NO-Synthasen vermitteln die cholinerge Kontrolle des P2X7-Rezeptors

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Humanmedizin
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Asci, Nilay
aus Schwerte

Gießen (2024)

Aus dem Fachbereich Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen.

Klink für Allgemein-, Viszeral-, Thorax-, Transplantations- und Kinderchirurgie
Sektion Experimentelle Chirurgie

Gutachterin: Prof. Dr. Veronika Grau

Gutachter: Prof. Dr. Tilman Borggrefe

Tag der Disputation: 02. Oktober 2024

Widmung

Meiner Mutter Naide Asci,

meinem Vater Naci Asci,

meinen Brüdern Eray Asci und Ahmet Berkay Asci

und meinem verstorbenen Onkel Taner Kürkcü.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung 1
1.1 Aktivierung des angeborenen Immunsystems 1
1.1.1 Mononukleäre Phagozyten 1
1.1.2 Ablauf der angeborenen Immunantwort 3
1.1.3 Toll-like-Rezeptor-4-Signalkaskade 4
1.1.4 NLRP3-Inflammasom 5
1.1.5 P2X7-Rezeptor-Signalkaskade 8
1.1.6 Interleukin-1β 10
1.1.7 Cholinerge Kontrolle der Interleukin-1β-Freisetzung 11
1.2 NO-Synthasen 14
1.2.1 Isoformen und Expression der NO-Synthasen 14
1.2.2 Signaltransduktion von Stickstoffmonoxid und Peroxynitrit 16
1.3 Fragestellung und Hypothesen 18
2. Material und Methoden 20
2.1 Reagenzien 20
2.2 Verbrauchsmaterialien 22
2.3 Geräte 24
2.4 Software 24
2.5 Methoden 25
2.5.1 Monozytäre THP-1-Zellen 25
2.5.1.1 Kultivierung der THP-1-Zellen 25
2.5.1.2 Versuchsaufbau 25
2.5.2 THP-1-Zellen-abhängige Makrophagen 27
2.5.2.1 Differenzierung von THP-1-Zellen zu Makrophagen 27
2.5.2.2 Versuchsaufbau 27
2.5.3 Murine mononukleäre Zellen des peripheren Blutes und bone marrow-derived Makrophagen 28
2.5.3.1 Mäuse 28
2.5.3.2 Isolierung und Experimente an murinen mononukleären Zellen des peripheren Blutes 28
2.5.3.3 Differenzierung und Experimente an murinen bone marrow-derived Makrophagen 29
2.5.4 Humane mononukleäre Zellen des peripheren Blutes 31
2.5.4.1 Blutspender und Aufreinigung der Zellen 31
2.5.4.2 Versuchsaufbau 31

2.5.5 Durchflusszytometrie 32
2.5.6 Messverfahren 34
2.5.6.1 Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) 34
2.5.6.2 Laktatdehydrogenase (LDH)-Aktivität 34
2.5.7 Statistische Datenauswertung 35
3. Ergebnisse 36
3.1 Wirkung von NO-Synthase-Inhibitoren 36
3.1.1 Experimente an monozytären THP-1-Zellen 36
3.1.2 Experimente an zu M1-Makrophagen differenzierten THP-1-Zellen 38
3.2 Wirkung von NO- und Peroxynitrit-Donoren 42
3.2.1 Experimente an monozytären THP-1-Zellen 42
3.2.2 Experimente an zu M1-Makrophagen differenzierten THP-1-Zellen 46
3.2.3 Experimente an murinen Zellen 48
3.2.3.1 Murine mononukleäre Zellen des peripheren Blutes 48
3.2.3.2 Murine bone marrow-derived Makrophagen 50
3.2.4 Experimente an humanen mononukleären Zellen des peripheren Blutes 53
3.3 Zellvitalität 57
4. Diskussion 61
4.1 Methodendiskussion 61
4.1.1 Verwendete Zellen 61
4.1.2 Zellvitalität 65
4.2 Nikotinische Acetylcholin-Rezeptor-Agonisten aktivieren die endotheliale NO-Synthase 67
4.3 NO und Peroxynitrit inibieren die ATP-abhängige Interleukin-1β-Freisetzung 70
4.4 Limitationen der Studie und Ausblick 74
5. Schlussfolgerung 75
6. Zusammenfassung 77
6.1 Englisch 77
6.2 Deutsch 79
7. Abbildungsverzeichnis 81
8. Tabellenverzeichnis 82
9. Abkürzungsverzeichnis 83
10. Litertaur 86
11. Publikationen und Kongressbeiträge 113
12. Ehrenwörtliche Erklärung 114
13. Danksagung 115

1. Einleitung

1.1 Aktivierung des angeborenen Immunsystems

1.1.1 Mononukleäre Phagozyten

Diese Arbeit konzentriert sich auf die mononukleären Phagozyten des angeborenen Immunsystems, insbesondere die Monozyten und Makrophagen. Monozyten entstehen aus Vorläuferzellen, den sogenannten Promonozyten, im Knochenmark und stellen die primäre Form mononukleärer Phagozyten im Blut dar (Jakubzick et al., 2017; Van Furth und Cohn, 1968). Sie zirkulieren für etwa 32 Stunden im Blut bevor sie in Gewebe und lymphatische Organe wandern (Sica et al., 2015; Van Furth und Cohn, 1968). Die im Blut zirkulierenden Monozyten werden in Menschen in 3 Subtypen eingeteilt. Ein Subtyp, die klassischen Monozyten, hat die Fähigkeit in Gewebe zu migrieren, während ein anderer Subtyp, die nicht klassischen Monozyten, die Endothelzellfunktion unterstützt und die Gefäßwände schützt (Jakubzick et al., 2017; Ziegler-Heitbrock et al., 2010). Der dritte Zelltyp sind die intermediären Monozyten, die eine Übergangsform zwischen den klassischen und den nicht klassischen Monozyten sind. Anhand der Ausprägung der Zelloberflächenmarker CD14 und CD16 (CD, cluster of differentiation) können die Monozytensubtypen eingeteilt werden und im Rahmen von durchflusszytometrischen Analysen identifiziert werden. Die klassischen Monozyten weisen eine hohe Expression von CD14 auf, aber keine Expression von CD16 ($CD14^{++}$, $CD16^{-}$). Die intermediären Monozyten zeigen ebenfalls eine hohe Expression von CD14 und eine niedrige Expression von CD16 ($CD14^{++}$, $CD16^{+}$). Die nicht klassischen Monozyten zeigen eine hohe Expression an CD16 und eine niedrige CD14 Expression ($CD14^{+}$, $CD16^{++}$) (Ziegler-Heitbrock et al., 2010). Lange Zeit wurde angenommen, dass Monozyten, die in Gewebe einwandern, sich zu Gewebsmakrophagen differenzieren und lediglich dadurch ihre Funktion in der Immunabwehr ausführen. Aktuelle Studien konnten zeigen, dass Monozyten auch in der Zirkulation im Blut immunologische Funktionen übernehmen (Jakubzick et al., 2017).

Makrophagen weisen eine bedeutende Plastizität auf und reagieren auf Reize aus dem jeweiligen Gewebe mit dem Erwerb unterschiedlicher funktioneller Phänotypen. Entsprechend der Veränderungen in ihrer Umgebung können Makrophagen, stark vereinfacht gesehen, zu pro-inflammatorischen M1-Makrophagen (klassische Aktivierung) oder zu anti-inflammatorischen M2-Makrophagen (alternative Aktivierung) polarisieren

(Jakubzick et al., 2017; Martinez und Gordon, 2014; Shapouri-Moghaddam et al., 2018; Sica und Mantovani, 2012). Ein wichtiger Aspekt der Makrophagen-Polarisierung ist die Veränderung der Expression von Zelloberflächenmarkern. M1-Makrophagen kennzeichnen sich durch eine Expression der Zelloberflächenmarker CD80, CD86 und CD16/32, während M2-Makrophagen eine Expression von CD206 und der zytoplasmatischen Arginase-1 zeigen (Yunna et al., 2020). Diese Marker werden bei der Unterscheidung der Makrophagensubtypen zum Beispiel im Rahmen von durchflusszytometrischen Analysen verwendet.

Die Polarisierung zu M1-Makrophagen wird zum Beispiel durch die von TH_1-Zellen sezernierten Zytokine Interferon-γ (IFN-γ) und Tumornekrosefaktor-α (TNF-α) und/oder durch Lipopolysaccharid (LPS) aus der Zellwand gramnegativer Bakterien induziert (Martinez und Gordon, 2014; Shapouri-Moghaddam et al., 2018). M1-Makrophagen stimulieren die Induktion und Aufrechterhaltung von Entzündungen durch die Sekretion pro-inflammatorischer Zytokine, wie IL-1β, IL-6, IL-12 (IL, Interleukin) und TNF-α (Martinez et al., 2009; Shapouri-Moghaddam et al., 2018). Darüber hinaus sind M1-Makrophagen in der Lage Effektormoleküle, wie Stickstoffmonoxid (NO) und reaktive Sauerstoffspezies (ROS) zu bilden, um Pathogene effektiv zu bekämpfen (Shapouri-Moghaddam et al., 2018; Sica und Mantovani, 2012).

M2-Makrophagen, die durch TH_2-Zellen induziert werden können, wirken anti-inflammatorisch und tragen zur Beendigung von Immunreaktionen bei (Gordon, 2003; Shapouri-Moghaddam et al., 2018). M2-Makrophagen dämmen die Immunreaktion durch Sekretion anti-inflammatorischer Zytokine, wie IL-10, ein. Weiterhin fördern sie die Gewebereparatur, wirken angiogenetisch und hemmend auf die Antigenpräsentation (Shapouri-Moghaddam et al., 2018). In infizierten Geweben dominieren darum zunächst die pro-inflammatorischen M1-Makrophagen, die den Wirt bei der Abwehr von Krankheitserregern unterstützen. Anschließend erfolgt die Polarisierung zu M2-Makrophagen, um eine entzündungshemmende Reaktion auszulösen und beschädigtes Gewebe zu reparieren (Yunna et al., 2020).

Sowohl Monozyten, als auch Makrophagen sind zur Phagozytose befähigt. Sie können Effektorzellen und Antigen-präsentierende Zellen sein und damit eine adaptive Immunantwort induzieren (Jakubzick et al., 2017). In diesem Zusammenhang ist die Produktion und Ausschüttung des pro-inflammatorischen Zytokins IL-1β von entscheidender Bedeutung. Dieses Zytokin reguliert die Intensität der Immunantwort. Allerdings führt ein Überangebot bzw. eine Dysregulation von IL-1β zu gravierenden

Konsequenzen, wie der Entwicklung eines lebensbedrohlichen SIRS (systemic inflammatory response syndrome) und einer Sepsis (siehe Kapitel 1.1.6).

1.1.2 Ablauf der angeborenen Immunantwort

Es gibt verschiedene Erklärungsansätze für die Funktionsweise des angeborenen Immunsystems. Janeway postulierte 1989, dass die Zellen des angeborenen Immusystems durch Pathogen-assoziierte molekulare Muster (pathogen-associated molecular patterns, PAMPs) erkannt und aktiviert werden (Janeway, 1989). PAMPs sind evolutionär stark konservierte überlebenswichtige Strukturen, die in verschiedenen Kompartimenten von Pathogenen vorkommen, was sie ideal als Erkennungsmerkmale macht. Zu den PAMPs zählen beispielsweise Glykolipide, Polysaccharide, Lipoproteine und Nukleinsäuren (Medzhitov und Janeway, 2000). PAMPs werden von Muster-erkennenden Rezeptoren (pattern recognition receptors, PRRs) erkannt, die von Monozyten, Makrophagen, dendritischen Zellen, aber auch B-, T-Zellen und vielen weiteren Zellen exprimiert werden (Kawai und Akira, 2010). Zu den PRRs gehören die an die Zellmembran gebundenen Toll-like Rezeptoren (TLRs) und die C-Typ Lektin Rezeptoren (CLRs), im Zytosol vorkommende Nukleotid-bindende und oligomerisierende Domäne (NOD)-like Rezeptoren (NLRs) und die sezernierten Collectine (Iwasaki und Medzhitov, 2015; Martinon et al., 2009). Einige Bereiche der Immunologie stellen das von Janeway vorgeschlagene DAMP-Modell in Frage. Dazu gehören unter anderem Immunreaktionen aufgrund von Verletzungen und die Tolerierung apathogener Keime zum Beispiel im gastrointestinalen System (Broggi und Granucci, 2015; Martinon et al., 2009).

1994 wurde von Matzinger eine alternative bzw. ergänzende Hypothese bezüglich der Aktivierung des angeborenen Immunsystems vorgeschlagen (Matzinger, 1994). Matzinger postulierte, dass das angeborene Immunsystem durch Schaden-assoziierte molekulare Muster (damage-associated molecular patterns, DAMPs) aktiviert wird, die von gestressten und geschädigten Körperzellen freigesetzt werden. Infolgedessen basiert die Immunreaktion in diesem Modell weniger auf dem Pathogen selbst, als auf dem Schaden, den es verursacht. Zu den DAMPs zählen unter anderem Harnsäurekristalle, extrazelluläres Adenosintriphosphat (ATP), freie DNA, high mobility group box protein 1, Hitzeschockproteine, sowie Bestandteile der extrazellulären Matrix wie Fibronectin und Heparansulfat (Bianchi, 2007; Gong et al., 2020; Martinon et al., 2009; Matzinger, 1994;

Tsan und Gao, 2004). Analog zu den PAMPs werden auch die DAMPs von PRRs erkannt und lösen weitgehend ähnliche Antworten aus (Matzinger, 2002; Schaefer, 2014).
Die beiden anerkannten Modelle von Janeway und Matzinger sollten nicht als sich widersprechend betrachtet werden, sondern vielmehr als sich ergänzend. Beide Modelle unterstreichen die Notwendigkeit zweier Signale zum Auslösen einer Immunreaktion. Die aktuelle Forschung beschreibt ein Zwei-Faktoren-Modell. Ein PAMP, wie zum Beispiel LPS, ein bakterielles Endotoxin aus der Zellwand gramnegativer Bakterien (Raetz und Whitfield, 2002), kann bereits eine Immunreaktion auslösen. Ein zeitlich versetzt auftretendes DAMP, wie zum Beispiel extrazelluläres ATP aus geschädigten Zellen, führt dann zu einer fulminanten Entzündungsreaktion (Fontana und Vance, 2011; Gong et al., 2020; Martinon et al., 2009). Ferner spielen der Ort der Aktivierung und der Zelltyp eine wichtige Rolle. Eine Pathogenerkennung im Blutkreislauf löst eine stärkere Immunantwort aus, als eine Erkennung an der Oberfläche der Mukosa. Ebenso ist die Immunreaktion, die von Gewebsmakrophagen ausgelöst wird, weniger stark, als die, die von im Blutkreislauf zirkulierenden Monozyten (Iwasaki und Medzhitov, 2015).

1.1.3 Toll-like-Rezeptor-4-Signalkaskade

TLRs wurden als erste unter den oben beschriebenen PRRs identifiziert und sind bis heute die am ausführlichsten beschriebenen PRRs (Kawasaki und Kawai, 2014). Die TLRs wurden erstmals in der Taufliege Drosophila melanogaster beschrieben (Lemaitre et al., 1996). In Menschen wurden bisher 10 Mitglieder (TLR1-TLR10) dieser Rezeptorfamilie identifiziert (Kawai und Akira, 2010; Kawasaki und Kawai, 2014). TLRs können in der Zellmembran oder in der Membran intrazellulärer Zellkompartimente lokalisiert sein, wobei alle TLRs einen ähnlichen Aufbau aufweisen. Die gemeinsamen Strukturmerkmale aller TLRs sind die Leucin-reichen Wiederholungen (leucin-rich repeats, LRRs) in der Ektodomäne, die die Erkennung von DAMPs und PAMPs vermitteln, die Transmembrandomäne und die zytoplasmatische Toll/IL-1-Rezeptor (TIR)-Domäne, die die nachgeschaltete Signalübertragung initiiert (Fitzgerald und Kagan, 2020; Kawasaki und Kawai, 2014).
Der TLR-4 gehört zu den membranständigen Rezeptoren der Zelloberfläche. Eine Vielzahl von Zellen exprimieren den TLR-4, wobei die höchste Expression in Monozyten und dendritischen Zellen gefunden wurde (Vaure und Liu, 2014). Einer der wichtigsten Liganden für den TLR-4 ist LPS (Kawasaki und Kawai, 2014). Daneben kann der TLR-4

auch endogene Liganden binden, wie die Hitzeschockproteine HSP60 und HSP70, Fibronectin, Hyaluronsäure und Heparansulfat (Arancibia et al., 2007).
Für die Erkennung von LPS durch den TLR-4 sind die beiden Zelloberflächenproteine CD14 und MD-2 (Lymphozytenantigen 96) notwendig (Kawasaki und Kawai, 2014). Ebenso scheint das LPS-bindende Protein (LBP) bei der Bindung von LPS an den TLR-4 von Bedeutung zu sein (Lu et al., 2008). Wenn LPS durch den TLR-4 erkannt wird, wird der TLR-4 durch Dimerisierung aktiviert. Die intrazelluläre Signalkaskade kann über 2 Signalwege weitergeleitet werden. Einer davon erfolgt über das Adapterprotein MyD88 (myeloid differentiation primary response 88), der andere über das Adapterprotein TRIF (TIR-domain-containing adapter-inducing interferon-β).
Beim MyD88-abhängigen Signalweg werden IRAK-1 (interleukin-1 receptor associated kinase-1) und IRAK-4 (interleukin-1 receptor associated kinase-4) aktiviert und bilden gemeinsam mit MyD88 das Myddosom. Sie arbeiten zusammen mit TRAF6 (TNF-α receptor associated factor-6) und aktivieren TAK1 (TGF-β-activated kinase-1), was die beiden Transkriptionsfaktoren NF-κB (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells) und AP-1 (Aktivatorprotein-1) rekrutiert.
Beim MyD88-unabhängigen Signalweg kommt es über TRIF und seinem Verbindungsmolekül TRAM (TRIF-related adaptor molecule) zur Aktivierung von TRAF3 (TNF-α receptor associated factor-3) und zur Rekrutierung des Transkriptionsfaktors IRF-3 (Interferon-regulierender Faktor 3). Ähnlich dem MyD88-abhängigen Signalweg kann TRIF zeitlich verzögert über TRAF6 TAK1 aktivieren und zur Rekrutierung des Transkriptionsfaktors NF-κB führen (Kawasaki und Kawai, 2014; Lu et al., 2008).
Beide Signalwege führen über die Aktivierung der Transkriptionsfaktoren AP-1, IRF-3 und NF-κB zu einer verstärkten Transkription und Bereitstellung verschiedener pro-inflammatorischer Zytokine, wie Pro-IL-1β (Kawasaki und Kawai, 2014), dem Vorläufer des biologisch aktiven Zytokins IL-1β (Cullen et al., 2015). Außerdem führen sie zu einer verstärkten Expression der Komponenten des NLRP3-Inflammasoms (Becker und O'Neill, 2007; Broggi und Granucci, 2015).

1.1.4 NLRP3-Inflammasom

Erstmals wurden Inflammasome 2002 als entscheidender Bestandteil des angeborenen Immunsystems beschrieben (Martinon et al., 2002). Inflammasome sind intrazelluläre Multiproteinkomplexe, die über eine Aktivierung von inflammatorischen Caspasen zur

proteolytischen Aktivierung der pro-inflammatorischen Zytokine IL-1β und IL-18 sowie weiteren Proteinen führen (Martinon et al., 2009). Sie können zudem Pyroptose auslösen, eine spezielle Form des Zelltodes, die weitere Entzündungsreaktionen fördert (Broz und Dixit, 2016). Sie kommen vor allem in Monozyten und Makrophagen vor, wurden aber auch in Ephitelzellen (Winsor et al., 2019) und Osteoblasten (McCall et al., 2008) nachgewiesen.

Der NLR (NOD-like Rezeptor), eine Untergruppe der PRRs, ist ein wesentlicher Bestandteil der Inflammasome. Alle humanen NLRs weisen einen ähnlichen Aufbau auf. Sie bestehen aus den folgenden 3 Strukturmerkmalen: 1. LRRs bilden die C-terminale Domäne, die der Erkennung und Bindung von Liganden dient. 2. Die NTP-ase Domäne umfasst NACHT (Akronym für NAIP (neuronal apoptosis inhibitory protein), CIITA (MHC class II transcription activator), HET-E (incompatibility locus protein from Podospora anserina) und TP1 (telomerase-associated protein)), die für die Oligomerisierung von entscheidender Bedeutung ist. 3. Die N-terminale Domäne kann je nach Inflammasom-Unterform eine PYD (pyrinhaltige Domäne), eine CARD (Caspase Rekrutierungsdomäne) oder eine BIR (Apoptose-inhibierende Domäne) enthalten. Sie übernehmen die Effektorfunktion (Martinon et al., 2009). Eine Unterfamilie der NLRs wird von NALP (NACHT, LRR and PYD domains-containing protein) gebildet. NALPs repräsentieren die größte Unterfamilie und werden im Menschen durch 14 Gene codiert (Martinon et al., 2009).

Das NLRP3-Inflammasom, auch bekannt unter dem Namen NALP3-Inflammasom, ist bisher das am besten untersuchte Inflammasom. Es setzt sich zusammen aus NLRP3 und dem Adapterprotein ASC (apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD), an das die Pro-Caspase 1 binden kann (Blevins et al., 2022; Schroder und Tschopp, 2010). ASC scheint ein entscheidender Bestandteil bei der Bildung des NLRP3-Inflammasoms zu sein. ASC enthält ein N-terminales PYD und ein C-terminales CARD (Martinon et al., 2009). Die Aktivierung von NLRP3 führt zu dessen Oligomerisierung. Über die PYD-Domäne interagiert NLRP3 mit der PYD-Domäne von ASC über eine PYD:PYD Interaktion. ASC rekrutiert über seine CARD-Domäne die CARD-Domäne der Pro-Caspase-1 und bildet eine CARD:CARD Interaktion. Durch proteolytische Spaltung aktiviert sich die Caspase-1 selbst. Caspase-1 selbst hat die Fähigkeit durch proteolytische Spaltung Pro-IL-1β in die biologisch aktive Form IL-1β zu überführen, welches anschließend die Zelle verlassen kann (Schroder und Tschopp, 2010).

Das NLRP3-Inflammasom kann durch verschiedene Signale aktiviert werden. Hierzu zählen Bestandteile mikrobiellen, aber auch nicht-mikrobiellen Ursprungs. Mikrobielle Aktivatoren können doppelsträngige RNA, MDP (Muramyl-Dipeptid) und porenbildende bakterielle Toxine wie α-Hämolysin, Aerolysin und Nigericin sein (Martinon et al., 2009). Nicht-mikrobielle Aktivatoren umfassen unter anderem Asbest, Silizium und Aluminium (Dostert et al., 2008). Auch endogene Signale spielen eine entscheidende Rolle bei der Aktivierung. ATP (Gombault et al., 2013), Cholesterinkristalle (Duewell et al., 2010), β-Amyloid (Halle et al., 2008) und Uratkristalle (Shi et al., 2010) sind einige Beispiele für endogene Aktivatoren des NLRP3-Inflammasoms. Die Mechanismen, die für die Bildung und Aktivierung von Inflammasomen verantwortlich sind, sind noch nicht vollständig verstanden und werden kontrovers diskutiert.

In der gegenwärtigen Forschung werden 3 wesentliche Mechanismen, die zum Zusammenbau des NLRP3-Inflammasoms führen, diskutiert, die durch DAMPs und PAMPs induziert werden können: 1. Ionenflüsse aus der Zelle, induziert durch Ionenkanäle oder porenbildende Toxine. 2. Lysosomaler Schaden und Cathepsin-B-abhängige Prozessierung, induziert durch Phagozytose kristalliner Substanzen. 3. Reaktive Sauerstoffspezies und mitochondriale Dysfunktion (Blevins et al., 2022; Schroder und Tschopp, 2010).

In dieser Arbeit wurden die NLRP3-Inflammasom-Aktivatoren ATP und Nigericin verwendet. Es ist bekannt, dass ATP bei Zellstress und Zelluntergang freigesetzt wird (Iyer et al., 2009; Martinon et al., 2009). Ebenso wurde gezeigt, dass humane Monozyten und Makrophagen als Reaktion auf verschiedene DAMPs, wie LPS und Uratkristalle, gezielt ATP freisetzen können (Gombault et al., 2013). Die Bindung von extrazellulärem ATP an den ionotropen Purinorezeptor P2X7 (P2X7R) führt unter anderem zu einer erhöhten Permeabilität der Zellmembran für Kalium (K^+)-Ionen und damit zu deren Ausstrom in den Extrazellularraum. Pannexin-1 scheint diesen Mechanismus durch Ausstrom von intrazelluärem ATP autokrin und parakrin zu verstärken (Gombault et al., 2013; Piccini et al., 2008). Ein wichtiger Aktivator des NLRP3-Inflammasoms ist die Verringerung der intrazellulären K^+-Konzentration (Katsnelson et al., 2015). Es wurde gezeigt, dass physiologische K^+-Konzentrationen um 70 µM eine hemmende Wirkung auf die Bildung und Aktivierung des Inflammasoms haben (Pétrilli et al., 2007). Ein P2X7R-unabhängiger Aktivator des NLRP3-Inflammasoms ist das bakterielle Exotoxin Nigericin. Durch die Bildung von Poren in der Zellmembran ermöglicht auch Nigericin den Ausstrom von K^+-Ionen (Greaney et al., 2015). Ein durch Nigericin induzierter lysosomaler Zerfall und

Cathepsin-B-abhängige Prozessierung und Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms werden in der gegenwärtigen Forschung ebenfalls diskutiert (Hentze et al., 2003).

1.1.5 P2X7-Rezeptor-Signalkaskade

Der P2X7R ist ein ATP-gesteuerter, nicht selektiver trimerer Ionenkanal und gehört in die Gruppe der purinergen Rezeptoren (Illes et al., 2021). Eine erste Klassifikation dieser Rezeptoren erfolgte 1976 durch Burnstock, welche bis heute noch Gültigkeit hat (Burnstock, 1976). Er teilte die purinergen Rezeptoren in 2 große Rezeptorfamilien auf, die P1- und P2-Purinorezeptoren. P1-Rezeptoren werden von Adenosin aktiviert und gehören zu den G-Protein gekoppelten Rezeptoren. P2-Rezeptoren werden vorwiegend durch extrazelluläres ATP aktiviert. Die Entdeckung ihrer grundlegend verschiedenen Signaltransduktionsmechanismen führte zur weiteren Untergliederung dieser Rezeptorklasse. Während P2Y-Rezeptoren (P2YR) G-Protein-gekoppelte Rezeptoren sind, handelt es sich bei den P2X-Rezeptoren (P2XR) um ligandengesteuerte Ionenkanäle (Abbracchio und Burnstock, 1994).

Die Gruppe der P2XRs umfasst 7 verschiedene Ionenkanäle mit einer sehr kurzen Reaktionszeit von 10 ms, was nur auf den P2X7R nicht zutrifft (Bean, 1992; Di Virgilio et al., 2017). Die Aktivierung der P2XRs durch Bindung von ATP bewirkt den Einstrom von Natrium (Na^+)-Ionen und Calcium (Ca^{2+})-Ionen, sowie den Ausstrom von K^+-Ionen (Cekic und Linden, 2016). Unter den P2XRs nimmt der P2X7R eine Sonderstellung ein. Im Vergleich zu den anderen P2XR-Subtypen weist der P2X7R die niedrigste Affinität zu ATP auf (Illes et al., 2021). Für die Aktivierung sind hohe ATP-Konzentrationen im mikromolaren Bereich erforderlich, weshalb eine Aktivierung hauptsächlich in stark entzündetem Gewebe erfolgt. Darüber hinaus zeigt der P2X7R im Gegensatz zu den anderen P2XRs keine Desensibilisierung gegenüber von ATP (McCarthy et al., 2019). Ein weiterer Unterschied besteht darin, dass der P2X7R Poren bildet, die bei längerer Einwirkung von ATP eine Dilatation zeigen. Dies ermöglicht den Durchtritt von Substanzen bis 900 Da, einschließlich ATP (Adinolfi et al., 2018; Cekic und Linden, 2016; Di Virgilio et al., 2017).

P2XRs sind homo- oder heterotrimere Proteine, wobei jedes Monomer eine Bindungsstelle für ATP aufweist (Nicke, 1998). Jedes Proteinmonomer weist einen ähnlichen Aufbau auf. Zwei Transmembrandomänen (TM1 und TM2) sind am Aufbau der Ionenpore beteiligt. Zwischen diesen hydrophoben Domänen liegt eine hydrophile extrazelluläre Schleife, die

aus etwa 280 Aminosäuren besteht. Auf dieser sind 14 Glycinreste, 6 Glykosylierungsstellen und 10 Cysteinreste lokalisiert, die paarweise Disulfidbrücken bilden und die dreidimensionale Bindungsstelle für ATP ausbilden. Intrazellulär liegen der N-Terminus und der C-Terminus vor. Der N-Terminus ist in allen P2XRs gleich lang und enthält eine Proteinkinase-C-Phosphorylierungsstelle (Di Virgilio et al., 2017). Eine Besonderheit weist der P2X7R im C-terminalen Proteinabschnitt auf. Der C-Terminus ist bei diesem Rezeptor etwa 200 Aminosäuren länger als bei den anderen P2XRs. Es wird angenommen, dass der C-Terminus eine Vielzahl von Sequenzen enthält, über die er mit verschiedenen Proteinen interagieren kann und dass er verschiedene Aminosäurereste enthält, die mögliche Stellen für kovalente Proteinmodifikation darstellen (Costa-Junior et al., 2011). Der C-Terminus scheint an der Regulierung der Rezeptorfunktion, insbesondere an der fehlenden Desensibilisierung sowie an der Öffnung und Dilatation der Pore beteiligt zu sein (Becker et al., 2008; Costa-Junior et al., 2011; Di Virgilio et al., 2017). Der strukturelle Aufbau des C-Terminus wurde erst kürzlich durch Kryoeletronenmikroskopie von McCarthy et al. (2019) aufgeklärt (McCarthy et al., 2019). Es besteht aus 3 funktionell wichtigen Domänen: 1. Cystein-reiche Domäne, 2. zytoplasmatische Domäne und 3. Ballastregion, die einen Zinkionenkomplex und eine Guanosin-Nukleotid-Bindungsstelle enthält. Die zytoplasmatische Kappe stellt die Verbindung zum N-Terminus her und ist am Aufbau der Ionenpore beteiligt. McCarthy et al. (2019) konnten zeigen, dass die fehlende Desensibilisierung des P2X7R gegenüber ATP auf eine Palmitoylierung der Cystein-reichen Domäne zurückzuführen ist. Die Cystein-reiche Domäne stellt eine Verbindung zwischen der TM2-Domäne und der zytoplasmatischen Kappe her. Proteinpalmitoylierung ist bekannt dafür, Ionenkanäle in Bezug auf die Proteinassemblierung, -reifung, -transport oder –einbau in die Membran zu regulieren (Naumenko und Ponimaskin, 2018; Shipston, 2011). Bei dem P2X7R stellt eine Palmitoylierung der Cystein-reichen Region eine Verankerung des zytoplasmatischen Anteils der TM2-Domäne an der Zellmembran her und verhindert darüber eine Desensibilisierung. Die Funktion der Ballastregion ist noch unklar.

Der P2X7R wird von fast allen Zellen des menschlichen Körpers exprimiert, wenn auch in unterschiedlichem Ausmaß (Illes et al., 2021). Immunzellen, wie Monozyten, Makrophagen, dendritische Zellen, B- und T-Lymphozyten zeigen die höchste Expression des Rezeptors (Di Virgilio et al., 2017; Lara et al., 2020). Die am besten charakterisierte Immunantwort im Zusammenhang mit der Stimulation des P2X7R ist die Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms über eine Senkung der intrazellulären K^+-Konzentration. Der

P2X7R gilt als der stärkste Aktivator der Reifung und Freisetzung von IL-1β und ist somit ein entscheidender Auslöser von Entzündungsreaktionen (Di Virgilio et al., 2017). Des Weiteren vermittelt der P2X7R die Freisetzung zusätzlicher pro-inflammatorischer Zytokine, Chemokine, die Differenzierung von T-Lymphozyten und den Zelltod (Illes et al., 2021). Während die Rolle des P2X7R im Immunsystem gut bekannt ist, ist sie in anderen Geweben noch unklar. Eine Beteiligung des Rezeptors an der Pathogenese kardiovaskulärer Erkrankungen (Shokoples et al., 2021) und der Tumorprogression (Lara et al., 2020), sowie der Schmerzverarbeitung (Inoue und Tsuda, 2021) werden diskutiert.

1.1.6 Interleukin-1β

IL-1β ist ein potentes pro-inflammatorisches Zytokin, das eine entscheidende Rolle im Rahmen von Entzündungsreaktionen spielt und verschiedene Wirkungen auf eine Vielzahl von Zellen ausübt (Kaneko et al., 2019). IL-1β wird sowohl von Zellen des angeborenen als auch des adaptiven Immunsystems sezerniert, wobei die Monozyten, Makrophagen und dendritischen Zellen als Hauptproduzenten dieses Zytokins gelten (Dinarello, 2009; Garlanda et al., 2013). Daneben konnte eine Freisetzung von IL-1β auch bei Epithelzellen, Keratinozyten, Fibroblasten, Synoviozyten, Neuronen und Gliazellen beobachtet werden (Kaneko et al., 2019; Ren und Torres, 2009).

1974 wurden erstmals von Dinarello et al. 2 verschiedene „human leukocytic pyrogens“ vorgestellt, die als wichtige Faktoren für die Entwicklung von Fieber angesehen wurden (Dinarello et al., 1974). 1985 gelang die Isolierung und Sequenzanalyse von 2 Molekülen, die seitdem als IL-1α und IL-1β bekannt sind (March et al., 1985). IL-1α und IL-1β gehören zu der IL-1-Familie, die heute insgesamt 11 Mitglieder umfasst (Dinarello, 2009, 2011). Obwohl IL-1α und IL-1β eine geringe Homologie in Bezug auf ihre Aminosäuresequenz (27%) zeigen, binden sie beide an dieselben Rezeptoren und vermitteln dieselbe biologische Reaktion (Kaneko et al., 2019). IL-1α wirkt hauptsächlich lokal in infizierten Geweben, wohingegen IL-1β eher systemische Wirkungen zeigt (Dinarello, 1998, 2005). Derzeit sind 10 verschiedene IL-1-Rezeptortypen (IL-1R) bekannt (Boraschi et al., 2018). IL-1β bindet an die Rezeptoren IL-1R1 und IL-1R2. Während die Bindung an den IL-1R1 ein Signal auslöst, führt die Bindung an den IL-1R2 zu keiner Signalweiterleitung. Der IL-1R2 gilt deshalb als Decoy-Rezeptor und fungiert als natürlicher Inhibitor (Dinarello, 2005).

IL-1β nimmt zahlreiche wichtige Funktionen im Organismus im Rahmen der Infektabwehr wahr. Dazu gehört unter anderem die Induktion der Synthese der Cyclooxygenase-2 und der induzierbaren Stickstoffmonoxid-Synthase (iNOS), die jeweils zu einer vermehrten Freisetzung von Prostaglandin-E2 oder NO führen (Dinarello, 2005). Prostaglandin-E2 führt im Gehirn zu einer Sollwerterhöhung der Körperkerntemperatur und dadurch zur Entwicklung von Fieber (Dinarello, 2009). Die vermehrte Freisetzung von NO führt in der Peripherie zur Verringerung des Gefäßwiderstandes und darüber zu einer Senkung des Blutdrucks. Im Knochenmark führt IL-1β zur Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten und Thrombozyten in die Blutbahn (Dinarello, 2005). Außerdem führt IL-1β zur Freisetzung von Chemokinen, Adhäsionsmolekülen und weiteren Zytokinen, wie IL-6 und TNF-α (Dinarello, 2005, 2009).

Allerdings wird eine unkontrollierte Freisetzung von IL-1β auch mit der Entwicklung einer Vielzahl von Erkrankungen in Verbindung gebracht. Dazu gehören unter anderem die rheumatoide Arthritis, Gicht, chronisch entzündliche Darmerkrankungen, Atherosklerose, SIRS oder Sepsis (Dinarello, 2005; Epstein et al., 1993; Garlanda et al., 2013; Mantovani et al., 2019). Zudem wurde eine Beteiligung von Il-1β am Progress und der Invasivität in verschiedenen Tumoren nachgewiesen, wie dem Mammakarzinom (Wu et al., 2018).

