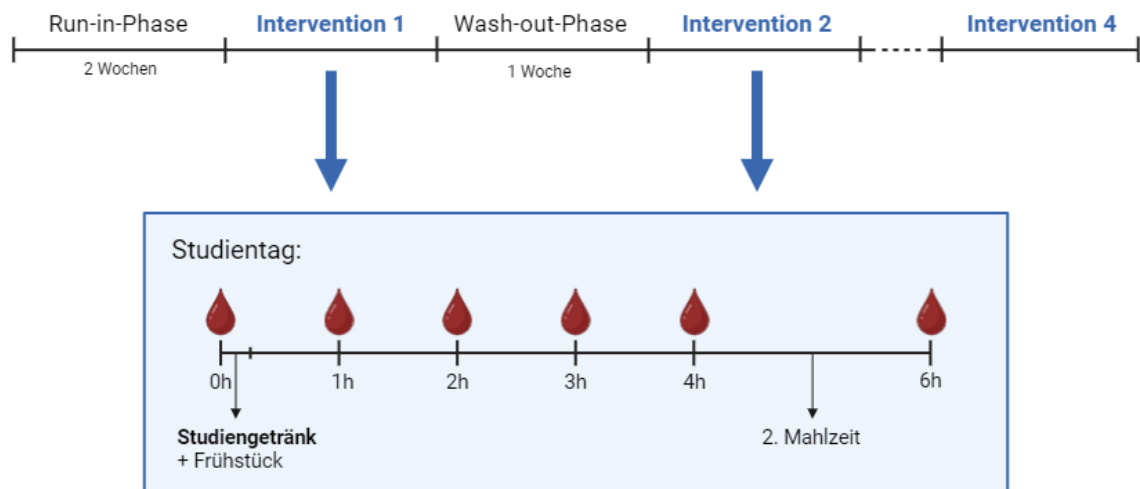


Abbildung 4: Darstellung des Studienablaufs und eines Studientages. Bei den Interventionen 1-4 wurde ein Studiengetränk mit 0,125 mg, 0,375 mg und 0,75 mg XN aus einem XN-haltigen Hopfenextrakt (75% XN) und einmal Placebo oral aufgenommen. Die Blutabnahme erfolgte vor Aufnahme, sowie 1, 2, 3, 4 und 6 h nach Aufnahme des Studiengetränks. Created with BioRender.com.

3.2 Isolation von Monozyten

Die Isolation von Monozyten erfolgte nach den Angaben des Herstellers pluriSelect Life Science UG & Co.KG mit einem pluriSelect System. Diese Methode basiert auf der Dichtegradientenzentrifugation, wodurch Monozyten aus Vollblut unter sterilen Bedingungen isoliert werden können. Beim pluriSelect System wird die Isolation mithilfe eines pluriMate II Zentrifugenröhrchens mit einer Trennmembran zur Auftrennung der einzelnen Phasen des Vollbluts durchgeführt. Im Folgenden sind die Isolationsschritte kurz zusammengefasst.

In jedes pluriMate II Zentrifugenröhrchen wurden 4,5 ml Monozyten Spin Medium, das RT hatte, gegeben. Die Röhrchen wurden dann bei 1000 rcf, accel 9, decel 9, RT für 10 s zentrifugiert, wonach sich das Monozyten Spin Medium unterhalb der integrierten Barriere befand. Anschließend wurden 4-7 ml Vollblut in die Röhrchen pipettiert. Die Proben wurden bei 800 rcf, accel 9, decel 9, RT für 15 min zentrifugiert. Nach diesem Schritt bildeten sich verschiedene Phasen (Abbildung 5). Die hellere Phase mit den Monozyten, die sich oberhalb der Trennmembran befand, wurde mit einer Pipette entnommen und in ein neues 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Das neue Zentrifugenröhrchen wurde mit DPBS auf 10 ml aufgefüllt und erneut für 10 min bei 300 rcf, accel 9, decel 9, RT zentrifugiert.

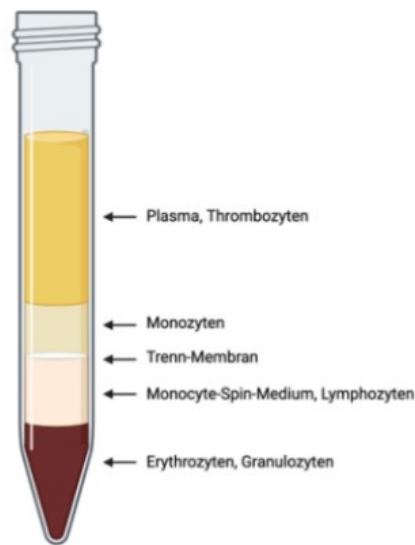


Abbildung 5: Trennung des Vollbluts in unterschiedliche Phasen. Nach der Zentrifugation mit Monozyten Spin Medium im pluriMate II Zentrifugenröhrchen mit Trenn-Membran entstandene Phasen. Created with BioRender.com.

Der übrig gebliebene Überstand wurde verworfen. Dieser Vorgang wurde wiederholt, wobei wieder mit DPBS auf 10 ml aufgefüllt wurde und im Anschluss für 10 min bei 300 rcf, accel 9, decel 9, RT zentrifugiert wurde. Der Überstand wurde erneut verworfen und dann das Zellpellet mit 2 ml DPBS resuspendiert. Nun wurden Zellen mithilfe einer Neubauerzählkammer gezählt, um die Gesamtzellzahl zu bestimmen. Hierzu wurden 10 µl der Zellsuspension auf die Neubauerzählkammer aufgetragen und anschließend unter einem Mikroskop platziert. Die Zellen wurden in allen vier Quadraten mit einem Handzähler wie in Abbildung 6 dargestellt gezählt und daraus der Mittelwert berechnet. Die Gesamtzellzahl wurde anhand folgender Formel berechnet: Gesamtzellzahl = Mittelwert x Kammerfaktor x Verdünnungsfaktor x Volumen der Zellsuspension.

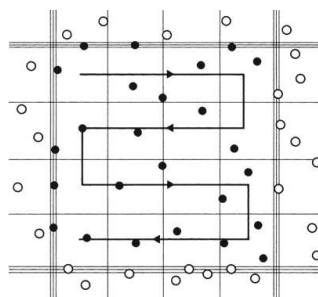


Abbildung 6: Bestimmung der Gesamtzellzahl der isolierten Monozyten. Monozyten werden in jedem Quadrat nach dem abgebildeten Schema gezählt. Abbildung aus: Schmitz, 2011 [62].

Anschließend wurden die Röhrchen erneut für 10 min bei 300 rcf, accel 9, decel 9, RT zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Die Zellen wurden in RPMI-1640 Zellkulturmedium (siehe Anhang III Isolation von Monozyten: *Herstellung RPMI-1640 Zellkulturmedium*) resuspendiert, sodass eine Zellzahl von 600000 Zellen/ml erreicht wurde.

3.3 Stimulation von Monozyten

Die für die Interventionsstudie isolierten Monozyten wurden für die weitere Zellstimulation verwendet. Es erfolgten zwei verschiedene Versuchsansätze mit unterschiedlichen Stimulationen.

Für den ersten Versuchsansatz wurden pro Well 50 µl der Zellsuspension pipettiert, wonach die Platte für eine Stunde bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert wurde. Nach der Inkubation wurden in die Wells, die unstimuliert bleiben sollten nur RPMI-1640 Medium pipettiert. Weitere Wells wurden mit Vehikel und der SCV2-Lösung (siehe Anhang IV Stimulation von Monozyten: *Herstellung der SCV2-Lösung*) stimuliert. Zur Herstellung des Vehikels wurde DOTAP Liposomal Transfection Reagent 1:30 mit Hepes-buffered saline (HBS) (siehe Anhang IV Stimulation von Monozyten: *Herstellung von HBS*) verdünnt. 100 µl des Vehikels wurden dann mit 50 µl SCV2-Lösung gemischt und für 15 min bei RT inkubiert. Danach wurde die Lösung in ein Well pipettiert. In einem weiteren Well wurden nur Vehikel sowie HBS hinzugefügt. Die Platte wurde anschließend für weitere 6 h inkubiert, wonach der Zellüberstand abgenommen wurde und in ein Eppendorfgefäß überführt wurde. Danach folgte ein Zentrifugationsschritt bei 2000 rpm, RT für 5 min, währenddessen 300 µl Trizol in jedes Well gegeben wurden.

Nach der Zentrifugation wurde der Überstand in ein neues Eppendorfgefäß überführt und bei -80°C gelagert. Das in die Wells pipettierte Trizol wurde dann auf das entstandene Zellpellet übertragen und ebenfalls bei -80°C gelagert.

Für den zweiten Versuchsansatz wurden die Monozyten mit SCV2-RNA1/-RNA2, sowie dem JNK-Inhibitor und sCD14 stimuliert. Zunächst wurde die Zellsuspension mit den isolierten Monozyten in die Wells einer TC-Platte pipettiert. Die Zellen wurde bei 37°C und 5% CO₂ für eine Stunde ruhen gelassen. Nach einer Stunde Ruhen wurden die Monozyten mit 10 µM JNK-Inhibitor und 500 ng/ml sCD14 (siehe Anhang IV Stimulation von Monozyten: *Verdünnung von JNK-Inhibitor und sCD14*) präinkubiert. Für die Präinkubation wurden die Zellen erneut bei 37°C und 5% CO₂ für eine Stunde in den Inkubator gestellt. Anschließend wurden in jedes Well RPMI-1640-Medium pipettiert, sodass zum Schluss das Endvolumen von 333 µl erreicht wurde. Zusätzlich wurden in ein Well 100 µl Vehikel, das wie beim ersten Versuchsansatz beschrieben angesetzt wurde, und 50 µl HBS pipettiert. Dann wurden für die anderen Wells je 100 µl Vehikel mit 50 µl SCV2-Lösung (siehe Anhang IV Stimulation von Monozyten: *Herstellung der SCV2-Lösung*) vermengt und für 15 min bei RT inkubiert. Dies wurde dann in die mit sCD14 und JNK-Inhibitor präinkubierten Wells, sowie ein weiteres Well pipettiert. Nun wurde die Platte für 6 h in den Inkubator gestellt, wonach 20 µl aus jedem Well in Eppendorfgefäße entnommen wurden und bei -80°C gelagert wurden. Nach 24 h und 48 h wurden nochmal 20 µl aus jedem Well entnommen. Die übrig gebliebenen Zellüberstände aus den Wells wurden in separate Eppendorfgefäße pipettiert. Diese Proben wurden bei -80°C gelagert.

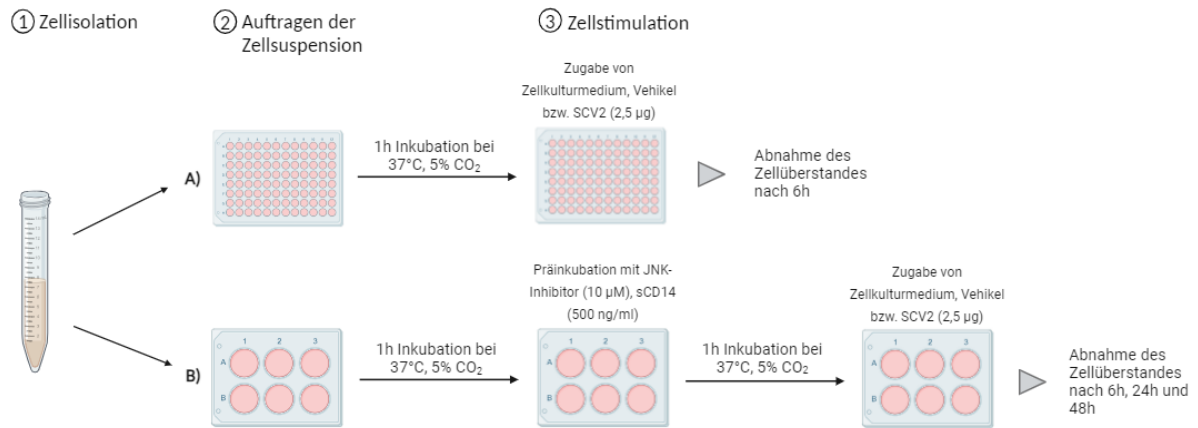


Abbildung 7: Stimulation von Monozyten. Die Zellen wurden je nach Versuchsprotokoll mit A) ssRNA Fragmenten von SCV2 oder B) JNK-Inhibitor, sCD14 und ssRNA Fragmente von SCV2 stimuliert. SCV2, SARS-CoV-2; sCD14, soluble Cluster of Differentiation 14; JNK, c-Jun N-terminal kinase. Created with BioRender.com.

