

Regulation der monozytären Interleukin-1 β -Freisetzung durch β -NAD – Untersuchungen zur Signaltransduktion

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

vorgelegt von Sarah Thielemeier geb. Heldmann
aus
Seeheim-Jugenheim

Gießen, 2023

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

Klinik für Allgemein-, Viszeral-, Thorax-, Transplantations- und Kinderchirurgie

Sektion Experimentelle Chirurgie

Gutachterin: Prof. Dr. Grau, Veronika

Gutachterin: Prof. Dr. Giehl, Klaudia

Tag der Disputation: 27.08.2024

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Aktivierung des angeborenen Immunsystems.....	1
1.2	Monozyten.....	3
1.3	<i>Toll-like</i> -Rezeptor 4.....	4
1.4	Inflammasome.....	6
1.5	IL-1 β	8
1.5.1	Cholinerge Regulation der IL-1 β -Expression und -Sekretion.....	10
1.6	β -Nikotinamidadenindinukleotid.....	12
1.7	Fragestellung und Hypothesen der Dissertation.....	15
2	Material und Methoden.....	17
2.1	Materialien und Geräte.....	17
2.1.1	Reagenzien.....	17
2.1.2	Verbrauchsmaterialien.....	20
2.1.3	Geräte.....	21
2.1.4	Software.....	21
2.2	Methoden.....	21
2.2.1	Zellkulturexperimente mit U937-Zellen.....	21
2.2.1.1	Versuchsaufbau.....	22
2.2.2	Herstellung und Verwendung von konditioniertem Medium.....	24
2.2.3	Herunterregulation der iPLA2 β (<i>PLA2G6</i>)-Expression mit small interfering RNA.....	25
2.2.4	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Western Blot-Verfahren.....	26
2.2.5	Aufreinigung von humanen mononukleären Zellen des peripheren Blutes.....	30
2.2.6	Bestimmung der IL-1 β -Konzentration und der LDH-Aktivität.....	30
2.2.6.1	IL-1 β -Messung.....	30
2.2.6.2	Vitalitätsbestimmung von Zellen.....	30
2.2.7	Statistische Datenauswertung.....	31
3	Ergebnisse.....	32
3.1	Kontrollexperimente.....	32
3.2	Inhibition der IL-1 β -Ausschüttung durch β -NAD.....	33
3.3	Inhibition der IL-1 β -Ausschüttung durch β -NAD bei humanen mononukleären Zellen des peripheren Blutes.....	35

3.4	Aufhebung der β -NAD-vermittelten Inhibition der IL-1 β -Ausschüttung durch Verwendung von Inhibitoren der iPLA2 β	38
3.5	Die Herunterregulation der iPLA2 β -Expression hebt den inhibitorischen Effekt von β -NAD auf.....	40
3.5.1	Überprüfung der Herunterregulation der iPLA2 β -Expression mittels Western Blot-Verfahren.....	43
3.6	Konditioniertes Medium.....	44
3.6.1	Konditioniertes Medium inhibiert die BzATP-vermittelte Ausschüttung von IL-1 β	44
3.6.2	Die Wirksamkeit von konditioniertem Medium ist unabhängig von P2Y ₁ - und P2Y ₁₁ -Rezeptoren.....	45
3.6.3	Die Wirksamkeit von konditioniertem Medium ist unabhängig von der iPLA2 β	45
3.6.4	Konditioniertes Medium wirkt über die nAChR-Untereinheiten α 9/ α 10.....	46
4	Diskussion.....	49
4.1	Wirkmechanismus und Signaltransduktion.....	49
4.2	Zellvitalität.....	56
4.3	Klinisches Potenzial.....	57
4.4	Schlussfolgerung und Ausblick.....	60
5	Kurzfassung.....	62
5.1	Deutsch.....	62
5.2	Englisch.....	63
6	Abkürzungsverzeichnis.....	64
7	Abbildungs- und Tabellenverzeichnis.....	66
7.1	Abbildungen.....	66
7.2	Tabellen.....	67
8	Literaturverzeichnis.....	68
9	Publikationsverzeichnis.....	94
9.1	Originalarbeiten.....	94
9.2	Vorträge.....	94
10	Ehrenwörtliche Erklärung.....	95
11	Danksagung.....	96

1 Einleitung

1.1 Aktivierung des angeborenen Immunsystems

Das Immunsystem ist ein komplexes System aus Zellen und Molekülen, die der Bekämpfung von Infektionen dienen und diese ermöglichen (Delves & Roitt, 2000). Es kann auf verschiedene Weisen eingeteilt werden. Eine sehr geläufige Einteilung ist die Unterscheidung zwischen einer angeborenen und einer erworbenen beziehungsweise (bzw.) adaptiven Immunantwort, abhängig von der Geschwindigkeit und der Spezialisierung der Reaktion (Parkin & Cohen, 2001). Das angeborene Immunsystem nutzt Phagozyten, welche ebenfalls inflammatorische Mediatoren ausschütten können, wie beispielsweise Neutrophile, Monozyten, Makrophagen, Mastzellen sowie natürliche Killerzellen (Delves & Roitt, 2000). Zugehörig sind zudem die Haut sowie die Epithelien, welche die inneren Organe, wie die Lunge oder den Darm, auskleiden (Janeway & Medzhitov, 2002; Medzhitov, 2007). Es ist eng mit dem adaptiven Immunsystem verzahnt. So kann es über die Aktivierung von T-Zellen die adaptive Immunantwort prägen und aktivieren (Iwasaki & Medzhitov, 2015).

Die Funktionsweise und Aktivierung des angeborenen Immunsystems ist sehr komplex. Charles A. Janeway lieferte 1989 eine mögliche Erklärung für dessen Funktionsweise, indem er der Unterscheidung zwischen *self* und *nonself* eine zentrale Rolle beimaß (Janeway, 1989). Er postulierte, dass die Erkennung von pathogenassoziierten molekularen Mustern (*pathogen-associated molecular patterns*, PAMP), durch Mustererkennungsrezeptoren (*pattern recognition receptors*, PRR), zu einer Aktivierung des angeborenen Immunsystems führt (Janeway, 1989). Zu den PRR zählen neben den bereits sehr gut untersuchten *Toll-like-Rezeptoren* (TLR), auf die in dieser Arbeit im Folgenden noch genauer eingegangen wird, unter anderem auch die C-Typ Lektinrezeptoren, die, wie die TLRs, an der Zelloberfläche lokalisiert sind (Takeuchi & Akira, 2010). Des Weiteren sind intrazelluläre Rezeptoren, wie die *nucleotide-binding oligomerisation domain* (NOD)-like-Rezeptoren (NLR) und lösliche Rezeptoren, wie das mannosebindende Lektin, bekannt (Takeuchi & Akira, 2010). PAMP finden sich beispielsweise in der Zellwand von Bakterien oder Mykobakterien, können aber auch Bestandteil von Pilzen oder Viren sein (Akira et al., 2006). Beispielhaft seien hier komplexe Polysaccharide, Glykolipide, Lipoproteine, das β -Glukan, Nukleotide oder Nukleinsäuren zu nennen (Janeway & Medzhitov, 2002; Medzhitov, 2007). Diese werden durch verschiedene PRR, mittels Ligandenerkennungsdomänen, erkannt, welche in Form von *leucine-rich repeats* (LRR), C-Typ-Lektindomänen oder verschiedenen

amino-säurebindenden Domänen vorliegen können (Janeway & Medzhitov, 2002; Medzhitov, 2007; Barton & Kagan, 2009).

Einen weiteren ergänzenden Erklärungsansatz lieferte Polly Matzinger 1994, indem sie postulierte, dass die Aktivierung des angeborenen Immunsystems nicht nur auf der Erkennung und Unterscheidung zwischen *self* und *nonself*, sondern auch auf der Erkennung von endogenen Gefahrensignalen beruht (Matzinger, 1994). Diese endogenen Signale, so genannte gefahrenassoziierte molekulare Muster (*damage-associated molecular pattern*, DAMP), welche beispielsweise durch eine Verletzung von Zellen freigesetzt werden können, sind ebenfalls in der Lage PRR zu aktivieren (Takeuchi & Akira, 2010). Hierbei handelt es sich meist um Stoffe, die sich normalerweise hauptsächlich intrazellulär befinden (Chen & Nuñez, 2010). Beispielhaft seien hier extrazelluläres Adenosintriphosphat (ATP), Hitzeschockproteine (HSP) oder Harnsäure zu nennen (Martinon et al., 2006, 2009; Chen & Nuñez, 2010; Borges et al., 2016). Dieser ergänzende Erklärungsansatz ermöglicht ein besseres Verständnis für die Entstehung von sterilen Entzündungen oder den kontrollierten Abbau geschädigter Zellen, in Abwesenheit von Pathogenen (Chen & Nuñez, 2010). Kommt es zu einer Aktivierung der PRR, folgt eine intrazelluläre Signalkaskade, welche unter anderem zu einer Genaktivierung, aber auch zur Aktivierung von Caspasen führt. Die kann letztlich zu einer Ausschüttung von inflammatorischen Zytokinen und Chemokinen führen (Takeuchi & Akira, 2010).

Die Haut als Oberfläche des Körpers sowie die Epithelien, welche die inneren Organe auskleiden, sind durch zahlreiche kommensale und symbiontische Viren und Bakterien besiedelt (Whitman et al., 1998; Haynes & Rohwer, 2011). Die Funktion des Magendarmtrakts ist von der immunologischen Toleranz gegenüber diesen Kommensalen und Symbionten abhängig (Rakoff-Nahoum et al., 2004; Haynes, 2006). Überschreiten diese Keime die körpereigene Barriere, beispielsweise durch eine Verletzung, rufen sie dennoch eine Entzündungsreaktion und Aktivierung des Immunsystems hervor (Iwasaki & Medzhitov, 2015). Eine mögliche Erklärung bietet das Zweisignalmodell, welches in vereinfachter Form bereits 1963 von Talmage und Pearlsman (Talmage & Pearlman, 1963) beschrieben wurde und in den folgenden Jahren, beispielsweise durch Bretscher und Cohn (Bretscher & Cohn, 1968) oder Lafferty und Cunningham (Lafferty & Cunningham, 1975), weiter entwickelt wurde (Baxter & Hodgkin, 2002). Ein PAMP oder DAMP kann als erstes Signal eine gewisse Reaktion im

Immunsystem hervorrufen. Kommt als zweites Signal ein DAMP hinzu, so führt dies zu einer deutlich effektiveren und stärkeren Immunantwort, welche zudem, in enger Verzahnung mit dem adaptiven Immunsystem, die Aktivierung und Rekrutierung von T- und B-Zellen beinhaltet (Fontana & Vance, 2011).

Die Immunantwort muss in engen Grenzen gesteuert werden, um eine überschießende Immunreaktion zu vermeiden. Die Art der DAMP und PAMP, die Diversität der jeweiligen PRR sowie der Ort der Erkennung bestimmen die Art und Stärke der Immunantwort (Takeuchi & Akira, 2010). Im Folgenden soll es um weitere Aspekte der zellulären Immunantwort des angeborenen Immunsystems gehen.

1.2 Monozyten

Bei Monozyten handelt es sich um im Knochenmark gereifte mononukleäre Phagozyten, die für wenige Tage im Blut zirkulieren (Ziegler-Heitbrock, 2014; Patel et al., 2017). Monozyten zählen mit einem Durchmesser von 14 – 22 μm zu den größten Zellen im peripheren Blut (Wacleche et al., 2018) und können Vorläufer für Makrophagen und dendritische Zellen darstellen (Chomarat et al., 2000; Anbazhagan et al., 2014). Des Weiteren ist mittlerweile bekannt, dass sowohl dendritische Zellen, als auch Makrophagen nicht zwangsläufig von Monozyten abstammen müssen, sondern bereits in der Embryogenese in die meisten Gewebe eingewandert sind und ihre Populationen sich durch Proliferation vor Ort aufrecht erhalten (Epelman et al., 2014; Soucie et al., 2016). Sowohl Monozyten, als auch Makrophagen und dendritische Zellen zählen zum angeborenen Immunsystem und kommen in allen Wirbeltieren vor (Ginhoux & Jung, 2014; Wacleche et al., 2018). Monozyten lassen sich in verschiedene Untergruppen unterteilen, die sich unter anderem in Form, Phänotyp und Größe unterscheiden und im Blutgefäßsystem unterschiedlich lokalisiert sein können (Geissmann et al., 2003; Wong et al., 2011). Ein mögliches Unterscheidungsmerkmal bei menschlichen Monozyten ist die Expression der Glykoproteine *cluster of differentiation* (CD)14 und CD16 (Ziegler-Heitbrock et al., 2010). 85 Prozent (%) des zirkulierenden Pools aus Monozyten sind sog. klassische $\text{CD14}^{++} \text{CD16}^{-}$ Monozyten. Die weiteren 15 % bestehen aus intermediären $\text{CD14}^{++} \text{CD16}^{+}$ und nicht klassischen $\text{CD14}^{+} \text{CD16}^{++}$ Monozyten (Passlick et al., 1989; Wong et al., 2011).

Alle drei Monozytentypen haben verschiedene Funktionen. Klassischen Monozyten kommt eine patrouillierende, phagozytierende, pro-inflammatorische und proliferierende Rolle, intermediären Monozyten eine pro-inflammatorische Rolle und nicht klassischen Monozyten eine antivirale und patrouillierende Rolle zu (Shi & Pamer, 2011; Williams et al., 2018). Die klassischen Monozyten spielen unter anderem bei der Gewebereparatur, Phagozytose, Wundheilung und Koagulation eine Rolle (Wong et al., 2011, 2012). Intermediäre Monozyten sind für die Aktivierung und die Induktion der Proliferation von T-Zellen verantwortlich. Sie weisen eine stärkere Expression von Oberflächenmarkern auf, welche in der Zell-Zell-Interaktion, zwischen antigenpräsentierender Zelle und T-Zelle, beteiligt sind. Zudem können sie eine Rolle im Rahmen der Angiogenese spielen und sind zur Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (*reactive oxygen species*; ROS) in der Lage (Wong et al., 2011; Zawada et al., 2011). Die nicht klassischen Monozyten sind ebenfalls für die Aktivierung von CD4⁺-T-Zellen verantwortlich, zudem patrouillieren sie auf dem Endothel der Blutgefäße und können Viren aufspüren (Cros et al., 2010; Wong et al., 2012). Die drei Untergruppen der Monozyten unterscheiden sich nachdem sie aktiviert wurden des Weiteren in ihrer Zytokinproduktion. Wong et al. zeigte, dass klassische Monozyten vermehrt Interleukin (IL)-10, IL-6, CC-Chemokin-Ligand-2 (CCL2) und granulozytenstimulierenden Faktor (G-CSF) ausschütten, wohingegen intermediäre Monozyten IL-1 β , IL-6 und Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) und nicht klassische Monozyten TNF- α und IL-1 β , vermehrt ausschütten (Wong et al., 2011). Nach der Aktivierung von klassischen Monozyten können diese zudem zu intermediären und nicht klassischen Monozyten differenzieren (Wong et al., 2012; Wacleche et al., 2018).

1.3 Toll-like-Rezeptor 4

Das angeborene Immunsystem erkennt, wie bereits oben beschrieben, verschiedenste PAMP unter anderem über die TLR. Hierbei handelt es sich um Transmembranproteine, die eine sehr wichtige Rolle im angeborenen Immunsystem spielen (Carvalho et al., 2012). Beim Menschen sind bisher 11 verschiedene TLR bekannt (Medzhitov et al., 1997; Takeda, 2004). Der am besten untersuchte ist der TLR4, der als erster TLR beim Menschen beschrieben wurde (Medzhitov et al., 1997; Takeda, 2004). TLR4 werden vermehrt auf Monozyten und Makrophagen, aber auch auf Adipozyten, Enterozyten und Muskelzellen exprimiert (Carvalho et al., 2012). Der primäre Agonist des TLR4 ist das

Lipopolysaccharid (LPS) (Hirschfeld et al., 2000), ein bakterielles Endotoxin, welches sich in der externen Membran von Gram-negativen Bakterien, wie *Escherichia coli*, findet und einen wichtigen Indikator für eine bakterielle Infektion darstellt (Raetz & Whitfield, 2002). In ihrem Aufbau ähneln sich die verschiedenen TLR sehr: Die extrazelluläre Domäne besteht aus LRR, an welche die PAMP binden können. Es schließt sich eine transmembrane Domäne an, die die extrazelluläre mit der intrazellulären Toll/IL-1-Rezeptor (IL-1R)-Domäne (TIR) verbindet. Über die TIR wird die Signalkaskade in das Zytosol weitergeleitet (Rock et al., 1998).

LPS bindet zu Beginn der Signalkaskade an das LPS-bindende Protein (LBP), welches anschließend an CD14 bindet (Wright, 1999). Mithilfe des löslichen Proteins Lymphozytenantigen 96 (*myeloid differentiation factor-2*, MD-2) kann der Komplex an den TLR4 binden, was zu dessen Dimerisierung führt (Shimazu et al., 1999; Connolly & O'Neill, 2012). Intrazellulär unterscheidet man einen, vom Adapterprotein *myeloid differentiation primary response 88* (MyD88) abhängigen, von einem vom Adapterprotein *TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β* (TRIF) abhängigen Signalweg. Im MyD88-abhängigen Signalweg, bindet dieses an die TIR-Domäne des Rezeptors und durch zusätzliche Bindung des Adapterproteins *TIR-domain-containing adaptor protein* (TRAP), kommt es zu einer Rekrutierung und Aktivierung verschiedener Kinasen, welche letztlich zu einer vermehrten Produktion der Transkriptionsfaktoren *nuclear factor kappa B* (NF- κ B) und Aktivatorprotein-1 (AP-1) führen (Takeda, 2004; Kawasaki & Kawai, 2014). Der TRIF-abhängige Weg führt, über eine Bindung von TRIF und dem Adapterprotein *TRIF-related adaptor molecule* (TRAM), ebenfalls zu einer Rekrutierung und Aktivierung von Kinasen, welche zu einer vermehrten Aktivierung der Transkriptionsfaktoren NF- κ B, AP-1 sowie des interferonregulierenden Faktors 3 (IRF3) führen (Takeda, 2004; Kawasaki & Kawai, 2014). Diese Faktoren führen unter anderem zu einer vermehrten Transkription von pro-inflammatorischen Zytokinen, wie IL-6, IL-1 β oder TNF- α (Kawai et al., 2001). Mit Ausnahme des TLR3 verwenden alle bekannten humanen TLR den MyD88-abhängigen Weg (Barton & Kagan, 2009). TLR4 kann hingegen als Einziger beide Wege aktivieren (Barton & Kagan, 2009). Die übermäßige Ausschüttung von pro-inflammatorischen Zytokinen kann zur Entstehung überschießender lebensbedrohlicher Immunreaktionen führen, sodass deren Ausschüttung in engen Grenzen gehalten werden muss (Takeda, 2004). Es existieren daher verschiedene modulierende Mechanismen, die sowohl eine

Suppression des MyD88-abhängigen Wegs, als auch des TRIF-abhängigen Wegs hervorrufen und so zu einer Feinmodulierung der Zytokinproduktion beitragen können (Yasukawa et al., 2000; Wald et al., 2003; Brint et al., 2004).

1.4 Inflammasome

Erstmals beschrieben wurden Inflammasome 2002 von Martinon et al. (Martinon & Burns, 2002). Inflammasome sind Multiproteinkomplexe, welche zu einer Aktivierung von Caspasen führen können, was wiederum die Spaltung der pro-Formen und Ausschüttung von inflammatorischem gereiftem IL-1 β oder IL-18 fördert (Schroder & Tschopp, 2010). Inflammasome kommen in Monozyten und Makrophagen vor (Gaidt et al., 2016; Wolf et al., 2016), finden sich aber zum Beispiel (z. B.) auch in Epithelzellen (Lei-Leston et al., 2017). Für die jeweilige Namensgebung sind die, das Inflammasom aktivierenden, verschiedenen PRR verantwortlich. Aktivierte Inflammasome bestehen aus einem NLR und Caspase-1. Es konnte gezeigt werden, dass NLR beim Menschen aus drei Bestandteilen bestehen: 1. einer zentralen Nukleotid-bindenden (NACHT)-Domäne, 2. einer LRR am Carboxylende sowie 3. einer Effektor-domäne am aminoterminalen Ende, die aus einer caspase-aktivierenden und -rekrutierenden Domäne (CARD) oder einer Pyrin-Domäne (PYD) bestehen kann (Martinon et al., 2009; Rathinam et al., 2012). Die NACHT-Domäne ist hierbei essenziell für die Oligomerisierung, die LRR dienen der Ligandenbindung und die Effektor-domäne der Bindung und Aktivierung weiterer Proteine (Martinon et al., 2009; Rathinam et al., 2012). Abhängig vom NLR sind Inflammasome in der Lage, auf verschiedenste Signale zu reagieren.

Die intrazellulär vorkommenden NACHT, LRR und PYD enthaltendes Protein (NLRP)-Inflammasome, NLRP1 und NLRP3, sind bisher am besten untersucht. Beim NLRP3-Inflammasom ist für die Interaktion von NLRP3 mit der Caspase-1 zusätzlich ein Adapterprotein namens *apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD* (ASC) notwendig (Schroder & Tschopp, 2010). Bei Bindung eines Liganden an die LRR kommt es, über die NACHT-Domäne, zu einer Oligomerisierung des NLRP3-Inflammasoms, was zu einer Aktivierung und Zusammenlagerung der PYD führt (Schroder & Tschopp, 2010). Die CARD des ASC kann an die PYD binden, was wiederum zu einer Rekrutierung der pro-Caspase-1 führt (Schroder & Tschopp, 2010; Franklin et al., 2018). Deren Anlagerung führt zur Spaltung und Entstehung der

aktivierten Form der Caspase-1 (Schroder & Tschopp, 2010; Franklin et al., 2018). Die Aktivierung und Oligomerisierung kann durch verschiedene Signale erfolgen, wie Pathogene, endogene Signale oder Signale der zellulären Umgebung (Rathinam et al., 2012). Mögliche Signale der zellulären Umgebung können beispielsweise zellulärer Stress, Zellverletzungen (Mariathasan et al., 2006; Yamasaki et al., 2009) oder auch ein erhöhtes Vorkommen von Harnsäurekristallen im Rahmen der Gicht sein (Martinon et al., 2006, 2009).

Mehreren Mechanismen ist hierbei eine Erhöhung der extrazellulären ATP-Konzentration gemein. Diese kann z. B. durch porenbildende bakterielle Toxine, die Verletzung oder Zerstörung von Zellen oder die gezielte Ausschüttung, durch z. B. Endothelzellen oder Makrophagen, bedingt sein (Fitz, 2007; Cauwels et al., 2014). Extrazelluläres ATP kann an den ionotropen, ATP-sensitiven P2X7-Rezeptor binden, welcher unter anderem auf Zellen des angeborenen Immunsystems, wie Makrophagen und Monozyten, exprimiert wird (Surprenant et al., 1996). Diese Bindung führt unter anderem zu einem Ausstrom von Kaliumionen aus der Zelle, was wiederum zu einer Aktivierung und Formierung des NLRP3-Inflammasoms führt (Grahames et al., 1999; Karmakar et al., 2016). Die intrazelluläre Konzentration von Kalium scheint hierbei für die Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms von großer Bedeutung zu sein, da eine Reduzierung der intrazellulären Kaliumkonzentration zu einer Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms führen kann (Muñoz-Planillo et al., 2013). Dem entgegen hemmt eine intrazellulär physiologische Kaliumkonzentration, von etwa 70 mM, die Aktivierung und Formierung des NLRP3-Inflammasoms (Pétrilli et al., 2007). Neben der P2X7-Rezeptor-abhängigen Aktivierung durch extrazelluläres ATP sind auch hiervon unabhängige Mechanismen, zur Reduktion der intrazellulären Kaliumkonzentration, bekannt. Als Beispiel ist hier Nigericin zu nennen. Hierbei handelt es sich um ein bakterielles Toxin, welches durch Porenbildung in der Zellmembran einen Kaliumausstrom bedingt (Perregaux & Gabel, 1994; Greaney et al., 2015). Weitere Mechanismen, denen eine mögliche NLRP3-Inflammasomaktivierung zugeschrieben wird, sind z. B. ROS oder eine phagolysosomale Membrandestabilisierung, welche durch eine Destabilisierung von Lysosomen zu einer Ausschüttung von Cathepsin-B führt (Martinon et al., 2009; Jin & Flavell, 2010). Die exakten Mechanismen der Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms sind bisher allerdings noch nicht abschließend geklärt.

1.5 IL-1 β

IL-1, von welchem sowohl eine IL-1 α -, als auch eine IL-1 β -Form bekannt ist, kann sowohl pro- als auch anti-inflammatorische Eigenschaften haben (Dinarello, 2018). Die IL-1-Familie besteht insgesamt aus 10 Mitgliedern mit 3 bekannten Unterfamilien (Dinarello, 2018). IL-1 war bereits 1977, noch vor Einführung der Interleukin-Nomenklatur, als *leukocytic pyrogen* im Zusammenhang mit der Auslösung von Fieber bekannt (Dinarello et al., 1977). Später postulierten Rosenwasser et al., dass es sich hierbei um dasselbe Molekül wie das damals als Leukozyten stimulierenden Faktor bekannte Produkt von Makrophagen handelte (Rosenwasser et al., 1979). Die Namensänderung zu IL-1 erfolgte 1980; 1985 konnte schließlich gezeigt werden, dass es zwei unterschiedliche Formen gibt, nämlich IL-1 α und IL-1 β (March et al., 1985; Dinarello, 1988).

IL-1 β kommt, anders als IL-1 α , nicht in ruhenden Zellen vor. Die Transkription von IL-1 β kann durch mikrobielle Produkte oder auch durch Zytokine wie beispielsweise TNF α , IL-18, aber auch IL-1 α oder IL-1 β selbst angestoßen werden (Dinarello et al., 1987). Zunächst entsteht hierbei ein inaktiver Vorläufer, das pro-IL-1 β , welches Inflammasom-abhängig durch eine aktivierte Caspase-1 zunächst in seine aktive Form gespalten wird (Tschopp et al., 2003; Martinon & Tschopp, 2007). Der größte Anteil an pro-IL-1 β befindet sich im Zytosol, wobei ein Teil in spezielle sekretorische Lysosomen verpackt wird (Andrei et al., 1999). Der durch die Aktivierung des purinergen P2X7-Rezeptors bedingte Ausstrom von Kalium aus der Zelle führt neben der Aktivierung und Formierung des Inflammasoms zudem dazu, dass die sekretorischen Lysosomen ihren Inhalt mit IL-1 β rasch an den Extrazellulärraum abgeben (Andrei et al., 1999; Dinarello, 2005). Aktuelle Studien halten die Gasdermin-abhängige Sekretion von IL-1 β , welche pyroptose-unabhängig erfolgen kann, heute allerdings für wichtiger (Evavold et al., 2018; Bulek et al., 2020).

IL-1 β wird hauptsächlich von Monozyten, Makrophagen und dendritischen Zellen produziert (Dinarello et al., 2012), aber auch Keratinozyten, Fibroblasten, B- und T-Lymphozyten sowie Gliazellen sind in der Lage, IL-1 β auszuschütten (Watkins et al., 1995; Copray, 2001; Ren & Torres, 2009). Es sind zwei IL-1-Rezeptoren (IL-1-R) bekannt. Sowohl IL-1 α als auch IL-1 β binden an den IL-1-Rezeptor Typ 1 (IL-1-RI) (McMahan et al., 1991; Ren & Torres, 2009). Eine Bindung an den IL-1-Rezeptor Typ 2 (IL-1-RII) ist zwar möglich, führt allerdings aufgrund des Fehlens einer intrazellulären

TIR-Domäne zu keinem zellulären Signal, weshalb es sich hierbei um einen Decoy-Rezeptor handelt (McMahan et al., 1991; Ren & Torres, 2009).

Das Wirkspektrum von IL-1 β ist sehr vielseitig. So kann es beispielsweise durch eine IL-1 β -vermittelte Produktion von Cyclooxygenase-1 (COX-1) zu einem Anstieg von Prostaglandin-E₂ (PGE₂) kommen (Bernheim, 1979; Kozak et al., 1998). PGE₂ wiederum bewirkt eine Veränderung der Einstellung der Sollwerttemperatur im Bereich des Hypothalamus und induziert so die Entstehung von Fieber (Bernheim, 1979; Kozak et al., 1998). Weiterhin kann IL-1 β die Produktion anderer Interleukine und Zytokine bewirken. Durch eine Induktion der IL-6-Produktion, wird die Produktion von Akute-Phase-Proteinen in der Leber und eine vermehrte Freisetzung von Granulozyten sowie Thrombozyten aus dem Knochenmark angeregt (Dinarello, 1996; Garlanda et al., 2013). Die Produktion von TNF- α hat einen Einfluss auf die Differenzierung von B-Zellen, die Reifung von Makrophagen und die Differenzierung von Monozyten zu dendritischen Zellen, wodurch es zu einer Modulation der Immunreaktion beiträgt (Witsell & Schook, 1992; Boussiotis et al., 1994; You et al., 2021). Durch IL-1 β kann es außerdem zu einer Aktivierung der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse kommen, was einen Anstieg an Cortisol zur Folge hat (Dinarello, 2005; Garlanda et al., 2013).

So essenziell die Rolle von IL-1 β im Rahmen von Immunreaktionen ist, so gefährlich kann eine überschießende oder unkontrollierte Synthese und Freisetzung für den Organismus sein. So kann eine unkontrollierte Ausschüttung von IL-1 β die Entstehung einer Sepsis mit möglichem letalem Ausgang oder die Entwicklung von Autoimmunerkrankungen bedingen (Dinarello, 2005; Dinarello et al., 2012). IL-1 β spielt eine Rolle bei zahlreichen chronischen Erkrankungen, wie beispielsweise Diabetes mellitus, Gicht, juveniler Arthritis oder dem familiären Mittelmeerfieber (Dinarello, 2005; Pascual et al., 2005; Ren & Torres, 2009). Auch im Rahmen der Entstehung und dem Fortschreiten maligner Erkrankungen spielen erhöhte IL-1 β -Spiegel eine Rolle. So zeigte sich beispielsweise bei Patienten mit Brustkrebs ein Zusammenhang zwischen der Höhe der IL-1 β -Spiegel und dem Metastasierungspotenzial der Tumorzellen (Nutter et al., 2014; Tulotta & Ottewell, 2018).

Die Notwendigkeit die IL-1 β -Ausschüttung streng zu regulieren ist daher für den Körper essenziell und kann auf verschiedenen Wegen erfolgen. Diese Regulation kann zum einen über PRR, wie dem TLR-4, die Regulation der Caspase-1 oder über die IL-1R ablaufen

(Symons et al., 1995; Dinarello, 2005; Netea et al., 2015; Karmakar et al., 2016). Der humane IL-1-Rezeptorantagonist (IL-1-RA) ist in der Lage, durch Bindung an den IL-1RI die Bindung sowohl von IL-1 α , als auch IL-1 β zu blockieren (Arend et al., 1985; Dinarello & Thompson, 1991). Der bereits oben beschriebene IL-1RII kann einen inflammasomunabhängigen Einfluss auf die Aktivität von IL-1 β haben (Schlüter et al., 2018). Mittlerweile wurden mehrere IL-1-Antagonisten-Präparate und Antikörper entwickelt, welche in der Behandlung von Erkrankungen erfolgreich eingesetzt werden. Beispielhaft zu nennen ist hierbei der rekombinante IL-1RA Anakinra, welcher 2001 erstmals zur Behandlung von rheumatoider Arthritis zugelassen wurde (Mertens & Singh, 2009b) und in den Folgejahren auch in der Behandlung des familiären Mittelmeerfiebers, juveniler Arthritis oder bei Morbus Still erfolgreich eingesetzt wurde (Dinarello & van der Meer, 2013; Vastert et al., 2019). Die Entwicklung dieser sog. *biologicals* ist auch weiterhin Gegenstand der Forschung.

1.5.1 Cholinerge Regulation der IL-1 β -Expression und -Sekretion

Acetylcholin (ACh) wurde 1921 durch Loewi als sog. Vagusstoff beschrieben und war der erste beschriebene Botenstoff im Bereich des Nervensystems (Loewi & Navratil, 1926; Tansey, 2006). 1929 wurde ACh erstmals durch Dale und Dudley aus der Milz von Ochsen und Pferden isoliert (Dale & Dudley, 1929). Neben seiner Fähigkeit als Neurotransmitter des zentralen und peripheren Nervensystems, ist ACh heute auch für immunmodulatorische Fähigkeiten bekannt (Borovikova et al., 2000; Kawashima, 2000). Es kann sowohl neuronaler als auch nicht neuronaler Herkunft sein, da beispielsweise Lymphozyten, vor allem CD4⁺ T-Lymphozyten, aber auch Makrophagen in der Lage sind, ACh zu produzieren (Kawashima et al., 2012).

