

β -NAD inhibiert die ATP-induzierte Freisetzung von Interleukin-1 β aus humanen U937-Zellen

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

vorgelegt von Sebastian Daniel Hiller
aus Hannover

Mainz (2020)

Aus dem Fachbereich Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

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

Sektion Experimentelle Chirurgie

Gutachterin: Prof. Dr. rer. nat. Veronika Grau

Gutachter: Prof. Dr. med. Gregor Bein

Tag der Disputation: 06.07.2021

Die vorliegende Arbeit wurde von der Landes-Offensive zur Entwicklung Wissenschaftlich-ökonomischer Exzellenz (LOEWE) des Landes Hessen gefördert. Sie wurde in der Klinik für Allgemein-, Viszeral-, Thorax-, Transplantations- und Kinderchirurgie (Direktor: Prof. Dr. med. Dr. h.c. Winfried Padberg) in der Sektion Experimentelle Chirurgie unter der Leitung von Prof. Dr. rer. nat. Veronika Grau angefertigt. Das Thema sowie das Labor wurden ebenfalls von Prof. Dr. rer. nat. Veronika Grau gestellt, unter deren Betreuung die Arbeit entstand. Die Sektion Experimentelle Chirurgie ist zudem Teil des Excellence Cluster Cardio Pulmonary Institute (CPI) sowie des Deutschen Zentrum für Lungenforschung (DZL).

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

1. Einleitung.....	1
1.1.Das angeborene Immunsystem	1
1.2.Ablauf der angeborenen Immunantwort	2
1.3.Toll-like-Rezeptor 4	4
1.4.NLRP3-Inflammasom	5
1.5.Interleukin-1 β	6
1.6.Nikotinamidadenindinukleotid.....	8
1.7.Rezeptoren.....	11
1.7.1.Purinrezeptoren.....	11
1.7.2.Nikotinische Acetylcholinrezeptoren	12
1.8.Fragestellung der Dissertation.....	12
2. Materialien und Methoden.....	13
2.1.Materialien und Geräte.....	13
2.1.1.Geräte	13
2.1.2.Verbrauchsmaterial	14
2.1.3.Reagenzien	14
2.1.4.Lösungen und Puffer	19
2.1.5.Acrylamidgele	24
2.1.6.Antikörper.....	25
2.1.7.Primer	25
2.1.8.siRNA	26
2.1.9.Software.....	26
2.2.Methoden.....	27
2.2.1.Zellkultur	27
2.2.2.siRNA-Transfektion	29

2.2.3.RNA-Isolierung	29
2.2.4.Herstellung von cDNA	29
2.2.5.real-time PCR	30
2.2.6.Western Blots.....	32
2.2.6.1.Proteingehaltsbestimmung.....	32
2.2.6.2.SDS-PAGE.....	33
2.2.6.3.Transfer	33
2.2.6.4.Proteindetektion.....	34
2.2.7.ELISA.....	35
2.2.8.Laktatdehydrogenase-Bestimmung	35
2.3.Verwendete Software und Datenauswertung	36
3. Ergebnisse.....	37
3.1.Dosisabhängige Wirkung von β -NAD	37
3.2. α -NAD.....	38
3.3.Inhibitoren der P2Y-Rezeptoren.....	39
3.4.Antagonisten nikotinischer Acetylcholinrezeptoren	41
3.5.Transfektionen.....	42
3.5.1.P2Y-Rezeptoren.....	42
3.5.2.Nikotinische Acetylcholinrezeptoren	44
3.6.Real-time PCR	46
3.7.Western Blots	47
3.8.Nigericin.....	49
4. Diskussion	51
4.1.Wirkmechanismus	51
4.2.In-vivo-Wirkung.....	54

4.3.Klinische Anwendung	56
5. Schlussfolgerung	58
6. Kurzfassung	60
6.1.Deutsch.....	60
6.2.Englisch.....	61
7. Abkürzungsverzeichnis	62
8. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	66
8.1.Abbildungen.....	66
8.2.Tabellen	67
9. Bibliografie	69
10. Publikationsverzeichnis	86
10.1.Originalarbeiten.....	86
10.2.Vorträge	86
10.3.Posterpräsentationen	86
11. Danksagung	87

1. Einleitung

1.1. Das angeborene Immunsystem

Das Immunsystem des menschlichen Körpers dient der Abwehr von pathogenen Mikroorganismen, schädlichen Substanzen sowie dem kontrollierten Abbau körpereigener Zellen. Der Aufbau des Immunsystems lässt sich auf verschiedene Arten einteilen. Eine weitverbreitete und anerkannte Einteilung ist die in das angeborene und das erworbene Immunsystem. Das erworbene Immunsystem ist evolutionär gesehen eine relativ neue Errungenschaft und vermittelt seine Effekte über T- und B-Lymphozyten sowie antigenpräsentierende Zellen. Seine initiale Reaktion auf körperfremde Antigene ist langsam, bei erneuter Konfrontation jedoch aufgrund des immunologischen Gedächtnisses schnell und spezifisch. Das angeborene Immunsystem ist deutlich älter als das Erworbene und findet sich auch bei Pflanzen, Pilzen und primitiven mehrzelligen Organismen (Murphy und Weaver, 2017). Hierbei haben sich im Laufe der Zeit verschiedene Ansätze zur Abwehr von Pathogenen entwickelt, die letztendlich alle zusammenarbeiten. So finden sich zu Beginn die mechanischen Hürden bestehend aus Haut und Schleimhäuten, die das Eindringen der Pathogene erschwert. Auch die Magensäure im Magen oder das Flimmerepithel der Trachea als physiologische Barriere zählen zum angeborenen Immunsystem (Gallo und Nizet, 2008). Auf zellulärer Ebene spielen besonders Makrophagen, Monozyten sowie neutrophile Granulozyten eine wichtige Rolle. Sie sind in der Lage Pathogene, die den Körper bereits infiltriert haben, durch Phagozytose zu bekämpfen oder durch Ausschüttung von Zytokinen die Immunantwort zu modulieren und so zur Eliminierung der Erreger beizutragen (Eming et al., 2007). Einen weiteren Aspekt des angeborenen Immunsystems bildet der humorale Anteil. Zu ihm gehört u.a. das Komplementsystem, welches bei Aktivierung eine Kaskade an Proteinen und Proteasen in Gang setzt. An ihrem Ende steht zum einen der Membranangriffskomplex, der über eine Porenbildung in den Zellmembranen der Zielzellen zu deren Lyse führt. Auf der anderen Seite wird über das chemotaktische Anlocken von Leukozyten wie den o.g. Monozyten und Makrophagen eine verstärkte Phagozytose der Zielzellen initiiert (Nesargikar et al., 2012). In der folgenden Arbeit wird genauer auf die zelluläre Antwort des angeborenen Immunsystems eingegangen. Monozyten, die im Blut zirkulieren, können durch die

Freisetzung des Zytokins Interleukin-1 β (IL-1 β) im Körper eine Entzündungsreaktion auslösen. Diese Reaktion muss jedoch gut kontrolliert werden, da eine überschießende Antwort eine schädigende Wirkung auf den Körper haben kann.

1.2. Ablauf der angeborenen Immunantwort

Das angeborene Immunsystem dient der schnellen Erkennung und Eliminierung pathogener Keime. Damit eine gezielte Immunantwort ausgelöst werden kann, muss das Immunsystem zwischen gefährlichen und ungefährlichen Strukturen unterscheiden. Zu den ungefährlichen Strukturen zählen z.B. kommensale *E.coli*-Bakterien im Magen-Darmtrakt. Die gefährlichen Strukturen sind u.a. pathogene Keime wie Bakterien oder Viren. Charles Janeway Jr. gilt als Erstbeschreiber der Differenzierung zwischen schädlich und unschädlich durch sogenannte *pathogen-associated molecular patterns* (PAMP) (Janeway, 1989). PAMP sind Moleküle wie Peptide, Bestandteile von Viren und Bakterien, die nicht vom abwehrenden Organismus stammen. Beispielhaft seien hier virale Ribonukleinsäuren (RNA) und Desoxyribonukleinsäuren (DNA) sowie Peptidoglykane und Lipopolysaccharide (LPS) als Bestandteil der Zellwand von Bakterien genannt (Medzhitov und Janeway, 2002) (Gasteiger et al., 2017). PAMP binden an *pattern recognition receptors* (PRR) von Zellen des angeborenen Immunsystems. Die bekanntesten PRR sind die oberflächengebundenen *Toll-like* Rezeptoren (TLR) und die C-Typ Lektin-Rezeptoren. PRR können aber auch in löslicher Form, wie das Mannose-bindende Lektin, oder intrazellulär, wie die *nucleotide-binding oligomerization domain* (NOD)-like Rezeptoren (NLR), vorkommen. Bindet ein jeweils spezifisches PAMP an den passenden PRR löst dies eine gezielte Immunantwort und Entzündungsreaktion aus (Gadjeva et al., 2004) (Kawai und Akira, 2009) (Iwasaki und Medzhitov, 2015). Dieses Modell erklärt die von Janeway und Medzhitov beschriebene Unterscheidung des Organismus zwischen *infectious non-self* und *noninfectious self*. Es erklärt jedoch nicht warum bei apathogenen Keimen, welche ebenfalls PAMP präsentieren, eine solche Reaktion ausbleibt. Auch die Elimination dysfunktionaler körpereigener Zellen, die durch das angeborene Immunsystem induziert wird, bleibt in diesem Modell außen vor. Als Ergänzung wurde

von Polly Matzinger das Modell der sogenannten *damage associated molecular patterns* (DAMP) postuliert (Matzinger, 1994). DAMP sind Moleküle des abwehrenden Organismus, die meist im Nukleus oder dem Zellplasma vorkommen, aber auch sezerniert werden können. Zu ihnen zählen u.a. das *high-mobility group box 1* (HMGB1)-Protein, freie DNA sowie extrazelluläres Adenosintriphosphat (ATP) (Pradeu und Cooper, 2012) (Tang et al., 2012). Sie können z.B. durch Ischämie, Trauma, Nekrose, aber auch bei entzündlichen und anderen Arten der Zellschädigung freigesetzt werden und im Anschluss ebenfalls eine immunologische Reaktion hervorrufen (Matzinger, 2007). Im Gegensatz zu den PAMP beruht diese Reaktion jedoch nicht auf der Anwesenheit pathogener Keime, sondern auf dem der Zelle und dem Organismus zugefügten Schaden. In der aktuellen Forschung wird ein Zwei-Faktoren-Modell beschrieben: Ein PAMP kann in immunkompetenten Zellen bereits eine gewisse Reaktion auslösen, das darauffolgende DAMP führt dann zur fulminanten Entzündungsreaktion (Fontana und Vance, 2011). Dies führt dazu, dass apathogene Keime geduldet werden, wohingegen jedoch pathogene Keime und virusbefallene Zellen effektiv bekämpft werden können. Folgt auf ein PAMP ein DAMP werden Zytokine und andere Lymphozyten-stimulierende Moleküle ausgeschüttet und das angeborene sowie das erworbene Immunsystem aktiviert (Iwasaki und Medzhitov, 2015). Über die Arten der PAMP und DAMP, deren Lokalisation sowie der aktivierten PRR kann das Ausmaß und die Art der Reaktion moduliert werden. Antigenpräsentierende Zellen wie z.B. dendritische Zellen können CD4-positive T-Helferzellen anlocken oder Makrophagen und Monozyten aktivieren, die im weiteren Verlauf Inflammation vermittelt weitere proinflammatorische Zytokine wie IL-1 β und Interleukin-18 (IL-18) ausschütten (Iwasaki und Medzhitov, 2015) (Gutschow et al., 2019) (Labzin et al., 2019).

1.3. *Toll-like-Rezeptor 4*

Von den oben angesprochenen PRR ist die Gruppe der *Toll-like-Rezeptoren* (TLR) am besten untersucht. Sie sind membrangebunden und in ihrem Aufbau sehr ähnlich: Der extrazelluläre Teil besteht aus Leucin-reichen Wiederholungen (*leucine-rich repeats*; LRR), an denen die PAMP binden können. Die transmembrane Domäne verbindet die LRR mit der intrazellulären Toll/IL-1R-Domäne (TIR), die die Signalkaskade in das Zytosol weiterleitet (Kawasaki und Kawai, 2014). Der *Toll-like-Rezeptor 4* (TLR4) befindet sich vorrangig auf der Zelloberfläche von Makrophagen und Monozyten. Einer der wichtigsten Liganden von TLR4 ist das bakterielle Endotoxin LPS bzw. dessen biologisch aktiver Teil Lipid A. Es ist ein wesentlicher Bestandteil der äußeren Membran von Gram-negativen Bakterien wie *E.coli* (Raetz und Whitfield, 2002).

Zu Beginn der Signalkaskade bindet LPS an das LPS bindende Protein (LBP). Dieser Komplex bindet nun mit Hilfe des Membranprotein *cluster of differentiation 14* (CD14) und des löslichen Protein Lymphozyten-Antigen 96 (MD-2) an den TLR4, was zu dessen Dimerisierung führt (Kitchens, 2000). Anschließend kann die Signalkaskade intrazellulär über die TIR-Domänen auf zwei unterschiedlichen Wegen fortgeleitet werden: Beim MyD-88-abhängigen Weg bindet das *TIR adaptor protein* (TIRAP) an das Adapterprotein *myeloid differentiation primary response 88* (MyD88), sodass eine Reihe von Kinasen aktiviert werden. Am Schluss dieser Signalkaskade werden vermehrt die Transkriptionsfaktoren *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells* (NF- κ B) und Aktivator Protein 1 (AP-1) produziert. Der MyD-88-unabhängige Weg führt über die Aktivierung der Proteine *TIR-domain-containing adaptor inducing interferon- β* (TRIF) und *TRIF-related adaptor molecule* (TRAM) ebenfalls zu einer vermehrten Produktion von NF- κ B und AP-1 sowie des Interferon regulierender Faktor 3 (IRF3) (Lu et al., 2008).

Diese drei Faktoren führen zu einer vermehrten Transkription proinflammatorischer Zytokine wie Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) und pro-Interleukin-1 β (pro-IL-1 β), dem Vorläufer des biologisch aktiven IL-1 β (Cullen et al., 2015).

1.4. NLRP3-Inflammasom

Inflammasome sind zytosolische Multiproteinkomplexe die vorrangig in Makrophagen und Monozyten, aber auch in Epithelgeweben vorkommen (Lei-Leston et al., 2017). Sie wurden erstmals 2002 von der Arbeitsgruppe um Jörg Tschopp beschrieben und können über die Aktivierung von Caspasen zu einer vermehrten Freisetzung von aktivem IL-1 β aus den o.g. Zellen führen (Martinon et al., 2002) (Martinon et al., 2009).

Inflammasome bestehen in Regel aus einem NOD-*like* Rezeptor (NLR), der wie folgt aufgebaut ist: Zentralen Punkt bildet die Nukleotid-bindende Domäne (NACHT). Durch ihre ATPase-Aktivität dient sie der Oligomerisierung des Komplexes. An ihrem C-terminalen Ende kann sich eine LRR befinden, an der Liganden binden und so zur Aktivierung führen. Am N-terminalen Ende der NACHT-Domäne befindet sich eine Caspase-rekrutierende Domäne (CARD) oder Pyrin-Domäne (PYD). Beim NLRP3-Inflammasom befindet sich an dieser Stelle die PYD *domains-containing protein 3*. Hier bindet das Adapterprotein *apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD* (ASC), an das wiederum die pro-Caspase-1 binden kann (Schroder und Tschopp, 2010). Bindet also ein Ligand an den LRR, findet über die NACHT-Domäne eine Oligomerisierung des NLRP3-Inflammasoms statt. Hierdurch wird die PYD aktiviert und es erfolgt eine Oligomerisierung der ASC. Es entstehen Proteinaggregate, sogenannte ASC *specks*, welche die pro-Caspase-1 in ihre biologisch aktive Form Caspase-1 spalten. Caspase-1 wiederum spaltet nun pro-IL-1 β in die biologisch aktive Form IL-1 β , welches aus der Zelle freigesetzt wird.

Das NLRP3-Inflammasom kann durch unterschiedliche Signale aktiviert werden. Eines der bekanntesten ist extrazelluläres ATP, das u.a. bei Zellstress und -untergang, aber auch gezielt von verschiedenen Zellarten wie Monozyten und Makrophagen freigesetzt werden kann (Iyer et al., 2009) (Dosch et al., 2018). Extrazelluläres ATP stellt einen DAMP dar und bindet an den Purinorezeptor P2X7, was zu einer erhöhten Permeabilität der Zellmembran für Kationen wie Kalzium (Ca²⁺) und Kalium (K⁺) führt. Durch den nachfolgenden K⁺-Ausstrom aus der Zelle formiert sich das NLRP3-Inflammasom und wird aktiviert (Grahames et al., 1999). Die niedrige intrazelluläre K⁺-Konzentration scheint hierbei essentiell für die Aktivierung zu sein, da normwertige intrazelluläre K⁺-Konzentration um ca. 70 μ M eine Bildung des NLRP3-Inflammasoms inhibieren

(Petrilli et al., 2007). Andere Aktivatoren des NLRP3-Inflammasoms sind z.B. *monosodium urate (MSU)*, oxidierte mitochondriale DNA und *reactive oxygen species (ROS)* (Zhou et al., 2010) (Hari et al., 2014) (Zhong et al., 2018). Einen P2X7-unabhängigen Aktivator stellt das bakterielle Toxin Nigericin dar. Es fungiert als Ionophor und vermittelt so den Transport der K⁺-Ionen aus der Zelle. Durch die hieraus resultierende erniedrigte intrazelluläre K⁺-Konzentration wird das NLRP3-Inflammasom aktiviert (Mariathasan et al., 2006) (Greaney et al., 2015).

1.5. Interleukin-1 β

Die Erstbeschreibung von Interleukin-1 (IL-1) geht auf Igal Gery aus dem Jahr 1972 zurück, welcher es damals als *lymphocyte-activating factor (LAF)* beschrieb. Charles Dinarello gelang 1977 die Aufreinigung des Stoffs und fand heraus, dass dieser bei Kaninchen in einer Dosis von nur 10 ng/kg ein starkes Fieber hervorruft (Gery et al., 1972) (Dinarello et al., 1977). Erst 1985 konnte gezeigt werden, dass es sich bei dem beschriebenen Stoff, welcher bis dahin auch als *human leukocytic pyrogen* oder IL-1 bekannt war, um zwei verschiedene Proteine handelte. Mittels cDNA-Analysen wurden somit Interleukin-1 α (IL-1 α) und IL-1 β erstmalig unterschieden (March et al., 1985). Während beide Formen proinflammatorische Wirkungen vermitteln, unterscheiden sie sich in wesentlichen Aspekten. So kann IL-1 α z.B. auch in gesunden Endothel- und Bindegewebszellen vorkommen, wohingegen IL-1 β erst nach Stimulation produziert wird (Berda-Haddad et al., 2011). Außerdem ist der Vorläufer von IL-1 α bereits biologisch aktiv und kann so als DAMP agieren (Kim et al., 2013). Sowohl IL-1 α als auch IL-1 β binden jedoch an die gleichen Rezeptoren, Interleukin-1-Rezeptor-1 (IL-1R1) und Interleukin-1-Rezeptor-2 (IL-1R2). Die proinflammatorische Wirkung wird jedoch nur durch Bindung an den IL-1R1 vermittelt, während der IL-1R2 als *decoy*-Rezeptor fungiert (Colotta et al., 1993). Beide Rezeptoren benötigen als zusätzlichen Co-Rezeptor den Interleukin-1-Rezeptor-3 (IL-1R3). Besonders IL-1 β spielt eine entscheidende Rolle in der Immunabwehr pathogener Keime. Es wird vorrangig von Zellen des angeborenen, aber auch des erworbenen Immunsystems produziert und

sezerniert, u.a. von Monozyten, Makrophagen, natürlichen Killerzellen und B-Lymphozyten (Stoffels et al., 2015).

Wird IL-1 β ausgeschüttet, hat dies weitreichende Effekte für den Körper: Im Gehirn wird vermehrt Cyclooxygenase-2 (COX-2) produziert, welches über einen Anstieg von Prostaglandin E₂ (PGE₂) wie oben beschrieben starkes Fieber auslöst (Li et al., 2001). In der Leber werden vermehrt sogenannte Akute-Phase-Proteine wie z.B. das C-reaktive Protein (CRP) und Komplementfaktoren gebildet (Ramadori et al., 1988). Über eine Bindung am Gefäßendothel führt IL-1 β zu erhöhten Serumkonzentrationen des proinflammatorischen Interleukin 6 (IL-6). Dies führt u.a. zu einer vermehrten Freisetzung von neutrophilen Granulozyten und Thrombozyten aus dem Knochenmark (Dinarello, 2005) (Garlanda et al., 2013). Nicht zuletzt induziert IL-1 β die Produktion von TNF- α und anderen Zytokinen, welche die proinflammatorischen Funktionen von immunkompetenten Zellen wie Makrophagen und neutrophilen Granulozyten fördern. So kann selbst die Wirkung von IL-1 β auf diese Zellen zu einer weiteren Produktion von IL-1 β führen (Dinarello, 2009) (Madej et al., 2017).

Eine unkontrollierte Ausschüttung von IL-1 β kann jedoch fatale Folgen haben und ist mit einer Reihe von Erkrankungen assoziiert. Hierzu zählen unter anderem seltene Autoimmunerkrankungen wie das familiäre Mittelmeerfieber oder Morbus Still. Aber auch weit verbreitete Erkrankungen wie z.B. chronisch entzündliche Darmerkrankungen, rheumatoide Arthritis, Diabetes mellitus Typ 2, Sepsis oder ein erhöhtes Risiko für bösartige Tumore werden mit erhöhten IL-1 β -Spiegeln in Verbindung gebracht (Dinarello, 2018) (Kaplanov et al., 2019). In Mausmodellen zur akuten Transplantatabstoßung konnte auch eine Beteiligung von IL-1 β nachgewiesen werden (Kranich, 2005).

IL-1 β ist als proinflammatorisches Zytokin im Rahmen eines Entzündungsprozesses somit unabdingbar, muss jedoch aufgrund der drohenden Gefahren bei einer Überproduktion streng reguliert werden. Dies geschieht zum einen durch die oben beschriebene Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms durch die konsekutive Bindung von PAMP und DAMP an die Zellen. Ist IL-1 β bereits ausgeschüttet, kann der proinflammatorische Effekt durch den IL-1R2 verhindert werden. Dieser *decoy*-Rezeptor fängt zusammen mit dem Co-Rezeptor IL-1R3 das IL-1 β ab und wird im

Anschluss ohne inflammatorische Reaktion abgebaut. Schon länger bekannt ist der sogenannte IL-1-Rezeptor Antagonist (IL-1-RA), welcher an den IL-1R1 bindet und somit verhindert, dass IL-1 β an diesem seine Wirkung entfalten kann (Dinarello, 1994). Der rekombinante IL-1RA ist unter dem Namen Anakinra seit 2001 u.a. zur Behandlung bei rheumatoider Arthritis zugelassen (Waugh und Perry, 2005).

Einen anderen Ansatzpunkt zur Reduktion der IL-1 β -Spiegel im Blut bietet das NLRP3-Inflammasom. So wurden in den letzten Jahren mehrere Kontrollmechanismen beschrieben, mit denen einer überschießenden Produktion von IL-1 β *in vitro* entgegen gewirkt werden kann. Beispielsweise können durch Acetylcholin, Cholin aber auch Nikotin die ATP-induzierte Ausschüttung von IL-1 β aus humanen Monozyten über nikotinische Acetylcholinrezeptoren (nAChR) inhibiert werden (Hecker et al., 2015) (Zakrzewicz et al., 2017). Das Inflammasom in aktivierten Makrophagen kann außerdem auch durch körpereigenes Stickstoffmonoxid (NO) inhibiert werden (Mao et al., 2013). Wird der Körper bei einer akuten Verletzung oder Krankheit durch verringerte Nahrungsaufnahme in den Zustand der Ketose geführt, produziert er aus Fettsäuren vermehrt Ketonkörper wie 3-Hydroxybutyrat als Energielieferant. 3-Hydroxybutyrat verhindert den K⁺-Ausstrom aus aktivierten Makrophagen und so auch die Bildung des NLRP3-Inflammasoms (Youm et al., 2015).

Der Beweis, dass die o.g. Mechanismen ihre Wirkung auch *in vivo* entfalten steht jedoch aktuell noch aus.

