



universität
wien

MASTERARBEIT/ MASTER'S THESIS

Titel der Masterarbeit / Title of the Master's Thesis

„Einfluss der oralen Aufnahme verschiedener Dosen von
Xanthohumol auf die Immunantwort:
eine Pilotstudie“

verfasst von / submitted by

Johanna Marie Kreher, BSc

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

Master of Science (MSc)

Wien, 2022/ Vienna, 2022

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:

Ernährungswissenschaften

Betreut von/ Supervisor:

Univ.-Prof. Dr. Ina Bergheim

Danksagung

Ich möchte mich zunächst bei Frau Prof. Dr. Ina Bergheim für die Möglichkeit bedanken, meine Masterarbeit über so ein spannendes Thema in der Forschungsgruppe Molekulare Ernährungswissenschaft an der Universität Wien zu schreiben.

Weiterhin gilt mein besonderer Dank Finn Jung, der mich bei meiner Masterarbeit stets mit viel Hilfsbereitschaft und Geduld betreut hat. Mein herzlicher Dank gilt außerdem der gesamten Arbeitsgruppe, in der keine Frage unbeantwortet blieb, und kein Problem unlösbar war. Danke!

Vielen Dank auch an die Masterstudenten, die gleichzeitig ihre Versuche für die Masterarbeit im Labor durchführten: Akos, Mert, Verena, Yagmur –ihr habt die Zeit nochmals verschönert, und hattet immer aufheiternde Worte parat, falls eine Zell-Stimulation wieder missglückt war.

Zum Schluss auch ein riesiges Dankeschön an Familie, Freunde und Mitbewohner, ihr seid großartig.

Eidesstattliche Erklärung

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

Ich erkläre weiterhin, dass die vorliegende Arbeit nur bei der Universität Wien als Prüfarbeit eingereicht wurde.

Ich habe mich bemüht, sämtliche Inhaber der Bildrechte ausfindig zu machen und ihre Zustimmung zur Verwendung der Bilder in dieser Arbeit eingeholt. Sollte dennoch eine Urheberrechtsverletzung bekannt werden, ersuche ich um Meldung bei mir.



Johanna Marie Kreher

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	VI
Abbildungsverzeichnis	VII
Tabellenverzeichnis	VIII
1. Einleitung	1
1.1 Xanthohumol: Vorkommen und Physiologische Wirkungen	1
1.2 Das Immunsystem des Bluts: Periphere mononukleäre Blutzellen	4
1.3 Bakterielle Infektionen beim Menschen	6
1.4 Bakterien und ihre Wandbestandteile	7
1.5 Von LPS und LTA aktivierte Signalkaskaden	10
1.6 Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit	12
2. Material	13
2.1 Studiengetränk	13
2.2 Blutabnahme	14
2.3 Isolation und Stimulation der Immunzellen	14
2.4 Caco-2 Zellkulturmodell	16
2.5 Cytospin	18
2.6 DAPI-Färbung	19
2.7 Konfokalmikroskopie	19
2.8 J774A.1 Zellkulturmodell	19
2.9 Griess-Assay	21
2.10 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)	21
2.11 Allgemeine Chemikalien und Geräte	23
3. Methoden	25
3.1 Pilotstudie	25
3.1.1 Studiendesign	25
3.1.2 Isolation der Immunzellen	27
3.1.3 Stimulation der Immunzellen	29
3.2 Caco-2 Zellkulturmodell	29
3.2.1 Zytospin	31
3.2.2 DAPI-Färbung	32
3.2.3 Konfokalmikroskopie	32
3.3 J774A.1 Zellkulturmodell	32
3.3.1 Griess-Assay	34

3.3.2 ELISA.....	34
4. Ergebnisse.....	35
4.1 Einfluss der oralen Aufnahme von Xanthohumol in Form eines Xanthohumol-haltigen Extrakts in unterschiedlichen Dosen auf die LPS- bzw. LTA-induzierte Freisetzung von Zytokinen im Zellkulturüberstand von Monozyten	35
4.2 Untersuchungen zur Bindung von Xanthohumol, appliziert aus einem Xanthohumol-haltigen Extrakt, an Caco-2 Zellen, Monozyten, Granulozyten und PBMCs im Caco-2 Ko-kulturmodell	44
4.3 Einfluss von Xanthohumol appliziert aus einem Xanthohumol-haltigen Extrakt in unterschiedlichen Dosen auf die LPS-induzierte Freisetzung von NO _x und TNF-α im Zellkulturüberstand von J774A.1 Zellen.....	49
5. Diskussion	53
5.1 Einfluss der oralen Aufnahme von Xanthohumol in unterschiedlichen Dosen auf die LPS- bzw. LTA-induzierte Konzentration von Zytokinen und CD14 im Zellkulturüberstand von Monozyten.....	53
5.2 Untersuchungen zur Bindung von Xanthohumol an Caco-2 Zellen, Monozyten, Granulozyten und PBMCs im Caco-2 Ko-kulturmodell	55
5.3 Einfluss der Prä-Inkubation von J774A.1 Zellen mit Xanthohumol in unterschiedlichen Dosen auf die LPS-induzierte Freisetzung von Nox und TNF-α im Zellkulturüberstand der J774A.1 Zellen.....	57
6. Zusammenfassung	59
Literaturverzeichnis	61

Abkürzungsverzeichnis

RT	Raumtemperatur
XN	Xanthohumol
DPBS	Dulbecco's phosphatgepufferte Salzlösung
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
FBS	Fetales Kälberserum
IL	Interleukin
LPS	Lipopolysaccharide
LTA	Lipoteichonsäure
MD2	myeloid differentiation factor 2
MDA	Malondialdehyd
MyD88	Myeloid differentiation primary response 88
PBMC	Peripheral Mononuclear Blood Cells (= mononukleäre Zellen des peripheren Blutes)
TNF	Tumornekrosefaktor
NF-κB	Nuclear Faktor kappa B

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Chemische Struktur von Xanthohumol.....	1
Abbildung 2: Zell- bzw. Subpopulationen der peripheren mononukleären Blutzellen (PBMCs) als Mediatoren des angeborenen und adaptiven Immunsystems.....	5
Abbildung 3: Vereinfachte Darstellung des unterschiedlichen Aufbaus der Zellwände von grampositiven und gramnegativen Bakterien mit den charakteristischen exogenen Pyrogenen Lipoteichonsäure bzw. Lipopolysaccharide.	9
Abbildung 4: Mechanismus der LTA-Erkennung über TLR2/MyD88.....	10
Abbildung 5: Mechanismus der LPS-Erkennung über TLR4/MD-2	11
Abbildung 6: Grafische Darstellung des Studiendesigns.....	26
Abbildung 7: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus.....	31
Abbildung 8: Untersuchung zum Einfluss von verschiedenen Xanthohumol-Dosen auf die LPS- bzw. LTA-induzierte IL-1β Proteinkonzentration im Zellkulturüberstand von Monozyten im Zeitverlauf.....	37
Abbildung 9: Untersuchung zum Einfluss von verschiedenen Xanthohumol-Dosen auf die LPS- bzw. LTA-induzierte IL-6 Proteinkonzentration im Zellkulturüberstand von Monozyten im Zeitverlauf.....	39
Abbildung 10: Untersuchung zum Einfluss von verschiedenen Xanthohumol-Dosen auf die LPS- bzw. LTA-induzierte TNF-α Proteinkonzentration im Zellkulturüberstand von Monozyten im Zeitverlauf.....	41
Abbildung 11: Untersuchung zum Einfluss von verschiedenen Xanthohumol-Dosen auf die LPS- bzw. LTA-induzierte CD14 Proteinkonzentration im Zellkulturüberstand von Monozyten im Zeitverlauf.....	43
Abbildung 12: Untersuchung zur Bindung von Xanthohumol an Caco-2 Zellen im Caco-2 Ko-kulturmodell. Die ausdifferenzierten Caco-2 Zellen wurden 1 bzw. 2 h mit 0 mg, 0,125 mg, 0,375 mg bzw. 0,75 mg Xanthohumol (XN) inkubiert. Die Bilder wurden mittels Konfokalmikroskop aufgenommen.	45
Abbildung 13: Untersuchung zur Bindung von Xanthohumol an Monozyten im Caco-2 Ko-kulturmodell. Die ausdifferenzierten Caco-2 Zellen wurden 1 bzw. 2 h mit 0 mg, 0,125 mg, 0,375 mg bzw. 0,75 mg Xanthohumol (XN) inkubiert. Die Bilder wurden mittels Konfokalmikroskop aufgenommen.	46
Abbildung 14: Untersuchung zur Bindung von Xanthohumol an Granulozyten im Caco-2 Ko-kulturmodell. Die ausdifferenzierten Caco-2 Zellen wurden 1 bzw. 2 h mit 0 mg, 0,125 mg, 0,375 mg bzw. 0,75 mg Xanthohumol (XN) inkubiert. Die Bilder wurden mittels Konfokalmikroskop aufgenommen.	47
Abbildung 15: Untersuchung zur Bindung von Xanthohumol an PBMCs im Caco-2 Ko-kulturmodell. Die ausdifferenzierten Caco-2 Zellen wurden 1 bzw. 2 h mit 0 mg, 0,125 mg, 0,375 mg bzw. 0,75 mg Xanthohumol (XN) inkubiert. Die Bilder wurden mittels Konfokalmikroskop aufgenommen.	48
Abbildung 16: Nitrit-Konzentration im Zellkulturüberstand von J774A.1 Zellen nach 1- bzw. 2-stündiger Behandlung (Pre-Inkubation) mit 0,03125 mg, 0,0625 mg oder 0,125 mg Xanthohumol (aus einem Xanthohumol-Extrakt) und nach 6- oder 18-stündiger Stimulation mit LPS.	50
Abbildung 17: TNF- α Konzentration im Zellkulturüberstand von J774A.1 Zellen nach 1- bzw. 2-stündiger Behandlung (Pre-Inkubation) mit 0,03125 mg, 0,0625 mg oder 0,125 mg Xanthohumol (aus einem Xanthohumol-Extrakt) und nach 6- oder 18-stündiger Stimulation mit LPS.	52

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Zusammensetzung des Mediums zur Kultivierung der isolierten Immunzellen	
.....	28
Tabelle 2: Zusammensetzung des Mediums für die Caco-2 Zellkultur	29
Tabelle 3: Zusammensetzung des Mediums für die J774A.1 Zellkultur	33
Tabelle 4: Verdünnungen der Proben für IL-1β, IL-6, TNF- α und CD14	34

1. Einleitung

1.1 Xanthohumol: Vorkommen und Physiologische Wirkungen

In den letzten Jahren hat das Interesse an bioaktiven und natürlichen Verbindungen auf Grund deren potenzieller pharmakologischer Aktivität bzw. Modulation inflammatorischer Signalwege, u. a. bei chronischen Erkrankungen und viralen und bakteriellen Infektionen, enorm zugenommen [1]. Hierbei wurden eine Vielzahl an *in vitro* und *in vivo* Studien mit unterschiedlichen Substanzen durchgeführt, und dabei auch mit Hopfenextrakten und Hopfeninhaltsstoffen wie Xanthohumol [2]. Vor allem für Xanthohumol (XN), dessen Struktur erstmals 1957 von Verzele et al. identifiziert wurde und in Abbildung 1 dargestellt ist, wurde in *in vitro* und *in vivo* Studien ein breites Spektrum medizinisch relevanter Aktivitäten aufgezeigt [3].

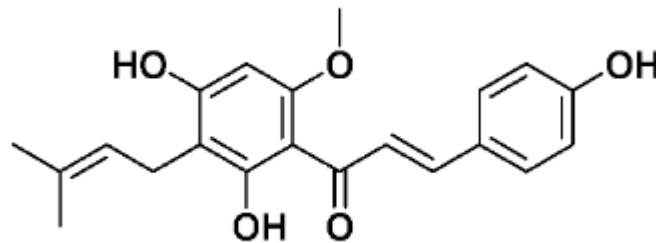


Abbildung 1: Chemische Struktur von Xanthohumol [Liu et al., 2015]

Vorkommen

Der echte Hopfen (*Humulus lupulus* L.) zählt zur Familie der *Cannabaceae*, ist eine mehrjährige Schlingpflanze und wird v. a. in Deutschland und den USA angebaut [2]. 97% des weltweit kultivierten Hopfens werden, ausschließlich unter Verwendung dessen weiblicher Blütenstände (Dolden), für die Bierbrauindustrie genutzt und verleihen dem Bier sein typisches Aroma und seine Bitterkeit [4]. Getrockneter Hopfen enthält 4-14% Polyphenole, wobei XN 0,1-1% des Trockengewichts der Dolden bildet und somit das am meisten vorkommende prenylierte Flavonoid in den weiblichen Blütenständen des Hopfens darstellt [5]. Bei Xanthohumol (2', 4', 4'-trihydroxy-6'-methoxy-3'-prenylchalcon) handelt es sich um ein prenyliertes Chalkon, welches bislang ausschließlich im Hopfen nachgewiesen wurde [4].

Obwohl Bier die wichtigste Quelle für XN bildet, sind auf Grund der während des Brauprozesses auftretenden Isomerisierung der Chalcone zu Flavonen, in diesem Fall

Iso-Xanthohumol, und weiteren Schritten in der Bierproduktion (z. B. Fermentation und Filtration) nur weniger als 0,2 mg XN/L in den meisten kommerziellen Bieren enthalten [6] [5]. Um den XN-Gehalt zu erhöhen, wurden bereits verschiedene Technologien entwickelt, wie die sog. XAN-Technologie, bei der u. a. ein XN-haltiger Extrakt 5 min vor Ende der Würzekochung zugegeben wird [7], oder die Verwendung unterschiedlicher Anteile bzw. anderer Herstellungsbedingungen des Röstmalzes [8]. Somit können auch Biere mit einer XN-Konzentration von über 10 mg/L hergestellt werden [4].

Bioverfügbarkeit und Sicherheit von Xanthohumol

Studien von Legette et al. (2014) stellten eine Dosis-abhängige Bioverfügbarkeit des XN beim Menschen fest, wobei im pharmakokinetischen Profil bei einmaliger oraler Aufnahme von 20, 60 oder 180 mg XN nach 1h und zwischen 4 und 5 h jeweils die höchsten Konzentrationen erkennbar waren [9]. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass 80 % des verabreichten XN innerhalb von 24 h über Fäzes ausgeschieden wurden [10]; davon stellten 11 % Metabolite dar, circa. 89 % des XN verließen den Magen-Darm-Trakt unverändert [11]. Dies weist auf eine sehr niedrige Bioverfügbarkeit von XN bei hoher Gabe hin und wird als eine wichtige Limitierung in der XN-Forschung und -Anwendung diskutiert [12].

Mehrere Studien wiesen darauf hin, dass XN (in getesteten Dosen bis 42 μ M im Zellexperiment) sehr niedrige bis gar keine Toxizität in humanen Fibroblasten der Lunge und Haut sowie primären humanen Hepatocyten aufwies, wobei eine niedrigere Toxizität des XN bei normalen Zellen im Vergleich zu Krebszellen *in vitro* beobachtet werden konnte [13] [14] [15]. Im Mausmodell wurden auch bei täglicher Gabe von 23 mg XN/ kg Körpergewicht über einen Zeitraum von 4 Wochen keine Zeichen einer Toxizität festgestellt [16]; selbst bei einer täglichen Dosis von 1000 mg XN/ kg Körpergewicht über 4 Wochen bei weiblichen SD Ratten wurde nur eine leichte Hepatotoxizität nachgewiesen [17]. In einer Humanstudie wurden bei XN-Dosen von bis zu 180 mg keine toxischen Effekte beobachtet [9].

Physiologische Wirkungen von Xanthohumol

In mehreren *in vitro* Studien konnte nachgewiesen werden, dass reines XN oder XN aus einem Extrakt bei Dosen, die mit einer oralen Aufnahme von Bier nicht erreicht werden können, immunmodulierende Effekte hervorrufen kann. So wurde in einer

Studie in LPS-stimulierten BV2 Zellen (Mikroglia) die exzessive Produktion der inflammatorischen Marker NO, IL-1beta und TNF-alpha sowie die Aktivierung von NFkb durch eine Präinkubation mit XN signifikant reduziert [18]. Auch in humanen Darmkrebszellen (HT29) wurde bei geringer XN-Dosis (10nM) eine signifikante Reduktion der Expression proinflammatorischer Gene beobachtet [19].

Xanthohumol und seine Effekte auf LPS bzw. LTA

Weiterhin weisen Studien darauf hin, dass XN die Endotoxin-induzierte Aktivierung des Toll-like-Rezeptor (TLR)- 4-Signalwegs hemmt [20] [21]. Der TLR-4 gehört zur Gruppe der Pattern Recognition Receptors (PPR) und erkennt Pathogene, primär das Endotoxin aus der Zellwand gramnegativer Bakterien, über pathogen-assoziierte molekulare Muster (PAMPs). Somit spielt er eine zentrale Rolle bei der angeborenen Immunität. Dabei bindet LPS nicht direkt an TLR-4, sondern wird von dem TLR-4 assoziierten Glykoprotein Cluster of differentiation CD14, welches sich v.a. auf Monozyten und Makrophagen befindet, erkannt, von diesem gebunden und anschließend auf den TLR-4/Myeloid differential protein-2 MD-2 Komplex übertragen (Vgl. 1.5) [22]. Mehrere Studien beobachteten eine dosisabhängige Reduktion der LPS-induzierten Aktivierung des TLR4-Signalwegs durch XN, assoziiert mit einer signifikanten Verringerung der CD14-Expression sowie einer Bindung des XN an den TLR4-Corezeptor MD-2 [20] [23]. Auch positive Effekte des XN auf die LTA-induzierte Immunantwort von Monozyten durch Hemmung der CD14-/ TLR2-abhängigen Zellaktivierung konnten gezeigt werden [24]. Somit kann nachgewiesen werden, dass XN sowohl die LPS- als auch die LTA-aktivierte Signalkaskade hemmen kann.

Antibakterielle Wirkung

Neben den oben beschriebenen antiinflammatorischen Effekten scheint XN auch antibakterielle Wirkung auf anaerobe Darmbakterien wie *Bacteroides fragilis*, *Clostridium perfringens* und *Clostridium difficile* zu haben [25]. So konnten Studien im Tiermodell antibakterielle Effekte von XN aus einem XN-reichen Extrakt (3-5 mg/ kg Körpergewicht für 8-10 Tage) auf gram-positive Bakterien, welche bei *Staphylococcus aureus* und *Clostridium difficile* besonders stark waren, nachweisen [26][27]. Auch in der Pilotstudie von Bogdanova et al. (2018) wies XN von mehreren getesteten Hopfeninhaltsstoffen die größten antibakteriellen Eigenschaften gegen gram-positive Bakterien sowie deren Methicillin- und Vancomycin-resistenten Stämme auf. In den Untersuchungen fanden sich keine antibakteriellen Effekte auf

gram-negative Bakterien [28]. In einer weiteren, bereits erwähnten Studie wiederum konnte XN die Bindung von LPS an CD14 und hemmen, und somit die Aktivierung der TLR4-Signalkaskade bzw. die Freisetzung von Zytokinen durch gramnegative Bakterien reduzieren [20].

Weiterhin wurden auch antikanzerogene, antivirale, antifungale antidiabetische, antioxidative sowie antigenotoxische Effekte von XN beschrieben [4]. So deuten Studien darauf hin, dass XN auf Grund seiner vielfältigen Eigenschaften u. a. auch als Präbiotikum [1] und Chemotherapeutikum [29] eingesetzt werden kann. Weitere Studien zur Untersuchung der Sicherheit, Dosierung und von zu Grunde liegenden Wirkungsmechanismen von XN sind notwendig, um eine sichere und effiziente Behandlung mit XN zu erreichen.

1.2 Das Immunsystem des Bluts: Periphere mononukleäre Blutzellen

Um Schutz vor Angriffen von Mikroorganismen bereit zu stellen, Entzündungs- und Heilungsprozesse zu steuern und pathologisch veränderte körpereigene Zellen zu eliminieren, besitzt der Körper zwei unterschiedliche Abwehrmechanismen: Mit Hilfe des angeborenen Immunsystems können - neben der direkten Abwehr von Pathogenen durch Barriere- und humorale Elemente - körperfremde von körpereigenen Stoffen unterschieden werden, indem Granulozyten und Periphere mononukleäre Blutzellen (PBMCs, Mischung aus Natürlichen Killerzellen, Monozyten bzw. Makrophagen, Dendritischen Zellen) unspezifische, pathogen-assoziierte molekulare Strukturen, sog. PAMPs, auf der Oberfläche von Pathogenen erkennen und mittels Phagozytose, Abtötung und/ oder Entzündungsreaktionen innerhalb weniger Sekunden bis Minuten bekämpfen [30]. Durch Aktivierung des adaptiven Immunsystems wiederum, u. a. durch antigenpräsentierende Zellen (v. a. dendritische Zellen), kann auf Antigene spezifisch, und damit sehr effektiv reagiert werden [31]. Die zelluläre Immunabwehr bilden dabei die T-Lymphozyten, wobei die zytotoxischen T-Zellen die Apoptose der Zielzelle auslösen können, und T-Helferzellen pro- (Typ 1, Typ 17) bzw. antiinflammatorisch (Typ 2), und regulatorische T-Zellen hemmend auf die Immunantwort wirken. B-Lymphozyten lösen die humorale Immunreaktion aus, indem sie nach Aktivierung Antikörper bilden; weitere Aufgaben der B-Lymphozyten bestehen in der Antigenpräsentation und Zytokinproduktion [32] [30]. Natürliche Killerzellen besitzen keine spezifischen Antigenrezeptoren auf der Zelloberfläche, verfügen jedoch über ein antigenspezifisches Gedächtnis und regulieren die dendritischen Zellen [31].

Somit stellen sie eine wichtige Verbindung des adaptiven und angeborenen Immunsystems dar [30].

Die durch einen runden Zellkern charakterisierten PBMCs, welche Lymphozyten (T-Zellen, B-Zellen, Natürliche Killerzellen; 70-90%), Monozyten (Makrophagenvorläuferzellen, 10-20%) sowie dendritische Zellen (1-2%) umfassen, bilden somit zusammen mit den Granulozyten - die zwar auch Teil des angeborenen Immunsystems sind, jedoch zu den polymorphnukleären Zellen gehören - die wichtigsten Mediatoren der Immunreaktion [33], und sind in Abbildung 2 nochmals grafisch zusammengefasst.