Die immunmodulatorischen Fähigkeiten von ACh umfassen unter anderem die Reduktion der Expression von Zytokinen, wie TNF- α , IL-6 oder IL-1 β . Bei Makrophagen beispielsweise erfolgt dies über die Aktivierung von nikotinischen ACh-Rezeptoren (nAChR) (Bertrand, 2001; Wang et al., 2003). Später wurde von unserer Arbeitsgruppe gezeigt, dass die Aktivierung der nAChR zu einer Hemmung des ATP-sensitiven P2X7-Rezeptors führen kann, wodurch die Inflammasom-abhängige Aktivierung der Caspase-1 und letztlich somit die IL-1 β -Produktion gehemmt wird (Hecker et al., 2015; Richter et al., 2016). nAChR sind membranständige Rezeptoren, die aus verschiedenen Untereinheiten in Pentamerform zusammengesetzt sein können. Beim Menschen sind

insgesamt 16 verschiedene Untereinheiten vom α - ($\alpha 1-7$, $\alpha 9-10$) und β -Typ ($\beta 1-4$) sowie verschiedene homo- und heteropentamere Rezeptorformen bekannt (Bertrand, 2001; Wang et al., 2003). Neben einer ligandengesteuerten Ionenkanalfunktion, welche je nach Rezeptorzusammensetzung einen Ionenfluss von Natrium (Na^+), Kalium (K^+) oder Kalzium (Ca^{2+}) über die Zellmembran ermöglicht, sind auch metabotrope Funktionsweisen bekannt (Richter et al., 2016; Mashimo et al., 2021).

Hecker et al. konnten zeigen, dass neben den typischen Agonisten, wie Nikotin oder ACh auch Phosphocholin (PC) und Phosphatidylcholin eine Aktivierung der nAChR bewirken und somit ebenfalls durch Hemmung des ATP-abhängigen P2X7-Rezeptors eine Modulation der IL-1 β -Ausschüttung bewirken können (Hecker et al., 2015; Backhaus et al., 2017). Gemein ist diesen Agonisten eine Cholingruppe; Cholin selbst, aber auch PC-modifizierte Makromoleküle sind in der Lage einen immunmodulatorischen Effekt zu bedingen (Hecker et al., 2015; Richter et al., 2016). Die Modifizierungen mit PC machen sich, im Rahmen einer Infektion, auch einige eukaryotische Parasiten und Bakterien zu nutze. Bakterien, wie beispielsweise die Gram-positiven *Streptococcus pneumoniae* benötigen PC nicht nur für ihr Wachstum, auch eine Modifikation der Lipoteichonsäuren in ihrer Zellwand birgt, durch die dadurch bedingten immunmodulatorischen Effekte, Vorteile für die Umgehung der Immunantwort des Wirts (Kharat & Tomasz, 2006; Clark & Weiser, 2013). Die meisten Erreger können selbst kein PC synthetisieren, sondern sind auf das PC des Wirts angewiesen, welches im menschlichen Körper beispielsweise in der Zellmembran in Form von Phosphatidylcholin zu finden ist (Vance, 1990). Die anti-inflammatorische Wirkung von PC-modifizierten Makromolekülen bringt allerdings nicht nur negative Aspekte für den Wirt mit sich. So konnten Lovell et al. zeigen, dass die körpereigene Modifizierung von Plazentaproteinen mit PC den Fötus vor einer Erkennung durch das mütterliche Immunsystem schützt (Lovell et al., 2007). Des Weiteren sind Autoimmunerkrankungen, wie rheumatoide Arthritis in Ländern mit hoher Infektionsrate eukaryotischer Parasiten deutlich seltener, was unter anderem auf die PC-modifizierten Parasiten, wie Nematoden und deren Wirkung auf das Immunsystem des Wirts zurück geführt werden könnte (Harnett et al., 2008; Richter et al., 2018).

1.6 β -Nikotinamidadenindinukleotid

Nikotinamidadenindinukleotid (NAD) ist in jeder menschlichen Zelle präsent und wirkt an einer Reihe von essenziellen Stoffwechselwegen mit. Erstmals beschrieben wurde es vor mehr als 100 Jahren durch Harden und Young (Harden et al., 1906; Harden & Young, 1908). NAD kann in einer α - und einer β -Form vorliegen, wobei die Position der Nikotinamidgruppe am C1-Atom des Riboserings über die Form des Stereoisomers entscheidet (Suzuki et al., 1967). Es besteht aus den beiden Nukleotiden, Nikotinamid und Adenin, welche über ihre jeweiligen Phosphatgruppen miteinander verbunden sind. Die aktive und hauptsächlich in der Natur vorkommende Form ist das β -Nikotinamidadenindinukleotid (β -NAD) (Suzuki et al., 1967; Oppenheimer & Kaplan, 1975).

NAD wirkt als Redox-Vermittler, wird zur Proteinmodifikation verwendet und dient als Vorläufer für einige *messenger* Moleküle (Houtkooper et al., 2010; Nikiforov et al., 2015). Es nimmt großen Einfluss auf den Energiehaushalt der Zellen, ist an der Glykolyse im Zytosol sowie an der β -Oxidation und dem Citratzyklus in den Mitochondrien beteiligt, wobei es von NAD^+ zu NADH reduziert wird (Hoek & Rydström, 1988; Houtkooper et al., 2010; Kincaid & Berger, 2020). Im Rahmen der Atmungskette kommt es an der inneren Mitochondrienmembran wieder zu einer Oxidierung von NADH zu NAD^+ , wodurch ATP gewonnen wird (Hoek & Rydström, 1988; Houtkooper et al., 2010; Kincaid & Berger, 2020). Neben seiner Rolle als Coenzym für Oxidoreduktasen im Rahmen von Redoxreaktionen stellt β -NAD ein Substrat für vier verschiedene Enzymklassen dar. Hierzu zählen die Adenosindiphosphat (ADP)-Ribosetransferase (ART) und Poly-ADP-Ribosepolymerase (PARP), sowie die zyklische ADP-Ribose Synthase (cADP-Synthase) und die Sirtuine (SIRT) (Belenky et al., 2007). Im Rahmen der post-translationalen Proteinmodifikation wird ADP-Ribose durch die ART über β -NAD auf Aminosäuren übertragen. Die β -NAD-abhängige Bildung von ADP-Ribosepolymeren, durch die PARP, hat zudem einen Einfluss auf den programmierten Zelltod und die Erkennung von Desoxyribonukleinsäure (DNA)-Schäden (Schreiber et al., 2006). Die cADP-Synthase, zu welcher die Glykohydrolase CD38 zählt, nutzt β -NAD zur Synthese von zyklischer ADP-Ribose, welche eine Inositoltriphosphat (IP_3)-unabhängige Ausschüttung von Ca^{2+} aus intrazellulären Speichern bedingen kann. (Kim et al., 1993). Die dritte Gruppe der β -NAD-abhängigen Enzyme sind die SIRT; von ihnen sind beim Menschen insgesamt sieben Formen bekannt (Sauve et al., 2006).

Hierbei handelt es sich um Proteindeacetylasen, welche unter anderem Einfluss auf die reversible Acetylierung von Histonen nehmen können und so zur Aktivierung der Transkription und Bildung von Proteinen führen (Sauve et al., 2006; Belenky et al., 2007). Die SIRT haben zudem einen Einfluss auf die Aktivität und Bildung des NLRP3-Inflammasoms. So kann SIRT3 NAD-abhängig zu einer Reduktion von ROS in den Mitochondrien führen und dadurch die Aktivität des NLRP3-Inflammasoms dämpfen (Traba et al., 2015). SIRT2 kann zudem, durch β -NAD-abhängige Deacetylierung von α -Tubulin, f inhibierend in Transportprozesse eingreifen, welche für die Inflammasombildung nötig sind (Misawa et al., 2013).

Im Rahmen von Redoxreaktionen wird β -NAD von seiner oxidierten Form (NAD^+) in seine reduzierte Form (NADH) umgewandelt, während seine Gesamtkonzentration konstant bleibt. Bei seiner Beteiligung an Nicht-Redoxreaktionen wird β -NAD allerdings verbraucht, was eine stetige Bereitstellung erfordert (Di Stefano & Conforti, 2013).

Die primäre Synthese von NAD benötigt als Ausgangsstoff die essentielle Aminosäure L-Tryptophan, welche aus der Nahrung aufgenommen werden muss (Bender, 1983). Die *de novo*-Synthese macht allerdings nur einen kleinen Teil der NAD-Herstellung aus, der größte Anteil wird durch Rückgewinnung von zuvor in verschiedenen Stoffwechselprozessen verbrauchtem NAD bereitgestellt. In diesen *salvage pathways* dienen Nikotinamid, Nikotinsäure, Nikotinamid-Ribosid, sowie Nikotinsäure-Ribosid als Substrate (Jacobson, 1995; Rongvaux et al., 2003; Houtkooper et al., 2010). Diese Substrate werden begrifflich heutzutage als Vitamin B3 zusammengefasst (Magni, 2008). Der größte Anteil wird einem Herstellungsweg, der Nikotinsäure als Basis nutzt, zugeschrieben (Preiss & Handler, 1958). Er schließt die Dinukleotidbildung sowie die Amidierung des Nikotinsäureanteils mit ein und wird nach den Erstbeschreibern auch als Preiss-Handler *pathway* bezeichnet (Preiss & Handler, 1958).

Auf Grund der wichtigen Rolle des β -NAD im Rahmen der Energiegewinnung und der Signalverarbeitung von Zellen, können Änderungen der β -NAD-Konzentration einen großen Einfluss auf die metabolische Effektivität und die Funktion von Zellen haben (Sultani et al., 2017). Physiologisch unterliegen die β -NAD-Konzentrationen einer zirkadianen Rhythmik (Ramsey et al., 2009) und korrelieren positiv mit körperlicher Bewegung und Kalorienrestriktion (Chen et al., 2008; Cantó et al., 2009). Unter physiologischen Bedingungen liegt die extrazelluläre β -NAD-Konzentration in einem

submikromolaren Bereich (O'Reilly & Niven, 2003), während die intrazelluläre Gesamtkonzentration deutlich höher, zwischen 200 und 500 μM , liegt (Yang & Sauve, 2016). Höhere extrazelluläre Konzentrationen können sich im Rahmen von Zellzerstörung zeigen (Nikiforov et al., 2015). Unter zellulärem Stress oder im Rahmen von Entzündungsreaktionen können Zellen allerdings auch aktiv NAD ausschütten (Nikiforov et al., 2015).

Für extrazelluläres β -NAD wurden bisher sowohl pro- als auch anti-inflammatorische Effekte beschrieben. Hierbei kann β -NAD, beispielsweise als Agonist, an den P2Y-Rezeptoren P2Y₁ und P2Y₁₁ wirken (Moreschi et al., 2006; Mutafova-Yambolieva et al., 2007). P2Y-Rezeptoren sind G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, von welchen beim Menschen 8 Subtypen existieren (Moreschi et al., 2006; von Kügelgen & Hoffmann, 2016). Bei Bindung an G_q-Proteine aktivieren sie die Phospholipase-C, was zu einer Erhöhung der IP₃-Konzentration und schließlich zu einer vermehrten Mobilisierung von intrazellulärem Ca²⁺ führt (von Kügelgen & Hoffmann, 2016). Wird hingegen das G_s-Protein gebunden, kommt es zu einer Aktivierung der Adenylatcyclase, was zu einer vermehrten Bildung von zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP) und schlussendlich einer erhöhten intrazellulären Ca²⁺-Konzentration führen kann (von Kügelgen & Hoffmann, 2016). Der P2Y₁-Rezeptor vermittelt seine Signalkaskade über G_q-Proteine, während der P2Y₁₁-Rezeptor sowohl G_q-als auch G_s-Proteine binden kann (Moreschi et al., 2006). Durch Bindung von β -NAD an den P2Y₁- und den P2Y₁₁-Rezeptor, kann beispielsweise eine Aktivierung von Granulozyten erfolgen (Moreschi et al., 2006). Des Weiteren kann, im Rahmen von Infektionen, durch vermehrtes *rearrangement* des Zytoskeletts, ein schützender Einfluss auf die endotheliale Barrierefunktion vermittelt werden (Umapathy et al., 2010).

Extrazellulärem β -NAD wird zudem eine neuromodulatorische Wirkung zugeschrieben. An glatten Muskelzellen des Darms kommt es, beispielsweise durch extrazelluläres β -NAD, welches in diesem Fall als inhibitorischer Neurotransmitter fungiert und aktiv durch neurosekretorische Zellen ausgeschüttet wird, zu einer Hyperpolarisation der glatten Muskelzellen (Mutafova-Yambolieva et al., 2007; Hwang et al., 2011). Alefishat et al. konnten zeigen, dass extrazelluläres β -NAD abhängig vom Effektorrezeptor an arteriellen Gefäßen von Ratten und Schweinen, sowohl zu einer Vasokonstriktion, als auch einer Vasodilatation führen kann (Alefishat et al., 2015).

Das mögliche therapeutische Potenzial von β -NAD und seinen Vorläufern ist Gegenstand aktueller Forschung. An Tieren konnten bereits gute therapeutische Ergebnisse für Erkrankungen, wie Alzheimer, Diabetes mellitus, Krebs oder auch Alterungsprozesse im Allgemeinen gezeigt werden (Houtkooper et al., 2010; Yang & Sauve, 2016). So führte beispielsweise die Erhöhung der β -NAD-Konzentration zu einer verminderten Toxizität des sich im Rahmen der Alzheimer-Erkrankung ablagernden β -Amyloids in der Maus (Gong et al., 2013). Andere Studien zeigten, dass die β -NAD-induzierte Erhöhung der Aktivität von SIRT3 und SIRT7 die Alterung von hämatopoetischen Stammzellen aufhalten konnte (Brown et al., 2013; Mohrin et al., 2015). Eine heute nur noch selten vorkommende Erkrankung des Menschen namens Pellagra, bei der es zu Symptomen, wie Demenz, Dermatitis und Diarrhoe kommen kann, geht mit einer zu geringen Aufnahme von Tryptophan oder Vitamin B3 und somit deutlich erniedrigten β -NAD-Konzentrationen einher (Hegyi et al., 2004). Pellagra kann durch die Zufuhr von Vitamin B3 effektiv behandelt und verhindert werden und zeigt sich heute meist nur bei ausgeprägter Mangelernährung (Hegyi et al., 2004).

Inwieweit die bereits am Tier gezeigten therapeutischen Erfolge durch β -NAD und seiner Vorläufer auch auf den menschlichen Organismus übertragbar sind, gilt es in Zukunft noch zu untersuchen.

1.7 Fragestellung und Hypothesen der Dissertation

Vorarbeiten meines Kollegen Dr. med Sebastian Hiller zeigten, dass in einer monozytären Zelllinie, β -NAD, durch Bindung an den P2Y₁- und den P2Y₁₁-Rezeptor, einen inhibitorischen Einfluss auf die ATP-vermittelte Freisetzung von IL-1 β hat (Hiller et al., 2018). Im Rahmen dieser Signaltransduktion kommt es zu einer Aktivierung der nAChR, welche eine Inhibition des ATP-abhängigen P2X7-Rezeptors zur Folge hat. Wichtig für den Wirkmechanismus sind die nAChR-Untereinheiten α 9, sowie α 7 und/oder α 10, wobei die Untereinheiten α 7 und α 10 funktionell redundant sind (Hiller et al., 2018). Amati et al. zeigten 2017 eine Chemokin-vermittelte Inhibition der ATP-abhängigen IL-1 β -Ausschüttung aus Monozyten. Ähnlich den P2Y_{1/11}-Rezeptoren, handelte es sich bei den Chemokin-Rezeptoren, an welche die untersuchten Chemokine CCL3, CCL4 und CCL5 binden, um G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (Amati et al., 2017). Die Chemokin-vermittelte Signaltransduktion schließt dabei die Aktivierung der kalziumunabhängigen

Phospholipase A2 (iPLA2 β ; PLA2G6) ein sowie die Ausschüttung eines löslichen nikotinischen Agonisten, welcher extrazellulär zu einer Aktivierung des nAChR führt (Amati et al., 2017).

Aus diesen Vorarbeiten ergibt sich die Fragestellung dieser Dissertation: Wie erfolgt die Signaltransduktion zwischen den G-Protein-gekoppelten Rezeptoren P2Y₁ und P2Y₁₁ und den nAChR?

Zunächst soll der durch Hiller et al. gezeigte inhibitorische Effekt von β -NAD auf die IL-1 β -Ausschüttung reproduziert und zudem an primären humanen Zellen überprüft werden. Anschließend sollen folgende Hypothesen geprüft werden:

1. Die iPLA2 β (PLA2G6) ist an der β -NAD-vermittelten Signaltransduktion beteiligt.
2. β -NAD induziert die Ausschüttung eines löslichen bioaktiven Faktors, der als Agonist an nAChRs fungiert.
3. Die nAChR-Untereinheiten α 9 ist für die Wirkung des löslichen Faktors von essenzieller Bedeutung.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien und Geräte

2.1.1 Reagenzien

Reagenz	Hersteller
2-Mercaptoethanol p.a. $\geq 99.0\%$	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Deutschland, M6250
Acrylamidlösung, Gel 30 (37,5:1) 30 % Acrylamid-, Bisacrylamid-Stammlösung im Verhältnis 37,5:1	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland, 3029.2
Amersham Hyperfilm™ ECL	Sigma-Aldrich Chemie, GE28-9068-35
Ammoniumperoxodisulfat (APS) p.a. $\geq 98\%$	Carl Roth, 9592.3
Anti-Phospholipase-A2-Antikörper, produziert in der Maus	Sigma-Aldrich Chemie, SAB4200129
Aqua destillata (Aqua dest.), Ecolav®	B. Braun, Melsungen, Deutschland, 387872
Arachidonyl-Trifluoromethylketon (ATK)	Enzo Life Science, Lausen, Österreich, BML -ST335-0010
ArIB[V11L,V16D]	Im Rahmen einer Kooperation zur Verfügung gestellt von J. Michael McIntosh, Salt Lake City, UT, USA
β -Nikotinamid-Adenindinukleotid (β -NAD)	Sigma-Aldrich Chemie, N8410
Benzoylbenzoyl-Adenosintriphosphat, 2'(3')-O-(4-Benzoylbenzoyl)-Adenosin 5'-Triphosphat-Triethylammonium-Salz (BzATP)	Jena Bioscience, Jena, Deutschland, NU-1620-5
Bromoenollakton (BEL)	Enzo Life Science, ALX-270-195-M005
CytoTox 96® Non-Radioactive Cytotoxicity Assay	Promega, Madison, WI, USA, G1780
Di-Natrium-Hydrogenphosphat (Na_2HPO_4)	Merck Chemicals, Darmstadt, Deutschland, 1065861000
<i>enzyme-linked immuno sorbent assay</i> (ELISA): Human Interleukin-1 β Quantikine	Bio-Techne/ R+D Systems, Minneapolis, MN, USA, SLB50

Essigsäure p.a. $\geq 95,9$ %	Carl Roth, T179.4
Ethanol p.a. $\geq 99,8$ %	Sigma-Aldrich Chemie, 32221M
fetales Kälberserum (FCS)	Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland, S 0115
Glycerin p.a. $\geq 99,5$ %, wasserfrei	Carl Roth 3783.1
Glycin	Carl Roth, 3790.2
Heparin-Natriumlösung 25000 I.E. / 5 ml	Ratiopharm, Ulm, Deutschland
L-Glutaminlösung 200 mM	Thermo Fisher Scientific Life Technologies, Darmstadt, Deutschland, 25030081
Lipopolysaccharid (LPS) E. coli Type 026: B6	Sigma-Aldrich Chemie, L8274
Lumi-Light Western-Blotting-Substrat	Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland, 12015200001
Meerrettichperoxidase (HRP)–markierte polyklonale anti-Kaninchen- Immunglobulin-Antikörper aus der Ziege	Dako, Hamburg, Deutschland, P044801-2
HRP-markierte polyklonale anti-Maus- Immunglobulin-Antikörper aus dem Kaninchen	Dako, P026002-2
Methanol p.a. $\geq 99,8$ %	Sigma-Aldrich Chemie, 32213
Milchpulver (MP)	Carl Roth, T145.3
Monoklonaler anti- β -Aktin-Antikörper produziert in der Maus, Klon AC-15	Sigma-Aldrich Chemie, A5441
MRS2279	Tocris Bioscience, Bristol, UK, 2158
NaCl-Lösung 0,9 %, Ecolav®	B. Braun, 387872
Natriumdodecylsulfat (SDS) Ultra Pure, $\geq 99,5$ %	Carl Roth, 2326.2
NF340	Tocris Bioscience, 3830

Nucleofector™ Cell Line Kit, Amaxa™	Lonza, Stuttgart, Deutschland, VCA-1004
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)	PAA Laboratories, Cölbe, Deutschland, H15-002
Pierce™ BCA Protein Assay Kit	Thermo Fisher Scientific Life Technologie, 23227
Precision Plus Protein™ Dual Color Standards	Bio-Rad Laboratories, München, Deutschland, 1610374
Protease-Inhibitor-Tablette, EDTA-frei	Roche Diagnostics, 11836170001
RgIA4	Im Rahmen einer Kooperation zur Verfügung gestellt von J. Michael McIntosh, Salt Lake City, UT, USA
Rinderserumalbumin (BSA), Albumin Bovine Fraction V, pH 7.0	Serva Electrophoresis, Heidelberg, Deutschland, 11930.04
Röntgenentwicklerkonzentrat	Adefo Chemie, Neu-Isenburg, Deutschland, 00009
Röntgenfixiererkonzentrat	Adefo Chemie, 00062
Roti®-Block	Carl Roth, A151.1
RPMI 1640-Medium	Thermo Fisher Scientific Life Technologies, 1175093
Salzsäure (HCl) 1 n, p.a. ≥ 99,9 %	Carl Roth, 6792.1
HCl p.a. ≥ 25 %	Carl Roth, 6331.3
<i>small interfering RNA</i> (siRNA) iPLA2β, siRNA PLA2G6 On-Target plus Human Smart Pool	Dharmacon™ GE Healthcare Europe, Freiburg, Deutschland, SO-2388181G
siRNA On-Target plus non-targeting control pool	Dharmacon™ GE Healthcare Europe, D-001810-10-05
SuperSignal™ West Dura extended duration Substrat	Thermo Fisher Scientific Life Technologies, 34075

Tetramethylethyldiamin (TEMED) p.a. \geq 99 %	Carl Roth, 2367.3
Tromethamin (Tris) p.a. \geq 99,9 %	Carl Roth, 4855.2
Trypanblau-Lösung 0.4 %	Sigma-Aldriche Chemie, T8154
U937-Zelllinie	Leibniz-Institut DSZM - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig, Deutschland

Tabelle 1: **Reagenzien**

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial	Hersteller
Bluecap-Gefäß Polypropylengefäße 50 ml	BD Bioscience, San Jose, CA, USA, 352070
Immobilon-P Membran, PVDF, 0,45 μ m	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland, IPVH00010
Leucosep [®]	Greiner Bio-One
Einmalspritzen, Injekt [®] 20 ml, Luer Ansatz, exzentrisch	B. Braun, 4606205V
Mikroreaktionsgefäß 1,5 ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland, 72.690.001
Pipetten Cellstar 10 ml	Greiner Bio-One, 607107
Pipetten Eppendorf Reference 0,5-10 μ l/ 10-100 μ l/ 100-1000 μ l	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Pipettenspitzen Steril 10 μ l/ 100 μ l/ 1000 μ l Unsteril 10 μ l/ 200 μ l/ 1000 μ l	Biozym, Hessisch Oldendorf, Deutschland, 770010/ 770100/ 770400 Sarstedt, 70.762.010/ 70.760.012/ 70.1115
Zellkulturflaschen 75 cm ²	Sarstedt, 83.1813.502
Zellkulturplatten 12-well, 24-well, 96- well	Greiner Bio-One, 665180/ 662160/ 655983

Tabelle 2: **Verbrauchsmaterialien**

2.1.3 Geräte

Gerät	Hersteller
Brutschrank Heracell™ 240i Kohlenstoffdioxid (CO ₂)- Inkubator	Thermo Fisher Scientific Life Technologies
Fluostar Optima®	BMG Labtech, Offenburg, Deutschland
Gewebemühle, Mixer Mill MM301	Retsch, Haan, Deutschland
Mikroskop Labovert	Leitz, Wetzlar, Deutschland
Mikroskop Olympus BX 51	Olympus, Hamburg, Deutschland
Nucleofactor device II	Lonza Cologne, Köln, Deutschland
pH-Meter, Ultra Basic UB-10	Denver Instruments, Göttingen, Deutschland
Röntgenkassette	Dr. Goos-Suprema, Heidelberg, Deutschland
Sicherheitswerkbank Zellkultur Class II ENA 2	Nuaire, Plymouth, MN, USA NU S437 500E
Ultraschallbad Sonorex Super RK102H	Bandelin, Berlin, Deutschland
Vortex Mixer REAX 2000	Heidolph, Schwabach, Deutschland
Wasserbad	Köttermann, Uetze/Hänigsen, Deutschland
Zählkammer nach Neubauer 0,1 mm 0,0025 mm ²	Karl Hecht "Assistent", Altnau, Schweiz
Zentrifuge Rotina 200R, 380R, 420R	Hettich, Tuttlingen, Deutschland

Tabelle 3: Geräte

2.1.4 Software

Produkt	Firma
Freeform	Apple, Cupertino, CA, USA
Microsoft Word, Excel, Powerpoint (2013)	Microsoft, Redmond, WA, USA
SPSS Statistics 21 Statistikprogramm	IBM, München, Deutschland

Tabelle 4: Software

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkulturexperimente mit U937-Zellen.

Für die Zellkulturexperimente wurde die humane Lymphomzelllinie U937 verwendet, welche ursprünglich aus einem 37 jährigen, männlichen Patienten isoliert wurde (Sundström & Nilsson, 1976). Es handelt sich dabei um eine nicht adhärenente, monozytäre Zelllinie. Die Zellen wurden in 40 ml RPMI 1640-Medium mit 10 % fetalem Kälberserum und 2 mM L-Glutamin bei 37 Grad Celsius (°C) und 5 % Kohlenstoffdioxid (CO₂) in einem Brutschrank kultiviert. Ein Austausch des Mediums und Splitten der Zellen fand

dreimal pro Woche unter sterilen Bedingungen statt. Zu Beginn der Experimente wurden die Zellsuspensionen den Zellkulturflaschen entnommen und für 8 Minuten, bei 20 °C, 200 g, in einem Bluecap-Gefäß zentrifugiert. Anschließend wurden die Überstände abgegossen und das Zellpellet mit 10 ml frischem Medium resuspendiert. Zur Zellzahlbestimmung wurde eine 1:10 Verdünnung mit Trypanblau-Lösung und Zellsuspension hergestellt und die Zellen mittels einer Zählkammer nach Neubauer gezählt. Für die folgenden Zellkulturexperimente wurden die Zellsuspensionen auf 1×10^6 U937-Zellen pro ml Medium eingestellt. Alle Experimente fanden in einer Sicherheitswerkbank der Klasse II unter sterilen Bedingungen statt.

2.2.1.1 Versuchsaufbau

Zunächst wurden pro Well 1×10^6 Zellen in einem ml auf Zellkulturplatten ausgesät und ein Teil der Zellen mit LPS (1 µg/ml Zellsuspension) für 5 Stunden bei 37 °C und 5 % CO₂ vorstimuliert. Im Anschluss folgte eine weitere 30-minütige Inkubation der U937-Zellen mit 100 µM 2'(3')-O-(4-Benzoylbenzoyl)-Adenosin 5'-Triphosphat-Triethylammonium-Salz (BzATP) in An- oder Abwesenheit von 1 mM β-NAD. Des Weiteren wurden Inhibitoren für verschiedene Formen der iPLA2β eingesetzt. Hierbei wurden Arachidonyl-Trifluoromethylketon (ATK), welches sowohl die kalziumabhängige- (cPLA2), als auch die kalziumunabhängige Form der iPLA2β hemmt, und Bromoenollakton (BEL), ein Inhibitor der iPLA2β, verwendet (Street et al., 1993; Ackermann et al., 1995). Als Inhibitor des Rezeptors P2Y₁ wurde MRS2279 verwendet (Boyer et al., 2002). Als Inhibitor des P2Y₁ wurde NF340 verwendet (Dreisig & Kornum, 2016). Als Agonisten der nikotinischen Acetylcholin-Rezeptoren wurde ArIB[V11L,V16D], selektiv für die Untereinheit α7 sowie RgIA4, selektiv für die α9α10-Untereinheiten, verwendet (Whiteaker et al., 2007; Romero et al., 2017). Alle verwendeten Stoffe wurden zuvor in phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) gelöst (Tabelle 5). Ausgenommen hiervon war BEL, welches zunächst als eine 10 mM Stammlösung in Ethanol hergestellt wurde. 30 Minuten vor der Applikation auf die U937-Zellen, wurde dann die entsprechende Menge der Stammlösung unter der Sicherheitswerkbank eingedampft. Anschließend wurde der auskristallisierte Stoff mit RPMI 1640-Medium erneut gelöst und schließlich in die entsprechenden Wells pipettiert. Bei der Zugabe der Stoffe wurden stets die Inhibitoren als Erstes, gefolgt vom β-NAD und das BzATP als Letztes auf die U937-Zellen gegeben (Abbildung (Abb.) 1 und 2). Zum Erhalt der zellfreien Überstände wurden nach der Durchführung der Zellstimulation

die Zellkulturplatten für 8 Minuten, bei 4 °C, 500 g zentrifugiert und jeweils 700 µl der Überstände in einem ausreichenden Abstand zum Zellpellet abgenommen. Es erfolgte eine Aufbewahrung der Überstände bei -20 °C, um eine Messung der IL-1β-Konzentration und der LDH-Aktivität anschließen zu können.

Tabelle 5: Reagenzien und deren Konzentrationen in der Zellsuspension

Reagenz	Konzentrationen in der Zellsuspension
LPS	1 µg/ml
BzATP	100 µM
β-NAD	1 mM
Inhibitoren der iPLA2β:	
ATK	50 µM
BEL	50 µM
Inhibitoren der P2Y-Rezeptoren:	
MRS2279	0,5 mM
NF340	1 mM
Antagonisten der nAChR-Untereinheiten:	
ArIB[V11L,V16D]	500 nM
RgIA4	200 nM

ATK, Arachidonyl-Trifluoromethylketon; BEL, Bromoenollakton; BzATP, 2'(3')-O-(4-Benzoylbenzoyl)Adenosin-5'-Triphosphat-Triethylammonium-Salz; iPLA2β, kalziumunabhängige Phospholipase A2β; LPS, Lipopolysaccharid; nAChR, nikotinischer Acetylcholinrezeptor, β-NAD, β-Nikotinamid-Adenindinukleotid.

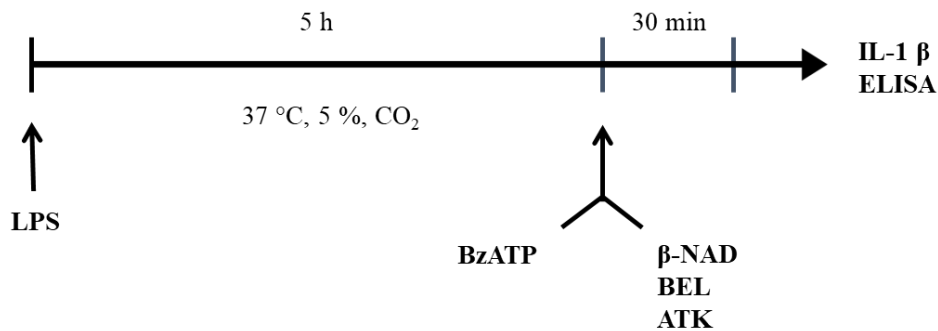


Abbildung 1: **Zeitlicher Ablauf des Versuchs.**

Chronologischer Überblick der Stimulation der U937-Zellen bis zur Entnahme der zellfreien Überstände, an welche sich die Messung der IL-1 β -Konzentration im ELISA und der LDH-Aktivität im CytoTox 96[®] Non-Radioactive Cytotoxicity Assay anschloss.

ATK, Arachidonyl-Trifluoromethylketon; BEL, Bromoenollakton; BzATP, 2'(3')-O-(4-Benzoylbenzoyl)Adenosin-5'-Triphosphat-Triethylammonium-Salz; CO₂, Kohlenstoffdioxid; ELISA, *enzyme-linked immuno sorbent assay*; h, Stunden; IL-1 β , Interleukin-1 β ; LDH, Laktatdehydrogenase; LPS, Lipopolysaccharid; min, Minuten; β -NAD, β -Nikotinamidadeninukleotid; °C, Grad Celsius

2.2.2 Herstellung und Verwendung von konditioniertem Medium.

Zur Herstellung des konditionierten Mediums wurden mit LPS-vorstimierte U937-Zellen in Abwesenheit von BzATP und alleiniger Anwesenheit von β -NAD stimuliert. Die Proben wurden nach den oben genannten Inkubationszeiten für 8 Minuten bei 20 °C, 500 g zentrifugiert und die zellfreien Überstände (das konditionierte Medium), abgenommen. Das konditionierte Medium wurde bei diesen Versuchen nach der 5-stündigen Inkubationszeit mit LPS und vor Zugabe der weiteren Reagenzien eingesetzt. Hierzu wurden die Zellkulturplatten für 8 Minuten bei 20 °C und 500 g zentrifugiert. Anschließend wurde 80 % des zellfreien Überstandes abgenommen und durch konditioniertes Medium ersetzt. Alle weiteren Schritte folgten dem bereits beschriebenen Schema (Abb. 2).

