



UNIVERSITÄT ZU LÜBECK

Aus der Klinik für Dermatologie, Allergologie und Venerologie  
der Universität zu Lübeck  
Direktorin: Prof. Dr. med. Evelyn Gaffal

---

**Metabolische Effekte der immunmodulatorischen  
Substanzen Dapson und Dimethyl-/Monomethylfumarat  
auf Immunantworten der Makrophagen-Zelllinie  
RAW 264.7**

Inauguraldissertation

zur Erlangung der Doktorwürde  
der Universität zu Lübeck  
- **Aus der Sektion Medizin** -

Vorgelegt von  
**Lea Carolin Knebel**  
aus Bad Berleburg

Lübeck 2025

1. Berichterstatter\*in: Prof. Dr. med. Christian D. Sadik  
Ko-Betreuer\*in: Prof. Dr. med. Karl-Friedrich Klotz  
2. Berichterstatter\*in: Prof. Dr. med. Siegfried Görg

Tag der mündlichen Prüfung: 06.06.2025

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 11.06.2025

- Promotionskommission der Sektion Medizin -

## Inhaltsverzeichnis

I.	Abkürzungsverzeichnis.....	V
II.	Abbildungsverzeichnis.....	VIII
III.	Tabellenverzeichnis.....	X
<b>1</b>	<b>EINLEITUNG.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1</b>	<b>Immunmetabolismus .....</b>	<b>1</b>
1.1.1	Hintergrund .....	1
<b>1.2</b>	<b>Makrophagen .....</b>	<b>2</b>
1.2.1	M1-Makrophagen.....	3
1.2.2	M2-Makrophagen.....	4
1.2.3	Veränderungen des Zellmetabolismus während der Polarisierung .....	5
<b>1.3</b>	<b>Testsubstanzen .....</b>	<b>9</b>
1.3.1	Dapson.....	9
1.3.2	Dimethylfumarat/Monomethylfumarat .....	10
<b>1.4</b>	<b>Zielsetzung .....</b>	<b>12</b>
<b>2</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN.....</b>	<b>13</b>
<b>2.1</b>	<b>Materialien.....</b>	<b>13</b>
<b>2.2</b>	<b>Methoden.....</b>	<b>17</b>
2.2.1	Makrophagen-Zellkultur.....	17
2.2.2	LDH-Zytotoxizitäts-Assay .....	19
2.2.3	Nachweis von Stickstoffmonoxid mithilfe der Griess-Reaktion .....	21
2.2.4	Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA).....	22
2.2.5	Metabolische Flussanalysen .....	22
2.2.6	Quantitative Reverse Transkriptase (RT) PCR.....	25
<b>2.3</b>	<b>Statistik.....</b>	<b>27</b>
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE.....</b>	<b>28</b>

<b>3.1</b>	<b>Zytotoxizität der Testsubstanzen</b> .....	<b>28</b>
<b>3.2</b>	<b>Einfluss der Testsubstanzen auf immunologische Phänotypen der RAW 264.7 Makrophagen</b> .....	<b>29</b>
3.2.1	Stickstoffmonoxid-Freisetzung .....	29
3.2.2	TNF- $\alpha$ Ausschüttung.....	30
<b>3.3</b>	<b>Beeinflussung der Immunantwort durch metabolische Modulatoren</b> ..	<b>32</b>
<b>3.4</b>	<b>Einfluss der Testsubstanzen auf den Makrophagen Metabolismus</b> ....	<b>33</b>
3.4.1	Metabolische Aktivität von RAW 264.7 Makrophagen als Antwort auf LPS + IFN- $\gamma$ Stimulation .....	33
3.4.2	Beeinflussung der glykolytischen Aktivität durch Dapson, DMF und MMF .....	36
<b>3.5</b>	<b>Regulation der mRNA-Expression</b> .....	<b>41</b>
<b>4</b>	<b>DISKUSSION</b> .....	<b>43</b>
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b> .....	<b>57</b>
<b>6</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b> .....	<b>58</b>
<b>7</b>	<b>DANKSAGUNGEN</b> .....	<b>67</b>

## I. Abkürzungsverzeichnis

### 2

2DG.....2-Deoxy-D-Glukose

### A

ATP.....Adenosintriphosphat

ACOD1.....Aconitate Decarboxylase 1

### B

BMDM.....Bone marrow-derived macrophages

### C

CARKL.....Carbohydrate kinase-like Protein

### D

DMF.....Dimethylfumarat

### E

ECAR.....Extracellular Acidification Rate

ELISA.....Enzyme-linked Immunosorbent Assay

### F

FAD.....Flavinadenindinukleotid

### G

GAPDH.....Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase

### H

HIF-1 $\alpha$ .....Hypoxie-induzierbarer Faktor 1 alpha

HPRT.....Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase

### I

IDH.....Isocitrat-Dehydrogenase

IFN- $\gamma$ .....Interferon- $\gamma$   
IL.....Interleukin  
iNOS.....induzierbare Stickstoffmonoxidsynthase  
Irg-1.....Immune responsive gene 1

## **L**

LDH.....Laktatdehydrogenase  
LPS.....Lipopolysaccharid

## **M**

MMF.....Monomethylfumarat  
mTOR.....Mammalian target of rapamycin  
MS.....Multiple Sklerose

## **N**

NAD.....Nikotinamidadenindiukleotid  
NF- $\kappa$ B.....Nuclear factor- $\kappa$ B  
NO.....Stickstoffmonoxid  
Nrf2.....Nuclear factor erythroid 2-related factor 2

## **O**

OCR.....Oxygen Consumption Rate  
Oxphos.....oxidative Phosphorylierung

## **P**

PAMP.....Pathogen-associated Molecular Pattern  
PCR.....Polymerase-Kettenreaktion  
PKM2.....Pyruvatkinase 2  
PPP.....Pentose-Phosphat-Weg  
PRR.....Pattern Recognition Receptor

## **R**

ROS.....Reaktive Sauerstoffspezies

**T**

TCA-Zyklus.....Tricarbonsäure-Zyklus  
TGF- $\beta$ .....Transforming Growth Factor- $\beta$   
TLR.....Toll-like Rezeptor  
TNF.....Tumornekrosefaktor

## II. Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1</b> Metabolismus der M1 und M2-Makrophagen.....	<b>5</b>
<b>Abbildung 2</b> Schematische Darstellung des LDH-Zytotoxizitäts-Versuchs.....	<b>20</b>
<b>Abbildung 3</b> Griess-Reaktion zum Nachweis von Nitrit.....	<b>21</b>
<b>Abbildung 4</b> Grafiken des Mito-Stress Tests und des glykolytischen Stresstests .....	<b>24</b>
<b>Abbildung 5</b> Zytotoxizität verschiedener Konzentrationen der Testsubstanzen Dapson, DMF und MMF.....	<b>28</b>
<b>Abbildung 6</b> Signifikante Inhibition der NO-Freisetzung in stimulierten RAW 264.7 Makrophagen nach Behandlung mit 500 $\mu$ M Dapson, 100 $\mu$ M DMF und 500 $\mu$ M MMF. Inhibitorischer Effekt von DMF und MMF .....	<b>30</b>
<b>Abbildung 7</b> Einfluss von Dapson (A), DMF und MMF (B) auf die TNF- $\alpha$ Ausschüttung in LPS + IFN- $\gamma$ stimulierten RAW 264.7 Makrophagen .....	<b>31</b>
<b>Abbildung 8</b> Beeinflussung der NO-Freisetzung in LPS + IFN- $\gamma$ stimulierten Makrophagen durch metabolische Modulatoren.....	<b>33</b>
<b>Abbildung 9</b> Einfluss von LPS + IFN- $\gamma$ auf die metabolische Aktivität der RAW 264.7 Makrophagen .....	<b>35</b>
<b>Abbildung 10</b> Morphologie der RAW 264.7 Makrophagen vor und nach Stimulation mit LPS + IFN- $\gamma$ .....	<b>36</b>
<b>Abbildung 11</b> Einfluss von Dapson auf die glykolytische Aktivität von RAW 264.7 Makrophagen .....	<b>38</b>
<b>Abbildung 12</b> Einfluss von Dapson auf die mitochondriale Aktivität von RAW 264.7 Makrophagen .....	<b>39</b>
<b>Abbildung 13</b> Einfluss von DMF und MMF auf die metabolische Aktivität von RAW 264.7 Makrophagen.....	<b>40</b>

**Abbildung 14** Einfluss der Testsubstanzen auf die mRNA-Expression von *Gapdh*,  
*Pkm2*, *Nos2* und *Hif1a* im Vergleich zur stimulierten  
Kontrolle.....**42**

### **III. Tabellenverzeichnis**

Tabelle 1: Chemikalien und Reagenzien .....	<b>13</b>
Tabelle 2: Verbrauchs- und Hilfsmaterialien.....	<b>14</b>
Tabelle 3: Lösungen und Puffer.....	<b>15</b>
Tabelle 4: Essays und Kits .....	<b>15</b>
Tabelle 5: RT qPCR Primer .....	<b>15</b>
Tabelle 6: Geräte und Hardware.....	<b>16</b>
Tabelle 7: Software.....	<b>16</b>
Tabelle 8: Stammkonzentrationen der verwendeten Substanzen .....	<b>19</b>
Tabelle 9: Stammlösungen und Endkonzentration LPS und Interferon- $\gamma$ .....	<b>19</b>
Tabelle 10: Inhibitoren und Substrate XF Assay .....	<b>23</b>

# **1 Einleitung**

## **1.1 Immunmetabolismus**

### **1.1.1 Hintergrund**

Das Forschungsgebiet des Immunmetabolismus beschreibt die Veränderungen und Einflüsse des zellulären Energiestoffwechsels auf die Funktion von Immunzellen. Die Analyse von Immun- und Entzündungsreaktionen hat gezeigt, dass diese eng mit tiefgreifenden Anpassungen des zellulären Stoffwechsels verknüpft sind. Dabei sind Veränderungen im Stoffwechsel nicht nur wichtig, um den erhöhten Energiebedarf aktivierter Immunzellen zu decken. Vielmehr spielen Stoffwechseleränderungen auch eine direkte Rolle in der Regulation von Effektorfunktionen und damit der Modulation der Immunantwort (1,2). Dadurch eröffnen sich neue Einblicke in die Prozesse der Immunabwehr und die gezielte Beeinflussung von Stoffwechselwegen als potenzieller therapeutischer Angriffspunkt gelangt zunehmend in den Fokus aktueller Forschung (3).

Unter normoxischen Bedingungen decken Immunzellen ihren Energiebedarf aus Adenosintriphosphat (ATP) aus der Glykolyse, dem sich anschließenden TCA-Zyklus sowie der oxidativen Phosphorylierung.

Die Glykolyse beginnt mit der Aufnahme des Substrates Glukose, welches schrittweise sauerstoffunabhängig zu 2 Molekülen Pyruvat abgebaut wird. Pro Einheit Glukose entstehen hierbei 2 Moleküle ATP. Pyruvat wird in den Mitochondrien unter aeroben Bedingungen weiter abgebaut. Die entstehenden Reduktionsäquivalente  $\text{FADH}_2$  und  $\text{NADH} + \text{H}^+$  werden in der Atmungskette weiter zur Erzeugung von ATP genutzt (oxidative Phosphorylierung). Der Gesamtenergiegewinn beträgt dann 36 ATP pro Molekül Glukose (4).

Unter anaeroben Bedingungen wird Pyruvat von der Laktatdehydrogenase unter Oxidation von  $\text{NADH} + \text{H}^+$  zu Laktat reduziert. Unter diesen Bedingungen entstehen 2 Moleküle ATP und  $\text{NAD}^+$  wird zur Aufrechterhaltung der Glykolyse regeneriert (2). In den 1920er Jahren machte der Biochemiker Otto Warburg die Beobachtung, dass Tumorzellen im Vergleich zum umgebenden Normalgewebe tiefgreifende Veränderungen ihres Metabolismus aufweisen. In seiner Forschung an Krebszellen beobachtete er, dass diese hochproliferativen Zellen eine hochregulierte glykolytische Aktivität aufweisen und trotz des Vorhandenseins von Sauerstoff und

der geringeren Energieausbeute, ihre Energie vor allem durch den nicht-oxidativen Glukosestoffwechsel gewinnen. Dieser sogenannte „Warburg-Effekt“ wurde lange Zeit als selektive Eigenschaft von Tumorzellen gesehen (5,6). In den 2000er Jahren zeigten Arbeiten, dass auch bei der Aktivierung naiver Lymphozyten ähnliche Stoffwechseleränderungen stattfinden. Forschergruppen fanden heraus, dass mit der Aktivierung naiver CD8-T-Zellen spezifische Veränderungen des Zellstoffwechsels einhergehen. So exprimieren diese Zellen eine höhere Menge glykolytischer Enzyme, die Glukoseaufnahme sowie die glykolytische Rate nehmen zu und es kommt zu einer vermehrten Laktatproduktion. Zudem konnte gezeigt werden, dass die Transkription des zytotoxischen Interferons und somit eine entscheidende Effektorfunktion der T-Zellen ein glukoseabhängiger Prozess ist, welcher sich durch eine gezielte Inhibition der Glykolyse hemmen lässt (7). Ähnlich den Tumorzellen, decken also auch Immunzellen trotz des Vorhandenseins von Sauerstoff ihren ATP-Bedarf aus der speziellen Form des Glukosestoffwechsels, welche als „aerobe Glykolyse“ bezeichnet wird (8). Das Interesse, wie Stoffwechselwege und Immunfunktion zusammenhängen und sich wechselseitig beeinflussen, hat daraufhin kontinuierlich zugenommen. Dass Stoffwechselwege dynamisch auf externe Signale reagieren und nicht nur der primären Energiegewinnung dienen, sondern die Aktivierung, Differenzierung und Effektorfunktion des Immunsystems mitregulieren, bildet heute Gegenstand aktueller Forschung. Der Metabolismus von Immunzellen stellt somit zunehmend ein attraktives therapeutisches Ziel dar, welches die gezielte Regulation von Immunantworten ermöglicht - potenziell, ohne das gesamte Immunsystem zu supprimieren (9).

## **1.2 Makrophagen**

Makrophagen sind Teil des angeborenen Immunsystems und spielen eine wichtige Rolle in der Initiation und Koordination von Entzündungsprozessen. Neben ihrem Vorkommen als gewebesansässige Makrophagen in jeglichen Geweben zirkulieren sie nach ihrer Bildung im Knochenmark als Monozyten im Blut (10).

Makrophagen gelten als sehr plastische Immunzellen. Sie reagieren auf Stimuli ihrer Umgebung und erwerben dabei einen spezifischen funktionellen Phänotyp. Über spezielle Mustererkennungsrezeptoren auf ihrer Zelloberfläche, den

sogenannten „Pattern Recognition Receptors“ (PRRs), erkennen sie „Pathogen-associated Molecular Patterns“ (PAMPs), beispielsweise bakterielle Zellwandbestandteile oder antiinflammatorische Zytokine. Die Bindung eines Liganden an einen Mustererkennungsrezeptor führt zur Auslösung einer intrazellulären Signalkaskade und dadurch spezifischen Reaktion der Makrophagen auf einen potenziellen Erreger (11,12). In diesem Prozess der sogenannten Polarisierung unterscheidet man *in vitro* zwei Subtypen: aktivierte, proinflammatorische M1-Makrophagen und alternativ-aktivierte, antiinflammatorische M2-Makrophagen (13). Der Prozess der M1-M2-Polarisierung umfasst dabei ein komplexes Spektrum von Signalwegen und Regulationsnetzwerken. Es ist bekannt, dass sich diese beiden Phänotypen nicht nur in ihrer Immunfunktion, sondern auch erheblich im zugrundeliegenden Zellmetabolismus unterscheiden. *In vivo* ergibt sich ein deutlich breiteres Spektrum der Polarisierungszustände und fließende Übergänge zwischen diesen beiden Extremtypen (14–16).

### 1.2.1 M1-Makrophagen

M1-Makrophagen stellen den proinflammatorischen Phänotypen der Makrophagenpolarisierung dar, welcher primär an entzündlichen Prozessen beteiligt ist und durch entsprechende Mediatoren aktiviert wird. *In vitro* erfolgt die M1-Aktivierung durch die Zugabe von Lipopolysaccharid (LPS), einem Bestandteil der äußeren Zellmembran gramnegativer Bakterien, und dem durch TH1-Lymphozyten ausgeschütteten Zytokin Interferon-gamma (IFN- $\gamma$ ) (17). Die Bindung dieser Liganden erfolgt an den Mustererkennungsrezeptor Toll-like Rezeptor 4. Zu den spezifischen Effektorfunktionen der proinflammatorischen M1-Makrophagen zählen die Phagozytose, die Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine wie TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-12, IL-23, IL-6, sowie die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) und Stickstoffradikale (NO), um eine Abwehr gegenüber intrazellulären Mikroorganismen zu gewährleisten. Klassisch aktivierte Makrophagen sind also elementarer Bestandteil der direkten Wirtsabwehr, allerdings auch Teil der Immunpathologie verschiedenster Autoimmunerkrankungen, wie beispielsweise der rheumatoiden Arthritis oder entzündlicher Darmerkrankungen (18). Als schnell proliferierende Immunzellen beziehen sie dabei ihre Energie primär aus der „aeroben Glykolyse“, ähnlich des Warburg Effekts in Tumorzellen (19).

### 1.2.2 M2-Makrophagen

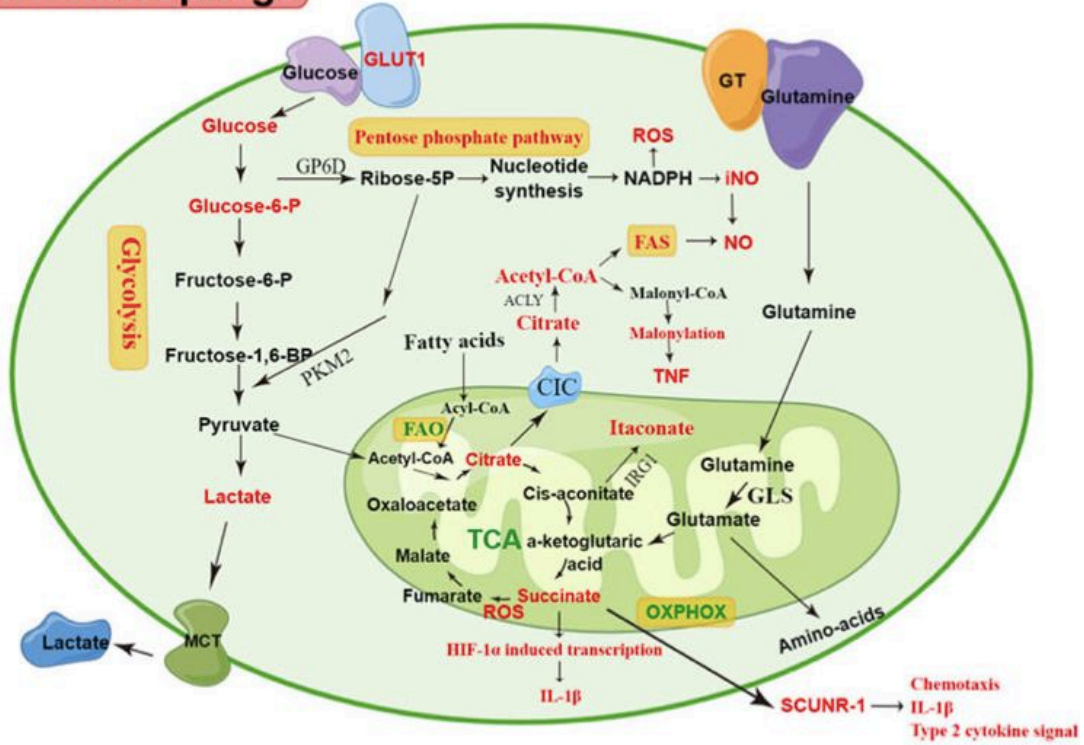
Antiinflammatorische oder auch sogenannte alternativ aktivierte M2-Makrophagen sind Bestandteil entzündungshemmender Immunantworten, der Gewebereparatur und dem Abklingen von Entzündungsprozessen. Ihre Aktivierung erfolgt durch IL-4, IL-10 oder IL-13, welche von Zellen des angeborenen Immunsystems wie Mastzellen, Basophilen und TH-2-Lymphozyten ausgeschüttet werden (13).

Zu ihren immunologischen Funktionen zählt die Produktion profibrotischer Faktoren, wie dem transformierenden Wachstumsfaktor (TGF- $\beta$ ) und dem insulinähnlichen Wachstumsfaktor (IGF-1), wodurch sie an der Angiogenese und Resolution von Gewebeschäden beteiligt sind. Zudem sezernieren sie das antiinflammatorische Zytokin IL-10. Außerdem sind M2-Makrophagen der primär vorliegende Phänotyp in Tumoren. Diese sogenannten Tumorassoziierten Makrophagen (TAMs) sind mit der Angiogenese und Tumorprogression assoziiert. Ebenso wie M1-Makrophagen weist auch der M2-Subtyp einen charakteristischen Zellmetabolismus auf. M2-Makrophagen beziehen ihre Energie in Form von ATP primär über den Tricarbonsäurezyklus (TCA-Zyklus) und der sich anschließenden mitochondrialen oxidativen Phosphorylierung (20,21).

Die Details der metabolischen Umstrukturierung, welche im Rahmen der Makrophagenpolarisierung erfolgen, werden im folgenden Abschnitt näher erläutert.

1.2.3 Veränderungen des Zellmetabolismus während der Polarisierung

**M1 macrophage**



**M2 macrophage**

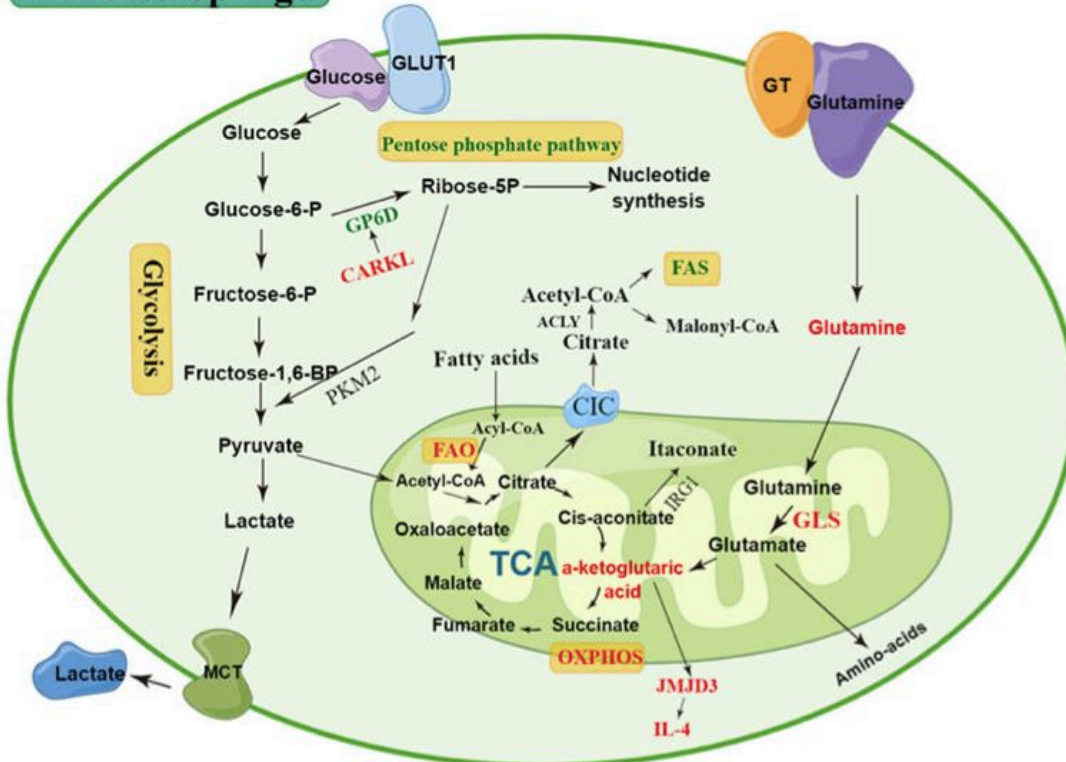


Abbildung 1 Metabolismus der M1 und M2-Makrophagen

M1 und M2-Makrophagen verwenden individuell angepasste Stoffwechselwege. Adaptiert von Wang *et al.* (22)

Während der Makrophagenpolarisierung finden neben Veränderungen der Immunantwort erhebliche metabolische Umstrukturierungen statt. Aktivierte M1-Makrophagen nutzen dabei andere Stoffwechselwege zur Energiegewinnung als M2-Makrophagen. Makrophagen des M1-Phänotyps zeichnen sich durch eine erhöhte Glykolyserate, eine hochregulierte Durchflussrate des Pentose-Phosphat-Wegs (PPP) und einen modifizierten TCA-Zyklus aus, während die oxidative Phosphorylierung und damit mitochondriale ATP-Synthese herunterreguliert wird (23). IL-4-induzierte M2-Makrophagen hingegen nutzen die mitochondriale oxidative Phosphorylierung (OXPHOS) als Hauptenergielieferant (24). Abbildung 1 gibt eine Übersicht der individuell angepassten Stoffwechselwege.