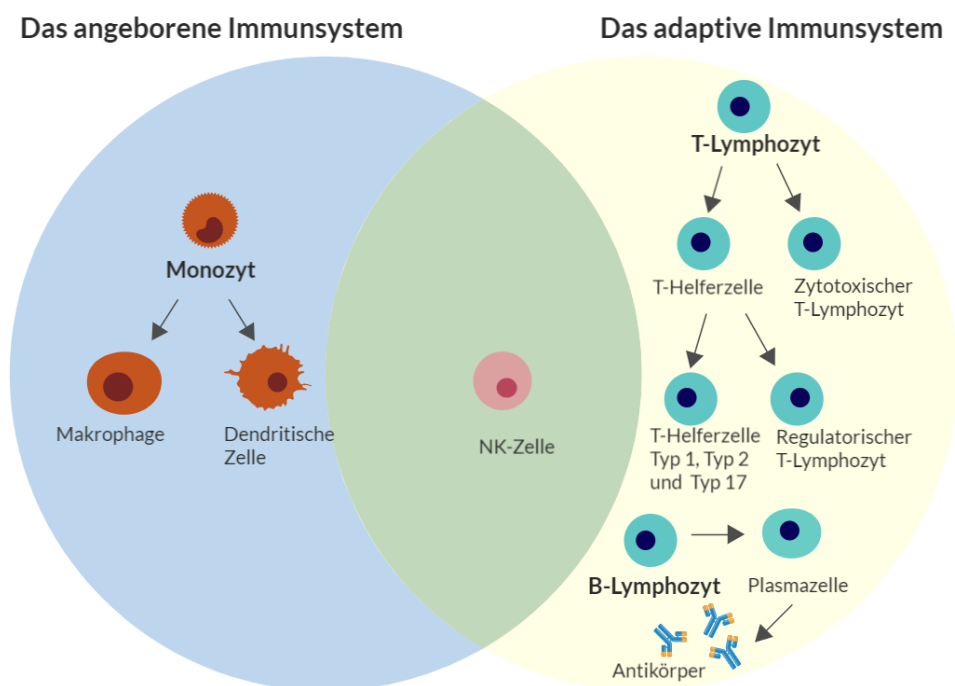


Abbildung 2: Zell- bzw. Subpopulationen der peripheren mononukleären Blutzellen (PBMCs) als Mediatoren des angeborenen und adaptiven Immunsystems. Die Natürlichen Killerzellen (NK) übernehmen Funktionen beider Systeme [adaptiert von: Grünenwald, 2021].

1.3 Bakterielle Infektionen beim Menschen

Bakterien befinden sich nicht nur überall in unserer Umgebung, sondern bilden auch den größten Anteil der menschlichen Normalflora durch Besiedlung von Hautoberflächen und Schleimhäuten [34]. Viele dieser Bakterien sind ungefährlich und teils sogar unentbehrlich für die menschliche Gesundheit [35]. Studien weisen darauf hin, dass nur circa ein Prozent aller bekannten Bakterien beim Menschen Krankheiten, wie beispielsweise Salmonellose (*Salmonellen*), Lungenerkrankungen (*Streptococcus pneumoniae*) oder Durchfallerkrankungen (*Campylobacter*), hervorrufen [36]. Die Übertragung der Bakterien erfolgt über kontaminierte Lebensmittel, kontaminiertes Wasser, Geschlechtsverkehr oder Tröpfchen- bzw. Schmierinfektion [34].

Die humanpathogenen Bakterien zählen zu den wichtigsten nosokomialen Keimen, können also Infektionen auslösen, die im zeitlichen Zusammenhang mit einer stationären oder ambulanten medizinischen Maßnahme stehen (Infektionsschutzgesetz, § 2) [37]. Diese gehören zu den häufigsten Infektionen entwickelter Industrieländer und stellen eine der weltweit häufigsten Komplikation medizinischer Behandlungen dar [38]. Dabei sind die Erreger nicht selten Teil der Normalflora und wirken fakultativ pathogen; weiterhin weisen viele Bakterienstämme durch den verstärkten, teils unsachgerechten Einsatz von Antibiotika in den letzten Jahrzehnten eine Antibiotikaresistenz auf [37]. Vor allem die unter dem Akronym ESKAPE zusammengefassten multiresistenten – also gegen mehrere Antibiotika widerstandsfähigen – gram-negativen und gram-positiven Bakterien (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* und *Enterobacter*-Arten) können insbesondere bei immungeschwächten und schwerkranken Patienten lebensbedrohliche nosokomiale Infektionen auslösen und stellen auf Grund der zunehmenden Resistenz eine große klinische Herausforderung dar [39]. Die häufigsten Krankenhausinfektionen werden von Bakterien ausgelöst und resultieren meist aus invasiven medizinischen Maßnahmen; zu ihnen zählen Pneumonien und andere tiefe Atemwegserkrankungen, Harnwegsinfektionen, postoperative Wundinfektionen, primäre Sepsis und gastrointestinale-, v.a. *Clostridium difficile*-Infektionen [40]. Nosokomiale Infektionen führen zu erhöhter Mortalität und Morbidität und stellen eine finanzielle Last für das Gesundheitssystem dar [41].

Prävalenz von bakteriellen Infekten

Infektionskrankheiten gehören weltweit zu den häufigsten Todesursachen [42]. Die meisten Infektionen davon entfallen auf von Bakterien ausgelöste Lungenentzündungen und Durchfallerkrankungen [43]. Im Jahr 2021 waren 3,2 % aller hospitalisierten Patienten in den USA und 6,5 % in Europa von nosokomialen Infektionen betroffen [41]. Die weltweite Prävalenz von nosokomialen Infektionen wird noch höher eingeschätzt, ist aber auf Grund fehlender Überwachungssysteme unbekannt [41]. In einer Studie des European Centres for Disease Prevention and Control wiesen von über 310 000 Patienten in Krankenhäusern 6,5% sowie von über 117 000 Patienten in Langzeitpflegeeinrichtungen 3,9% mindestens eine Krankenhausinfektion auf [40]. Die jährliche Anzahl an nosokomialen Infektionen in Europa wurde auf 8,9 Millionen geschätzt [40]. Weiterhin fanden sich im Infektionsepidemiologischen Jahrbuch meldepflichtiger Krankheiten (2020) des Robert-Koch-Instituts unter den häufigsten 10 auch 3 durch Bakterien ausgelöste, meldepflichtige Erkrankungen (Campylobacter-Enteritis, Salmonellose, Syphilis) [44].

1.4 Bakterien und ihre Wandbestandteile

Grampositive Bakterien

Im Gegensatz zu gramnegativen Bakterien besitzen grampositive Organismen, zu denen u. a. Strepto-, Entero-, Staphylokokken, Lactobazillen und Listerien zählen, keine zusätzliche äußere Lipidmembran und haben eine 30-100 nm dicke mehrschichtige Peptidoglycanhülle aus Murein, in welcher sich bei der Gram-Färbung Farbstoff-Iod-Komplexe sammeln. Diese können auf Grund der vielen Schichten nicht mit Ethanol ausgewaschen werden, und sind somit für die dunkelblaue Färbung verantwortlich [45].

Neben Proteinen befinden sich in der Zellwand die für grampositive Bakterien charakteristischen Wand (WTA)- und Lipoteichonsäuren (LTA), die bis zu 60 % der Zellwand-Trockenmasse ausmachen und somit Hauptfaktoren der Zellwandstruktur sowie -funktion darstellen [45]. Sowohl WTAs als auch LTAs spielen eine wichtige Rolle bei Infektionen [46]. WTAs sind meist aus komplexen Ribitol-Phosphat-Polymeren aufgebaut und kovalent an die Peptidoglycan- Zellwand gebunden [47]. LTAs hingegen bestehen aus Glycerol-Phosphat-Polymeren, welche an Glykolipide in der Zytoplasmamembran gebunden sind und die gesamte Peptidoglycanschicht durchdringen [48]. Aufgrund ihrer wichtigen Rolle beim Aufbau der Zellwand sowie bei

der Antibiotikaresistenz bei Methicillin-resistenten Staphylokokken (MSRA) gelten Teichonsäuren als Schlüsselsubstanz bei der Entwicklung neuer Antibiotika sowie von Impfungen, bei denen gezielt die Zellwandsynthese behindert werden soll [49].

Gramnegative Bakterien

Auch gramnegative Bakterien, wie Pseudomonas und Neisseria (Meningokokken und Gonokokken), stellen angesichts ihrer Komplexität von Resistenzmechanismen und der Vielzahl von Erregern sehr gefährliche Keime dar [50]. Da sie nur eine dünne, wenige Schichten umfassende Peptidoglycanschicht aus Murein aufweisen, können die bei der Gramfärbung gebildeten Farbstoff-Iod-Komplexe mittels Ethanol ausgewaschen und die Bakterien somit entfärbt werden [45]. Die innere und äußere Membran, jeweils eine Phospholipiddoppelschicht, begrenzen den sog. periplasmatischen Raum, in welchem die Mureinschicht eingelagert ist [51].

Die Oberfläche der gramnegativen Bakterien besteht aus spezifischen Glykolipiden, v.a. Lipopolysacchariden (LPS). Diese bestehen aus dem äußeren, hydrophilen O-Antigen - ein Oligo- oder Polysaccharid, welches zur Differenzierung der verschiedenen Bakterienarten beiträgt -, dem mittleren Kern-Oligosaccharid, sowie dem in der äußeren Membran verankerten lipophilen A-Antigen, einem Disaccharid aus Glucosaminen und die endotoxisch wirkende Komponente der LPS [52].

Die Differenzierung anhand der Gramfärbung bzw. des unterschiedlichen Aufbaus der Zellwände, stellt eine wichtige Methode, v. a. in der Diagnostik bakterieller Infektionskrankheiten, dar [53]. Der Unterschied der Zellwände von grampositiven und gramnegativen Bakterien ist nochmals in Abbildung 3 grafisch dargestellt

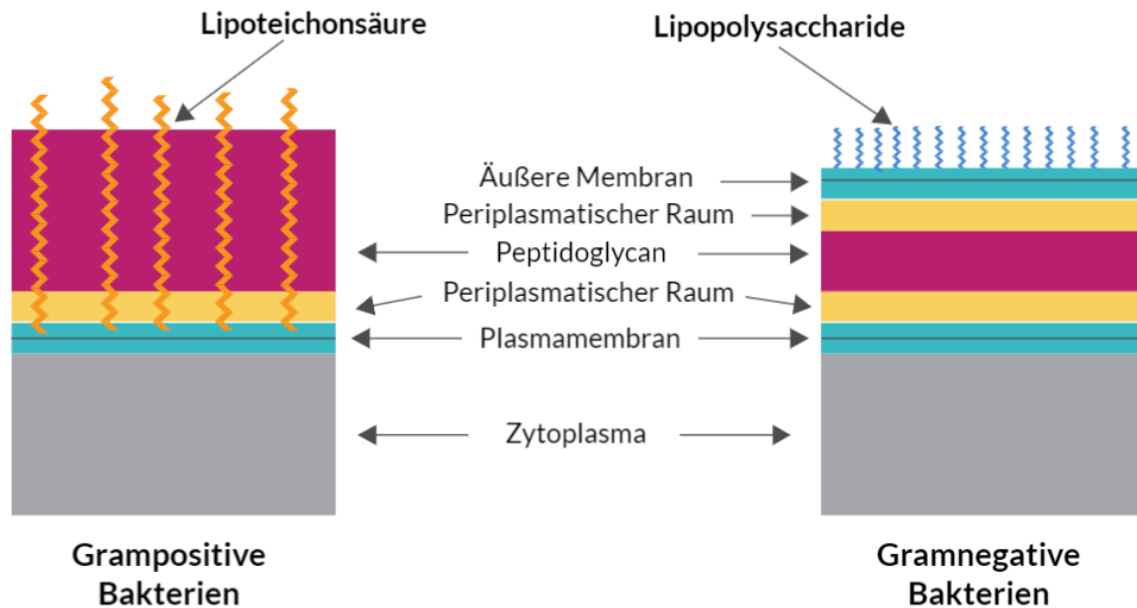


Abbildung 3: Vereinfachte Darstellung des unterschiedlichen Aufbaus der Zellwände von grampositiven und gramnegativen Bakterien mit den charakteristischen exogenen Pyrogenen Lipoteichonsäure bzw. Lipopolysaccharide. Während sowohl die Zellwände von grampositiven als auch von gramnegativen Bakterien Peptidoglycan enthalten, ist die Mureinschicht bei gramnegativen Bakterien viel dünner; dafür besitzen diese aber eine äußere Membran (wie die Plasmamembran eine Phospholipiddoppelschicht) als zusätzlichen Schutz. (Erstellt mit Visme.)

1.5 Von LPS und LTA aktivierte Signalkaskaden

Sowohl LTA als auch LPS stellen Virulenzfaktoren und starke exogene Pyrogene dar. Sie werden von Toll-like Receptor TLR-2 (LTA) bzw. TLR-4 (LPS), welche sich u. a. auf der Zelloberfläche von PBMCs befinden, erkannt, induzieren die Expression proinflammatorischer Zytokine wie IL-1 β , IL-6 und Tumornekrosefaktor TNF α und sind somit maßgeblich an der Entzündungsreaktion nach einer Infektion beteiligt [54].

LTA-Erkennung über TLR2/MyD88

Mehrere Studien weisen darauf hin, dass LTA ein Ligand und Aktivator von TLR2 darstellt [55] [56]. Durch die Bindung von LTA an TLR2 kommt es zur Aktivierung eines MyD88-abhängigen Signalwegs, der in Abbildung 4 dargestellt ist. Das sog. TIR domain-containing adaptor protein—Molekül (TIRAP) spielt dabei neben MyD88 eine wichtige Rolle bei der von TLR2 ausgehenden Signalweiterleitung. Durch MyD88 aktiviertes IRAK-1 verbindet sich anschließend an TRAF6. Der somit aktivierte TAK1/TAB-Komplex aktiviert wiederum den IKK-Komplex, vermittelt den Abbau von I κ B und führt zur Translokation von NF- κ B in den Zellkern. Dadurch kommt es zur vermehrten Transkription proinflammatorischer Zytokine [57] [55].

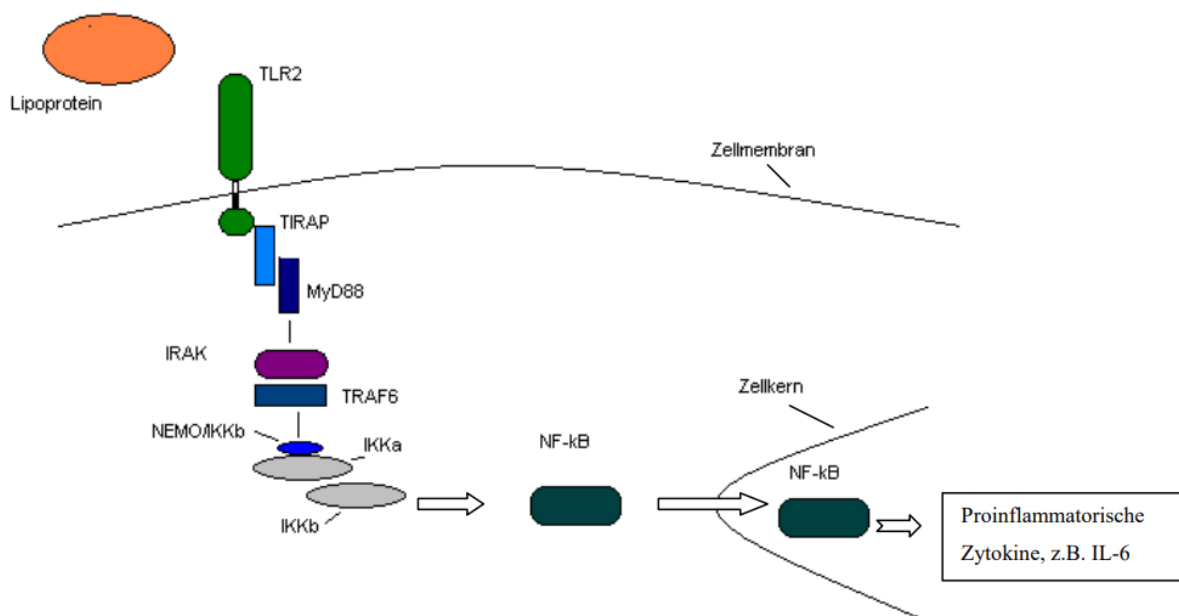


Abbildung 4: Mechanismus der LTA-Erkennung über TLR2/MyD88 [Konnerth, 2012]

LPS-Erkennung über TLR4/MD-2

Es wird vermutet, dass das Lipopolysaccharid-bindende Protein LBP den ersten Bindungspartner von LPS im Organismus darstellt, wie auch in Abbildung 5 zu sehen ist. Der so gebildete LBP/LPS-Komplex (A) wird dann vom Glykoprotein CD14, welches sowohl membrangebunden an v. a. Monozyten und Makrophagen als auch in löslicher Form vorkommt, gebunden; das Endotoxin wird also auf CD14 übertragen (B). Den letzten Schritt zur LPS-Signaltransduktion stellt die Übertragung des LPS von CD14 auf den TLR4/MD-2 Rezeptorkomplex (C) sowie die darauffolgende Homodimerisierung und Auslösung einer Signalkaskade durch TLR4 dar. Dabei erfolgt die Bindung von LPS über seine Lipidkomponente Lipid A ausschließlich über MD-2

[56] [58].

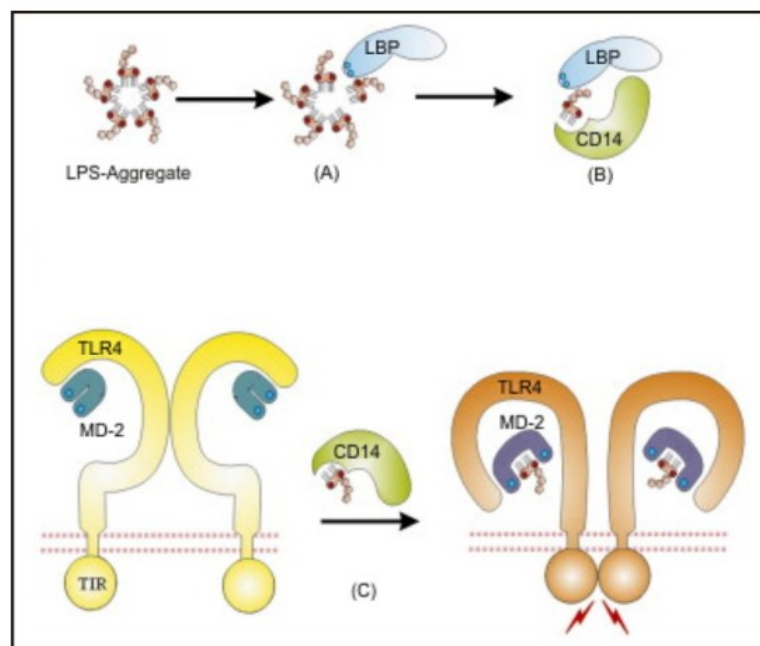


Abbildung 5: Mechanismus der LPS-Erkennung über TLR4/MD-2 [Groß, 2009]

1.6 Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit

Studienergebnisse von Jung et al. (2022) weisen darauf hin, dass bei gesunden Personen bereits der einmalige Konsum von XN in Konzentrationen, wie sie beispielsweise beim Konsum von 250 ml Bier aufgenommen werden, die LPS- sowie LTA-vermittelte Aktivierung von Immunzellen des Blutes *ex vivo*, bereits 1 h nach XN-Einnahme, deutlich abschwächt [20][24]. Inwiefern diese antiinflammatorischen Effekte des XN im Tagesverlauf anhalten, und ob die Dauer und Wirkung von verschieden hohen XN-Dosen beeinflusst wird, ist bisher nicht geklärt.

Ausgehend von diesem Hintergrund war es das Ziel der vorliegenden Masterarbeit, zu untersuchen, wie lange die immunmodulierende Wirkung von XN beim Menschen anhält. Weiterhin sollte in einem Caco-2 Ko-kulturmodell *in vitro* untersucht werden, ob XN die Darmbarriere passiert. Im J774A.1 Zellkulturversuch wurde außerdem untersucht, ob XN einen Effekt auf die LPS-stimulierte TNF- α Freisetzung hat.

Folgende Fragestellungen wurden untersucht:

- 1) Hat die orale Aufnahme von Xanthohumol in unterschiedlichen Dosen unterschiedlich starke protektive Effekte auf die Immunantwort von isolierten Blutzellen, und wie ist der zeitliche Verlauf der Wirkung?
- 2) Kann die Behandlung von J774A.1 Zellen mit unterschiedlichen Xanthohumol-Dosen unterschiedlich stark die LPS-induzierte TNF- α Produktion im Zellkulturmodell hemmen?
- 3) Ist nach Behandlung des intestinalen Zellkulturmodells aus Caco-2 Zellen mit unterschiedlichen Xanthohumol-Dosen eine unterschiedlich starke Bindung an Caco-2 Zellen, Monozyten, Granulozyten und PBMCs zu beobachten?

In allen Versuchen wurde XN aus einem XN-reichen Hopfenextrakt (75% XN) verwendet.