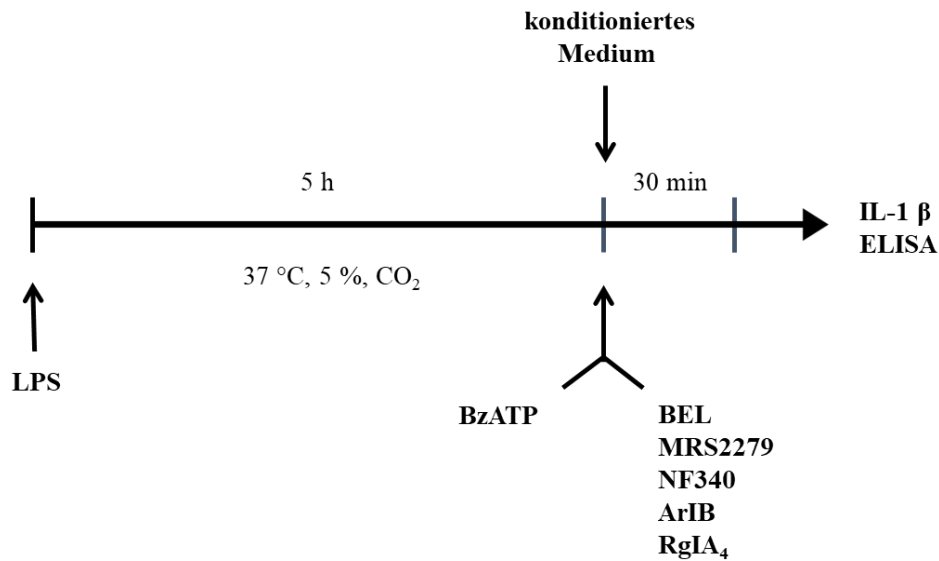


Abbildung 2: Zeitlicher Ablauf des Versuchs mit konditioniertem Medium.

Chronologischer Überblick der Stimulation der U937-Zellen und dem Einsatz des konditionierten Mediums, bis zur Entnahme der zellfreien Überstände, an welche sich die Messung der IL-1 β -Konzentration im ELISA und der LDH-Aktivität im CytoTox 96[®] Non-Radioactive Cytotoxicity Assay anschloss.

ATK, Arachidonyl-Trifluoromethylketon; BEL, Bromoenollakton; BzATP, 2'(3')-O-(4-Benzoylbenzoyl)Adenosin-5'-Triphosphat-Triethylammonium-Salz; CO₂, Kohlenstoffdioxid; ELISA, *enzyme-linked immuno sorbent assay*; h, Stunden; IL-1 β , Interleukin-1 β ; LDH, Laktatdehydrogenase; LPS, Lipopolysaccharid; min, Minuten; β -NAD, β -Nikotinamidadenindinukleotid; °C, Grad Celsius

2.2.3 Herunterregulation der iPLA2 β (PLA2G6)-Expression mit small interfering RNA.

In dieser Arbeit sollte mittels der *small interfering ribonucleic acid* (siRNA)-Technik die *messenger* Ribonukleinsäure (mRNA)-Expression der *PLA2G6* herunterreguliert werden. Für die Transfektion der siRNA wurde die Nukleofektions-Technik von Amaxa benutzt. Hierbei handelt es sich um eine nicht-virale Form der Transfektion, bei der, mittels Elektroporation, die eingesetzte siRNA in die Zellen transferiert wird. Die Transfektion wurde nach dem Protokoll des Nucleofektor Basis Kit von Amaxa durchgeführt. Bei der verwendeten siRNA handelte es sich, um die siRNA PLA2G6 On-Target plus Human Smart Pool. Um mögliche unspezifische Effekt der siRNA-Transfektion zu kontrollieren, wurde zusätzlich eine unspezifische siRNA, On-Target plus non-targeting control pool, als Negativkontrolle verwendet. Die U937-Zellen wurden mit 30 pmol siRNA pro 1 x 10⁶ Zellen transfiziert.

Die folgenden Experimente wurden nach 48-stündiger Inkubationszeit, sowohl mit nicht transfizierten U937-Zellen, mit unspezifischer siRNA transfizierten Zellen, als auch mit siRNA für *PLA2G6* transfizierten Zellen, nach dem oben bereits beschriebenen Schema, durchgeführt. Eine Analyse der Effizienz der Transfektionen mittels Western Blot-Verfahren wurde angeschlossen (siehe 2.2.4). Die Zellen wurden 48 Stunden nach der Transfektion zunächst für 8 Minuten, bei 20 °C, 500 g, zentrifugiert, in frischem Medium resuspendiert und gezählt. Anschließend wurden die Zellen mit einer Konzentration von 1×10^6 Zellen pro ml und Well ausgesät. Nach 5-stündiger Inkubation mit LPS (1 µg/ml Zellsuspension) folgten weitere 30 Minuten Inkubation in An- und Abwesenheit von 100 µM BzATP und 1 mM β-NAD. Nach 30 Minuten erfolgte die bereits beschriebene Entnahme der Überstände zur anschließenden Bestimmung der IL-1β-Konzentrationen und der Bestimmung der LDH-Aktivität in den Zellkulturüberständen (siehe 2.2.6). Die Zellpellets wurden mit je 1 ml PBS gewaschen und erneut für 8 Minuten bei 4 °C, 500 g zentrifugiert. Nachdem möglichst der gesamte Überstand abgenommen wurde, wurden die Zellpellets bei -20 °C eingefroren und im Folgenden eine SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und ein Western Blot-Verfahren durchgeführt (siehe 2.2.4).

2.2.4 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Western Blot-Verfahren.

Die in den siRNA Experimenten erhaltenen Zellpellets sollten mittels Natriumdodecylsulfat (SDS)-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Western Blot-Verfahren analysiert werden, um die Effizienz der Transfektion zu überprüfen. Die Proben wurden zunächst, mit dem Ziel ein Proteinextrakt herzustellen, aufgearbeitet. Hierzu wurden die Zellpellets in 50 µl einer Pufferlösung (P1) (Tabelle 6) pro 1×10^6 Zellen aufgenommen und eine Metallkugel hinzugegeben. Die Zellen wurden dann, in einer Gewebemühle, für 5 Minuten bearbeitet. Anschließend wurden die Proben 5 Minuten, bei 20 °C, 5340 g zentrifugiert, für 10 Minuten auf 95 °C erhitzt und anschließend nochmals für 14 Minuten, bei 20 °C, 18620 g, zentrifugiert. Um die Konzentration des Gesamtproteins in den Proben zu messen, wurde das Pierce BCA Protein Assay Kit nach Angaben des Herstellers verwendet. Für die Proteinkonzentrationsmessung wurde als Standardreihe eine Verdünnungsreihe, aus in P1 gelöstem Rinderserumalbumin (BSA) (50 mg/ml), P1 und Natriumchlorid (NaCl)-Lösung (0,9 %), mit folgenden Konzentrationen angesetzt: 50 µg/ml, 40 µg/ml, 20 µg/ml,

10 µg/ml, 5 µg/ml, 2,5 µg/ml, 1,25 µg/ml und 0 µg/ml. Jede Probe wurde dreifach bestimmt. Die Proben wurden im Verhältnis 1:4 mit P1 und folgend im Verhältnis 1:20 mit Natriumchlorid (NaCl)-Lösung (0,9 %) verdünnt. Die Konzentrationsmessung des Gesamtproteins der Versuchsproben, wurde in Anwesenheit von Working-Reagenz des Pierce BCA Protein Assay Kit durchgeführt (Verhältnis 1:2) und die Farbintensität in der Lösung im Fluostar Optima quantifiziert. Die zuvor beschriebene Standardreihe diente der Erstellung einer Standardkurve, die im Vergleich mit den Extinktionen der Versuchsproben auf deren Gesamtproteinkonzentration rückschließen ließ.

Zur Durchführung der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese wurden die Proben mit zwei Pufferlösungen (P1 und P2) so aufbereitet, dass jede Probe einen Proteingehalt von 1 µg/µl enthielt. Dabei entsprachen 50 % der Lösung der Pufferlösung 2 (P2) (Tabelle 6), die Menge an Probenlösung wurde aus den gemessenen Proteinkonzentrationen errechnet und mit Pufferlösung 1 (P1) auf 100 % ergänzt.

Lösungen	Konzentrationen in der Lösung
Pufferlösung 1 (P1)	Tris/ HCl 62,5 mM SDS 81 mM 1 Proteaseinhibitortablette
Pufferlösung 2 (P2)	Tris / HCl 62,5 mM SDS 81 mM Glycerin 22 mM 2-Mercaptoethanol 1,02 mM 1 Proteaseinhibitortablette

Tabelle 6: **Zusammensetzung der Pufferlösungen P1 und P2**

HCl, Salzsäure; SDS, Natriumdodecylsulfat; Pufferlösung 1, P1; Pufferlösung 2, P2; Tris, Tromethamin

Bei der Durchführung der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese wurde ein 10 % Trenngel verwendet (Tabelle 7). Der Gellauf fand für 90 Minuten bei 120 V, 90 mA und 150 W mit je 10 µl Probelösung (\cong 10 µg Protein) pro Sammelgeltasche (Tabelle 7), in einer SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese-Kammer in Anwesenheit eines Gellaufpuffers, statt (Tabelle 8). Als Molekulargewichtsmarker wurde Precision Plus Protein™ Dual Color Standards verwendet.

Lösungen	Konzentrationen in der Lösung
Trenngel 10 %	1830 µl Aqua dest. 1080 µl Gelpuffer 1 1460 µl Acrylamidlösung 30 % 7,7 µl APS-Lösung 50 % 3 µl TEMED
Sammelgel	1350 µl Aqua dest. 790 µl Gelpuffer 2 312,5 µl Acrylamidlösung 30 % 5,62 µl APS-Lösung 50 % 4,5 µl TEMED
APS-Lösung 50 %	22 mM APS auf 10 ml Aqua dest.

Tabelle 7: Zusammensetzung der Gele für die SDS-Gelelektrophorese

APS, Ammoniumperoxodisulfat; Aqua dest, Aqua destillata; TEMED, Tetramethylethylendiamin

Lösungen	Konzentrationen in der Lösung
Gelpuffer 1	Tris 50 mM (pH 6,8) SDS 1,4 mM
Gelpuffer 2	Tris 1,5 M (pH 8,8) SDS 14 mM
Gellaufpuffer	Tris 25 mM Glycin 192 mM SDS 3,5 mM

Tabelle 8: Zusammensetzungen der Puffer für die SDS-Gelelektrophorese

SDS, Natriumdodecylsulfat; Tris, Tromethamin

Im Anschluss wurde ein Western Blot durchgeführt, bei dem die zuvor nach Molekulargewicht getrennten Proteine, bei 90 mA in 90 Minuten in einem Transferpuffer, auf eine Immobilon-P-Membran übertragen wurden (Tabelle 9). Alle verwendeten Stoffe wurden, sofern dies nicht anders angegeben ist, in Aqua destillata (Aqua dest.) gelöst

Lösung	Zusammensetzung
Transferpuffer	Gelöst in einer Lösung aus Methanol und Aqua dest. im Verhältnis 1:5: Tris 25 mM Glycin 190 mM SDS 1,75 mM

Tabelle 9: **Zusammensetzung des Transferpuffers für das Western Blot-Verfahren**
Aqua dest., Aqua destillata; SDS, Natriumdodecylsulfat; Tris, Tromethamin

Mittels Antikörpern wurden im Folgenden sowohl die iPLA2, als auch das β -Aktin als Beladungskontrolle detektiert. Zur Detektion der iPLA2 wurde die Membran zunächst für eine Stunde getrocknet und dann für 1 Minute in Methanol, anschließen für 10 Minuten in PBS gewaschen. Im Anschluss wurde die Membran mit einer Lösung aus 5 % BSA in PBS (5 % BSA/PBS) für eine Stunde blockiert. Die Membranen wurden mit Antiphospholipase-A2-Antikörpern aus dem Kaninchen, 1:15.000 in 5 % BSA/PBS, 4 °C, über Nacht inkubiert. Darauf folgten vier 7-minütige Waschschrte mit phosphat-gepufferter Salzlösung mit Tween (PBST), gefolgt von einer 90-minütigen Inkubation mit Meerrettichperoxidase (HRP)-markierten, polyklonalen anti-Kaninchen-Immunglobulin-Antikörpern aus der Ziege, 1:5.000 in einer Lösung aus 2,5 % Milchpulver (MP) in PBST (2,5 % MP/PBST). Zuletzt folgten weitere 3 Waschschrte in PBST für je 10 Minuten und abschließend ein 10-minütiger Waschschrte mit PBS. Zur Detektion der an den Zweitantikörper gebundenen HRP, wurde das Lumi-Light Western Blotting-Substrat, nach Angaben des Herstellers, verwendet und auf Amersham Hyperfilm™ ECL, unter Verwendung von Röntgenentwickler und -fixierer, visualisiert.

Als Beladungskontrolle wurde β -Aktin nachgewiesen. Als Erstantikörper wurden monoklonale anti- β -Aktin-Antikörper aus der Maus, Klon AC-15, 1:100.000, in einer Lösung von 1 % Roti®-Block in PBST, verwendet. Als Zweitantikörper wurden HRP-markierte polyklonale anti-Maus-Immunglobulin-Antikörper aus dem Kaninchen, 1:5.000 in 2,5 % MP/PBST eingesetzt und die Membran hiermit eine Stunde inkubiert. Die Entwicklung erfolgte wie oben beschrieben.

2.2.5 Aufreinigung von humanen mononukleären Zellen des peripheren Blutes.

Die folgend beschriebenen Experimente wurden von der Ethikkommission Gießen genehmigt (Nr. 81/13). Von gesunden männlichen Spendern wurde 15 ml Blut in Einmalspritzen mit 25 µl Heparin-Natriumlösung abgenommen. Einem Teil des abgenommenen Blutes, wurde 5 ng/ml LPS hinzugefügt, während der verbliebene Anteil unbehandelt blieb. Die enthaltenen humanen mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMC) wurden dann, mittels Leucosep, nach dem Prinzip der Dichtegradientenzentrifugation, isoliert. Anschließend wurde pro Well eine Zellsuspension von 1×10^6 Zellen pro ml ausgesät und für 3 Stunden bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Danach folgte eine weitere 30-minütige Inkubation mit 100 µM BzATP in An- oder Abwesenheit von 1 mM β-NAD. Die nachfolgenden Schritte, wurden nach dem bereits beschriebenen Schema der Experimente mit U937-Zellen durchgeführt (vgl. 2.2.1.1). Abschließend wurde die IL-1β-Konzentration und die LDH-Aktivität in den zellfreien Überständen der PBMC-Proben bestimmt.

2.2.6 Bestimmung der IL-1β-Konzentration und der LDH-Aktivität.

2.2.6.1 IL-1β-Messung

Für die Messung der IL-1β-Konzentrationen in zellfreiem Zellkulturüberstand wurde das DuoSet[®] Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) Development System Human IL-1β/IL-1F2 verwendet. Die Messungen wurden nach den vom Hersteller angegebenen Schritten durchgeführt.

2.2.6.2 Vitalitätsbestimmung von Zellen

Zur Verifizierung der Zellvitalität wurde die Aktivität des Zytoplasmaproteins LDH, im zellfreien Überstand aller Zellkulturüberstände am Ende der Experimente bestimmt. Als Referenzwert galt eine Probe, welche wie alle anderen Ansätze auch, 1 ml Zellsuspension mit 1×10^6 Zellen/ml enthielt und während der Experimente nicht stimuliert wurde. Diese Probe wurde am Ende der Experimente bei -80 °C für mindestens 24 Stunden eingefroren, um die Lyse möglichst aller Zellen zu erreichen. Die Bestimmung der LDH-Aktivität wurde, mittels CytoTox 96[®] Non-Radioactive Cytotoxicity Assay, nach Angaben des

Herstellers, durchgeführt. Die ermittelte LDH-Aktivität im zellfreien Überstand der Referenzprobe wurde gleich 100 % gesetzt und ermöglichte so eine Interpretation der LDH-Aktivität der Versuchsproben.

2.2.7 Statistische Datenauswertung

Zur statistischen Datenauswertung wurde das Statistikprogramm SPSS Statistics 21 von IBM verwendet. Im ersten Schritt wurde der Kruskal-Wallis-Test angewendet. Dieser diente dazu, zu errechnen, ob es sich bei der Verteilung der Messdaten um eine zufällig entstandene Verteilung halten könnte. Bei einem p-Wert von kleiner 0,05 wurde gegen eine solche, zufällig entstandene Verteilung entschieden. Darauffolgend wurde der Mann-Whitney-U-Test angewendet. Dieser nicht-parametrische Test ermittelt, ob sich die Messwerte zweier unabhängiger Gruppen signifikant unterscheiden. Bei einem p-Wert von kleiner 0,05 wurde von signifikanten Unterschieden ausgegangen. Der Kruskal-Wallis-Test, sowie der Mann-Whitney-U-Test wurden, für alle Messergebnisse der in 2.2.1 – 2.2.3 beschriebenen Versuche, verwendet. Hiervon ausgenommen waren die Ergebnisse der Versuche mit PBMC. Für die Auswertung der Messergebnisse dieser Versuche wurde zuerst der Friedmann-Test angewendet. Dieser nicht-parametrische Test ermittelt, ob sich die zentralen Tendenzen abhängiger Gruppen unterscheiden. Bei einem p-Wert von kleiner 0,05 wurde von einem signifikanten Unterschied ausgegangen und im zweiten Schritt der Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test angewendet. Dieser nicht-parametrische Test ermittelt, ob sich die Messwerte zweier abhängiger Gruppen signifikant unterscheiden. Auch hier wurde bei einem p-Wert von kleiner 0,05 von signifikanten Unterschieden ausgegangen.

3 Ergebnisse

3.1 Kontrollexperimente

Im zellfreien Zellkulturüberstand unstimulierter U937-Zellen wurden IL-1 β -Konzentrationen von 0,27 pg/ml – 7,46 pg/ml (Median = 3,025 pg/ml) gemessen. Nach Stimulation mit LPS über 5 Stunden zeigte sich, mit Messwerten von 1,61 pg/ml – 7,58 pg/ml (Median = 5,19 pg/ml), keine signifikante Erhöhung der IL-1 β -Konzentration im zellfreien Zellkulturüberstand im Vergleich zu nicht stimulierten Zellen. Die Zugabe von BzATP über 30 Minuten hatte mit Werten von 23,02 pg/ml – 55,32 pg/ml und einem Median von 42,01 pg/ml, eine signifikant ($p = 0,0001$, $n = 12$, Mann-Whitney-U-Test) erhöhte IL-1 β -Konzentration im Überstand zur Folge (Abb. 3).

Der prozentuale Anteil der LDH-Aktivität im zellfreien Überstand wurde mit der maximal möglichen LDH-Aktivität nach Lyse der gleichen Zahl von Zellen verglichen. Für die verschiedenen Substanzkombinationen wurde dabei ein Wert von 6 % nie überschritten. Die Mediane der LDH-Konzentrationen mit Werten zwischen 1,24 % und 1,96 % zeigten eine geringe Variabilität und keine Abhängigkeit von den verschiedenen verwendeten Substanzen (Abb. 4).

Die gezeigten Daten entsprechen Kontrollexperimenten, welche bei den folgenden Experimenten immer mitgeführt wurden. Hieraus ergibt sich die n-Zahl von 12. Die Daten stammen aus Experimenten mit β -NAD, konditioniertem Medium und siRNA und werden dort noch einmal gezeigt.

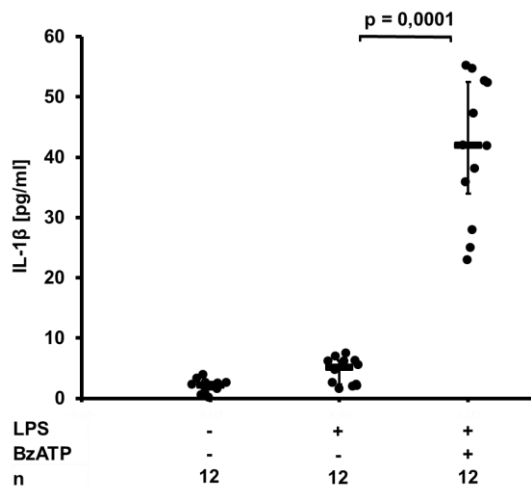


Abbildung 3: **BzATP-induzierte IL-1 β -Freisetzung aus U937 Zellen.**

Die U937-Zellen wurden für 5 Stunden mit LPS stimuliert und anschließend für 30 Minuten mit BzATP inkubiert. BzATP führt zu einer signifikant vermehrten Ausschüttung von IL-1 β aus LPS-vorstimulierten U937-Zellen in den zellfreien Überstand.

Die Einzelwerte sind in Punkten dargestellt. Die Balken stehen für die Mediane und die Antennen entsprechen den Perzentilen 25 und 75; Kruskal-Wallis-Test, gefolgt vom Mann-Whitney-U-Test. Die Daten dieser Kontrollexperimente stammen aus den Versuchen mit β -NAD, konditioniertem Medium und siRNA. Daher ergibt sich eine n-Zahl von 12. Einzelwerte werden bei den jeweiligen Experimenten erneut gezeigt.

BzATP, 2'(3')-O-(4-Benzoylbenzoyl)Adenosin-5'-Triphosphat-Triethylammonium-Salz; IL-1 β , Interleukin-1 β ; LPS, Lipopolysaccharid; β -NAD, β -Nikotinamidadenindinukleotid; siRNA, *small interfering RNA*

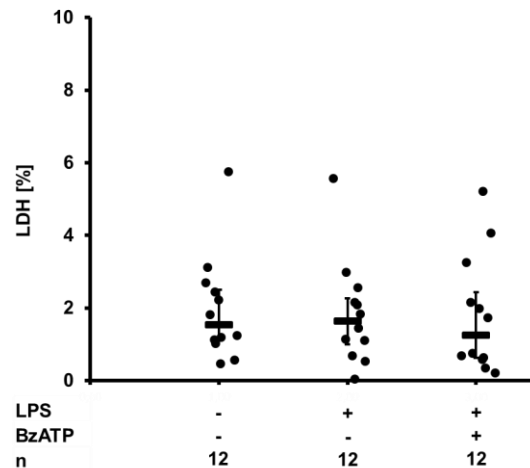


Abbildung 4: **LDH-Aktivität im zellfreien Überstand von LPS stimulierten und mit BzATP inkubierten U-937-Zellen.**

Die LDH-Aktivität wurde im zellfreien Überstand gemessen und ins Verhältnis zur maximalen LDH-Aktivität, welche lysierte Zellen freisetzen, gesetzt. Ein Wert von 6 % wurde bei keinem der Experimente überschritten. Es konnten keine signifikanten Unterschiede der gemessenen LDH-Aktivität gezeigt werden.

Die Einzelwerte sind in Punkten dargestellt. Die Balken stehen für die Mediane und die Antennen entsprechen den Perzentilen 25 und 75. Die Daten dieser Kontrollexperimente stammen aus den Versuchen mit β -NAD, konditioniertem Medium und siRNA. Daher ergibt sich die n-Zahl von 12. Einzelwerte werden bei den jeweiligen Experimenten erneut gezeigt.

BzATP, 2'(3')-O-(4-Benzoylbenzoyl)Adenosin-5'-Triphosphat-Triethylammonium-Salz; LDH, Laktatdehydrogenase; LPS, Lipopolysaccharid; β -NAD, β -Nikotinamidadenindinukleotid; siRNA, *small interfering RNA*

3.2 Inhibition der IL-1 β -Ausschüttung durch β -NAD.

In dieser ersten Versuchsreihe sollte die durch Hiller et al. gezeigte Inhibition der IL-1 β -Ausschüttung durch β -NAD reproduziert werden (Hiller et al., 2018). Im zellfreien Überstand, von über 5 Stunden mit LPS vorstimulierten und mit BzATP für 30 Minuten inkubierten U937-Zellen, zeigte sich eine signifikante Erhöhung ($p = 0,0001$, $n = 12$, Mann-Whitney-U-Test) der IL-1 β -Konzentration im Vergleich zu Zellen, welche nur mit LPS vorstimuliert wurden (Abb. 3 und Abb. 5). Die Zugabe von β -NAD gemeinsam mit BzATP über 30 Minuten hatte, mit Messwerten von 1,39 pg/ml - 11,57 pg/ml und einem Median von 2,865 pg/ml, eine signifikante Reduktion ($p = 0,0001$, $n = 12$, Mann-

Whitney-U-Test) der IL-1 β -Ausschüttung in den zellfreien Überstand zur Folge (Abb. 5). Der prozentuale Anteil der LDH-Aktivität im zellfreien Überstand überschritt nie einen Anteil von 10 %. Die Mediane der LDH-Aktivität lagen zwischen 1,8 % und 4,3 %. Im statistischen Vergleich der verschiedenen, verwendeten Substanzen, zeigte sich die LDH-Aktivität bei den Experimenten mit β -NAD, im Vergleich zu unbehandelten Zellen, geringfügig aber statistisch signifikant ($p = 0,003$, $n = 4$, Mann-Whitney-U-Test) erhöht. (Abb. 6).

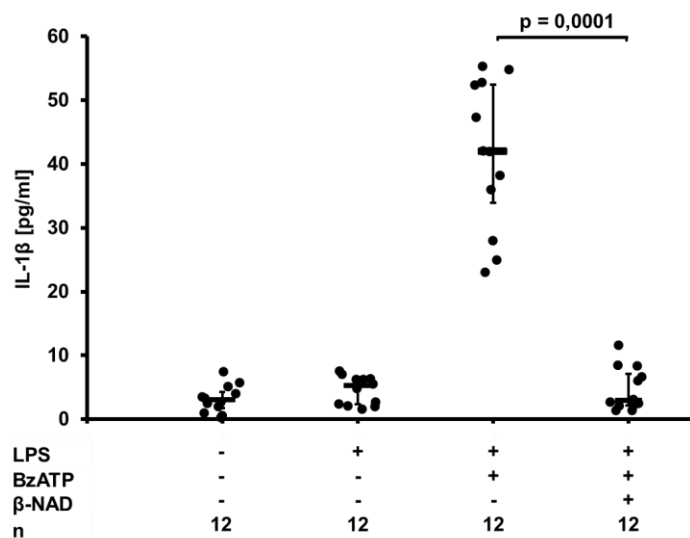


Abbildung 5: β -NAD reduziert signifikant die BzATP-induzierte Ausschüttung von IL-1 β . Die U937-Zellen wurden über 5 Stunden mit LPS vorstimuliert und anschließend für 30 Minuten mit β -NAD und BzATP inkubiert. BzATP führt zu einer signifikant vermehrten Ausschüttung von IL-1 β aus LPS-vorstimulierten U937 Zellen. Durch Zugabe von β -NAD wird diese Ausschüttung signifikant reduziert.

Die Einzelwerte sind in Punkten dargestellt. Die Balken stehen für die Mediane und die Antennen entsprechen den Perzentilen 25 und 75; Kruskal-Wallis-Test, gefolgt vom Mann-Whitney-U-Test. Die gezeigten Daten entstammen der Experimente mit β -NAD, konditioniertem Medium und siRNA. Daher ergibt sich die n-Zahl von 12. Einzelwerte werden bei den jeweiligen Experimenten erneut gezeigt.

BzATP, 2'(3')-O-(4-Benzoylbenzoyl)Adenosin-5'-Triphosphat-Triethylammonium-Salz; IL-1 β , Interleukin-1 β ; LPS, Lipopolysaccharid; β -NAD, β -Nikotinamidadenindinukleotid; siRNA, *small interfering RNA*

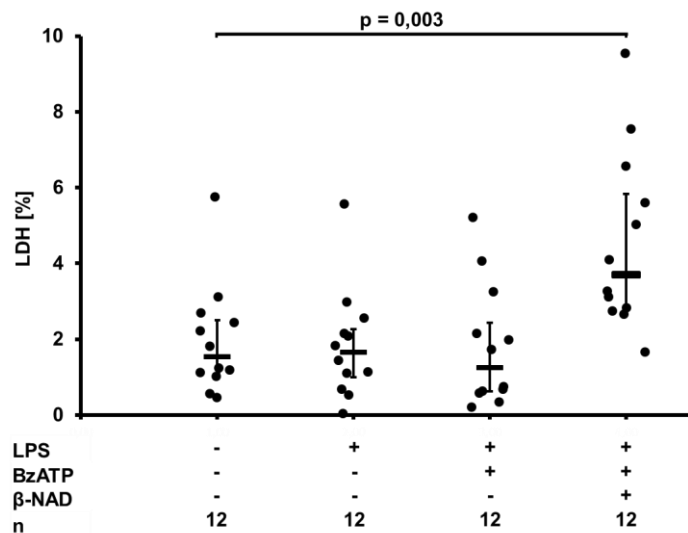


Abbildung 6: **LDH-Aktivität im zellfreien Überstand von mit LPS stimulierten und mit BzATP und β-NAD inkubierten Zellen.**

Die LDH-Aktivität wurde im zellfreien Überstand gemessen und ins Verhältnis zur maximalen LDH-Aktivität, welche lysierte Zellen freisetzen, gesetzt. Die LDH-Aktivität zeigte sich in den Experimenten, in denen sowohl BzATP als auch β-NAD eingesetzt wurden geringfügig, aber statistisch signifikant erhöht. Ein Wert von 10 % wurde bei keinem der Versuche überschritten.

Die Einzelwerte sind in Punkten dargestellt. Die Balken stehen für die Mediane und die Antennen entsprechen den Perzentilen 25 und 75, Kruskal-Wallis-Test, gefolgt vom Mann-Whitney-U-Test. Die Daten dieser Kontrollexperimente stammen aus den Versuchen mit β-NAD, konditioniertem Medium und siRNA. Daher ergibt sich die n-Zahl von 12. Einzelwerte werden bei den jeweiligen Experimenten erneut gezeigt.

BzATP, 2'(3')-O-(4-Benzoylbenzoyl)Adenosin-5'-Triphosphat-Triethylammonium-Salz; LDH, Laktatdehydrogenase; LPS, Lipopolysaccharid; β-NAD, β-Nikotinamidadenindinukleotid; siRNA, *small interfering RNA*

3.3 Inhibition der IL-1β-Ausschüttung durch β-NAD bei humanen mononukleären Zellen des peripheren Blutes.

Um den Einfluss von β-NAD auf die IL-1β-Ausschüttung bei humanen primären Zellen zu zeigen, erfolgten die folgenden Experimente. Im Blut von gesunden männlichen Spendern wurden humane mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (PBMC) isoliert. Ein Teil der isolierten Zellen wurde über 3 Stunden mit LPS vorstimuliert, der andere Teil nicht. Im zellfreien Überstand von unstimulierten PBMC zeigte sich eine IL-1β-Konzentration zwischen 31 pg/ml und 99 pg/ml (Median = 47,5 pg/ml). Die Zugabe von BzATP über 30 Minuten führte, mit Messwerten zwischen 335 pg/ml und 4070 pg/ml, zu einer signifikanten Erhöhung ($p = 0,028$, $n = 6$, Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test) der IL-1β-Konzentration im zellfreien Überstand. Bei zusätzlicher Zugabe von β-NAD über 30 Minuten zeigte sich, mit Messwerten zwischen 82 pg/ml und 1140 pg/ml

(Median= 300,5 pg/ml), eine signifikante Reduktion ($p = 0,028$, $n = 6$, Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test) der IL-1 β -Ausschüttung (Abb. 7 A).

Die mit LPS vorstimulierten PBMC zeigten ähnliche Ergebnisse: Die Vorstimulation mit LPS führte zu einer Konzentration zwischen 53 pg/ml - 681 pg/ml an IL-1 β im zellfreien Überstand. Die 30-minütige Zugabe von BzATP führte auch hier, mit Messwerten zwischen 669 pg/ml und 16050 pg/ml (Median = 5662 pg/ml) zu einem signifikanten Anstieg ($p = 0,028$, $n = 6$, Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test) der IL-1 β -Konzentration im zellfreien Überstand. Die zusätzliche Zugabe von β -NAD über 30 Minuten zeigte, mit Messwerten zwischen 335 pg/ml und 6750 pg/ml, eine signifikante Reduktion der IL-1 β -Ausschüttung im Vergleich zu mit LPS vorstimulierten und mit BzATP inkubierten PBMC (Abb. 7 B). Insgesamt zeigte sich, zwischen den einzelnen Spendern, eine hohe interindividuelle Streuung (Abb. 7 A; B).