1.6. Nikotinamidadenindinukleotid

Nikotinamidadenindinukleotid (NAD) ist ein wichtiges Co-Enzym das in jeder menschlichen Zelle vorkommt. Es besteht aus zwei Nukleotiden, welche über ihre Phosphatgruppen miteinander verbunden sind. Ein Nukleotid ist Nikotinamid, das andere Adenin. NAD ist ein Stereoisomer und kann somit als α -Nikotinamidadenindinukleotid (α -NAD) und β -Nikotinamidadenindinukleotid (β -NAD) existieren (Suzuki et al., 1967). Die Position der Nikotinamidgruppe am 1. C-Atom des Riboserings bestimmt hierbei das Isomer. In der Natur kommt jedoch fast ausschließlich

β -NAD vor (Jacobson et al., 1973) (Oppenheimer und O. Kaplan, 1975). Zusätzlich kann NAD in oxidiertem (NAD^+) oder reduziertem (NADH) Form vorliegen.

Die Erstbeschreibung geht zurück auf Arthur Harden und William John Young im Jahr 1906. Sie zeigten, dass ein Extrakt aus gekochter Hefe einen schnelleren Gärungsprozess in ungekochter Hefe versprach und nannten den von Ihnen vermuteten Stoff „coferment“ (Harden und Young, 1906). Hans von Euler-Chelpin identifizierte diesen Stoff als Nukleotid und bezeichnete ihn als erster als Cozymase (Euler-Chelpin, 1930). Im Jahr 1936 gelang es Otto Heinrich Warburg die Beteiligung von NAD bei Redoxreaktionen zu zeigen (Warburg und Christian, 1936). Jack Preiss and Philip Handler beschrieben 1958 die Metaboliten und Enzyme, die für die Biosynthese von NAD benötigt werden. Diese Metaboliten sind die Basen Nikotinamid und Nikotinsäure sowie die Nucleoside Nikotinamid-Ribosid und Nikotinsäure-Ribosid, welche heutzutage alle unter dem Begriff Vitamin-B3 zusammengefasst werden (Preiss und Handler, 1958). Sie sind Teil des *salvage pathways*, also der Rückgewinnung von β -NAD, nachdem es in verschiedenen Stoffwechselprozessen verbraucht wurde. Die *de-novo* Synthese von NAD hat ihren Ausgangspunkt in der essentiellen Aminosäure L-Tryptophan, allerdings wird nur ein sehr geringer Teil des vom Körper benötigten β -NAD neu synthetisiert (Oxenkrug, 2010).

Der Großteil des vom Körper produzierten β -NAD wird von Dehydrogenasen als Substrat bei Redoxreaktionen benötigt. Sowohl bei der Glykolyse im Zytosol als auch beim Zitratzyklus und der β -Oxidation in den Mitochondrien wird NAD^+ zu NADH reduziert. Bei der Atmungskette an der inneren Mitochondrienmembran wird dann NADH wiederum zu NAD^+ oxidiert und dadurch ATP gewonnen (Yang und Sauve, 2016). Aber auch außerhalb von Redoxreaktionen wurden verschiedene Funktionen von β -NAD beschrieben. Hierbei lassen sich drei große Gruppen von Enzymen beschreiben, die β -NAD als Substrat benötigen: Adenosindiphosphat-Ribosyltransferasen (ADP-Ribosyltransferasen), cyclische Adenosindiphosphat-Synthetasen (cADP-Synthetasen) und die Sirtuine (Houtkooper et al., 2010). So ist es z.B. als Co-Enzym der ADP-Ribosyltransferasen bei der posttranslationalen Modifikationen von Proteinen zu finden, indem sie ADP-Ribose von β -NAD auf Aminosäuren transferieren. Die Glycohydrolase *cluster of differentiation 38* (CD38), welche sich auch außerhalb der Zellen als

membrangebundenes Enzym befindet, benötigt β -NAD als Ausgangspunkt der Synthese von cyclischer ADP-Ribose (cADPR). Letztere führt zu einer erhöhten, Inositoltrisphosphat(IP3)-unabhängigen Kalzium-Ausschüttung aus der Zelle (Lee, 2006). Eine andere Gruppe von β -NAD-abhängigen Enzymen sind die sogenannten Sirtuine. Es sind sieben dieser β -NAD-abhängigen Proteindeacetylasen beim Menschen bekannt. Sie können z.B. Histonproteine deacetylieren und somit die Transkription von bestimmten DNA-Abschnitten steuern. Für die Sirtuine SIRT2 und SIRT3 sind Mechanismen beschrieben, die die Zusammensetzung und Aktivität der NLRP3-Inflammasoms verhindern können (Misawa et al., 2013) (Traba et al., 2015). Über diesen Weg können also auch verminderte β -NAD-Konzentrationen zu einer erhöhten Ausschüttung von proinflammatorischen Zytokinen durch das Inflammasom führen.

Die intrazellulären β -NAD-Konzentrationen bewegen sich physiologischerweise im mikromolaren Bereich (300-700 μ M), der Großteil hiervon befindet sich innerhalb der Mitochondrien (VanLinden et al., 2015) (Nikiforov et al., 2015). Adipositas und zunehmendes Alter sind mit erniedrigten intrazellulären Konzentrationen vergesellschaftet, Fasten jedoch führt zu erhöhten β -NAD Konzentrationen in den Zellen (Gomes et al., 2013) (Yang und Sauve, 2016). Die Konzentrationen von β -NAD im Extrazellularraum sind in der Regel deutlich niedriger und bewegen sich im nanomolaren Bereich (O'Reilly und Niven, 2003) (Houtkooper et al., 2010). Erhöhte extrazelluläre Konzentrationen finden sich u.a. bei der passiven Freisetzung durch Zelllyse als Folge einer Gewebsverletzung oder im Rahmen von Entzündungen, sind aber auch durch aktive Freisetzung möglich (Donnelly et al., 1996) (Scheuplein et al., 2009). Dieser Vorgang kann von Neuronen ausgehen und β -NAD hierüber eine Wirkung auf die glatten Muskelzellen der Blase vermitteln, also als Neurotransmitter fungieren (Smyth et al., 2004) (Mutafova-Yambolieva et al., 2007). Auf Zellen des Immunsystems wirkt extrazelluläres β -NAD unterschiedlich. So konnte z.B. eine proinflammatorische Wirkung von β -NAD auf Granulozyten gezeigt werden, indem es als Agonist der Rezeptoren P2Y1 und P2Y11 zu einer erhöhten intrazellulären Konzentration von Kalzium führt (Bruzzone et al., 2001) (Romanello et al., 2002) (Moreschi et al., 2006) (Mutafova-Yambolieva et al., 2007). In anderen Versuchen konnte ein antiinflammatorischer Effekt von β -NAD gezeigt werden, indem es die Wirkung des

bakteriellen Toxins LPS an Mäuselungen verringerte und somit einer akuten Lungenschädigung entgegenwirkte. (Umopathy et al., 2010) (Umopathy et al., 2012).

Die im Laufe des Lebens abnehmenden Konzentrationen von β -NAD haben u.a. über die o.g. Sirtuine einen negativen Effekt auf altersbedingte Krankheiten wie z.B. Diabetes mellitus, Koronare Herzkrankheit (KHK), neurodegenerative Erkrankungen und auch verschiedene Arten von Krebs (Elhassan et al., 2017) (Matasic et al., 2018) (Hou et al., 2018) (Braidy et al., 2019). Eine heute nur noch selten zu findende Erkrankung, Pellagra, beruht auf der zu geringen Aufnahme von Vitamin-B3 und damit einem geringen Gehalt an β -NAD im Körper. Durch die früher häufig einseitige Ernährung mit Mais oder Hirse als Hauptnahrungsquellen wurde zu wenig Vitamin-B3 aufgenommen, die Folgen sind Durchfall, Dermatitisen und Demenz. Die Therapie besteht in der hochdosierten Gabe von Nikotinsäure oder Nikotinamid (Hegyí et al., 2004) (World Health Organization, 2000).

1.7. Rezeptoren

1.7.1. Purinrezeptoren

Purinrezeptoren werden unterteilt in P1-Rezeptoren (Adenosinrezeptoren) und P2-Rezeptoren, die neben den Purinen (ADP und ATP) auch Pyrimidine (Uridindiphosphat (UDP) und Uridintriphosphat (UTP)) binden können. P2X-Rezeptoren sind ligandengesteuerte Ionenkanäle. Der hier untersuchte P2X7-Rezeptor wird vornehmlich an der Oberfläche von immunkompetenten Zellen exprimiert. Bindet ATP oder der selektive Agonist Benzoylbenzoyl-Adenosintriphosphat (BzATP) an den P2X7-Rezeptor wird dieser für Kationen durchlässig (North, 2002). Als Folge strömen K^+ -Ionen aus und Natrium- (Na^+ -) sowie Ca^{2+} -Ionen in die Zelle (Coutinho-Silva und Persechini, 1997). P2Y-Rezeptoren hingegen sind G-Protein-gekoppelte Rezeptoren. Bindet ein Ligand an den Rezeptor wird über Signalkaskaden bei G_s -Proteinen die Adenylatcyclase, bei G_q -Proteinen die Phospholipase-C aktiviert. Am Ende der Signalkaskade stehen in der Regel erhöhte intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentrationen (Gilman, 1987). P2Y1-Rezeptoren sind an G_q -Proteine, P2Y11 sowohl an G_q - als auch G_s -Proteine gekoppelt (Communi et al., 1997) (Sak und Webb, 2002).

1.7.2. Nikotinische Acetylcholinrezeptoren

Nikotinische Acetylcholinrezeptoren (nAChR) sind membranständige Rezeptoren, die meist eine ligandengesteuerte Ionenkanalfunktion haben. In aktuellen Studien konnte jedoch gezeigt werden, dass sie bei Monozyten auch metabotrop funktionieren können (Richter et al., 2016). Während muskuläre nAChR ausschließlich an der motorischen Endplatte vorhanden sind, finden sich nAChR vom neuronalen Typ in vielen verschiedenen Zellen (Zoli et al., 2018). Neuronale nAChR bilden aus ihren fünf Untereinheiten Pentamere, welche entweder vom α - ($\alpha 2$ - $\alpha 10$; CHRNA2-10) oder β - ($\beta 2$ - $\beta 4$; CHRNB 2-4) Typ sind. Die Zusammensetzung der Untereinheiten sowie die Affinität der Rezeptoren zu ihren Liganden bestimmen den vermittelten Effekt. Prototypische Liganden sind Acetylcholin sowie Nikotin. Bindet ein spezifischer Ligand an den nAChR formen die fünf Untereinheiten meist einen Kanal, welcher K^+ , Na^+ - sowie, je nach Zusammensetzung der Untereinheiten, auch Ca^{2+} -Ionen durch die Zellmembran entlang ihres Konzentrationsgradienten fließen lässt (Siegel und Agranoff, 1999) (Beker et al., 2003).

1.8. Fragestellung der Dissertation

In der Literatur wurden unterschiedliche immunologische Wirkungen von β -NAD beschrieben. Sowohl ATP als auch β -NAD werden bei Zellschädigung und im Rahmen von Entzündungen freigesetzt. In dieser Arbeit sollte zunächst die Hypothese untersucht werden, dass extrazelluläres β -NAD die ATP-induzierte Freisetzung von IL-1 β aus humanen Monozyten inhibiert. Nachdem dies bestätigt werden konnte, sollte anschließend der Wirkmechanismus weiter untersucht werden.

2. Materialien und Methoden

2.1. Materialien und Geräte

2.1.1. Geräte

Gerät	Hersteller
Brutschrank Heracell 240i CO ₂ -Inkubator	Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA
Consort Electrophoresis Power Supply E835	Peqlab Biotechnologie, Erlangen, Deutschland
FLUOstar Optima Microplate Reader	BMG Labtech, Offenburg, Deutschland
Folienschweißgerät	Severin, Sundern, Deutschland
Mikroskop Labovert	Leitz, Wetzlar, Deutschland
Mini Plate Spinner C1000	Labnet, Edison, NJ, USA
NanoDrop 1000	Peqlab Biotechnologie
Nucleofactor™ device II	Lonza, Köln, Deutschland
Olympus C-4000 Zoom	Olympus, Hamburg, Deutschland
pH-Meter Ultra Basic UB-10	Denver Instruments, Göttingen, Deutschland
Pipetten Eppendorf Reference 0,5-10 µl/ 10-100 µl/ 100-1000 µl	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
real-time PCR-System StepOnePlus	Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA
Röntgenkassette	Dr. Goos Suprema, Heidelberg, Deutschland
Schwingmühle RETSCH MM 301	Bioendis, Mannheim, Deutschland
Sicherheitswerkbank Zellkultur Class II ENA 2	Nuaire, Plymouth, MN, USA
<i>Thermal Cycler</i> G-Storm GS482	AlphaMetrix Biotech, Rödermark, Deutschland
Ultraschallbad Sonorex Super RK102H	Bandelin, Berlin, Deutschland
Transluminator	Biozym, Hessisch Oldendorf, Deutschland
Vortex Mixer REAX 2000	Heidolph, Schwabach, Deutschland

Wasserbad	Köttermann, Uetze/Hänigsen, Deutschland
Elektrophoresekammer	Keutz - Labortechnik, Reiskirchen, Deutschland
Zählkammer nach Neubauer	Laboroptik, Friedrichsdorf, Deutschland
Zentrifuge Rotina 420R	Hettich, Tuttlingen, Deutschland

Tabelle 1: **Geräte**

2.1.2. Verbrauchsmaterial

Verbrauchsmaterial	Hersteller
Röntgenfilm Amersham Hyperfilm ECL	GE Healthcare, Little Chalfont, UK
Pipetten Cellstar 10 ml	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
Pipettenspitzen 10 µl, 200 µl, 1000 µl	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
PVDF Membran Immobilon-P	Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland
Reagiergefäß 1,5ml	Sarstedt
Zellkulturflaschen 75 cm ²	Sarstedt
Zellkulturplatten 24-well	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland

Tabelle 2: **Verbrauchsmaterialien**

2.1.3. Reagenzien

Reagenz und Bestellnummer	Hersteller
[V11L;V16D]ArIB	J. Michael McIntosh, Salt Lake City, UT, USA Im Rahmen einer Kooperation zur Verfügung gestellt
α-Bungarotoxin 2133	Bio-Techne/ Tocris, Minneapolis, MN, USA
α-NAD N6879	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
β-NAD N8410	Sigma-Aldrich

2-Mercaptoethanol 4227	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Acrylamidlösung, Rotiphorese Gel 30 % (37,5:1) 3029.2	Carl Roth
Agarose 15510-019	Invitrogen, Darmstadt, Deutschland
<i>Amaxa Cell Line</i> <i>Nucleofector™ C</i>	Lonza
Ammoniumperoxodisulfat (APS), ≥ 98 % 9592	Carl Roth
Apyrase A6410	Sigma-Aldrich
<i>Aqua destillata</i>	B. Braun, Melsungen, Deutschland
Benzoylbenzoyl- Adenosintriphosphat (BzATP) B6396	Sigma-Aldrich
Bovines Serumalbumin (BSA), ≥ 99 % A7638	Sigma-Aldrich
Bromphenolblau T116	Carl Roth
<i>CytoTox 96 Non-Radioactive</i> <i>Cytotoxicity Assay</i> G1780	Promega, Madison, WI, USA
Desoxyribonukleosidtri- phosphat (dNTPs) C1145	Promega
Dinatriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄), ≥ 99,5 % 1.06580.1000	Merck Millipore
DNA <i>Loading Dye</i> R0611	Thermo Fisher Scientific
ELISA: <i>Human Interleukin-1β</i> <i>Quantikine</i> SLB50	Bio-Techne/ R+D Systems, Minneapolis, MN, USA

Entwickler-Konzentrat 00009	Adefo Chemie, Neu Isenburg, Deutschland
Essigsäure (C ₂ H ₄ O ₂) 96 % 33206	Sigma-Aldrich
Ethylendiamintetraacetat (EDTA) 112800	Serva, Heidelberg, Deutschland
Fetales Kälberserum (FCS) A15-151	PAA, Cölbe, Deutschland
Fixier-Konzentrat 00062	Adefo Chemie
<i>Gelred</i> 41002	Biotium, Hayward, CA, USA
<i>GeneRuler</i> 100 bp DNA- Leiter SM0241	Thermo Fisher Scientific
Glyzerin, ≥ 99 % G2025	Sigma-Aldrich
Glycin, ≥ 99 % 3908	Carl Roth
Kaliumchlorid (KCl), ≥ 99,5% 1.04936.1000	Merck Millipore
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄), ≥ 99,5 % 1.04873.0250	Merck Millipore
L-Glutamin 200 mM M11-004	PAA
Lipopolysaccharid (LPS) <i>Escherichia coli</i> 026:B6 L2654	Sigma-Aldrich
M-MLV-RT M368B	Promega
M-MLV-RT-Puffer M531A	Promega
Magnesiumchlorid (MgCl ₂), ≥ 99 % A351H	Promega

Mecamylamin M9020	Sigma-Aldrich
Methanol, $\geq 99,8\%$ 32213	Sigma-Aldrich
Milchpulver T145	Carl Roth
MRS2279 2158	Bio-Techne/Tocris
Natriumchlorid (NaCl), $\geq 99,5\%$ 31434	Sigma-Aldrich
Natriumdodecylsulfat (SDS) $\geq 99,5\%$ 2326	Carl Roth
Natronlauge 1 N (NaOH), $\geq 99,5\%$ 1.09137.9010	Merck Millipore
NF340 3830	Bio-Techne/Tocris
Nigericin-Natriumsalz N7143	Sigma-Aldrich
Nikotin-Hydrogentartratsalz N5260	Sigma-Aldrich
<i>PCR Purification kit MinElute</i> 28004	Qiagen, Hilden, Deutschland
<i>peqGOLD Total RNA kit</i> 732-2868	VWR International, Lutterworth, England
<i>Pierce™ BCA Protein Assay Kit</i> 23235	Thermo Fisher Scientific
<i>Platinum SYBR Green qPCR SuperMix-UDG</i> 11733-046	Invitrogen, Darmstadt, Deutschland
<i>Precision Plus Protein Standards</i> 1610374	Bio-Rad, Dreieich

Primer (RT-PCR) P2Y1 Forward/Reverse P2Y11 Forward/Reverse HMBS Forward/Reverse	Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Deutschland
Proteaseinhibitortabletten 88265	Thermo Fisher Scientific
<i>Random Primer</i> C1101	Promega
RgIA4	J. Michael McIntosh, Salt Lake City, UT, USA Im Rahmen einer Kooperation zur Verfügung gestellt
RNase-freies Wasser 129112	Qiagen
RNasin Ribonukleaseinhibitor N2511	Promega
RPMI-1640 31870025	Thermo Fisher Scientific
Salzsäure 1 N (HCl), $\geq 99,9\%$ 1.09057.1000	Merck Millipore
Strychnin S8753	Sigma-Aldrich
SuperSignal™ West Femto 34094	Thermo Fisher Scientific
Tetramethylethylenediamine (TEMED) 2367	Carl Roth
Tris-Base, $\geq 99,9\%$ 4855	Carl Roth
Tris-Hydrochlorid, $\geq 99\%$ T3253	Sigma-Aldrich
Trypanblaulösung T8154	Sigma-Aldrich
Tween® 20 817072	Merck Millipore
U937-Zelllinie	Leibniz-Institut DSZM - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig, Deutschland

Tabelle 3: **Reagenzien**

2.1.4. Lösungen und Puffer

Natriumchloridlösung 0,9%

Menge	Reagenz
9g (0,15 M)	Natriumchlorid
Auf 1000ml	<i>Aqua destillata</i>

Tabelle 4: Natriumchloridlösung 0,9%

BSA-Lösung

Menge	Reagenz
5 mg	BSA
1 ml	Lysepuffer S1
Für 5 Minuten bei 95° erhitzen und dann für 5 Minuten bei 13000 g zentrifugieren	

Tabelle 5: BSA-Lösung

Tris/HCl-Puffer 0,1 M

Menge	Reagenz
800ml	<i>Aqua destillata</i>
12,1g (0,1 M)	Tris-Base
pH mit HCl 1 N auf 8,2 eingestellt	
Auf 1000ml	<i>Aqua destillata</i>

Tabelle 6: Tris/HCl-Puffer 0,1 M

SDS-Stammlösung 10%

Menge	Reagenz
10g (0,35 M)	Natriumdodecylsulfat (SDS)
Auf 100ml	<i>Aqua destillata</i>

Tabelle 7: SDS-Stammlösung 10%

Lysepuffer S1

Menge	Reagenz
0,625 ml	Tris/HCl-Puffer 0,1 M
2,3 ml	SDS-Stammlösung 10%
1 Tablette	Proteaseinhibitor
Auf 10 ml	<i>Aqua destillata</i>

Tabelle 8: Lysepuffer S1

Probenpuffer S2

Menge	Reagenz
0,625 ml	Tris/HCl-Puffer 0,1 M
4 ml (55 mM)	Glyzerin
2,3 ml	SDS-Stammlösung 10%
1,6 ml (22,7 mM)	2-Mercaptoethanol
1 Tablette	Proteaseinhibitor
Auf 10 ml	<i>Aqua destillata</i>

Tabelle 9: Probenpuffer S2

Unterer Gelpuffer

Menge	Reagenz
18,16 g (0,15 M)	Tris-Base
4 ml	SDS-Stammlösung 10%
Auf 100 ml	<i>Aqua destillata</i>
pH mit HCl 1 N auf 8,8 eingestellt	

Tabelle 10: Unterer Gelpuffer

Oberer Gelpuffer

Menge	Reagenz
6,06 g (50 mM)	Tris-Base
4 ml	SDS-Stammlösung 10%
Auf 100 ml	<i>Aqua destillata</i>
pH mit HCl 1 N auf 6,8 eingestellt	

Tabelle 11: Oberer Gelpuffer

Laufpuffer

Menge	Reagenz
3,04 g (25 mM)	Tris-Base
14,42 g (0,192 M)	Glycin
10 ml	SDS-Stammlösung 10%
Auf 1000 ml	<i>Aqua destillata</i>

Tabelle 12: Laufpuffer

Transferpuffer

Menge	Reagenz
3,04 g (24,7 mM)	Tris-Base
14,3 g (0,19 M)	Glycin
5 ml	SDS-Stammlösung 10%
200 ml (4,93 M)	Methanol
Auf 1000 ml	<i>Aqua destillata</i>

Tabelle 13: Transferpuffer

Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) 10x (Stammlösung)

Menge	Reagenz
900 ml	<i>Aqua destillata</i>

80 g (1,37 M)	Natriumchlorid (NaCl)
2 g (27mM)	Kaliumchlorid (KCl)
14,24 g (80 mM)	Dinatriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)
2 g (15 mM)	Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)
0,8 ml	Salzsäure (HCl) 1 N
Auf 1000 ml	<i>Aqua destillata</i>
pH mit HCl 1 N auf 7,4 eingestellt	

Tabelle 14: **Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) 10x (Stammlösung)**

PBS 1x

Menge	Reagenz
100 ml	PBS 10x
Auf 1000 ml	<i>Aqua destillata</i>
pH mit HCl 1 N auf 7,4 eingestellt	

Tabelle 15: **PBS 1x**

Phosphatgepufferte Salzlösung mit Tween 20 (PBST) 10x (Stammlösung)

Menge	Reagenz
900 ml	<i>Aqua destillata</i>
80 g (1,37 M)	Natriumchlorid (NaCl)
2 g (27mM)	Kaliumchlorid (KCl)
14,24 g (80 mM)	Dinatriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)
2 g (15 mM)	Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)
0,8 ml	Salzsäure (HCl) 1 N
1 ml	Tween 20
Auf 1000 ml	<i>Aqua destillata</i>
pH mit HCl 1 N auf 7,4 eingestellt	

Tabelle 16: **Phosphatgepufferte Salzlösung mit Tween 20 (PBST) 10x (Stammlösung)**

PBST 1x

Menge	Reagenz
100 ml	PBST 10x
Auf 1000 ml	<i>Aqua destillata</i>
pH mit HCl 1 N auf 7,4 eingestellt	

Tabelle 17: PBST 1x

TAE (Tris-Acetat-EDTA-Puffer) 50x

Menge	Reagenz
242 g (2 M)	Tris-Base
57,1 ml (1 M)	Essigsäure 96%ig
18,6 g (0,06 M)	EDTA
Auf 1000 ml	<i>Aqua destillata</i>

Tabelle 18: TAE 50x

TAE 1x

Menge	Reagenz
20 ml	TAE 50x
Auf 1000 ml	<i>Aqua destillata</i>
pH mit HCl 1 N auf 8,0 eingestellt	

Tabelle 19: TAE 1x

2.1.5. Acrylamidgele

APS-Lösung 50%

Menge	Reagenz
5 g (22 mM)	APS
Auf 10 ml	<i>Aqua destillata</i>

Tabelle 20: APS-Lösung 50%

Sammelgel

Menge	Reagenz
1350 µl	<i>Aqua destillata</i>
326 µl	Acrylamidlösung 30%
790 µl	Oberer Gelpuffer
5,6 µl	APS-Lösung 50%
4,5 µl	TEMED

Tabelle 21: Sammelgel

Laufgel

Menge	Reagenz
1490 µl	<i>Aqua destillata</i>
1760 µl	Acrylamidlösung 30%
1076 µl	Unterer Gelpuffer
7,7 µl	APS-Lösung 50%
3 µl	TEMED

Tabelle 22: Laufgel

2.1.6. Antikörper

Antigen und Bestellnummer	Wirt	Firma
P2Y1, human LS-C163318	Kaninchen	Lifespan Biosciences, Seattle, WA, USA
P2Y11, human LS-C200442	Kaninchen	Lifespan Biosciences, Seattle, WA, USA
β -Actin, human A1978	Maus	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
<i>rabbit</i> -Ig HRP P0448	Ziege	Dako/Agilent, Santa Clara, CA, USA
<i>mouse</i> -Ig HRP P0447	Ziege	Dako/Agilent, Santa Clara, CA, USA

Tabelle 23: Antikörper

2.1.7. Primer

Gen	Sequenz <i>forward</i> (5'-3')	Sequenz <i>reverse</i> (5'-3')	Produktlänge (bp)
Human HMBS	TGTCTGGTAACGGCAAT GCG	ATGAGAGTGATTCGCGT GGG	70
Human P2RY1	GGTAGGGAGGAGGAAG ATGC	GTCAAGGGAAACTCGC TCTG	360
Human P2RY11	AGCAGACACAGGCTGAG GAT	CCTGGAACCCACTGAGT TTG	232

Tabelle 24: Primer

2.1.8. siRNA

Reagenz und Bestellnummer	Hersteller
SMARTpool: ON-TARGETplus P2RY1 L-005689-00-0005	Dharmacon, Lafayette, CO, USA
SMARTpool: ON-TARGETplus P2RY11 L-005691-00-0005	Dharmacon
ON-TARGETplus Non-targeting Pool D-001810-10-05	Dharmacon

Tabelle 25: **siRNA**

2.1.9. Software

Produkt	Hersteller
Microsoft Word 2010	Microsoft, Redmond, WA, USA
Microsoft Excel 2010	Microsoft
SPSS Statistics 21	IBM, Armonk, NY, USA
AlphaEaseFC 3.3.0	Alpha Innotec, Kasendorf, Deutschland

Tabelle 26: **Software**

2.2. Methoden

2.2.1. Zellkultur

Die U937-Zellen wurden von der „Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH“ (DSMZ, Braunschweig, Deutschland) gekauft und nach den Richtlinien der DSMZ behandelt. Hierbei wurden die Zellen in RPMI-1640 suspendiert, welchem 10% Fetales Kälberserum (FCS) und 2 mM L-Glutamin hinzugefügt wurden. Die Zellen wurden bei 37°C und 5% Kohlenstoffdioxid (CO₂) inkubiert.