Die Glykolyse ist ein kataboler, energieliefernder Stoffwechselweg, bei welchem sauerstoffunabhängig Glukose in 10 enzymatisch geregelten Schritten zu Pyruvat abgebaut wird. Über die Laktatdehydrogenase (LDH) kann Pyruvat weiter zu Laktat verstoffwechselt werden, welches in die Zellumgebung sezerniert wird. Diese als „aerobe Glykolyse“ bezeichnete Reaktion ist der primär vorliegende Stoffwechselweg in M1-Makrophagen und dient der Regeneration von  $\text{NAD}^+$ , sodass die Glykolyse aufrechterhalten werden kann (25,26).

Im Vergleich zur oxidativen Phosphorylierung, welche Energie in Form von 36 Molekülen ATP liefert, entstehen dabei 2 Moleküle ATP pro Molekül Glukose. Schnell proliferierende aktivierte M1-Makrophagen nutzen also den energetisch „ineffizienteren“ Weg der ATP-Synthese. Verglichen mit der mitochondrialen oxidativen Phosphorylierung, welche eine mitochondriale Biogenese erfordert, kann die Glykolyse jedoch deutlich schneller hochreguliert werden. Darüber hinaus liefert der Glukoseabbau wichtige Zwischenprodukte für die Biosynthese von Nukleotiden, Aminosäuren und Fettsäuren (21). Die Bindung von LPS und  $\text{IFN-}\gamma$  an den TLR4 führt zur Aktivierung von mTOR (mammalian Target of Rapamycin), einer Serin/Threonin-Kinase, sodass die mRNA des Hypoxie-induzierbaren Faktors 1 ( $\text{HIF-1}\alpha$ ) vermehrt translatiert wird. Dieser Transkriptionsfaktor ist bei normaler Sauerstoffversorgung an spezifischen Prolyl-Resten hydroxyliert, was zu dessen proteasomalen Abbau führt (27). Succinat, ein Zwischenprodukt des TCA-Zyklus, welches in M1-Makrophagen vermehrt akkumuliert, hemmt die Aktivität der Prolylhydroxylase und stabilisiert somit  $\text{HIF-1}\alpha$ . Dieses Phänomen ist auch als „Pseudohypoxie“ bekannt.  $\text{HIF-1}\alpha$  reguliert wiederum positiv die Transkription proglykolytischer Enzyme sowie Glukosetransportern und induziert die Expression von

Genen, welche für proinflammatorische Zytokine, wie zum Beispiel IL-1 $\beta$ , kodieren (4,27).

Auch das Enzym Pyruvatkinase ist ein HIF-1 $\alpha$ -Zielgen. Es katalysiert den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Glykolyse, indem es Phosphoenolpyruvat in Pyruvat umwandelt. Die Expression der enzymatisch inaktiven Form PKM2 wird in Makrophagen vermehrt durch LPS induziert. PKM2 wird in den Zellkern transloziert und bildet dort einen Komplex mit HIF-1 $\alpha$  und stabilisiert diesen. Dadurch übt PKM2 eine positive Wirkung auf die Expression proinflammatorischer und proglykolytischer Gene aus und fördert den M1-Phänotypen (12,28).

Das glykolytische Enzym Glycerinaldehyd-3-phosphat katalysiert den sechsten Schritt des Glukoseabbaus, die Reaktion von Glycerinaldehyd-3-phosphat zu 1,3-Bisphosphoglycerat. Zudem verfügt das Enzym, welches vor allem in Zellen mit hoher Glykolyserate wie den M1-Makrophagen hoch aktiv ist, über mRNA-bindende Eigenschaften. In ruhenden Makrophagen und M2-Makrophagen bindet GAPDH an die TNF-alpha-mRNA. Die Zellaktivierung führt hingegen dazu, dass GAPDH von der TNF-alpha-mRNA dissoziiert und das proinflammatorische Zytokin vermehrt ausgeschüttet wird (29,30).

Der Pentosephosphatweg zweigt von der Glykolyse ab und dient der Generation von Ribose-5-Phosphat und NADPH. Auch dieser Abbauweg der Glukose ist in aktivierten M1-Makrophagen hochreguliert (31). NADPH dient der Regeneration von Antioxidantien wie Glutathion und damit dem Schutz der Zelle vor oxidativem Stress. Außerdem wird NADPH von der Plasmamembran gebundenen NADPH-Oxidase genutzt, um reaktive Sauerstoffspezies (ROS) zur direkten Abwehr von Pathogenen zu bilden (25).

Im Gegensatz dazu ist der Pentosephosphatweg in M2-Makrophagen gehemmt. Eine regulierende Funktion übernimmt hier das Carbohydrate Kinase-Like Protein (CARKL), welches in M2-Makrophagen als Reaktion auf IL-4 hochreguliert wird, wohingegen es auf LPS-Stimulation in M1-Makrophagen unterdrückt wird (32).

Ein weiterer entscheidender Unterschied im Metabolismus von M1- und M2-Makrophagen besteht im Ablauf des TCA-Zyklus. M2-Makrophagen verfügen über einen intakten TCA-Zyklus: Acetyl-CoA wird in den Mitochondrien in 8 aufeinanderfolgenden Reaktionen zu CO<sub>2</sub> oxidiert. Dabei werden NAD<sup>+</sup> und FAD zu

NADH und FADH reduziert, welche wiederum in der Atmungskette ihre Elektronen abgeben. So baut sich ein Protonengradient auf, welcher die mitochondriale ATP-Synthese antreibt. In M1-Makrophagen ist der TCA-Zyklus hingegen so reguliert, dass es zu einer Anhäufung der Stoffwechselzwischenprodukte Citrat, Succinat und Itaconat kommt. Diese Metaboliten sind essenzielle Signalmetaboliten für die inflammatorische Aktivität der aktivierten Immunzellen (28,33,34). Die posttranskriptionelle Herunterregulierung der Isocitrat-Dehydrogenase (IDH) führt in M1-Makrophagen zu einem Anstieg des Citratspiegels (33). LPS führt über den NF- $\kappa$ B Signalweg zu einer erhöhten Expression des mitochondrialen Citratträgers SLC25a1, wodurch Citrat aus den Mitochondrien exportiert wird (35,36). Das zytosolische Citrat wird durch die Citrat-Lyase in Acetyl-CoA und Oxalacetat gespalten. Acetyl-CoA wird für die Fettsäurebiosynthese verwendet und stellt ein Ausgangsprodukt der Prostaglandinsynthese dar. Zudem entsteht bei der zytosolischen Citratspaltung NADPH, ein wichtiger Kofaktor der induzierbaren Stickstoffmonoxidsynthase iNOS und Substrat der membrangebundenen NADPH-Oxidase für die ROS-Produktion (36).

Als Reaktion auf eine Stimulation mit LPS und IFN- $\gamma$  wird in M1-Makrophagen das Irg-1-Gen (Immune responsive gene 1, häufig auch als ACOD1 genannt) induziert, welches für das Enzym Aconitat-Decarboxylase kodiert. Dieses Enzym wandelt cis-Aconitat im TCA-Zyklus in Itaconat um, wodurch dieser Metabolit vermehrt akkumuliert (37,38). Itaconat verfügt über direkte antimikrobielle Eigenschaften, indem es die bakterielle Isocitrat Lyase inhibiert und somit eine bakterizide Funktion ausübt (37,39). Zudem hemmt Itaconat die Aktivität der Succinat-Dehydrogenase. Dieses Enzym katalysiert die Oxidation von Succinat zu Fumarat und stellt gleichzeitig ein Teil des Komplex II der mitochondrialen Atmungskette dar, sodass Succinat in LPS-aktivierten Makrophagen akkumuliert. Dadurch verfügt Itaconat über immunmodulierende Eigenschaften und reduziert die Freisetzung mitochondrialer ROS sowie proinflammatorischer Zytokine (40,41).

Auch ein erhöhter Succinatspiegel ist ein wesentliches Merkmal proinflammatorischer M1-Makrophagen und wichtiger Regulator der entzündlichen Immunantwort. Durch die verstärkte Glykolyse und reduzierte oxidative Phosphorylierung in diesem Makrophagensubtypen erfolgt eine mitochondriale Umstrukturierung von der Energiegewinnung hin zur Generierung reaktiver Sauerstoffspezies. Die Anhäufung von Succinat ist eng mit einem umgekehrten

Elektronentransport durch die Atmungskette und der ROS-Produktion assoziiert, wodurch die proinflammatorische Genexpression verstärkt und die Entzündung aufrechterhalten wird (42,43). Zudem fungiert Succinat, wie bereits beschrieben, als wichtiger Stabilisator des Transkriptionsfaktors HIF-1 $\alpha$  und verstärkt somit den pro-glykolytischen Stoffwechsel und damit den M1-Phänotyp.

Während M1-Makrophagen also ihre Energie primär aus der aeroben Glykolyse gewinnen, erzeugen M2-Makrophagen ATP vorwiegend über die energetisch effiziente mitochondriale Respiration (33). Die Elektronentransportkette in M1-Makrophagen dient hingegen nicht der Energiegewinnung, sondern primär der mitochondrialen ROS-Erzeugung (21).

Eine wichtige Effektorfunktion der M1-Makrophagen besteht in der Synthese und Freisetzung von Stickstoffmonoxid (NO). Die Stickstoffmonoxidsynthase iNOS, welche in M1-Makrophagen als Reaktion auf LPS induziert wird, katalysiert die Bildung von NO aus der Aminosäure Arginin. NO wirkt direkt zytotoxisch auf mögliche Erreger und unterdrückt zudem die Aktivität der mitochondrialen Elektronentransportkette durch eine Hemmung der Komplexe I und IV. Dadurch fördert NO den pro-glykolytischen Phänotypen. Im Gegensatz dazu setzen M2-Makrophagen weder NO frei, noch exprimieren sie iNOS, sondern verstoffwechseln Arginin über die Arginase 1 in Ornithin und Harnstoff (44).

### **1.3 Testsubstanzen**

#### **1.3.1 Dapson**

Dapson (4,4'-Diaminodiphenylsulfon) ist eine Substanz aus der Gruppe der Sulfone, welche bereits im Jahr 1908 synthetisiert wurde. Sie vereint sowohl antibakterielle als auch entzündungshemmende Eigenschaften. Erstmals eingesetzt wurde die Substanz im Jahr 1945 als wirksames Antibiotikum gegen den Lepraerreger *Mycobacterium leprae* (45). Die antibakterielle Wirkung der Substanz beruht auf der Hemmung der bakteriellen Dihydropteroat-Synthase, wodurch der Einbau von Paraaminobenzoensäure und damit ein entscheidender Schritt der Folsäuresynthese gehemmt wird. Somit hemmt Dapson als Antibiotikum das Zellwachstum verschiedener pathogener Protozoen und Bakterien wie Streptokokken, Pneumokokken oder Mykobakterien (45).

Im Jahr 1950 wurde Dapson erstmals im Rahmen der Behandlung von Dermatitis

herpetiformis eingesetzt, einer blasenbildende Hauterkrankung, welche durch IgA-Ablagerungen in der papillären Dermis charakterisiert ist. Heute findet Dapson seinen klinischen Einsatz in der Behandlung einer Vielzahl dermatologischer und systemischer Erkrankungen (46).

Dabei zeigt sich Dapson besonders in der Behandlung dermatologischer Erkrankungen als wirksam, die durch eine abnormale Neutrophilenansammlung charakterisiert sind. Als kortikoidsparendes Medikament erfolgt der Einsatz in der Behandlung autoimmuner bullöser Erkrankungen, also Dermatosen, bei denen Autoantikörper gegen epidermale Strukturen gerichtet sind, sodass es folglich zu einer Blasenbildung der Haut kommt. Der Einsatz als Monotherapie oder in Kombination mit Kortikoiden und Immunsuppressiva erfolgt hier beispielsweise in der Behandlung des Pemphigus vulgaris, Pemphigus herpetiformis, des Schleimhautpemphigoids oder des bullösen Pemphigoids (47,48). Dapson verfügt über eine bekannte hemmende Wirkung auf die Myeloperoxidase in Neutrophilen und hemmt die Neutrophilenrekrutierung. Zudem lindert die Substanz die Freisetzung einiger entzündlicher Zytokine (45,46,49). Allerdings ist die entzündungshemmende Wirkung der Substanz trotz des wirksamen Einsatzes in der Therapie zahlreicher entzündlicher Erkrankungen noch nicht vollständig geklärt und es bleibt bisher offen, ob auch eine Wirkung auf den Zellmetabolismus für die immunmodulierende Wirkung der Substanz ursächlich sein könnte.

### 1.3.2 Dimethylfumarat/Monomethylfumarat

Dimethylfumarat (DMF), der Methylester der Fumarsäure, ist ein zugelassenes Medikament zur Behandlung der Psoriasis vulgaris und der Multiplen Sklerose (50). *In vivo* wird DMF zu MMF hydrolysiert, welcher als der therapeutisch wirksame Metabolit der Substanz beschrieben wird (51). Einige Autoren beschreiben allerdings DMF nicht ausschließlich als Prodrug von MMF, sondern beobachten unterschiedliche pharmakologische Eigenschaften beider Substanzen (52,53). Die erste Zulassung eines DMF-haltigen Medikaments erfolgte 1994 unter dem Handelsnamen Fumaderm® in der Behandlung der Psoriasis vulgaris (54). Bei der Psoriasis vulgaris handelt es sich um eine chronisch entzündliche Erkrankung der Haut, welche klinisch durch scharf begrenzte schuppige Hautplaques imponiert (55). Die Pathogenese der Erkrankung wird durch eine ungewöhnliche Aktivität

verschiedener Immunzellen wie T-Lymphozyten, Makrophagen, Neutrophilen und dendritischer Zellen beeinflusst, in deren Folge es zu einer gestörten Proliferation der Epidermis kommt (56).

Die entzündungshemmenden Eigenschaften und die gute Verträglichkeit des Medikaments in der Langzeittherapie der Psoriasis, führten zu einem zunehmenden Interesse am Potenzial der Substanz hinsichtlich der Anwendung bei weiteren autoimmunvermittelten Erkrankungen.

2013 erfolgte erstmalig die Zulassung von DMF als Erstlinientherapie in der Behandlung der schubförmig remittierenden Multiplen Sklerose bei Erwachsenen. Die Multiple Sklerose ist eine chronisch-entzündliche Autoimmunerkrankung, in deren Verlauf es zur Demyelinisierung von Nervenfasern und somit herdförmigen entzündlichen Schädigungen des zentralen Nervensystems kommt (59). Bis heute gilt DMF als gute therapeutische Option in der Behandlung dieser neurodegenerativen Erkrankung (50,57,58).

Die Wirkweise von DMF ist noch nicht vollständig geklärt, aber bisher sind einige Ziele für die therapeutische Funktion der Substanz identifiziert. DMF stabilisiert beispielsweise den Transkriptionsfaktor Nrf2 (Nuclear factor erythroid 2-related factor 2), welcher die Expression antioxidativer und zytoprotektiver Gene fördert und somit einen zentralen Regulator der zellulären Abwehr gegen oxidativen Stress bildet (60,61). Zudem scheint DMF den Hypoxie-induzierbaren Faktor 1 zu modulieren (62). DMF gilt als ein wirksames Medikament in der Modulation von Entzündungsprozessen und bietet ein großes therapeutisches Potenzial in der Therapie einer Vielzahl entzündlicher Erkrankungen. Dabei verfügt das Medikament über eine pleiotrope Wirkung und vereint zahlreiche antioxidative, immunmodulierende und entzündungshemmende Eigenschaften. Zudem wird beschrieben, dass DMF das glykolytische Enzym GAPDH inhibiert und somit den Metabolismus einer Immunzelle beeinflussen kann (63).

## 1.4 Zielsetzung

Die wechselseitige Beeinflussung von Stoffwechselveränderungen und der Effektorfunktion von Immunzellen spielt eine zentrale Rolle in der Funktion von Immunzellen. Erkenntnisse aus der aktuellen Immunmetabolismus-Forschung zeigen, wie sich Veränderungen des Metabolismus auf entzündliche Reaktionen auswirken können. Einige Medikamente, welche erfolgreich in der Therapie entzündlicher Erkrankungen etabliert sind, verfügen über bekannte immunmodulierende Funktionen, allerdings ist häufig noch nicht geklärt, ob und in welcher Form auch eine unbekannte Beeinflussung des Metabolismus ursächlich für die immunmodulierende Wirkung ist. In der hier vorliegenden Arbeit soll eine immunmodulatorische Wirkung der Medikamente Dapson, DMF und MMF untersucht werden. Dazu wird ein Makrophagen-Zellkultursystem verwendet. Zudem soll überprüft werden, ob eine gezielte Manipulation von Stoffwechselwegen in einer veränderten Immunantwort der Makrophagen resultiert.

Es ergeben sich folgende Fragestellungen:

- 1. Zeigt sich eine veränderte entzündliche Aktivität aktivierter M1-Makrophagen nach Behandlung mit Dapson, DMF und MMF, gemessen an der Freisetzung von NO und TNF- $\alpha$ ?*
- 2. Verändern Substanzen, die eine modulierende Wirkung auf den Zellstoffwechsel besitzen, die inflammatorische NO-Freisetzung aktivierter M1-Makrophagen?*
- 3. Lässt sich eine veränderte Aktivität des Stoffwechsels (v.a. Glykolyse und oxidative Phosphorylierung) durch die Behandlung mit Dapson, DMF und MMF beobachten?*
- 4. Lässt sich eine veränderte Expression inflammatorischer Marker auf mRNA-Ebene durch Behandlung mit Dapson, DMF und MMF erkennen?*

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Materialien

Tabelle 1 Chemikalien und Reagenzien

Chemikalien/Reagenzien	Hersteller	Katalognummer
2-Deoxy-D-Glukose	Carbosynth Limited, Berkshire, UK	MD051 871601
2-Propanol	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland	6752.5
Antimycin A	Sigma-Aldrich, Darmstadt, Deutschland	A8674
Chloroform	Honeywell International Inc., Morristown, NJ, USA	C2432-500ML
D-(+)-Glukose	Sigma-Aldrich, Darmstadt, Deutschland	G 8270
Dapson	Sigma-Aldrich, Darmstadt, Deutschland	46158
Dimethylfumarat	Sigma-Aldrich, Darmstadt, Deutschland	242926-25G
Dinatriumhydrogenphosphat	Sigma-Aldrich, Darmstadt, Deutschland	4984.1
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)	Sigma-Aldrich, Darmstadt, Deutschland	D5796-500ML
Ethanol 70 %	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland	T913.3
FCCP	Sigma-Aldrich, Darmstadt, Deutschland	C2920
Fetal Bovine Serum (FBS)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA	264000 44
Königinsäure	Biomol GmbH, Hamburg, Deutschland	Cay14079
Kaliumchlorid	Sigma-Aldrich, Darmstadt, Deutschland	104936
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck KGAA, Darmstadt, Deutschland	112034
Lipopolysaccharid aus E. coli O111:B4	Sigma-Aldrich, Darmstadt, Deutschland	L2630
Monomethylfumarat	Sigma-Aldrich, Darmstadt, Deutschland	651419-10G
N-(1-Naphthyl)ethylendiamin	Sigma-Aldrich, Darmstadt, Deutschland	222488
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland	9265.3
Natrium-Pyruvat	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland	P04-43100

Oligomycin A	Sigma-Aldrich, Darmstadt, Deutschland	O4876
Penicillin/Streptomycin	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA	151401 22
Rotenon	Sigma-Aldrich, Darmstadt, Deutschland	R8875
Stop Solution	Biolegend, San Diego, CA, USA	423001
Sulfanilamid	Sigma-Aldrich, Darmstadt, Deutschland	S9251
SYBR Select Master Mix	Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA	PI26634
TRIzol® Reagent	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA	155960 18
Trypanblau-Lösung	Sigma-Aldrich, Darmstadt, Deutschland	T8154

**Tabelle 2 Verbrauchs- und Hilfsmaterialien**

<b>Material</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Katalognummer</b>
Biosphere® Filter Tips	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland	70.762.21 1
ELISA plate, High Binding, F	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland	821.582.2 00
Falcon Röhrchen	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland	62.547.254
Parafilm Verschlussfolie	Bemis Company Inc., WI, USA	9170002
PCR-Platte 96 Well, Standard	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland	72.1979.1 02
TC-Flasche T75, Standard	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland	83.3911.0 02
TC-Platte 6 Well, Standard, F	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland	83.3920.0 05
TC-Platte 96 Well Standard, F	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland	83.3924
TC-Platte 96 Well, Standard, Suspension, F	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland	83.3924.5 00
XF FluxPak (XF24 V7 PS Cell Culture Microplates, XF24 sensor cartridges, XF Calibrant/ Kalibrierungslösung)	Agilent Technologies Deutschland GmbH, Waldbronn, Deutschland	100850-001
Zellschaber, 2-Positionen-Klinge	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland	83.3950

**Tabelle 3 Lösungen und Puffer**

<b>Lösungen/Puffer</b>	<b>Zusammensetzung</b>
ELISA Assay Diluent	10 % FBS in PBS
ELISA Wash Buffer	0,05 % Tween-20 in PBS
Medium Xf24 Extracellular Flux (Seahorse) Analyzer	50 ml DMEM 1 ml L-Glutamin (Konz. 4mM) 1,125 ml Glukose (Konz. 4,5 g/l) 500 µl Natrium-Pyruvat (Konz. 1mM) pH 7,4 37 °C
PBS	8,0 g NaCl 1,16 g Dinatriumhydrogenphosphat 0,2 g Kaliumdihydrogenphosphat 0,2 g Kaliumchlorid ddWasser bis 1 L auffüllen pH 7,4
Zellkulturmedium	450 ml DMEM 5 ml Penicillin/Streptomycin 50 ml FBS 5 ml Natrium-Pyruvat

**Tabelle 4 Essays und Kits**

<b>Essay/Kit</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Katalognummer</b>
ELISA MAX Standard Set Mouse TNFalpha	Biologend, San Diego, CA, USA	430901
Maxima SYBR Green qPCR Master Mix	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA	K0251
Pierce LDH Cytotoxicity Assay Kit	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA	88954
RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA	K1622

**Tabelle 5 RT qPCR Primer**

<b>Gen</b>	<b>Forward Primer</b>	<b>Reverse Primer</b>	<b>Größe (bp)</b>
<i>Hif1a</i>	ACCTTCATCGGAAACTCCAAAG	CTGTTAGGCTGGGAAAAGTTAGG	228
<i>Hprt</i>	GGTTAAGCAGTACAGCCCA	CAAATCCAACAAAGTCTGGCCT	98
<i>Gapdh</i>	AGGTCGGTGTGAACGGATTTG	TGTAGACCATGTAGTTGAGGTCA	123
<i>Nos2</i>	AATCTTGGAGCGAGTTGTGG	CAGGAAGTAGGTGAGGGCTTG	107
<i>Pkm2</i>	TCGCATGCAGCACCTGATT	CCTCGAATAGCTGCAAGTGGTA	65

**Tabelle 6 Geräte und Hardware**

<b>Geräte und Hardware</b>	<b>Hersteller</b>
Accu-Jet® Pro Pipette	Brand GmbH, Wertheim, Deutschland
Galaxy™ 170 S CO <sub>2</sub> -Inkubator	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Hanna All in One educational pH-Meter	Hanna Instruments Deutschland GmbH, Vöhringen, Deutschland
Heidolph Buchler Reax 2000 Schüttler Shaker Vortexer	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach, Deutschland
Kern Analysenwaage ABS/ABJ 82 G* 0.1 mg	Kern & Sohn GmbH, Balingen, Deutschland
Mastercycler Ep Realplex	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Micro centrifuge Micro Star 17R	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
NeoVortex® Shaker	Neolab Migge GmbH, Heidelberg, Deutschland
Neubauer-Zählkammer	Brand GmbH, Wertheim, Deutschland
Tecan Reader Infinite 200Pro	Tecan Group Ltd., Männedorf, Schweiz
Thermo Cycler 2720	Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, Deutschland
XF24 Extracelluluar Flux Analyzer	Agilent Technologies Deutschland, Waldbronn, Deutschland
Zellkulturinkubator B5060 EC/CO <sub>2</sub>	Heraeus Sepatech GmbH, Hanau, Deutschland
Zentrifuge 48 Place	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Zentrifuge 5810R	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Zuzi Inverted Biological Microscope 181	Auxilab, Beriain, Spanien

**Tabelle 7 Software**

<b>Software</b>	<b>Hersteller</b>
Biorender.com	Biorender, Toronto, Kanada
GraphPad Prism (Version 9.2.0)	GraphPad Software Inc., Sand Diego, CA, USA
Microsoft® Excel for Windows (Version 2111)	Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA
Microsoft® Word for Mac (Version 16.87)	Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA
Tecan-i-control	Tecan Group Ltd., Männedorf, Schweiz

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Makrophagen-Zellkultur

Als Zelllinie wurde die murine Makrophagen Zelllinie RAW 264.7 ATCC® TIB71™ verwendet. Dabei handelt es sich um eine adhärent wachsende Zelllinie aus einer männlichen *Balb/c* Maus. Die Kultivierung erfolgte in DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium), versetzt mit 10 % fetalem Kälberserum, 1 % Penicillin/Streptomycin und 1 % Natrium-Pyruvat. Die Zellkultur wurde in 15 ml Medium in 75 cm<sup>2</sup> Kulturflaschen bei 37 °C und unter 5 % CO<sub>2</sub>-Begasung im Brutschrank kultiviert. Das verwendete Medium wurde bis zum Gebrauch bei 4 °C gelagert und vor Anwendung im Wasserbad auf 37 °C erwärmt. Das Austauschen des Mediums erfolgte alle 2 – 3 Tage, das Passagieren der Zellen etwa alle 5 Tage. Das Arbeiten mit der Zellkultur erfolgte stets unter einer sterilen Werkbank bei Raumtemperatur und die Inkubation in einem Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>-Begasung, sofern nicht anders beschrieben.