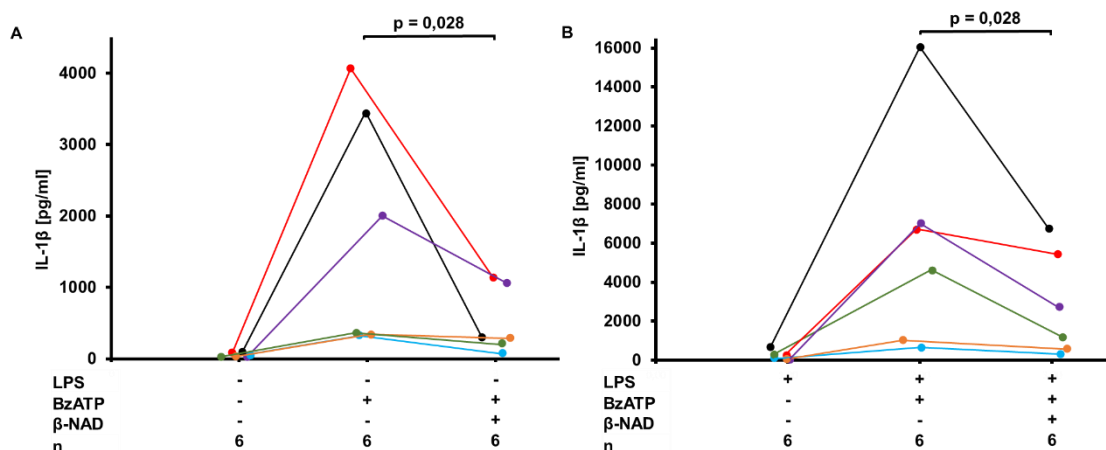


Abbildung 7 A; B: **β -NAD inhibiert die IL-1 β -Ausschüttung durch humane mononukleäre Zellen des peripheren Blutes.**

A: Humane mononukleäre Zellen des peripheren Blutes wurden aus dem Blut männlicher Spender isoliert und mit BzATP und β -NAD über 30 Minuten inkubiert. BzATP führte zu einer signifikant erhöhten IL-1 β -Ausschüttung. Durch die zusätzliche Zugabe von β -NAD wird dieser Effekt signifikant inhibiert.

B: Humane mononukleäre Zellen des peripheren Blutes wurden aus dem Blut männlicher Spender isoliert und mit LPS vorstimuliert, sowie für 30 Minuten mit BzATP und β -NAD inkubiert. BzATP führte zu einer signifikant erhöhten IL-1 β -Ausschüttung. Durch die zusätzliche Zugabe von β -NAD wird dieser Effekt signifikant inhibiert.

A; B: Zwischen den einzelnen Spendern bestand eine hohe interindividuelle Streuung. Die Einzelwerte sind in Punkten dargestellt und die Einzelwerte der individuellen Spender wurden jeweils mit Strichen verbunden; Friedman-Test gefolgt vom Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test.

BzATP, 2'(3')-O-(4-Benzoylbenzoyl)Adenosin-5'-Triphosphat-Triethylammonium-Salz; IL-1 β , Interleukin-1 β ; LPS, Lipopolysaccharid; β -NAD, β -Nikotinamidadenindinukleotid

Der prozentuale Anteil der LDH-Aktivität im zellfreien Überstand zeigte, in beiden Settings, ebenfalls eine hohe interindividuelle Variabilität. Die LDH-Aktivität lag bei nicht stimulierten Zellen zwischen 2,31 % - 10,4 %, nach Zugabe von BzATP zwischen 3,9 % - 13,4 % sowie nach Zugabe von β -NAD zwischen 4,4 % - 16,3 % (Abb 8 A). Für die mit LPS vorstimulierten PBMC zeigten sich ähnliche Daten: Die Streuung der LDH-Aktivität, von mit LPS vorstimulierten PBMC, lag zwischen 6,2 % - 8,2 %, nach Zugabe von BzATP zwischen 3,85 % - 11,53 % sowie nach Zugabe von β -NAD zwischen 6,8 % - 15,3 % (Abb 8 B). Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied der LDH-Aktivität zwischen den Zellkulturüberständen der einzelnen experimentellen Ansätze (Abb. 8 A; B).

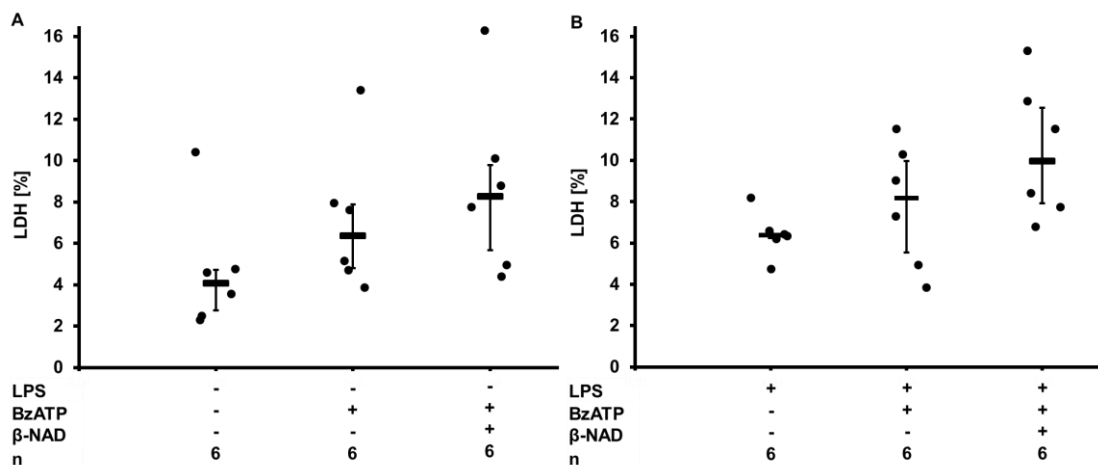


Abbildung 8 A; B: **LDH-Aktivität im zellfreien Überstand von mit BzATP und β -NAD inkubierten human mononukleären Zellen des peripheren Blutes.**

A: Die LDH-Aktivität wurde im zellfreien Überstand gemessen und ins Verhältnis zur maximalen LDH-Aktivität, welche lysierte Zellen freisetzen, gesetzt. Ein Wert von 16,3 % wurde bei keinem der Versuche überschritten. Die LDH-Aktivität zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen den einzelnen experimentellen Ansätzen.

B: Die LDH-Aktivität wurde im zellfreien Überstand gemessen und ins Verhältnis zur maximalen LDH-Aktivität, welche lysierte Zellen freisetzen, gesetzt. Ein Wert von 15,3 % wurde bei keinem der Versuche überschritten. Die LDH-Aktivität zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen den einzelnen verwendeten Substanzen.

A; B: Die LDH-Aktivität der verschiedenen Spender zeigten eine hohe interindividuelle Variabilität. Die Einzelwerte sind in Punkten dargestellt. Die Balken stehen für die Mediane und die Antennen entsprechen den Perzentilen 25 und 75; Friedmann-Test gefolgt vom Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test.

BzATP, 2'(3')-O-(4-Benzoylbenzoyl)Adenosin-5'-Triphosphat-Triethylammonium-Salz; IL-1 β , Interleukin-1 β ; LDH, Laktatdehydrogenase; LPS, Lipopolysaccharid; β -NAD, β -Nikotinamidadenindinukleotid

3.4 Aufhebung der β -NAD-vermittelten Inhibition der IL-1 β -Ausschüttung durch Verwendung von Inhibitoren der iPLA2 β .

Als nächstes wurde untersucht, inwieweit die iPLA2 β eine Rolle in der zu untersuchenden Signaltransduktion spielt. Um dies zu klären, wurden die oben beschriebenen IL-1 β -Freisetzungsexperimente mit U937-Zellen durchgeführt, jedoch erfolgte zusammen mit BzATP und β -NAD die Zugabe der iPLA2 β -Inhibitoren BEL oder ATK. Es zeigte sich, sowohl für BEL, mit Messwerten zwischen 27,7 pg/ml und 42,44 pg/ml (Median = 35,26 pg/ml), als auch für ATK, mit Messwerten zwischen 30,65 pg/ml und 37,02 pg/ml (Median: 36,18 pg/ml), eine signifikante Aufhebung ($p = 0,029$, $n = 4$, Mann-Whitney-U-Test) des durch β -NAD vermittelten inhibitorischen Effekts auf die IL-1 β -Ausschüttung (Abb. 9).

Der prozentuale Anteil der LDH-Aktivität im zellfreien Überstand überschritt nie einen Anteil von 7,5 %. Die Mediane der LDH-Aktivität zeigten, mit Werten zwischen 3,45 % und 5,02 %, eine geringe Variabilität und keine Abhängigkeit von den verwendeten Substanzen (Abb. 10).

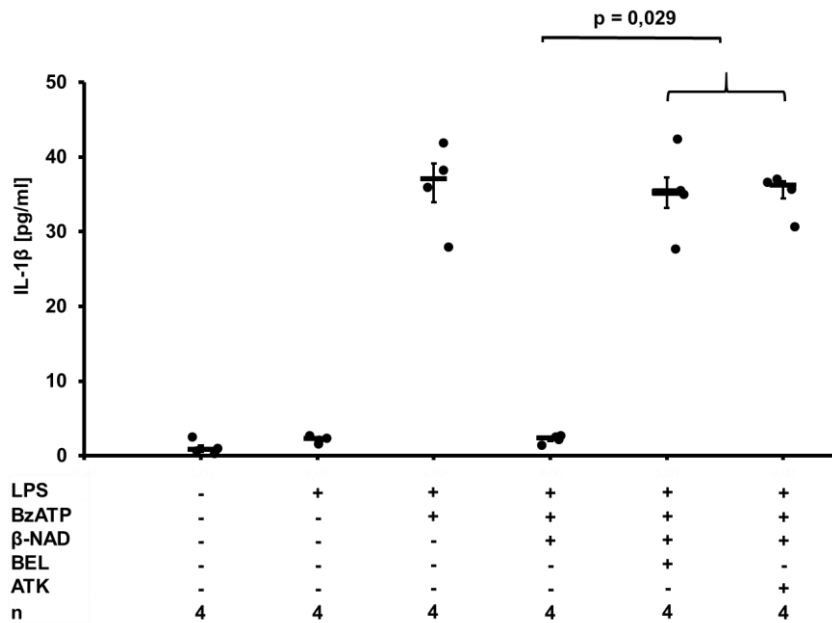


Abbildung 9: **BEL und ATK führen zu einer signifikanten Aufhebung der β -NAD vermittelten Inhibition der IL-1 β Ausschüttung.**

Die U937-Zellen wurden über 5 Stunden mit LPS vorstimuliert und anschließend für 30 Minuten mit β -NAD und BzATP inkubiert. BzATP führt zu einer vermehrten Ausschüttung von IL-1 β aus LPS-vorstimulierten U937 Zellen. Durch Zugabe von β -NAD wird diese Ausschüttung signifikant reduziert. Die Zugabe von jeweils BEL oder ATK über 30 Minuten, führt zu einer signifikanten Aufhebung der durch β -NAD induzierten Inhibition der IL-1 β -Ausschüttung.

Ein p-Wert von 0,029 (Mann-Whitney-U-Test) zeigte sich sowohl bei der Zugabe von BEL, als auch bei der Zugabe von ATK (geschweifte Klammer).

Die Einzelwerte sind in Punkten dargestellt. Die Balken stehen für die Mediane und die Antennen entsprechen den Perzentilen 25 und 75; Kruskal-Wallis-Test, gefolgt vom Mann-Whitney-U-Test.

ATK, Arachidonyl-Trifluoromethylketon; BEL, Bromoenollakton; BzATP, 2'(3')-O-(4-Benzoylbenzoyl)Adenosin-5'-Triphosphat-Triethylammonium-Salz; IL-1 β , Interleukin-1 β ; iPLA2 β , kalziumunabhängige Phospholipase A2 β ; LPS, Lipopolysaccharid; β -NAD, β -Nikotinamidadenindinukleotid

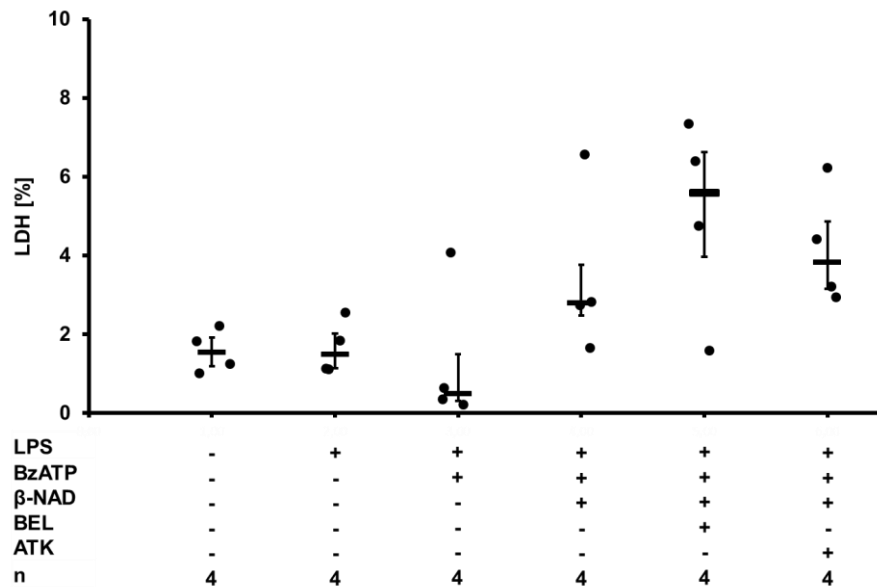


Abbildung 10: **LDH-Aktivität im zellfreien Überstand von mit LPS stimulierten und mit BzATP und β-NAD inkubierten Zellen unter Verwendung von Inhibitoren für die iPLA2β.**

Die LDH-Aktivität wurde im zellfreien Überstand gemessen und ins Verhältnis zur maximalen LDH-Aktivität, welche lysierte Zellen freisetzen, gesetzt. Ein Wert von 7,5 % wurde bei keinem der Versuche überschritten. Die LDH-Aktivität zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen den einzelnen experimentellen Ansätzen.

Die Einzelwerte sind in Punkten dargestellt. Die Balken stehen für die Mediane und die Antennen entsprechen den Perzentilen 25 und 75; Kruskal-Wallis-Test, gefolgt vom Mann-Whitney-U-Test.

ATK, Arachidonyl-Trifluoromethylketon; BEL, Bromoenollakton; BzATP, 2'(3')-O-(4-Benzoylbenzoyl)Adenosin-5'-Triphosphat-Triethylammonium-Salz; IL-1β, Interleukin-1β; LDH, Laktatdehydrogenase; LPS, Lipopolysaccharid; β-NAD, β-Nikotinamidadenindinukleotid

3.5 Die Herunterregulation der iPLA2β-Expression hebt den inhibitorischen Effekt von β-NAD auf.

Zur weiteren Festigung der Theorie, welche der iPLA2β eine entscheidende Rolle im Signalweg der durch β-NAD inhibierten Freisetzung von IL-1β beimisst, erfolgte eine Herunterregulation der *PLA2G6*-Expression mittels siRNA-Technik. Hierbei wurden die U937-Zellen mit siRNA transfiziert und 48 Stunden inkubiert. Zur Kontrolle möglicher unspezifischer Effekte der siRNA-Transfektion wurde zusätzlich eine unspezifische siRNA (Kontroll-siRNA) als Negativkontrolle verwendet. Zudem erfolgten Kontrollen mit nicht-transfizierten U937-Zellen.

Sowohl unter Verwendung von nicht transfizierten Zellen, als auch bei der Verwendung von mit unspezifischer siRNA transfizierten Zellen, zeigte sich eine durch β-NAD vermittelte signifikante Inhibition (U937: $p = 0,029$, $n = 4$, Mann-Whitney-U-Test; Kontroll-siRNA: $p = 0,029$, $n = 4$, Mann-Whitney-U-Test) der IL-1β-Freisetzung in den

zellfreien Überstand (Abb.11). Bei Verwendung von U937-Zellen, in welchen die *PLA2G6*-Expression mittels siRNA-Technik herunterreguliert wurde, konnte diese Inhibition nicht mehr gezeigt werden: Mit Messwerten von 35,03 pg/ml - 49,83 pg/ml (Median = 41,075 pg/ml) zeigte sich keine signifikante Inhibition ($p = 0,248$, $n = 4$, Mann-Whitney-U-Test) der IL-1 β Freisetzung in den zellfreien Überstand durch die Zugabe von β -NAD (Abb. 11).

Der prozentuale Anteil der LDH-Aktivität im zellfreien Überstand überschritt nie einen Anteil von 11 %. Die Mediane der LDH-Aktivität zeigten, mit Werten zwischen 3,67 % und 5,63 % geringe Variabilität und keine Abhängigkeit von den durchgeführten Transfektionen (Abb. 12). Innerhalb der 3 experimentellen Gruppen (U937, Kontroll-siRNA und iPLA2 β -siRNA), zeigte sich die LDH-Aktivität in den Experimenten, in denen β -NAD zugesetzt wurde, im Vergleich zu unstimulierten Zellen signifikant erhöht ($p = 0,029$, $n = 4$, Mann-Whitney-U-Test).

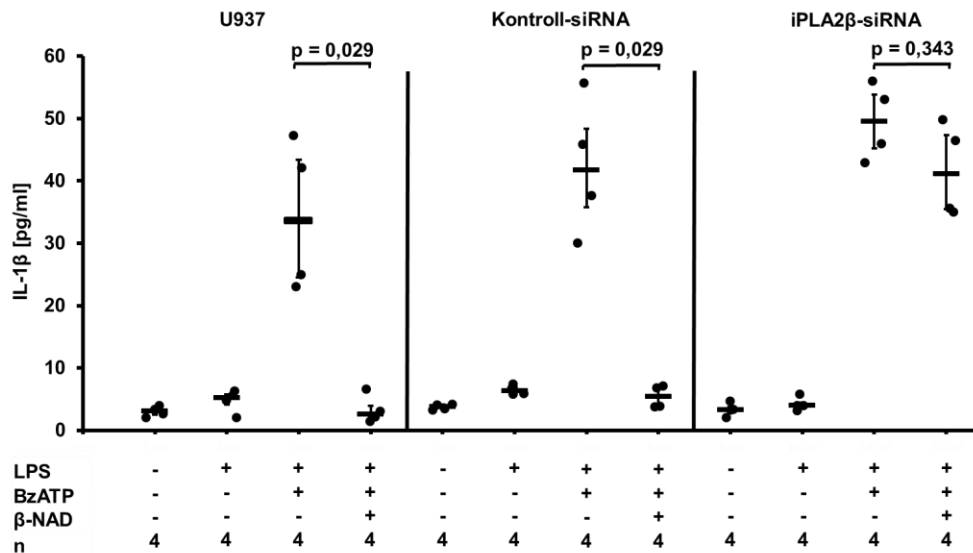


Abbildung 11: **Die Herunterregulation der *PLA2G6*-Expression mittels siRNA-Technik führt zu einer Aufhebung der β-NAD-vermittelten Inhibition der IL-1β-Ausschüttung.**

Nicht transfizierte U937-Zellen wurden über 5 Stunden mit LPS vorstimuliert und anschließend für 30 Minuten mit β-NAD und BzATP inkubiert. BzATP führt zu einer signifikant vermehrten Ausschüttung von IL-1β aus mit LPS vorstimulierten U937 Zellen. Durch Zugabe von β-NAD wird diese Ausschüttung signifikant reduziert. Diese Effekte ließen sich ebenfalls für U937-Zellen, welche mit einer unspezifischen siRNA (Kontroll-siRNA) transfiziert wurden, zeigen. U937-Zellen, in welchen die *PLA2G6*-Expression herunterreguliert wurde, zeigen bei Inkubation mit β-NAD und BzATP sowie Vorstimulation mit LPS keine signifikante Inhibition der IL-1β-Ausschüttung in den zellfreien Überstand.

Die Einzelwerte sind in Punkten dargestellt. Die Balken stehen für die Mediane und die Antennen entsprechen den Perzentilen 25 und 75; Kruskal-Wallis-Test, gefolgt vom Mann-Whitney-U-Test.

BzATP, 2'(3')-O-(4-Benzoylbenzoyl)Adenosin-5'-Triphosphat-Triethylammonium-Salz; IL-1β, Interleukin-1β; iPLA2β, kalziumunabhängige Phospholipase A2β; LPS, Lipopolysaccharid; β-NAD, β-Nikotinamidadeninukleotid; siRNA, *small interfering RNA*

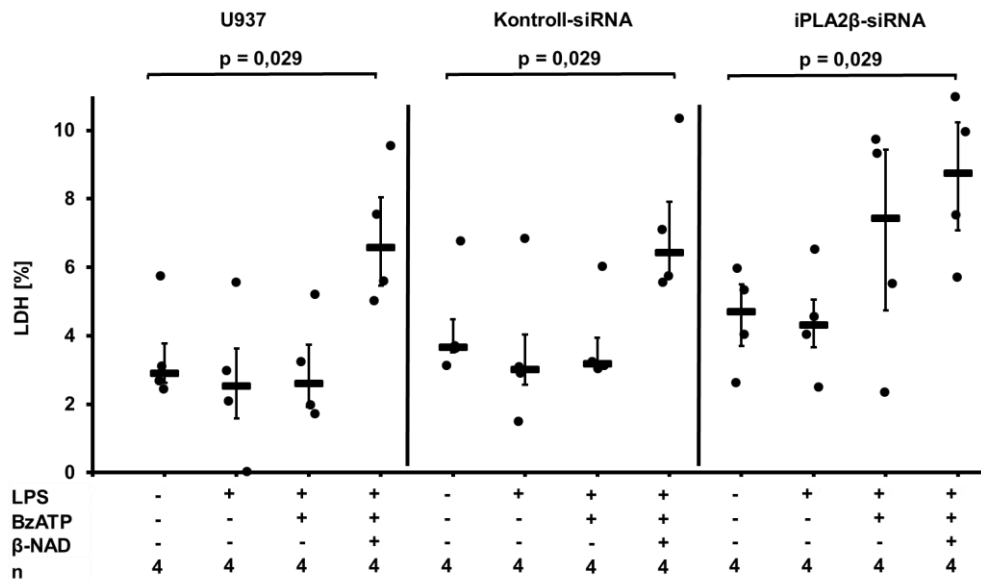


Abbildung 12: LDH-Aktivität im zellfreien Überstand von mit LPS stimulierten und mit BzATP und β-NAD inkubierten transfizierten und nicht transfizierten U937-Zellen.

Die LDH-Aktivität wurde im zellfreien Überstand gemessen und ins Verhältnis zur maximalen LDH-Aktivität, welche lysierte Zellen freisetzen, gesetzt. Ein Wert von 11 % wurde bei keinem der Experimente überschritten. Die Mediane der LDH-Aktivität zeigten eine geringe Variabilität und keine Abhängigkeit von den durchgeführten Transfektionen. Innerhalb der 3 Experimentengruppen (U937, Kontroll-siRNA und iPLA2β-siRNA), zeigte sich die LDH-Aktivität in den Experimenten, in denen β-NAD zugesetzt wurde, im Vergleich zu unstimulierten Zellen geringfügig jedoch statistisch signifikant erhöht.

Die Einzelwerte sind in Punkten dargestellt. Die Balken stehen für die Mediane und die Antennen entsprechen den Perzentilen 25 und 75; Kruskal-Wallis-Test, gefolgt vom Mann-Whitney-U-Test.

BzATP, 2'(3')-O-(4-Benzoylbenzoyl)Adenosin-5'-Triphosphat-Triethylammonium-Salz; IL-1β, Interleukin-1β; iPLA2β, kalziumunabhängige Phospholipase A2β; LDH, Laktatdehydrogenase; LPS, Lipopolysaccharid; β-NAD, β-Nikotinamidadenindinukleotid; siRNA, *small interfering RNA*

3.5.1 Überprüfung der Herunterregulation der iPLA2β-Expression mittels Western Blot-Verfahren.

Um die Effizienz der in 2.2.3 beschriebenen Transfektionen zu überprüfen, wurden Western Blots durchgeführt. U937-Zellen wurden mittels siRNA-Technik, wie oben beschrieben, transfiziert und für 48 Stunden inkubiert. Anschließend wurden die Zellen lysiert. Aus den Lysaten erfolgten SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophoresen, welchen Western Blots zum Nachweis der iPLA2β-Proteinexpression angeschlossen wurden. Abschließend wurde die optische Dichte (OD) der Banden gemessen. Neben der OD der iPLA2β-Banden, der nicht transfizierten und transfizierten U937-Zellen, wurde die OD der β-Aktin-Banden gemessen und diese zueinander ins Verhältnis gesetzt (AU, *arbitrary units*). Als Vergleich dienten die Experimente, der mit Kontroll-siRNA transfizierten U937-Zellen, deren AU auf 1 festgelegt wurde. Die Transfektion der U937-Zellen mit

siRNA gegen die iPLA2 β führte, mit Messwerten zwischen 0,58 und 0,89 AU (Median = 0,7 AU), zu einer signifikanten Reduktion ($p = 0,029$, $n = 4$, Mann-Whitney-U-Test) des iPLA2 β -Proteins (Abb. 13).

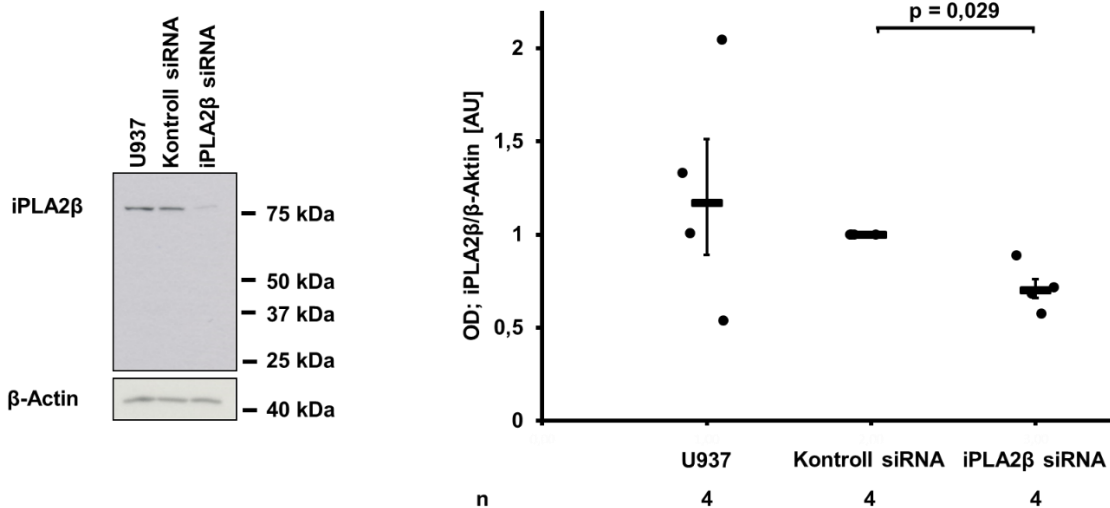


Abbildung 13: **Die Transfektion mit siRNA gegen die iPLA2 β führt zu einer signifikanten Reduktion der Expression des iPLA2 β -Proteins.**

Dargestellt ist ein exemplarischer Western Blot (links). Im Western Blot wurde die OD der Banden gemessen. Die OD der iPLA2 β -Banden wurde ins Verhältnis zu jenen von β -Aktin gesetzt (AU). Als Kontrolle dienten mit Kontroll-siRNA transfizierte U937-Zellen, deren AU auf 1 festgelegt wurde.

Die Einzelwerte sind in Punkten dargestellt. Die Balken stehen für die Mediane und die Antennen entsprechen den Perzentilen 25 und 75; Kruskal-Wallis-Test, gefolgt vom Mann-Whitney-U-Test.

AU, *arbitrary units*; iPLA2 β , kalziumunabhängige Phospholipase A2 β ; OD, optische Dichte, siRNA, *small interfering RNA*

3.6 Konditioniertes Medium

3.6.1 Konditioniertes Medium inhibiert die BzATP-vermittelte Ausschüttung von IL-1 β .

In der Annahme, dass β -NAD zu einer Ausschüttung eines löslichen niedermolekularen Faktors in den zellfreien Überstand des Mediums führt, erfolgten die folgenden IL-1 β -Freisetzungsexperimente unter Einsatz von konditioniertem Medium. Zum Vergleich wurden Kontrollexperimente unter Verwendung von normalem, nicht konditioniertem Medium mitgeführt. Das konditionierte Medium entsprach dem zellfreien Überstand von U937-Zellen, die für 5 Stunden mit LPS vorstimuliert wurden und anschließend mit β -NAD für 30 Minuten inkubiert wurden.

Die Inkubation der U937-Zellen in konditioniertem Medium während der Stimulation mit BzATP hatte, mit Messwerten zwischen 7,36 pg/ml und 13,99 pg/ml und einem Median von 10,68 pg/ml, eine signifikante Reduktion ($p = 0,029$, $n = 4$, Mann-Whitney-U-Test) der BzATP-induzierten IL-1 β -Ausschüttung in den zellfreien Überstand zur Folge (Abb. 14).

3.6.2 Die Wirksamkeit von konditioniertem Medium ist unabhängig von P2Y₁- und P2Y₁₁-Rezeptoren.

Um die Unabhängigkeit der Wirkung des konditionierten Mediums von den P2Y₁- und P2Y₁₁-Rezeptoren zu zeigen, erfolgten Experimente mit Antagonisten für diese beiden Rezeptoren. Es erfolgte jeweils die Zugabe des P2Y₁-Rezeptor-Antagonisten MRS2279 und des P2Y₁₁-Rezeptor-Antagonisten NF340 für 30 Minuten. Die Zugabe von MRS2279 zu mit über 30 Minuten mit BzATP stimulierten und in konditioniertem Medium inkubierten U937-Zellen, führte nicht zu einer Aufhebung des inhibierenden Effekts des konditionierten Mediums auf die Ausschüttung von IL-1 β . Mit Messwerten zwischen 10,84 pg/ml und 15,57 pg/ml (Median = 14,69 pg/ml) zeigte sich, trotz Anwesenheit des Antagonisten für den P2Y₁-Rezeptor, weiterhin eine signifikante Reduktion ($p = 0,029$, $n = 4$, Mann-Whitney-U-Test) der IL-1 β -Ausschüttung, im Vergleich zu den entsprechenden Experimenten mit nicht konditioniertem Medium. Auch in Anwesenheit des P2Y₁₁-Rezeptor-Antagonisten NF340 kommt es nicht zu einer Aufhebung des inhibitorischen Effekts des konditionierten Mediums auf die IL-1 β -Ausschüttung (IL-1 β -Konzentrationen: 9,22 pg/ml - 16,47 pg/ml, Median = 12,74 pg/ml, $p = 0,029$, $n = 4$, Mann-Whitney-U-Test) (Abb. 14).

3.6.3 Die Wirksamkeit von konditioniertem Medium ist unabhängig von der iPLA2 β .

Die folgenden Experimente erfolgten um die Unabhängigkeit der Wirkung des konditionierten Mediums von der iPLA2 β zu zeigen. Die U937 Zellen wurden für 5 Stunden mit LPS vorstimuliert und anschließend für 30 Minuten in konditioniertem Medium mit BzATP, unter Zugabe des iPLA2 β -Inhibitors BEL über 30 Minuten, stimuliert. Mit Messwerten zwischen 8,94 pg/ml und 14,78 pg/ml (Median = 12,38 pg/ml) zeigte sich eine signifikante Reduktion ($p = 0,029$, $n = 4$, Mann-Whitney-U-Test) der IL-

IL-1 β -Konzentration im Vergleich zur Positivkontrolle mit nicht konditioniertem Medium (Abb. 14).

3.6.4 Konditioniertes Medium wirkt über die nAChR-Untereinheiten α 9/ α 10.

Um die Wirkweise des löslichen bioaktiven Faktors am nAChR zu untersuchen, erfolgten Experimente mit Zugabe von Antagonisten der nAChR-Untereinheiten. Als Antagonist der nAChR-Untereinheit α 7 wurde das α -Conopeptid ArIB[V11L,V16D] und als Antagonist für die nAChR-Untereinheiten α 9/ α 10 das α -Conopeptid RgIA verwendet. Die Experimente erfolgten zudem in Anwesenheit von BEL. Die U937-Zellen wurden für 5 Stunden mit LPS vorstimuliert und anschließend für 30 Minuten in konditioniertem Medium mit BzATP, BEL und ArIB[V11L,V16D] oder RgIA inkubiert. Trotz der zusätzlichen Zugabe des α 7 nAChR-Antagonisten ArIB[V11L,V16D] zeigte sich, mit Messwerten zwischen 8,18 pg/ml und 16,18 pg/ml (Median = 12,54 pg/ml), eine signifikante Reduktion ($p = 0,029$, $n = 4$, Mann-Whitney-U-Test) der IL-1 β -Konzentration im zellfreien Überstand (Abb. 14).

Im Gegensatz dazu, führte die zusätzliche Zugabe des Antagonisten für die nAChR-Untereinheiten α 9/ α 10 RgIA, zu keiner signifikanten Inhibition der IL-1 β -Ausschüttung (IL-1 β -Konzentrationen: 51,77 pg/ml - 55,13 pg/ml, Median = 52,84 pg/ml, $p = 0,486$, $n = 4$, Mann-Whitney-U-Test), im Vergleich zur Positivkontrolle mit nicht konditioniertem Medium (Abb. 14).