10 µl der Zellsuspension wurden mit 90 µl Trypanblaulösung gemischt und die Anzahl der Zellen mittels Zählkammer unter dem Mikroskop ausgezählt. Nun wurde der Zellsuspension Medium inkl. FCS und L-Glutamin zugesetzt, sodass sich in einem ml Suspension 1x10⁶ Zellen befanden. 1 mg LPS wurden in 10 ml 0,9%-iger Natriumchloridlösung aufgelöst, vor Benutzung wurde diese LPS-Lösung 3 Minuten lang im Ultraschallbad behandelt. In den Wells der 24-Well-Platten wurden jeweils 10 µl LPS-Lösung [0,1 mg/ml] vorgelegt und anschließend 1 ml der Zellsuspension mit 1x10⁶ Zellen hinzugefügt. Nun wurden die Platten vorsichtig geschwenkt und anschließend für 5 Stunden bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde in die einzelnen Wells sowohl β-NAD-Lösung in verschiedenen Konzentrationen als auch jeweils 100 µM BzATP hinzugefügt. Im Anschluss wurden die Zellen weitere 30 Minuten bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Nun wurde der Inhalt der Wells einzeln in Eppendorfgefäße pipettiert und bei folgenden Einstellungen zentrifugiert: 16°C, 500 g, 8 Minuten.

Im Anschluss wurden 700 µl Überstand abgenommen. Der Überstand wurde dann bis zur Messung der IL-1β-Konzentration und der Laktatdehydrogenase (LDH)-Konzentration bei -80°C eingefroren. Eine Übersicht über den Ablauf der Versuche in der Zellkultur ist in Abbildung 1 dargestellt.

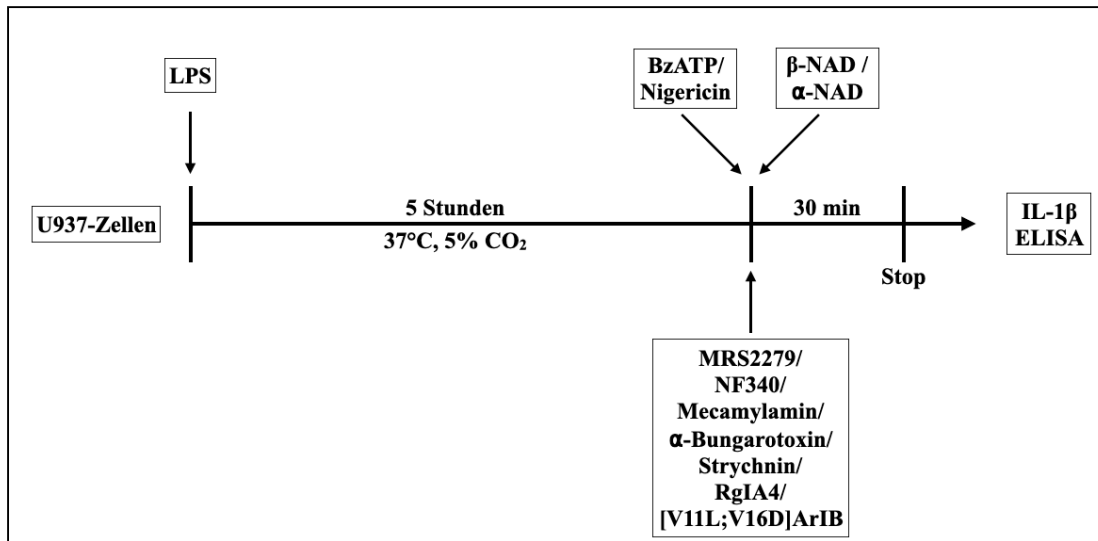


Abbildung 1: **Zeitleiste des Versuchsaufbaus.** Dargestellt ist der zeitliche Ablauf der Experimente in der Zellkultur bis zur Messung der IL-1 β -Konzentration bzw. der LDH-Konzentration im Überstand.
BzATP: Benzoylbenzoyl-Adenosintriphosphat; **IL-1 β :** Interleukin-1 β **LPS:** Lipopolysaccharid; **NAD:** Nikotinamidadenindinukleotid

Die verschiedenen Konzentrationen von β -NAD zur Erstellung der Dosis-Wirkungskurve betragen 1 μ M, 10 μ M, 100 μ M sowie 1 mM. Bei allen weiteren Experimenten betrug die Konzentration 1 mM β -NAD. In Experimenten, bei denen mit α -NAD gearbeitet wurde, betrug die Konzentration ebenfalls 1 mM. Als Positivkontrolle zur Inhibition der IL-1 β -Freisetzung wurden 100 mM Nikotin verwendet. Anstelle von BzATP wurde den U937-Zellen in einigen Experimenten 0,5 IE/ml des Enzyms Apyrase sowie 50 μ M des Toxins Nigericin hinzugegeben. Außerdem wurden in einigen Experimenten die Antagonisten der nAChR Mecamylamin [100 μ M], α -Bungarotoxin [1 μ M] sowie Strychnin [10 μ M] verwendet. Die Conopeptide RgIA4 [200 nM] und [V11L,V16D]ArIB [500 nM] wurden ebenfalls zur Inhibition der nAChR eingesetzt.

Um die Beteiligung der P2Y1- und P2Y11-Rezeptoren an der Signalkaskade von β -NAD zu ermitteln, wurden die Inhibitoren MRS2279 [0,5 μ M] und NF340 [5 μ M] verwendet.

2.2.2. siRNA-Transfektion

Um die Beteiligung des P2Y1- und P2Y11-Rezeptors zu untersuchen wurden außerdem U937-Zellen mit *small interfering* RNA (siRNA) transfiziert. Hierzu wurde der Amaxa *Cell Line Nucleofactor™ C* mit dem *Nucleofactor™ device II* verwendet und nach Herstellerangaben verfahren. Für die Transfektion wurden 40 pmol siRNA auf 1×10^6 Zellen verwendet. Anschließend wurden die Zellen für 48 Stunden bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Nun wurde mit den Zellen entweder der oben beschriebene Zellkulturversuch durchgeführt oder sie wurden bei -80°C eingefroren um später die Reverse Transkriptase Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) und Western Blots durchzuführen.

2.2.3. RNA-Isolierung

Um die *messenger* RNA (mRNA) Expression verschiedener Gene in den U937 Zellen zu untersuchen, wurde zuerst die RNA der Zellen mit dem peqGOLD Total RNA kit isoliert. Hierzu wurden die Zellen aufgetaut, mit Hilfe der Schwingmühle zerkleinert und im Anschluss nach den Herstellerangaben weiterverfahren. Hierbei wurden die Zellen gemäß dem Protokoll des Herstellers mit DNase behandelt. Zum Schluss wurde die RNA, welche am Ende des Vorgangs an eine Silikamembran gebunden ist, mit 50 µl Ribonuklease- (RNase)-freiem Wasser und anschließender Zentrifugation aus diesen Membranen gelöst. Nun wurde die RNA-Konzentration mit dem NanoDrop 1000 gemessen und die RNA-Lösung im Anschluss bei -80°C bis zur weiteren Verarbeitung eingefroren.

2.2.4. Herstellung von cDNA

Um die RNA in komplementäre DNA (cDNA) umzuschreiben wurden in ein Eppendorfgefäß jeweils 1 µg *Template* RNA sowie 1 µg *Random* Primer gegeben und anschließend mit Wasser auf 10 µl aufgefüllt. Damit die Primer an die Template-RNA binden wurden die Eppendorfgefäße in den *Thermal Cycler* gegeben und zuerst für 5 Minuten bei 70°C, dann für 5 Minuten bei 4°C inkubiert.

Nun wurde der Mastermix angesetzt, welcher aus folgenden Teilen besteht (Tab. 27):

Menge	Reagenz	Endkonzentration
5 µl	M-MLV-RT-Puffer	
7,5 µl	RNase-freies Wasser	
1,5 µl	Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs) (10 mM)	1 mM/µl
0,5 µl	M-MLV reverse Transkriptase (200 U/µl)	6,67 U/µl
0,5 µl	Ribonukleaseinhibitor (40 U/µl)	1,33 U/µl
15 µl	Gesamt	

Tabelle 27: **cDNA Mastermix**

Diese 15 µl Mastermix wurden zu dem Eppendorfgefäß mit dem Mix aus RNA und Primern gegeben. Nach kurzem Schütteln wurde das Gefäß wieder in den *Thermal Cycler* gegeben und bei folgenden Temperaturen inkubiert (Tab. 28):

Dauer	Temperatur
10 Minuten	25°C
60 Minuten	40°C
15 Minuten	70°C
15 Minuten	4°C

Tabelle 28: **Herstellung von cDNA im *Thermal Cycler***

Die so hergestellte fertige cDNA wurde direkt weiter verarbeitet oder bei -20°C eingefroren.

2.2.5. real-time PCR

Um die mRNA-Expression verschiedener Gene zu analysieren wurde eine *real-time* Polymerase-Kettenreaktion (PCR) im *Thermal Cycler* durchgeführt und mit der dazugehörigen Software ausgewertet. Zu Beginn wurde die benötigte Menge eines Mastermix angesetzt, welcher aus folgenden Teilen besteht (Tab. 29):

Menge	Reagenz	Endkonzentration
0,5 µl	Primer <i>Forward</i> (10 pmM/µl)	21,7 fM/µl
0,5 µl	Primer <i>Reverse</i> (10 pM/µl)	21,7 fM/µl
1 µl	Magnesiumchloridlösung (MgCl ₂) (50 mM)	2,17 mM/µl
13 µl	Platinum SYBR Green Mix	
8 µl	<i>Aqua destillata</i>	
23 µl	Gesamt	

Tabelle 29: **Real-time PCR Mastermix**

Als Referenz diente die mRNA-Expression des *housekeeping* Gens Hydroxymethylbilan-Synthase (HMBS). Jeweils 23 µl des Mastermix wurden in die Wells einer 96-Well-Platte gegeben. Anschließend wurden jeweils 2 µl cDNA hinzugegeben. Die Platten wurden im *Mini Plate Spinner* zentrifugiert, damit sich Mastermix und cDNA am Boden der Wells sammeln. Danach wurden die Platten in den *Thermal Cycler* eingelegt und bei folgenden Einstellungen inkubiert (Tab. 30):

Dauer	Temperatur	Schritt
2 Minuten	50°C	Aktivierung der DNA-Polymerase
5 Minuten	95°C	Denaturierung der DNA
5 Sekunden	95°C	Amplifizierung der DNA in 45 Zyklen
5 Sekunden	60°C	
30 Sekunden	72°C	
15 Sekunden	95°C	Erstellen der Schmelzkurve
1 Minute	1 Minute	
0,5° C/s bis auf 95°C		
∞	4°C	Aufbewahrung

Tabelle 30: **Real-time PCR im Thermal Cycler**

Mittels Gelelektrophorese wurden die PCR-Produkte ihrer Größe nach aufgetrennt. Hierzu wurden 1,2 g Agarose in 80 ml TAE-Puffer (1x) gegeben und in der Mikrowelle gelöst. Anschließend wurden 8 µl *Gelred* zur Färbung der Nukleinsäuren hinzugefügt. Die flüssige Lösung wurde nun in vorbereitete Gelkammern gegossen und ein Kamm

platziert, sodass sich Taschen für die Proben bildeten. Nach ca. 30 Minuten war das Gel fest, die Kämme wurden entfernt und das Gel in einer Laufkammer mit TAE-Puffer platziert. Jeweils 9 µl der PCR-Produkte wurden mit 1 µl DNA *Loading Dye* gemischt und in eine Probenflasche pipettiert. Um später die Fragmentgröße der PCR-Produkte ablesen zu können, wurden zusätzlich 4 µl eines *GeneRuler* in die letzte Probenkammer pipettiert. Anschließend wurden die Nukleinsäuren bei 100 V für ca. 30 Minuten ihrer Größe nach aufgetrennt. Das Gel wurde aus der Kammer entnommen und auf den Transluminator gelegt. Die Produktgrößen der PCR-Fragmente wurde mit der AlphaEaseFC 3.3.0 Software ausgewertet. Für die nachfolgenden Versuche wurden nur Primer verwendet, bei denen in der Gelelektrophorese eine einzelne Bande der erwarteten Größe sichtbar wurde.

Zur Sequenzierung der PCR-Fragmente wurden die Produkte mittels des *PCR Purification kit MinElute* aufgereinigt und nach Messen der DNA-Konzentration im NanoDrop 1000 auf 20 ng/µl in RNase-freiem Wasser eingestellt. Diese Proben wurden zur Sequenzierung an die Firma SeqLab (Göttingen, Deutschland) versandt.

2.2.6. Western Blots

2.2.6.1. Proteingehaltsbestimmung

Zur Extraktion der Proteine aus den U937-Zellen wurden 1×10^6 Zellen mit 50 µl Lysepuffer S1 in einem Eppendorfgefäß gemischt. Hierzu wurde ein kleiner Metallball gegeben und das Gefäß für 5 Minuten in der Schwingmühle gerüttelt. Der Metallball wurde anschließend mit Hilfe eines Magneten entfernt und das Homogenisat in ein frisches Eppendorfgefäß pipettiert. Dieses wurde nun für 15 Minuten bei 95°C erhitzt. Im Anschluss wurde das Homogenisat für 15 Minuten bei 13000 g zentrifugiert.

Um den Proteingehalt der Proben zu bestimmen, wurde das Pierce™ *BCA Protein Assay Kit* verwendet und nach Herstelleranleitung verfahren. Hierzu wurde eine *bicinchoninic acid* (BSA)-Lösung sowie eine zugehörige Verdünnungsreihe hergestellt. Die Inkubationsdauer nach Mischen der Reagenzien betrug 2 Stunden bei 37°C. Gemessen wurde mit dem FLUOstar Optima Microplate Reader nach Herstelleranleitung.

Nun wurde den Proben eine bestimmte Menge Probenpuffer S2 hinzugegeben, sodass die Proteinkonzentration der Proben jeweils 1,5 µg/µl betrug und die Proben wurden im Anschluss bei -20°C gelagert.

2.2.6.2. SDS-PAGE

Das Laufgel wurde hergestellt, in die Elektrophoresekammern gefüllt und für 2 Stunden bei Raumtemperatur polymerisiert. Danach wurde das Sammelgel hergestellt, ebenfalls in die Elektrophoresekammern gefüllt und ein Kamm in dem Sammelgel platziert. Das Sammelgel wurde über Nacht bei 4°C im Kühlschrank platziert, sodass das Gel polymerisiert. Am nächsten Tag wurde der Kamm entfernt. Die nun fertigen Gele wurden in die Laufkammer eingespannt, welche mit Laufpuffer gefüllt wurde. Die Proben wurden nun für 5 Minuten bei 95°C erhitzt und anschließend 5 Minuten bei 4500 g zentrifugiert. Im Anschluss wurden die Taschen der Sammelgele mit jeweils 10 µl der präparierten Proben gefüllt. Zusätzlich wurden 10 µl des *Precision Plus Protein Standards* Molekulargewichtsmarker in eine der Taschen pipettiert. An die Kammern wurde für ca. 15 Minuten eine konstante Spannung von 80 Volt angelegt, sodass sich die Proben am Übergang vom Sammelgel zum Laufgel konzentrieren. Anschließend wurde eine konstante Spannung von 120 Volt für ca. 90 Minuten angelegt, sodass die Proben der Größe nach aufgetrennt wurden.

2.2.6.3. Transfer

Als nächsten Schritt wurden Polyvinylidenfluorid(PVDF)-Membranen zurechtgeschnitten und für eine Minute in Methanol gelegt. Nach Ablauf der Elektrophorese wurden das Gel, die PVDF-Membran und Filterpapier für 10 Minuten in Transferpuffer gelegt. Um die aufgetrennten Proteine von dem Gel auf die PVDF-Membran zu übertragen wurde die Apparatur in der folgenden Reihenfolge zusammengesetzt: Filterpapier, Vlies, Gel, PVDF-Membran, Vlies, Filterpapier. Nun wurde die Transferkammer mit Transferpuffer gefüllt und das Gebilde zwischen zwei gelöcherten Plastikplatten so eingesetzt, dass der Strom von der Kathode durch das Gel

über die Membran zur Anode läuft. Bei 90 mA wurde nun für 90 Minuten der Transfer durchgeführt. Hiernach wurde die Membran für eine Stunde luftgetrocknet.

2.2.6.4. Proteindetektion

Die Membran wurde zunächst für eine Minute in Methanol gelegt und im Anschluss für 10 Minuten mit phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) gewaschen. Zur Absättigung der Proteinbindungsstellen auf der Membran wurde diese für 90 Minuten bei Raumtemperatur mit 5% Milchpulver in PBS inkubiert. Nun wurde der Primärantikörper in entsprechender Verdünnung auf die Membran gegeben und für zwei Stunden bei Raumtemperatur auf einer Wippe inkubiert. Hiernach wurde die Antikörperlösung herausgewaschen. Dazu wurde die Membran jeweils vier Mal für sieben Minuten mit phosphatgepufferter Salzlösung mit Tween (PBST) auf der Wippe gewaschen. Im Anschluss wurde der an Meerrettichperoxidase (*horseradish-peroxidase*, HRP) gebundene Sekundärantikörper in entsprechender Verdünnung in 2,5% Milchpulver in PBST verdünnt und für 90 Minuten mit der Membran inkubiert. Hiernach wurde die Membran jeweils drei Mal für 10 Minuten mit PBST und zum Schluss noch einmal für 10 Minuten mit PBS gewaschen.

Zum Nachweis der gebundenen HRP wurden die beiden Bestandteile des Chemolumineszenz-Reagenz SuperSignal™ West Femto miteinander gemischt und auf die Membran gegeben. Nach der Einwirkzeit von 5 Minuten wurde diese mit dem Folienschweißgerät in einer Plastiktüte eingeschweißt und in eine Röntgenkassette eingeklebt. Im Anschluss wurde in einer Dunkelkammer ein Röntgenfilm zurechtgeschnitten und auf die Membran gelegt. Nun wurde die Röntgenkassette für ca. 10 Sekunden geschlossen. Hiernach wurde der Röntgenfilm im Entwicklerbad entwickelt und in einem Wasserbad abgewaschen. Nun wurde der Röntgenfilm in der Fixierlösung fixiert und wiederum in einem Wasserbad abgewaschen. Jetzt wurde der Film zum Trocknen aufgehängt. Anschließend wurde er nochmals auf die Membran gelegt und das Molekulargewicht der Banden wurde anhand des Molekulargewichtsmarkers abgelesen.

Zur Quantifizierung der immunoreaktiven Banden wurde der entwickelte Röntgenfilm auf den Transluminator gelegt. Es wurde mit der Kamera ein Bild gemacht, welches auf den Computer übertragen und hier mit dem Programm AlphaEaseFC ausgewertet wurde.

2.2.7. ELISA

Um die Konzentration des ausgeschütteten IL-1 β zu messen, wurde das *Enzyme-linked Immunosorbent Assay* (ELISA)-Kit „*ELISA: Human Interleukin-1 β Quantikine*“ verwendet. Hierzu wurden jeweils 200 μ l Überstand in die Wells einer Mikrotiterplatte pipettiert und anschließend weiter nach Herstellerangaben verfahren. Hierbei band das in dem Überstand enthaltene IL-1 β an die Antikörper auf der beschichteten Mikrotiterplatte. Im nächsten Schritt wurde die Platte gewaschen und ein zweiter Antikörper, welcher an ein Enzym gekoppelt ist, wurde hinzugegeben. Dieser Zweitantikörper band nun an das IL-1 β . Anschließend wurde die Platte wiederum gewaschen und ein Chromogen hinzugegeben, welches von dem Enzym in einen sichtbaren Farbstoff umgewandelt wurde. Die Menge des Farbstoffs ist proportional zur Menge des IL-1 β . Anschließend wurde die Platte, welche eine Standardkurve mit rekombinantem IL-1 β enthält, im Fluostar Optima bei 450 nm ausgewertet. Anhand der Extinktion im Vergleich zur Standardkurve wurde die Menge des IL-1 β im Überstand ermittelt.

2.2.8. Laktatdehydrogenase-Bestimmung

Die Menge an ausgeschütteter Laktatdehydrogenase (LDH) im Überstand ermöglicht Rückschlüsse auf die Zellviabilität. Um die LDH-Konzentrationen in den Überständen zu ermitteln, wurde der *Cytotox96 Assay* verwendet und nach Herstellerangaben verfahren. Um die maximale Menge an LDH zu bestimmen, wurden jeweils 1×10^6 Zellen pro Experiment unstimuliert über die Versuchsreihe mitgeführt und anschließend zur Zellyse bei -80° C eingefroren. Nach mindestens 24 Stunden wurden die Proben aufgetaut und der Überstand mittels Zentrifugation von den ungelösten Zellbestandteilen

getrennt. Nach der Messung der LDH-Konzentrationen im *FLUOstar Optima Microplate Reader* bei 490 nm aller Proben einer Versuchsreihe wurden diese in Relation zum Maximalwert der unstimulierten Proben gesetzt.

2.3. Verwendete Software und Datenauswertung

Für die statistische Auswertung der Experimente wurde das Statistikprogramm SPSS benutzt. Zuerst wurde der Kruskal-Wallis-Test angewendet. Bei einem p-Wert von $\leq 0,05$ wurde angenommen, dass die Verteilung nicht zufällig zustande gekommen ist. Im Anschluss wurde dann mit Hilfe des Mann-Whitney-U-Tests untersucht, ob sich die Messergebnisse zweier Versuchsgruppen signifikant unterscheiden. Hierbei wurde bei einem p-Wert $\leq 0,05$ von einem signifikanten Unterschied ausgegangen.