Folglich erfüllt IL-1β einerseits lebenswichtige Funktionen für den Organismus in Bezug auf die Infektabwehr, kann jedoch bei einem Überschuss auch zu lebensbedrohlichen Zuständen, wie der SIRS und Sepsis führen. Die Tatsache, dass für die Reifung und Freisetzung von IL-1β 2 Stimuli erforderlich sind, zeigt, wie wichtig eine strenge Regulierung dieses Zytokins für den Organismus ist. Aus dem Grund ist die Aufklärung von Mechanismen, die eine strikte Kontrolle der Reifung und Freisetzung von IL-1β regulieren von immenser Bedeutung und therapeutischem Interesse.

1.1.7 Cholinerge Kontrolle der Interleukin-1β-Freisetzung

Um lebensbedrohliche Entzündungsprozesse zu verhindern hat das Immunsystem verschiedene Mechanismen entwickelt, um die Reifung und Freisetzung von IL-1β zu kontrollieren. Ein Mechanismus in murinen und humanen Monozyten, der die ATP-vermittelte NLRP3-Inflammasom Aktivierung und damit einhergehend Reifung und Freisetzung von IL-1β inhibiert, erfolgt über nikotinische Acetylcholinrezeptoren (nAChRs) (Hecker et al., 2015).

Acetylcholin (ACh) gehört zu den ersten Neurotransmittern, die sowohl im zentralen als auch im peripheren Nervensystem identifiziert wurden (Kawashima, 2000). ACh und ACh-synthetisierende Enzyme wurden aber auch in verschiedenen Lebensformen ohne Nervensystem nachgewiesen, was eine weitere nicht-neuronale Funktion erahnen ließ. Heute ist bekannt, dass ACh von weiteren nicht-neuronalen Zellen, wie Lymphozyten, Leukozyten und Endothelzellen exprimiert wird und eine Vielzahl weiterer physiologischer Funktionen im Organismus erfüllt (Hecker et al., 2009; Kawashima et al., 2012, 2015). Eine wichtige Funktion von ACh außerhalb des Nervensystems ist seine anti-inflammatorische Eigenschaft (Kawashima et al., 2012). Außerdem konnte mit verschiedenen Techniken die Expression von nAChRs außerhalb des Nervensystems in Immunzellen nachgewiesen werden (Kawashima, 2000).

Die ATP-vermittelte Reifung und Freisetzung von IL-1β über den P2X7R ist ein wichtiger Teilaspekt in der Regulation dieses Zytokins. Hecker A. et al. (2015) konnten zeigen, dass ACh die ATP-vermittelte IL-1β-Freisetzung in murinen und humanen Monozyten inhibieren kann. Außerdem konnten sie zeigen, dass nAChRs an dieser Inhibierung beteiligt sind (Hecker et al., 2015). Diese unkoventioenellen nAChRs enthalten die Untereinheiten α7, α9 und/oder α10 (Hecker et al., 2015; Itier und Bertrand, 2001; Zoli et al., 2018). Ein weiterer Unterschied zwischen den klassischen und unkonventionellen nAChRs liegt in den grundlegend verschiedenen Signaltransduktionsmechanimen, die nach der Bindung der Liganden ausgelöst werden. Die Aktivierung der typischen nAChRs durch Bindung von ACh führt zu einer Permeabilitätserhöhung für Na^{+}-, K^{+}- und Ca^{2+}-Ionen. Diese Ionenströme lösen klassicherweise eine Depolarisation der Zellmembran aus (Itier und Bertrand, 2001). Die nAChRs, die an der Inhibierung der ATP-induzierten Freisetzung von IL-1β beteiligt sind, weisen keine ionotropen Eigenschaften auf. Vielmehr wird von einer unkonventionellen metabotropen Aktivierung ausgegangen, die zu einer Inhibierung des P2X7R führt. Durch diesen metabotropen Signalweg kann der P2X7R nicht mehr ionotrop auf ATP reagieren. Somit wird die Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms und die proteolytische Spaltung von Pro-IL-1β in seine aktive Form gehemmt (Hecker et al., 2015; Richter et al., 2016). Neben ACh konnten weitere konventionelle und unkonventionelle nikotinische Agonisten identifiziert werden, die die ATP-vermittelte IL-1β-Freisetzung in Monozyten und Makrophagen über die Bindung an nAChRs inhibieren können. Hierzu zählen Nikotin (Nic), Cholin (Cho), Phosphocholin (PC), PC-haltige Moleküle wie Glycerophosphocholin (GPC), Lysophosphatidylcholin (LPC), sowie der Surfactantbestandteil Dipalmitoylphosphatidylcholin (DPPC) (Backhaus et al., 2017;

Hecker et al., 2015; Richter et al., 2016, 2018; Zakrzewicz et al., 2017). Interessanterweise konnte ebenso gezeigt werden, dass einige Akute-Phase-Proteine, die im Rahmen von Entzündungsreaktionen sezerniert werden, ebenso nAChRs aktivieren und die ionotrope Funktion des P2X7R hemmen können. Dazu gehören C-reaktives Protein (CRP), α1-Antitrypsin (AAT) und sekretorische Leukozytenprotease-Inhibitor (SLPI) (Richter et al., 2018; Siebers et al., 2018; Zakrzewicz et al., 2019). CRP, AAT und SLPI scheinen ein Teil der negativen Rückkopplungsschleife zu sein und den Wirt vor einer systemischen Hyperinflammation zu schützen (Richter et al., 2022).

Die cholinerge Kontrolle der IL-1β-Freisetzung ist von hoher biomedizinischer Relevanz, da die für Krankheitserreger typischen ATP-unabhängigen Signalkaskaden zur Inflammasom-Aktivierung nicht beeinträchtigt werden. In der akuten Phase von Traumata und größeren chirurgischen Eingriffen ist die Abwehr gegen Infektionen wünschenswert, wohingegen traumabedingte sterile Entzünden möglichst vermieden werden sollten. Allerdings ist die Signalkaskade zwischen der metabotropen Aktivierung der nAChRs, die zu einer Inhibierung der ionotropen Funktion des P2X7R führt, noch nicht ausreichend geklärt und bedarf weiterer Untersuchungen.

1.2 NO-Synthasen

1.2.1 Isoformen und Expression der NO-Synthasen

In Säugetieren werden 3 Isoformen von NO-Synthasen (NOS) unterschieden: die neuronale NOS (nNOS; NOS I), die induzierbare NOS (iNOS, NOS II) und die endotheliale NOS (eNOS; NOS III) (Förstermann und Sessa, 2012). Durch differentielles Spleißen können aus den entsprechenden Genen weitere NOS-Isoformen generiert werden (Daff, 2010). Trotz ihrer unterschiedlichen Lokalisation, katalytischen Eigenschaften und physiologischen Funktionen weisen die 3 NOS Isoformen eine Homologie der Aminosäuresequenz von 51 bis 57 % auf (Alderton et al., 2001).

Alle 3 NOS Isoformen katalysieren die Reaktion aus L-Arginin zu NO und L-Citrullin und weisen einen ähnlichen Aufbau auf. Alle NOSs bilden ein Dimer aus 2 identischen Monomeren. Jedes NOS-Monomer besteht aus 2 unterschiedlichen Domänen: die C-terminale Reduktase-Domäne und die N-terminale Oxygenase-Domäne. Beide Domänen werden durch eine Calmodulin-Bindungsstelle miteinander verbunden. Die Reduktase-Domäne wird von einer Reihe von redoxaktiven Cofaktoren, wie Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat (NADPH), Flavin-Adenin-Dinukleotid (FAD) und Flavin-Mononukleotid (FMN) gebildet, die ein Elektron seriell weiterleiten. Die Oxygenase-Domäne, beinhaltet ein Zinkion, den redoxaktiven Cofaktor Tetrahydrobiopterin (BH_4), Häm und das Substrat L-Arginin. Über das Zinkion erfolgt die Dimerisierung der beiden NOS-Monomere. BH_4 spielt eine wesentliche Rolle bei der Kopplung zwischen der Reduktase- und Oxygenase-Domäne. Es überträgt das Elektron von FMN aus der Reduktase-Domäne zum Häm der Oxygenase-Domäne. Dies führt zu einer Reduktion des Eisens im Häm, das dann einen Komplex mit molekularem Sauerstoff bilden kann. Dieser Komplex oxidiert die Guanidin-Einheit des Substrats L-Arginin und führt zur Produktion von NO und L-Citrullin (Alderton et al., 2001; Andrew, 1999; Förstermann und Sessa, 2012).

Die beiden NOS-Isoformen eNOS und nNOS werden konstitutiv exprimiert und ihre Aktivität wird posttranslational reguliert durch Phosphorylierung, S-Nitrosylierung, Proteininteraktionen, Verfügbarkeit der Cofaktoren und Substrate, sowie durch den Calciumspiegel (Fernando et al., 2019). Im Gegensatz zu der eNOS und der nNOS ist die iNOS eine nicht konstitutiv vorkommende Isoform. Die Expression von der iNOS wird induziert durch verschiedene Entzündungssignale, wie die Zytokine IL-1β und IFN-γ und

bakterielle Bestandteile, wie LPS. Während die eNOS und nNOS geringe Mengen an NO produzieren, produziert die iNOS eine um den Faktor 10^3 höhere Menge (Fernando et al., 2019).

Je nach Lokalisation und Isoform der NOS ist NO an verschiedenen physiologischen Funktionen des Körpers beteiligt (Bruckdorfer, 2005). Die nNOS ist die erste NOS-Isoform, die aus Gehirngewebe isoliert und kloniert wurde (Bredt et al., 1990, 1991). Daneben konnte nNOS durch immunhistochemische Analysen auch im Rückenmark, in sympatischen Ganglien, in Macula densa-Zellen der Niere, den Insulin-produzierenden Zellen der Bauchspeicheldrüse, den glatten Muskelzellen der Blutgefäße und Epithelzellen verschiedener Organe nachgewiesen werden (Förstermann et al., 1994), wobei die größte Quelle für nNOS gemessen an der Gewebemasse die Skelettmuskulatur ist (Nakane et al., 1993). Im zentralen Nervensystem vermittelt NO verschiedene physiologische Funktionen, wie die Gedächtnisbildung, Lernprozesse und Neurogense (Zhou und Zhu, 2009). NO ist ebenso an der Regulation des Blutdrucks und der Verarbeitung von Schmerz beteiligt (Snyder & Bredt, 1992; Togashi et al., 1992). Im peripheren Nervensystem wird NO als Neurotransmitter von vielen Nerven freigesetzt. Diese Nerven sind nicht nur an der Verringerung des Tonus verschiedener Arten glatter Muskulatur, einschließlich der Blutgefäße beteiligt, sondern nehmen auch verschiedene Funktionen im Gastrointestinaltrakt, im respiratorischen System und bei der Peniserektion ein (Förstermann und Sessa, 2012; Li und Förstermann, 2000).

Die eNOS wird hauptsächlich in den Endothelzellen von Blutgefäßen exprimiert (Knowles und Moncada, 1994). Zudem wurde die eNOS auch in Kardiomyozyten, in Thrombozyten, Neuronen des Gehirns, Synzytiotrophoblasten der menschlichen Plazenta und in Tubuluszellen der Niere nachgewiesen (Förstermann und Sessa, 2012). Als Reaktion auf einen chemischen oder physikalischen Stress, wie Scherstress, bilden Endothelzellen NO, was zur Vasodilatation führt. Dies ist für die Steuerung des Blutflusses und des Blutdrucks von entscheidender Bedeutung (Huang et al., 1995; Shesely et al., 1996). NO gilt zudem als potenter Inhibitor der Thrombozytenaggregation und -adhäsion sowie der Leukozytenadhäsion (Kubes et al., 1991). Darüber hinaus wurde gezeigt, dass NO die DNA-Synthese und die Proliferation von glatten Gefäßmuskelzellen hemmt (Furchgott, 1999; Garg und Hassid, 1989; Nakaki et al., 1990).

Obwohl die Expression von iNOS hauptsächlich in Immunzellen, insbesondere den Makrophagen identifiziert wurde, kann die Expression dieser Isoform durch Induktion via Zytokine und bakterieller Bestandteile in praktisch jeder Zelle erfolgen (Förstermann und

Sessa, 2012). Einmal aktiviert produziert die iNOS große Mengen an NO und nimmt wichtige Funktionen in der Immunregulation ein (Nussler und Billiar, 1993). Während NO einerseits antimikrobiell wirkt, führen große Mengen an NO zur Zellschädigung und Gewebezerstörung. NO ist für die Zytotoxizität von Makrophagen gegenüber von Bakterien, Viren und Tumorzellen verantwortlich. Die zytotoxische und zytostatische Wirkung von NO beruht auf einer Hemmung von Enzymen der Atmungskette und DNA-Synthese und damit Hemmung der Replikation und Vermehrung der Zielzellen (Förstermann und Sessa, 2012; Nguyen et al., 1992).

1.2.2 Signaltransduktion von Stickstoffmonoxid und Peroxynitrit

Seit seiner Entdeckung durch Furchgott RF. et al. vor über 30 Jahren gilt NO nachwievor als eines der am meisten untersuchten Moleküle im Bereich der biomedizinischen Wissenschaft (Fernando et al., 2019; Furchgott et al., 1984). NO ist eine sehr reaktive Verbindung mit einer kurzen Halbwertszeit von wenigen Sekunden (Kelm, 1999). Wie bereits in Kapitel 1.2.1 beschrieben, nimmt NO verschiedene physiologische Funktionen im Organismus ein, wie der Neurotransmission, Muskel- und Gefäßdilatation, sowie Immunregulation.

Es wurden 2 verschiedene Wege der NO-Signalübertragung beschrieben: die klassiche und die nicht-klassische Signalweiterleitung. Bei der klassischen Signalübertragung aktiviert NO die lösliche Guanylatzyklase, welche die Synthese von zyklischem Guanosinmonophosphat (cGMP) aus Guanosintriphosphat (GTP) katalysiert. Als second-messenger vermittelt cGMP unter anderem die Aktivierung der cGMP-abhängigen Proteinkinase G. Diese senkt die K^+- und Ca^{2+}-Konzentration im Zytosol, sodass es zur Hyperpolarisation der Zelle kommt, was die Neurotransmission in Neuronen und Senkung des Tonus in Gefäßen fördert. Die nicht-klassische Signalübertragung beinhaltet die posttranslationale S-Nitrosylierung an Cysteinresten von Proteinen durch NO (Fernando et al., 2019). Aus früheren Studien geht hervor, dass die S-Nitrosylierung ein ubiquitärer Regulierungsmechanimus für die Konformationsänderung und Funktion von Proteinen ist. Viele Prozesse, darunter die Transkription, Reparatur von DNA-Schäden, Zellwachstum und –differenzierung und Apoptose werden durch die S-Nitrosylierung reguliert. Auf der anderen Seite wird eine Fehlregulation dieser Modifikation mit der Pathogenese von

Krankheiten wie Krebs in Verbindung gebracht (Fernando et al., 2019; Hess et al., 2005; Plenchette et al., 2015; Wang, 2012).

In Gegenwart von reaktiven Sauerstoffspezies, wie Superoxidanionenradikalen, die sowohl von aktivierten mononukleären Phagozyten, aber auch von den NOSs selber gebildet werden können, kann NO zu Peroxynitrit reagieren (Andrew, 1999; Canton et al., 2021; Fernando et al., 2019). Peroxynitrit ist ebenfalls ein sehr reaktives Molekül mit einer kurzen Halbwertzeit von weniger als einer Sekunde (Radi et al., 2001). Peroxynitrit ist ein potenziell zytotoxisches Oxidans. Ferner ist die Nitrierung von Tyrosinresten in Proteinen ein elementarer Reaktionsmechanimus, der durch Peroxynitrit durchgeführt wird. Auch die Nitrierung von proteingebundenem Tyrosin kann die Struktur und/oder Funktion von Proteinen beeinträchtigen (Gunaydin und Houk, 2009). Es konnte gezeigt werden, dass die Nitrierung von Tyrosin die Struktur von Aktin und der Tyrosinkinase verändert (Kong et al., 1996). Ebenso konnte gezeigt werden, dass die Nitrierung der Tyrosinhydroxylase, der Tyrosinkinase, sowie der Mangan- und Eisen-Superoxiddismutase durch Peroxynitrit die Aktivität dieser Enzyme verringert (Ara et al., 1998; Gow et al., 1996; Ischiropoulos, 1998). Während die Nitrierung durch Peroxynitrit eher als stabil gilt, ist die S-Nitrosylierung durch NO eine reversible Modifikation (Fernando et al., 2019; Jones, 2012).

1.3 Fragestellung und Hypothesen

Da IL-1β eine schwere systemische Entzündung auslösen kann, ist es evolutionär gesehen sinnvoll, dass seine Ausschüttung durch verschiedene endogene Faktoren kontrolliert werden kann. Die Aufklärung der zugrundeliegenden Signaltransduktionsmechanismen ist daher von hoher biomedizinischer Relevanz. Unsere Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass die Signaltransduktion, die durch eine Aktivierung von nAChRs in mononukleären Phagozyten ausgelöst wird, Ionenfluss-unabhängig ist (Richter et al., 2016; Zakrzewicz et al., 2017). Ionenfluss-unabhängige metabotrope Signalwege der nAChRs sind noch nicht im Detail verstanden. Diese Studie zielt darauf ab, einen zentralen Schritt des Signaltransduktionsmechanimus aufzuklären, bei der die Aktivierung von nAChRs zur Hemmung der ionotropen Funktion des P2X7R führt, das wiederum die Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms und die Freisetzung von IL-1β hemmt.

Frühere Studien haben gezeigt, dass in neuronalen Zellen und Endothelzellen die Aktivierung des homopentameren α7-nAChR zu einer Aktivierung einer NOS führt (El-Mas et al., 2011; Haberberger et al., 2003; Papadopolou et al., 2004). Ebenso geht aus früheren Studien hervor, dass NO und Peroxynitrit durch Modifikationen, wie der S-Nitrosylierung und/oder Nitration, Proteinfunktionen regulieren können (Althaus et al., 2011; Fernando et al., 2019; Jones, 2012). Diese Hinweise veranlassten uns zu der Hypothese, dass der inhibitorische Effekt der nAChRs auf die IL-1β-Freisetzung durch eine Modifikation des P2X7R verursacht wird, die über eine der 3 NOS und NO und/oder Peroxynitrit vermittelt wird.

In dieser Arbeit sollen folgende Hypothesen überprüft werden:

I. Die Aktivierung der nAChRs in mononukleären Phagozyten führt zur Aktivierung einer der 3 NO-Synthasen.
II. Der inhibierende Effekt der nAChRs auf die IL-1β-Freisetzung durch mononukleäre Phagozyten ist auf NO und/oder Peroxynitrit zurückzuführen.

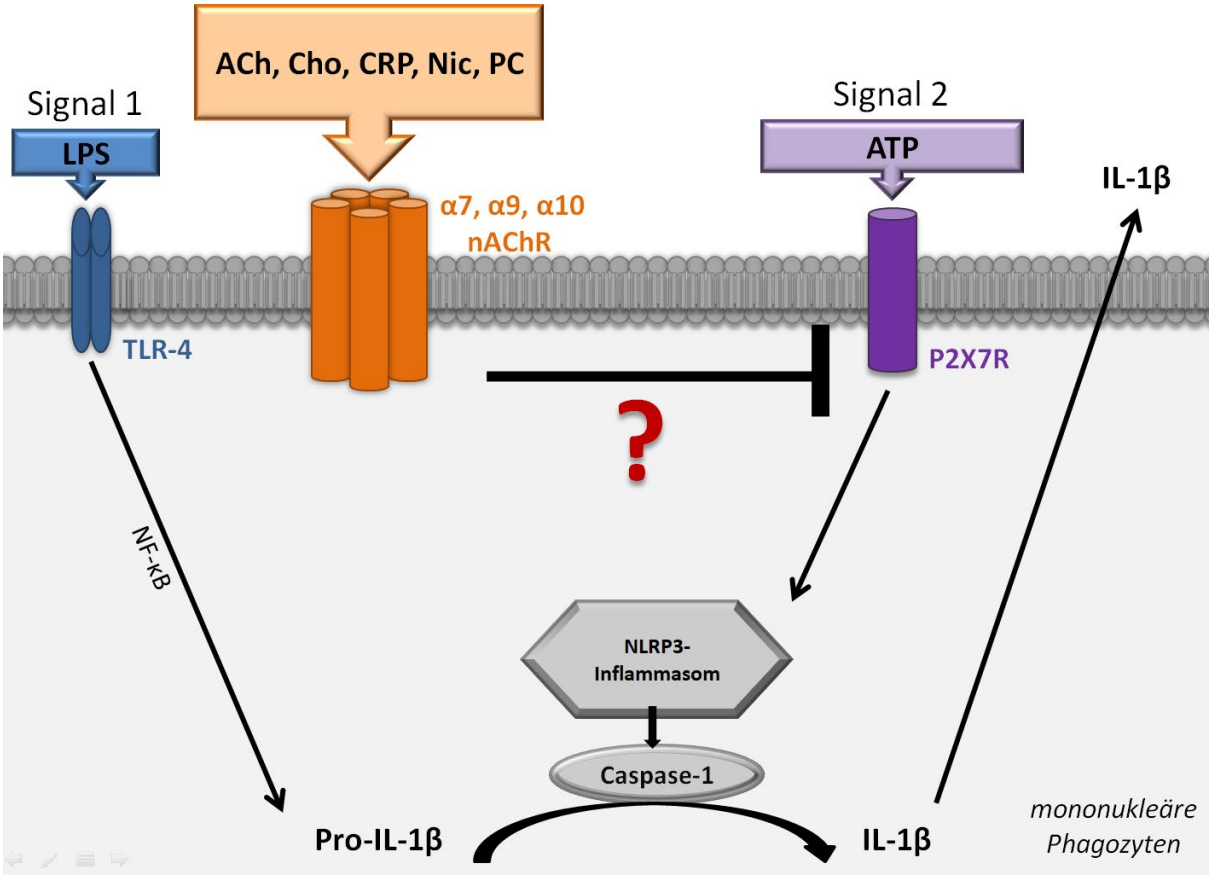

Abbildung 1: **Schematische Darstellung der Fragestellung dieser Arbeit.**
Es bedarf zweier Signale zur Bildung und Freisetzung von reifem IL-1β durch mononukleäre Phagozyten. Das erste Gefahrensignal ist zum Beispiel das Endotoxin LPS aus der Zellwand gramnegativer Bakterien. Dieser bindet an den TLR-4 und führt unter anderem über NF-κB zur Bildung von Pro-IL-1β. Ein zweites Signal kann extrazelluläres ATP aus aktivierten oder geschädigten Zellen sein. Dieses initiiert über die Bindung an den P2X7R die Assemblierung und Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms und Aktivierung der Caspase-1. Es kommt zur Spaltung von Pro-IL-1β in die biologisch aktive Form IL-1β und zu dessen Freisetzung. Der nAChR kann durch verschiedene endogene Signale aktiviert werden, wie ACh, Cho, CRP, Nic und PC. Über einen metabotropen Signalweg inhibiert der nAChR die ionotrope Funktion des P2X7R und führt konsekutiv zu einer geringeren Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms und Bildung von IL-1β.
Ziel dieser Arbeit ist die Identifikation der Komponenten, die an Inhibierung der ionotropen Funktion des ATP-sensitiven P2X7R durch den nAChR beteiligt sind.
ACh: Acetylcholin; **ATP**: Adenosin-5′-Triphosphat; **Cho**: Cholin; **CRP**: C-reaktives Protein; **IL-1β**: Interleukin-1β; **LPS**: Lipopolysaccharid; **nAChR**: nikotinischer Acetylcholinrezeptor; **NF-κB**: Nuclear factor κB; **Nic**: Nikotin; **NLRP3**: NACHT, LRR und PYD Region enthaltendes Protein 3; **P2X7R**: Purinrezeptor 2X7; **PC**: Phosphocholin; **TLR-4**: Toll-like-Rezeptor 4

2. Material und Methoden

2.1 Reagenzien

Reagenz	Firma
Acetylcholin (ACh)	Merck, Darmstadt, Deutschland A6625
2'(3')-O-(4-Benzoylbenzoyl)Adenosin-5'-Triphosphat (BzATP)	Jena Bioscience, Jena, Deutschland B6396
Adenosin-5′-Triphosphat Dinatriumsalz-Hydrat (ATP)	Jena Bioscience A2383
Apyrase	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland A6410
Aqua destillata (ddH_2O)	B. Braun, Melsungen, Deutschland
Bovines Serumalbumin (BSA) Standardklasse, Fraktion V	Serva, Heidelberg, Deutschland A94718
C-reaktives Protein (CRP)	Merck AG723-M
CytoTox 96® Non-Radioactive Cytotoxicity Assay	Promega, Madison, WI, USA
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck D2650
Ethanol (70%)	Merck 32205
Ethylendiamintetraessigsäure 0.5 M (EDTA)	bioWORLD, Dublin, OH, United States 40520000
Fetales Kälberserum (FCS)	Capricorn, Ebsdorfergrund, Deutschland FBS-16A
	Cell Concepts, Umkirch, Germany S-EUR30-I
Heparin	Ratiopharm, Ulm, Deutschland 03029843
Human IL-1 beta/IL-1F2 DuoSet® enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)	R&D Systems®, Biotechne® Minneapolis, MN, USA DY201

Isofluran (5%)	Baxter, Unterschleißheim, Deutschland
L-Glutamin 2 mM	Thermo Fischer Scientific, Dreieich, Deutschland 35050-038
Mouse IL-1 beta/IL-1 F2 DuoSet® enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)	R&D Systems®, Biotechne® DY401
Mouse Quantikine IL-1β Immunoassay	R&D Systems®, Biotechne® MLB00C
Nω-Nitro-L-Arginin-Methylester-Hydrochlorid (L-NAME)	Merck N5751
L-N5-(1-Iminoethyl)-Ornithin (L-NIO)	Tocris, Biotechne®, Wiesbaden-Nordenstadt, Deutschland 0546
Lipopolysaccharid (LPS) aus Escheria coli O111:B4 aus Escheria coli O26:B6	Sigma-Aldrich L2630 L2654
Lymphoprep™	Stemcell Technologies, Köln, Deutschland
Macrophage Colony-Stimulating Factor (M-CSF)	Merck SRP3110
Nikotin-hydrogen-tartrat (Nic)	Merck N5260
Nigericin (Nig)	Sigma-Aldrich N7143
Penicillin-Streptomycin-Stammlösung	Thermo Fischer Scientific
Phorbol-12-Myristate 13-Acetat (PMA)	Sigma-Aldrich P1585
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)	Sigma-Aldrich D8537
Phosphocholin (PC)	Sigma-Aldrich P038
Red Blod Cell (RBC)-lysis Puffer	BioLegend, San Diego, CA, USA 420301

Rekombinantes Interferon-γ Protein der Maus (INF-γ)	R&D Systems, Minneapolis, MN, United States IF005
RNase-freies Wasser	Qiagen, Hilden, Deutschland 129112
RosetteSep™ Human Monocyte Enrichment Cocktail	Stemcell Technologies
RPMI-1640-Medium	Cytiva, Marlborough, MA, United States SH30027
	Sigma-Aldrich R8758
3-Morpholinosydnonimin (SIN-1)	Merck 567028
S-Nitroso -N-Acetyl-DL-Penicillamin (SNAP)	Merck 3398
THP-1-Zelllinie	Leibniz-Institut – Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig, Deutschland
Trypanblau-Lösung	Sigma-Aldrich T8154
TrypLE™ Express	Thermo Fischer Scientific 12605010
Türks-Lösung	Merck 109277

Tabelle 1: **Reagenzien**

2.2 Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial	**Firma**
10 ml Röhrchen	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland 164161
12-well-Zellkulturplatten	Costar™, Corning, NY, United States 3513
12-well- Zellkulturplatten	Greiner Bio-One 665180

48-well- Zellkulturplatten	Greiner Bio-One 677180
50 ml Röhrchen	Greiner Bio-One 227261
96-well- Zellkulturplatten	Greiner Bio-One 655180
Einmalkanüle 26 Gauge (G) x 1/2" / Ø 0,45 x 12 mm 27 Gauge (G) x 1/2" / Ø 0,40 x 13 mm	B. Braun, Melsungen, Deutschland 4665457 305770
Einmalspritze 5 ml/10 ml/ 20 ml	B. Braun 4606051V/ 4606108V/ 4606205V
Eppendorf Safe-Lock Tubes (1,5 ml)	Sarstedt 72.690.001
Falcon tube (50 ml)	Greiner Bio-One 227261
Leucosep	Greiner Bio-One 227288
Percoll-Gradient (diskontinuierlich)	GE Healthcare Biosciences AB, Uppsala, Schweden 17-0891-02
Pipetten Reference 0,5-10 µl/ 10-100 µl/ 100 – 1000 µl	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Pipettenspitzen Steril 10 µl/ 100 µl/ 1000 µl Unsteril 10 µl/ 200 µl/ 1000 µl	Biozym, Hessisch Oldendorf, Deutschland 770010/ 770100/ 770400 Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland 70.762.010/ 70.760.012/ 70.1115
Serologische Pipetten 5 ml/ 10 ml/ 25 ml	Greiner Bio-One 606180/ 607180/ 760180
Zellkulturflasche 75 cm²	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland 83.3911.502
Zellsieb (40 µm)	Thermo Fischer Scientific 22363547

Tabelle 2: **Verbrauchsmaterialien**

2.3 Geräte

Gerät	Firma
Brutschrank Heracell 240i CO_2-Inkubator	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
BD FACSVerse™ Durchflusszytometer	BD Biosciences, Heidelberg
Mikroskop Laborlux D	Leitz, Wetzlar, Deutschland
Mikroskop Laborvert	Leitz, Wetzlar, Deutschland
Sicherheitswerkbank Zellkultur Class II ENA 2	Nuaire, Plymouth, MN, USA
Spektralphotometer FLUOStar OPTIMA	BMG Labortechnologies, Offenberg, Deutschland
Ultraschallbad Sonorex Super RK120H	Bandelin, Berlin, Deutschland
Vortex Mixer REAX 2000	Heidolph, Schwabach, Deutschland
Wasserbad	Köttermann, Uetze/Hänigsen, Deutschland
Zählkammer Neubauer Tiefe: 0,1 mm 0,0025 mm²	Laboroptik, Friedrichshof, Deutschland
Zentrifuge Rotina 420R	Hettich, Tuttlingen, Deutschland

Tabelle 3: **Geräte**

2.4 Software

Produkt	Firma
BD FACSuite™ software	BD Biosciences, Heidelberg
Microsoft Word & Excel	Microsoft, Redmond, WA, USA
SPSS Statistikprogramm	IBM, München, Deutschland
Vektorgrafiksoftware Inkscape	Freie Software

Tabelle 4: **Software**

2.5 Methoden

2.5.1 Monozytäre THP-1-Zellen

2.5.1.1 Kultivierung der THP-1-Zellen

Die THP-1-Zellen wurden vom Leibniz-Institut Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) erworben. Es handelt sich um eine humane monozytäre Zelllinie, die einem 1-jährigen Jungen mit akuter myeloischer Leukämie (AML) im Jahr 1987 entnommen wurde (Tsuchiya et al., 1980).

Alle Arbeiten mit diesen Zellen wurden unter sterilen Bedingungen an einer Sicherheitswerkbank der Klasse II durchgeführt. Sowohl bei der Kultivierung, als auch bei der Durchführung der Experimente wurden die THP-1-Zellen mit 2 mM L-Glutamin und 10% FCS (Fetales Kälberserum) versetztem RPMI-1640-Medium bei 37°C und 5% CO_2-Sättigung im Brutschrank gehalten. Alle 3 bis 4 Tage erfolgte die Passagierung der Zellen. Dazu wurden die Zellsuspensionen in ein 50 ml Falcon-tube überführt und bei 19°C für 8 min bei 500 g zentrifugiert. Das entstandene Zellpellet wurde durch vorsichtiges Abgießen vom Überstand getrennt, in einem definierten Volumen RPMI-1640-Medium resuspendiert, mit Trypanblau-Lösung versetzt und die Zellzahl in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Anschließend wurden 1 x 10^6 Zellen in 10 ml frisches Medium aufgenommen und in Zellkulturflaschen überführt.

2.5.1.2 Versuchsaufbau

Alle Experimente zur Untersuchung der IL-1β-Ausschüttung und der Laktatdehydrogenase (LDH)-Aktivität wurden gemäß dem in Abbildung 2 dargestellten Versuchsschema durchgeführt. Dazu wurden zunächst 0,5 x 10^6 Zellen pro 500 µl RPMI-1640-Medium eingestellt und pro well in eine 48-well-Zellkulturplatte überführt. Anschließend erfolgte eine Stimulation der THP-1-Zellen mit 1 µg/ml LPS (E. coli O26:B6) für 5 Stunden bei 37°C und 5% CO_2-Sättigung im Brutschrank. Im Anschluss dazu wurden die Zellen für 40 min mit 100 µM BzATP (2'(3')-O-(4-Benzoylbenzoyl)Adenosin-5'-Triphosphat) oder 50 µM Nigericin behandelt. Dies erfolgte in An- oder Abwesenheit von nAChR-Agonisten, NO-Synthase-Inhibitoren oder NO- bzw. Peroxynitrit-Donoren. Folgende nAChR-Agonisten wurden eingesetzt: 10 µM Acetylcholin (ACh), 10 µg/ml C-reaktives Protein (CRP), 100 µM Nikotin (Nic) oder 200 µM Phosphocholin (PC). Als NO-Synthase-Inhibitoren wurden 50 µM L-NIO (L-N5-(1-Iminoethyl)-Ornithin) und 10 µM L-NAME

(Nω-Nitro-L-Arginin-Methylester-Hydrochlorid) verwendet. Als NO-Donor wurde 10 mM SNAP (S-nitroso-N-Acetyl-DL-Penicillamin) und als Peroxynitrit-Donor 1 mM SIN-1 (3-Morpholinosydnonimin) eingesetzt.

Nach einer 8-minütigen Zentrifugation bei 500 g und 4°C wurden je 350 µl Überstand einzeln aus den wells mit ausreichendem Sicherheitsabstand zum Zellpellet entnommen und bei -20°C in Eppendorf Safe-Lock Tubes gelagert. Die Messungen der IL-1β-Konzentration im Überstand mittels enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA, siehe Kapitel 2.5.6.1), sowie der LDH-Aktivität mittels CytoTox96 Non-radioactive Cytotoxicity Assay (siehe Kapitel 2.5.6.2) wurden zu einem späteren Zeitpunkt durchgeführt.