Das Passagieren der Zellkultur erfolgte, sobald die Zellen ein konfluentes Wachstum von etwa 90 % erreichten. Um die adhärent wachsenden Zellen vom Boden der Kulturflaschen zu lösen, wurden diese vorsichtig mit einem Zellschaber abgeschabt. Durch langsames Auf- und Abpipettieren wurde die Suspension gemischt und in ein 50 ml Falcon Röhrchen überführt. Anschließend erfolgte das Zentrifugieren bei 400 x g bei einer Temperatur von 19 °C für 5 Minuten. Das Medium wurde daraufhin abgekippt und anschließend das Zellpellet in 2 ml frischem Medium resuspendiert. Die Zellzahl einer Suspension wurde mithilfe einer Neubauer-Zählkammer in einer 1:10 Verdünnung ermittelt. Dazu wurde in einem 1,5 ml Eppendorf-Röhrchen 10 µl der Zellsuspension mit 80 µl PBS und 10 µl Trypanblau vermischt. Von diesem Gemisch wurden 10 µl in die Neubauerkammer gegeben und die Zellen pro Quadrat unter dem Lichtmikroskop ausgezählt.

Für die Berechnung der Zellzahl gilt:

$$\text{Zelldichte (Zellzahl pro ml)} = \frac{\text{Zellzahl} \times \text{Verdünnungsfaktor} (10) \times 10^4}{\text{Anzahl gezählter Quadrate}}$$

Anschließend wurden die Zellen in einer entsprechenden Zellzahl von  $0,5 \times 10^6$  in Zellkulturflaschen gegeben oder für das jeweilige Experiment in einer bestimmten Zellzahl auf Zellkulturplatten ausgesät.

Um die Zellen über längere Zeit zu lagern und eine Kultivierung der Zellen von mehr als 12 Wochen zu vermeiden, wurden die Zellen kryokonserviert. Dazu wurden die Zellen wie oben beschrieben abgelöst, zentrifugiert und ausgezählt. In Portionen von  $0,5 \times 10^6$  wurden die Zellen in Einfriermedium (Zellkulturmedium mit 5% DMSO) resuspendiert und in Kryokonservierungsröhrchen überführt. Diese wurden bei  $-80^\circ\text{C}$  über Nacht gelagert und am nächsten Tag in flüssigem Stickstoff eingefroren. Zur Wiederaufnahme der Kultivierung wurden die Zellen zunächst für 2 Minuten im  $37^\circ\text{C}$ -Wasserbad aufgetaut. Anschließend wurden diese vorsichtig in 10 ml Zellkulturmedium überführt und für 10 Minuten bei  $250 \times g$  zentrifugiert. Nach Abpipettieren des Überstands wurde das Zellpellet in 2 ml frischem Kulturmedium resuspendiert und in 15 ml Kulturmedium in die Zellkulturflasche gegeben.

Die RAW 264.7 Makrophagen wurden zunächst über Nacht in einer Zellzahl von 20.000 pro 100  $\mu\text{l}$  Medium auf einer 96-Loch Platte vorinkubiert und am nächsten Morgen mit den Testsubstanzen behandelt. Dapson, Dimethylfumarat und Monomethylfumarat wurden als Stammlösungen in DMSO angesetzt. Als metabolische Modulatoren wurden Oligomycin A, 2-Deoxy-D-Glukose (2-DG), DMOG und Koninginsäure verwendet.

Alle Stammlösungen wurden mit PBS weiter verdünnt und in einem Volumen von jeweils 10  $\mu\text{l}$  auf die Zellkulturplatte gegeben. Als Lösungsmittelkontrolle (Vehikelkontrolle) diente eine entsprechende DMSO-Kontrolle in PBS verdünnt. Sowohl die Testsubstanzen als auch die entsprechenden Lösungsmittelkontrollen wurden in Triplikaten verwendet. Die Testplatten wurden für eine Stunde im Brutschrank inkubiert.

Tabelle 8 zeigt die jeweiligen Stammkonzentrationen und Endkonzentrationen in der Zellkultur.

**Tabelle 8 Stammkonzentrationen der verwendeten Substanzen**

<b>Substanz</b>	<b>Lösungsmittel</b>	<b>Stammkonzentration</b>	<b>Zielkonzentration</b>
<b>Dapson</b>	DMSO	200 mM	10 - 500 $\mu$ M
<b>DMF</b>	DMSO	200 mM	10 - 500 $\mu$ M
<b>MMF</b>	DMSO	200 mM	10 - 500 $\mu$ M
<b>Oligomycin A</b>	DMSO	2.5 mM	10 $\mu$ M
<b>2-DG</b>	PBS	1 M	1 mM
<b>DMOG</b>	PBS	114 mM	500 $\mu$ M
<b>Koninginsäure</b>	DMSO	100 - 200 mM	3 $\mu$ M

Die Stimulation der RAW 264.7 Makrophagen erfolgte durch die Zugabe von LPS und IFN- $\gamma$ . Die Stammlösungen beider Substanzen wurden gemeinsam im Zellkulturmedium verdünnt und in einem Volumen von 10  $\mu$ l zur Zellkultur hinzugegeben. Die Endkonzentrationen im Zellkulturüberstand betragen 100 ng/ml LPS und 150 U/ml IFN- $\gamma$  (Tabelle 9). Die Inkubation der Zellkulturplatten erfolgte im Brutschrank für mindestens 6 Stunden oder entsprechend der jeweiligen Methode. Nach Ende der Inkubationszeit konnten entweder die Zellen oder der Zellüberstand für den folgenden Versuch verwendet werden.

**Tabelle 9 Stammlösungen und Endkonzentration LPS und Interferon- $\gamma$**

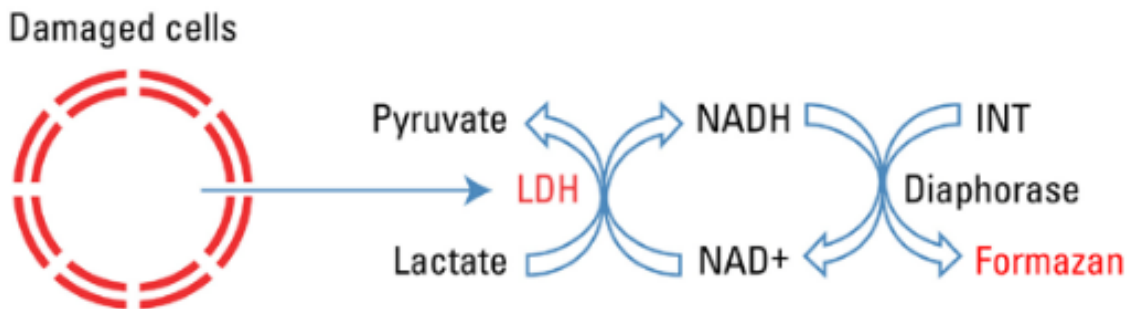
<b>Substanz</b>	<b>Lösungsmittel</b>	<b>Stammlösung</b>	<b>Endkonzentration in Zellkultur</b>
<b>LPS</b>	PBS	1 mg/ml	100 ng/ml
<b>Interferon-<math>\gamma</math></b>	PBS	150.000 U/ml	150 U/ml

### 2.2.2 LDH-Zytotoxizitäts-Assay

Die Messung der Zytotoxizität verschiedener Substanzkonzentrationen wurde entsprechend des LDH-Zytotoxizitäts-Assays des Herstellers Thermo Scientific durchgeführt.

Das Prinzip des Versuchs beruht auf der Kopplung zweier katalytischer Reaktionen (Abb. 2). Das Enzym LDH (Laktatdehydrogenase) ist ein zytosolisches Enzym,

welches bei einer Schädigung der Zellmembran in das Zellkulturmedium übertritt. Dort katalysiert es die Oxidation von Laktat zu Pyruvat. Dabei wird  $\text{NAD}^+$  zu  $\text{NADH} + \text{H}^+$  reduziert. Diese freiwerdenden Protonen werden auf das im Testreagenz enthaltene Tetrazoliumsalz (INT) übertragen. Dabei entsteht rötliches Formazan, welches photometrisch bei 490 nm und 680 nm bestimmt werden kann. Die Extinktion korreliert dabei direkt mit der Menge LDH und somit der Zellschädigung.



**Abbildung 2 Schematische Darstellung des LDH-Zytotoxizitäts-Versuchs**  
 adaptiert aus [Pierce LDH Cytotoxicity Assay Kit Protokoll – Katalognr. 88954 – Thermo Scientific]

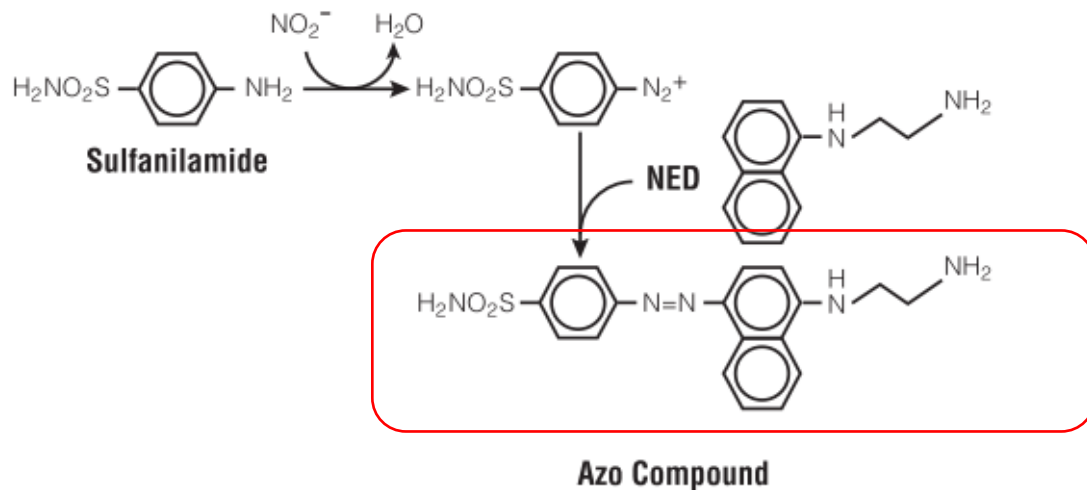
Als Referenz der maximalen LDH-Freisetzung wurde ein Triplikat der Zellen mit einem Lyse-Puffer behandelt. Dann wurden jeweils 50 µl des Zellkulturüberstands sowie eine Medium-Kontrolle in Duplikaten in eine 96-Lochplatte überführt. Dazu wurden 50 µl des Reaktionsmixes zugegeben. Dieser Reaktionsmix enthält das Enzym Diaphorase und das Substrat Tetrazoliumsalz (INT). Daraufhin erfolgte eine dreißigminütige Inkubation bei Raumtemperatur (21 °C) in Dunkelheit. Zum Beenden der Reaktion wurden 50 µl der Stopplösung hinzugegeben und die Absorption mittels Tecan Reader bei 490 nm und 680 nm Wellenlänge gemessen. Mittels folgender Formel wurde die Zytotoxizität berechnet:

$$\text{Zytotoxizität} = \frac{\text{Wert (experimentell)} - \text{Wert (Medium Kontrolle)}}{\text{Wert (Lyse)}} \times 100$$

Als Cut-off für eine zytotoxische Wirkung der Substanz wird ein Wert über 7% angenommen.

### 2.2.3 Nachweis von Stickstoffmonoxid mithilfe der Griess-Reaktion

Außerhalb der Zelle reagiert das von den RAW 264.7 Makrophagen abgegebene Stickstoffmonoxid (NO) mit dem im Zellkulturmedium vorhandenen Sauerstoff zu Nitrat ( $\text{NO}_3^-$ ) bzw. Nitrit ( $\text{NO}_2^-$ ). Diese Oxidationsprodukte können mithilfe der sogenannten Griess-Reaktion sichtbar gemacht werden.



**Abbildung 3 Griess-Reaktion zum Nachweis von Nitrit**  
adaptiert aus [Griess Reagent System – Promega Corporation]

Zur Vorbereitung des Versuchs wurden die Zellen jeweils für 1 Stunde mit der Testsubstanz behandelt und anschließend für weitere 6 Stunden mit LPS + IFN- $\gamma$  stimuliert.

Als erster Schritt wurden 50  $\mu\text{l}$  des Zellkulturüberstands auf eine neue 96-Lochplatte überführt. Hinzu wurden pro Vertiefung 50  $\mu\text{l}$  Sulfanilamid (1%ig in 5%iger Phosphorsäure) gegeben und bei Raumtemperatur für 5 Minuten inkubiert. Daraufhin folgte die Zugabe von 50  $\mu\text{l}$  N-1-Naphtylethyldiamin (NED) (0,1%ig in 5%iger Phosphorsäure). Aus der Bildung des entstehenden Diazoniumsalzes resultierte ein Farbumschlag (Abb. 3). Die Absorption wurde bei einer Wellenlänge von 550 nm und einer Referenzwellenlänge von 620 nm gemessen. Als Standard zur Erstellung einer Kalibriergeraden wurde Natriumnitrit in Konzentrationen von 0 - 100  $\mu\text{M}$  eingesetzt. Als Verdünnung wurde hier das Zellkulturmedium verwendet. Mittels dieser Standardkurve konnte die Konzentration des freigesetzten NO quantifiziert werden.

#### 2.2.4 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Zur Quantifizierung der TNF- $\alpha$  Freisetzung wurde das Sandwich-ELISA-Verfahren (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) verwendet. Dieser Versuch wurde gemäß des ELISA MAX Standard Set Mouse TNF- $\alpha$  Herstellerprotokolls durchgeführt. Dabei wird zunächst eine Lochplatte mit einem Antikörper, welcher gegen das zu bestimmende Antigen gerichtet ist, beschichtet. Nach Zugabe des Antigens wird dieses gebunden. Nach mehreren Waschschritten wird ein zweiter Antikörper gegen das Antigen hinzugegeben. An diesen zweiten Antikörper bindet Avidin-HRP, ein spezifisches Enzym, welches ein chromogenes Substrat umsetzt. Anhand der Intensität der Farbreaktion kann die Antigen-Menge durch Vergleich mit einem Antigenstandard photometrisch quantifiziert werden.

Die TNF- $\alpha$  Konzentration wurde in den Zellkulturüberständen der RAW 264.7 Makrophagen bestimmt, welche mit den Testsubstanzen Dapson, DMF und MMF behandelt und anschließend für 6 Stunden mit LPS + IFN- $\gamma$  inkubiert wurden. Als Kontrolle dienten die unbehandelten, unstimulierten Makrophagen und die mit LPS + IFN- $\gamma$  stimulierten Makrophagen. Die Auslesung erfolgte mittels Multifunktions-Fluoreszenz-Reader bei einer Wellenlänge von 450 nm und 570 nm.

#### 2.2.5 Metabolische Flussanalysen

##### 2.2.5.1 *Grundlagen*

Zur Analyse des Zellmetabolismus *in vitro* wurde das metabolische Analysegerät Extracellular Flux (Seahorse) Analyzer verwendet. Bei dieser Methode handelt es sich um eine Mikroplatten-basierte Fluoreszenztechnologie. Das Messprinzip beruht auf der Messung der extrazellulären Ansäuerungsrate ECAR (Extracellular Acidification Rate) und der Sauerstoffverbrauchsrate OCR (Oxygen Consumption Rate).

Ein Fluoreszenzsensor detektiert die Konzentration freier Protonen im Medium. Diese Konzentration wird hauptsächlich durch die Sekretion des Glykolyse-Endproduktes Laktat beeinflusst. Diese extrazelluläre Ansäuerungsrate (ECAR) gilt als Surrogatmarker für die Glykolyse-Aktivität der Zellen. Gleichzeitig erfolgt fluorometrisch die Messung des Sauerstoffgehaltes im Assay-Medium. Diese Sauerstoffverbrauchsrate (OCR) lässt Rückschlüsse auf die Quantität der

oxidativen Phosphorylierung zu.

Während des Versuchsablaufes erfolgt die Messung der ECAR und OCR in Echtzeit. Durch vier Injektionsports werden nach einem festen zeitlichen Schema Inhibitoren und Substrate der Stoffwechselwege automatisch in die Zellkulturplatte injiziert (Tab.10).

**Tabelle 10 Inhibitoren und Substrate XF Assay**

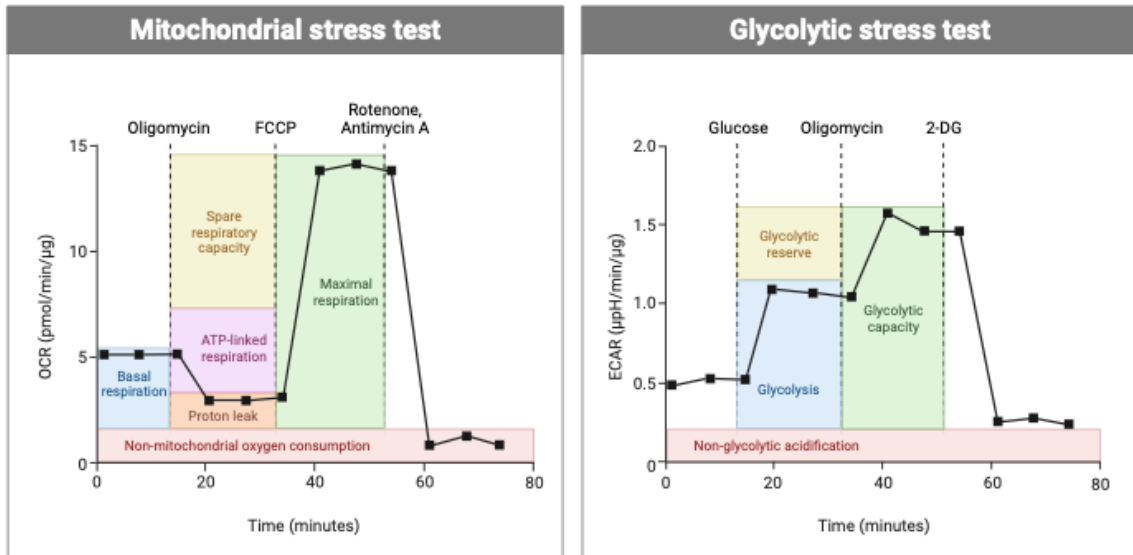
	<b>Substanz</b>	<b>Funktion</b>
<b>Port A</b>	1 $\mu$ M Oligomycin A	Inhibitor Komplex V (ATP-Synthase) Atmungskette
<b>Port B</b>	1,2 $\mu$ M FCCP	Entkoppler der Atmungskette
<b>Port C</b>	1 $\mu$ M Antimycin A 1 $\mu$ M Rotenon	Inhibitor Komplex I Atmungskette Inhibitor Komplex III Atmungskette
<b>Port D</b>	100 mM 2-Deoxy-D- Glukose	Inhibitor der Hexokinase

Port A enthält Oligomycin A, ein Inhibitor des Komplex V (ATP-Synthase) der Atmungskette. Als nächstes folgt in Port B FCCP (Carbonylcyanid-p-trifluoromethoxyphenylhydrazon), ein Entkoppler der Atmungskette, welcher zu einem maximalen Energie- und Sauerstoffverbrauch führt. Im nächsten Schritt erfolgt über Port C die Injektion von Rotenon, einem Inhibitor des Komplex I der Atmungskette sowie Antimycin A, einem Inhibitor des Komplex III der Atmungskette. In einem letzten Schritt folgt in Port D die Injektion von 2-Deoxy-D-Glukose (2-DG), wodurch das Enzym Hexokinase der Glykolyse gehemmt wird. Durch die Messung der ECAR und OCR in Echtzeit können verschiedene Parameter der Glykolyse und mitochondrialen Respiration berechnet werden (Abb. 4).



## Metabolic Assays

Using Seahorse Analyzers



Template adapted from: Daisy Shu, PhD  
Postdoc, Schepens Eye Research Institute, Harvard Medical School

Created in BioRender.com

**Abbildung 4 Grafiken des Mito-Stress Tests und des glykolytischen Stresstests.** Darstellung des Versuchsablaufes gegen die Zeit. Die Berechnung der Parameter des Mito-Stress Tests und des glykolytischen Stresstests erfolgt durch die Injektion von Oligomycin A, FCCP, Antimycin A, Rotenon und 2-DG.

### 2.2.5.2 Versuchsablauf

Am Vortag des Versuchs wurde die XF-Sensorplatte pro Vertiefung mit 1 ml der Kalibrierungslösung versehen und bei 37 °C ohne CO<sub>2</sub>-Begasung für 24 Stunden inkubiert. Die RAW 264.7 Makrophagen wurden in einer Zellzahl von jeweils 30.000 Zellen in 100 µl Medium pro Vertiefung in eine spezielle XF-Zellkulturplatte ausgesät. Daraufhin erfolgte die Inkubation bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>.

Nach etwa 7 Stunden Inkubation wurde die Lochplatte unter sterilen Bedingungen mit den Testsubstanzen (500 µM Dapson, 100 µM DMF, 500 µM MMF) oder der entsprechenden Medium-Kontrolle versehen und für eine weitere Stunde inkubiert. Anschließend erfolgte die Stimulation der Zellen durch Injektionen von LPS + IFN-γ pro Vertiefung und eine Inkubation der Zellen über Nacht (ca. 14 h). Dabei wurden unstimulierte und unbehandelte Kontrollen berücksichtigt.

Am Versuchstag erfolgte die Vorbereitung des speziellen Versuchsmediums (DMEM Sigma D5030), versetzt mit 4 mM L-Glutamin, 4,5 g/l Glukose und 1 mM Natrium-Pyruvat, pH 7,4, welches zunächst im Wasserbad auf 37 °C erwärmt wurde

und anschließend zur zweimaligen Waschung der Zellen verwendet wurde. Nach dem letzten Waschschrift erfolgte eine einstündige Inkubation (37 °C, ohne CO<sub>2</sub>) der Zellen in 525 µl Medium, versetzt mit der jeweils zu testenden Substanz (500 µM Dapson, 100 µM DMF, 500 µM MMF) bzw. Medium-Kontrolle.

Nach Transfer der Platte in das Analysegerät führte dies eine automatische Kalibrierung durch, die basale Zellaktivität (ECAR/OCR) wurde gemessen und nach einem festen zeitlichen Schema A) Oligomycin A (1 µM), B) FCCP (1,2 µM), C) Antimycin A/Rotenon (1 µM) und D) 2-DG (100 mM) injiziert. Nach Injektion der jeweiligen Substanz folgten 3 Messzyklen mit jeweils einer 3-minütigen Mischphase und einer 2-minütigen Wartephase mit anschließender 3-minütiger Messung.

## 2.2.6 Quantitative Reverse Transkriptase (RT) PCR

### 2.2.6.1 *RNA-Isolierung*

Die Isolierung der mRNA aus den Makrophagen erfolgte gemäß des Herstellerprotokolls (lifetechnologies Trizol<sup>®</sup> Reagent).