2. Material

2.1 Studiengetränk

Chemikalien

XanthoFlav™ 75 %

Stilles Wasser

ThickenUp® Clear

Zitronensäure

Puderzucker

Zitronensirup zuckerfrei, naturtrüb

Hersteller

Simon H. Steiner, Hopsteiner GmbH,
Mainburg, Deutschland

Vöslauer Mineralwasser GmbH, Wien,
Österreich

Nestlé S. A., Vevey, Schweiz

Haas Austria GmbH, Traun, Österreich

Wiener Zucker, Agrana Zucker GmbH,
Wien, Österreich

SodaStream Österreich GmbH,
Leopoldsdorf, Österreich

Geräte und Verbrauchsmaterial

Waage Sartorius RC 210S

Zentrifugenröhren, 50 ml

Pipettierhilfe macro

Serologische Pipetten, 25 ml

Sartorius AG, Göttingen, Deutschland

Sarstedt AG & CO. KG, Nümbrecht,
Deutschland

Carl Roth GmbH & CO. KG, Karlsruhe,
Deutschland

Sarstedt AG & Co., Nürnberg,
Deutschland

2.2 Blutabnahme

Multifly® Kanüle 21G 200 mm lang	Sarstedt AG & CO., Nümbrecht, Deutschland
Fixierverband für i. v. Kanülen, Cosmor® I.V.	Paul Hartmann AG, Heidenheim, Deutschland
BD Vacutainer®(Blutsammelröhren)	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland
BD Venflon™ Pro Safety (Venenverweilkanüle mit Nadelschutz)	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland
Luer-Lock-Kappe	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland
BD Posiflush™ SP	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland
BD Vacutainer® Luer Adapter	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland
Zentrifuge Z216MK/ Z446 K	Hermle Labortechnik GmbH, Wehingen, Deutschland

2.3 Isolation und Stimulation der Immunzellen

Chemikalien	Hersteller
Histopaque®-1119	Sigma-Aldrich Co. LLC, St. Louis, USA
Pancoll human	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland
Monocytes Spin Medium	pluriSelect Life Science UG & Co. KG, Leipzig, Deutschland

Dulbecco`s Phosphate-Buffered Saline (DPBS), w/o: Ca und Mg	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland
Rotipuran H ₂ O	Carl Roth GmbH & CO. KG, Karlsruhe, Deutschland
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH & CO. KG, Karlsruhe, Deutschland
RPML-1640 Medium	Sigma-Aldrich Co. LLC, St. Louis, USA
Penicillin-Streptomycin	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland
Fetales Kälberserum (FBS)	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland
Trizol (peqGOLD Trifast™)	VWR International GmbH, Radnor, USA
Lipopolysaccharide	Sigma-Aldrich Co. LLC, St. Louis, USA
Lipoteichonsäure	Sigma-Aldrich Co. LLC, St. Louis, USA
ORF 7a	Hölzel Diagnostika Handels GmbH, Köln, Deutschland

Geräte und Verbrauchsmaterial

High Volume Zentrifuge Z446 K	Hermle Labortechnik GmbH, Wehingen, Deutschland
pluriMate® II Zentrifugenröhrchen	pluriSelect Life Science UG & Co. KG, Leipzig, Deutschland
Pipettierhilfe macro	Carl Roth GmbH & CO. KG, Karlsruhe, Deutschland

Serologische Pipetten, 5 ml, 10 ml	Sarstedt AG & Co., Nürnberg, Deutschland
Mikroskop Primovert	Carl Zeiss Deutschland GmbH, Oberkochen, Deutschland
Analysenwaage	VWR International GmbH, Radnor, USA
Waage Sartorius RC 210S	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
Pipettenfilter	Starlab GmbH, Hamburg, Deutschland
96-Well Platte	R&D Systems, Inc., Minneapolis, USA
CO ₂ Inkubator MCO-170AIC	Panasonic Healthcare Co. Ltd., Oizumi-Machi, Japan

2.4 Caco-2 Zellkulturmodell

Chemikalien	Hersteller
Dulbecco Modified Eagle Medium (DMEM) (w: 4,5 g/L Glucose, L-Glutamine, Sodium pyruvate. 3,7 g/L NaHCO ₃)	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland
Fetales Kälberserum (FBS)	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland
Penicillin-Streptomycin	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland
MEM NEAA, Non Essential Amino Acid Solution, w/o: L-Glutamine	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland
Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline (DPBS), w/o: Ca und Mg	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland

(10x) Trypsin 0,5%/EDTA 0.2% in PBS, w/o: Ca und Mg	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland
Ethanol 70%	Carl Roth GmbH & CO. KG, Karlsruhe, Deutschland
Fisherbrand-stabil, Badstabilisator	Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland
Wasserbadkonservierer AKASOLV Aqua Care	Carl Roth GmbH & CO. KG, Karlsruhe, Deutschland

Geräte und Verbrauchsmaterial

Bench (Scanlaf Mars)	LaboGene A/S, Allerød, Dänemark
Wasserbad	Köttermann GmbH, Uetze, Deutschland
CO ₂ Inkubator MCO-170AIC	Panasonic Healthcare Co. Ltd., Oizumi-Machi, Japan
Zellkulturflaschen (75 cm ²)	Sarstedt AG & CO., Nümbrecht, Deutschland
Serologische Pipetten, 5 ml, 10 ml, 25 ml	Sarstedt AG & Co., Nürnberg, Deutschland
Pipettierhilfe	DLAB Scientific Co., Ltd., Beijing, China
Filterspitzen, 10 µl, 100 µl, 1000 µl	Starlab GmbH, Hamburg, Deutschland; Biozym Scientific GmbH, Oldendorf, Deutschland
Vakuumpumpe SafeVac	DLAB Scientific Co., Ltd., Beijing, China
TC-Zellkulturplatten (12-Well)	Sarstedt AG & CO., Nümbrecht, Deutschland

TC-Inserts für 12 Well Platte	Sarstedt AG & CO., Nümbrecht, Deutschland
Hämozytometer	VWR International GmbH, Radnor, USA
Deckgläser	Carl Roth GmbH & CO. KG, Karlsruhe, Deutschland
Lichtmikroskop	Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland
Handzähler	Tamaco Industrial, Taichung, Taiwan
Millicell® ERS-2 Elektrode	Merck Millipore (Merck KGaA), Burlington, USA
Millicell® ERS-2 Voltohmmessgerät	Merck Millipore (Merck KGaA), Burlington, USA
Zentrifuge Z446 K	Hermle Labortechnik GmbH, Wehingen, Deutschland
Sonorex Ultraschallbad	BANDELIN electronic, Berlin, Deutschland

2.5 Cytospin

Edelstahlclip	Laborbestand
Objektträger	VWR International GmbH, Radnor, USA
Filterkarte	Epedria, Runcorn, UK
Zytologietrichter	Laborbestand
Dulbecco`s Phosphate-Buffered Saline (DPBS), w/o: Ca und Mg	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland
Cytozentrifuge	Thermo Scientific, Astmoor, UK

2.6 DAPI-Färbung

Chemikalien

4',6-Diamidino-2-phenylindol

(DAPI)-Stocklösung

Dulbecco's Phosphate-Buffered
Saline (DPBS), w/o: Ca und Mg

Eindeckmedium

Hersteller

Sigma-Aldrich Co. LLC, St. Louis, USA

PAN-Biotech GmbH, Aidenbach,
Deutschland

Sigma-Aldrich Co. LLC, St. Louis, USA

Geräte und Verbrauchsmaterial

Objektträger

VWR International GmbH, Radnor, USA

Deckgläser

Carl Roth GmbH & CO. KG, Karlsruhe,
Deutschland

Färbekammer

Laborbestand

2.7 Konfokalmikroskopie

Konfokalmikroskop Leica TCS SPE

Leica Microsystems CMS GmbH,
Wetzlar, Deutschland

Immersion Liquid

Leica Microsystems CMS GmbH,
Wetzlar, Deutschland

2.8 J774A.1 Zellkulturmodell

Chemikalien

Dulbecco Modified Eagle Medium
(DMEM) (w: 4,5 g/L Glucose, L-

Hersteller

PAN-Biotech GmbH, Aidenbach,
Deutschland

Glutamine, Sodium pyruvate. 3,7 g/L

NaHCO₃

Fetales Kälberserum (FBS)

PAN-Biotech GmbH, Aidenbach,
Deutschland

Penicillin-Streptomycin

PAN-Biotech GmbH, Aidenbach,
Deutschland

Geräte und Verbrauchsmaterial

Bench (Scanlaf Mars)

LaboGene A/S, Allerød, Dänemark

Wasserbad

Köttermann GmbH, Uetze, Deutschland

CO₂ Inkubator MCO-170AIC

Panasonic Healthcare Co. Ltd., Oizumi-
Machi, Japan

Zellkulturflaschen (75 cm²)

Sarstedt AG & CO., Nümbrecht,
Deutschland

Pipettierhilfe

DLAB Scientific Co., Ltd., Beijing, China

Serologische Pipetten, 10 ml

Sarstedt AG & Co., Nürnberg,
Deutschland

Filterspitzen, 10 µl, 100 µl, 1000 µl

Starlab GmbH, Hamburg, Deutschland;
Biozym Scientific GmbH, Oldendorf,
Deutschland

Zellschaber

VWR International GmbH, Radnor, USA

Vakuumpumpe SafeVac

DLAB Scientific Co., Ltd., Beijing, China

TC-Zellkulturplatten (6-Well)

Sarstedt AG & CO., Nümbrecht,
Deutschland

Lichtmikroskop	Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland
6-Well Platte	R&D Systems, Inc., Minneapolis, USA

2.9 Griess-Assay

Chemikalien	Hersteller
Nitrit Standard (0,1M Natriumnitrit)	Promega Corporation, Madison, USA
Sulfanilamid Lösung	Promega Corporation, Madison, USA
NED Lösung	Promega Corporation, Madison, USA

Geräte und Verbrauchsmaterial

96-Well Assay-Platte	Sarstedt AG & CO., Nümbrecht, Deutschland
Pufferwanne	Laborbestand
Eppendorf Research® plus, 8-Kanal Pipette, 300 µl	Eppendorf Austria GmbH, Wien, Österreich
Pipettenspitzen 300 µl	Sarstedt AG & CO., Nümbrecht, Deutschland
SpectraMax® M3 Multi-Mode Microplate Reader	Molecular Devices, San Jose, USA

2.10 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Chemikalien	Hersteller
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth GmbH & CO. KG, Karlsruhe, Deutschland

Kaliumchlorid (KCl)	Carl Roth GmbH & CO. KG, Karlsruhe, Deutschland
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Carl Roth GmbH & CO. KG, Karlsruhe, Deutschland
Dinatriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	Carl Roth GmbH & CO. KG, Karlsruhe, Deutschland
Tween®20	Carl Roth GmbH & CO. KG, Karlsruhe, Deutschland
Bovines Serumalbumin (BSA)	Carl Roth GmbH & CO. KG, Karlsruhe, Deutschland
H ₂ O ₂ (Color Reagent A)	R&D Systems, Inc., Minneapolis, USA
Tetramethylbenzidin (Color Reagent B)	R&D Systems, Inc., Minneapolis, USA
Mouse Anti-Human Capture Antibody (TNF-alpha, IL-6, IL-1 beta, CD14)	R&D Systems, Inc., Minneapolis, USA
Human Standard (TNF-alpha, IL-6, IL-1 beta, CD14)	R&D Systems, Inc., Minneapolis, USA
Biotinylated Goat Anti-Human Detection Antibody (TNF-alpha, IL-6, IL-1 beta, CD14)	R&D Systems, Inc., Minneapolis, USA
Streptavidin-HRP (horseradish peroxidase)	R&D Systems, Inc., Minneapolis, USA

Geräte und Verbrauchsmaterial

96-Well Elisa Platte	Sarstedt AG & CO., Nümbrecht, Deutschland
----------------------	--

Klebe-Plattenversiegelung	Sarstedt AG & CO., Nümbrecht, Deutschland
Pipettenfilter	Starlab GmbH, Hamburg, Deutschland
Pufferwanne	Laborbestand
Eppendorf Research® plus, 8-Kanal Pipette, 300 µl	Eppendorf Austria GmbH, Wien, Österreich
Pipettenspitzen 300 µl	Sarstedt AG & CO., Nümbrecht, Deutschland
Papierhandtücher, Zellstoff	Tork® AT, Stockholm, Schweden
SpectraMax® M3 Multi-Mode Microplate Reader	Molecular Devices, San Jose, USA

2.11 Allgemeine Chemikalien und Geräte

Ultra-Tiefkühltruhe, Recvo®, Ultima II	VWR International GmbH, Radnor, USA
Stoppuhr	Carl Roth GmbH & CO. KG, Karlsruhe, Deutschland
Reaktionsgefäßständer ROTILABO®	Carl Roth GmbH & CO. KG, Karlsruhe, Deutschland
Scotsman Flockeneisbereiter EF 103	Scotsman Ice Systems, Vernon Hills, USA
Labormarker Micronova™	Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland

Einmalhandschuhe Nitril	Sempercare®, Semperit Technische Produkte GmbH, Wien, Österreich
Ethanol 70% (Arbeitsplatz Reinigung)	Carl Roth GmbH & CO. KG, Karlsruhe, Deutschland
Destilliertes Wasser	Carl Roth GmbH & CO. KG, Karlsruhe, Deutschland
TPP-Röhrchengestelle und Kryoboxen	TPP Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Schweiz
Becherglas	DWK Life Science GmbH, Mainz, Deutschland
Laborflasche, Glas	
Eppendorf Research® plus, Einkanalpipette 10 µl, 100 µl, 1000 µl Pipettenspitzen 10 µl, 100 µl, 1000 µl	Eppendorf Austria GmbH, Wien, Österreich Sarstedt AG & CO., Nümbrecht, Deutschland
epT.I.P.S.® Standard	Eppendorf Austria GmbH, Wien, Österreich
Safe-Seal Tubes, 0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml	Sarstedt AG & CO., Nümbrecht, Deutschland
Zentrifugenröhren, 15 ml, 50 ml	Sarstedt AG & CO. KG, Nümbrecht, Deutschland

3. Methoden

3.1 Pilotstudie

Bei der vorliegenden Pilotstudie handelt es sich um ein Teilprojekt des Forschungsvorhabens „WIFÖ Wirkung von Iso-Alpha-Säuren und Xanthohumol auf das menschliche Immunsystem/ FA549047“. Die Studie wurde von der Ethikkommission der Universität Wien genehmigt und in Einklang mit den in der geltenden revidierten Fassung der Erklärung von Helsinki niedergelegten ethischen Grundsätzen durchgeführt.

3.1.1 Studiendesign

Die gesunden weiblichen und männlichen Probanden (18-70 Jahre, BMI <30 kg/m²) wurden nach einer Nüchternblutabnahme (15ml) gebeten, ein Getränk mit 0 mg (=Placebo), 0,125 mg, 0,375 mg oder 0,75 mg Xanthohumol aus einem XN-reichen Hopfenextrakt (XanthoFlav, Hopsteiner GmbH, bestehend aus 75% XN und <25% anderen prenylierten Flavonoiden) zu sich zu nehmen. Das Getränk wurde jeweils am Tag vor der Intervention mit Puderzucker, Zitronensäure, Bindemittel und Wasser hergestellt. Die Aufnahme erfolgte verblindet und randomisiert im Cross-over Design, sodass jeder Proband alle Interventionen konsumierte, und zusammen mit einem standardisierten Frühstück (2 Brezeln + 30 g Butter, 500 ml stilles Wasser mit 20 ml Zitronensirup) innerhalb von 15 Minuten. Weitere Blutabnahmen (jeweils 15ml) erfolgten 1, 2, 3, 4 und 6 Stunden nach Aufnahme des Getränks. Nach 4 Stunden wurde dem Probanden eine standardisierte Mahlzeit (Pizza oder Nudeln) zur Verfügung gestellt. In Abbildung 6 ist das Studiendesign nochmals grafisch zusammengefasst. Die vorliegende Arbeit analysiert die Ergebnisse eines Probanden.

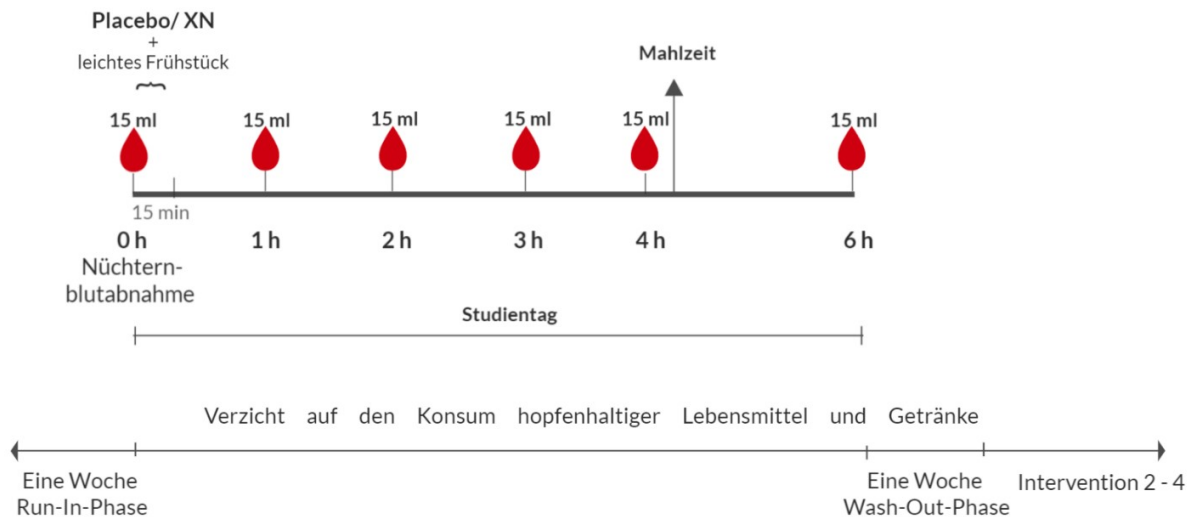


Abbildung 6: Grafische Darstellung des Studiendesigns. Insgesamt wurden 4 Interventionen mit unterschiedlichen Konzentrationen des Xanthohumol-haltigen Extrakts (0 - 0,75 mg XN im Extrakt) in randomisierter Reihenfolge durchgeführt. Eine Woche vor der 1. Intervention und während der Intervention sowie den Wash-Out-Phasen wurden die Probanden gebeten, auf den Konsum hopfenhaltiger Lebensmittel zu verzichten. Die Blutabnahme (♾) erfolgte nüchtern direkt vor der oralen Aufnahme des Studiengetränks sowie 1, 2, 3, 4 und 6 h danach.

Ausschlusskriterien für die Teilnahme waren Lebensmittelunverträglichkeiten und -allergien, die besondere diätetische Interventionen erfordern, bestimmte Ernährungsformen (u. a. vegane/ vegetarische Ernährung), die Einnahme von entzündungshemmenden Medikamenten, Schwangerschaft und Stillzeit, das Vorliegen metabolischer und chronischer inflammatorischer Erkrankungen, erhöhter Alkoholkonsum sowie virale und bakterielle Infektionen innerhalb der letzten 3 Wochen vor Studienbeginn. Die Teilnehmer sollten sowohl eine Woche vor Beginn der Studie als auch über den gesamten Interventionszeitraum hinweg auf den Konsum hopfenhaltiger Produkte verzichten. Vor der schriftlichen Einwilligung zur Teilnahme wurden die Probanden mündlich und schriftlich durch den Studienarzt über Ziele und Risiken der Studie aufgeklärt. Auch während der Untersuchungen war jederzeit ein Arzt in unmittelbarer Nähe.

3.1.2 Isolation der Immunzellen

Alle verwendeten Lösungen wurden auf Raumtemperatur gebracht. Im ersten Schritt wurden 7 ml Histopaque-1119 mit 7 ml Pancoll in ein 50 ml Falcon überschichtet, und im Anschluss vorsichtig das gesamte am jeweiligen Zeitpunkt abgenommene Blut (etwa 15 ml) darauf zu pipettieren, ohne dass die Schichten sich vermischen. Nach der anschließenden Dichtegradientenzentrifugation (30 Minuten, 700 x g, accel:1, decell:0) waren zwei Ringe deutlich erkennbar: Der obere Ring, der zwischen Plasma und Histopaque-1077 fasst die PBMCs, während der untere Ring zwischen Histopaque-1077 und Pancoll die Granulozyten enthält.

Isolation der PBMCs bzw. Monozyten

Es wurden jeweils 3 x 0,5 ml Plasma aliquotiert und für weiterführende Untersuchungen bei -80°C gelagert. Der obere PBMC-haltige Ring wurde abpipettiert und – jeweils mit DPBS auf 6 ml aufgefüllt - auf zwei pluriMate® II Zentrifugationsröhren (pluriSelect, 15 ml) verteilt. Diese wurden zuvor mit 4,5 ml Monocytes Spin Medium (pluriSelect) befüllt und bei 1000 x g für 10 s zentrifugiert. Nach einer weiteren Zentrifugation (15 min, 800 x g, accel:9, decell:9, RT) konnten die Monozyten aus der unteren weißen Schicht abgenommen werden, wurden in einen neuen 15 ml Falcon überführt und mit DPBS auf 10 ml aufgefüllt wurden. Nach zweimaligem Waschen wurde das Zellpellet in 2 ml DPBS resuspendiert. Im Folgenden wurden von dieser Zellsuspension 500 µl für nachfolgende Untersuchungen bei -80°C eingefroren sowie 100 µl – mit 100 µl DPBS gemischt – für den Cytospin genutzt (siehe 3.2.1). Die restliche Zellsuspension wurde erneut zentrifugiert, das Pellet in 1280 µl Medium aufgenommen, und davon anschließend 160 µl pro Well auf einer 96 Well Platte ausgesät. Die Zusammensetzung des Mediums, welches für die Kultivierung von Monozyten, Granulozyten und PBMCs verwendet wurde, ist in Tabelle 1 aufgelistet.

Isolation der Granulozyten

Die Granulozyten wurden ebenfalls abgenommen, in ein 15 ml Falcon überführt, mit DPBS auf 10 ml aufgefüllt und bei 200 x g für 10 Minuten (RT) zentrifugiert. Nach darauffolgendem zweimaligem Waschen wurde das Zellpellet in 1 ml DPBS resuspendiert und daraufhin eine Erythrozytenzelllyse durchgeführt, indem man 9 ml eiskaltes Rotipuran H₂O hinzugab, den Falcon 25 s lang schwenkte und die Reaktion mit Zugabe von 3 ml eiskalter 3,6%-NaCl-Lösung stoppte. Nach Zentrifugation bei 200

x g für 10 min (RT) wurde der Überstand abgenommen und verworfen, und das Pellet in 2 ml DPBS resuspendiert. Wie auch schon bei den Monozyten wurden 500 µl dieser Zellsuspension eingefroren bzw. 100 µl für den Cytospin genutzt, der Rest wurde nochmals zentrifugiert (700 xg, 10 min, RT), das Pellet ebenfalls in 1280 µl Medium resuspendiert und 160 µl pro Well ausgesät.

Tabelle 1: Zusammensetzung des Mediums zur Kultivation der isolierten Immunzellen

Substanz	Volumen (ml)
RPMI-1640 Medium	445
FBS	50
Pen/Strep	5

Die Isolation der Immunzellen aus einem Buffy Coat verlief ähnlich wie oben für das Vollblut beschrieben: Von den 30-35 ml Blut wurden 5 ml zur Herstellung eines Dichtegradienten genutzt, wobei anschließend sowohl die PBMCs als auch die Granulozyten jeweils in einen neuen Falcon überführt wurden. Das restliche Blutvolumen wurde auf 4 vorbereitete pluriMate® II Zentrifugationsröhren aufgeteilt, zentrifugiert, die Monozyten abgenommen und ebenso in einen neuen Falcon gegeben. Die Zellen wurden anschließend zweimal gewaschen. Für den Versuch wurden 300 000 Monozyten bzw. 500 000 PBMCs/ Granulozyten pro 350 µl Medium benötigt. Dazu wurden die Pellets in 3 ml DPBS resuspendiert, und in 10 µl davon die Zellen mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer ausgezählt. Die Zellsuspension wurde daraufhin erneut zentrifugiert, der Überstand abgenommen und verworfen, und das Zellpellet im mittels Formel (1) bzw. (2) errechneten Mediavolumen resuspendiert.

$$\text{Monozyten: Menge Kulturmedium [ml]} = \frac{\text{Gesamtzellzahl} \times 0,35 \text{ ml}}{300.000} \quad (1)$$

$$\text{PBMCs/ Granulozyten: Menge Kulturmedium [ml]} = \frac{\text{Gesamtzellzahl} \times 0,35 \text{ ml}}{500.000} \quad (2)$$

3.1.3 Stimulation der Immunzellen

Nach einer einstündigen „Ruhephase“ wurden die Zellen stimuliert, indem man LPS (50 ng/ml), LTA (10 µg/ml) oder ORF (0,3nM)– jeweils in Doppelbestimmung - in die Wells gab und mit Medium auffüllte, sodass das Volumen jedes Wells am Ende 200 µl betrug. Zu den unstimulierten Proben wurden 40 µl Medium hinzugegeben.

