

Modulation der cholinergen Inhibition der Interleukin-1 β - Sekretion mononukleärer Leukozyten durch Amyloid- β

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

vorgelegt von Ogiemwonyi-Schaefer, Osayamen Raymond
aus Port-Harcourt

Gießen 2022

Aus dem Fachbereich Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

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

Gutachter: PD Dr. med. Andreas Hecker

Gutachter: Frau Prof. Dr. Ritva Tikkanen

Tag der Disputation: 10.10.2022

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
1.1.	Entzündungsreaktionen	1
1.2.	Abläufe des angeborenen Immunsystems	1
1.2.1.	LPS kann als erstes Signal über den TLR-4 die Synthese von pro-IL-1 β induzieren	2
1.2.2.	ATP bindet als zweites Signal an monozytäre P2X7R	4
1.2.3.	Das NLRP3-Inflammasom kann die Aktivierung der Caspase-1 herbeiführen	5
1.3.	IL-1 β -Regulation und immunologische Wirkung	7
1.3.1.	Cholinerge Kontrolle der IL-1 β -Freisetzung	7
1.3.2.	CRP inhibiert die ATP-abhängige IL-1 β -Freisetzung	12
1.4.	A β -Peptide	13
1.4.1.	APP und die Bildung von A β -Peptiden	13
1.4.2.	Einfluss von A β (1-42) auf Immunzellen	15
1.4.3.	Zirkulieren bestimmte A β -Moleküle auch im Blut?	15
1.4.4.	Gewisse A β -Peptide beeinflussen die cholinerge Transmission in Neuronen	16
2.	Zielsetzung der Arbeit	18
3.	Material und Methoden	19
3.1.	Reagenzien	19
3.2.	Verbrauchsmaterialien	20
3.3.	Geräte und Software	21
3.4.	Versuche mit U937-Zellen	21
3.4.1.	Zellkulturen	21
3.4.2.	Versuchsaufbau	22
3.5.	Versuche mit PBMCs	24
3.6.	Messverfahren	24
3.6.1.	ELISA	24
3.6.2.	LDH-Messung	25
3.7.	Datenauswertung mit SPSS	25
4.	Ergebnisse	27

4.1.	Experimente mit U937-Zellen	27
4.1.1.	A β (1-42) hebt dosisabhängig den inhibitorischen Effekt von ACh auf die IL-1 β -Freisetzung auf	27
4.1.2.	Ohne vorherige zelluläre Stimulation kann A β (1-42) keinen Einfluss auf die IL-1 β -Ausschüttung nehmen	29
4.1.3.	Reverse A β (42-1) hat keinen Einfluss auf die cholinerge Inhibition	31
4.1.4.	A β (1-42) schwächt den inhibitorischen Effekt der nicht-kanonischen nAChR-Agonisten auf die IL-1 β -Freisetzung ab	32
4.1.5.	Die Wirkung des partiellen Agonisten S 24795 an monozytären nAChRs	36
4.1.6.	A β (1-42) hebt die Wirkung von S 24795 an nAChRs auf	38
4.1.7.	A β (1-42) hebt die inhibitorische Wirkung von CRP auf die BzATP-induzierte IL-1 β -Freisetzung auf	40
4.2.	Experimente mit PBMCs	43
4.2.1.	A β (1-42) hebt den inhibitorischen Effekt von PC auf die BzATP-induzierte IL-1 β -Freisetzung durch humane PBMCs auf	43
5.	Diskussion	46
5.1.	APP und seine Spaltprodukte sind evolutionsbiologisch hoch konserviert	46
5.2.	Immunologische Wirkung von A β (1-42)	46
5.3.	Wirkungsmechanismus von A β (1-42) in monozytären Zellen	47
5.4.	Interaktion von A β (1-42) mit den nAChRs	48
5.5.	S 24795 wirkt als kompletter Agonist am nAChR	49
5.6.	A β (1-42) antagonisiert die Wirkung von CRP am nAChR	50
5.7.	Klinische Bedeutung und Ausblick	51
6.	Schlussfolgerung	53
7.	Zusammenfassung	54
7.1.	Modulation cholinergischer Inhibition der IL-1 β -Sekretion von mononukleären Leukozyten durch A β (1-42)	54
7.2.	A β (1-42) moduliert die cholinergische Inhibition von ATP-vermittelte IL-1 β Freisetzung	55
8.	Abkürzungsverzeichnis	56
9.	Abbildungsverzeichnis	60
10.	Tabellenverzeichnis	63

11. Literaturverzeichnis	64
12. Publikationsverzeichnis	75
13. Erklärung zur Dissertation	76
14. Danksagung	77

1. Einleitung

1.1. Entzündungsreaktionen

Das menschliche Immunsystem ist ein Zusammenspiel von verschiedenen Zelltypen, deren Rezeptoren und Zytokinen, mit dem Ziel, Pathogene zu bekämpfen. Auslösbar sind systemische Entzündungsreaktionen durch exogene Noxen, wie beispielsweise bakterielle Infektionen, was im schlimmsten Fall in einer Sepsis enden kann. Eine systemische Entzündungsreaktion kann jedoch auch endogene nicht-infektiöse Auslöser haben, wobei hier von einem *systemic inflammatory response syndrome* (SIRS) gesprochen wird [37, 93]. Aktuell stellt die Sepsis die Haupttodesursache auf chirurgischen Intensivstationen dar [40]. Die Therapie der Sepsis basiert auf einem dreistufigen Schema: chirurgischer Herdsanierung, antimikrobieller Therapie und intensivmedizinischer supportiver Behandlung. Bisherige additive Behandlungsansätze wie beispielsweise die Gabe von aktiviertem Protein C (rhAPC) sind fehlgeschlagen und daher auch nicht mehr empfohlen [36]. Ein genaueres Verständnis über die Abläufe und Interaktionen einer systemischen Entzündungsreaktion wären von Bedeutung zur Erforschung neuer pharmakologischer Therapieansätze.

1.2. Abläufe des angeborenen Immunsystems

Monozytäre Zellen enthalten membrangebundene Toll-Like-Rezeptoren (TLRs), mit denen sie *pathogen associated molecular patterns* (PAMPs) erkennen können. Ein Beispiel für ein PAMP ist das Lipopolysaccharid (LPS) der Zellwand von gramnegativen Bakterien [4, 41].

Zugleich besitzen Monozyten ebenfalls die Fähigkeit „Gefahrensignale“ (DAMPs, *damage associated molecular patterns*) zu erkennen. Die Erkennung von DAMPs erfolgt über verschiedene Mechanismen, beispielsweise über Phagozytose oder über Membranrezeptoren wie beispielsweise TLRs [25, 33, 95]. DAMPs werden typischerweise aus beschädigten Zellen freigesetzt. Zu den DAMPs zählen Moleküle, wie extrazelluläres Adenosintriphosphat (ATP) und freie Desoxyribonukleinsäure (DNA). Auch das aus der Alzheimerforschung bekannte Peptid Amyloid- β (1-42) ($A\beta$ (1-42)) stellt ein DAMP dar [13, 25, 60].

Interleukin-1 β (IL-1 β) ist ein wichtiges Zytokin der angeborenen Immunabwehr und kann in monozytären Zellen synthetisiert und von ihnen ausgeschüttet werden. Auf-

grund seiner Wirkungen, wie beispielsweise dem Auslösen von Fieber, Thrombozytose, Induktion von Akute-Phase-Proteinen etc., ist die Freisetzung dieses Zytokins streng reguliert [20].

Typischerweise werden zwei Signale für die Freisetzung von reifem IL-1 β benötigt: Das erste Signal, welches die PAMP-Erkennung durch TLR-4 auf monozytären Zellen darstellt, führt zur Transkription und Translation der Proform von IL-1 β (pro-IL-1 β). Das zweite Signal kann beispielsweise ATP aus lysierten Zellen sein. Über Bindung an den ATP-Rezeptor P2X7 (P2X7-Rezeptor, P2X7R) erfolgt die Aktivierung des NLRP3 (*NOD-, LRR- and pyrin domain-containing protein 3*)-Inflammasoms, welches für die Umwandlung der Proform in aktives IL-1 β essentiell ist [45] (Abbildung 6). Neben diesem Syntheseweg existieren weitere Möglichkeiten der IL-1 β -Bildung [2]. Da diese für die vorliegende Arbeit nicht relevant sind, wird nicht weiter darauf eingegangen.

1.2.1. LPS kann als erstes Signal über den TLR-4 die Synthese von pro-IL-1 β induzieren

Die *pathogen recognition receptors* (PRRs) des angeborenen Immunsystems, insbesondere die Gruppe der TLRs, leiten eine Entzündungsreaktion gegen Pathogene ein, indem sie antimikrobielle Gene aktivieren und die Synthese inflammatorischer Zytokine induzieren [73].

TLRs bestehen aus einer extrazellulären Region, die 18-25 Kopien leucinreicher Wiederholungen (*leucine rich repeats*, LRRs) enthält [89]. Zudem enthalten TLRs eine transmembranäre Region und auf zytosolischer Seite eine Toll-IL-Rezeptor (TIR)-Domäne, die mit weiteren Domänen des TIR-Typs in anderen Signalmolekülen interagiert. Die Signalübertragung der TLRs wird aktiviert, sobald die Ligandenbindung zu einer Konformationsänderung der Rezeptoren geführt hat. Die Liganden (PAMPs, DAMPs) werden jeweils von verschiedenen TLRs erkannt, beispielsweise LPS vom TLR-4 [42].

Nach einer Infektion mit gramnegativen Bakterien wird LPS rasch durch das Serumprotein *LPS-binding protein* (LBP) gebunden. Die Bindung von LPS an den TLR-4 erfolgt in der Regel mittels LBP und ist von dem auf fast allen Immunzellen lokalisierten Oberflächenprotein CD14 abhängig [102].

Der TLR-4 kann nach LPS-Erkennung zwei Signalwege bei der Immunantwort einleiten: den MyD88-abhängigen Signalweg und den MyD88-unabhängigen TRIF-Signalweg [90].

Das MyD88-Protein (*differentiation primary response gene 88*, myeloischer Differenzierungsfaktor 88) ist ein Adaptormolekül, welches mit der TIR-Domäne der TLRs interagiert. Nach Stimulation des Rezeptors rekrutiert das MyD88-Protein die IRAK (*IL-1-receptor-associated-kinase*) [90]. Danach wird diese Kinase phosphoryliert und somit aktiviert und bildet mit TRAF6 (*TNF receptor associated kinase*) einen Komplex. Dieser Komplex führt zur Aktivierung zweier Signalwege, welche in der Aktivierung von NF- κ B (*nuclear factor „kappa-light-chain-enhancer“ of activated B-cells*) und JNK (*c-Jun N-terminal kinase*) münden [61]. Nach Aktivierung kann JNK die Bildung vom Aktivatorprotein-1 (AP-1) induzieren. Dieser Transkriptionsfaktor verstärkt wie auch NF- κ B die Transkription proinflammatorischer Zytokine wie pro-IL-1 β [47].

Im MyD88-unabhängigen Signalweg führt die Stimulation von TLR-4 durch LPS zu einer Aktivierung vom Transkriptionsfaktor IRF-3 (*interferon regulatory factor 3*). Dieser wird durch TRIF (*TIR domain-containing adaptor-inducing IFN- β*), einem Adaptormolekül, reguliert. Die Aktivierung von IRF-3 kann zur Induktion von IFN- β -Genen und somit letztlich zu einer erhöhten IFN-Sekretion führen [89]. TRIF selbst kann zudem direkt TRAF6 induzieren, was über Bildung von NF- κ B zur Induktion von pro-IL-1 β -mRNA führt [47] (Abbildung 1).

Der TLR-4 ist der einzige TLR, der sowohl den MyD88-abhängigen als auch den MyD88-unabhängigen Signalweg einleiten kann. Die Rezeptoraktivierung induziert eine Ausschüttung von Zytokinen, antimikrobiellen Peptiden und Interferonen (IFN) [7]. Darüber hinaus kann LPS über den TLR-4 die de-novo-Proteinsynthese von Komponenten des NLRP3-Inflammasoms stimulieren [59].

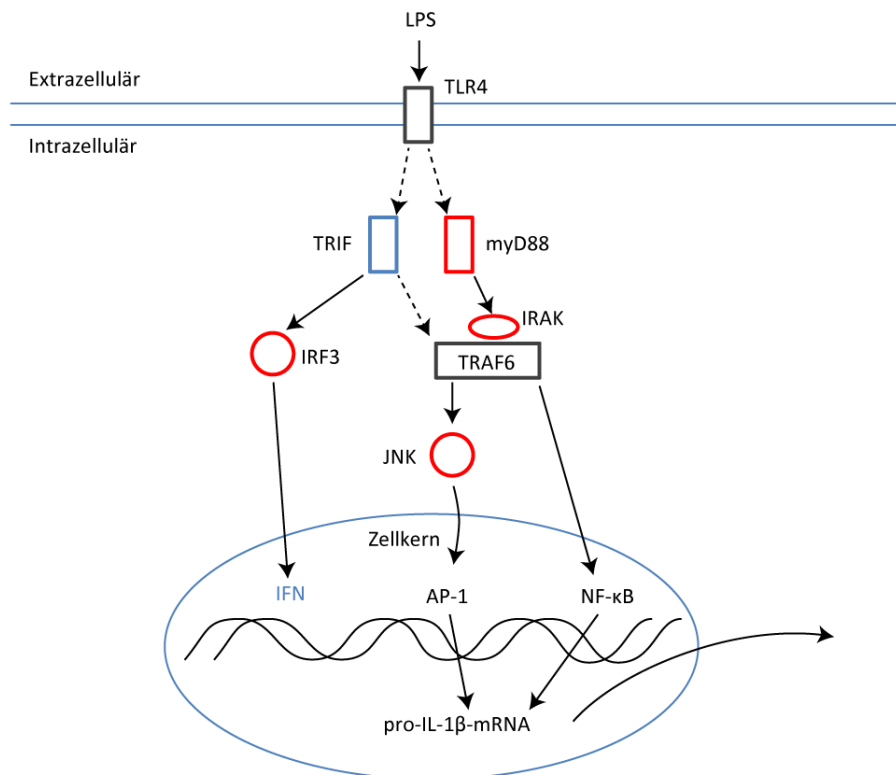


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Reaktionen nach Toll-Like-Rezeptor-(TLR)-4-Aktivierung

Das MyD88- (*differentiation primary response gene 88*)-Protein interagiert mit der Toll-IL-Rezeptor-(TIR)-Domäne der TLRs. Nach Stimulation des Rezeptors rekrutiert das MyD88-Protein die IRAK (*IL-1-receptor-associated-kinase*). Danach wird diese Kinase phosphoryliert und bildet mit TRAF6 (*TNF receptor associated kinase*) einen Komplex. Dieser Komplex führt zur Aktivierung zweier Signalwege, welche in der Aktivierung von NF-κB (*nuclear factor „kappa-light-chain-enhancer“ of activated B-cells*) und JNK (*c-Jun N-terminal kinase*) münden. Nach Aktivierung kann JNK die Bildung vom Aktivatorprotein-1 (AP-1) induzieren. Dieser Transkriptionsfaktor verstärkt wie NF-κB die Transkription proinflammatorischer Zytokine wie beispielsweise pro-Interleukin-(IL)-1β.

Der MyD88-unabhängige Signalweg: Stimulation von TLR-4 durch LPS führt zur Aktivierung vom Transkriptionsfaktor IRF-3 (*interferon regulatory factor 3*). Dieser wird durch das Adaptormolekül TRIF (*TIR domain-containing adaptor-inducing IFN-β*) reguliert. Die Aktivierung von IRF-3 kann zur Induktion von Interferon-(IFN)-β-Genen und somit letztlich zu einer erhöhten IFN-Sekretion führen. TRIF selbst kann zudem direkt TRAF6 induzieren, was über Bildung von NF-κB zur Induktion von pro-IL-1β-mRNA führt.

Quelle: R.Ogiemwonyi-Schaefer

1.2.2. ATP bindet als zweites Signal an monozytäre P2X7R

Das zweite Signal zur Aktivierung und Synthese von reifem IL-1β stellt die Bindung von Gefahrensignalen wie extrazellulärem ATP an den ATP-Rezeptor P2X7 dar [77, 95]. In dieser Arbeit wurde hierzu das ATP-Derivat Benzoylbenzoyl-Adenosintriphosphat (BzATP) verwendet.

Die P2XR werden von fast allen Immunzellen exprimiert [95]. Neben dem natürlichen

Agonisten ATP kann der Rezeptor auch von Nicotin-Adenin-Dinukleotid (NAD⁺) aktiviert werden [83]. P2XRs vermitteln die NLRP3-Inflammasomaktivierung, die T-Lymphozyten-Differenzierung, Zytokin- und Chemokinausschüttung und die Apoptose [95]. Für das Verständnis dieser Arbeit ist vor allem die Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms über P2X7Rs von Bedeutung.

Von allen P2XRs ist der Subtyp P2X7 der am besten untersuchte Rezeptor bezüglich seiner immunologischen Funktion. Dieser Rezeptor ist als Trimer organisiert. Nach Ligandenbindung erfolgt ein rascher Einstrom von Ca²⁺- und Na⁺-Ionen in die Zelle sowie ein Efflux von K⁺-Ionen [86]. Die Reaktion nach Ligandenbindung lässt sich in drei Phasen unterteilen: eine Aktivierungsphase, in der Kationen durch den Ionenkanal strömen, eine Desensibilisierungsphase und zuletzt eine Deaktivierungsphase, bei welcher der Strom nach ATP-Dissoziation sistiert [14]. Auch wenn der genaue Mechanismus noch unklar ist, stellt die Reduktion der intrazellulären K⁺-Konzentration den entscheidenden Reiz für die NLRP3-Inflammasomaktivierung dar [67].

1.2.3. Das NLRP3-Inflammasom kann die Aktivierung der Caspase-1 herbeiführen

An der Aktivierung des intrazellulären Effektorproteins Caspase-1 ist ein Proteinkomplex, welcher als NLRP3-Inflammasom bezeichnet wird, maßgeblich beteiligt [53]. Von den verschiedenen Inflammasomen ist das NLRP3 das am besten untersuchte [54].

Namensgebend für die verschiedenen Arten von Inflammasomen sind jeweils die unterschiedlichen *NOD-like-receptors* (NLR)-Domänen, aus denen sich diese zusammensetzen [60]. NLRs besitzen eine dreigliedrige Struktur: eine zentrale NOD-Domäne (*nucleotide-binding oligomerization domain*), welche sich nach Aktivierung selbst oligomerisiert; eine C-terminale LRR-Einheit, die für die Ligandenbindung verantwortlich ist und eine variable N-terminalen Protein-Protein-Interaktionsdomäne. Die Subtypen der NLRs unterscheiden sich aufgrund der Varianz der N-terminalen Domänen, welche beim NLRP3-Inflammasom aus einer PYD (*pyrin domain*) besteht [12].

Für die Inflammasombildung werden - analog zur IL-1 β -Synthese - zwei Signale benötigt: Das erste Signal stellt die LPS-Bindung an den TLR-4 dar, welche zur Transkription von Komponenten des NLRP3-Inflammasoms führt. Die Bindung von extrazellulärem ATP an den P2X7-Rezeptor führt als zweites Signal zur Formation des NLRP3-Inflammasomkomplexes [53] (Abbildung 2). Weitere Substanzen und Prozesse können als zweites Signal fungieren: Uratkristalle, Nigericin und Silikate sowie Ionenströme

(Cl⁻; Ca²⁺), Lysosomenschäden und mitochondriale Dysfunktion [53, 54].

Der NLRP3-Inflammasomkomplex spielt aufgrund der Aktivierung der Cystein-Protease Caspase-1 eine wichtige Rolle im angeborenen und erworbenen Immunsystem [21]. Die Aktivierung von Caspase-1 erfolgt über die *caspase recruitment domain* (CARD), welche via ASC (*adaptor protein apoptosis speckprotein with caspase recruitment*) an PYD des NLRP3-Inflammasoms binden kann [12]. Die Caspase-1, auch bekannt als *Interleukin-1 converting enzyme* (ICE), liegt im Zytosol als inaktives Zymogen vor und kann nach Aktivierung im Sinne einer Autoprozessierung weitere Caspase-1-Moleküle bilden. Caspase-1 spaltet anschließend Substrat-spezifisch pro-IL-1 β und pro-IL-18 in ihre aktive Formen [21, 54] (Abbildung 6).

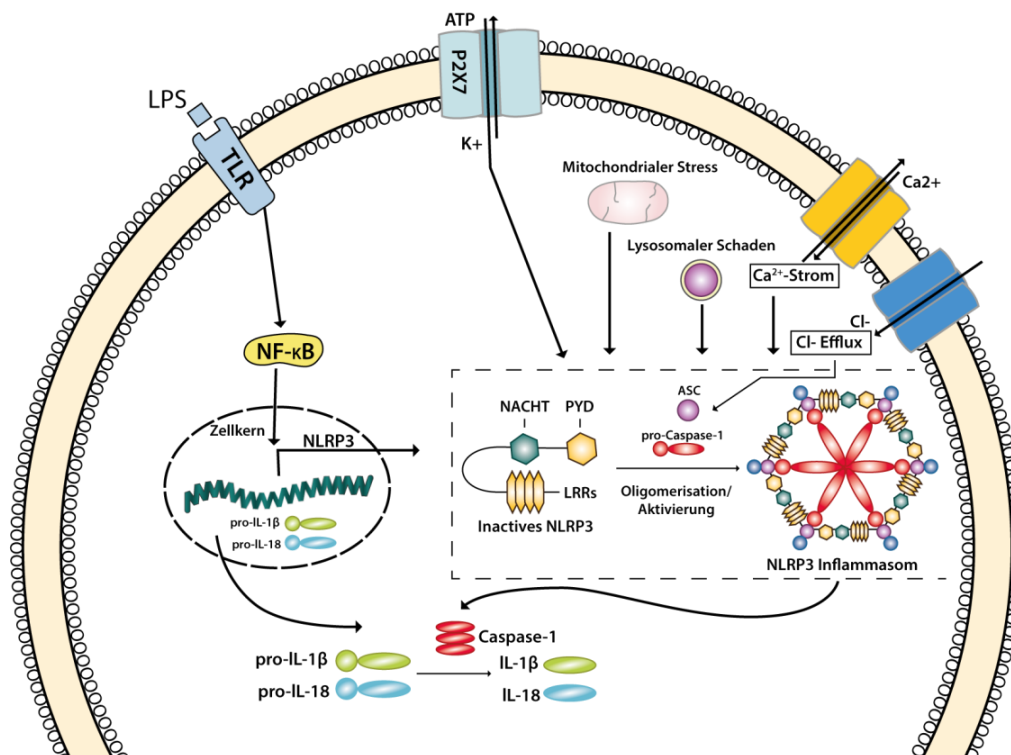


Abbildung 2: Inflammasombildung und -aktivierung

Für die Inflammasombildung werden zwei Signale benötigt: Das erste Signal stellt die Lipopolysaccharid-(LPS)-Bindung an den Toll-Like-Rezeptor-(TLR)-4 dar, welche zur Transkription von Komponenten des NLRP3-(*NOD*-, *LRR*- and *pyrin domain-containing protein 3*)-Inflammasoms führt. Die Bindung von extrazellulärem Adenosintriphosphat (ATP) als zweites Signal an den P2X7-Rezeptor führt zur Formation des NLRP3-Inflammasomkomplexes.

Die Aktivierung von Caspase-1 erfolgt über CARD (*caspase recruitment domain*), welche via ASC (*adaptor protein apoptosis speckprotein with caspase recruitment*) an PYD (Purindomäne) des NLRP3-Inflammasoms binden kann. Caspase-1 spaltet anschließend Substrat-spezifisch pro-Interleukin-(IL)-1 β und pro-IL-18 in ihre aktiven Formen.

Quelle: R.Ogiemwonyi-Schaefer, in Anlehnung an [12].

1.3. IL-1 β -Regulation und immunologische Wirkung

IL-1 β ist ein proinflammatorisches Zytokin, welches von Natürlichen Killerzellen, neutrophilen Granulozyten und aktivierten Makrophagen und Monozyten gebildet wird [60]. Intrazellulär liegt IL-1 β als Zymogen in seiner pro-Form vor und wird nach Stimulation durch ein zweites Signal wie extrazelluläres ATP in die aktive Form gespalten und unmittelbar sezerniert [75]. Neben dieser NLRP3-abhängigen Bildung, erfolgt die Produktion von IL-1 β in Monozyten auch durch Autoinduktion nach Bindung an den IL-1-Rezeptor (IL-1R) [2].

IL-1 β ist eines der wichtigsten Zytokine des angeborenen und erworbenen Immunsystems. Es kann zur Stimulation von Faktoren und Zytokinen, wie beispielsweise G-CSF (*Granulocyte-Colony Stimulating Factor*), TNF- α (Tumornekrosefaktor- α) und IL-6 führen [17, 70, 81]. Darüber hinaus kann IL-1 β als Co-Stimulator die Lymphozytenantwort beeinflussen [81].