3. Ergebnisse

3.1. Dosisabhängige Wirkung von β -NAD

In der ersten Versuchsreihe wurde untersucht, ob β -NAD eine Auswirkung auf die BzATP-induzierte Ausschüttung von IL-1 β aus LPS-stimulierten U937 Zellen hat. Die Konzentrationen von IL-1 β im Zellkulturmedium von Zellen, die weder mit LPS noch mit BzATP behandelt wurde lag zwischen 0,46 und 3,35 pg/ml, der Median war 2,38 pg/ml. Wurden die Zellen für 5 Stunden mit LPS stimuliert, war die IL-1 β -Konzentration zwischen 1,92 und 3,66 pg/ml, der Median lag bei 3,51 pg/ml. Bei der zusätzlichen Inkubation der Zellen für 30 min mit BzATP im Anschluss an die LPS-Stimulation stieg die IL-1 β -Konzentration im Zellkulturmedium signifikant auf Werte zwischen 26,42 und 51,42 pg/ml, der Median lag bei 36,09 pg/ml. Wurde Nikotin, welches in den Versuchen als Positivkontrolle diente, für 30 Minuten zusammen mit BzATP appliziert, konnte die ausgeschüttete Menge an IL-1 β auf Werte ähnlich der unstimulierten Zellen reduziert werden. Die gemessenen IL-1 β -Konzentrationen lagen zwischen 2,20 und 7,67 pg/ml, der Median lag bei 3,49 pg/ml. Die Zugabe von β -NAD in ansteigenden Konzentrationen von 1 μ M bis 1 mM zusammen mit BzATP für 30 Minuten zeigte eine dosisabhängige Inhibition der BzATP-induzierten Ausschüttung von IL-1 β aus LPS-stimulierten U937-Zellen in das Zellkulturmedium ($IC_{50} = 15 \mu$ M). Für die Zugabe von 1 mM β -NAD konnte eine signifikante Reduktion der IL-1 β -Konzentration im Vergleich zur Behandlung ohne β -NAD gezeigt werden ($p = 0,008$, $n = 5$). Die gemessenen IL-1 β -Konzentrationen lagen zwischen 5,05 und 13,41 pg/ml, der Median lag bei 6,23 pg/ml (Abb. 2a).

Die LDH-Konzentration der einzelnen Versuchsansätze wurden im Überstand gemessen, in Relation zur maximalen LDH-Konzentration aus lysierten, unstimulierten Zellen gesetzt und in Prozent angegeben. Der maximale Anteil betrug 14,0%, die Mediane schwankten zwischen 1,26% und 4,56% (Abb. 2b). Es zeigten sich hierbei keine signifikanten Unterschiede der LDH-Ausschüttung.

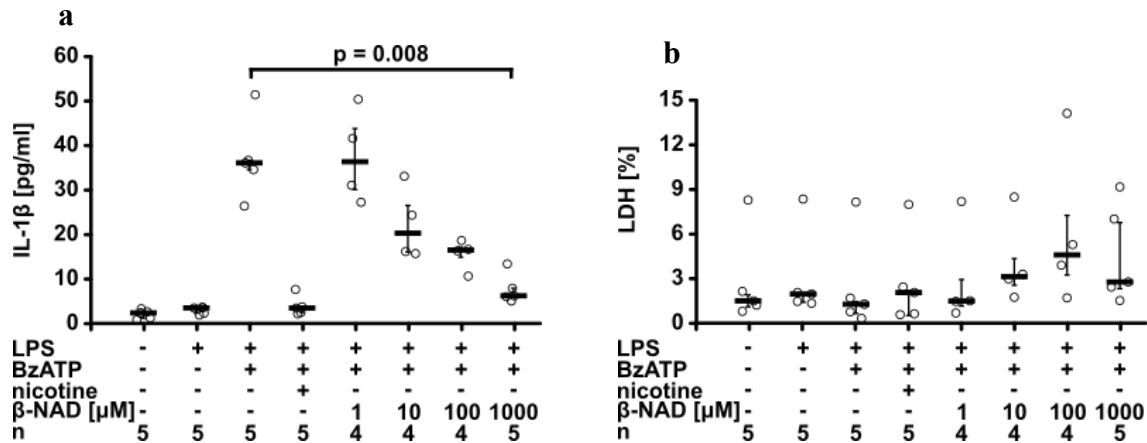


Abbildung 2a/b: **β-NAD inhibiert in dosisabhängiger Weise die BzATP-induzierte Ausschüttung von IL-1β aus LPS-stimulierten U937-Zellen.** Die Zellen wurden 5 Stunden mit LPS stimuliert und anschließend 30 Minuten mit BzATP und β-NAD bzw. Nikotin inkubiert. a) BzATP induziert eine vermehrte Ausschüttung von IL-1β aus LPS-stimulierten U937-Zellen in das Medium. Eine Konzentration von 1 mM β-NAD inhibiert die Ausschüttung von IL-1β nahezu vollständig. Nikotin diente als Positivkontrolle. b) Die LDH-Konzentrationen im Überstand wurden gemessen und ins Verhältnis zur maximalen LDH-Freisetzung aus lysierten Zellen gesetzt. Es konnten keine signifikanten Unterschiede der LDH-Konzentrationen im Zellüberstand gezeigt werden. Die Werte sind als Punkte und die Mediane als Balken abgebildet. Die Antennen stellen die 25. sowie 75. Perzentile dar. Es wurde zuerst der Kruskal-Wallis-Test, dann der Mann-Whitney-U-Test durchgeführt.

β-NAD: β-Nikotinamidadenindinukleotid; **BzATP:** Benzoylbenzoyl-Adenosintriphosphat; **IL-1β:** Interleukin-1β; **LDH:** Laktatdehydrogenase; **LPS:** Lipopolysaccharid

3.2. α-NAD

Als nächstes wurde untersucht, ob α-NAD, das Stereoisomer von β-NAD, denselben Effekt auf die IL-1β-Ausschüttung hat. Bei der Inkubation von LPS-stimulierten U937-Zellen mit BzATP lag die gemessene IL-1β-Konzentration im Medium zwischen 38,67 und 59,15 pg/ml, der Median bei 46,125 pg/ml. Wurde zusätzlich α-NAD zu den Zellen gegeben, lag die gemessene IL-1β-Konzentration im Medium zwischen 35,32 und 55,91 pg/ml, der Median bei 44,46 pg/ml (Abb. 3a).

Es konnte somit keine signifikante Inhibition der IL-1β-Ausschüttung gezeigt werden ($p = 0,686$, $n = 4$). Die Inkubation von LPS-stimulierten U937-Zellen mit α-NAD ohne BzATP führte zu keiner erhöhten IL-1β-Konzentration im Medium im Vergleich zu unstimulierten Zellen.

Die LDH-Konzentration der einzelnen Versuche wurden im Überstand gemessen, in Relation zur maximalen LDH-Konzentration aus lysierten, unstimulierten Zellen gesetzt und in Prozent angegeben. Der maximale Anteil betrug 3,99%, die Mediane schwankten

zwischen 1,69% und 3,26% (Abb. 3b). Es zeigten sich hierbei keine signifikanten Unterschiede der LDH-Ausschüttung.

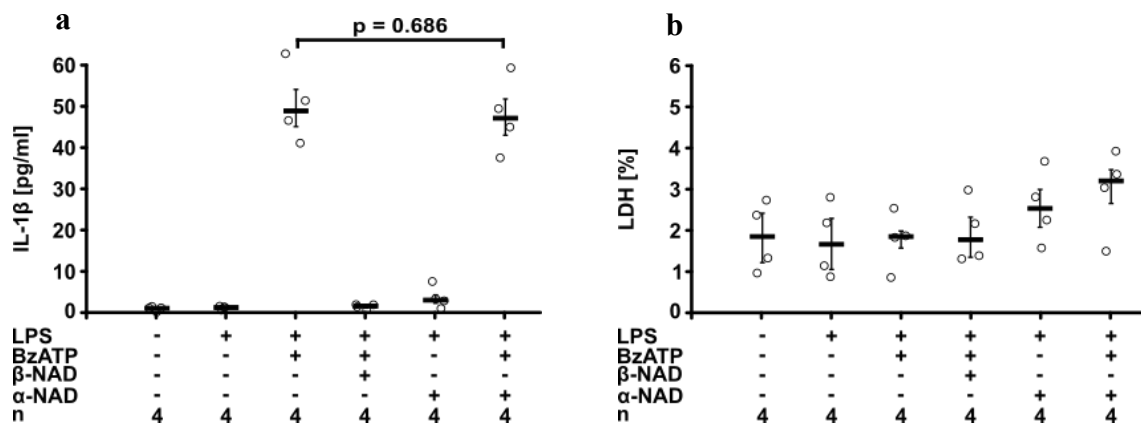


Abbildung 3a/b: α -NAD hat keinen signifikanten Effekt auf die BzATP-induzierte Ausschüttung von IL-1 β aus LPS-stimulierten U937-Zellen. Die Zellen wurden 5 Stunden mit LPS stimuliert und anschließend 30 Minuten mit BzATP und α -NAD bzw. β -NAD inkubiert. a) BzATP induziert eine vermehrte Ausschüttung von IL-1 β aus LPS-stimulierten U937-Zellen in das Medium. Die Zugabe von 1 mM α -NAD zeigte im Gegensatz zur selben Konzentration β -NAD keinen signifikanten Einfluss auf die gemessene IL-1 β Konzentration im Medium. b) Die LDH-Konzentrationen im Überstand wurden gemessen und ins Verhältnis zur maximalen LDH-Freisetzung aus lysierten Zellen gesetzt. Es konnten keine signifikanten Unterschiede der LDH-Konzentrationen im Zellüberstand gezeigt werden. Die Werte sind als Punkte und die Mediane als Balken abgebildet. Die Antennen stellen die 25. sowie 75. Perzentile dar. Es wurde zuerst der Kruskal-Wallis-Test, dann der Mann-Whitney-U-Test durchgeführt.

α -NAD: α -Nikotinamidadenindinukleotid; β -NAD: β -Nikotinamidadenindinukleotid; BzATP: Benzoylbenzoyl-Adenosintriphosphat; IL-1 β : Interleukin-1 β ; LDH: Laktatdehydrogenase; LPS: Lipopolysaccharid

3.3. Inhibitoren der P2Y-Rezeptoren

Im nächsten Experiment sollte der Einfluss der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren P2Y1 und P2Y11 auf die inhibierende Wirkung von β -NAD auf die IL-1 β -Ausschüttung aus U937-Zellen getestet werden. Die Stimulation der Zellen für 5 Stunden mit LPS mit anschließender Inkubation mit ATP für 30 Minuten führte zu einer deutlichen Freisetzung an IL-1 β in das Medium, der Median lag bei 53,84 pg/ml. Wie zuvor gezeigt inhibierte β -NAD diese Freisetzung nahezu vollständig, der Median lag bei 2,26 pg/ml. Wurde zu den Zellen jedoch zusammen mit β -NAD der spezifische Inhibitor des P2Y1-Rezeptors (MRS2279; 0,5 μ M) gegeben, konnte der Effekt von β -NAD signifikant antagonisiert werden ($p = 0,001$, $n = 8$ bzw. $n = 6$). Die gemessenen IL-1 β -Konzentrationen im Medium lagen zwischen 13,24 und 24,35 pg/ml, der Median bei 17,94 pg/ml. Bei der Inkubation der Zellen mit dem spezifischen Inhibitor des P2Y11-

Rezeptors (NF340; 5 μ M) wurde der inhibitorische Effekt von β -NAD nahezu vollständig aufgehoben ($p = 0,004$, $n = 8$ bzw. $n = 4$). Die gemessenen IL-1 β -Konzentrationen im Medium lagen zwischen 33,41 und 57,23 pg/ml, der Median bei 49,02 pg/ml (Abb. 4a).

Die LDH-Konzentration der einzelnen Versuche wurden im Überstand gemessen, in Relation zur maximalen LDH-Konzentration aus lysierten, unstimulierten Zellen gesetzt und in Prozent angegeben. Der maximale Anteil betrug 4,59%, die Mediane schwankten zwischen 2,00% und 3,82% (Abb. 4b). Es zeigten sich hierbei keine signifikanten Unterschiede der LDH-Ausschüttung.

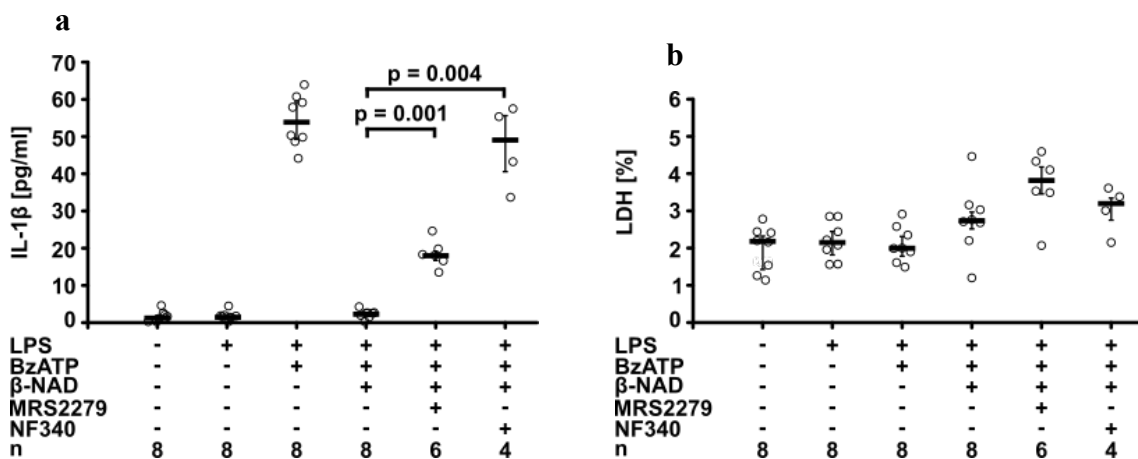


Abbildung 4a/b: **MRS2279 und NF340 antagonisieren den inhibitorischen Effekt von β -NAD auf die BzATP-induzierte Ausschüttung von IL-1 β aus LPS-stimulierten U937-Zellen.** Die Zellen wurden 5 Stunden mit LPS stimuliert und anschließend 30 Minuten mit BzATP, β -NAD, MRS2279 und NF340 inkubiert. a) BzATP führt zu einer vermehrten Ausschüttung von IL-1 β aus LPS-stimulierten U937-Zellen in das Medium. Die Zugabe von β -NAD inhibiert diese Ausschüttung. Durch die Inkubation der Zellen mit MRS2279 und NF340 kann der Effekt von β -NAD abgeschwächt werden. b) Die LDH-Konzentrationen im Überstand wurden gemessen und ins Verhältnis zur maximalen LDH-Freisetzung aus lysierten Zellen gesetzt. Es konnten keine signifikanten Unterschiede der LDH-Konzentrationen im Zellüberstand gezeigt werden.

Die Werte sind als Punkte und die Mediane als Balken abgebildet. Die Antennen stellen die 25. sowie 75. Perzentile dar. Es wurde zuerst der Kruskal-Wallis-Test, dann der Mann-Whitney-U-Test durchgeführt.

β -NAD: β -Nikotinamidadenindinukleotid; **BzATP:** Benzoylbenzoyl-Adenosintriphosphat; **IL-1 β :** Interleukin-1 β ; **LDH:** Laktatdehydrogenase; **LPS:** Lipopolysaccharid

3.4. Antagonisten nikotinischer Acetylcholinrezeptoren

In dieser Versuchsreihe sollte untersucht werden, ob der inhibitorische Effekt von β -NAD auf die IL-1 β -Ausschüttung aus BzATP-behandelten und mit LPS vorstimulierten U937-Zellen über nikotinische Acetylcholinrezeptoren vermittelt wird. Die Zellen wurden für 5 Stunden mit LPS stimuliert und anschließend für 30 Minuten mit BzATP inkubiert. Dies führte zu einer Freisetzung von IL-1 β in das Medium, der Median lag bei 36,09 pg/ml. Die Inkubation von 1 mM β -NAD zusammen mit BzATP für 30 Minuten reduzierte die freigesetzte Menge an IL-1 β deutlich, sodass diese in einer ähnlichen Größenordnung wie bei den unstimulierten Zellen lag. Der Median war 3,49 pg/ml. Diese Daten wurden bereits in Abbildung 2a gezeigt. In den folgenden Versuchen wurden zusätzlich zu BzATP und β -NAD für 30 Minuten jeweils die nikotinischen Acetylcholinrezeptorantagonisten Mecamylamin, α -Bungarotoxin, Strychnin sowie die Conopeptide [V11L;V16D]ArIB und RgIA4 gegeben. Bei der Behandlung mit Mecamylamin wurden IL-1 β -Konzentration im Medium zwischen 17,94 und 42,10 pg/ml gemessen, der Median lag bei 29,62 pg/ml. Es zeigte sich eine signifikante Antagonisierung des inhibitorischen Effekts von β -NAD durch Mecamylamin ($p = 0,016$, $n = 5$ bzw. $n = 4$). Bei der Behandlung mit α -Bungarotoxin wurden IL-1 β -Konzentration im Medium zwischen 11,12 und 41,56 pg/ml gemessen, der Median lag bei 24,125 pg/ml. Es zeigte sich eine signifikante Antagonisierung des inhibitorischen Effekts von β -NAD durch α -Bungarotoxin ($p = 0,032$, $n = 5$ bzw. $n = 4$). Bei der Behandlung mit Strychnin wurden IL-1 β -Konzentration im Medium zwischen 23,34 und 49,29 pg/ml gemessen, der Median lag bei 29,58 pg/ml. Es zeigte sich eine signifikante Antagonisierung des inhibitorischen Effekts von β -NAD durch Strychnin ($p = 0,016$, $n = 5$ bzw. $n = 4$). Bei der Behandlung mit RgIA4 wurden IL-1 β -Konzentration im Medium zwischen 45,27 und 46,98 pg/ml gemessen, der Median lag bei 46,35 pg/ml. Es zeigte sich eine signifikante Antagonisierung des inhibitorischen Effekts von β -NAD durch RgIA4 ($p = 0,016$, $n = 5$ bzw. $n = 4$). Bei der Behandlung mit [V11L;V16D]ArIB wurden IL-1 β -Konzentration im Medium zwischen 2,71 und 4,51 pg/ml gemessen, der Median lag bei 3,80 pg/ml (Abb. 5a). Es konnte hierbei keine Antagonisierung des inhibitorischen Effekts von β -NAD durch [V11L;V16D]ArIB gezeigt werden.

Die LDH-Konzentration der einzelnen Versuche wurden im Überstand gemessen, in Relation zur maximalen LDH-Konzentration aus lysierten, unstimulierten Zellen gesetzt und in Prozent angegeben. Der maximale Anteil betrug 9,09%, die Mediane schwankten zwischen 0,29% und 2,75% (Abb. 5b). Es zeigten sich hierbei keine signifikanten Unterschiede der LDH-Ausschüttung.

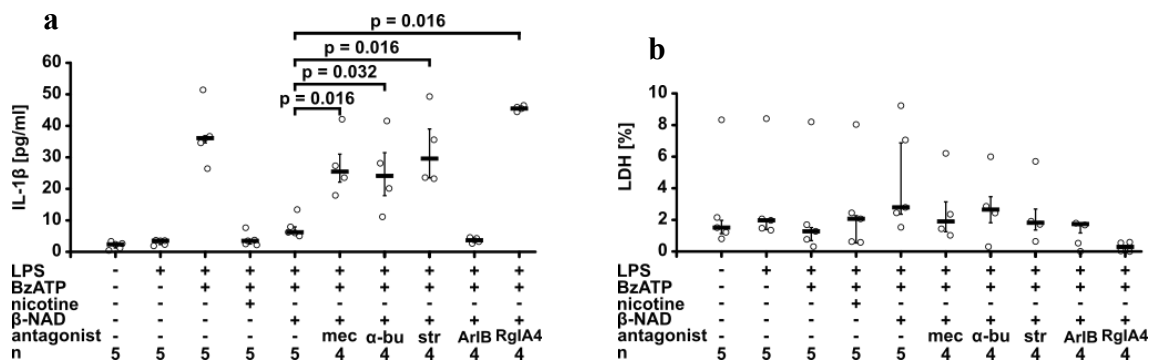


Abbildung 5a/b: Mecamylamin, α -Bungarotoxin, Strychnin sowie RgIA4 antagonisieren den inhibitorischen Effekt von β -NAD auf die BzATP-induzierte Ausschüttung von IL-1 β aus LPS-stimulierten U937-Zellen. Die Zellen wurden 5 Stunden mit LPS stimuliert und anschließend 30 Minuten mit BzATP, β -NAD, Mecamylamin, α -Bungarotoxin, Strychnin, [V11L;V16D]ArIB und RgIA4 inkubiert. a) BzATP führt zu einer vermehrten Ausschüttung von IL-1 β aus LPS-stimulierten U937-Zellen in das Medium. Die Zugabe von β -NAD inhibiert diese Ausschüttung. Durch die Inkubation der Zellen mit Mecamylamin, α -Bungarotoxin, Strychnin sowie RgIA4 kann der Effekt von β -NAD abgeschwächt werden. Die Inkubation der Zellen mit [V11L;V16D]ArIB zeigt keinen signifikanten Effekt auf die inhibitorische Wirkung von β -NAD. b) Die LDH-Konzentrationen im Überstand wurden gemessen und ins Verhältnis zur maximalen LDH-Freisetzung aus lysierten Zellen gesetzt. Es konnten keine signifikanten Unterschiede der LDH-Konzentrationen im Zellüberstand gezeigt werden.

Die Werte sind als Punkte und die Mediane als Balken abgebildet. Die Antennen stellen die 25. sowie 75. Perzentile dar. Es wurde zuerst der Kruskal-Wallis-Test, dann der Mann-Whitney-U-Test durchgeführt.

α -bu: α -Bungarotoxin; **β -NAD:** β -Nikotinamidadenindinukleotid; **ArIB:** [V11L;V16D]ArIB; **BzATP:** Benzoylbenzoyl-Adenosintriphosphat; **IL-1 β :** Interleukin-1 β ; **LDH:** Laktatdehydrogenase; **LPS:** Lipopolysaccharid; **mec:** Mecamylamin; **str:** Strychnin

3.5. Transfektionen

3.5.1. P2Y-Rezeptoren

Um den Einfluss der P2Y-Rezeptoren auf die Wirkung von β -NAD weiter zu untersuchen wurden die folgenden Experimente durchgeführt. Die U937-Zellen wurden entweder mit Kontroll-siRNA oder mit siRNA, die spezifisch gegen die mRNA der P2Y1- bzw. P2Y11-Rezeptoren gerichtet ist, transfiziert. Nach 48 Stunden Inkubation wurden die Zellen für 5 Stunden mit LPS stimuliert und im Anschluss für 30 Minuten mit BzATP und β -NAD inkubiert. In allen drei Gruppen führte die Stimulation mit LPS

mit nachfolgender Zugabe von BzATP zu einer deutlichen Freisetzung von IL-1 β in das Medium. Der Median in der Kontrollgruppe mit LPS und BzATP lag bei 46,52 pg/ml. Die Mediane bei der Transfektion mit siRNA, die gegen die mRNA von P2RY1 bzw. P2RY11 gerichtet ist, lagen bei 43,42 pg/ml und 49,65 pg/ml. Bei der Zugabe von 1 mM β -NAD wurde die Menge freigesetztes IL-1 β , wie in den vorherigen Versuch gezeigt, deutlich reduziert. Der Median lag in der Kontrollgruppe bei 3,14 pg/ml. Wurden die Zellen jedoch zuvor mit siRNA gegen die mRNA des P2Y1-Rezeptor transfiziert, so konnte der Effekt von β -NAD signifikant abgeschwächt werden ($p = 0,029$, $n = 4$). Die gemessenen IL-1 β Werte lagen zwischen 10,73 und 16,74 pg/ml, der Median bei 14,60 pg/ml. Wurden die Zellen zuvor mit siRNA gegen die mRNA des P2Y11-Rezeptors transfiziert, konnte der Effekt von β -NAD ebenfalls signifikant abgeschwächt werden ($p = 0,029$, $n = 4$). Die gemessenen IL-1 β -Werte lagen hier zwischen 21,56 und 30,98 pg/ml, der Median bei 26,96 pg/ml (Abb. 6a).