Nach 2 und 6 Stunden Inkubationszeit wurde der Wellinhalt jeweils in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und zentrifugiert (4°C, 5 min, max. speed). Der Überstand wurde im Folgenden in ein weiteres Eppi (0,5 ml) gegeben, und die zuvor in jedes Well hinzugefügten 300 µl Trizol zum Pellet ins 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Alle Proben wurden bei -80°C für weitere Analysen eingefroren.

3.2 Caco-2 Zellkulturmodell

Zur Untersuchung von Transportvorgängen im Dünndarm hat sich die Caco-2 (Cancer coli) Zelllinie als Enterozytenmodell etabliert [59]. Die Caco-2 Zellkultur stammt aus einem humanen ausdifferenzierten Adenokarzinom des Kolons. Bei erreichter Konfluenz differenzieren die adhärennten Caco-2 Zellen zu polarisierten Enterozyten, bilden einen dichten Monolayer und können auf Grund ihrer Ähnlichkeit zum Dünndarmepithel u.a. für Permeabilitätstest verwendet werden [59].

Tabelle 2: Zusammensetzung des Mediums für die Caco-2 Zellkultur

Substanz	Volumen (ml)
DMEM	400
FBS	100
Pen/Strep	5
NEAS	5

Kultivation der Zellen:

Das Splitten bzw. Passagieren der Zellen in eine neue 75 cm² Zellkulturflasche sowie das Aussähen auf Transwells erfolgte nach jeweils sieben Tagen, nachdem die Zellen eine etwa 85-90%ige Konfluenz erreicht hatten. Hierzu wurde zunächst das Medium (Zusammensetzung siehe Tabelle 2) abgesaugt und die Flasche mit 10 ml DPBS gespült, um etwaige Reste des im Medium enthaltenen FBS zu entfernen. Anschließend wurden 4,5 ml Trypsin auf die Zellen für 2 Minuten gegeben, um die

Ablösezeit und somit die Zellschädigung im nächsten Schritt, bei dem erneut 4,5 ml Trypsin in die Flasche gegeben und für maximal 12 Minuten bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert wurden, zu verringern. Nachdem sich alle Zellen vom Boden gelöst haben, wurde mittels Zugabe von 10 ml Medium das Ablösereagens inhibiert, durch resuspendieren wurden die letzten Zellen vom Boden gelöst und letztendlich die im Medium aufgenommenen Zellen bei 300 x g für 5 Minuten (RT) zentrifugiert. Nach Entfernung und Verwerfen des Überstands wurde das Zellpellet in 10 ml Medium mehrfach resuspendiert, um eine homogene Zellsuspension zu erhalten. Anschließend wurde die relative Zellanzahl (Zellen/ml) nach Auszählung der Quadranten der Neubauer-Zählkammer und mit Hilfe der Formel (3) bestimmt, um eine gleichmäßige Zellverteilung und damit auch zeitlich gleichmäßige Bildung eines Monolayers auf den Wells zu ermöglichen.

Relative Zellzahl [Zellen/ml] =

$$\text{Mittelwert der Zellzahl} \times \text{Kammervolumen (10}^4\text{)} \times \text{Verdünnungsfaktor (2)} \quad (3)$$

Die benötigte Menge an Zellsuspension für die im Versuch verwendete Konzentration der ausgesäten Zellen in den Transwells wurde mit Formel (4) berechnet und mit Medium verdünnt, sodass schließlich 500 µl der verdünnten Zellsuspension mit jeweils $1,35 \times 10^5$ Zellen pro Transwell ausgesät werden konnten.

$$\text{Volumen der Zellsuspension } [\mu\text{m}/\text{Transwell}] = \frac{1,35 \times 10^5 \times 500 \mu\text{l}}{\text{relative Zellzahl}} \quad (4)$$

In die Wells der 12-Wellplatten wurden jeweils 1,5 ml Medium gegeben. Ab dem ersten Tag der Konfluenz (3 Tage nach dem Aussäen) wurde zur Überprüfung des Zellkultur-Zustandes täglich der transepithelische elektrische Widerstand (TEER-Wert, Ω/cm^2) der Transwells gemessen, jeden zweiten Tag wurde das Medium der Transwells sowie am 3. Tag ab Konfluenz ebenfalls das Medium der Plattenwells gewechselt, und letztlich am 9. Tag ab Konfluenz der Versuch durchgeführt. Dazu wurde sowohl das Medium in den Wells als auch in den Transwells entfernt. Auf die Caco-2 Zellen wurde je Transwell 500 µl Caco-2 Medium mit verschiedenen Xanthohumol-Konzentrationen (0 mg/ 0,125 mg/ 0,375 mg/ 0,75 mg) aus einem XH-haltigen Extrakt gegeben. Die Löslichkeit des Xanthohumols sollte dabei durch drei davor durchgeführte Ultraschallbehandlungen für je 10 min bei 30°C sowie mehrmaligen Vortexen gesteigert werden.

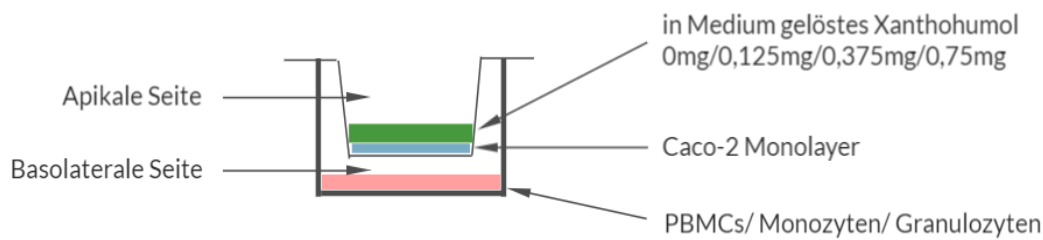


Abbildung 7: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus. Auf apikaler Seite des Transwells befinden sich der ausdifferenzierte Caco-2 Monolayer sowie der in Caco-2 Medium gelöste Xanthohumol-haltige Extrakt. Auf basolateraler Seite befinden sich die in Medium schwimmenden Immunzellen.

Je 1,5 ml der mit Medium verdünnten Zellsuspensionen aus den vorher aus einem Buffy Coat isolierten Monozyten, Granulozyten und PBMCs (siehe 3.1.2) wurden pro Well der 12-Wellplatten ausgesät. Der Versuchsaufbau ist in Abbildung 7 nochmals schematisch dargestellt.

Nach 1 bzw. 2 Stunden wurde das gesamte Caco-2 Medium sowie 1 ml des Well-Inhaltes abgenommen und bei -80 °C gelagert. Weiterhin wurden die Caco-2 Zellen nach 2-maligen Waschen mit DPBS in 500 µl DPBS mittels Zellschaber sowie die Monozyten, Granulozyten und PBMCs in den übrig gebliebenen 500 µl Medium gelöst, abgenommen und für den Cytospin benutzt bzw. ebenfalls eingefroren.

3.2.1 Zytospin

Um möglichst viele Zellen auf einen definierten Bereich konzentrieren zu können, wurde ein Zytospin pro Bedingung (Zelltyp, Abnahmezeitpunkt, XN-Konzentration) angefertigt. In einen Edelstahlclip wurde der Objektträger, eine Filterkarte und darauf wiederum ein Zytologietrichter, in welchem 150 µl der Zellsuspension gegeben wurden, eingesetzt. Durch anschließende Zentrifugation in der Zytozentrifuge wird die Flüssigkeit vom umgebenden Papier aufgenommen, während die Zellen auf einen vorgegebenen Bereich des Objektträgers fixiert werden [60].

3.2.2 DAPI-Färbung

Zur Markierung der nuklearen DNA, und somit zur Bestimmung der Nuclei-Anzahl sowie groben Zellmorphologie der vorher mittels Cytospin fixierten Zellen, wurde der Fluoreszenzfarbstoff 4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI) verwendet [61]. Dazu wurden 10,5 µl der DAPI-Stocklösung mit 100 µl DPBS verdünnt, und anschließend 1,5 µl der hergestellten Lösung nochmals 1:1000 mit DPBS verdünnt. Nachdem die Zellen des Cytospins auf dem Objektträger 1-mal mit DPBS gewaschen wurden, gab man 150 µl der DAPI-Lösung auf die Zellen und inkubierte für 3 Minuten in Dunkelheit. Nachfolgend wurden die Zellen 3-mal mit DPBS gewaschen, mit ausreichend Eindeckmedium bedeckt und ein Deckglas vorsichtig – um die Entstehung von Luftblasen zu vermeiden – darauf gegeben.

3.2.3 Konfokalmikroskopie

Um eine dreidimensionale Darstellung der Zellkerne sowie eine sichtbare Lokalisation des Xanthohumols zu ermöglichen, wurden die Präparate unter Einsatz eines Konfokalmikroskops betrachtet. Durch die Verwendung unterschiedlicher Wellenlängen des Beobachtungslasers können unterschiedliche Ebenen der Probe separiert betrachtet werden. Dabei passiert nur Licht aus der Fokusebene die Blende. Licht aus anderen Ebenen des Präparats wird unterdrückt [62].

Durch Einstellung der verschiedenen Wellenlängen des Beobachtungslasers für die Darstellung der DAPI-Färbung (350-480nm) bzw. des Xanthohumols (493-600nm), der zu untersuchenden Position und Schichtdicke jedes einzelnen Präparates (Ende und Beginn in µm), Angabe der Ebenenanzahl (=25) und anschließender überlappender Darstellung der zwei sequenziellen Scans (DAPI + Xanthohumol) wurden für alle Präparate Bilder erstellt, welche in Zellgröße und Kontrast vergleichbar waren.

3.3 J774A.1 Zellkulturmodell

Die murine adhärente Makrophagen- Zelllinie J774A.1 wurde aus der Aszites einer weiblichen, erwachsenen Maus mit Retikulumzellsarkom isoliert, und wird v. a. in der immunologischen Forschung eingesetzt [63]. Die Zellen wurden vom Anbieter ATCC (American Type Culture Collection) verwendet. Für die hier durchgeführten Experimente wurden J774A.1 Zellen der Passagen 5-15 genutzt. Die Zellen wurden in

je 10 ml Medium, dessen Zusammensetzung in Tabelle 3 dargestellt ist, in 75 cm² Zellkulturflaschen kultiviert und bei 37 °C und 5% CO₂ inkubiert. Das Medium wurde alle zwei bis drei Tage gewechselt und das Wachstum der Zellkultur täglich mikroskopisch überprüft. Bei ca. 80%iger Konfluenz der Zellen wurde das Medium aus der Zellkulturflasche abgesaugt, 10 ml frisches Medium hinzu gegeben, die Zellen mittels Zellschaber von der Oberfläche gelöst und mehrmals im Medium resuspendiert. Anschließend wurden von der erhaltenen Zellsuspension 1 ml in 10 ml Medium pro Zellkulturflasche bzw. 200 µl in 2 ml Medium pro Well einer 6-Well Platte ausgesät, und durch vorsichtiges Schwenken eine gleichmäßige Verteilung der Zellen gewährleistet.

Tabelle 3: Zusammensetzung des Mediums für die J774A.1 Zellkultur

Substanz	Volumen (ml)
DMEM	450
FBS	50
Pen/Strep	5

Sobald bei den in den Wells ausgesäten Zellen eine 90-95%ige Konfluenz beobachtet werden konnte, wurde das Medium abgesaugt. Je Well wurden 996,7 µl frisches Medium mit unterschiedlichen Xanthohumol-Konzentrationen (0 mg/ 0,03125 mg/ 0,0625 mg/ 0,125 mg) aus einem XN-haltigen Extrakt, wiederum nach mehrmaligem Vortexen und mehreren Ultraschallbehandlungen (vgl. Caco-2 Zellkulturversuch, 3.2), in Doppelbestimmung auf die Zellen gegeben. Im nächsten Schritt wurden die Zellen nach einer Stunde bzw. 2 Stunden Präinkubationszeit mit LPS (50 pg/ml) stimuliert. 6 h nach Inkubation mit LPS wurde je Well 125 µl Zellkulturüberstand bzw. nach 18 Stunden der restliche Überstand sowie die in 500 µl Trizol pro Well aufgenommenen Zellen abgenommen, und bei -80°C gelagert.

3.3.1 Griess-Assay

Da Stickstoffmonoxid als Botenstoff an Gefäß-, Nerven- und Immunprozessen beteiligt ist und damit große physiologische und pathophysiologische Bedeutung hat, ist die Messung von NO in biologischen Geweben und Flüssigkeiten von großem Interesse [64]. Der sog. Griess-Assay stellt einen NO-Nachweis basierend auf der Identifizierung des NO-Abbauproduktes Nitrit (NO_2^-) dar [65] und wurde im Versuch zur Überprüfung der Wirkung der LPS-Stimulation von J774A.1-Zellen mit dem Griess Reagent System von Promega nach Protokoll des Herstellers durchgeführt. Dabei kommt es im letzten Schritt durch Bindung von N-1-naphthylethylenediamin Dihydrochlorid (NED) an das vorher im sauren Milieu durch Reaktion mit Nitrit entstandene Diazonium-Ion zur Bildung einer chromophoren Azoverbindung, deren Absorption anschließend bei 540 nm gemessen wurde.

3.3.2 ELISA

Die Konzentration von IL-1 β , IL-6, TNF- α sowie CD14 im Zellkulturüberstand der Interventionsstudie wurde mit Hilfe von spezifischen ELISA Kits (DuoSet® ELISA Development Systems, R&D Systems) bestimmt. Die Messung wurde nach Anleitung des Herstellers durchgeführt.

Die unstimulierten und stimulierten Proben wurden vor Durchführung des ELISAs entsprechend Tabelle 4 mit Reagent Diluent (1% BSA in PBS) verdünnt.

Tabelle 4: Verdünnungen der Proben für IL-1 β , IL-6, TNF- α und CD14

Probe	IL-1 β	IL-6	TNF- α	CD14
Unstimuliert 6h	1:3	1:3	1:3	1:3
LTA 6h	1:20	1:20	1:10	1:5
LPS 6h	1:20	1:20	1:5	1:2
ORF 6h	1:3	1:3	1:3	1:3

Zur Bestimmung der TNF- α Konzentration im Zellkulturüberstand der J774A.1 Zellen wurde ebenfalls ein ELISA Kit verwendet und die Messung nach Anleitung des Herstellers durchgeführt. Die unstimulierten Proben wurden unverdünnt gemessen, während die für 6 h stimulierten Proben 1:2, die für 18 h stimulierten Proben 1:20 mit Reagent Diluent verdünnt wurden.

4. Ergebnisse

Die vorliegende Arbeit untersucht die Effekte unterschiedlicher Dosen von Xanthohumol aus einem XN-reichen Extrakt auf Immunzellen und verschiedene Zellkulturmodelle. Dazu wurde einerseits eine Pilotstudie durchgeführt und die protektiven Effekte auf die Immunantwort von isolierten Monozyten im Zeitverlauf nach oraler XN-Aufnahme analysiert. Andererseits wurde im Caco-2 Ko-kulturmodell die Bindung von Xanthohumol an Caco-2 Zellen, Monozyten, Granulozyten und PBMCs untersucht. Weiterhin wurde im J774A.1-Zellkulturmodell die Wirkung von XN auf die LPS-induzierte TNF- α Produktion untersucht.

4.1 Einfluss der oralen Aufnahme von Xanthohumol in Form eines Xanthohumol-haltigen Extrakts in unterschiedlichen Dosen auf die LPS- bzw. LTA-induzierte Freisetzung von Zytokinen im Zellkulturüberstand von Monozyten

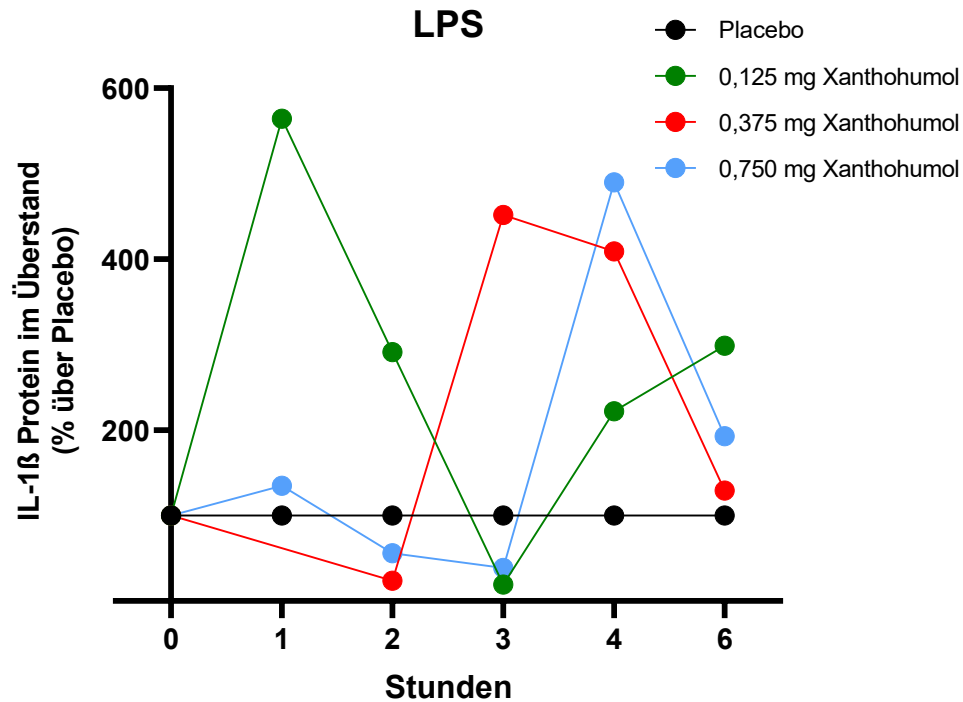
Im ersten Teil der Arbeit wurde ein Proband aus einer noch laufenden Pilotstudie untersucht. Dabei sollte analysiert werden, ob die einmalige Aufnahme von Xanthohumol in Form eines XN-reichen Extrakts in verschiedenen Dosen, wie sie auch durch moderaten Konsum von Bier (250-1000 ml Bier) aufgenommen werden können, die LPS- bzw. LTA-induzierte Immunantwort von Monozyten und Granulozyten *ex vivo* im Zeitverlauf beeinflusst. Die Monozyten und Granulozyten wurden dafür direkt vor und 1, 2, 3, 4 sowie 6 h nach der oralen Aufnahme von XN isoliert und für 2 bzw. 6 h mit LPS bzw. LTA stimuliert. Die Konzentrationen von IL-1 β , IL-6, TNF- α und CD14 wurden mittels ELISA im Zellkulturüberstand bestimmt.

Da sowohl in den Untersuchungen der Granulozyten nach 2- und 6-stündiger Stimulation als auch in den Untersuchungen der Monozyten nach 2-stündiger Stimulation die Freisetzung der Zytokine und von CD14 unter der Nachweisgrenze der ELISAs lag, sind in der vorliegenden Arbeit ausschließlich die Ergebnisse für Monozyten nach 6-stündiger Stimulation mit LPS bzw. LTA dargestellt.

IL-1 β :

Bei der Intervention mit 0,125 mg XN, sowohl bei Stimulation mit LPS als auch LTA, war die höchste Konzentration von IL-1 β 1h nach der Aufnahme des Hopfeninhaltsstoffes erreicht. Diese lag 500 % über dem Placebo und nahm in den nächsten 2 h wieder ab. Nach 4 h konnte wieder eine leichte Zunahme der LPS-induzierten IL-1 β Freisetzung verglichen mit dem Placebo im Zellkulturmedium gemessen werden. Bei 0,375 mg bzw. 0,75 mg XN liegt der Peak sowohl bei der LPS- als auch LTA-stimulierten Probe bei 3h bzw. 4 h nach XN-Aufnahme.

8A



8B

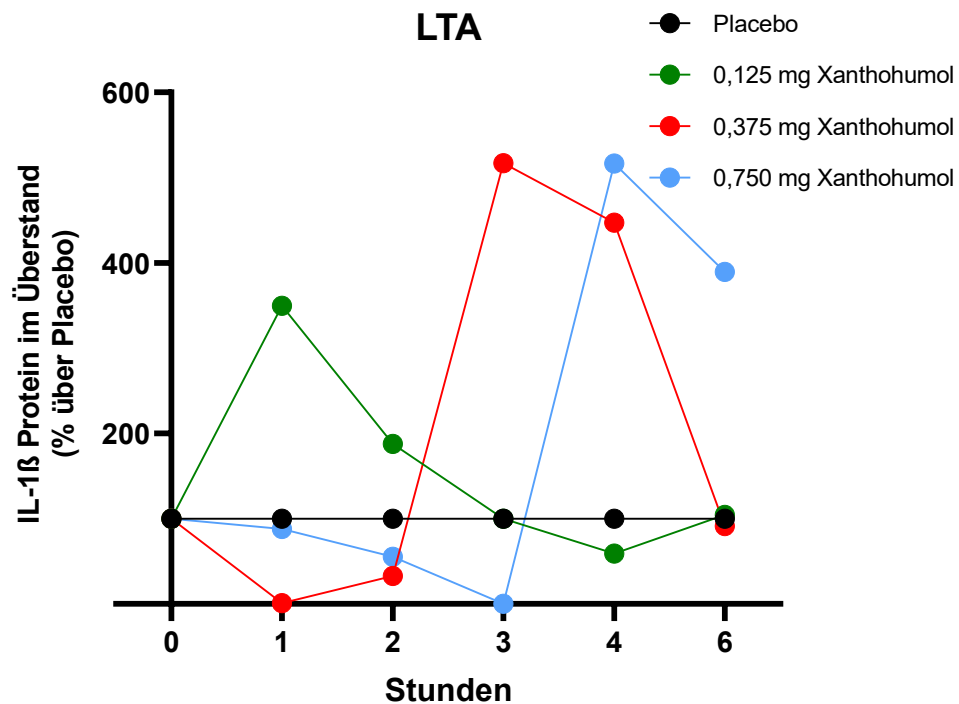
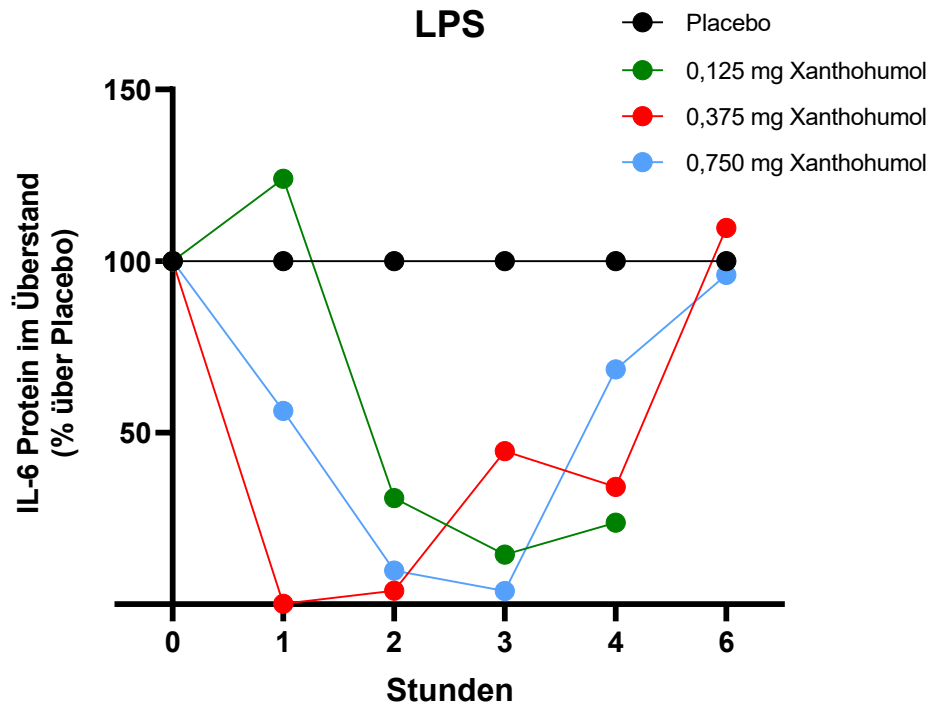


Abbildung 8: Untersuchung zum Einfluss von verschiedenen Xanthohumol-Dosen auf die LPS- bzw. LTA-induzierte IL-1 β Proteinkonzentration im Zellkulturüberstand von Monozyten im Zeitverlauf.