Die biologische Aktivität von IL-1 β kann durch verschiedene Mechanismen und IL-1Rs reguliert werden. Exemplarisch kann der IL-1R1 nach Aktivierung eine Reaktionskaskade in Gang setzen, die zur Aktivierung von NF- κ B führt [8]. Dahingegen führt eine Ligandenbindung an IL-1R2 zu keiner weiteren Reaktion und resultiert in einer inhibitorischen Wirkung auf IL-1 β [15]. Auch das Strukturanalogon *interleukin 1 receptor antagonist* (IL-1Ra) setzt nach Bindung an den IL-1R keine Reaktionskaskade in Gang. Die Expression von IL-1Ra wird unter anderem durch IL-1 β selbst, aber auch durch LPS und antiinflammatorische Zytokine (IL-4, IL-10) induziert [3].

Eine Fehlregulierung in der Expression oder Wirkung von IL-1 β kann zu Autoimmunerkrankungen wie Morbus Crohn, Vaskulitiden oder Arthritiden führen [63]. Exemplarisch wird IL-1Ra (Anakinra®) bei der Therapie von chronisch entzündlichen Erkrankungen eingesetzt [51].

1.3.1. Cholinerge Kontrolle der IL-1 β -Freisetzung

Acetylcholin (ACh) wurde 1914 erstmals aus dem Pilz *Claviceps purpurea* isoliert. Damals erkannte man, dass diese Substanz eine inhibitorische Wirkung auf das Herz und eine stimulierende Wirkung auf die glatte Muskulatur des Darms hat [23]. Inzwischen ist bekannt, dass ACh nicht nur als Neurotransmitter, sondern auch non-neuronal als Immunmodulator fungiert (sogenanntes Non-neuronales cholinerges System) [48].

Lymphozyten, Monozyten und Makrophagen, exprimieren muskarinerge ACh-

Rezeptoren (mAChR) und nikotinerge ACh-Rezeptoren (nAChR). Somit können cholinerge Substanzen außerhalb des Zentralen Nervensystems (ZNS) Einfluss auf das Immunsystem nehmen [26]. Aus den Neurowissenschaften ist bekannt, dass nAChRs mit P2X7Rs interagieren können. Dies resultiert in einer gegenseitigen Beeinflussung der ausgelösten Ionenströme [49, 82]. 2015 zeigten Hecker *et al.*, dass die cholinerg wirkenden Substanzen Nikotin, ACh und Phosphocholin (PC) die IL-1 β -Freisetzung aus monozytären Zellen inhibieren [39]. Nach LPS-Gabe erhöhte sich die intrazelluläre Konzentration von pro-IL-1 β . Anschließende Stimulation mit BzATP induzierte eine Erhöhung der IL-1 β -Konzentration im Zellüberstand, die durch Applikation von ACh inhibiert werden konnte. Dahingegen konnten die Konzentrationen von IL-6 und TNF- α durch ACh nicht beeinflusst werden. Daraus schlussfolgerten sie, dass cholinerge Substanzen nach Rezeptorbindung die BzATP-vermittelte NLRP3-Aktivierung und damit die IL-1 β -Freisetzung hemmen [39, 79]. Dieser Mechanismus spielt in der Natur eine wichtige Rolle. Eine Vielzahl von Bakterien und eukaryontischen Parasiten, vornehmlich Nematoden und Protozoen, besitzen PC-modifizierte Zellmembrankomponenten und können mit PC-beladene Makromoleküle sezernieren. Mithilfe dieses cholinerg wirkenden Stoffes wird die IL-1 β -Ausschüttung der Monozyten inhibiert und dadurch insgesamt ein hemmender Einfluss auf die Immunzellen ausgeübt [29]. Diese antiinflammatorische Wirkung ermöglicht es den Mikroorganismen leichter in den Körper einzudringen [30].

Neuronale nAChRs haben ebenfalls eine wichtige Funktion bei neurodegenerativen Erkrankungen [71], wie beispielsweise der Alzheimerdemenz (AD). Hier findet eine Interaktion zwischen A β (1-42) und den nAChRs statt. Liu *et al.* zeigten 2001, dass A β (1-42) die Funktion der nikotinergen Rezeptoren mit der α 7-Untereinheit blockieren und damit die cholinerge Transmission beeinträchtigen [55]. Die genauere, extraneuronale Untersuchung dieser Interaktion steht im Mittelpunkt dieser Arbeit.

Bei der AD spielt die cholinerge Transmission eine wichtige Rolle. Ursachen der AD können entweder eine verminderte Aktivität der Cholinacetyltransferase (ChAT) oder eine verminderte Rezeptoraktivität (nAChRs) sein [9]. Zudem zeigte sich post-mortem eine verminderte nAChR-Konzentration in untersuchten Gehirnen von Patienten mit AD [9] und anderen neurodegenerativen Erkrankungen wie Parkinson [32].

In Mikrogliazellen des Gehirns, die viele Ähnlichkeiten zu peripheren Monozyten aufweisen, moduliert eine Stimulation mit ACh und Nikotin die TNF- α -Freisetzung nach

LPS-Applikation. Neben dem genauen Mechanismus bleibt auch der Ursprung des freigesetzten ACh noch unklar [84].

1.3.1.1. Der nAChR

Der nAChR ist ein ubiquitär vorhandener Membranrezeptor, der an den Zellmembranen von Muskelzellen, Nervenzellen und nicht-neuronalen Zellen wie Lymphozyten, Monozyten und Makrophagen vorhanden ist [27]. nAChRs bestehen aus einer extrazellulären Ligandenbindungsdomäne und einem intramembranären Kanal. Eine Aktivierung dieser Rezeptoren führt zu einer Konformationsänderung des Rezeptors, die klassischerweise zu einer höheren Membranpermeabilität für Na^+ -, K^+ - und Ca^{2+} -Ionen und damit zur Membrandepolarisation führt [65].

Die nAChRs bestehen aus unterschiedlichen Untereinheiten, die klassischerweise einen pentameren Komplex bilden. Die bisher bekannten Untereinheiten sind die α ($\alpha 1-10$)-, β ($\beta 1-4$)-, γ -, δ -, und ϵ -Untereinheiten [27]. Jede nAChR-Untereinheit wiederum besteht aus einer großen extrazellulären N-terminalen Domäne, vier transmembranären Domänen und einer großen intrazellulären Schleife zwischen den Transmembrandomänen 3 und 4 (M3-M4-Schleife) [44]. Die nAChRs sind stets aus mindestens 2 α -Untereinheiten zusammengesetzt. Die Bindungsstelle für ACh befindet sich im Bereich der α -Untereinheit [27] (Abbildung 3).

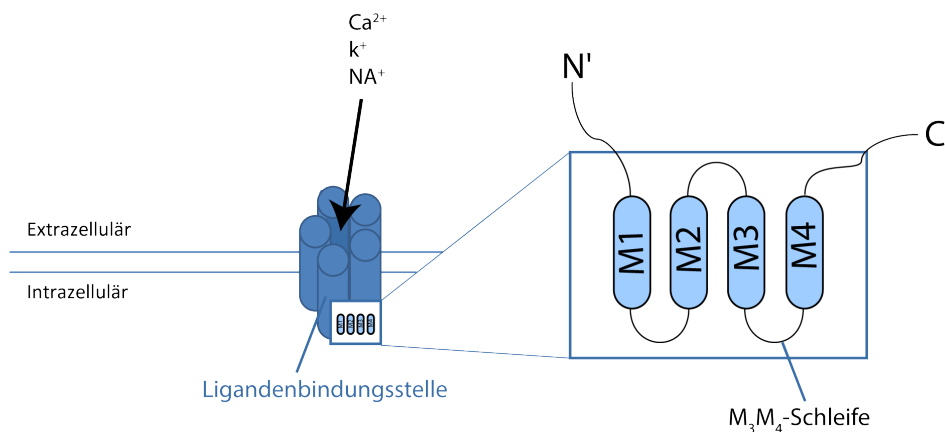


Abbildung 3: Schematischer Aufbau des monozytären nikotinischen Acetylcholinrezeptors (nAChR)

Der nAChR besteht aus einem Komplex aus fünf Untereinheiten, die sich um eine zentrale Kationen-leitende Pore organisieren.

Jede Untereinheit ist wiederum aus vier Blöcken zusammengesetzt, die über Schleifen miteinander verbunden sind.

Die Ligandenbindungsdomänen liegen in den Bereichen, in denen die Untereinheiten aneinander angrenzen.

Quelle: R.Ogiemwonyi-Schaefer

Nach dem exprimierenden Zelltyp unterteilt man die nAChRs in muskuläre und neuronale Subtypen. Die muskulären Subtypen bestehen aus vier verschiedenen Untereinheiten, die den pentameren Komplex bilden: $(\alpha 1)_2/\beta 1/\delta/\gamma$. Neuronale nAChRs werden sowohl von Neuronen als auch von nicht-neuronalen Zellen wie beispielsweise Monozyten exprimiert. Diese Rezeptoren bestehen aus α ($\alpha 2$ – $\alpha 7$, $\alpha 9$, $\alpha 10$)- und β ($\beta 2$ – $\beta 4$)-Untereinheiten [27]. In dieser Arbeit spielen vor allem die Funktionen der $\alpha 7$ -, $\alpha 9$ - und $\alpha 10$ -Untereinheiten in Monozyten eine wesentliche Rolle.

1.3.1.2. Liganden des nAChR und ausgelöste Reaktionswege

Klassischerweise löst die Bindung von ACh oder Nikotin an nAChRs einen Ionenstrom durch die Zellmembran aus. Neben dieser ionotropen Wirkung von nAChRs konnte eine metabotrope Wirkung beschrieben werden. In den Versuchen von Hecker *et al.* war nach Applikation von Nikotin zu Monozyten kein Ionenstrom messbar. Sie schlussfolgerten, dass im Gegensatz zu neuronalen nAChRs die nAChRs auf Monozyten keine klassischen Ionenkanäle bilden [39, 85]. Kabbani *et al.* zeigten, dass sich in den Verbindungslinien (M3-4 Loops) ein GPBC (*G protein-binding cluster*) befindet. Mithilfe dieses GPBC können nAChRs G-Proteine binden [44]. King *et al.* zeigten, dass über die Kopplung von nAChR mit einem G-Protein (Gi, Gq, Gs) über diese Sequenz intrazellulär eine Reaktionskaskade in Gang gesetzt werden konnte [50]. Ein weiterer Reaktionsweg nach Aktivierung von $\alpha 7$ -nAChR in Monozyten ist die G-Protein-unabhängige JAK2/STAT3-Aktivierung (*Janus kinase 2/signal transducer and activator of transcription 3*), welche die Translokation von NF κ B in den Zellkern blockiert und damit zur NF κ B-Inhibition führen kann [16].

Dadurch, dass ACh eine ionotrope Reaktion an nAChRs auslösen kann, wird bei ACh von einem kanonischen nAChR-Agonisten gesprochen. Das zuvor erwähnte PC zählt zu den nicht-kanonischen nAChR-Agonisten. Diese cholinerge Substanz kann zwar metabotrop an Rezeptoren wirken, induziert jedoch keine ionotrope Wirkung. Dasselbe gilt für die Rezeptoragonisten Dipalmitoylphosphatidylcholin (DPPC) und Glycerophosphocholin (GPC) [5, 103] (Abbildung 4).

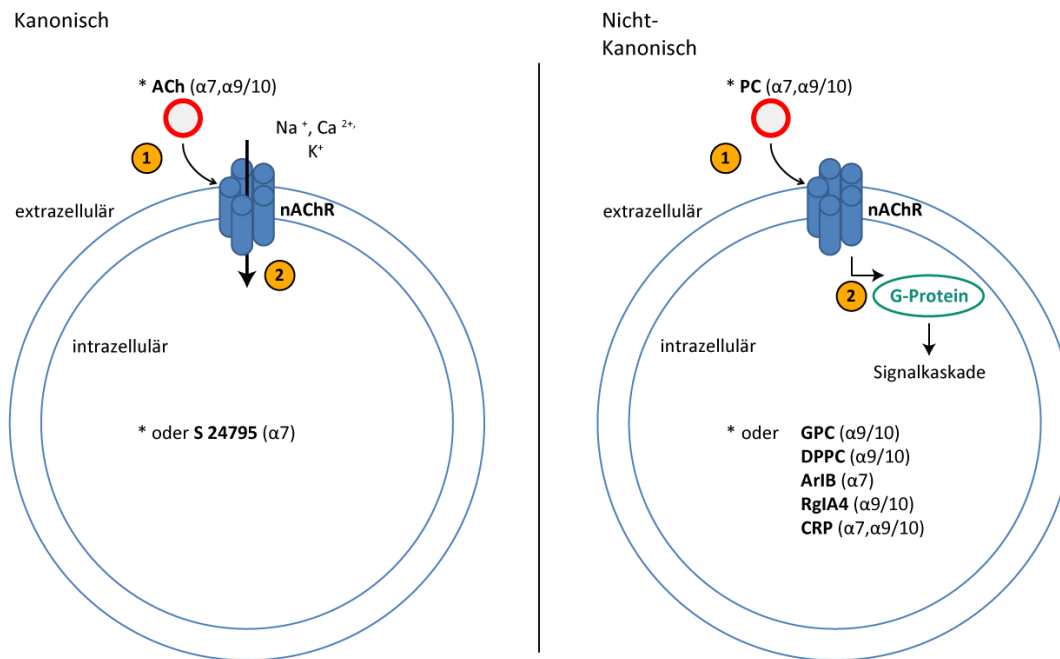


Abbildung 4: Kanonische und nicht-kanonische Acetylcholinrezeptoren (nAChR)

Man unterscheidet eine kanonische und nicht-kanonische Wirkung der nAChRs. Nach Aktivierung kanonischer nAChRs wird ein Ionenstrom in die Zelle induziert. Nicht-kanonische nAChRs sind an G-Proteine gekoppelt, sodass nach Aktivierung eine intrazelluläre Signalkaskade in Gang gesetzt wird.

Quelle: R.Ogiemwonyi-Schaefer

Während ACh und PC ihre Wirkung über alle drei Untereinheiten entfalten können, wirken DPPC und GPC $\alpha 7$ -unabhängig [5, 38, 103]. Zur Untersuchung, über welche Rezeptoruntereinheiten die Substanzen GPC und DPPC ihre Wirkungen entfalten, wurden in den Versuchen von Zakrzewicz *et al.* die Conopeptide [V11L;V16D]ArIB (ArIB) und RgIA4 verwendet. Diese Substanzen sind artifizielle $\alpha 7$ (ArIB)- und $\alpha 9/10$ (RgIA4)-Antagonisten [31]. Nach Gabe von GPC und DPPC konnte die BzATP-induzierte IL-1 β -Freisetzung inhibiert werden. Während die Gabe von RgIA4 die Wirkung von GPC und DPPC antagonisieren konnte, hatte ArIB keinen relevanten Effekt. GPC und DPPC entfalten ihre Wirkungen über die Bindung an $\alpha 9$ -/ $\alpha 10$ -Rezeptoruntereinheiten [5, 103].

Erst kürzlich wurde die Substanz 2-[2-(4-bromophenyl)-2-oxoethyl]-1-methylpyridinium (S 24795) in der Literatur als partieller Agonist an der $\alpha 7$ -Untereinheit des nAChR beschrieben [56]. Diese Substanz wurde ursprünglich als Alzheimermedikament entwickelt, da es in Studien eine Verbesserung neurokognitiver Defizite in Mäusen bewirkte. Lopez-Hernandez *et al.* untersuchten die Wirkungen von ACh und S 24795 an nAChRs. Sie zeigten, dass die Substanz S 24795 ähnlich wie ACh ebenfalls einen Strom an $\alpha 7$ -

nAChRs induzieren konnte. Die Wirkung erfolgte über die $\alpha 7$ -Untereinheit, da nach Gabe von Methyllycaconitin (MLA), einem $\alpha 7$ -spezifischen Rezeptorantagonist, der zuvor gemessene Strom sistierte. Da der durch S 24795 erzeugte Strom nur etwa 10% des ACh-induzierten Stroms betrug, beschrieben sie die Substanz als partiellen $\alpha 7$ -Agonist. Gleichzeitig zeigten sie, dass bei gemeinsamer Applikation von S 24795 und ACh, S 24795 die Amplitudenhöhe des von ACh ausgelösten Stroms senkte, ganz im Sinne eines partiellen Agonisten. Diese Beobachtungen führten Lopez-Hernandez *et al.* dazu, die Substanz als Neuromodulator zu beschreiben [56].

1.3.2. CRP inhibiert die ATP-abhängige IL-1 β -Freisetzung

Das C-Reaktive Protein (CRP) ist ein Akute-Phase-Protein, welches im klinischen Alltag als nichtspezifischer Entzündungsparameter fungiert. Die Synthese, welche vor allem in der Leber nach IL-6-Induktion stattfindet, wird bei Gewebeschäden, Infektionen, Entzündungen und neoplastischen Erkrankungen hochreguliert [58, 74]. Humanes CRP bindet mit hoher Affinität an Phosphocholinreste [91]. Es besitzt die Fähigkeit zu aggregieren und präzipitieren sowie körperfremde und körpereigene Bestandteile wie beispielsweise Lipoproteine und zerstörte Zellmembranen zu binden [28]. Nach Ligandenbindung kann CRP das Komplementsystem über den „klassischen Weg“ aktivieren [66]. Die biologischen Funktionen dieses Proteins werden kontrovers diskutiert, da bisher *in vivo* und *in vitro* gezeigt werden konnte, dass CRP sowohl proinflammatorische als auch antiinflammatorische Wirkungen hat. Einerseits kann CRP als Bestandteil des Komplementsystems mit Phagozyten interagieren und zur Ausschüttung von IL-1 β , IL-6 und TNF- α führen [6]. Andererseits führt CRP zur starken Konzentrationszunahme von antiinflammatorisch wirkendem IL-Ra [92]. Darüber hinaus haben hohe CRP-Konzentrationen *in vitro* eine inhibierende Wirkung auf die Chemotaxis von neutrophilen Granulozyten [105]. Richter *et al.* erkannten 2018, dass endogenes CRP (eCRP) die ATP-induzierte IL-1 β -Freisetzung von monozytären Zellen inhibiert. In dieser endogenen Form ist CRP bereits mit PC beladen [78]. Es zeigte sich, dass CRP nur im Zusammenspiel mit PC, die IL-1 β -Ausschüttung inhibieren konnte. Zum Vergleich diente humanes CRP (rhCRP), welches keine PC-Gruppen enthält. Erst in Kombination mit PC konnte rhCRP eine Senkung der IL-1 β -Konzentration bewirken. Die Rezeptorbindung von PC-gebundenem CRP – und damit der inhibitorische Effekt auf die IL-1 β -Ausschüttung – erfolgte an metabotropen nAChRs. An konventionellen $\alpha 7$ -, $\alpha 9$ - und $\alpha 10$ -nAChRs konnte CRP keinen Strom induzieren. Damit zählt eCRP zu den nicht-

kanonischen nAChR-Agonisten [78]. Auch zeigten Richter *et al.*, dass eCRP mit kanonischen nAChRs interagieren und den durch Cholin induzierten Strom an $\alpha 9/\alpha 10$ -nAChRs reduzieren kann. Aufgrund dieser Beobachtung beschrieben sie eCRP als einen stillen Agonisten, welcher zwar selbst keine kanonische Wirkung auslösen kann, aber die Wirkung von kanonischen Agonisten moduliert. Anhand dieser Ergebnisse postulierten Richter *et al.* eine negative Feedback-Rolle von eCRP: Im Verlauf einer Immunreaktion wird CRP ausgeschüttet, welches nach Bindung von PC, die ATP-induzierte IL-1 β -Freisetzung aus Monozyten inhibiert und die Immunreaktion damit herunterreguliert [78].

1.4. A β -Peptide

1.4.1. APP und die Bildung von A β -Peptiden

Amyloid-Peptide sind Spaltprodukte des größeren Vorläuferproteins *Amyloid precursor protein* (APP) [19] und sind in der Literatur vor allem wegen ihrer Assoziation mit der AD bekannt. Es existieren viele verschiedene Amyloid-Peptide unterschiedlicher Längen [68]. Für diese Arbeit ist das Peptid A β (1-42) von zentraler Bedeutung.

APP ist ein Transmembranprotein, dessen biologische Funktion nicht gänzlich geklärt ist. Vermutlich ist es an neuronalem Wachstum, Synapsenbildung, axonalem Proteintransport, Signaltransduktion, Zelladhäsion und Calcium-Metabolismus beteiligt. Da APP proteolytisch gespalten wird und die Spaltprodukte selbst aktive Metaboliten sind, fällt die Gesamtaktivität von APP deutlich vielfältiger aus [19].

APP kann als Zielstruktur verschiedener Enzyme dienen, welche enzymatische Spaltungen an unterschiedlichen Stellen im Molekül vornehmen. Dabei spielt die Gruppe der Sekretasen eine entscheidende Rolle. Die α -Sekretase spaltet APP an der extrazellulären Domäne; es entsteht als Produkt das lösliche APP α (sAPP α , *soluble APP*). Nach Spaltung verbleibt als Rest das α -C-terminal fragment (α CTF) intramembranär [104]. sAPP α reguliert die neuronale Stammzellregeneration und spielt eine wichtige Rolle in der Frühentwicklung des ZNS [10, 72].

Zur Entstehung von A β aus APP werden zwei enzymatische Spaltungen benötigt: Nach Spaltung von APP durch das Enzym β -Sekretase entsteht das lösliche APP β (sAPP β). Auch hier verbleibt nach Spaltung ein intramembranärer Rest, das β -C-terminal fragment (CTF β). Dieser Rest wird anschließend von der γ -Sekretase gespalten und es entsteht A β (Abbildung 5). Die Spaltung durch die γ -Sekretase erfolgt jedoch etwas unprä-

zise, sodass das C-terminale Ende der A β -Moleküle heterogen beschaffen ist [104]. Die beiden häufigsten A β -Moleküle enden an Position 40 (A β (1-40), ca. 80-90%) und 42 (A β (1-42), ca. 5-10%). Die länger gearteten Moleküle, insbesondere A β (1-42), sind hydrophober, fibrillogener und zudem auch die am häufigsten im Gehirn gefundenen Formen [68].

Die A β -Bildung kann nicht nur in Zellen des ZNS, sondern in fast allen Körperzellen stattfinden, da die bedeutendste β -Sekretase BACE (*β -site of APP cleaving enzyme*) sowie das Vorläuferprotein APP von fast allen Zellen exprimiert werden und biologisch hochkonservierte Moleküle sind [94].

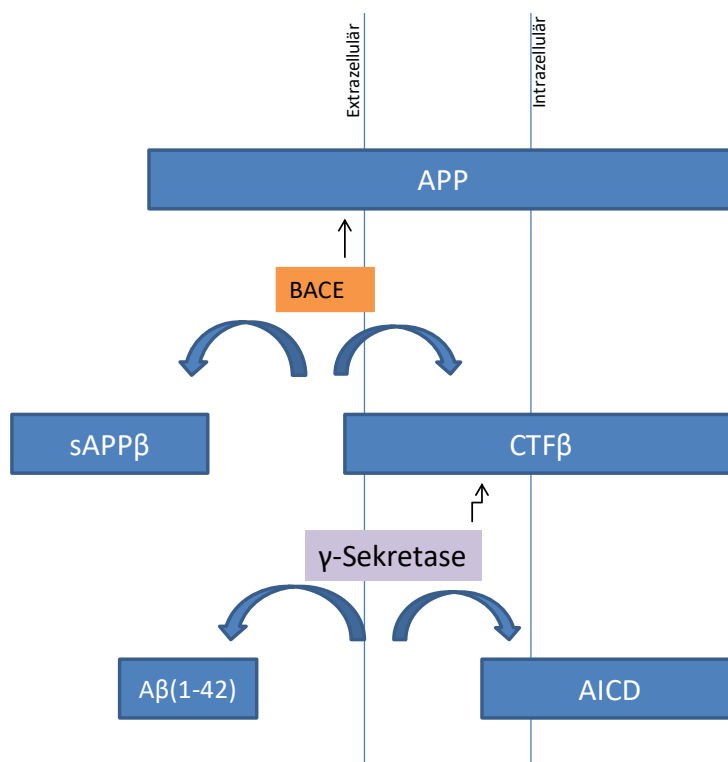


Abbildung 5: Schematische Darstellung der Amyloid- β -(1-42)-Bildung

Zur Entstehung von Amyloid- β (A β) aus dem *amyloid precursor protein* (APP) werden zwei aufeinander folgende enzymatische Spaltungen benötigt: Zunächst erfolgt die Spaltung von APP durch das Enzym β -Sekretase (BACE). Dadurch entsteht das lösliche APP β (sAPP β). Nach der Spaltung verbleibt ein intramembranärer Rest, das *β -C-terminal fragment* (CTF β). Dieser Rest wird anschließend durch die γ -Sekretase gespalten und es entsteht A β (1-42) und die *APP intracellular domain* (AICD).