Die LDH-Konzentration der einzelnen Versuche wurden im Überstand gemessen, in Relation zur maximalen LDH-Konzentration aus lysierten, unstimulierten Zellen gesetzt und in Prozent angegeben. Der maximale Anteil betrug 10,08%, die Mediane schwankten zwischen 2,93% und 4,81% (Abb. 6b). Es zeigten sich hierbei keine signifikanten Unterschiede der LDH-Ausschüttung.

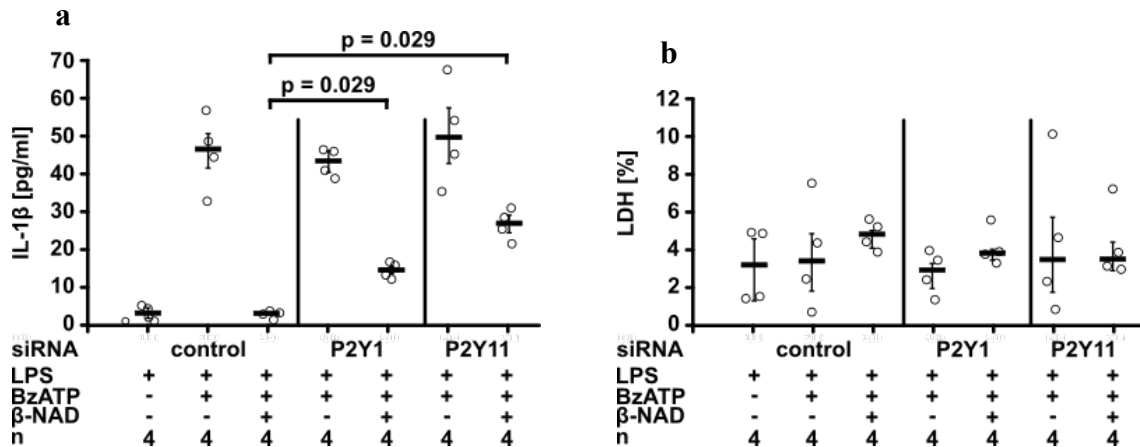


Abbildung 6a/b: Die Transfektion von U937-Zellen mit siRNA gegen P2Y1- und P2Y11-mRNA schwächt den inhibitorischen Effekt von β -NAD auf die BzATP-induzierte Ausschüttung von IL-1 β aus LPS-stimulierten U937-Zellen ab. Die Zellen wurden mit siRNA transfiziert, 48 Stunden inkubiert und anschließend für 5 Stunden mit LPS stimuliert und für 30 Minuten mit BzATP und β -NAD inkubiert. a) BzATP führt zu einer vermehrten Ausschüttung von IL-1 β aus LPS-stimulierten U937-Zellen in das Medium. Die Zugabe von β -NAD inhibiert diese Ausschüttung bei Zellen, die mit Kontroll-siRNA transfiziert wurden. Durch die Transfektion der Zellen mit siRNA gegen P2Y1- und P2Y11-mRNA kann der Effekt von β -NAD abgeschwächt werden. b) Die LDH-Konzentrationen im Überstand wurden gemessen und ins Verhältnis zur maximalen LDH-Freisetzung aus lysierten Zellen gesetzt. Es konnten keine signifikanten Unterschiede der LDH-Konzentrationen im Zellüberstand gezeigt werden.

Die Werte sind als Punkte und die Mediane als Balken abgebildet. Die Antennen stellen die 25. sowie 75. Perzentile dar. Es wurde zuerst der Kruskal-Wallis-Test, dann der Mann-Whitney-U-Test durchgeführt.

β -NAD: β -Nikotinamidadenindinukleotid; BzATP: Benzoylbenzoyl-Adenosintriphosphat; IL-1 β : Interleukin-1 β ; LDH: Laktatdehydrogenase; LPS: Lipopolysaccharid; siRNA: *small interfering RNA*

3.5.2. Nikotinische Acetylcholinrezeptoren

Um den Einfluss der nAChR weiter zu untersuchen wurden außerdem Versuche mit siRNA gegen die Untereinheiten CHRNA7, CHRNA9, CHRNA10 einzeln sowie gegen die Untereinheiten CHRNA7 und CHRNA10 zusammen durchgeführt. Zunächst wurden die Zellen mit der siRNA transfiziert und für 48 Stunden inkubiert. Danach wurden die U937-Zellen für 5 Stunden mit LPS stimuliert und für 30 Minuten mit BzATP und β -NAD inkubiert. In der Kontrollgruppe führte die Stimulation mit LPS und BzATP zu einer deutlichen Freisetzung an IL-1 β , der Median lag bei 46,52 pg/ml. Die Behandlung mit β -NAD inhibierte diese Ausschüttung nahezu vollständig, der Median lag bei 1,87 pg/ml. Die Transfektion der U937-Zellen mit siRNA gegen CHRNA 7 schwächte den Effekt von β -NAD signifikant ab ($p = 0,029$, $n = 4$). Die gemessenen IL-1 β -Werte lagen zwischen 27,71 und 37,76 pg/ml, der Median bei 34,64 pg/ml. Auch die gemeinsame Transfektion der Zellen mit siRNA gegen CHRNA7 und CHRNA10

schwächte den Effekt von β -NAD auf die BzATP-induzierte Ausschüttung von IL-1 β aus LPS-stimulierten U937-Zellen signifikant ab ($p = 0,029$, $n = 4$). Die gemessenen IL-1 β -Werte lagen zwischen 30,30 und 43,53 pg/ml, der Median bei 37,19 pg/ml (Abb. 7a). Die alleinige Transfektion der Zellen mit siRNA gegen CHRNA7 bzw. CHRNA10 hatte keinen signifikanten Effekt auf die Wirkung von β -NAD.

Die LDH-Konzentration der einzelnen Versuche wurden im Überstand gemessen, in Relation zur maximalen LDH-Konzentration aus lysierten, unstimulierten Zellen gesetzt und in Prozent angegeben. Der maximale Anteil betrug 20,19%, die Mediane schwankten zwischen 1,88% und 11,72% (Abb. 7b). Es zeigte sich hierbei keine signifikanten Unterschiede der LDH-Ausschüttung.

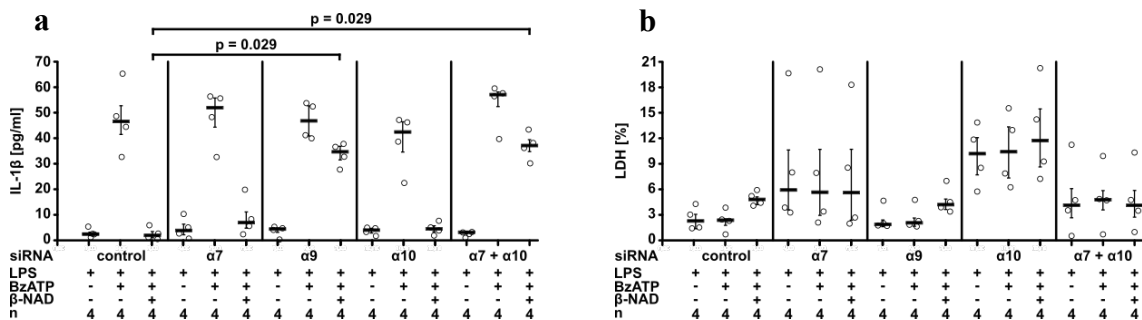


Abbildung 7a/b: Die Transfektion von U937-Zellen mit siRNA gegen CHRNA9- sowie CHRNA7- und CHRNA10-mRNA antagonisieren den inhibitorischen Effekt von β -NAD auf die BzATP-induzierte Ausschüttung von IL-1 β aus LPS-stimulierten U937-Zellen. Die Zellen wurden mit siRNA transfiziert, 48 Stunden inkubiert und anschließend für 5 Stunden mit LPS stimuliert und für 30 Minuten mit BzATP und β -NAD inkubiert. a) BzATP führt zu einer vermehrten Ausschüttung von IL-1 β aus LPS-stimulierten U937-Zellen in das Medium. Die Zugabe von β -NAD inhibiert diese Ausschüttung bei Zellen, die mit Kontroll-siRNA transfiziert wurden. Durch die Transfektion der Zellen mit siRNA gegen CHRNA9- sowie CHRNA7- und CHRNA10-mRNA kann der Effekt von β -NAD antagonisiert werden. Die Transfektion mit siRNA gegen CHRNA7- sowie CHRNA10-mRNA zeigt keinen signifikanten Effekt auf die inhibitorische Wirkung von β -NAD. b) Die LDH-Konzentrationen im Überstand wurden gemessen und ins Verhältnis zur maximalen LDH-Freisetzung aus lysierten Zellen gesetzt. Es konnten keine signifikanten Unterschiede der LDH-Konzentrationen im Zellüberstand gezeigt werden.

Die Werte sind als Punkte und die Mediane als Balken abgebildet. Die Antennen stellen die 25. sowie 75. Perzentile dar. Es wurde zuerst der Kruskal-Wallis-Test, dann der Mann-Whitney-U-Test durchgeführt.

β -NAD: β -Nikotinamidadenindinukleotid; **BzATP:** Benzoylbenzoyl-Adenosintriphosphat; **IL-1 β :** Interleukin-1 β ; **LDH:** Laktatdehydrogenase; **LPS:** Lipopolysaccharid; **siRNA:** *small interfering RNA*

3.6. Real-time PCR

In der nächsten Versuchsreihe sollte untersucht werden, ob die Transfektion der U937-Zellen mit siRNA gegen die mRNA der P2Y1- bzw. P2Y11-Rezeptoren zu einer Reduktion der P2Y1- bzw. P2Y11-mRNA führt. Hierzu wurden die Zellen zunächst mit siRNA transfiziert und dann für 48 Stunden inkubiert. Anschließend wurde die RNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und eine real-time PCR durchgeführt. Als Haushaltsgen wurde HMBS benutzt. Die gemessene Menge an P2Y1- bzw. P2Y11-mRNA wurde in das Verhältnis zur HMBS-mRNA gesetzt und in der Kontrollgruppe für jeden Versuch als 1 *arbitrary unit* (AU) festgelegt. Die Transfektion der U937-Zellen mit siRNA gegen P2Y1-mRNA führte zu einer signifikanten Reduktion der P2Y1-mRNA ($p = 0,00016$, $n = 8$). Die Werte schwankten zwischen 0,04 und 0,60 AU, der Median lag bei 0,34 AU. Zusätzlich zeigte sich bei der Transfektion der U937-Zellen mit siRNA gegen P2Y11-mRNA ebenfalls eine signifikante Reduktion der P2Y11-mRNA ($p = 0,00016$, $n = 8$). Die Werte schwankten zwischen 0,06 und 0,99 AU, der Median lag bei 0,44 AU (Abb. 8). Die Transfektion der U937-Zellen mit siRNA gegen P2Y11-mRNA führte zu einer signifikanten Reduktion der P2Y11-mRNA ($p = 0,00016$, $n = 8$). Die Werte schwankten zwischen 0,13 und 0,57 AU, der Median lag bei 0,32 AU (Abb. 9).

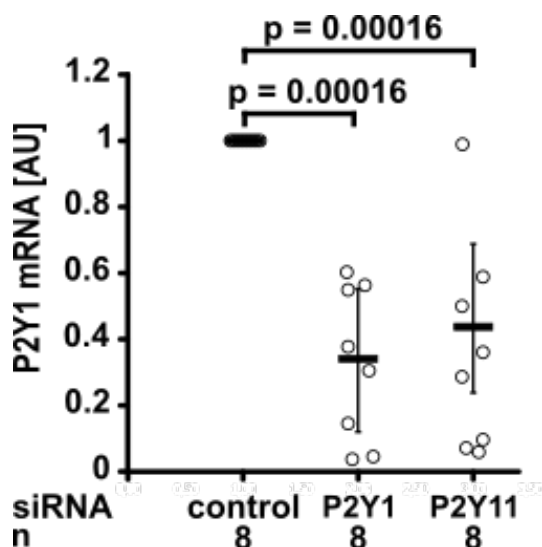


Abbildung 8: Die Transfektion von U937-Zellen mit siRNA gegen P2Y1-mRNA und gegen P2Y11-mRNA reduzierten die mittels real-time PCR gemessene Konzentration an P2Y1-mRNA signifikant. Die Konzentration der P2Y1-mRNA wird in *arbitrary units* (AU) angegeben, wobei die Konzentration in der Kontrollgruppe für jede Versuchsreihe mit 1 AU festgelegt wurde. Die mittels real-time PCR gemessenen Konzentrationen an P2Y1-mRNA wurden hierzu ins Verhältnis gesetzt. Hierbei zeigte sich eine signifikante Reduktion der P2Y1-mRNA bei Transfektion mit siRNA gegen P2Y1-mRNA und bei Transfektion mit siRNA gegen P2Y11-mRNA.

Die Werte sind als Punkte und die Mediane als Balken abgebildet. Die Antennen stellen die 25. sowie 75. Perzentile dar. Es wurde zuerst der Kruskal-Wallis-Test, dann der Mann-Whitney-U-Test durchgeführt.

mRNA: messenger RNA; **siRNA:** small interfering RNA

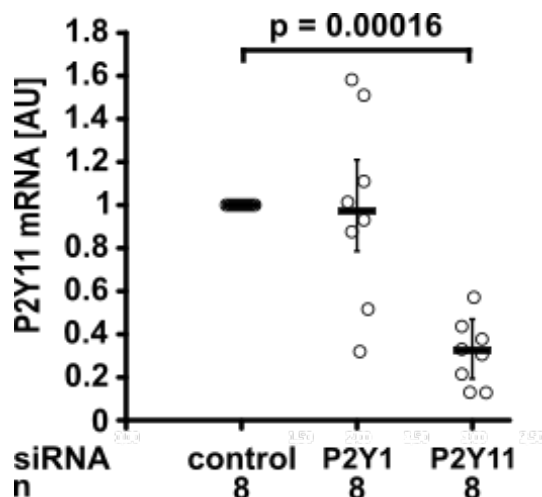


Abbildung 9: Die Transfektion von U937-Zellen mit siRNA gegen P2Y11-mRNA reduzierten die mittels real-time PCR gemessene Konzentration an P2Y11-mRNA signifikant. Die Konzentration der P2Y11-mRNA wird in *arbitrary units* (AU) angegeben, wobei die Konzentration in der Kontrollgruppe für jede Versuchsreihe mit 1 AU festgelegt wurde. Die mittels real-time PCR gemessenen Konzentrationen an P2Y11-mRNA wurden hierzu ins Verhältnis gesetzt. Hierbei zeigte sich eine signifikante Reduktion der P2Y11-mRNA bei Transfektion mit siRNA gegen P2Y11-mRNA.

Die Werte sind als Punkte und die Mediane als Balken abgebildet. Die Antennen stellen die 25. sowie 75. Perzentile dar. Es wurde zuerst der Kruskal-Wallis-Test, dann der Mann-Whitney-U-Test durchgeführt.

mRNA: messenger RNA; **siRNA:** small interfering RNA

3.7. Western Blots

In der nächsten Versuchsreihe sollte untersucht werden, ob die Transfektion der U937-Zellen mit siRNA gegen P2Y1- bzw. P2Y11-mRNA zu einer Reduktion der exprimierten Menge an P2Y1- bzw. P2Y11-Protein führt. Hierzu wurden die Zellen mit siRNA transfiziert, für 48 Stunden inkubiert und anschließend lysiert. Mit den Lysaten wurden Western Blots durchgeführt und die optische Dichte (OD) der Banden wurde gemessen. Zusätzlich wurde die OD der β -Aktin-Banden gemessen und die OD der P2Y1- bzw. P2Y11-Banden zu diesen ins Verhältnis gesetzt. Die gemessene

Konzentration an P2Y1- bzw. P2Y11-Protein wurde als dieses Verhältnis angegeben, als *arbitrary units* (AU) bezeichnet und für die Kontrollgruppe jeweils als 1 AU festgelegt. Die Transfektion der U937-Zellen mit siRNA gegen P2Y1-mRNA führte zu einer signifikanten Reduktion an messbarem P2Y1-Protein im Western Blot ($p = 0,008$, $n = 5$). Die gemessenen Werte lagen zwischen 0,42 und 0,94 AU, der Median bei 0,57 AU (Abb. 10).

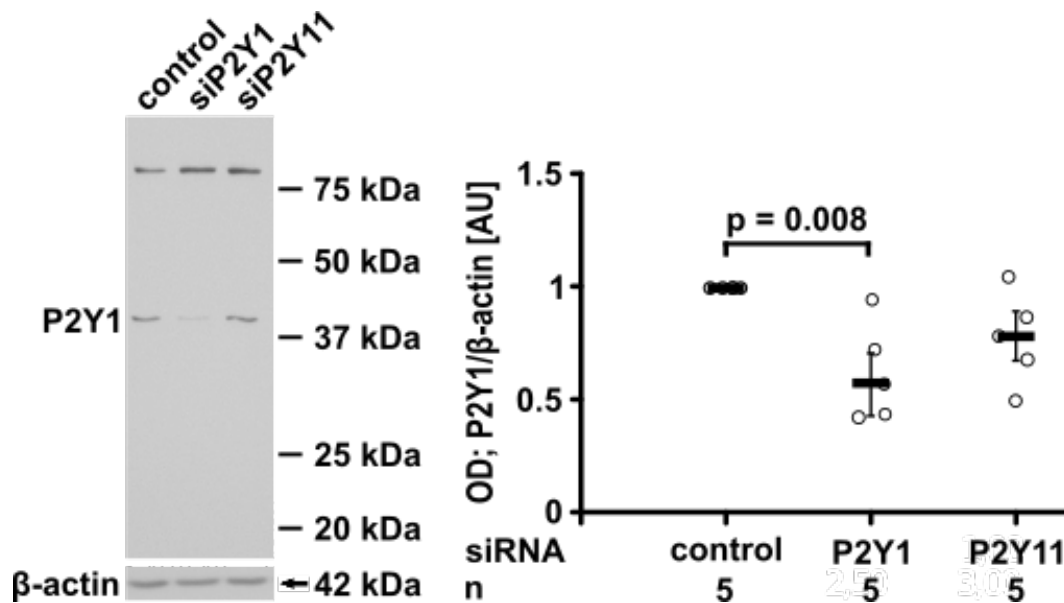


Abbildung 10: Die Transfektion von U937-Zellen mit siRNA gegen P2Y1-mRNA reduzierten die mittels Western Blot und optischer Dichtemessung ermittelte Konzentration an P2Y1-Protein signifikant. Gezeigt wird ein repräsentativer Western Blot (links). Die optische Dichte (OD) der Banden für P2Y1 und β -Aktin wurde gemessen und ins Verhältnis gesetzt. Die Konzentration an P2Y1-Protein wird in *arbitrary units* (AU) angegeben, wobei die Konzentration in der Kontrollgruppe für jede Versuchsreihe mit 1 AU festgelegt wurde. Die ermittelten Konzentrationen an P2Y1-Protein wurden hierzu ins Verhältnis gesetzt. Hierbei zeigt sich eine signifikante Reduktion der Konzentrationen von P2Y1-Protein bei Transfektion mit siRNA gegen P2Y1-mRNA (rechts).

Die Werte sind als Punkte und die Mediane als Balken abgebildet. Die Antennen stellen die 25. sowie 75. Perzentile dar. Es wurde zuerst der Kruskal-Wallis-Test, dann der Mann-Whitney-U-Test durchgeführt.

siRNA: *small interfering RNA*; kDa: Kilodalton

Die Transfektion der U937-Zellen mit siRNA gegen P2Y11-mRNA führte zu einer signifikanten Reduktion an messbarem P2Y11-Protein im Western Blot ($p = 0,008$, $n = 5$). Die gemessenen Werte lagen zwischen 0,53 und 0,97 AU, der Median bei 0,76 AU (Abb. 11).

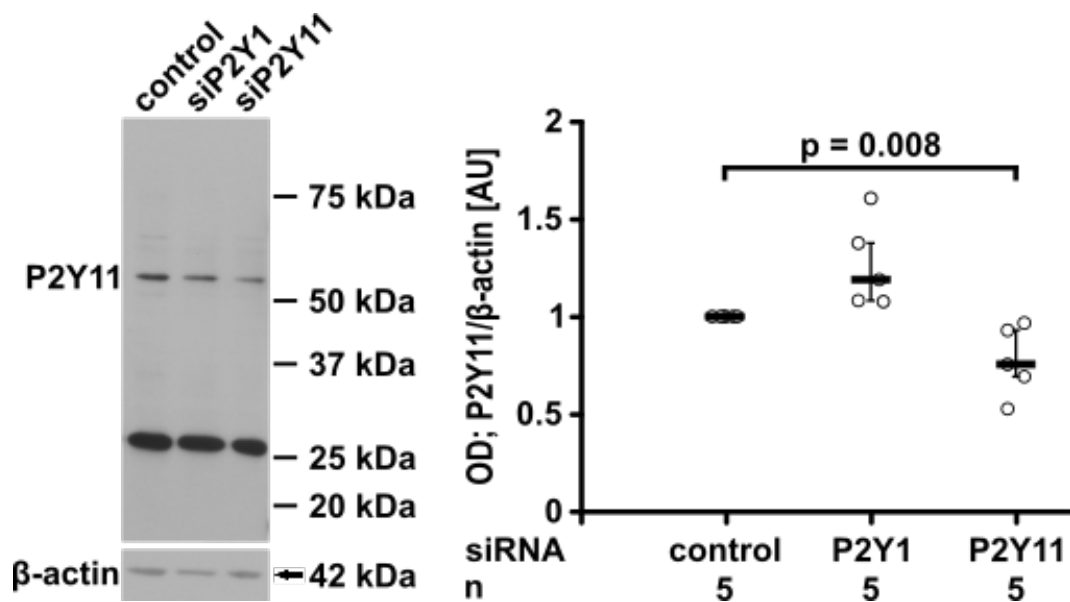


Abbildung 11: Die Transfektion von U937-Zellen mit siRNA gegen P2Y11-mRNA reduzierten die mittels Western Blot und optischer Dichtemessung ermittelte Konzentration an P2Y11-Protein signifikant. Gezeigt wird ein repräsentativer Western Blot (links). Die optische Dichte (OD) der Banden für P2Y11 und β -Aktin wurde gemessen und ins Verhältnis gesetzt. Die Konzentration an P2Y11-Protein wird in *arbitrary units* (AU) angegeben, wobei die Konzentration in der Kontrollgruppe für jede Versuchsreihe mit 1 AU festgelegt wurde. Die ermittelten Konzentrationen an P2Y11-Protein wurden hierzu ins Verhältnis gesetzt. Hierbei zeigt sich eine signifikante Reduktion der Konzentrationen von P2Y11-Protein bei Transfektion mit siRNA gegen P2Y11-mRNA (rechts).

Die Werte sind als Punkte und die Mediane als Balken abgebildet. Die Antennen stellen die 25. sowie 75. Perzentile dar. Es wurde zuerst der Kruskal-Wallis-Test, dann der Mann-Whitney-U-Test durchgeführt.

siRNA: *small interfering RNA*; kDa: Kilodalton

3.8. Nigericin

In der nächsten Versuchsreihe sollte untersucht werden, ob β -NAD auch die ATP-unabhängige Ausschüttung von IL-1 β aus LPS-stimulierten U937-Zellen inhibiert. Hierzu wurden die Zellen 5 Stunden mit LPS stimuliert und anschließend 30 Minuten mit Nigericin und Apyrase inkubiert. Dies führte zu einer Ausschüttung von IL-1 β , welche jedoch geringer war als bei der Inkubation mit BzATP. Die Werte lagen zwischen 14,96 und 28,80 pg/ml, der Median bei 20,87 pg/ml. Bei der Zugabe von β -NAD lagen die gemessenen IL-1 β -Konzentrationen im Medium zwischen 16,01 und 22,39 pg/ml, der Median bei 21,12 pg/ml (Abb. 12a). Es konnte somit keine signifikante Inhibition der IL-1 β -Ausschüttung bei Nigericin-behandelten U937-Zellen durch β -NAD nachgewiesen werden ($p = 1,00$, $n = 4$).

Die LDH-Konzentration der einzelnen Versuchsansätze wurden im Überstand gemessen, in Relation zur maximalen LDH-Konzentration aus lysierten, unstimulierten

Zellen gesetzt und in Prozent angegeben. Der maximale Anteil betrug 5,88%, die Mediane schwankten zwischen 1,15 und 5,14% (Abb. 12b). Es zeigten sich statistisch signifikant erhöhte LDH-Konzentrationen bei der Behandlung mit β -NAD.