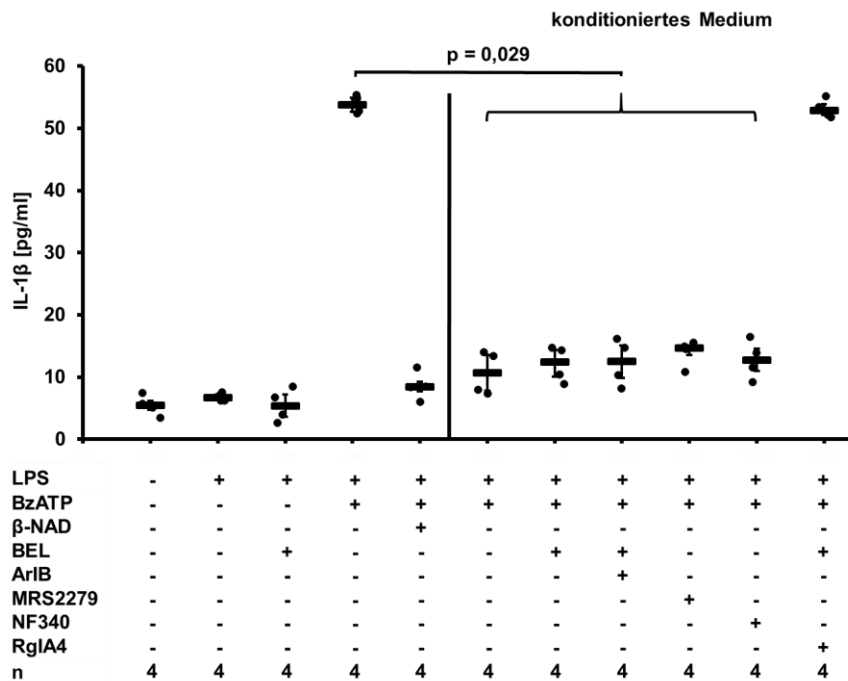


Abbildung 14: β -NAD führt zur Ausschüttung eines löslichen bioaktiven Faktors in den zellfreien Überstand.

Als Positivkontrolle erfolgten Experimente ohne konditioniertes Medium (links). Die U937-Zellen wurden über 5 Stunden mit LPS vorstimuliert und anschließend für 30 Minuten mit BzATP in konditioniertem Medium inkubiert (rechts). BzATP führt unter Verwendung von konditioniertem Medium nicht zu einer vermehrten Ausschüttung von IL-1 β in den zellfreien Überstand. Im Vergleich zur Positivkontrolle zeigt sich die IL-1 β -Konzentration signifikant reduziert. Dieser Effekt bleibt auch unter Zugabe von BEL als Antagonist der iPLA2 β , sowie unter Zugabe der P2Y₁- (MRS2279) und P2Y₁₁- (NF340) Rezeptor-Antagonisten bestehen. Auch die Zugabe des Antagonisten der nAChR-Untereinheit α 7 (α -Conopeptid ArIB[V11L,V16D]) führt zu einer signifikant reduzierten IL-1 β -Ausschüttung in den zellfreien Überstand im Vergleich zur Positivkontrolle. Die p-Werte lagen für alle genannten Substanzen bei 0,029 (geschweifte Klammer).

Die Zugabe des Antagonisten der nAChR-Untereinheiten α 9 α 10, (α -Conopeptid RgIA4) zeigt keine signifikante Reduktion der IL-1 β -Konzentration im zellfreien Überstand des konditionierten Mediums.

Die Einzelwerte sind in Punkten dargestellt. Die Balken stehen für die Mediane und die Antennen entsprechen den Perzentilen 25 und 75; Kruskal-Wallis-Test, gefolgt vom Mann-Whitney-U-Test.

ATK, Arachidonyl-Trifluoromethylketon; BEL, Bromoenollakton; BzATP, 2'(3')-O-(4-Benzoylbenzoyl)Adenosin-5'-Triphosphat-Triethylammonium-Salz; IL-1 β , Interleukin-1 β ; LPS, Lipopolysaccharid; β -NAD, β -Nikotinamidadenindinukleotid

Der prozentuale Anteil der LDH-Aktivität im zellfreien Überstand, der unter 3.6.1 – 3.6.4 beschriebenen Experimente, überschritt nie einen Anteil von 5 %. Die Mediane der LDH-Aktivität zeigten, mit Werten zwischen 2,55 % und 3,83 %, eine geringe Variabilität (Abb. 15). Die LDH-Aktivität in den Experimenten mit konditioniertem Medium zeigte sich, unter Verwendung von LPS und ATP, BEL und ArIB[V11L,V16D], im Vergleich zu unbehandelten Zellen in nicht konditioniertem Medium, geringfügig, aber statistisch

signifikant erhöht ($p = 0,029$, $n = 4$, Mann-Whitney-U-Test). Für NF340, MRS2279 und RgIA4 ließ sich kein statistisch signifikanter Unterschied, dennoch eine Tendenz zu erhöhter LDH-Aktivität unter Verwendung von konditioniertem Medium, feststellen ($p = 0,057$, $n = 4$, Mann-Whitney-U-Test). Verglichen mit der gemessenen LDH-Aktivität der Zellkulturüberstände aus Experimenten mit β -NAD in nicht konditioniertem Medium, ließ sich für die verschiedenen verwendeten Substanzen kein signifikanter Unterschied der LDH-Aktivität unter Verwendung von konditioniertem Medium feststellen.

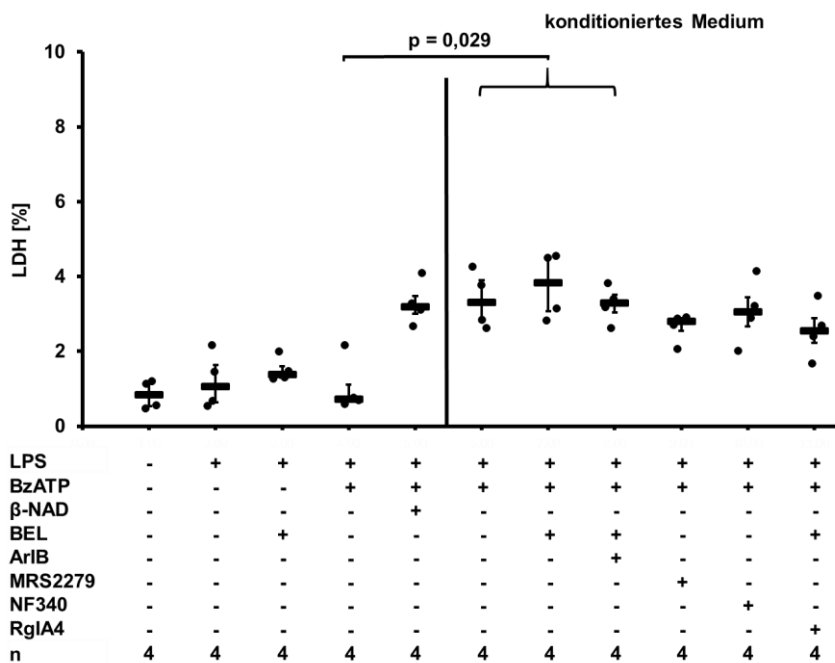


Abbildung 15: LDH-Aktivität im zellfreien Überstand von mit LPS stimulierten und mit BzATP und β -NAD inkubierten Zellen sowie unter Verwendung von konditioniertem Medium.

Die LDH-Aktivität wurde im zellfreien Überstand gemessen und ins Verhältnis zur maximalen LDH-Aktivität, welche lysierte Zellen freisetzen, gesetzt. Ein Wert von 5 % wurde bei keinem der Versuche überschritten. Die LDH-Aktivität in den Experimenten mit konditioniertem Medium zeigten sich, unter Verwendung von LPS und ATP, BEL und ArIB[V11L,V16D], im Vergleich zu unbehandelten Zellen in nicht konditioniertem Medium, geringfügig, aber statistisch signifikant erhöht. Für NF340, MRS2279 und RgIA4 ließ sich kein statistisch signifikanter Unterschied, dennoch eine Tendenz zu einer erhöhten LDH-Aktivität, unter Verwendung von konditioniertem Medium, feststellen. Verglichen mit der gemessenen LDH-Aktivität der Zellkulturüberstände der Experimente mit β -NAD in nicht konditioniertem Medium, ließ sich für die verschiedenen verwendeten Substanzen kein signifikanter Unterschied der LDH-Aktivität, unter Verwendung von konditioniertem Medium, feststellen.

Die Einzelwerte sind in Punkten dargestellt. Die Balken stehen für die Mediane und die Antennen entsprechen den Perzentilen 25 und 75; Kruskal-Wallis-Test, gefolgt vom Mann-Whitney-U-Test.

ATK, Arachidonyl-Trifluoromethylketon; BEL, Bromoenollakton; BzATP, 2'(3')-O-(4-Benzoylbenzoyl)Adenosin-5'-Triphosphat-Triethylammonium-Salz; IL-1 β , Interleukin-1 β ; LDH, Laktatdehydrogenase; LPS, Lipopolysaccharid; β -NAD, β -Nikotinamidadenindinukleotid

4 Diskussion

4.1 Wirkmechanismus und Signaltransduktion

Die vorliegende Arbeit knüpft an Vorarbeiten meines Kollegen Dr. med Sebastian Hiller an, der zeigte, dass in einer monozytären Zelllinie, β -NAD durch Bindung an den P2Y₁- und den P2Y₁₁-Rezeptor einen inhibitorischen Einfluss auf die ATP-vermittelte Freisetzung von IL-1 β hat (Hiller et al., 2018). Im Rahmen dieser Signaltransduktion kommt es zu einer Aktivierung der nAChR, welche eine Inhibition des ATP-abhängigen P2X₇-Rezeptors zur Folge hat (Hiller et al., 2018). In dieser Arbeit sollte untersucht werden, wie die Signaltransduktion zwischen den G-Protein-gekoppelten Rezeptoren P2Y₁ und P2Y₁₁ und den nAChR erfolgt. Dazu wurde der durch Hiller et al. gezeigte Effekt reproduziert und an primären humanen Zellen überprüft. Nachfolgend wurden Versuchsreihen durchgeführt, um die in Abschnitt 1.7 aufgestellten Hypothesen zu prüfen:

1. Die iPLA2 β (PLA2G6) ist an der β -NAD-vermittelten Signaltransduktion beteiligt.
2. β -NAD induziert die Ausschüttung eines löslichen bioaktiven Faktors, der als Agonist an nAChRs fungiert.
3. Die nAChR-Untereinheiten $\alpha 9$ ist für die Wirkung des löslichen Faktors von essenzieller Bedeutung.

Die Ergebnisse der Thesis sollen nachfolgend anhand der relevanten Literatur diskutiert werden.

In der ersten Versuchsreihe wurde der durch Hiller et al. (Hiller et al., 2018) gezeigte inhibitorische Effekt des β -NAD auf die IL-1 β -Ausschüttung aus Monozyten reproduziert. Eine Dosis von 1 mM β -NAD führte dabei zu einer fast vollständigen Inhibition der BzATP-induzierten IL-1 β -Ausschüttung aus U937-Zellen (Abb. 5). Es ist bekannt, dass intrazellulär hohe Konzentrationen an β -NAD eine Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms verhindern können und so ebenfalls zu einer verminderten IL-1 β -Ausschüttung führen (Traba et al., 2015). Extrazelluläres β -NAD kann über die Zellmembran in die Zelle aufgenommen werden; dies erfolgt allerdings langsam, mit einem Höhepunkt nach etwa 6 Stunden (Bruzzone et al., 2001; Pittelli et al., 2011). Da in der vorliegenden Arbeit die gemeinsame Inkubationszeit der U937-Zellen mit β -NAD und BzATP bei 30 Minuten lag und es in dieser Zeit bereits zu einer nahezu vollständigen

Inhibition der IL-1 β -Ausschüttung kam, erscheint eine verminderte Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms durch Aufnahme des extrazellulären β -NAD unwahrscheinlich.

Bei den verwendeten U937-Zellen handelt es sich um eine humane, histiozytäre Lymphomzelllinie, welche als *in vitro*-Modell für humane Monozyten sehr gut etabliert ist und bereits in zahlreichen Studien verwendet wurde (Sundström & Nilsson, 1976; Minafra et al., 2011; Galindo & Clavijo-Ramírez, 2020). Es ist bekannt, dass U937-Zellen zu Makrophagen differenzieren können (Caligo et al., 1996; Minafra et al., 2011), zahlreiche Eigenschaften von humanen Monozyten aufweisen und einfach in der Handhabung sind (Chanput et al., 2015). Dennoch birgt eine Kultivierung von Zellen, außerhalb ihrer natürlichen Umgebung und ohne die Interaktion mit anderen Zellen, die Möglichkeit eines abweichenden Antwortverhaltens und einer abweichenden Sensitivität, im Vergleich zu somatischen Zellen in ihrer natürlichen Umgebung (Haynes, 2006; Schildberger et al., 2013). Neben den Vorteilen der U937-Zelllinie, ist zudem zu erwähnen, dass es sich um eine Krebszelllinie handelt, welche Mutationen und Chromosomenanomalien aufweisen kann und bei der mit der Zeit weitere Mutationen auftreten können (Strefford et al., 2001).

Auf Grund der genannten Limitationen der U937-Zellen, wurde der inhibitorische Effekt des β -NAD auf die BzATP-induzierte Freisetzung von IL-1 β in der vorliegenden Arbeit an primären humanen PBMC von gesunden männlichen Spendern überprüft (Abb. 7 A, B). Die inhibierende Wirkung von β -NAD auf die BzATP-induzierte Freisetzung von IL-1 β konnte in den PBMC bestätigt werden. Der Effekt zeigte sich signifikant, jedoch nicht in einem so starken Ausmaß, wie er bei den eingesetzten U937-Zellen zu beobachten war. PBMC schließen neben Monozyten in verschiedenen Differenzierungs- und Aktivierungsstadien auch Lymphozyten, natürliche Killerzellen und dendritische Zellen mit ein (Bolen et al., 2011), welche möglicherweise nicht in gleichem Maße auf β -NAD reagieren. Diese gemischte Zusammensetzung kann auch eine Erklärung für die hohe interindividuelle Variabilität der einzelnen Blutspender sein. So variierte die BzATP induzierte Freisetzung von IL-1 β zwischen 335 pg/ml und 4070 pg/ml (Abb. 7 A, B). Diese konnte durch Zugabe von β -NAD auf Messwerte zwischen 82 pg/ml und 1140 pg/ml reduziert werden (Abb. 7 A, B). Um eine selektivere Untersuchung von Monozyten zu gewährleisten, wäre beispielsweise eine Positivselektion mittels Antikörper-Magnetbeads, gegen den Monozyten-Oberflächenmarker CD14, möglich (Hecker et al., 2015). Wie bereits in 1.2 beschrieben, sind drei verschiedene

Monozytentypen bekannt, die sich nicht nur in ihrer Funktion unterscheiden, sondern auch in der Expression der Glykoproteine CD14 und CD16 (Passlick et al., 1989; Ziegler-Heitbrock et al., 2010). 85 % der zirkulierenden Monozyten sind sog. klassische CD14⁺⁺ CD16⁻ Monozyten. Die weiteren 15 % bestehen aus intermediären CD14⁺⁺ CD16⁺ und nicht klassischen CD14⁺ CD16⁺⁺ Monozyten (Passlick et al., 1989; Wong et al., 2011), welche durch die Positivselektion jedoch nicht in gleichem Maß berücksichtigt würden. Zudem kann der Einsatz von Antikörper-Magnetbeads gegen CD14 bereits eine Ausschüttung von Zytokinen, wie IL-1 β , bewirken (Tang et al., 2002). Durch die verschiedenen Eigenschaften der unterschiedlichen Monozytentypen ist es nicht auszuschließen, dass sich auch die Wirkung von β -NAD an den verschiedenen Monozytentypen unterscheidet. Inwieweit der in der vorliegenden Arbeit gezeigte Effekt beim Menschen *in vivo* reproduziert werden kann, steht zur Diskussion und bedarf weiteren Untersuchungen.

Zwischen dem weiblichen und dem männlichen Geschlecht lassen sich Unterschiede in der Immunantwort erkennen (Abdullah et al., 2012). Bei Frauen kann, beispielsweise im Rahmen einer Vakzinierung, eine stärkere humorale und zelluläre Immunantwort beobachtet werden als bei Männern (Kennedy et al., 2009). Ebenso unterscheidet sich die Zusammensetzung der Blutleukozyten zwischen den beiden Geschlechtern; so lassen sich bei Frauen beispielsweise niedrigere Anteile an natürlichen Killerzellen finden (Abdullah et al., 2012). Auch der Anteil an T- und B-Lymphozyten unterscheidet sich zwischen den beiden Geschlechtern (Chng et al., 2004). Einfluss hierauf können die Unterschiede im Hormonhaushalt haben. So ist beispielsweise ein negativer Einfluss von Progesteron und Östrogen auf Menge und Aktivität von natürlichen Killerzellen bekannt (Roberts et al., 2001). Um mögliche geschlechtsspezifische Einflüsse auf die Wirkung von β -NAD und die Ausschüttung von IL-1 β auszuschließen, wurden in der vorliegenden Arbeit ausschließlich PBMC aus Blutproben von gesunden männlichen Spendern isoliert. Dies muss allerdings auch bei der möglichen Übertragbarkeit auf den Effekt von β -NAD *in vivo* berücksichtigt werden. Ein möglicher geschlechterspezifischer Unterschied in der Wirkung von β -NAD könnte Gegenstand zukünftiger Untersuchungen sein.

In Vorarbeiten zeigten Hiller et al., dass der inhibitorische Effekt des β -NAD über die P2Y₁- und P2Y₁₁-Rezeptoren vermittelt wird (Hiller et al., 2018). Es ist bekannt, dass P2Y-Rezeptoren zu einer Aktivierung der iPLA2 β führen können (Bruner & Murphy, 1993). Dies kann entweder direkt durch Aktivierung von G-Proteinen oder durch eine

Aktivierung der Phospholipase-C, welche zur Bildung von IP₃ und durch Aktivierung des IP₃-Rezeptors zu einer vermehrten Ca²⁺-Mobilisierung aus intrazellulären Speichern führt, erfolgen (Bruner & Murphy, 1993; von Kügelgen & Hoffmann, 2016). In der vorliegenden Arbeit sollte deshalb in einer weiteren Versuchsreihe die Beteiligung der iPLA2 β an der Signaltransduktion durch den Einsatz spezifischer Inhibitoren (BEL und ATK) untersucht werden (Street et al., 1993; Ackermann et al., 1995). In Anwesenheit von BEL und auch von ATK wurde die inhibierende Wirkung von β -NAD auf die ATP-abhängige IL-1 β -Ausschüttung vollständig aufgehoben (Abb. 9) und somit eine Beteiligung der iPLA2 β an dem β -NAD-vermittelten Effekt nahegelegt. BEL ist bekannterweise ein selektiver, irreversibler Inhibitor der iPLA2 β (Zupan et al., 1993; Ackermann et al., 1995; Balsinde & Dennis, 1996), während ATK reversibel an der iPLA2 β und an der cPLA2 wirkt (Bartoli et al., 1994; Ackermann et al., 1995; Alzola et al., 1998). Es ist dennoch nicht auszuschließen, dass die eingesetzten Inhibitoren auch andere, bisher nicht untersuchte Enzyme, hemmen (Balsinde & Dennis, 1996; Baskakis et al., 2008). Da sowohl beim Einsatz von BEL, als auch beim Einsatz von ATK eine vollständige Umkehr des β -NAD-vermittelten Effekts auf die ATP-abhängige IL-1 β -Ausschüttung erfolgte und somit sowohl die cPLA2, als auch die iPLA2 β für die, in dieser Arbeit, untersuchte Signaltransduktion in Frage kämen, erfolgten im nächsten Schritt Transfektionen mit siRNA, um die Expression von *PLA2G6* herunterzuregulieren.

Um die Rolle der iPLA2 β an der Signaltransduktion zu bestätigen, wurden U937-Zellen mit spezifischer siRNA gegen die *PLA2G6* transfiziert. Hierdurch konnte der Effekt von β -NAD stark abgeschwächt werden (Abb. 11). Es ist bekannt, dass U937-Zellen zu den schwer zu transfizierenden Zellen zählen (Martinet et al., 2003). Benutzt wurde daher die Technik der *nucleofection*, bei der die Transfektion non-viral mittels Elektroporation erfolgt, was als eine der erfolgversprechendsten Techniken zur Transfektion von U937-Zellen bekannt ist (Weir & Meltzer, 1993; Martinet et al., 2003; Amati et al., 2017; Backhaus et al., 2017). Zur Überprüfung des Erfolges der Transfektionen wurden Western Blot Experimente durchgeführt. Diese zeigten, dass die Transfektionen der U937-Zellen mit siRNA gegen die iPLA2 β zu einer signifikanten Reduktion der iPLA2 β -Proteine führte, verglichen mit U937-Zellen, welche mit einer unspezifischen Kontroll-siRNA transfiziert wurden. Allerdings führte die Transfektion nicht zu einer vollständigen Unterdrückung der iPLA2 β -Proteine. Hier zeigte sich lediglich eine tendenzielle Reduktion, welche allerdings nicht statistisch signifikant war. Die Ursache

hierfür könnte unter anderem in der bereits beschriebenen schlechten Transfizierbarkeit der U937-Zellen begründet liegen.

Um die Problematik der schlechten Transfizierbarkeit zu umgehen, könnten in Folgearbeiten iPLA2 β -gendifiziente Mäuse eingesetzt werden (Deng et al., 2016). In Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe konnte die Isolation von PBMC, aus gendifizienten Mäusen für die iPLA2 β , bereits erfolgreich durchgeführt werden (Richter et al., 2016; Siebers et al., 2018). Ähnliche Experimente könnten somit hilfreich sein, um die Rolle der iPLA2 β in der β -NAD vermittelten Signalkaskade weiter zu untermauern.

Die Aktivierung der iPLA2 β führt zu einer vermehrten Spaltung von Phosphatidylcholinen aus der Zellmembran, was in einer vermehrten Bildung von freien Fettsäuren und Lysophosphatidylcholinen resultiert (Turk & Ramanadham, 2004). Unter den Fettsäuren ist die Arachidonsäure besonders relevant, welche als Vorläufer verschiedener Oxylipide dient. Lysophosphatidylcholine können zu Glycerophosphocholin, PC oder Cholin metabolisiert werden (Atsumi et al., 1998; Turk & Ramanadham, 2004). In Vorarbeiten konnte bereits gezeigt werden, dass freies PC, PC-modifizierte Makromoleküle, Lysophosphatidylcholin, Glycerophosphocholin und Cholin als Agonisten von nAChR, mit den Untereinheiten $\alpha 7$, $\alpha 9$ und $\alpha 10$, fungieren und deren Aktivierung zu einer Inhibition der ATP-vermittelten IL-1 β -Ausschüttung aus Monozyten führt (Hecker et al., 2015; Richter et al., 2016; Zakrzewicz et al., 2017). Um zu untersuchen, ob die β -NAD-induzierte Aktivierung der iPLA2 β zur Ausschüttung eines löslichen bioaktiven, cholinergen Faktors führt, wurden in der vorliegenden Arbeit Experimente mit konditionierten Medien durchgeführt. Zur Herstellung des konditionierten Mediums wurden mit LPS vorstimulierte U937-Zellen, in Abwesenheit von BzATP und alleiniger Anwesenheit von β -NAD, stimuliert. Anschließend wurde der zellfreie Überstand abgenommen und in den folgenden Versuchsreihen als konditioniertes Medium verwendet. Der Einsatz von konditioniertem Medium führte zu einer signifikanten Reduktion der ATP-vermittelten IL-1 β -Ausschüttung aus U937-Zellen (Abb. 14). Die Halbwertszeit von β -NAD liegt bei nur wenigen Sekunden, da es extrazellulär durch CD38 zügig abgebaut wird (Horenstein et al., 2015; Hogan et al., 2019; Chini et al., 2021). Dennoch kann nicht vollständig ausgeschlossen werden, dass sich geringe Mengen von β -NAD im zuvor beschriebenen konditionierten Medium befanden. Um die Hypothese der Ausschüttung eines löslichen bioaktiven Faktors zu

untermauern, wurden in der vorliegenden Arbeit Experimente mit verschiedenen Inhibitoren der P2Y-Rezeptoren und der iPLA2 β durchgeführt.

Als spezifische Inhibitoren der P2Y-Rezeptoren wurde zum einen MRS2279 als Inhibitor des P2Y₁-Rezeptors und zum anderen NF340 als Inhibitor des P2Y₁₁-Rezeptors eingesetzt (Boyer et al., 2002; Dreisig & Kornum, 2016). Die inhibierende Wirkung des konditionierten Mediums auf die ATP-vermittelte IL-1 β -Ausschüttung wurde durch die Anwesenheit von MRS2279 oder NF340 nicht beeinflusst (Abb. 14). Die beiden Inhibitoren schwächten jedoch die Wirkung von β -NAD signifikant ab (Hiller et al., 2018). Somit konnte gezeigt werden, dass der Effekt des konditionierten Mediums unabhängig von den P2Y-Rezeptoren ist. Um die Unabhängigkeit des Effekts von der iPLA2 β zu untersuchen, wurde BEL als spezifischer Inhibitor eingesetzt. Die Anwesenheit von BEL hatte keinen Einfluss auf die inhibierende Wirkung des konditionierten Mediums auf die ATP-vermittelte IL-1 β -Ausschüttung (Abb. 14). Die aufgezeigte Unabhängigkeit des konditionierten Mediums von den P2Y-Rezeptoren und der iPLA2 β macht eine Vermittlung über noch im konditionierten Medium enthaltenes β -NAD unwahrscheinlich und spricht für das Vorhandensein eines löslichen bioaktiven Faktors. Um die Hypothese weiter zu untermauern, könnte der Faktor in Folgearbeiten z. B. mit massenspektrometrischen Methoden identifiziert werden.

Wie bereits in 1.5.1 beschrieben, kann die ATP-induzierte IL-1 β -Ausschüttung aus U937-Zellen durch die Aktivierung von nAChR mit Agonisten, wie ACh, Cholin, freies PC, PC-modifizierte Makromoleküle, Lysophosphatidylcholin oder Glycerophosphocholin inhibiert werden (Hecker et al., 2015; Richter et al., 2016). Hiller et al. zeigten in Vorarbeiten, dass auch der inhibitorische Effekt von β -NAD auf die ATP-vermittelte IL-1 β -Ausschüttung *downstream* über nAChR vermittelt wird (Hiller et al., 2018). Hierbei zeigte sich die α 9-Untereinheit der nAChR für die β -NAD-vermittelte Wirkung essenziell, wohingegen die nAChR-Untereinheit α 7 keinen Einfluss hatte (Hiller et al., 2018). Um zu untersuchen, welche Untereinheiten für die Bindung des löslichen bioaktiven Faktors essenziell sind, wurden Experimente mit konditioniertem Medium in An- und Abwesenheit spezifischer Inhibitoren, den Conopeptiden ArIB[V11L,V16D] und RgIA4, der nAChR-Untereinheiten, durchgeführt. ArIB[V11L,V16D] ist ein spezifischer Antagonist der α 7-Untereinheit und RgIA4 ein spezifischer Antagonist der α 9/ α 10-Untereinheiten des nAChRs (Whiteaker et al., 2007; Romero et al., 2017; Grau et al., 2019). Die Applikation des Conopeptids ArIB[V11L,V16D] hatte keinen Einfluss auf

die Inhibition der ATP-vermittelten IL-1 β -Ausschüttung durch konditioniertes Medium, wohingegen die Applikation des Conopeptids RgIA4 zu einer vollständigen Umkehr des inhibitorischen Effekts des konditionierten Mediums auf die IL-1 β -Ausschüttung führte. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Untereinheiten α 9 und/oder α 10 für die Wirkung des löslichen bioaktiven Faktors unabdingbar sind, wobei die Untereinheiten α 7 und α 10 funktionell redundant sind (Hiller et al., 2018). Dies wurde in gleicher Weise bereits für β -NAD gezeigt (Hiller et al., 2018).

Des Weiteren weisen diese Ergebnisse einen Unterschied zu einem ähnlichen, von Amati et al. beschriebenen Mechanismus auf (Amati et al., 2017). In der Arbeit von Amati et al. kam es, wie bereits beschrieben, zu einer Chemokin-vermittelten Aktivierung der iPLA2 β sowie ebenfalls zu einer Ausschüttung eines löslichen bioaktiven Faktors durch U937-Zellen, welcher als Agonist am nAChR wirkt und somit die ATP-vermittelte IL-1 β -Ausschüttung inhibiert (Amati et al., 2017). Der von Amati et al. beschriebene Faktor benötigt allerdings alle drei nAChR-Untereinheiten (α 7, α 9 und α 10) (Amati et al., 2017). Für Nikotin, ACh oder PC wurden ähnliche Ergebnisse beschrieben, denn auch diese benötigen alle drei nAChR-Untereinheiten (α 7, α 9 und α 10) (Hecker et al., 2015; Richter et al., 2016; Zakrzewicz et al., 2017). Es ist daher davon auszugehen, dass es sich bei dem durch β -NAD ausgeschütteten bioaktiven Faktor um ein anderes Molekül handeln muss, als bei Amati et al. (Amati et al., 2017). Möglich wäre eine Ähnlichkeit zu Dipalmitoylphosphatidylcholin (DPPC), welches den Hauptbestandteil des Surfactants in der Lunge darstellt (Agassandian & Mallampalli, 2013). DPPC kann ebenfalls als Agonist am nAChR eine inhibierende Wirkung auf die IL-1 β -Ausschüttung vermitteln (Backhaus et al., 2017). Wichtig für den durch Backhaus et al. beschriebenen Wirkmechanismus ist ebenfalls die nAChR-Untereinheit α 9, welche zwingend benötigt wird (Backhaus et al., 2017). Die Bildung von Phosphatidylcholinen, zu welchen DPPC zählt, ist allerdings unabhängig von der iPLA2 β (Bao et al., 2006), somit ist es unwahrscheinlich, dass es sich bei dem in dieser Arbeit beschriebenen unbekanntem Faktor um ein Phosphatidylcholin handelt. Die Identifizierung des in der vorliegenden Arbeit beschriebenen löslichen bioaktiven Faktors bedarf weiterer zukünftiger Untersuchungen. Zur möglichen Identifizierung des bioaktiven Faktors könnten in Folgearbeiten beispielsweise *Lipidomics*-Analysen durchgeführt werden. *Lipidomics*-Analysen kombinieren mehrere Analysemethoden, wie beispielsweise die Massenspektrometrie, welche auf Grund ihrer

Spezifität und Sensitivität eine der Methoden der Wahl bei der Analyse von Lipiden darstellt (Rustam & Reid, 2018; Züllig et al., 2020).

4.2 Zellvitalität

Zelltod kann sowohl bei Eukaryonten, als auch bei Prokaryonten über verschiedene Mechanismen erfolgen (Galluzzi et al., 2018). Unterschieden werden unter anderem die Apoptose von der Pyroptose und der Necroptose (Wang & Kanneganti, 2021). Regulierter Zelltod erfolgt beispielsweise auf Grund von extrazellulärem oder intrazellulärem Stress, kann aber auch physiologisch im Rahmen von Zellalterung oder Gewebeumbau erfolgen (Conradt, 2009; Fuchs & Steller, 2011; Galluzzi et al., 2018). Im Rahmen der Apoptose kommt es zunächst nicht zu einer Ruptur der Zellmembran (Green et al., 2016; Galluzzi et al., 2018). Falls die apoptotischen Zellen jedoch nicht eliminiert werden, kann eine sogenannte sekundäre Necroptose einsetzen, bei der die Zellen aufbrechen (Galluzzi et al., 2018; Wang & Kanneganti, 2021). Im Gegensatz dazu führen die Pyroptose und die Necroptose per se zur Ruptur der Zellmembran und damit zum Austritt von intrazellulären Bestandteilen (Galluzzi et al., 2018; Wang & Kanneganti, 2021). Im Rahmen der Pyroptose kommt es vor dem Aufbrechen der Zelle zur Aktivierung des porenbildenden Proteins Gasdermin und dessen Einlagerung in die Zellmembran (Kayagaki et al., 2015; Shi et al., 2015; Evavold et al., 2018; Wang & Kanneganti, 2021), was eine Ausschüttung von pro-inflammatorischen Zytokinen, wie IL-1 β oder IL-18 bereits vor Vollendung der Pyroptose ermöglicht (Kayagaki et al., 2015; Shi et al., 2015) und die hohe Bedeutung der Prüfung der Zellvitalität in dieser Arbeit erklärt. Um auszuschließen, dass die beschriebenen Effekte durch Freisetzung intrazellulärer Stoffe durch Zelltod zustande gekommen sind, wurde die Aktivität des Zytoplasmaproteins LDH bestimmt.