Es wurden die mit 500 µM Dapson, 100 µM DMF und 500 µM MMF behandelten und anschließend mit LPS + IFN-γ stimulierten Makrophagen nach 24 Stunden Inkubationszeit verwendet. Um die adhärent wachsenden Zellen in Suspension zu bringen, wurde das Kulturmedium abpipettiert und nach einem Waschschrift mit 1 ml PBS pro Vertiefung 1 ml Trizol pro Vertiefung zur Zellkulturplatte gegeben. Durch mehrfaches Auf- und Abpipettieren wurden die Zellen lysiert und in 2 ml Eppendorf Reaktionsgefäße überführt. Nach Zugabe von 200 µl Chloroform wurden die Reaktionsgefäße für 15 Sekunden auf dem NeoVortex<sup>®</sup> vermischt und für 2-3 Minuten bei Raumtemperatur ruhen gelassen. Anschließend erfolgte die Zentrifugation für 15 Minuten bei 4 °C und 12000 x g. Die wässrige Phase, welche die RNA enthält, wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Es erfolgten die Zugabe von 500 µl Isopropanol und eine 10-minütige Ruhephase bei Raumtemperatur. Anschließend erfolgte eine erneute Zentrifugation bei 4 °C und 12000 x g für 10 Minuten. Der Überstand wurde vorsichtig abpipettiert, auf das verbleibende Pellet 1 ml 75% Ethanol gegeben und bei 4 °C bei 7500 x g für 5 Minuten zentrifugiert. Dieser RNA-Waschschrift wurde erneut wiederholt. Nach Abpipettieren des Überstands wurde das verbliebene Pellet für etwa 20 Minuten

luftgetrocknet. Im letzten Schritt wurden 20 µl RNase-freies Wasser auf das getrocknete Pellet gegeben und die RNA-Konzentration jeder Probe mittels Spektralphotometer bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt.

#### 2.2.6.2 *cDNA-Synthese*

Die Herstellung der cDNA erfolgte mittels des Thermo Scientific RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit. 250 ng der isolierten RNA wurden mit 1 µl des Oligo(dT)<sub>18</sub> Primers und RNase-freiem Wasser auf 12 µl aufgefüllt. Es erfolgte die Zugabe von 8 µl Mastermix (4 µl Reaction Buffer, 1 µl Ribolock, 2 µl dNTP und 1 µl Revertaid Reverse Transkriptase). Mittels Thermocycler wurde die RNA für 60 Minuten bei 42 °C in cDNA umgeschrieben. Die Reaktion wurde bei 70 °C gestoppt und anschließend auf 4 °C heruntergekühlt.

#### 2.2.6.3 *Quantitative RT PCR*

Zur Durchführung der qPCR wurden der SYBR Select MasterMix sowie verschiedene Primer (100 µM) verwendet. Die Primer sind in Tabelle 5 gelistet. Auf eine 96-Lochplatte wurden in Duplikaten jeweils 4 µl einer 1:10 Verdünnung der cDNA gegeben (5 ng cDNA). Als Negativkontrolle wurde RNase-freies Wasser verwendet. Pro Vertiefung wurden jeweils der Vor- und Rückwärtsprimer, SYBR Mastermix und RNase-freies Wasser gegeben und es erfolgte eine kurze Zentrifugation. Die qPCRs wurden mit dem Eppendorf Mastercycler ep Realplex durchgeführt: 50 °C für 2 min, 95 °C für 2 min und anschließend 40 Zyklen von jeweils 15 Sekunden 95 °C und 60 Sekunden 60 °C.

#### 2.2.6.4 *Auswertung*

Die Auswertung der qPCR erfolgte mittels  $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Methode. CT steht für Cycle Threshold und entspricht der Anzahl der PCR-Zyklen, die nötig sind, um ein konstant definiertes Fluoreszenzniveau zu erreichen. Zunächst wurde der Mittelwert der Duplikate genommen. Als Referenzgen wurde *Hprt* verwendet.

$$\Delta\text{CT}(\text{Probe}) = \text{CT}(\text{Gen von Interesse}) - \text{CT}(\text{Referenzgen})$$

$$\Delta\Delta\text{CT} = \Delta\text{CT}(\text{Probe}) - \Delta\text{CT}(\text{unstimulierte Kontrolle})$$

### 2.3 Statistik

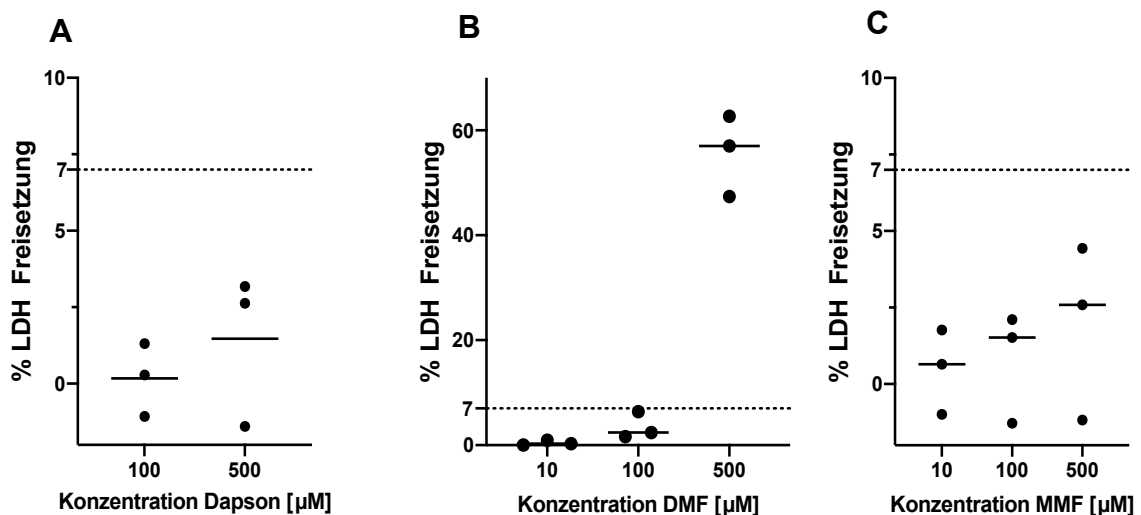
Die Bearbeitung der erhobenen Daten erfolgte mittels Microsoft Excel für Microsoft. Die Erstellung der Graphen und die statistische Auswertung der Daten wurden mit GraphPad Prism 9 durchgeführt. Soweit nicht anders angegeben, sind die Daten als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung (SD) dargestellt. Das Signifikanzniveau wurde mit  $p < 0,05$  festgelegt. Die Gruppen wurden mittels One- oder Two-way ANOVA mit Holm-Sidak's multiple comparisons test oder Dunnet's multiple comparisons test verglichen. Als Text Editor wurde Microsoft Word für Mac verwendet.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Zytotoxizität der Testsubstanzen

Zum Ausschluss einer zytotoxischen Wirkung der Testsubstanzen auf die Makrophagen, wurde ein LDH-Zytotoxizitätstest durchgeführt. Bei einem Zelluntergang kommt es durch einen Bruch in der Membran zur Freisetzung des im Zytosol befindlichen Enzyms Laktatdehydrogenase (LDH) in den Zellüberstand. Zur Durchführung des Versuchs wurden die Makrophagen mit der jeweiligen Testsubstanz behandelt und anschließend mit LPS + IFN- $\gamma$  stimuliert. Nach 6 Stunden Inkubationszeit wurde die LDH-Freisetzung in Prozent im Zellüberstand ermittelt. Der Cut-Off Wert wurde durch den Hersteller bei 7 % gesetzt.

Die verwendeten Konzentrationen von Dapson (Abb. 5A) und MMF (Abb. 5C) zeigen jeweils keine LDH-Erhöhung über den Cut-Off-Wert von 7%. Die LDH-Freisetzung von DMF in den Konzentrationen 10  $\mu$ M und 100  $\mu$ M liegt ebenfalls unterhalb des Cut-off-Wertes. Hingegen führt eine Konzentration von 500  $\mu$ M DMF zu einer Überschreitung des Cut-off-Wertes und somit laut Test zu einer toxischen Wirkung auf das Zellkultursystem (Abb. 5B).



**Abbildung 5 Zytotoxizität verschiedener Konzentrationen der Testsubstanzen Dapson, DMF und MMF.** Pierce-LDH-Zytotoxizität Assay. Die stimulierten Makrophagen wurden jeweils mit **A)** Dapson [100  $\mu$ M, 500  $\mu$ M], **B)** DMF [10  $\mu$ M, 100  $\mu$ M, 500  $\mu$ M] und **C)** MMF [10  $\mu$ M, 100  $\mu$ M, 500  $\mu$ M] behandelt. Die Darstellung der LDH-Konzentration erfolgt in Prozent zur maximalen LDH-Freisetzung bei kompletter Zellyse. n=3. Cut-off Wert=7 %.

### **3.2 Einfluss der Testsubstanzen auf immunologische Phänotypen der RAW 264.7 Makrophagen**

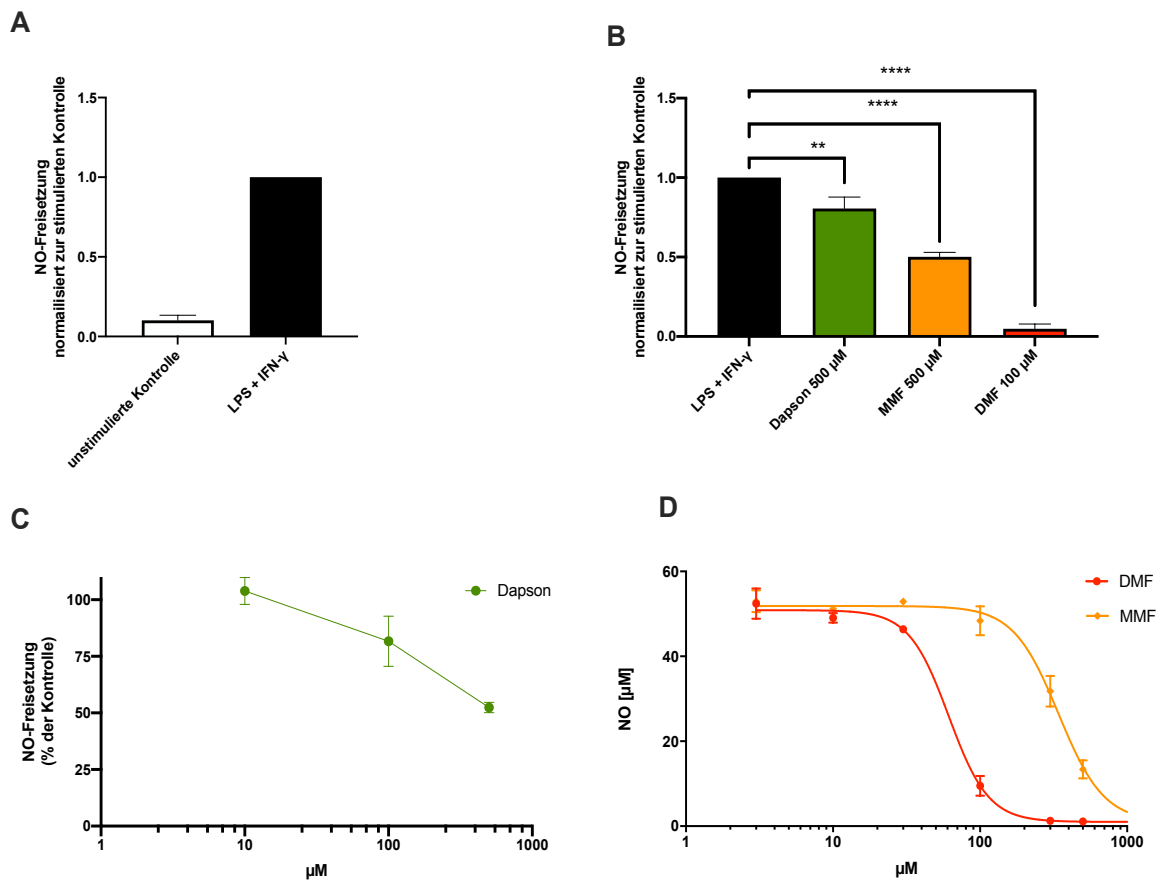
#### **3.2.1 Stickstoffmonoxid-Freisetzung**

Durch die Stimulation mit LPS + IFN- $\gamma$  können Makrophagen aktiviert und in den proinflammatorischen M1-Phänotypen überführt werden. M1-Makrophagen setzen durch eine erhöhte Expression der induzierbaren Stickstoffmonoxid-Synthase (iNOS) vermehrt Stickstoffmonoxid frei (64). M2-Makrophagen setzen hingegen kein Stickstoffmonoxid frei. Das in den Zellkulturüberstand freigesetzte Stickstoffmonoxid kann somit als Messwert der inflammatorischen Aktivität der Makrophagen herangezogen werden.

Dazu wurden die Makrophagen mit den Testsubstanzen Dapson, DMF und MMF in verschiedenen Konzentrationen behandelt und anschließend mit LPS + IFN- $\gamma$  stimuliert. Das freigesetzte Stickstoffmonoxid im Zellkulturüberstand wurde mittels der Griess-Reaktion (Abb. 3) nach 6 Stunden Inkubationszeit quantifiziert.

In der Gegenüberstellung der unstimulierten Makrophagen mit den LPS + IFN- $\gamma$  stimulierten Makrophagen zeigt sich wie erwartet eine erhöhte NO-Freisetzung der stimulierten Makrophagen (Abb. 6A). Außerdem wurde der Einfluss der Testsubstanzen Dapson, DMF und MMF auf die NO-Freisetzung quantifiziert (Abb. 6B). Es zeigt sich jeweils eine signifikante Reduktion der NO-Freisetzung in den Zellkulturüberstand durch die mit 500  $\mu$ M Dapson, 100  $\mu$ M DMF und 500  $\mu$ M MMF behandelten Makrophagen. Dabei zeigt sich eine dosisabhängige Inhibition durch die verschiedenen Dapson-Konzentrationen 10-500  $\mu$ M (Abb. 6C). Abbildung 6D zeigt die Verschiebung der inhibitorischen Konzentration entlang der X-Achse verglichen zwischen DMF und MMF.

Die jeweiligen Testsubstanzen Dapson, DMF und MMF zeigen also zusammenfassend eine dosisabhängige signifikante Inhibition der Stickstoffmonoxid-Freisetzung.



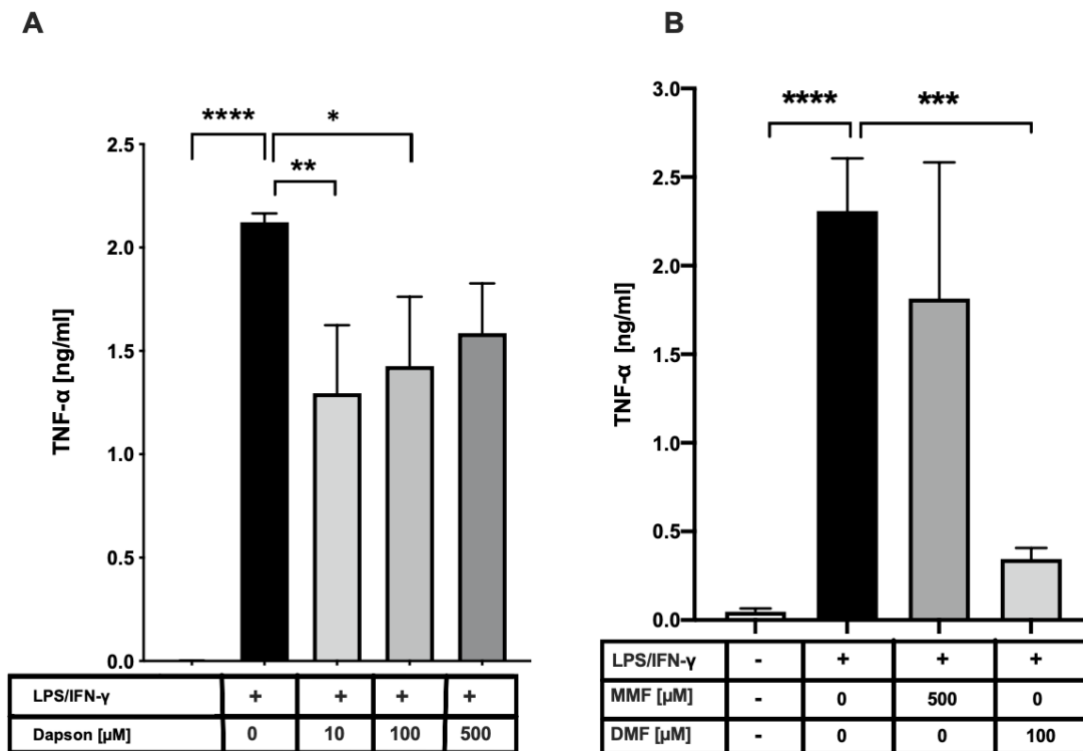
**Abbildung 6** Signifikante Inhibition der NO-Freisetzung in stimulierten RAW 264.7 Makrophagen nach Behandlung mit 500  $\mu$ M Dapson, 100  $\mu$ M DMF und 500  $\mu$ M MMF. Inhibitorischer Effekt von DMF und MMF.

Die Menge des Stickstoffmonoxids im Zellkulturüberstand wurde mithilfe der Griess-Reaktion ermittelt. Die RAW 264.7 Makrophagen wurden jeweils für 1 Stunde mit 500  $\mu$ M Dapson, 100  $\mu$ M DMF oder 500  $\mu$ M MMF inkubiert und mit LPS + Interferon- $\gamma$  stimuliert (B). Es erfolgte eine Normalisierung gegen die stimulierte Kontrolle. Die Ergebnisse in B werden als Mittelwert und Fehler SD dargestellt. n=3 Die Analyse erfolgte mittels ONE-way ANOVA mit Dunnet's multiple comparison test. p-Werte \* p <=0.05, \*\* p <=0.01, \*\*\* p <= 0.001

### 3.2.2 TNF- $\alpha$ Ausschüttung

TNF- $\alpha$  ist ein proinflammatorisches Zytokin, welches von inflammatorischen M1-Makrophagen freigesetzt wird und die Phagozytose stimuliert. Um die TNF- $\alpha$  Ausschüttung der RAW 264.7 Makrophagen im Zellkulturüberstand zu quantifizieren, wurde ein ELISA durchgeführt. Es wurden die TNF- $\alpha$  Konzentrationen in den Zellkulturüberständen der Makrophagen bestimmt, welche mit Dapson in den Konzentrationen von 10 – 500  $\mu$ M, 500  $\mu$ M MMF und 100  $\mu$ M DMF behandelt und anschließend für 6 Stunden mit LPS + IFN- $\gamma$  stimuliert wurden.

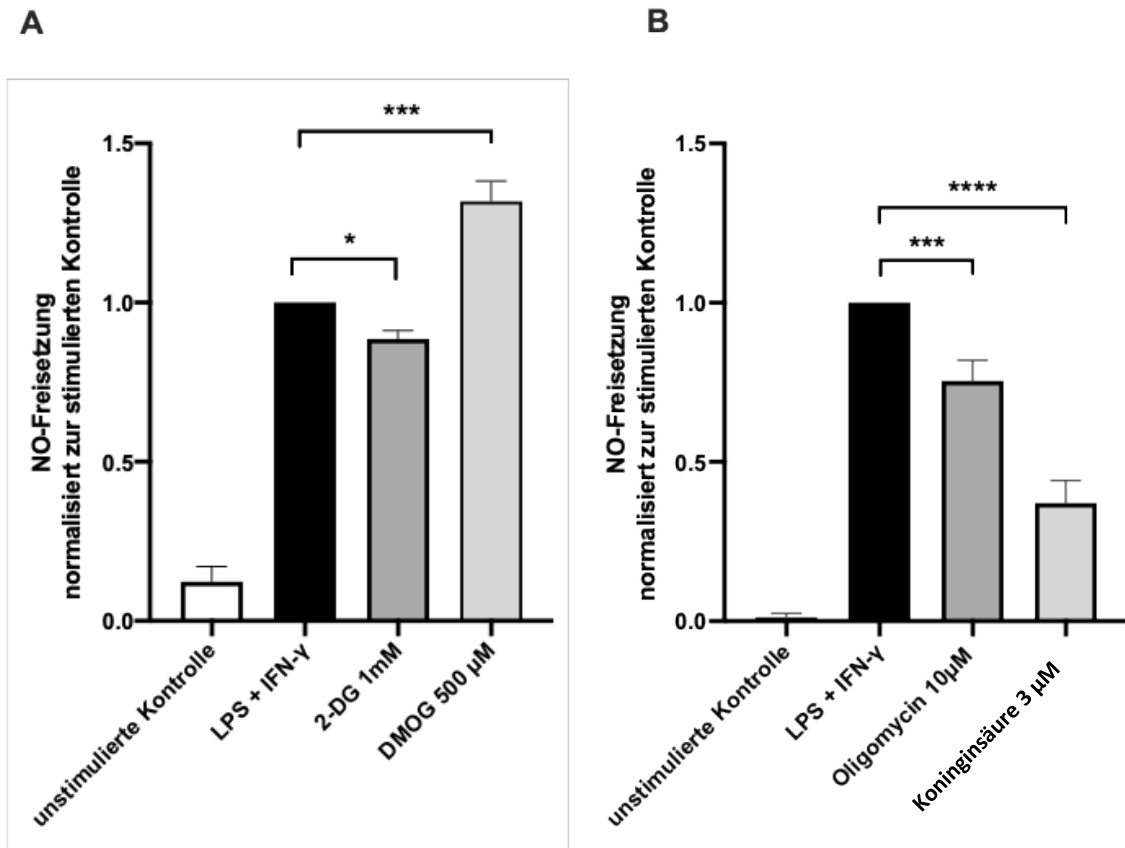
Es zeigt sich eine signifikante Erhöhung der TNF- $\alpha$  Ausschüttung in den LPS + IFN- $\gamma$  stimulierten Makrophagen im Gegensatz zu den nicht stimulierten Zellen (Abb. 7). Ebenso zeigt sich eine signifikante Reduktion der TNF- $\alpha$  Freisetzung in den mit Dapson (10 und 100  $\mu$ M) stimulierten Makrophagen im Vergleich zur stimulierten Kontrolle. Allerdings führt eine Erhöhung der Dapson-Konzentration nicht zu einem stärkeren inhibitorischen Effekt auf die TNF- $\alpha$  Ausschüttung (Abb. 7A). Zudem zeigt sich eine signifikante Reduktion der TNF- $\alpha$  Freisetzung nach Behandlung mit 100  $\mu$ M DMF (Abb. 7B). Es lässt sich ein Trend für die Konzentrationsabnahme des freigesetzten TNF- $\alpha$  in den mit MMF stimulierten Makrophagen beobachten, die sich allerdings nicht als signifikant erweist (Abb. 7B).



**Abbildung 7 Einfluss von Dapson (A), DMF und MMF (B) auf die TNF- $\alpha$  Ausschüttung in LPS + IFN- $\gamma$  stimulierten RAW 264.7 Makrophagen.** Die Konzentration von TNF- $\alpha$  in ng/ml in den Zellüberständen der Makrophagen wurde mittels TNF- $\alpha$  ELISA bestimmt. Die Ergebnisse werden als Mittelwert  $\pm$  SD dargestellt. n=3. Die Daten wurden mittels ONE-way ANOVA Dunnetts multiple comparisons test analysiert. p-Werte \* p  $\leq$  0.05, \*\* p  $\leq$  0.01, \*\*\* p  $\leq$  0.001

### **3.3 Beeinflussung der Immunantwort durch metabolische Modulatoren**

Um zu quantifizieren, wie sich die Veränderung bestimmter Stoffwechselwege auf die Immunreaktion der RAW 264.7 Makrophagen auswirkt, wurde der Einfluss gezielter metabolischer Modulatoren auf die Stickstoffmonoxid-Freisetzung getestet. Dazu wurden 2-DG (Glykolyse-Inhibitor), DMOG (HIF-1 $\alpha$ -Aktivator), Oligomycin A (Inhibitor der ATP-Synthase) und Koninginsäure (GAPDH-Inhibitor) verwendet. Die Substanzen sind in Tabelle 8 gelistet. Zur Vorbereitung wurden die Zellen mit den jeweiligen Modulatoren inkubiert und anschließend mit LPS + IFN- $\gamma$  stimuliert. Die Menge des freigesetzten Stickstoffmonoxids wurde mittels des NO Griess Assays bestimmt. Es zeigt sich, dass 1mM 2-DG, also eine Inhibition der Glykolyse, zu einer signifikanten Erniedrigung der NO-Konzentration im Zellkulturüberstand im Vergleich zur LPS + IFN- $\gamma$  stimulierten Kontrolle führt (Abb. 8A). Auch die Behandlung mit 10  $\mu$ M Oligomycin A und 3  $\mu$ M Koninginsäure (Abb. 8B) führt zu einer signifikanten Reduktion der NO-Freisetzung. Die mit 500  $\mu$ M DMOG behandelten Zellen, weisen hingegen eine signifikant höhere NO-Konzentration im Zellkulturüberstand auf (Abb. 8B).