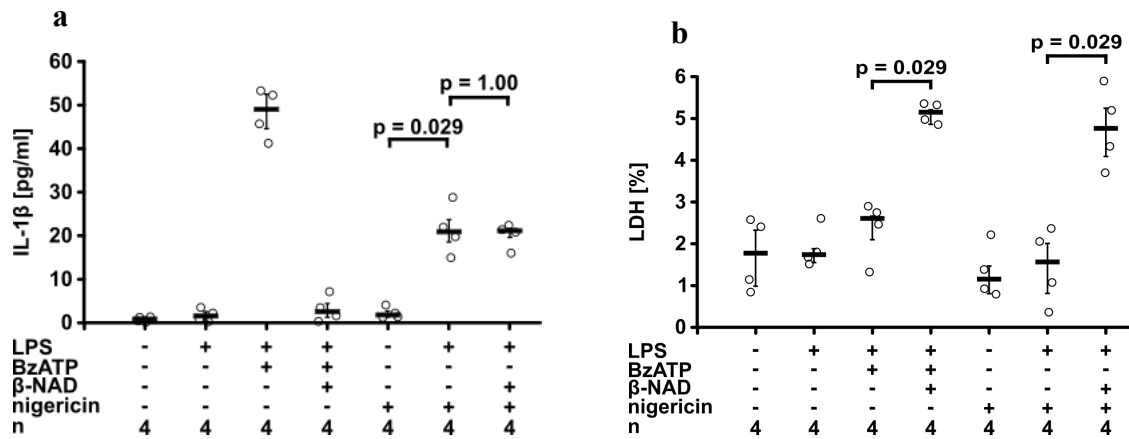


Abbildung 12a/b: β -NAD hat keinen signifikanten Effekt auf die Nigericin-induzierte Ausschüttung von IL-1 β aus LPS-stimulierten U937-Zellen. Die Zellen wurden 5 Stunden mit LPS stimuliert und anschließend 30 Minuten mit BzATP oder Nigericin und β -NAD inkubiert. a) Nigericin führt wie BzATP zu einer vermehrten Ausschüttung von IL-1 β aus LPS-stimulierten U937-Zellen in das Medium. Die Zugabe von β -NAD zeigte keinen signifikanten Einfluss auf die Nigericin-induzierte Ausschüttung von IL-1 β in das Medium. b) Die LDH-Konzentrationen im Überstand wurden gemessen und ins Verhältnis zur maximalen LDH-Freisetzung aus lysierten Zellen gesetzt. Bei der Inkubation mit LPS, BzATP und β -NAD sowie bei der Inkubation mit LPS, β -NAD und Nigericin kam es zu einer signifikant erhöhten Ausschüttung von LDH in das Medium. Die Werte sind als Punkte und die Mediane als Balken abgebildet. Die Antennen stellen die 25. sowie 75. Perzentile dar. Es wurde zuerst der Kruskal-Wallis-Test, dann der Mann-Whitney-U-Test durchgeführt.

β -NAD: β -Nikotinamidadenindinukleotid; BzATP: Benzoylbenzoyl-Adenosintriphosphat; IL-1 β : Interleukin-1 β ; LDH: Laktatdehydrogenase; LPS: Lipopolysaccharid

4. Diskussion

4.1. Wirkmechanismus

In der ersten Versuchsreihe wurde die Wirkung von β -NAD auf die BzATP-induzierte Freisetzung von IL-1 β aus humanen U937-Zellen untersucht. Hierbei zeigte sich ein dosisabhängiger Effekt von β -NAD, der bei einer Konzentration von 1 mM zu einer nahezu vollständigen Inhibition der IL-1 β -Freisetzung führte ($IC_{50} = 15 \mu\text{M}$). Die Menge des hierbei ausgeschütteten IL-1 β ist ähnlich niedrig wie bei Zellen, die mit Nikotin behandelt wurden (Abb. 2a). Nikotin wurde zuvor als starker Inhibitor der BzATP-induzierten IL-1 β -Freisetzung aus humanen U937-Zellen beschrieben und daher in diesem und folgenden Experimenten als Positivkontrolle verwendet (Hecker et al., 2015). In Untersuchungen mit humanen Granulozyten konnten Moreschi et al. zeigen, dass α -NAD einen ähnlichen Effekt wie β -NAD vermitteln kann (Moreschi et al., 2006). α -NAD hatte jedoch in den oben gezeigten Versuchen überraschenderweise keinen inhibierenden Effekt (Abb. 3a). Dieser Unterschied zwischen Granulozyten und Monozyten ist aktuell weiter ungeklärt.

β -NAD kann in hohen intrazellulären Konzentrationen eine Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms verhindern (Misawa et al., 2013) (Traba et al., 2015). Die Aufnahme von extrazellulärem β -NAD in die Zelle ist möglich, verläuft jedoch relativ langsam und erreicht seinen Höhepunkt ca. 6 Stunden nach Applikation (Pittelli et al., 2011). Die gemeinsame Inkubationszeit der U937-Zellen zusammen mit β -NAD lag bei 30 Minuten und zeigte eine nahezu vollständige Inhibition der BzATP-induzierten IL-1 β -Ausschüttung. Eine Aufnahme des extrazellulären β -NAD in die Zellen und hierüber vermittelte Wirkung erscheint daher unwahrscheinlich.

β -NAD kann die Purinrezeptoren P2Y1 sowie P2Y11 in verschiedenen Zellarten aktivieren (Bruzzone et al., 2006; Moreschi et al., 2006) (Mutafova-Yambolieva et al., 2007). Auch bei Monozyten kann β -NAD über die Rezeptoren P2Y1 und P2Y11 eine Signalkaskade auslösen, die zu einer erhöhten intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration führt (Klein et al., 2009). Um zu untersuchen ob der oben beschriebene Effekt über diese Rezeptoren vermittelt wird, wurden zunächst spezifische Inhibitoren des P2Y1-Rezeptors (MRS2279) sowie des P2Y11-Rezeptors (NF340) eingesetzt (Boyer et al., 2002) (Dreisig und Kornum, 2016). Die Applikation von NF340 konnte den Effekt von

β -NAD vollständig inhibieren, MRS2279 hingegen zeigte eine teilweise Inhibition der β -NAD-Wirkung (Abb. 4a). P2Y-Rezeptoren können sowohl Homomere als auch Heteromere mit anderen P2Y-Rezeptoren bilden. So sind z.B. auch P2Y1/P2Y11-Heteromere beschrieben (Ecke et al., 2008). Sollte der durch β -NAD vermittelte Effekt sowohl durch den P2Y11-Rezeptor bzw. P2Y11-Homomere als auch durch P2Y1/P2Y11-Heteromere vermittelt werden, wäre dies eine mögliche Erklärung für die oben beschriebenen Effekte von MRS2279 und NF340. Um die Beteiligung der P2Y1- und P2Y11-Rezeptoren an der Signalkaskade von β -NAD zu bestätigen, wurden U937-Zellen mit spezifischer siRNA gegen die mRNA der Rezeptoren transfiziert. Hierdurch konnte der Effekt von β -NAD signifikant, jedoch nur teilweise abgeschwächt werden (Abb. 6a). In der nachfolgenden real-time PCR konnte gezeigt werden, dass die Transfektion erfolgreich war, aber nur zu einer gewissen Abnahme und nicht der vollständigen Unterdrückung der P2Y1- bzw. P2Y11-mRNA geführt hat (Abb. 8 und Abb. 9). Die U937-Zelllinie ist bekanntermaßen nur schwer zu transfizieren (Martinet et al., 2003) (Neuhaus et al., 2016). Auch mit der hier verwendeten Methode der *nucleofection*, also der siRNA-Transfektion mittels Elektroporation, konnten wir trotz unterschiedlicher Protokolle keine höheren Transfektionsraten erzielen. Möglich ist auch, dass die verwendete siRNA nicht spezifisch genug gewesen ist und nach Übergang in die Zellen andere mRNA als die der Ziel-mRNA gebunden hat. Dies stellt auch eine mögliche Erklärung dafür dar, dass die siRNA gegen P2Y11-mRNA zu einer signifikanten Reduktion der P2Y1-mRNA geführt hat (Abb. 8). Die oben beschriebenen Ergebnisse spiegeln sich auch in den Untersuchungen der Proteinkonzentrationen mittels Western Blot wider. Durch die Transfektion mit siRNA gegen P2Y1- bzw. P2Y11-mRNA konnte die Expression der Rezeptoren in den U937-Zellen zwar herunterreguliert, jedoch nicht vollständig verhindert werden (Abb. 10 und Abb. 11). Die zusätzlichen Banden bei ca. 80 kDA (P2Y1) und ca. 27 kDA (P2Y11) könnten zudem auf eine geringe Spezifität der verwendeten Antikörper hinweisen, ein Problem das zumindest für P2Y11-Antikörper bereits beschrieben worden ist (Dreisig und Kornum, 2016).

Die BzATP-induzierte IL-1 β -Ausschüttung aus humanen U937-Zellen sowie aus PBMCs kann durch Nikotin, aber auch durch Acetylcholin und Cholin über nAChR

inhibiert werden (Hecker et al., 2015) (Richter et al., 2016). Hierbei sind insbesondere die Untereinheiten $\alpha 7$, $\alpha 9$ und $\alpha 10$ involviert. Um zu untersuchen, ob der Effekt von β -NAD downstream ebenfalls über nAChR vermittelt wird, wurden Inhibitoren gegen nAChR und dessen Untereinheiten eingesetzt. Mecamylamin, ein genereller Inhibitor von nAChR, führte zu einer Antagonisierung der durch β -NAD vermittelten Wirkung (Philip et al., 2012). Auch α -Bungarotoxin und Strychnin, Inhibitoren der nAChR mit den Untereinheiten $\alpha 7$ und $\alpha 9$, konnten den β -NAD vermittelten Effekt aufheben (McIntosh et al., 2009) (Kudryavtsev et al., 2015). Um zwischen der $\alpha 7$ - und $\alpha 9$ -Untereinheit genauer zu differenzieren, verwendeten wir die Conopeptide RgIA4 und [V11L;V16D]ArIB. RgIA4 ist ein spezifischer Antagonist der $\alpha 9$ -Untereinheit von nAChR, ArIB ein spezifischer Antagonist der $\alpha 7$ -Untereinheit (Innocent et al., 2008) (Grau et al., 2018). [V11L;V16D]ArIB hatte hierbei keinen Effekt, wohingegen RgIA4 die β -NAD-vermittelte Inhibition der IL-1 β -Ausschüttung vollständig antagonisieren konnte (Abb. 5a). Diese Ergebnisse legen nahe, dass die $\alpha 9$ -Untereinheit der nAChR unabdingbar für den hier beschriebenen Wirkmechanismus von β -NAD ist. In den nachfolgenden Experimenten mit siRNA gegen die mRNA der $\alpha 7$ -, $\alpha 9$ - und $\alpha 10$ -Untereinheiten konnten diese Ergebnisse bestätigt werden. siRNA gegen die mRNA der $\alpha 7$ - und $\alpha 10$ -Untereinheiten zeigte hierbei keinen Effekt, wohingegen durch die Transfektion mit siRNA gegen die $\alpha 9$ -Untereinheit die β -NAD vermittelte Wirkung vollständig verhindert werden konnte. Interessanterweise stellte sich ein ähnlicher Effekt beim *double knock-down* der $\alpha 7$ - und $\alpha 10$ -Untereinheit ein (Abb. 7a). Hier unterscheiden sich die benötigten Untereinheiten im Vergleich zu Nikotin oder Acetylcholin und ähneln denen, die beim Surfactantbestandteil DPPC eine Rolle spielen (Backhaus et al., 2017).

In nachfolgenden Experimenten konnte der oben beschriebene Mechanismus weiter entschlüsselt werden. Die Aktivierung der P2Y-Rezeptoren durch β -NAD führt über die Ca²⁺-unabhängige Phospholipase A2 β (iPLA2 β) dazu, dass ein löslicher Mediator aus der Zelle ausgeschüttet wird. Dieser vermittelt dann die Wirkung am nAChR (Hiller et al., 2018). Zur Identifizierung dieses Mediators bedarf es jedoch noch weiterer Untersuchungen.

Abschließend wurde untersucht, ob β -NAD auch die ATP-unabhängige IL-1 β -Ausschüttung aus humanen Monozyten inhibiert. Hierzu wurde Nigericin zusammen mit dem ATP-spaltenden Enzym Apyrase verwendet, um die Ergebnisse nicht durch endogenes ATP zu verfälschen. Die Anwendung von LPS und Nigericin führte zu einer leicht verringerten Ausschüttung von IL-1 β im Vergleich zur Behandlung mit LPS und BzATP, β -NAD hatte hierbei jedoch keinen inhibierenden Effekt (Abb. 12a). Dies bestätigt die Annahme, dass β -NAD das NLRP3-Inflammasom nicht direkt inhibiert und die Signalkaskade über die Purinrezeptoren P2Y1 bzw. P2Y11 und P2X7 vermittelt wird.

Um sicherzustellen, dass die in den Versuchen gemessenen IL-1 β -Konzentrationen durch aktive Ausschüttung und nicht durch Freisetzung im Rahmen eines unbeabsichtigten Zelltods zustande gekommen sind, wurden die LDH-Konzentrationen im Überstand gemessen. Anschließend wurden diese LDH-Konzentrationen in Relation zu der LDH-Konzentration im Überstand einer unstimulierten Probe gesetzt, in der alle Zellen lysiert wurden. Hierdurch konnte der prozentuale Zelltod ermittelt werden. Den höchsten Anteil an nicht vitalen Zellen ergaben sich mit 20,19% bei Versuchen mit siRNA, was durch die zytotoxische Wirkung der Methode zu erklären ist (Abb. 7b). Signifikant erhöhte LDH-Konzentrationen zeigten sich lediglich in der Versuchsreihe mit Nigericin. Aus ungeklärten Gründen ergab die Behandlung der Zellen mit LPS, BzATP und β -NAD sowie mit LPS, β -NAD und Nigericin statistisch signifikant höhere LDH-Konzentration bis maximal 5,88% (Abb. 12b). Dies stellt jedoch im Vergleich zu den anderen Versuchsreihen keine exorbitante Zelltodrate dar und scheint auf die Ausschüttung von IL-1 β keinen signifikanten Einfluss gehabt zu haben.

4.2. In-vivo-Wirkung

In dieser Arbeit mit der U937-Zellreihe konnte eine ausgeprägte Inhibition der BzATP-induzierten IL-1 β -Ausschüttung durch β -NAD *in vitro* gezeigt werden. In nachfolgenden Experimenten mit *peripheral blood mononuclear cells* (PBMCs) konnte dieser Effekt an Monozyten von männlichen Nichtrauchern bestätigt werden (Hiller et

al., 2018). Inwiefern diese Ergebnisse *in vivo* zum Tragen kommen, steht zur Diskussion.

Erhöhte extrazelluläre Konzentrationen von β -NAD können die Folge von Zelluntergang, aber auch von aktiver Freisetzung über das Transmembranprotein Connexin 43 im Rahmen einer Entzündungsreaktion sein (Bruzzone et al., 2001) (Adriouch et al., 2007) (Scheuplein et al., 2009) (Yang und Sauve, 2016). Die in der Regel niedrigen extrazellulären β -NAD-Konzentrationen könnten durch diese Mechanismen drastisch erhöht werden und mindestens ähnlich der in dieser Arbeit ermittelten IC_{50} sein (Adriouch et al., 2007). Die hieraus resultierende antiinflammatorische Wirkung von extrazellulärem β -NAD konnte *in vivo* u.a. beim LPS-induziertem ARDS im Mausmodell gezeigt werden, die ebenfalls über die Purinrezeptoren P2Y1 und P2Y11 vermittelt wird (Umapathy et al., 2010) (Umapathy et al., 2012).

Interessanterweise ist β -NAD in der Literatur bei Mäusen als Agonist, beim Menschen jedoch als Antagonist am P2X7-Rezeptor beschrieben (Hubert et al., 2010) (Pliyev et al., 2014). Diese unterschiedliche Wirkung könnte u.a. über das Enzym RT6 vermittelt werden, welches eine ADP-Ribosylierung des P2X7-Rezeptors nach sich zieht und als dessen Substrat β -NAD benötigt wird. Das Enzym RT6 ähnelt der humanen *mono-ADP-ribosyltransferase A2* (ART2) und existiert zwar in Mäusen, ist aufgrund eines verfrühten Stopcodons jedoch nicht im Menschen zu finden (Haag et al., 1994).

Zusätzlich ist bekannt, dass sowohl BzATP als auch das *in vivo* vorliegende ATP nicht nur Agonisten des P2X7-, sondern auch des P2Y1- und P2Y11-Rezeptors sind (Vitiello et al., 2012). In dieser und auch in vorangegangenen Arbeiten ist jedoch deutlich geworden, dass der IL-1 β -induzierende Effekt von BzATP über den P2X7-Rezeptors größer ist als der IL-1 β -inhibierende Effekt über die P2Y-Rezeptoren (Hecker et al., 2015) (Richter et al., 2016). Eine mögliche Erklärung sind die bereits beschriebenen Heteromere der P2Y1-/P2Y11-Rezeptoren, die mit einer veränderten Sensitivität gegenüber ihren Agonisten oder auch einer Internalisierung der Rezeptoren einhergehen können (Ecke et al., 2008) (Dreisig und Kornum, 2016).

Eine überschießende IL-1 β -Produktion kann wie zuvor beschrieben für den Körper ernsthafte Folgen haben. Der hier gezeigte antiinflammatorische Effekt von β -NAD

könnte einen Baustein in der engen Regulation der IL-1 β -Ausschüttung aus humanen Monozyten *in vivo* darstellen. Damit der hier beschriebene Effekt von β -NAD jedoch nicht überschießt, ist ebenfalls eine Kontrolle erforderlich. Die Glycohydrolase CD38 befindet sich u.a. auf der Oberfläche von verschiedenen immunkompetenten Zellen und katalysiert die Reaktion von β -NAD zu cADPR. Ihre enzymatische Aktivität scheint erst bei deutlich erhöhten extrazellulären β -NAD-Konzentrationen hochreguliert zu werden und bietet daher einen möglichen Ansatz zu Limitierung der extrazellulären β -NAD-Wirkung (Horenstein et al., 2015).

Verlässliche Zahlen zu den extrazellulären Konzentrationen von ATP und β -NAD, nachdem diese Moleküle durch verletzte Zellen ausgeschüttet wurden, sind in der Literatur nur schwer zu finden. Anhand der intrazellulären Konzentrationen (β -NAD: 300-700 μ M; ATP: 1-10 mM) lässt sich jedoch abschätzen, dass der hier beschriebene inhibitorische Effekt von β -NAD auf die Ausschüttung von IL-1 β aus humanen Monozyten ebenfalls *in vivo* zum Tragen kommt (Coddou et al., 2011; Nikiforov et al., 2015; VanLinden et al., 2015). Die Halbwertszeiten von extrazellulärem ATP und β -NAD liegen jedoch im Bereich von nur wenigen Sekunden. Somit erscheint es möglich, dass β -NAD *in vivo* eine initial überschießende inflammatorische Reaktion abmildert ehe es schon kurz darauf von Enzymen wie der Glycohydrolase CD38 abgebaut wird (Horenstein et al., 2015).

4.3. Klinische Anwendung

In den letzten Jahren wurde in der Wissenschaft vermehrtes Interesse am therapeutischen Potential von β -NAD laut. Viele Studien beziehen sich hierbei jedoch auf die Vorläufer in der Synthese von β -NAD wie etwa Nikotinamid-Mononukleotid (NMN), Nikotinamid (NAM) und Nikotinamid-Ribosid (NR). Ihre Einnahme und Effekt auf erhöhte intrazelluläre β -NAD Konzentration im Vergleich zu einer ausgeglichenen Ernährung ist fraglich, auch wenn diese Verbindungen als Nahrungsergänzungsmittel frei verkäuflich sind. Eine Schwierigkeit ist hierbei die Detektion spezifischer NAD-Metaboliten *in vivo* (Trammell und Brenner, 2013).

Ein anderer Ansatzpunkt für erhöhte β -NAD-Konzentrationen liegt in der Inhibition der NAD-verbrauchenden Enzyme wie Poly-ADP-Ribose-Polymerasen (PARP), Sirtuine

oder CD38 (Braidy et al., 2019). Da die β -NAD-Konzentrationen im Alter abnehmen, wird vor allem die Wirkung von β -NAD auf altersabhängige Erkrankungen erforscht. Hierzu zählen neben Diabetes mellitus Typ 2, auch Altersdiabetes genannt, v.a. neurodegenerative Erkrankungen wie Alzheimer Demenz und Morbus Parkinson (Houtkooper et al., 2010) (Rajman et al., 2018) (Aman et al., 2018).

Die direkte Anwendung von extrazellulärem β -NAD hingegen ist ein noch wenig untersuchtes Feld. In den USA werden β -NAD-Infusionen aber schon als „Allheilmittel“ angepriesen. Sie sollen bei der Suchtbehandlung als Co-Medikation wirken, gegen Depressionen und Stress helfen und generell die Folgen des Alterns verlangsamen. Eine hinreichende wissenschaftliche Grundlage für diese Behandlungen lässt sich in der Literatur jedoch nicht finden.

Die antiinflammatorischen Effekte von extrazellulärem β -NAD hingegen wurden u.a. von Umaphy et al. untersucht. Sie berichteten von antiinflammatorischen Effekten von extrazellulärem β -NAD bei LPS-induziertem ARDS im Mausmodell (Umaphy et al., 2012). Hieran angelehnt untersuchten Jurastow et al. β -NAD als Bronchodilatator und konnten eine vergleichbare Wirkung zu Salbutamol aufzeigen. Sie postulieren eine mögliche therapeutische Option von β -NAD bei Autoimmunerkrankungen wie Asthma bronchiale, indem es mittels Inhaler vernebelt wird (Jurastow et al., 2015).

Ein großer Vorteil von β -NAD im Hinblick auf seine therapeutische Anwendung ist das selbst in hohen Dosen geringe Nebenwirkungspotential, da es ein körpereigenes Molekül ist. Um die richtigen Indikationen für eine Anwendung ausfindig zu machen sind jedoch noch weitere Studien nötig. Im Hinblick auf die vorliegende Arbeit scheinen insbesondere Krankheiten mit erhöhten IL-1 β -Konzentrationen hierzu geeignet. So wäre z.B. bei rheumatoider Arthritis auch eine intraartikuläre Injektion von β -NAD denkbar, um im Gegensatz zu Anakinra nur eine lokale Wirkung zu entfalten. Auch bei der akuten Abstoßung im Rahmen einer Transplantation erscheint β -NAD als interessanter Ansatzpunkt: Die Ausschüttung von IL-1 β aus Monozyten ist ein wesentlicher Bestandteil der Abstoßung und könnte durch die Infusion von hochdosiertem β -NAD inhibiert werden (Weigt et al., 2017). Bei allen Anwendungen muss jedoch auch die Möglichkeit einer zu starken Inhibition der IL-1 β -Ausschüttung in Betracht gezogen werden. So muss bei einer aktiven Infektion, für dessen Abwehr das Immunsystem

IL-1 β benötigt, die Indikation von β -NAD mutmaßlich vorsichtiger gestellt werden. Eine weitere Einschränkung ist die oben beschriebene extrem kurze Halbwertszeit des extrazellulären β -NAD. Möglicherweise könnten stabile künstliche P2Y-Agonisten in Zukunft zum therapeutischen Einsatz kommen.

5. Schlussfolgerung

Als Ausgangspunkt dieser Arbeit diente ein in der Literatur vorbeschriebener Mechanismus zur Ausschüttung des proinflammatorischen Zytokins IL-1 β aus humanen Monozyten. Im ersten Schritt wird zunächst durch LPS, einen Bestandteil der äußeren Membran Gram-negativer Bakterien, die Produktion des IL-1 β -Vorläufers initiiert. Extrazelluläres ATP aktiviert als zweiten Schritt über den P2X7-Rezeptor das NLRP3-Inflammasom, welches wiederum die Caspase-1 in seine aktive Form spaltet und dadurch pro-IL-1 β zu IL-1 β spaltet. Dieses wird aus der Zelle freigesetzt.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass der oben beschriebene Mechanismus durch extrazellulär appliziertes β -NAD inhibiert werden kann. Durch Inhibitoren der Purinrezeptoren P2Y1 und P2Y11 sowie mittels siRNA-Experimente wurde die Beteiligung der beiden Rezeptoren nachgewiesen. Der P2Y11-Rezeptor scheint hierbei eine größere Rolle als der P2Y1-Rezeptor zu spielen. Downstream sind auch nAChR, die die Untereinheiten α 9 oder α 7 α 10 beinhalten, involviert. Über welchen Weg der Effekt von den P2Y-Rezeptoren zu den nAChR verläuft wurde in dieser Arbeit nicht untersucht. Die Nigericin-vermittelte Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms wurde durch die Anwendung von extrazellulärem β -NAD nicht beeinflusst.