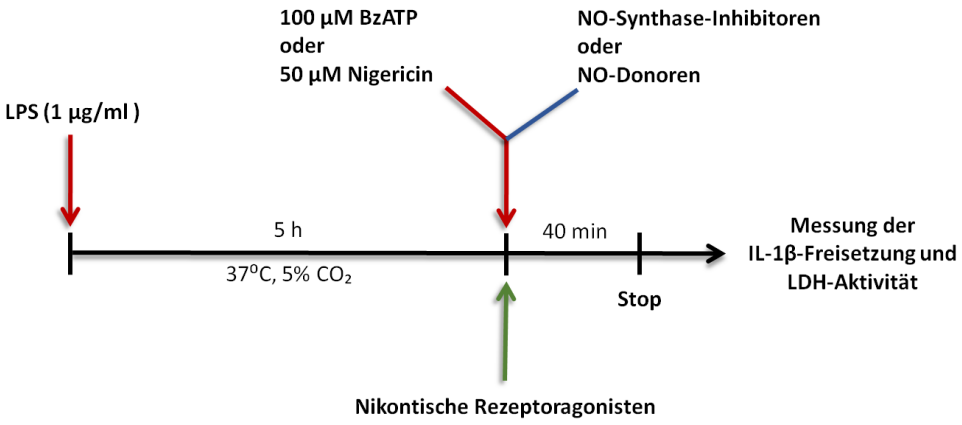

Abbildung 2: **Versuchsaufbau**
Zunächst wurden die THP-1-Zellen mit LPS für 5 Stunden (5 h) bei 37°C und 5 % CO2-Sättigung im Brutschrank vorstimuliert. Anschließend erfolgte eine 40-minütige Stimulation mit BzATP oder Nig, sowie NO-Synthase-Inhibitoren, NO- bzw. Peroxynitrit-Donoren und/oder nikotinischen Rezeptoragonisten. Nach der Inkubation wurde eine 8-minütige Zentrifugation bei 500 g und 4°C durchgeführt. Die Zellüberstände wurden bis zur Messung der IL-1β-Konzentration und LDH-Aktivität bei -20 °C aufbewahrt.
BzATP: 2'(3')-O-(4-Benzoylbenzoyl)Adenosin-5'-Triphosphat ; **IL-1β**: Interleukin-1β; **LDH**: Laktatdehydorgenase **LPS**: Lipopolysaccharid; **Nig**: Nigericin

2.5.2 THP-1-Zellen-abhängige Makrophagen

2.5.2.1 Differenzierung von THP-1-Zellen zu Makrophagen

Monozytäre THP-1-Zellen erwerben einen M1-Makrophagen Phänotyp, wenn sie mit PMA (Phorbol 12-Myristate 13-Acetat) behandelt werden (Daigneault et al., 2010; Lund et al., 2016). Für die Differenzierung der M1-Makrophagen aus monozytären THP-1-Zellen wurden zunächst pro well einer 12-well-Zellkulturplatte 0,3 x 10^6 THP-1-Zellen pro 1 ml RPMI-1640-Medium, supplementiert mit 10% FCS, 50 U Penicillin/ml und 50 µg Streptomycin/ml, ausgesät. Pro well wurden 50 nM PMA zugegeben und die Zellkulturplatte für 24 Stunden bei 37°C und 5% CO_2-Sättigung im Brutschrank inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen mit 500 µl frischem RPMI-1640-Medium gewaschen und mit 10% FCS versetztem RPMI-1640-Medium behandelt. Eine erneute Inkubation erfolgte im Brutschrank für weitere 24 Stunden bei 37°C und 5% CO_2-Sättigung. Durch vorsichtiges Abschütten wurde der Überstand verworfen und nachfolgend das Medium für die Zelldifferenzierung zu M1-Makrophagen hinzugegeben. Das Differenzierungsmedium bestand aus RPMI-1640-Medium mit 10 ng/ml INF-γ und 10 ng/ml LPS (E. coli O111:B4). Hierauf folgte eine weitere Inkubation für 72 Stunden im Brutschrank bei 37°C und 5% CO_2-Sättigung. Abschließend wurde nochmals der Überstand durch vorsichtiges Abschütten entfernt, die Zellen mit RPMI-1640-Medium gewaschen und mit 1 ml frischem 10% FCS versetztem RPMI-1640-Medium behandelt.

Am 5. Tag wurden Durchflusszytometrie-Analysen (siehe Kapitel 2.5.6) durchgeführt, um die Differenzierung der THP-1-Zellen zu M1-Makrophagen nachzuweisen. Ebenso wurden zur Kontrolle parallel M0-Makrophagen ausgesät und untersucht. Dazu wurden THP-1-Zellen mit PMA nach dem oben beschriebenen Protokoll behandelt. Der Unterschied lag in der Behandlung der Zellen am 3. Tag, die M0-Makrophagen erhielten nur 10% FCS versetztes RPMI-1640-Medium ohne den Zusatz von INF-γ und LPS.

2.5.2.2 Versuchsaufbau

Der nachfolgende Ablauf bis zur Messung der IL-1β-Konzentration und der LDH-Aktivität im Überstand erfolgte am 5. Tag analog zu den Experimenten mit THP-1-Zellen (siehe Abbildung 2). Zunächst wurden die M1-Makrophagen mit 1 µg/ml LPS (E. coli O26:B6) stimuliert und für 5 Stunden bei 37°C und 5% CO_2-Sättigung im Brutschrank gehalten. Anschließend erfolgte die Zugabe von BzATP (100 µM) in An- oder Abwesenheit von nAChR-Agonisten, NO- bzw. Peroxynitrit-Donoren oder NO-Synthase-Inhibitoren. Als

nAChR-Agonisten wurden ACh (10 µM), Nic (100 µM) oder PC (200 µM) eingesetzt. SNAP (10 mM) und SIN-1 (1 mM) wurden als NO- bzw. als Peroxynitrit-Donor und L-NIO (50 µM) und L-NAME (10 µM) als NO-Synthase-Inhibitoren verwendet. Nach einer 40-minütigen Inkubation im Brutschrank bei 37°C und 5% CO_2-Sättigung erfolgte eine 8-minütige Zentrifugation bei 500 g und 4°C. Etwa 700 µl Überstand wurden mit ausreichendem Sicherheitsabstand zum Zellpellet aus den wells entnommen. Bis zur Messung der IL-1β-Konzentration und der LDH-Aktivität wurden die Überstände bei -20°C in Eppendorf Safe-Lock Tubes gelagert.

2.5.3 Murine mononukleäre Zellen des peripheren Blutes und bone marrow-derived Makrophagen

2.5.3.1 Mäuse

Männliche und weibliche Wildtyp-Mäuse (C57BL/6J, The Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME, USA) im Alter zwischen 8 und 12 Wochen wurden zur Isolierung von mononukleären Leukozyten des peripheren Blutes (PBMCs) und zur Differenzierung von bone marrow-derived Makrophagen (BMDMs) verwendet. Die für die Experimente verwendeten Mäuse erhielten eine Versorgung nach den Richtlinien des „National Institute of Health“ (NIH) in Übereinstimmung mit dem „Guide for the Care and Use of Laboratory Animals“. Die Versuchstiere wurden beim Hersteller unter SPF (Specific-Pathogen-Free)-Bedingungen gehalten. Sie wurden für 2 Wochen in einem 12-Stunden Hell/Dunkel-Rhythmus mit Zugang zu Futter und Wasser in der Zentralen Versuchstierhaltung der Justus-Liebig-Universität gehalten. Die Tierexperimente wurden von den Regierungspräsidien in Gießen (Referenznummer 571_M) und Düsseldorf (Referenznummer O16/04) genehmigt.

2.5.3.2 Isolierung und Experimente an murinen mononukleären Zellen des peripheren Blutes

Nachdem die Mäuse zunächst mittels Isofluran (5%) betäubt wurden, erfolgte das Töten durch cervicale Dislokation. Darauf folgte umgehend die Entnahme von Blut aus der Hohlvene mittels zuvor vorbereiteter Einmalspritze (2 ml Spritze gefüllt mit 15 µl Heparin (5000 I.E./ml)).

Zur Isolierung der murinen PBMCs wurde das Blut mit einem Gemisch aus 1 ml phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) und 0,1% bovines Serumalbumin (BSA) in einem Verhältnis von 1:1 behandelt, die Zellen mit 10 ng/ml LPS (E. coli O26:B6) vorstimuliert und auf eine Percollphase geschichtet (Dichte 1.082 g/ml). Anschließend wurde eine Zentrifugation bei 850 g, 18°C für 30 min in einem Ausschwingrotor ohne Bremse durchgeführt. Die dabei entstandene Interphase wurde entnommen, in ein neues Falcon-tube überführt und mit 5 ml PBS und BSA in einem Verhältnis von 1:2 gewaschen. Nach 3 weiteren Waschschritten wurde der Überstand verworfen und die Zellen in RPMI-1640-Medium resuspendiert. Es wurden 0,1 x 10^6 Zellen pro 100 µl RPMI-1640-Medium pro well einer 96-well-Zellkulturplatte ausgesät. Darauf folgte eine Inkubation für 2 Stunden bei 37°C und 5% CO_2-Sättigung im Brutschrank. Durch vorsichtiges Abschütten wurden die nicht-adhärenten Zellen entfernt und frisches RPMI-1640-Medium zugegeben.
Zur Untersuchung der IL-1β-Freisetzung wurden die Zellen mit ATP (1 mM), dem NO-Donoren SNAP (10 mM) oder dem Peroxynitrit-Donor SIN-1 (1 mM) behandelt. Nach einer 30-minütigen Inkubation bei 37°C und 5% CO_2-Sättigung im Brutschrank und einer Zentrifugation bei 500 g, 4°C für 10 min wurden etwa 100 µl des zellfreien Überstandes mit ausreichendem Abstand zum Zellpellet pro well entnommen. Bis zur Messung der IL-1β-Konzentration und der LDH-Aktivität wurde der Überstand bei -20°C in Eppendorf Safe-Lock Tubes gelagert.

2.5.3.3 Differenzierung und Experimente an murinen bone marrow-derived Makrophagen

Die Mäuse wurden zunächst mittels Isofluran (5%) betäubt und anschließend durch cervicale Dislokation getötet. Die Hinterläufe wurden entnommen, die Haut entfernt und die Knochen (Femur und Tibia) mit dem umliegenden Muskelgewebe zunächst mit Ethanol (70%) gewaschen. Daraufhin wurde das Muskelgewebe vorsichtig abgesetzt und die Knochen mittels PBS (50 ml), Penicillin (50 U/ml) und Streptomycin (50 µg/ml) gereinigt.
Die Knochen wurden mit Penicillin (50 U/ml) und Streptomycin (50 µg/ml) versetztem RPMI-1640-Medium unter Verwendung einer 10 ml Einmalspritze und 26-27 G Einmalkanüle gespült und die Knochenmarkszellen über ein Zellsieb (40 µm) in ein Falcon-tube überführt. Anschließend wurden die Zellen bei 520 g, 4ºC für 13 min zentrifugiert. Durch vorsichtiges Abgießen wurde der Überstand entfernt. Für die Lyse der

Erythrozyten wurde dem Zellpellet Red Blod Cell (RBC)-lysis Puffer nach Angaben des Herstellers zugegeben. Darauf folgte eine Inkubation für 6 min bei Raumtemperatur. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 20 ml PBS gestoppt, die Zellen bei 520 g, 4ºC für 10 min zentrifugiert und der Überstand durch vorsichtiges Abschütten verworfen. Es wurden 1 x 10^6 Zellen pro 1 ml eingestellt und jeweils 1 ml pro well einer 12-well-Zellkulturplatte im Differenzierungsmedium ausgesät. Das Differenzierungsmedium bestand aus RPMI-1640-Medium, supplementiert mit 10% FCS, 50 U Penicillin/ml, 50 µg Streptomycin/ml und 10 ng/ml M-CSF (macrophage colony-stimulating factor). Eine Inkubation für 3 Tage bei 37°C und 5% CO_2-Sättigung im Brutschrank folgte. Anschließend wurden die Zellen mit 1 ml RPMI-1640-Medium, versetzt mit 10 ng/ml M-CSF, 10 ng/ml INF-γ und 10 pg/ml LPS (E. coli O26:B6) behandelt. Eine weitere Inkubation für 3 Tage bei 37°C und 5% CO_2-Sättigung im Brutschrank folgte.

Am 6. Tag wurden an den bone marrow-derived Makrophagen Experimente zur Ausschüttung von IL-1β durchgeführt. Zunächst wurden pro well 1 ml des Überstandes mit ausreichendem Abstand zu den adhärenten Zellen abpipettiert. Anschließend erfolgte die Behandlung der Zellen mit 1 µg/ml LPS (E. coli O26:B6) und eine Inkubation für 5 Stunden bei 37°C und 5% CO_2-Sättigung im Brutschrank. Die Zellen wurden mit ATP (2 mM) oder Nigericin (50 µM; zusammen mit 0,5 U/ml Apyrase) in Anwesenheit des NO-Donors SNAP (10 mM) oder des Peroxynitrit-Donors SIN-1 (1 mM) behandelt und für 40 min bei 37°C und 5% CO_2-Sättigung im Brutschrank gehalten. Abschließend erfolgte eine Zentrifugation bei 500 g, 4°C für 8 min. Etwa 750 µl des zellfreien Überstandes wurden pro well entnommen und bis zur Messung der IL-1β-Konzentration und der LDH-Aktivität bei -20°C in Eppendorf Safe-Lock Tubes gelagert.

2.5.4 Humane mononukleäre Zellen des peripheren Blutes

2.5.4.1 Blutspender und Aufreinigung der Zellen

Die im Folgenden durchgeführten Experimente wurden von der Ethikkommission der Justus-Liebig-Universität in Gießen (Aktenzeichen 90/18) genehmigt und in Übereinstimmung mit der Deklaration von Helsinki durchgeführt. Alle freiwilligen Probanden wurden aufgeklärt und willigten durch Unterzeichnen einer Einverständniserklärung ein. Zur Gewinnung von humanen PBMCs wurde gesunden nichtrauchenden weiblichen und männlichen Probanden Blut mittels zuvor vorbereiteter Einmalspritze, in der eine EDTA-Lösung vorgelegt war (Ethylendiamintetraessigsäure; 1 mM Endkonzentration), entnommen. Das Blut wurde in ein Falcon-tube überführt und RosetteSep™ Human Monocyte Enrichment Cocktail (50 µl/ml Blut) hinzugegeben. Eine Inkubation für 20 min bei Raumtemperatur folgte. In einem Verhältnis von 1:2 zum Volumen des Blut-RosetteSep™ Human Monocyte Enrichment Cocktail-Gemisches wurde PBS, supplementiert mit 2% FCS und 1 mM EDTA, hinzugegeben. Etwa 6 ml des Blutgemisches wurden auf 3 ml des Lymphoprep™-Gradienten gegeben und bei 1200 g, 20ºC für 20 min in einem Ausschwingrotor ohne Bremse zentrifugiert. Der Zellring mit den PBMCs wurde geerntet und in ein frisches Falcon-tube überführt. Etwa 25 ml PBS (versetzt mit 2% FCS und 1 mM EDTA) wurde hinzugegeben. Anschließend erfolgte die Stimulierung mit LPS (5 ng/ml; E. coli O26:B6) und Inkubation bei Raumtemperatur für 10 min. Nach Zentrifugation bei 250 g, 20ºC für 15 min und einem erneuten Waschvorgang mit PBS, supplementiert mit 2% FCS und 1 mM EDTA, folgte eine weitere Zentrifugation bei 300 g, 20ºC für 15 min. Anschließend wurden die Zellen in 1 ml RPMI-1640-Medium aufgenommen. Die Reinheit der gewonnenen Monozyten wurde per Durchflusszytometrie-Analysen bestimmt (siehe Kapitel 2.5.6).

2.5.4.2 Versuchsaufbau

Zur Versuchsdurchführung wurden 1 x 10^5 Zellen pro 200 µl RPMI-1640-Medium eingestellt und pro well einer 48-well-Zellkulturplatte ausgesät. Eine Inkubation für 3 Stunden bei 37ºC und 5% CO_2-Sättigung im Brutschrank folgte. Die Zellen wurden zunächst mit BzATP (100 µM) oder Nigericin (25 µM plus 0.5 U/ml Apyrase) in An- oder Abwesenheit von SNAP (10 mM) oder SIN-1 (1 mM) behandelt. Pro well wurden zusätzlich 50 µl RPMI-1640-Medium hinzugegeben. Nach einer 30-minütigen Inkubation

bei 37°C und 5% CO_2-Sättigung im Brutschrank und einer Zentrifugation bei 500 g, 4°C für 8 min wurden etwa 250 µl des zellfreien Überstandes pro well entnommen und in Eppendorf Safe-Lock Tubes überführt. Bis zur Messung der IL-1β-Konzentration und der LDH-Aktivität wurden die Überstände bei -20°C gelagert.

2.5.5 Durchflusszytometrie

In dieser Arbeit wurde die durchflusszytometrische Analyse durchgeführt, um den Phänotyp der aus THP-1-Zellen differenzierten M1-Makrophagen (siehe Kapitel 2.5.2) und die Reinheit der durch die Rosetten-Technik gewonnen Monozyten (siehe Kapitel 2.5.5) nachzuweisen.

Die Zellen wurden anhand der Expression der Oberflächenmerkmale klassifiziert. Dazu wurden mehrere spezifische Antikörper verwendet (siehe Tabelle 2.5). Zum Nachweis der Monozyten dienten die Antikörper gegen CD14, CD38, CD80 und HLA-DR (human leukocyte antigen, DR-Isotyp). Die M1-Makrophagen wurden charakterisiert durch Antikörper gegen CD14, CD16, CD45 und HLA-DR. Eine Kontamination mit T-Zellen und B-Zellen wurde unter Verwendung der Antikörper gegen CD3 und CD19 überprüft.

Dazu wurden die Zellen zunächst in Durchflusszytometrie-Puffer (PBS, 2 mM EDTA, 5% FCS) resuspendiert und 5 x 10^5 Zellen pro 1 ml Pufferlösung wurden eingestellt. Entsprechend der zu untersuchenden Zelle wurden die Antikörper nach Angaben des Herstellers dazugegeben. Ebenso wurden nach Herstellerangaben Kontrollisotyp-Antikörper entsprechend den primären Antikörpern eingesetzt (siehe Tabelle 2.5). Eine Inkubation für 30 min bei 4°C im Dunkeln folgte. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit Durchflusszytometrie-Puffer gewaschen. Die Analyse erfolgte mittels BD FACSLyric™ Durchflusszytometer unter Verwendung der BD FACS™ Software (Version 1.4).

	Antikörper	Fluorochrom	Klon	Firma
Nachweisantikörper	Maus anti-CD3	FITC	SK7	Becton Dickinson
	Maus anti-CD14	FITC	M5E2	BD Pharmingen
	Maus anti-CD16	PE	3G8	Becton Dickinson
	Maus anti-CD19	PE	4G7	Becton Dickinson
	Maus anti-CD38	PE-Cy7	HIT2	BioLegend
	Maus anti-CD45	APC	HI30	BD Pharmingen
	Maus anti-CD80	FITC	BB1	BD Pharmingen
	Maus anti-HLA-DR	PerCP-Cy5.5	L243	BD Biosciences
Isotypkontrolle	Maus-IgG1, κ	APC	M1-14012	eBioscience
	Maus-IgG1, κ	PerCP-Cy5	679.1Mc7	Becton Dickinson
	Maus-IgG1, κ	PE	X40	BD Biosciences
	Maus-IgG1, κ	FITC	X40	BD Biosciences
	Maus-IgG1, κ	PE-Cy7	X40	BD Biosciences
	Maus-IgG2a κ	FITC	X39	BD Biosciences
	Maus-IgG2a, κ	PE	G155-178	BD Pharmingen
	Maus-IgG2b, κ	PE	MPC-11	BD Pharmingen

Tabelle 5: **Antikörper, die für durchflusszytometrische Analysen von Makrophagen aus THP-1-Zellen und mit RosetteSep™ gewonnenen menschlichen Monozyten verwendet wurden** **APC**: Allophycocyanin; **FITC**: Fluorescein Isothiocyanat; **PE**: Phycoerythrin; **PE-Cy7**: Phycoerythrin-Cyanin7; **PerCP-Cy5.5**: Peridinin Chlorophyll Protein-Cyanin5.5

2.5.6 Messverfahren

2.5.6.1 Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

Zur Messung der IL-1β-Konzentration in den zellfreien Überständen wurde eine Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) verwendet. Hierzu wurden 3 unterschiedliche ELISA-kits benutzt. Die IL-1β-Konzentration in den Überständen der THP-1-Zellen (monozytär und M1-Makrophagen) und in den Überständen humanen mononukleären Zellen wurde mittels Human IL-1 beta/IL-1F2 DuoSet ® enzyme-linked immunosorbent assay bestimmt. Für die Proben von murinen mononukleären Zellen des peripheren Blutes wurde der Mouse Quantikine IL-1β Immunoassay verwendet, wohingegen für Proben von murinen bone marrow-derived Makrophagen der Mouse IL-1 beta/IL-1 F2 DuoSet ® enzyme-linked immunosorbent assay benutzt wurde.

Alle eingesetzten ELISAs wurden nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Dazu wurden zunächst 200 µl der Proben pro well einer 96-well-Zellkulturplatte gegeben, die mit monoklonalen, für humanes IL-1β- oder polyklonalen, für Mäuse IL-1β-spezifischen Antikörpern vorbeschichtet war. Während der Inkubationszeit von 2 Stunden bei Raumtemperatur erfolgte die Bindung zwischen dem in den Proben vorhandenen Antigen IL-1β und den auf der Platte immobilisierten Antikörpern. Nach einem Waschschritt erfolgte die Zugabe eines zweiten IL-1β-spezifischen Antikörpers. An diesem Zweitantikörper war das Reporterenzym Peroxidase gekoppelt (HRP, horseradish peroxidase). Nach Hinzugabe eines chromogenen Substrates aus Wasserstoffperoxid und Tetramethylbenzidin konnte innerhalb eines definierten Zeitraums die Bildung eines Farbstoffs beobachtet werden. Die Menge des Farbstoffs war direkt proportional zu der IL-1β-Konzentration. Abschließend konnte die Färbung im Fluostar Optima bei einer Wellenlänge von 450 nm quantifiziert werden. Im Vergleich mit der Extinktion einer Standardkurve, erstellt mit rekombinanten IL-1β, wurde auf die IL-1β-Konzentration in pg/ml in den Überständen rückgeschlossen.

2.5.6.2 Laktatdehydrogenaseaktivität (LDH)-Messung

Anhand der Messung der LDH-Aktivität in den zellfreien Überständen konnte eine indirekte Aussage über die Zellvitalität getroffen werden. Zur LDH-Aktivitätsmessung wurde der CytoTox 96® Non-Radioactive Cytotoxicity Assay verwendet und nach Herstellerangaben vorgegangen. Als Referenzwert diente die maximal mögliche LDH-

Freisetzung im Überstand lysierter Zellen. Dazu wurde zu Versuchsbeginn 1 x 10^6 Zellen in ein separates well ausgesät und unstimuliert über den experimentellen Zeitraum mitgeführt. Um eine Zelllyse herbeizuführen erfolgte das Einfrieren bei -80°C für mindestens einen Tag. Zum Zeitpunkt der Messung wurde der Überstand durch Auftauen und Abzentrifugation der unlöslichen Bestandteile gewonnen. Mittels Spektralphotometer mit einer Absorption bei 490 nm konnte abschließend der Anteil der lysierten Zellen in den Proben in Relation zum Referenzwert gesetzt werden.

2.5.7 Statistische Datenauswertung

Die statistische Datenauswertung erfolgte mit der SPSS-Statistiksoftware (Version 25, IBM, Armonk, NY, USA). Zunächst wurde anhand des nicht-parametrischen Kruskal-Wallis-Tests getestet, ob zwischen den unabhängigen Messdaten statistisch signifikante Unterschiede zu verzeichnen waren. Ein p-Wert kleiner gleich 0,05 wies daraufhin, dass dies der Fall war. Anschließend wurde anhand des nicht-parametrischen Mann-Whitney-U-Tests ermittelt, ob die Messergebnisse zwischen jeweils zwei Gruppen signifikante Unterschiede zeigen. Ab einem p-Wert von kleiner gleich 0,05 wurde von signifikanten Unterschieden ausgegangen. Für die Analyse der abhängigen Daten wurde zunächst der Friedmann-Test verwendet und danach der Wilcoxon-Rangsummentest. Die Anzahl der durchgeführten Experimente wurde als „n“ angegeben. Die angegebene n-Zahl bei Primärzellen bezieht sich jeweils auf Experimente, die an einzelnen Menschen und Mäusen durchgeführt wurden. Bei den Experimenten an Zelllinien bezieht sich die n-Zahl auf unabhängige und an verschiedenen Tagen durchgeführte Versuche an verschiedenen Passagen. Aus den Analysen wurden keine Werte ausgeschlossen. Alle Abbildungen wurden mit der freien Vektorgrafiksoftware Inkscape (Version 0.48.5 r10040) erstellt.

3. Ergebnisse

3.1 Wirkung von NO-Synthase-Inhibitoren

3.1.1 Experimente an monozytären THP-1-Zellen

In der ersten Versuchsreihe wurde untersucht, ob eine NO-Synthase eine Rolle bei der cholinergen Kontrolle der BzATP-induzierten Ausschüttung von IL-1β durch LPS-stimulierte monozytäre THP-1-Zellen spielt. Dazu wurden die NO-Synthase-Inhibitoren L-NAME und L-NIO verwendet.

Zunächst wurden die THP-1-Zellen für 5 Stunden mit LPS (1 µg/ml) vorstimuliert, um die Bildung von Pro-IL-1β zu initiieren. Eine zweite Stimulierung per BzATP (100 µM) für 40 min folgte, um das NLRP3-Inflammasom zu aktivieren und die Bildung und Sekretion von IL-1β zu induzieren. Als Positivkontrolle für die cholinerge Inhibition der IL-1β-Freisetzung wurden die nAChR-Agonisten Nic (100 µM), PC (100 µM) und CRP (5 µg/ml) für 30 min zusammen mit BzATP eingesetzt.

Wie zuvor beschrieben (Hecker et al., 2015; Richter et al., 2016, 2018) lag die IL-1β-Konzentration in den zellfreien Überständen, die weder mit LPS noch mit BzATP behandelt wurden zwischen 0,5 und 3,0 pg/ml, der Median bei 1,0 pg/ml. Nach 5-stündiger Stimulation der Zellen mit LPS lag der IL-1β-Wert zwischen 3,0 und 12,0 pg/ml mit einem Median von 7,5 pg/ml. Bei zusätzlicher Inkubation der Zellen mit dem P2X7R-Agonisten BzATP im Anschluss an die Stimulation mit LPS stieg die IL-1β-Konzentration im Zellkulturmedium auf Werte zwischen 40,5 und 173,5 pg/ml mit einem Median von 114,5 pg/ml an. In Anwesenheit der nAChR-Agonisten Nic, PC und CRP zeigte sich eine signifikante Inhibition der IL-1β-Freisetzung ($p \leq 0{,}05$; $n = 6$; Wilcoxon-Test). Die Konzentration von IL-1β in den zellfreien Überständen lag bei Nic zwischen 9,0 und 126,0 pg/ml mit einem Median von 47,5 pg/ml, bei PC zwischen 2,0 und 59,0 pg/ml mit einem Median von 28,5 pg/ml und bei CRP zwischen 6,0 und 25,0 pg/ml mit einem Median von 18,5 pg/ml. Diese Ergebnisse bestätigten die bereits von Hecker et al. (2015) und Richter et al. (2018) veröffentlichten Daten (Hecker et al., 2015; Richter et al., 2018).

Wurden die NO-Synthase-Inhibitoren L-NAME (10 µM) oder L-NIO (50 µM) zu den LPS- und BzATP-behandelten Zellen in Anwesenheit der nAChR-Agonisten gegeben, konnte der inhibitorische Effekt auf die IL-1β-Freisetzung signifikant ($p \leq 0{,}05$, $n = 6$, Wilcoxon-Test) aufgehoben werden. Die ausgeschüttete Menge an IL-1β stieg auf Werte ähnlich der Zellen, die eine Stimulation mit LPS und BzATP erhielten.

Wurden die Zellen mit LPS, BzATP und den NO-Synthase Inhibitoren L-NAME oder L-NIO behandelt, zeigten sich keine Veränderungen. Die gemessene IL-1β-Konzentration war ähnlich der gemessenen Werte an Zellen, die mit LPS und BzATP stimuliert wurden. Alle Daten sind in normalisierter Form in Abbildung 3 dargestellt.

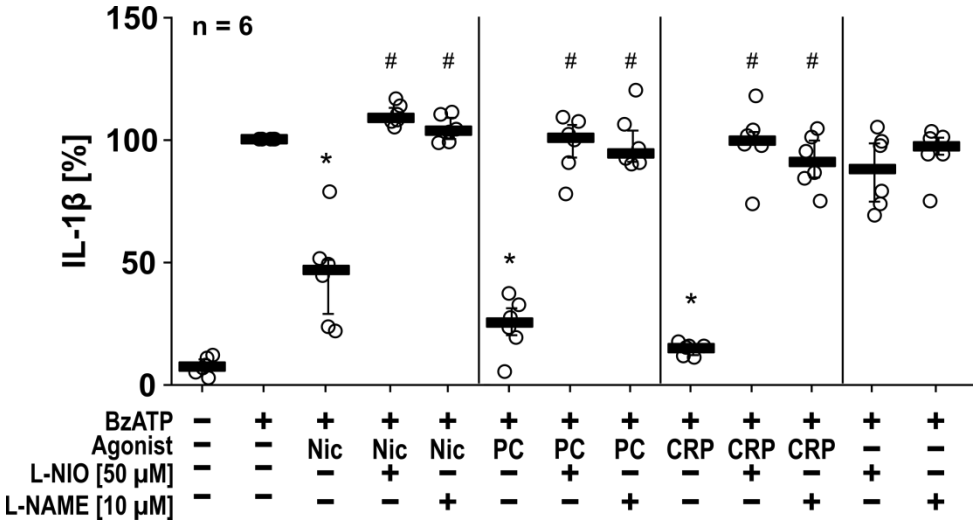

Abbildung 3: **Die hemmende Wirkung der nikotinischen Rezeptor-Agonisten Nic, PC und CRP auf die BzATP-induzierte Freisetzung von IL-1β wird durch die Zugabe der NO-Synthase-Inhibitoren L-NAME und L-NIO in monozytären THP-1-Zellen aufgehoben.**
Zunächst wurden die monozytären THP-1-Zellen mit LPS (1 µg/ml) für 5 Stunden vorstimuliert. Anschließend erfolgte eine zweite 40-minütige Stimulation mit dem P2X7-Rezeptor-Agonisten BzATP (100 µM), um die Bildung und Sekretion von IL-1β zu induzieren. Der Einfluss der NO-Synthase-Inhibitoren L-NAME (10 µM) und L-NIO (50 µM) auf die BzATP-induzierte IL-1β-Freisetzung wurde in An- oder Abwesenheit der nikotinischen Rezeptor-Agonisten Nic (100 µM), PC (200 µM) oder CRP (10 µg/ml) untersucht.
Die IL-1β-Konzentration in Zellkulturüberständen von monozytären THP-1-Zellen, die mit LPS vorstimuliert und mit BzATP inkubiert wurden, wurde auf 100 % gesetzt und die weiteren Ergebnisse in Relation zu dieser gesetzt. Die Einzelwerte (n) sind als Punkte dargestellt, die Balken entsprechen den Medianen und die Antennen den Perzentilen 25 und 75. * $p \leq 0{,}05$ signifikant unterschiedlich zu den Zellen, die mit LPS und BzATP behandelt wurden; # $p \leq 0{,}05$ signifikant unterschiedlich zu den Zellen, die mit LPS, BzATP und dem jeweiligen nikotinischen Rezeptor-Agonisten behandelt wurden. Friedmann-Test gefolgt vom Wilcoxon-Test.
BzATP: 2'(3')-O-(4-Benzoylbenzoyl)Adenosin-5'-Triphosphat; **CRP**: C-reaktives Protein; **IL-1β**: Interleukin-1β; **Nic**: Nikotin; **L-NAME**: Nω-Nitro-L-Arginin-Methylester-Hydrochlorid; **L-NIO**: L-N5-(1-Iminoethyl)-Ornithin; **LPS**: Lipopolysaccharid; **PC**: Phosphocholin

3.1.2 Experimente an zu M1-Makrophagen differenzierten THP-1-Zellen

Um zu testen, ob die NO-Synthase-Inhibitoren L-NAME und L-NIO dieselbe Wirkung an weiteren Zellen monozytären Ursprungs haben, wurden ähnliche Experimente an zu M1-Makrophagen differenzierten THP-1-Zellen durchgeführt. Zunächst wurde per durchflusszytometrischer Analyse untersucht, ob die aus THP-1-Zellen differenzierten Makrophagen die für M1-Makrophagen typischen Zelloberflächenmarker exprimieren. Dazu wurden die für M1-Makrophagen typischen Zelloberflächenmarker CD14, CD38, CD80 und HLA-DR verwendet. Durchflusszytometrische Analysen ergaben, dass die differenzierten M1-Makrophagen zu 46,6% CD14, 83,9% CD38, 42,4% CD80 und 28,4% HLA-DR exprimieren (siehe Abbildung 4A). Zudem wurde anhand derselben Zelloberflächenmarker gezeigt, dass die aus THP-1-Zellen differenzierten M1-Makrophagen signifikant ($p \leq 0{,}05$, $n = 6$, Mann-Whitney-Rangsummentest) verschieden zu den ebenso aus THP-1-Zellen differenzierten M0-Makrophagen sind (siehe Abbildung 4B).

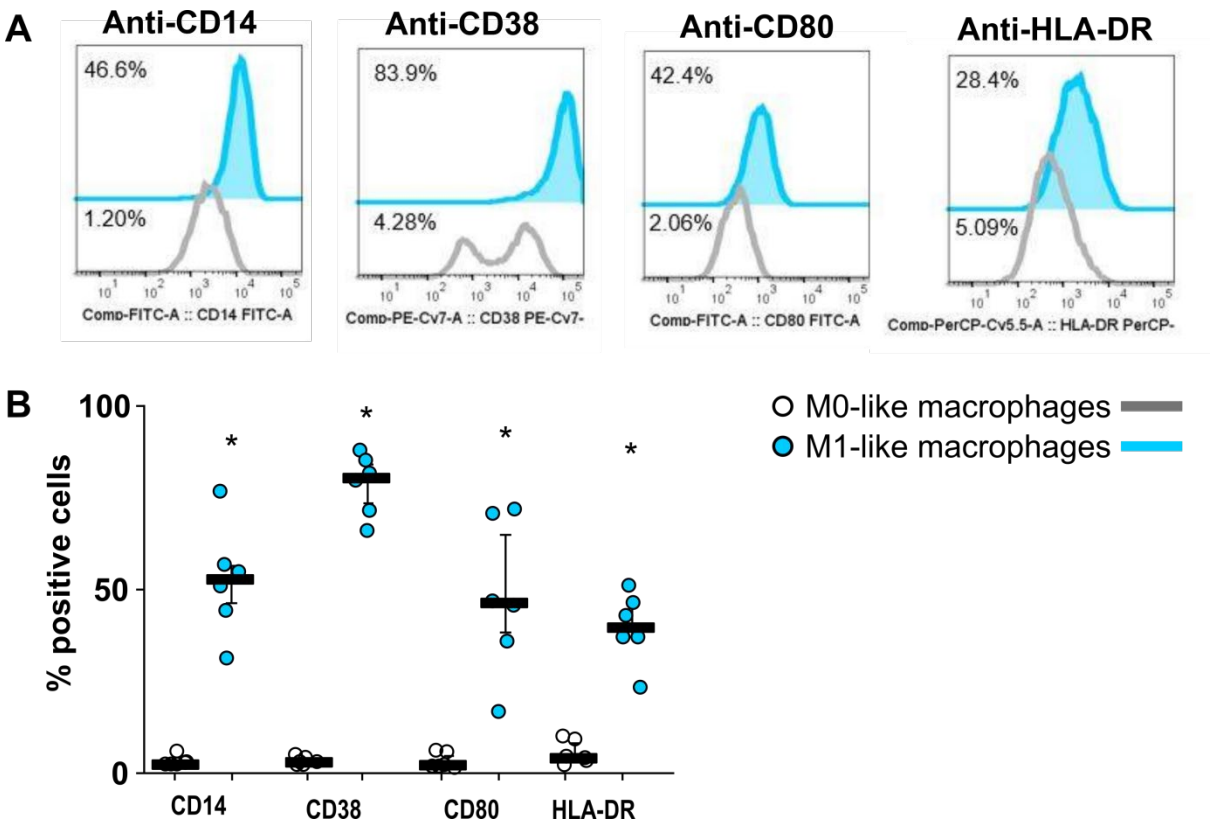

Abbildung 4: **Durchflusszytometrische Analysen bestätigten, dass die aus THP-1-Zellen differenzierten Makrophagen die für M1-Makrophagen typischen Zelloberflächenmarker exprimieren.**

A) Repräsentative Histogramme der CD14-, CD38-, CD80- und HLA-DR-Expression in M0- und M1-ähnlichen Makrophagen, die aus THP-1-Zellen differenziert wurden

B) Quantifizierung von Makrophagen, die CD14, CD38, CD80 und HLA-DR exprimieren (n = 6).
Die Daten wurden mit dem Kruskal-Wallis-Test gefolgt vom Mann-Whitney-Rangsummentest analysiert und als einzelne Datenpunkte dargestellt. Die Balken stellen den Median dar. Die Antennen entsprechen den Perzentilen 25 und 75. * $p \leq 0{,}05$, M1-Makrophagen signifikant verschieden zu den M0-Makrophagen.