**Abbildung 8 Beeinflussung der NO-Freisetzung durch metabolische Modulatoren in LPS + IFN- $\gamma$  stimulierten Makrophagen.** Die Menge des freigesetzten NO im Zellkulturüberstand wurde mithilfe der Griess-Reaktion ermittelt. Die RAW 264.7 Makrophagen wurden jeweils für 1 Stunde mit 1 mM 2-DG und 500  $\mu$ M DMOG (A) behandelt und für 6 h mit LPS + Interferon- $\gamma$  stimuliert sowie für 1 h mit 10  $\mu$ M Oligomycin A und 3  $\mu$ M Königinsäure inkubiert und anschließend für 12 h mit LPS + Interferon- $\gamma$  stimuliert (B). Es erfolgte eine Normalisierung gegen die stimulierte Kontrolle. Die Ergebnisse werden als Mittelwert und Fehler SD dargestellt. n=3 Die Analyse erfolgte mittels ONE-way ANOVA mit Dunnet's multiple comparison test. p-Werte \* p <=0.05, \*\* p <=0.01, \*\*\* p <= 0.001

### 3.4 Einfluss der Testsubstanzen auf den Makrophagen Metabolismus

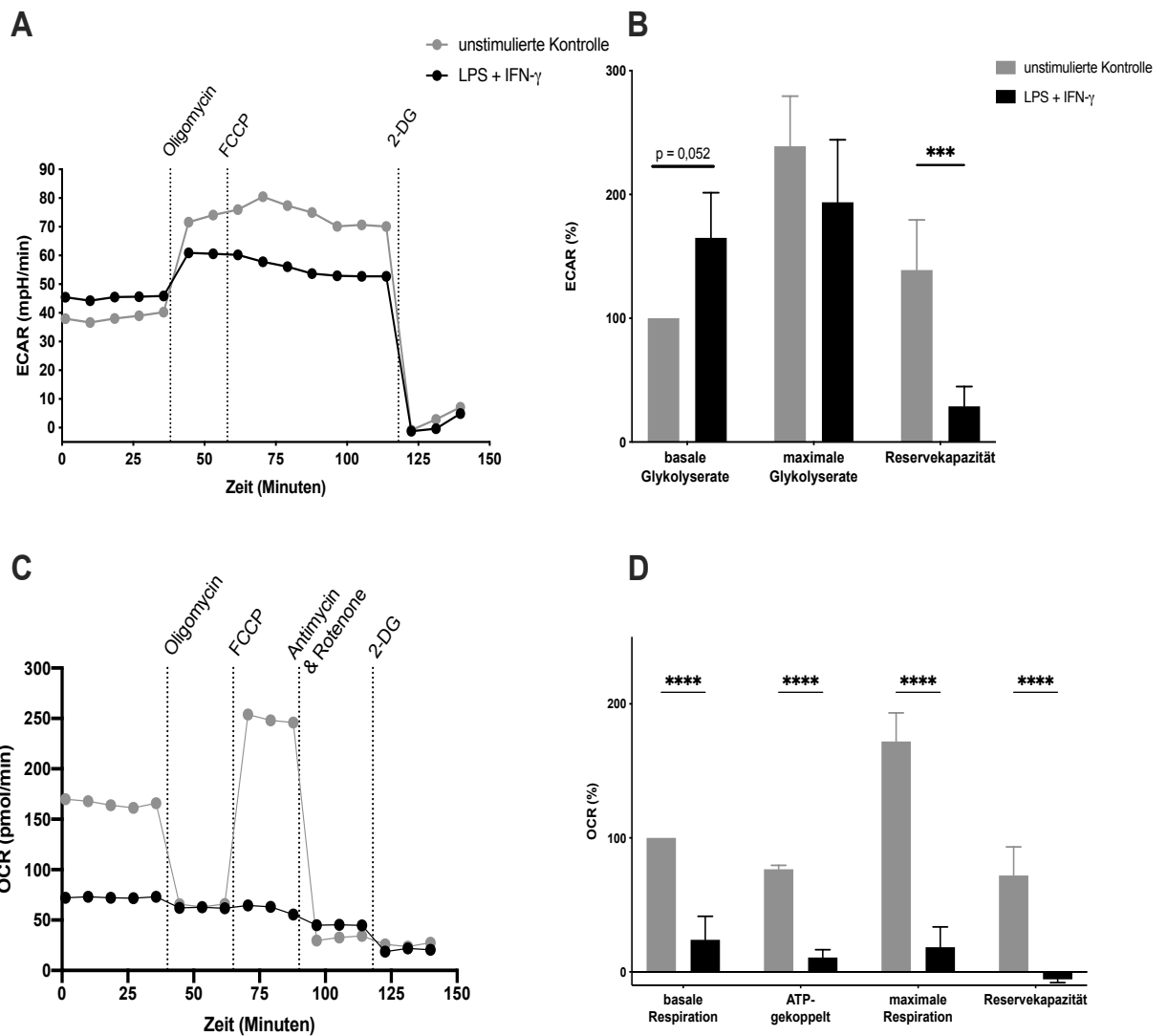
#### 3.4.1 Metabolische Aktivität von RAW 264.7 Makrophagen als Antwort auf LPS + IFN- $\gamma$ Stimulation

Um die metabolische Aktivität und Veränderungen des Stoffwechsels der RAW 264.7 Makrophagen als Antwort auf die Stimulation mit LPS + IFN- $\gamma$  zu erfassen, erfolgte die Analyse mittels Seahorse Bioscience Extracellular Flux Analyzer. Die extrazelluläre Ansäuerungsrate (ECAR) wird als Indikator für die glykolytische Aktivität der Makrophagen verwendet. Die Sauerstoffverbrauchsrate (OCR) wird als Indikator für die mitochondriale Respiration über die Zeit gemessen (Abb. 9). Zu festgelegten Zeitpunkten erfolgte im Versuchsablauf die Injektion der metabolischen

Substrate und Inhibitoren Oligomycin A, FCCP, Antimycin A, Rotenon und 2-DG, um Rückschlüsse auf die Stoffwechselaktivität der Makrophagen zu ziehen.

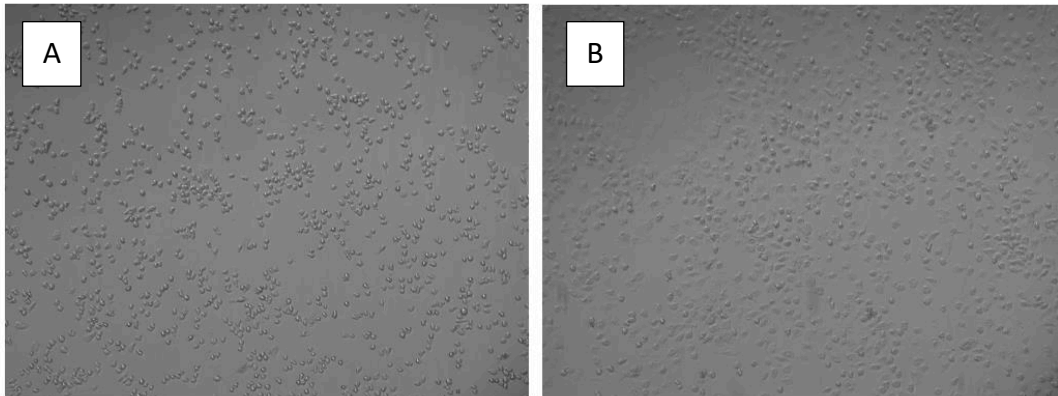
Die Abbildungen 9A und C zeigen jeweils die Messungen der OCR und ECAR in Echtzeit. Die Injektion des ATP-Synthase-Inhibitors Oligomycin führt zu einem Abfall der mitochondrialen Respiration (OCR) und gleichzeitigem Anstieg der Glykolyserate (ECAR). Nach weiteren 3 Messzyklen erfolgt die Injektion von FCCP. FCCP ist ein Entkoppler der Atmungskette, welcher das mitochondriale Membranpotential abbaut und somit einen maximalen Sauerstoffverbrauch erzwingt, ohne jedoch die ATP-Synthese anzutreiben. Die OCR in den unstimulierten Makrophagen steigt als Reaktion auf die FCCP Injektion maximal an (Abb. 9C). Auch die ECAR in der unstimulierten Kontrolle steigt zunächst leicht an. Die Injektion von Antimycin (inhibiert Komplex I der Atmungskette) und Rotenon (inhibiert Komplex III) führt anschließend zu einem Abfall der Sauerstoffverbrauchsrate. Als letzten Schritt führt die Injektion des Glykolyseinhibitors 2-DG zu einem Abfall der glykolytischen Aktivität (ECAR). Diese Aufzeichnung erlaubt gemäß des in Abbildung 4 dargestellten Schemas eine Berechnung der glykolytischen und respiratorischen Parameter.

Unter basalen Bedingungen weisen die stimulierten Makrophagen eine höhere Glykolyserate ( $p = 0,052$ ) als die unstimulierten Makrophagen auf (Abb. 9A/B). Außerdem zeigt sich eine signifikant niedrigere basale Sauerstoffverbrauchsrate und somit mitochondriale Respiration in den LPS + IFN- $\gamma$  stimulierten Makrophagen sowie eine signifikant niedrigere maximale Respiration (Abb. 9C/D). Zudem zeigen die unstimulierten Makrophagen eine signifikant höhere ATP-Produktion als die stimulierten Makrophagen sowie eine signifikant höhere Reservekapazität, um Sauerstoff zu nutzen.



**Abbildung 9 Einfluss von LPS + IFN- $\gamma$  auf die metabolische Aktivität der RAW 264.7 Makrophagen.** Die glykolytische Aktivität (Extracellular Acidification Rate ECAR) (**A-B**) und die respiratorische Aktivität (Oxygen consumption rate OCR) (**C-D**) der RAW 264.7 Makrophagen wurde in An- und Abwesenheit von LPS + IFN- $\gamma$  mittels des metabolischen Analysegeräts (Seahorse Bioscience Extracellular Flux Analyzer) gemessen. Darstellung des Versuchsablaufes gegen die Zeit (**A und C**). Die gestrichelten Linien stellen die Injektion der metabolischen Modulatoren dar, welche die Berechnung der glykolytischen und respiratorischen Parameter (**B und D**) ermöglichen. (**C**) und (**D**) wurden normalisiert nach basalem Stoffwechsel der unstimulierten Kontrolle. Die Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwert  $\pm$  SD. n=4 Analyse mittels two-way ANOVA Holm-Sidak's multiple comparison test.

Auch morphologisch fällt ein Unterschied zwischen den Makrophagen vor und nach Stimulation auf. Nach Stimulation ist eine leichte Größenzunahme sowie Änderung der Form von rundlichen adhärennten Zellen zu spindelförmigen Ausläufern zu beobachten (Abb. 10 A/B).



**Abbildung 10 Morphologie der RAW 264.7 Makrophagen vor und nach Stimulation mit LPS + IFN- $\gamma$**

A: RAW 264.7 Makrophagen ohne Stimulation, B: RAW 264.7 Makrophagen nach Stimulation mit LPS und IFN- $\gamma$

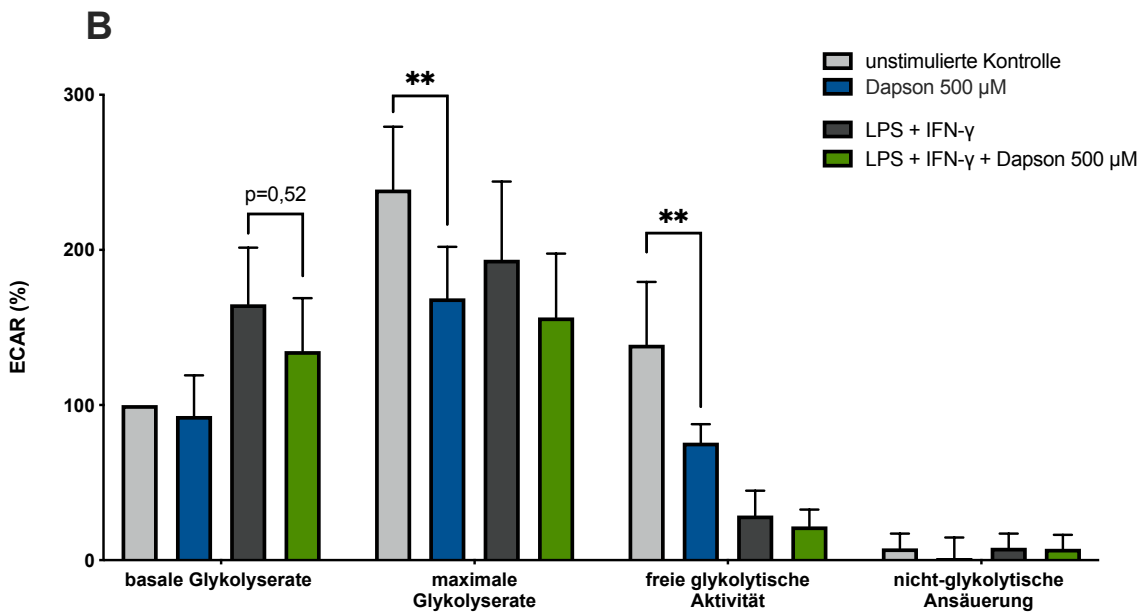
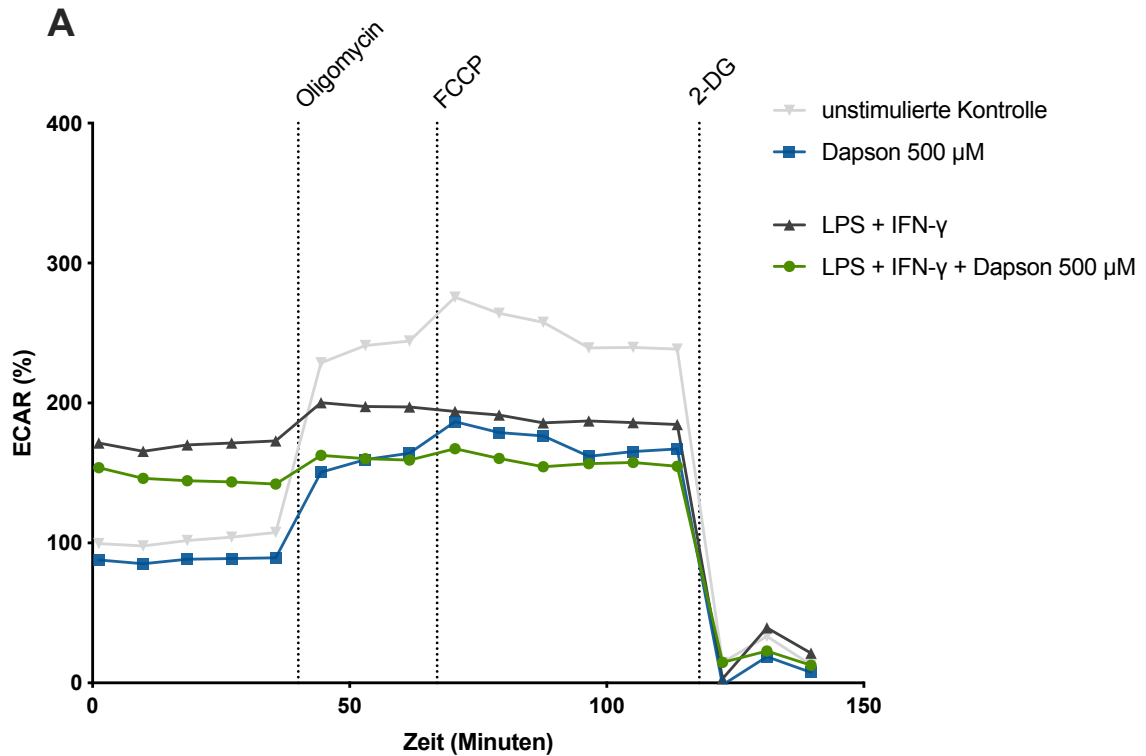
### 3.4.2 Beeinflussung der glykolytischen Aktivität durch Dapson, DMF und MMF

Um den Einfluss der Testsubstanzen auf die Stoffwechselwege der Makrophagen zu quantifizieren, wurden die Zellen mit LPS + IFN- $\gamma$  stimuliert und sowohl die unstimulierte Kontrolle als auch die LPS + IFN- $\gamma$  stimulierten Zellen mit der jeweiligen Testsubstanz 500  $\mu$ M Dapson (Abb. 11) und 100  $\mu$ M DMF sowie 500  $\mu$ M MMF (Abb. 13) behandelt. Anschließend erfolgte mittels des XF Flux Analyzers die Injektion der Substrate und Inhibitoren, sodass die extrazelluläre Ansäuerungsrate über die Zeit hinweg aufgezeichnet wurde und Rückschlüsse auf die glykolytische Aktivität der Makrophagen zuließ (Abb. 11A). Die Messung der Sauerstoffverbrauchsrate ließ Rückschlüsse auf die mitochondriale Aktivität der mit Dapson behandelten Makrophagen zu (Abb. 12).

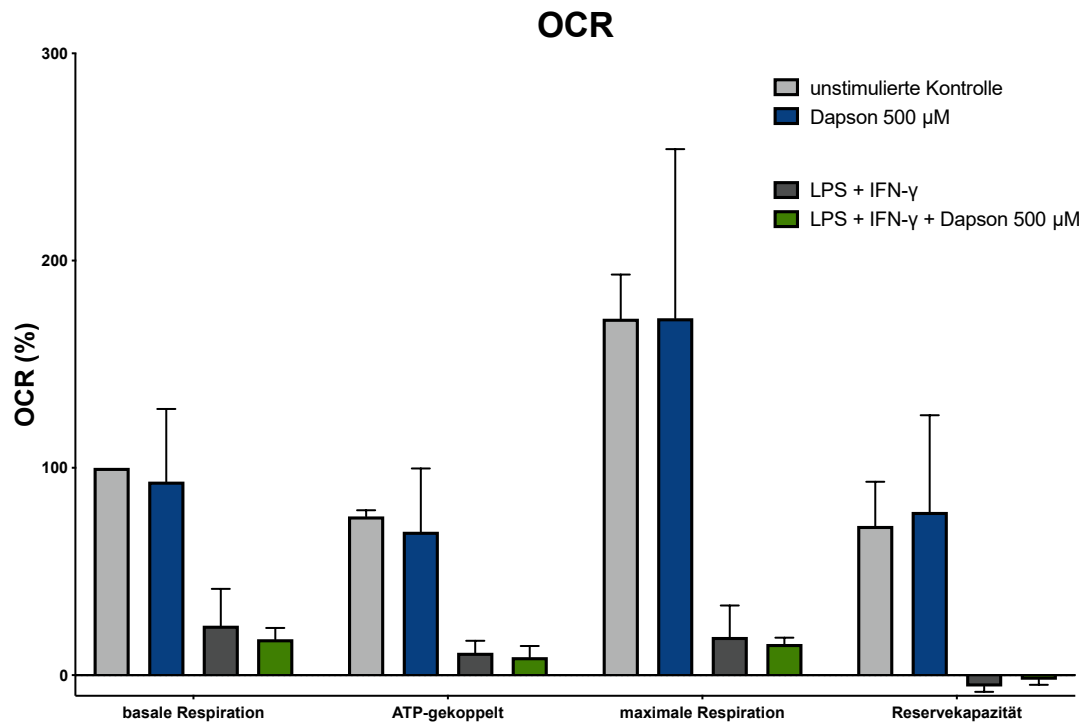
Im dargestellten Versuchsablauf über die Zeit befindet sich die glykolytische Aktivität der mit Dapson behandelten Zellen insgesamt auf einem niedrigeren Niveau als die der nicht behandelten Zellen (Abb. 11A). Die Behandlung der RAW 264.7 Makrophagen mit 500  $\mu$ M Dapson führt im Vergleich zur LPS + IFN- $\gamma$

stimulierten Kontrolle zu einer nicht signifikanten Senkung der basalen Glykolyserate ( $p=0.52$ ) (Abb. 11B). Weiterhin sind signifikante Veränderungen der maximalen Glykolyserate in den 500  $\mu\text{M}$  Dapson behandelten Makrophagen im Vergleich zu den unbehandelten Zellen zu beobachten. Zudem führt die Behandlung mit 500  $\mu\text{M}$  Dapson im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle zu einer signifikanten Senkung der freien glykolytischen Aktivität.

Die Behandlung der Makrophagen mit 500  $\mu\text{M}$  Dapson führt zu keiner signifikanten Veränderung der mitochondrialen Aktivität (Abb. 12).



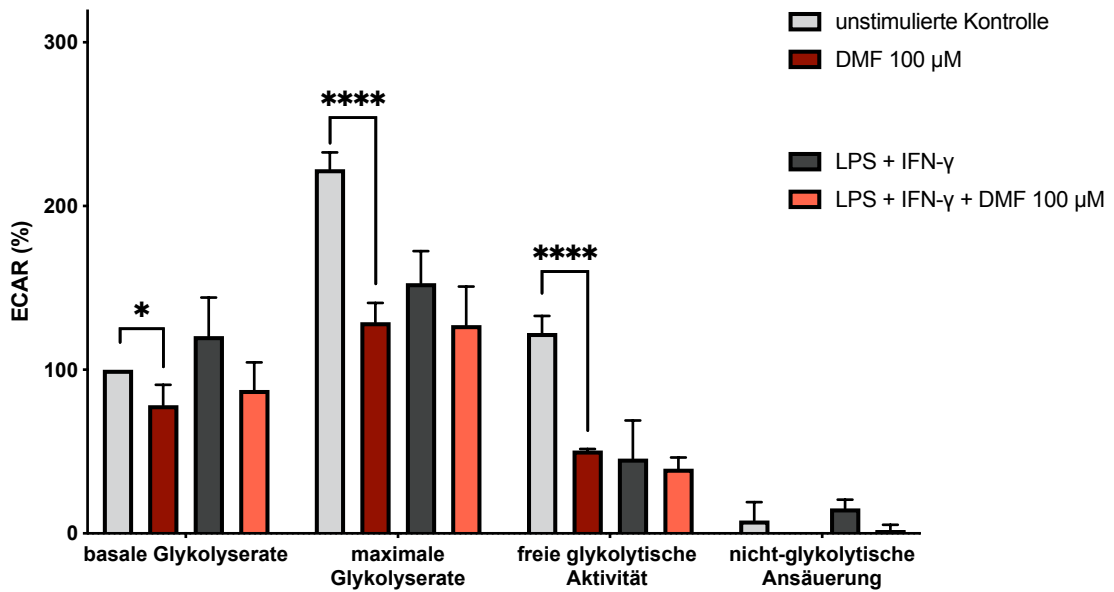
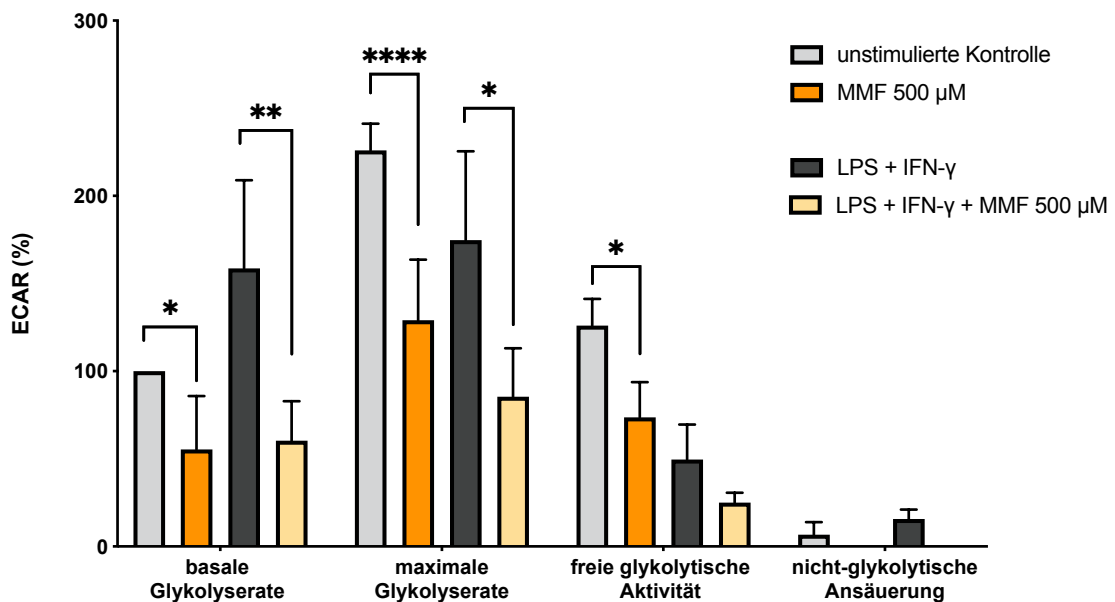
**Abbildung 11 Einfluss von Dapson auf die glykolytische Aktivität von RAW 264.7 Makrophagen.** Die glykolytische Aktivität (Extracellular Acidification Rate ECAR) der unstimulierten und LPS + IFN-γ stimulierten RAW 264.7 Makrophagen wurde in An- und Abwesenheit von 500 µM Dapson mittels des metabolischen Analysegeräts (Seahorse Bioscience Extracellular Flux Analyzer) gemessen. **A)** Darstellung des Versuchsablaufes gegen die Zeit **B)** Berechnung der glykolytischen Parameter. Es erfolgte eine Normalisierung nach basaler Glykolyserate der unstimulierten Kontrolle. Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwert ± SD. n=4 Analyse mittels two-way ANOVA Holm-Sidak's multiple comparison test.