Quelle: R.Ogiemwonyi-Schaefer

1.4.2. Einfluss von A β (1-42) auf Immunzellen

Bezogen auf die AD hat die Neuroinflammation in den letzten Jahren verstärkt an Aufmerksamkeit gewonnen [97]. Einige Subtypen der bereits oben erwähnten Inflammasome sind im ZNS nachgewiesen worden, wie beispielsweise die NLRP1-, NLRP3- und NLRC4-Inflammasome. Diese Inflammasome sind in den Immunzellen des ZNS, den Mikrogliazellen und den Makrophagen, zu finden [96]. Das ZNS reagiert besonders sensibel auf IL-1 β und IL-18. Multiple neuronale Zelllinien besitzen Rezeptoren für diese proinflammatorischen Zytokine [1].

Das erste mit einer neurodegenerativen Erkrankung assoziierte Molekül, welches mit der Inflammasomaktivierung in Verbindung gebracht wurde, war A β (1-42). Halle *et al.* zeigten 2008, dass die Kombination von LPS-vorbehandelten Makrophagen mit fibrillärem A β (1-42) über eine Caspase-1-Aktivierung zu einer IL-1 β -Ausschüttung führte. Diese Immunantwort war NLRP3-abhängig [33]. Voraussetzung für die Inflammasomaktivierung war, dass die fibrillären A β -Peptide von den Mikrogliazellen phagozytiert wurden. Auffällig war, dass sich die Lysosomen dieser Zellen nach Phagozytose morphologisch stark veränderten; einerseits nahmen sie an Volumen zu, andererseits veränderte sich der pH-Wert in diesen Kompartimenten. Die Zerstörung der Lysosomen nach A β -Internalisierung führte zur Freisetzung des lysosomalen Inhalts ins Zytoplasma. Diese freigesetzten Substanzen könnten dann über die Inflammasomaktivierung zur IL-1 β -Freisetzung führen. Für die Theorie spricht, dass die IL-1 β -Freisetzung über die Caspase-1-Aktivierung vom lysosomalen Protein Cathepsin-B abhängig ist [33].

Diese Versuche von Halle *et al.* zeigten, dass fibrilläres A β (1-42) als zweites Signal die IL-1 β -Ausschüttung in LPS-vorstimulierten monozytären Zellen induzieren kann. Weiterhin unklar bleibt jedoch, wie A β (1-42) in die Zellen gelangt. Eine mögliche Erklärung hierfür lieferten Fassbender *et al.*, in dem sie zeigten, dass A β (1-42) über eine Interaktion mit dem monozytären Oberflächenmolekül CD 14 (*cluster of differentiation* 14) von Monozyten phagozytiert wird und so in die Zellen gelangt [24].

1.4.3. Zirkulieren bestimmte A β -Moleküle auch im Blut?

In der Alzheimerforschung sind bereits mehrfach Versuche unternommen worden, anhand von Plasmaveränderungen zwischen gesunden Patienten, Patienten mit milder Kognitionsstörung und Patienten mit AD zu unterscheiden. Ein spezifischer Biomarker konnte bisher nicht beschrieben werden. Jedoch sind diverse Immunmediatoren wie beispielsweise IL-6, TNF- α , IL-1 β und IL-18 im Plasma von Patienten mit AD erhöht

[76]. Eine mögliche Ursache für diese erhöhten Konzentrationen proinflammatorischer Zytokine könnten höhere Konzentrationen von A β -Peptiden im Plasma der Betroffenen sein [43].

Erste Hinweise lieferten Wolfe *et al.* [101]. Sie untersuchten, welchen Effekt die Zugabe von Plasma von Patienten mit milder Kognitionsstörung und von Patienten mit AD zu THP-1-Zellen, einer monozytären Zelllinie, hatte. Die Versuche zeigten, dass nur Plasma von AD-Patienten eine Erhöhung inflammatorischer Zytokine, wie beispielsweise TNF- α , bewirkte [101]. In weiteren murinen Versuchen konnte gezeigt werden, dass im Plasma von APP/PS1-Mäusen die Konzentrationen von IL-1 β und TNF- α im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen erhöht waren. Gleichzeitig waren in diesen Mäusen auch die Konzentrationen von A β (1-40) und A β (1-42) erhöht. Sie schlussfolgerten, dass die A β -Peptide für die Erhöhung der inflammatorischen Zytokine verantwortlich sein könnten [101].

Sondag *et al.* zeigten, dass APP selbst eine immunmodulierende Wirkung haben kann. In ihrer Arbeit konnte APP als Membranrezeptor tyrosinkinase-abhängig eine Signalkaskade in Gang setzen, die in der Bildung von Cyclooxygenase-2 (COX-2) und IL-1 β endete [87].

1.4.4. Gewisse A β -Peptide beeinflussen die cholinerge Transmission in Neuronen

Im ZNS scheint A β (1-42) seinen degenerativen Effekt über die cholinerge Achse in Neuronen auszuüben. Mehrere Studien zeigten, dass die cholinerge Neurotransmission auf verschiedenen Ebenen beeinflusst werden kann. Verschiedene A β -Peptide können beispielsweise die ACh-Synthese und -Freisetzung inhibieren, die Signaltransduktion über muskarinerge Rezeptoren beeinträchtigen und mit nAChRs interagieren [80]. Es konnte gezeigt werden, dass die A β -Fragmente A β (1-42), A β (1-40), A β (1-28) und A β (25-35) die ACh-Freisetzung in Neuronen in gleicher Weise inhibieren. Diese Beobachtung deutete darauf hin, dass diese inhibitorische Aktivität innerhalb der Sequenz A β (25-28) liegen muss [46]. Der inhibitorische Einfluss von A β (1-40) und A β (1-42) wird über eine nicht-kompetitive Bindung an der α 7-Untereinheit des nAChR vermittelt [55].

Für diese Arbeit von zentraler Bedeutung ist die Tatsache, dass A β (1-42) nicht nur im ZNS wirkt, sondern auch mit monozytären Zellen interagieren kann. Erste Hinweise hierfür wurden bereits 1996 durch Lorton *et al.* geliefert. Es wurde gezeigt, dass die

Amyloidpeptide A β (25-35), A β (1-40) und A β (1-42) eine IL-1 β -Freisetzung aus THP-1-Zellen bewirken können [57]. Nach Applikation dieser Peptide zu LPS-vorstimulierten THP-1-Zellen zeigte sich eine dosisabhängige IL-1 β -Freisetzung. Während für die IL-1 β -Freisetzung fibrilläres A β (1-40) benötigt wurde, waren vor allem A β (25-35) und A β (1-42) auch in nicht-fibrillärer Form in der Lage, die IL-1 β -Freisetzung zu induzieren [57].

Basierend auf der bereits bestätigten Interaktion von A β (1-42) mit nAChRs in Neuronen sowie der durch Lorton *et al.* gezeigten Wirkung dieses Peptids auf IL-1 β -Freisetzung in Monozyten, wird in dieser Arbeit die Wirkung von A β (1-42) auf nAChRs monozytärer Zellen untersucht.

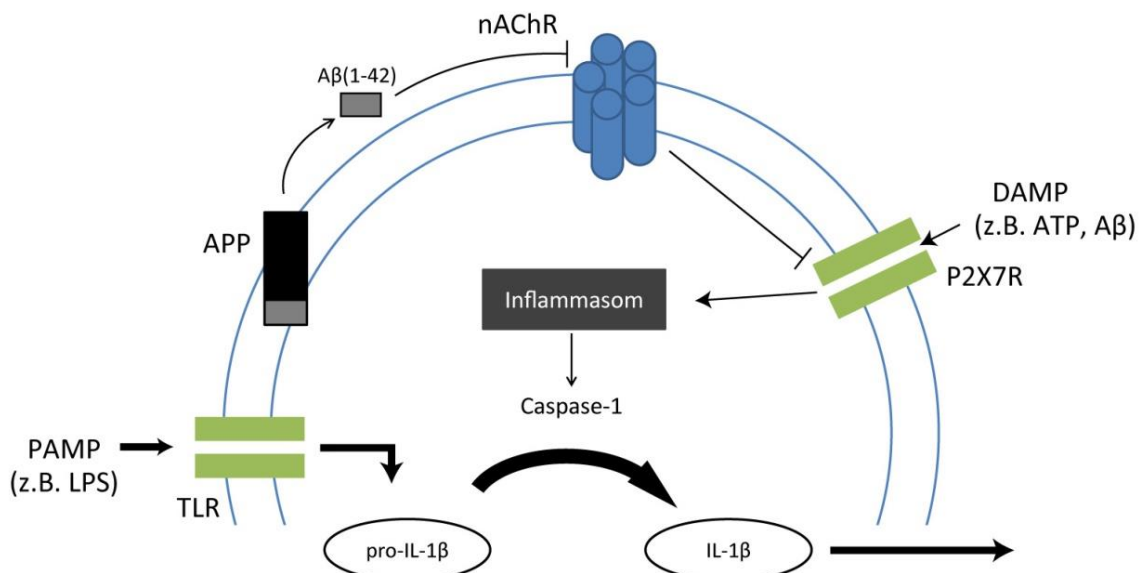


Abbildung 6: Schematische Darstellung der Interleukin-1 β -Produktion

Zur Freisetzung von Interleukin-1 β (IL-1 β) werden zwei Signale benötigt. Das erste Signal Lipopolysaccharid (LPS) induziert die Produktion von pro-IL-1 β . Das zweite Signal ist die Aktivierung des P2X7-Rezeptors durch extrazelluläres Adenosintriphosphat (ATP). Dies bewirkt eine Zusammensetzung und Aktivierung des NLRP3-(*NOD*-, *LRR*- and *pyrin domain-containing protein 3*)-Inflammasoms. NLRP3 aktiviert die Caspase-1, die wiederum pro-IL-1 β in die aktive Form spaltet. IL-1 β wird dann freigesetzt.

Die Liganden von nikotinischen Acetylcholinrezeptoren (nAChRs) (Acetylcholin, Phosphocholin, C-reaktives Protein) inhibieren die ATP-induzierte IL-1 β -Freisetzung.

Amyloid- β (1-42) kann nach Spaltung aus dem Vorläufermolekül *amyloid precursor protein* (APP) die Funktion der nAChR beeinträchtigen [55].

Quelle: R.Ogiemwonyi-Schaefer

2. Zielsetzung der Arbeit

IL-1 β ist aufgrund seiner potenten proinflammatorischen Wirkung ein wichtiges Zytokin in der Entstehung systemischer Entzündungsreaktionen, für dessen Bildung zwei Signale benötigt werden: Das erste Signal stellt die PAMP-Erkennung durch den TLR-4 auf monozytären Zellen dar, während das zweite Signal beispielsweise extrazelluläres ATP sein kann, welches die Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms und somit die Freisetzung von reifem IL-1 β induzieren kann [45].

Liu *et al.* konnten zeigen, dass A β (1-42), welches aufgrund seiner proinflammatorischen Wirkung in der AD bekannt ist, im ZNS mit nAChRs interagieren kann. A β (1-42) scheint zudem auch mit monozytären Zellen interagieren zu können [57].

Um den Einfluss von A β (1-42) auf die inhibitorische Wirkung der Cholinergika auf die ATP-Ausschüttung in Monozyten zu untersuchen, wurden in der vorliegenden Arbeit LPS-stimulierte monozytäre Zellen mit dem P2X7R-Agonist BzATP und cholinergen Agonisten, CRP und A β (1-42) behandelt. Zur Quantifizierung der Zytokinausschüttung wurde die IL-1 β -Konzentrationen in den Überständen mittels ELISA bestimmt.

In dieser Dissertation soll folgende Hypothese überprüft werden:

A β (1-42) moduliert die cholinerge Inhibition der BzATP-vermittelten NLRP3-Aktivierung und damit die IL-1 β -Freisetzung aus Monozyten.

Würde sich diese Hypothese bestätigen, hätte man durch diese Arbeit wichtige neue Erkenntnisse zur Rolle von A β (1-42) im Immunsystem gewonnen. Dieses Wissen wäre von großer Bedeutung zur weiteren Erforschung neuer therapeutischer Ansätze in der Behandlung von systemischer Inflammation.

3. Material und Methoden

3.1. Reagenzien

Tabelle 1: Substanzen und deren Hersteller

Substanz	Hersteller
Acetylcholin (ACh)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Aqua destillata	B. Braun, Melsungen, Deutschland
[V11L;V16D]ArIB	J. Michael McIntosh, Salt Lake City, UT, USA
2'(3')-O-(4-Benzoylbenzoyl)Adenosin 5'Triphosphat-Triethylammonium-Salz, Benzoylbenzoyl-Adenosintriphosphat (BzATP)	Jena Bioscience, Jena, Deutschland
Amyloid- β (A β (1-42))	Merck, Darmstadt, Deutschland
C-reaktives Protein (CRP)	Merck, Darmstadt, Deutschland
1,2-Dipalmitoyl-sn-Glycero-3Phosphatidylcholin, Dipalmitoylphosphatidylcholin (DPPC)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Human Pro-IL-1 beta/IL-1F2 Quantikine ELISA Kit	Bio-Techne/ R+D Systems, Minneapolis, MN, USA
Fetales Kälberserum (FCS)	PAA, Cölbe, Deutschland
Glycerophosphocholin (GPC)	Merck, Darmstadt, Deutschland
L-Glutaminlösung 200 mM	PAA, Cölbe, Deutschland
Lipopolysaccharid (LPS), <i>Escherichia coli</i> 026:B6	Sigma-Aldrich, Taufkirchen Deutschland
Nikotin-Hydrogentartratsalz	Merck, Darmstadt, Deutschland
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)	PAA, Cölbe, Deutschland
Phosphatidylcholin (PC)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Reverses Amyloid- β	Merck, Darmstadt, Deutschland
RgIA4	J. Michael McIntosh, Salt Lake City, UT, USA
RPMI 1640	PAA, Cölbe, Deutschland

2-(2-(4-bromophenyl)-2-oxoethyl)-1-methyl pyridinium (S 24795)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Trypanblau-Lösung	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Türks-Lösung	Merck, Darmstadt, Deutschland
U937-Zelllinie	Leibniz-Institut DSZM - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig, Deutschland
Venticute®	Nycomed, Konstanz, Deutschland

3.2. Verbrauchsmaterialien

Tabelle 2: Materialien und deren Hersteller

Material	Hersteller
Bluecap BD-Gefäß Polypropylengefäße 50 ml	BD Bioscience, San Jose, CA, USA,
Leucosep®	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
EDTA	bioWORLD, Dublin, OH, USA
Mikroreaktionsgefäß 1,5 ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Pipetten Eppendorf Reference 0,5-10 µl/ 10-100 µl/ 100-1000 µl	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Pipetten Cellstar 10 ml	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland,
Pipettenspitzen Steril 10 µl/ 100 µl/ 1000 µl Unsteril 10 µl/ 200 µl/ 1000 µl	Biozym, Hessisch Oldendorf, Deutschland Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Zellkulturflaschen 75 cm ²	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Zellkulturplatten 24-well	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland

3.3. Geräte und Software

Tabelle 3: Geräte / Software und deren Hersteller

Gerät	Hersteller
Brutschrank Heracell 420i CO2-Inkubator	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Fluostar Optima®	BMG Labtech, Offenburg, Deutschland
Mikroskop Labovort	Leitz, Wetzlar, Deutschland
CytoTox96 nonradioactive cytotoxicity assay	Promega, Madison, WI, USA
Sicherheitswerkbank Zellkultur Class II ENA 2	Nuair, Plymouth, MN, USA
Ultraschallbad Sonorex Super RK102H	Bandelin, Berlin, Deutschland
Vortex Mixer REAX 2000	Heidolph, Schwabach, Deutschland
Wasserbad	Köttermann, Uetze/Hänigsen, Deutschland
Zählkammer Neubauer Tiefe: 0,1 mm 0,0025 mm ²	Laboroptik, Friedrichsdorf, Deutschland
Zentrifuge Rotina 420R	Hettich, Tuttlingen, Deutschland
IBM SPSS Statistics 23 und 27 SPSS	IBM, München, Deutschland
Mircosoft Word und Excel	Microsoft, Redmond, WA, USA

3.4. Versuche mit U937-Zellen

3.4.1. Zellkulturen

In den Versuchen wurden U937-Zellen verwendet. Dabei handelt es sich um Zellen einer monozytären Zelllinie, isoliert aus einem histiozytären Lymphom eines 37 jährigen Patienten [88]. Diese Zellen entstammen myeloiden Vorläuferzellen und sezernieren eine Reihe von Chemokinen und Zytokinen, u.a. IL-1 β . Sie wurden vom Leibniz-Institut DSZM – Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig – bezogen. Die U937-Zellen wurden bei 37°C und 5% CO₂ in einem

RPMI1640-Medium mit 10% fetalem Kälberserum und 2 mM L-Glutamin gezüchtet. Nach Aussähen in einer 24-Well-Platte (10^6 Zellen/ml) wurden die Zellen für 5 h mit 1 $\mu\text{g/ml}$ LPS inkubiert. Anschließend wurden sie mit dem P2X7R-Agonist BzATP (100 μM) für 30 Minuten in An- oder Abwesenheit von A β (1-42), A β (42-1) beziehungsweise Agonisten der nAChR stimuliert. Das Isomer A β (42-1) diente als Kontrolle, um zu demonstrieren, dass nur A β (1-42) eine zelluläre Wirkung entfaltetete. Nach den Versuchen wurde der zellfreie Überstand nach vorheriger Zentrifugation abgenommen und bei -20°C gelagert.

3.4.2. Versuchsaufbau

Die Arbeiten mit den Zellen erforderten sterile Verhältnisse und fanden in einer Sicherheitswerkbank der Klasse II statt.

Nach Entnahme der Zellen aus dem Brutschrank, wurden diese für 10 Minuten bei 500 g zentrifugiert. Danach wurden die Zellpellets in 10 ml frisches Medium aufgenommen und resuspendiert. Anschließend wurde dieser Suspension 10 μl Flüssigkeit entnommen und zu 90 μl Trypanblau beigegeben. Daraufhin wurde die Suspension in einer Neubauer-Zählkammer gezählt.

Alle verwendeten Substanzen wurden vor Einsatz in einer phosphatgepufferten Salzlösung (PBS) gelöst. Diese setzte sich folgendermaßen zusammen: 1 L vollentsalztes (VE) Wasser mit 80 g NaCl (1,37 M), 2 g KCl (27 mM), 2 g KH_2PO_4 (15 mM) und 14,24 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ (80 mM). Sie wurde 1:10 mit VE-Wasser verdünnt und auf pH 7,2 eingestellt.

Die lipidhaltigen Substanzen (LPS, A β (1-42), A β (42-1)) wurden vor den Versuchen für 3 Minuten bei 37°C in einem Ultraschallbad beschallt.

1 ml U937-Zellen (1×10^6 Zellen) wurden zunächst mit 1 μl LPS (1 $\mu\text{g/ml}$) behandelt. Danach wurden sie im Brutschrank für 5 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit 100 μM BzATP stimuliert und dann für weitere 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Dies geschah je nach Versuchsreihe in An- oder Abwesenheit von nikotinischen Rezeptorantagonisten und (partiellen) -agonisten sowie A β (1-42) (Abbildung 7).

Als nikotinische Rezeptoragonisten wurden GPC, DPPC, PC, ACh und CRP eingesetzt. Als partieller Agonist wurde S 24795 verwendet. Die Conopeptide RgIa und ArIB dienten als nikotinische Rezeptorantagonisten.

Die Dosierungen der eingesetzten Substanzen sind in Tabelle 4 aufgeführt.

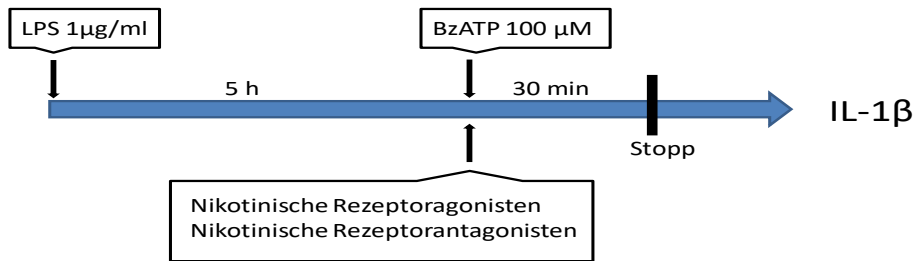


Abbildung 7: Zeitleiste der U937-Versuche

Chronologie bis zum Zeitpunkt der Überstandsentnahme zur Messung der Interleukin-(IL)-1 β - und der Laktatdehydrogenase-(LDH)-Konzentration.

Quelle: R.Ogiemwonyi-Schaefer

Tabelle 4: Substanzen der unterschiedlichen Versuchsansätze und ihre Konzentrationen

Substanz	Konzentration in der Zellsuspension
Lipopolysaccharid	1 $\mu\text{g/ml}$
Benzoylbenzoyl-Adenosintriphosphat (BzATP)	100 μM
Nikotinerge Rezeptoragonisten <ul style="list-style-type: none"> • GPC • DPPC • ACh • PC 	1 μM , 10 μM 10 μM , 100 μM 7,5 μM , 10 μM 10 μM , 100 μM
Partielle nikotinische Rezeptoragonisten <ul style="list-style-type: none"> • 2-(2-(4-bromophenyl)-2-oxoethyl)-1-methyl pyridinium (S 24795) 	1 μM , 5 μM , 10 μM , 50 μM , 100 μM 10 μM
CRP	5 $\mu\text{g/ml}$
Amyloide Substanzen <ul style="list-style-type: none"> • Aβ(1-42) • Reverse β-Amyloid(42-1) 	0,5 μM , 1 μM , 2 μM , 5 μM , 10 μM 1 μM , 5 μM , 10 μM
Conopeptide (nAChR-Antagonisten) <ul style="list-style-type: none"> • RgIa (α7-spezifisch) • ArIB (α9-spezifisch) 	50 nM 500 nM

Um den Zellüberstand zu gewinnen, wurden die Zellsuspensionslösungen in den einzelnen Wells in Mikroreaktionsgefäße überführt. Anschließend wurden diese für 8 Minuten bei 500 g und 4°C zentrifugiert. Danach wurden 700 µl an Überstand aus den Mikroreaktionsgefäßen entnommen und bei -20°C eingefroren.

Zu einem späteren Zeitpunkt wurde die Konzentration an ausgeschüttetem IL-1β mittels ELISA gemessen. Die Laktatdehydrogenasekonzentration (LDH) wurde mittels Cytotox96 nonradioactive cytotoxicity assay ermittelt.

3.5. Versuche mit PBMCs

Die Experimente sind von der Ethikkommission der Justus-Liebig-Universität Gießen genehmigt worden (Nr. 90/18) und nach den Grundsätzen der Helsinki-Deklaration durchgeführt. Jeder Studienteilnehmer hat eine schriftliche Einwilligungserklärung abgegeben. Gesunden, nichtrauchenden erwachsenen Probanden wurde Blut in sterilen Spritzen, die 1 mM EDTA pro ml Blut enthielten, abgenommen. Aus dem Blut der Probanden wurden die peripheren mononukleären Zellen (*peripheral mononuclear cells*, PBMCs) mittels Leucosep™-Röhrchen (Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland) isoliert.

Vor der Dichtezentrifugation wurde den Blutproben LPS (5 ng/ml) zugefügt. Anschließend wurden 1 x 10⁶ Zellen in 1 ml eines Monozyten-Adhäsionsmedium (PromoCell, Heidelberg, Deutschland) pro Well in einer 24-well Platte ausgesät und für 3 h im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Nach dieser Inkubationszeit wurden nichtadhärente Zellen entfernt und das Medium durch RPMI 1640 Medium (Sigma-Aldrich R8758) ersetzt. Die im Anschluss folgende Versuchsprozedur bis zur IL-1β- und LDH-Messung erfolgte analog zu derjenigen der U937-Versuchen.

3.6. Messverfahren

3.6.1. ELISA

Die IL-1β-Konzentration im zellfreien Überstand wurde mithilfe eines *Human IL-1β/IL-1F2 DuoSet® enzyme-linked Immunosorbent Assays* (ELISA) nach Herstellerspezifikationen von R&D Systems (Minneapolis, MN, USA; Sensitivität: bei weniger als 1 pg/ml human IL-1β) gemessen.