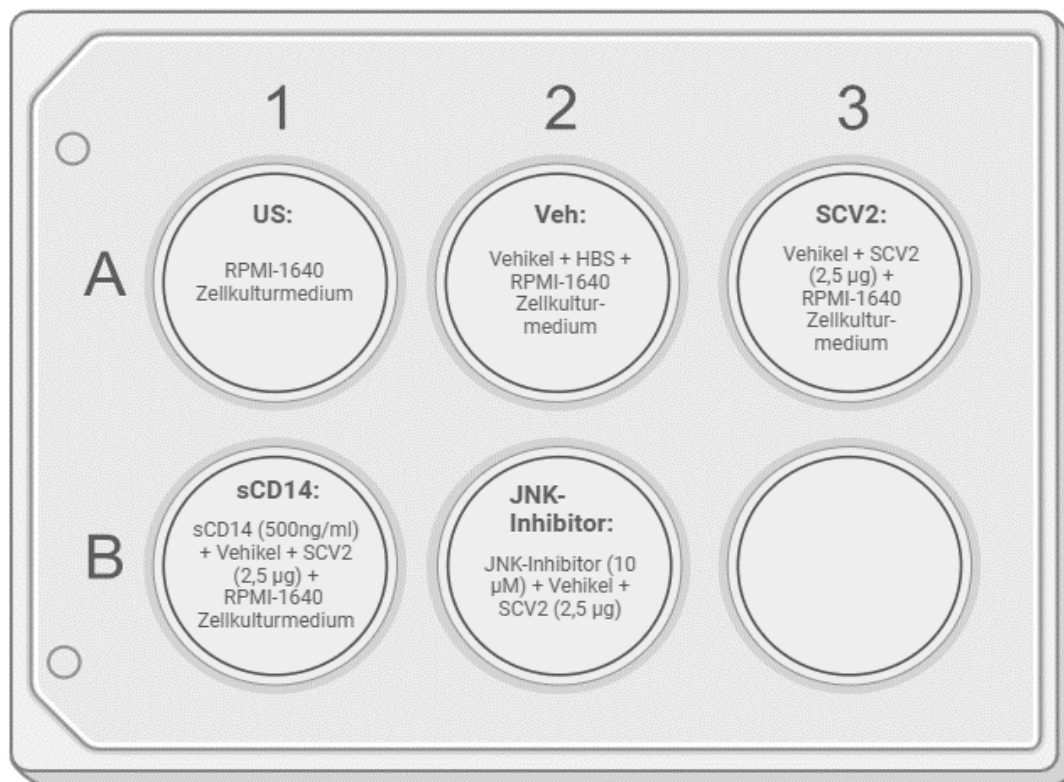


Abbildung 8: Pipettierschema für Stimulation von Monozyten. Die Monozyten wurden mit Vehikel, ssRNA Fragmenten von SCV2, sCD14 und JNK-Inhibitor für 6 h, 24 h und 48 h stimuliert. US, unstimuliert; Veh, Vehikel; SCV2, SARS-CoV-2; sCD14, soluble Cluster of Differentiation 14; J JNK, c-Jun N-terminal kinase. Created with BioRender.com.

3.4 ELISA

ELISA dient zum qualitativen und quantitativen Nachweis von spezifischen Antigenen oder Antikörpern. Das in der Probe vorhandene Antigen bindet spezifisch an einen Antikörper. An das Komplex bindet ein weiterer enzymgekoppelter Antikörper, wonach ein chromogenes Substrat zu einer Farbveränderung oder Fluoreszenz führt, die auf das Vorhandensein des Antigens hinweist [58].

In der vorliegenden Arbeit wurden Proteinkonzentrationen von TNF- α , IL-6 und IL-1 β in den Zellüberständen von humanen Monozyten mittels eines ELISA ermittelt, der nach Anleitung des Herstellers durchgeführt wurde. Zusätzlich benötigte Chemikalien, Phosphate Buffered Saline (PBS), Waschpuffer und Reagent Diluent (RD), wurden vor der Durchführung separat hergestellt (siehe Anhang II ELISA). Laut den Angaben im beiliegenden Certificate of Analysis (COA) wurden Capture Antibody, Detection Antibody, Streptavidin-HRP und Standard verdünnt (siehe Anhang II ELISA). Die Verdünnungen der Proben wurden gemäß Tabelle 1 mit RD verdünnt.

Tabelle 1: Verdünnungen der Zellüberstände für den ELISA

Probe	TNF- α	IL-6	IL-1 β
Unstimuliert (US)	1:3	1:3	1:3
Vehikel	1:50	1:50	1:50
SCV2	1:100	1:500	1:500

Die einzelnen Schritte wurden nach Tabelle 2 durchgeführt. Die Inkubation fand bei 25°C im Dunkeln statt und die Platte wurde zwischen den einzelnen Schritten mit 400 μ l Waschpuffer pro Well drei Mal gewaschen. Das Streptavidin-HRP wurde 1:40 mit RD verdünnt und die Substratlösung als 1:1 Mischung aus Color Reagent A und Color Reagent B hergestellt. Unmittelbar nach dem Hinzufügen von H₂SO₄ erfolgte die Messung der Absorption im Photometer bei 450 nm.

Tabelle 2: Arbeitsschritte beim ELISA

Inkubationszeit	Substanz	Menge [μ l/Well]
Über Nacht	Capture Antibody	100
Waschen		
1 h	Reagent Diluent	300
Waschen		
2 h	Proben	100
Waschen		
2 h	Detection Antibody	100
Waschen		
20 min	Streptavidin-HRP	100
Waschen		
20 min	Substratlösung	100
	2N H ₂ SO ₄	50

3.5 Statistik

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mithilfe von Microsoft Excel und Graphpad Prism 7. Zunächst wurde mittels Grubb's Test auf Ausreißer überprüft und diese von der weiteren Auswertung ausgeschlossen. Die Normalverteilung wurde überprüft, indem ein Shapiro-Wilk-Test durchgeführt wurde. Beim Vorliegen einer Normalverteilung wurde ein gepaarter T-Test gemacht und bei nicht normalverteilten Daten wurde ein Wilcoxon-Test ausgeführt. Für signifikante Unterschiede wurde ein p-Wert < 0,05 festgelegt. In den Abbildungen werden Werte als Mittelwert $\pm$ Standardfehler (SEM) dargestellt.

4 Ergebnisse

4.1 Einfluss der oralen Aufnahme von Xanthohumol auf die Stimulation von Monozyten mit ssRNA Fragmenten von SCV2 ex vivo: Konzentration von TNF- α , IL-6 und IL-1 β nach 6 h, 24 h und 48 h Stimulation

Um weiter zu untersuchen, inwiefern sich XN auf die Stimulation von Monozyten mit SCV2 auswirkt, wurde Proband*innen nüchtern sowie 1 h nach Aufnahme eines Studiengetränkes mit 0,75 mg XN aus einem XN-haltigen Hopfenextrakt (75%) Blut abgenommen. Nach Isolation der Monozyten aus dem Vollblut wurden die Zellen für 6, 24 und 48 h mit 2,5 μ g ssRNA Fragmenten von SCV2 stimuliert. Im Anschluss wurden die Zytokinkonzentrationen mittels ELISA bestimmt. Zur Kontrolle wurden Zellen nur mit Vehikel inkubiert. Die Inkubation von Monozyten mit SCV2 vor der Aufnahme des Studiengetränkes führte zu einem signifikanten Anstieg der Freisetzung von TNF- α , IL-6 und IL-1 β nach 6, 24 und 48 h im Vergleich zu den unstimulierten Zellen.

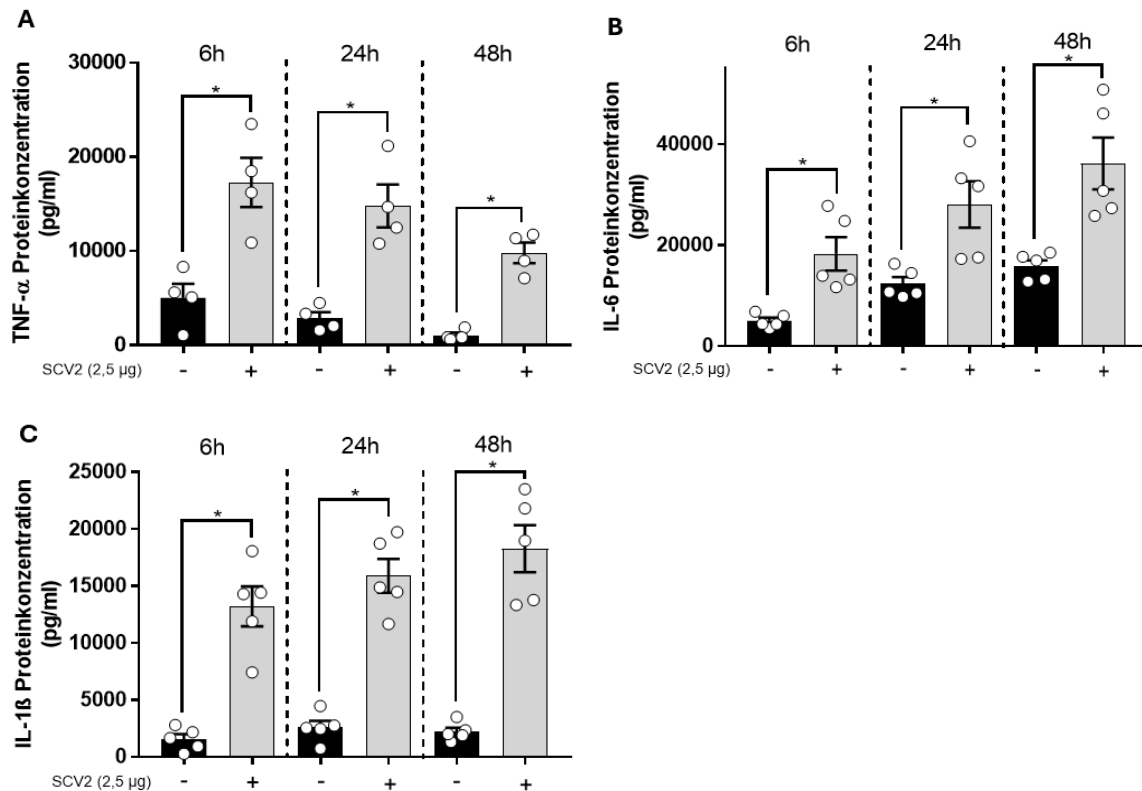


Abbildung 9: Proteinkonzentrationen von proinflammatorischen Zytokinen im Zellüberstand von humanen Monozyten, die für 6 h, 24 h und 48 h mit 2,5 μg ssRNA Fragmenten von SCV2 stimuliert wurden. Proteinkonzentrationen von (A) TNF-α, (B) IL-6 und (C) IL-1β bei Stimulation mit ssRNA Fragmenten von SCV2. TNF-α, Tumor-Nekrose-Faktor α; IL, Interleukin; SCV2, SARS-CoV-2. Werte dargestellt als Mittelwert ± SEM; (A) n=5, (B) n=5, (C) n=5.