**Abbildung 12 Einfluss von Dapson auf die mitochondriale Aktivität von RAW 264.7 Makrophagen.** Die mitochondriale Respiration (Oxygen Consumption Rate) der unstimulierten und LPS + IFN- $\gamma$  stimulierten RAW 264.7 Makrophagen wurde in An- und Abwesenheit von 500  $\mu$ M Dapson mittels des metabolischen Analysegeräts (Seahorse Bioscience Extracellular Flux Analyzer) gemessen. Es erfolgte die Berechnung der respiratorischen Parameter. Normalisierung nach basaler Respiration der unstimulierten Kontrolle. Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwert  $\pm$  SD. n=4 Analyse mittels two-way ANOVA Holm-Sidak's multiple comparison test.

Abbildung 13 A stellt den Einfluss der Testsubstanz 100  $\mu$ M DMF auf die Stoffwechselaktivität der RAW 264.7 Makrophagen dar. Verglichen mit der unstimulierten Kontrolle weisen die mit 100  $\mu$ M DMF behandelten Makrophagen eine signifikant reduzierte basale Glykolyserate auf. Ebenso lässt sich eine signifikant erniedrigte maximale Glykolyserate sowie freie glykolytische Aktivität der mit 100  $\mu$ M DMF behandelten Zellen im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle erkennen.

Die mit 500  $\mu$ M MMF behandelten Zellen weisen sowohl verglichen mit der nicht stimulierten Kontrolle als auch mit der LPS + IFN- $\gamma$  stimulierten Kontrolle eine signifikant niedrigere basale Glykolyserate auf (Abb. 13B). Außerdem führt die Behandlung mit 500  $\mu$ M MMF zu einer signifikanten Reduktion der maximalen Glykolyserate.

**A****B**

**Abbildung 13 Einfluss von DMF und MMF auf die metabolische Aktivität von RAW 264.7 Makrophagen**  
 Die glykolytische Aktivität (Extracellular Acidification Rate ECAR) der unstimulierten und LPS + IFN- $\gamma$  stimulierten RAW 264.7 Makrophagen wurde in An- und Abwesenheit von **A)** 100  $\mu$ M DMF und **B)** 500  $\mu$ M MMF mittels des metabolischen Analysegeräts (Seahorse Bioscience Extracellular Flux Analyzer) gemessen. Es erfolgte eine Normalisierung nach basaler Glykolyserate der unstimulierten Kontrolle. Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwert  $\pm$  SD. n=3 Analyse mittels two-way ANOVA Holm-Sidak's multiple comparison test.

### 3.5 Regulation der mRNA-Expression

Um weiter zu quantifizieren, ob durch die Testsubstanzen Dapson, DMF und MMF eine Regulation einzelner Enzyme und inflammatorischer Marker auf mRNA-Ebene erfolgt, wurde eine qPCR durchgeführt.

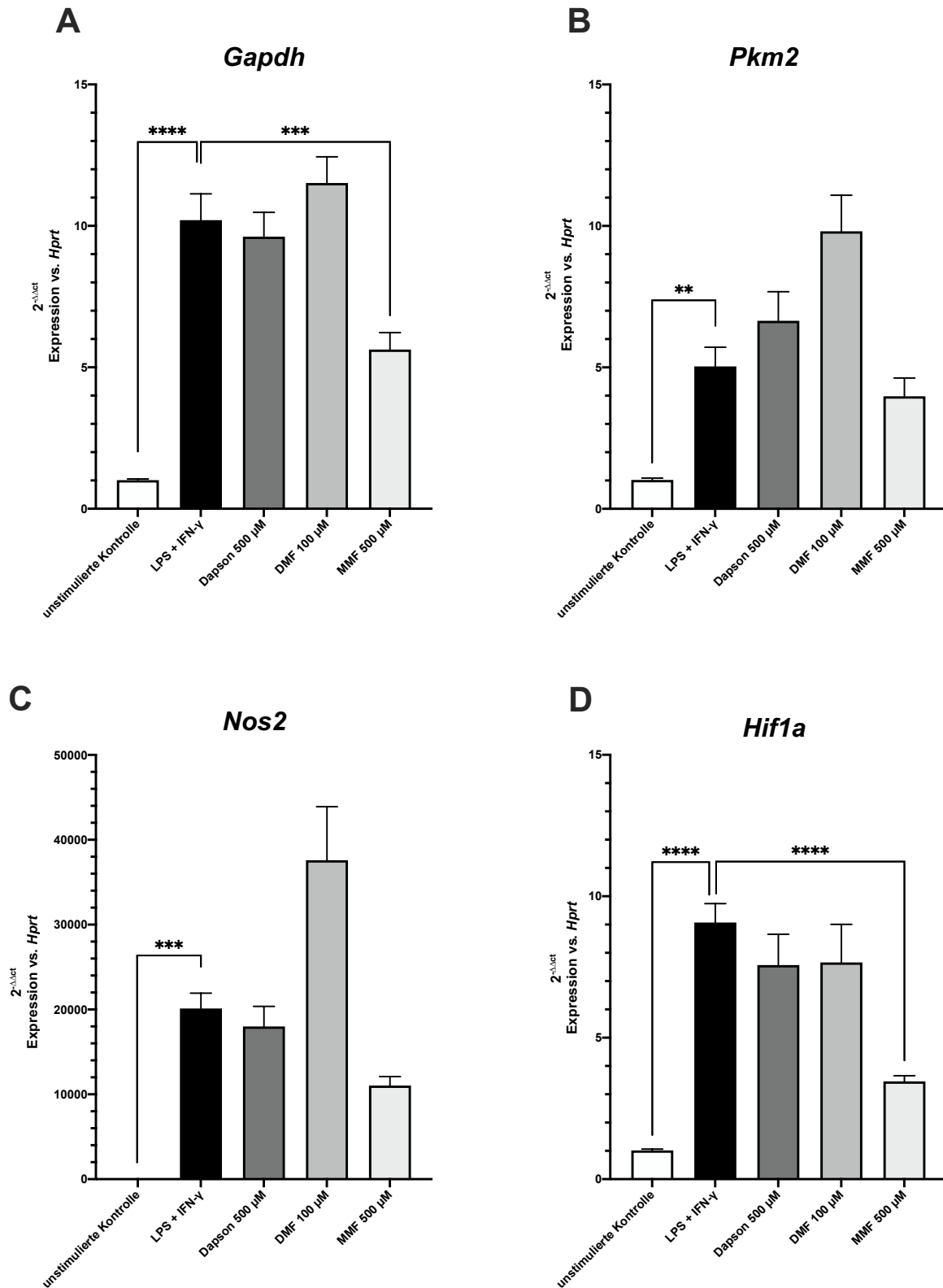
Näher betrachtet wurde die Expression von *Gapdh* und *Pkm2*, welche für Schlüsselenzyme der Glykolyse codieren. Außerdem wurden die inflammatorischen Marker iNOS (*Nos2*) und HIF-1 $\alpha$  gewählt.

Dazu wurden die Makrophagen mit 500  $\mu$ M Dapson, 100  $\mu$ M DMF oder 500  $\mu$ M MMF behandelt und anschließend die mRNA-Expression nach 24 Stunden Inkubationszeit mit LPS + IFN- $\gamma$  gemessen. Zudem wurden eine unstimulierte und stimulierte Kontrolle verwendet. Als Referenzgen wurde *Hprt* verwendet und es erfolgte eine Normalisierung zur unstimulierten und unbehandelten Kontrolle.

Die mRNA-Expression von *Gapdh* und *Pkm2* erweist sich in den LPS + IFN- $\gamma$  stimulierten Makrophagen im Vergleich zu den unstimulierten Zellen signifikant hochreguliert (Abb. 14A/B). Die mit 500  $\mu$ M MMF behandelten Zellen weisen eine signifikante Reduktion der mRNA-Expression des Enzyms *Gapdh* im Vergleich zur stimulierten Kontrolle auf (Abb. 14A). Ebenso führt die Zugabe von 500  $\mu$ M MMF zu einer Reduktion der Expression von *Pkm2*, welche jedoch nicht signifikant ist (Abb. 14B). Die beiden Testsubstanzen Dapson und DMF führen zu keiner signifikanten Änderung der mRNA-Expression der beiden Enzyme.

Die mRNA-Expression des Markers iNOS ist signifikant hochreguliert in der stimulierten Kontrolle im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle (Abb. 14C). Es zeigt sich eine Tendenz der Runterregulation der mRNA-Expression jeweils in den Dapson und MMF behandelten Makrophagen. Diese ist jedoch nicht signifikant.

Die Expression der HIF-1 $\alpha$ -mRNA wird in den stimulierten Makrophagen im Vergleich zur nicht stimulierten Kontrolle signifikant hochreguliert (Abb. 14D). Nach Behandlung mit 500  $\mu$ M MMF zeigt sich eine signifikante Reduktion der mRNA-Expression von HIF-1 $\alpha$  (Abb. 14D). Es zeigt sich eine Tendenz der verminderten mRNA-Expression durch die 500  $\mu$ M Dapson und 100  $\mu$ M DMF behandelten Makrophagen für HIF-1 $\alpha$ . Diese ist jedoch nicht signifikant.



**Abbildung 14** Einfluss der Testsubstanzen auf die mRNA-Expression von *Gapdh*, *Pkm2*, *Nos2* und *Hif1a* im Vergleich zur stimulierten Kontrolle. RT qPCR. mRNA-Expression von *Gapdh*, *Pkm2*, *Nos2* und *Hif1a* mittels qPCR quantifiziert und mittels Delta-Delta-Ct Methode (Referenzgen *Hprt*) normalisiert. Darstellung der Ergebnisse erfolgt als Mittelwert  $\pm$  SEM.  $n=4$ . Die Daten wurden mittels One-Way-Anova mit Dunnett's multiple comparisons analysiert. p-Werte \*  $p \leq 0.05$ , \*\*  $p \leq 0.01$ , \*\*\*  $p \leq 0.001$ , \*\*\*\*  $p \leq 0.0001$

## 4 Diskussion

In dieser Arbeit wurde der Einfluss vielversprechender immunmodulatorischer Substanzen auf die Immunantwort und den Metabolismus von Monozyten getestet. Dazu wurde ein Makrophagen-Zellkultursystem verwendet. Makrophagen spielen eine zentrale Rolle in sowohl pro- als auch antiinflammatorischen Immunreaktionen und gelten als sehr plastische Zellen, deren Funktion und Aktivität maßgeblich durch ihren Zellmetabolismus beeinflusst werden (21). Jüngste Erkenntnisse über die wechselseitige Beziehung zwischen Immunantwort und den damit einhergehenden spezifischen Veränderungen von Stoffwechselwegen lassen die Zellen zu einem geeigneten System für die immunmetabolische Forschung werden (65).

Die zentrale Bedeutung von Stoffwechseleränderungen in der Funktionsweise von Makrophagen verdeutlicht, dass Interventionen auf metabolischer Ebene weitreichende Auswirkungen auf das entzündliche Potential von Makrophagen, bzw. Immunzellen im Allgemeinen haben können. Dabei variiert die Bedeutung einzelner Stoffwechselwege zwischen verschiedenen Immunzellpopulationen und es ist nicht a priori abschätzbar, ob sich gezielte metabolische Manipulationen erfolgreich auf eine Entzündungsreaktion auswirken. Auch wird häufig nicht untersucht, ob entzündliche Reaktionen von Immunzellen mit Veränderungen des Stoffwechsels einhergehen und es ist häufig noch nicht bekannt, ob die metabolische Komponente kritisch für die Effektorfunktion der Zelle ist. Es ist also sinnvoll zu untersuchen, ob Wirkungsweisen von Immunmodulatoren in Teilen und/oder in Gänze auf unbekanntem Wirkungen des Zellmetabolismus basieren.

Neben seinem ursprünglichen Einsatz als bakteriostatisch wirksame Substanz in der Behandlung der Lepra wird Dapson seit Jahren als entzündungshemmendes Medikament in der Behandlung zahlreicher Hauterkrankungen eingesetzt (45). Dabei sind die immunmodulierenden und möglicherweise metabolischen Wirkmechanismen der Substanz nach wie vor nicht ausreichend bekannt, sodass wir Dapson als vielversprechende Substanz in unserem Zellkultursystem testeten. Als weiteres Beispiel wurden der entzündungshemmende Wirkstoff DMF und sein aktiver Metabolit MMF verwendet. DMF ist zur Therapie der Multiplen Sklerose und Psoriasis vulgaris zugelassen. Es gibt zunehmend Erkenntnisse über die

immunmodulatorischen Eigenschaften der Substanzen, die genauen Wirkmechanismen sind allerdings noch nicht ausreichend geklärt (29,52).

Zunächst wurde anhand des LDH-Zytotoxizitätstests geprüft, ob die Substanzen eine zytotoxische Wirkung auf die Makrophagen haben. Es konnte gezeigt werden, dass Dapson in Konzentrationen bis 500  $\mu\text{M}$  keine zytotoxische Wirkung auf die Makrophagen ausübt. Für DMF ergab sich eine nicht toxische Wirkung in Konzentrationen bis 100  $\mu\text{M}$  und für MMF bis 500  $\mu\text{M}$ , sodass für die weiteren Versuche die drei Substanzen in den entsprechenden Konzentrationen verwendet wurden. Im klinischen Alltag liegt die verwendete Dosis von Dapson bei Erwachsenen in der Regel zwischen 50 und 100 mg/Tag und kann aber auch in höheren Dosen von 150-300 mg/Tag eingesetzt werden (46). Trotz des langjährigen und sicheren Einsatzes der Substanz gibt es einige schwere unerwünschte Nebenwirkungen, die in der Therapie beachtet und überwacht werden müssen. Zu diesen Nebenwirkungen zählen die Methämoglobinämie, Hämolyse und Agranulozytose (45). Daher ist es umso wichtiger ein weitreichendes Verständnis über die Wirkungsweise der Substanz zu gewinnen.

### **Einfluss von Dapson, DMF und MMF auf die Immunantwort von Makrophagen**

Die Stimulation von Makrophagen mit dem TLR4-Liganden LPS und dem entzündlichen Zytokin IFN- $\gamma$  führt zur Induktion der Stickstoffmonoxidsynthase (iNOS) und somit Freisetzung von Stickstoffmonoxid (NO) (64). Dieses Ergebnis konnte im Zellkultursystem reproduziert werden.

Die Freisetzung von NO ist ein wichtiger Bestandteil der inflammatorischen Aktivität der Makrophagen. Als zytotoxischer Mediator spielt Stickstoffmonoxid eine Rolle in der direkten Erregerabwehr, indem es mit Sauerstoff zu reaktiven Stickstoff- und Sauerstoffmetaboliten reagiert und somit Krankheitserreger abtötet (66). Eine weitere zentrale Funktion des gebildeten Stickstoffmonoxids besteht darin, dass es die phänotypische Polarisierung zu M2-Makrophagen verhindert. Van den Bossche *et al.* identifizierten eine hemmende Wirkung von NO auf die oxidative Phosphorylierung als entscheidenden Faktor, welcher die M1-M2-Repolarisierung verhindert. Sowohl in aktivierten Makrophagen als auch in dendritischen Zellen inhibiert NO die mitochondriale Respiration durch Nitrosylierung der NADH-Dehydrogenase (Komplex I) und eine reversible Hemmung der Cytochrom C

Oxidase (Komplex IV). Daraus resultieren eine verminderte oxidative Phosphorylierung, eine erhöhte Glykolyserate und Anhäufung der TCA-Zyklus-Intermediate, welche essenzielle Modulatoren der inflammatorischen Makrophagenfunktion sind (28,67).

Die dosisabhängige hemmende Wirkung der Testsubstanzen Dapson, DMF und MMF auf die NO-Freisetzung könnte also die M2-Repolarisierung und damit einen entzündungshemmenden Phänotypen begünstigen (67).

Der hemmende Einfluss von DMF auf den LPS-induzierten Anstieg der Nitritkonzentration reproduziert die Ergebnisse aus der aktuellen Literatur und konnte bereits anhand von Astrozyten *in vitro* festgestellt werden. Dieser Zelltyp gehört ebenfalls zur Monozyten-/Makrophagenlinie und spielt eine zentrale Rolle in der Pathogenese der Neuroinflammation. In dieser Studie wird NO als proinflammatorisches Molekül beschrieben, welches an der Entstehung von Myelinschädigungen in MS-Plaques beteiligt ist (60). Auch in einer Arbeit von Zhou *et al.* zum Einsatz von DMF im septischen akuten Nierenversagen konnte gezeigt werden, dass DMF die NO-Freisetzung in LPS-aktivierten RAW 264.7 Makrophagen dosis- und zeitabhängig hemmt (68).

Der Tumornekrosefaktor-alpha (TNF- $\alpha$ ) ist ein proinflammatorisches Zytokin, welches unter anderem von aktivierten Makrophagen freigesetzt wird und an Entzündungsprozessen, Zellproliferation, Apoptose und der Regulierung weiterer proinflammatorischer Zytokine beteiligt ist. TNF- $\alpha$  kann als Marker der inflammatorischen Aktivität der Makrophagen verwendet werden (69).

Wie erwartet zeigte sich als Reaktion auf die LPS + IFN- $\gamma$  Stimulation eine signifikant erhöhte Ausschüttung des Tumornekrosefaktors. Der hemmende Einfluss von Dapson, DMF und MMF auf die TNF- $\alpha$ -Freisetzung spricht für das antiinflammatorische Potenzial der Testsubstanzen. Dabei nahm die hemmende Wirkung von Dapson mit steigender Konzentration nicht weiter zu. Dies könnte darauf hinweisen, dass die restliche Freisetzung von TNF- $\alpha$  durch Wege ausgelöst wird, welche für Dapson unempfindlich sind (70).

Eine hemmende Wirkung von Dapson auf proinflammatorische Zytokine konnte bereits in einigen Studien gezeigt werden. Kwon *et al.* zeigten, dass Dapson in einer niedrigen Konzentration von 25  $\mu\text{g/ml}$  die Produktion von TNF- $\alpha$  in LPS-aktiviertem Knochenmark signifikant reduziert (71). Zudem wird beschrieben, dass Dapson *in*

*vitro* zu einer signifikanten Hemmung der IL-8 Sekretion aus LPS-stimulierten Bronchialepithelzellen führt (49).

Zahlreiche Studien belegen, dass die Effektorfunktionen von Immunzellen wie beispielsweise die Zytokinproduktion direkt an spezifische Veränderungen des Zellmetabolismus gekoppelt sind (29). Das Enzym Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH), welches als das geschwindigkeitsbestimmende Enzym der aeroben Glykolyse beschrieben wird (72), spielt beispielsweise eine wichtige Rolle in der Regulation der TNF- $\alpha$ -mRNA. Turner *et al.* beschreiben, dass GAPDH die TNF- $\alpha$ -mRNA durch Bindung an diese posttranskriptionell unterdrückt (73). Wie Studien belegen, hemmen DMF und MMF die enzymatische Aktivität von GAPDH (63). Die im ELISA-Versuch beobachtete hemmende Wirkung von DMF und MMF auf die TNF- $\alpha$  Ausschüttung scheint daher nicht durch die bekannte hemmende Wirkung beider Substanzen auf GAPDH vermittelt zu sein. In der Studie von Turner *et al.* wurde zudem beobachtet, dass die GAPDH-Bindung die TNF- $\alpha$ -mRNA-Translation stärker begrenzt, wenn die Glykolyserate abnimmt (73). Da DMF und MMF durch ihre hemmende Wirkung auf GAPDH die Glykolyserate reduzieren, könnte es in diesem Fall einen Zusammenhang in der Wirkung geben.

### **Beeinflussung der Immunantwort von Makrophagen durch Modulation bestimmter Stoffwechselwege**

Um aufzuzeigen, inwiefern die gezielte Modulation von Stoffwechselwegen in einer veränderten Immunantwort der Makrophagen resultiert, wurde der Einfluss bestimmter Immunmodulatoren auf die NO-Freisetzung der Makrophagen getestet. Dazu wurden 2-Deoxy-D-Glukose (2-DG), DMOG, Koninginsäure und Oligomycin A verwendet.

Die Substanz 2-DG ist ein synthetisches Glukoseanalogon, welches die Glykolyse hemmt. Durch die Bindung eines Wasserstoffmoleküls statt 2-Hydroxylgruppen an dem zweiten Kohlenstoffmolekül unterscheidet es sich in seinem Aufbau von D-Glukose. Die Aufnahme erfolgt ähnlich wie D-Glukose über Glukosetransporter, insbesondere über GLUT1 und GLUT4 (74). Innerhalb der Zelle wird 2-DG weiter zu 2-Deoxy-D-Glukose-6-Phosphat (2-DG-6-P) phosphoryliert. Aufgrund der fehlenden OH-Gruppe kann diese Verbindung jedoch nicht weiter zu Fructose-6-

Phosphat isomerisiert werden, wodurch es zu einer intrazellulären Akkumulation und folglich kompetitiven Hemmung der Hexokinase und Blockade des Glukosestoffwechsels kommt (75,76).

Der hemmende Effekt auf die Glykolyserate der Makrophagen lässt sich auch im Experiment der metabolischen Flussanalysen beobachten. Die Injektion von 2-DG führte in diesem Versuch zu einem unmittelbaren Abfall der extrazellulären Ansäuerungsrate, dem Surrogatmarker der glykolytischen Aktivität.

Es zeigte sich eine signifikante Hemmung der NO-Freisetzung durch 1 mM 2-DG im Vergleich zur stimulierten Kontrolle und somit eine reduzierte Immunantwort der Makrophagen. Auch in einer Arbeit von Liu *et al.* wurde festgestellt, dass 2-DG zu einer signifikanten Hemmung der NO-Produktion in Makrophagen führt und sich dieser Effekt wiederum durch Glukose-reiches Medium umkehren lässt (77). Es ist also naheliegend, dass aktivierte M1-Makrophagen die Glykolyse zur Aufrechterhaltung ihrer Energiehomöostase und proinflammatorischen Funktion nutzen und umgekehrt eine Hemmung des Glukosestoffwechsels die Immunzellen in ihrer Funktion einschränkt. Dies wird durch zahlreiche weitere Studien unterstützt, in denen beschrieben wird, dass die Hemmung der Glykolyse durch 2-DG wichtige Effektorfunktionen des klassischen M1-Phänotypes hemmt wie beispielsweise die Zytokinproduktion (21), die Phagozytoseaktivität oder die ROS-Produktion (78,79). Die veränderten Stoffwechselwege der polarisierten Makrophagen stellen dabei nicht nur Differenzierungsmerkmale der Untergruppen dar, sondern sind auch selbst eine wichtige Voraussetzung für die Entzündungsregulation (24). Besonders die Glykolyse als Hauptstoffwechselweg inflammatorisch aktiver Immunzellen stellt somit einen vielversprechenden therapeutischen Angriffspunkt dar (9). Die potenzielle Verträglichkeit und Wirksamkeit von 2-DG, als Medikament einen erhöhten Glukosestoffwechsel zu blockieren, wurden bereits in der Therapie von Krebserkrankungen in einigen Phase 1 und Phase 2-Studien getestet (80,81). Allerdings ist 2-DG bisher nicht auf dem deutschen Markt zugelassen.

Koninginsäure inhibiert das glykolytische Enzym GAPDH, indem es an die Aminosäure Cystein im aktiven Zentrum des Enzyms bindet (72). GAPDH stellt in aktivierten Makrophagen ein ratenlimitierendes Enzym der aeroben Glykolyse dar (82). Die mit Koninginsäure behandelten Makrophagen wiesen eine signifikant verminderte NO-Freisetzung auf. Kornberg *et al.* konnten in ihrer Studie zeigen,

dass auch DMF und MMF die Enzymaktivität von GAPDH inaktivieren. Sie replizierten die Effekte von DMF mit Koninginsäure und zeigten, dass die Behandlung von Makrophagen mit Koninginsäure unter anderem die Expression der induzierbaren Stickstoffmonoxid-Synthase (iNOS) hemmt (63). Die Hemmung des glykolytischen Enzyms GAPDH resultiert in einer reduzierten Immunantwort der proinflammatorischen Makrophagen und stellt somit ein attraktives entzündungshemmendes Ziel dar (83).

DMOG gilt als Aktivator des Hypoxie-induzierbaren Faktors HIF-1 $\alpha$ , indem die Substanz die Aktivität der Prolyhydroxylase (PHD) hemmt. Diese Hemmung führt zu einer verringerten Hydroxylierung und damit einer Stabilisierung der HIF-1 $\alpha$ -Proteinexpression (29). HIF-1 $\alpha$  ist von zentraler Bedeutung für die metabolische Umprogrammierung inflammatorischer Makrophagen und reguliert als Transkriptionsfaktor die Expression wichtiger glykolytischer Enzyme (64). Die genauere Funktion des Transkriptionsfaktors wird in einem späteren Abschnitt beschrieben.