CD: Cluster of differentiation; **HLA-DR**: human leukocyte antigen, DR-Isotyp

Nachdem per durchflusszytometrischer Analysen bestätigt wurde, dass es sich bei den aus THP-1-Zellen differenzierten Makrophagen um M1-ähnliche Makrophagen handelt, wurde der Effekt der NO-Synthase-Inhibitoren L-NAME und L-NIO an diesen Zellen untersucht. Zunächst wurden die M1-Makrophagen für 5 Stunden mit LPS (1 µg/ml) vorstimuliert, um die Bildung von Pro-IL-1β zu initiieren. Eine zweite Stimulierung per BzATP (100 µM) für 40 min folgte, um das NLRP3-Inflammasom zu aktivieren und die Bildung und Sekretion von IL-1β zu induzieren. Als Positivkontrolle wurden die nAChR-Agonisten Nic (100 µM) und PC (100 µM) zusammen mit BzATP eingesetzt.

Die IL-1β-Konzentration in den zellfreien Überständen, die weder eine Behandlung mit LPS noch mit BzATP erhielten, lag bei Werten zwischen 11,0 und 71,0 pg/ml mit einem Median von 26,0 pg/ml. Die alleinige Stimulation der M1-Makrophagen mit LPS führte zu IL-1β-Konzentrationen zwischen 215,0 und 307,0 pg/ml mit einem Median von 257,0 pg/ml. Die zusätzliche Stimulation mit dem P2X7R-Agonisten BzATP ließ die IL-1β-Konzentration im Zellkulturmedium ansteigen auf Werte zwischen 483,5 und 1107,5 pg/ml mit einem Median von 758,5 pg/ml.

In Gegenwart der nAChR-Agonisten Nic und PC sanken die IL-1β-Werte im Zellkulturmedium ähnlich den Werten wie bei alleiniger Stimulation der Zellen mit LPS. Der Einsatz von Nic ließ die IL-1β-Konzentration im Zellkulturmedium sinken auf Werte zwischen 188,0 und 358,0 pg/ml mit einem Median von 251,5 pg/ml. PC ließ die IL-1β-Konzentration fallen auf Werte zwischen 201,0 und 379,0 pg/ml mit einem Median von 273,0 pg/ml.

Wurden die NO-Synthase-Inhibitoren L-NAME (10 µM) oder L-NIO (50 µM) zu den LPS- und BzATP-stimulierten Zellen in Anwesenheit der nAChR-Agonisten Nic oder PC gegeben, konnte auch bei den M1-Makrophagen der inhibitorische Effekt auf die IL-1β-Freisetzung signifikant ($p \leq 0{,}05$; $n = 6$, Wilcoxon-Test) aufgehoben werden. Die IL-1β-Konzentration im Zellkulturmedium der Zellen, die mit L-NAME behandelt wurden, wurden Werte zwischen 346,0 und 1108,0 pg/ml mit einem Median von 559,5 pg/ml gemessen. L-NIO führte zu IL-1β-Werten im zellfreien Medium zwischen 349,0 und 1039,0 pg/ml mit einem Median von 543,0 pg/ml.

Die alleinige Behandlung der mit LPS und BzATP stimulierten M1-Makrophagen mit L-NAME oder L-NIO führte zu IL-1β-Konzentration ähnlichen den Werten der Zellen, die mit LPS und BzATP stimuliert wurden. Alle Daten sind in normalisierter Form in Abbildung 5 dargestellt.

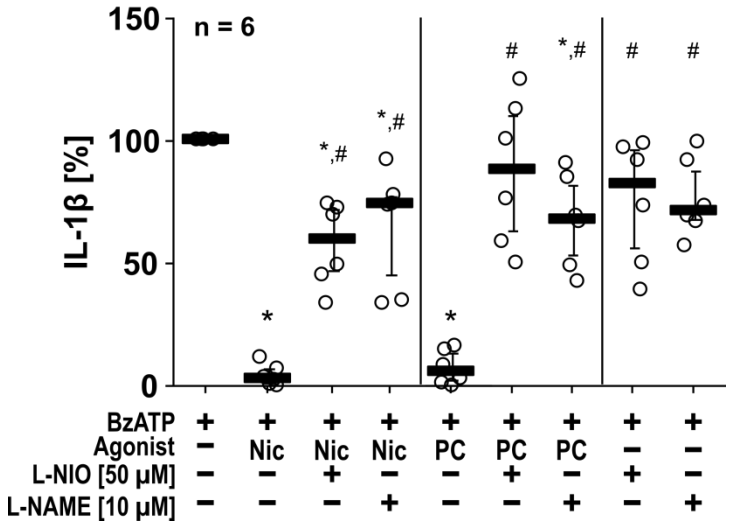

Abbildung 5: **Die hemmende Wirkung der nikotinischen Rezeptor-Agonisten Nic und PC auf die BzATP-induzierte Freisetzung von IL-1β wird durch die Zugabe der NO-Synthase-Inhibitoren L-NAME und L-NIO in den zu M1-Makrophagen differenzierten THP-1-Zellen aufgehoben.**

Zunächst wurden die aus THP-1-Zellen differenzierten M1-Makrophagen mit LPS (1 µg/ml) für 5 Stunden vorstimuliert. Anschließend erfolgte eine zweite 40-minütige Stimulation mit dem P2X7-Rezeptor-Agonisten BzATP (100 µM), um die Bildung und Sekretion von IL-1β zu induzieren. Der Einfluss der NO-Synthase-Inhibitoren L-NAME (10 µM) und L-NIO (50 µM) auf die BzATP-induzierte IL-1β-Freisetzung wurde in An- oder Abwesenheit der nikotinischen Rezeptor-Agonisten Nic (100 µM) oder PC (200 µM) untersucht.

Die IL-1β-Konzentration in Zellkulturüberständen der aus THP-1-Zellen differenzierten M1-Makrophagen, die mit LPS und BzATP inkubiert wurden, wurde auf 100 % gesetzt und die weiteren Ergebnisse in Relation zu dieser gesetzt. Bei der Darstellung der Ergebnisse wurde der IL-1β-Wert bei alleiniger Stimulation der Zellen mit LPS von den gemessenen IL-1β-Konzentrationen der weiteren Versuchsansätze subtrahiert. Die Einzelwerte (n) sind als Punkte dargestellt, die Balken entsprechen den Medianen und die Antennen den Perzentilen 25 und 75. * $p \leq 0{,}05$ signifikant unterschiedlich zu den Zellen, die mit LPS und BzATP behandelt wurden; # $p \leq 0{,}05$ signifikant unterschiedlich zu den Zellen, die mit LPS, BzATP und dem jeweiligen nikotinischen Rezeptor-Agonisten behandelt wurden. Friedmann-Test gefolgt vom Wilcoxon-Test.

BzATP: 2'(3')-O-(4-Benzoylbenzoyl)Adenosin-5'-Triphosphat; **IL-1β**: Interleukin-1β; **Nic**: Nikotin; **L-NAME**: Nω-Nitro-L-Arginin-Methylester-Hydrochlorid; **L-NIO**: L-N5-(1-Iminoethyl)-Ornithin; **LPS**: Lipopolysaccharid; **PC**: Phosphocholin

3.2 Wirkung von NO- und Peroxynitrit-Donoren

3.2.1 Experimente an monozytären THP-1-Zellen

Es ist bekannt, dass die NO-Synthase die Umwandlung von L-Arginin in NO und L-Citrullin katalysiert (Boucher et al., 1999). Ebenso ist bekannt, dass in Gegenwart von Superoxidanionen NO in Peroxynitrit umgewandelt wird (Zielonka et al., 2010). Um unsere Hypothese zu testen, dass NO und/oder Peroxynitrit die BzATP-induzierte Freisetzung von IL-1β inhibieren, wurden Experimente mittels der NO- und Peroxynitrit-Donoren SNAP und SIN-1 durchgeführt.

Dazu wurden monozytäre THP-1-Zellen für 5 Stunden mit LPS (1 µg/ml) vorstimuliert und anschließend mit BzATP (100 µM) für 40 min behandelt, um die Bildung und Sekretion von IL-1β zu induzieren. Als Positivkontrolle wurde der nAChR-Agonist ACh (10 µM) zeitgleich mit BzATP eingesetzt. Die IL-1β-Konzentration in den zellfreien Überständen, die weder mit LPS noch mit BzATP behandelt wurden, lag bei 1,0 bis 2,0 pg/ml mit einem Median von 1,0 pg/ml. Eine Stimulation mit LPS führte zu IL-1β-Konzentrationen im Zellkulturmedium zwischen 5,0 und 15,0 pg/ml mit einem Median von 7,0 pg/ml. Die zusätzliche Stimulation der Zellen mit dem P2X7R-Agonisten BzATP ließ die IL-1β-Konzentration im Zellkulturmedium auf Werte zwischen 43,0 und 160,0 pg/ml mit einem Median von 122,0 pg/ml ansteigen. Wie zuvor beschrieben (Hecker et al., 2015) wurde die IL-1β-Ausschüttung in Anwesenheit des nAChR-Agonisten ACh signifikant ($p \leq 0{,}05$, $n = 6$, Wilcoxon-Test) inhibiert. Die IL-1β-Konzentration im Zellkulturmedium lag bei Werten zwischen 8,0 und 26,0 pg/ml mit einem Median von 20,0 pg/ml.

Wurden die NO- und Peroxynitrit-Donoren SNAP (10 mM) oder SIN-1 (1 mM) zu den LPS- und BzATP-stimulierten Zellen gegeben, konnte eine signifikante ($p \leq 0{,}05$, $n = 6$, Wilcoxon-Test) Inhibierung der BzATP-induzierten IL-1β-Ausschüttung, ähnlich der von ACh, verzeichnet werden. SNAP führte bei gleichzeitiger Applikation mit BzATP zu IL-1β-Konzentrationen im Zellkulturmedium von 6,0 bis 20,0 pg/ml mit einem Median von 12,5 pg/ml. SIN-1 führte bei gleichzeitiger Behandlung der Zellen mit BzATP ebenfalls zu einer Reduktion der IL-1β-Konzentration, allerdings mit einer breiteren Streuung. Es wurden IL-1β-Werte zwischen 7,0 und 90,0 pg/ml mit einem Median von 61,0 pg/ml gemessen. Dies veranlasste uns die THP-1-Zellen 30 min, 20 min und 10 min vor der Stimulation mit BzATP mit SIN-1 zu inkubieren. Alle 3 Ansätze zeigten ähnliche IL-1β-Konzentrationen. Der IL-1β-Wert im Zellkulturmedium lag bei 30-minütiger

Vorinkubation zwischen 4,0 und 39,0 pg/ml mit einem Median von 21,0 pg/ml, bei 20-minütiger Vorinkubation zwischen 6,0 und 55,0 pg/ml mit einem Median von 25,0 pg/ml und bei 10-minütiger Vorinkubation zwischen 5,0 und 91,0 pg/ml mit einem Median von 28 pg/ml.

Die alleinige Stimulierung der Zellen mit LPS und den NO- und Peroxynitrit-Donoren SNAP oder SIN-1 in Abwesenheit von BzATP führte zu keiner Veränderung der IL-1β-Konzentration. Die gemessenen IL-1β-Werte im Zellkulturmedium waren ähnlich der Werte wie bei alleiniger Stimulierung der Zellen mit LPS. Alle Daten sind in Abbildung 6 in normalisierter Form dargestellt.

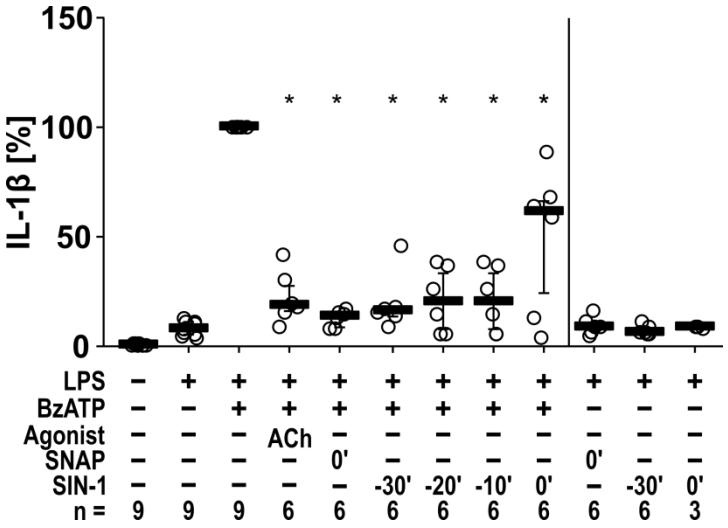

Abbildung 6: **Die BzATP-induzierte Freisetzung von IL-1β wird durch die NO- und Peroxynitrit-Donoren SNAP und SIN-1 in monozytären THP-1-Zellen gehemmt.**
Zunächst wurden die monozytären THP-1-Zellen mit LPS (1 µg/ml) für 5 Stunden vorstimuliert. Anschließend erfolgte eine zweite 40-minütige Stimulation der Zellen mit dem P2X7-Rezeptor-Agonisten BzATP (100 µM), um die Bildung und Sekretion von IL-1β zu induzieren. Als Positivkontrolle wurde der nikotinische Rezeptor-Agonist ACh (10 µM) zeitgleich mit BzATP zu den LPS-stimulierten Zellen gegeben. Der Einfluss auf die BzATP-induzierte Freisetzung von IL-1β durch NO und Peroxynitrit wurde durch die NO- und Peroxynitrit-Donoren SNAP (10 mM) und SIN-1 (1 mM) untersucht. Während SNAP zeitgleich mit BzATP eingesetzt wurde, wurde SIN-1 30 min (30'), 20 min (20') und 10 min (10') vor und zeitgleich (0') dem Einsatz von BzATP zugegeben.
Die IL-1β-Konzentration in Zellkulturüberständen von monozytären THP-1-Zellen, die mit LPS vorstimuliert und mit BzATP inkubiert wurden, wurde auf 100 % gesetzt und die weiteren Ergebnisse in Relation zu dieser gesetzt. Die Einzelwerte (n) sind als Punkte dargestellt, die Balken entsprechen den Medianen und die Antennen den Perzentilen 25 und 75. * $p \leq 0{,}05$ signifikant unterschiedlich zu den Zellen, die mit LPS und BzATP behandelt wurden. Friedmann-Test gefolgt vom Wilcoxon-Test.
ACh: Acetylcholin; **BzATP**: 2'(3')-O-(4-Benzoylbenzoyl)Adenosin-5'-Triphosphat;
IL-1β: Interleukin-1β; **LPS**: Lipopolysaccharid; **SIN-1**: 3-Morpholinosydnonimin; **SNAP**: S-Nitroso-N-Acetyl-DL-Penicillamin

Um nachzuweisen, dass die Hemmung der IL-1β-Freisetzung durch die NO- und Peroxynitrit-Donoren SNAP und SIN-1 auf den BzATP-induzierten Signalweg zurückzuführen ist, wurden weitere Experimente an monozytären THP-1-Zellen mittels Nigericin durchgeführt. Es ist bekannt, dass Nigericin, ein porenbildendes bakterielles Toxin über den Ausfluss von K^+-Ionen das NLRP3-Inflammasom aktiviert und ATP unabhängig zur Bildung und Sekretion von IL-1β führt (Cheneval et al., 1998).

Dazu wurden monozytäre THP-1-Zellen für 5 Stunden mit LPS (1 µg/ml) vorstimuliert und anschließend mit Nigericin (50 µM) für 40 min behandelt, um die Bildung und Sekretion von IL-1β zu induzieren. Um sicherzustellen, dass nur der ATP-unabhängige Mechanismus untersucht wird, wurden die Zellen zusätzlich mit dem ATP-abbauenden Enzym Apyrase (0,5 U/ml) behandelt. Die IL-1β-Konzentration im Zellkulturmedium unbehandelter Zellen lag bei Werten zwischen 0 und 2,0 pg/ml mit einem Median von 1,0 pg/ml. Die Stimulierung der Zellen mit LPS führte zu IL-1β-Konzentrationen im Zellkulturmedium zwischen 6,0 und 15,0 pg/ml mit einem Median von 11,0 pg/ml. Die alleinige Stimulierung der Zellen mit Nigericin führte zu IL-1β-Werten im Zellkulturmedium zwischen 2,0 und 3,0 pg/ml mit einem Median von 2,0 pg/ml. Die Zugabe von Nigericin zu den LPS-stimulierten Zellen führte zu einem Anstieg der IL-1β-Konzentration im Bereich zwischen 105,0 und 169,0 pg/ml mit einem Median von 111,5 pg/ml.

Wurde SNAP (10 mM) zu den mit LPS und Nigericin stimulierten Zellen gegeben, konnte eine signifikante ($p \leq 0{,}05$, $n = 6$, Wilcoxon-Test) Inhibierung der Nigericin-induzierten Freisetzung von IL-1β verzeichnet werden. Es wurden IL-1β-Konzentrationen im Zellkulturmedium zwischen 48 und 91 pg/ml mit einem Median von 64,5 pg/ml gemessen. Auch die Applikation von SIN-1 (1 mM) zu den LPS- und Nigericin-stimulierten Zellen 30 min, 20 min und 10 min vor der Behandlung der Zellen mit Nigericin, führten ebenfalls zu einer signifikanten ($p \leq 0{,}05$, $n = 6$, Wilcoxon-Test) Reduktion der IL-1β-Konzentration.

Wurden die LPS-stimulierten Zellen allerdings zeitgleich mit Nigericin und SIN-1 behandelt, konnte ein signifikanter ($p \leq 0{,}05$, $n = 6$, Wilcoxon-Test) Anstieg der IL-1β-Konzentration beobachtet werden. Die IL-1β-Konzentration im zellfreien Überstand lag bei Werten zwischen 109,0 und 165,0 pg/ml mit einem Median von 117,0 pg/ml. Die Daten sind in normalisierter Form in Abbildung 7 dargestellt.

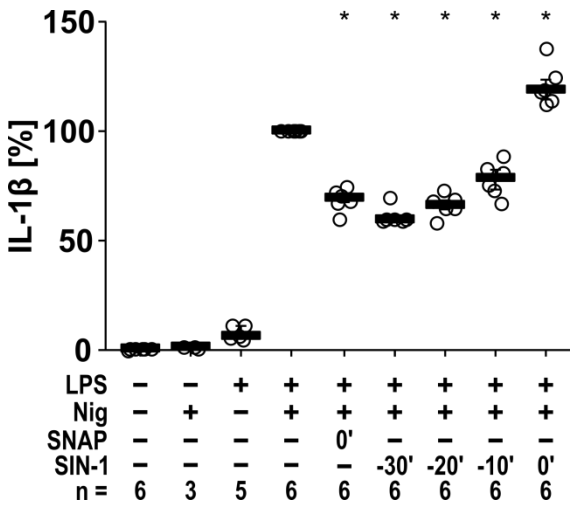

Abbildung 7: **Die Nigericin-induzierte Freisetzung von IL-1β in Gegenwart der NO- und Peroxynitrit-Donoren SNAP und SIN-1.**
Zunächst wurden die monozytären THP-1-Zellen mit LPS (1 µg/ml) für 5 Stunden vorstimuliert. Anschließend erfolgte eine zweite 40-minütige Stimulation der Zellen mit Nig (100 µM) in An- und Abwesenheit der NO- und Peroxynitrit-Donoren SNAP (10 mM) und SIN-1 (1 mM). Die Zellen wurden zusätzlich 30 min (30'), 20 min (20') und 10 min (10') mit SIN-1 vorinkubiert, bevor sie mit Nigericin behandelt wurden.
Die IL-1β-Konzentration in Zellkulturüberständen von monozytären THP-1-Zellen, die mit LPS vorstimuliert und mit Nigericin inkubiert wurden, wurde auf 100 % gesetzt und die weiteren Ergebnisse in Relation zu dieser gesetzt. Die Einzelwerte (n) sind als Punkte dargestellt, die Balken entsprechen den Medianen und die Antennen den Perzentilen 25 und 75. * $p \leq 0{,}05$ signifikant unterschiedlich zu den Zellen, die mit LPS und Nigericin behandelt wurden. Friedmann-Test gefolgt vom Wilcoxon-Test.
IL-1β: Interleukin-1β; LPS: Lipopolysaccharid; **Nig**: Nigericin; **SIN-1**: 3-Morpholinosydnonimin; **SNAP**: S-Nitroso-N-Acetyl-DL-Penicillamin

3.2.2 Experimente an zu M1-Makrophagen differenzierten THP-1-Zellen

Um zu testen, ob die NO-und Peroxynitrit-Donoren SNAP und SIN-1 dieselbe Wirkung an weiteren Zellen monozytären Ursprungs haben, wurden ähnliche Experimente an zu M1-Makrophagen differenzierten THP-1-Zellen durchgeführt. Dazu wurden die M1-Makrophagen für 5 Stunden mit LPS (1 µg/ml) vorstimuliert und anschließend mit BzATP (100 µM) für 40 min behandelt, um die Bildung und Sekretion von IL-1β zu induzieren. Als Positivkontrolle wurde der nAChR-Agonist ACh (10 µM) zeitgleich mit BzATP zu den mit LPS stimulierten Zellen gegeben.

Die IL-1β-Konzentration im Zellkulturmedium unbehandelter Zellen lag bei 14,0 und 64,0 pg/ml mit einem Median von 44,0 pg/ml. Die Behandlung der Zellen mit LPS führte zu IL-1β-Werten zwischen 137,0 und 296,0 pg/ml mit einem Median von 245,0 pg/ml. Die zusätzliche Stimulierung der LPS-behandelten Zellen mit dem P2X7R-Agonisten BzATP führte zu IL-1β-Konzentrationen im Zellkulturmedium zwischen 601,0 und 5227,0 pg/ml mit einem Median von 1011,0 pg/ml. In Anwesenheit des nAChR-Agonisten ACh zeigte sich in den mit LPS und BzATP stimulierten Zellen eine signifikante Inhibition der IL-1β-Freisetzung ($p \leq 0{,}05$, $n = 7$, Wilcoxon-Test). Es wurden IL-1β-Konzentrationen zwischen 265,0 und 493,0 pg/ml mit einem Median von 315,0 pg/ml gemessen.

Wurden die NO- und Peroxynitrit-Donoren SNAP (10 mM) oder SIN-1 (1 mM) zu den LPS- und BzATP-behandelten Zellen gegeben, konnte eine signifikante ($p \leq 0{,}05$, $n = 7$, Wilcoxon-Test) Inhibierung der BzATP-induzierten IL-1β-Konzentration, ähnlich den Werten von ACh, verzeichnet werden. Eine Behandlung der LPS-stimulierten Zellen mit SNAP oder SIN-1 in Abwesenheit von BzATP führte zu keiner Veränderung der IL-1β-Konzentration. Es wurden ähnliche IL-1β-Werte wie bei alleiniger Stimulation der Zellen mit LPS gemessen. Alle Daten sind in normalisierter Form in Abbildung 8 dargestellt.

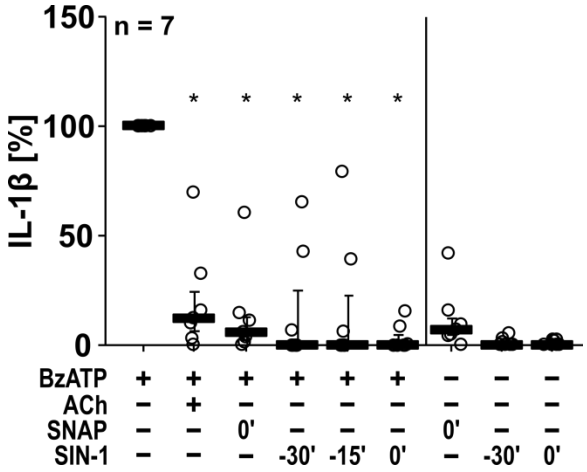

Abbildung 8: **Die BzATP-induzierte Freisetzung von IL-1β wird durch die NO- und Peroxynitrit-Donoren SNAP und SIN-1 in den zu M1-Makrophagen differenzierten THP-1-Zellen gehemmt.**
Zunächst wurden die M1-Makrophagen mit LPS (1 µg/ml) für 5 Stunden vorstimuliert. Anschließend erfolgte eine zweite 40-minütige Stimulation der Zellen mit dem P2X7-Rezeptor-Agonisten BzATP (100 µM), um die Bildung und Sekretion von IL-1β zu induzieren. Als Positivkontrolle wurde der nikotinische Rezeptor-Agonist ACh (10 µM) zeitgleich mit BzATP zu den LPS-stimulierten Zellen gegeben. Der Einfluss auf die BzATP-induzierte Freisetzung von IL-1β durch NO und Peroxynitrit wurde durch die NO- und Peroxynitrit-Donoren SNAP (10 mM) und SIN-1 (1 mM) untersucht. Während SNAP zeitgleich mit BzATP eingesetzt wurde, wurde SIN-1 30 min (30'), 20 min (20') und 10 min (10') vor und zeitgleich dem Einsatz von BzATP eingesetzt.
Die IL-1β-Konzentration in Zellkulturüberständen der aus THP-1-Zellen differenzierten M1-Makrophagen, die mit LPS vorstimuliert und mit BzATP inkubiert wurden, wurde auf 100 % gesetzt und die weiteren Ergebnisse in Relation zu dieser gesetzt. Bei der Darstellung der Ergebnisse wurde der IL-1β-Wert bei alleiniger Stimulation der Zellen mit LPS von den gemessenen IL-1β-Konzentrationen der weiteren Versuchsansätze subtrahiert. Die Einzelwerte (n) sind als Punkte dargestellt, die Balken entsprechen den Medianen und die Antennen den Perzentilen 25 und 75. * $p \leq 0{,}05$ signifikant unterschiedlich zu den Zellen, die mit LPS und BzATP behandelt wurden. Friedmann-Test gefolgt vom Wilcoxon-Test.
ACh: Acetylcholin; **BzATP**: 2'(3')-O-(4-Benzoylbenzoyl)Adenosin-5'-Triphosphat;
IL-1β: Interleukin-1β; **SIN-1**: 3-Morpholinosydnonimin; **SNAP**: S-Nitroso-N-Acetyl-DL-Penicillamin

3.2.3 Experimente an murinen Zellen

3.2.3.1 Murine mononukleäre Zellen des peripheren Blutes

Als nächstes wurde getestet, ob der Peroxynitrit-Donor SIN-1 auch eine hemmende Wirkung auf die ATP-induzierte Freisetzung von IL-1β in murinen Zellen hat. Zunächst wurde der Effekt auf murinen PBMCs getestet. Dazu wurde frisch entnommenes Blut von Wildtyp-C57BL/6J Mäusen mit LPS (10 ng/ml) vorstimuliert und für 2 Stunden inkubiert. Die gewonnenen PBMCs wurden anschließend mit ATP (1 mM) für 30 min stimuliert, um die Bildung und Freisetzung von IL-1β zu induzieren. Die IL-1β-Konzentration in den zellfreien Überständen lag bei Stimulation mit LPS bei Werten zwischen 0 und 6,0 pg/ml mit einem Median von 3,0 pg/ml. Die zusätzliche Stimulation der mit LPS behandelten Zellen mit ATP führte zu IL-1β-Konzentrationen zwischen 58,0 und 285,0 pg/ml mit einem Median von 109,0 pg/ml.

In Gegenwart des Peroxynitrit-Donors SIN-1 (1 mM) wurde die ATP-induzierte Freisetzung von IL-1β signifikant ($p \leq 0{,}05$, $n = 6$, Wilcoxon-Test) gehemmt. Die zeitgleiche Behandlung der mit LPS und ATP stimulierten PBMCs mit SIN-1 führte zu IL-1β-Werten zwischen 17,0 und 98,0 pg/ml mit einem Median von 61,0 pg/ml. Erfolgte eine Vorinkubation der LPS-stimulierten Zellen für 30 min mit SIN-1 bevor eine Stimulation mit ATP durchgeführt wurde, wurden IL-1β-Werte von 38 und 126 pg/ml mit einem Median von 87 pg/ml gemessen.

Die Behandlung der murinen PBMCs mit LPS und SIN-1 in Abwesenheit von ATP führte zu keiner Veränderung der IL-1β-Konzentration. Es wurden ähnliche Werte wie bei alleiniger Stimulation der Zellen mit LPS verzeichnet. Alle Daten sind in normalisierter Form in Abbildung 9 dargestellt.

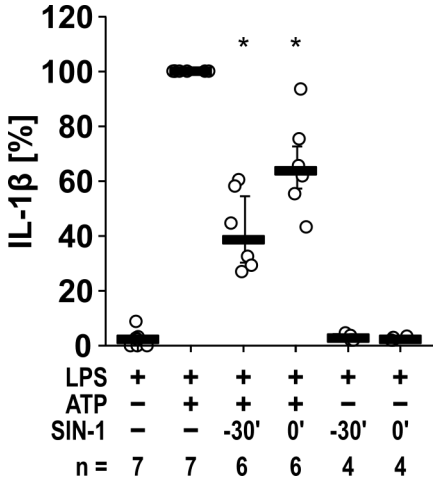

Abbildung 9: **Die ATP-induzierte Freisetzung von IL-1β wird durch den Peroxynitrit-Donor SIN-1 in murinen mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMCs) gehemmt.**
Frisch entnommenes Blut aus Wildtyp-C57BL/6J Mäusen wurde zunächst mit LPS (10 ng/ml) vorstimuliert und für 2 Stunden inkubiert. Anschließend erfolgte die Separation der PBMCs und Stimulierung der Zellen mit ATP (1 mM), um die Bildung und Sekretion von IL-1β zu induzieren. Die Behandlung der PBMCs mittels dem Peroxynitrit-Donor SIN-1 (1 mM) erfolgte 30 min (30') vor oder zeitgleich mit der Stimulierung der Zellen mit ATP.
Die IL-1β-Konzentration in Zellkulturüberständen von murinen PBMCs, die mit LPS vorstimuliert und mit ATP inkubiert wurden, wurde auf 100 % gesetzt und die weiteren Ergebnisse in Relation zu dieser gesetzt. Die Einzelwerte (n) sind als Punkte dargestellt, die Balken entsprechen den Medianen und die Antennen den Perzentilen 25 und 75.
* $p \leq 0{,}05$ signifikant unterschiedlich zu den Zellen, die mit LPS und ATP behandelt wurden. Friedmann-Test gefolgt vom Wilcoxon-Test.
ATP: Adenosin-5′-Triphosphat-Dinatriumsalz-Hydrat; **IL-1β**: Interleukin-1β; **LPS**: Lipopolysaccharid; **SIN-1**: 3-Morpholinosydnonimin

3.2.3.2 Murine bone marrow-derived Makrophagen

Eine umfangreichere Reihe an Experimenten wurde mit murinen BMDMs durchgeführt. Sowohl die ATP-induzierte, als auch die Nigericin-induzierte Freisetzung von IL-1β wurde in Gegenwart der NO- und Peroxynitrit-Donoren SNAP und SIN-1 getestet. BMDMs wurden zunächst für 5 Stunden mit LPS (1 µg/ml) vorstimuliert und anschließend für 40 min mittels ATP stimuliert, um die Bildung und Sekretion von IL-1β zu induzieren. Die NO- und Peroxynitrit-Donoren SNAP (10 mM) bzw. SIN-1 (1 mM) wurden 30 min vor der Applikation oder zeitgleich mit ATP zugegeben.

Unbehandelte BMDMs wiesen eine IL-1β-Konzentration im Zellkulturmedium zwischen 0 bis 2,0 pg/ml mit einem Median von 0 pg/ml auf. Die Stimulation der Zellen mit LPS führte zu IL-1β-Werten im zellfreien Überstand zwischen 71,0 und 382,0 pg/ml mit einem Median von 318,0 pg/ml. Die Zugabe von ATP zu den LPS-stimulierten Zellen führte zu IL-1β-Werten im Zellkulturmedium zwischen 390,0 und 2925,0 pg/ml mit einem Median von 593,0 pg/ml. In Gegenwart der NO- und Peroxynitrit-Donoren SNAP oder SIN-1, sowohl 30 min vor der Applikation von ATP, als auch zeitgleich mit ATP, führte zu einer signifikanten ($p \leq 0{,}05$, $n = 9\text{-}13$, Wilcoxon-Test) Reduktion der IL-1β-Konzentration. SNAP führte bei 30-minütiger Vorinkubation der Zellen vor der Applikation von ATP zu IL-1β-Werten zwischen 61,0 und 337,0 pg/ml mit einem Median von 211,0 pg/ml. Bei gleichzeitiger Applikation von SNAP und ATP wurden IL-1β-Werte zwischen 238,0 und 508,0 pg/ml mit einem Median von 277,0 pg/ml gemessen. SIN-1 führte bei 30-minütiger Vorinkubation der Zellen vor der Applikation von ATP zu IL-1β-Werten zwischen 51,0 und 284,0 pg/ml mit einem Median von 231,0 pg/ml, während die gleichzeitige Applikation von SIN-1 zu ATP zu IL-1β-Werten zwischen 196,0 und 575,0 pg/ml mit einem Median von 380,0 pg/ml führte.

Die Behandlung der BMDMs mit LPS und den NO- und Peroxynitrit-Donoren SNAP oder SIN-1 in Abwesenheit von ATP führte zu keiner Veränderung der IL-1β-Konzentration. Die IL-1β-Konzentrationen waren ähnlich den Werten der BMDMs, die mit LPS behandelt wurden. Alle Daten sind in normalisierter Form in Abbildung 10 dargestellt.

Um zu testen, ob der inhibitorische Effekt auf die IL-1β-Konzentration auf ATP und den P2X7R zurückzuführen ist, wurden zusätzliche Experimente mit dem porenbildenden bakteriellen Toxin Nigericin (50 µM) durchgeführt. Nigericin aktiviert ATP-unabhängig das NLRP3-Inflammasom und führt zur Bildung und Sekretion von IL-1β. Um

sicherzustellen, dass nur der ATP-unabhängige Mechanismus untersucht wird, wurden die Zellen zusätzlich mit dem ATP-abbauenden Enzym Apyrase (0,5 U/ml) behandelt.

BMDMs, die mit Nigericin stimuliert wurden, wiesen IL-1β-Werte im Zellkulturmedium zwischen 2,0 und 14,0 pg/ml mit einem Median von 9,0 pg/ml auf. Die zusätzliche Vorstimulierung der Zellen mit LPS in Gegenwart von Nigericin führte zu IL-1β-Konzentrationen im Bereich von 14439,0 bis 21855,0 pg/ml mit einem Median von 17143,0 pg/ml.

Sowohl die 30-minütige Vorinkubation, als auch die zeitgleiche Applikation von SNAP und Nigericin, führte zu einer signifikanten ($p \leq 0,05$, $n = 6-11$, Wilcoxon-Test) Reduktion der IL-1β-Konzentration. Bei 30-minütiger Vorinkubation der LPS- und Nigericin-stimulierten Zellen mit SIN-1 kam es ebenfalls zu einer signifikanten ($p \leq 0,05$, $n = 7$, Wilcoxon-Test) Reduktion der IL-1β-Konzentration im Zellkulturmedium. Die zeitgleiche Behandlung der LPS-stimulierten BMDMs mit SIN-1 und Nigericin führte zu keiner signifikanten Reduktion der IL-1β-Konzentration im zellfreien Überstand. Es wurden IL-1β-Werte im Bereich von 67,0 bis 5070,0 pg/ml mit einem Median von 2513,0 pg/ml gemessen. Auch diese Daten wurden normalisiert und in Abbildung 10 dargestellt.