IL-6:

Der suppressierende Effekt von XN auf die Freisetzung von IL-6 in dem Zellkulturmedium war 2 bis 4 h nach der Aufnahme von 0,125 mg, 0,375 mg oder 0,75 mg XN aus einem XN-reichen Extrakt am ausgeprägtesten im Vergleich zum Placebo (=100% Kontrolle). Sowohl bei LPS- als auch LTA-stimulierten Monozyten wurde nach 1 h bei 0,125 mg XN die IL-6 Konzentration im Vergleich zum Placebo erhöht. Auch bei 0,75 mg XN war eine leichte Erhöhung der LTA-induzierten IL-6 Freisetzung messbar. Nach 6 h war der Effekt von 0,125 mg und 0,75 mg XN auf die IL-6 Freisetzung aus den Monozyten weder für LPS noch für LTA nachweisbar. Die Konzentration von IL-6 glich zu diesem Zeitpunkt der vom Placebo. Lediglich 0,375 mg XN wies auch nach 6 h noch einen hemmenden Effekt auf die LTA-induzierte IL-6 Freisetzung auf.

9A



9B

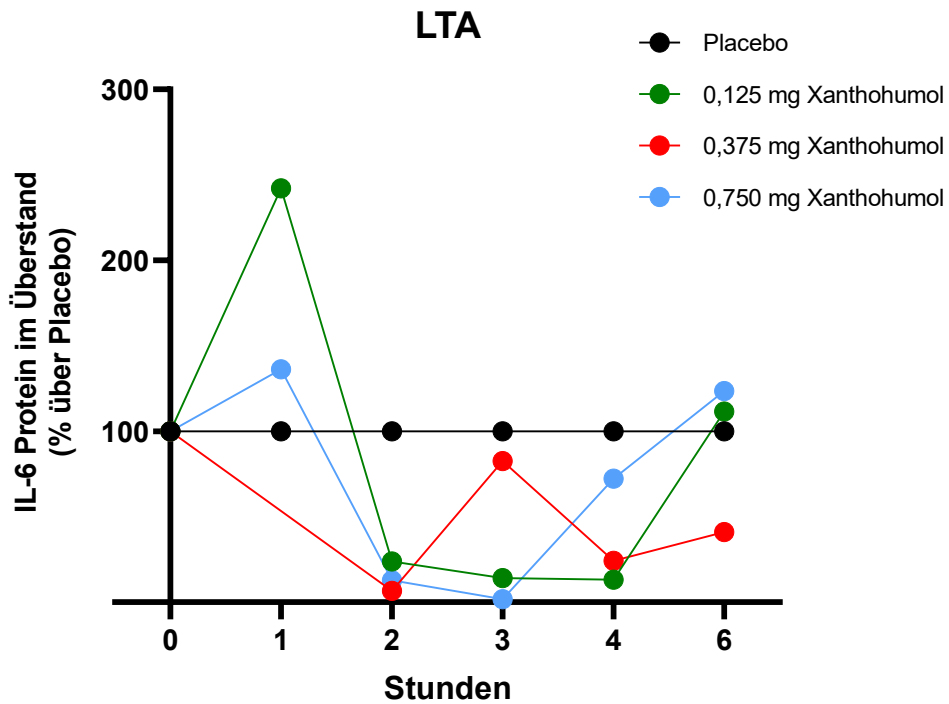
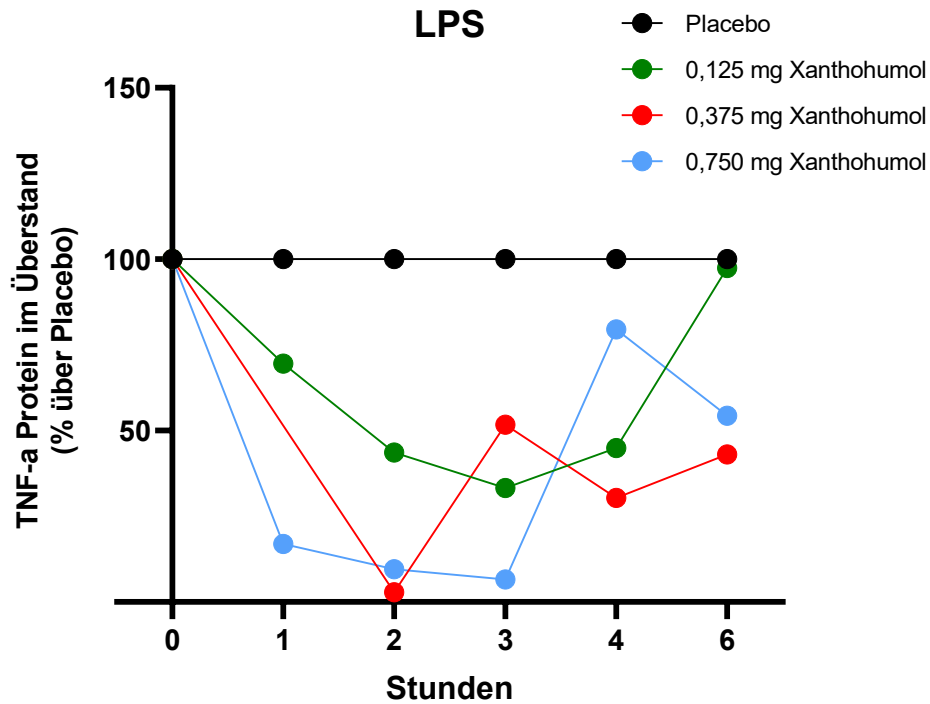


Abbildung 9: Untersuchung zum Einfluss von verschiedenen Xanthohumol-Dosen auf die LPS- bzw. LTA-induzierte IL-6 Proteinkonzentration im Zellkulturüberstand von Monozyten im Zeitverlauf.

TNF- α :

Die Konzentration von TNF- α im Zellkulturmedium der LPS- bzw. LTA-stimulierten Monozyten war zwischen 2 und 3 h nach Aufnahme der verschiedenen XN-Dosen am stärksten reduziert im Vergleich zum Placebo (=100% Kontrolle). Auch nach 6 h waren die Spiegel nach Aufnahme von 0,375 mg und 0,75 mg XN aus einem XN-reichen Extrakt um 46-84 % niedriger als nach der Aufnahme des Placebos. Die Aufnahme von 0,125 mg XN-Extrakt zeigte den geringsten Effekt auf LPS- bzw. LTA-induzierte Freisetzung von TNF- α im Zellkulturmedium nach 1 und 6 h im Vergleich zum Placebo.

10A



10B

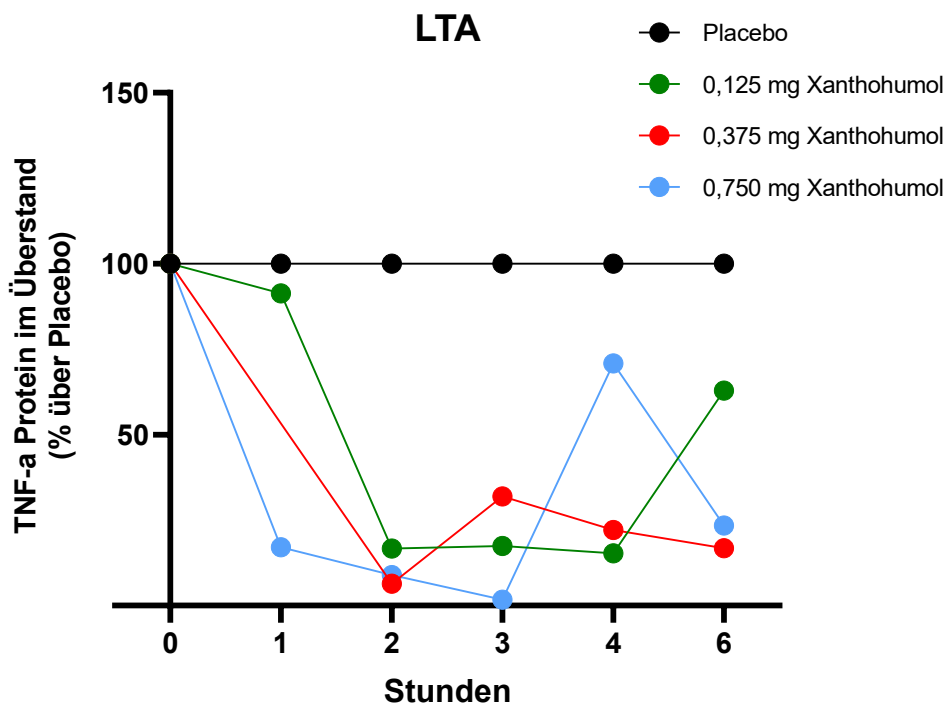
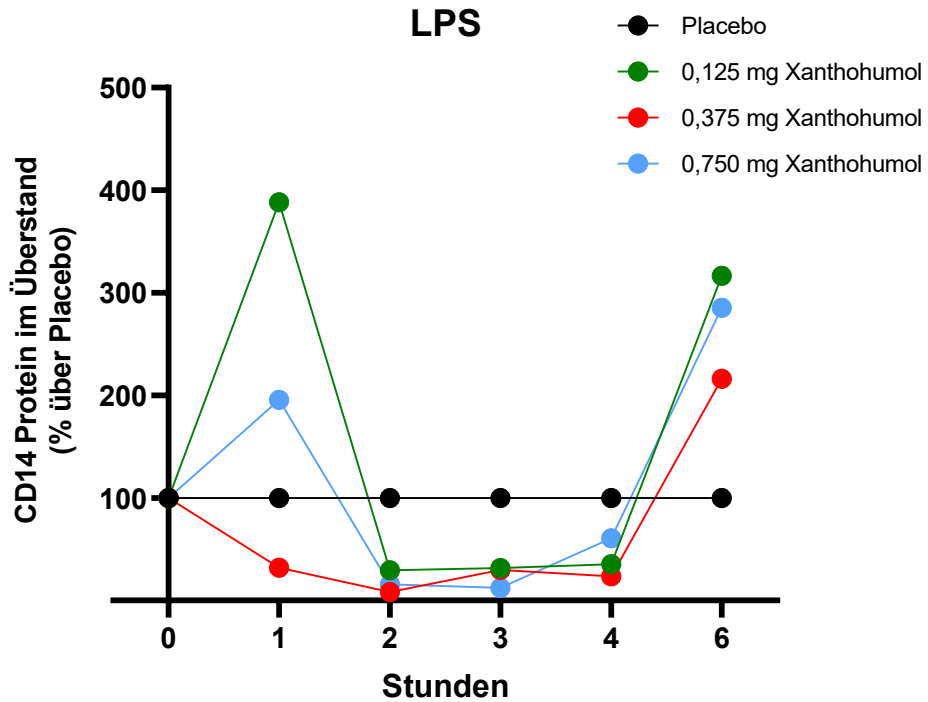


Abbildung 10: Untersuchung zum Einfluss von verschiedenen Xanthohumol-Dosen auf die LPS- bzw. LTA-induzierte TNF- α Proteinkonzentration im Zellkulturüberstand von Monozyten im Zeitverlauf.

CD14:

Bei allen eingesetzten XN-Dosen aus einem XN-reichen Extrakt konnte ein U-förmiger Verlauf des Effekts von XN auf die CD14-Freisetzung im Zellkulturmedium der LPS- bzw. LTA-stimulierten Monozyten nachgewiesen werden. Der supprimierende Effekt auf die Freisetzung von CD14 im Zellkulturmedium war 2 bis 4 h nach Aufnahme der verschiedenen XN-Dosen im Vergleich zum Placebo am stärksten. In dieser Zeitspanne konnte XN die LPS- bzw. LTA-induzierte CD14 Freisetzung um bis zu 93% verglichen mit dem Placebo reduzieren. Im Gegensatz dazu konnten nach 1 h und 6 h nach der Aufnahme von 0,125 mg und 0,75 mg XN aus einem XN-reichen Extrakt sowohl bei LPS als auch LTA 2-4fach erhöhte CD14-Konzentrationen im Vergleich zum Placebo nachgewiesen werden.

11A



11B

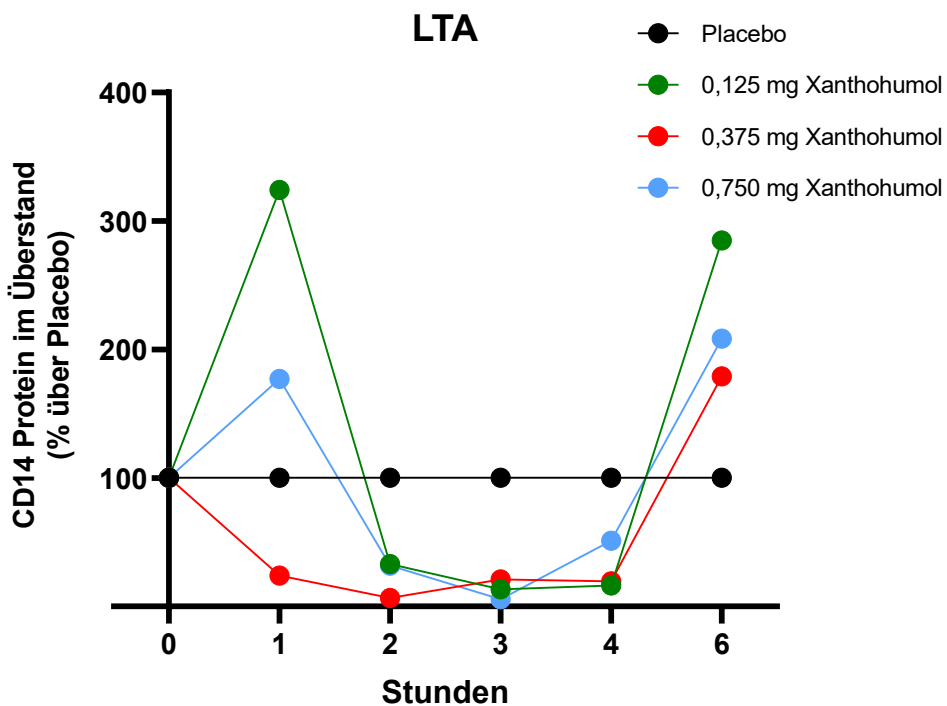


Abbildung 11: Untersuchung zum Einfluss von verschiedenen Xanthohumol-Dosen auf die LPS- bzw. LTA-induzierte CD14 Proteinkonzentration im Zellkulturüberstand von Monozyten im Zeitverlauf.

4.2 Untersuchungen zur Bindung von Xanthohumol, appliziert aus einem Xanthohumol-haltigen Extrakt, an Caco-2 Zellen, Monozyten, Granulozyten und PBMCs im Caco-2 Ko-kulturmodell

In einem *in vitro* Ko-Kultur-Modell mit Caco-2 Zellen wurde untersucht, inwiefern Xanthohumol nach Überwindung der intestinalen Barriere an Immunzellen bindet. Dazu wurden ausdifferenzierte Caco-2 Zellen im Transwell für 1 bzw. 2 h mit 0 mg, 0,125 mg, 0,375 mg bzw. 0,75 mg XN aus einem XN-Extrakt inkubiert. Zuvor aus einem Buffy Coat isolierte Monozyten, Granulozyten bzw. PBMCs befanden sich im Well darunter. Die Zellen wurden anschließend mittels Cytospin auf einen Objektträger gebracht, die DNA mit DAPI angefärbt, und im Konfokalmikroskop betrachtet. Durch die Färbung erschienen die Zellkerne blau (480 nm), und das XN auf Grund seiner Autofluoreszenz bei 530 nm grün. Bei den hier gezeigten Bildern handelt es sich um Merge-, also kombinierte Bilder der DAPI- und Xanthohumol-Aufnahme.

Die mikroskopischen Bilder sind in Abbildung 12-15 dargestellt. Wie zu erwarten, konnte man weder bei den Monozyten noch Granulozyten und PBMCs nach Inkubation mit 0 mg XN grün fluoreszierende Bereiche bei der XN-spezifischen Wellenlängen-Einstellung erkennen. Lediglich bei den Caco-2 Zellen wurden schwach fluoreszierende Punkte zwischen den Zellkernen beobachtet (Vgl. Abb. 12A), die auf äußere, ebenfalls bei gleicher Wellenlänge fluoreszierende Einflüsse hindeuten.

Da mittels DAPI-Färbung nur der Zellkern, und nicht die Zellhülle angefärbt wird, kann die Bindung des XN nicht genau lokalisiert werden. Jedoch weisen mehrere Aufnahmen auf eine Bindung an den Zellkern hin (u. a. Abb. 13E, 14C). Weiterhin wurden in einigen Fällen größere Mengen an XN zwischen nah beieinander liegenden Zellkernen beobachtet (u. a. Abb. 13H, 14G).

Nach Augenmaß bewertet, wurde nach Inkubation mit 0,125 mg und 0,375 mg XN in allen Versuchsreihen mehr an die Zellkerne bzw. in der Nähe der Zellkerne gebundenes XN beobachtet als bei 0,75 mg XN. Bei den Caco-2 Zellen konnte stets quantitativ mehr XN als bei den anderen untersuchten Zelltypen festgestellt werden; teils waren sogar Caco-2 Zellen überdeckende „Schwaden“ aus XN erkennbar (Vgl. Abb. 12H).

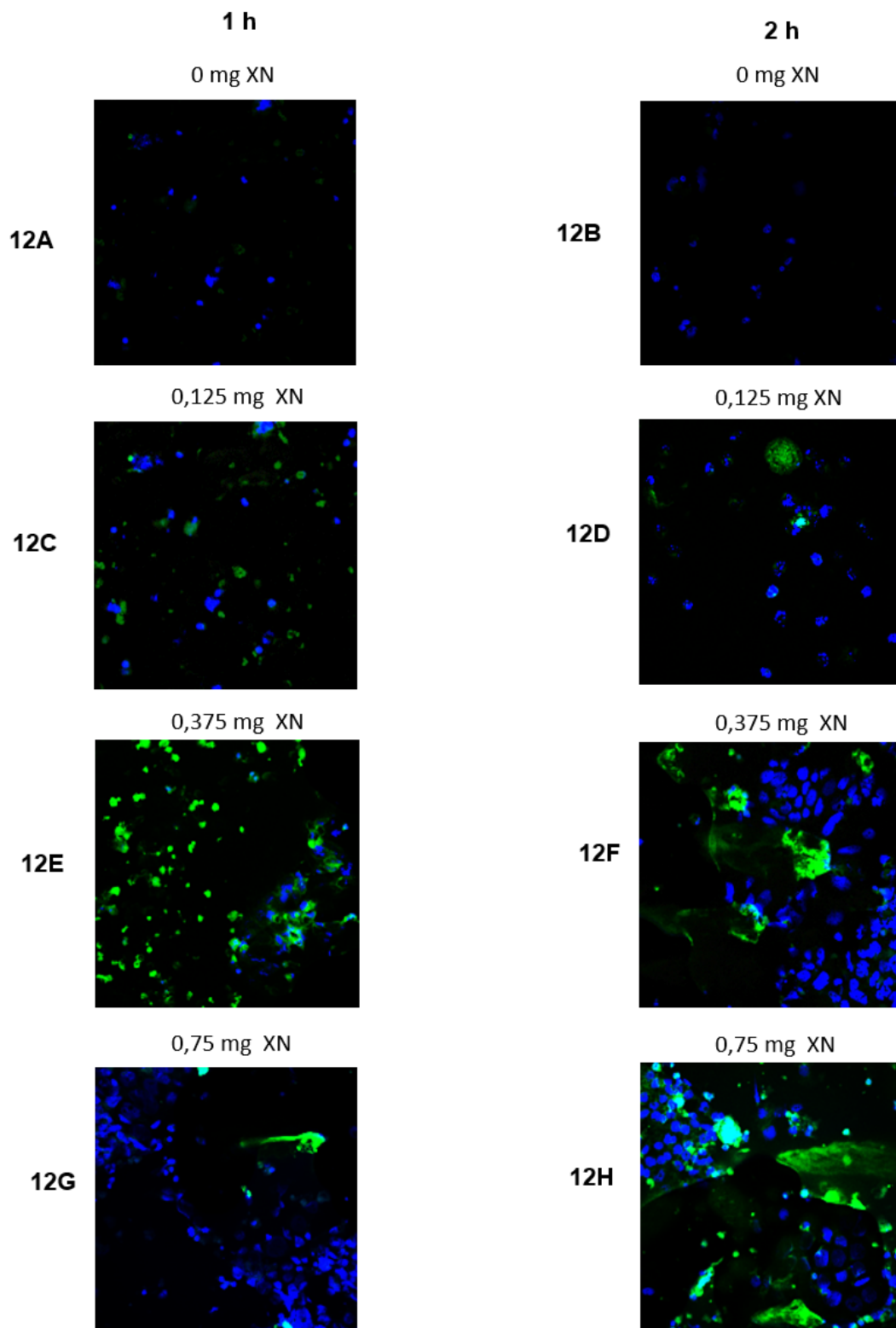


Abbildung 12: Untersuchung zur Bindung von Xanthohumol an Caco-2 Zellen im Caco-2 Ko-kulturmodell. Die ausdifferenzierten Caco-2 Zellen wurden 1 bzw. 2 h mit 0 mg, 0,125 mg, 0,375 mg bzw. 0,75 mg Xanthohumol (XN) inkubiert. Die Bilder wurden mittels Konfokalmikroskop aufgenommen.