Interessanterweise führte die Behandlung der Makrophagen mit DMOG zu einer vermehrten Freisetzung von NO. Dies scheint also Hinweise darauf zu liefern, dass eine erhöhte Glykolyserate, vermittelt durch Stabilisierung des Transkriptionsfaktors, die entzündliche Immunantwort der Makrophagen verstärkt. In einer Arbeit von Tannahil *et al.* konnte gezeigt werden, dass DMOG ebenfalls die LPS-induzierte IL-1 $\beta$ -mRNA-Expression erhöht (28).

Da wie bereits beschrieben die Hemmung der Glykolyse durch 2-DG und die Inhibierung des glykolytischen Enzyms GAPDH jeweils zu einer reduzierten NO-Freisetzung führen, könnte es sein, dass umgekehrt eine Erhöhung der Glykolyserate zu einer verstärkten NO-Freisetzung und somit proinflammatorischen Immunantwort führt.

Die Substanz Oligomycin A inhibiert die mitochondriale oxidative Phosphorylierung durch eine Blockade der F<sub>0</sub>-Untereinheit der ATP-Synthase (84,85). Die Behandlung der Makrophagen mit Oligomycin A erhöht folglich die Glykolyserate, wie auch das Ergebnis der Messung der extrazellulären Ansäuerungsrate ergab. Dass die geringere NO-Freisetzung in den Oligomycin A behandelten Makrophagen auf eine geringere ATP-Verfügbarkeit zurückzuführen ist, scheint eher

unwahrscheinlich, da die Respiration der aktivierten M1-Makrophagen bereits stark reduziert ist und die Mitochondrien nicht mehr an der Bereitstellung von ATP beteiligt zu sein scheinen. Auch die Freisetzung des LPS-induzierten IL-1 $\beta$  wird durch die Hemmung der ATP-Synthase durch Oligomycin reduziert, was darauf hindeutet, dass intakte Mitochondrien und eine gewisse mitochondriale ATP-Synthase für die proinflammatorische Reaktion notwendig sind (43).

In einer Studie von Chen *et al.* wurde festgestellt, dass die Behandlung von M1 peritonealen Mausemakrophagen mit Oligomycin A zusammen mit Antimycin A, einem Inhibitor der Cytochrom C Reduktase, zu einem signifikanten Anstieg der iNOS-Expression führte. Dieses Ergebnis spricht also eher dafür, dass die Hemmung der mitochondrialen Funktion die proinflammatorische Immunantwort verstärkt (86). Antimycin A fördert die Freisetzung mitochondrialer ROS, wodurch die M1-Polarisierung gefördert wird (87).

In der hier vorliegenden Arbeit wurde lediglich der Einfluss von Oligomycin A auf die NO-Freisetzung und nicht die iNOS-Expression getestet, sodass der genaue Mechanismus unklar bleibt. Generell ist die Regulation der NO-Freisetzung während der Polarisation sehr komplex und die mitochondriale Aktivität scheint eine wichtige Rolle zu spielen. Zum einen kommt es als Konsequenz der Polarisation zur Reduktion der mitochondrialen Aktivität und Induktion des TCA-Zyklus Metaboliten Itaconat, welcher die Aktivität der Succinatdehydrogenase (SDH) unterdrückt und somit eine entzündungshemmende Wirkung vermittelt (88). Gleichzeitig kommt es während der Aktivierung proinflammatorischer Makrophagen zur Inhibition der Komplexe I oder IV der Atmungskette und die Funktion der Mitochondrien wird von der oxidativen Phosphorylierung hin zur Produktion mitochondrialer ROS gelenkt, was wiederum den proinflammatorischen M1-Status der Makrophagen fördert (89,90).

Das von der iNOS produzierte NO scheint die Polarisation wieder etwas einzudämmen und zu viel NO reduziert die effektive M1-Polarisation. Studien mit tierexperimentellen Modellen des Endotoxinschocks zeigten, dass eine iNOS Defizienz zu einer verstärkten proinflammatorischen M1-Makrophagenaktivierung und überschießenden Entzündungsreaktion führt (91). Diese Studien liefern Hinweise darauf, dass iNOS und das abgeleitete NO eine wichtige Rolle in der Makrophagendifferenzierung spielen und es sich bei dieser Regulation am ehesten

um einen dynamischen Kreislauf handelt, welcher *in vivo* weit über die Einteilung in einen ausschließlich polarisierten M1- oder M2-Status hinausgeht.

### **Beeinflussung des Makrophagen-Stoffwechsels durch Dapson, DMF und**

#### **MMF**

Um einen möglichen Einfluss der Testsubstanzen Dapson, DMF und MMF auf den Stoffwechsel von Makrophagen weiter zu untersuchen, wurden metabolische Flussanalysen durchgeführt.

Aktivierete, proinflammatorische M1-Makrophagen zeichnen sich durch eine hohe Glykolyserate bei gleichzeitig niedriger mitochondrialer Aktivität aus (2). Als unmittelbare metabolische Reaktion auf die TLR-Stimulation mittels LPS + IFN- $\gamma$  kommt es zu einer vermehrten Glukoseaufnahme und Erhöhung des glykolytischen Flusses (25,92). Wie erwartet wiesen die unbehandelten Makrophagen eine geringere basale Glykolyserate, abgeleitet von der geringeren extrazellulären Ansäuerungsrate (ECAR), im Vergleich zu den stimulierten Makrophagen auf. Die Zugabe des ATP-Synthase-Inhibitors Oligomycin A verringert die mitochondriale Respiration drastisch (84), sodass die Glykolyserate zur Aufrechterhaltung der ATP-Erzeugung in den Makrophagen weiter zunimmt. Verglichen mit einem ähnlichen Versuchsaufbau in einer Arbeit von Van den Bossche *et al.* fällt auf, dass in der hier vorliegenden Arbeit die Glykolyserate der stimulierten (M1-ähnlichen) Makrophagen im Vergleich zu den unstimulierten (M0) Makrophagen geringer ansteigt, was in einer niedrigeren glykolytischen Reservekapazität der M1-Makrophagen resultiert. Dieses abweichende Ergebnis könnte daran liegen, dass bei Versuchsstart bereits Glukose im Medium vorhanden war, wohingegen im Versuchsaufbau von Van den Bossche *et al.* Glukose erst im ersten Schritt der Messung injiziert wurde (24). Das Vorhandensein der Glukose im Versuchsmedium könnte dazu führen, dass die aktivierten Makrophagen bereits ihre glykolytische Kapazität ausgeschöpft haben.

Dass die stimulierten Makrophagen den glykolytischen Stoffwechselweg als Energiequelle nutzen, wird auch deutlich, wenn man die Sauerstoffverbrauchsrate (OCR) betrachtet, welche Rückschlüsse auf die mitochondriale Aktivität zulässt. Gleichzeitig zum Anstieg der extrazellulären Ansäuerungsrate kann ein Abfall der Sauerstoffverbrauchsrate in den mit LPS + IFN- $\gamma$  stimulierten Zellen beobachtet werden. Diese Daten reproduzieren die Ergebnisse aus der aktuellen

Immunmetabolismus-Forschung und verdeutlichen den metabolischen Wechsel von oxidativer Phosphorylierung hin zu aerober Glykolyse, welcher mit der M1-Makrophagen-Polarisation einhergeht (93,94).

Die erhöhte Glykolyse-Rate in aktivierten Makrophagen ist zum einen wichtig, um schnell den hohen Energiebedarf der aktiven Immunzelle zu decken, aber auch um die Bausteine für die Biosynthese von Lipiden, Nukleinsäuren und Proteinen zu generieren und somit die Effektorfunktion der proinflammatorischen Makrophagen aufrecht zu erhalten (95).

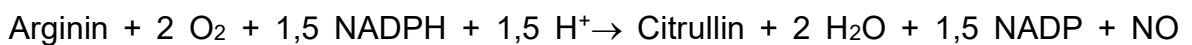
DMF zeigte einen signifikant hemmenden Einfluss auf die maximale und die basale Glykolyserate in den unstimulierten (M0)-Makrophagen. Ebenso zeigte MMF eine hemmende Wirkung auf die glykolytische Aktivität. Die mit MMF behandelten Makrophagen wiesen sowohl in den unstimulierten (M0) als auch in den stimulierten (M1) Versionen eine signifikante Hemmung der basalen Glykolyserate und der maximalen Glykolyserate auf. Kornberg *et al.* zeigen, dass DMF und MMF die GAPDH-Enzymaktivität hemmen und sich daraus eine Hemmung der Glykolyseaktivität ergibt (63). In dieser Studie konnte allerdings kein hemmender Einfluss der Testsubstanzen auf die Glykolyserate der unstimulierten Makrophagen gezeigt werden. Dieses abweichende Ergebnis könnte daran liegen, dass in der hier vorliegenden Arbeit höhere Konzentrationen der Testsubstanzen DMF und MMF verwendet wurden. Insgesamt sprechen die Ergebnisse für das Potenzial der Substanzen Einfluss auf den Zellmetabolismus zu nehmen.

Auch die Behandlung der Makrophagen mit Dapson resultierte in einer Hemmung der Glykolyserate. Die unstimulierten mit Dapson behandelten Makrophagen wiesen im Vergleich zur Kontrollgruppe eine niedrigere basale Glykolyserate ( $p=0,52$ ) und eine signifikant niedrigere maximale Glykolyserate und freie glykolytische Aktivität auf. Interessanterweise hatte die Behandlung der Zellen mit Dapson keine Auswirkung auf die mitochondriale Aktivität. Es scheint also möglich, dass Dapson selektiv eine hemmende Wirkung auf den glykolytischen Stoffwechsel der Makrophagen ausübt und somit ein Zusammenhang zu den immunmodulierenden Eigenschaften der Substanz besteht. Dabei sind einige Mechanismen wie beispielsweise eine Substrathemmung durch Hemmung der Glukoseaufnahme über Glukosetransporter, eine direkte Enzyminhibierung oder eine indirekte Wirkung über die TCA-Zyklus assoziierten Signalmetaboliten denkbar.

In der aktuellen Literatur finden sich dazu bisher keine Ergebnisse. Wie und in welchem Umfang die Substanz den Stoffwechsel der Makrophagen verändert, könnte in weiteren Arbeiten umfänglich untersucht werden.

### **Einfluss auf mRNA-Expression**

Das Enzym iNOS (induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase) katalysiert die Synthese von NO (96,97). Die Expression des Enzyms gilt als Charakteristikum der proinflammatorischen M1-Makrophagen, während M2-Makrophagen das Enzym nicht exprimieren. Als Substrat gilt die Aminosäure Arginin (97):



Entsprechend der Literatur konnte eine signifikant erhöhte Expression der iNOS-mRNA auf Stimulation mit dem TLR4-Liganden LPS und dem entzündlichen Zytokin IFN- $\gamma$  detektiert werden (98). Die Testsubstanzen Dapson, DMF und MMF zeigen jeweils eine hemmende Wirkung auf die Freisetzung von NO. Das Ergebnis der qPCR ergab keine signifikante Hemmung der iNOS-mRNA Expression durch DMF. Durch MMF konnte eine verringerte mRNA-Expression detektiert werden, diese erwies sich jedoch als nicht signifikant. Dass DMF einen Einfluss auf das Enzym iNOS nimmt, wird in einigen Studien beschrieben. In einem Kolitis-Mausmodell wird eine verringerte Aktivität des Enzyms nach Behandlung mit DMF beschrieben (99), zudem inhibiert DMF die iNOS Expression in Nieren in einem Mausmodell des Endotoxin-induzierten akuten Nierenversagens (68). Außerdem wird ein signifikant hemmender Einfluss von DMF auf die iNOS-Proteinexpression in murinen Peritonealmakrophagen beschrieben (63). In Zusammenschau dieser Publikationen scheint es wahrscheinlich, dass DMF und MMF eine direkte regulatorische Funktion auf das Enzym iNOS auswirken. Dapson zeigte keinen signifikanten Einfluss auf die iNOS-mRNA Expression. Im Griess-Assay konnte allerdings eine signifikante Reduktion der Stickstoffmonoxid-Freisetzung festgestellt werden. Es bleibt also unklar, ob dieser hemmende Effekt durch iNOS vermittelt ist.

Der Hypoxie-induzierbare Faktor (HIF-1 $\alpha$ ) ist essenziell für die metabolische Umprogrammierung in aktivierten Makrophagen. Als Reaktion auf einen

proinflammatorischen Stimulus wird die HIF-1 $\alpha$  mRNA in Makrophagen hochreguliert. HIF-1 $\alpha$  wurde zunächst als Regulator einiger Gene identifiziert, welche unter hypoxischen Bedingungen induziert werden (100). Darüber hinaus zeigten mehrere Studien, dass auch die LPS-Stimulation unter normoxischen Bedingungen zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors führt und dieser eine Schlüsselrolle für die glykolytische Aktivität und die Freisetzung von Entzündungsmediatoren hat (100,101). Es ist bekannt, dass es in aktivierten Makrophagen zu spezifischen Unterbrechungen des TCA-Zyklus kommt, sodass einige Metaboliten akkumulieren. In LPS-induzierten Makrophagen kommt es zur Anhäufung des TCA-Zyklus-Zwischenproduktes Succinat. Succinat wird aus den Mitochondrien in das Zytosol transportiert und hemmt die Aktivität der Prolylhydroxylasen, wodurch HIF-1 $\alpha$  stabilisiert wird (28). HIF-1 $\alpha$  induziert die Expression des Glukosetransporters GLUT1, welcher geschwindigkeitsbestimmend für die Glukoseaufnahme in proinflammatorischen Makrophagen ist (74,102). Außerdem fördert HIF-1 $\alpha$  die Expression wichtiger Enzyme wie beispielsweise die Laktatdehydrogenase, welche die Reduktion des aus der Glykolyse gewonnenen Pyruvats zu Laktat katalysiert. Somit wird die Produktion von Acetyl-CoA für den Eintritt in den TCA eingeschränkt und NAD<sup>+</sup> für die Aufrechterhaltung der Glykolyse wiederhergestellt (103). Als weiteres wichtiges durch HIF-1 $\alpha$  induziertes Enzym gilt die Pyruvatdehydrogenase-Kinase, welche die Pyruvatdehydrogenase inaktiviert und damit den Eintritt von Pyruvat in den Krebszyklus beschränkt (104).

In der hier vorliegenden Arbeit zeigte sich keine signifikante Beeinflussung der HIF-1 $\alpha$  mRNA-Expression durch die Behandlung mit 100  $\mu$ M DMF. Die Behandlung mit 500  $\mu$ M MMF führte jedoch zu einer signifikanten Reduktion der mRNA-Expression. An murinen Osteoblasten wurde gezeigt, dass DMF die Hypoxie-induzierte Akkumulation des HIF-1 $\alpha$ -Proteins abschwächt, indem es dessen Abbau fördert. Als Folge wird auch die Expression von HIF-1 $\alpha$ -Zielgenen wie IL-8 und VEGF gehemmt (52). Zhao *et al.* beschreiben die Regulation von HIF-1 $\alpha$  durch DMF auf mRNA-Ebene als unwahrscheinlich, da es zu keiner signifikanten Veränderung der mRNA-Spiegel von HIF-1 $\alpha$  kommt (62). HIF-1 $\alpha$  ist auch bei der Psoriasis übermäßig stark ausgeprägt und spielt eine Rolle in der Pathogenese der Erkrankung. Die Wirkungsweise von DMF und MMF in der Behandlung der Psoriasis könnte also über die Wirkung auf HIF-1 $\alpha$  vermittelt werden (105).

DMF und MMF scheinen also jeweils einen hemmenden Einfluss auf HIF-1 $\alpha$  zu

haben. Dabei ist sowohl eine Beeinflussung auf mRNA-Ebene als auch eine posttranskriptionelle Hemmung des Hypoxie-induzierbaren Transkriptionsfaktors möglich.

Dapson scheint einen leicht hemmenden Einfluss auf die HIF-1 $\alpha$  mRNA-Expression zu haben, dieser erwies sich jedoch nicht als signifikant. In der aktuellen Literatur wurden diesbezüglich bisher keine Ergebnisse veröffentlicht. Die Frage, ob und auf welcher Ebene die immunmodulierenden Eigenschaften von Dapson durch HIF-1 $\alpha$  vermittelt sind, müsste also weiter erforscht werden und könnte beispielsweise durch Analyse der Proteinexpression mittels Immunoblot vertieft werden.

Das Enzym PKM2 steht in engem Bezug zu HIF1- $\alpha$  und spielt ebenfalls eine Rolle in Regulation pro-glykolytischer Enzyme. Wie in der Literatur beschrieben wird, konnte eine Induktion der PKM2-mRNA Expression als Reaktion auf die Stimulation der Makrophagen beobachtet werden (12). Die enzymatisch aktivere Isoform PKM1 ist das ratenlimitierende Enzym während der Glykolyse und wandelt Phosphoenolpyruvat in Pyruvat um. Studien an LPS-aktivierten aus murinem Knochenmark gewonnenen Makrophagen (BMDMs) konnten zeigen, dass das enzymatisch weniger aktive PKM2 den Transkriptionsfaktor HIF-1 $\alpha$  stabilisiert, indem es in den Zellkern transloziert und mit diesem einen Komplex bildet (12). So fördert PKM2 die Expression von HIF-1 $\alpha$  Zielgenen wie GLUT1, PHD oder LDH und damit die Umstellung auf einen glykolytischen Stoffwechsel.

Die stimulierten und mit Dapson und DMF behandelten Makrophagen zeigten keine Veränderung der PKM2-mRNA Expression. Die mit MMF behandelten Makrophagen zeigten eine leichte Reduktion der PKM2-mRNA Expression, welche sich allerdings als nicht signifikant erwies.

In der aktuellen Literatur finden sich bislang keine Ergebnisse zum Einfluss der Testsubstanzen Dapson, DMF und MMF auf PKM2.

Die pharmakologische Hemmung von PKM2 stellt einen vielversprechenden therapeutischen Angriffspunkt in der Immunmetabolischen Forschung dar. Die Hemmung der PKM2 abhängigen Glykolyse führt zu einer abgeschwächten NLRP3-Inflammasom Aktivierung in Makrophagen (106). Inflammasome sind zytosolische Proteinkomplexe, welche an der Aktivierung von Entzündungsprozessen und der Freisetzung proinflammatorischer Zytokine wie IL-1 $\beta$  oder IL-18 beteiligt sind (107). Folglich führte die PKM2-Hemmung zu einer verminderten Freisetzung von IL-1 $\beta$

und IL-18 in Makrophagen. Darüber hinaus zeigten Studien an Mäusen, dass der Knockout von PKM2 in myeloischen Zellen die Mäuse vor einem NLRP3-induzierten septischen Tod schützt (106).

Das Enzym GAPDH katalysiert die Umwandlung von Glycerinaldehyd-3-Phosphat zu 1,3-Bisphosphonat während der Glykolyse (30). DMF und MMF inhibieren GAPDH, indem die Substanzen die Succinylierung von Cysteinresten von GAPDH fördern und damit dessen enzymatische Aktivität hemmen. Die pharmakologische Inhibition von GAPDH durch DMF führt zu einer verringerten Glykolyserate (63).

In der hier vorliegenden Arbeit führte die Behandlung der Makrophagen mit 100  $\mu$ M DMF zu keiner signifikanten Beeinflussung der GAPDH-mRNA-Expression. MMF führte hingegen zu einer signifikant verringerten Expression der GAPDH-mRNA. Es scheint also möglich, dass die hemmende Wirkung von DMF und MMF auf GAPDH nicht nur auf Proteinebene, sondern auch auf mRNA-Ebene stattfindet. Dapson hingegen scheint keinen Einfluss auf die GAPDH-mRNA-Expression zu haben. Zu einem möglichen Effekt von Dapson auf das Enzym gibt es in der aktuellen Literatur bislang keine Forschungsergebnisse.

### **Limitationen**

Die in dieser Arbeit beschriebene klassische Einteilung der Makrophagen in die zwei Hauptgruppen M1 (proinflammatorische) und M2 (antiinflammatorische) Makrophagen ist eine stark vereinfachte Darstellung des *in vivo* deutlich breiter vorliegenden Spektrums der Makrophagendifferenzierung. Anstelle eines ausschließlichen M1- oder M2-Zustands existieren fließende Übergänge zwischen den Subtypen sowie gemischt vorliegende Populationen. Auch nach Annahme eines bestimmten Phänotyps behalten Makrophagen die Fähigkeit, sich auf neue Umgebungsreize weiter zu verändern (19,108).

Zudem sind die beschriebene Stoffwechselwege, welche hier stark vereinfacht wurden, von großer Komplexität und häufig handelt es sich um vielschichtige regulatorische Netzwerke, die eng über Feedbackmechanismen untereinander verknüpft sind und teilweise gemeinsam reguliert werden. Dabei sind einige Regulationsmechanismen der Makrophagenpolarisierung noch nicht vollständig geklärt und umfassen eine Reihe von Signalwegen sowie transkriptionelle und

posttranskriptionelle Regulationsnetzwerke. Die Vielschichtigkeit dieser physiologischen Netzwerke und *in-vivo*-Interaktionen können in einem Zellkultursystem nur bedingt dargestellt werden. Einige Marker wurden in der hier vorliegenden Arbeit nur auf mRNA-Ebene betrachtet. In diesem Zusammenhang wäre es lohnend weitere Analysen auf Proteinebene durchzuführen und die Ergebnisse beispielsweise mittels Immunoblot zu vertiefen. Zudem wurde nicht für alle Substanzen die optimale Dosierung für die Experimente ermittelt. So wirkt beispielsweise 2-DG in höheren Konzentrationen noch besser, ohne dabei eine toxische Wirkung zu haben.

## **5 Zusammenfassung**

Das Forschungsgebiet des Immunmetabolismus beschreibt die wechselseitigen Zusammenhänge zwischen dem zellulären Energiestoffwechsel und der Effektorfunktion von Immunzellen. Grundlegend ist dabei die Erkenntnis, dass mit der Aktivierung von Immunzellen tiefgreifende Veränderungen des Zellmetabolismus einhergehen. In dieser Arbeit wurde ein Makrophagen-Zellkultursystem als Immunmetabolismus Modellsystem verwendet. Makrophagen können vereinfacht in einen proinflammatorischen M1- und einen antiinflammatorischen M2-Phänotypen eingeteilt werden. M1-Makrophagen beziehen ihre Energie primär aus der aeroben Glykolyse, während M2-Makrophagen die oxidative Phosphorylierung zur Energiegewinnung verwenden. Anhand dieses Modells wurde eine immunmetabolische Wirkung der immunmodulierenden Substanzen Dapson, DMF und MMF sowie die Auswirkung gezielter Stoffwechsel-modulierender Substanzen auf die Immunantwort der Makrophagen untersucht. Die Behandlung der M1-Makrophagen mit den Testsubstanzen Dapson, DMF und MMF führte zu einer verringerten Ausschüttung von Stickstoffmonoxid und TNF- $\alpha$  und somit reduzierten inflammatorischen Aktivität. Die Analyse der glykolytischen und mitochondrialen Aktivität mittels Seahorse Flux Analyzers ergab eine erhöhte glykolytische Aktivität und reduzierte mitochondriale Respiration nach Aktivierung der Makrophagen mittels LPS + IFN- $\gamma$ . In diesem Versuch zeigte Dapson eine signifikante Verminderung der maximalen Glykolyserate und freien glykolytischen Aktivität. Auf die mitochondriale Respiration zeigte die Dapson-Behandlung keinen Effekt. Auch die Testsubstanzen DMF und MMF führten zu einer verringerten glykolytischen Aktivität der Makrophagen. Die Behandlung mit MMF führte zu einer signifikant verringerten Expression der HIF-1 $\alpha$ -mRNA sowie GAPDH-mRNA. Im Stickstoffmonoxid-Test führte die Behandlung mit dem Glykolyse-Inhibitor 2-DG, dem GAPDH-Inhibitor Koninginsäure sowie dem ATP-Synthase-Inhibitor Oligomycin zu einer verringerten inflammatorischen Aktivität der M1 Makrophagen. Die Behandlung mit dem HIF-1 $\alpha$ -Aktivator DMOG führte hingegen zu einer vermehrten Stickstoffmonoxid-Ausschüttung. Insgesamt zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit, dass durch die gezielte Modulation von Stoffwechselwegen die inflammatorische Aktivität von Makrophagen beeinflusst werden kann und die Immunmodulatoren Dapson, DMF und MMF in Teilen eine Wirkung auf den Zellstoffwechsel ausüben.