In der vorliegenden Arbeit wurde die LDH-Aktivität im zellfreien Überstand gemessen und mit der, durch die gleiche Zahl lysierter Zellen freigesetzte LDH-Aktivität, verglichen. Rechnerisch konnte so ein Wert für den prozentualen Zelltod ermittelt werden. Der so ermittelte prozentuale Wert an nichtvitalen Zellen zeigte sich bei U937-Zellen mit 11 % bei Experimenten mit siRNA am höchsten, was durch die zellschädigende Wirkung der Methode erklärbar ist (Abb. 12). Im Vergleich lag diese Zelltodrate allerdings nur leicht über dem gemessenen Anteil an nichtvitalen Zellen der anderen Versuchsreihen. Aus nicht geklärten Gründen ergab die Applikation von β -NAD

gemeinsam mit BzATP, im Vergleich zu unbehandelten U937-Zellen, eine signifikant erhöhte Zelltodrate, von maximal 10 %, bei zwei der durchgeführten Versuchsreihen (Abb. 6; Abb. 12). Dies stellt jedoch, im Vergleich zu den anderen Versuchsreihen, keine stark erhöhte Zelltodrate dar und hatte vermutlich keinen Einfluss auf die IL-1 β -Ausschüttung. In den Experimenten mit PBMC, zeigte sich bei einem einzigen Spender mit 16 % eine leicht erhöhte Zelltodrate (Abb. 8 A;B). Verglichen mit den Experimenten mit U937-Zellen, zeigte sich diese jedoch nicht signifikant erhöht. Eine mögliche Ursache könnten ungeklärte individuelle Unterschiede der Spender in ihrer Zellvitalität oder das verwendete Aufreinigungsverfahren (2.2.5) sein. Weiterhin ist auch ein technisches Problem im Rahmen der Herstellung und Messung der lysierten Referenzzellen möglich. Einen Einfluss auf die BzATP-induzierte IL-1 β -Ausschüttung scheint es, im Vergleich zu den anderen Spendern, nicht gegeben zu haben. Die Methode der LDH-Bestimmung wurde als valide Methode bereits in zahlreichen Vorarbeiten verwendet (Hecker et al., 2015; Richter et al., 2016; Amati et al., 2017; Zakrzewicz et al., 2017; Hiller et al., 2018; Richter et al., 2018; Siebers et al., 2018). Verglichen mit diesen Arbeiten ist die Zelltodrate in der vorliegenden Arbeit mit maximal 10 % nicht sehr hoch. Auch die Zelltodrate der Experimente mit siRNA ähnelt mit 11 % den Vorarbeiten (Hecker et al., 2015; Richter et al., 2016; Amati et al., 2017; Hiller et al., 2018; Siebers et al., 2018).

4.3 Klinisches Potenzial

Das klinische bzw. therapeutische Potenzial von β -NAD und seinen Vorläufermolekülen ist seit einigen Jahren Gegenstand der Forschung. Wie bereits erwähnt, konnten in Tiermodellen bereits gute therapeutische Ergebnisse unter dem Einsatz von β -NAD bei Erkrankungen wie Alzheimer, Diabetes mellitus oder Krebs gezeigt werden (siehe 1.6) (Houtkooper et al., 2010; Gong et al., 2013; Brown et al., 2013; Yang & Sauve, 2016). Beispielsweise konnten Umaphy et al. anti-inflammatorische Effekte durch β -NAD, vermittelt über P2Y_{1/11}-Rezeptoren, bereits *in vivo* in der Maus zeigen (Umaphy et al., 2010, 2012). In der Literatur wird β -NAD in der Maus als Agonist am P2X7-Rezeptor beschrieben, wohingegen es beim Menschen als Antagonist gilt (Semán et al., 2003; Hubert et al., 2010). Bei der Maus kommt es vermittelt durch das Enzym RT6 zu einer ADP-Ribosylierung des P2X7-Rezeptors, wobei β -NAD als Substrat benötigt wird (Semán et al., 2003; Hubert et al., 2010). RT6 agiert als eine mono-ADP-

Ribosyltransferase (Koch-Nolte et al., 1996), welche interessanterweise auf Grund eines verfrühten Stopcodons beim Menschen nicht zu finden ist (Haag et al., 1994).

Im Alter kommt es zu einer Abnahme der zellulären β -NAD Konzentration. Wird diese therapeutisch angehoben, lassen sich positive Effekte auf die Gesundheit und Krankheitsentwicklung verschiedener Spezies, von Hefen bis hin zu Nagetieren, beobachten (Balan et al., 2008; Rajman et al., 2018). Eine Erhöhung der β -NAD-Konzentration kann auf 3 Wegen erfolgen: durch die Aktivierung der β -NAD-Synthesewege, durch Hemmung des β -NAD-Abbaus oder durch Zufuhr von β -NAD-Vorläufermolekülen (Rajman et al., 2018). Die Aktivierung der NAD-Synthesewege könnte durch zusätzliche Zufuhr der limitierenden Enzyme der Synthesewege erfolgen. Nicotinamid-Phosphoribosyltransferase (NAMPT) ist beispielsweise eines der limitierenden Enzyme der Umwandlung von NAM zu NAD^+ ; die Wirkung von NAMPT-Aktivatoren konnte bisher allerdings nur *in vitro* gezeigt werden (Rajman et al., 2018). Die Hemmung des NAD-Abbaus kann durch Hemmung der NAD-verbrauchenden Enzyme, wie beispielsweise der PARP, SIRT oder von CD38 erfolgen (Bai et al., 2011; Escande et al., 2013; Braidy et al., 2019). Die Vorläufermoleküle Nikotinamid-Ribosid und Nikotinamid-Mononukleotid (NMN) können bei Supplementierung zu erhöhten NAD-Konzentrationen führen. Sie sind löslich und auch nach oraler Einnahme bioverfügbar (Trammell et al., 2016). Bei der Maus kann oral aufgenommenes NMN über den Darmtrakt aufgenommen werden und im Blut, der Leber oder dem Skelettmuskel in NAD umgewandelt werden (Rajman et al., 2018). Die klinische Studienlage beim Menschen zeigt hierzu gemischte Ergebnisse. Die erste klinische Studie zur Supplementierung von Vorläufermolekülen erfolgte 2016, welche keine Zunahme von NAD, dennoch aber von NAD-Metaboliten im Plasma durch die dosisabhängige NMN-Einnahme bei 10 gesunden Männern zeigen konnte (Irie et al., 2020). Weitere klinische Studien konnten ähnliche Ergebnisse zeigen. Yi et al. zeigten 2022 in einer klinischen Multicenter-Studie, dass die orale Aufnahme von NMN dosisabhängig zu einer Erhöhung der NAD-Konzentration im Vollblut der Probanden führte (Yi et al., 2023). Gegensätzliche Ergebnisse zeigten hingegen Morita et al. in deren Studie es zu einer Abnahme der NAD-Konzentrationen im Plasma nach oraler NMN-Einnahme kam (Morita et al., 2022). Allen Studien war jedoch gemein, dass die orale Einnahme von NAD-Vorläufermolekülen nicht zu vermehrtem Auftreten unerwünschter Nebenwirkungen führte (Irie et al., 2020; Yoshino et al., 2021; Pérez et al., 2021; Morita

et al., 2022; Yi et al., 2023). Aktuelle Studien zeigen zudem Hinweise dafür, dass auch beim Menschen die Supplementierung von NAD-Vorläufermolekülen Vorteile in der Behandlung von Erkrankungen, wie Diabetes mellitus oder Morbus Parkinson erbringen könnte (Yoshino et al., 2021; Pérez et al., 2021). So bewirkte eine NMN-Einnahme beispielsweise eine gesteigerte Insulinsensitivität der Muskulatur von übergewichtigen Frauen, welche an einem Prädiabetes litten (Yoshino et al., 2021). Interessanterweise ergaben sich zudem Hinweise für anti-inflammatorische Effekte durch die Einnahme von NAD-Vorläufermolekülen (Elhassan et al., 2019; Zhou et al., 2020). Elhassan et al. zeigten beispielsweise, dass oral zugeführtes Nikotinamid-Ribosid zu einer Senkung proinflammatorischer Zytokine im Blut der männlichen Probanden zwischen 70 und 80 Jahren führte (Elhassan et al., 2019).

Die direkte Zufuhr von β -NAD ist bisher nur wenig untersucht (Radenkovic et al., 2020). Da es sich bei β -NAD um ein körpereigenes Molekül handelt ist auch hierbei von einem geringen Nebenwirkungsspektrum auszugehen, was einen eindeutigen Vorteil für das therapeutische Potenzial darstellt. Der in dieser Arbeit untersuchte unbekannte lösliche bioaktive Faktor, könnte ebenfalls therapeutische Anwendung finden. Erkrankungen, welche mit einer erhöhten IL-1 β -Konzentration einhergehen erscheinen demnach als therapeutisches Ziel sinnvoll. Hierzu zählen zahlreiche chronische Erkrankungen, wie beispielsweise Diabetes mellitus, Gicht, juvenile Arthritis oder das familiäre Mittelmeerfieber (Dinarello, 2005; Pascual et al., 2005; Ren & Torres, 2009). Auch in Bezug auf die Entwicklung einer generalisierten systemischen Entzündungsreaktion (*systemic inflammatory response syndrome*, SIRS), welche im Rahmen erhöhter IL-1 β -Konzentrationen beispielsweise nach großen chirurgischen Eingriffen oder Traumata auftreten können, zeigt sich mögliches therapeutisches Potenzial (Giannoudis, 2003; Wen et al., 2010). Gerade im Hinblick auf die sehr kurze Halbwertszeit von extrazellulärem β -NAD, welche im Bereich weniger Sekunden liegt, bevor es zu einem Abbau durch Enzyme kommt (Cakir-Kiefer et al., 2001; Horenstein et al., 2015), könnte die Identifizierung des unbekanntes Faktors den Einsatz eines stabilen künstlichen Inhibitors der ATP-vermittelten IL-1 β -Ausschüttung ermöglichen. Die noch ausstehende Identifizierung könnte hierbei mehr Hinweise auf die Möglichkeiten der Bioverfügbarkeit und des therapeutischen Potenzials bieten. Da IL-1 β eine essenzielle Rolle im Rahmen der Immunabwehr im Falle einer Infektion spielt, sollte eine potenziell zu starke Inhibition der IL-1 β -Ausschüttung beim möglichen therapeutischen Einsatz von β -NAD

bedacht werden. Ein großer Vorteil von β -NAD für den therapeutischen Einsatz, beispielsweise zur Behandlung und Prävention des SIRS, besteht darin dass eine ATP-unabhängige Ausschüttung von IL-1 β , häufig ausgelöst durch Pathogene, nicht gehemmt würde (Lopez-Castejon & Brough, 2011; Hiller et al., 2018).

Neben einer oralen und intravenösen Einsetzbarkeit sind auch lokale Applikationen von Medikamenten, die auf Basis dieser Studie entwickelt werden, denkbar. Da IL-1 β , wie bereits erwähnt, eine wichtige Rolle in der Entstehung und dem Verlauf von Erkrankungen, wie juveniler Arthritis oder Gicht spielt (Dinarello, 2005; Pascual et al., 2005), wäre eine lokale Injektion in ein betroffenes Gelenk denkbar. Die mögliche lokale Wirkung könnte hierbei einen deutlichen Vorteil zu den aktuell eingesetzten, systemisch wirksamen Therapeutika, wie beispielsweise Anakinra darstellen. Auch wenn das Nebenwirkungsspektrum bei der Behandlung mit Anakinra gering ist, kann es dennoch unter anderem zu Blutbildveränderungen, zu einer Erhöhung der Leberwerte oder zu einer erhöhten Infektionsgefahr kommen (Mertens & Singh, 2009a; Ramírez & Cañete, 2018).

4.4 Schlussfolgerung und Ausblick

Als Ausgangspunkt dieser Arbeit dienten Vorarbeiten welche zeigten, dass β -NAD durch Bindung an die Rezeptoren P2Y₁ und P2Y₁₁ zu einer Aktivierung von nAChR, welche die Untereinheiten α 9 oder α 7/ α 10 beinhalten, führt. Die Aktivierung der nAChR wiederum führt, durch Hemmung des P2X7-Rezeptors, zu einer Inhibition der Ausschüttung von IL-1 β (Abb. 16). In der vorliegenden Arbeit konnten die Ergebnisse der Vorarbeiten repliziert werden. Es konnte bewiesen werden, dass β -NAD *in vitro* vermittelt durch P2Y₁- und P2Y₁₁-Rezeptoren zu einer Inhibition der IL-1 β -Ausschüttung führt. Dieser inhibitorische Effekt konnte ebenfalls an primären humanen Zellen, durch Einsatz von Spender-PBMC, gezeigt werden. Die Ergebnisse dieser Arbeit präsentieren Aspekte einer Signalkaskade, welche durch die Bindung von β -NAD an die P2Y₁- und P2Y₁₁-Rezeptoren aktiviert wird. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit weisen eine Beteiligung der iPLA2 β an der Signalkaskade nach. Zudem zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit, dass β -NAD durch Aktivierung der iPLA2 β , zur Ausschüttung eines löslichen bioaktiven Faktors führt, welcher als Agonist an nAChR wirkt (Abb. 16). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass für die Bindung dieses nikotinischen Agonisten, die nAChR-Untereinheit α 9 zwingend benötigt wird. Mit der vorliegenden Arbeit wurde die Signalkaskade hinter der anti-inflammatorischen Wirkung von β -NAD identifiziert. Eine

in dieser Arbeit nicht erfolgte Identifizierung des bioaktiven löslichen Faktors erscheint in Zukunft höchst interessant, da sie die Herstellung von Mustersubstanzen ermöglichen kann, welche als zukünftige Therapeutika eingesetzt werden könnten. Dies könnte der Entwicklung neuer Therapiestrategien zur Behandlung von zahlreichen chronischen Erkrankungen sowie der Prävention von postoperativ oder posttraumatisch bedingtem SIRS, dienen.

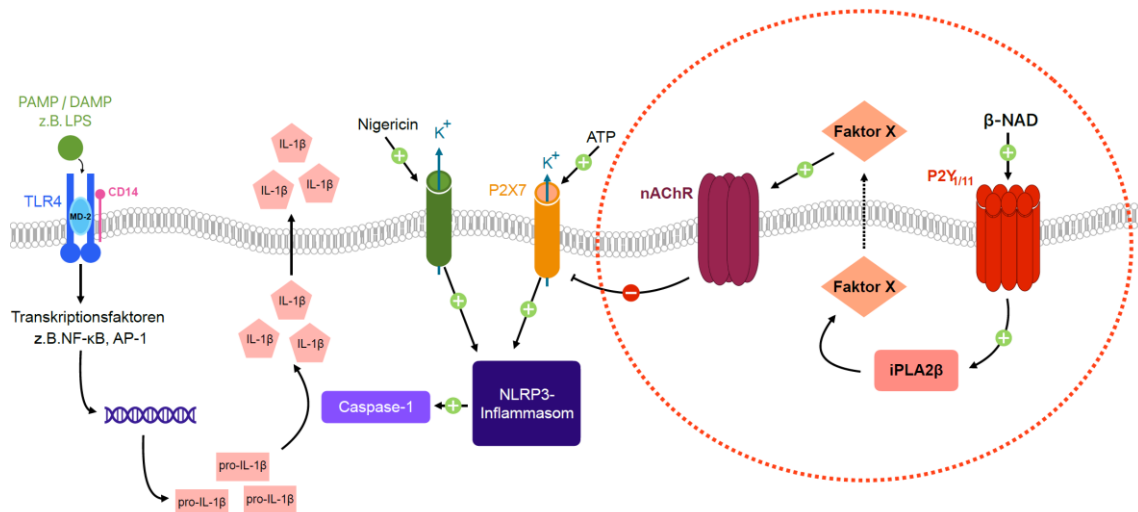


Abbildung 16: Schematische Darstellung des in dieser Arbeit gezeigten anti-inflammatorischen Effekts von β -NAD auf die ATP-induzierte Freisetzung von IL-1 β .

Die Freisetzung von IL-1 β bedarf zweier Gefahrensignale. PAMP oder DAMP, beispielsweise LPS, welches als erstes Gefahrensignal den TLR-4-Weg aktiviert, führt zu einer vermehrten Produktion von pro-IL-1 β . ATP, als zweites Gefahrensignal, aktiviert den P2X7-Rezeptor. In der folgenden Signalkaskade und durch einen Kalium-Ausstrom aus der Zelle kommt es zu einer Formierung und Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms, sowie einer Aktivierung der Caspase-1. Diese spaltet Pro-IL-1 β in seine reife Form, welche schließlich freigesetzt werden kann. β -NAD kann an die P2Y₁- und P2Y₁₁-Rezeptoren binden, welche zu einer Aktivierung der iPLA2 β führen. Die Aktivierung der iPLA2 β führt zur Bildung und Ausschüttung eines löslichen bioaktiven Faktor X, welcher extrazellulär an nAChR binden kann. Nach der Aktivierung können nAChR den P2X7-Rezeptor und somit die Bildung und Ausschüttung von IL-1 β hemmen. Die in der vorliegenden Arbeit untersuchte Signaltransduktion ist durch den rot gestrichelten Kreis markiert.

AP-1, Aktivatorprotein-1; ATP, Adenosintriphosphat; CD14, *cluster of differentiation* 14; DAMP, *danger-associated molecular patterns*; IL-1 β , Interleukin-1 β ; iPLA2 β , kalziumunabhängige Phospholipase A2; K⁺, Kaliumion; LPS, Lipopolysaccharid; MD2, *myeloid differentiation factor* 2; β -NAD, β -Nikotinamidadenindinukleotid; nAChR, nikotinsche Acetylcholinrezeptoren; NF- κ B *nuclear factor kappa B*; NLRP-Inflammasome, NACHT, LRR und PYD enthaltendes Protein-Inflammasome; PAMP, *pathogen-associated molecular patterns*; TLR4, Toll-like-Rezeptor 4

5 Kurzfassung

5.1 Deutsch

Einleitung: Interleukin (IL)-1 β ist ein pro-inflammatorische Zytokin des angeborenen Immunsystems. Es spielt eine wichtige Rolle im Rahmen der Immunabwehr, kann jedoch in hohen Konzentrationen zu Fieber, Organschäden und Sepsistentstehung beitragen. Lipopolysaccharid (LPS) kann ein erstes Gefahrensignal darstellen, dass zur Produktion von pro-IL-1 β führt. Als zweites Gefahrensignal kann extrazelluläres Adenosintriphosphat (ATP) durch Inflammasomaktivierung die Spaltung der Pro-Form und die Ausschüttung von reifem IL-1 β bedingen. β -Nikotinamidadenindinukleotid (NAD) ist ein bekanntes Coenzym von Redox-Reaktionen, weist immunmodulatorische Eigenschaften auf und kann die ATP-abhängige IL-1 β -Ausschüttung hemmen. Hier sollen die Hypothesen geprüft werden, dass für die immunmodulatorische Funktion des β -NAD die kalziumunabhängige Phospholipase A2 β (iPLA2 β) notwendig ist und es im Rahmen der Signalkaskade zur Ausschüttung eines löslichen bioaktiven Faktors kommt, der an nikotinischen Acetylcholinrezeptoren (nAChR) wirkt.

Methoden: LPS vorstimulierte U937-Zellen sowie humane mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (PBMC) wurden mit BzATP in An- und Abwesenheit von β -NAD stimuliert. Die IL-1 β -Messung erfolgte mittels *enzyme-linked immuno sorbent assay* im Zellkulturüberstand. Konditioniertes Medium wurde aus dem Überstand von LPS vorstimulierten U937-Zellen, die mit β -NAD stimuliert wurden, hergestellt. Es wurden spezifische Inhibitoren sowie *small interfering ribonucleic acid* (siRNA) gegen die iPLA2 β verwendet. Die Effizienz der Transfektion wurde mittels Western Blot überprüft. Zusätzlich wurden Antagonisten für die nAChR-Untereinheiten eingesetzt.

Ergebnisse: β -NAD führt zu einer Hemmung der ATP-vermittelten IL-1 β -Ausschüttung aus U937-Zellen sowie aus PBMC. Die Notwendigkeit der iPLA2 β für die Signalkaskade konnte bestätigt werden. Der Einsatz von konditioniertem Medium weist auf die Ausschüttung eines noch unbekanntes nikotinischen Agonisten hin, für dessen Wirkung die Untereinheiten $\alpha 9$ und $\alpha 7$ oder $\alpha 10$ des nAcChR unabdingbar sind.

Schlussfolgerung: In dieser Arbeit gelang es, wesentliche Aspekte der Signaltransduktion der β -NAD-vermittelten Inhibition der ATP-induzierten IL-1 β -Ausschüttung durch Monozyten aufzuklären. Auf Basis dieser Erkenntnisse können neue Therapiestrategien zur Behandlung und Prävention zahlreicher entzündlicher Erkrankungen, einschließlich der postoperativen oder posttraumatischen systemischen Entzündung entwickelt werden.

5.2 Englisch

Introduction: Interleukin (IL)-1 β is a pro inflammatory cytokine of the innate immune system. It plays a central role in host defense, however, high systemic concentrations are associated with fever, organ damage and sepsis. Lipopolysaccharide (LPS) can be the first signal, inducing the synthesis of pro-IL-1 β . As a second signal, extracellular adenosine triphosphate (ATP), leads to inflammasome activation, cleavage of pro-IL1 β and release of mature IL-1 β . β -Nicotinamide adenine dinucleotide (β -NAD), a well-known co-enzyme involved in redox-reactions, is also known to modulate immune functions and is able to inhibit the ATP-mediated release of IL-1 β . Here, we tested the hypotheses that the immunomodulatory function of β -NAD requires the activity of the calciumindependent phospholipase A2 β (iPLA2 β) and that a soluble bioactive factor is released, which acts as an agonist of nicotinic receptors.

Methods: Human monocytic U937-cells were primed with LPS and stimulated with BzATP in presence or absence of β -NAD. The same process was performed on human peripheral blood mononuclear cells (PBMC). IL-1 β released into the cell culture supernatants was measured by enzyme-linked immuno sorbent assay. In addition, a conditioned medium was produced by taking cell culture supernatants from LPS primed and β -NAD treated U937-cells. Specific inhibitors of iPLA2 β and small interfering ribonucleic acid (siRNA) technology were used. The efficiency of gene silencing was controlled by Western blotting. In addition inhibitors of the nicotinic acetylcholine receptor (nAChR) subunits were used.

Results: β -NAD leads to an inhibition of ATP-mediated release of IL-1 β from U937-cells as well as from human PBMC. The requirement of the iPLA2 β in the β -NAD signaling pathway was further confirmed by using specific inhibitors and performing experiments with siRNA. The use of conditioned medium from β -NAD-treated cells showed an inhibitory effect on the ATP-induced release of IL-1 β and indicated the release of a soluble agonist of nAChR containing the subunits α 9 and α 7 or α 10.

Conclusion: This study elucidated central aspects of the β -NAD-mediated signal transduction cascade that results in an inhibition of the ATP-induced release of IL-1 β by monocytes. On the basis of this knowledge new therapeutic strategies can be developed for the treatment of numerous inflammatory diseases including the prevention of postoperative or posttraumatic systemic inflammation.

6 Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celcius
%	Prozent
ACh	Acetylcholin
ADP	Adenosindiphosphat
AP-1	Aktivatorprotein-1
APS	Ammoniumperoxodisulfat
Aqua dest.	Aqua destillata
ART	Ribosetransferase
ASC	<i>apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD</i>
ATK	Arachidonyl-Trifluoromethylketon
ATP	Adenosintriphosphat
AU	<i>arbitrary units</i>
BEL	Bromoellakton
BSA	Rinderserumalbumin
BzATP	2'(3')-O-(4Benzoylbenzoyl)-Adenosin 5'-Triphosphat-Triethylammonium-Salz
bzw.	beziehungsweise
Ca ²⁺	Kalziumion
cADP-Synthase	zyklische ADP-Ribose Synthase
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CARD	caspase-aktivierenden und -rekrutierenden Domäne
CCL2	CC-Chemokin-Ligand-2
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
COX-1	Cyclooxygenase-1
cPLA2	kalziumabhängige Phospholipase A2
DAMP	<i>damage-associated molecular pattern</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DPPC	Dipalmitoylphosphatidylcholin
ELISA	<i>enzyme-linked immuno sorbent assay</i>
FCS	fetales Kälberserum
G-CSF	granulozytenstimulierender Faktor
h	Stunden
HCl	Salzsäure
HRP	Meerrettichperoxydase
HSP	Hitzeschockprotein
IL	Interleukin
IL-1-R	IL-1-Rezeptor

IL-1-RA	IL-1-Rezeptorantagonist
IL-1-RI	IL-1-Rezeptor Typ 1
IL-1-RII	IL-1-Rezeptor Typ 2
IP ₃	Inositoltriphosphat
iPLA2β; PLA2G6	kalziumunabhängige Phospholipase A2β
IRF3	interferonregulierender Faktor 3
K ⁺	Kaliumion
LBP	LPS-bindendes Protein
LPS	Lipopolysaccharid
LRR	<i>leucine-rich repeats</i>
MD-2	<i>myeloid differentiation factor-2</i>
MP	Milchpulver
mRNA	<i>messenger</i> Ribonukleinsäure
MyD88	<i>myeloid differentiation primary response 88</i>
Na ⁺	Natriumion
Na ₂ HPO ₄	Di-Natrium-Hydrogenphosphat
nAChR	nikotinischer Acetylcholinrezeptor
NACHT-Domäne	Nukleotid-bindende-Domäne
NaCl	Natriumchlorid
NAD	Nikotinamidadenindinukleotid
NAMPT	Nikotinamid-Phosphoribosyltransferase
NF-κB	<i>nuclear factor kappa B</i>
NLR	<i>(NOD)-like-Rezeptor</i>
NLRP	NACHT, LRR und PYD enthaltendes Protein
NMN	Nikotinamid-Mononukleotid
NOD	<i>nucleotide-binding oligomerisation domain</i>
OD	optische Dichte
P1	Pufferlösung 1
P2	Pufferlösung 2
PAMP	<i>pathogen-associated molecular pattern</i>
PARP	Poly-ADP-Ribosepolymerase
PBMC	humane mononukleäre Zellen des peripheren Blutes
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PBST	Phosphat-gepuffertes Salzlösung mit Tween
PC	Phosphocholin
PGE ₂	Prostaglandin-E ₂
PRR	<i>pattern recognition receptor</i>
PYD	Pyrin-Domäne
ROS	<i>reactive oxigene species</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
siRNA	small interfering ribonucleic acid

SIRS	<i>systemic inflammatory response syndrome</i>
SIRT	Sirtuine
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TIR	Toll/IL-1R-Domäne
TLR	<i>Toll-like-Rezeptor</i>
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
TRAM	<i>TRIF-related adaptor molecule</i>
TRAP	<i>TIR-domain-containing adaptor protein</i>
TRIF	<i>TIR-domain-containing adapter-inducing interferon-β</i>
Tris	Tromethamin
z. B.	zum Beispiel
β -NAD	β -Nikotinamidadenindinukleotid

Tabelle 10: **Abkürzungen**

7 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

7.1 Abbildungen

- Abbildung 1** Zeitlicher Ablauf des Versuchs.
- Abbildung 2** Zeitlicher Ablauf des Versuchs mit konditioniertem Medium.
- Abbildung 3** BzATP induzierte IL-1 β -Freisetzung aus U937-Zellen.
- Abbildung 4** LDH-Aktivität im zellfreien Überstand von LPS stimulierten und mit BzATP inkubierten U937-Zellen.
- Abbildung 5** β -NAD reduziert signifikant die BzATP-induzierte Ausschüttung von IL-1 β .
- Abbildung 6** LDH-Aktivität im zellfreien Überstand von mit LPS stimulierten und mit BzATP und β -NAD inkubierten U937-Zellen.
- Abbildung 7 A;B** β -NAD inhibiert die IL-1 β -Ausschüttung durch humane mononukleäre Zellen des peripheren Blutes.
- Abbildung 8 A;B** LDH-Aktivität im zellfreien Überstand von mit BzATP und β -NAD inkubierten humanen mononukleären Zellen des peripheren Blutes.
- Abbildung 9** BEL und ATK führen zu einer signifikanten Aufhebung der β -NAD vermittelten Inhibition der IL-1 β -Ausschüttung.
- Abbildung 10** LDH-Aktivität im zellfreien Überstand von mit LPS stimulierten und mit BzATP und β -NAD inkubierten U937-Zellen unter Verwendung von Inhibitoren für die iPLA2 β .

- Abbildung 11** Die Herunterregulation der *PLA2G6*-Expression mittels siRNA-Technik führt zu einer Aufhebung der β -NAD vermittelten Inhibition der IL-1 β -Ausschüttung.
- Abbildung 12** LDH-Aktivität im zellfreien Überstand von mit LPS stimulierten und mit BzATP und β -NAD inkubierten transfizierten und nicht transfizierten U937-Zellen.
- Abbildung 13** Die Transfektion mit siRNA gegen die iPLA2 β führt zu einer signifikanten Reduktion der Expression des iPLA2 β -Proteins.
- Abbildung 14** β -NAD führt zur Ausschüttung eines löslichen bioaktiven Faktors in den zellfreien Überstand.
- Abbildung 15** LDH-Aktivität im zellfreien Überstand von mit LPS stimulierten und mit BzATP und β -NAD inkubierten Zellen sowie unter Verwendung von konditioniertem Medium.
- Abbildung 16** Schematische Darstellung des in dieser Arbeit gezeigten anti-inflammatorischen Effekts von β -NAD auf die ATP-induzierte Freisetzung von IL-1 β .