Verwendet wurden 700 µl des Überstands in den Mikroreaktionsgefäßen. Das nachzuweisende Antigen IL-1β wurde in Wells einer Mikrotiterplatte von Erstan-

tikörpern gebunden. Im Reaktionsverlauf wurde ein chromogenes Substrat hinzugegeben, welches sich nach Bindung in ein gelbes Produkt umwandelte.

Sobald gute Farbkontraste sichtbar waren, wurde die Reaktion abgebrochen.

Die Färbung war proportional zur gebundenen Menge an IL-1 β und wurde im Fluostar Optima (BMG Labtech, Offenburg, Deutschland) bei einer Wellenlänge von 450 nm quantifiziert. Die Extinktion der zu bestimmenden Proben wurde mit einer Standardkurve, erstellt mit rekombinant-hergestelltem IL-1 β , verglichen. Mittels *Reader control software* und *MARS Data Analysis software* (BMG Labtech, Offenburg, Deutschland) wurde so auf die IL-1 β -Konzentration in den Überständen rückgeschlossen.

3.6.2. LDH-Messung

Die LDH ist ein Enzym, welches sich im Zytosol der Zellen befindet und bei Zelllyse freigesetzt wird [52]. Die Anzahl der zerstörten Zellen während des Gesamtversuchs wurde anhand der gemessenen Konzentrationen der freigesetzten LDH im Überstand ermittelt. Als Referenz für die maximale LDH-Freisetzung wurden über den gesamten Versuch in einem Well 1 x 10⁶ Zellen der Zellsuspensionslösungen der jeweiligen Passage mitgeführt. Die LDH-Konzentration im Überstand der einzelnen Proben wurde in Relation dazu gesetzt.

Die Lösungen wurden in ein Mikroreaktionsgefäß umpipettiert und bei -80°C für mindestens einen Tag aufbewahrt. Die Aufbewahrung unter diesen Temperaturen führte eine Zelllyse herbei. Anschließend wurden die LDH-Konzentrationen mittels *CytoTox96 non-radioactive cytotoxicity assay* (Promega, Madison, WI, USA) gemessen. Das Prinzip beruht darauf, dass LDH mit einem Tetrazolium Salz reagiert und diese Reaktion einen Farbumschlag herbeiführt. Das Ausmaß des Farbumschlags ist proportional zur Konzentration an freigesetzter LDH.

3.7. Datenauswertung mit SPSS

Die statistische Auswertung der Experimente erfolgte mittels SPSS. Zunächst erfolgte die Analyse mittels Kruskal-Wallis-Test. Hierbei wurde untersucht, ob es sich bei der Verteilung der Daten um Zufallswerte handelt. Bei einem p kleiner oder gleich 0,05 wurde der Mann-Whitney-U-Test verwendet. Mit dem Mann-Whitney-U-Test wurde getestet, ob sich die zentralen Tendenzen zweier unabhängiger Stichproben signifikant unterscheiden. Ab einem p-Wert von kleiner oder gleich 0,05 wurde von einer statistischen Signifikanz ausgegangen. Bis auf die Ergebnisse der Versuche mit PBMCs er-

folgte die statistische Auswertung aller Experimente mit dem Mann-Whitney-U-Test. Die Auswertung der PBMC-Versuche erfolgte erst mit dem Friedman-Test und im Anschluss mit dem Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test, der die zentrale Tendenz zweier abhängiger Stichproben testet. Man ging auch hier von einer statistischen Signifikanz ab einem p-Wert von kleiner oder gleich 0,05 aus.

4. Ergebnisse

4.1. Experimente mit U937-Zellen

4.1.1. A β (1-42) hebt dosisabhängig den inhibitorischen Effekt von ACh auf die IL-1 β -Freisetzung auf

Um die Produktion von pro-IL-1 β zu induzieren, wurden humane monozytäre U937-Zellen mit LPS für 5 Stunden inkubiert. Wie erwartet, zeigten die Zellen, die ausschließlich mit LPS vorbehandelt waren, keine IL-1 β -Ausschüttung. Erst die Gabe von BzATP (100 μ M, 30 Minuten) führte zur IL-1 β -Freisetzung ins Zellkulturmedium mit einem Median von 54,69 pg/ml.

Die BzATP-induzierte IL-1 β -Freisetzung wurde in Anwesenheit von ACh (7,5 μ M und 10 μ M; $p = 0,029$ jeweils) signifikant inhibiert (Abbildung 8). 10 μ M ACh führten zu einer maximalen Inhibition der IL-1 β -Freisetzung, während 7.5 μ M ACh eine Reduktion der IL-1 β -Freisetzung auf die halbe Konzentration bewirkte. Interessanterweise wurde dieser inhibitorische cholinerge Effekt durch A β (1-42) dosisabhängig aufgehoben. Statistisch signifikante Unterschiede waren schon bei einer Gabe von 1 μ M A β (1-42) ($p = 0,029$) zu sehen. Eine vollständige Aufhebung des inhibitorischen Effekts von ACh auf die IL-1 β -Ausschüttung hatten die Gaben von 5 und 10 μ M A β (1-42) ($p = 0,029$) (Abbildung 8).

Der prozentuale Anteil der LDH im Überstand wurde mit der maximal möglichen LDH-Freisetzung aus lysierten Zellen entsprechend 100% verglichen. Bei diesen Experimenten wurden nie Werte von 5,75% überschritten. Die Mediane der LDH-Konzentrationen der einzelnen Substanzkombinationen zeigten eine geringe Variabilität mit Werten zwischen 2,79% und 4,7%, sodass keine Abhängigkeit der LDH-Konzentration von den verschiedenen kombinierten Chemikalien besteht (Abbildung 9).

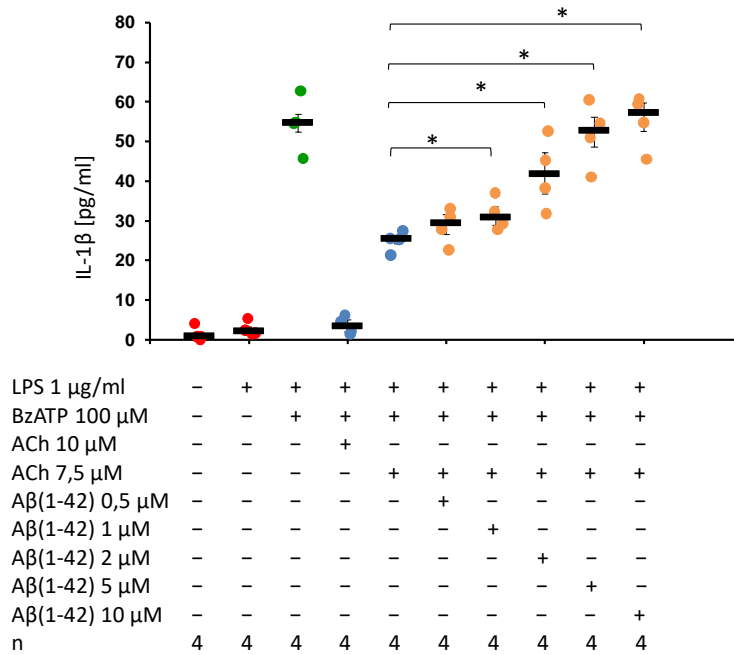


Abbildung 8: Amyloid- β ($A\beta$)(1-42) macht den inhibitorischen Effekt von Acetylcholin (ACh) auf die Benzoylbenzoyl-Adenosintri-phosphat-(BzATP)-induzierte Interleukin-(IL)-1 β -Ausschüttung wieder rückgängig

U937-Zellen wurden für 5 Stunden mit Lipopolysaccharid (LPS) inkubiert. Anschließend wurden sie mit dem P2X7-Rezeptor-Agonist BzATP für 30 Minuten stimuliert. Danach wurde die IL-1 β -Konzentration im Überstand gemessen.

Diese Ausschüttung kann durch ACh (7,5 μ M; 10 μ M) inhibiert werden.

Diese Inhibition der IL-1 β -Ausschüttung durch ACh konnte dosisabhängig durch A β (1-42) wieder aufgehoben werden.

Mann-Whitney-U-Test; n = 4, *p \leq 0.05. Die Einzelwerte sind als Punkte dargestellt, die Balken entsprechen den Medianen und die Antennen dem 25. und 75. Perzentil.

Teile der Daten wurden publiziert. Verändert nach [77].

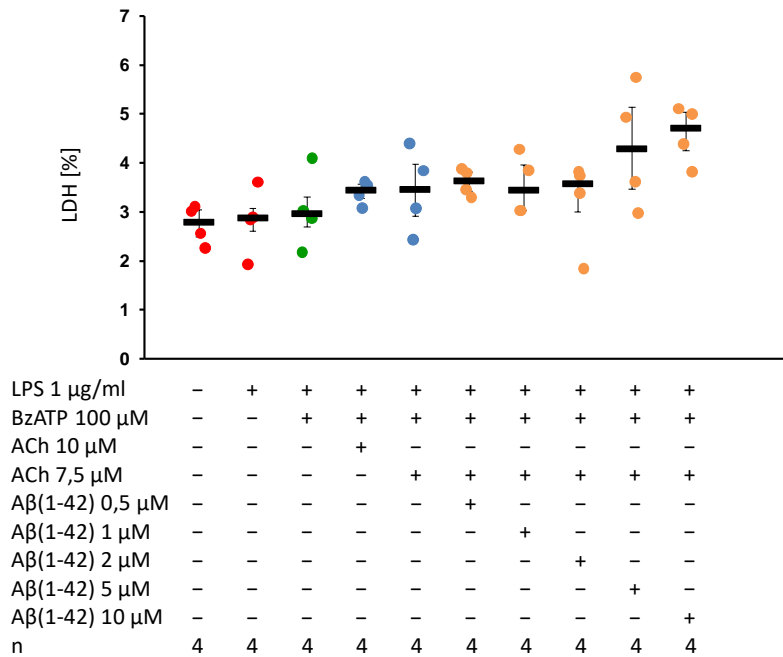


Abbildung 9: Die Laktakdehydrogenase-(LDH)-Freisetzung aus Lipopolysaccharid-(LPS)-vorstimulierten und mit Benzoylbenzoyl-Adenosintriphosphat (BzATP) inkubierten Zellen in Abhängigkeit von Acetylcholin (ACh) und Amyloid-β (Aβ)(1-42)

Die LDH-Konzentration wurde im Überstand gemessen und ins Verhältnis zur maximalen Freisetzung aus lysierten Zellen gesetzt. Die mit LPS vorstimulierten Zellen waren über 30 Minuten mit ATP, ACh und Aβ(1-42) behandelt worden. Teile der Daten wurden publiziert. Verändert nach [77].

4.1.2. Ohne vorherige zelluläre Stimulation kann Aβ(1-42) keinen Einfluss auf die IL-1β-Ausschüttung nehmen

Die folgenden Versuche wurden durchgeführt, um zu untersuchen, ob Aβ(1-42) unabhängig von BzATP und nAChR-Agonisten, einen Einfluss auf die IL-1β-Konzentration im Überstand der Zellen hat.

Die Zellen dieser Versuche waren zuvor nicht mit BzATP stimuliert worden. Die Applikation von Aβ(1-42) zu LPS-vorstimulierten Zellen bewirkte keine Induktion der IL-1β-Ausschüttung. Trotz Dosissteigerung zeigte sich keine Zunahme der IL-1β-Konzentration im Überstand (Abbildung 10).

Der prozentuale Anteil der LDH im Überstand wurde mit der maximal möglichen LDH-Freisetzung aus lysierten Zellen entsprechend 100% verglichen. Bei diesen Experimenten wurden nie Werte von 3,43% überschritten. Die Mediane der LDH-Konzentrationen der einzelnen Substanzkombinationen zeigten eine geringe Variabilität mit Werten zwi-

schen 0,37% und 1,64%, sodass keine Abhängigkeit der LDH-Konzentration von den unterschiedlichen Kombinationen der Chemikalien besteht (Abbildung 11).

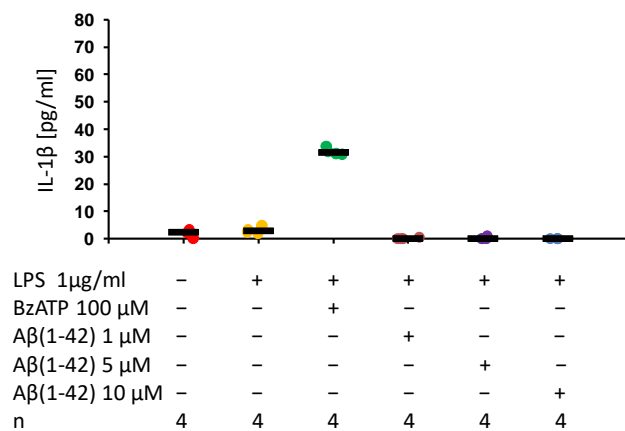


Abbildung 10: Amyloid-β (Aβ)(1-42) übt keinerlei Einfluss auf die Interleukin-(IL)-1β-Freisetzung aus Lipopolysaccharid-(LPS)-vorstimulierten U937-Zellen aus

U937-Zellen wurden für 5 Stunden mit LPS inkubiert. Anschließend wurden sie mit dem P2X7-Rezeptor-Agonist Benzoylbenzoyl-Adenosintriphosphat (BzATP) für 30 Minuten stimuliert. Danach wurde die IL-1β-Konzentration im Überstand gemessen. Die alleinige Stimulation durch Aβ(1-42) führte auch bei steigender Dosis zu keiner IL-1β-Ausschüttung.

Mann-Whitney-U-Test; n = 4. Die Einzelwerte sind als Punkte dargestellt, die Balken entsprechen den Medianen und die Antennen dem 25. und 75. Perzentil.

Teile der Daten wurden publiziert. Verändert nach [77].

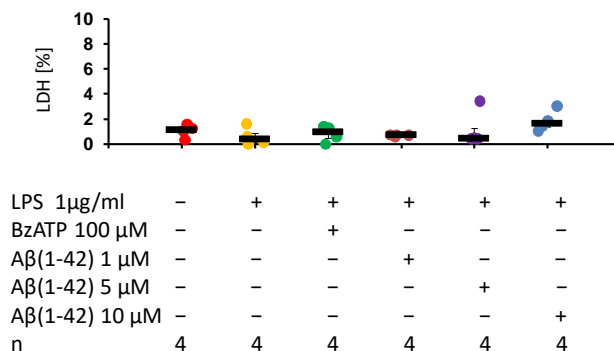


Abbildung 11: Laktatdehydrogenase-(LDH)-Freisetzung aus Lipopolysaccharid-(LPS)-vorstimulierten und mit Benzoylbenzoyl-Adenosintriphosphat (BzATP) inkubierten Zellen in Abhängigkeit von Amyloid-β (Aβ)(1-42)

Die LDH-Konzentration wurde im Überstand gemessen und ins Verhältnis zur maximalen Freisetzung aus lysierten Zellen gesetzt. Die mit LPS vorstimulierten Zellen waren über 30 Minuten mit BzATP und Aβ(1-42) behandelt worden.

Teile der Daten wurden publiziert. Verändert nach [77].

4.1.3. Reverse A β (42-1) hat keinen Einfluss auf die cholinerge Inhibition

Das Peptid *reverse* A β (42-1) ist ein artifizuell hergestelltes Isomer von A β (1-42). A β (42-1) wurde verwendet, um zu zeigen, dass die Beeinflussung der IL-1 β -Ausschüttung allein durch A β (1-42) erfolgt und nicht durch sein Isomer A β (42-1).

Im Vergleich zu unstimulierten U937-Zellen bewirkte die Applikation von A β (42-1) zu LPS-vorstimulierten Zellen keine messbare Erhöhung der IL- β -Konzentration im Zellüberstand. Die Gabe von A β (42-1) zu mit BzATP-stimulierten Zellen hatte ebenfalls keine Wirkung. Die Inhibition der BzATP-induzierten IL-1 β -Freisetzung durch ACh wurde nicht verändert durch A β (42-1). Auch eine Dosissteigerung in allen drei Versuchsansätzen führte zu keinem Effekt auf die IL-1 β -Konzentration (Abbildung 12).

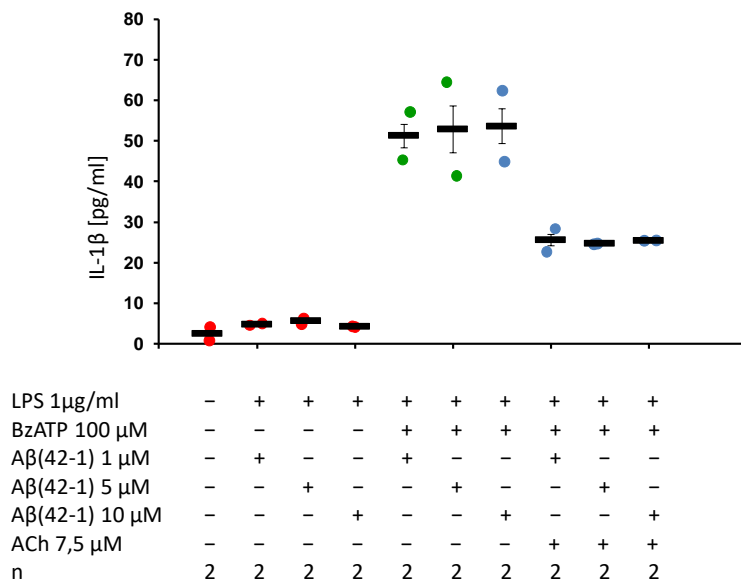


Abbildung 12: Effekt unterschiedlicher Amyloid- β -(A β)(42-1)-Konzentrationen auf die Interleukin-(IL)-1 β -Freisetzung von Lipopolysaccharid-(LPS)-vorstimulierten U937-Zellen

U937-Zellen wurden für 5 Stunden mit LPS inkubiert. Anschließend wurden sie mit dem P2X7-Rezeptor-Agonist Benzoylbenzoyl-Adenosintriphosphat (BzATP) für 30 Minuten stimuliert. Danach wurde die IL-1 β -Konzentration im Überstand gemessen.

Die zusätzliche Gabe von A β (42-1) bewirkte keine Änderung der IL-1 β -Ausschüttung. Die alleinige Stimulation durch A β (42-1) führte auch bei steigender Dosis zu keiner Erhöhung der IL-1 β -Ausschüttung.

A β (42-1) bewirkte ebenfalls keine Änderung der IL-1 β -Ausschüttung nach ACh-Gabe. Mann-Whitney-U-Test; n = 2. Die Einzelwerte sind als Punkte dargestellt, die Balken entsprechen den Medianen und die Antennen dem 25. und 75. Perzentil.

Teile der Daten wurden publiziert. Verändert nach [77].

Der prozentuale Anteil der LDH im Überstand wurde mit der maximal möglichen LDH-Freisetzung aus lysierten Zellen entsprechend 100% verglichen. Bei diesen Experimenten wurden nie Werte von 6,51% überschritten. Die Mediane der LDH-Konzentrationen der einzelnen Substanzkombinationen zeigten geringe Unterschiede bei Werten zwischen 2,64% und 4,98%, sodass keine Abhängigkeit der LDH-Konzentration von der Kombination der eingesetzten Chemikalien besteht (Abbildung 13).

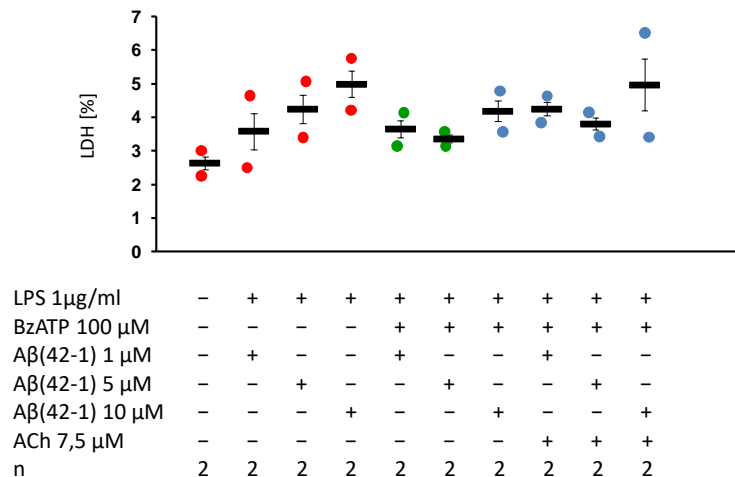


Abbildung 13: Laktatdehydrogenase-(LDH)-Freisetzung aus Lipopolysaccharid-(LPS)-vorstimulierten und mit Benzoylbenzoyl-Adenosintriphosphat (BzATP) inkubierten U937-Zellen in Abhängigkeit von Amyloid-β (Aβ)(42-1) und Acetylcholin (ACh)

Die LDH-Konzentration wurde im Überstand gemessen und ins Verhältnis zur maximalen Freisetzung aus lysierten Zellen gesetzt. Die mit LPS vorstimulierten Zellen waren über 30 Minuten mit BzATP, Aβ(42-1) und ACh behandelt worden. Teile der Daten wurden publiziert. Verändert nach [77].

4.1.4. Aβ(1-42) schwächt den inhibitorischen Effekt der nicht-kanonischen nAChR-Agonisten auf die IL-1β-Freisetzung ab

Wie im Kapitel 1.3.1.2 beschrieben, können die Substanzen PC, GPC und DPPC als nicht-kanonische nAChR-Agonisten die BzATP-induzierte IL-1β-Freisetzung inhibieren. Bisher wurde gezeigt, dass Aβ(1-42) den inhibitorischen Effekt des kanonischen Agonisten ACh dosisabhängig aufheben kann. Die nachfolgenden Versuche wurden durchgeführt, um zu ermitteln, ob Aβ(1-42) die inhibitorische Wirkung der nicht-kanonischen nAChR-Agonisten ebenfalls beeinflussen kann.

Ähnlich wie durch ACh (7,5 µM; $p < 0,05$) wurde die BzATP-vermittelte IL-1β-

Freisetzung durch PC (10 μM ; $p < 0,05$), GPC (1 μM ; $p < 0,05$) und DPPC (10 μM ; $p < 0,05$) inhibiert. Es wurde jeweils die Substanzkonzentration gewählt, welche eine Reduktion der IL-1 β -Ausschüttung zur halben Konzentration bewirkte. In der Tat wurde der inhibitorische Effekt aller nAChR-Agonisten in Anwesenheit von 2 μM A β (1-42) abgeschwächt. Allerdings zeigte sich nur bei Gabe von A β (1-42) zu ACh ($p < 0,05$) und PC ($p < 0,05$) ein signifikanter Unterschied in der IL-1 β -Ausschüttung (Abbildung 14). Der prozentuale Anteil der LDH im Überstand wurde mit der maximal möglichen LDH-Freisetzung aus lysierten Zellen entsprechend 100% verglichen. Die Mediane der LDH-Konzentrationen der einzelnen Substanzkombinationen zeigten geringe Unterschiede mit Werten zwischen 1,77% und 2,80%, sodass keine Abhängigkeit der LDH-Konzentration von den verschiedenen kombinierten Chemikalien besteht (Abbildung 15).

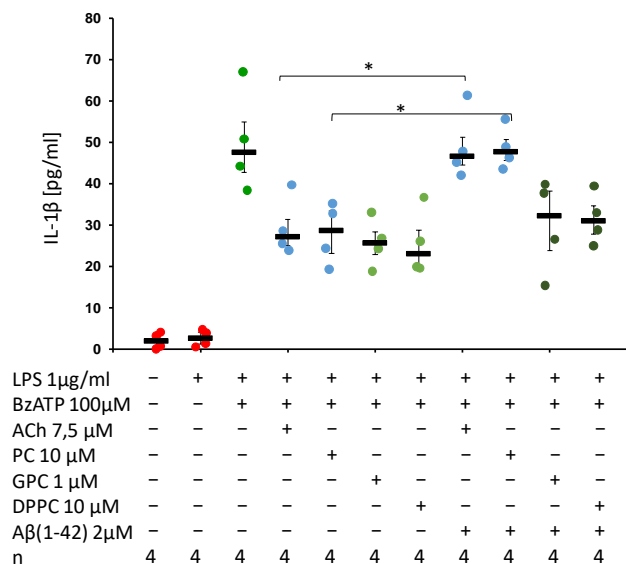


Abbildung 14: Amyloid- β (A β)(1-42) schwächt die cholinerg-vermittelte Inhibition der Benzoylbenzoyl-Adenosintri-phosphat-(BzATP)-induzierten Interleukin-(IL)-1 β -Freisetzung aus U937-Zellen ab

U937-Zellen wurden für 5 Stunden mit Lipopolysaccharid (LPS) inkubiert. Anschließend wurden sie mit dem P2X7-Rezeptor-Agonist BzATP für 30 Minuten stimuliert. Danach wurde die IL-1 β -Konzentration im Überstand gemessen.

Die gewählten Konzentrationen von Acetylcholin (ACh), Phosphocholin (PC), Glycerophosphocholin (GPC) und Dipalmitoylphosphatidylcholin (DPPC) führten zu einer Reduktion der IL-1 β -Ausschüttung auf die halbe Konzentration. A β (1-42) konnte die durch ACh und PC induzierte Inhibition vollständig aufheben.