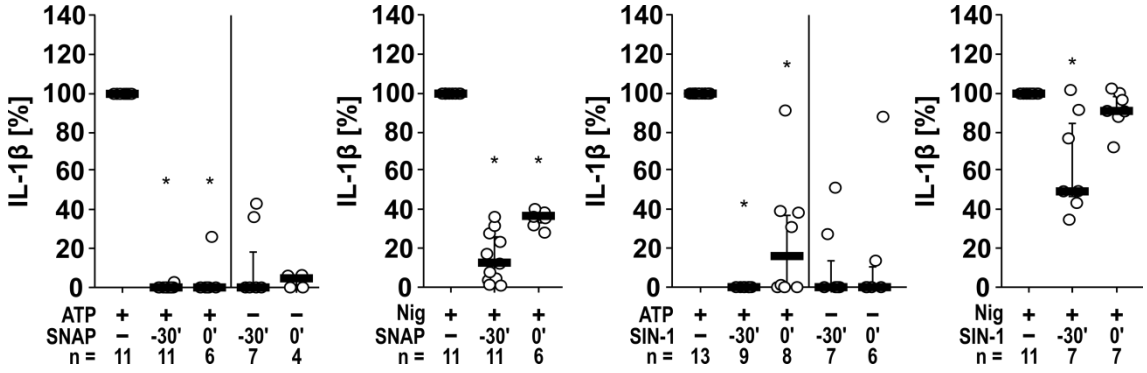

Abbildung 10: **Die ATP-induzierte Freisetzung von IL-1β wird durch die NO- und Peroxynitrit-Donoren SNAP und SIN-1 in murinen bone marrow-derived Makrophagen (BMDMs) gehemmt.**

Murine BMDMs wurden mit LPS (1 µg/ml) für 5 Stunden vorstimuliert. Anschließend erfolgte eine zweite 40-minütige Stimulierung der Zellen mit ATP (1 mM), um die Bildung und Sekretion von IL-1β zu induzieren. Die Behandlung der murinen BMDMs mittels den NO- und Peroxynitrit-Donoren SNAP (10 mM) oder SIN-1 (1 mM) erfolgte 30 min (30') vor der Behandlung mit ATP oder zeitgleich (0') mit ATP.

Um die P2X7-Rezeptor unabhängige Freisetzung von IL-1β zu testen, wurden zusätzliche Experimente mit Nigericin (50 µM) und dem ATP-abbauenden Enzym Apyrase (0,5 U/ml) durchgeführt. Dazu wurden die BMDMs für 5 Stunden mit LPS (1 µg/ml) stimuliert und für 40 min mit Nigericin und Apyrase behandelt. Die NO- und Peroxynitrit-Donoren SNAP (10 mM) oder SIN-1 (1 mM) wurden entweder zeitgleich (0') mit Nigericin oder 30 min (30') vor der Behandlung mit Nigericin zu den mit LPS stimulierten BMDMs gegeben.

Die IL-1β-Konzentration in Zellkulturüberständen der murinen BMDMs, die mit LPS vorstimuliert und mit ATP oder Nig inkubiert wurden, wurde auf 100 % gesetzt und die weiteren Ergebnisse in Relation zu dieser gesetzt. Bei der Darstellung der Ergebnisse wurde der IL-1β-Wert bei alleiniger Stimulation der Zellen mit LPS von den gemessenen IL-1β-Konzentrationen der weiteren Versuchsansätze subtrahiert. Die Einzelwerte (n) sind als Punkte dargestellt, die Balken entsprechen den Medianen und die Antennen den Perzentilen 25 und 75. * $p \leq 0{,}05$ signifikant unterschiedlich zu den Zellen, die mit LPS und ATP oder Nig behandelt wurden. Friedmann-Test gefolgt vom Wilcoxon-Test.

ATP: Adenosin-5′-Triphosphat-Dinatriumsalz-Hydrat; **IL-1β**: Interleukin-1β; **LPS**: Lipopolysaccharid; **Nig**: Nigericin; **SIN-1**: 3-Morpholinosydnonimin; **SNAP**: S-Nitroso-N-Acetyl-DL-Penicillamin

3.2.4 Experimente an humanen mononukleären Zellen des peripheren Blutes

Ähnliche Experimente wie an murinen BMDMs wurden an humanen PBMCs durchgeführt. Zunächst wurden durchflusszytometrische Analysen an den durch RosetteSep™-Technik gewonnen Monozytenfraktionen durchgeführt, um die Reinheit der Monozyten nachzuweisen. Im ersten Ansatz wurde untersucht, ob die aufgereinigten Zellen die für Monozyten typischen Zelloberflächenmarker exprimieren. Dazu wurden die für Monozyten typischen Zelloberflächenmarker CD14, CD16 und CD38 und HLA-DR verwendet. Durchflusszytometrische Analysen ergaben, dass die mittels RosetteSep™-Technik angereicherte Monozytenfraktion zu 80,2% CD14, 18,2% CD16, 99,2% CD45 und zu 91,4% HLA-DR exprimieren (siehe Abbildung 11A).

Basierend auf dem Zelloberflächenmarker CD45 und der side scatter area (SSC-A) konnte nachgewiesen werden, dass 99,2% der gewonnenen Zellen mononukleäre Leukozyten sind (siehe Abbildung 11B). Anhand der Zelloberflächenmarker CD14 und CD16 wurde weiterhin gezeigt, dass 80,73% der Zellen Charakteristika von Monozyten aufweisen (siehe Abbildung 11C). Ähnliche Werte wurden erreicht, wenn anhand der Zelloberflächenmarker CD16 und HLA-DR eine Abgrenzung gegenüber von Natürlichen Killerzellen (NK cells) vorgenommen wurde (76,17% Monozyten, siehe Abbildung 11D) oder mittels der Zelloberflächenmarker CD14 und HLA-DR eine Abgrenzung gegenüber von B-Zellen erfolgte (76,07% Monozyten, siehe Abbildung 11E).

Zudem wurde anhand der Zelloberflächenmarker CD14 und CD16 die prozentuelle Verteilung der Monozyten-Untergruppen untersucht. Zu 85,4% handelte es sich um die klassischen-, zu 4,2% um die intermediären- und zu 10,4% um die nicht-klassischen-Monozyten (siehe Abbildung 11F).

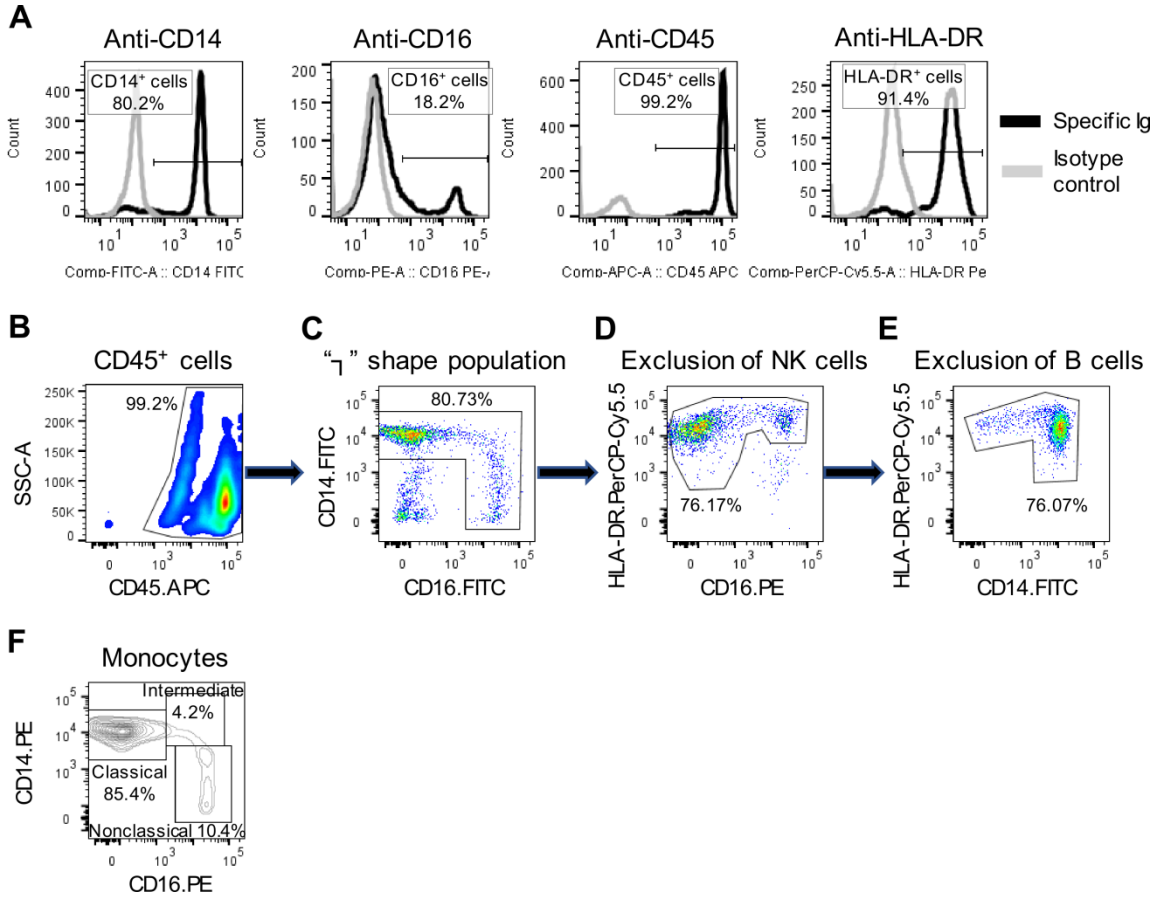

Abbildung 11: **Durchflusszytometrische Analyse zum Nachweis der Reinheit der mittels RosetteSep™-Technik gewonnenen humanen Monozyten aus der Blutprobe eines Probanden.**

A) Repräsentative Histogramme der Zelloberflächenmarker CD14, CD16, CD45 und HLA-DR an humanen Monozytenfraktionen
B) CD45 vs SSC-A: Gating zur Selektion der Immunzellen
C) CD16 vs CD14: Gating zur Selektion von Monozyten
D) CD16 vs. HLA-DR: Gating zum Ausschluss von NK-Zellen
E) CD14 vs. HLA-DR: Gating zum Auschluss von B-Zellen
F) Prozentuelle Darstellung der klassischen-, intermediären- und nicht-klassischen-Monozyten

CD: Cluster of differentiation; **HLA-DR**: human leukocyte antigen, DR-Isotyp; **NK-Zellen**: Natürliche Killerzellen; **SSC-A**: side scatter area

Nachdem per durchflusszytometrischer Analysen eine ausreichende Reinheit der angereicherten humanen Monozyten nachgewiesen wurde, wurde die Wirkung der NO- und Peroxynitrit-Donoren SNAP und SIN-1 auf die BzATP-induzierte Freisetzung von IL-1β an diesen Zellen getestet.

Zunächst wurden die humanen Monozyten während der Aufreinigung kurz mit LPS (5 ng/ml) vorstimuliert und danach für 3 Stunden inkubiert. Darauf folgte eine zweite Stimulierung der Zellen mit BzATP (100 µM) für 30 min, um die Bildung und Sekretion

von IL-1β zu induzieren. Die NO- und Peroxynitrit-Donoren SNAP (10 mM) oder SIN-1 (1 mM) wurden entweder zur selben Zeit mit BzATP zu den Zellen gegeben oder 30 min vor der Applikation von BzATP.

Humane Monozyten, die mit LPS vorstimuliert wurden, wiesen eine IL-1β-Konzentration im Zellkulturmedium von 74,0 bis 1384,0 pg/ml mit einem Median von 498,0 pg/ml auf. Die Zugabe von BzATP zu den LPS-stimulierten Zellen führte zu IL-1β-Werten zwischen 1035,0 und 13723,0 pg/ml mit einem Median von 8605,0 pg/ml. In Gegenwart der NO- und Peroxynitrit-Donoren SNAP oder SIN-1 kam es zu einer signifikanten ($p \leq 0,05$, n = 6-8, Wilcoxon-Test) Reduktion der IL-1β-Konzentration mit LPS und BzATP stimulierter Zellen. Die IL-1β-Konzentration im Zellkulturmedium lag bei 30-minütiger Vorinkubation mit SNAP bei Werten zwischen 172,0 und 6227,0 pg/ml mit einem Median von 360,0 pg/ml. Die zeitgleiche Applikation von SNAP und BzATP zu LPS-stimulierten Zellen führte zu IL-1β-Werten im zellfreien Überstand zwischen 156,0 und 6598,0 pg/ml mit einem Median von 1262,5 pg/ml. SIN-1 führte bei gleichzeitiger Zugabe mit BzATP zu den zu IL-1β-Werten zwischen 484,0 und 11794,0 pg/ml mit einem Median von 3628,0 pg/ml im Zellkulturmedium. Die 30-minütige Vorinkubation der Zellen mit SIN-1 vor der Behandlung der mit LPS stimulierten Zellen mit BzATP führte zu IL-1β-Werten im zellfreien Überstand zwischen 493,0 und 5577,0 pg/ml mit einem Median von 2616,0 pg/ml. Die Behandlung der humanen Monozyten mit LPS und den NO- und Peroxynitrit-Donoren SNAP oder SIN-1 in Abwesenheit von BzATP führte zu keiner Veränderung der IL-1β-Konzentration. Die gemessenen IL-1β-Konzentrationen waren ähnlich den Werten der Monozyten, die mit LPS behandelt wurden. Alle Daten sind in normalisierter Form in Abbildung 12 dargestellt.

Um zu testen, ob der inhibitorische Effekt auf die IL-1β-Sekretion auf eine Inhibition des P2X7R zurückzuführen ist, wurden zusätzliche Experimente mit Nigericin (50 μM) durchgeführt. Nigericin, ein porenbildendes bakterielles Toxin, aktiviert ATP-unabhängig das NLRP3-Inflammasom und führt zur Bildung und Sekretion von IL-1β. Um sicherzustellen, dass nur der ATP-unabhängige Mechanismus untersucht wird, wurden die Zellen zusätzlich mit dem ATP-abbauenden Enzym Apyrase (0,5 U/ml) behandelt.

Humane Monozyten, die mit LPS und Nigericin stimuliert wurden, wiesen IL-1β-Werte im Zellkulturmedium zwischen 4961,0 und 26233,0 pg/ml mit einem Median von 10053,0 pg/ml auf. Sowohl bei 30-minütiger Vorinkubation, als auch zeitgleicher Applikation mit Nigericin, führte SNAP an LPS-stimulierten humanen Monozyten zu einer signifikanten ($p \leq 0,05$, n = 7-8, Wilcoxon-Test) Reduktion der IL-1β-Konzentration. Die IL-1β-

Konzentration lag bei 30-minütiger Vorinkubation bei Werten zwischen 3603,0 und 23012,0 pg/ml mit einem Median von 7951,0 pg/ml im Zellkulturmedium. Wurde SNAP zur gleichen Zeit mit Nigericin zu den LPS-stimulierten Zellen gegeben, wurden IL-1β-Werte im Bereich von 1486,0 und 14746,0 pg/ml mit einem Median von 3673,0 pg/ml gemessen. Auch die 30-minütige Vorinkubation der humanen PBMCs mit SIN-1 führte zu einer signifikanten ($p \leq 0,05$, $n = 7$, Wilcoxon-Test) Reduktion der IL-1β-Konzentration.
Wurde SNAP zur selben Zeit mit Nigericin zu den LPS-stimulierten Zellen gegeben, kam es nicht zu einer signifikanten Reduktion der IL-1β-Konzentration. Es wurden IL-1β-Werte im Zellkulturmedium im Bereich von 3297,0 bis 18179,0 pg/ml mit einem Median von 9612,0 pg/ml gemessen. Auch diese Daten sind in Abbildung in normalisierter Form dargestellt.

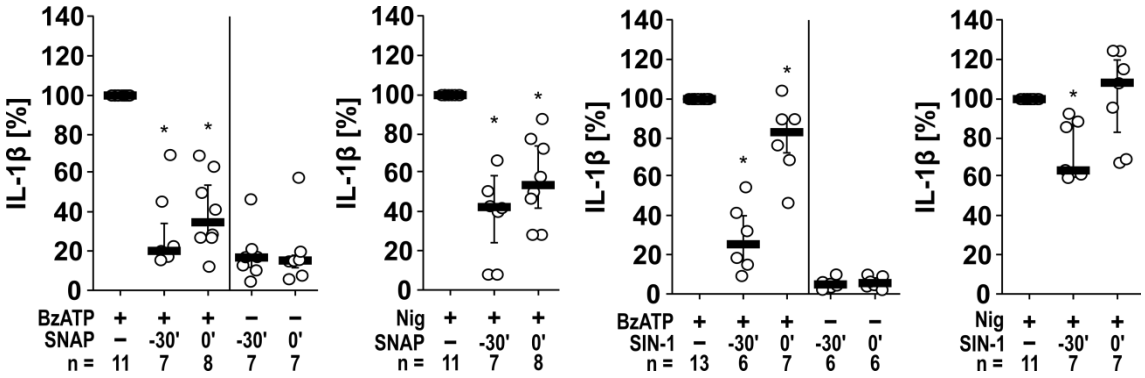

Abbildung 12: **Die BzATP-induzierte Freisetzung von IL-1β wird durch die NO-und Peroxynitrit-Donoren SNAP und SIN-1 in humanen Monozyten gehemmt.**
Humane Monozyten wurden mit LPS (5 ng/ml) für 5 Stunden vorstimuliert. Anschließend erfolgte eine zweite 30-minütige Stimulierung der Zellen mit BzATP (100 µM), um die Bildung und Sekretion von IL-1β zu induzieren. Die Behandlung der Monozyten mit den NO- und Peroxynitrit Donoren SNAP (10 mM) oder SIN-1 (1 mM) erfolgte 30 min (30') vor der Behandlung mit BzATP oder zeitgleich (0') mit BzATP.
Um die P2X7-Rezeptor-unabhängige Freisetzung von IL-1β zu untersuchen, wurden Experimente mit Nigericin (50 µM) und dem BzATP-abbauenden Enzym Apyrase (0,5 U/ml) durchgeführt. Dazu wurden die humanen Monozyten für 3 Stunden mit LPS vorstimuliert und für 30 min mit Nigericin und Apyrase behandelt. Die NO- und Peroxynitrit-Donoren SNAP (10 mM) oder SIN-1 (1 mM) wurden entweder zeitgleich (0') mit Nigericin oder 30 min (30') vor der Behandlung mit Nigericin zu den mit LPS stimulierten humanen Monozyten gegeben
Die IL-1β-Konzentration in Zellkulturüberständen der humanen Monozyten, die mit LPS vorstimuliert und mit BzATP oder Nig inkubiert wurden, wurde auf 100 % gesetzt und die weiteren Ergebnisse in Relation zu dieser gesetzt. Die Einzelwerte (n) sind als Punkte dargestellt, die Balken entsprechen den Medianen und die Antennen den Perzentilen 25 und 75. * $p \leq 0,05$ signifikant unterschiedlich zu den Zellen, die mit LPS und BzATP oder Nig behandelt wurden. Friedmann-Test gefolgt vom Wilcoxon-Test.
BzATP: 2'(3')-O-(4-Benzoylbenzoyl)Adenosin-5'-Triphosphat; **IL-1β**: Interleukin-1β; **LPS**: Lipopolysaccharid; **Nig**: Nigericin; **SIN-1**: 3-Morpholinosydnonimin; **SNAP**: S-Nitroso-N-Acetyl-DL-Penicillamin

3.3 Zellvitalität

Die Zellvitalität monozytärer THP-1-Zellen, muriner PBMCs, muriner BMDMs und humaner Monozyten wurde über die Messung der LDH-Aktivität bestimmt. Dazu wurde die LDH-Aktivität der einzelnen Versuchsansätze im zellfreien Überstand gemessen und in Relation zur höchsten LDH-Aktivität aus lysierten und unbehandelten mononukleären Phagozyten im Zellkulturüberstand gesetzt und in Prozent angegeben (Tabellen 6-10).

Zellen, Behandlung	**Zelltod [%] Mittelwert ± SD**	**n**
THP-1, -	7.3 ± 1.5	6
THP-1, LPS	7.5 ± 1.0	6
THP-1, LPS, BzATP	10.4 ± 1.7	6
THP-1, LPS, BzATP, Nic 100 µM	8.8 ± 1.9	6
THP-1, LPS, BzATP, Nic 100 µM, L-NIO 50 µM	10.7 ± 2.7	6
THP-1, LPS, BzATP, Nic 100 µM, L-NAME 10 µM	10.2 ± 2.5	6
THP-1, LPS, BzATP, PC 200 µM	8.2 ± 1.5	6
THP-1, LPS, BzATP, PC 200 µM, L-NIO 50 µM	9.8 ± 2.8	6
THP-1, LPS, BzATP, PC 200 µM, L-NAME 10 µM	10.7 ± 1.9	6
THP-1, LPS, BzATP, CRP 10 µg/ml	8.2 ± 1.3	6
THP-1, LPS, BzATP, CRP 10 µg/ml, L-NIO 50 µM	9.7 ± 2.7	6
THP-1, LPS, BzATP, CRP 10 µg/ml, L-NAME 10 µM	10.0 ± 2.8	6
THP-1, LPS, BzATP, L-NIO 50 µM	9.3 ± 2.3	6
THP-1, LPS, BzATP, L-NAME 10 µM	9.7 ± 2.3	6

Tabelle 6: **Prozentueller Anteil toter Zellen bei Experimenten mit monozytären THP-1-Zellen; NO-Synthase-Inhibitoren.**
Die LDH-Aktivität der einzelnen Versuchsansätze wurden im Überstand gemessen und in Relation zur maximalen LDH-Aktivität aus lysierten und unstimulierten Zellen gesetzt und in Prozent angegeben.
BzATP: 2'(3')-O-(4-Benzoylbenzoyl)Adenosin-5'-Triphosphat; **CRP**: C-reaktives Protein; **LPS**: Lipopolysaccharid; **Nic**: Nikotin; **L-NAME**: Nω-Nitro-L-Arginin-Methylester-Hydrochlorid; **L-NIO**: L-N5-(1-Iminoethyl)-Ornithin; **n**: Anzahl der Versuchsansätze; **PC**: Phosphocholin

Zellen, Behandlung	Zelltod [%] Mittelwert ± SD	n
THP-1, -	12.1 ± 5.5	15
THP-1, LPS	11.6 ± 4.1	14
THP-1, LPS, BzATP ± solvent	11.3 ± 5.4	9
THP-1, LPS, BzATP, ACh 10 µM	9.2 ± 4.5	6
THP-1, LPS, BzATP, SNAP 10 mM	6.2 ± 3.5	6
THP-1, LPS, BzATP, SIN-1 -30‘	5.3 ± 2.7	6
THP-1, LPS, BzATP, SIN-1 -20‘	6.0 ± 2.7	6
THP-1, LPS, BzATP, SIN-1 -10‘	7.8 ± 3.5	6
THP-1, LPS, BzATP, SIN-1 0‘	6.2 ± 2.2	6
THP-1, LPS, SNAP 10 mM	8.0 ± 4.1	6
THP-1, LPS, SIN-1 -30‘	9.3 ± 4.5	6
THP-1, LPS, SIN-1 0‘	8.3 ± 4.2	3
THP-1, Nig	19.7 ± 3.1	3
THP-1, LPS, Nig ± solvent	18.3 ± 4.9	6
THP-1, LPS, Nig, SNAP 10 mM	37.5 ± 12.7	6
THP-1, LPS, Nig, SIN-1 -30‘	15.3 ± 4.8	6
THP-1, LPS, Nig, SIN-1 -20‘	13.8 ± 4.2	6
THP-1, LPS, Nig, SIN-1 -10‘	15.0 ± 4.9	6
THP-1, LPS, Nig, SIN-1 0‘	17.5 ± 4.7	6

Tabelle 7: **Prozentueller Anteil toter Zellen bei Experimenten mit monozytären THP-1-Zellen; SNAP und SIN-1.**
Die LDH-Aktivität der einzelnen Versuchsansätze wurden im Überstand gemessen und in Relation zur maximalen LDH-Aktivität aus lysierten und unstimulierten Zellen gesetzt und in Prozent angegeben.
ACh: Acetylcholin; **BzATP**: 2’(3’)-O-(4-Benzoylbenzoyl)Adenosin-5’-Triphosphat; **LPS**: Lipopolysaccharid; **n**: Anzahl der Versuchsansätze; **Nig**: Nigericin; **SIN-1**: 3-Morpholinosydnonimin; **SNAP**: S-Nitroso-N-Acetyl-DL-Penicillamin

Zellen, Behandlung	Zelltod [%] Mittelwert ± SD	n
Murine PBMCs, LPS	7.1 ± 9.3	7
Murine PBMCs, LPS, ATP	12.1 ± 7.3	7
Murine PBMCs, LPS, ATP, SIN-1 -30’	2.2 ± 1.7	6
Murine PBMCs, LPS, ATP, SIN-1 0’	5.0 ± 3.3	6
Murine PBMCs, LPS, SIN-1 -30’	3.8 ± 5.0	4
Murine PBMCs, LPS, SIN-1 0’	6.5 ± 7.5	4

Tabelle 8: **Prozentueller Anteil toter Zellen bei Experimenten mit murinen mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMCs); SIN-1.**
Die LDH-Aktivität der einzelnen Versuchsansätze wurden im Überstand gemessen und in Relation zur maximalen LDH-Aktivität aus lysierten und unstimulierten Zellen gesetzt und in Prozent angegeben.
ATP: Adenosin-5′-Triphosphat-Dinatriumsalz-Hydrat; **LPS**: Lipopolysaccharid;
n: Anzahl der Versuchsansätze; **SIN-1**: 3-Morpholinosydnonimin

Zellen, Behandlung	Zelltod [%] Mittelwert ± SD	n
Murine BMDMs, -	14.9 ± 4.4	13
Murine BMDMs, LPS	16.7 ± 5.5	13
Murine BMDMs, LPS, ATP ± solvent	18.2 ± 4.0	24
Murine BMDMs, LPS, ATP, SNAP 10 mM -30’	16.9 ± 6.8	11
Murine BMDMs, LPS, ATP, SNAP 10 mM 0’	14.5 ± 6.2	8
Murine BMDMs, LPS, SNAP 10 mM -30’	16.8 ± 2.6	6
Murine BMDMs, LPS, SNAP 10 mM 0’	13.8 ± 11.9	6
Murine BMDMs, LPS, ATP, SIN-1 -30’	14.5 ± 6.3	8
Murine BMDMs, LPS, ATP, SIN-1 0’	15.6 ± 3.9	8
Murine BMDMs, LPS, SIN-1 -30’	16.6 ± 7.4	8
Murine BMDMs, LPS, SIN-1 0’	17.1 ± 10.3	8
Murine BMDMs, Nig	1.2 ± 2.2	11
Murine BMDMs, LPS, Nig ± solvent	13.9 ± 11.7	22
Murine BMDMs, LPS, Nig, SNAP 10 mM -30’	13.2 ± 5.9	11
Murine BMDMs, LPS, Nig, SNAP 10 mM 0’	16.3 ± 9.8	8
Murine BMDMs, LPS, Nig, SIN-1-30’	3.0 ± 4.8	4
Murine BMDMs, LPS, Nig, SIN-1 0’	3.5 ± 4.7	6

Tabelle 9: **Prozentueller Anteil toter Zellen bei Experimenten mit murinen bone marrow-derived Makrophagen (BMDMs); SNAP und SIN-1.**
Die LDH-Aktivität der einzelnen Versuchsansätze wurden im Überstand gemessen und in Relation zur maximalen LDH-Aktivität aus lysierten und unstimulierten Zellen gesetzt und in Prozent angegeben.
ATP: Adenosin-5′-Triphosphat-Dinatriumsalz-Hydrat; **LPS**: Lipopolysaccharid;
n: Anzahl der Versuchsansätze; **Nig**: Nigericin; **SIN-1**: 3-Morpholinosydnonimin;
SNAP: S-Nitroso-N-Acetyl-DL-Penicillamin

Zellen, Behandlung	Zelltod [%] Mittelwert ± SD	n
Humane Monozyten, LPS	3.3 ± 3.2	13
Humane Monozyten, LPS, BzATP ± solvent	4.4 ± 3.5	24
Humane Monozyten, LPS, BzATP, SNAP 10 mM -30’	5.2 ± 2.5	6
Humane Monozyten, LPS, BzATP, SNAP 10 mM 0’	3.6 ± 2.0	7
Humane Monozyten, LPS, SNAP 10 mM-30’	4.6 ± 2.1	6
Humane Monozyten, LPS, SNAP 10 mM0’	11.2 ± 9.9	9
Humane Monozyten, LPS, BzATP, SIN-1 -30’	8.0 ± 5.7	8
Humane Monozyten, LPS, BzATP, SIN-1 0’	6.8 ± 5.2	6
Humane Monozyten, LPS, SIN-1 -30’	5.0 ± 1.9	7
Humane Monozyten, LPS, SIN-1 0’	10.3 ± 12.3	7
Humane Monozyten, LPS, Nig ± solvent	12.2 ± 8.2	18
Humane Monozyten, LPS, Nig, SNAP 10 mM -30’	12.9 ± 12.7	7
Humane Monozyten, LPS, Nig, SNAP 10 mM 0’	25.6 ± 19.1	11
Humane Monozyten, LPS, Nig, SIN-1 -30’	19.3 ± 11.3	8
Humane Monozyten, LPS, Nig, SIN-1 0’	19.0 ± 9.6	7

Tabelle 10: **Prozentueller Anteil toter Zellen bei Experimenten mit humanen Monozyten; SNAP und SIN-1.**
Die LDH-Aktivität der einzelnen Versuchsansätze wurden im Überstand gemessen und in Relation zur maximalen LDH-Aktivität aus lysierten und unstimulierten Zellen gesetzt und in Prozent angegeben.
ATP: Adenosin-5′-Triphosphat-Dinatriumsalz-Hydrat; **LPS**: Lipopolysaccharid;
n: Anzahl der Versuchsansätze; **Nig**: Nigericin; **SIN-1**: 3-Morpholinosydnonimin; **SNAP**: S-Nitroso-N-Acetyl-DL-Penicillamin

4. Diskussion

4.1 Methodendiskussion

4.1.1 Verwendete Zelltypen

Es wurden verschiedene Zellarten verwendet, um den Signaltransduktionsmechanismus zu klären, bei dem die Aktivierung von nAChRs zur Inhibierung der ionotropen Funktion des P2X7R führt und somit die IL-1β-Freisetzung in mononukleären Phagozyten inhibiert. Zunächst wurden Experimente an der humanen monozytären THP-1-Zelllinie durchgeführt. Wie bereits in Kapitel 2.5.1.1 erwähnt, wurden die THP-1-Zellen 1987 aus dem peripheren Blut eines 1-jährigen männlichen Patienten isoliert, der an akuter myeloischer Leukämie litt (Tsuchiya et al., 1980).

Die THP-1-Zellen sind bekanntermaßen ein geeignetes Modell zur einfachen und zuverlässigen Untersuchung von Monozyten im Rahmen einer Immunreaktion. Eine Besonderheit dieser Zellen ist, dass sie nicht nur als in vitro-Modell für humane Monozyten dienen, sondern sich auch zu Makrophagen differenzieren lassen (Chanput et al., 2014; Qin, 2012). Sowohl monozytäre THP-1-Zellen, als auch zu M1-Makrophagen differenzierte THP-1-Zellen zeigen eine konstitutive Expression von TLRs, einschließlich TLR-4 und reagieren nach der Behandlung mit LPS mit der Veränderung der Expression einer Reihe von Genen mit pro-inflammatorischen Funktionen, darunter IL-1β (Chanput et al., 2010, 2014; Schildberger et al., 2013; Sharif et al., 2007).

Die Differenzierung der monozytären THP-1-Zellen zu M1-Makrophagen kann durch verschiedene Stimuli erfolgen. PMA und 1α, 25-Dihydroxyvitamin D3 (vD3) sind häufig verwendete Stimuli, die zur Differenzierung von Makrophagen aus monozytären Zelllinien verwendet werden. In dieser Studie wurde zunächst PMA verwendet, um M0-Makrophagen aus monozytären THP-1-Zellen zu differenzieren. Die weitere Differenzierung zu M1-Makrophagen erfolgte durch die Zugabe von INF-γ und LPS (siehe Kapitel 2.5.2.1). Daigneault et al. (2010) konnten zeigen, dass eine Behandlung von monozytären THP-1-Zellen mit PMA im Vergleich zu vD3 zu einer Differenzierung von Makrophagen führt, die die phagozytotische Kapazität behalten und ein ähnliches Zytokinprofil als Reaktion auf TLR-Liganden zeigen, wie Makrophagen, die aus primären humanen PBMCs differenziert wurden (Daigneault et al., 2010). Die vollständige Differenzierung der M1-Makrophagen aus monozytären THP-1-Zellen kann unter anderem durch den Nachweis Differenzierungs-abhängiger Zelloberflächenmarker erfolgen. In

dieser Arbeit wurden anhand durchflusszytometrischer Analysen folgende Zelloberflächenmarker untersucht: CD14, CD38, CD80 und HLA-DR. CD14 ist ein Oberflächenprotein, das vor allem in Monozyten und Makrophagen zu finden ist. Per CD14 erfolgt in Zusammenspiel mit dem TLR-4 die Erkennung von LPS. CD14 ist ein Monozyten-Marker, der bei der Differenzierung zu Makrophagen abnimmt (Daigneault et al., 2010; Steinbach & Thiele, 1994). Anhand der Expression von CD38 können M1-Makrophagen von M2-Makrophagen unterschieden werden (Jablonski et al., 2015). CD80 und HLA-DR sind typischerweise auf der Zelloberfläche von antigenpräsentierenden Zellen zu finden und dienen ebenfalls dem Nachweis von Makrophagen (Unuvar Purcu et al., 2022). Die durchflusszytometrischen Analysen ergaben in dieser Arbeit, dass die zu M1-Makrophagen differenzierten THP-1-Zellen zu 46,6% CD14, 83,9% CD38, 42,4% CD80 und 28,4% HLA-DR exprimieren. Zudem wurde anhand derselben Zelloberflächenmarker gezeigt, dass die aus THP-1-Zellen differenzierten M1-Makrophagen signifikant verschieden zu den ebenso aus THP-1-Zellen differenzierten M0-Makrophagen sind.

Zuvor konnten Richter et al. (2022) zeigen, dass mit LPS vorstimulierte monozytäre THP-1-Zellen und zu M1-Makrophagen differenzierte THP-1-Zellen nach Applikation von ATP IL-1β freisetzen (Richter et al., 2022). Deshalb stellen monozytäre THP-1-Zellen und zu M1-Makrophagen differenzierte THP-1-Zellen ein geeignetes ex vivo-Modell zur Untersuchung der Effekte der NO-Synthasen bzw. NO und Peroxynitrit auf die ATP-induzierte Reifung und Freisetzung von IL-1β dar. Untersuchungen an Zelllinien weisen jedoch ihre Grenzen auf. Monozytäre THP-1-Zellen und zu M1-Makrophagen differenzierte THP-1-Zellen weisen einen homogenen genetischen Hintergrund auf, was die Variabilität des Phänotyps minimiert und die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse erhöht. Dies erhöht jedoch auch die Wahrscheinlichkeit dafür, dass die erhaltenen Effekte möglicherweise genotypabhängig sind (Chanput et al., 2014; Qin, 2012). Ein weiterer Nachteil besteht darin, dass die THP-1-Zellen als Krebszellen Mutationen tragen und die Kultivierung der Zellen unter kontrollierten Bedingungen, außerhalb des natürlichen Umfelds, erfolgt. Dies kann unter anderem zu unterschiedlich starken Empfindlichkeiten und Antworten auf Stimuli führen (Chanput et al., 2014). Schildberger et al. (2013) konnten beispielsweise zeigen, dass primäre humane PBMCs auf eine Behandlung mit LPS mit einer stärkeren Zytokinexpression reagieren als monozytäre THP-1-Zellen (Schildberger et al., 2013). Diese Beobachtungen wurden in der vorliegenden Arbeit bestätigt. Da Zelllinien im Gegensatz zu primären Blutzellen menschlicher Spender

einfacher verfügbar sind und geringere ethische Probleme bestehen, stellen Zelllinien ein gutes Modell dar, um Hypothesen erstmals zu testen. Jedoch sollte die Zuverlässigkeit der Ergebnisse an Zelllinien kritisch gesehen und in weiteren Experimenten an primären Zellen bestätigt werden.