In weiterer Folge wurde das Studiengetränk von fünf Proband*innen und Placebo von zwei Proband*innen aufgenommen und nach 1 h eine Blutabnahme durchgeführt. Die Ergebnisse des ELISA sind in Abbildung 10 zu sehen. Bei der Placebogruppe konnte aufgrund der geringen Stichprobe kein statistischer Test durchgeführt werden. Dabei wurde durch die Stimulation mit SCV2 die Zytokinfreisetzung bei allen Zytokinen im nüchternen Zustand signifikant erhöht. Die Freisetzung von TNF-α in den mit SCV2 stimulierten Zellen war nach Aufnahme des XN-haltigen Studiengetränkes im Vergleich zur Intervention mit Placebo zu allen Zeitpunkten etwas höher. Einen signifikanten Unterschied konnte man zwischen den unstimulierten und stimulierten Zellen nach 48 h Stimulation bei der XN-Gruppe feststellen. Bei IL-6 konnte man ebenfalls beobachten, dass bei XN ein zunehmender Trend im Vergleich zu Placebo vorliegt. Dahingegen war bei IL-1β kein deutlicher Unterschied zwischen den beiden Interventionen erkennbar. Einen signifikanten Unterschied in der IL-1β Konzentration

konnte man zwischen den unstimulierten und stimulierten Zellen nach 6 h Stimulation bei der XN-Gruppe feststellen.

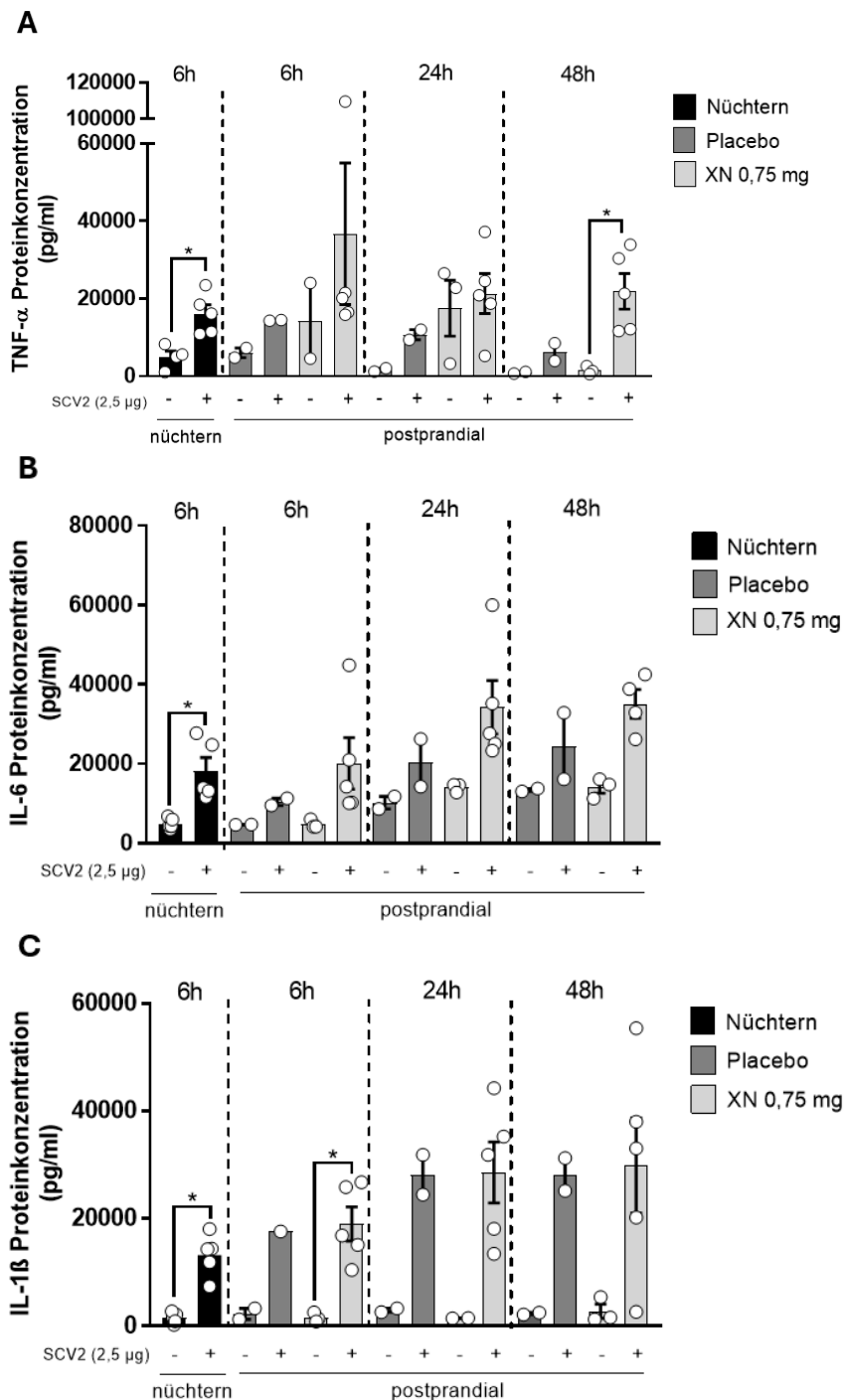


Abbildung 10: Proteinkonzentrationen von proinflammatorischen Zytokinen im Zellüberstand von humanen Monozyten, die nach Aufnahme eines Studiengetränks mit Xanthohumol oder Placebo für 6 h, 24 h und 48 h mit 2,5 µg ssRNA Fragmenten von SCV2 stimuliert wurden. Proteinkonzentrationen von (A) TNF-α, (B) IL-6 und (C) IL-1β nüchtern und nach Aufnahme eines Studiengetränkes mit 0,75 mg XN aus einem XN-haltigen Hopfenextrakt (75% XN) oder Placebo bei Stimulation mit ssRNA Fragmenten von SCV2. TNF-α, Tumor-Nekrose-Faktor α; IL, Interleukin; XN, Xanthohumol; SCV2, SARS-CoV-2. Werte dargestellt als Mittelwert ± SEM; (A) n=2-5, (B) n=2-5, (C) n=2-5.

4.2 Einfluss der oralen Aufnahme von verschiedenen Konzentrationen von Xanthohumol auf die Stimulation von Monozyten mit ssRNA Fragmenten von SCV2 ex vivo im Zeitverlauf: Konzentration von TNF- α , IL-6 und IL-1 β nach 6 h Stimulation

Um zu untersuchen, ob eine orale Aufnahme von XN in unterschiedlichen Dosen von 0-0,75 mg die durch SCV2 verursachte Freisetzung von Zytokinen beeinflusst, konsumierten drei normalgewichtige gesunde Frauen das XN-haltige Studiengetränk und es wurden 0-6 h später Monozyten isoliert und ex vivo mit 2,5 μ g ssRNA Fragmenten von SCV2 stimuliert.

Tabelle 3: Charakteristika und klinische Parameter der Studienteilnehmer*innen

Parameter	Werte
Geschlecht (m/w)	0 / 3
Alter (Jahre)	35,0 $\pm$ 16,3
Körpergewicht (kg)	71 $\pm$ 2,2
Körpergröße (m)	1,7 $\pm$ 0,03
BMI (kg/m ²)	25,0 $\pm$ 0,4

Einer Studienteilnehmerin konnte bei der Intervention mit einer Dosis von 0,125 mg kein Blut abgenommen werden und aufgrund technischer Probleme beim ELISA konnten für eine weitere Probandin keine Werte ermittelt werden, weshalb bei dieser Intervention nur eine Probandin dargestellt ist. Die Werte sind im Vergleich zum Ausgangswert (Zytokinkonzentration zum Zeitpunkt T0 = 100%) der jeweiligen Intervention dargestellt. Aufgrund der kleinen Stichprobe wurde keine statistische Auswertung durchgeführt.

In Abbildung 11 zeigte die höchste Dosis von 0,75 mg einen Höhepunkt der TNF- α Konzentration bereits 1 h nach Aufnahme des Studiengetränkes. Danach erfolgte eine Abnahme der Zytokinfreisetzung, wobei sich die Zytokinkonzentration aber nur bei den Messpunkten nach 2 und 4 h auf gleicher Höhe mit der Zytokinfreisetzung bei Placebo

befanden. Die Zytokinausschüttung war bei der Dosis von 0,375 mg ebenfalls etwas höher im Vergleich zur Placebogruppe mit Ausnahme des Zeitpunktes bei 3 h. Bei der niedrigsten Dosis von 0,125 mg war zunächst ein leichter Anstieg der TNF- α Konzentration bis 2 h zu beobachten, wonach eine starke Zunahme der Zytokinfreisetzung mit einem Höchstwert bei 6 h zu erkennen war.

Die IL-6 Konzentration zeigte bei der Verabreichung einer Dosis von 0,75 mg einen deutlichen Anstieg mit einem Höhepunkt nach 2 h. Dabei konnte man im gesamten Zeitverlauf eine höhere Zytokinfreisetzung als bei der Placebointervention beobachten. Bei den Dosen von 0,375 mg und 0,125 mg war die Zytokinfreisetzung nach 1 h niedriger als bei der Placebogruppe, wonach aber bei beiden Dosen die Zytokinfreisetzung gestiegen ist.

Bei der höchsten Dosis wurden für die IL-1 β Konzentration erneut über den gesamten Zeitverlauf höhere Werte im Vergleich zur Placebogruppe gemessen. Im Gegensatz dazu sank die Konzentration bei der mittleren Dosis von 0,375 mg nach 1 h und befand sich unterhalb der Zytokinkonzentration bei der Placebointervention. 3 h nach der Aufnahme von XN konnte erneut eine niedrigere IL-1 β Konzentration als bei Placebo und im Anschluss ein Anstieg gemessen werden. Die Konzentration bei der geringsten Dosis blieb konstant bis 1 h nach der Aufnahme des Studiengetränkes, woraufhin ein starker Anstieg zu erkennen war und bei 2 h der Höhepunkt erreicht wurde. Bei dieser Dosis konnten, mit Ausnahme des ersten Zeitpunktes, nur höhere IL-1 β Konzentrationen als bei der Placebogruppe gemessen werden.