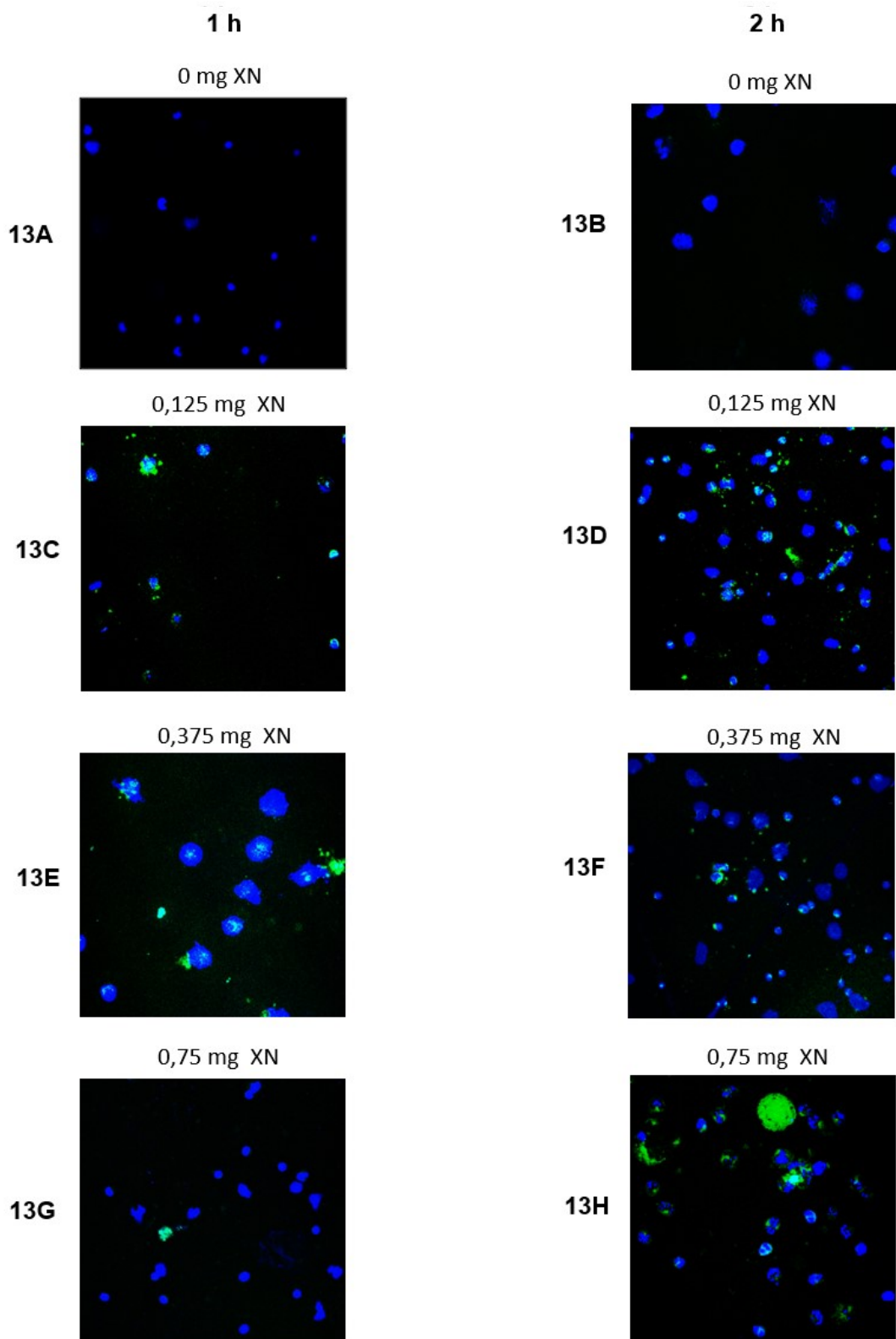


Abbildung 13: Untersuchung zur Bindung von Xanthohumol an Monozyten im Caco-2 Ko-kulturmodell. Die ausdifferenzierten Caco-2 Zellen wurden 1 bzw. 2 h mit 0 mg, 0,125 mg, 0,375 mg bzw. 0,75 mg Xanthohumol (XN) inkubiert. Die Bilder wurden mittels Konfokalmikroskop aufgenommen.

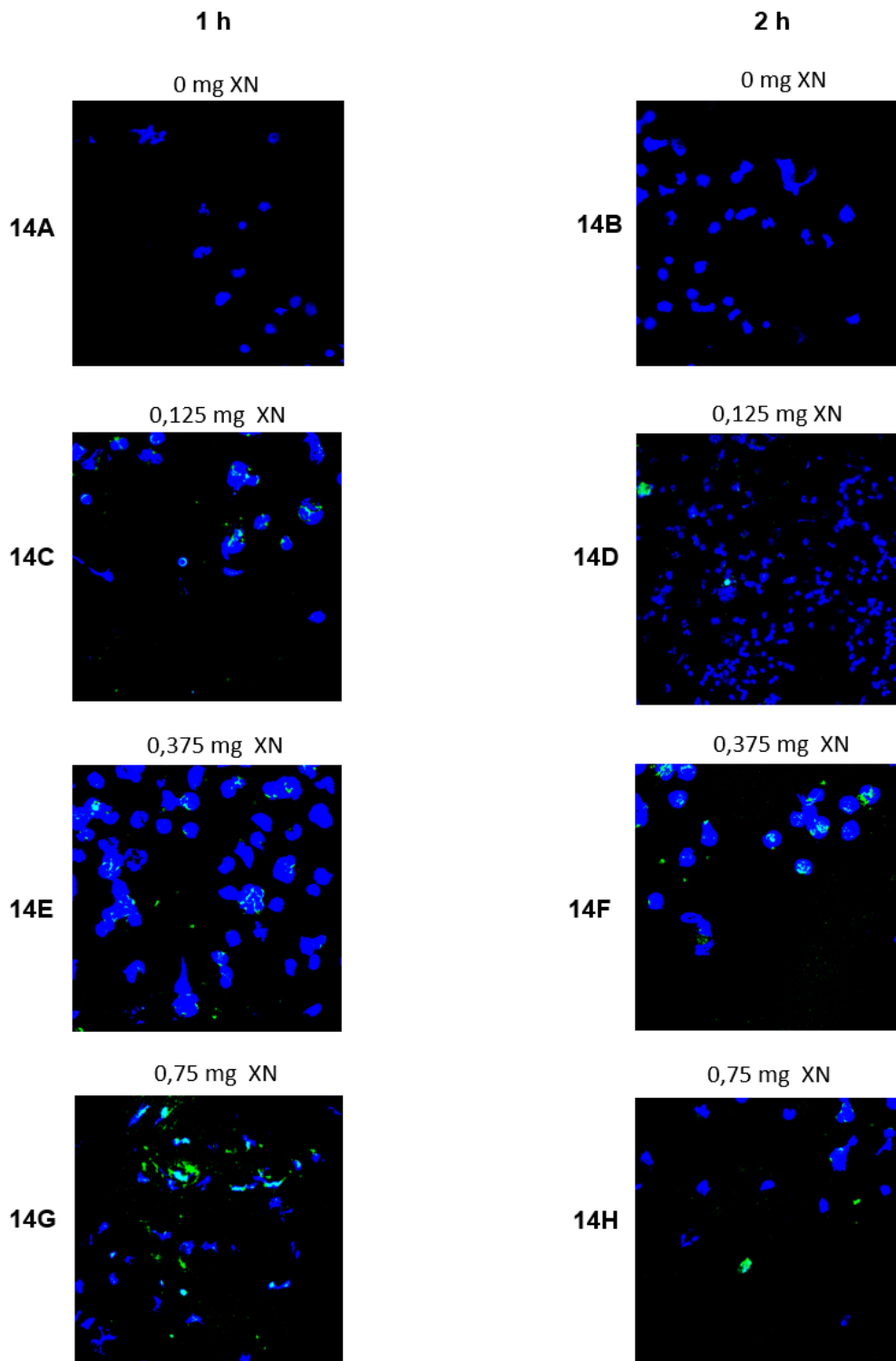


Abbildung 14: Untersuchung zur Bindung von Xanthohumol an Granulozyten im Caco-2 Ko-kulturmodell. Die ausdifferenzierten Caco-2 Zellen wurden 1 bzw. 2 h mit 0 mg, 0,125 mg, 0,375 mg bzw. 0,75 mg Xanthohumol (XN) inkubiert. Die Bilder wurden mittels Konfokalmikroskop aufgenommen.

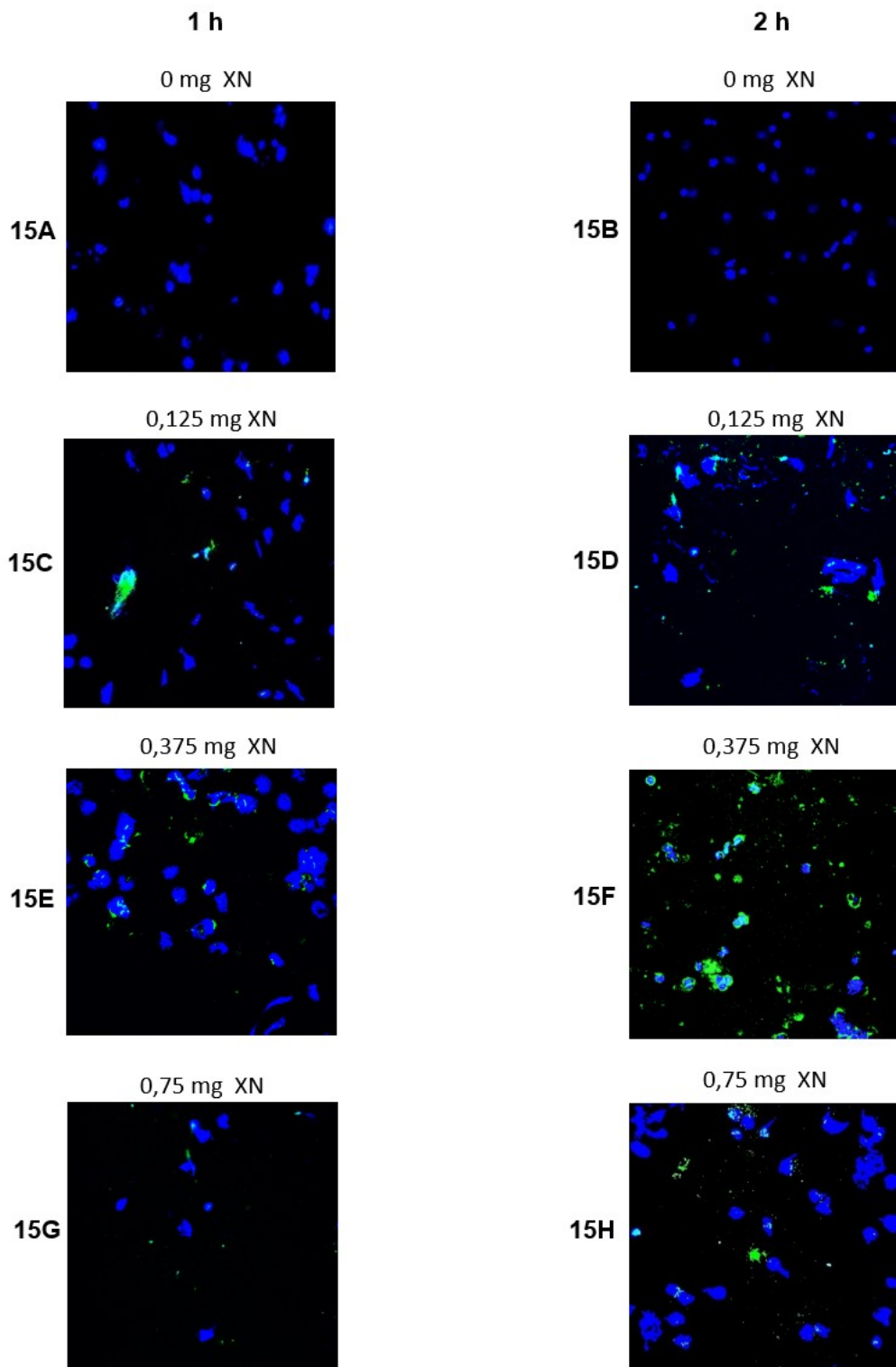


Abbildung 15: Untersuchung zur Bindung von Xanthohumol an PBMCs im Caco-2 Ko-kulturmodell. Die ausdifferenzierten Caco-2 Zellen wurden 1 bzw. 2 h mit 0 mg, 0,125 mg, 0,375 mg bzw. 0,75 mg Xanthohumol (XN) inkubiert. Die Bilder wurden mittels Konfokalmikroskop aufgenommen.

4.3 Einfluss von Xanthohumol appliziert aus einem Xanthohumol-haltigen Extrakt in unterschiedlichen Dosen auf die LPS-induzierte Freisetzung von NO_x und TNF-α im Zellkulturüberstand von J774A.1 Zellen

Im Gegensatz zu den vorherigen Untersuchungen wurden in diesem Experiment geringe Dosen von XN (0,03125 mg, 0,0625 mg und 0,125 mg) aus einem XN-Extrakt pro mL eingesetzt. Dies wurde zum einen auf Grund der geringen Wasserlöslichkeit von XN gewählt, zum anderen sollte untersucht werden, ob auch bei geringeren Dosen ein positiver Effekt von XN auf die LPS-induzierte Konzentration von TNF-α im Zellkulturüberstand von J774A.1 Zellen beobachtet werden kann.

Stickstoffmonoxid

Die Konzentration von Nitrit im Zellkulturüberstand von J774A.1 Zellen wurde mittels Griess-Assay bestimmt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 16 dargestellt.

Weder die 1- noch die 2-stündige Vorbehandlung der Zellen mit verschiedenen XN-Dosen vor Stimulation mit LPS hatte nach 6 h einen Effekt auf die NO_x Freisetzung im Zellkulturüberstand. Im Gegensatz dazu war sowohl in den für 1 und 2 h mit XN vorbehandelten Zellen nach 18 h Stimulation mit LPS die NO_x Freisetzung bei Vorbehandlung mit 0 mg als auch mit 0,03125 mg XN deutlich induziert. Das Signifikanzniveau wurde zwar bei LPS-stimulierten und mit 0,03125 mg XN vorbehandelten Zellen im Vergleich zu unstimulierten, unbehandelten Proben erreicht, ist aber wahrscheinlich auf die große Streuung der Werte zurückzuführen. Nach 2-stündiger Pre-Inkubation der J774A.1 Zellen mit verschiedenen XN-Dosen war ein inverser Zusammenhang zwischen der NO_x-Konzentration im Zellkulturüberstand und der zur Behandlung eingesetzten XN-Konzentration zu erkennen.

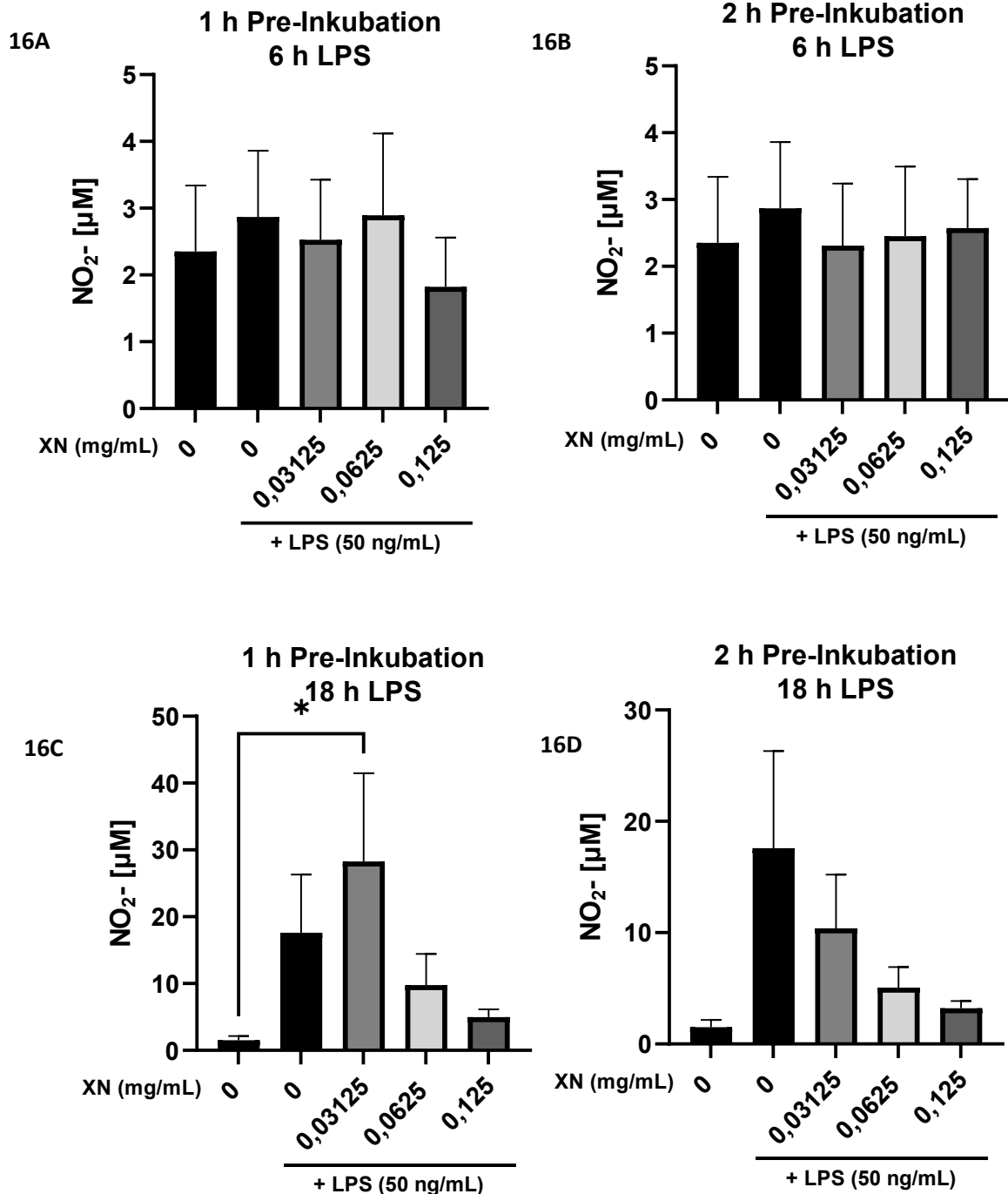


Abbildung 16: Nitrit-Konzentration im Zellkulturüberstand von J774A.1 Zellen nach 1- bzw. 2-stündiger Behandlung (Pre-Inkubation) mit 0,03125 mg, 0,0625 mg oder 0,125 mg Xanthohumol (aus einem Xanthohumol-Extrakt) und nach 6- oder 18-stündiger Stimulation mit LPS.

Die Werte sind als Mittelwerte $\pm$ SEM dargestellt. n=3; (XN) Xanthohumol; (LPS) Lipopolysaccharide; (NO₂⁻) Nitrit.

TNF- α

Da bei 6-stündiger LPS-Stimulation auf Grund zu hoher Werte der gemessenen TNF- α Konzentration nur zwei Versuchsreihen für die Auswertung berücksichtigt werden konnten, war keine statistische Auswertung möglich. Auf Grund der inhomogenen Varianzen bei den Ergebnissen der für 18 h mit LPS stimulierten Proben wurde auch hier keine statistische Analyse durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 17 dargestellt.

Bei 1-stündiger Behandlung mit XN und 6-stündiger LPS-Stimulation ist eine negative Korrelation zwischen der TNF- α Konzentration und der XN-Dosis zu beobachten- je höher die XN-Dosis, desto weniger TNF- α im Vergleich zum Placebo konnte gemessen werden. Auch nach 2-stündiger Pre-Inkubation mit XN und 6-stündiger LPS-Stimulation konnte sowohl bei 0,03125 mg als auch bei 0,0625 mg und 0,125 mg XN eine Reduktion der TNF- α Konzentration im Zellkulturüberstand der J774A.1 im Vergleich zur unbehandelten, LPS-stimulierten Probe beobachtet werden.

Nach 18-stündiger LPS-Stimulation konnte weder bei 1- noch bei 2-stündiger Behandlung mit XN ein Einfluss von 0,03125 mg und 0,0625 mg XN auf die TNF- α Konzentration im Vergleich zur unbehandelten Probe festgestellt werden. Lediglich bei 0,125 mg XN wurde die TNF- α Konzentration deutlich reduziert im Vergleich zu 0 mg XN.

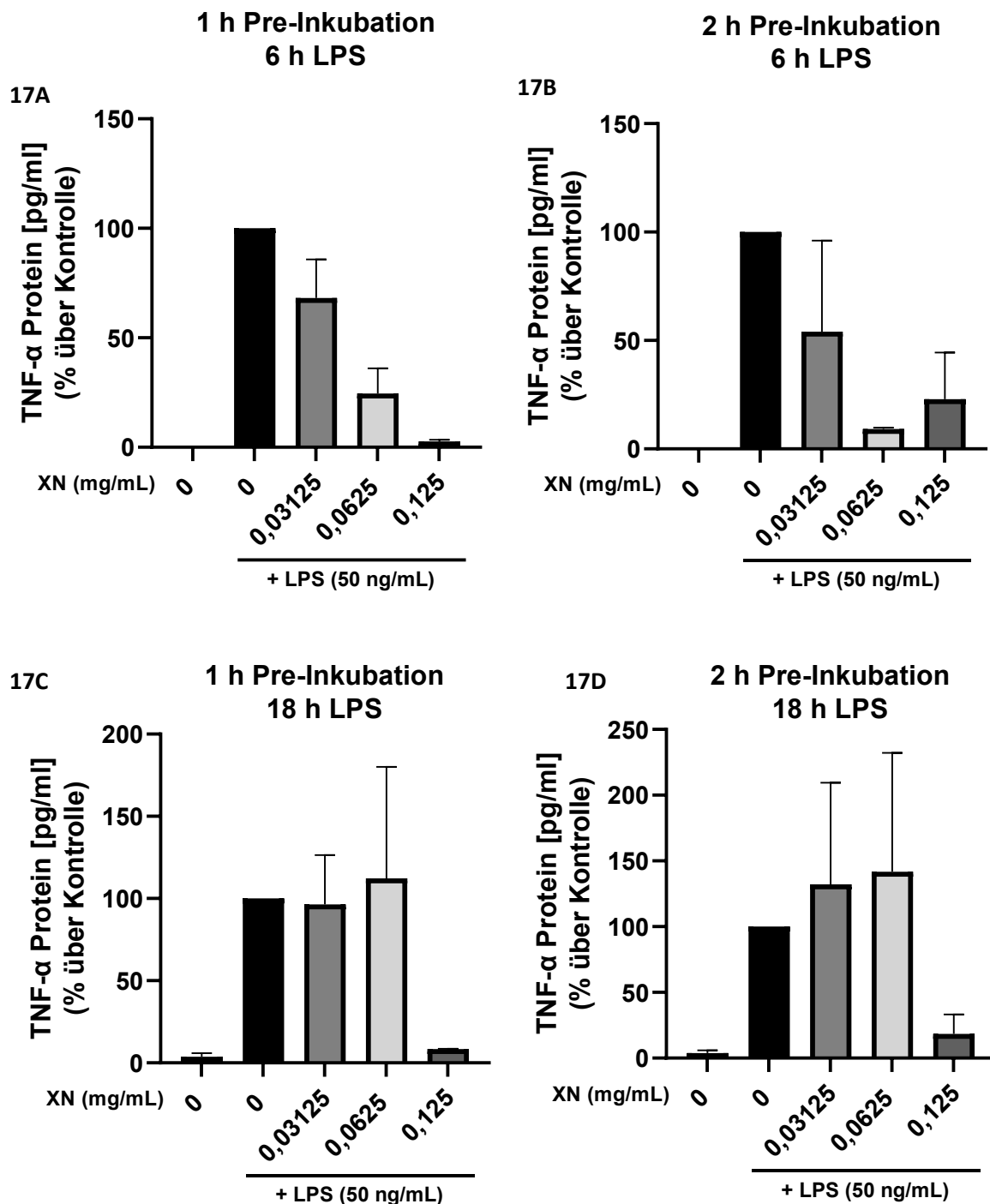


Abbildung 17: TNF- α Konzentration im Zellkulturüberstand von J774A.1 Zellen nach 1- bzw. 2-stündiger Behandlung (Pre-Inkubation) mit 0,03125 mg, 0,0625 mg oder 0,125 mg Xanthohumol (aus einem Xanthohumol-Extrakt) und nach 6- oder 18-stündiger Stimulation mit LPS.