Aus dem Grund wurden Experimente an murinen PBMCs und murinen BMDMs durchgeführt. Seit der Entschlüsselung des Mausgenoms ist bekannt, dass 90% der Gene der Maus mit den Genen des Menschen übereinstimmen (Mouse Genome Sequencing Consortium, 2002). Ähnlich den humanen Monozyten zeigen auch murine Monozyten eine Einteilung in die 3 Subpopulationen: klassisch, intermediär und nicht-klassisch (Ziegler-Heitbrock et al., 2010). Murine BMDMs stellen eine effiziente und kostengünstige Möglichkeit zur Untersuchung der Makrophagenbiologie dar (Bailey et al., 2020). Copeland S. et al. (2005) konnten zeigen, dass die Induktion von Zytokinen durch Endotoxine in Mäusen und Menschen große Ähnlichkeiten aufweisen, wenn auch für die Induktion in Mäusen eine größere Konzentration an Endotoxinen notwendig sind (Copeland et al., 2005). Takao K. und Miyakawa T. (2015) konnten zeigen, dass durch Endotoxine induzierte Veränderungen der Genexpression in Mäusen menschlichen Entzündungsreaktionen stark ähneln (Takao und Miyakawa, 2015). Ein weiterer Vorteil der Experimente an Mäusen ist, dass sie leicht genetisch veränderbar sind, sodass Experimente an diesen genedefizienten Tieren durchgeführt werden können. Aus dem Grund sind Mäuse die am häufigsten verwendeten Tiere in der biomedizischen Forschung (Italiani und Boraschi, 2014). Außerdem geht aus früheren Studien hervor, dass die cholinerge Kontrolle der IL-1β-Freisetzung in murinen PBMCs und murinen BMDMs der von humanen mononukleären Leukozyten ähnelt (Richter et al., 2022; Zakrzewicz et al., 2017).

Jedoch weisen Experimente an murinen Zellen ebenfalls ihre Grenzen auf. Die Mäuse werden außerhalb ihres natürlichen Lebensraums nach den Richtlinien des „National Institute of Health“ (NIH) in Übereinstimmung mit dem „Guide for the Care and Use of Laboratory Animals“ gehalten (siehe Kapitel 2.5.3.1), wodurch sie im Gegensatz zum Menschen weitgehend vor Infektionen geschützt sind. Ein wesentlicher und beachtlicher Nachteil ist zudem das Töten der Tiere für die Experimente. Außerdem sollte trotz der genetischen Übereinstimmungen die Übertragbarkeit der Effekte auf den Menschen immer in Frage gestellt werden. Man sollte sich stets im Klaren sein, dass Makrophagen in vivo eine Vielzahl verschiedener Differenzierungszustände annehmen können und die in vitro

zu M1-artigen Makrophagen differenzierten THP-1-Zellen und murine BMDMs nur einen möglichen Zustand widerspiegeln (Murray et al., 2014).

Um die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse im Menschen zu prüfen, wurden Experimente an primären humanen PBMCs durchgeführt. In dieser Arbeit wurde zur Negativselektion von Monozyten aus dem menschlichen Blut der RosetteSep™ Human Monocyte Enrichment Cocktail verwendet. Laut Herstellerangaben beträgt der Anteil an Monozyten nach der Negativselektion 72-85% des Zellgemisches (Stemcell Technologies, Köln, Deutschland).

Anhand durchflusszytometrischer Analysen kann die Reinheit von isolierten Monozyten bestätigt werden. Durch die Verwendung des RosetteSep™ Human Monocyte Enrichment Cocktails konnten Mueller YM. et al. (2001) einen Anteil von $CD14^+$-Monozyten von mehr als 85% durch durchflusszytometrische Analysen nachweisen (Mueller et al., 2001). In dieser Arbeit ergaben durchflusszytometrische Analysen einen Anteil von 80,2% an Monozyten. Basierend auf dem Zelloberflächenmarker CD45 und der SSC-A konnten 99,2% der gewonnenen Zellen als mononukleäre Immunzellen identifiziert werden. Anhand der Zelloberflächenmarker CD14 und CD16 und der daraus resultierenden Form in der Gating-Abbildung konnte gezeigt werden, dass 80,73% der Zellen Monozyten sind. Die Zelloberflächenmarker CD16, CD14 und HLA-DR wurden verwendet, um die kontaminierenden $CD16^+$ und HLA-DR^- NK-Zellen und die stark HLA-DR- und schwach CD14-exprimierenden B-Zellen im Zellgemisch nachzuweisen (Unuvar Purcu et al., 2022). Beide Zellpopulationen machten jeweils etwa 24% aus. Die leichte Diskrepanz zu der oben genannten Reinheit der Monozyten von etwa 81% ist dadurch zu erklären, dass einige Monozyten bezüglich der Expression von CD16, CD14 und HLA-DR NK-Zellen oder B-Zellen ähneln können.

Damit konnten wir nachweisen, dass das untersuchte Zellgemisch hauptsächlich aus Monozyten bestand. Eine Beimengung von weiteren Leukozyten wurde jedoch nachgewiesen. Dennoch stellen die per Negativselektion angereicherten humanen Monozyten eine gute Alternative dar, um den Effekt der NO-Synthasen und der Substrate NO und/oder Peroxynitrit auf die cholinerge Kontrolle der IL-1β-Freisetzung zu untersuchen. Meyer et al. (2020) konnten bereits zeigen, dass nAChR-Agonisten die ATP-abhängige IL-1β-Sekretion in Monozyten, die durch Negativselektion per RosetteSep™ Human Monocyte Enrichment Cocktail angereichert wurden, hemmen (Meyer et al., 2020).

4.1.2 Zellvitalität

Ein etabliertes und häufig verwendetes Verfahren zur Abschätzung der Zellvitalität in Zellkulturexperimenten ist die Messung der LDH-Aktivität (Legrand et al., 1992). Die Schädigung von Zellen kann mit dem Verlust der Integrität der Zellmembran und dem Austreten von Zytoplasma verbunden sein. LDH ist ein zytoplasmatisches Enzym, das in allen eukaryontischen Zellen vorkommt und aufgrund seiner langen Halbwertszeit ein geeignetes Protein zur Abschätzung der Zellvitalität darstellt (Freyer und Harms, 2017; Legrand et al., 1992).

Die Information über die Zellvitalität in den Zellkulturexperimenten in dieser Arbeit ist entscheidend, zumal durch den Zelltod neben der LDH auch zytosolisches Pro-IL-1β und IL-1β in den Zellkulturüberstand gelangen können, die zu falsch hohen Messwerten führen können. Extrazelluläres ATP führt über die Bindung an den P2X7R zur Assemblierung und Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms, das wiederum die Caspase-1 aktiviert. Neben der Spaltung von Pro-IL-1β zu IL-1β, ist Caspase-1 in der Lage, Gasdermin-D zu aktivieren, das im Rahmen der Pyroptose Poren in der Zellmembran mit einer Größe von 20 nm bildet, die den Durchtritt von LDH, aber auch von Pro-IL-1β und IL-1β ermöglichen können (Broz und Dixit, 2016; Devant und Kagan, 2023; Evavold et al., 2018; Sborgi et al., 2016). Die Pyroptose ist eine Form des programmierten pro-inflammatorischen Zelltodes und wird klassischerweise als Abwehrmechanismus von intrazellulär infizierten mononukleären Phagozyten angesehen. Im Vergleich zur Apoptose tritt bei der Pyroptose intrazelluäres Material aus der perforierten Zelle aus und fördert Entzündungsprozesse im umliegenden Gewebe (Den Hartigh und Fink, 2018; Martinon et al., 2009). Ähnliches gilt für das Exotoxin Nigericin, das ebenfalls Zelltod auslösen kann (Den Hartigh und Fink, 2018; Greaney et al., 2015; Martinon et al., 2009).

Es ist ebenso wichtig zu überprüfen, ob die eingesetzten Substanzen zytotoxisch auf die mononukleären Phagozyten wirken, um Fehlinterpretationen der Ergebnisse auszuschließen. Zu diesem Zweck wurde in jedem Versuchsansatz die LDH-Aktivität im zellfreien Überstand gemessen und in Relation zur LDH-Aktivität aus lysierten unbehandelten mononukleären Phagozyten gesetzt und in Prozent angegeben.

In den Zellkulturüberständen unbehandelter monozytärer THP-1-Zellen, muriner PBMCs und humaner Monozyten wurden LDH-Aktivitätswerte im Mittel unter 10% gemessen. Allein unbehandelte murine BMDMs zeigten eine LDH-Aktivität im Mittel von 14,9%. Für die Differenzierung der murinen BMDMs sind unter anderem Behandlungen der

Zellen mit RBC-lysis Puffer, M-CSF und IFN-γ notwendig (siehe Kapitel 2.5.3.3), die einen zellschädigenden Effekt haben können. Aber auch die zahlreichen Zentrifugationsschritte stellen potentiell zellschädigende Prozesse dar, die den erhöhten LDH-Aktivitätswert in den Zellkulturüberständen der murinen BMDMs erklären können.
Die Stimulierung der mononukleären Phagozyten mit LPS und ATP oder BzATP führte zu einem moderaten Anstieg der gemessenen LDH-Aktivität im Zellkulturüberstand aller Zellen. Ähnliche Beobachtungen wurden von Backhaus S. et al. (2017) und Meyer et al. (2020) beschrieben, die Experimente an mononukleären U937-Zellen und humanen PBMCs durchführten (Backhaus et al., 2017; Meyer et al., 2020). Diese moderate Abnahme der Zellvitalität kann auf eine direkte Zytotoxizität der eingesetzten Substanzen hindeuten oder auf eine beginnende Pyroptose, die über die Bildung von Poren in der Zellmembran den Durchtritt von LDH ermöglicht (Sborgi et al., 2016).
In Gegenwart der nAChR-Agonisten ACh, CRP, Nic oder PC zeigten die mit LPS und ATP oder BzATP stimulierten Zellen keine Veränderungen der LDH-Aktivität im Zellkulturüberstand im Vergleich zu der alleinigen Stimulation der Zellen mit LPS und ATP oder BzATP. Auch die NO-Inhibitoren L-NAME und L-NIO, sowie die NO- und Peroxynitrit-Donoren SNAP und SIN- 1 führten zu keiner Veränderung der LDH-Aktivität im Zellkulturüberstand, was eine Zytotoxizität dieser Substanzen ausschließen ließ.
Die Behandlung der monozytären THP-1-Zellen, murinen BMDMs und humanen Monozyten mit dem porenbildenden Toxin Nigericin führte zu unterschiedlichen LDH-Aktivitäten. Bei den monozytären THP-1-Zellen lag die LDH-Aktivität im Zellkulturmedium im Mittel bei 19,7%, während sie bei murinen BMDMs bei 1,2% lag. Eine Behandlung der mononukleären Phagozyten mit LPS und der NO- und Peroxynitrit-Donoren SNAP und SIN-1 führte zu unterschiedlich starken Anstiegen der LDH-Aktivität. Diese Effekte könnten auf einen durch Nigericin induzierten Zelltod zurückgeführt werden. Aus dem Grund sollten die Effekte der NO- und Peroxynitrit-Donoren auf die ATP-unabhängige Freisetzung von IL-1β in diesen Versuchsansätzen kritisch bewertet werden.

4.2 Nikotinische Acetylcholin-Rezeptor-Agonisten aktivieren die endotheliale NO-Synthase

Zunächst wurde untersucht, ob eine der 3 NOS-Isoformen eNOS, iNOS oder nNOS an der Inhibierung der ATP-abhängigen Freisetzung von IL-1β via nAChRs beteiligt sind. Dazu wurden die generellen NOS-Inhibitoren L-NAME und L-NIO verwendet (Moore und Handy, 1997; Pfeiffer et al., 1996; Rees et al., 1990). Sowohl L-NAME, als auch L-NIO hoben die hemmende Wirkung der nAChR-Agonisten Nic, PC und CRP auf die ATP-induzierte Freisetzung von IL-1β auf. Das galt sowohl für monozytäre THP-1-Zellen, als auch für die aus THP-1-Zellen differenzierten M1-Makrophagen. Die Behandlung der mit LPS und BzATP stimulierten Zellen mit L-NAME und L-NIO in Abwesenheit der nAChR-Agonisten zeigte keine signifikanten Änderungen der IL-1β-Konzentration in den Zellkulturüberständen.

Diese Ergebnisse deuten darauf, dass eine der 3 NOS-Isoformen an der nAChR-vermittelten Inhibierung des ATP-sensitiven P2X7R beteiligt ist. Allerdings können anhand dieser Daten keine sicheren Rückschlüsse gezogen werden, welche Isoform der NOS an der Signaltransduktion der monozytären nAChRs involviert ist.

Bisher veröffentlichte Daten unterstützen die Ergebnisse, dass die nAChRs zu einer Aktivierung einer der 3 NOS-Isoformen führen. In Neuronen des Spinalganglions von Ratten konnte gezeigt werden, dass eine Aktivierung der homopentameren α7-nAChRs zu einer Aktivierung von insbesondere eNOS, aber auch von nNOS und iNOS führt (Haberberger et al., 2003; Papadopolou et al., 2004). Ebenso konnte im Hippocampus von Ratten ein Beziehung zwischen der α7-Untereinheit von nAChRs und NOS nachgewiesen werden (Adams et al., 2000).

Als nächstes wurde von unserer Arbeitsgruppe der Versuch unternommen, die durch nAChRs aktivierten NOS-Isoformen in mononukleären Phagozyten zu identifizieren. Eine Beteiligung von iNOS wurde als unwahrscheinlich eingeschätzt. Die iNOS wird auf der Ebene der Expression reguliert, wobei transkriptionelle, posttranskriptionelle und translationale Mechanismen beteiligt sind (Kleinert et al., 2004). Ihre Expression wird unter anderem durch Zytokine wie IL-1β und TNF-α oder bakterielle Bestandteile wie LPS induziert (Beck et al., 1999; Förstermann und Sessa, 2012). Damit verbunden ist eine Verzögerung von 6-8 Stunden von der Induktion der Expression der iNOS bis zur NO-Produktion. Sobald sie allerdings induziert ist, kann die iNOS stunden- bis tagelang aktiv sein und eine um den Faktor 10^3 höhere Menge an NO bilden im Vergleich zu den beiden

konstitutiv aktiven NOS-Isoformen nNOS und eNOS (Beck et al., 1999; Fernando et al., 2019). Deshalb wurde eine schnelle iNOS-abhängige Inhibierung des ATP-sensitiven P2X7R als unwahrscheinlich eingeschätzt.

Daher untersuchte unsere Arbeitsgruppe unabhängig von der vorliegenden Arbeit eine mögliche Beteiligung der NOS-Isoformen eNOS und/oder nNOS an der Inhibierung der nAChRs auf den ATP-sensitiven P2X7R. In RT-PCR (Reverse Transkriptase-Polymerase Kettenreaktion)-Analysen konnte eNOS-mRNA in LPS-stimulierten monozytären U937-Zellen nachgewiesen werden, wenn auch in kleinen Mengen, während nNOS-mRNA nicht sicher nachweisbar war (Richter et al., 2023). Dieses Ergebnis ließ uns die Hypothese aufstellen, dass eNOS am ehesten an der Inhibierung der ionotropen Funktion des P2X7R beteiligt ist.

Um diese Hypothese zu bestätigen, wurden zwei unabhängige Versuche durchgeführt. Im ersten Versuch wurden murine PBMCs aus eNOS-genedefizienten Mäusen (C57BL/6.129/Ola-eNOS™; Gödecke et al., 1998) und Wildtyp-Mäusen untersucht. Die Zellen wurden mit LPS vorstimuliert und für 30 min mit BzATP in An- oder Abwesenheit der nAChR-Agonisten ACh, Cho, Nic und PC behandelt. Eine Behandlung der PBMCs mit LPS und BzATP führte sowohl in eNOS-gendefizienten Mäusen, als auch in Wildtyp-Mäusen zur Bildung und Freisetzung von IL-1β. In Gegenwart der nAChR-Agonisten konnte eine signifikante Inhibierung der IL-1β-Freisetzung durch PBMCs von Wildtyp-Mäusen beobachtet werden. Im Gegensatz dazu wurde keine Inhibierung der IL-1β-Freisetzung in eNOS-gendefizienten PBMCs beobachtet, die eine Behandlung mit den nAChR-Agonisten erhielten (Richter et al., 2023). Obwohl die Aussagekraft von Experimenten an gentechnisch veränderter Tieren fraglich ist, zumal oft beobachtet wurde, dass ein Gendefekt durch andere Gene kompensiert werden kann, war die fehlende cholinerge Inhibierung in eNOS-gendefizienten PBMCs auf die IL-1β-Freisetzung dennoch bemerkenswert.

Um die Beteiligung von eNOS an der cholinergen Kontrolle der ATP-abhängigen IL-1β-Freisetzung nachzuweisen, wurden small interfering ribonucleic acid (siRNA)-Experimente an monozytären U937-Zellen durchgeführt. Die Zellen erhielten eine Transfektion mit siRNA, die auf das eNOS-Gen abzielt, oder Kontroll-siRNA. 48 Stunden nach Transfektion wurden RT-PCR-Analysen durchgeführt. Es konnte bestätigt werden, dass die mRNA-Expression von eNOS in Zellen, die mit genspezifischer siRNA behandelt wurden, signifikant herunter reguliert war. Die Zellen wurden zunächst für 5 Stunden mit LPS vorstimuliert und anschließend für 30 min mit BzATP behandelt in An- oder

Abwesenheit der nAChR-Agonisten CRP, Nic oder PC. Monozytäre U937-Zellen, die eine Transfektion mit der eNOS-siRNA erhielten, zeigten eine leichte Abschwächung der IL-1β-Freisetzung in Gegenwart der nAChR-Agonisten. Hingegen zeigten die monozytären U937-Zellen, die mit der Kontroll-siRNA behandelt wurden, eine signifikante Inhibierung der IL-1β-Freisetzung in Gegenwart der nAChR-Agonisten (Richter et al., 2023). Es ist bekannt, dass exogen zugeführte siRNA-Moleküle durch Interaktion mit PRRs zu einer Aktivierung des angeborenen Immunsystems führen können (Whitehead et al., 2011). Ebenso ist fraglich, ob neben dem Target-Gen weitere Gene durch die zugeführten siRNA-Moleküle herunter reguliert oder sogar induziert werden (Chen und Zhaori, 2011). Allerdings reagierten Zellen, die mit Kontroll-siRNA behandelt wurden, mit ähnlichen Ergebnissen wie nicht transfizierte Zellen, was einen Teil der Bedenken widerlegt. Damit konnte anhand von 2 unahängigen Versuchsansätzen die Hypothese bestätigt werden, dass eNOS an der inhibierenden Wirkung aktivierter nAChRs auf die ionotrope Funktion des P2X7R maßgeblich beteiligt ist.

Richter et al. (2023) konnten zeigen, dass in monozytären U937-Zellen neben den generellen NOS-Inhibitoren L-NAME und L-NIO auch der iNOS-Inhibitor 1400W (Garvey et al., 1997) und der nNOS-Inhibitor N-PLA (Zhang et al., 1997) dosisabhängig die durch nAChR-Agonisten induzierte Hemmung auf die IL-1β-Freisetzung aufheben (Richter et al., 2023). Aus den oben genannten Gründen wurden die Wirkungen dieser beiden NOS-Inhibitoren nicht in weiteren Versuchsansätzen untersucht. Jedoch sind weitere Experimente notwendig, um die Beteiligung der beiden NOS-Isoformen iNOS und/oder nNOS an der Inhibierung der ATP-induzierten Freisetzung von IL-1β via dem P2X7R sicher ausschließen zu können.

4.3 NO und Peroxynitrit inhibieren die ATP-abhängige Interleukin-1β-Freisetzung

Als nächstes wurde der Einfluss von NO und Peroxynitrit auf die ATP-induzierte Freisetzung von IL-1β untersucht. Wie bereits in Kapitel 1.2.1 dargelegt, katalysieren alle 3 NOS-Isoformen die Umwandlung von L-Arginin in NO und L-Citrullin (Boucher et al., 1999). NO ist ein sehr reaktives Molekül und hat eine biologische Halbwertszeit von weniger als einer Sekunde (Fernando et al., 2019). In Gegenwart von ROS, die von aktivierten mononukleären Phagozyten über verschiedene Wege gebildet werden können, kann NO zu Peroxynitrit reagieren, einem weiteren sehr reaktiven Molekül (Andrew, 1999; Canton et al., 2021; Fernando et al., 2019).

Es wurden Experimente unter Verwendung der NO- und Peroxynitrit-Donoren SNAP und SIN-1 (Dasgupta et al., 2018) an monozytären THP-1-Zellen, aus THP-1-Zellen differenzierten M1-Makrophagen, murinen PBMCs, murinen BMDMs und angereicherten humanen Monozyten durchgeführt. An monozytären THP-1-Zellen führte SNAP zu einer signifikanten Hemmung der BzATP-induzierten Freisetzung von IL-1β. Auch SIN-1 führte sowohl bei gleichzeitiger Behandlung der Zellen mit BzATP, als auch bei 30-minütiger, 20-minütiger und 10-minütiger Vorinkubation der Zellen vor der Zugabe von BzATP zu einer signifikanten Inhibierung der IL-1β-Freisetzung. An zu M1-Makrophagen differenzierten THP-1-Zellen führten SNAP und SIN-1 zu jedem Zeitpunkt der Behandlung der Zellen zu einer kompletten Hemmung der IL-1β-Freisetzung. Murine PBMCs, die mit SIN-1 behandelt wurden, zeigten ebenfalls eine signifikante Reduzierung der IL-1β-Freisetzung, sowohl bei gleichzeitiger Behandlung der Zellen mit ATP und SIN-1, als auch bei 30-minütiger Vorinkubation der Zellen vor der Zugabe von ATP. SNAP führte an murinen BMDMs zu einer kompletten Inhibierung der IL-1β-Freisetzung. SIN-1 hingegen zeigte bei 30-minütiger Vorinkubation der murinen BMDMs vor der Stimulierung mit ATP eine komplette Hemmung der IL-1β-Freisetzung, während die gleichzeitige Behandlung der Zellen mit ATP zu einer signifikanten Reduzierung der IL-1β-Werte führte. An humanen angereicherten Monozyten wurde eine signifikante Reduzierung der ATP-induzierten IL-1β-Freisetzung durch die Behandlung mit SNAP oder SIN-1 beobachtet, sowohl bei gleichzeitiger Behandlung der Zellen mit SNAP oder SIN-1 und ATP, als auch bei 30-minütiger Vorinkubation der Zellen mit SNAP oder SIN-1 vor der Zugabe mit ATP.

Diese Ergebnisse zeigen, dass NO und Peroxynitrit abhängig vom untersuchten Zelltyp die ATP-induzierte Freisetzung von IL-1β via dem P2X7R vollständig hemmen oder signifikant abschwächen können. Die unterschiedlich starke Inhibierung der IL-1β-Freisetzung abhängig vom Zeitpunkt der Zugabe von SIN-1 könnte zum Beispiel mit einer differentiellen Permeabilität der Zellmembran für diese Substanz erklärt werden.

Im weiteren Verlauf der Studie wurde untersucht, ob die Reduzierung der IL-1β-Freisetzung mononukleärer Phagozyten durch die NO- und Peroxynitrit-Donoren SNAP und SIN-1 auf eine Inhibition ATP-Rezeptor-unabhängiger Faktoren zurückzuführen ist. Dazu wurden Experimente mit dem ATP-unabhängigen NLRP3-Inflammasom-Aktivator Nigericin durchgeführt. Nigericin führt über die Bildung von Poren in der Zellmembran zum Ausstrom von K^+-Ionen und aktiviert über eine Senkung der intrazellulären K^+-Konzentration das NLRP3-Inflammasoms. Über die von Nigericin gebildeten Poren in der Zellmembran könnte zusätzlich der Ausstrom von ATP in den Extrazellularraum ermöglicht werden. Auch die durch Gasdermin-D gebildeten Poren in der Zellmembran können den Ausstrom von ATP ermöglichen. Durch Pyroptose gestorbene Zellen stellen ebenfalls eine Quelle für ATP im Zellkulturüberstand dar. Aus dem Grund wurden die Zellen zusätzlich zu Nigericin mit Apyrase behandelt, einem ATP-abbauenden Enzym, um mögliche Effekte von endogenem ATP in diesen Experimenten auszuschließen.

Mit LPS vorstimulierte monozytäre THP-1-Zellen, murine BMDMs und humane angereicherte Monozyten wurden mit Apyrase in An- und Abwesenheit von SNAP oder SIN-1 mit Nigericin behandelt. An monozytären THP-1-Zellen führte Nigericin in Gegenwart des NO-Donors SNAP zu einer signifikanten Reduzierung der ATP-unabhängigen Freisetzung von IL-1β. Auch der Peroxynitrit-Donor SIN-1 führte bei 30-minütiger, 20-minütiger und 10-minütiger Vorinkubation der Zellen vor Zugabe von Nigericin zu einer signifikanten Reduzierung der IL-1β-Freisetzung. Wurden die monozytären THP-1-Zellen allerdings gleichzeitig mit Nigericin und SIN-1 behandelt, wurde eine signifikante Steigerung der ATP-unabhängigen IL-1β-Freisetzung beobachtet. Der Einsatz von SNAP bewirkte in Gegenwart von Nigericin an murinen BMDMs und humanen Monozyten zu einer signifikanten Reduzierung der Nigericin-abhängigen Freisetzung von IL-1β. SIN-1 führte bei 30-minütiger Vorinkubation der murinen BMDMs und humanen Monozyten vor der Behandlung der Zellen mit Nigericin zu einer signifikanten Reduzierung der Nigericin-abhängigen Freisetzung von IL-1β, während bei zeitgleichem Einsatz von SIN-1 und Nigericin keine signifikante Hemmung der IL-1β-

Freisetzung beobachtet werden konnte, sondern eine Steigerung der ATP-unabhängigen Freisetzung von IL-1β.

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass SNAP und SIN-1 nicht ausschließlich auf den P2X7R wirken. Hernandez-Cuellar E. et al. (2012), Mishra B.B. et al. (2013) und Mao et al. (2013) konnten zuvor zeigen, dass das über die iNOS produziertes NO zu einer S-Nitrosylierung von NLRP3 führt und damit die Assemblierung des NLRP3-Inflammasoms hemmt (Hernandez-Cuellar et al., 2012; Mao et al., 2013; Mishra et al., 2013). Dieser Mechanismus könnte die beobachteten Effekte von SNAP und SIN-1 auf die Nigericin-induzierte IL-1β-Freisetzung erklären. Unsere Studie zeigte jedoch, dass NO und Peroxynitrit die ATP-abhängige IL-1β-Freisetzung deutlich stärker hemmt, als die Nigericin-induzierte IL-1β-Freisetzung. Diese Ergebnisse legen nahe, dass NO und Peroxynitrit die Funktion des P2X7R beeinträchtigen können.

Derzeit sind 2 verschiedene Signaltransduktionsmechanismen bekannt, die durch NO induziert werden können (siehe Kapitel 1.2.2). Die nicht-klassische Signalübertragung beinhaltet die posttranslationale S-Nitrosylierung an Cysteinresten von Proteinen durch NO, die die Funktion mancher Proteine modulieren kann (Fernando V. et al. 2019). Es ist ebenso bekannt, dass Peroxynitrit über eine Nitrierung von Tyrosin die Struktur und/oder Funktion von Proteinen beeinträchtigen kann (Gunaydin und Houk, 2009). Solche Modifikationen könnten auch bei dem hier untersuchten Mechanismus der Inhibition der P2X7R-Funktion eine Rolle spielen.

Unsere Arbeitsgruppe testete deswegen im Anschluss dieser Studie die direkte Wirkung von SIN-1 auf die ionotrope Funktion des P2X7R. Zum einen wurden two electrode voltage-clamp (TEVC)-Messungen an Xenopus laevis-Oozyten durchgeführt, die den humanen P2X7R exprimieren. TEVC-Messungen an Xenopus laevis-Oozyten sind eine anerkannte Methode zur Untersuchung der ionotropen Funktion von P2X7Rs (Schmalzing und Markwardt, 2022; T. Pournara et al., 2020). Dazu wurden die Xenopus laevis-Oozyten in An- und Abwesenheit von SIN-1 mit BzATP stimuliert. BzATP löste wie erwartet wiederholbare Ionenströme aus. In Anwesenheit von SIN-1 wurden die BzATP-induzierten Ionenströme allerdings signifikant reduziert (Richter et al., 2023).

Zum anderen wurden human embryonic kidney (HEK)-Zellen, die den humanen P2X7R überexprimieren, in An- und Abwesenheit von SIN-1 mit BzATP behandelt. Auch diese Zellen sind ein etabliertes Modell zur Untersuchung der Funktionen von P2X7Rs (Di Virgilio et al., 2019). Zum einen wurden die intrazellulären Ca^{2+}-Konzentrationen visualisiert und zum anderen whole cell patch-clamp-Messungen durchgeführt. In

Kontrollexperimenten induzierte BzATP einen Anstieg der intrazellulären Ca^{2+}-Konzentration. Wurden die HEK-Zellen mit SIN-1 vorinkubiert und anschließend mit BzATP behandelt, konnten keine Veränderungen der Ca^{2+}-Konzentrationen gemessen werden. Whole cell patch-clamp-Messungen zeigten in Gegenwart von BzATP Ionenströme, die nach Zugabe von SIN-1 signifikant reduziert wurden (Richter et al., 2023). Diese Ergebnisse bestätigten unsere Hypothese, dass NO und/oder Peroxynitrit die ionotrope Funktion des P2X7R hemmen.

Schließlich wurde ebenfalls im Anschluss an diese Arbeit eine Aminosäure identifiziert, deren Modifikation durch NO oder Peroxynitrit vermutlich eine zantrale Rolle bei der cholinergen Kontrolle der P2X7R-Funktion spielt. Wie bereits in Kapitel 1.1.5 dargelegt, weist der P2X7R einen langen C-Terminus auf, der mögliche Stellen für kovalente Proteinmodifikation enthält (Costa-Junior et al., 2011). McCarthy et al. (2019) zeigten, dass der C-Terminus unter anderem eine Cystein-reiche Domäne enthält, die nach Palmitoylierung in der Zellmembran verankert wird und die eine Desensibilisierung des P2X7R verhindert (McCarthy et al., 2019). Um zu testen ob diese Domäne eine Rolle bei der Inhibition des P2X7R spielt, wurde der Cysteinrest in Position C377 zu Alanin mutiert und in HEK-Zellen exprimiert. Whole cell patch-clamp-Messungen wurden an diesen Zellen in An- und Abwesenheit von SIN-1 durchgeführt. Die Zellen reagierten in der oben beschriebenen Weise auf BzATP mit Ionenströmen, diese wurden in den mutierten Zellen jedoch nicht durch SIN-1 inhibiert (Richter et al., 2023).

Aus den Daten dieser Dissertation und denen, die im Anschluss in unserem Labor erhoben wurden, sind folgende Schlussfolgerungen möglich: Die Aktivierung der nAChRs führt zur Aktivierung der eNOS und zur Bildung von NO und/oder Peroxynitrit. Die Funktion des P2X7R wird vermutlich durch eine Nitrosylierung an Position C377 gehemmt. Damit findet keine ATP-abhängige Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms statt und damit auch keine ATP-abhängige Freisetzung von IL-1β durch mononukleäre Phagozyten.

4.4 Limitationen der Studie und Ausblick

Die Studie weist einige Einschränkungen auf. Im Zuge der Arbeit wurde nicht konkret darauf eingegangen, wie die eNOS durch die nAChRs in mononukleären Phagozyten aktiviert wird. In zukünftigen Studien sollte dieser Aspekt des Signaltransduktionsmechanimus näher untersucht werden. Ebenso konnte die Beteiligung der NOS-Isoformen iNOS und nNOS an der Inhibierung der ATP-induzierten Freisetzung von IL-1β via dem P2X7R nicht sicher ausgeschlossen werden. Experimente unserer Arbeitsgruppe an monozytären U937-Zellen haben gezeigt, dass N-PLA (nNOS-Inhibitor) und 1400W (iNOS-Inhibitor) ebenso den inhibitorischen Effekt der nAChR-Agonisten auf die ATP-induzierte Freisetzung von IL-1β aufheben (Richter et al., 2023). Aus Gründen, die in Kapitel 4.3 bereits genannt wurden, wurden keine weiteren Experimente mit iNOS und nNOS durchgeführt. Allerdings sind weitere Experimente notwendig, um die mögliche Beteiligung dieser NOS-Isoformen in dem untersuchten Signalweg zu klären. Ebenso sind weitere Experimente notwendig, um die durch die nAChRs generierte Proteinmodifikation an Stelle C377 des P2X7R in mononukleären Phagozyten direkt nachzuweisen. Die Art der Modifikation, die zu einer Inhibierung der ionotropen Funktion des P2X7R führt, konnte in unserer Studie ebenfalls nicht identifiziert werden. Weiterhin steht die Frage offen, ob neben C377 noch weitere Cysteinreste und/oder andere Aminosäuren des P2X7R ebenfalls modifiziert werden. Die S-Nitrosylierung durch NO könnte mit dem Biotin-switch-assay nachgewiesen werden (Jaffrey und Snyder, 2001). Für den Nachweis der Nitrierung durch Peroxynitrit stehen verschiedene Antikörper zur Verfügung.

5. Schlussfolgerung und Ausblick

In mononukleären Phagozyten sind zwei Gefahrensignale notwendig zur Bildung und Freisetzung von IL-1β. Das erste Gefahrensignal kann das Endotoxin LPS aus der Zellwand gramnegativer Bakterien sein. Dieses bindet an den TLR-4 und induziert über eine Signalkaskade, die unter anderem NF-κB beinhaltet, die Synthese von Pro-IL-1β. Ein mögliches zweites Gefahrensignal ist extrazelluläres ATP, das von aktivierten oder geschädigten Zellen freigesetzt wird. ATP bindet an den P2X7R und aktiviert dadurch dessen ionotrope Funktion. Über die Senkung der intrazellulären K^+-Konzentration wird die Assemblierung und Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms initiiert, welches nachfolgend die Caspase-1 aktiviert. Es kommt zur Spaltung von Pro-IL-1β in seine biologisch aktive Form IL-1β und zu dessen Freisetzung. Bekannt war, dass die Aktivierung der nAChRs durch klassische und unkonventionelle Agonisten zu einer Inhibierung der ionotropen Funktion des ATP-sensitiven P2X7R führt. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Stimulation der nAChRs eine Aktivierung von eNOS bewirkt. Es werden erste Beweise geliefert, dass die Produkte von NOS NO und Peroxynitrit die Funktion von P2X7Rs hemmen. Diese Ergebnisse sind von großem medizinischem Interesse, da diese Modifikation am P2X7R zu einer Verringerung der ATP-vermittelten Freisetzung von IL-1β in mononukleären Phagozyten führt.

Abbildung 13 stellt schematisch den in dieser Arbeit identifizierten Signaltransduktionsmechanismus dar.