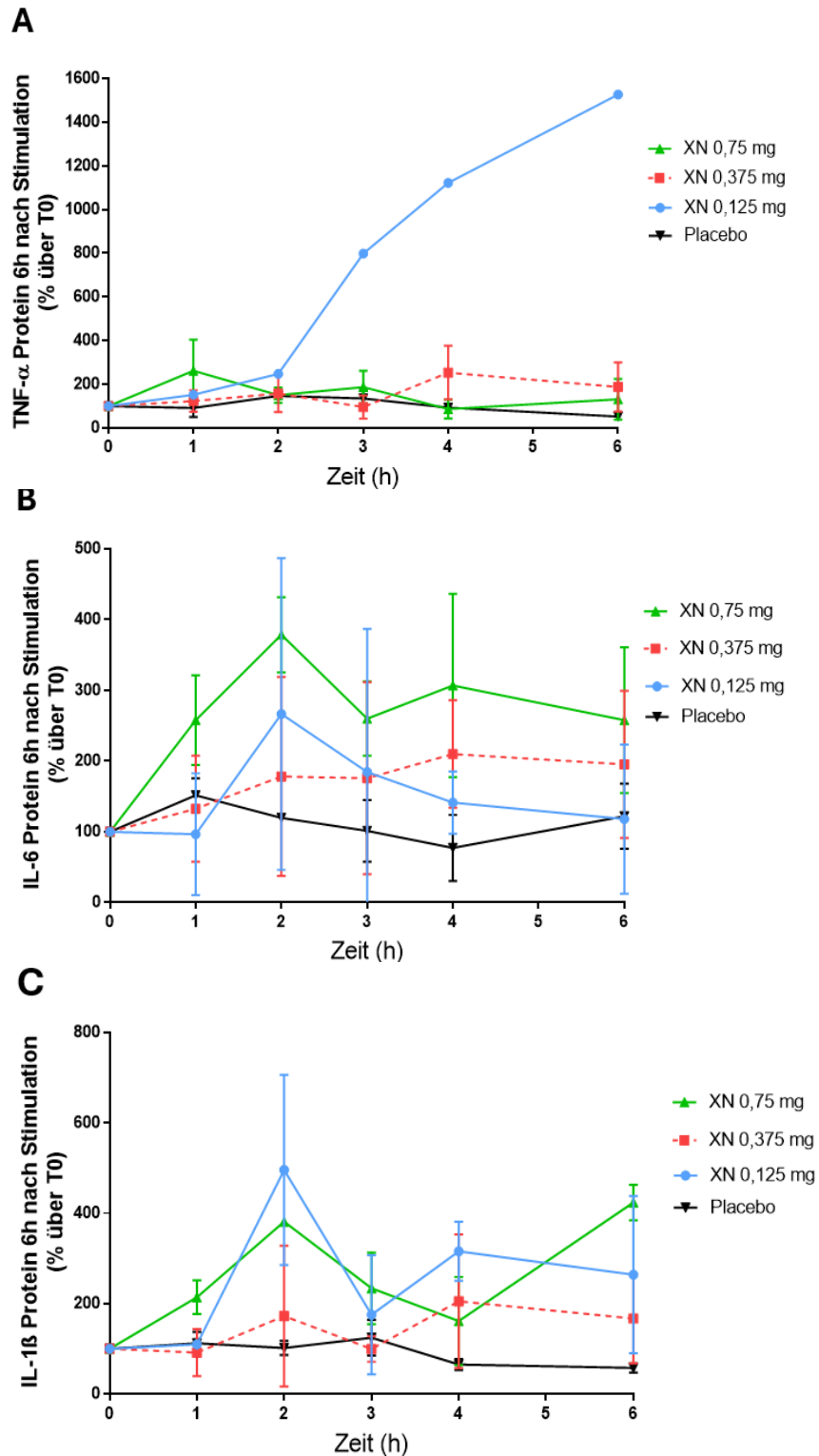


Abbildung 11: Einfluss der oralen Aufnahme des xanthohumolhaltigen Extraktes in unterschiedlichen Dosen im Zeitverlauf auf die Zytokinfreisetzung im Zellüberstand humaner Monozyten, die für 6 h mit 2,5 μ g ssRNA Fragmenten von SCV2 stimuliert wurden. Proteinkonzentrationen von (A) TNF- α , (B) IL-6 und (C) IL-1 β nach Aufnahme eines Studiengetränkes mit 0,75 mg, 0,375 mg oder 0,125 mg XN aus einem XN-haltigen Hopfenextrakt (75% XN) oder Placebo bei Stimulation mit ssRNA Fragmenten von SCV2. TNF- α , Tumor-Nekrose-Faktor α ; IL, Interleukin; XN, Xanthohumol; SCV2, SARS-CoV-2. Dargestellt in % über T0; n=3.

4.3 Effekte der Zugabe von JNK-Inhibitor und sCD14 auf die Stimulation von Monozyten mit ssRNA Fragmenten von SCV2 ex vivo zu verschiedenen Zeitpunkten: Konzentration von TNF- α , IL-6 und IL-1 β

Um zu untersuchen ob und über welche Signalwege SCV2 die Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen in Monozyten stimuliert, wurden naive Monozyten von gesunden Spender*innen mit 10 μ M JNK-Inhibitor oder 500 ng/ml sCD14 präinkubiert und dann für 6, 24 und 48 h mit 2,5 μ g ssRNA Fragmenten von SCV2 stimuliert.

Wie in Abbildung 12 zu sehen ist, wurde bei TNF- α nach 6 h Stimulation mit ssRNA Fragmenten von SCV2 und dem JNK-Inhibitor kein signifikanter Unterschied gemessen. Nach 24 h war die Freisetzung beim Vergleich der nur mit SCV2 behandelten Zellen zu den mit JNK-Inhibitor behandelten Zellen um etwa 50% vermindert. Nach weiterer Abnahme der Zytokinfreisetzung konnte ein weiterer signifikanter Unterschied nach 48 h gemessen werden. Bei IL-6 und IL-1 β wurde bei allen Zeitpunkten ein signifikanter Unterschied zwischen den mit SCV2 stimulierten Zellen und den mit JNK-Inhibitor stimulierten Zellen gemessen.

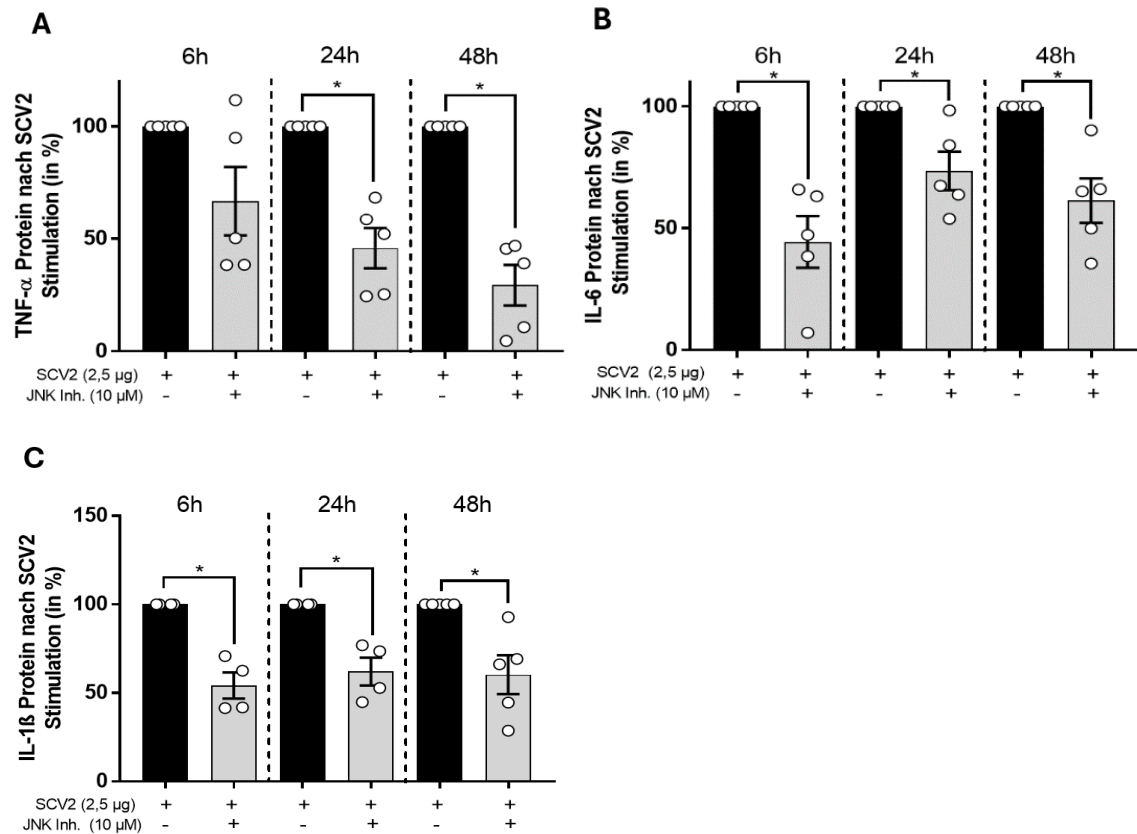


Abbildung 12: Proteinkonzentrationen von proinflammatorischen Zytokinen im Zellüberstand von humanen Monozyten, die für 6 h, 24 h und 48 h mit 2,5 μ g ssRNA Fragmenten von SCV2 und 10 μ M JNK-Inhibitor stimuliert wurden. Proteinkonzentrationen von (A) TNF- α , (B) IL-6 und (C) IL-1 β bei Stimulation mit ssRNA Fragmenten von SCV2. SCV2; SARS-CoV-2; JNK, c-Jun N-terminal kinase; TNF- α , Tumornekrosefaktor- α ; IL, Interleukin. Werte dargestellt als Mittelwert $\pm$ SEM in % über SCV2; (A) n=5, (B) n=5, (C) n=5.

Nach Präinkubation mit sCD14 nahm die TNF- α Konzentration im Vergleich zur Stimulation mit SCV2 im Trend ab, wobei nur nach 6 und 48 h ein signifikanter Unterschied festgestellt werden konnte. Im Gegensatz dazu konnten bei IL-6 und IL-1 β keine signifikanten Unterschiede gemessen werden.

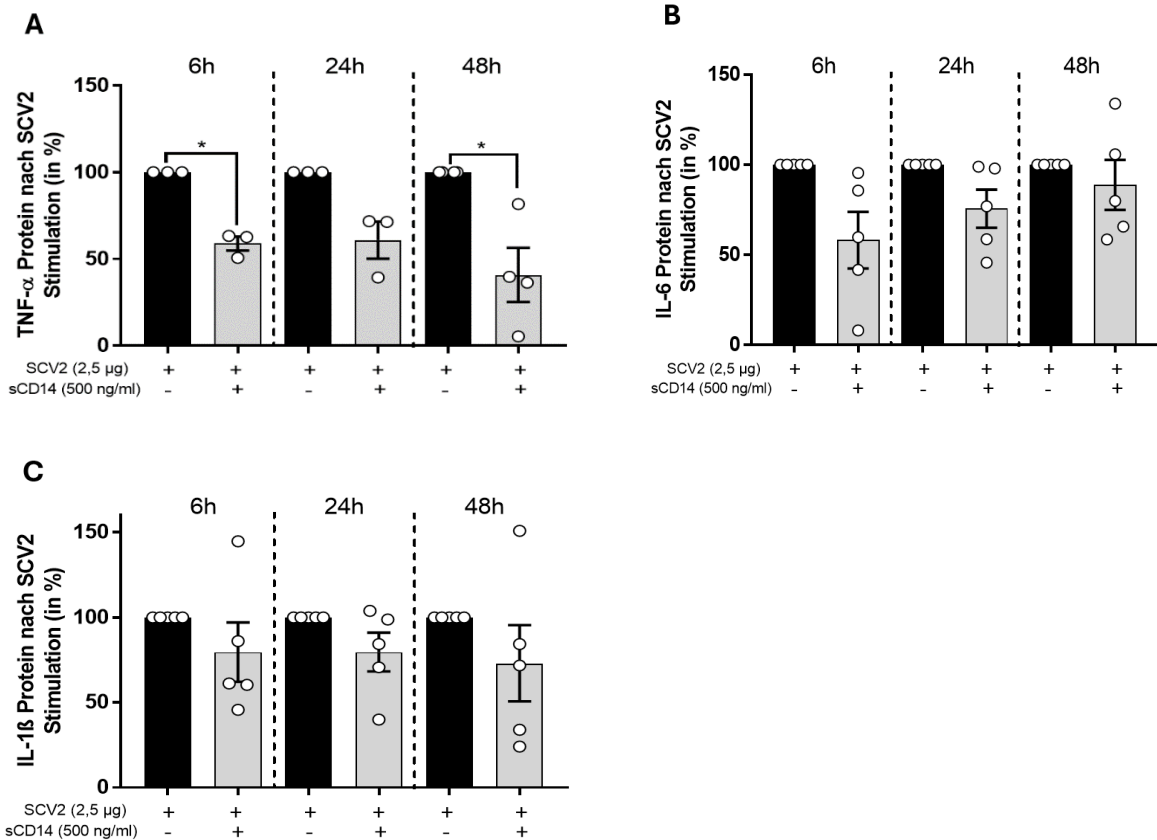


Abbildung 13: Proteinkonzentrationen von proinflammatorischen Zytokinen im Zellüberstand von humanen Monozyten, die für 6 h, 24 h und 48 h mit 2,5 µg ssRNA Fragmenten von SCV2 und 500 ng/ml sCD14 stimuliert wurden. Proteinkonzentrationen von (A) TNF- α , (B) IL-6 und (C) IL-1 β bei Stimulation mit ssRNA Fragmenten von SCV2. SCV2; SARS-CoV-2; sCD14, soluble cluster of differentiation 14; TNF- α , Tumornekrosefaktor- α ; IL, Interleukin. Werte dargestellt als Mittelwert $\pm$ SEM in % über SCV2; (A) n=5, (B) n=5, (C) n=5.