Die Werte sind als Mittelwerte $\pm$ SEM dargestellt. 15A+B:n=2; 15C+D: n=3; (XN) Xanthohumol; (LPS) Lipopolysaccharide; (TNF- α) Tumornekrosefaktor.

5. Diskussion

Von Bakterien hervorgerufene Infektionen gehören zu den häufigsten Erkrankungen weltweit und ziehen meist langandauernde und kostenintensive Behandlungen nach sich. Obwohl Antibiotika weiterhin bei vielen bakteriellen Erkrankungen das Mittel der Wahl sind, stellt das globale Problem der zunehmenden Antibiotikaresistenz eine der größten gesundheitlichen Herausforderungen, assoziiert mit erhöhter Morbidität und Mortalität, dar [66]. Mehrere Studien, u. a. auch Untersuchungen der eigenen Arbeitsgruppe, weisen darauf hin, dass Xanthohumol eine immunmodulierende Wirkung aufweist [67] [24]. So konnte in einer Humanstudie nachgewiesen werden, dass bereits der einmalige Konsum von 0,125 mg XN bei gesunden Personen, die durch Toxine gramnegativer und grampositiver Bakterien induzierte Aktivierung von Immunzellen des Blutes *ex vivo* in Stimulationsversuchen deutlich mindert [24] [20]. Dabei konnte der immunmodulatorische Effekt bereits 1 h nach Einnahme von XN beobachtet werden, war jedoch nach 12-stündiger XN-Abstinenz nicht mehr nachweisbar [24]. Wie lang jedoch der immunmodulierende Effekt anhält und ob dieser von der aufgenommenen XN-Dosis abhängt, ist bisher nicht geklärt. Vor diesem Hintergrund werden in der vorliegenden Arbeit der Effekt von 3 unterschiedlichen Dosen XN auf die Stimulierbarkeit von Immunzellen des Blutes *ex vivo* im Zeitverlauf untersucht. Weiterhin wurde in einem Caco-2 Ko-kulturmodell *in vitro* untersucht, ob XN die Darmbarriere passiert. Im J774A.1 Zellkulturversuch wurde außerdem untersucht, ob XN einen Effekt auf die LPS-stimulierte TNF- α Freisetzung im Zellkulturmedium hat.

5.1 Einfluss der oralen Aufnahme von Xanthohumol in unterschiedlichen Dosen auf die LPS- bzw. LTA-induzierte Konzentration von Zytokinen und CD14 im Zellkulturüberstand von Monozyten

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit wurde ein Proband aus einer noch laufenden Pilotstudie untersucht. Ziel war es, zu untersuchen, ob die orale Aufnahme von Xanthohumol aus einem XN-haltigen Extrakt in unterschiedlichen Dosen (0,125 mg, 0,375 mg, 0,75 mg) unterschiedlich starke protektive Effekte auf die LPS- bzw. LTA-vermittelte Ausschüttung von IL-1 β , IL-6, TNF- α und CD14 im Zellkulturüberstand von isolierten Monozyten aufweist, und wie der zeitliche Verlauf des protektiven Effekts ist.

Nach Aufnahme von 0,125 mg, 0,375 mg und 0,75 mg Xanthohumol aus einem Xanthohumol-reichen Extrakt konnte ein supprimierender Effekt von Xanthohumol auf die LPS- bzw. LTA-induzierte Freisetzung von IL-6, TNF- α und CD14 im Vergleich zum Placebo in isolierten Monozyten nachgewiesen werden, welcher jeweils 2- 4 h nach der Aufnahme von Xanthohumol am stärksten war. Bei der LPS- bzw. LTA-induzierten Freisetzung von IL-1 β hingegen wurde die Zytokin-Konzentration nach der Aufnahme von XN bis zu 6-fach erhöht im Vergleich zum Placebo.

Die Ergebnisse stimmen mit Ergebnissen der eigenen Arbeitsgruppe, in denen der Effekt der einmaligen Aufnahme von 0,125 mg XN aus einem XN-haltigen Extrakt auf die *ex vivo* Stimulation von PBMCs untersucht wurde, in weiten Teilen überein.

Mehrere Studien weisen darauf hin, dass eine vollständige Unterdrückung der Immunantwort bei viralen und bakteriellen Infektionen schädlich sein oder sogar die Krankheitsschwere verschlimmern und eine längere Genesungszeit nach sich ziehen könnte [68] [69]. Die punktuell aktivierenden Effekte von bereits geringen Dosen an XN auf die Freisetzung der hier untersuchten pro-inflammatorischen Zytokine und CD14 könnten also durchaus als Teil der immunmodulierenden Eigenschaften von XN gewertet werden, sollten aber in zukünftigen Studien mit größerem Stichprobeumfang detaillierter untersucht werden.

Welche Mechanismen an dem hemmenden Effekt von XN auf die LPS-induzierte Aktivierung von Immunzellen beteiligt sind, ist noch nicht vollständig geklärt [1]. Während die Ergebnisse anderer Studien darauf hinweisen, dass XN durch Bindung an MD-2 die Endotoxin-abhängige Aktivierung des TLR4-Signalwegs beeinträchtigt, konnte in einer Studie von Jung et al. (2022) gezeigt werden, dass weder LPS an MD-2 bindet noch die MD-2 Konzentration in LPS-stimulierten PBMCs durch XN aus einem XN-reichen Extrakt verändert wurde [20]. Weiterhin konnte in dieser Studie kein Effekt von XN auf die TLR4 Proteinkonzentration oder die Bindung von LPS an TLR4 festgestellt werden. Im Gegensatz dazu wurde nachgewiesen, dass XN die Bindung von LPS an CD14 hemmen sowie die CD14- Freisetzung in LPS-stimulierten PBMCs reduzieren kann. Auch andere Studien weisen darauf hin, dass LPS an CD14 bindet und anschließend auf TLR4/MD2 übertragen wird [22] [70]. Weiterhin wurde beobachtet, dass CD14 eine wesentliche Rolle bei der Erkennung von LPS durch TLR4 und MD2 spielt [71]. In der vorliegenden Pilotstudie konnte gezeigt werden, dass XN, unabhängig von der Dosis, v. a. zwischen 2 und 4 h nach der Aufnahme, zu einer

deutlichen Reduktion der LPS- und LTA-induzierten CD14-Freisetzung im Zellkulturmedium führt und somit die LPS-abhängige Aktivierung des TLR4-Signalwegs hemmt.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse der Pilotstudie, dass bereits der einmalige Konsum geringer Dosen von XN aus einem XN-reichen Extrakt die LPS- und LTA-stimulierte Immunantwort von Monozyten bei einem gesunden, normalgewichtigen Mann hemmen kann. Da jedoch die Ergebnisse von nur einem Probanden vorliegen, und nur die einmalige orale Aufnahme von verschiedenen Dosen an XN aus einem XN-reichen Extrakt untersucht wurden, sind weitere Studien notwendig, um aussagekräftige Ergebnisse bzgl. der immunmodulierenden Effekte von XN in beiden Geschlechtern, der Wirkung bei wiederholtem Konsum von XN sowie des Konsums von 100% purem XN zu erhalten. Weiterhin wurden die Zellstimulationen *ex vivo* durchgeführt; inwiefern die immunmodulierenden Effekte auch bei mit gramnegativen oder grampositiven Bakterien infizierten Personen nachweisbar sind, sollte in zukünftigen Studien untersucht werden.

5.2 Untersuchungen zur Bindung von Xanthohumol an Caco-2 Zellen, Monozyten, Granulozyten und PBMCs im Caco-2 Ko-kulturmodell

Um zu untersuchen, ob XN die intestinale Barriere überwindet und an Immunzellen bindet oder von ihnen aufgenommen wird, wurde ein Co-Kulturmodell aus Caco-2 Zellen auf apikaler Seite und aus einem Buffy Coat isolierten Monozyten, Granulozyten und PBMCs auf basolateraler Seite verwendet

Xanthohumol überwindet rasch die intestinale Barriere und bindet an Monozyten, Granulozyten und PBMCs oder wird von diesen aufgenommen.

Sowohl nach 1 h als auch nach 2 h Behandlung mit XN wurde in bzw. auf den Caco-2 Zellen das meiste XN beobachtet. Grund dafür könnte die geringe Wasserlöslichkeit von XN mit nur 1,3 mg/L bei 23 °C sein [72]. Ob XN von den Zellen direkt oder über eine Bindung an Oberfläche bzw. Zellmembran aufgenommen wurde, konnte in der vorliegenden Arbeit nicht geklärt werden. Bei allen XN-Dosen wurde nach 1h sowie 2h Inkubation in Monozyten, Granulozyten und PBMCs XN an bzw. in den Zellkernen beobachtet, was auf eine Aufnahme des XN in die Zellen bzw. Bindung an den Zellkern

hinweist. Dabei konnte kein Unterschied bzgl. der detektierten XN-Menge zwischen den unterschiedlichen Inkubationszeiten und den verschiedenen untersuchten Immunzellen festgestellt werden. Bei 0,125 mg und 0,375 mg XN konnte jedoch per Augenmaß mehr an oder in den Zellkernen gebundenes XN identifiziert werden als nach Behandlung der Zellen mit 0,75 mg XN. Die Ergebnisse lassen darauf schließen, dass XN rasch von den Enterozyten aufgenommen wird bzw. die intestinale Barriere überwindet. Weiterhin weisen die übereinander gelagerten Bilder (Merge, DAPI + XN) darauf hin, dass XN sowohl an Monozyten als auch Granulozyten und Subpopulationen der PBMCs bindet bzw. von ihnen aufgenommen wird.

In einer Studie von Wolff et al. (2011) wurde mittels Fluoreszenzmikroskopie die Aufnahme und intrazelluläre Verteilung von XN u. a. bei Hepatozyten, Sternzellen und Caco-2 Zellen, untersucht [73]. Die Ergebnisse weisen ebenfalls darauf hin, dass XN an die Zellen bindet oder von ihnen aufgenommen wird. In dieser Arbeit wurde auch gezeigt, dass die meisten XN Moleküle an zelluläre Proteine binden und somit Eigenschaften zellulärer Faktoren ändern könnten [73]. In einer weiteren Studie wurde nachgewiesen, dass ca. 70 % des auf apikaler Seite zu den Caco-2 Zellen hinzugefügten XN im Inneren der Zellen akkumulieren, wovon 93 % des intrazellulären XN im Zytosol lokalisiert sind. Die Akkumulation des XN in den Caco-2 Zellen wurde auch hier mit der spezifischen Bindung an cytosolische Proteine assoziiert [74]. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass XN an Zellmembranen bindet, und somit auch deren molekulare Organisation sowie strukturellen Eigenschaften, v. a. durch Reduktion des Raumes zwischen den Phospholipidschichten und Herabsetzen der Temperatur für Phasenübergänge der Phospholipide, beeinflussen kann [75].

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit weisen darauf hin, dass XN *in vitro* von Darm- und Immunzellen gebunden und/ oder aufgenommen wird. Die zugrunde liegenden Mechanismen müssen in weiterführenden Untersuchungen geklärt werden.

5.3 Einfluss der Prä-Inkubation von J774A.1 Zellen mit Xanthohumol in unterschiedlichen Dosen auf die LPS-induzierte Freisetzung von NO_x und TNF- α im Zellkulturüberstand der J774A.1 Zellen

Nachdem der Effekt von verschiedenen Dosen an XN auf die LPS- bzw. LTA-induzierte TNF- α Freisetzung bei isolierten Monozyten bereits in der Pilotstudie untersucht wurde, sollte auch die Wirkung geringerer Dosen an XN (0,03125 mg, 0,0625 mg und 0,125 mg) auf die LPS-induzierte TNF- α Freisetzung aus J774A.1 Zellen untersucht werden.

Durch Behandlung mit geringen Dosen von Xanthohumol konnte nach 6-stündiger Stimulation mit LPS die LPS-induzierte Freisetzung von TNF- α im Zellkulturüberstand von J774A.1 Zellen dosisabhängig reduziert werden, nach 18-stündiger LPS-Stimulation war nur noch bei mit 0,125 mg XN vorbehandelten Zellen ein hemmender Effekt nachweisbar. Weiterhin konnte eine deutliche Erhöhung der LPS-induzierten NO_x-Freisetzung im Zellkulturüberstand erst nach 18 h beobachtet werden, nach 6-stündiger LPS-Stimulation war dieser nicht nachweisbar.

Auch Lupinacci et al. (2009) konnten eine Hemmung der LPS-induzierten TNF- α Freisetzung in murinen Makrophagen (RAW264.7) sowie humanen Monozyten durch Vorbehandlung mit XN nachweisen [76]. In einer Studie von Jung et al. (2022) konnte nach oraler Aufnahme von 0,125 mg XN aus einem XN-reichen Extrakt und 2-stündiger LPS-Stimulation die LPS-induzierte TNF- α Freisetzung von isolierten PBMCs im Vergleich zu 0 mg XN ebenfalls reduziert werden [20]. Weiterhin wird in gleicher Studie angenommen, dass jene immunmodulierenden Effekte von XN mit einer nachgewiesenen dosisabhängigen Hemmung der Bindung von LPS an CD14 durch XN assoziiert werden können [20]. Wiederum andere Studien zeigten, dass XN die Expression der LPS-Rezeptorkomponente MD2 und in Folge die Aktivierung des TLR4-Signalwegs in LPS-aktivierten RAW264.7 Zellen reduzieren, und somit auch die LPS-induzierte Ausschüttung des Zytokins TNF- α unterdrücken kann [21] [77].

Die LPS-induzierte TNF- α Freisetzung im Zellkulturüberstand von sowohl unbehandelten als auch mit XN behandelten J774A.1 Zellen war nach 6-stündiger LPS-Stimulation, also in der Akut Phase, deutlich stärker als nach LPS-Stimulation für 18 h. Die Ergebnisse der Messung von NO_x hingegen zeigten erst nach 18-stündiger LPS-Stimulation bei unbehandelten sowie mit XN vorbehandelten Zellen eine deutliche

Erhöhung der Nitrit-Konzentration der LPS-stimulierten im Vergleich zu den unstimulierten Proben. Dabei konnte nach 2-stündiger Vorbehandlung mit XN aus einem XN-reichen Extrakt eine dosisabhängige Reduktion der NO_x-Konzentration im Zellkulturüberstand gemessen werden, wobei jedoch nie das Signifikanzniveau erreicht wurde.

Insgesamt deuten die Ergebnisse darauf hin, dass bereits niedrige Dosen von Xanthohumol aus einem XN-reichen Extrakt immunmodulierende Effekte auf LPS- bzw. LTA-stimulierte Immunzellen haben. Zukünftige Studien sind notwendig, um die zugrundeliegenden Mechanismen der Effekte zu untersuchen sowie weitere vergleichbare Ergebnisse mit größerem Stichprobenumfang bzgl. der XN-Wirkung im Zeitverlauf als auch bei verschiedenen Dosen zu erhalten.

6. Zusammenfassung

Xanthohumol ist ein bislang ausschließlich im Hopfen nachgewiesenes prenyliertes Chalkon, welches in Studien u. a. antiinflammatorische sowie antibakterielle Wirkungen zeigte.

Ziel der vorliegenden Masterarbeit war es, zu untersuchen, ob die orale Aufnahme von verschiedenen Xanthohumol-Dosen aus einem Xanthohumol-reichen Extrakt immunmodulierende Wirkung auf die LPS- bzw. LTA-stimulierte Freisetzung verschiedener Zytokine sowie CD14 im Zellkulturüberstand von isolierten Immunzellen *ex vivo* zeigen, ob unterschiedliche Dosen von Xanthohumol unterschiedlich starke protektive Effekte induzieren und inwiefern sich die Immunantwort im Zeitverlauf ändert. Die Ergebnisse eines Probanden der durchgeführten Pilotstudie weisen darauf hin, dass die verschiedenen Xanthohumol-Dosen sowohl die LPS-als auch LTA-stimulierte Freisetzung von IL-6, TNF- α und CD14 im Zellkulturmedium von Monozyten im Vergleich zum Placebo im Zeitverlauf hemmen konnten. Im Gegensatz dazu wurde die LPS-induzierte Freisetzung von IL-1 β durch die orale Aufnahme von Xanthohumol verstärkt.

Außerdem konnte Xanthohumol ebenfalls nach 6-stündiger LPS-Stimulation von J774A.1 Zellen die LPS-induzierte Freisetzung von TNF- α hemmen, nach 18-stündiger LPS-Stimulation war jedoch kein Effekt mehr nachweisbar. Nach 18-stündiger LPS-Stimulation konnte Xanthohumol die LPS-induzierte NO_x Freisetzung hemmen, während nach 6 h keine Effekte nachweisbar waren.

Weiterhin weisen die Ergebnisse eines Experiments in einem Caco-2 Ko-kulturmodell *in vitro* darauf hin, dass Xanthohumol die intestinale Barriere passiert und von Darm- und Immunzellen gebunden und/ oder aufgenommen wird.

Summary

Xanthohumol is a prenylated chalcone that occurs only in the hop plant. It is considered a bioactive agent with, among others, antiinflammatory and antibacterial effects.

The aim of the present paper was to determine if the oral uptake of different doses of Xanthohumol from a Xanthohumol-rich extract could have immune-modulating effects of the LPS- or LTA-induced release of different cytokines and CD14 in the supernatant of isolated monocytes *ex vivo*, if different doses of Xanthohumol differentiate regarding their protective effects, and if the immune response changes over time. The results of one participant indicate that different doses of Xanthohumol could inhibit the LPS- and LTA-stimulated release of IL-6, TNF- α and CD14 in contrast to placebo over time. In contrast, the release of LPS-induced release of IL-1 β was enhanced due to Xanthohumol.

Furthermore, Xanthohumol diminished the TNF- α release after LPS stimulation for 6 h whereas after stimulation for 18 h no effects were detectable anymore. Xanthohumol could also inhibit the LPS-induced release NOx release after 18 h. After 6 h no effects on the concentration of NOx could be detected.

Moreover, it could be shown in a Caco-2 Co-culture experiment that Xanthohumol passes the intestinal barrier and is binded and/or taken up by intestinal and immune cells.