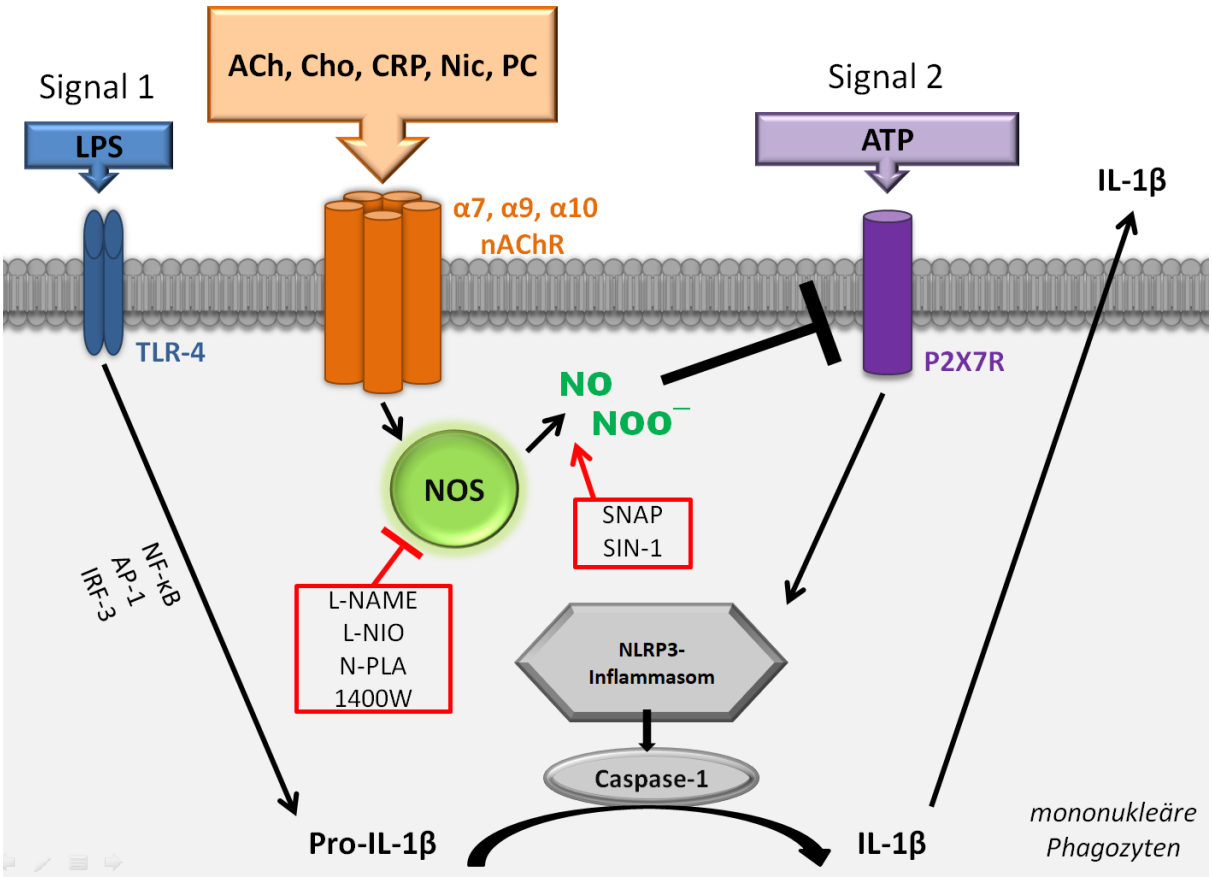

Abbildung 13: **Schematische Darstellung der metabotropen Hemmung des ATP-sensitiven P2X7R durch nAChRs in mononukleären Phagozyten.**
Es bedarf zweier Signale zur Bildung und Freisetzung von reifem IL-1β in Phagozyten. Das erste Gefahrensignal ist zum Beispiel das Endotoxin LPS aus der Zellwand gramnegativer Bakterien. Dieses bindet an den TLR-4 und führt unter anderem über NF-κB zur Bildung von Pro-IL-1β. Extrazelluläres ATP kann als zweites Gefahrensignal fungieren. Dieses initiiert über die Bindung an den P2X7R die Zusammensetzung des NLRP3-Inflammasoms und die Aktivierung der Caspase-1. Es kommt zur Spaltung von Pro-IL-1β in die biologisch aktive Form IL-1β und zu dessen Freisetzung. Verschiedene endogene Signale können nAChRs aktivieren, wie ACh, Cho, CRP, Nic und PC. Über einen metabotropen Signalweg, der die Aktivierung von NOS und Bildung von NO und NOO^- beinhaltet, inhibiert der nAChR die ionotrope Funktion des P2X7R und führt dadurch zu einer geringeren Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms und Bildung von IL-1β.
1400W: N-(3-(Aminomethyl)benzyl)Acetamidin; **ACh**: Acetylcholin; **AP-1**: Aktivatorprotein-1; **ATP**: Adenosin-5′-Triphosphat; **Cho**: Cholin; **CD14**: Cluster of differentiation 14; **CRP**: C-reaktives Protein; **IL-1β**: Interleukin-1β; **IRF-3**: Interferon-regulierender Faktor 3; **L-NAME**: Nω-Nitro-L-Arginin-Methylester-Hydrochlorid **L-NIO**: L-N5-(1-Iminoethyl)-Ornithin; **LPS**: Lipopolysaccharid; **MD-2**: Lymphozytenantigen 96; **nAChR**: nikotinischer Acetylcholinrezeptor; **NF-κB**: Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells; **Nic**: Nicotin; **NLRP3**: NACHT, LRR und PYD Region enthaltendes Protein 3; **NO**: Stickstoffmonoxid; **NOO^-**: Peroxynitrit; **NOS**: NO-Synthase; **N-PLA**: Nω-Propyl-L-Arginin-Hydrochlorid; **P2X7R**: Purinrezeptor 2X7; **PC**: Phosphocholin; **SIN-1**: 3-Morpholinosydnonimin; **SNAP**: S-Nitroso-N-Acetyl-DL-Penicillamin; **TLR-4**: Toll-like-Rezeptor 4

6. Zusammenfassung

6.1 Englisch

NO-synthases mediate the cholinergic control of the P2X7-receptor

Objective:

Monocytes and macrophages are important sources of the pro-inflammatory cytokine interleukin-1β (IL-1β), a potent pro-inflammatory cytokine involved in host defense against infections. However, high levels of this cytokine are also associated with life-threatening systemic inflammatory diseases such as fever, shock and organ damage. Therefore, mechanisms controlling IL-1β release are of substantial clinical interest. There are two main signals required for the production and release of IL-1β. In response to a first danger signal such as the endotoxin lipopolysaccharide (LPS), which interacts with the Toll-like receptor 4 (TLR-4), pro-IL-1β is synthesized. In mononuclear phagocytes extracellular ATP originating from activated cells or spilled cytoplasm of damaged cells triggers the ionotropic function of the P2RX7 receptor (P2X7R), resulting in NLRP3-inflammasome assembly, activation of caspase-1, cleavage of pro-IL-1β and release of bioactive IL-1β. Previously, our laboratory identified a cholinergic mechanism inhibiting the ATP-mediated release of IL-1β via nicotinic acetylcholine receptors (nAChRs) in mononuclear phagocytes. Classical and unconventional nAChR agonists trigger this mechanism. Here, the metabotropic cholinergic signaling pathway is investigated that leads to an inhibition of the ionotropic function of the ATP-sensitive P2X7R.

Methods:

Human monocytic THP-1 cells, THP-1 cell-derived M1-like macrophages, murine peripheral blood mononuclear leucocytes (PBMCs), murine bone marrow-derived macrophages (BMDMs) and human PBMCs were used. LPS-primed cells were stimulated with the P2X7R agonist BzATP or ATP in the presence of various nAChR agonists. To demonstrate an involvement of NO synthase (NOS) in the above-described pathway, cells were additionally treated with the NOS inhibitors L-NAME (Nω-nitro-L-arginine methyl ester) or L-NIO (N5-(1-iminoethyl)-L-ornithine). To investigate the effect of the NOS products NO and peroxynitrite on the ATP-mediated release of IL-1β, cells were treated with the NO donor SNAP (S-nitroso-N-acetylpenicillamine) and the peroxynitrite donor

SIN-1 (3-morpholino-sydnonimine). In addition, experiments with the pore-forming bacterial toxin nigericin were performed in the presence of NOS inhibitors, NO donor and peroxynitrite donor, to identify a possible effect on the ATP-independent effect on the IL-1β release. The IL-1β concentration was measured in cell culture supernatants via ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay).

Results:

The inhibitory effect of nAChR agonists on the ATP-mediated release of IL-1β was mimicked by the NO donor SNAP and the peroxynitrite donor SIN-1 and reversed by the NOS inhibitors L-NAME and L-NIO. In the presence of nigericin and the NO donor SNAP or peroxynitrite donor SIN-1, a reduction of the ATP-independent release of IL-1β was shown. However, the effect on the nigericin-induced IL-1β release was smaller compared to that mediated by ATP.

Conclusion:

The results of this study suggest that the metabotropic signaling of nAChRs that results in an inhibition of the P2X7R involves NOS and the products NO and/or peroxynitrite. This pathway is active in human and murine monocytes and macrophages and seems to be a promising therapeutic target for the treatment of inflammatory disorders.

6.2 Deutsch

NO-Synthasen vermitteln die cholinerge Kontrolle des P2X7-Rezeptors

Hintergrund:

Monozyten und Makrophagen sind wichtige Quellen des proinflammatorischen Zytokins Interleukin-1β (IL-1β), das an der Abwehr von Infektionen beteiligt ist. Hohe Konzentrationen dieses Zytokins werden jedoch auch mit lebensbedrohlichen systemischen Entzündungserkrankungen wie Fieber, Schock und Organschäden in Verbindung gebracht. Daher sind Mechanismen, die die IL-1β-Freisetzung kontrollieren, von erheblichem klinischem Interesse. Für die Produktion und Freisetzung von IL-1β sind zwei Hauptsignale erforderlich. Als Reaktion auf ein erstes Gefahrensignal, etwa das Endotoxin Lipopolysaccharid (LPS), das mit dem Toll-like-Rezeptor 4 (TLR-4) interagiert, wird Pro-IL-1β synthetisiert. In mononukleären Phagozyten löst extrazelluläres ATP, das aus aktivierten oder beschädigten Zellen ausgeschüttet wird, die ionotrope Funktion des P2X7-Rezeptors (P2X7R) aus, was zur Zusammensetzung des NLRP3-Inflammasoms, Aktivierung von Caspase-1, Spaltung von Pro-IL-1β in seine biologisch aktive Form IL-1β und schließlich zu seiner Freisetzung führt. Unsere Arbeitsgruppe hatte zuvor einen cholinergen Mechanismus identifiziert, der die ATP-vermittelte Freisetzung von IL-1β über nikotinische Acetylcholinrezeptoren (nAChRs) in mononukleären Phagozyten hemmt. Es wurden klassische und unkonventionelle nAChR-Agonisten identifiziert, die diese Hemmfunktion auslösen, ohne die ionotrope Funktion herkömmlicher nAChRs auszulösen. Hier untersuchten wir den Signalweg, der zur cholinergen Hemmung der ionotropen Funktion des ATP-sensitiven P2X7R führt.

Methoden:

Humane monozytäre THP-1-Zellen, aus THP-1-Zellen abgeleitete M1-ähnliche Makrophagen, murine mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (PBMCs), bone marrow-derived Makrophagen (BMDMs) und humane PBMCs wurden untersucht. Mit LPS stimulierte Zellen wurden mit dem P2X7R-Agonisten BzATP oder ATP in Gegenwart von verschiedenen nAChR-Agonisten behandelt. Um die Beteiligung einer NO-Synthase (NOS) in dem oben beschriebenen Signalweg zu untersuchen, wurden die Zellen zusätzlich mit den NOS-Inhibitoren L-NAME (Nω-Nitro-L-Arginin-Methylester-Hydrochlorid) und

L-NIO (L-N5-(1-Iminoethyl)-Ornithin) behandelt. Um den Effekt von NO und Peroxynitrit auf die ATP-induzierte Freisetzung von IL-1β zu untersuchen, wurde den Zellen der NO-Donor SNAP (S-Nitroso-N-Acetyl-DL-Penicillamin) oder der Peroxynitrit-Donor SIN-1 (3-Morpholinosydnonimin) zugegeben. Darüber hinaus wurden Experimente mit dem porenbildenden bakteriellen Toxin Nigericin in Gegenwart der NOS-Inhibitoren, NO- und Peroxynitrit-Donoren durchgeführt, um einen möglichen Effekt dieser Substanzen auf die ATP-unabhängige IL-1β-Freisetzung zu identifizieren. Die IL-1β-Konzentration wurde in Zellkulturüberständen mittels ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) ermittelt.

Ergebnisse:

Die hemmende Wirkung von nAChR-Agonisten auf die ATP-induzierte Freisetzung von IL-1β wurde durch die NO- und Peroxynitrit-Donoren SIN-1 und SNAP nachgeahmt und durch die NOS-Inhibitoren L-NAME und L-NIO aufgehoben. In Gegenwart von Nigericin und dem NO- bzw. Peroxynitrit-Donor SIN-1 und SNAP, konnte abhängig vom untersuchten Zelltyp ebenfalls eine Reduzierung der ATP-unabhängigen Freisetzung von IL-1β gezeigt werden. Der Effekt auf die Nigericin-induzierte IL-1β-Freisetzung war jedoch deutlich geringer als der Effekt auf die ATP-induzierte IL-1β-Freisetzung.

Schlussfolgerung:

Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten darauf hin, dass die Stimulation von nAChRs zur Aktivierung einer NOS führt und dass deren Produkte NO und/oder Peroxynitrit den ATP-sensitiven P2X7R inhibieren. Dieser Mechanismus lässt sich in humanen und murinen Monozyten und Makrophagen nachweisen und dürfte ein vielversprechendes therapeutisches Ziel für die zukünftige Behandlung entzündlicher Erkrankungen sein.

7. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung der Fragestellung dieser Arbeit. **19**

Abbildung 2: Versuchsaufbau. **26**

Abbildung 3: Die hemmende Wirkung der nikotinischen Rezeptor-Agonisten Nic, PC und CRP auf die BzATP-induzierte Freisetzung von IL-1β wird durch die Zugabe der NO-Synthase-Inhibitoren L-NAME und L-NIO in monozytären THP-1-Zellen aufgehoben. **37**

Abbildung 4: Durchflusszytometrische Analysen bestätigten, dass die aus THP-1-Zellen differenzierten Makrophagen die für M1-Makrophagen typischen Zelloberflächenmarker exprimieren. **39**

Abbildung 5: Die hemmende Wirkung der nikotinischen Rezeptor-Agonisten Nic und PC auf die BzATP-induzierte Freisetzung von IL-1β wird durch die Zugabe der NO-Synthase-Inhibitoren L-NAME und L-NIO in den zu M1-Makrophagen differenzierten THP-1-Zellen aufgehoben. **41**

Abbildung 6: Die BzATP-induzierte Freisetzung von IL-1β wird durch die NO- und Peroxynitrit-Donoren SNAP und SIN-1 in monozytären THP-1-Zellen gehemmt. **43**

Abbildung 7: Die Nigericin-induzierte Freisetzung von IL-1β in Gegenwart der NO- und Peroxynitrit-Donoren SNAP und SIN-1. **45**

Abbildung 8: Die BzATP-induzierte Freisetzung von IL-1β wird durch die NO- und Peroxynitrit-Donoren SNAP und SIN-1 in den zu M1-Makrophagen differenzierten THP-1-Zellen gehemmt. **47**

Abbildung 9: Die ATP-induzierte Freisetzung von IL-1β wird durch den Peroxynitrit-Donor SIN-1 in murinen mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMCs) gehemmt. **49**

Abbildung 10: Die ATP-induzierte Freisetzung von IL-1β wird durch die NO- und Peroxynitrit-Donoren SNAP und SIN-1 in murinen bone marrow-derived Makrophagen (BMDMs) gehemmt. **52**

Abbildung 11: Durchflusszytometrische Analyse zum Nachweis der Reinheit der mittels RosetteSep™-Technik gewonnenen humanen Monozyten aus der Blutprobe eines Probanden. **54**

Abbildung 12: Die BzATP-induzierte Freisetzung von IL-1β wird durch die NO- und Peroxynitrit-Donoren SNAP und SIN-1 in humanen Monozyten gehemmt.. **56**

Abbildung 13: Schematische Darstellung der metabotropen Hemmung des ATP-sensitiven P2X7R durch nAChRs in mononukleären Phagozyten....**76**

8. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Reagenzien **20**

Tabelle 2: Verbrauchsmaterialien **22**

Tabelle 3: Geräte **24**

Tabelle 4: Software **24**

Tabelle 5: Antikörper, die für durchflusszytometrische Analysen von Makrophagen aus THP-1-Zellen und mit RosetteSep™ gewonnenen menschlichen Monozyten verwendet wurden. **33**

Tabelle 6: Prozentueller Anteil toter Zellen bei Experimenten mit monozytären THP-1-Zellen; NO-Synthase-Inhibitoren. **57**

Tabelle 7: Prozentueller Anteil toter Zellen bei Experimenten mit monozytären THP-1-Zellen; SNAP und SIN-1. ..... **58**

Tabelle 8: Prozentueller Anteil toter Zellen bei Experimenten mit murinen mononukleären Zellen des peripheren Blutes (murine PBMCs); SIN-1. **58**

Tabelle 9: Prozentueller Anteil toter Zellen bei Experimenten mit murinen bone marrow-derived Makrophagen (BMDMs); SNAP und SIN-1. ..... **59**

Tabelle 10: Prozentueller Anteil toter Zellen bei Experimenten mit humanen Monozyten; SNAP und SIN-1. ..... **60**

9. Abkürzungsverzeichnis

ACh	Acetylcholin
AP-1	Aktivatorprotein-1
ASC	apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD
ATP	Adenosintriphosphat
BH_4	Tetrahydrobiopterin
BMDM	bone marrow-derived Makrophagen
BSA	bovines Serumalbumin
BzATP	2'(3')-O-(4-Benzoylbenzoyl)Adenosin-5'-Triphosphat
Ca^{2+}	Kalzium
CARD	Caspase Rekrutierungsdomäne
CD	cluster of differentiation
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
Cho	Cholin
CRP	C-reaktives Protein
DAMP	damage-associated molecular patterns
E.coli	Escheria coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
eNOS	endotheliale NO-Synthase
et al.	und andere
FCS	Fetales Kälberserum
GTP	Guanosintriphosphat
HEK	human embryonic kidney
HLA-DR	human leukocyte antigen, DR-Isotyp
IL-1β	Interleukin-1β
IL-1R1/ 2	Interleukin-1-Rezeptor-Typ1/ 2
INF-γ	Interferon-γ
iNOS	induzierbare NO-Synthase
IRF-3	Interferon-regulierender Faktor 3
K^+	Kalium
LBP	Lipopolysaccharid-bindendes Protein

LDH	Laktatdehydrogenase
L-NAME	Nω-nitro-L-Arginin-Methylesterhydrochlorid
L-NIO	L-N5-(1-Iminoethyl)-Ornithin
LPS	Lipopolysaccharid
LRR	leucin-rich repeat
M-CSF	macrophage colony-stimulating factor
MD-2	Lymphozytenantigen 96
mRNA	messenger ribonucleic acid
MyD88	myeloid differentiation primary response 88
Na^+	Natrium
nAChR	nikotinischer Acetylcholinrezeptor
NACHT	Akronym für NAIP (Neuronal apoptosis inhibitory protein), CIITA (MHC class II transcription activator), HET-E (Incompatibility locus protein from Podospora anserina) und TP1 (Telomerase-associated protein)
NF-κB	nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells
Nic	Nikotin
Nig	Nigericin
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	NO-Synthase
nNOS	neuronale NO-Synthase
NLR	NOD-like Rezeptor
NLRP3	NACHT, LRR und PYD Region enthaltendes Protein 3
P2X7R	P2X purinoceptor 7
PAMP	pathogen-associated molecular patterns
PBMC	mononukleäre Zellen des peripheren Blutes
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PC	Phosphocholin
PMA	Phorbol-12-Myristate 13-Acetat
PRR	pathogen-recognition receptor
PYD	pyrinhaltige Domäne
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies

RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerase Kettenreaktion
SIN-1	3-Morpholinosydnonimin
siRNA	small interfering ribonucleic acid
SIRS	systemic inflammatory response syndrome
SNAP	S-Nitroso -N-Acetyl-DL-Peniciliinamin
TEVC	two electrode voltage-clamp
TIR	Toll/Interleukin-1-Rezeptor
TLR-4	Toll-like-Rezeptor 4
TNF-α	Tumornekrosefaktor-α
TRIF	TIR-domain-containing adapter-inducing interferon-β
vD3	1α, 25-Dihydroxyvitamin

10. Literatur

Abbracchio, M. P., & Burnstock, G. (1994). Purinoceptors: Are there families of P2X and P2Y purinoceptors? *Pharmacology & Therapeutics*, *64*(3), 445–475. https://doi.org/10.1016/0163-7258(94)00048-4

Adams, C. E., Stevens, K. E., Kem, W. R., & Freedman, R. (2000). Inhibition of nitric oxide synthase prevents α7 nicotinic receptor-mediated restoration of inhibitory auditory gating in rat hippocampus. *Brain Research*, *877*(2), 235–244. https://doi.org/10.1016/S0006-8993(00)02677-9

Adinolfi, E., Giuliani, A. L., De Marchi, E., Pegoraro, A., Orioli, E., & Di Virgilio, F. (2018). The P2X7 receptor: A main player in inflammation. *Biochemical Pharmacology*, *151*, 234–244. https://doi.org/10.1016/j.bcp.2017.12.021

Alderton, W. K., Cooper, C. E., & Knowles, R. G. (2001). Nitric oxide synthases: Structure, function and inhibition. *Biochemical Journal*, *357*(3), 593–615. https://doi.org/10.1042/bj3570593

Althaus, M., Pichl, A., Clauss, W. G., Seeger, W., Fronius, M., & Morty, R. E. (2011). Nitric oxide inhibits highly selective sodium channels and the Na^+/K^+-ATPase in H441 cells. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, *44*(1), 53–65. https://doi.org/10.1165/2009-0335OC

Andrew, P. (1999a). Enzymatic function of nitric oxide synthases. *Cardiovascular Research*, *43*(3), 521–531. https://doi.org/10.1016/S0008-6363(99)00115-7

Andrew, P. (1999b). Enzymatic function of nitric oxide synthases. *Cardiovascular Research*, *43*(3), 521–531. https://doi.org/10.1016/S0008-6363(99)00115-7

Ara, J., Przedborski, S., Naini, A. B., Jackson-Lewis, V., Trifiletti, R. R., Horwitz, J., & Ischiropoulos, H. (1998). Inactivation of tyrosine hydroxylase by nitration following exposure to peroxynitrite and 1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine (MPTP). *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *95*(13), 7659–7663. https://doi.org/10.1073/pnas.95.13.7659

Arancibia, S. A., Beltrán, C. J., Aguirre, I. M., Silva, P., Peralta, A. L., Malinarich, F., & Hermoso, M. A. (2007). Toll-like receptors are key participants in innate immune responses. *Biological Research*, *40*(2). https://doi.org/10.4067/S0716-97602007000200001

Backhaus, S., Zakrzewicz, A., Richter, K., Damm, J., Wilker, S., Fuchs-Moll, G., Küllmar, M., Hecker, A., Manzini, I., Ruppert, C., McIntosh, J. M., Padberg, W., & Grau, V. (2017). Surfactant inhibits ATP-induced release of interleukin-1β via nicotinic acetylcholine receptors. *Journal of Lipid Research*, *58*(6), 1055–1066. https://doi.org/10.1194/jlr.M071506

Bailey, J. D., Shaw, A., McNeill, E., Nicol, T., Diotallevi, M., Chuaiphichai, S., Patel, J., Hale, A., Channon, K. M., & Crabtree, M. J. (2020). Isolation and culture of murine bone marrow-derived macrophages for nitric oxide and redox biology. *Nitric Oxide*, *100–101*, 17–29. https://doi.org/10.1016/j.niox.2020.04.005

Bean, B. P. (1992). Pharmacology and electrophysiology of ATP-activated ion channels. *Trends in Pharmacological Sciences*, *13*, 87–90. https://doi.org/10.1016/0165-6147(92)90032-2

Beck, K.-F., Eberhardt, W., Frank, S., Huwiler, A., Meßmer, U. K., Mühl, H., & Pfeilschifter, J. (1999). Inducible NO synthase: Role in cellular signalling. *Journal of Experimental Biology*, *202*(6), 645–653. https://doi.org/10.1242/jeb.202.6.645

Becker, C. E., & O'Neill, L. A. J. (2007). Inflammasomes in inflammatory disorders: The role of TLRs and their interactions with NLRs. *Seminars in Immunopathology*, *29*(3), 239–248. https://doi.org/10.1007/s00281-007-0081-4

Becker, D., Woltersdorf, R., Boldt, W., Schmitz, S., Braam, U., Schmalzing, G., & Markwardt, F. (2008). The P2X7 carboxyl tail is a regulatory module of P2X7 receptor channel activity. *Journal of Biological Chemistry*, *283*(37), 25725–25734. https://doi.org/10.1074/jbc.M803855200

Bianchi, M. E. (2007). DAMPs, PAMPs and alarmins: All we need to know about danger. *Journal of Leukocyte Biology*, *81*(1), 1–5. https://doi.org/10.1189/jlb.0306164

Blevins, H. M., Xu, Y., Biby, S., & Zhang, S. (2022). The NLRP3 inflammasome pathway: A review of mechanisms and inhibitors for the treatment of inflammatory diseases. *Frontiers in Aging Neuroscience*, *14*, 879021. https://doi.org/10.3389/fnagi.2022.879021

Boraschi, D., Italiani, P., Weil, S., & Martin, M. U. (2018). The family of the interleukin-1 receptors. *Immunological Reviews*, *281*(1), 197–232. https://doi.org/10.1111/imr.12606

Boucher, J. L., Moali, C., & Tenu, J. P. (1999). Nitric oxide biosynthesis, nitric oxide synthase inhibitors and arginase competition for L-arginine utilization. *Cellular and Molecular Life Sciences*, *55*(9), 1015. https://doi.org/10.1007/s000180050352

Bredt, D. S., Glatt, C. E., Hwang, P. M., Fotuhi, M., Dawson, T. M., & Snyder, S. H. (1991). Nitric oxide synthase protein and mRNA are discretely localized in neuronal populations of the mammalian CNS together with NADPH diaphorase. *Neuron*, *7*(4), 615–624. https://doi.org/10.1016/0896-6273(91)90374-9

Bredt, D. S., Hwang, P. M., & Snyder, S. H. (1990). Localization of nitric oxide synthase indicating a neural role for nitric oxide. *Nature*, *347*(6295), 768–770. https://doi.org/10.1038/347768a0

Broggi, A., & Granucci, F. (2015). Microbe- and danger-induced inflammation. *Molecular Immunology*, *63*(2), 127–133. https://doi.org/10.1016/j.molimm.2014.06.037

Broz, P., & Dixit, V. M. (2016). Inflammasomes: Mechanism of assembly, regulation and signalling. *Nature Reviews Immunology*, *16*(7), 407–420. https://doi.org/10.1038/nri.2016.58

Bruckdorfer, R. (2005). The basics about nitric oxide. *Molecular Aspects of Medicine*, *26*(1–2), 3–31. https://doi.org/10.1016/j.mam.2004.09.002

Burnstock, G. (1976). Purinergic receptors. *Journal of Theoretical Biology*, *62*(2), 491–503. https://doi.org/10.1016/0022-5193(76)90133-8

Canton, M., Sánchez-Rodríguez, R., Spera, I., Venegas, F. C., Favia, M., Viola, A., & Castegna, A. (2021). Reactive oxygen species in macrophages: Sources and targets. *Frontiers in Immunology*, *12*, 734229. https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.734229

Cekic, C., & Linden, J. (2016). Purinergic regulation of the immune system. *Nature Reviews Immunology*, *16*(3), 177–192. https://doi.org/10.1038/nri.2016.4

Chanput, W., Mes, J. J., & Wichers, H. J. (2014). THP-1 cell line: An in vitro cell model for immune modulation approach. *International Immunopharmacology*, *23*(1), 37–45. https://doi.org/10.1016/j.intimp.2014.08.002

Chanput, W., Mes, J., Vreeburg, R. A. M., Savelkoul, H. F. J., & Wichers, H. J. (2010). Transcription profiles of LPS-stimulated THP-1 monocytes and macrophages: A tool to study inflammation modulating effects of food-derived compounds. *Food & Function*, *1*(3), 254. https://doi.org/10.1039/c0fo00113a

Chen, S.-H., & Zhaori, G. (2011). Potential clinical applications of siRNA technique: Benefits and limitations. *European Journal of Clinical Investigation*, *41*(2), 221–232. https://doi.org/10.1111/j.1365-2362.2010.02400.x

Cheneval, D., Ramage, P., Kastelic, T., Szelestenyi, T., Niggli, H., Hemmig, R., Bachmann, M., & MacKenzie, A. (1998). Increased mature interleukin-1β (IL-1β) secretion from THP-1 cells induced by nigericin is a result of activation of p45 IL-1β-converting enzyme processing. *Journal of Biological Chemistry*, *273*(28), 17846–17851. https://doi.org/10.1074/jbc.273.28.17846

Copeland, S., Warren, H. S., Lowry, S. F., Calvano, S. E., & Remick, D. (2005). Acute inflammatory response to endotoxin in mice and humans. *Clinical and Vaccine Immunology*, *12*(1), 60–67. https://doi.org/10.1128/CDLI.12.1.60-67.2005

Costa-Junior, H. M., Sarmento Vieira, F., & Coutinho-Silva, R. (2011). C terminus of the P2X7 receptor: Treasure hunting. *Purinergic Signalling*, *7*(1), 7–19. https://doi.org/10.1007/s11302-011-9215-1

Cullen, S. P., Kearney, C. J., Clancy, D. M., & Martin, S. J. (2015). Diverse activators of the NLRP3 inflammasome promote IL-1β secretion by triggering necrosis. *Cell Reports*, *11*(10), 1535–1548. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.05.003

Daff, S. (2010). NO synthase: Structures and mechanisms. *Nitric Oxide*, *23*(1), 1–11. https://doi.org/10.1016/j.niox.2010.03.001

Daigneault, M., Preston, J. A., Marriott, H. M., Whyte, M. K. B., & Dockrell, D. H. (2010). The identification of markers of macrophage differentiation in PMA-stimulated THP-1 cells and monocyte-derived macrophages. *PLoS ONE*, *5*(1), e8668. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0008668

Dasgupta, S., Gomez, J.-J., Singh, I., & Khan, M. (2018). S-Nitrosylation in regulation of inflammation and cell damage. *Current Drug Targets*, *19*(15), 1831–1838. https://doi.org/10.2174/1389450119666180213094747

Den Hartigh, A. B., & Fink, S. L. (2018). Pyroptosis induction and detection. *Current Protocols in Immunology*, *122*(1), e52. https://doi.org/10.1002/cpim.52

Devant, P., & Kagan, J. C. (2023). Molecular mechanisms of gasdermin D pore-forming activity. *Nature Immunology*, *24*(7), 1064–1075. https://doi.org/10.1038/s41590-023-01526-w

Di Virgilio, F., Dal Ben, D., Sarti, A. C., Giuliani, A. L., & Falzoni, S. (2017). The P2X7 receptor in infection and inflammation. *Immunity*, *47*(1), 15–31. https://doi.org/10.1016/j.immuni.2017.06.020

Di Virgilio, F., Jiang, L.-H., Roger, S., Falzoni, S., Sarti, A. C., Vultaggio-Poma, V., Chiozzi, P., & Adinolfi, E. (2019). Structure, function and techniques of investigation of the P2X7 receptor (P2X7R) in mammalian cells. In *Methods in Enzymology* (Bd. 629, S. 115–150). Elsevier. https://doi.org/10.1016/bs.mie.2019.07.043

Dinarello, C. A. (1998). Interleukin-1β, interleukin-18, and the interleukin-1β converting enzyme. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *856*(1), 1–11. https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1998.tb08307.x

Dinarello, C. A. (2005). Interleukin-1β. *Critical Care Medicine*, *33*(Suppl), S460–S462. https://doi.org/10.1097/01.CCM.0000185500.11080.91

Dinarello, C. A. (2009). Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family. *Annual Review of Immunology*, *27*(1), 519–550. https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.021908.132612

Dinarello, C. A. (2011). Interleukin-1 in the pathogenesis and treatment of inflammatory diseases. *Blood*, *117*(14), 3720–3732. https://doi.org/10.1182/blood-2010-07-273417

Dinarello, C. A., Goldin, N. P., & Wolff, S. M. (1974). Demonstration and characterization of two distinct human leukocytic pyrogens. *The Journal of Experimental Medicine*, *139*(6), 1369–1381. https://doi.org/10.1084/jem.139.6.1369

Dostert, C., Pétrilli, V., Van Bruggen, R., Steele, C., Mossman, B. T., & Tschopp, J. (2008). Innate immune activation through NALP3 inflammasome sensing of asbestos and silica. *Science*, *320*(5876), 674–677. https://doi.org/10.1126/science.1156995

Duewell, P., Kono, H., Rayner, K. J., Sirois, C. M., Vladimer, G., Bauernfeind, F. G., Abela, G. S., Franchi, L., Nuñez, G., Schnurr, M., Espevik, T., Lien, E., Fitzgerald, K. A., Rock, K. L., Moore, K. J., Wright, S. D., Hornung, V., & Latz, E. (2010). NLRP3 inflammasomes are required for atherogenesis and activated by cholesterol crystals. *Nature*, *464*(7293), 1357–1361. https://doi.org/10.1038/nature08938

El-Mas, M. M., El-gowilly, S. M., Gohar, E. Y., Ghazal, A.-R. M., & Abdel-Rahman, A. A. (2011). Estrogen dependence of the renal vasodilatory effect of nicotine in rats: Role of α7 nicotinic cholinergic receptor/eNOS signaling. *Life Sciences*, *88*(3–4), 187–193. https://doi.org/10.1016/j.lfs.2010.11.009

Epstein, F. H., Dinarello, C. A., & Wolff, S. M. (1993). The role of interleukin-1 in disease. *New England Journal of Medicine*, *328*(2), 106–113. https://doi.org/10.1056/NEJM199301143280207

Evavold, C. L., Ruan, J., Tan, Y., Xia, S., Wu, H., & Kagan, J. C. (2018). The pore-forming protein gasdermin D regulates interleukin-1 secretion from living macrophages. *Immunity*, *48*(1), 35-44.e6. https://doi.org/10.1016/j.immuni.2017.11.013

Fernando, V., Zheng, X., Walia, Y., Sharma, V., Letson, J., & Furuta, S. (2019). S-nitrosylation: An emerging paradigm of redox signaling. *Antioxidants*, *8*(9), 404. https://doi.org/10.3390/antiox8090404

Fitzgerald, K. A., & Kagan, J. C. (2020). Toll-like receptors and the control of immunity. *Cell*, *180*(6), 1044–1066. https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.02.041

Fontana, M. F., & Vance, R. E. (2011). Two signal models in innate immunity. *Immunological Reviews*, *243*(1), 26–39. https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2011.01037.x

Förstermann, U., Closs, E. I., Pollock, J. S., Nakane, M., Schwarz, P., Gath, I., & Kleinert, H. (1994). Nitric oxide synthase isozymes. Characterization, purification, molecular cloning, and functions. *Hypertension*, *23*(6_pt_2), 1121–1131. https://doi.org/10.1161/01.HYP.23.6.1121

Förstermann, U., & Sessa, W. C. (2012). Nitric oxide synthases: Regulation and function. *European Heart Journal*, *33*(7), 829–837. https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehr304

Freyer, D., & Harms, C. (2017). Kinetic lactate dehydrogenase assay for detection of cell damage in primary neuronal cell cultures. *BIO-PROTOCOL*, *7*(11). https://doi.org/10.21769/BioProtoc.2308

Furchgott, R. F. (1999). Endothelium-Derived Relaxing Factor: Discovery, Early Studies, and Identification as Nitric Oxide. *Bioscience Reports*, *19*(4), 235–251. https://doi.org/10.1023/A:1020537506008

Furchgott, R. F., Cherry, P. D., Zawadzki, J. V., & Jothianandan, D. (1984). Endothelial cells as mediators of vasodilation of arteries. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, *6*, S336–S343. https://doi.org/10.1097/00005344-198406002-00008

Garg, U. C., & Hassid, A. (1989). Nitric oxide-generating vasodilators and 8-bromo-cyclic guanosine monophosphate inhibit mitogenesis and proliferation of cultured rat vascular smooth muscle cells. *Journal of Clinical Investigation*, *83*(5), 1774–1777. https://doi.org/10.1172/JCI114081

Garlanda, C., Dinarello, C. A., & Mantovani, A. (2013). The interleukin-1 family: Back to the future. *Immunity*, *39*(6), 1003–1018. https://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.11.010

Garvey, E. P., Oplinger, J. A., Furfine, E. S., Kiff, R. J., Laszlo, F., Whittle, B. J. R., & Knowles, R. G. (1997). 1400W is a slow, tight binding, and highly selective inhibitor of inducible nitric-oxide synthase in vitro and in vivo. *Journal of Biological Chemistry*, *272*(8), 4959–4963. https://doi.org/10.1074/jbc.272.8.4959

Gödecke, A., Decking, U. K. M., Ding, Z., Hirchenhain, J., Bidmon, H.-J., Gödecke, S., & Schrader, J. (1998). Coronary hemodynamics in endothelial NO synthase knockout mice. *Circulation Research*, *82*(2), 186–194. https://doi.org/10.1161/01.RES.82.2.186

Gombault, A., Baron, L., & Couillin, I. (2013). ATP release and purinergic signaling in NLRP3 inflammasome activation. *Frontiers in Immunology*, *3*. https://doi.org/10.3389/fimmu.2012.00414

Gong, T., Liu, L., Jiang, W., & Zhou, R. (2020). DAMP-sensing receptors in sterile inflammation and inflammatory diseases. *Nature Reviews Immunology*, *20*(2), 95–112. https://doi.org/10.1038/s41577-019-0215-7

Gordon, S. (2003). Alternative activation of macrophages. *Nature Reviews Immunology*, *3*(1), 23–35. https://doi.org/10.1038/nri978