5 Diskussion

Infektionen durch SARS-CoV-2 können schwerwiegende Erkrankungen hervorrufen, wobei bisher kaum Behandlungsmöglichkeiten zur Verfügung stehen und vorwiegend symptomorientiert behandelt wird. Patient*innen leiden häufig unter überschießenden Immunreaktionen mit einer hohen Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine, die Inflammationen hervorrufen [44].

Verschiedenen Hopfeninhaltsstoffen, darunter auch XN, konnten in mehreren Studien immunmodulierende Effekte nachgewiesen werden [14-17], [23], [56]. Es konnte festgestellt werden, dass XN die Aktivierung von NF- κ B in murinen Makrophagen hemmt, sowie die Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine in murinen und humanen Zellen hemmen kann [14-17]. Außerdem konnten XN antivirale Eigenschaften nachgewiesen werden, indem es das Wachstum von Viren in vitro eindämmt und die virus-induzierte Zytokinausschüttung in Alveolarmakrophagen von Schweinen dämpft [23].

In einer weiteren Studie konnten ssRNA Fragmente von SCV2 erkannt werden, die in weiterer Folge für die Stimulation der von Monozyten abgeleiteten dendritischen Zellen verwendet wurden. Nach einer Stimulation mit 2,5 μ g und 5 μ g konnte eine erhöhte Zytokinausschüttung festgestellt werden, was möglicherweise auf die Aktivierung der TLR7/8 Signalkaskade zurückzuführen ist [50]. Inwiefern XN mit der TLR7/8 Signalkaskade interagiert und ob die Aufnahme von XN in ernährungsphysiologisch relevanten Dosen immunmodulierende Effekte bei einer Infektion mit SCV2 hat, konnte bisher nicht geklärt werden. Daher sollte in der vorliegenden Arbeit untersucht werden, ob die orale Aufnahme von ernährungsphysiologisch relevanten Dosen von XN die Freisetzung proinflammatorischer Zytokine in humanen Monozyten nach Stimulation mit einzelsträngigen RNA Fragmenten von SCV2 hemmen kann. Des Weiteren wurden die Signalkaskaden untersucht, die möglicherweise durch SCV2 aktiviert werden, indem die isolierten Monozyten mit einem JNK-Inhibitor und sCD14 präinkubiert wurden.

5.1 Einfluss der oralen Aufnahme von Xanthohumol in unterschiedlichen Dosen auf die SCV2-induzierte Freisetzung proinflammatorischer Zytokine im Zellüberstand humaner Monozyten

Die Exposition von Monozyten gesunder Proband*innen ex vivo mit 2,5 µg SCV2 führte zu einer signifikant höheren Freisetzung der proinflammatorischen Zytokine TNF-α, IL-6 und IL-1β im Vergleich zu den unstimulierten Zellen. Zellen, die eine Stunde nach der oralen Aufnahme des Studiengetränkes mit 0,75 mg XN-haltigen Hopfenextrakt isoliert und mit 2,5 µg SCV2 ex vivo stimuliert wurden, setzten im Vergleich zur Kontrolle ebenfalls mehr von allen drei Zytokinen frei. Diese Ergebnisse sind ähnlich wie bei Salvi et al. (2021), die durch Stimulation von Monozyten-abgeleiteten dendritischen Zellen mit 2,5 µg und 5 µg ssRNA Fragmenten eine Erhöhung der Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine erzielten [50]. Beim Vergleich von Placebo und der Dosis von 0,75 mg XN konnte bei der TNF-α und IL-6 Konzentration eine Erhöhung und bei IL-1β keine Veränderung der Zytokinfreisetzung 1h nach Aufnahme des XN-haltigen Studiengetränkes festgestellt werden. Daher deuten die Ergebnisse insgesamt darauf hin, dass sich die einzelsträngigen ssRNA-Fragmente von SCV2 für die Stimulation von Monozyten gut eignen, aber durch eine Dosis von 0,75 mg XN die Zytokinausschüttung nicht gedämpft wird.

Bei einer SCV2 Infektion kommt es bei Patient*innen mit schweren Verläufen häufig zu Zytokinstürmen, die schwerwiegende Folgen für die Patient*innen haben können. Dennoch weist die aktuelle Datenlage daraufhin, dass eine vollständige Unterdrückung der Zytokinfreisetzung von Nachteil bei einer Infektion mit SCV2 sein könnte [59]. Daher könnte XN durch eine geringe, aber nicht vollständige Hemmung der Freisetzung proinflammatorischer Zytokine bereits positive Effekte auf einen Infektionsverlauf haben. Bisherige Studienergebnisse zur Auswirkung von XN auf die Immunantwort haben hemmende Effekte auf die TLR2 und TLR4-abhängige Freisetzung proinflammatorischer Zytokine gezeigt. In Untersuchungen wurden ernährungsphysiologisch relevante Dosen von 0,125 mg XN aus XN-haltigem Extrakt verwendet, um die LPS- und LTA-vermittelte Zytokinfreisetzung in humanen PBMCs zu

untersuchen. Dabei konnte eine immunsuppressive Wirkung durch XN beobachtet werden [17], [56].

Da diese Ergebnisse im Widerspruch zu den Ergebnissen dieser Arbeit mit einer Dosis von 0,75 mg XN-haltigen Hopfenextrakt stehen, wurden die Auswirkungen der oralen Aufnahme von XN weiter untersucht. Gesunden Proband*innen wurde an sechs verschiedenen Zeitpunkten vor und nach der Einnahme des Studiengetränkes, das drei unterschiedliche ernährungsphysiologisch relevante Dosen XN-haltiges Extrakt enthielt, Blut abgenommen. Damit sollte beobachtet werden, wie sich die Zytokinfreisetzung im Zeitverlauf und dosisabhängig verhält. Anhand der Ergebnisse konnte kein eindeutig hemmender Effekt von XN auf die SCV2-vermittelte Zytokinfreisetzung gezeigt werden. Die niedrigeren Dosen von 0,125 mg und 0,375 mg führten 1 h nach Aufnahme des Studiengetränkes zu einer Dämpfung der IL-1 β und IL-6 Freisetzung. Des Weiteren war dies bei der Dosis von 0,375 mg auch nach 3 h bei TNF- α und IL-1 β zu beobachten. Im Gegensatz zur höchsten Dosis von 0,75 mg, bei der auch im Zeitverlauf kein dämpfender Effekt auf die Zytokinausschüttung festgestellt wurde, zeigen die Ergebnisse zu den niedrigeren Dosen eine immunsuppressive Wirkung ähnlich wie bei vorangegangenen Studien zu LTA und LPS mit einer Dosis von 0,125 mg XN [17], [56].

Zur Auswirkung von XN auf die SCV2-vermittelte Zytokinausschüttung gibt es bisher kaum Untersuchungen. Allerdings konnte in einer Studie zum PRRSV beobachtet werden, dass die Expression von IL-1, IL-6, IL-8 und TNF- α in PRRSV-infizierten Alveolarmakrophagen von Schweinen durch die Gabe von XN in Dosen von 10-25 mg/kg Körpergewicht, gehemmt wurde [23]. Inwiefern sich diese Effekte auf Infektionen mit SARS-CoV-2 im Menschen übertragen lassen, ist bisher weitgehend ungeklärt. Eine klinische Studie untersuchte die Effekte einer 7-tägigen enteralen Aufnahme von 4,5 mg XN pro kg Körpergewicht bei Covid-19 Patient*innen, wobei festgestellt wurde, dass unter anderem die Mortalitätsrate, Klinikaufenthaltsdauer und die IL-6 Konzentration im Plasma reduziert werden konnten [55]. Diese Ergebnisse deuten ebenfalls darauf hin, dass XN bei einer SARS-CoV-2 Infektion immunsuppressive Wirkungen haben könnte. Allerdings handelt es sich bei den

Studien um pharmakologische Dosen, weshalb auch ernährungsphysiologisch relevante Dosen weiter untersucht werden müssen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen keine eindeutige Hemmung der Freisetzung proinflammatorischer Zytokine nach oraler Aufnahme ernährungsphysiologisch relevanter Dosen, weshalb weitere Untersuchungen mit verschiedenen Dosen und einem größerem Studienkollektiv notwendig wären. Die Zytokinfreisetzung durch die höchste Dosis von 0,75 mg wurde in den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit nicht gedämpft, wohingegen niedrigere Dosen von 0,125 mg und 0,375 mg dämpfende Effekte gezeigt haben. Wie lange dieser dämpfende Effekt anhält, wurde nicht geklärt, weshalb insbesondere die niedrigeren Dosen weiter in Betracht gezogen werden sollten und mit größerem Stichprobenumfang genauer untersucht werden. Zusätzlich sollten die Effekte einer regelmäßigen Aufnahme von XN über einen längeren Zeitraum beobachtet, sowie die Auswirkung von XN auf Patient*innen mit einer aktiven SCV2 Infektion erforscht werden.

5.2 Einfluss der Zugabe von JNK-Inhibitor und sCD14 auf die SCV2-induzierte Freisetzung proinflammatorischer Zytokine im Zellüberstand humaner Monozyten

Inwiefern SCV2 mit der TLR-abhängigen Signalkaskade interagiert, sollte weiter untersucht werden, indem Monozyten gesunder Proband*innen ex vivo für 1 h mit 10 μ M JNK-Inhibitor oder 500 ng/ml sCD14 präinkubiert und anschließend mit 2,5 μ g ssRNA von SCV2 stimuliert wurden.

Beim Vergleich der isolierten Monozyten, die nur mit SCV2 und denen die sowohl mit SCV2 als auch mit einem JNK-Inhibitor stimuliert wurden, konnte eine signifikant geringere Freisetzung der TNF- α Konzentration nach 24 und 48 h festgestellt werden, während bei den Zytokinen IL-6 und IL-1 β zu allen Zeitpunkten eine signifikant niedrigere Ausschüttung gemessen werden konnte. Damit deuten die Ergebnisse darauf hin, dass SCV2 über die JNK-abhängige Signalkaskade die Zytokinfreisetzung beeinflusst und ein JNK-Inhibitor die Ausschüttung dämpft. In einer Studie von Shirato

et al. (2021) konnte festgestellt werden, dass der JNK-Signalweg durch das S1 Protein von SCV2 in murinen Makrophagen aktiviert wird. Die einstündige Behandlung von murinen RAW264.7 Makrophagen mit 10 μ M SP600125, das in dieser Arbeit ebenfalls angewendet wurde, hat die JNK und c-Jun Phosphorylierung gehemmt, wodurch die TNF- α Freisetzung unterdrückt wurde [48]. Die Beteiligung des JNK-Signalweges bei Infektionen und die Möglichkeit JNK-Inhibitoren als Behandlung für infektiöse Erkrankungen einzusetzen, um unter anderem entzündliche Prozesse zu lindern, ist auch in vorheriger Forschung erkannt worden [60]. Allerdings wurden bisher nur wenige Untersuchungen zum Einsatz von JNK-Inhibitoren und der Aktivierung dieses Signalweges bei SCV2 gemacht.

Es wurde bisher noch nicht untersucht, ob die ssRNA von SCV2 über TLR7/8 in weiterer Folge den JNK-Signalweg aktiviert und somit die Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine fördert. Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten auf eine Interaktion mit JNK hin, weshalb weitere Untersuchungen zu JNK als mögliches therapeutisches Behandlungsziel bei SCV2 Infektionen erforderlich ist. Des Weiteren ist ein möglicher Einfluss von XN auf den JNK-Signalweg im Zusammenhang mit SCV2 weitgehend ungeklärt und stellt ein weiteres Forschungsfeld für zukünftige Studien dar.

Die Ergebnisse zur Stimulation mit sCD14 zeigten nur bei TNF- α eine signifikante Abnahme nach 6 und 48 h. Die Zytokinkonzentrationen bei IL-1 β und IL-6 zeigten keine signifikanten Unterschiede, allerdings ist ein abnehmender Trend durch die Präinkubation mit sCD14 erkennbar. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass SCV2 möglicherweise mit sCD14 interagieren und somit die Zytokinfreisetzung beeinflussen könnte.