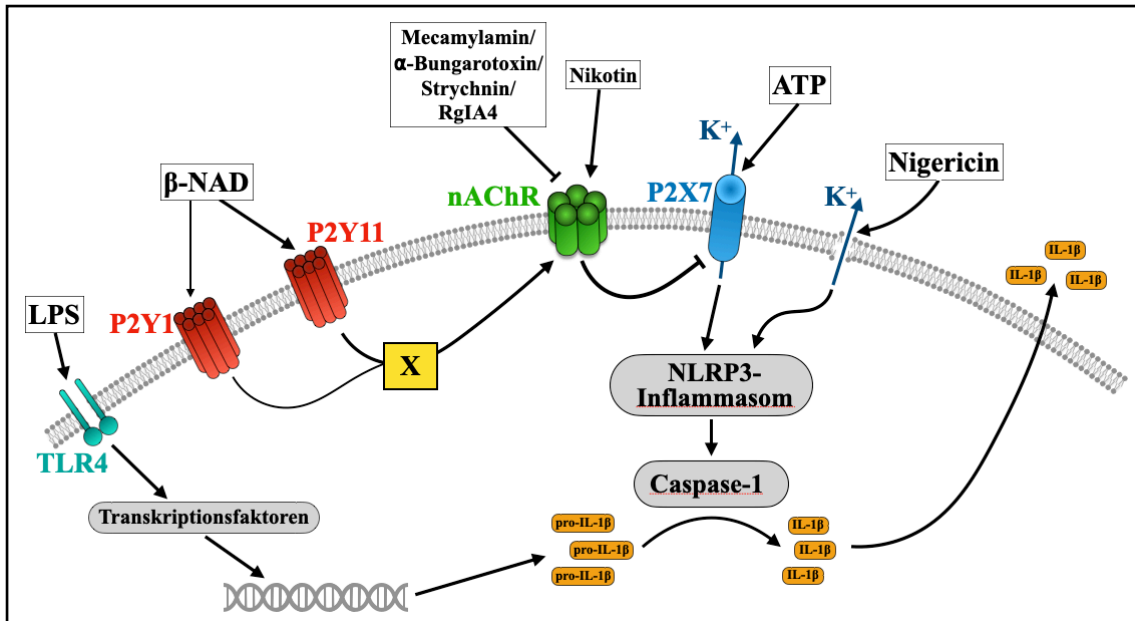


Abbildung 13: **Übersicht** Zu Beginn der Signalkaskade aktiviert LPS als PAMP den TLR4. Über verschiedene Transkriptionsfaktoren wie NF- κ B und AP-1 wird die vermehrte Produktion von pro-IL-1 β initiiert. Bindet extrazelluläres ATP als DAMP an den P2X7-Rezeptor kommt es u.a. durch den konsekutiven K⁺-Ausstrom aus der Zelle zur Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms. Dieses wiederum aktiviert die Caspase-1, welches pro-IL-1 β spaltet und in das biologisch aktive Zytokin IL-1 β überführt. Dieses wird anschließend aus der Zelle geschleust und kann seine proinflammatorische Wirkung vermitteln. Nikotin kann über nAChR den P2X7-Rezeptor inhibieren und somit die Ausschüttung von IL-1 β verhindern. Extrazelluläres β -NAD kann über die Purinrezeptoren P2Y1 und P2Y11 ebenfalls nAChR aktivieren und somit die Ausschüttung von IL-1 β verhindern. Dieser Effekt wird über eine Mediators substanz X vermittelt, die in dieser Arbeit nicht weiter untersucht wurde. Der Effekt von β -NAD wird durch Mecamylamin, α -Bungarotoxin, Strychnin und RgIA4 inhibiert. Die Nigericin-induzierte Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms wurde durch β -NAD nicht beeinträchtigt.
 β -NAD: β -Nikotinamidadenindinukleotid **ATP:** Adenosintriphosphat; **IL-1 β :** Interleukin-1 β **LPS:** Lipopolysaccharid; **nAChR:** nikotinische Acetylcholinrezeptoren; **TLR4:** *Toll-like-Rezeptor 4*

6. Kurzfassung

6.1. Deutsch

β -NAD inhibiert die ATP-induzierte Freisetzung von IL-1 β aus humanen U937-Zellen

Hintergrund: IL-1 β ist ein potentes proinflammatorisches Zytokin mit einer zentralen Rolle in der Abwehr pathogener Keime. Hohe Serumspiegel an IL-1 β können jedoch zu einer lebensbedrohlichen Entzündungsreaktion des Körpers führen. Die Freisetzung von IL-1 β wird daher in der Regel durch zwei konsekutive Gefahrensignale kontrolliert. LPS können als erstes Signal die Synthese von pro-IL-1 β induzieren. Extrazelluläres ATP kann als prototypisches zweites Gefahrensignal das Inflammasom aktivieren und so die Spaltung von pro-IL-1 β zu aktivem IL-1 β vermitteln. β -NAD ist ein Co-Enzym für viele Redoxreaktionen, fungiert als Neurotransmitter und kann die Immunantwort modulieren. Hier wird die Hypothese überprüft, dass β -NAD die ATP-vermittelte Freisetzung von IL-1 β aus LPS-stimulierten U937-Zellen hemmt.

Methoden: Monozytäre U937-Zellen wurden für 5 Stunden mit LPS inkubiert und anschließend mit BzATP, einem spezifischen Liganden für den ATP-Rezeptor P2X7, in An- und Abwesenheit von β -NAD stimuliert. Die Freisetzung von IL-1 β sowie von LDH wurde nach 30 Minuten im Überstand mittels ELISA gemessen. Die β -NAD-Rezeptoren wurden sowohl mit Antagonisten (P2Y1: MRS2279; P2Y11: NF340) als auch mit spezifischer siRNA abgeschwächt. Zusätzlich wurden Antagonisten der nAChR sowie siRNA gegen ebendiese eingesetzt. Der Effekt der siRNA wurde durch RT-PCR und Western Blots kontrolliert.

Ergebnisse: Die BzATP-induzierte Freisetzung von IL-1 β aus den U937-Zellen konnte durch β -NAD dosisabhängig inhibiert werden (IC₅₀ = 15 μ M). Dieser Effekt wurde vorrangig durch den P2Y11-Rezeptor vermittelt und konnte durch Antagonisten der nAChR mit den Untereinheiten α 7 oder α 9 und α 10 verhindert werden.

Schlussfolgerung: Der hier beschriebene Vorgang ist ein neuartiger antiinflammatorischer Mechanismus, in dem extrazelluläres β -NAD die ATP-induzierte Freisetzung von IL-1 β aus humanen Monozyten inhibiert. Dieser Effekt wird durch den P2Y11-Rezeptor vermittelt, welcher nAChR über einen bisher unbekanntem Signalweg aktiviert. Aufgrund der hohen klinischen Relevanz von IL-1 β könnten diese Daten zu einem neuen therapeutischen Ansatz zur Behandlung überschießender Entzündungsreaktionen führen.

6.2. Englisch

β -NAD inhibits ATP-dependent IL-1 β release from human U937-cells

Background: IL-1 β is a potent proinflammatory cytokine, which plays a central role in host defense. High systemic IL-1 β levels, however, can result in life-threatening systemic inflammation. Release of IL-1 β is typically controlled by two consecutive danger signals. LPS can be the first signal inducing the synthesis of pro-IL-1 β . Extracellular ATP is a prototypical second danger signal, which leads to inflammasome activation, cleavage of pro-IL-1 β and release of mature IL-1 β . β -NAD is a co-enzyme for redox reactions, functions as a neurotransmitter and seems to modulate immune reactions. We test the hypothesis that β -NAD regulates ATP-induced release of IL-1 β from LPS-primed U937-cells.

Methods: U937 cells, a human monocytic cell line, were primed with LPS for 5 hours followed by stimulation with BzATP, a specific ligand for the ATP receptor P2X7, in the presence or absence of β -NAD. Release of IL-1 β into the cell culture supernatant was measured by ELISA, 30 minutes later. Receptors for β -NAD were targeted by specific inhibitors (P2Y1: MRS2279; P2Y11: NF340) and siRNA technology. In addition, antagonists of nAChR as well as siRNA were used. The efficiency of gene silencing was controlled by Western blotting.

Results: BzATP induced release of IL-1 β by U937 cells was dose-dependently suppressed by addition of β -NAD (IC₅₀ = 15 μ M). The suppressive effect of β -NAD was predominantly mediated via receptor P2Y11 and was sensitive to antagonists of nAChR subunits containing α 7 or α 9 and α 10.

Conclusions: We describe a novel antiinflammatory mechanism triggered by extracellular β -NAD, which efficiently suppresses ATP-induced release of IL-1 β from human monocytic cells. This effect is mediated by receptor P2Y11, which activates nAChR by a yet unknown mechanism and inhibits ATP-induced IL-1 β release from human monocytes. Considering the high clinical relevance of IL-1 β , our data may lead to new therapies controlling severe inflammation.

7. Abkürzungsverzeichnis

α -NAD	α -Nikotinamidadenindinukleotid
β -NAD	β -Nikotinamidadenindinukleotid
%	Prozent
°C	Grad Celsius
Abb.	Abbildung
ADP	Adenosindiphosphat
AP-1	Aktivator Protein 1
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ART2	<i>mono-ADP-ribosyltransferase A2</i>
ASC	<i>apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD</i>
ATP	Adenosintriphosphat
AU	<i>arbitrary units</i>
BCA	<i>bicinchoninic acid</i>
BzATP	Benzoylbenzoyl-Adenosintriphosphat
bzw.	beziehungsweise
ca.	zirka
Ca ²⁺	Kalziumion
cADP	cyclische ADP
cADPR	cyclische ADP-Ribose
CARD	Caspase-rekrutierende Domäne
CD14	<i>cluster of differentiation 14</i>
CD38	<i>cluster of differentiation 38</i>
cDNA	Komplementäre DNA
CHRNA2-10	Acetylcholinrezeptoruntereinheit α 2-10
CHRNB2-4	Acetylcholinrezeptoruntereinheit β 2-4
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
COX-2	Cyclooxygenase-2
CRP	C-reaktives Protein

DAMP	<i>damage associated molecular patterns</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
FCS	Fetales Kälberserum
HCl	Salzsäure
HMBS	Hydroxymethylbilan-Synthase
HMGB1	<i>high-mobility group box 1</i>
HRP	<i>horseradish-peroxidase</i> , Meerrettichperoxidase
IL-1-RA	Interleukin-1-Rezeptor-Antagonist
IL-1R1/2/3	Interleukin-1-Rezeptor-1/2/3
IL-1 β / -6/ -18	Interleukin-1 β , Interleukin-6, Interleukin-18
IP3	Inositoltrisphosphat
IRF3	Interferon regulierender Faktor 3
K ⁺	Kaliumion
KCl	Kaliumchlorid
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
KHK	Koronare Herzkrankheit
LAF	<i>lymphocyte-activating factor</i>
LBP	LPS bindende Protein
LDH	Laktatdehydrogenase
LPS	Lipopolysaccharid
LRR	<i>Leucine-rich repeats</i>
MD-2	Lymphozyten-Antigen 96
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
mRNA	<i>messenger RNA</i>

MSU	<i>monosodium urate</i>
MyD88	<i>myeloid differentiation primary response 88</i>
Na ⁺	Natriumion
Na ₂ HPO ₄	Dinatriumhydrogenphosphat
nAChR	nikotinischer Acetylcholinrezeptor
NACHT	Akronym für NAIP, CIITA, HET-E und TP-1
NaCl	Natriumchlorid
NAD	Nikotinamidadenindinukleotid
NAM	Nikotinamid
NaOH	Natriumhydroxid
NF-κB	<i>nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells</i>
NLR	NOD-like Rezeptor
NLRP3	NACHT, LRR und PYD Region enthaltendes Protein 3
NMN	Nikotinamid-Mononukleotid
NOD	<i>nucleotide-binding oligomerization domain</i>
NR	Nikotinamid-Ribosid
P2X7-Rezeptor	P2X purinoceptor 7
P2Y1/11-Rezeptor	P2Y purinoceptor 1/11
PAMP	<i>pathogen-associated molecular patterns</i>
PARP	Poly-ADP-Ribose-Polymerase
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PBST	Phosphatgepufferte Salzlösung mit Tween
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PGE2	Prostaglandin E ₂
pro-IL-1β	pro-Interleukin-1β
PRR	<i>pattern recognition receptors</i>
PVDF	Polyvinylidenfluorid
PYD	pyrinhaltige Domäne
qPCR	quantitative PCR

RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
ROS	<i>reactive oxygen species</i>
RT-PCR	Reverse Transkriptase PCR
SDS	Natriumdodecylsulfat
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
TEMED	Tetramethylethylenediamine
TIR	Toll/IL-1R-Domäne
TIRAP	<i>TIR adaptor protein</i>
TLR	<i>Toll-like-Rezeptoren</i>
TLR4	<i>Toll-like-Rezeptor 4</i>
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
TRAM	<i>TRIF-related adaptor molecule</i>
TRIF	<i>TIR-domain-containing adaptor inducing interferon-β</i>
u. a.	unter anderem
UDP	Uridindiphosphat
UTP	Uridintriphosphat
z.B.	zum Beispiel

Tabelle 31: **Abkürzungen**

8. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

8.1. Abbildungen

Abbildung 1	Zeitleiste des Versuchsaufbaus
Abbildung 2a/b	β -NAD inhibiert in dosisabhängiger Weise die BzATP-induzierte Ausschüttung von IL-1 β aus LPS-stimulierten U937-Zellen
Abbildung 3a/b	α -NAD hat keinen signifikanten Effekt auf die BzATP-induzierte Ausschüttung von IL-1 β aus LPS stimulierten U937-Zellen.
Abbildung 4a/b	MRS2279 und NF340 antagonisieren den inhibitorischen Effekt von β -NAD auf die BzATP-induzierte Ausschüttung von IL-1 β aus LPS-stimulierten U937-Zellen.
Abbildung 5a/b	Mecamylamin, α -Bungarotoxin, Strychnin sowie RgIA4 antagonisieren den inhibitorischen Effekt von β -NAD auf die BzATP-induzierte Ausschüttung von IL-1 β aus LPS-stimulierten U937-Zellen.
Abbildung 6a/b	Die Transfektion von U937-Zellen mit siRNA gegen P2Y1- und P2Y11-mRNA schwächt den inhibitorischen Effekt von β -NAD auf die BzATP-induzierte Ausschüttung von IL-1 β aus LPS-stimulierten U937-Zellen ab.
Abbildung 7a/b	Die Transfektion von U937-Zellen mit siRNA gegen CHRNA9- sowie CHRNA7- und CHRNA10-mRNA antagonisieren den inhibitorischen Effekt von β -NAD auf die BzATP-induzierte Ausschüttung von IL-1 β aus LPS-stimulierten U937-Zellen.
Abbildung 8	Die Transfektion von U937-Zellen mit siRNA gegen P2Y1-mRNA und gegen P2Y11-mRNA reduzierten die mittels real-time PCR gemessene Konzentration an P2Y1-mRNA signifikant.
Abbildung 9	Die Transfektion von U937-Zellen mit siRNA gegen P2Y11-mRNA reduzierten die mittels real-time PCR gemessene Konzentration an P2Y11-mRNA signifikant.
Abbildung 10	Die Transfektion von U937-Zellen mit siRNA gegen P2Y1-mRNA reduzierten die mittels Western Blot und optischer Dichtemessung ermittelte Konzentration an P2Y1-Protein signifikant.

Abbildung 11	Die Transfektion von U937-Zellen mit siRNA gegen P2Y11-mRNA reduzierten die mittels Western Blot und optischer Dichtemessung ermittelte Konzentration an P2Y11-Protein signifikant.
Abbildung 12a/b	β -NAD hat keinen signifikanten Effekt auf die Nigericin-induzierte Ausschüttung von IL-1 β aus LPS-stimulierten U937-Zellen.
Abbildung 13	Übersicht

8.2. Tabellen

Tabelle 1	Geräte
Tabelle 2	Verbrauchsmaterialien
Tabelle 3	Reagenzien
Tabelle 4	Natriumchloridlösung 0,9%
Tabelle 5	BSA-Lösung
Tabelle 6	Tris/HCl-Puffer 0,1 M
Tabelle 7	SDS-Stammlösung 10%
Tabelle 8	Lysepuffer S1
Tabelle 9	Probenpuffer S2
Tabelle 10	Unterer Gelpuffer
Tabelle 11	Oberer Gelpuffer
Tabelle 12	Laufpuffer
Tabelle 13	Transferpuffer
Tabelle 14	Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) 10x (Stammlösung)
Tabelle 15	PBS 1x
Tabelle 16	Phosphatgepufferte Salzlösung mit Tween 20 (PBST) 10x (Stammlösung)
Tabelle 17	PBST 1x
Tabelle 18	TAE 50x
Tabelle 19	TAE 1x

Tabelle 20	APS-Lösung 50%
Tabelle 21	Sammelgel
Tabelle 22	Laufgel
Tabelle 23	Antikörper
Tabelle 24	Primer
Tabelle 25	siRNA
Tabelle 26	Software
Tabelle 27	cDNA Mastermix
Tabelle 28	Herstellung von cDNA im Thermal Cycler
Tabelle 29	Real-time PCR Mastermix
Tabelle 30	Real-time PCR im Thermal Cycler
Tabelle 31	Abkürzungen

9. Bibliografie

Adriouch, S., Hubert, S., Pechberty, S., Koch-Nolte, F., Haag, F. und Seman, M. (2007) 'Nad⁺ released during inflammation participates in t cell homeostasis by inducing art2-mediated death of naive t cells in vivo', *The Journal of Immunology*, 179(1), pp. 186-194.

Aman, Y., Qiu, Y., Tao, J. und Fang, E. F. (2018) 'Therapeutic potential of boosting nad⁺ in aging and age-related diseases', *Translational Medicine of Aging*, 2, pp. 30-37.

Backhaus, S., Zakrzewicz, A., Richter, K., Damm, J., Wilker, S., Fuchs-Moll, G., Kullmar, M., Hecker, A., Manzini, I., Ruppert, C., McIntosh, J. M., Padberg, W. und Grau, V. (2017) 'Surfactant inhibits atp-induced release of interleukin-1beta via nicotinic acetylcholine receptors', *J Lipid Res*, 58(6), pp. 1055-1066.

Beker, F., Weber, M., Fink, R. H. und Adams, D. J. (2003) 'Muscarinic and nicotinic ach receptor activation differentially mobilize ca²⁺ in rat intracardiac ganglion neurons', *J Neurophysiol*, 90(3), pp. 1956-1964.

Berda-Haddad, Y., Robert, S., Salers, P., Zekraoui, L., Farnarier, C., Dinarello, C. A., Dignat-George, F. und Kaplanski, G. (2011) 'Sterile inflammation of endothelial cell-derived apoptotic bodies is mediated by interleukin-1alpha', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108(51), pp. 20684-20689.

Boyer, J. L., Adams, M., Ravi, R. G., Jacobson, K. A. und Harden, T. K. (2002) '2-chloro n(6)-methyl-(n)-methanocarpa-2'-deoxyadenosine-3',5'-bisphosphate is a selective high affinity p2y(1) receptor antagonist', *Br J Pharmacol*, 135(8), pp. 2004-2010.

Braidy, N., Berg, J., Clement, J., Khorshidi, F., Poljak, A., Jayasena, T., Grant, R. und Sachdev, P. (2019) 'Role of nicotinamide adenine dinucleotide and related precursors as

therapeutic targets for age-related degenerative diseases: Rationale, biochemistry, pharmacokinetics, and outcomes', *Antioxid Redox Signal*, 30(2), pp. 251-294.

Bruzzone, S., Guida, L., Zocchi, E., Franco, L. und De Flora, A. (2001) 'Connexin 43 hemi channels mediate ca^{2+} -regulated transmembrane nad^{+} fluxes in intact cells', *FASEB J*, 15(1), pp. 10-12.

Bruzzone, S., Moreschi, I., Guida, L., Usai, C., Zocchi, E. und De Flora, A. (2006) 'Extracellular nad^{+} regulates intracellular calcium levels and induces activation of human granulocytes', *Biochem J*, 393(Pt 3), pp. 697-704.

Coddou, C., Yan, Z., Obsil, T., Huidobro-Toro, J. P. und Stojilkovic, S. S. (2011) 'Activation and regulation of purinergic $p2x$ receptor channels', *Pharmacol Rev*, 63(3), pp. 641-683.

Colotta, F., Re, F., Muzio, M., Bertini, R., Polentarutti, N., Sironi, M., Giri, J. G., Dower, S. K., Sims, J. E. und Mantovani, A. (1993) 'Interleukin-1 type ii receptor: A decoy target for il-1 that is regulated by il-4', *Science*, 261(5120), pp. 472-475.

Communi, D., Govaerts, C., Parmentier, M. und Boeynaems, J. M. (1997) 'Cloning of a human purinergic $p2y$ receptor coupled to phospholipase c and adenylyl cyclase', *J Biol Chem*, 272(51), pp. 31969-31973.

Coutinho-Silva, R. und Persechini, P. M. (1997) 'P2z purinoceptor-associated pores induced by extracellular atp in macrophages and j774 cells', *Am J Physiol*, 273(6), pp. C1793-1800.

Cullen, S. P., Kearney, C. J., Clancy, D. M. und Martin, S. J. (2015) 'Diverse activators of the nlrp3 inflammasome promote il-1 β secretion by triggering necrosis', *Cell Rep*, 11(10), pp. 1535-1548.

Dinarello, C. A. (1994) 'The interleukin-1 family: 10 years of discovery', *FASEB J*, 8(15), pp. 1314-1325.

Dinarello, C. A. (2005) 'The many worlds of reducing interleukin-1', *Arthritis Rheum*, 52(7), pp. 1960-1967.

Dinarello, C. A. (2009) 'Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family', *Annu Rev Immunol*, 27, pp. 519-550.

Dinarello, C. A. (2018) 'Overview of the il-1 family in innate inflammation and acquired immunity', *Immunol Rev*, 281(1), pp. 8-27.

Dinarello, C. A., Renfer, L. und Wolff, S. M. (1977) 'Human leukocytic pyrogen: Purification and development of a radioimmunoassay', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 74(10), pp. 4624-4627.

Donnelly, L. E., Rendell, N. B., Murray, S., Allport, J. R., Lo, G., Kefalas, P., Taylor, G. W. und MacDermot, J. (1996) 'Arginine-specific mono(adp-ribosyl)transferase activity on the surface of human polymorphonuclear neutrophil leucocytes', *Biochem J*, 315 (Pt 2), pp. 635-641.

Dosch, M., Gerber, J., Jebbawi, F. und Beldi, G. (2018) 'Mechanisms of atp release by inflammatory cells', *Int J Mol Sci*, 19(4), pp. 1222-1238.

Dreisig, K. und Kornum, B. R. (2016) 'A critical look at the function of the p2y11 receptor', *Purinergic Signal*, 12(3), pp. 427-437.

Ecke, D., Hanck, T., Tulapurkar, M. E., Schafer, R., Kassack, M., Stricker, R. und Reiser, G. (2008) 'Hetero-oligomerization of the p2y11 receptor with the p2y1 receptor controls the internalization and ligand selectivity of the p2y11 receptor', *Biochem J*, 409(1), pp. 107-116.

Elhassan, Y. S., Philp, A. A. und Lavery, G. G. (2017) 'Targeting nad⁺ in metabolic disease: New insights into an old molecule', *J Endocr Soc*, 1(7), pp. 816-835.

Eming, S. A., Krieg, T. und Davidson, J. M. (2007) 'Inflammation in wound repair: Molecular and cellular mechanisms', *J Invest Dermatol*, 127(3), pp. 514-525.

Euler-Chelpin, H. v. (1930) *Nobel lecture: Fermentation of sugars and fermentative enzymes*. Available at: http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/1929/euler-chelpin-lecture.html (Accessed: 17.10.2019).

Fontana, M. F. und Vance, R. E. (2011) 'Two signal models in innate immunity', *Immunol Rev*, 243(1), pp. 26-39.

Gadjeva, M., Takahashi, K. und Thiel, S. (2004) 'Mannan-binding lectin--a soluble pattern recognition molecule', *Mol Immunol*, 41(2-3), pp. 113-121.

Gallo, R. L. und Nizet, V. (2008) 'Innate barriers against infection and associated disorders', *Drug Discov Today Dis Mech*, 5(2), pp. 145-152.

Garlanda, C., Dinarello, C. A. und Mantovani, A. (2013) 'The interleukin-1 family: Back to the future', *Immunity*, 39(6), pp. 1003-1018.