Mann-Whitney-U-Test; $n = 4$, * $p \leq 0,05$. Die Einzelwerte sind als Punkte dargestellt, die Balken entsprechen den Medianen und die Antennen dem Perzentilen 25. und 75.

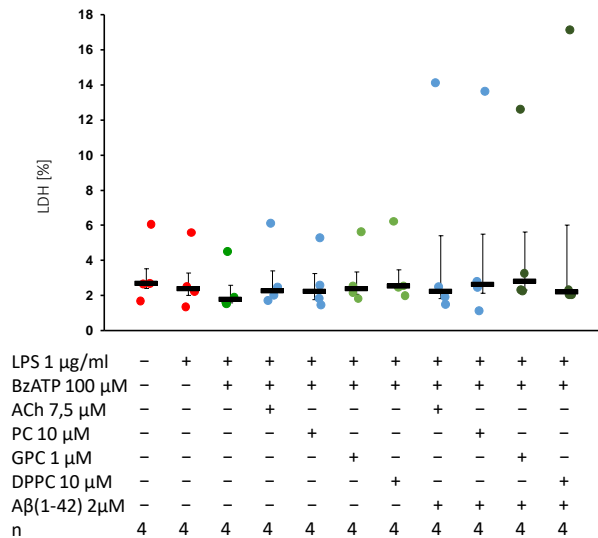


Abbildung 15: Laktatdehydrogenase-(LDH)-Freisetzung aus Lipopolysaccharid-(LPS)-vorstimulierten und mit Benzoylbenzoyl-Adenosintri-phosphat (BzATP) inkubierten U937-Zellen in Abhängigkeit von cholinergen Substanzen

Die LDH-Konzentration wurde im Überstand von LPS-vorstimulierten und über 30 Minuten mit BzATP und Acetylcholin (ACh), Phosphocholin (PC), Glycerophosphocholin (GPC) und Dipalmitoylphosphatidylcholin (DPPC), sowie Amyloid-β (Aβ)(1-42) behandelten U937-Zellen gemessen und ins Verhältnis zur maximalen Freisetzung aus lysierten Zellen gesetzt.

4.1.4.1. Wirksamkeit von Aβ(1-42) auf die nAChR-Agonisten GPC und DPPC

Wie bereits im Kapitel 1.3.1.2 beschrieben, binden GPC und DPPC vor allem an nAChRs mit den $\alpha 9$ -/ $\alpha 10$ -Untereinheiten. Aufgrund der Eigenschaften von GPC und DPPC wurden diese Substanzen verwendet, um die Interaktion von Aβ(1-42) an nAChRs mit den Rezeptoruntereinheiten $\alpha 9$ beziehungsweise $\alpha 10$ zu untersuchen. In den Versuchen in 4.1.4 konnte die Gabe von 2 µM Aβ(1-42) den inhibitorischen Effekt, den 1 µM GPC beziehungsweise 10 µM DPPC auf die BzATP-vermittelte IL-1β-Freisetzung auslöst, nicht signifikant aufheben. Dennoch zeigte sich eine Tendenz, dass Aβ(1-42) den inhibitorischen Effekt, der durch die Substanzen ausgelöst wird, beeinflussen kann. Aufgrund dessen wurden weitere Versuche mit einer höheren Aβ(1-42)-Konzentration durchgeführt (Abbildung 16).

Die Gabe von BzATP zu LPS-vorstimulierten U937-Zellen führte zu einer Freisetzung von 56,89 pg/ml IL-1β ins Zellkulturmedium. Für GPC (10 µM) und DPPC (100 µM) wurde eine Konzentration gewählt, die eine vollständige Inhibition dieser BzATP-vermittelten IL-1β-Freisetzung bewirkt. Tatsächlich zeigte sich, dass die Konzentration

von 5 μM A β (1-42) eine signifikante Abschwächung der durch GPC (10 μM ; $p < 0,05$) und DPPC (100 μM ; $p < 0,05$) ausgelösten Verminderung der ATP-induzierten IL-1 β -Ausschüttung bewirkt. Die Reversibilität war nicht vollständig, sondern führte zu Werten um die 26,54 pg/ml IL-1 β (GPC) beziehungsweise 25,7 pg/ml IL-1 β (DPPC), was der halbmaximalen IL-1 β -Konzentration entsprach (Abbildung 16).

Der prozentuale Anteil der LDH im Überstand wurde mit der maximal möglichen LDH-Freisetzung aus lysierten Zellen entsprechend 100% verglichen. Bei diesen Experimenten wurden nie Werte von 10,93% überschritten. Die Mediane der LDH-Konzentrationen der einzelnen Substanzkombinationen zeigten geringe Unterschiede mit Werten zwischen 1,21% und 7,18%, sodass keine Abhängigkeit der LDH-Konzentration von den verschiedenen Kombinationen der eingesetzten Chemikalien besteht (Abbildung 17).

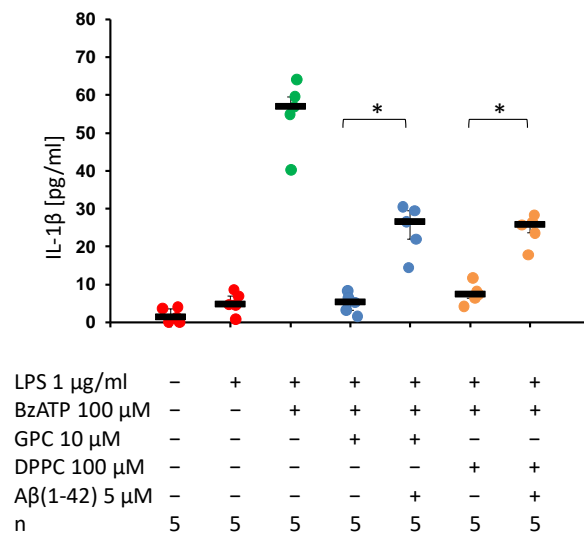


Abbildung 16: Effekt von Amyloid- β (A β)(1-42) auf die durch Glycerophosphocholin (GPC) und Dipalmitoylphosphatidylcholin (DPPC) ausgelöste Inhibition der Benzoylbenzoyl-Adenosintri-phosphat-(BzATP)-induzierten Interleukin-(IL)-1 β -Ausschüttung aus U937-Zellen

U937-Zellen wurden für 5 Stunden mit Lipopolysaccharid (LPS) inkubiert. Anschließend wurden sie mit dem P2X7-Rezeptor-Agonist BzATP für 30 Minuten stimuliert. Danach wurde die IL-1 β -Konzentration im Überstand gemessen.

Die IL-1 β -Freisetzung konnte durch GPC und DPPC inhibiert werden.

Die Applikation von A β (1-42) führte zu einer signifikanten Reversibilität dieser Inhibition. Mann-Whitney-U-Test; $n = 5$, * $p \leq 0.05$. Die Einzelwerte sind als Punkte dargestellt, die Balken entsprechen den Medianen und die Antennen dem 25. und 75. Perzentil.

Teile der Daten wurden publiziert. Verändert nach [77].

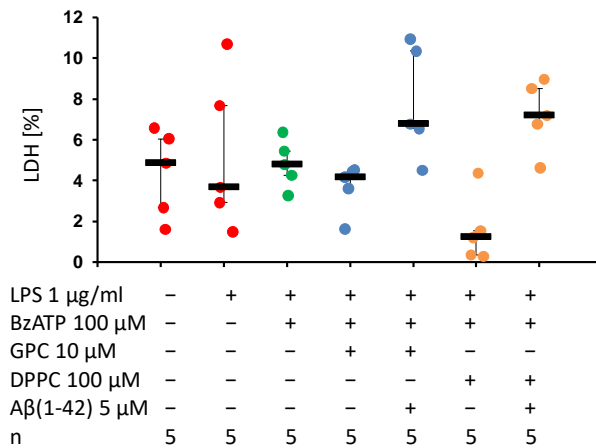


Abbildung 17: Laktatdehydrogenase-(LDH)-Freisetzung aus Lipopolysaccharid-(LPS)-vorstimulierten und mit Benzoylbenzoyl-Adenosinatriphosphat (BzATP) inkubierten Zellen in Abhängigkeit von Glycerophosphocholin (GPC), Dipalmitoylphosphatidylcholin (DPPC) und Amyloid- β

Die LDH-Konzentration wurde im Überstand gemessen und ins Verhältnis zur maximalen Freisetzung aus lysierten Zellen gesetzt. Die LPS-vorstimulierten Zellen waren über 30 Minuten mit BzATP, DPPC, GPC und Amyloid- β ($A\beta$)(1-42) behandelt worden. Teile der Daten wurden publiziert. Verändert nach [77].

4.1.5. Die Wirkung des partiellen Agonisten S 24795 an monozytären nAChRs

Die Substanz S 24795 ist in der Literatur als partieller Agonist an der $\alpha 7$ -Untereinheit der nAChRs bekannt (siehe Kapitel 1.3.1.2). Darüber hinaus wurde beschrieben, dass die Substanz die Interaktion zwischen $A\beta$ (1-42) und der $\alpha 7$ -Untereinheit in Nervenzellen abschwächt [99]. Zur Prüfung der Wirkung von S 24795 an monozytären nAChRs wurden die nachfolgenden Versuche durchgeführt.

Die Stimulation von LPS-vorbehandelten U937-Zellen mit BzATP (100 μ M, 30 Minuten) führte zur IL-1 β -Freisetzung ins Zellkulturmedium mit Werten um die 53,67 pg/ml. Die Gabe von S 24795 (1 μ M, 5 μ M, 10 μ M, 50 μ M, 100 μ M) führte zu einer dosisabhängigen Abnahme der IL-1 β -Konzentration im Überstand. Ein signifikanter Unterschied zeigte sich ab einer Konzentration von 50 μ M ($p < 0,05$). Eine fast vollständige Inhibition konnte bei Applikation von 100 μ M S 24795 ($p < 0,05$) mit Werten um die 8,35 pg/ml IL-1 β beobachtet werden. Die alleinige Applikation von 50 μ M S 24795 ohne vorherige Stimulation der Zellen durch LPS und/oder ATP führte nicht zu einer IL-1 β -Ausschüttung (Abbildung 18).

Der prozentuale Anteil der LDH im Überstand wurde mit der maximal möglichen LDH-

Freisetzung aus lysierten Zellen entsprechend 100% verglichen. Bei diesen Experimenten wurden nie Werte von 5,71% überschritten. Die Mediane der LDH-Konzentrationen der einzelnen Substanzkombinationen zeigten geringe Unterschiede, mit Werten zwischen 1,50% bis 2,73%, sodass keine Abhängigkeit der LDH-Konzentration von den verschiedenen kombinierten Chemikalien besteht (Abbildung 19).

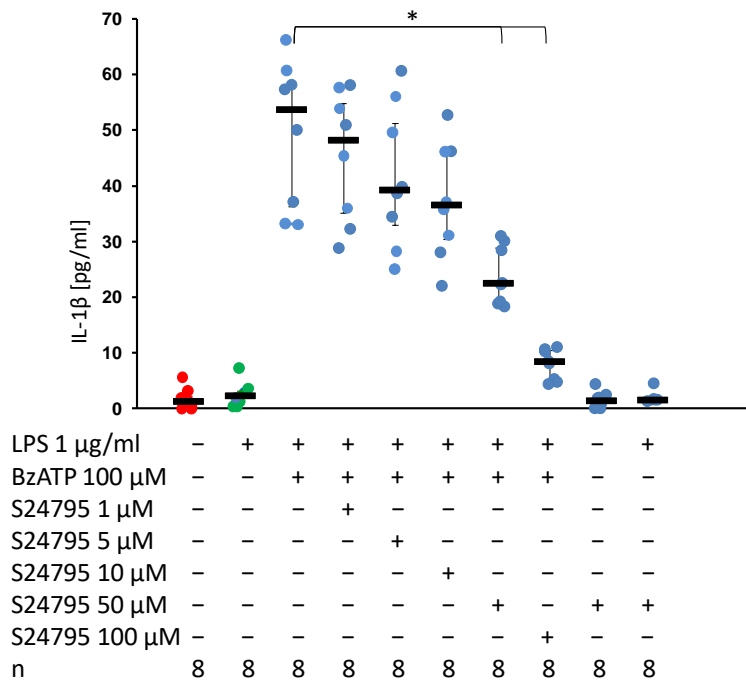
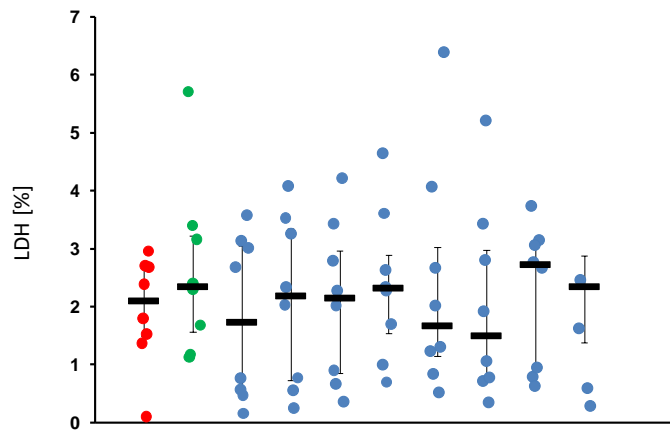


Abbildung 18: Inhibition der Benzoylbenzoyl-Adenosintri-phosphat-(BzATP)-induzierten Interleukin-(IL)-1 β -Freisetzung aus U937-Zellen durch 2-[2-(4-bromophenyl)-2-oxoethyl]-1-methyl pyridinium (S 24795)

U937-Zellen wurden für 5 Stunden mit Lipopolysaccharid (LPS) inkubiert. Anschließend wurden sie mit dem P2X7-Rezeptor-Agonist BzATP für 30 Minuten stimuliert. Danach wurde die IL-1 β -Konzentration im Überstand gemessen.

Die IL-1 β -Ausschüttung konnte durch S 24795 inhibiert werden.

Mann-Whitney-U-Test; n = 8, * p \leq 0.05. Die Einzelwerte sind als Punkte dargestellt, die Balken entsprechen den Medianen und die Antennen dem 25. und 75. Perzentil.



LPS 1 µg/ml	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+
BzATP 100 µM	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-
S24795 1 µM	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
S24795 5 µM	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
S24795 10 µM	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
S24795 50 µM	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+
S24795 100 µM	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
n	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8

Abbildung 19: Laktatdehydrogenase-(LDH)-Freisetzung aus Lipopolysaccharid-(LPS)-vorstimulierten und mit Benzoylbenzoyl-Adenosintriphosphat (BzATP) inkubierten U937-Zellen in Abhängigkeit von 2-[2-(4-bromophenyl)-2-oxoethyl]-1-methylpyridinium (S 24795)

Die LDH-Konzentrationen im Überstand wurden gemessen und ins Verhältnis zur maximalen Freisetzung aus lysierten Zellen gesetzt. Die mit LPS vorstimulierten Zellen waren über 30 Minuten mit BzATP und S 24795 behandelt worden.

4.1.6. A β (1-42) hebt die Wirkung von S 24795 an nAChRs auf

Nachdem gezeigt werden konnte, dass S 24795 ähnlich wie die oben genannten Cholinergika im Sinne eines vollwertigen nAChR-Agonisten die IL-1 β -Ausschüttung inhibiert, wurde untersucht, ob A β (1-42) diese Inhibition rückgängig machen kann.

In den Versuchen zeigte sich, dass 5 µM A β (1-42) in der Lage war, die inhibitorische Wirkung von S 24795 wieder aufzuheben. Die Applikation von A β (1-42) zu S 24795 (50 µM, 100 µM; $p < 0,05$) führte zu einer vollständigen Reversibilität mit den Werten 46,05 pg/ ml IL-1 β (50 µM S 24795) beziehungsweise 54,25 pg/ ml IL-1 β (50 µM S 24795) (Abbildung 20).

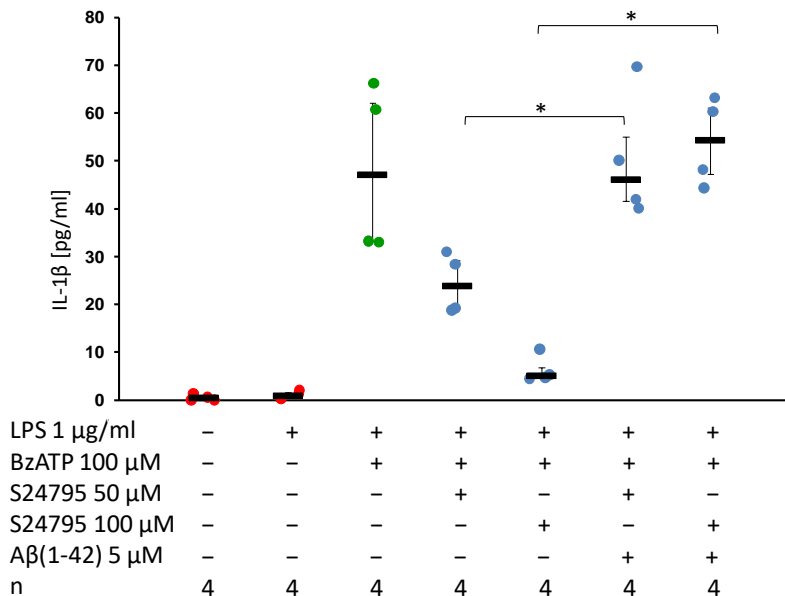


Abbildung 20: Amyloid-β (Aβ)(1-42) hebt die inhibitorische Wirkung von 2-[2-(4-bromophenyl)-2-oxoethyl]-1-methyl pyridinium (S 24795) auf die Benzoylben-zoyl-Adenosintri-phosphat-(BzATP)-induzierte Interleukin-(IL)-1β-Freisetzung auf

U937-Zellen wurden für 5 Stunden mit Lipopolysaccharid (LPS) inkubiert. Anschließend wurden sie mit dem P2X7-Rezeptor-Agonist BzATP für 30 Minuten stimuliert. Danach wurde die IL-1β-Konzentration im Überstand gemessen.

Die IL-1β-Ausschüttung kann durch S 24795 inhibiert werden.

Die Applikation von Aβ(1-42) führt zu einer signifikanten Reversibilität der Inhibition. Mann-Whitney-U-Test; n = 4, * p ≤ 0.05. Die Einzelwerte sind als Punkte dargestellt, die Balken entsprechen den Medianen und die Antennen dem 25. und 75. Perzentil.

Teile dieser Daten wurden schon in Abbildung 18 gezeigt.

Der prozentuale Anteil der LDH im Überstand wurde mit der maximal möglichen LDH-Freisetzung aus lysierten Zellen entsprechend 100% verglichen. Bei diesen Experimenten wurden nie Werte von 10,68% überschritten. Die Mediane der LDH-Konzentrationen der einzelnen Substanzkombinationen zeigten eine geringe Variabilität mit Werten zwischen 1,15% und 3,24%, sodass keine Abhängigkeit der LDH-Konzentration von den verschiedenen Kombinationen der eingesetzten Chemikalien besteht (Abbildung 21).

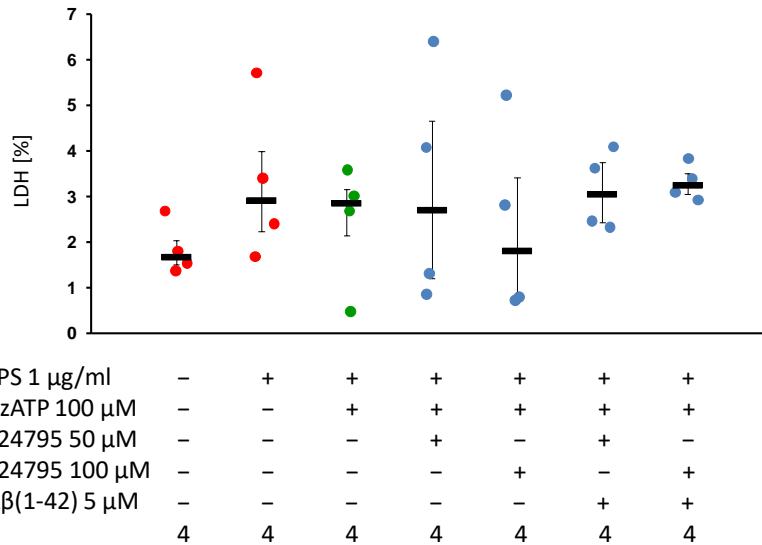


Abbildung 21: Laktatdehydrogenase-(LDH)-Freisetzung aus Lipopolysaccharid-(LPS)-vorstimulierten und mit Benzoylbenzoyl-Adenosintri-phosphat (BzATP) inkubierten Zellen in Abhängigkeit von 2-[2-(4-bromophenyl)-2-oxoethyl]-1-methyl pyridinium (S 24795) und Amyloid-β

Die LDH-Konzentration wurde im Überstand gemessen und ins Verhältnis zur maximalen Freisetzung aus lysierten Zellen gesetzt. Die LPS-vorstimulierten Zellen waren über 30 Minuten mit BzATP, S 24795 und Amyloid-β(1-42) behandelt worden. Teile dieser Daten wurden schon in Abbildung 19 gezeigt.

4.1.7. Aβ(1-42) hebt die inhibitorische Wirkung von CRP auf die BzATP-induzierte IL-1β-Freisetzung auf

PC-gebundenes CRP kann im Sinne eines nicht-kanonischen nAChR-Agonisten die BzATP-induzierte IL-1β-Freisetzung in Monozyten inhibieren (siehe Kapitel 1.3.2). Da Aβ(1-42) in der Lage war, die Wirkung aller bisher eingesetzten Agonisten wieder aufzuheben, wurde in diesem Versuch geprüft, ob dies auch für CRP gilt.

Ähnlich wie ACh (10 µM; $p < 0,05$), PC (100 µM; $p < 0,05$) und S 24795 (100 µM; $p < 0,05$) hatte auch CRP (5 µg/ml; $p < 0,05$) einen vollständig inhibitorischen Effekt auf die IL-1β-Freisetzung. In der Tat wurde diese inhibitorische Wirkung von CRP in Anwesenheit von Aβ(1-42) vollständig aufgehoben ($p < 0,05$) (Abbildung 22).

Der prozentuale Anteil der LDH im Überstand wurde mit der maximal möglichen LDH-Freisetzung aus lysierten Zellen entsprechend 100% verglichen. Bei diesen Experimenten wurden nie Werte von 5,21% überschritten. Die Mediane der LDH-Konzentrationen der einzelnen Substanzkombinationen zeigten eine geringe Variabilität mit Werten zwi-

schen 1,15% und 3,94%, sodass keine Abhängigkeit der LDH-Konzentration von den verschieden kombinierten Chemikalien besteht (Abbildung 23).

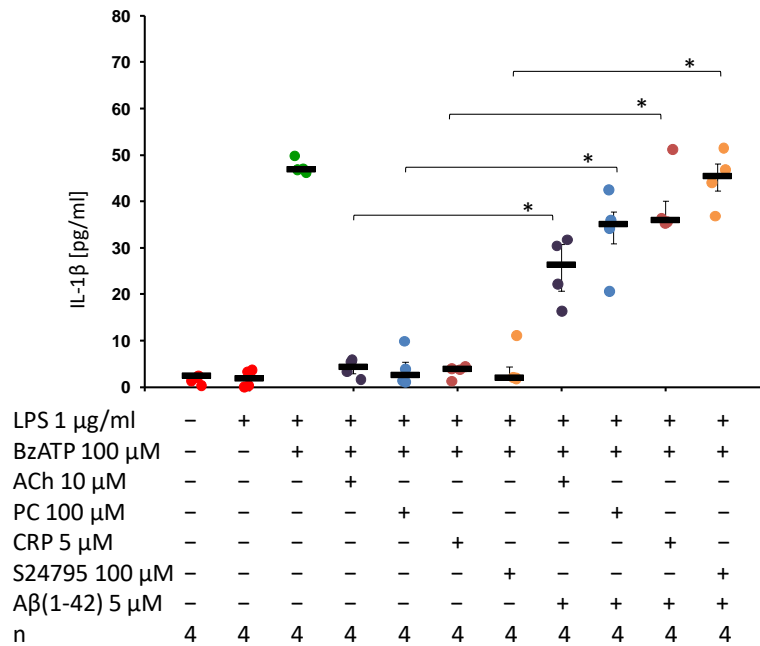


Abbildung 22: Effekt von Amyloid-β (Aβ)(1-42) auf nikotinische Acetylcholinrezeptor-(nAChR)-Agonisten

U937-Zellen wurden für 5 Stunden mit Lipopolysaccharid (LPS) inkubiert. Anschließend wurden sie mit dem P2X7-Rezeptor-Agonist Benzoylbenzoyl-Adenosintriphosphat (BzATP) für 30 Minuten stimuliert. Danach wurde die Interleukin-(IL)-1β-Konzentration im Überstand gemessen.