Bisher konnten Baumann et al. (2010) in peritonealen Makrophagen von CD14-defizienten und Wildtyp Mäusen, die mit dem Influenza A Virus und vesikulären Stomatitis-Virus infiziert wurden, beobachten, dass die IL-6 Konzentration bei den CD14-defizienten Mäusen niedriger war. Weiters haben Sie eine Interaktion von CD14 mit TLR7 und 8, wodurch die ssRNA-Viren erkannt werden, in HEK293T-Zellen feststellen können [53]. Da CD14 mit den TLRs interagiert und somit die

Zytokinausschüttung fördert, wäre auf Grundlage der aktuellen Daten bei den Ergebnissen dieser Arbeit eine Erhöhung der Zytokinfreisetzung durch die Präinkubation von Monozyten mit sCD14 zu erwarten gewesen [52]. Allerdings lag eine hohe Streuung der Werte vor und es konnte nur bei TNF- α eine signifikante Senkung der Freisetzung gemessen werden. Daher wäre weitere Forschung erforderlich, um die genauen Mechanismen zu klären.

Inwiefern XN sich auf die Interaktion von CD14 mit SCV2 wirkt, ist bisher ebenfalls ungeklärt. In humanen PBMCs, die mit LPS stimuliert wurden, konnte im Gegensatz zur Placebointervention nach Aufnahme einer Dosis von 0,125 mg XN über einen XN-haltigen Extrakt (75%) keine Erhöhung der sCD14 Konzentration im Zellüberstand festgestellt werden. XN hemmte in vitro außerdem die Bindung von biotinyliertem LPS an CD14, weshalb die Aktivierung der TLR4 Signalkaskade gedämpft wurde [17]. Ebenso konnte durch die LTA-abhängige Stimulation eine Hemmung der sCD14 Freisetzung in humanen PBMCs durch die orale Aufnahme von XN beobachtet werden [56]. Da die ssRNA Fragmente von SCV2 aber die TLR7/8 Signalkaskade aktivieren, bleibt ungeklärt ob diese Effekte von XN auf virale Infektionen übertragbar sind. Da CD14 eine zentrale Rolle bei Entzündungsprozessen spielt und sie stark vorantreiben kann, sollte in der zukünftigen Forschung auch der Einfluss von XN auf CD14 bei Infektionen mit SCV2 untersucht werden, um den Zusammenhang mit diesem Signalweg genauer zu verstehen [52].

6 Zusammenfassung

SARS-CoV-2 hat durch seine rasante Verbreitung eine weltweite Pandemie ausgelöst und das Gesundheitssystem vor große Herausforderungen gestellt. Eine Infektion wird meist symptomorientiert behandelt, wobei es kaum Behandlungsmethoden gibt. Es ist bekannt, dass eine überschießende Immunreaktion begleitet von Zytokinstürmen zur Schwere der Erkrankung beiträgt. Eine Dämpfung der Freisetzung proinflammatorischer Zytokine stellt ein mögliches Behandlungsziel bei einer Infektion mit SARS-CoV-2 dar. Bisherige Studien konnten feststellen, dass das in Hopfen enthaltene prenylierte Chalkon Xanthohumol (XN) eine antiinflammatorische Wirkung hat. Welche immunmodulatorischen Effekte XN in ernährungsphysiologisch relevanten Mengen auf den Menschen hat, sowie welche Rolle es bei viralen Infektionen spielt, wurde bislang nur wenig untersucht. Des Weiteren sind die molekularen Wirkmechanismen noch weitgehend ungeklärt.

Um die Wirkung von XN auf den menschlichen Organismus weiter zu untersuchen, wurden in dieser Arbeit im Rahmen einer Humanstudie gesunden Proband*innen ein Studiengetränk, das 0,125 mg, 0,375 mg und 0,75 mg XN in Form eines XN-haltigen Hopfenextrakts (75 % XN) enthielt und Placebo verabreicht. Anschließend wurden aus dem Vollblut Monozyten isoliert und diese ex vivo mit 2,5 µg einzelsträngigen RNA-Fragmenten von SARS-CoV-2 (SCV2) stimuliert. Zur weiteren Untersuchung der molekularen Mechanismen wurden Monozyten zusätzlich mit 10 µM c-Jun N-terminale Kinase (JNK) Inhibitor sowie 500 ng/ml soluble Cluster of Differentiation 14 (sCD14) präinkubiert. Im Anschluss wurde der Zellüberstand 6-48 h nach Zugabe von SCV2 abgenommen und mittels ELISA die Zytokinkonzentration von Tumornekrosefaktor α (TNF-α), Interleukin-1β (IL-1β) und Interleukin-6 (IL-6) bestimmt.

Die 6-stündige ex vivo Stimulation von Monozyten mit SCV2 führte 1 h nach Aufnahme einer Dosis von 0,125 mg und 0,375 mg XN über einen XN-haltigen Extrakt zu einer Dämpfung der Freisetzung von IL-6 und IL-1β im Vergleich zu Placebo. Bei einer Dosis von 0,375 mg konnte dieser Effekt auch nach 3 h bei TNF-α und IL-1β beobachtet werden. Die Aufnahme einer Dosis von 0,75 mg hatte keine dämpfende Wirkung auf

die Zytokinfreisetzung. Weiters zeigten die Untersuchungen in isolierten Monozyten eine Hemmung der Freisetzung von allen drei Zytokinen nach der in vitro Präinkubation mit einem JNK-Inhibitor. Bei der in vitro Präinkubation mit sCD14 konnte nur bei TNF- α eine signifikante Verminderung der Freisetzung gemessen werden.

Insgesamt konnte gezeigt werden, dass die Aufnahme von ernährungsphysiologisch relevanten Dosen von XN möglicherweise zur Dämpfung der virusinduzierten Freisetzung proinflammatorischer Zytokine bei gesunden Proband*innen führen könnten. Außerdem konnte eine Interaktion von SARS-CoV-2 mit den JNK- und CD14-abhängigen Signalwegen nachgewiesen werden. Weitere Untersuchungen sollten mit einem größeren Studienkollektiv und über längere Zeiträume durchgeführt werden, um die immunmodulatorischen Effekte und molekularen Mechanismen von XN bei SARS-CoV-2 Infektionen genauer zu untersuchen.

Summary

SARS-CoV-2 caused a worldwide pandemic due to its rapid spread and has caused major challenges for healthcare systems. To date, there are only very few treatment methods for infections. It is well known that an exaggerated immune response accompanied by cytokine storms contributes to the severity of the disease. Therefore, a possible treatment target would be the dampening of the release of proinflammatory cytokines during an infection with SARS-CoV-2. Studies have shown that Xanthohumol (XN), a prenylated chalcone that can be found in hop, has anti-inflammatory properties. However, it is not well investigated what kind of immunomodulatory effects nutritionally relevant doses of XN have on the human organism and what role they play in viral infections. Furthermore, the molecular mechanisms remain largely unresolved.

To further examine the effects of XN on the human organism, a human study was conducted where study participants were asked to consume a study drink with 0,125 mg, 0,375 mg and 0,75 mg XN derived through a XN-rich hop extract (75%) or placebo. Then monocytes were isolated from the whole blood and stimulated *ex vivo* with single-stranded RNA fragments of SARS-CoV-2. In addition, to further investigate the molecular mechanisms, monocytes were additionally preincubated with a c-Jun N-terminal kinase (JNK) inhibitor and soluble Cluster of Differentiation 14 (sCD14). The cell supernatant was obtained 6-48 h after the addition of SCV2 and the cytokine concentration of tumor necrosis factor α (TNF- α), interleukin-1 β (IL-1 β) and interleukin-6 (IL-6) was measured by ELISA.

The intake of the study drink with the lower doses of 0,125 mg and 0,375 mg XN from a XN-rich extract was related with a lower release of IL-6 and IL-1 β 1 h after intake compared to placebo. For the dose of 0,375 mg, a similar effect was found after 3 h for TNF- α and IL-1 β . The intake of the dose of 0,75 mg did not show a dampening effect on the cytokine concentration. Furthermore, the results showed an inhibition of the release of all three cytokines in isolated monocytes after the *in vitro* preincubation with a JNK-inhibitor. After the *in vitro* preincubation with sCD14 only the release of TNF- α was significantly reduced.

Taken together, these results showed that nutritionally relevant doses of XN could possibly have a dampening effect on the virus induced release of proinflammatory cytokines in healthy study participants. Moreover, an interaction between SARS-CoV-2 and the JNK- and CD14-dependent pathways was observed. Further research should be carried out with a larger study group and over longer periods of time to better understand the immunomodulatory effects and molecular mechanisms of XN in SARS-CoV-2 infections.

Literaturverzeichnis

- [1] P. Zanolì und M. Zavatti, „Pharmacognostic and pharmacological profile of *Humulus lupulus* L.“, *J Ethnopharmacol*, Bd. 116, Nr. 3, S. 383–396, März 2008, doi: 10.1016/j.jep.2008.01.011.
- [2] M. Lin, D. Xiang, X. Chen, und H. Huo, „Role of Characteristic Components of *Humulus lupulus* in Promoting Human Health“, *J Agric Food Chem*, Bd. 67, Nr. 30, S. 8291–8302, Juli 2019, doi: 10.1021/acs.jafc.9b03780.
- [3] G. Vicente de Andrade Silva, G. Demaman Arend, A. Antonio Ferreira Zielinski, M. Di Luccio, und A. Ambrosi, „Xanthohumol properties and strategies for extraction from hops and brewery residues: A review“, *Food Chem*, Bd. 404, S. 134629, März 2023, doi: 10.1016/j.foodchem.2022.134629.
- [4] J. F. Stevens und J. E. Page, „Xanthohumol and related prenylflavonoids from hops and beer: to your good health!“, *Phytochemistry*, Bd. 65, Nr. 10, S. 1317–1330, Mai 2004, doi: 10.1016/j.phytochem.2004.04.025.
- [5] L. Legette *u. a.*, „Human pharmacokinetics of xanthohumol, an antihyperglycemic flavonoid from hops“, *Mol Nutr Food Res*, Bd. 58, Nr. 2, S. 248–255, Feb. 2014, doi: 10.1002/mnfr.201300333.
- [6] A. Nookandeh, „Xanthohumol metabolites in faeces of rats“, *Phytochemistry*, Bd. 65, Nr. 5, S. 561–570, März 2004, doi: 10.1016/j.phytochem.2003.11.016.
- [7] L. Legette *u. a.*, „Pharmacokinetics of xanthohumol and metabolites in rats after oral and intravenous administration“, *Mol Nutr Food Res*, Bd. 56, Nr. 3, S. 466–474, März 2012, doi: 10.1002/mnfr.201100554.
- [8] A. B. Iniguez und M.-J. Zhu, „Hop bioactive compounds in prevention of nutrition-related noncommunicable diseases“, *Crit Rev Food Sci Nutr*, Bd. 61, Nr. 11, S. 1900–1913, Juni 2021, doi: 10.1080/10408398.2020.1767537.
- [9] C. L. Miranda, V. D. Elias, J. J. Hay, J. Choi, R. L. Reed, und J. F. Stevens, „Xanthohumol improves dysfunctional glucose and lipid metabolism in diet-induced obese C57BL/6J mice“, *Arch Biochem Biophys*, Bd. 599, S. 22–30, Juni 2016, doi: 10.1016/j.abb.2016.03.008.
- [10] K. Yui, A. Kiyofuji, und K. Osada, „Effects of Xanthohumol-rich Extract from the Hop on Fatty Acid Metabolism in Rats Fed a High-fat Diet“, *J Oleo Sci*, Bd. 63, Nr. 2, S. 159–168, 2014, doi: 10.5650/jos.ess13136.