## 6 Literaturverzeichnis

1. Raulien N. Immunmetabolismus und Inflammation. *Z Rheumatol.* 2017 Oct 23;76(8):705–7.
2. Palsson-Mcdermott EM, O'Neill LAJ. The Warburg effect then and now: From cancer to inflammatory diseases. *Biochem Z.* 2013;35(11):965–73.
3. Assmann N, Finlay DK. Metabolic regulation of immune responses: Therapeutic opportunities. *J Clin Invest.* 2016;126(6):2031–9.
4. O'Neill LAJ, Kishton RJ, Rathmell J. A guide to immunometabolism for immunologists. *Nat Rev Immunol.* 2016;16(9):553–65.
5. Warburg O. Metabolism of Tumours. *Biochem Z.* 1923;1(142):317–33.
6. Kornberg MD. The immunologic Warburg effect: Evidence and therapeutic opportunities in autoimmunity. *WIREs Syst Bio Med.* 2020;12(5):1–17.
7. Cham CM, Gajewski TF. Glucose Availability Regulates IFN- $\gamma$  Production and p70S6 Kinase Activation in CD8 + Effector T Cells . *J Immunol.* 2005;174(8):4670–7.
8. Vander Heiden MG, Cantley LC, Thompson CB. Understanding the Warburg Effect: The Metabolic Requirements of Cell Proliferation. *Science (80- ).* 2009;324(5930):1029–33.
9. Patel CH, Leone RD, Horton MR, Powell JD. Targeting metabolism to regulate immune responses in autoimmunity and cancer. *Nat Rev Drug Discov.* 2019;18(9):669–88.
10. Sheu KM, Hoffmann A. Functional Hallmarks of Healthy Macrophage Responses: Their Regulatory Basis and Disease Relevance. *Annu Rev Immunol.* 2022;40(1):295–321.
11. Janeway CA, Medzhitov R. Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol.* 2002;20(2):197–216.
12. Palsson-Mcdermott EM, Curtis AM, Goel G, Lauterbach MAR, Sheedy FJ, Gleeson LE, et al. Pyruvate kinase M2 regulates hif-1 $\alpha$  activity and il-1 $\beta$  induction and is a critical determinant of the warburg effect in LPS-activated macrophages. *Cell Metab.* 2015;21(1):65–80.
13. Viola A, Munari F, Sánchez-Rodríguez R, Scolaro T, Castegna A. The metabolic signature of macrophage responses. *Front Immunol.* 2019;10(1462):1–16.

14. Epelman S, Lavine KJ, Randolph GJ. Origin and Functions of Tissue Macrophages. *Immunity*. 2014;41(1):21–35.
15. Wang N, Liang H, Zen K. Molecular mechanisms that influence the macrophage M1-M2 polarization balance. *Front Immunol*. 2014;5(614):1–9.
16. Xue J, Schmidt S V., Sander J, Draffehn A, Krebs W, Quester I, et al. Transcriptome-Based Network Analysis Reveals a Spectrum Model of Human Macrophage Activation. *Immunity*. 2014;40(2):274–88.
17. Huang X, Li Y, Fu M, Xin HB. Activating THP1-derived macrophage in vitro. *Methods Mol Biol*. 2018;1784:119–26.
18. Mosser DM, Edwards JP. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol*. 2008;8(12):958–69.
19. Stout RD, Jiang C, Matta B, Watkins SK, Suttles J, Tietzel I. Macrophages Sequentially Change Their Functional Phenotype in Response to Changes in Microenvironmental Influence. *J Immunol*. 2005;175(1):342–9.
20. Mantovani A, Sozzani S, Locati M, Allavena P, Sica A. Macrophage polarization: Tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends Immunol*. 2002;23(11):549–55.
21. Diskin C, Pålsson-McDermott EM. Metabolic modulation in macrophage effector function. *Front Immunol*. 2018;9:1–17.
22. Wang L, Wang D, Zhang T, Ma Y, Tong X, Fan H. The role of immunometabolism in macrophage polarization and its impact on acute lung injury/acute respiratory distress syndrome. *Front Immunol*. 2023;14:1–12.
23. Pearce EL, Pearce EJ. Metabolic pathways in immune cell activation and quiescence. *Immunity*. 2013;38(4):633–43.
24. Van den Bossche J, Baardman J, de Winther MPJ. Metabolic characterization of polarized M1 and M2 bone marrow-derived macrophages using real-time extracellular flux analysis. *J Vis Exp*. 2015;2015(105):1–7.
25. Nagy C, Haschemi A. Time and demand are two critical dimensions of immunometabolism: The process of macrophage activation and the pentose phosphate pathway. *Front Immunol*. 2015;6(164):1–8.
26. Lunt SY, Vander Heiden MG. Aerobic glycolysis: Meeting the metabolic requirements of cell proliferation. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2011;27:441–64.
27. Semba H, Takeda N, Isagawa T, Sugiura Y, Honda K, Wake M, et al. HIF-1 $\alpha$ -PDK1 axis-induced active glycolysis plays an essential role in macrophage

- migratory capacity. *Nat Commun.* 2016;7:1–10.
28. Tannahill GM, Curtis AM, Adamik J, Palsson-McDermott EM, McGettrick AF, Goel G, et al. Succinate is a danger signal that induces IL-1 $\beta$  via HIF-1 $\alpha$ . *Nature.* 2013;496(7444):238–42.
29. Pålsson-McDermott EM, O’Neill LAJ. Targeting immunometabolism as an anti-inflammatory strategy. *Cell Res.* 2020;30(4):300–14.
30. Colell A, Green DR, Ricci JE. Novel roles for GAPDH in cell death and carcinogenesis. *Cell Death Differ.* 2009;16(12):1573–81.
31. TeSlaa T, Ralser M, Fan J, Rabinowitz JD. The pentose phosphate pathway in health and disease. *Nat Metab.* 2023;5(8):1275–89.
- hep 32. Haschemi A, Kosma P, Gille L, Evans CR, Burant CF, Starkl P, et al. The sedotulose kinase CARKL directs macrophage polarization through control of glucose metabolism. *Cell Metab.* 2012;15(6):813–26.
33. Jha AK, Huang SCC, Sergushichev A, Lampropoulou V, Ivanova Y, Loginicheva E, et al. Network integration of parallel metabolic and transcriptional data reveals metabolic modules that regulate macrophage polarization. *Immunity.* 2015;42(3):419–30.
34. O’Neill LAJ. A Broken Krebs Cycle in Macrophages. *Immunity.* 2015;42(3):393–4.
35. Infantino V, Convertini P, Cucci L, Panaro MA, Di Noia MA, Calvello R, et al. The mitochondrial citrate carrier: A new player in inflammation. *Biochem J.* 2011;438(3):433–6.
36. Infantino V, Iacobazzi V, Menga A, Avantaggiati ML, Palmieri F. A key role of the mitochondrial citrate carrier (SLC25A1) in TNF $\alpha$ - and IFN $\gamma$ -triggered inflammation. *Biochim Biophys Acta.* 2014;1839(11):1217–25.
37. Michelucci A, Cordes T, Ghelfi J, Pailot A, Reiling N, Goldmann O, et al. Immune-responsive gene 1 protein links metabolism to immunity by catalyzing itaconic acid production. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013;110(19):7820–5.
38. Strelko CL, Lu W, Dufort FJ, Seyfried TN, Chiles TC, Rabinowitz JD, et al. Itaconic acid is a mammalian metabolite induced during macrophage activation. *J Am Chem Soc.* 2011;133(41):16386–9.
39. Naujoks J, Tabeling C, Dill BD, Hoffmann C, Brown AS, Kunze M, et al. IFNs Modify the Proteome of Legionella-Containing Vacuoles and Restrict Infection

- Via IRG1-Derived Itaconic Acid. *PLOS Pathog.* 2016;12(2).
40. Mills EL, Kelly B, Logan A, Costa ASH, Varma M, Bryant CE, et al. Succinate Dehydrogenase Supports Metabolic Repurposing of Mitochondria to Drive Inflammatory Macrophages. *Cell.* 2016;167(2):457–70.
  41. Lampropoulou V, Sergushichev A, Bambouskova M, Nair S, Vincent EE, Loginicheva E, et al. Itaconate Links Inhibition of Succinate Dehydrogenase with Macrophage Metabolic Remodeling and Regulation of Inflammation. *Cell Metab.* 2016;24(1):158–66.
  42. Murphy MP. How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem J.* 2009;417(1):1–13.
  43. Mills EL, Kelly B, Logan A, Costa ASH, Varma M, Bryant CE, et al. Repurposing mitochondria from ATP production to ROS generation drives a pro-inflammatory phenotype in macrophages that depends on succinate oxidation by complex II. *Cell.* 2016;167(2):457–70.
  44. Palmieri EM, Gonzalez-Cotto M, Baseler WA, Davies LC, Ghesquière B, Maio N, et al. Nitric oxide orchestrates metabolic rewiring in M1 macrophages by targeting aconitase 2 and pyruvate dehydrogenase. *Nat Commun.* 2020;11(1).
  45. Zhu YI, Stiller MJ. Dapsone and sulfones in dermatology: Overview and update. *J Am Acad Dermatol.* 2001;45(3):420–34.
  46. Wozel G, Blasum C. Dapsone in dermatology and beyond. *Arch Dermatol Res.* 2014;306(2):103–24.
  47. Piette EW, Werth VP. Dapsone in the Management of Autoimmune Bullous Diseases. *Immunol Allergy Clin North Am.* 2012;32(2):317–22.
  48. Flügel DC. Dapsone [Internet]. 2024. p. 1–5. Available from: [https://www.gelbeliste.de/wirkstoffe/Dapsone\\_10063](https://www.gelbeliste.de/wirkstoffe/Dapsone_10063)
  49. Kanoh S, Tanabe T, Rubin BK. Dapsone inhibits IL-8 secretion from human bronchial epithelial cells stimulated with lipopolysaccharide and resolves airway inflammation in the ferret. *Chest.* 2011;140(4):980–90.
  50. Bresciani G, Manai F, Davinelli S, Tucci P, Saso L, Amadio M. Novel potential pharmacological applications of dimethyl fumarate—an overview and update. *Front Pharmacol.* 2023;14:1–19.
  51. Zhang Y, Tang J, Zhou Y, Xiao Q, Chen Q, Wang H, et al. Short-term exposure to dimethyl fumarate (DMF) inhibits LPS-induced I $\kappa$ B $\zeta$  expression in

- macrophages. *Front Pharmacol.* 2023;14:1–14.
52. Brück J, Dringen R, Amasuno A, Pau-Charles I, Ghoreschi K. A review of the mechanisms of action of dimethylfumarate in the treatment of psoriasis. *Exp Dermatol.* 2018;27(6):611–24.
  53. Gillard GO, Collette B, Anderson J, Chao J, Scannevin RH, Huss DJ, et al. DMF, but not other fumarates, inhibits NF- $\kappa$ B activity in vitro in an Nrf2-independent manner. *J Neuroimmunol.* 2015;283:74–85.
  54. Mrowietz U, Barker J, Boehncke WH, Iversen L, Kirby B, Naldi L, et al. Clinical use of dimethyl fumarate in moderate-to-severe plaque-type psoriasis: a European expert consensus. *J Eur Acad Dermatology Venereol.* 2018;32:3–14.
  55. Boehncke WH, Schön MP. Psoriasis. *Lancet.* 2015;386(9997):983–94.
  56. Nograles KE, Krueger JG. Anti-cytokine therapies for psoriasis. *Exp Cell Res.* 2011;317(9):1293–300.
  57. Kappos L, Gold R, Miller DH, MacManus DG, Havrdova E, Limmroth V, et al. Efficacy and safety of oral fumarate in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis: a multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled phase IIb study. *Lancet.* 2008;372(9648):1463–72.
  58. Fox RJ, Miller DH, Phillips JT, Hutchinson M, Havrdova E, Kita M, et al. Placebo-Controlled Phase 3 Study of Oral BG-12 or Glatiramer in Multiple Sclerosis. *N Engl J Med.* 2012;367(12):1087–97.
  59. Dobson R, Giovannoni G. Multiple sclerosis – a review. *Eur J Neurol.* 2019;26(1):27–40.
  60. Wilms H, Sievers J, Rickert U, Rostami-Yazdi M, Mrowietz U, Lucius R. Dimethylfumarate inhibits microglial and astrocytic inflammation by suppressing the synthesis of nitric oxide, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  and IL-6 in an in-vitro model of brain inflammation. *J Neuroinflammation.* 2010;7:1–8.
  61. Linker RA, Lee DH, Ryan S, Van Dam AM, Conrad R, Bista P, et al. Fumaric acid esters exert neuroprotective effects in neuroinflammation via activation of the Nrf2 antioxidant pathway. *Brain.* 2011;134(3):678–92.
  62. Zhao G, Liu Y, Fang J, Chen Y, Li H, Gao K. Dimethyl fumarate inhibits the expression and function of hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ). *Biochem Biophys Res Commun.* 2014;448(3):303–7.
  63. Kornberg MD, Bhargava P, Kim PM, Putluri V, Snowman AM, Putluri N, et al.

- Dimethyl fumarate targets GAPDH and aerobic glycolysis to modulate immunity. *Science* (80- ). 2018;360(6387):449–53.
64. Kelly B, O'Neill LAJ. Metabolic reprogramming in macrophages and dendritic cells in innate immunity. *Cell Res*. 2015;25(7):771–84.
  65. O'Neill LAJ, Pearce EJ. Immunometabolism governs dendritic cell and macrophage function. *J Exp Med*. 2016;213(1):15–23.
  66. Schairer DO, Chouake JS, Nosanchuk JD, Friedman AJ. The potential of nitric oxide releasing therapies as antimicrobial agents. *Virulence*. 2012;3(3):271–9.
  67. Van den Bossche J, Baardman J, Otto NA, van der Velden S, Neele AE, van den Berg SM, et al. Mitochondrial Dysfunction Prevents Repolarization of Inflammatory Macrophages. *Cell Rep*. 2016;17(3):684–96.
  68. Zhou K, Xie M, Yi S, Tang Y, Luo H, Xiao Q, et al. Dimethyl fumarate ameliorates endotoxin-induced acute kidney injury against macrophage oxidative stress. *Ren Fail*. 2021;43(1):1229–39.
  69. Atri C, Guerfali FZ, Laouini D. Role of human macrophage polarization in inflammation during infectious diseases. *Int J Mol Sci*. 2018;19(6).
  70. Murthy S, Schilf P, Patzelt S, Thieme M, Becker M, Kröger L, et al. Dapsone Suppresses Disease in Preclinical Murine Models of Pemphigoid Diseases. *J Invest Dermatol*. 2021;141(11):2587-2595.e2.
  71. Kwon M-J, Joo H-G. Dapsone modulates lipopolysaccharide-activated bone marrow cells by inducing cell death and down-regulating tumor necrosis factor-alpha production. *J Vet Sci*. 2018;19(6):744–9.
  72. Liberti M V., Dai Z, Wardell SE, Baccile JA, Liu X, Gao X, et al. Metabolic Control Analysis Uncovers predictive model for selective targeting of the Warburg effect through GAPDH inhibition with a natural product. *Cell Metab*. 2017;26(4):648–59.
  73. Millet P, Vachharajani V, McPhail L, Yoza B, McCall C. GAPDH Binding to TNF- $\alpha$  mRNA Contributes to Post- Transcriptional Repression in Monocytes: A Novel Mechanism of Communication between Inflammation and Metabolism. *J Immunol*. 2016;196(6):2541–51.
  74. Freerman AJ, Johnson AR, Sacks GN, Milner JJ, Kirk EL, Troester MA, et al. Glucose transporter 1 (GLUT1)-mediated glucose metabolism drives a proinflammatory phenotype. *J Biol Chem*. 2014;289(11):7884–96.

75. Pajak B, Siwiak E, Soltyka M, Priebe A, Zielinski E, Fokt I, et al. 2-Deoxy-D-Glucose and Its Analogs : From Diagnostic to Therapeutic Agents. *Int J Mol Sci.* 2020;21(1):234.
76. Xi H, Kurtoglu M, Lampidis TJ. The Wonders of 2-Deoxy-D-Glucose. *IUBMB Life.* 2014;66(2):110–21.
77. Liu RT, Zhang M, Yang CL, Zhang P, Zhang N, Du T, et al. Enhanced glycolysis contributes to the pathogenesis of experimental autoimmune neuritis. *J Neuroinflammation.* 2018;15(1):1–13.
78. Pavlou S, Wang L, Xu H, Chen M. Higher phagocytic activity of thioglycollate-elicited peritoneal macrophages is related to metabolic status of the cells. *J Inflamm (United Kingdom).* 2017;14(1):12–7.
79. Ohlbaum DJ, York N, Service PH, Hertz-foundation H, Microbiology M, Germany W, et al. 2-Deoxyglucose selectively inhibits Fc and complement receptor-mediated phagocytosis in mouse peritoneal macrophages. *J Exp Med.* 1976;144.
80. Mohanti BK, Rath GK, Naranappa Anantha I, Kannan I V, Das BS, R Chandramouli BA, et al. Improving cancer radiotherapy with 2-Deoxy-D-Glucose: Phase I/II clinical trials on human cerebral gliomas. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 1996;35(1):103–11.
81. Stein M, Lin H, Jeyamohan C, Dvorthinski D, Gounder M, Bray K, et al. Targeting tumor metabolism with 2-deoxyglucose in patients with castrate-resistant prostate cancer and advanced malignancies. *Prostate.* 2010;70(13):1388–94.
82. Shestov AA, Liu X, Ser Z, Cluntun AA, Hung YP, Huang L, et al. Quantitative determinants of aerobic glycolysis identify flux through the enzyme GAPDH as a limiting step. *Elife.* 2014;3(2014):1–18.
83. Liao ST, Han C, Xu DQ, Fu XW, Wang JS, Kong LY. 4-Octyl itaconate inhibits aerobic glycolysis by targeting GAPDH to exert anti-inflammatory effects. *Nat Commun.* 2019;10(1):1–11.
84. Terada H. Uncouplers of oxidative phosphorylation. *Environ Health Perspect.* 1990;87:213–8.
85. Mackieh R, Al-Bakkar N, Kfoury M, Roufayel R, Sabatier JM, Fajloun Z. Inhibitors of ATP Synthase as New Antibacterial Candidates. *Antibiotics.* 2023;12(4):1–15.

86. Chen W, Sandoval H, Kubiak JZ, Li XC, Ghobrial RM, Kloc M. The phenotype of peritoneal mouse macrophages depends on the mitochondria and ATP/ADP homeostasis. *Cell Immunol.* 2018;324:1–7.
87. Patoli D, Mignotte F, Deckert V, Dusuel A, Dumont A, Rieu A, et al. Inhibition of mitophagy drives macrophage activation and antibacterial defense during sepsis. *J Clin Invest.* 2020;130(11):5858–74.
88. Li Z, Zheng W, Kong W, Zeng T. Itaconate: A Potent Macrophage Immunomodulator. *Inflammation.* 2023;46(4):1177–91.
89. Wang Y, Li N, Zhang X, Horng T. Mitochondrial metabolism regulates macrophage biology. *J Biol Chem.* 2021;297(1):1–11.
90. Jones AE, Divakaruni AS. Macrophage activation as an archetype of mitochondrial repurposing. *Mol Aspects Med.* 2020;71(1):1–12.
91. Lu G, Zhang R, Geng S, Peng L, Jayaraman P, Chen C, et al. Myeloid cell-derived inducible nitric oxide synthase suppresses M1 macrophage polarization. *Nat Commun.* 2015;6:6676.
92. Everts B, Amiel E, Huang SC-C, Smith AM, Chang C-H, Lam WY, et al. TLR-driven early glycolytic reprogramming via the kinases TBK1-IKK $\epsilon$  supports the anabolic demands of dendritic cell activation. *Nat Immunol.* 2014;15(4):323–32.
93. Li X, Shen H, Zhang M, Teissier V, Huang EE, Gao Q, et al. Glycolytic reprogramming in macrophages and MSCs during inflammation. *Front Immunol.* 2023;14:1–14.
94. Krawczyk CM, Holowka T, Sun J, Blagih J, Amiel E, DeBerardinis RJ, et al. Toll-like receptor-induced changes in glycolytic metabolism regulate dendritic cell activation. *Blood.* 2010;115(23):4742–9.
95. Artyomov M, Sergushiev A, Schilling JD. Integrating Immunometabolism and Macrophage Diversity. *Semin Immunol.* 2016;28(5):417–424.
96. Kieler M, Hofmann M, Schabbauer G. More than just protein building blocks: how amino acids and related metabolic pathways fuel macrophage polarization. *FEBS J.* 2021;288(12):3694–714.
97. Qualls JE, Subramanian C, Rafi W, Smith AM, Balouzian L, DeFreitas AA, et al. Sustained generation of nitric oxide and control of mycobacterial infection requires argininosuccinate synthase 1. *Cell Host Microbe.* 2012;12(3):313–23.

98. MacMicking J, Xie QW, Nathan C. Nitric oxide and macrophage function. *Annu Rev Immunol.* 1997;15(1):323–50.
99. Liu X, Zhou W, Zhang X, Lu P, Du Q, Tao L, et al. Dimethyl fumarate ameliorates dextran sulfate sodium-induced murine experimental colitis by activating Nrf2 and suppressing NLRP3 inflammasome activation. *Biochem Pharmacol.* 2016;112:37–49.
100. Nicholas C. Denko. Hypoxia, HIF1 and glucose metabolism in the solid tumour. *Nat Rev Cancer.* 2008;8:705–13.
101. Blouin CC, Pagé EL, Soucy GM, Richard DE. Hypoxic gene activation by lipopolysaccharide in macrophages: Implication of hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$ . *Blood.* 2004;103(3):1124–30.
102. Jantsch J, Chakravorty D, Turza N, Prechtel AT, Gerlach RG, Volke M, et al. Hypoxia and Hypoxia-Inducible Factor-1 Modulate Lipopolysaccharide-Induced Dendritic Cell Activation and Function. *J Immunol.* 2008;180(7):4697–705.
103. Semenza GL, Jiang BH, Leung SW, Passantino R, Concordat JP, Maire P, et al. Hypoxia response elements in the aldolase A, enolase 1, and lactate dehydrogenase a gene promoters contain essential binding sites for hypoxia-inducible factor 1. *J Biol Chem.* 1996;271(51):32529–37.
104. Kim JW, Tchernyshyov I, Semenza GL, Dang C V. HIF-1-mediated expression of pyruvate dehydrogenase kinase: A metabolic switch required for cellular adaptation to hypoxia. *Cell Metab.* 2006;3(3):177–85.
105. Torales-Cardena A, Martínez-Torres I, Rodríguez-Martínez S, Gómez-Chávez F, Cancino-Díaz JC, Vázquez-Sánchez EA, et al. Cross talk between proliferative, angiogenic, and cellular mechanisms orchestrated by HIF-1 in Psoriasis. *Mediators Inflamm.* 2015;2015:1–11.
106. Xie M, Yu Y, Kang R, Zhu S, Yang L, Zeng L, et al. PKM2-Dependent glycolysis promotes NLRP3 and AIM2 inflammasome activation. *Nat Commun.* 2016;7:1–13.
107. Latz E, Xiao TS, Stutz A. Activation and regulation of the inflammasomes. *Nat Rev Immunol.* 2013;13(6):1–7.
108. Funes SC, Rios M, Escobar-Vera J, Kalergis AM. Implications of macrophage polarization in autoimmunity. *Immunology.* 2018;154(2):186–95.

## **7 Danksagungen**

An dieser Stelle möchte ich den Personen meinen Dank aussprechen, die mich bei der Anfertigung der Dissertation unterstützt und begleitet haben.

Zunächst möchte ich mich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. med. Christian Sadik für die Bereitstellung des Themas und die Möglichkeit die Arbeit in seiner Arbeitsgruppe durchzuführen danken. Ich danke ihm für die hervorragende Betreuung und die Unterstützung in der Umsetzung des Projekts.

Ich danke Herrn Prof. Dr. med. D. Zilikens<sup>†</sup>, ehemaliger Direktor der Klinik für Dermatologie, Allergologie und Venerologie der Universität zu Lübeck für die Möglichkeit der Durchführung der Dissertation an seiner Klinik.

Mein besonderer Dank gilt meinem Betreuer Dr. rer. nat. Paul Schilf für die kontinuierliche Unterstützung während der Zeit im Labor und auf dem Weg der Fertigstellung der Dissertation. Vielen Dank für das Beibringen der Labortechniken, die uneingeschränkte Hilfsbereitschaft bei der Umsetzung der Arbeit, die geduldige Beantwortung meiner Fragen und den stets motivierenden Zuspruch.

Ich bedanke mich bei allen aktiven und ehemaligen Mitgliedern der AG Sadik. Danke für eure tatkräftige Unterstützung und die schöne gemeinsame Zeit im Labor, die ich gerne in Erinnerung behalte.

Ein weiterer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Jan Rupp aus der Klinik für Infektiologie und Mikrobiologie für die Bereitstellung des Seahorse Bioscience Analysegerätes.

Darüber hinaus bedanke ich mich bei den Mitgliedern des Graduiertenkollegs RTG1727 *Modulation of Autoimmunity* für die Möglichkeit der Zusammenarbeit und den intensiven fachlichen Austausch.

Meinen Eltern danke ich für ihre Unterstützung während des Studiums und darüber hinaus. Danke für euer Vertrauen, ohne euch wäre meine Studienzeit so nicht möglich gewesen.

Ganz besonders dankbar bin ich meinen engsten Freunden, die mit mir durch die Höhen und Tiefen der letzten Jahre gegangen sind und mir stets der größte Rückhalt sind. Ich danke euch von Herzen.