Die IL-1β-Ausschüttung kann durch Acetylcholin (ACh), Phosphocholin (PC), C-reaktives Protein (CRP) und 2-[2-(4-bromophenyl)-2-oxoethyl]-1-methyl pyridinium (S 24795) inhibiert werden.

Die Applikation von Aβ(1-42) führte zu einer signifikanten Reversibilität dieser Inhibition.

Mann-Whitney-U-Test; n = 4, * p ≤ 0.05. Die Einzelwerte sind als Punkte dargestellt, die Balken entsprechen den Medianen und die Antennen dem 25. und 75. Perzentil.

Teile der Daten wurden publiziert. Verändert nach [77].

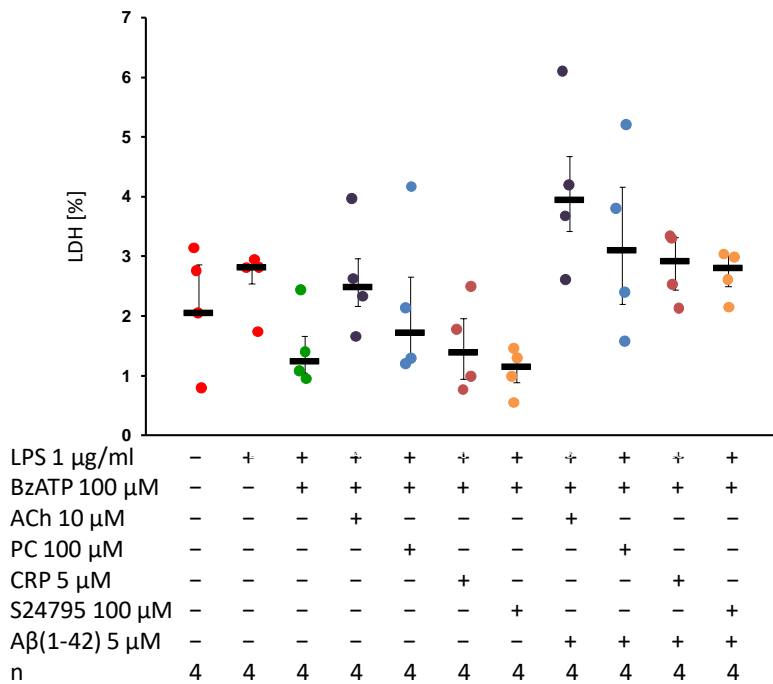


Abbildung 23: Laktatdehydrogenase-Freisetzung aus Lipopolysaccharid-vorstimulierten und mit Benzoylbenzoyl-Adenosintri-phosphat inkubierten Zellen in Abhängigkeit von Cholinergika, C-reaktivem Protein, 2-[2-(4-bromophenyl)-2-oxoethyl]-1-methylpyridinium und Amyloid-β

Die Laktatdehydrogenase-(LDH)-Konzentration wurde im Überstand gemessen und ins Verhältnis zur maximalen Freisetzung aus lysierten Zellen gesetzt. Die Lipopolysaccharid-(LPS)-vorstimulierten Zellen waren über 30 Minuten mit Benzoylbenzoyl-Adenosintri-phosphat (BzATP), Acetylcholin (ACh), Phosphocholin (PC), C-reaktives Protein (CRP), 2-[2-(4-bromophenyl)-2-oxoethyl]-1-methyl pyridinium (S 24795) und Amyloid-β (Aβ)(1-42) behandelt worden.

Teile der Daten wurden publiziert. Verändert nach [77].

4.2. Experimente mit PBMCs

4.2.1. A β (1-42) hebt den inhibitorischen Effekt von PC auf die BzATP-induzierte IL-1 β -Freisetzung durch humane PBMCs auf

Als letztes wurde untersucht, ob A β (1-42) an nAChRs peripherer mononukleärer Zellen die inhibitorische Wirkung von cholinergen Substanzen auf die BzATP-vermittelte IL-1 β -Freisetzung ebenfalls antagonisieren kann. Dazu wurden humane PBMCs aus dem Blut von Probanden isoliert und während des Isolierungsprozesses mit 5 ng/ml LPS behandelt.

Wie erwartet, war die spontane IL-1 β -Sekretion dieser Zellen auf einem niedrigen Niveau. Durch Stimulation mit BzATP (100 μ M; 30 Minuten) konnte eine Erhöhung dieser IL-1 β -Sekretion erreicht werden. Zur besseren Vergleichbarkeit wurde diese BzATP-induzierte IL-1 β -Freisetzung als 100% gesetzt. Alle nachfolgend bestimmten Werte wurden in Relation dazu gesetzt und konnten somit zwischen den Probanden verglichen werden.

Die IL-1 β -Freisetzung konnte durch PC (200 μ M; $p < 0,05$) inhibiert werden. Ähnlich wie in den Versuchen mit U937-Zellen, konnten 5 μ M A β (1-42) diesen inhibitorischen Effekt von PC rückgängig machen.

Um zu untersuchen, ob PC seine Wirkung tatsächlich über nAChRs entfaltet, wurden die Conopeptide ArIB und RgIA4 eingesetzt. ArIB ist ein spezifischer Antagonist an der α 7-Untereinheit des nAChR. RgIA4 ist ebenfalls ein spezifischer Antagonist an nAChRs, interagiert allerdings mit der α 9- und α 10-Untereinheit [31]. ArIB (500 nM; $p < 0,05$) und RgIA4 (50 nM; $p < 0,05$) wurden 10 Minuten vor PC-Gabe appliziert. Beide Conopeptide konnten den inhibitorischen Effekt von PC auf die BzATP-induzierte IL- β -Freisetzung wieder aufheben. Des Weiteren zeigte sich, dass die alleinige Applikation von A β (1-42) sowie ArIB und RgIA4 ohne vorherige BzATP-Stimulation keinen Einfluss auf IL-1 β -Freisetzung hatten (Abbildung 24).

Der prozentuale Anteil der LDH im Überstand wurde mit der maximal möglichen LDH-Freisetzung aus lysierten Zellen entsprechend 100% verglichen. Bei diesen Experimenten wurden nie Werte von 10% überschritten. Die Mediane der LDH-Konzentrationen der einzelnen Substanzkombinationen zeigten geschlechtsunabhängig eine geringe Va-

riabilität mit Werten zwischen 1% und 7%, sodass keine Abhängigkeit der LDH-Konzentration von den verschiedenen kombinierten Chemikalien besteht (Abbildung 25).

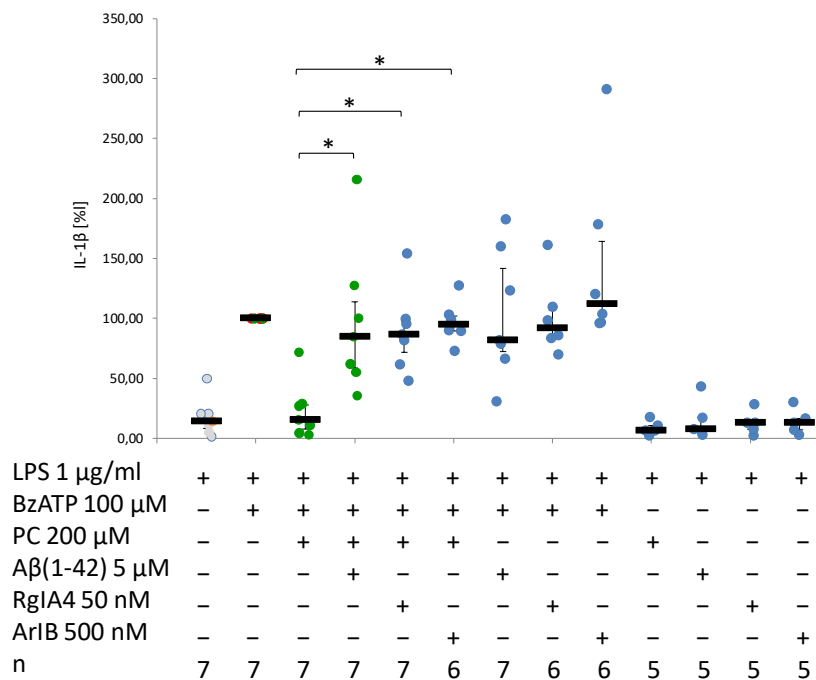


Abbildung 24: Amyloid-β (Aβ)(1-42) und Conopeptide hemmen die inhibitorische Wirkung durch Phosphocholin (PC) auf die Interleukin-(IL)-1β-Freisetzung aus Lipopolysaccharid-(LPS)-vorstimulierten mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMCs)

Benzoylbenzoyl-Adenosintriphosphat (BzATP) induziert eine Ausschüttung von IL-1β aus mit LPS vorstimulierten PBMCs ins Zellkulturmedium. Diese Ausschüttung kann durch PC reversibel inhibiert werden.

Die Applikation von Aβ(1-42) führt zu einer signifikanten Reversibilität dieser Inhibition. Der gleiche Effekt wird nach Applikation der Conopeptide RgIA4 und [V11L;V16D]ArIB (ArIB) beobachtet.

Die Gabe von Aβ(1-42), Rg1A4 und ArIB zu LPS-vorstimulierten Zellen ohne Stimulation durch BzATP bewirkte keine Konzentrationserhöhung von IL-1β.

Mann-Whitney-U-Test; n = 5, 6, 7, * p ≤ 0.05. Die Einzelwerte sind als Punkte dargestellt, die Balken entsprechen den Medianen und die Antennen dem 25. und 75. Perzentil.

Teile dieser Daten wurden publiziert. Verändert nach [77].

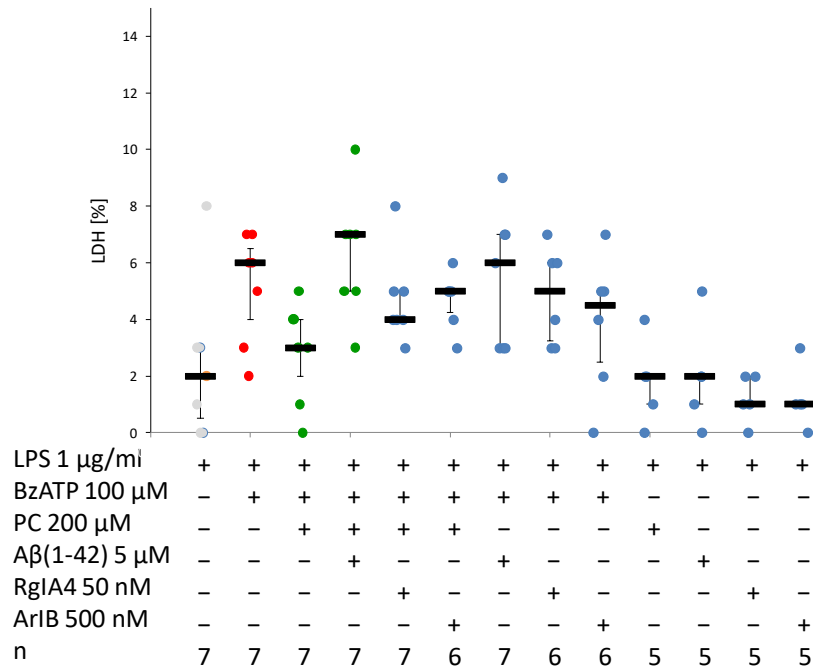


Abbildung 25: Laktatdehydrogenase-(LDH)-Freisetzung aus Lipopolysaccharid-(LPS)-vorstimulierten und mit Benzoylbenzoyl-Adenosintriphosphat (BzATP) inkubierten Zellen in Abhängigkeit von Phosphocholin (PC), Amyloid-β (Aβ)(1-42), RgIA4 und [V11L;V16D]ArIB (ArIB)

Die LDH-Konzentration wurde im Überstand gemessen und ins Verhältnis zur maximalen Freisetzung aus lysierten Zellen gesetzt. Die LPS-vorstimulierten Zellen waren über 30 Minuten mit BzATP, PC, Aβ(1-42), RgIA4 und ArIB behandelt worden. Teile dieser Daten wurden bereits publiziert. Verändert nach [77].

5. Diskussion

5.1. APP und seine Spaltprodukte sind evolutionsbiologisch hoch konserviert

Das Transmembranprotein APP und seine Spaltprodukte sowie nAChRs sind evolutionsbiologisch hochkonservierte Moleküle, die sich vermutlich vor der Entwicklung eines Nervensystems gebildet hatten [18]. Da APP ein häufiges Ziel verschiedener Enzyme ist, dürfte, wie bereits in Kapitel 1.4.1 beschrieben, die Wirkung äußerst vielfältig ausfallen. APP-Moleküle lassen sich außer im Gehirn auch in den Nieren, in Endothelien und in Thrombozyten nachweisen [18]. Daraus lässt sich ableiten, dass die ursprüngliche Funktion in der Regulation eines ubiquitär vorkommenden Systems, wie beispielsweise dem Immunsystem, liegen dürfte [64, 69].

APP kann durch diverse Enzyme in multiple Spaltprodukte gespalten werden. Das bekannteste Spaltprodukt von APP ist das Peptid A β (1-42), welches in der Pathogenese der AD eine zentrale Rolle spielt. Bisher wurde die Interaktion zwischen A β (1-42) und der α 7-Untereinheit der nAChRs im Rahmen der Alzheimerforschung beschrieben. In dieser Arbeit konnten wir zeigen, dass A β (1-42) seine Wirkung als Antagonist der cholinergen Inhibition an monozytären nAChRs mit den Untereinheiten α 7, α 9 und/oder α 10 entfaltet. Nach vorheriger Hemmung durch nAChR-Agonisten bewirkte A β (1-42) eine erneute IL-1 β -Ausschüttung. Folglich wurde mit dieser Arbeit eine neue immunmodulierende Wirkung dieses Peptids beschrieben.

5.2. Immunologische Wirkung von A β (1-42)

Lange war man davon ausgegangen, dass immunologische Reaktionen im ZNS aufgrund der Blut-Hirn-Schranke von denen des peripheren Immunsystems getrennt waren. Inzwischen ist klar, dass Mediatoren des peripheren Immunsystems auch im ZNS gefunden werden können – sowohl bei physiologischen als auch pathologischen Gesundheitszuständen. A β (1-42) beeinflusst in erheblichem Maße die Immunantwort der monozytären Mikroglia [33, 87].

Die hier durchgeführten Versuche konnten zeigen, dass A β (1-42) in der Lage ist, die IL-1 β -Konzentration zu erhöhen, nachdem die BzATP-induzierte Ausschüttung zuvor durch cholinerge Substanzen inhibiert worden war. Die IL-1 β -Konzentration stieg durch Gabe von A β (1-42) dosisabhängig wieder an. Die Experimente wurden mit A β (1-42)

durchgeführt. Als Kontrollpeptid diente sein Isomer *reverse* A β (42-1), welches die IL-1 β -Konzentration nicht beeinflusste (Kapitel 4.1.3).

Ähnlich wie von Lorton *et al.* bereits für THP-1-Zellen gezeigt, hat A β (1-42) auch in unseren Experimenten eine immunmodulierende Wirkung auf LPS-vorstimulierte monozytäre Zellen [57]. Im Unterschied zu den von uns verwendeten U937-Zellen zeichnen sich die THP-1-Zellen durch eine erhöhte Phagozytosefähigkeit und einen unterschiedlichen Ursprung und Differenzierungsgrad aus [11, 62].

5.3. Wirkungsmechanismus von A β (1-42) in monozytären Zellen

Wie im Kapitel 1.2.3 erklärt, spielt die Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms eine zentrale Rolle in der Bildung und Ausschüttung von reifem IL-1 β [33].

Halle *et al.* zeigten 2008, dass A β (1-42) über eine NLRP3-Inflammasomaktivierung zur IL-1 β -Ausschüttung führte [33]. Phagozytiertes A β (1-42) führte intrazellulär zur Lysosomzerstörung und damit zur Freisetzung lysosomalen Inhalts. Der exakte Mechanismus konnte nicht abschließend geklärt werden, es wurde jedoch vermutet, dass aus den Lysosomen freigesetzte Proteine zur Inflammasomaktivierung führten.

Unsere Versuche konnten diesen Wirkmechanismus von A β (1-42) in Monozyten weder bestätigen noch widerlegen. In den in Kapitel 4.1.2 beschriebenen Versuchen, führte die alleinige Applikation von A β (1-42) nicht zu einer IL-1 β -Freisetzung. Damit kann davon ausgegangen werden, dass keine Inflammasomaktivierung stattgefunden hatte.

Eine mögliche Erklärung hierfür könnte eine zu kurze Stimulationszeit (30 Minuten) sein. Diese kurze Zeitdauer war vermutlich nicht ausreichend, um eine lysosomale Zerstörung zu bewirken. Somit konnten die Freisetzung von lysosomalen Stoffen und die anschließende Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms nicht stattfinden. Eine andere Erklärung wäre, dass in unseren Versuchen A β (1-42) in nicht-fibrillärer Form eingesetzt wurde, während Halle *et al.* in ihren Versuchen fibrilläres A β (1-42) verwendeten.

Bei Annahme, dass A β (1-42) in den vorgelegten Versuchen nicht zu einer Inflammasomaktivierung führte, stellt sich die Frage, wie A β (1-42) nach vorheriger Hemmung durch cholinerge Substanzen eine erneute IL-1 β -Freisetzung bewirken konnte. Erste Hinweise auf die Beantwortung dieser Frage sind im Jahre 2000 von Wang *et al.* geliefert worden. Sie zeigten, dass A β (1-42) kompetitiv an die α 7-Untereinheit des nAChR binden konnte [100]. Im Folgejahr wiederum wurde von Liu *et al.* eine nicht-kompetitive Bindung von A β (1-42) an die α 7-Untereinheit des nAChR beschrieben [55]. In jedem Fall zeigten beide Arbeiten, dass die Bindung von A β (1-42) an die α 7-

Untereinheit mit hoher Affinität erfolgte. Die Untersuchungen beider Arbeiten sind an Nervenzellen vorgenommen worden, was die Übertragbarkeit der Ergebnisse auf monozytäre Zellen einschränkt. Denn während die nAChRs auf den verwendeten Nervenzellen funktionell Ionenkanäle sind, konnte unsere Arbeitsgruppe zeigen, dass sie auf Monozyten eine metabotrope Funktion haben [103]. Auch unsere Ergebnisse bei Monozyten bestätigen eine Interaktion von A β (1-42) mit den nAChRs. Dennoch lassen sich aus unseren Versuchen keine genauen Wirkungsmechanismen oder Interaktionen von A β (1-42) ableiten und es bleibt offen, ob A β (1-42) von intra- oder extrazellulär wirkte. Erste Erklärungsansätze könnten die Versuche von Halle *et al.* und Lorton *et al.* liefern. Beide Arbeiten erfolgten an Monozyten und wiesen folgende Parallelen auf: Erstens, dass A β (1-42) als zweites Signal wirkte, da die Zellen zuvor mit LPS stimuliert wurden und erst die Gabe von A β (1-42) die IL-1 β -Freisetzung bewirkte. Und zweitens, dass A β (1-42) von den Monozyten phagozytiert werden musste, um seine Wirkung entfalten zu können [34, 57].

Sollte A β (1-42) auch in unseren Versuchen phagozytiert worden sein, besteht die Möglichkeit, dass es intrazellulär als allosterischer Inhibitor an den nAChRs fungiert und die cholinergen Substanzen von den Rezeptoren verdrängt hat. Ein solcher nicht-kompetitiver Mechanismus zeigte sich in den Versuchen von Liu *et al.* an Nervenzellen [55]. Damit ließe sich auch erklären, warum A β (1-42) alleine keinen Effekt auslöst, sondern erst nachdem die nAChRs zuvor durch die cholinergen Substanzen aktiviert worden waren. Weitere Arbeiten werden benötigt, um den genauen Wirkungsmechanismus von A β (1-42) in monozytären Zellen zu erklären.

5.4. Interaktion von A β (1-42) mit den nAChRs

Aufgrund der eingeschränkten Aussagefähigkeit von Experimenten mit Zelllinien (U937), wurden zusätzlich PBMCs gesunder Probanden eingesetzt. Die Versuche mit PBMCs erfolgten mit PC, dem Hauptbestandteil der monozytären nicht-kanonischen nAChR-Agonisten. In den Versuchen wurde die Wirkung der Conopeptide ArIB und RgIA4 mit der Wirkung von A β (1-42) verglichen.

Wie bereits im Kapitel 1.3.1.2 beschrieben, entfaltet PC seine inhibitorische Wirkung über α 7-, α 9- und/oder α 10-Untereinheiten des nAChR. Die im Kapitel 4.1.4 beschriebenen Versuche zeigten, dass A β (1-42) in der Lage war, diesen inhibitorischen Effekt von PC auf die BzATP-induzierte IL-1 β -Freisetzung wieder aufzuheben. A β (1-42) verhielt sich damit ähnlich antagonistisch wie die Conopeptide ArIB (α 7-spezifisch) und

RgIA4 ($\alpha 9/\alpha 10$ -spezifisch). Vergleicht man diese Ergebnisse mit den in Kapitel 4.2.1 beschriebenen Resultaten, wird klar, dass A β (1-42) in U937-Zellen und PBMCs dieselbe Wirkung entfaltete.

Auch wenn A β (1-42) in der Lage war, die inhibitorische Wirkung aller eingesetzten nAChR-Agonisten aufzuheben beziehungsweise abzuschwächen und somit vermutlich mit den $\alpha 7$ -, $\alpha 9$ - und $\alpha 10$ -Untereinheiten interagiert, so deuten die Versuche an, dass die Bindung an die $\alpha 7$ -Untereinheit mit höherer Affinität als an den anderen nAChR-Untereinheiten ($\alpha 9/\alpha 10$) erfolgte. Dies zeigten die Experimente mit GPC und DPPC (Kapitel 1.3.1.2). GPC und der Surfactantbestandteil DPPC inhibierten die BzATP-induzierte IL-1 β -Freisetzung $\alpha 7$ -unabhängig [5, 103].

Die Versuche im Kapitel 4.1.4 zeigten, dass bereits niedrige Konzentrationen von A β (1-42) (2 μ M) zu einer signifikanten Aufhebung der durch ACh und PC ausgelösten Inhibition der BzATP-induzierten IL-1 β -Freisetzung führten. Diesen Effekt konnte man bei Applikation von 2 μ M A β (1-42) zu GPC und DPPC nicht beobachten. Nach vollständiger Inhibition der BzATP-induzierten IL-1 β -Freisetzung durch GPC und DPPC, führte nur eine hohe Dosis von A β (1-42) (5 μ M) zu einer statistisch signifikanten Aufhebung der durch beide Substanzen ausgelösten Inhibition der IL-1 β -Freisetzung. Nach Gabe von 5 μ M A β (1-42) zu den beiden cholinergen Substanzen (GPC und DPPC), wurde die IL-1 β -Konzentrationen im Überstand jeweils halbiert (Kapitel 4.1.4.1). Im Gegensatz dazu, führte die Applikation von 5 μ M A β (1-42) zu ACh und PC zu einer vollständigen Aufhebung der durch beide Substanzen ausgelösten Inhibition der BzATP-induzierten IL-1 β -Freisetzung.

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass A β (1-42) anders als in Neuronen [55] in monozytären Zellen sowohl mit den $\alpha 7$ -, als auch mit den $\alpha 9$ - und $\alpha 10$ -Untereinheiten der nAChRs interagieren kann. Auch wenn die Ergebnisse dieser Arbeit nicht beweisend dafür sind, dass A β (1-42) die stärkste Affinität zur $\alpha 7$ -Untereinheit des nAChR besitzt, zeigen die vorliegenden Ergebnisse eine deutliche Tendenz in diese Richtung: Die Hemmung der BzATP-induzierten IL-1 β -Freisetzung durch ACh und PC, welche neben der $\alpha 9$ - und $\alpha 10$ - auch über die $\alpha 7$ -Untereinheit vermittelt wird [103], konnte durch A β (1-42) vollständig aufgehoben werden (Kapitel 4.1.4).

5.5. S 24795 wirkt als kompletter Agonist am nAChR

Die bisher diskutierten cholinergen Substanzen (PC, ACh, DPPC, GPC) wurden aufgrund ihrer Fähigkeit, die BzATP-induzierte IL-1 β -Freisetzung vollständig zu inhibie-

ren, als Agonisten an monozytären nAChRs beschrieben.

Die Substanz S 24795 wurde in der Literatur als Partialagonist am nAChR beschrieben [56]. In unseren Versuchen wurde diese Substanz ursprünglich zur Untersuchung der Interaktion von A β (1-42) mit der α 7-Untereinheit des nAChR in Monozyten eingesetzt, da in der Literatur gezeigt werden konnte, dass S 24795 einerseits als Modulator an der α 7-Untereinheit fungiert [56] und andererseits über eine direkte Interaktion mit der A β ₁₅₋₂₀-Region von A β (1-42) eine Dissoziation des Moleküls von der α 7-Untereinheit bewirken konnte und damit die neurotoxische Wirkung von A β (1-42) reduzieren konnte [98].