- [11] L. L. Legette *u. a.*, „Xanthohumol lowers body weight and fasting plasma glucose in obese male Zucker fa/fa rats“, *Phytochemistry*, Bd. 91, S. 236–241, Juli 2013, doi: 10.1016/j.phytochem.2012.04.018.
- [12] R. Costa *u. a.*, „Xanthohumol and 8-prenylnaringenin ameliorate diabetic-related metabolic dysfunctions in mice“, *J Nutr Biochem*, Bd. 45, S. 39–47, Juli 2017, doi: 10.1016/j.jnutbio.2017.03.006.
- [13] H. Hirata *u. a.*, „Xanthohumol Prevents Atherosclerosis by Reducing Arterial Cholesterol Content via CETP and Apolipoprotein E in CETP-Transgenic Mice“, *PLoS One*, Bd. 7, Nr. 11, S. e49415, Nov. 2012, doi: 10.1371/journal.pone.0049415.
- [14] Y.-C. Cho *u. a.*, „Differential anti-inflammatory pathway by xanthohumol in IFN- γ and LPS-activated macrophages“, *Int Immunopharmacol*, Bd. 8, Nr. 4, S. 567–573, Apr. 2008, doi: 10.1016/j.intimp.2007.12.017.
- [15] J.-M. Cho *u. a.*, „Xanthohumol prevents dextran sulfate sodium-induced colitis via inhibition of IKK β /NF- κ B signaling in mice“, *Oncotarget*, Bd. 9, Nr. 1, S. 866–880, Jan. 2018, doi: 10.18632/oncotarget.23183.
- [16] E. Lupinacci, J. Meijerink, J.-P. Vincken, B. Gabriele, H. Gruppen, und R. F. Witkamp, „Xanthohumol from Hop (*Humulus lupulus* L.) Is an Efficient Inhibitor of Monocyte Chemoattractant Protein-1 and Tumor Necrosis Factor- α Release in LPS-Stimulated RAW 264.7 Mouse Macrophages and U937 Human Monocytes“, *J Agric Food Chem*, Bd. 57, Nr. 16, S. 7274–7281, Aug. 2009, doi: 10.1021/jf901244k.
- [17] F. Jung *u. a.*, „A Xanthohumol-Rich Hop Extract Diminishes Endotoxin-Induced Activation of TLR4 Signaling in Human Peripheral Blood Mononuclear Cells: A Study in Healthy Women“, *Int J Mol Sci*, Bd. 23, Nr. 20, S. 12702, Okt. 2022, doi: 10.3390/ijms232012702.
- [18] N. Yamaguchi, K. Satoh-Yamaguchi, und M. Ono, „In vitro evaluation of antibacterial, anticollagenase, and antioxidant activities of hop components (*Humulus lupulus*) addressing acne vulgaris“, *Phytomedicine*, Bd. 16, Nr. 4, S. 369–376, Apr. 2009, doi: 10.1016/j.phymed.2008.12.021.
- [19] S. Wei, T. Sun, J. Du, B. Zhang, D. Xiang, und W. Li, „Xanthohumol, a prenylated flavonoid from Hops, exerts anticancer effects against gastric cancer in vitro“, *Oncol Rep*, Sep. 2018, doi: 10.3892/or.2018.6723.

- [20] W.-J. Lu *u. a.*, „Xanthohumol from *Humulus lupulus* L. induces glioma cell autophagy via inhibiting Akt/mTOR/S6K pathway“, *J Funct Foods*, Bd. 18, S. 538–549, Okt. 2015, doi: 10.1016/j.jff.2015.08.020.
- [21] D. Guo, B. Zhang, S. Liu, und M. Jin, „Xanthohumol induces apoptosis via caspase activation, regulation of Bcl-2, and inhibition of PI3K/Akt/mTOR-kinase in human gastric cancer cells“, *Biomedicine & Pharmacotherapy*, Bd. 106, S. 1300–1306, Okt. 2018, doi: 10.1016/j.biopha.2018.06.166.
- [22] V. BUCKWOLD *u. a.*, „Antiviral activity of hop constituents against a series of DNA and RNA viruses“, *Antiviral Res*, Bd. 61, Nr. 1, S. 57–62, Jan. 2004, doi: 10.1016/S0166-3542(03)00155-4.
- [23] X. Liu *u. a.*, „Therapeutic effect of Xanthohumol against highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome viruses“, *Vet Microbiol*, Bd. 238, S. 108431, Nov. 2019, doi: 10.1016/j.vetmic.2019.108431.
- [24] B. Luzak, H. Kassassir, E. Rój, L. Stanczyk, C. Watala, und J. Golanski, „Xanthohumol from hop cones (*Humulus lupulus* L.) prevents ADP-induced platelet reactivity“, *Arch Physiol Biochem*, Bd. 123, Nr. 1, S. 54–60, Jan. 2017, doi: 10.1080/13813455.2016.1247284.
- [25] P. Cermak *u. a.*, „Strong antimicrobial activity of xanthohumol and other derivatives from hops (*Humulus lupulus* L.) on gut anaerobic bacteria“, *APMIS*, Bd. 125, Nr. 11, S. 1033–1038, Nov. 2017, doi: 10.1111/apm.12747.
- [26] G. Chen *u. a.*, „Discovery of new MD2-targeted anti-inflammatory compounds for the treatment of sepsis and acute lung injury“, *Eur J Med Chem*, Bd. 139, S. 726–740, Okt. 2017, doi: 10.1016/j.ejmech.2017.08.036.
- [27] S. McComb, A. Thiriot, B. Akache, L. Krishnan, und F. Stark, „Introduction to the Immune System“, 2019, S. 1–24. doi: 10.1007/978-1-4939-9597-4_1.
- [28] N. Tomar und R. K. De, „A Brief Outline of the Immune System“, 2014, S. 3–12. doi: 10.1007/978-1-4939-1115-8_1.
- [29] K. L. Medina, „Overview of the immune system“, 2016, S. 61–76. doi: 10.1016/B978-0-444-63432-0.00004-9.
- [30] C. R. Kleiveland, „Peripheral Blood Mononuclear Cells“, in *The Impact of Food Bioactives on Health*, Cham: Springer International Publishing, 2015, S. 161–167. doi: 10.1007/978-3-319-16104-4_15.
- [31] A. K. Rana, Y. Li, Q. Dang, und F. Yang, „Monocytes in rheumatoid arthritis: Circulating precursors of macrophages and osteoclasts and, their

- heterogeneity and plasticity role in RA pathogenesis“, *Int Immunopharmacol*, Bd. 65, S. 348–359, Dez. 2018, doi: 10.1016/j.intimp.2018.10.016.
- [32] P. E. Pellett, S. Mitra, und T. C. Holland, „Basics of virology“, 2014, S. 45–66. doi: 10.1016/B978-0-444-53488-0.00002-X.
- [33] E. M. Y. Moresco, D. LaVine, und B. Beutler, „Toll-like receptors“, *Current Biology*, Bd. 21, Nr. 13, S. R488–R493, Juli 2011, doi: 10.1016/j.cub.2011.05.039.
- [34] P. Behzadi, H. A. García-Perdomo, und T. M. Karpiński, „Toll-Like Receptors: General Molecular and Structural Biology“, *J Immunol Res*, Bd. 2021, S. 1–21, Mai 2021, doi: 10.1155/2021/9914854.
- [35] A. Manan, R. H. Pirzada, M. Haseeb, und S. Choi, „Toll-like Receptor Mediation in SARS-CoV-2: A Therapeutic Approach“, *Int J Mol Sci*, Bd. 23, Nr. 18, S. 10716, Sep. 2022, doi: 10.3390/ijms231810716.
- [36] S. Akashi-Takamura und K. Miyake, „TLR accessory molecules“, *Curr Opin Immunol*, Bd. 20, Nr. 4, S. 420–425, Aug. 2008, doi: 10.1016/j.coi.2008.07.001.
- [37] M. R. Thompson, J. J. Kaminski, E. A. Kurt-Jones, und K. A. Fitzgerald, „Pattern Recognition Receptors and the Innate Immune Response to Viral Infection“, *Viruses*, Bd. 3, Nr. 6, S. 920–940, Juni 2011, doi: 10.3390/v3060920.
- [38] S. Khanmohammadi und N. Rezaei, „Role of Toll-like receptors in the pathogenesis of COVID-19“, *J Med Virol*, Bd. 93, Nr. 5, S. 2735–2739, Mai 2021, doi: 10.1002/jmv.26826.
- [39] World Health Organization (WHO), „WHO COVID-19 dashboard“. Zugegriffen: 5. August 2024. [Online]. Verfügbar unter: <https://data.who.int/dashboards/covid19/deaths?n=c>
- [40] P. V’kovski, A. Kratzel, S. Steiner, H. Stalder, und V. Thiel, „Coronavirus biology and replication: implications for SARS-CoV-2“, *Nat Rev Microbiol*, Bd. 19, Nr. 3, S. 155–170, März 2021, doi: 10.1038/s41579-020-00468-6.
- [41] A. R. Fehr und S. Perlman, „Coronaviruses: An Overview of Their Replication and Pathogenesis“, 2015, S. 1–23. doi: 10.1007/978-1-4939-2438-7_1.
- [42] R. Chilamakuri und S. Agarwal, „COVID-19: Characteristics and Therapeutics“, *Cells*, Bd. 10, Nr. 2, S. 206, Jan. 2021, doi: 10.3390/cells10020206.
- [43] C. Huang u. a., „Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China“, *The Lancet*, Bd. 395, Nr. 10223, S. 497–506, Feb. 2020, doi: 10.1016/S0140-6736(20)30183-5.

- [44] D. Blanco-Melo *u. a.*, „Imbalanced Host Response to SARS-CoV-2 Drives Development of COVID-19“, *Cell*, Bd. 181, Nr. 5, S. 1036-1045.e9, Mai 2020, doi: 10.1016/j.cell.2020.04.026.
- [45] M. Manik und R. K. Singh, „Role of toll-like receptors in modulation of cytokine storm signaling in SARS-CoV-2-induced COVID-19“, *J Med Virol*, Bd. 94, Nr. 3, S. 869–877, März 2022, doi: 10.1002/jmv.27405.
- [46] M. A. Moreno-Eutimio, C. López-Macías, und R. Pastelin-Palacios, „Bioinformatic analysis and identification of single-stranded RNA sequences recognized by TLR7/8 in the SARS-CoV-2, SARS-CoV, and MERS-CoV genomes“, *Microbes Infect*, Bd. 22, Nr. 4–5, S. 226–229, Mai 2020, doi: 10.1016/j.micinf.2020.04.009.
- [47] S. Khan, M. S. Shafiei, C. Longoria, J. W. Schoggins, R. C. Savani, und H. Zaki, „SARS-CoV-2 spike protein induces inflammation via TLR2-dependent activation of the NF-κB pathway“, *Elife*, Bd. 10, Dez. 2021, doi: 10.7554/eLife.68563.
- [48] K. Shirato und T. Kizaki, „SARS-CoV-2 spike protein S1 subunit induces pro-inflammatory responses via toll-like receptor 4 signaling in murine and human macrophages“, *Heliyon*, Bd. 7, Nr. 2, S. e06187, Feb. 2021, doi: 10.1016/j.heliyon.2021.e06187.
- [49] H. Yan, L. He, D. Lv, J. Yang, und Z. Yuan, „The Role of the Dysregulated JNK Signaling Pathway in the Pathogenesis of Human Diseases and Its Potential Therapeutic Strategies: A Comprehensive Review“, *Biomolecules*, Bd. 14, Nr. 2, S. 243, Feb. 2024, doi: 10.3390/biom14020243.
- [50] V. Salvi *u. a.*, „SARS-CoV-2–associated ssRNAs activate inflammation and immunity via TLR7/8“, *JCI Insight*, Bd. 6, Nr. 18, Sep. 2021, doi: 10.1172/jci.insight.150542.
- [51] D. Bortolotti *u. a.*, „TLR3 and TLR7 RNA Sensor Activation during SARS-CoV-2 Infection“, *Microorganisms*, Bd. 9, Nr. 9, S. 1820, Aug. 2021, doi: 10.3390/microorganisms9091820.
- [52] Z. Wu, Z. Zhang, Z. Lei, und P. Lei, „CD14: Biology and role in the pathogenesis of disease“, *Cytokine Growth Factor Rev*, Bd. 48, S. 24–31, Aug. 2019, doi: 10.1016/j.cytogfr.2019.06.003.
- [53] C. L. Baumann *u. a.*, „CD14 is a coreceptor of Toll-like receptors 7 and 9“, *Journal of Experimental Medicine*, Bd. 207, Nr. 12, S. 2689–2701, Nov. 2010, doi: 10.1084/jem.20101111.