7.2 Tabellen

- Tabelle 1** Reagenzien
- Tabelle 2** Verbrauchsmaterialien
- Tabelle 3** Geräte
- Tabelle 4** Software
- Tabelle 5** Reagenzien und deren Konzentrationen in der Zellsuspension.
- Tabelle 6** Zusammensetzung der Pufferlösungen P1 und P2.
- Tabelle 7** Zusammensetzung der Gele für die SDS-Gelelektrophorese.
- Tabelle 8** Zusammensetzungen der Puffer für die SDS-Gelelektrophorese.
- Tabelle 9** Zusammensetzung des Transferpuffers für das Western Blot-Verfahren.
- Tabelle 10** Abkürzungen

8 Literaturverzeichnis

- Abdullah, M., Chai, P.-S., Chong, M.-Y., Tohit, E. R. M., Ramasamy, R., Pei, C. P., & Vidyadaran, S. (2012). Gender effect on in vitro lymphocyte subset levels of healthy individuals. *Cellular Immunology*, 272(2), 214–219. <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2011.10.009>
- Ackermann, E. J., Conde-Frieboes, K., & Dennis, E. A. (1995). Inhibition of Macrophage Ca²⁺-independent Phospholipase A2 by Bromoenol Lactone and Trifluoromethyl Ketones. *Journal of Biological Chemistry*, 270(1), 445–450. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.1.445>
- Agassandian, M., & Mallampalli, R. K. (2013). Surfactant phospholipid metabolism. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1831(3), 612–625. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2012.09.010>
- Akira, S., Uematsu, S., & Takeuchi, O. (2006). Pathogen Recognition and Innate Immunity. *Cell*, 124(4), 783–801. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.02.015>
- Alefishat, E., Alexander, S. P. H., & Ralevic, V. (2015). Effects of NAD at purine receptors in isolated blood vessels. *Purinergic Signalling*, 11(1), 47–57. <https://doi.org/10.1007/s11302-014-9428-1>
- Alzola, E., Pérez-Etxebarria, A., Kabré, E., Fogarty, D. J., Métioui, M., Chaïb, N., Macarulla, J. M., Matute, C., Dehaye, J.-P., & Marino, A. (1998). Activation by P2X7 Agonists of Two Phospholipases A2 (PLA2) in Ductal Cells of Rat Submandibular Gland. *Journal of Biological Chemistry*, 273(46), 30208–30217. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.46.30208>
- Amati, A.-L., Zakrzewicz, A., Siebers, R., Wilker, S., Heldmann, S., Zakrzewicz, D., Hecker, A., McIntosh, J. M., Padberg, W., & Grau, V. (2017). Chemokines (CCL3, CCL4, and CCL5) Inhibit ATP-Induced Release of IL-1 β by Monocytic Cells. *Mediators of Inflammation*, 2017, 1–10. <https://doi.org/10.1155/2017/1434872>
- Anbzhagan, K., Duroux-Richard, I., Jorgensen, C., & Apparailly, F. (2014). Transcriptomic Network Support Distinct Roles of Classical and Non-Classical Monocytes in Human. *International Reviews of Immunology*, 33(6), 470–489. <https://doi.org/10.3109/08830185.2014.902453>
- Andrei, C., Dazzi, C., Lotti, L., Torrisi, M. R., Chimini, G., & Rubartelli, A. (1999). The Secretory Route of the Leaderless Protein Interleukin 1 β Involves Exocytosis of

- Endolysosome-related Vesicles. *Molecular Biology of the Cell*, 10(5), 1463–1475. <https://doi.org/10.1091/mbc.10.5.1463>
- Arend, W. P., Joslin, F. G., & Massoni, R. J. (1985). Effects of immune complexes on production by human monocytes of interleukin 1 or an interleukin 1 inhibitor. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 134(6), 3868–3875.
- Atsumi, G., Tajima, M., Hadano, A., Nakatani, Y., Murakami, M., & Kudo, I. (1998). Fas-induced Arachidonic Acid Release Is Mediated by Ca²⁺-independent Phospholipase A2 but Not Cytosolic Phospholipase A2, Which Undergoes Proteolytic Inactivation. *Journal of Biological Chemistry*, 273(22), 13870–13877. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.22.13870>
- 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-1 β via nicotinic acetylcholine receptors. *Journal of Lipid Research*, 58(6), 1055–1066. <https://doi.org/10.1194/jlr.M071506>
- Bai, P., Cantó, C., Oudart, H., Brunyánszki, A., Cen, Y., Thomas, C., Yamamoto, H., Huber, A., Kiss, B., Houtkooper, R. H., Schoonjans, K., Schreiber, V., Sauve, A. A., Menissier-de Murcia, J., & Auwerx, J. (2011). PARP-1 Inhibition Increases Mitochondrial Metabolism through SIRT1 Activation. *Cell Metabolism*, 13(4), 461–468. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2011.03.004>
- Balan, V., Miller, G. S., Kaplun, L., Balan, K., Chong, Z.-Z., Li, F., Kaplun, A., VanBerkum, M. F. A., Arking, R., Freeman, D. C., Maiese, K., & Tzivion, G. (2008). Life Span Extension and Neuronal Cell Protection by Drosophila Nicotinamidase. *Journal of Biological Chemistry*, 283(41), 27810–27819. <https://doi.org/10.1074/jbc.M804681200>
- Balsinde, J., & Dennis, E. A. (1996). Bromoenol Lactone Inhibits Magnesium-dependent Phosphatidate Phosphohydrolase and Blocks Triacylglycerol Biosynthesis in Mouse P388D1 Macrophages. *Journal of Biological Chemistry*, 271(50), 31937–31941. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.50.31937>
- Bao, S., Song, H., Wohltmann, M., Ramanadham, S., Jin, W., Bohrer, A., & Turk, J. (2006). Insulin Secretory Responses and Phospholipid Composition of Pancreatic Islets from Mice That Do Not Express Group VIA Phospholipase A2 and Effects of Metabolic Stress on Glucose Homeostasis. *Journal of Biological Chemistry*, 281(30), 20958–20973. <https://doi.org/10.1074/jbc.M600075200>

- Bartoli, F., Lin, H. K., Ghomashchi, F., Gelb, M. H., Jain, M. K., & Apitz-Castro, R. (1994). Tight binding inhibitors of 85-kDa phospholipase A2 but not 14-kDa phospholipase A2 inhibit release of free arachidonate in thrombin-stimulated human platelets. *The Journal of Biological Chemistry*, 269(22), 15625–15630.
- Barton, G. M., & Kagan, J. C. (2009). A cell biological view of Toll-like receptor function: Regulation through compartmentalization. *Nature Reviews Immunology*, 9(8), 535–542. <https://doi.org/10.1038/nri2587>
- Baskakis, C., Magrioti, V., Cotton, N., Stephens, D., Constantinou-Kokotou, V., Dennis, E. A., & Kokotos, G. (2008). Synthesis of Polyfluoro Ketones for Selective Inhibition of Human Phospholipase A₂ Enzymes. *Journal of Medicinal Chemistry*, 51(24), 8027–8037. <https://doi.org/10.1021/jm800649q>
- Baxter, A. G., & Hodgkin, P. D. (2002). Activation rules: The two-signal theories of immune activation. *Nature Reviews Immunology*, 2(6), 439–446. <https://doi.org/10.1038/nri823>
- Belenky, P., Bogan, K. L., & Brenner, C. (2007). NAD⁺ metabolism in health and disease. *Trends in Biochemical Sciences*, 32(1), 12–19. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2006.11.006>
- Bender, D. A. (1983). Biochemistry of tryptophan in health and disease. *Molecular Aspects of Medicine*, 6(2), 101–197. [https://doi.org/10.1016/0098-2997\(83\)90005-5](https://doi.org/10.1016/0098-2997(83)90005-5)
- Bernheim, H. A. (1979). Fever: Pathogenesis, Pathophysiology, and Purpose. *Annals of Internal Medicine*, 91(2), 261. <https://doi.org/10.7326/0003-4819-91-2-261>
- Bertrand, S. L., Daniel. (2001). Neuronal nicotinic receptors: From structure to function. *Nicotine & Tobacco Research*, 3(3), 203–223. <https://doi.org/10.1080/14622200110050213>
- Bolen, C. R., Uduman, M., & Kleinstein, S. H. (2011). Cell subset prediction for blood genomic studies. *BMC Bioinformatics*, 12(1), 258. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-12-258>
- Borges, T. J., Lang, B. J., Lopes, R. L., & Bonorino, C. (2016). Modulation of Alloimmunity by Heat Shock Proteins. *Frontiers in Immunology*, 7. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00303>
- Borovikova, L. V., Ivanova, S., Zhang, M., Yang, H., Botchkina, G. I., Watkins, L. R., Wang, H., Abumrad, N., Eaton, J. W., & Tracey, K. J. (2000). Vagus nerve

- stimulation attenuates the systemic inflammatory response to endotoxin. *Nature*, 405(6785), 458–462. <https://doi.org/10.1038/35013070>
- Boussiotis, V. A., Nadler, L. M., Strominger, J. L., & Goldfeld, A. E. (1994). Tumor necrosis factor alpha is an autocrine growth factor for normal human B cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91(15), 7007–7011. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.15.7007>
- Boyer, J. L., Adams, M., Ravi, R. G., Jacobson, K. A., & Harden, T. K. (2002). 2-Chloro N⁶-methyl-(N)-methanocarba-2'-deoxyadenosine-3',5'-bisphosphate is a selective high affinity P2Y₁ receptor antagonist: High affinity P2Y₁ receptor antagonist. *British Journal of Pharmacology*, 135(8), 2004–2010. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0704673>
- Braidy, N., Berg, J., Clement, J., Khorshidi, F., Poljak, A., Jayasena, T., Grant, R., & Sachdev, P. (2019). Role of Nicotinamide Adenine Dinucleotide and Related Precursors as Therapeutic Targets for Age-Related Degenerative Diseases: Rationale, Biochemistry, Pharmacokinetics, and Outcomes. *Antioxidants & Redox Signaling*, 30(2), 251–294. <https://doi.org/10.1089/ars.2017.7269>
- Bretscher, P. A., & Cohn, M. (1968). Minimal Model for the Mechanism of Antibody Induction and Paralysis by Antigen. *Nature*, 220(5166), 444–448. <https://doi.org/10.1038/220444a0>
- Brint, E. K., Xu, D., Liu, H., Dunne, A., McKenzie, A. N. J., O'Neill, L. A. J., & Liew, F. Y. (2004). ST2 is an inhibitor of interleukin 1 receptor and Toll-like receptor 4 signaling and maintains endotoxin tolerance. *Nature Immunology*, 5(4), 373–379. <https://doi.org/10.1038/ni1050>
- Brown, K., Xie, S., Qiu, X., Mohrin, M., Shin, J., Liu, Y., Zhang, D., Scadden, D. T., & Chen, D. (2013). SIRT3 Reverses Aging-Associated Degeneration. *Cell Reports*, 3(2), 319–327. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2013.01.005>
- Bruner, G., & Murphy, S. (1993). Purinergic P2Y receptors on astrocytes are directly coupled to phospholipase A₂. *Glia*, 7(3), 219–224. <https://doi.org/10.1002/glia.440070305>
- Bruzzone, S., Guida, L., Zocchi, E., Franco, L., & Flora, A. D. (2001). Connexin 43 hemichannels mediate Ca²⁺-regulated transmembrane NAD⁺ fluxes in intact cells. *The FASEB Journal*, 15(1), 10–12. <https://doi.org/10.1096/fj.00-0566fje>
- Bulek, K., Zhao, J., Liao, Y., Rana, N., Corridoni, D., Antanaviciute, A., Chen, X., Wang, H., Qian, W., Miller-Little, W. A., Swaidani, S., Tang, F., Willard, B. B., McCrae,

- K., Kang, Z., Dubyak, G. R., Cominelli, F., Simmons, A., Pizarro, T. T., & Li, X. (2020). Epithelial-derived gasdermin D mediates nonlytic IL-1 β release during experimental colitis. *The Journal of Clinical Investigation*, *130*(8), 4218–4234. <https://doi.org/10.1172/JCI138103>
- Cakir-Kiefer, C., Muller-Steffner, H., Oppenheimer, N., & Schuber, F. (2001). Kinetic competence of the cADP-ribose–CD38 complex as an intermediate in the CD38/NAD⁺ glycohydrolase-catalysed reactions: Implication for CD38 signalling. *Biochemical Journal*, *358*(2), 399–406. <https://doi.org/10.1042/bj3580399>
- Caligo, M. A., Cipollini, G., Petrini, M., Valentini, P., & Bevilacqua, G. (1996). Down regulation of NM23.H1, NM23.H2 and c-myc genes during differentiation induced by 1,25 dihydroxyvitamin D3. *Leukemia Research*, *20*(2), 161–167. [https://doi.org/10.1016/0145-2126\(95\)00122-0](https://doi.org/10.1016/0145-2126(95)00122-0)
- Cantó, C., Gerhart-Hines, Z., Feige, J. N., Lagouge, M., Noriega, L., Milne, J. C., Elliott, P. J., Puigserver, P., & Auwerx, J. (2009). AMPK regulates energy expenditure by modulating NAD⁺ metabolism and SIRT1 activity. *Nature*, *458*(7241), 1056–1060. <https://doi.org/10.1038/nature07813>
- Carvalho, F. A., Aitken, J. D., Vijay-Kumar, M., & Gewirtz, A. T. (2012). Toll-Like Receptor–Gut Microbiota Interactions: Perturb at Your Own Risk! *Annual Review of Physiology*, *74*(1), 177–198. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-020911-153330>
- Cauwels, A., Rogge, E., Vandendriessche, B., Shiva, S., & Brouckaert, P. (2014). Extracellular ATP drives systemic inflammation, tissue damage and mortality. *Cell Death & Disease*, *5*(3), e1102–e1102. <https://doi.org/10.1038/cddis.2014.70>
- Chanput, W., Peters, V., & Wichers, H. (2015). THP-1 and U937 Cells. In K. Verhoeckx, P. Cotter, I. López-Expósito, C. Kleiveland, T. Lea, A. Mackie, T. Requena, D. Swiatecka, & H. Wichers (Hrsg.), *The Impact of Food Bioactives on Health: In vitro and ex vivo models*. Springer. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK500159/>
- Chen, D., Bruno, J., Easlon, E., Lin, S.-J., Cheng, H.-L., Alt, F. W., & Guarente, L. (2008). Tissue-specific regulation of SIRT1 by calorie restriction. *Genes & Development*, *22*(13), 1753–1757. <https://doi.org/10.1101/gad.1650608>
- Chen, & Nuñez, G. (2010). Sterile inflammation: Sensing and reacting to damage. *Nature Reviews Immunology*, *10*(12), 826–837. <https://doi.org/10.1038/nri2873>

- Chini, C. C. S., Zeidler, J. D., Kashyap, S., Warner, G., & Chini, E. N. (2021). Evolving concepts in NAD⁺ metabolism. *Cell Metabolism*, 33(6), 1076–1087. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2021.04.003>
- Chng, W. J., Tan, G. B., & Kuperan, P. (2004). Establishment of adult peripheral blood lymphocyte subset reference range for an Asian population by single-platform flow cytometry: Influence of age, sex, and race and comparison with other published studies. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 11(1), 168–173. <https://doi.org/10.1128/cdli.11.1.168-173.2004>
- Chomarat, P., Banchereau, J., Davoust, J., & Karolina Palucka, A. (2000). IL-6 switches the differentiation of monocytes from dendritic cells to macrophages. *Nature Immunology*, 1(6), 510–514. <https://doi.org/10.1038/82763>
- Clark, S. E., & Weiser, J. N. (2013). Microbial Modulation of Host Immunity with the Small Molecule Phosphorylcholine. *Infection and Immunity*, 81(2), 392–401. <https://doi.org/10.1128/IAI.01168-12>
- Connolly, D. J., & O’Neill, L. A. (2012). New developments in Toll-like receptor targeted therapeutics. *Current Opinion in Pharmacology*, 12(4), 510–518. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2012.06.002>
- Conradt, B. (2009). Genetic control of programmed cell death during animal development. *Annual Review of Genetics*, 43, 493–523. <https://doi.org/10.1146/annurev.genet.42.110807.091533>
- Copray, J. (2001). Expression of interleukin-1 beta in rat dorsal root ganglia. *Journal of Neuroimmunology*, 118(2), 203–211. [https://doi.org/10.1016/S0165-5728\(01\)00324-1](https://doi.org/10.1016/S0165-5728(01)00324-1)
- Cros, J., Cagnard, N., Woollard, K., Patey, N., Zhang, S.-Y., Senechal, B., Puel, A., Biswas, S. K., Moshous, D., Picard, C., Jais, J.-P., D’Cruz, D., Casanova, J.-L., Trouillet, C., & Geissmann, F. (2010). Human CD14^{dim} Monocytes Patrol and Sense Nucleic Acids and Viruses via TLR7 and TLR8 Receptors. *Immunity*, 33(3), 375–386. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2010.08.012>
- Dale, H. H., & Dudley, H. W. (1929). The presence of histamine and acetylcholine in the spleen of the ox and the horse. *The Journal of Physiology*, 68(2), 97–123. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1929.sp002598>
- Delves, P. J., & Roitt, I. M. (2000). The Immune System. *New England Journal of Medicine*, 343(1), 37–49. <https://doi.org/10.1056/NEJM200007063430107>

- Deng, X., Wang, J., Jiao, L., Utaipan, T., Tuma-Kellner, S., Schmitz, G., Liebisch, G., Stremmel, W., & Chamulitrat, W. (2016). iPLA2 β deficiency attenuates obesity and hepatic steatosis in ob / ob mice through hepatic fatty-acyl phospholipid remodeling. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1861(5), 449–461. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2016.02.004>
- Di Stefano, M., & Conforti, L. (2013). Diversification of NAD biological role: The importance of location. *FEBS Journal*, 280(19), 4711–4728. <https://doi.org/10.1111/febs.12433>
- Dinarello, C. A. (1988). Interleukin-1. *Digestive Diseases and Sciences*, 33(S3), 25S-35S. <https://doi.org/10.1007/BF01538128>
- Dinarello, C. A. (1996). Biologic basis for interleukin-1 in disease. *Blood*, 87(6), 2095–2147.
- Dinarello, C. A. (2005). Blocking IL-1 in systemic inflammation. *The Journal of Experimental Medicine*, 201(9), 1355–1359. <https://doi.org/10.1084/jem.20050640>
- Dinarello, C. A. (2018). Overview of the IL-1 family in innate inflammation and acquired immunity. *Immunological Reviews*, 281(1), 8–27. <https://doi.org/10.1111/imr.12621>
- Dinarello, C. A., Ikejima, T., Warner, S. J., Orencole, S. F., Lonnemann, G., Cannon, J. G., & Libby, P. (1987). Interleukin 1 induces interleukin 1. I. Induction of circulating interleukin 1 in rabbits in vivo and in human mononuclear cells in vitro. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 139(6), 1902–1910.
- Dinarello, C. A., Renfer, L., & Wolff, S. M. (1977). Human leukocytic pyrogen: Purification and development of a radioimmunoassay. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 74(10), 4624–4627. <https://doi.org/10.1073/pnas.74.10.4624>
- Dinarello, C. A., Simon, A., & van der Meer, J. W. M. (2012). Treating inflammation by blocking interleukin-1 in a broad spectrum of diseases. *Nature Reviews Drug Discovery*, 11(8), 633–652. <https://doi.org/10.1038/nrd3800>
- Dinarello, C. A., & Thompson, R. C. (1991). Blocking IL-1: Interleukin 1 receptor antagonist in vivo and in vitro. *Immunology Today*, 12(11), 404–410. [https://doi.org/10.1016/0167-5699\(91\)90142-G](https://doi.org/10.1016/0167-5699(91)90142-G)

- Dinareello, C. A., & van der Meer, J. W. M. (2013). Treating inflammation by blocking interleukin-1 in humans. *Seminars in Immunology*, 25(6), 469–484. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2013.10.008>
- Dreisig, K., & Kornum, B. R. (2016). A critical look at the function of the P2Y11 receptor. *Purinergic Signalling*, 12(3), 427–437. <https://doi.org/10.1007/s11302-016-9514-7>
- Elhassan, Y. S., Kluckova, K., Fletcher, R. S., Schmidt, M. S., Garten, A., Doig, C. L., Cartwright, D. M., Oakey, L., Burley, C. V., Jenkinson, N., Wilson, M., Lucas, S. J. E., Akerman, I., Seabright, A., Lai, Y.-C., Tennant, D. A., Nightingale, P., Wallis, G. A., Manolopoulos, K. N., ... Lavery, G. G. (2019). Nicotinamide Riboside Augments the Aged Human Skeletal Muscle NAD⁺ Metabolome and Induces Transcriptomic and Anti-inflammatory Signatures. *Cell Reports*, 28(7), 1717-1728.e6. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.07.043>
- Epelman, S., Lavine, K. J., & Randolph, G. J. (2014). Origin and Functions of Tissue Macrophages. *Immunity*, 41(1), 21–35. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2014.06.013>
- Escande, C., Nin, V., Price, N. L., Capellini, V., Gomes, A. P., Barbosa, M. T., O’Neil, L., White, T. A., Sinclair, D. A., & Chini, E. N. (2013). Flavonoid Apigenin Is an Inhibitor of the NAD⁺ase CD38. *Diabetes*, 62(4), 1084–1093. <https://doi.org/10.2337/db12-1139>
- 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>
- Fitz, J. G. (2007). *REGULATION OF CELLULAR ATP RELEASE*. 10.
- Fontana, M. F., & Vance, R. E. (2011). Two signal models in innate immunity: Two signal models in innate immunity. *Immunological Reviews*, 243(1), 26–39. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2011.01037.x>
- Franklin, B. S., Latz, E., & Schmidt, F. I. (2018). The intra- and extracellular functions of ASC specks. *Immunological Reviews*, 281(1), 74–87. <https://doi.org/10.1111/imr.12611>
- Fuchs, Y., & Steller, H. (2011). Programmed cell death in animal development and disease. *Cell*, 147(4), 742–758. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.10.033>

- Gaidt, M. M., Ebert, T. S., Chauhan, D., Schmidt, T., Schmid-Burgk, J. L., Rapino, F., Robertson, A. A. B., Cooper, M. A., Graf, T., & Hornung, V. (2016). Human Monocytes Engage an Alternative Inflammasome Pathway. *Immunity*, *44*(4), 833–846. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2016.01.012>
- Galindo, C. C., & Clavijo-Ramírez, C. A. (2020). Generation and characterization of U937-TR: A platform cell line for inducible gene expression in human macrophages. *Parasitology*, *147*(13), 1524–1531. <https://doi.org/10.1017/S0031182020001110>
- Galluzzi, L., Vitale, I., Aaronson, S. A., Abrams, J. M., Adam, D., Agostinis, P., Alnemri, E. S., Altucci, L., Amelio, I., Andrews, D. W., Annicchiarico-Petruzzelli, M., Antonov, A. V., Arama, E., Baehrecke, E. H., Barlev, N. A., Bazan, N. G., Bernassola, F., Bertrand, M. J. M., Bianchi, K., ... Kroemer, G. (2018). Molecular mechanisms of cell death: Recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death and Differentiation*, *25*(3), 486–541. <https://doi.org/10.1038/s41418-017-0012-4>
- 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>
- Geissmann, F., Jung, S., & Littman, D. R. (2003). Blood Monocytes Consist of Two Principal Subsets with Distinct Migratory Properties. *Immunity*, *19*(1), 71–82. [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(03\)00174-2](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(03)00174-2)
- Giannoudis, P. V. (2003). Current concepts of the inflammatory response after major trauma: An update. *Injury*, *34*(6), 397–404. [https://doi.org/10.1016/S0020-1383\(02\)00416-3](https://doi.org/10.1016/S0020-1383(02)00416-3)
- Ginhoux, F., & Jung, S. (2014). Monocytes and macrophages: Developmental pathways and tissue homeostasis. *Nature Reviews Immunology*, *14*(6), 392–404. <https://doi.org/10.1038/nri3671>
- Gong, B., Pan, Y., Vempati, P., Zhao, W., Knable, L., Ho, L., Wang, J., Sastre, M., Ono, K., Sauve, A. A., & Pasinetti, G. M. (2013). Nicotinamide riboside restores cognition through an upregulation of proliferator-activated receptor- γ coactivator 1 α regulated β -secretase 1 degradation and mitochondrial gene expression in Alzheimer's mouse models. *Neurobiology of Aging*, *34*(6), 1581–1588. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2012.12.005>

- Grahames, C. B. A., Michel, A. D., Chessell, I. P., & Humphrey, P. P. A. (1999). *Pharmacological characterization of ATP- and LPS-induced IL-1 β release in human monocytes*. 7. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0702732>
- Grau, V., Richter, K., Hone, A. J., & McIntosh, J. M. (2019). Conopeptides [V11L;V16D]ArIB and RgIA4: Powerful Tools for the Identification of Novel Nicotinic Acetylcholine Receptors in Monocytes. *Frontiers in Pharmacology*, 9, 1499. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.01499>
- 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>
- Green, D. R., Oguin, T. H., & Martinez, J. (2016). The clearance of dying cells: Table for two. *Cell Death & Differentiation*, 23(6), 915–926. <https://doi.org/10.1038/cdd.2015.172>
- Guilliams, M., Mildner, A., & Yona, S. (2018). Developmental and Functional Heterogeneity of Monocytes. *Immunity*, 49(4), 595–613. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2018.10.005>
- Haag, F., Koch-Nolte, F., Köhl, M., Lorenzen, S., & Thiele, H.-G. (1994). Premature Stop Codons Inactivate the RT6 Genes of the Human and Chimpanzee Species. *Journal of Molecular Biology*, 243(3), 537–546. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1994.1680>
- Harden, A., & Young, W. J. (1908). The Alcoholic Ferment of Yeast-Juice. Part III.-The Function of Phosphates in the Fermentation of Glucose by Yeast-Juice. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Containing Papers of a Biological Character*, 80(540), 299–311.
- Harden, A., Young, W. J., & Martin, C. J. (1906). The alcoholic ferment of yeast-juice. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Containing Papers of a Biological Character*, 77(519), 405–420. <https://doi.org/10.1098/rspb.1906.0029>
- Harnett, M. M., Kean, D. E., Boitelle, A., McGuinness, S., Thalhamer, T., Steiger, C. N., Egan, C., Al-Riyami, L., Alcocer, M. J., Houston, K. M., Gracie, J. A., McInnes, I. B., & Harnett, W. (2008). The phosphorycholine moiety of the filarial nematode immunomodulator ES-62 is responsible for its anti-inflammatory action in arthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 67(4), 518–523. <https://doi.org/10.1136/ard.2007.073502>
- Haynes. (2006). Gut microbes out of control in HIV infection. *Nature Medicine*, 12(12), 1351–1352. <https://doi.org/10.1038/nm1206-1351>

- Haynes, & Rohwer, F. (2011). The Human Virome. In K. E. Nelson (Hrsg.), *Metagenomics of the Human Body* (S. 63–77). Springer New York. https://doi.org/10.1007/978-1-4419-7089-3_4
- 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-1 β Release. *The Journal of Immunology*, *195*(5), 2325–2334. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1400974>
- Hegyí, J., Schwartz, R. A., & Hegyí, V. (2004). Pellagra: Dermatitis, dementia, and diarrhea. *International Journal of Dermatology*, *43*(1), 1–5. <https://doi.org/10.1111/j.1365-4632.2004.01959.x>
- Hiller, S., Heldmann, S., Richter, K., Jurastow, I., Küllmar, M., Hecker, A., Wilker, S., Fuchs-Moll, G., Manzini, I., Schmalzing, G., Kummer, W., Padberg, W., McIntosh, J., Damm, J., Zakrzewicz, A., & Grau, V. (2018). β -Nicotinamide Adenine Dinucleotide (β -NAD) Inhibits ATP-Dependent IL-1 β Release from Human Monocytic Cells. *International Journal of Molecular Sciences*, *19*(4), 1126. <https://doi.org/10.3390/ijms19041126>
- Hirschfeld, M., Ma, Y., Weis, J. H., Vogel, S. N., & Weis, J. J. (2000). Cutting Edge: Repurification of Lipopolysaccharide Eliminates Signaling Through Both Human and Murine Toll-Like Receptor 2. *The Journal of Immunology*, *165*(2), 618–622. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.165.2.618>
- Hoek, J. B., & Rydström, J. (1988). Physiological roles of nicotinamide nucleotide transhydrogenase. *Biochemical Journal*, *254*(1), 1–10.
- Hogan, K. A., Chini, C. C. S., & Chini, E. N. (2019). The Multi-faceted Ecto-enzyme CD38: Roles in Immunomodulation, Cancer, Aging, and Metabolic Diseases. *Frontiers in Immunology*, *10*, 1187. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01187>
- Horenstein, A., Chillemi, A., Quarona, V., Zito, A., Roato, I., Morandi, F., Marimpietri, D., Bolzoni, M., Toscani, D., Oldham, R., Cuccioloni, M., Sasser, A., Pistoia, V., Giuliani, N., & Malavasi, F. (2015). NAD⁺-Metabolizing Ectoenzymes in Remodeling Tumor–Host Interactions: The Human Myeloma Model. *Cells*, *4*(3), 520–537. <https://doi.org/10.3390/cells4030520>

- Houtkooper, R. H., Cantó, C., Wanders, R. J., & Auwerx, J. (2010). The Secret Life of NAD⁺: An Old Metabolite Controlling New Metabolic Signaling Pathways. *Endocrine Reviews*, *31*(2), 194–223. <https://doi.org/10.1210/er.2009-0026>
- Hubert, S., Rissiek, B., Klages, K., Huehn, J., Sparwasser, T., Haag, F., Koch-Nolte, F., Boyer, O., Seman, M., & Adriouch, S. (2010). Extracellular NAD⁺ shapes the Foxp3⁺ regulatory T cell compartment through the ART2-P2X7 pathway. *The Journal of Experimental Medicine*, *207*(12), 2561–2568. <https://doi.org/10.1084/jem.20091154>
- Hwang, S. J., Durnin, L., Dwyer, L., Rhee, P.-L., Ward, S. M., Koh, S. D., Sanders, K. M., & Mutafova-Yambolieva, V. N. (2011). β -Nicotinamide Adenine Dinucleotide Is an Enteric Inhibitory Neurotransmitter in Human and Nonhuman Primate Colons. *Gastroenterology*, *140*(2), 608–617.e6. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2010.09.039>
- Irie, J., Inagaki, E., Fujita, M., Nakaya, H., Mitsuishi, M., Yamaguchi, S., Yamashita, K., Shigaki, S., Ono, T., Yukioka, H., Okano, H., Nabeshima, Y., Imai, S., Yasui, M., Tsubota, K., & Itoh, H. (2020). Effect of oral administration of nicotinamide mononucleotide on clinical parameters and nicotinamide metabolite levels in healthy Japanese men. *Endocrine Journal*, *67*(2), 153–160. <https://doi.org/10.1507/endocrj.EJ19-0313>
- 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>
- Jacobson, E. (1995). Evaluating the role of niacin in human carcinogenesis. *Biochimie*, *77*(5), 394–398. [https://doi.org/10.1016/0300-9084\(96\)88152-1](https://doi.org/10.1016/0300-9084(96)88152-1)
- 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>
- Janeway, C. A., & Medzhitov, R. (2002). Innate Immune Recognition. *Annual Review of Immunology*, *20*(1), 197–216. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.20.083001.084359>
- Jin, C., & Flavell, R. A. (2010). Molecular Mechanism of NLRP3 Inflammasome Activation. *Journal of Clinical Immunology*, *30*(5), 628–631. <https://doi.org/10.1007/s10875-010-9440-3>
- Karmakar, M., Katsnelson, M. A., Dubyak, G. R., & Pearlman, E. (2016). Neutrophil P2X7 receptors mediate NLRP3 inflammasome-dependent IL-1 β secretion in

- response to ATP. *Nature Communications*, 7(1), 10555. <https://doi.org/10.1038/ncomms10555>
- Kawai, T., Takeuchi, O., Fujita, T., Inoue, J., Mühlradt, P. F., Sato, S., Hoshino, K., & Akira, S. (2001). Lipopolysaccharide Stimulates the MyD88-Independent Pathway and Results in Activation of IFN-Regulatory Factor 3 and the Expression of a Subset of Lipopolysaccharide-Inducible Genes. *The Journal of Immunology*, 167(10), 5887–5894. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.167.10.5887>
- 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](https://doi.org/10.1016/S0163-7258(99)00071-6)
- Kawashima, K., Fujii, T., Moriwaki, Y., & Misawa, H. (2012). Critical roles of acetylcholine and the muscarinic and nicotinic acetylcholine receptors in the regulation of immune function. *Life Sciences*, 91(21–22), 1027–1032. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2012.05.006>
- Kayagaki, N., Stowe, I. B., Lee, B. L., O'Rourke, K., Anderson, K., Warming, S., Cuellar, T., Haley, B., Roose-Girma, M., Phung, Q. T., Liu, P. S., Lill, J. R., Li, H., Wu, J., Kummerfeld, S., Zhang, J., Lee, W. P., Snipas, S. J., Salvesen, G. S., ... Dixit, V. M. (2015). Caspase-11 cleaves gasdermin D for non-canonical inflammasome signalling. *Nature*, 526(7575), 666–671. <https://doi.org/10.1038/nature15541>
- Kennedy, R. B., Ovsyannikova, I. G., Pankratz, V. S., Vierkant, R. A., Jacobson, R. M., Ryan, M. A. K., & Poland, G. A. (2009). Gender effects on humoral immune responses to smallpox vaccine. *Vaccine*, 27(25–26), 3319–3323. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2009.01.086>
- Kharat, A. S., & Tomasz, A. (2006). Drastic reduction in the virulence of *Streptococcus pneumoniae* expressing type 2 capsular polysaccharide but lacking choline residues in the cell wall. *Molecular Microbiology*, 60(1), 93–107. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2006.05082.x>
- Kim, H., Jacobson, E. L., & Jacobson, M. K. (1993). Synthesis and Degradation of Cyclic ADP-Ribose by NAD Glycohydrolases. *Science*, 261(5126), 1330–1333. <https://doi.org/10.1126/science.8395705>
- Kincaid, J. W., & Berger, N. A. (2020). NAD metabolism in aging and cancer. *Experimental Biology and Medicine*, 245(17), 1594–1614. <https://doi.org/10.1177/1535370220929287>

- Koch-Nolte, F., Petersen, D., Balasubramanian, S., Haag, F., Kahlke, D., Willer, T., Kastelein, R., Bazan, F., & Thiele, H.-G. (1996). Mouse T Cell Membrane Proteins Rt6-1 and Rt6-2 Are Arginine/Protein Mono(ADPriboseyl)transferases and Share Secondary Structure Motifs with ADP-ribosylating Bacterial Toxins. *Journal of Biological Chemistry*, 271(13), 7686–7693. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.13.7686>
- Kozak, W., Kluger, M. J., Soszynski, D., Conn, C. A., Rudolph, K., Leon, L. R., & Zheng, H. (1998). IL-6 and IL-1beta in Fever: Studies Using Cytokine-Deficient (Knockout) Mice. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 856(1 MOLECULAR MEC), 33–47. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1998.tb08310.x>
- Lafferty, K., & Cunningham, A. (1975). A NEW ANALYSIS OF ALLOGENEIC INTERACTIONS. *Australian Journal of Experimental Biology and Medical Science*, 53(1), 27–42. <https://doi.org/10.1038/icb.1975.3>
- Lei-Leston, A. C., Murphy, A. G., & Maloy, K. J. (2017). Epithelial Cell Inflammasomes in Intestinal Immunity and Inflammation. *Frontiers in Immunology*, 8, 1168. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01168>
- Loewi, O., & Navratil, E. (1926). Über humorale Übertragbarkeit der Herznervenwirkung: X. Mitteilung. Über das Schicksal des Vagusstoffs. *Pflüger's Archiv für die Gesamte Physiologie des Menschen und der Tiere*, 214–214(1), 678–688. <https://doi.org/10.1007/BF01741946>
- Lopez-Castejon, G., & Brough, D. (2011). Understanding the mechanism of IL-1β secretion. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 22(4), 189–195. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2011.10.001>
- Lovell, T. M., Woods, R. J., Butlin, D. J., Brayley, K. J., Manyonda, I. T., Jarvis, J., Howell, S., & Lowry, P. J. (2007). Identification of a novel mammalian post-translational modification, phosphocholine, on placental secretory polypeptides. *Journal of Molecular Endocrinology*, 39(3), 189–198. <https://doi.org/10.1677/JME-07-0007>
- Magni, G. (2008). Enzymology of mammalian NAD metabolism in health and disease. *Frontiers in Bioscience, Volume*(13), 6135. <https://doi.org/10.2741/3143>
- 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>
- Mariathasan, S., Weiss, D. S., Newton, K., McBride, J., O'Rourke, K., Roose-Girma, M., Lee, W. P., Weinrauch, Y., Monack, D. M., & Dixit, V. M. (2006). Cryopyrin activates the inflammasome in response to toxins and ATP. *Nature*, 440(7081), 228–232. <https://doi.org/10.1038/nature04515>
- Martinet, W., Schrijvers, D. M., & Kockx, M. M. (2003). Nucleofection as an efficient nonviral transfection method for human monocytic cells. *Biotechnology Letters*, 25(13), 1025–1029. <https://doi.org/10.1023/a:1024157508492>
- Martinon, F., & Burns, K. (2002). The Inflammasome: A Molecular Platform Triggering Activation of Inflammatory Caspases and Processing of proIL- β . *Molecular Cell*, 10.
- 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>
- Martinon, F., Pétrilli, V., Mayor, A., Tardivel, A., & Tschopp, J. (2006). Gout-associated uric acid crystals activate the NALP3 inflammasome. *Nature*, 440(7081), 237–241. <https://doi.org/10.1038/nature04516>
- Martinon, F., & Tschopp, J. (2007). Inflammatory caspases and inflammasomes: Master switches of inflammation. *Cell Death and Differentiation*, 14(1), 10–22. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4402038>
- Mashimo, M., Moriwaki, Y., Misawa, H., Kawashima, K., & Fujii, T. (2021). Regulation of Immune Functions by Non-Neuronal Acetylcholine (ACh) via Muscarinic and Nicotinic ACh Receptors. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(13), 6818. <https://doi.org/10.3390/ijms22136818>
- 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>
- McMahan, C. J., Slack, J. L., Mosley, B., Cosman, D., Lupton, S. D., Brunton, L. L., Grubin, C. E., Wignall, J. M., Jenkins, N. A., & Brannan, C. I. (1991). A novel IL-1 receptor, cloned from B cells by mammalian expression, is expressed in many cell types. *The EMBO Journal*, 10(10), 2821–2832. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1991.tb07831.x>