Überraschenderweise zeigten die vorliegenden Experimente, dass S 24795 nicht als partieller Agonist wirkte, sondern als kompletter Agonist seine Wirkung entfaltete – zumindest an den monozytären metabotropen nAChRs. S 24795 konnte die IL-1 β -Freisetzung dosisabhängig vollständig inhibieren (Kapitel 4.1.5). Somit wurde erstmals eine neue Wirkung von S 24795 beschrieben.

Weitere Versuche mit S 24795 und A β (1-42) zeigten, dass A β (1-42) auch hier in der Lage ist, die inhibitorische Wirkung von S 24795 auf die BzATP-induzierte IL-1 β -Freisetzung wieder aufzuheben (Kapitel 4.1.6). S 24795 verhielt sich damit analog zu den cholinergen Substanzen. Dadurch, dass die alleinige Applikation von A β (1-42) in unseren Versuchen keinen Effekt auslöste, war es nicht möglich, die von Wang *et al.* beschriebene Entdeckung, dass S 24795 A β (1-42) von der α 7-Untereinheit des nAChR in Neuronen verdrängt, zu beobachten [99]. Stattdessen zeigten unsere Versuche erstaunlicherweise das Gegenteil: In monozytären Zellen verdrängt A β (1-42) S 24795 vom nAChR. Es werden weitere Untersuchungen benötigt, um das Zusammenspiel beider Substanzen miteinander genauer zu charakterisieren.

5.6. A β (1-42) antagonisiert die Wirkung von CRP am nAChR

Die in der Literatur beschriebene Wirkung von S 24795 an ionotropen nAChRs ähnelt der von Richter *et al.* beschriebenen Wirkung von CRP in elektrophysiologischen Versuchen. In ihren Versuchen war CRP in der Lage, einen durch Cholin induzierten Strom zu reduzieren. Die Autoren folgerten daraus, dass CRP im Sinne eines stillen oder partiellen Agonisten fungiere [78]. Diese Ähnlichkeit von S 24795 und CRP, als Partialagonisten an ionotropen nAChRs, führte zu der Überlegung, ob A β (1-42) auf ähnliche Weise die Wirkung von CRP an monozytären nAChRs beeinflussen könnte.

Tatsächlich zeigten die vorliegenden Versuche erstmalig, dass die Applikation von

A β (1-42) die IL-1 β -Konzentration nach vorheriger Hemmung der BzATP-induzierten IL-1 β -Freisetzung durch PC-gebundenes CRP steigerte (Kapitel 4.1.7). Aufgrund der zentralen Stellung von CRP im Immunsystem stellt diese Erkenntnis eine wichtige Entdeckung dar. Es sind bereits verschiedene pro- und antiinflammatorische Wirkungen von CRP beschrieben worden [6, 92]. Auch bezogen auf die IL-1 β -Freisetzung existieren unterschiedliche Ergebnisse bezüglich der CRP-Wirkung: Während beispielsweise Hanriot *et al.* zeigen konnten, dass CRP selbst eine IL-1 β -Ausschüttung in Monozyten induzieren kann [35], zeigten die Versuche von Eklund *et al.*, dass IL-1 β eine CRP-Freisetzung induzieren kann [22]. Angenommen, dass IL-1 β die CRP-Freisetzung induziert und CRP wiederum, wie in unseren Versuchen, die IL-1 β -Freisetzung inhibiert, wäre die Schlussfolgerung von Richter *et al.*, dass CRP im Sinne eines negativen Feedbacks, die IL-1 β -Freisetzung hemmt und daher die Immunreaktion begrenzt, nur folgerichtig [78]. Insgesamt stellen die Wirkungen und Interaktionen von CRP ein sehr komplexes Thema dar, da CRP in einer Vielzahl von Reaktionen im Körper involviert ist, die entweder auf direktem oder indirektem Wege mit IL-1 β zusammenhängen.

Unsere Beobachtung, dass A β (1-42) die Wirkung von PC-gebundenem CRP an den nAChRs vollständig antagonisieren konnte, ist im Kontext von immunologischen Reaktionen eine wichtige Beobachtung. Damit könnte A β (1-42) in den negativen Feedback-Mechanismus von CRP eingreifen und dadurch die Regulation einer Immunantwort beeinträchtigen.

5.7. Klinische Bedeutung und Ausblick

Die vorliegenden Versuche konnten einige neue Erkenntnisse bezüglich der Wirkung von A β (1-42) und dessen Interaktion mit cholinergen Substanzen und dem Akute-Phase-Protein CRP liefern. Es zeigte sich, dass A β (1-42) die BzATP-induzierte IL-1 β -Freisetzung beeinflusste und zumindest in den hier vorliegenden Versuchen eine proinflammatorische Wirkung hatte.

Mithilfe dieser Ergebnisse könnte eine neue Möglichkeit gezeigt worden sein, die Abläufe einer Immunreaktion genauer zu charakterisieren, da Hinweise existieren, dass A β (1-42) auch im Blut zirkuliert [101]. Wie bereits im Kapitel 1.4.1 beschrieben, kann A β (1-42) von fast allen Körperzellen gebildet werden, da das Enzym BACE und das Vorläuferprotein APP in fast allen Körperzellen exprimiert werden. Darüber hinaus ist beschrieben, dass selbst APP die IL-1 β -Freisetzung in Monozyten induzieren kann [87]. Anhand dieser Erkenntnisse ergibt sich die Notwendigkeit zu untersuchen, welche Wir-

kung eine langandauernde Applikation von A β (1-42) zu Monozyten auslösen könnte und ob sich die hier gezeigte proinflammatorische Wirkung von A β (1-42) allgemein auf das Immunsystem im Menschen übertragen lässt.

Unter der Annahme, die hier beschriebene Wirkung von A β (1-42) gelte auch in vivo, hätte man neue Erkenntnisse zu den Abläufen und Regulationen in Entzündungsprozessen gewonnen. Ein besseres Verständnis dieser Abläufe könnte die Grundlage neuer therapeutischer Ansätze in der Therapie eines SIRS liefern. Vor allem die genauere Charakterisierung der Wirkung von A β (1-42) am nAChR, ist essentiell und könnte wichtig für zukünftige immunmodulatorische Therapieansätze sein.

6. Schlussfolgerung

Aus Vorarbeiten war bereits bekannt, dass für die Sekretion von reifem IL-1 β aus humanen Monozyten zwei Signale benötigt werden. Das erste Signal kann beispielsweise LPS aus der Zellwand gramnegativer Bakterien sein. Diese Substanz bindet mit Hilfe von CD14 und dem Adapterprotein MD-2 (*myeloid differentiation factor 2*) an den TLR-4 und induziert so die Synthese von pro-IL-1 β . Das zweite Gefahrensignal, beispielsweise extrazelluläres ATP, führt zur Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms, welches wiederum die Caspase-1 aktiviert. Aktiviertes Caspase-1 spaltet IL-1 β aus der pro-Form, welches anschließend sezerniert wird und systemisch wirksam ist.

In diese Reaktionskette können cholingruppen-tragende Substanzen eingreifen: Der ATP-Rezeptor P2X7 und nAChRs können sich gegenseitig negativ beeinflussen, wodurch eine Aktivierung der nAChRs zu einer verminderten Aktivität von P2X7 führt und damit auch die IL-1 β -Freisetzung herabsetzt wird.

Die Hypothese, dass A β (1-42) als proinflammatorisches Protein die cholinerge Inhibition der ATP-vermittelten NLRP3-Aktivierung und damit die IL-1 β -Freisetzung aus monozytären Leukozyten moduliert, konnte bestätigt werden. Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass A β (1-42) die durch CRP und cholinerge Substanzen ausgelöste Inhibition der BzATP-vermittelten IL-1 β -Freisetzung aufheben kann. Der genaue Wirkmechanismus, ob A β (1-42) als allosterischer oder kompetitiver Inhibitor die Wirkung der cholinergen Substanzen am nAChR antagonisiert, bleibt jedoch unklar. Was aber gezeigt werden konnte ist, dass A β (1-42) auch in Monozyten eine hohe Affinität zur α 7-Untereinheit der nAChRs besitzt.

Hiermit ist ein neuer proinflammatorischer Wirkmechanismus identifiziert worden, der durch A β (1-42) ausgelöst wird. Diese Erkenntnis kann zukünftig der pharmakologischen Entwicklung neuer antiinflammatorischer Therapiestrategien im Rahmen von Entzündungserkrankungen dienen, da A β (1-42) ein ubiquitär vorhandenes Molekül ist. Weitere Arbeiten werden benötigt, um die genaue Interaktion zwischen A β (1-42) und der α 7-Untereinheit des nAChR zu untersuchen.

7. Zusammenfassung

7.1. Modulation cholinergischer Inhibition der IL-1 β -Sekretion von mononukleären Leukozyten durch A β (1-42)

Hintergrund: Aufgrund der vielfältigen proinflammatorischen Eigenschaften von Interleukin-1 β (IL-1 β) spielt dieses Zytokin eine wichtige Rolle in der Pathogenese von SIRS (*systemic inflammatory response syndrome*). Agonisten an den Untereinheiten $\alpha 7$ und $\alpha 9$ der nikotinischen Acetylcholinrezeptor (nAChR) sind in der Lage die ATP-induzierte NLRP3-abhängige IL-1 β -Ausschüttung von humanen Monozyten zu inhibieren.

Im Gehirn interagieren die nAChRs mit Amyloid- β (1-42), welches ein Spaltprodukt vom APP (*amyloid precursor protein*) ist und eine zentrale proinflammatorische Rolle in der Alzheimererkrankung (AD) spielt.

Hier wird die Hypothese überprüft, dass Amyloid- β (1-42) die cholinerge Inhibition der ATP-vermittelten NLRP3-Aktivierung in proinflammatorischer Wirkung moduliert.

Methoden: Lipopolysaccharid-stimulierte monozytäre U937-Zellen und primäre humane Monozyten wurden mit dem P2X7-Rezeptoragonist 2'(3')-O-(4-benzoylbenzoyl)ATP triethylammonium Salz (BzATP) aktiviert und anschließend mit Amyloid- β , ACh, PC, S 24795 und CRP behandelt. Die IL-1 β -Konzentration wurde im Überstand mittels ELISA gemessen. *Reverse* Amyloid- β (42-1)-Peptide dienten als Kontrolle.

Ergebnisse: Amyloid- β (1-42) inhibierte dosisabhängig die antiinflammatorische Wirkung von ACh, PC und CRP. Alle drei Substanzen sind Agonisten von monozytären $\alpha 7$ -nAChR. Im Gegensatz dazu konnte Amyloid- β seinen proinflammatorischen Effekt nicht wieder ausüben, wenn die $\alpha 9$ -nAChR-Agonisten Glycerophosphocholin oder Dipalmitoyl-Phosphatidylcholin verwendet wurden.

Schlussfolgerung: Hier wird erstmals eine neue proinflammatorische Wirkung von Amyloid- β (1-42) gezeigt, die eine monozytäre IL-1 β -Freisetzung auslöst, trotz Vorhandensein von nAChR-Agonisten.

7.2. A β (1-42) modulates the cholinergic inhibition of ATP-mediated IL-1 β release

Background: Interleukin-1 β (IL-1 β) is one key cytokine in the pathogenesis of SIRS, exerting numerous proinflammatory effects. As shown recently agonists of the nicotinic acetylcholine receptor (nAChR) subunits $\alpha 7$ and $\alpha 9$ are able to inhibit the ATP-mediated NLRP3 dependent IL-1 β release in human monocytes. In brain nAChRs interact with Amyloid- β (1-42), a cleavage product of Amyloid Precursor Protein, which is known to play a proinflammatory role in Alzheimer's Disease.

Here, we hypothesize that amyloid- β (1-42) modulates the cholinergic inhibition of ATP-mediated IL-1 β release.

Methods: Lipopolysaccharide-primed monocytic U937 cells were activated with the P2X7 receptor agonist 2'(3')-O-(4-benzoyl-benzoyl)ATP triethylammonium salt (BzATP) in the presence or absence nAChR agonists and amyloid- β (1-42). Concentrations of IL-1 β were measured in the cell culture supernatant.

Results: Amyloid- β (1-42) but not a corresponding control peptide with a reversed sequence dose-dependently inhibited the anti-inflammatory effect of acetylcholine and phosphocholine, both agonists of monocytic $\alpha 7$ *nAChR . In contrast, amyloid- β (1-42) did not restore IL-1 β secretion, when the $\alpha 9$ * nAChR agonists glycerophosphocholine or dipalmitoyl-phosphatidylcholine were used.

Conclusion: We discovered a novel pro-inflammatory function of amyloid- β (1-42) that enables monocytic IL-1 β release in despite of the presence of nAChR agonists.

8. Abkürzungsverzeichnis

Tabelle 5: Abkürzungen und deren Bedeutung

Abkürzung	Bedeutung
A β	Amyloid-Beta
ACh	Acetylcholin
AD	Alzheimererkrankung
AMPA	α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid
AP-1	Aktivatorprotein-1
APH1	anterior pharynx-defective-1
APLP	APP-like-protein
APP	Amyloid precursor protein
ArIB	[V11L, V16D]ArIB
ASC	apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD
ATP	Adenosintriphosphat
BACE	β -site of APP cleaving enzyme
BzATP	Benzoylbenzoyl-Adenosintriphosphat
Ca ²⁺	Calcium-Ion
CARD	Caspase recruitment Domäne
CD14	cluster of differentiation 14
ChAT	Cholinacetyltransferase
Cl ⁻	Chlorid-Ion
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
COX-2	Cyclooxygenase-2
CRP	C-Reaktives Protein
CTF	C-terminal fragment
DAMP	damage associated molecular pattern
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DPPC	Dipalmitoylphosphatidylcholin
eCRP	endogenes C-reaktive Protein
EDTA	Ethylendiamintetraacetat

ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
FCS	Fetales Kälberserum
G-CSF	Granulocyte-Colony Stimulating Factor
GPBC	G protein-binding cluster
GPC	Glycerophosphocholin
GSI	γ -Sekretase-Inhibitoren
H ₂ O	Wasser
ICE	Interleukin-1 converting enzyme
IL-1 β	Interleukin-1 β
IL-1R	Interleukin-1-Rezeptor
IL-1Ra	Interleukin-1 receptor antagonist
IL-18BP	Interleukin 18 binding protein
IFN	Interferon
IRAK	Interleukin-1-receptor-associated-kinase
IRF3	Interferon regulatory factor 3
JAK2-/STAT3	Janus kinase 2/signal transducer and activator of transcription 3
JNK	c-Jun N-terminal kinase
K ⁺	Kalium-Ion
KH ₂ PO ₄	Kaliumhydrogenphosphat
LDH	Laktatdehydrogenase
LBP	LPS-binding protein
LPS	Lipopolysaccharid
LRP-1	LDL receptor-related-protein-1
LRR	Leucine rich repeat
mAChR	muskarinenger/muskarinischer Acetylcholinrezeptor
MD-2	myeloid differentiation factor 2
MLA	methyllycaconitine
MyD88	differentiation primary response gene 88
Na ⁺	Natrium-Ion
Na ₂ HPO ₄	Natriumhydrogenphosphat
nAChR	nikotinischer Acetylcholinrezeptor

NAD+	Nicotin-Adenin-Dinukleotid
NFκB	nuclear factor „kappa-light-chain-enhancer“ of activated B-cells
NLR	NOD-like-receptor
NLRP1/NALP1	NACHT, LRR, FIIND, CARD domain and PYD domains-containing protein 1
NLRC4	NLR Family CARD Domain Containing 4
NLRP3	NACHT, LRR und PYD Region enthaltendes Protein 3
NO	Stickstoffoxid
NOD	Nukleotid-bindende Oligomerisationsdomäne
P2R	P2-Rezeptor
P2X7R	P2X purinoreceptor 7
PAMP	pathogen associated molecular pattern
PBMC	peripheral blood mononuclear cells
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
PC	Phosphorylcholin
PRR	Pathogen recognition receptors
PS	Presenilin
PYD	Pyrin-Domäne
rhAPC	rekombinantes aktiviertes Protein C
rhCRP	rekombinantes humanes C-reaktive Protein
S 24795	2-(2-(4-bromophenyl)-2-oxoethyl)-1-methyl pyridinium
SAP	Serum-Amyloid P
sAPP	soluble Amyloid precursor protein
SIRS	Systemic inflammatory response syndrome
TIR	Toll-IL-Rezeptor
TLR	Toll-Like-Rezeptor

TNF- α	Tumornekrosefaktor α
TRAF6	TNF Receptor Associated Factor 6
TRIF	TIR domain-containing adaptor-inducing IFN- β
ZNS	Zentrales Nervensystem

9. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung der Reaktionen nach Toll-Like-Rezeptor-(TLR)-4-Aktivierung	4
Abbildung 2: Inflammation und -aktivierung	6
Abbildung 3: Schematischer Aufbau des monozytären nikotinischen Acetylcholinrezeptors (nAChR)	9
Abbildung 4: Kanonische und nicht-kanonische Acetylcholinrezeptoren (nAChR)	11
Abbildung 5: Schematische Darstellung der Amyloid- β -(1-42)-Bildung	14
Abbildung 6: Schematische Darstellung der Interleukin-1 β -Produktion	17
Abbildung 7: Zeitleiste der U937-Versuche	23
Abbildung 8: Amyloid- β ($A\beta$)(1-42) macht den inhibitorischen Effekt von Acetylcholin (ACh) auf die Benzoylbenzoyl-Adenosintri-phosphat-(BzATP)-induzierte Interleukin-(IL)-1 β -Ausschüttung wieder rückgängig	28
Abbildung 9: Die Laktatdehydrogenase-(LDH)-Freisetzung aus Lipopolysaccharid-(LPS)-vorstimulierten und mit Benzoylbenzoyl-Adenosintri-phosphat (BzATP) inkubierten Zellen in Abhängigkeit von Acetylcholin (ACh) und Amyloid- β ($A\beta$)(1-42)	29
Abbildung 10: Amyloid- β ($A\beta$)(1-42) übt keinerlei Einfluss auf die Interleukin-(IL)-1 β -Freisetzung aus Lipopolysaccharid-(LPS)-vorstimulierten U937-Zellen aus	30
Abbildung 11: Laktatdehydrogenase-(LDH)-Freisetzung aus Lipopolysaccharid-(LPS)-vorstimulierten und mit Benzoylbenzoyl-Adenosintri-phosphat (BzATP) inkubierten Zellen in Abhängigkeit von Amyloid- β ($A\beta$)(1-42)	30
Abbildung 12: Effekt unterschiedlicher Amyloid- β -($A\beta$)(42-1)-Konzentrationen auf die Interleukin-(IL)-1 β -Freisetzung von Lipopolysaccharid-(LPS)-vorstimulierten U937-Zellen	31
Abbildung 13: Laktatdehydrogenase-(LDH)-Freisetzung aus Lipopolysaccharid-(LPS)-vorstimulierten und mit Benzoylbenzoyl-Adenosintri-phosphat (BzATP) inkubierten U937-Zellen in Abhängigkeit von Amyloid- β ($A\beta$)(42-1) und Acetylcholin (ACh)	32
Abbildung 14: Amyloid- β ($A\beta$)(1-42) schwächt die cholinerg-vermittelte Inhibition der Benzoylbenzoyl-Adenosintri-phosphat-(BzATP)-induzierten Interleukin-(IL)-1 β -Freisetzung aus U937-Zellen ab	33

- Abbildung 15:** Laktatdehydrogenase-(LDH)-Freisetzung aus Lipopolysaccharid-(LPS)-vorstimulierten und mit Benzoylbenzoyl-Adenosintriphosphat (BzATP) inkubierten U937-Zellen in Abhängigkeit von cholinergen Substanzen _____ 34
- Abbildung 16:** Effekt von Amyloid- β (A β)(1-42) auf die durch Glycerophosphocholin (GPC) und Dipalmitoylphosphatidylcholin (DPPC) ausgelöste Inhibition der Benzoylbenzoyl-Adenosintriphosphat-(BzATP)-induzierten Interleukin-(IL)-1 β -Ausschüttung aus U937-Zellen _____ 35
- Abbildung 17:** Laktatdehydrogenase-(LDH)-Freisetzung aus Lipopolysaccharid-(LPS)-vorstimulierten und mit Benzoylbenzoyl-Adenosintriphosphat (BzATP) inkubierten Zellen in Abhängigkeit von Glycerophosphocholin (GPC), Dipalmitoylphosphatidylcholin (DPPC) und Amyloid- β _____ 36
- Abbildung 18:** Inhibition der Benzoylbenzoyl-Adenosintriphosphat-(BzATP)-induzierten Interleukin-(IL)-1 β -Freisetzung aus U937-Zellen durch 2-[2-(4-bromophenyl)-2-oxoethyl]-1-methyl pyridinium (S 24795) _____ 37
- Abbildung 19:** Laktatdehydrogenase-(LDH)-Freisetzung aus Lipopolysaccharid-(LPS)-vorstimulierten und mit Benzoylbenzoyl-Adenosintriphosphat (BzATP) inkubierten U937-Zellen in Abhängigkeit von 2-[2-(4-bromophenyl)-2-oxoethyl]-1-methyl pyridinium (S 24795) _____ 38
- Abbildung 20:** Amyloid- β (A β)(1-42) hebt die inhibitorische Wirkung von 2-[2-(4-bromophenyl)-2-oxoethyl]-1-methyl pyridinium (S 24795) auf die Benzoylbenzoyl-Adenosintriphosphat-(BzATP)-induzierte Interleukin-(IL)-1 β -Freisetzung auf _____ 39
- Abbildung 21:** Laktatdehydrogenase-(LDH)-Freisetzung aus Lipopolysaccharid-(LPS)-vorstimulierten und mit Benzoylbenzoyl-Adenosintriphosphat (BzATP) inkubierten Zellen in Abhängigkeit von 2-[2-(4-bromophenyl)-2-oxoethyl]-1-methyl pyridinium (S 24795) und Amyloid- β _____ 40
- Abbildung 22:** Effekt von Amyloid- β (A β)(1-42) auf nikotinische Acetylcholinrezeptor-(nAChR)-Agonisten _____ 41
- Abbildung 23:** Laktatdehydrogenase-Freisetzung aus Lipopolysaccharid-vorstimulierten und mit Benzoylbenzoyl-Adenosintriphosphat inkubierten Zellen in Abhängigkeit von Cholinergika, C-reaktives Protein, 2-[2-(4-bromophenyl)-2-oxoethyl]-1-methylpyridinium und Amyloid- β _____ 42
- Abbildung 24:** Amyloid- β (A β)(1-42) und Conopeptide hemmen die inhibitorische Wirkung durch Phosphocholin (PC) auf die Interleukin-(IL)-1 β -Freisetzung aus

Lipopolysaccharid-(LPS)-vorstimulierten mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMCs) _____ 44

Abbildung 25: Laktatdehydrogenase-(LDH)-Freisetzung aus Lipopolysaccharid-(LPS)-vorstimulierten und mit Benzoylbenzoyl-Adenosintriposphat (BzATP) inkubierten Zellen in Abhängigkeit von Phosphocholin (PC), Amyloid- β ($A\beta$)(1-42), RgIA4 und [V11L;V16D]ArIB (ArIB) _____ 45

10. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Substanzen und deren Hersteller _____	19
Tabelle 2: Materialien und deren Hersteller _____	20
Tabelle 3: Geräte / Software und deren Hersteller _____	21
Tabelle 4: Substanzen der unterschiedlichen Versuchsansätze und ihre Konzentrationen _____	23
Tabelle 5: Abkürzungen und deren Bedeutung _____	56

11. Literaturverzeichnis

- [1] Allan, S.M. et al. 2005. Interleukin-1 and neuronal injury. *Nature Reviews Immunology*.
- [2] Arend, W.P. et al. 2008. IL-1, IL-18, and IL-33 families of cytokines. *Immunological Reviews*.
- [3] Arend, W.P. et al. 1998. INTERLEUKIN-1 RECEPTOR ANTAGONIST: Role in Biology. *Annual Review of Immunology*. (1998). DOI:<https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.16.1.27>.
- [4] Armant, M.A. and Fenton, M.J. 2002. Toll-like receptors: A family of pattern-recognition receptors in mammals. *Genome Biology*.
- [5] Backhaus, S. et al. 2017. Surfactant inhibits ATP-induced release of interleukin-1 via nicotinic acetylcholine receptors. *Journal of Lipid Research*. (2017). DOI:<https://doi.org/10.1194/jlr.M071506>.
- [6] Ballou, S.P. and Lozanski, G. 1992. Induction of inflammatory cytokine release from cultured human monocytes by C-reactive protein. *Cytokine*. (1992). DOI:[https://doi.org/10.1016/1043-4666\(92\)90079-7](https://doi.org/10.1016/1043-4666(92)90079-7).
- [7] Barton, G.M. and Kagan, J.C. 2009. A cell biological view of toll-like receptor function: Regulation through compartmentalization. *Nature Reviews Immunology*.
- [8] Boraschi, D. and Tagliabue, A. 2013. The interleukin-1 receptor family. *Seminars in Immunology*.
- [9] Burghaus, L. et al. 2000. Quantitative assessment of nicotinic acetylcholine receptor proteins in the cerebral cortex of Alzheimer patients. *Molecular Brain Research*. (2000). DOI:[https://doi.org/10.1016/S0169-328X\(00\)00031-0](https://doi.org/10.1016/S0169-328X(00)00031-0).
- [10] Caillé, I. et al. 2004. Soluble form of amyloid precursor protein regulates proliferation of progenitors in the adult subventricular zone. *Development*. (2004). DOI:<https://doi.org/10.1242/dev.01103>.
- [11] Chanput, W. et al. 2015. THP-1 and U937 cells. *The Impact of Food Bioactives*

on Health: In Vitro and Ex Vivo Models.