- [54] Y. Lin *u. a.*, „Xanthohumol Is a Potent Pan-Inhibitor of Coronaviruses Targeting Main Protease“, *Int J Mol Sci*, Bd. 22, Nr. 22, S. 12134, Nov. 2021, doi: 10.3390/ijms222212134.
- [55] W. Dabrowski *u. a.*, „Humulus lupulus extract rich in xanthohumol improves the clinical course in critically ill COVID-19 patients“, *Biomedicine & Pharmacotherapy*, Bd. 158, S. 114082, Feb. 2023, doi: 10.1016/j.biopha.2022.114082.
- [56] F. Jung *u. a.*, „Oral intake of xanthohumol attenuates lipoteichoic acid-induced inflammatory response in human PBMCs“, *Eur J Nutr*, Bd. 61, Nr. 8, S. 4155–4166, Dez. 2022, doi: 10.1007/s00394-022-02964-2.
- [57] „World Medical Association Declaration of Helsinki“, *JAMA*, Bd. 310, Nr. 20, S. 2191, Nov. 2013, doi: 10.1001/jama.2013.281053.
- [58] S. D. Gan und K. R. Patel, „Enzyme Immunoassay and Enzyme-Linked Immunosorbent Assay“, *Journal of Investigative Dermatology*, Bd. 133, Nr. 9, S. 1–3, Sep. 2013, doi: 10.1038/jid.2013.287.
- [59] A. Pum, M. Ennemoser, T. Adage, und A. J. Kungl, „Cytokines and Chemokines in SARS-CoV-2 Infections—Therapeutic Strategies Targeting Cytokine Storm“, *Biomolecules*, Bd. 11, Nr. 1, S. 91, Jan. 2021, doi: 10.3390/biom11010091.
- [60] J. Chen *u. a.*, „The Roles of c-Jun N-Terminal Kinase (JNK) in Infectious Diseases“, *Int J Mol Sci*, Bd. 22, Nr. 17, S. 9640, Sep. 2021, doi: 10.3390/ijms22179640.
- [61] N. Kirtipal, S. Bharadwaj, und S. G. Kang, „From SARS to SARS-CoV-2, insights on structure, pathogenicity and immunity aspects of pandemic human coronaviruses“, *Infection, Genetics and Evolution*, Bd. 85, S. 104502, Nov. 2020, doi: 10.1016/j.meegid.2020.104502.
- [62] S. Schmitz, *Der Experimentator: Zellkultur*. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag, 2011. doi: 10.1007/978-3-8274-2573-7.

Anhang

I. Herstellung des Studiengetränks

Für das Studiengetränk wurde eine geringe Menge von XN-haltigen Extrakt (XanthoFlav™ bestehend aus 75% XN und <25% anderen prenylierten Flavonoiden) im Mörser zerkleinert und je nach benötigtem Endvolumen, wie in Tabelle 4 dargestellt, in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen abgewogen. Zusätzlich wurden sowohl der Puderzucker, die Zitronensäure als auch das Bindemittel abgewogen.

Tabelle 4: Zusammensetzung des Studiengetränkes für die Humanstudie

Studiengetränk	0,125 mg XN	0,375 mg XN	0,75 mg XN	Placebo
XN-haltiges Extrakt (75% XN)	1,35 mg	4 mg	4 mg	-
Puderzucker	16 g	16 g	8 g	16 g
Zitronensäure	1 g	1 g	0,5 g	1 g
Bindino Bindemittel	2,6 g	2,6 g	1,3 g	2,6 g

Nun wurden alle Substanzen in das Zentrifugenröhrchen hinzugefügt und geschüttelt, um die Substanzen gut zu vermengen. Die Mischung wurde dann auf neue 50ml Zentrifugenröhrchen aufgeteilt, indem in jedes 2,45 g abgefüllt wurde. Somit wurde die entsprechende Endkonzentration erreicht. In 500 ml stilles Wasser wurden 10 ml Zitronensirup beigefügt und unmittelbar vor der Getränkeinnahme 50 ml davon zur Mischung hinzugegeben. Das Zentrifugenröhrchen wurde erneut geschüttelt, bis sich eine homogene Lösung gebildet hatte.

II. ELISA

Herstellung von PBS

Für die Herstellung von 1 L PBS wurden die in Tabelle 5 angeführten Substanzen mithilfe der Analysenwaage in ein Becherglas eingewogen.

Tabelle 5: Zusammensetzung von PBS für ELISA

Substanzen	Menge [g]	Konzentration [M]
Na ₂ HPO ₄ (di-Natriumhydrogenphosphat)	1,49876	0,01056
KCl (Kaliumchlorid)	0,2013	0,0027
NaCl (Natriumchlorid)	8,00628	0,137
KH ₂ PO ₄ (Kaliumdihydrogenphosphat)	0,204135	0,00150

Anschließend wurde destilliertes Wasser dazugegeben und die Substanzen mittels Magnetrührstäbchen und Magnetrührer gelöst. Danach wurde mit destilliertem Wasser auf das Endvolumen von 1 L aufgefüllt. Mithilfe eines pH-Meters wurde durch Zugabe von Salzsäure (HCl) bzw. Natriumhydroxid (NaOH) auf einen pH-Wert von 7,2-7,4 eingestellt. Die PBS-Lösung wurde dann mit einem 0,22 µm Filter steril filtriert und bei 4°C im Kühlschrank gelagert.

Herstellung von Waschpuffer

Für 1 L Waschpuffer mit 0,05% Vol. Tween®20 wurden die in Tabelle 6 angeführten Mengen in eine Glasflasche überführt und geschwenkt. Der Waschpuffer wurde bei 4°C im Kühlschrank gelagert.

Tabelle 6: Zusammensetzung des Waschpuffers für ELISA

Substanzen	Menge
PBS	1 L
Tween®20	500 µl

Herstellung von Reagent Diluent

Zur Herstellung von 100 ml RD wurden zu 100 ml PBS 1% Vol. BSA, wie in Tabelle 7 dargestellt, in eine Glasflasche hinzugegeben. Anschließend wurde unter Verwendung eines Magnetrührstäbchens die Lösung auf einem Magnetrührer gemischt, bis sich das BSA vollständig gelöst hatte. RD wurde ebenfalls bei 4°C im Kühlschrank gelagert.

Tabelle 7: Zusammensetzung des Reagent Diluents für ELISA

Substanzen	Menge
PBS	100 ml
BSA	1 g

Verdünnung von Capture und Detection Antibody

Der Capture Antibody des jeweiligen ELISA Kits wurde in 0,5 ml PBS gelöst und zu je 50 µl aliquotiert. Diese Aliquots wurden bei -20°C gelagert. Bei der Durchführung des ELISA musste die Stocklösung gemäß COA auf die Arbeitskonzentration verdünnt werden (Tabelle 8).

Tabelle 8: Verdünnungen des Capture Antibodys für ELISA TNF- α, IL-6 und IL-1β

ELISA	Arbeitskonzentration [µg/ml]	Verdünnung der Stocklösung
TNF-α	4,00	1:120
IL-6	2,00	1:120
IL-1β	4,00	1:120

Der Detection Antibody hingegen wurde in 1 ml RD gelöst und zu je 100 µl aliquotiert. Diese Aliquots wurden ebenfalls bei -20°C gelagert. Bei der Durchführung des ELISA musste die Stocklösung gemäß COA auf die Arbeitskonzentration verdünnt werden (Tabelle 9).

Tabelle 9: Verdünnungen des Detection Antibodys für ELISA TNF- α , IL-6 und IL-1 β

ELISA	Arbeitskonzentration [ng/ml]	Verdünnung der Stocklösung
TNF- α	50,0	1:60
IL-6	50,0	1:60
IL-1 β	75,0	1:60

Verdünnung des Standards

Der Standard des jeweiligen ELISA Kits wurde in 0,5 ml RD bzw. destilliertem Wasser gelöst und zu je 50 μ l aliquotiert. Diese Aliquots wurden bei -80°C gelagert. Für die Durchführung des ELISA musste für Standard A 1 ml der Stocklösung gemäß COA auf die Arbeitskonzentration verdünnt werden. Um die Standards B-G herzustellen, mussten 500 μ l RD in Eppendorfgefäße vorgelegt werden. Anschließend wurde Standard A seriell 1:2 weiter verdünnt und es ergaben sich die Konzentrationen, die in Tabelle 10 dargestellt sind.

Tabelle 10: Verdünnungen und Konzentrationen der Standards für ELISA TNF- α , IL-6 und IL-1 β

ELISA	Verdünnung der Stocklösung	Konzentrationen der Standards [pg/ml]							
TNF- α	1:120	A	B	C	D	E	F	G	H
		1000	500	250	125	62,5	31,3	15,6	0
IL-6	1:200	A	B	C	D	E	F	G	H
		600	300	150	75	37,5	18,8	9,4	0
IL-1 β	1:360	A	B	C	D	E	F	G	H
		250	125	62,5	31,3	15,6	7,8	3,9	0

III. Isolation von Monozyten

Herstellung von RPMI-1640 Zellkulturmedium

Zur Herstellung des RPMI-1640 Zellkulturmediums wurden 50 ml FBS, gelagert bei -20°C, zur Hitzeinaktivierung in ein Wasserbad bei 56°C für 35 min gestellt. Zusätzlich wurde noch ein 5 ml Aliquot von Penicillin/Streptomycin, das ebenfalls bei -20°C gelagert wird, aufgetaut. Anschließend wurden 55 ml von dem RPMI-1640 Medium entnommen und in einem Zentrifugenröhrchen aufbewahrt. Danach konnten das FBS und P/S hinzugefügt werden (Tabelle 11).

Tabelle 11: Zusammensetzung des RPMI-1640 Zellkulturmediums

Substanzen	Menge [ml]
RPMI-1640 Medium	445
FBS	50
Penicillin/Streptomycin	5

IV. Stimulation von Monozyten

Herstellung der SCV2-Lösung

Um die SCV2-Lösung herzustellen, wurden die Mengen von SCV2-RNA1 und SCV2-RNA2, wie in Tabelle 12 dargestellt, in ein Eppendorfgefäß pipettiert und anschließend mit 48,47 µl HBS vermengt.

Tabelle 12: Zusammensetzung und Konzentration der SCV2-Lösung

Substanzen	Arbeitskonzentration [µg/ml]	Menge [µl]
SCV2-RNA1	1,25	0,88
SCV2-RNA2	1,25	0,65

Herstellung von HBS

Zur Herstellung von HBS wurden HEPES und NaCl, wie in Tabelle 13 für 1 L HBS-Lösung dargestellt, mithilfe der Analysewaage abgewogen. Anschließend wurden die Substanzen in destilliertem Wasser mithilfe eines Magnetrührstäbchens und eines Magnetrührers gelöst. Der pH-Wert wurde mittels pH-Meter auf 7,4 eingestellt.

Tabelle 13: Zusammensetzung und Konzentration von HBS

Substanzen	Arbeitskonzentration [mM]	Menge pro Liter [g]
HEPES	20	4,766
NaCl	150	8,76

Verdünnung von JNK-Inhibitor und sCD14

Die JNK-Inhibitor-Stocklösung ($c = 50000 \mu\text{M}$) wurde verdünnt, um die Arbeitslösung zu erhalten, indem 99 μl RPMI-1640 Zellkulturmedium und 1 μl Stocklösung vermengt wurden. Die sCD14-Stocklösung ($c = 500000 \text{ ng/ml}$) wurde verdünnt, indem 9 μl RPMI-1640 Zellkulturmedium und 1 μl Stocklösung zusammengefügt wurden (Tabelle 14).

Tabelle 14: Zusammensetzung und Konzentrationen von JNK-Inhibitor und sCD14

Substanzen	Arbeitskonzentration	Verdünnung der Stocklösung
JNK-Inhibitor	500 μM	1:100
sCD14	50000 ng/ml	1:10