Literaturverzeichnis

- [1] Bradley, R., Langley, B.O., Ryan, J.J. et al. Xanthohumol microbiome and signature in healthy adults (the XMaS trial): a phase I triple-masked, placebo-controlled clinical trial. *Trials* 21, 835 (2020). <https://doi.org/10.1186/s13063-020-04769-2>.
- [2] Šrédl, K.; Prášilová, M.; Svoboda, R.; Severová, L. Hop production in the Czech Republic and its international aspects. *Heliyon* 2020, 6, e04371..
- [3] Jiang CH, Sun TL, Xiang DX, Wei SS, Li WQ. Anticancer Activity and Mechanism of Xanthohumol: A Prenylated Flavonoid From Hops (*Humulus lupulus* L.). *Front Pharmacol.* 2018 May 22;9:530. doi: 10.3389/fphar.2018.00530. PMID: 29872398; PMCID: PMC5972274.
- [4] Harish V, Haque E, Śmiech M, Taniguchi H, Jamieson S, Tewari D, Bishayee A. Xanthohumol for Human Malignancies: Chemistry, Pharmacokinetics and Molecular Targets. *International Journal of Molecular Sciences.* 2021; 22(9):4478. <https://doi.org/10.3390/ijms22094478>
- [5] Liu M, Hansen PE, Wang G, Qiu L, Dong J, Yin H, Qian Z, Yang M, Miao J. Pharmacological profile of xanthohumol, a prenylated flavonoid from hops (*Humulus lupulus*). *Molecules.* 2015 Jan 7;20(1):754–79. doi: 10.3390/molecules20010754. PMID: 25574819; PMCID: PMC6272297.
- [6] Magalhães PJ, Carvalho DO, Cruz JM, Guido LF, Barros AA. Fundamentals and health benefits of xanthohumol, a natural product derived from hops and beer. *Nat Prod Commun.* 2009 May;4(5):591–610. PMID: 19445313
- [7] Wunderlich, S.; Zürcher, A.; Back, W. Enrichment of xanthohumol in the brewing process. *Mol. Nutr. Food Res.* 2005, 49, 874–881.
- [8] Karabín, M.; Jelínek, L.; Kinčl, T.; Hudcová, T.; Kotlíková, B.; Dostálek, P. New approach to the production of xanthohumol-enriched beers. *J. Inst. Brew.* 2013, 119, 98–102.
- [9] Legette L, Karnpracha C, Reed RL, Choi J, Bobe G, Christensen JM, Rodriguez-Proteau R, Purnell JQ, Stevens JF. Human pharmacokinetics of xanthohumol, an antihyperglycemic flavonoid from hops. *Mol Nutr Food Res.* 2014 Feb;58(2):248–55. doi: 10.1002/mnfr.201300333. Epub 2013 Aug 27. PMID: 24038952; PMCID: PMC4371792.
- [10] Avula B, Ganzera M, Warnick JE, Feltenstein MW, Sufka KJ, Khan IA. High-performance liquid chromatographic determination of xanthohumol in rat plasma, urine, and fecal samples. *J Chromatogr Sci.* 2004 Aug;42(7):378–82. doi: 10.1093/chromsci/42.7.378. PMID: 15355578.
- [11] Nookandeh A, Frank N, Steiner F, Ellinger R, Schneider B, Gerhäuser C, Becker H. Xanthohumol metabolites in faeces of rats. *Phytochemistry.* 2004 Mar;65(5):561–70. doi: 10.1016/j.phytochem.2003.11.016. PMID: 15003419
- [12] Venturelli, S., Burkard, M., Biendl, M., Lauer, U. M., Frank, J., and Busch, C. (2016). Prenylated chalcones and flavonoids for the prevention and treatment of cancer. *Nutrition* 32, 1171–1178. doi: 10.1016/j.nut.2016.03.020
- [13] Dorn, C., Weiss, T. S., Heilmann, J., and Hellerbrand, C. (2010). Xanthohumol, a prenylated chalcone derived from hops, inhibits proliferation, migration and interleukin-8 expression of hepatocellular carcinoma cells. *Int. J. Oncol.* 36, 435–441. doi: 10.1055/s-0029-1246396
- [14] Yong, W. K., Ho, Y. F., and Malek, S. N. (2015). Xanthohumol induces apoptosis and S phase cell cycle arrest in A549 non-small cell lung cancer cells. *Pharmacogn. Mag.* 11, S275–S283. doi: 10.4103/0973-1296.166069
- [15] Sławińska-Brych A, Król SK, Dmoszyńska-Graniczka M, Zdzisińska B, Stepulak A, Gagoś M. Xanthohumol inhibits cell cycle progression and proliferation of larynx cancer cells in vitro. *Chem Biol Interact.* 2015 Oct 5;240:110–8. doi: 10.1016/j.cbi.2015.08.008. Epub 2015 Aug 20. PMID: 26297991.
- [16] Vanhoecke, B. W., Delporte, F., Van Braeckel, E., Heyerick, A., Depypere, H. T., Nuytinck, M., et al. (2005). A safety study of oral tangeretin and xanthohumol administration to laboratory mice. *In Vivo* 19, 103–107.
- [17] Hussong, R., Frank, N., Knauff, J., Ittrich, C., Owen, R., Becker, H., et al. (2005). A safety study of oral xanthohumol administration and its influence on fertility in Sprague Dawley rats. *Mol. Nutr. Food Res.* 49, 861–867. doi: 10.1002/mnfr.200500089

- [18] Lee IS, Lim J, Gal J, Kang JC, Kim HJ, Kang BY, Choi HJ. Anti-inflammatory activity of xanthohumol involves heme oxygenase-1 induction via NRF2-ARE signaling in microglial BV2 cells. *Neurochem Int.* 2011 Feb;58(2):153-60. doi: 10.1016/j.neuint.2010.11.008. Epub 2010 Nov 18. PMID: 21093515.
- [19] Torrens-Mas M, Alorda-Clara M, Martínez-Vigara M, Roca P, Sastre-Serra J, Oliver J, Pons DG. Xanthohumol reduces inflammation and cell metabolism in HT29 primary colon cancer cells. *Int J Food Sci Nutr.* 2022 Jun;73(4):471-479. doi: 10.1080/09637486.2021.2012561. Epub 2021 Dec 8. PMID: 34879764.
- [20] Jung F, Staltner R, Baumann A, Burger K, Halilbasic E, Hellerbrand C, Bergheim I. 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.* 2022 Oct 21;23(20):12702. doi: 10.3390/ijms232012702. PMID: 36293555; PMCID: PMC9603845.
- [21] Cho YC, Kim HJ, Kim YJ, Lee KY, Choi HJ, Lee IS, Kang BY. Differential anti-inflammatory pathway by xanthohumol in IFN-gamma and LPS-activated macrophages. *Int Immunopharmacol.* 2008 Apr;8(4):567-73. doi: 10.1016/j.intimp.2007.12.017. Epub 2008 Jan 24. PMID: 18328448.
- [22] Ciesielska, A.; Matyjek, M.; Kwiatkowska, K. TLR4 and CD14 trafficking and its influence on LPS-induced pro-inflammatory signaling. *Cell Mol. Life Sci.* 2021, 78, 1233–1261.
- [23] Peluso MR, Miranda CL, Hobbs DJ, Proteau RR, Stevens JF. Xanthohumol and related prenylated flavonoids inhibit inflammatory cytokine production in LPS-activated THP-1 monocytes: structure-activity relationships and in silico binding to myeloid differentiation protein-2 (MD-2). *Planta Med.* 2010 Oct;76(14):1536-43. doi: 10.1055/s-0029-1241013. Epub 2010 Mar 22. PMID: 20309792.
- [24] Jung F, Staltner R, Tahir A, Baumann A, Burger K, Halilbasic E, Hellerbrand C, Bergheim I. Oral intake of xanthohumol attenuates lipoteichoic acid-induced inflammatory response in human PBMCs. *Eur J Nutr.* 2022 Dec;61(8):4155-4166. doi: 10.1007/s00394-022-02964-2. Epub 2022 Jul 20. PMID: 35857130; PMCID: PMC9596557.
- [25] Cermak P, Olsovska J, Mikyska A, Dusek M, Kadleckova Z, Vanicek J, Nyc O, Sigler K, Bostikova V, Bostik P. Strong antimicrobial activity of xanthohumol and other derivatives from hops (*Humulus lupulus* L.) on gut anaerobic bacteria. *APMIS.* 2017 Nov;125(11):1033-1038. doi: 10.1111/apm.12747. Epub 2017 Sep 28. PMID: 28960474.
- [26] Sleha R, Radochova V, Mikyska A, Houska M, Bolehovska R, Janovska S, Pejchal J, Muckova L, Cermak P, Bostik P. Strong Antimicrobial Effects of Xanthohumol and Beta-Acids from Hops against *Clostridioides difficile* Infection In Vivo. *Antibiotics (Basel).* 2021 Apr 6;10(4):392. doi: 10.3390/antibiotics10040392. PMID: 33917416; PMCID: PMC8067520.
- [27] Bartmańska A, Wałęcka-Zacharska E, Tronina T, Popłoński J, Sordon S, Brzezowska E, Bania J, Huszcza E. Antimicrobial Properties of Spent Hops Extracts, Flavonoids Isolated Therefrom, and Their Derivatives. *Molecules.* 2018 Aug 17;23(8):2059. doi: 10.3390/molecules23082059. PMID: 30126093; PMCID: PMC6222488.
- [28] Bogdanova K, Kolar M, Langova K, Dusek M, Mikyska A, Bostikova V, Bostik P, Olsovska J. Inhibitory effect of hop fractions against Gram-positive multi-resistant bacteria. A pilot study. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.* 2018 May 23. doi: 10.5507/bp.2018.026. Epub ahead of print. PMID: 29790489.
- [29] Vesaghhamedani S, Ebrahimzadeh F, Najafi E, Shabgah OG, Askari E, Shabgah AG, Mohammadi H, Jadidi-Niaragh F, Navashenaq JG. Xanthohumol: An underestimated, while potent and promising chemotherapeutic agent in cancer treatment. *Prog Biophys Mol Biol.* 2022 Aug;172:3-14. doi: 10.1016/j.pbiomolbio.2022.04.002. Epub 2022 Apr 8. PMID: 35405185.
- [30] Chaplin DD. Overview of the immune response. *J Allergy Clin Immunol.* 2010 Feb;125(2 Suppl 2):S3-23. doi: 10.1016/j.jaci.2009.12.980. PMID: 20176265; PMCID: PMC2923430.
- [31] McComb S, Thiriot A, Akache B, Krishnan L, Stark F. Introduction to the Immune System. *Methods Mol Biol.* 2019;2024:1-24. doi: 10.1007/978-1-4939-9597-4_1. PMID: 31364040.
- [32] Medina KL. Overview of the immune system. *Handb Clin Neurol.* 2016;133:61-76. doi: 10.1016/B978-0-444-63432-0.00004-9. PMID: 27112671.

- [33] Rahmoune H, Guest PC. Studies of Isolated Peripheral Blood Cells as a Model of Immune Dysfunction. *Methods Mol Biol.* 2018;1735:221-229. doi: 10.1007/978-1-4939-7614-0_12. PMID: 29380315.
- [34] Doron S, Gorbach SL. Bacterial Infections: Overview. *International Encyclopedia of Public Health.* 2008:273–82. doi: 10.1016/B978-012373960-5.00596-7. Epub 2008 Aug 26. PMCID: PMC7149789.
- [35] Piano S, Singh V, Caraceni P, Maiwall R, Alessandria C, Fernandez J, Soares EC, Kim DJ, Kim SE, Marino M, Vorobioff J, Barea RCR, Merli M, Elkrief L, Vargas V, Krag A, Singh SP, Lesmana LA, Toledo C, Marciano S, Verhelst X, Wong F, Intagliata N, Rabinowich L, Colombato L, Kim SG, Gerbes A, Durand F, Roblero JP, Bhamidimarri KR, Boyer TD, Maevskaya M, Fassio E, Kim HS, Hwang JS, Gines P, Gadano A, Sarin SK, Angeli P; International Club of Ascites Global Study Group. Epidemiology and Effects of Bacterial Infections in Patients With Cirrhosis Worldwide. *Gastroenterology.* 2019 Apr;156(5):1368-1380.e10. doi: 10.1053/j.gastro.2018.12.005. Epub 2018 Dec 13. PMID: 30552895.
- [36] Hills RD Jr, Pontefract BA, Mishcon HR, Black CA, Sutton SC, Theberge CR. Gut Microbiome: Profound Implications for Diet and Disease. *Nutrients.* 2019 Jul 16;11(7):1613. doi: 10.3390/nu11071613. PMID: 31315227; PMCID: PMC6682904.
- [37] Mancuso G, Midiri A, Gerace E, Biondo C. Bacterial Antibiotic Resistance: The Most Critical Pathogens. *Pathogens.* 2021 Oct 12;10(10):1310. doi: 10.3390/pathogens10101310. PMID: 34684258; PMCID: PMC8541462.
- [38] Monegro AF, Muppidi V, Regunath H. Hospital Acquired Infections. 2022 Aug 22. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022 Jan–. PMID: 28722887.
- [39] De Oliveira DMP, Forde BM, Kidd TJ, Harris PNA, Schembri MA, Beatson SA, Paterson DL, Walker MJ. Antimicrobial Resistance in ESKAPE Pathogens. *Clin Microbiol Rev.* 2020 May 13;33(3):e00181-19. doi: 10.1128/CMR.00181-19. PMID: 32404435; PMCID: PMC7227449.
- [40] Suetens C, Latour K, Kärki T, Ricchizzi E, Kinross P, Moro ML, Jans B, Hopkins S, Hansen S, Lyytikäinen O, Reilly J, Deptula A, Zingg W, Plachouras D, Monnet DL; Healthcare-Associated Infections Prevalence Study Group. Prevalence of healthcare-associated infections, estimated incidence and composite antimicrobial resistance index in acute care hospitals and long-term care facilities: results from two European point prevalence surveys, 2016 to 2017. *Euro Surveill.* 2018 Nov;23(46):1800516. doi: 10.2807/1560-7917.ES.2018.23.46.1800516. Erratum in: *Euro Surveill.* 2018 Nov;23(47): PMID: 30458912; PMCID: PMC6247459.
- [41] Sikora A, Zahra F. Nosocomial Infections. 2022 Sep 23. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022 Jan–. PMID: 32644738.
- [42] Erdem H, Hargreaves S, Ankarali H, Caskurlu H, Ceviker SA, Bahar-Kacmaz A, Meric-Koc M, Altindis M, Yildiz-Kirazaldi Y, Kizilates F, Alsalman J, Cag Y, Kamal AHM, Dokmetas I, Dindar-Demiray EK, Shehata GA, Hasman H, Sadykova A, Llopis F, Ramosaco E, Logar M, Alay H, Kesmez-Can F, Ruch Y, Bulut D, Makek MJ, Marino A, Mahboob A, El-Kholy A, Abdallah D, Sefa-Sayar M, Karaali R, Aslan S, Dar RE, Abdalla E, Monzón-Camps H, Baljić R, Mgdalena DI, Naghili B, Abbas Dafalla ME, Alwashmi ASS, Carmen CR, Ramirez-Estrada S, Wojewodzka-Zeleznikowicz M, Akyildiz O, Zajkowska J, El-Sokkary R, Pandya N, Amer F, Alavi-Darazam I, Grgić S, Wegdan AA, El-Kholy J, Bulut-Avsar C, Kulzhanova S, Tasbakan M, Kumari HP, Dirani N, Koganti K, Konkayev AK, Petrov MM, Cascio A, Liskova A, Del Vecchio RF, Lambertenghi L, Mladenov N, Oncu S, Rello J. Managing adult patients with infectious diseases in emergency departments: international ID-IRI study. *J Chemother.* 2021 Sep;33(5):302-318. doi: 10.1080/1120009X.2020.1863696. Epub 2021 Mar 18. PMID: 33734040.
- [43] Bundesministerium für Gesundheit (BMG): Infektionskrankheiten (2021) www.bundesgesundheitsministerium.de/themen/praevention/gesundheitsgefahren/infektionskrankheiten.html (letzter Abruf am 12.10.2022)
- [44] Robert Koch Institut. Infektionsepidemiologisches Jahrbuch meldepflichtiger Krankheiten für 2020. Robert Koch-Institut, Berlin, 2021

- [45] Silhavy TJ, Kahne D, Walker S. The bacterial cell envelope. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2010 May;2(5):a000414. doi: 10.1101/cshperspect.a000414. Epub 2010 Apr 14. PMID: 20452953; PMCID: PMC2857177.
- [46] Weidenmaier C, Peschel A. Teichoic acids and related cell-wall glycopolymers in Gram-positive physiology and host interactions. *Nat Rev Microbiol.* 2008 Apr;6(4):276-87. doi: 10.1038/nrmicro1861. Epub 2008 Mar 10. PMID: 18327271.
- [47] Wu X, Han J, Gong G, Koffas MAG, Zha J. Wall teichoic acids: physiology and applications. *FEMS Microbiol Rev.* 2021 Aug 17;45(4):fuaa064. doi: 10.1093/femsre/fuaa064. PMID: 33270820.“.
- [48] „Rajagopal M, Walker S. Envelope Structures of Gram-Positive Bacteria. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2017;404:1-44. doi: 10.1007/82_2015_5021. PMID: 26919863; PMCID: PMC5002265.“.
- [49] „Pasquina LW, Santa Maria JP, Walker S. Teichoic acid biosynthesis as an antibiotic target. *Curr Opin Microbiol.* 2013 Oct;16(5):531-7. doi: 10.1016/j.mib.2013.06.014. Epub 2013 Jul 31. PMID: 23916223; PMCID: PMC3834221.
- [50] Bischoff, A. Gramnegative Keime werden immer bedrohlicher. *MMW - Fortschritte der Medizin* 160, 18 (2018). <https://doi.org/10.1007/s15006-018-0356-9>
- [51] „Galdiero S, Falanga A, Cantisani M, Tarallo R, Della Pepa ME, D’Oriano V, Galdiero M. Microbe-host interactions: structure and role of Gram-negative bacterial porins. *Curr Protein Pept Sci.* 2012 Dec;13(8):843-54. doi: 10.2174/138920312804871120. Erratum in: 10.2174/138920371808170602182934. PMID: 23305369; PMCID: PMC3706956.
- [52] Kawahara K. Variation, Modification and Engineering of Lipid A in Endotoxin of Gram-Negative Bacteria. *Int J Mol Sci.* 2021 Feb 25;22(5):2281. doi: 10.3390/ijms22052281. PMID: 33668925; PMCID: PMC7956469.
- [53] Li H, Li L, Chi Y, Tian Q, Zhou T, Han C, Zhu Y, Zhou Y. Development of a standardized Gram stain procedure for bacteria and inflammatory cells using an automated staining instrument. *Microbiologyopen.* 2020 Sep;9(9):e1099. doi: 10.1002/mbo3.1099. Epub 2020 Jun 27. PMID: 32592452; PMCID: PMC7520987.
- [54] Hof H, Dörries R: *Medizinische Mikrobiologie*. 3. Auflage, S. 273, 2004, Georg Thieme Verlag, ISBN 3-13-125313-4.
- [55] Long EM, Millen B, Kubes P, Robbins SM. Lipoteichoic acid induces unique inflammatory responses when compared to other toll-like receptor 2 ligands. *PLoS One.* 2009;4(5):e5601. doi: 10.1371/journal.pone.0005601. Epub 2009 May 19. PMID: 19440307; PMCID: PMC2680621.“.
- [56] „Groß, P. (2012). *Modulation der Immunantwort in der mikrobiellen Sepsis durch lösliche Toll-like Rezeptoren*. Universität Regensburg
- [57] Konnerth, A. (2012). *Vorkommen und Funktion des toll-like Rezeptor 2 in follikulostellaren Hypophysenzellen*. Universität München
- [58] Lu YC, Yeh WC, Ohashi PS. LPS/TLR4 signal transduction pathway. *Cytokine.* 2008 May;42(2):145-151. doi: 10.1016/j.cyto.2008.01.006. Epub 2008 Mar 4. PMID: 18304834.
- [59] Lea T. Caco-2 Cell Line. In: Verhoeckx K, Cotter P, López-Expósito I, Kleiveland C, Lea T, Mackie A, Requena T, Swiatecka D, Wichers H, editors. *The Impact of Food Bioactives on Health: in vitro and ex vivo models* [Internet]. Cham (CH): Springer; 2015. Chapter 10. PMID: 29787057.“.
- [60] „Koh CM. Preparation of cells for microscopy using cytospin. *Methods Enzymol.* 2013;533:235-40. doi: 10.1016/B978-0-12-420067-8.00016-7. PMID: 24182928.
- [61] Jež M, Bas T, Veber M, Košir A, Dominko T, Page R, Rožman P. The hazards of DAPI photoconversion: effects of dye, mounting media and fixative, and how to minimize the problem. *Histochem Cell Biol.* 2013 Jan;139(1):195-204. doi: 10.1007/s00418-012-1039-8. Epub 2012 Oct 14. PMID: 23064788.
- [62] Elliott AD. Confocal Microscopy: Principles and Modern Practices. *Curr Protoc Cytom.* 2020 Mar;92(1):e68. doi: 10.1002/cpcy.68. PMID: 31876974; PMCID: PMC6961134.
- [63] Lam J, Herant M, Dembo M, Heinrich V. Baseline mechanical characterization of J774 macrophages. *Biophys J.* 2009 Jan;96(1):248-54. doi: 10.1529/biophysj.108.139154. PMID: 18835898; PMCID: PMC2710052.

- [64] Ghimire K, Altmann HM, Straub AC, Isenberg JS. Nitric oxide: what's new to NO? *Am J Physiol Cell Physiol*. 2017 Mar 1;312(3):C254-C262. doi: 10.1152/ajpcell.00315.2016. Epub 2016 Dec 14. PMID: 27974299; PMCID: PMC5401944
- [65] Ivanov VM. The 125th Anniversary of the Griess Reagent. *J Anal Chem*. 2004;59(10):1002–5.
- [66] Frieri M, Kumar K, Boutin A. Antibiotic resistance. *J Infect Public Health*. 2017 Jul-Aug;10(4):369-378. doi: 10.1016/j.jiph.2016.08.007. Epub 2016 Sep 6. PMID: 27616769.
- [67] Gao X, Deeb D, Liu Y, Gautam S, Dulchavsky SA, Gautam SC. Immunomodulatory activity of xanthohumol: inhibition of T cell proliferation, cell-mediated cytotoxicity and Th1 cytokine production through suppression of NF-kappaB. *Immunopharmacol Immunotoxicol*. 2009;31(3):477-84. doi: 10.1080/08923970902798132. PMID: 19555200; PMCID: PMC2759314.
- [68] Handley G, Hand J. Adverse Effects of Immunosuppression: Infections. *Handb Exp Pharmacol*. 2022;272:287-314. doi: 10.1007/164_2021_550. PMID: 34671868.
- [69] Bouchard-Boivin F, Désy O, Béland S, Houde I, De Serres SA. TNF- α Production by Monocytes Stimulated With Epstein-Barr Virus-Peptides as a Marker of Immunosuppression-Related Adverse Events in Kidney Transplant Recipients. *Kidney Int Rep*. 2019 Jul 19;4(10):1446-1453. doi: 10.1016/j.ekir.2019.07.007. PMID: 31701054; PMCID: PMC6829185.
- [70] Zanon I, Ostuni R, Marek LR, Barresi S, Barbalat R, Barton GM, Granucci F, Kagan JC. CD14 controls the LPS-induced endocytosis of Toll-like receptor 4. *Cell*. 2011 Nov 11;147(4):868-80. doi: 10.1016/j.cell.2011.09.051. PMID: 22078883; PMCID: PMC3217211.
- [71] Da Silva Correia, J.; Soldau, K.; Christen, U.; Tobias, P.S.; Ulevitch, R.J. Lipopolysaccharide is in close proximity to each of the proteins in its membrane receptor complex. transfer from CD14 to TLR4 and MD-2. *J. Biol. Chem*. 2001, 276, 21129–21135.
- [72] Stevens JF, Taylor AW, Clawson JE, Deinzer ML (1999) Fate of xanthohumol and related prenylflavonoids from hops to beer. *J Agric Food Chem*47: 2421–2428.
- [73] Wolff H, Motyl M, Hellerbrand C, Heilmann J, Kraus B. Xanthohumol uptake and intracellular kinetics in hepatocytes, hepatic stellate cells, and intestinal cells. *J Agric Food Chem*. 2011 Dec 28;59(24):12893-901. doi: 10.1021/jf203689z. Epub 2011 Nov 29. PMID: 22088086.
- [74] Pang Y, Nikolic D, Zhu D, Chadwick LR, Pauli GF, Farnsworth NR, van Breemen RB. Binding of the hop (*Humulus lupulus* L.) chalcone xanthohumol to cytosolic proteins in Caco-2 intestinal epithelial cells. *Mol Nutr Food Res*. 2007 Jul;51(7):872-9. doi: 10.1002/mnfr.200600252. PMID: 17579893.
- [75] Arczewska M, Kamiński DM, Górecka E, Pocięcha D, Rój E, Sławińska-Brych A, Gagoś M. The molecular organization of prenylated flavonoid xanthohumol in DPPC multibilayers: X-ray diffraction and FTIR spectroscopic studies. *Biochim Biophys Acta*. 2013 Feb;1828(2):213-22. doi: 10.1016/j.bbamem.2012.10.009. Epub 2012 Oct 17. PMID: 23085000.
- [76] Lupinacci E, Meijerink J, Vincken JP, Gabriele B, Gruppen H, Witkamp RF. 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*. 2009 Aug 26;57(16):7274-81. doi: 10.1021/jf901244k. PMID: 19634869.
- [77] Chen G, Xiao B, Chen L, et al. Discovery of new MD2-targeted anti-inflammatory compounds for the treatment of sepsis and acute lung injury. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2017 Oct;139:726-740. DOI: 10.1016/j.ejmech.2017.08.036. PMID: 28858767.