- [12] Chen, G. et al. 2009. NOD-Like Receptors: Role in Innate Immunity and Inflammatory Disease. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*. (2009). DOI:<https://doi.org/10.1146/annurev.pathol.4.110807.092239>.
- [13] Clark, I.A. and Vissel, B. 2015. Amyloid β : one of three danger-associated molecules that are secondary inducers of the proinflammatory cytokines that mediate Alzheimer's disease. *British Journal of Pharmacology*.
- [14] Coddou, C. et al. 2011. Activation and regulation of purinergic P2X receptor channels. *Pharmacological Reviews*. (2011). DOI:<https://doi.org/10.1124/pr.110.003129>.
- [15] Colotta, F. et al. 1993. Interleukin-1 type II receptor: A decoy target for IL-1 that is regulated by IL-4. *Science*. (1993). DOI:<https://doi.org/10.1126/science.8332913>.
- [16] Corradi, J. and Bouzat, C. 2016. Understanding the bases of function and modulation of $\alpha 7$ nicotinic receptors: implications for drug discovery. *Molecular Pharmacology*.
- [17] Crown, J. et al. 1993. Interleukin-1: Biological effects in human hematopoiesis. *Leukemia and Lymphoma*. (1993). DOI:<https://doi.org/10.3109/10428199309145750>.
- [18] D'Uscio, L. V. et al. 2017. Expression and processing of amyloid precursor protein in vascular endothelium. *Physiology*.
- [19] Dawson, G.R. et al. 1999. Age-related cognitive deficits, impaired long-term potentiation and reduction in synaptic marker density in mice lacking the β -amyloid precursor protein. *Neuroscience*. (1999). DOI:[https://doi.org/10.1016/S0306-4522\(98\)00410-2](https://doi.org/10.1016/S0306-4522(98)00410-2).
- [20] Dinarello, C.A. 2009. Immunological and Inflammatory Functions of the Interleukin-1 Family. *Annual Review of Immunology*. 27, 1 (Apr. 2009), 519–550. DOI:<https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.021908.132612>.
- [21] Dinarello, C.A. 1998. Interleukin-1 β , interleukin-18, and the interleukin-1 β

- converting enzyme. *Annals of the New York Academy of Sciences* (1998).
- [22] Eklund, C.M. 2009. Chapter 5 Proinflammatory cytokines in CRP baseline regulation. *Advances in Clinical Chemistry*.
- [23] Ewins, A.J. 1914. Acetylcholine, a New Active Principle of Ergot. *Biochemical Journal*. (1914). DOI:<https://doi.org/10.1042/bj0080044>.
- [24] Fassbender, K. et al. 2004. The LPS receptor (CD14) links innate immunity with Alzheimer's disease. *The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. (2004). DOI:<https://doi.org/10.1096/fj.03-0364fje>.
- [25] Feldman, N. et al. 2015. DAMPs as mediators of sterile inflammation in aging-related pathologies. *Ageing Research Reviews*.
- [26] Fujii, T. et al. 2008. Basic and clinical aspects of non-neuronal acetylcholine: Expression of an independent, non-neuronal cholinergic system in lymphocytes and its clinical significance in immunotherapy. *Journal of Pharmacological Sciences*.
- [27] Fujii, T. et al. 2017. Expression and function of the cholinergic system in immune cells. *Frontiers in Immunology*.
- [28] Gershov, D. et al. 2000. C-reactive protein binds to apoptotic cells, protects the cells from assembly of the terminal complement components, and sustains an antiinflammatory innate immune response: Implications for systemic autoimmunity. *Journal of Experimental Medicine*. (2000). DOI:<https://doi.org/10.1084/jem.192.9.1353>.
- [29] Grabitzki, J. et al. 2008. The PCome of *Caenorhabditis elegans* as a prototypic model system for parasitic nematodes: Identification of phosphorylcholine-substituted proteins. *Molecular and Biochemical Parasitology*. (2008). DOI:<https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2008.06.014>.
- [30] Grabitzki, J. and Lochnit, G. 2009. Immunomodulation by phosphocholine-Biosynthesis, structures and immunological implications of parasitic PC-epitopes. *Molecular Immunology*.

- [31] Grau, V. et al. 2019. Conopeptides [V11L;V16D]Arib and RGIA4: Powerful tools for the identification of novel nicotinic acetylcholine receptors in monocytes. *Frontiers in Pharmacology*. (2019). DOI:<https://doi.org/10.3389/fphar.2018.01499>.
- [32] Guan, Z.Z. et al. 2002. Selective changes in the levels of nicotinic acetylcholine receptor protein and of corresponding mRNA species in the brains of patients with Parkinson's disease. *Brain Research*. (2002). DOI:[https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(02\)03571-0](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(02)03571-0).
- [33] Halle, A. et al. 2008. The NALP3 inflammasome is involved in the innate immune response to amyloid- β . *Nature Immunology*. (2008). DOI:<https://doi.org/10.1038/ni.1636>.
- [34] Halle, A. et al. 2008. The NALP3 inflammasome is involved in the innate immune response to amyloid- β . *Nature Immunology*. (2008). DOI:<https://doi.org/10.1038/ni.1636>.
- [35] Hanriot, D. et al. 2008. C-reactive protein induces pro- and anti-inflammatory effects, including activation of the liver X receptor α , on human monocytes. *Thrombosis and Haemostasis*. (2008). DOI:<https://doi.org/10.1160/TH07-06-0410>.
- [36] Hecker, A. et al. 2014. Diagnosis and therapy of an acute abdomen. *Medizinische Klinik - Intensivmedizin und Notfallmedizin*. (2014). DOI:<https://doi.org/10.1007/s00063-013-0335-y>.
- [37] Hecker, A. et al. 2014. Diagnostics, therapy and outcome prediction in abdominal sepsis: Current standards and future perspectives. *Langenbeck's Archives of Surgery*.
- [38] Hecker, A. et al. 2015. Phosphocholine-modified macromolecules and canonical nicotinic agonists inhibit ATP-induced IL-1 β release. *Journal of Immunology*. 195, 5 (2015). DOI:<https://doi.org/10.4049/jimmunol.1400974>.
- [39] Hecker, A. et al. 2015. Phosphocholine-Modified Macromolecules and Canonical Nicotinic Agonists Inhibit ATP-Induced IL-1 β Release. *The Journal of Immunology*. (2015). DOI:<https://doi.org/10.4049/jimmunol.1400974>.

- [40] Hecker, A. et al. 2015. The impact of early surgical intervention in free intestinal perforation: A time-to-intervention pilot study. *World Journal of Emergency Surgery*. 10, 1 (2015). DOI:<https://doi.org/10.1186/s13017-015-0047-0>.
- [41] Iwasaki, A. and Medzhitov, R. 2015. Control of adaptive immunity by the innate immune system. *Nature Immunology*.
- [42] Iwasaki, A. and Medzhitov, R. 2004. Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nature Immunology*.
- [43] Jayasena, T. et al. 2015. Upregulation of glycolytic enzymes, mitochondrial dysfunction and increased cytotoxicity in glial cells treated with Alzheimer's disease plasma. *PLoS ONE*. (2015). DOI:<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0116092>.
- [44] Kabbani, N. et al. 2013. Are nicotinic acetylcholine receptors coupled to G proteins? *BioEssays*. (2013). DOI:<https://doi.org/10.1002/bies.201300082>.
- [45] Kanneganti, T.D. et al. 2006. Bacterial RNA and small antiviral compounds activate caspase-1 through cryopyrin/Nalp3. *Nature*. (2006). DOI:<https://doi.org/10.1038/nature04517>.
- [46] Kar, S. et al. 1996. β -Amyloid-related peptides inhibit potassium-evoked acetylcholine release from rat hippocampal slices. *Journal of Neuroscience*. (1996). DOI:<https://doi.org/10.1523/jneurosci.16-03-01034.1996>.
- [47] Kawasaki, T. and Kawai, T. 2014. Toll-like receptor signaling pathways. *Frontiers in Immunology*.
- [48] Kawashima, K. and Fujii, T. 2000. Extraneuronal cholinergic system in lymphocytes. *Pharmacology and Therapeutics*.
- [49] Khakh, B.S. et al. 2005. An angstrom scale interaction between plasma membrane ATP-gated P2X 2 and $\alpha 4\beta 2$ nicotinic channels measured with fluorescence resonance energy transfer and total internal reflection fluorescence microscopy. *Journal of Neuroscience*. (2005). DOI:<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0561-05.2005>.
- [50] King, J.R. et al. 2015. Identification and characterization of a G protein-binding

- cluster in $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptors. *Journal of Biological Chemistry*. (2015). DOI:<https://doi.org/10.1074/jbc.M115.647040>.
- [51] Kuemmerle-Deschner, J.B. et al. 2013. Treatment of Muckle-Wells syndrome: Analysis of two IL-1-blocking regimens. *Arthritis Research and Therapy*. (2013). DOI:<https://doi.org/10.1186/ar4237>.
- [52] Kumar, P. et al. 2018. Analysis of cell viability by the lactate dehydrogenase assay. *Cold Spring Harbor Protocols*. (2018). DOI:<https://doi.org/10.1101/pdb.prot095497>.
- [53] Lang, T. et al. 2018. Macrophage migration inhibitory factor is required for NLRP3 inflammasome activation. *Nature Communications*. (2018). DOI:<https://doi.org/10.1038/s41467-018-04581-2>.
- [54] Li, Z. et al. 2020. Role of the NLRP3 inflammasome in autoimmune diseases. *Biomedicine and Pharmacotherapy*.
- [55] Liu, Q.S. et al. 2001. β -Amyloid peptide blocks the response of $\alpha 7$ -containing nicotinic receptors on hippocampal neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. (2001). DOI:<https://doi.org/10.1073/pnas.081553598>.
- [56] Lopez-Hernandez, G. et al. 2007. Partial agonist and neuromodulatory activity of S 24795 for $\alpha 7$ nAChR responses of hippocampal interneurons. *Neuropharmacology*. (2007). DOI:<https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2007.04.007>.
- [57] Lorton, D. et al. 1996. β -Amyloid induces increased release of interleukin-1 β from lipopolysaccharide-activated human monocytes. *Journal of Neuroimmunology*. (1996). DOI:[https://doi.org/10.1016/0165-5728\(96\)00030-6](https://doi.org/10.1016/0165-5728(96)00030-6).
- [58] Mantovani, A. et al. 2008. Pentraxins in innate immunity: From C-reactive protein to the long pentraxin PTX3. *Journal of Clinical Immunology*.
- [59] Mariathasan, S. and Monack, D.M. 2007. Inflammasome adaptors and sensors: Intracellular regulators of infection and inflammation. *Nature Reviews Immunology*.

- [60] Martinon, F. et al. 2002. The Inflammasome: A molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL- β . *Molecular Cell*. (2002). DOI:[https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(02\)00599-3](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(02)00599-3).
- [61] Medzhitov, R. et al. 1998. MyD88 is an adaptor protein in the hToll/IL-1 receptor family signaling pathways. *Molecular Cell*. (1998). DOI:[https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(00\)80136-7](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(00)80136-7).
- [62] Mendoza-Coronel, E. and Castañón-Arreola, M. 2016. Comparative evaluation of in vitro human macrophage models for mycobacterial infection study. *Pathogens and Disease*. (2016). DOI:<https://doi.org/10.1093/femspd/ftw052>.
- [63] Migliorini, P. et al. 2020. The IL-1 family cytokines and receptors in autoimmune diseases. *Autoimmunity Reviews*.
- [64] Miklós, I. and Zádori, Z. 2012. Positive evolutionary selection of an hd motif on alzheimer precursor protein orthologues suggests a functional role. *PLoS Computational Biology*. (2012). DOI:<https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1002356>.
- [65] Miyazawa, A. et al. 2003. Structure and gating mechanism of the acetylcholine receptor pore. *Nature*. (2003). DOI:<https://doi.org/10.1038/nature01748>.
- [66] Mold, C. et al. 1999. Regulation of complement activation by C-reactive protein. *Immunopharmacology* (1999).
- [67] Muñoz-Planillo, R. et al. 2013. K⁺ Efflux Is the Common Trigger of NLRP3 Inflammasome Activation by Bacterial Toxins and Particulate Matter. *Immunity*. (2013). DOI:<https://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.05.016>.
- [68] Murphy, M.P. and Levine, H. 2010. Alzheimer's disease and the amyloid- β peptide. *Journal of Alzheimer's Disease*.
- [69] Le Novère, N. and Changeux, J.P. 1995. Molecular evolution of the nicotinic acetylcholine receptor: An example of multigene family in excitable cells. *Journal of Molecular Evolution*. (1995). DOI:<https://doi.org/10.1007/BF00167110>.
- [70] Numerof, R.P. et al. 2005. Cytokines as potential therapeutic targets for

inflammatory skin diseases. *European Cytokine Network*.

- [71] O'Neill, M.J. et al. 2002. The role of neuronal nicotinic acetylcholine receptors in acute and chronic neurodegeneration. *Current drug targets. CNS and neurological disorders*.
- [72] Ohsawa, I. et al. 1999. Amino-terminal region of secreted form of amyloid precursor protein stimulates proliferation of neural stem cells. *European Journal of Neuroscience*. (1999). DOI:<https://doi.org/10.1046/j.1460-9568.1999.00601.x>.
- [73] Pasare, C. and Medzhitov, R. 2004. Toll-like receptors and acquired immunity. *Seminars in Immunology*. (2004). DOI:<https://doi.org/10.1016/j.smim.2003.10.006>.
- [74] Pepys, M.B. and Hirschfield, G.M. 2003. C-reactive protein: A critical update. *Journal of Clinical Investigation*.
- [75] Perregaux, D.G. and Gabel, C.A. 1998. Post-translational processing of murine IL-1: evidence that ATP-induced release of IL-1 alpha and IL-1 beta occurs via a similar mechanism. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*. (1998).
- [76] Ray, S. et al. 2007. Classification and prediction of clinical Alzheimer's diagnosis based on plasma signaling proteins. *Nature Medicine*. (2007). DOI:<https://doi.org/10.1038/nm1653>.
- [77] Richter, K. et al. 2020. Amyloid beta peptide (A β 1-42) reverses the cholinergic control of monocyte IL-1 β release. *Journal of Clinical Medicine*. (2020). DOI:<https://doi.org/10.3390/jcm9092887>.
- [78] Richter, K. et al. 2018. C-Reactive Protein Stimulates Nicotinic Acetylcholine Receptors to Control ATP-Mediated Monocyte Inflammation Activation. *Frontiers in Immunology*. (2018). DOI:<https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01604>.
- [79] Richter, K. et al. 2016. Phosphocholine-an agonist of metabotropic but not of ionotropic functions of α 9-containing nicotinic acetylcholine receptors. *Scientific Reports*. (2016). DOI:<https://doi.org/10.1038/srep28660>.
- [80] Salminen, A. et al. 2008. Amyloid- β oligomers set fire to inflammasomes and

- induce Alzheimer's pathology: Alzheimer Review Series. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. (2008). DOI:<https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2008.00496.x>.
- [81] Schindler, R. et al. 1990. IL-1 induces IL-1. IV. IFN-gamma suppresses IL-1 but not lipopolysaccharide-induced transcription of IL-1. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*. (1990).
- [82] Searl, T.J. et al. 1998. Mutual occlusion of P2X ATP receptors and nicotinic receptors on sympathetic neurons of the guinea-pig. *Journal of Physiology*. (1998). DOI:<https://doi.org/10.1111/j.1469-7793.1998.783bj.x>.
- [83] Seman, M. et al. 2003. NAD-induced T cell death: ADP-ribosylation of cell surface proteins by ART2 activates the cytolytic P2X7 purinoceptor. *Immunity*. (2003). DOI:[https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(03\)00266-8](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(03)00266-8).
- [84] Shytle, R.D. et al. 2004. Cholinergic modulation of microglial activation by $\alpha 7$ nicotinic receptors. *Journal of Neurochemistry*. (2004). DOI:<https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2004.02347.x>.
- [85] Skok, M. V. 2009. Editorial: To channel or not to channel? Functioning of nicotinic acetylcholine receptors in leukocytes. *Journal of Leukocyte Biology*. (2009). DOI:<https://doi.org/10.1189/jlb.0209106>.
- [86] Sluyter, R. 2017. The P2X7 receptor. *Advances in Experimental Medicine and Biology*.
- [87] Sondag, C.M. and Combs, C.K. 2004. Amyloid Precursor Protein Mediates Proinflammatory Activation of Monocytic Lineage Cells. *Journal of Biological Chemistry*. (2004). DOI:<https://doi.org/10.1074/jbc.M313747200>.
- [88] Sundström, C. and Nilsson, K. 1976. Establishment and characterization of a human histiocytic lymphoma cell line (U-937). *International Journal of Cancer*. (1976). DOI:<https://doi.org/10.1002/ijc.2910170504>.
- [89] Takeda, K. and Akira, S. 2004. TLR signaling pathways. *Seminars in Immunology*. (2004). DOI:<https://doi.org/10.1016/j.smim.2003.10.003>.
- [90] Takeda, K. and Akira, S. 2015. Toll-Like receptors. *Current Protocols in*

- Immunology*. (2015). DOI:<https://doi.org/10.1002/0471142735.im1412s109>.
- [91] Thompson, D. et al. 1999. The physiological structure of human C-reactive protein and its complex with phosphocholine. *Structure*. (1999). DOI:[https://doi.org/10.1016/S0969-2126\(99\)80023-9](https://doi.org/10.1016/S0969-2126(99)80023-9).
- [92] Tilg, H. et al. 1993. Antiinflammatory properties of hepatic acute phase proteins: Preferential induction of interleukin 1 (IL-1) receptor antagonist over IL-1 β synthesis by human peripheral blood mononuclear cells. *Journal of Experimental Medicine*. (1993). DOI:<https://doi.org/10.1084/jem.178.5.1629>.
- [93] Uhle, F. et al. 2015. Role of the RAGE Axis during the Immune Response after Severe Trauma: A Prospective Pilot Study. *Mediators of Inflammation*. (2015). DOI:<https://doi.org/10.1155/2015/691491>.
- [94] Vassar, R. et al. 1999. β -Secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE. *Science*. (1999). DOI:<https://doi.org/10.1126/science.286.5440.735>.
- [95] Di Virgilio, F. et al. 2017. The P2X7 Receptor in Infection and Inflammation. *Immunity*.
- [96] Walsh, J.G. et al. 2014. Inflammasomes in the CNS. *Nature Reviews Neuroscience*.
- [97] Walters, A. et al. 2016. Evidence for neuroinflammation in Alzheimer's disease. *Progress in Neurology and Psychiatry*.
- [98] Wang, H.-Y. et al. 2009. Dissociating β -Amyloid from $\alpha 7$ Nicotinic Acetylcholine Receptor by a Novel Therapeutic Agent, S 24795, Normalizes $\alpha 7$ Nicotinic Acetylcholine and NMDA Receptor Function in Alzheimer's Disease Brain. *Journal of Neuroscience*. (2009). DOI:<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.6088-08.2009>.
- [99] Wang, H.Y. et al. 2010. S 24795 Limits β -Amyloid- $\alpha 7$ Nicotinic Receptor Interaction and Reduces Alzheimer's Disease-Like Pathologies. *Biological Psychiatry*. (2010). DOI:<https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2009.09.031>.
- [100] Wang, H.Y. et al. 2000. β -Amyloid1-42 binds to $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine

- receptor with high affinity. Implications for Alzheimer's disease pathology. *Journal of Biological Chemistry*. (2000). DOI:<https://doi.org/10.1074/jbc.275.8.5626>.
- [101] Wolfe, H. et al. 2019. Monocytes exposed to plasma from patients with Alzheimer's disease undergo metabolic reprogramming. *Neuroscience Research*. (2019). DOI:<https://doi.org/10.1016/j.neures.2019.01.001>.
- [102] Wright, S.D. et al. 1990. CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. *Science*. (1990). DOI:<https://doi.org/10.1126/science.1698311>.
- [103] Zakrzewicz, A. et al. 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*. (2017). DOI:<https://doi.org/10.3389/fncel.2017.00189>.
- [104] Zhang, Y.W. et al. 2011. APP processing in Alzheimer's disease. *Molecular Brain*.
- [105] Zhong, W. et al. 1998. Effect of human C-reactive protein on chemokine and chemotactic factor-induced neutrophil chemotaxis and signaling. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*. (1998).

12. Publikationsverzeichnis

A. Hecker, **R. Ogiemwonyi-Schaefer**, S. Wilker, A. Zakrzewicz, W. Padberg, V. Grau 2017. Die Rolle des Amyloid-Precursor-Proteins (APP) und seines Spaltproduktes Amyloid- β (1-42) bei der Regulation hyperinflammatorischer monozytärer Zellen. Wissenschaftliches Poster, *Mittelrheiner 2017*.

K. Richter, **R. Ogiemwonyi-Schaefer**, S. Wilker, A.I. Chaveiro, A. Agné, M. Hecker, M. Reichert, A. Amati, K. Schlüter, I. Manzini, G. Schmalzing, J. M. McIntosh, W. Padberg, V. Grau, A. Hecker 2020. Amyloid beta peptide ($A\beta$ 1-42) reverses the cholinergic control of monocytic IL-1 β -release.

Journal of Clinical Medicine 2020. DOI:<https://doi.org/10.3390/jcm9092887>.

13. Erklärung zur Dissertation

„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, oder habe diese nachstehend spezifiziert. Die vorgelegte Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt. 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

14. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei Herrn PD. Dr. med. Andreas Hecker bedanken, einerseits für die freundliche Überlassung dieser Arbeit, andererseits für die engagierte, geduldige, freundliche und kollegiale Unterstützung während der letzten fünf Jahre.

Des Weiteren möchte ich mich bei Frau Prof. Dr. Veronika Grau, Leiterin der Sektion der experimentellen Chirurgie der Klinik für Allgemein-, Thorax-, Viszeral-, Transplantations- und Kinderchirurgie, für ihre zahlreichen konstruktiven Hilfestellungen bedanken.

Herzlichen Dank auch an Dr. Katrin Richter, die sich für mich, meine Fragen und Probleme immer gerne Zeit genommen hat.

Ganz herzlich möchte ich mich auch beim restlichen Laborteam der Sektion der experimentellen Chirurgie der Klinik für Allgemein-, Thorax-, Viszeral-, Transplantations- und Kinderchirurgie bedanken, das mich stets freundlich begleitet hat und für Fragen immer zur Verfügung stand. An dieser Stelle seien Kathrin Petri, Gabriele Fuchs-Moll, Sabine Stumpf und Sigrid Wilker genannt. Insbesondere Sigrid Wilker möchte ich danken. Neben einer freundlichen und geduldigen Einarbeitung hatte ich jederzeit die Möglichkeit, mich mit meinen Fragen an sie zu wenden und von ihrem reichen Erfahrungsschatz zu profitieren.

Abschließend möchte ich mich bei meiner Familie bedanken, die mich immer uneingeschränkt unterstützt hat. Ihr habe ich meinen beruflichen und privaten Werdegang zu verdanken. Auch sind mir meine Eltern bei der Fertigstellung der Arbeit stets mit Rat und Tat zur Seite gestanden. Ein besonderer Dank gilt auch meiner Partnerin Romina Zimmermann, die mir, seit wir uns kennen, immer den Rücken freigehalten hat.

Diese Arbeit ist meiner im Jahre 2019 verstorbenen Großmutter, Mrs. Janet Ogiemwonyi, gewidmet. Sie hat maßgeblich zur Bildung meiner Persönlichkeit beigetragen.

Vielen Dank!