- Medzhitov, R. (2007). Recognition of microorganisms and activation of the immune response. *Nature*, *449*(7164), 819–826. <https://doi.org/10.1038/nature06246>
- Medzhitov, R., Preston-Hurlburt, P., & Janeway, C. A. (1997). A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature*, *388*(6640), 394–397. <https://doi.org/10.1038/41131>
- Mertens, M., & Singh, J. A. (2009a). Anakinra for rheumatoid arthritis. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD005121.pub3>
- Mertens, M., & Singh, J. A. (2009b). Anakinra for Rheumatoid Arthritis: A Systematic Review. *The Journal of Rheumatology*, *36*(6), 1118–1125. <https://doi.org/10.3899/jrheum.090074>
- Minafra, L., Di Cara, G., Albanese, N. N., & Cancemi, P. (2011). Proteomic differentiation pattern in the U937 cell line. *Leukemia Research*, *35*(2), 226–236. <https://doi.org/10.1016/j.leukres.2010.07.040>
- Misawa, T., Takahama, M., Kozaki, T., Lee, H., Zou, J., Saitoh, T., & Akira, S. (2013). Microtubule-driven spatial arrangement of mitochondria promotes activation of the NLRP3 inflammasome. *Nature Immunology*, *14*(5), 454–460. <https://doi.org/10.1038/ni.2550>
- Mohrin, M., Shin, J., Liu, Y., Brown, K., Luo, H., Xi, Y., Haynes, C. M., & Chen, D. (2015). A mitochondrial UPR-mediated metabolic checkpoint regulates hematopoietic stem cell aging. *Science*, *347*(6228), 1374–1377. <https://doi.org/10.1126/science.aaa2361>
- Moreschi, I., Bruzzone, S., Nicholas, R. A., Fruscione, F., Sturla, L., Benvenuto, F., Usai, C., Meis, S., Kassack, M. U., Zocchi, E., & De Flora, A. (2006). Extracellular NAD⁺ Is an Agonist of the Human P2Y₁₁ Purinergic Receptor in Human Granulocytes. *Journal of Biological Chemistry*, *281*(42), 31419–31429. <https://doi.org/10.1074/jbc.M606625200>
- Morita, Y., Izawa, H., Hirano, A., Mayumi, E., Isozaki, S., & Yonei, Y. (2022). *Clinical evaluation of changes in biomarkers by oral intake of NMN*. (2). Society for Glycative Stress Research. https://doi.org/10.24659/gsr.9.2_33
- Muñoz-Planillo, R., Kuffa, P., Martínez-Colón, G., Smith, B. L., Rajendiran, T. M., & Núñez, G. (2013). K⁺ Efflux Is the Common Trigger of NLRP3 Inflammasome Activation by Bacterial Toxins and Particulate Matter. *Immunity*, *38*(6), 1142–1153. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.05.016>

- Mutafova-Yambolieva, V. N., Hwang, S. J., Hao, X., Chen, H., Zhu, M. X., Wood, J. D., Ward, S. M., & Sanders, K. M. (2007). β -Nicotinamide adenine dinucleotide is an inhibitory neurotransmitter in visceral smooth muscle. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *104*(41), 16359–16364. <https://doi.org/10.1073/pnas.0705510104>
- Netea, M. G., van de Veerdonk, F. L., van der Meer, J. W. M., Dinarello, C. A., & Joosten, L. A. B. (2015). Inflammasome-Independent Regulation of IL-1-Family Cytokines. *Annual Review of Immunology*, *33*(1), 49–77. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-032414-112306>
- Nikiforov, A., Kulikova, V., & Ziegler, M. (2015). The human NAD metabolome: Functions, metabolism and compartmentalization. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, *50*(4), 284–297. <https://doi.org/10.3109/10409238.2015.1028612>
- Nutter, F., Holen, I., Brown, H. K., Cross, S. S., Evans, C. A., Walker, M., Coleman, R. E., Westbrook, J. A., Selby, P. J., Brown, J. E., & Ottewill, P. D. (2014). Different molecular profiles are associated with breast cancer cell homing compared with colonisation of bone: Evidence using a novel bone-seeking cell line. *Endocrine-Related Cancer*, *21*(2), 327–341. <https://doi.org/10.1530/ERC-13-0158>
- Oppenheimer, N. J., & Kaplan, N. O. (1975). The alpha beta epimerization of reduced nicotinamide adenine dinucleotide. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, *166*(2), 526–535. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(75\)90416-6](https://doi.org/10.1016/0003-9861(75)90416-6)
- O'Reilly, T., & Niven, D. F. (2003). Levels of nicotinamide adenine dinucleotide in extracellular body fluids of pigs may be growth-limiting for *Actinobacillus pleuropneumoniae* and *Haemophilus parasuis*. *Canadian Journal of Veterinary Research = Revue Canadienne De Recherche Veterinaire*, *67*(3), 229–231.
- Parkin, J., & Cohen, B. (2001). An overview of the immune system. *The Lancet*, *357*(9270), 1777–1789. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(00\)04904-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(00)04904-7)
- Pascual, V., Allantaz, F., Arce, E., Punaro, M., & Banchereau, J. (2005). Role of interleukin-1 (IL-1) in the pathogenesis of systemic onset juvenile idiopathic arthritis and clinical response to IL-1 blockade. *Journal of Experimental Medicine*, *201*(9), 1479–1486. <https://doi.org/10.1084/jem.20050473>
- Passlick, B., Flieger, D., & Ziegler-Heitbrock, H. (1989). Identification and characterization of a novel monocyte subpopulation in human peripheral blood. *Blood*, *74*(7), 2527–2534. <https://doi.org/10.1182/blood.V74.7.2527.2527>

- Patel, A. A., Zhang, Y., Fullerton, J. N., Boelen, L., Rongvaux, A., Maini, A. A., Bigley, V., Flavell, R. A., Gilroy, D. W., Asquith, B., Macallan, D., & Yona, S. (2017). The fate and lifespan of human monocyte subsets in steady state and systemic inflammation. *Journal of Experimental Medicine*, *214*(7), 1913–1923. <https://doi.org/10.1084/jem.20170355>
- Pérez, M. J., Baden, P., & Deleidi, M. (2021). Progresses in both basic research and clinical trials of NAD⁺ in Parkinson's disease. *Mechanisms of Ageing and Development*, *197*, 111499. <https://doi.org/10.1016/j.mad.2021.111499>
- Perregaux, D., & Gabel, C. A. (1994). Interleukin-1 beta maturation and release in response to ATP and nigericin. Evidence that potassium depletion mediated by these agents is a necessary and common feature of their activity. *Journal of Biological Chemistry*, *269*(21), 15195–15203. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(17\)36591-2](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(17)36591-2)
- 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>
- Pittelli, M., Felici, R., Pitozzi, V., Giovannelli, L., Bigagli, E., Cialdai, F., Romano, G., Moroni, F., & Chiarugi, A. (2011). Pharmacological Effects of Exogenous NAD on Mitochondrial Bioenergetics, DNA Repair, and Apoptosis. *Molecular Pharmacology*, *80*(6), 1136–1146. <https://doi.org/10.1124/mol.111.073916>
- Preiss, J., & Handler, P. (1958). Biosynthesis of diphosphopyridine nucleotide. II. Enzymatic aspects. *The Journal of Biological Chemistry*, *233*(2), 493–500.
- Radenkovic, D., Reason, & Verdin, E. (2020). Clinical Evidence for Targeting NAD Therapeutically. *Pharmaceuticals*, *13*(9), 247. <https://doi.org/10.3390/ph13090247>
- 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>
- Rajman, L., Chwalek, K., & Sinclair, D. A. (2018). Therapeutic Potential of NAD-Boosting Molecules: The In Vivo Evidence. *Cell Metabolism*, *27*(3), 529–547. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2018.02.011>
- Rakoff-Nahoum, S., Paglino, J., Eslami-Varzaneh, F., Edberg, S., & Medzhitov, R. (2004). Recognition of Commensal Microflora by Toll-Like Receptors Is

- Required for Intestinal Homeostasis. *Cell*, 118(2), 229–241.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2004.07.002>
- Ramírez, J., & Cañete, J. D. (2018). Anakinra for the treatment of rheumatoid arthritis: A safety evaluation. *Expert Opinion on Drug Safety*, 17(7), 727–732.
<https://doi.org/10.1080/14740338.2018.1486819>
- Ramsey, K. M., Yoshino, J., Brace, C. S., Abrassart, D., Kobayashi, Y., Marcheva, B., Hong, H.-K., Chong, J. L., Buhr, E. D., Lee, C., Takahashi, J. S., Imai, S., & Bass, J. (2009). Circadian Clock Feedback Cycle Through NAMPT-Mediated NAD⁺ Biosynthesis. *Science*, 324(5927), 651–654.
<https://doi.org/10.1126/science.1171641>
- Rathinam, V. A. K., Vanaja, S. K., & Fitzgerald, K. A. (2012). Regulation of inflammasome signaling. *Nature Immunology*, 13(4), 333–342.
<https://doi.org/10.1038/ni.2237>
- Ren, K., & Torres, R. (2009). Role of interleukin-1beta during pain and inflammation. *Brain Research Reviews*, 60(1), 57–64.
<https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2008.12.020>
- Richter, K., Koch, C., Perniss, A., Wolf, P., Schweda, E., Wichmann, S., Wilker, S., Magel, I., Sander, M., McIntosh, J., Padberg, W., & Grau, V. (2018). Phosphocholine-Modified Lipooligosaccharides of *Haemophilus influenzae* Inhibit ATP-Induced IL-1 β Release by Pulmonary Epithelial Cells. *Molecules*, 23(8), 1979. <https://doi.org/10.3390/molecules23081979>
- 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 $\alpha 9$ -containing nicotinic acetylcholine receptors. *Scientific Reports*, 6(1), 28660.
<https://doi.org/10.1038/srep28660>
- Roberts, C. W., Walker, W., & Alexander, J. (2001). Sex-Associated Hormones and Immunity to Protozoan Parasites. *Clinical Microbiology Reviews*, 14(3), 476–488. <https://doi.org/10.1128/CMR.14.3.476-488.2001>
- Rock, F. L., Hardiman, G., Timans, J. C., Kastelein, R. A., & Bazan, J. F. (1998). A family of human receptors structurally related to *Drosophila* Toll. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(2), 588–593.
<https://doi.org/10.1073/pnas.95.2.588>

- Romero, H. K., Christensen, S. B., Di Cesare Mannelli, L., Gajewiak, J., Ramachandra, R., Elmslie, K. S., Vetter, D. E., Ghelardini, C., Iadonato, S. P., Mercado, J. L., Olivera, B. M., & McIntosh, J. M. (2017). Inhibition of $\alpha 9\alpha 10$ nicotinic acetylcholine receptors prevents chemotherapy-induced neuropathic pain. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *114*(10). <https://doi.org/10.1073/pnas.1621433114>
- Rongvaux, A., Andris, F., Van Gool, F., & Leo, O. (2003). Reconstructing eukaryotic NAD metabolism. *BioEssays*, *25*(7), 683–690. <https://doi.org/10.1002/bies.10297>
- Rosenwasser, L. J., Dinarello, C. A., & Rosenthal, A. S. (1979). Adherent cell function in murine T-lymphocyte antigen recognition. IV. Enhancement of murine T-cell antigen recognition by human leukocytic pyrogen. *The Journal of Experimental Medicine*, *150*(3), 709–714. <https://doi.org/10.1084/jem.150.3.709>
- Rustam, Y. H., & Reid, G. E. (2018). Analytical Challenges and Recent Advances in Mass Spectrometry Based Lipidomics. *Analytical Chemistry*, *90*(1), 374–397. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.7b04836>
- Sauve, A. A., Wolberger, C., Schramm, V. L., & Boeke, J. D. (2006). The Biochemistry of Sirtuins. *Annual Review of Biochemistry*, *75*(1), 435–465. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.74.082803.133500>
- Schildberger, A., Rossmann, 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>
- Schlüter, T., Schelmbauer, C., Karram, K., & Mufazalov, I. A. (2018). Regulation of IL-1 signaling by the decoy receptor IL-1R2. *Journal of Molecular Medicine*, *96*(10), 983–992. <https://doi.org/10.1007/s00109-018-1684-z>
- Schreiber, V., Dantzer, F., Ame, J.-C., & de Murcia, G. (2006). Poly(ADP-ribose): Novel functions for an old molecule. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *7*(7), 517–528. <https://doi.org/10.1038/nrm1963>
- Schroder, K., & Tschopp, J. (2010). The Inflammasomes. *Cell*, *140*(6), 821–832. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.01.040>
- Seman, M., Adriouch, S., Scheuplein, F., Krebs, C., Freese, D., Glowacki, G., Deterre, P., Haag, F., & Koch-Nolte, F. (2003). NAD-Induced T Cell Death. *Immunity*, *19*(4), 571–582. [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(03\)00266-8](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(03)00266-8)

- Shi, C., & Pamer, E. G. (2011). Monocyte recruitment during infection and inflammation. *Nature Reviews. Immunology*, *11*(11), 762–774. <https://doi.org/10.1038/nri3070>
- Shi, Zhao, Y., Wang, K., Shi, X., Wang, Y., Huang, H., Zhuang, Y., Cai, T., Wang, F., & Shao, F. (2015). Cleavage of GSDMD by inflammatory caspases determines pyroptotic cell death. *Nature*, *526*(7575), 660–665. <https://doi.org/10.1038/nature15514>
- Shimazu, R., Akashi, S., Ogata, H., Nagai, Y., Fukudome, K., Miyake, K., & Kimoto, M. (1999). MD-2, a Molecule that Confers Lipopolysaccharide Responsiveness on Toll-like Receptor 4. *Journal of Experimental Medicine*, *189*(11), 1777–1782. <https://doi.org/10.1084/jem.189.11.1777>
- 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-1 β via CD36 and Nicotinic Acetylcholine Receptors. *Frontiers in Immunology*, *9*, 877. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00877>
- Soucie, E. L., Weng, Z., Geirsdóttir, L., Molawi, K., Maurizio, J., Fenouil, R., Mossadegh-Keller, N., Gimenez, G., VanHille, L., Beniazza, M., Favret, J., Berruyer, C., Perrin, P., Hacohen, N., Andrau, J.-C., Ferrier, P., Dubreuil, P., Sidow, A., & Sieweke, M. H. (2016). Lineage-specific enhancers activate self-renewal genes in macrophages and embryonic stem cells. *Science*, *351*(6274), aad5510. <https://doi.org/10.1126/science.aad5510>
- Street, I. P., Lin, H. K., Laliberte, F., Ghomashchi, F., Wang, Z., Perrier, H., Tremblay, N. M., Huang, Z., Weech, P. K., & Gelb, M. H. (1993). Slow- and tight-binding inhibitors of the 85-kDa human phospholipase A2. *Biochemistry*, *32*(23), 5935–5940. <https://doi.org/10.1021/bi00074a003>
- Strefford, J. C., Foot, N. J., Chaplin, T., Neat, M. J., Oliver, R. T. D., Young, B. D., & Jones, L. K. (2001). The characterisation of the lymphoma cell line U937, using comparative genomic hybridisation and multi-plex FISH. *Cytogenetic and Genome Research*, *94*(1–2), 9–14. <https://doi.org/10.1159/000048774>
- Sultani, G., Samsudeen, A. F., Osborne, B., & Turner, N. (2017). NAD⁺: A key metabolic regulator with great therapeutic potential. *Journal of Neuroendocrinology*, *29*(10). <https://doi.org/10.1111/jne.12508>

- Sundström, C., & Nilsson, K. (1976). Establishment and characterization of a human histiocytic lymphoma cell line (U-937). *International Journal of Cancer*, 17(5), 565–577. <https://doi.org/10.1002/ijc.2910170504>
- Surprenant, A., Rassendren, F., Kawashima, E., North, R. A., & Buell, G. (1996). The Cytolytic P_{2Z} Receptor for Extracellular ATP Identified as a P_{2X} Receptor (P2X₇). *Science*, 272(5262), 735–738. <https://doi.org/10.1126/science.272.5262.735>
- Suzuki, K., Nakano, H., & Suzuki, S. (1967). Natural occurrence and enzymatic synthesis of alpha-nicotinamide adenine dinucleotide phosphate. *The Journal of Biological Chemistry*, 242(14), 3319–3325.
- Symons, J. A., Young, P. R., & Duff, G. W. (1995). Soluble type II interleukin 1 (IL-1) receptor binds and blocks processing of IL-1 beta precursor and loses affinity for IL-1 receptor antagonist. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92(5), 1714–1718. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.5.1714>
- Takeda, K. (2004). Toll-like receptors in innate immunity. *International Immunology*, 17(1), 1–14. <https://doi.org/10.1093/intimm/dxh186>
- Takeuchi, O., & Akira, S. (2010). Pattern Recognition Receptors and Inflammation. *Cell*, 140(6), 805–820. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.01.022>
- Talmage, D. W., & Pearlman, D. S. (1963). The antibody response: A model based on antagonistic actions of antigen. *Journal of Theoretical Biology*, 5(2), 321–339. [https://doi.org/10.1016/0022-5193\(63\)90067-5](https://doi.org/10.1016/0022-5193(63)90067-5)
- Tang, X., Yocum, D. E., DeJonghe, D., & Nordensson, K. (2002). Characterizing a soluble survival signal for activated lymphocytes from CD14⁺ cells. *Immunology*, 107(1), 56–68. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2567.2002.01463.x>
- Tansey, E. M. (2006). Henry Dale and the discovery of acetylcholine. *Comptes Rendus Biologies*, 329(5–6), 419–425. <https://doi.org/10.1016/j.crv.2006.03.012>
- Traba, J., Kwarteng-Siaw, M., Okoli, T. C., Li, J., Huffstutler, R. D., Bray, A., Waclawiw, M. A., Han, K., Pelletier, M., Sauve, A. A., Siegel, R. M., & Sack, M. N. (2015). Fasting and refeeding differentially regulate NLRP3 inflammasome activation in human subjects. *Journal of Clinical Investigation*, 125(12), 4592–4600. <https://doi.org/10.1172/JCI83260>
- Trammell, S. A. J., Schmidt, M. S., Weidemann, B. J., Redpath, P., Jaksch, F., Dellinger, R. W., Li, Z., Abel, E. D., Migaud, M. E., & Brenner, C. (2016). Nicotinamide riboside is uniquely and orally bioavailable in mice and humans. *Nature Communications*, 7(1), 12948. <https://doi.org/10.1038/ncomms12948>

- Tschopp, J., Martinon, F., & Burns, K. (2003). NALPs: A novel protein family involved in inflammation. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 4(2), 95–104. <https://doi.org/10.1038/nrm1019>
- Tulotta, C., & Ottewell, P. (2018). The role of IL-1B in breast cancer bone metastasis. *Endocrine-Related Cancer*, 25(7), R421–R434. <https://doi.org/10.1530/ERC-17-0309>
- Turk, J., & Ramanadham, S. (2004). The expression and function of a group VIA calcium-independent phospholipase A₂ (iPLA₂ β) in β-cells. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 82(10), 824–832. <https://doi.org/10.1139/y04-064>
- Umamathy, N. S., Gonzales, J., Fulzele, S., Kim, K., Lucas, R., & Verin, A. D. (2012). β-Nicotinamide adenine dinucleotide attenuates lipopolysaccharide-induced inflammatory effects in a murine model of acute lung injury. *Experimental Lung Research*, 38(5), 223–232. <https://doi.org/10.3109/01902148.2012.673049>
- Umamathy, N. S., Zemskov, E. A., Gonzales, J., Gorshkov, B. A., Sridhar, S., Chakraborty, T., Lucas, R., & Verin, A. D. (2010). Extracellular Î²-nicotinamide adenine dinucleotide (Î²-NAD) promotes the endothelial cell barrier integrity via PKA- and EPAC1/Rac1-dependent actin cytoskeleton rearrangement. *Journal of Cellular Physiology*, n/a-n/a. <https://doi.org/10.1002/jcp.22029>
- Vance, D. E. (1990). Phosphatidylcholine metabolism: Masochistic enzymology, metabolic regulation, and lipoprotein assembly. *Biochemistry and Cell Biology*, 68(10), 1151–1165. <https://doi.org/10.1139/o90-172>
- Vastert, S. J., Jamilloux, Y., Quartier, P., Ohlman, S., Osterling Koskinen, L., Kullenberg, T., Franck-Larsson, K., Fautrel, B., & de Benedetti, F. (2019). Anakinra in children and adults with Still's disease. *Rheumatology*, 58(Supplement_6), vi9–vi22. <https://doi.org/10.1093/rheumatology/kez350>
- von Kügelgen, I., & Hoffmann, K. (2016). Pharmacology and structure of P2Y receptors. *Neuropharmacology*, 104, 50–61. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2015.10.030>
- Wacleche, V., Tremblay, C., Routy, J.-P., & Ancuta, P. (2018). The Biology of Monocytes and Dendritic Cells: Contribution to HIV Pathogenesis. *Viruses*, 10(2), 65. <https://doi.org/10.3390/v10020065>
- Wald, D., Qin, J., Zhao, Z., Qian, Y., Naramura, M., Tian, L., Towne, J., Sims, J. E., Stark, G. R., & Li, X. (2003). SIGIRR, a negative regulator of Toll-like receptor–

- interleukin 1 receptor signaling. *Nature Immunology*, 4(9), 920–927.
<https://doi.org/10.1038/ni968>
- Wang, H., Yu, M., Ochani, M., Amella, C. A., Tanovic, M., Susarla, S., Li, J. H., Wang, H., Yang, H., Ulloa, L., Al-Abed, Y., Czura, C. J., & Tracey, K. J. (2003). Nicotinic acetylcholine receptor $\alpha 7$ subunit is an essential regulator of inflammation. *Nature*, 421(6921), 384–388. <https://doi.org/10.1038/nature01339>
- Wang, & Kanneganti, T.-D. (2021). From pyroptosis, apoptosis and necroptosis to PANoptosis: A mechanistic compendium of programmed cell death pathways. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 19, 4641–4657. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2021.07.038>
- Watkins, L. R., Maier, S. F., & Goehler, L. E. (1995). Immune activation: The role of pro-inflammatory cytokines in inflammation, illness responses and pathological pain states. *Pain*, 63(3), 289–302. [https://doi.org/10.1016/0304-3959\(95\)00186-7](https://doi.org/10.1016/0304-3959(95)00186-7)
- Weir, J. P., & Meltzer, M. S. (1993). Transfection of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Proviral DNA into Primary Human Monocytes. *Cellular Immunology*, 148(1), 157–165. <https://doi.org/10.1006/cimm.1993.1098>
- Wen, A.-Q., Gu, W., Wang, J., Feng, K., Qin, L., Ying, C., Zhu, P.-F., Wang, Z.-G., & Jiang, J.-X. (2010). CLINICAL RELEVANCE OF IL-1 β PROMOTER POLYMORPHISMS (–1470, –511, AND –31) IN PATIENTS WITH MAJOR TRAUMA. *Shock*, 33(6), 576–582. <https://doi.org/10.1097/SHK.0b013e3181cc0a8e>
- Whiteaker, P., Christensen, S., Yoshikami, D., Dowell, C., Watkins, M., Gulyas, J., Rivier, J., Olivera, B. M., & McIntosh, J. M. (2007). Discovery, Synthesis, and Structure Activity of a Highly Selective $\alpha 7$ Nicotinic Acetylcholine Receptor Antagonist. *Biochemistry*, 46(22), 6628–6638. <https://doi.org/10.1021/bi7004202>
- Whitman, W. B., Coleman, D. C., & Wiebe, W. J. (1998). Prokaryotes: The unseen majority. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(12), 6578–6583. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.12.6578>
- Witsell, A. L., & Schook, L. B. (1992). Tumor necrosis factor alpha is an autocrine growth regulator during macrophage differentiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 89(10), 4754–4758. <https://doi.org/10.1073/pnas.89.10.4754>
- Wolf, A. J., Reyes, C. N., Liang, W., Becker, C., Shimada, K., Wheeler, M. L., Cho, H. C., Popescu, N. I., Coggeshall, K. M., Arditi, M., & Underhill, D. M. (2016).

- Hexokinase Is an Innate Immune Receptor for the Detection of Bacterial Peptidoglycan. *Cell*, 166(3), 624–636. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.05.076>
- Wong, K. L., Tai, J. J.-Y., Wong, W.-C., Han, H., Sem, X., Yeap, W.-H., Kourilsky, P., & Wong, S.-C. (2011). Gene expression profiling reveals the defining features of the classical, intermediate, and nonclassical human monocyte subsets. *Blood*, 118(5), e16–e31. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-12-326355>
- Wong, K. L., Yeap, W. H., Tai, J. J. Y., Ong, S. M., Dang, T. M., & Wong, S. C. (2012). The three human monocyte subsets: Implications for health and disease. *Immunologic Research*, 53(1–3), 41–57. <https://doi.org/10.1007/s12026-012-8297-3>
- Wright, S. D. (1999). Toll, A New Piece in the Puzzle of Innate Immunity. *Journal of Experimental Medicine*, 189(4), 605–609. <https://doi.org/10.1084/jem.189.4.605>
- Yamasaki, K., Muto, J., Taylor, K. R., Cogen, A. L., Audish, D., Bertin, J., Grant, E. P., Coyle, A. J., Misaghi, A., Hoffman, H. M., & Gallo, R. L. (2009). NLRP3/Cryopyrin Is Necessary for Interleukin-1 β (IL-1 β) Release in Response to Hyaluronan, an Endogenous Trigger of Inflammation in Response to Injury. *Journal of Biological Chemistry*, 284(19), 12762–12771. <https://doi.org/10.1074/jbc.M806084200>
- Yang, Y., & Sauve, A. A. (2016). NAD + metabolism: Bioenergetics, signaling and manipulation for therapy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, 1864(12), 1787–1800. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2016.06.014>
- Yasukawa, H., Sasaki, A., & Yoshimura, A. (2000). Negative Regulation of Cytokine Signaling Pathways. *Annual Review of Immunology*, 18(1), 143–164. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.18.1.143>
- Yi, L., Maier, A. B., Tao, R., Lin, Z., Vaidya, A., Pendse, S., Thasma, S., Andhalkar, N., Avhad, G., & Kumbhar, V. (2023). The efficacy and safety of β -nicotinamide mononucleotide (NMN) supplementation in healthy middle-aged adults: A randomized, multicenter, double-blind, placebo-controlled, parallel-group, dose-dependent clinical trial. *GeroScience*, 45(1), 29–43. <https://doi.org/10.1007/s11357-022-00705-1>
- Yoshino, M., Yoshino, J., Kayser, B. D., Patti, G. J., Franczyk, M. P., Mills, K. F., Sindelar, M., Pietka, T., Patterson, B. W., Imai, S.-I., & Klein, S. (2021). Nicotinamide mononucleotide increases muscle insulin sensitivity in prediabetic

- women. *Science (New York, N.Y.)*, *372*(6547), 1224–1229. <https://doi.org/10.1126/science.abe9985>
- You, K., Gu, H., Yuan, Z., & Xu, X. (2021). Tumor Necrosis Factor Alpha Signaling and Organogenesis. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, *9*, 727075. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.727075>
- 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-1 β via Different Combinations of Nicotinic Acetylcholine Receptor Subunits $\alpha 7$, $\alpha 9$ and $\alpha 10$. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, *11*, 189. <https://doi.org/10.3389/fncel.2017.00189>
- Zawada, A. M., Rogacev, K. S., Rotter, B., Winter, P., Marell, R.-R., Fliser, D., & Heine, G. H. (2011). SuperSAGE evidence for CD14⁺⁺CD16⁺ monocytes as a third monocyte subset. *Blood*, *118*(12), e50–e61. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-01-326827>
- Zhou, B., Wang, D. D.-H., Qiu, Y., Airhart, S., Liu, Y., Stempien-Otero, A., O'Brien, K. D., & Tian, R. (2020). Boosting NAD level suppresses inflammatory activation of PBMCs in heart failure. *The Journal of Clinical Investigation*, *130*(11), 6054–6063. <https://doi.org/10.1172/JCI138538>
- Ziegler-Heitbrock, L. (2014). Reprint of: Monocyte subsets in man and other species. *Cellular Immunology*, *291*(1–2), 11–15. <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2014.06.008>
- 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>
- Züllig, T., Trötz Müller, M., & Köfeler, H. C. (2020). Lipidomics from sample preparation to data analysis: A primer. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, *412*(10), 2191–2209. <https://doi.org/10.1007/s00216-019-02241-y>
- Zupan, L. A., Weiss, R. H., Hazen, S. L., Parnas, B. L., Aston, K. W., Lennon, P. J., Getman, D. P., & Gross, R. W. (1993). Structural determinants of haloenol lactone-mediated suicide inhibition of canine myocardial calcium-independent

phospholipase A2. *Journal of Medicinal Chemistry*, 36(1), 95–100.
<https://doi.org/10.1021/jm00053a012>

9 Publikationsverzeichnis

9.1 Originalarbeiten

Hiller, S., **Heldmann, S.**, Richter, K., Jurastow, I., Küllmar, M., Hecker, A., Wilker, S., Fuchs-Moll, G., Manzini, I., Schmalzing, G., Kummer, W., Padberg, W., McIntosh, J., Damm, J., Zakrzewicz, A., & Grau, V. (2018). β -Nicotinamide Adenine Dinucleotide (β -NAD) Inhibits ATP-Dependent IL-1 β Release from Human Monocytic Cells. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(4), 1126.
<https://doi.org/10.3390/ijms19041126>

9.2 Vorträge

134. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Chirurgie (DGCH) (München 03/2017):

Sarah Heldmann, S. Hiller, A. Zakrewicz, W. Padberg, V. Grau / Gießen
The inhibition of ATP-mediated interleukin 1 β release from human monocytes by β -NAD involves a nicotinic adonist produced by phospholipase A2.

10 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

11 Danksagung

Zum Abschluss möchte ich mich an dieser Stelle bei allen bedanken, die diese Arbeit möglich gemacht haben und mich während des Forschens und Schreibens unterstützt haben.

Allen voran gilt mein Dank meiner Doktormutter Prof. Dr. Veronika Grau für die Vergabe des Dissertationsthemas und die Bereitstellung des Labors. Danke für Ihre geduldige, sorgfältige Betreuung als Doktormutter, das große Engagement und die vielen Stunden des Korrigierens und Auswertens.

Großer Dank gilt allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe, die mich stets tatkräftig und vorbehaltlos unterstützt haben. Frau Sigrid Wilker gilt hierbei besonderer Dank dafür, dass sie mich in die umfangreiche Methodik eingearbeitet hat und mir stets mit einem offenen Ohr und einem helfenden Rat zur Seite stand, auch wenn es im Labor einmal nicht so lief, wie es sollte. Auch Dr. Anka Zakrzewicz gilt großer Dank für ihre Mitbetreuung und meine Einarbeitung in benötigte Labortechniken.

Vielen Dank auch an Dr. Katrin Richter dafür, dass ich sie stets mit Fragen und Problemen kontaktieren konnte, sie nie aufgehört hat mich zu motivieren, an mich zu glauben und die vielen Stunden des Korrekturlesens.

Der Justus-Liebig-Universität möchte ich danken für die Möglichkeit der Dissertation und das Rahmenprogramm des Prägraduierertenkollegs.

Abschließend möchte ich mich bei meinen Eltern dafür bedanken, dass ihr mir immer alles ermöglicht habt, für eure uneingeschränkte, liebevolle Unterstützung, eure stetige Motivation und Euer Vertrauen in mich. Ohne Euch stünde ich nicht dort, wo ich heute bin. Zudem gilt mein Dank meinem Mann, der mich immer unterstützt, an mich geglaubt und mich auch in schwierigen Zeiten „ertragen“ und stets motiviert hat.