Gow, A. J., Duran, D., Malcolm, S., & Ischiropoulos, H. (1996). Effects of peroxynitrite-induced protein modifications on tyrosine phosphorylation and degradation. *FEBS Letters*, *385*(1–2), 63–66. https://doi.org/10.1016/0014-5793(96)00347-X

Greaney, A. J., Leppla, S. H., & Moayeri, M. (2015). Bacterial exotoxins and the inflammasome. *Frontiers in Immunology*, *6*. https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00570

Gunaydin, H., & Houk, K. N. (2009). Mechanisms of peroxynitrite-mediated nitration of tyrosine. *Chemical Research in Toxicology*, *22*(5), 894–898. https://doi.org/10.1021/tx800463y

Haberberger, R. V., Henrich, M., Lips, K. S., & Kummer, W. (2003). Nicotinic receptor alpha7-subunits are coupled to the stimulation of nitric oxide synthase in rat dorsal root ganglion neurons. *Histochemistry and Cell Biology*, *120*(3), 173–181. https://doi.org/10.1007/s00418-003-0550-3

Halle, A., Hornung, V., Petzold, G. C., Stewart, C. R., Monks, B. G., Reinheckel, T., Fitzgerald, K. A., Latz, E., Moore, K. J., & Golenbock, D. T. (2008). The NALP3 inflammasome is involved in the innate immune response to amyloid-β. *Nature Immunology*, *9*(8), 857–865. https://doi.org/10.1038/ni.1636

Hecker, A., Küllmar, M., Wilker, S., Richter, K., Zakrzewicz, A., Atanasova, S., Mathes, V., Timm, T., Lerner, S., Klein, J., Kaufmann, A., Bauer, S., Padberg, W., Kummer, W., Janciauskiene, S., Fronius, M., Schweda, E. K. H., Lochnit, G., & Grau, V. (2015). Phosphocholine-modified macromolecules and canonical nicotinic agonists inhibit ATP-induced IL-1β release. *The Journal of Immunology*, *195*(5), 2325–2334. https://doi.org/10.4049/jimmunol.1400974

Hecker, A., Mikulski, Z., Lips, K. S., Pfeil, U., Zakrzewicz, A., Wilker, S., Hartmann, P., Padberg, W., Wessler, I., Kummer, W., & Grau, V. (2009). Pivotal advance: Up-regulation of acetylcholine synthesis and paracrine cholinergic signaling in intravascular transplant leukocytes during rejection of rat renal allografts. *Journal of Leukocyte Biology*, *86*(1), 13–22. https://doi.org/10.1189/jlb.1107722

Hentze, H., Lin, X. Y., Choi, M. S. K., & Porter, A. G. (2003). Critical role for cathepsin B in mediating caspase-1-dependent interleukin-18 maturation and caspase-1-independent necrosis triggered by the microbial toxin nigericin. *Cell Death & Differentiation*, *10*(9), 956–968. https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401264

Hernandez-Cuellar, E., Tsuchiya, K., Hara, H., Fang, R., Sakai, S., Kawamura, I., Akira, S., & Mitsuyama, M. (2012). Cutting edge: Nitric oxide inhibits the NLRP3 inflammasome. *The Journal of Immunology*, *189*(11), 5113–5117. https://doi.org/10.4049/jimmunol.1202479

Hess, D. T., Matsumoto, A., Kim, S.-O., Marshall, H. E., & Stamler, J. S. (2005). Protein S-nitrosylation: Purview and parameters. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *6*(2), 150–166. https://doi.org/10.1038/nrm1569

Huang, P. L., Huang, Z., Mashimo, H., Bloch, K. D., Moskowitz, M. A., Bevan, J. A., & Fishman, M. C. (1995). Hypertension in mice lacking the gene for endothelial nitric oxide synthase. *Nature*, *377*(6546), 239–242. https://doi.org/10.1038/377239a0

Illes, P., Müller, C. E., Jacobson, K. A., Grutter, T., Nicke, A., Fountain, S. J., Kennedy, C., Schmalzing, G., Jarvis, M. F., Stojilkovic, S. S., King, B. F., & Di Virgilio, F. (2021). Update of P2X receptor properties and their pharmacology: IUPHAR Review 30. *British Journal of Pharmacology*, *178*(3), 489–514. https://doi.org/10.1111/bph.15299

Inoue, K., & Tsuda, M. (2021). Nociceptive signaling mediated by P2X3, P2X4 and P2X7 receptors. *Biochemical Pharmacology*, *187*, 114309. https://doi.org/10.1016/j.bcp.2020.114309

Ischiropoulos, H. (1998). Biological tyrosine nitration: A pathophysiological function of nitric oxide and reactive oxygen species. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, *356*(1), 1–11. https://doi.org/10.1006/abbi.1998.0755

Italiani, P., & Boraschi, D. (2014). From monocytes to M1/M2 macrophages: Phenotypical vs. functional differentiation. *Frontiers in Immunology*, *5*. https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00514

Itier, V., & Bertrand, D. (2001). Neuronal nicotinic receptors: From protein structure to function. *FEBS Letters*, *504*(3), 118–125. https://doi.org/10.1016/S0014-5793(01)02702-8

Iwasaki, A., & Medzhitov, R. (2015). Control of adaptive immunity by the innate immune system. *Nature Immunology*, *16*(4), 343–353. https://doi.org/10.1038/ni.3123

Iyer, S. S., Pulskens, W. P., Sadler, J. J., Butter, L. M., Teske, G. J., Ulland, T. K., Eisenbarth, S. C., Florquin, S., Flavell, R. A., Leemans, J. C., & Sutterwala, F. S. (2009). Necrotic cells trigger a sterile inflammatory response through the NLRP3 inflammasome. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *106*(48), 20388–20393. https://doi.org/10.1073/pnas.0908698106

Jablonski, K. A., Amici, S. A., Webb, L. M., Ruiz-Rosado, J. D. D., Popovich, P. G., Partida-Sanchez, S., & Guerau-de-Arellano, M. (2015). Novel markers to delineate murine M1 and M2 macrophages. *PLOS ONE*, *10*(12), e0145342. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0145342

Jaffrey, S. R., & Snyder, S. H. (2001). The Biotin Switch Method for the Detection of S-Nitrosylated Proteins. *Science's STKE*, *2001*(86). https://doi.org/10.1126/stke.2001.86.pl1

Jakubzick, C. V., Randolph, G. J., & Henson, P. M. (2017). Monocyte differentiation and antigen-presenting functions. *Nature Reviews Immunology*, *17*(6), 349–362. https://doi.org/10.1038/nri.2017.28

Janeway, C. A. (1989). Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, *54*(0), 1–13. https://doi.org/10.1101/SQB.1989.054.01.003

Jones, L. H. (2012). Chemistry and biology of biomolecule nitration. *Chemistry & Biology*, *19*(9), 1086–1092. https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2012.07.019

Kaneko, N., Kurata, M., Yamamoto, T., Morikawa, S., & Masumoto, J. (2019). The role of interleukin-1 in general pathology. *Inflammation and Regeneration*, *39*(1), 12. https://doi.org/10.1186/s41232-019-0101-5

Katsnelson, M. A., Rucker, L. G., Russo, H. M., & Dubyak, G. R. (2015). K^+-efflux agonists induce NLRP3 inflammasome activation independently of Ca^{2+}-signaling. *The Journal of Immunology*, *194*(8), 3937–3952. https://doi.org/10.4049/jimmunol.1402658

Kawai, T., & Akira, S. (2010). The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: Update on Toll-like receptors. *Nature Immunology*, *11*(5), 373–384. https://doi.org/10.1038/ni.1863

Kawasaki, T., & Kawai, T. (2014). Toll-like receptor signaling pathways. *Frontiers in Immunology*, *5*. https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00461

Kawashima, K. (2000). Extraneuronal cholinergic system in lymphocytes. *Pharmacology & Therapeutics*, *86*(1), 29–48. https://doi.org/10.1016/S0163-7258(99)00071-6

Kawashima, K., Fujii, T., Moriwaki, Y., Misawa, H., & Horiguchi, K. (2012). Reconciling neuronally and nonneuronally derived acetylcholine in the regulation of immune function. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *1261*(1), 7–17. https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2012.06516.x

Kawashima, K., Fujii, T., Moriwaki, Y., Misawa, H., & Horiguchi, K. (2015). Non-neuronal cholinergic system in regulation of immune function with a focus on α7 nAChRs. *International Immunopharmacology*, *29*(1), 127–134. https://doi.org/10.1016/j.intimp.2015.04.015

Kelm, M. (1999). Nitric oxide metabolism and breakdown. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, *1411*(2–3), 273–289. https://doi.org/10.1016/S0005-2728(99)00020-1

Kleinert, H., Pautz, A., Linker, K., & Schwarz, P. M. (2004). Regulation of the expression of inducible nitric oxide synthase. *European Journal of Pharmacology*, *500*(1–3), 255–266. https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2004.07.030

Knowles, R. G., & Moncada, S. (1994). Nitric oxide synthases in mammals. *Biochemical Journal*, *298*(2), 249–258. https://doi.org/10.1042/bj2980249

Kong, S. K., Yim, M. B., Stadtman, E. R., & Chock, P. B. (1996). Peroxynitrite disables the tyrosine phosphorylation regulatory mechanism: Lymphocyte-specific tyrosine kinase fails to phosphorylate nitrated cdc2(6-20)NH2 peptide. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *93*(8), 3377–3382. https://doi.org/10.1073/pnas.93.8.3377

Kubes, P., Suzuki, M., & Granger, D. N. (1991). Nitric oxide: An endogenous modulator of leukocyte adhesion. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *88*(11), 4651–4655. https://doi.org/10.1073/pnas.88.11.4651

Lara, R., Adinolfi, E., Harwood, C. A., Philpott, M., Barden, J. A., Di Virgilio, F., & McNulty, S. (2020). P2X7 in cancer: From molecular mechanisms to therapeutics. *Frontiers in Pharmacology*, *11*, 793. https://doi.org/10.3389/fphar.2020.00793

Legrand, C., Bour, J. M., Jacob, C., Capiaumont, J., Martial, A., Marc, A., Wudtke, M., Kretzmer, G., Demangel, C., Duval, D., & Hache, J. (1992). Lactate dehydrogenase (LDH) activity of the number of dead cells in the medium of cultured eukaryotic cells as marker. *Journal of Biotechnology*, *25*(3), 231–243. https://doi.org/10.1016/0168-1656(92)90158-6

Lemaitre, B., Nicolas, E., Michaut, L., Reichhart, J.-M., & Hoffmann, J. A. (1996). The dorsoventral regulatory gene cassette spätzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in Drosophila adults. *Cell*, *86*(6), 973–983. https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80172-5

Li, H., & Förstermann, U. (2000). Nitric oxide in the pathogenesis of vascular disease. *The Journal of Pathology*, *190*(3), 244–254. https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9896(200002)190:3<244::AID-PATH575>3.0.CO;2-8

Lu, Y.-C., Yeh, W.-C., & Ohashi, P. S. (2008). LPS/TLR4 signal transduction pathway. *Cytokine*, *42*(2), 145–151. https://doi.org/10.1016/j.cyto.2008.01.006

Lund, M. E., To, J., O'Brien, B. A., & Donnelly, S. (2016). The choice of phorbol 12-myristate 13-acetate differentiation protocol influences the response of THP-1 macrophages to a pro-inflammatory stimulus. *Journal of Immunological Methods*, *430*, 64–70. https://doi.org/10.1016/j.jim.2016.01.012

Mantovani, A., Dinarello, C. A., Molgora, M., & Garlanda, C. (2019). Interleukin-1 and related cytokines in the regulation of inflammation and immunity. *Immunity*, *50*(4), 778–795. https://doi.org/10.1016/j.immuni.2019.03.012

Mao, L., Zhou, Q., Zhou, S., Wilbur, R. R., & Li, X. (2013). Roles of apolipoprotein E (ApoE) and inducible nitric oxide synthase (iNOS) in inflammation and apoptosis in preeclampsia pathogenesis and progression. *PLoS ONE*, *8*(3), e58168. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0058168

March, C. J., Mosley, B., Larsen, A., Cerretti, D. P., Braedt, G., Price, V., Gillis, S., Henney, C. S., Kronheim, S. R., Grabstein, K., Conlon, P. J., Hopp, T. P., & Cosman, D. (1985). Cloning, sequence and expression of two distinct human interleukin-1 complementary DNAs. *Nature*, *315*(6021), 641–647. https://doi.org/10.1038/315641a0

Martinez, F. O., & Gordon, S. (2014). The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: Time for reassessment. *F1000Prime Reports*, *6*. https://doi.org/10.12703/P6-13

Martinez, F. O., Helming, L., & Gordon, S. (2009). Alternative activation of macrophages: An immunologic functional perspective. *Annual Review of Immunology*, *27*(1), 451–483. https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.021908.132532

Martinon, F., Burns, K., & Tschopp, J. (2002). The inflammasome: A molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-β. *Molecular Cell*, *10*(2), 417–426. https://doi.org/10.1016/S1097-2765(02)00599-3

Martinon, F., Mayor, A., & Tschopp, J. (2009). The inflammasomes: Guardians of the body. *Annual Review of Immunology*, *27*(1), 229–265. https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.021908.132715

Matzinger, P. (1994). Tolerance, danger, and the extended family. *Annual Review of Immunology*, *12*(1), 991–1045. https://doi.org/10.1146/annurev.iy.12.040194.005015

Matzinger, P. (2002). The danger model: A renewed sense of self. *Science*, *296*(5566), 301–305. https://doi.org/10.1126/science.1071059

McCall, S. H., Sahraei, M., Young, A. B., Worley, C. S., Duncan, J. A., Ting, J. P.-Y., & Marriott, I. (2008). Osteoblasts express NLRP3, a nucleotide-binding domain and leucine-rich repeat region containing receptor implicated in bacterially induced cell death. *Journal of Bone and Mineral Research*, *23*(1), 30–40. https://doi.org/10.1359/jbmr.071002

McCarthy, A. E., Yoshioka, C., & Mansoor, S. E. (2019). Full-length P2X7 structures reveal how palmitoylation prevents channel desensitization. *Cell*, *179*(3), 659-670.e13. https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.09.017

Medzhitov, R., & Janeway, C. (2000). Innate immunity. *New England Journal of Medicine*, *343*(5), 338–344. https://doi.org/10.1056/NEJM200008033430506

Meyer, M. M., Brandenburg, L., Hudel, H., Agné, A., Padberg, W., Erdogan, A., Nef, H., Amati, A.-L., Dörr, O., Witte, B., & Grau, V. (2020). Who is afraid of CRP? Elevated preoperative CRP levels might attenuate the increase in inflammatory parameters in response to lung cancer surgery. *Journal of Clinical Medicine*, *9*(10), 3340. https://doi.org/10.3390/jcm9103340

Mishra, B. B., Rathinam, V. A. K., Martens, G. W., Martinot, A. J., Kornfeld, H., Fitzgerald, K. A., & Sassetti, C. M. (2013). Nitric oxide controls the immunopathology of tuberculosis by inhibiting NLRP3 inflammasome–dependent processing of IL-1β. *Nature Immunology*, *14*(1), 52–60. https://doi.org/10.1038/ni.2474

Moore, P. K., & Handy, R. L. C. (1997). Selective inhibitors of neuronal nitric oxide synthase–is no NOS really good NOS for the nervous system? *Trends in Pharmacological Sciences*, *18*(6), 204–211. https://doi.org/10.1016/S0165-6147(97)01064-X

Mouse Genome Sequencing Consortium. (2002). Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. *Nature*, *420*(6915), 520–562. https://doi.org/10.1038/nature01262

Mueller, Y. M., De Rosa, S. C., Hutton, J. A., Witek, J., Roederer, M., Altman, J. D., & Katsikis, P. D. (2001). Increased CD95/Fas-induced apoptosis of HIV-specific CD8+ T cells. *Immunity*, *15*(6), 871–882. https://doi.org/10.1016/S1074-7613(01)00246-1

Murray, P. J., Allen, J. E., Biswas, S. K., Fisher, E. A., Gilroy, D. W., Goerdt, S., Gordon, S., Hamilton, J. A., Ivashkiv, L. B., Lawrence, T., Locati, M., Mantovani, A., Martinez, F. O., Mege, J.-L., Mosser, D. M., Natoli, G., Saeij, J. P., Schultze, J. L., Shirey, K. A., … Wynn, T. A. (2014). Macrophage activation and polarization: Nomenclature and experimental guidelines. *Immunity*, *41*(1), 14–20. https://doi.org/10.1016/j.immuni.2014.06.008

Nakaki, T., Nakayama, M., & Kato, R. (1990). Inhibition by nitric oxide and nitric oxide-producing vasodilators of DNA synthesis in vascular smooth muscle cells. *European Journal of Pharmacology: Molecular Pharmacology*, *189*(6), 347–353. https://doi.org/10.1016/0922-4106(90)90031-R

Nakane, M., Schmidt, H. H. H. W., Pollock, J. S., Förstermann, U., & Murad, F. (1993). Cloned human brain nitric oxide synthase is highly expressed in skeletal muscle. *FEBS Letters*, *316*(2), 175–180. https://doi.org/10.1016/0014-5793(93)81210-Q

Naumenko, V. S., & Ponimaskin, E. (2018). Palmitoylation as a functional regulator of neurotransmitter receptors. *Neural Plasticity*, *2018*, 1–18. https://doi.org/10.1155/2018/5701348

Nguyen, T., Brunson, D., Crespi, C. L., Penman, B. W., Wishnok, J. S., & Tannenbaum, S. R. (1992). DNA damage and mutation in human cells exposed to nitric oxide in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *89*(7), 3030–3034. https://doi.org/10.1073/pnas.89.7.3030

Nicke, A. (1998). P2X1 and P2X3 receptors form stable trimers: A novel structural motif of ligand-gated ion channels. *The EMBO Journal*, *17*(11), 3016–3028. https://doi.org/10.1093/emboj/17.11.3016

Nussler, A. K., & Billiar, T. R. (1993). Inflammation, immunoregulation, and inducible nitric oxide synthase. *Journal of Leukocyte Biology*, *54*(2), 171–178. https://doi.org/10.1002/jlb.54.2.171

Papadopolou, S., Hartmann, P., Lips, K. S., Kummer, W., & Haberberger, R. V. (2004). Nicotinic receptor mediated stimulation of NO-generation in neurons of rat thoracic dorsal root ganglia. *Neuroscience Letters*, *361*(1–3), 32–35. https://doi.org/10.1016/j.neulet.2003.08.064

Pétrilli, V., Papin, S., Dostert, C., Mayor, A., Martinon, F., & Tschopp, J. (2007). Activation of the NALP3 inflammasome is triggered by low intracellular potassium concentration. *Cell Death & Differentiation*, *14*(9), 1583–1589. https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4402195

Pfeiffer, S., Leopold, E., Schmidt, K., Brunner, F., & Mayer, B. (1996). Inhibition of nitric oxide synthesis by NG-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME): Requirement for bioactivation to the free acid, NG-nitro-L-arginine. *British Journal of Pharmacology*, *118*(6), 1433–1440. https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.1996.tb15557.x

Piccini, A., Carta, S., Tassi, S., Lasiglié, D., Fossati, G., & Rubartelli, A. (2008). ATP is released by monocytes stimulated with pathogen-sensing receptor ligands and induces IL-1β and IL-18 secretion in an autocrine way. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *105*(23), 8067–8072. https://doi.org/10.1073/pnas.0709684105

Plenchette, S., Romagny, S., Laurens, V., & Bettaieb, A. (2015). S-nitrosylation in TNF superfamily signaling pathway: Implication in cancer. *Redox Biology*, *6*, 507–515. https://doi.org/10.1016/j.redox.2015.08.019

Qin, Z. (2012). The use of THP-1 cells as a model for mimicking the function and regulation of monocytes and macrophages in the vasculature. *Atherosclerosis*, *221*(1), 2–11. https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2011.09.003

Radi, R., Peluffo, G., Alvarez, M. N., Naviliat, M., & Cayota, A. (2001). Unraveling peroxynitrite formation in biological systems. *Free Radical Biology and Medicine*, *30*(5), 463–488. https://doi.org/10.1016/S0891-5849(00)00373-7

Raetz, C. R. H., & Whitfield, C. (2002). Lipopolysaccharide endotoxins. *Annual Review of Biochemistry*, *71*(1), 635–700. https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.71.110601.135414

Rees, D. D., Palmer, R. M. J., Schulz, R., Hodson, H. F., & Moncada, S. (1990). Characterization of three inhibitors of endothelial nitric oxide synthase in vitro and in vivo. *British Journal of Pharmacology*, *101*(3), 746–752. https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.1990.tb14151.x

Ren, K., & Torres, R. (2009). Role of interleukin-1β during pain and inflammation. *Brain Research Reviews*, *60*(1), 57–64. https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2008.12.020

Richter, K., Amati, A.-L., Padberg, W., & Grau, V. (2022). Negative regulation of ATP-induced inflammasome activation and cytokine secretion by acute-phase proteins: A mini review. *Frontiers in Pharmacology*, *13*, 981276. https://doi.org/10.3389/fphar.2022.981276

Richter, K., Asci, N., Singh, V. K., Yakoob, S. H., Meixner, M., Zakrzewicz, A., Liese, J., Hecker, A., Wilker, S., Stumpf, S., Schlüter, K.-D., Rohde, M., Gödecke, A., Padberg, W., Manzini, I., Schmalzing, G., & Grau, V. (2023). Activation of endothelial NO synthase and P2X7 receptor modification mediates the cholinergic control of ATP-induced interleukin-1β release by mononuclear phagocytes. *Frontiers in Immunology*, *14*, 1140592. https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1140592

Richter, K., Mathes, V., Fronius, M., Althaus, M., Hecker, A., Krasteva-Christ, G., Padberg, W., Hone, A. J., McIntosh, J. M., Zakrzewicz, A., & Grau, V. (2016). Phosphocholine – an agonist of metabotropic but not of ionotropic functions of α9-containing nicotinic acetylcholine receptors. *Scientific Reports*, *6*(1), 28660. https://doi.org/10.1038/srep28660

Richter, K., Papke, R. L., Stokes, C., Roy, D. C., Espinosa, E. S., Wolf, P. M. K., Hecker, A., Liese, J., Singh, V. K., Padberg, W., Schlüter, K.-D., Rohde, M., McIntosh, J. M., Morley, B. J., Horenstein, N. A., Grau, V., & Simard, A. R. (2022). Comparison of the anti-inflammatory properties of two nicotinic acetylcholine receptor ligands, phosphocholine and pCF3-diEPP. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, *16*, 779081. https://doi.org/10.3389/fncel.2022.779081

Richter, K., Sagawe, S., Hecker, A., Küllmar, M., Askevold, I., Damm, J., Heldmann, S., Pöhlmann, M., Ruhrmann, S., Sander, M., Schlüter, K.-D., Wilker, S., König, I. R., Kummer, W., Padberg, W., Hone, A. J., McIntosh, J. M., Zakrzewicz, A. T., Koch, C., & Grau, V. (2018). C-reactive protein stimulates nicotinic acetylcholine receptors to control ATP-mediated monocytic inflammasome activation. *Frontiers in Immunology*, *9*, 1604. https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01604

Sborgi, L., Rühl, S., Mulvihill, E., Pipercevic, J., Heilig, R., Stahlberg, H., Farady, C. J., Müller, D. J., Broz, P., & Hiller, S. (2016). GSDMD membrane pore formation constitutes the mechanism of pyroptotic cell death. *The EMBO Journal*, *35*(16), 1766–1778. https://doi.org/10.15252/embj.201694696

Schaefer, L. (2014). Complexity of danger: The diverse nature of damage-associated molecular patterns. *Journal of Biological Chemistry*, *289*(51), 35237–35245. https://doi.org/10.1074/jbc.R114.619304

Schildberger, A., Rossmanith, E., Eichhorn, T., Strassl, K., & Weber, V. (2013). Monocytes, peripheral blood mononuclear cells, and THP-1 cells exhibit different cytokine expression patterns following stimulation with lipopolysaccharide. *Mediators of Inflammation*, *2013*, 1–10. https://doi.org/10.1155/2013/697972

Schmalzing, G., & Markwardt, F. (2022). Established protocols for cRNA expression and voltage-clamp characterization of the P2X7 receptor in Xenopus laevis oocytes. In A. Nicke (Hrsg.), *The P2X7 Receptor* (Bd. 2510, S. 157–192). Springer US. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-2384-8_9

Schroder, K., & Tschopp, J. (2010). The inflammasomes. *Cell*, *140*(6), 821–832. https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.01.040

Shapouri-Moghaddam, A., Mohammadian, S., Vazini, H., Taghadosi, M., Esmaeili, S., Mardani, F., Seifi, B., Mohammadi, A., Afshari, J. T., & Sahebkar, A. (2018). Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease. *Journal of Cellular Physiology*, *233*(9), 6425–6440. https://doi.org/10.1002/jcp.26429

Sharif, O., Bolshakov, V. N., Raines, S., Newham, P., & Perkins, N. D. (2007). Transcriptional profiling of the LPS induced NF-κB response in macrophages. *BMC Immunology*, *8*(1), 1. https://doi.org/10.1186/1471-2172-8-1

Shesely, E. G., Maeda, N., Kim, H.-S., Desai, K. M., Krege, J. H., Laubach, V. E., Sherman, P. A., Sessa, W. C., & Smithies, O. (1996). Elevated blood pressures in mice lacking endothelial nitric oxide synthase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *93*(23), 13176–13181. https://doi.org/10.1073/pnas.93.23.13176

Shi, Y., Mucsi, A. D., & Ng, G. (2010). Monosodium urate crystals in inflammation and immunity. *Immunological Reviews*, *233*(1), 203–217. https://doi.org/10.1111/j.0105-2896.2009.00851.x

Shipston, M. J. (2011). Ion channel regulation by protein palmitoylation. *Journal of Biological Chemistry*, *286*(11), 8709–8716. https://doi.org/10.1074/jbc.R110.210005

Shokoples, B. G., Paradis, P., & Schiffrin, E. L. (2021). P2X7 receptors: An untapped target for the management of cardiovascular disease. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, *41*(1), 186–199. https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.120.315116

Sica, A., Erreni, M., Allavena, P., & Porta, C. (2015). Macrophage polarization in pathology. *Cellular and Molecular Life Sciences*, *72*(21), 4111–4126. https://doi.org/10.1007/s00018-015-1995-y

Sica, A., & Mantovani, A. (2012). Macrophage plasticity and polarization: In vivo veritas. *Journal of Clinical Investigation*, *122*(3), 787–795. https://doi.org/10.1172/JCI59643

Siebers, K., Fink, B., Zakrzewicz, A., Agné, A., Richter, K., Konzok, S., Hecker, A., Zukunft, S., Küllmar, M., Klein, J., McIntosh, J. M., Timm, T., Sewald, K., Padberg, W., Aggarwal, N., Chamulitrat, W., Santoso, S., Xia, W., Janciauskiene, S., & Grau, V. (2018). Alpha-1 Antitrypsin inhibits ATP-mediated release of interleukin-1β via CD36 and nicotinic acetylcholine receptors. *Frontiers in Immunology*, *9*, 877. https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00877

Snyder, S. H., & Bredt, D. S. (1992). Biological roles of nitric oxide. *Scientific American*, *266*(5), 68–77. https://doi.org/10.1038/scientificamerican0592-68

Steinbach, F., & Thiele, B. (1994). Phenotypic investigation of mononuclear phagocytes by flow cytometry. *Journal of Immunological Methods*, *174*(1–2), 109–122. https://doi.org/10.1016/0022-1759(94)90015-9

T. Pournara, D., Durner, A., Kritsi, E., Papakostas, A., Zoumpoulakis, P., Nicke, A., & Koufaki, M. (2020). Design, synthesis, and in vitro evaluation of P2X7 antagonists. *ChemMedChem*, *15*(24), 2530–2543. https://doi.org/10.1002/cmdc.202000303

Takao, K., & Miyakawa, T. (2015). Genomic responses in mouse models greatly mimic human inflammatory diseases. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *112*(4), 1167–1172. https://doi.org/10.1073/pnas.1401965111

Togashi, H., Sakuma, I., Yoshioka, M., Kobayashi, T., Yasuda, H., Kitabatake, A., Saito, H., Gross, S. S., & Levi, R. (1992). A central nervous system action of nitric oxide in blood pressure regulation. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, *262*(1), 343–347.

Tsan, M.-F., & Gao, B. (2004). Endogenous ligands of Toll-like receptors. *Journal of Leukocyte Biology*, *76*(3), 514–519. https://doi.org/10.1189/jlb.0304127

Tsuchiya, S., Yamabe, M., Yamaguchi, Y., Kobayashi, Y., Konno, T., & Tada, K. (1980). Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1). *International Journal of Cancer*, *26*(2), 171–176. https://doi.org/10.1002/ijc.2910260208

Unuvar Purcu, D., Korkmaz, A., Gunalp, S., Helvaci, D. G., Erdal, Y., Dogan, Y., Suner, A., Wingender, G., & Sag, D. (2022). Effect of stimulation time on the expression of human macrophage polarization markers. *PLOS ONE*, *17*(3), e0265196. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0265196

Van Furth, R., & Cohn, Z. A. (1968). The origin and kinetics of mononuclear phagocytes. *The Journal of Experimental Medicine*, *128*(3), 415–435. https://doi.org/10.1084/jem.128.3.415

Vaure, C., & Liu, Y. (2014). A comparative review of Toll-like receptor 4 expression and functionality in different animal species. *Frontiers in Immunology*, *5*. https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00316

Wang, Z. (2012). Protein S-nitrosylation and cancer. *Cancer Letters*, *320*(2), 123–129. https://doi.org/10.1016/j.canlet.2012.03.009

Whitehead, K. A., Dahlman, J. E., Langer, R. S., & Anderson, D. G. (2011). Silencing or stimulation? siRNA delivery and the immune system. *Annual Review of Chemical and Biomolecular Engineering*, *2*(1), 77–96. https://doi.org/10.1146/annurev-chembioeng-061010-114133

Winsor, N., Krustev, C., Bruce, J., Philpott, D. J., & Girardin, S. E. (2019). Canonical and noncanonical inflammasomes in intestinal epithelial cells. *Cellular Microbiology*, *21*(11). https://doi.org/10.1111/cmi.13079

Wu, T.-C., Xu, K., Martinek, J., Young, R. R., Banchereau, R., George, J., Turner, J., Kim, K. I., Zurawski, S., Wang, X., Blankenship, D., Brookes, H. M., Marches, F., Obermoser, G., Lavecchio, E., Levin, M. K., Bae, S., Chung, C.-H., Smith, J. L., … Palucka, A. K. (2018). IL1 receptor antagonist controls transcriptional signature of inflammation in patients with metastatic breast cancer. *Cancer Research*, *78*(18), 5243–5258. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-18-0413

Yunna, C., Mengru, H., Lei, W., & Weidong, C. (2020). Macrophage M1/M2 polarization. *European Journal of Pharmacology*, *877*, 173090. https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2020.173090

Zakrzewicz, A., Richter, K., Agné, A., Wilker, S., Siebers, K., Fink, B., Krasteva-Christ, G., Althaus, M., Padberg, W., Hone, A. J., McIntosh, J. M., & Grau, V. (2017). Canonical and novel non-canonical cholinergic agonists inhibit ATP-induced release of monocytic interleukin-1β via different combinations of nicotinic acetylcholine receptor subunits α7, α9 and α10. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, *11*, 189. https://doi.org/10.3389/fncel.2017.00189

Zakrzewicz, A., Richter, K., Zakrzewicz, D., Siebers, K., Damm, J., Agné, A., Hecker, A., McIntosh, J. M., Chamulitrat, W., Krasteva-Christ, G., Manzini, I., Tikkanen, R., Padberg, W., Janciauskiene, S., & Grau, V. (2019). SLPI inhibits ATP-mediated maturation of IL-1β in human monocytic leukocytes: A novel function of an old player. *Frontiers in Immunology*, *10*, 664. https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00664

Zhang, H. Q., Fast, W., Marletta, M. A., Martasek, P., & Silverman, R. B. (1997). Potent and selective inhibition of neuronal nitric oxide synthase by Nω-propyl-L-arginine. *Journal of Medicinal Chemistry*, *40*(24), 3869–3870. https://doi.org/10.1021/jm970550g

Zhou, L., & Zhu, D.-Y. (2009). Neuronal nitric oxide synthase: Structure, subcellular localization, regulation, and clinical implications. *Nitric Oxide*, *20*(4), 223–230. https://doi.org/10.1016/j.niox.2009.03.001

Ziegler-Heitbrock, L., Ancuta, P., Crowe, S., Dalod, M., Grau, V., Hart, D. N., Leenen, P. J. M., Liu, Y.-J., MacPherson, G., Randolph, G. J., Scherberich, J., Schmitz, J., Shortman, K., Sozzani, S., Strobl, H., Zembala, M., Austyn, J. M., & Lutz, M. B. (2010). Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. *Blood*, *116*(16), e74–e80. https://doi.org/10.1182/blood-2010-02-258558

Zielonka, J., Sikora, A., Joseph, J., & Kalyanaraman, B. (2010). Peroxynitrite Is the major species formed from different flux ratios of co-generated nitric oxide and superoxide. *Journal of Biological Chemistry*, *285*(19), 14210–14216. https://doi.org/10.1074/jbc.M110.110080

Zoli, M., Pucci, S., Vilella, A., & Gotti, C. (2018). Neuronal and extraneuronal nicotinic acetylcholine receptors. *Current Neuropharmacology*, *16*(4), 338–349. https://doi.org/10.2174/1570159X15666170912110450

11. Publikationen und Kongressbeiträge

11.1 Publikation

Katrin Richter, Nilay Asci, Vijay K. Singh , SanariaHawroYakoob , Marion Meixner, Anna Zakrzewicz, Juliane Liese, Andreas Hecker, Sigrid Wilker, Sabine Stumpf, Klaus-Dieter Schlüter, Marius Rohde, Axel Gödecke , Winfried Padberg , Ivan Manzini, Günther Schmalzingand Veronika Grau. Activation of endothelial NO synthase and P2X7 receptor modification mediates the cholinergic control of ATPinduced interleukin-1b release by mononuclear phagocytes. Frontiers in Immunology (2023) doi: 10.3389/fimmu.2023.1140592

11.2 Kongressbeitrag

2022 Vortrag auf dem fünften Science-Day des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität, Gießen
Nilay Asci, Katrin Richter, Marion Meixner, Anna Zakrzewicz, Sanaria H. Yakoob, Vijay K. Singh, Juliane Liese, Andreas Hecker, Sigrid Wilker, Sabine Stumpf, Klaus-Dieter Schlüter, Marius Rohde, Axel Gödecke, Winfried Padberg, Ivan Manzini, Günther Schmalzing, Veronika Grau. Activation of endothelial NO synthase and P2X7 receptor mediates the cholinergic control of ATP-induced interleukin-1β release

12. Ehrenwörtliche Erklärung

„Ehrenwörtliche Erklärung „Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, und dass die vorgelegte Arbeit weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt wurde. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

_____ _____

Ort, Datum Unterschrift

13. Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei Prof. Dr. Veronika Grau bedanken für die Überlassung dieses Promotionsthemas, die wissenschaftliche Förderung und hervorragende Betreuung über die vergangenen Jahre. Sowohl ihr Engagement in der wissenschaftlichen Ausbildung, als auch ihr menschliches Einfühlungsvermögen haben mich nachhaltig beeindruckt. Vielen Dank für die geduldigen und konstruktiven Hilfestellungen bei der Erstellung dieser Arbeit. Ich schätze mich sehr glücklich ein Teil ihrer Arbeitsgruppe geworden zu sein.

Ein ganz besonderer Dank gilt Dr. Katrin Richter. Nicht nur fachlich, sondern auch menschlich konnte ich in den vergangenen Jahren viel von ihr lernen. Vielen Dank für die geduldige Einarbeitung, die zahlreichen Hilfestellungen und vor allem Motivationen bei der Erstellung der Thesis. Ohne sie wäre diese Doktorarbeit nicht in dieser Form zustande gekommen.

Bei allen Mitarbeitern der Sektion Experimentelle Chirurgie möchte ich mich für die tolle Zusammenarbeit und Unterstützung bedanken. Vielen Dank auch allen Doktoranden für die netten Gespräche und die schöne Zeit im Büro.

Abschließend möchte ich mich bei meiner Familie bedanken, die mich in jedem Lebensabschnitt uneingeschränkt unterstützt haben.