Gasteiger, G., D'Oswaldo, A., Schubert, D. A., Weber, A., Bruscia, E. M. und Hartl, D. (2017) 'Cellular innate immunity: An old game with new players', *J Innate Immun*, 9(2), pp. 111-125.

Gery, I., Gershon, R. K. und Waksman, B. H. (1972) 'Potentiation of the t-lymphocyte response to mitogens. I. The responding cell', *J Exp Med*, 136(1), pp. 128-142.

Gilman, A. G. (1987) 'G proteins: Transducers of receptor-generated signals', *Annu Rev Biochem*, 56, pp. 615-649.

Gomes, A. P., Price, N. L., Ling, A. J., Moslehi, J. J., Montgomery, M. K., Rajman, L., White, J. P., Teodoro, J. S., Wrann, C. D., Hubbard, B. P., Mercken, E. M., Palmeira, C. M., de Cabo, R., Rolo, A. P., Turner, N., Bell, E. L. und Sinclair, D. A. (2013) 'Declining nad(+) induces a pseudohypoxic state disrupting nuclear-mitochondrial communication during aging', *Cell*, 155(7), pp. 1624-1638.

Grahames, C. B., Michel, A. D., Chessell, I. P. und Humphrey, P. P. (1999) 'Pharmacological characterization of atp- and lps-induced il-1beta release in human monocytes', *Br J Pharmacol*, 127(8), pp. 1915-1921.

Grau, V., Richter, K., Hone, A. J. und McIntosh, J. M. (2018) 'Conopeptides [v111;v16d]arib and rgia4: Powerful tools for the identification of novel nicotinic acetylcholine receptors in monocytes', *Front Pharmacol*, 9(1499).

Greaney, A. J., Leppla, S. H. und Moayeri, M. (2015) 'Bacterial exotoxins and the inflammasome', *Front Immunol*, 6(570).

Gutschow, M. V., Mason, J. C., Lane, K. M., Maayan, I., Hughey, J. J., Bajar, B. T., Amatya, D. N., Valle, S. D. und Covert, M. W. (2019) 'Combinatorial processing of bacterial and host-derived innate immune stimuli at the single-cell level', *Mol Biol Cell*, 30(2), pp. 282-292.

Haag, F., Koch-Nolte, F., Kuhl, M., Lorenzen, S. und Thiele, H. G. (1994) 'Premature stop codons inactivate the rt6 genes of the human and chimpanzee species', *J Mol Biol*, 243(3), pp. 537-546.

Harden, A. und Young, W. J. (1906) 'The alcoholic ferment of yeast-juice', *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 77(519), pp. 405-420.

Hari, A., Zhang, Y., Tu, Z., Detampel, P., Stenner, M., Ganguly, A. und Shi, Y. (2014) 'Activation of nlrp3 inflammasome by crystalline structures via cell surface contact', *Sci Rep*, 4(7281).

Hecker, A., Kullmar, M., Wilker, S., Richter, K., Zakrzewicz, A., Atanasova, S., Mathes, V., Timm, T., Lerner, S., Klein, J., Kaufmann, A., Bauer, S., Padberg, W., Kummer, W., Janciauskiene, S., Fronius, M., Schweda, E. K., Lochnit, G. und Grau, V. (2015) 'Phosphocholine-modified macromolecules and canonical nicotinic agonists inhibit atp-induced il-1beta release', *J Immunol*, 195(5), pp. 2325-2334.

Hegyí, J., Schwartz, R. A. und Hegyí, V. (2004) 'Pellagra: Dermatitis, dementia, and diarrhea', *Int J Dermatol*, 43(1), pp. 1-5.

Hiller, S. D., Heldmann, S., Richter, K., Jurastow, I., Kullmar, M., Hecker, A., Wilker, S., Fuchs-Moll, G., Manzini, I., Schmalzing, G., Kummer, W., Padberg, W., McIntosh, J. M., Damm, J., Zakrzewicz, A. und Grau, V. (2018) 'Beta-nicotinamide adenine dinucleotide (beta-nad) inhibits atp-dependent il-1beta release from human monocytic cells', *Int J Mol Sci*, 19(4).

Horenstein, A. L., Chillemi, A., Quarona, V., Zito, A., Roato, I., Morandi, F., Marimpietri, D., Bolzoni, M., Toscani, D., Oldham, R. J., Cuccioloni, M., Sasser, A. K., Pistoia, V., Giuliani, N. und Malavasi, F. (2015) 'Nad(+)-metabolizing ectoenzymes in remodeling tumor-host interactions: The human myeloma model', *Cells*, 4(3), pp. 520-537.

Hou, Y., Lautrup, S., Cordonnier, S., Wang, Y., Croteau, D. L., Zavala, E., Zhang, Y., Moritoh, K., O'Connell, J. F., Baptiste, B. A., Stevensner, T. V., Mattson, M. P. und Bohr, V. A. (2018) 'Nad(+) supplementation normalizes key alzheimer's features and DNA damage responses in a new ad mouse model with introduced DNA repair deficiency', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 115(8), pp. E1876-E1885.

Houtkooper, R. H., Canto, C., Wanders, R. J. und Auwerx, J. (2010) 'The secret life of nad⁺: An old metabolite controlling new metabolic signaling pathways', *Endocr Rev*, 31(2), pp. 194-223.

Hubert, S., Rissiek, B., Klages, K., Huehn, J., Sparwasser, T., Haag, F., Koch-Nolte, F., Boyer, O., Seman, M. und Adriouch, S. (2010) 'Extracellular nad⁺ shapes the foxp3⁺ regulatory t cell compartment through the art2-p2x7 pathway', *J Exp Med*, 207(12), pp. 2561-2568.

Innocent, N., Livingstone, P. D., Hone, A., Kimura, A., Young, T., Whiteaker, P., McIntosh, J. M. und Wonnacott, S. (2008) 'Alpha-conotoxin arenatus ib[v111,v16d] [corrected] is a potent and selective antagonist at rat and human native alpha7 nicotinic acetylcholine receptors', *J Pharmacol Exp Ther*; 327(2), pp. 529-537.

Iwasaki, A. und Medzhitov, R. (2015) 'Control of adaptive immunity by the innate immune system', *Nat Immunol*, 16(4), pp. 343-353.

Iyer, S. S., Pulskens, W. P., Sadler, J. J., Butter, L. M., Teske, G. J., Ulland, T. K., Eisenbarth, S. C., Florquin, S., Flavell, R. A., Leemans, J. C. und Sutterwala, F. S. (2009) 'Necrotic cells trigger a sterile inflammatory response through the nlrp3 inflammasome', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106(48), pp. 20388-20393.

Jacobson, E., Bernofsky, C. und Jacobson, M. (1973) 'Evidence against the natural occurrence of alpha-nicotinamide adenine dinucleotide in azotobacter vinelandii', *The Journal of biological chemistry*, 248, pp. 7801-7807.

Janeway, C. (1989) 'Immunogenicity signals 1,2,3 ... And 0', *Immunol Today*, 10(9), pp. 283-286.

Jurastow, I., Engel, S., Wiegand, S., Rafiq, A., Zakrzewicz, A., Grau, V., Nassenstein, C., Bünemann, M. und Kummer, W. (2015) 'B-nicotinamide adenine dinucleotide: A novel bronchodilator inducing increase in intracellular camp', *Pneumologie*, 69.

Kaplanov, I., Carmi, Y., Kornetsky, R., Shemesh, A., Shurin, G. V., Shurin, M. R., Dinarello, C. A., Voronov, E. und Apte, R. N. (2019) 'Blocking il-1beta reverses the immunosuppression in mouse breast cancer and synergizes with anti-pd-1 for tumor abrogation', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 116(4), pp. 1361-1369.

Kawai, T. und Akira, S. (2009) 'The roles of tlrs, rlr and nlr in pathogen recognition', *Int Immunol*, 21(4), pp. 317-337.

Kawasaki, T. und Kawai, T. (2014) 'Toll-like receptor signaling pathways', *Front Immunol*, 5(461).

Kim, B., Lee, Y., Kim, E., Kwak, A., Ryoo, S., Bae, S. H., Azam, T., Kim, S. und Dinarello, C. A. (2013) 'The interleukin-1alpha precursor is biologically active and is likely a key alarmin in the il-1 family of cytokines', *Front Immunol*, 4(391).

Kitchens, R. L. (2000) 'Role of cd14 in cellular recognition of bacterial lipopolysaccharides', *Chem Immunol*, 74, pp. 61-82.

Klein, C., Grahert, A., Abdelrahman, A., Muller, C. E. und Hauschildt, S. (2009) 'Extracellular nad(+) induces a rise in [ca(2+)](i) in activated human monocytes via engagement of p2y(1) and p2y(11) receptors', *Cell Calcium*, 46(4), pp. 263-272.

Kranich, P. (2005) *Akute transplantatabstoßung: Expressionskinetik unterschiedlicher mediatoren der akuten transplantatabstoßung*. Available at: <http://geb.uni-giessen.de/geb/volltexte/2006/2751/pdf/KranichPia-2005-02-22.pdf> (Accessed: 30.10.2019 2019).

Kudryavtsev, D., Shelukhina, I., Vulfius, C., Makarieva, T., Stonik, V., Zhmak, M., Ivanov, I., Kasheverov, I., Utkin, Y. und Tsetlin, V. (2015) 'Natural compounds interacting with nicotinic acetylcholine receptors: From low-molecular weight ones to peptides and proteins', *Toxins (Basel)*, 7(5), pp. 1683-1701.

Labzin, L. I., Bottermann, M., Rodriguez-Silvestre, P., Foss, S., Andersen, J. T., Vaysburd, M., Clift, D. und James, L. C. (2019) 'Antibody and DNA sensing pathways converge to activate the inflammasome during primary human macrophage infection', *EMBO J*, 38(e101365).

Lee, H. C. (2006) 'Structure and enzymatic functions of human cd38', *Mol Med*, 12(11-12), pp. 317-323.

Lei-Leston, A. C., Murphy, A. G. und Maloy, K. J. (2017) 'Epithelial cell inflammasomes in intestinal immunity and inflammation', *Front Immunol*, 8(1168).

Li, S., Ballou, L. R., Morham, S. G. und Blatteis, C. M. (2001) 'Cyclooxygenase-2 mediates the febrile response of mice to interleukin-1beta', *Brain Res*, 910(1-2), pp. 163-173.

Lu, Y. C., Yeh, W. C. und Ohashi, P. S. (2008) 'Lps/tlr4 signal transduction pathway', *Cytokine*, 42(2), pp. 145-151.

Madej, M. P., Topfer, E., Boraschi, D. und Italiani, P. (2017) 'Different regulation of interleukin-1 production and activity in monocytes and macrophages: Innate memory as an endogenous mechanism of il-1 inhibition', *Front Pharmacol*, 8(335).

Mao, K., Chen, S., Chen, M., Ma, Y., Wang, Y., Huang, B., He, Z., Zeng, Y., Hu, Y., Sun, S., Li, J., Wu, X., Wang, X., Strober, W., Chen, C., Meng, G. und Sun, B. (2013) 'Nitric oxide suppresses nlrp3 inflammasome activation and protects against lps-induced septic shock', *Cell Res*, 23(2), pp. 201-212.

March, C. J., Mosley, B., Larsen, A., Cerretti, D. P., Braedt, G., Price, V., Gillis, S., Henney, C. S., Kronheim, S. R., Grabstein, K. und et al. (1985) 'Cloning, sequence and expression of two distinct human interleukin-1 complementary dnas', *Nature*, 315(6021), pp. 641-647.

Mariathasan, S., Weiss, D. S., Newton, K., McBride, J., O'Rourke, K., Roose-Girma, M., Lee, W. P., Weinrauch, Y., Monack, D. M. und Dixit, V. M. (2006) 'Cryopyrin activates the inflammasome in response to toxins and atp', *Nature*, 440(7081), pp. 228-232.

Martinet, W., Schrijvers, D. M. und Kockx, M. M. (2003) 'Nucleofection as an efficient nonviral transfection method for human monocytic cells', *Biotechnol Lett*, 25(13), pp. 1025-1029.

Martinon, F., Burns, K. und Tschopp, J. (2002) 'The inflammasome: A molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proil-beta', *Mol Cell*, 10(2), pp. 417-426.

Martinon, F., Mayor, A. und Tschopp, J. (2009) 'The inflammasomes: Guardians of the body', *Annu Rev Immunol*, 27, pp. 229-265.

Matasic, D. S., Brenner, C. und London, B. (2018) 'Emerging potential benefits of modulating nad(+) metabolism in cardiovascular disease', *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 314(4), pp. H839-H852.

Matzinger, P. (1994) 'Tolerance, danger, and the extended family', *Annu Rev Immunol*, 12, pp. 991-1045.

Matzinger, P. (2007) 'Friendly and dangerous signals: Is the tissue in control?', *Nat Immunol*, 8(1), pp. 11-13.

McIntosh, J. M., Absalom, N., Chebib, M., Elgoyhen, A. B. und Vincler, M. (2009) 'Alpha9 nicotinic acetylcholine receptors and the treatment of pain', *Biochem Pharmacol*, 78(7), pp. 693-702.

Medzhitov, R. und Janeway, C. A., Jr. (2002) 'Decoding the patterns of self and nonself by the innate immune system', *Science*, 296(5566), pp. 298-300.

Misawa, T., Takahama, M., Kozaki, T., Lee, H., Zou, J., Saitoh, T. und Akira, S. (2013) 'Microtubule-driven spatial arrangement of mitochondria promotes activation of the nlrp3 inflammasome', *Nat Immunol*, 14(5), pp. 454-460.

Moreschi, I., Bruzzone, S., Nicholas, R. A., Fruscione, F., Sturla, L., Benvenuto, F., Usai, C., Meis, S., Kassack, M. U., Zocchi, E. und De Flora, A. (2006) 'Extracellular nad⁺ is an agonist of the human p2y11 purinergic receptor in human granulocytes', *J Biol Chem*, 281(42), pp. 31419-31429.

Murphy, K. und Weaver, C. (2017) *Janeway's immunobiology*.

Mutafova-Yambolieva, V. N., Hwang, S. J., Hao, X., Chen, H., Zhu, M. X., Wood, J. D., Ward, S. M. und Sanders, K. M. (2007) 'Beta-nicotinamide adenine dinucleotide is an inhibitory neurotransmitter in visceral smooth muscle', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104(41), pp. 16359-16364.

Nesargikar, P. N., Spiller, B. und Chavez, R. (2012) 'The complement system: History, pathways, cascade and inhibitors', *Eur J Microbiol Immunol (Bp)*, 2(2), pp. 103-111.

Neuhaus, B., Tosun, B., Rotan, O., Frede, A., Westendorf, A. und Epple, M. (2016) 'Nanoparticles as transfection agents: A comprehensive study with ten different cell lines', *RSC Advances*, 6(22), pp. 18102-18112.

Nikiforov, A., Kulikova, V. und Ziegler, M. (2015) 'The human nad metabolome: Functions, metabolism and compartmentalization', *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 50(4), pp. 284-297.

North, R. A. (2002) 'Molecular physiology of p2x receptors', *Physiol Rev*, 82(4), pp. 1013-1067.

O'Reilly, T. und Niven, D. F. (2003) 'Levels of nicotinamide adenine dinucleotide in extracellular body fluids of pigs may be growth-limiting for actinobacillus pleuropneumoniae and haemophilus parasuis', *Can J Vet Res*, 67(3), pp. 229-231.

Oppenheimer, N. und O. Kaplan, N. (1975) 'The alpha beta epimerization of reduced nicotinamide adenine dinucleotide', *Archives of biochemistry and biophysics*, 166.

Oxenkrug, G. F. (2010) 'Tryptophan kynurenine metabolism as a common mediator of genetic and environmental impacts in major depressive disorder: The serotonin hypothesis revisited 40 years later', *Isr J Psychiatry Relat Sci*, 47(1), pp. 56-63.

Petrilli, V., Papin, S., Dostert, C., Mayor, A., Martinon, F. und Tschopp, J. (2007) 'Activation of the nalp3 inflammasome is triggered by low intracellular potassium concentration', *Cell Death Differ*, 14(9), pp. 1583-1589.

Philip, N. S., Carpenter, L. L., Tyrka, A. R. und Price, L. H. (2012) 'The nicotinic acetylcholine receptor as a target for antidepressant drug development', *ScientificWorldJournal*, 2012(104105).

Pittelli, M., Felici, R., Pitozzi, V., Giovannelli, L., Bigagli, E., Cialdai, F., Romano, G., Moroni, F. und Chiarugi, A. (2011) 'Pharmacological effects of exogenous nad on mitochondrial bioenergetics, DNA repair, and apoptosis', *Mol Pharmacol*, 80(6), pp. 1136-1146.

Pliyev, B. K., Ivanova, A. V. und Savchenko, V. G. (2014) 'Extracellular nad(+) inhibits human neutrophil apoptosis', *Apoptosis*, 19(4), pp. 581-593.

Pradeu, T. und Cooper, E. L. (2012) 'The danger theory: 20 years later', *Front Immunol*, 3(287).

Preiss, J. und Handler, P. (1958) 'Biosynthesis of diphosphopyridine nucleotide. I. Identification of intermediates', *J Biol Chem*, 233(2), pp. 488-492.

Raetz, C. R. und Whitfield, C. (2002) 'Lipopolysaccharide endotoxins', *Annu Rev Biochem*, 71, pp. 635-700.

Rajman, L., Chwalek, K. und Sinclair, D. A. (2018) 'Therapeutic potential of nad-boosting molecules: The in vivo evidence', *Cell Metab*, 27(3), pp. 529-547.

Ramadori, G., Van Damme, J., Rieder, H. und Meyer zum Buschenfelde, K. H. (1988) 'Interleukin 6, the third mediator of acute-phase reaction, modulates hepatic protein synthesis in human and mouse. Comparison with interleukin 1 beta and tumor necrosis factor-alpha', *Eur J Immunol*, 18(8), pp. 1259-1264.

Richter, K., Mathes, V., Fronius, M., Althaus, M., Hecker, A., Krasteva-Christ, G., Padberg, W., Hone, A. J., McIntosh, J. M., Zakrzewicz, A. und Grau, V. (2016) 'Phosphocholine - an agonist of metabotropic but not of ionotropic functions of alpha9-containing nicotinic acetylcholine receptors', *Sci Rep*, 6(28660).

Romanello, M., Bicego, M., Pirulli, D., Crovella, S., Moro, L. und D'Andrea, P. (2002) 'Extracellular nad⁺: A novel autocrine/paracrine signal in osteoblast physiology', *Biochem Biophys Res Commun*, 299(3), pp. 424-431.

Sak, K. und Webb, T. E. (2002) 'A retrospective of recombinant p2y receptor subtypes and their pharmacology', *Arch Biochem Biophys*, 397(1), pp. 131-136.

Scheuplein, F., Schwarz, N., Adriouch, S., Krebs, C., Bannas, P., Rissiek, B., Seman, M., Haag, F. und Koch-Nolte, F. (2009) 'Nad⁺ and atp released from injured cells induce p2x7-dependent shedding of cd62l and externalization of phosphatidylserine by murine t cells', *J Immunol*, 182(5), pp. 2898-2908.

Schroder, K. und Tschopp, J. (2010) 'The inflammasomes', *Cell*, 140(6), pp. 821-832.

Siegel, G. J. und Agranoff, B. W. (1999) Basic neurochemistry: Molecular, cellular, and medical aspects. Lippincott Williams & Wilkins.

Smyth, L. M., Bobalova, J., Mendoza, M. G., Lew, C. und Mutafova-Yambolieva, V. N. (2004) 'Release of beta-nicotinamide adenine dinucleotide upon stimulation of postganglionic nerve terminals in blood vessels and urinary bladder', *J Biol Chem*, 279(47), pp. 48893-48903.

Stoffels, M., Zaal, R., Kok, N., van der Meer, J. W., Dinarello, C. A. und Simon, A. (2015) 'Atp-induced il-1beta specific secretion: True under stringent conditions', *Front Immunol*, 6(54).

Suzuki, K., Nakano, H. und Suzuki, S. (1967) 'Natural occurrence and enzymatic synthesis of alpha-nicotinamide adenine dinucleotide phosphate.', *The Journal of biological chemistry*, 242 14, pp. 3319-3325.

Tang, D., Kang, R., Coyne, C. B., Zeh, H. J. und Lotze, M. T. (2012) 'Pamps and damps: Signal 0s that spur autophagy and immunity', *Immunol Rev*, 249(1), pp. 158-175.

Traba, J., Kwarteng-Siaw, M., Okoli, T. C., Li, J., Huffstutler, R. D., Bray, A., Waclawiw, M. A., Han, K., Pelletier, M., Sauve, A. A., Siegel, R. M. und Sack, M. N. (2015) 'Fasting and refeeding differentially regulate nlrp3 inflammasome activation in human subjects', *J Clin Invest*, 125(12), pp. 4592-4600.

Trammell, S. A. und Brenner, C. (2013) 'Targeted, lcms-based metabolomics for quantitative measurement of nad(+) metabolites', *Comput Struct Biotechnol J*, 4(e201301012).

Umamathy, N. S., Gonzales, J., Fulzele, S., Kim, K. M., Lucas, R. und Verin, A. D. (2012) 'Beta-nicotinamide adenine dinucleotide attenuates lipopolysaccharide-induced inflammatory effects in a murine model of acute lung injury', *Exp Lung Res*, 38(5), pp. 223-232.

Umamathy, N. S., Zemskov, E. A., Gonzales, J., Gorshkov, B. A., Sridhar, S., Chakraborty, T., Lucas, R. und Verin, A. D. (2010) 'Extracellular beta-nicotinamide adenine dinucleotide (beta-nad) promotes the endothelial cell barrier integrity via pka- and epac1/rac1-dependent actin cytoskeleton rearrangement', *J Cell Physiol*, 223(1), pp. 215-223.

VanLinden, M. R., Dolle, C., Pettersen, I. K., Kulikova, V. A., Niere, M., Agrimi, G., Dyrstad, S. E., Palmieri, F., Nikiforov, A. A., Tronstad, K. J. und Ziegler, M. (2015) 'Subcellular distribution of nad+ between cytosol and mitochondria determines the metabolic profile of human cells', *J Biol Chem*, 290(46), pp. 27644-27659.

Vitiello, L., Gorini, S., Rosano, G. und la Sala, A. (2012) 'Immunoregulation through extracellular nucleotides', *Blood*, 120(3), pp. 511-518.

Warburg, O. und Christian, W. (1936) 'Pyridin, der wasserstoffübertragende bestandteil von gärungsfermenten', *Helvetica Chimica Acta*, 19(1), pp. E79-E88.

Waugh, J. und Perry, C. M. (2005) 'Anakinra: A review of its use in the management of rheumatoid arthritis', *BioDrugs*, 19(3), pp. 189-202.

Weigt, S. S., Palchevskiy, V. und Belperio, J. A. (2017) 'Inflammasomes and il-1 biology in the pathogenesis of allograft dysfunction', *J Clin Invest*, 127(6), pp. 2022-2029.

World Health Organization (2000) *Pellagra and its prevention and control in major emergencies*. Available at: https://www.who.int/nutrition/publications/en/pellagra_prevention_control.pdf (Accessed: 28.10.2019).

Yang, Y. und Sauve, A. A. (2016) 'Nad(+) metabolism: Bioenergetics, signaling and manipulation for therapy', *Biochim Biophys Acta*, 1864(12), pp. 1787-1800.

Youm, Y. H., Nguyen, K. Y., Grant, R. W., Goldberg, E. L., Bodogai, M., Kim, D., D'Agostino, D., Planavsky, N., Lupfer, C., Kanneganti, T. D., Kang, S., Horvath, T. L., Fahmy, T. M., Crawford, P. A., Biragyn, A., Alnemri, E. und Dixit, V. D. (2015) 'The ketone metabolite beta-hydroxybutyrate blocks nlrp3 inflammasome-mediated inflammatory disease', *Nat Med*, 21(3), pp. 263-269.

Zakrzewicz, A., Richter, K., Agne, A., Wilker, S., Siebers, K., Fink, B., Krasteva-Christ, G., Althaus, M., Padberg, W., Hone, A. J., McIntosh, J. M. und Grau, V. (2017) 'Canonical and novel non-canonical cholinergic agonists inhibit atp-induced release of monocytic interleukin-1beta via different combinations of nicotinic acetylcholine receptor subunits alpha7, alpha9 and alpha10', *Front Cell Neurosci*, 11(189).

Zhong, Z., Liang, S., Sanchez-Lopez, E., He, F., Shalapour, S., Lin, X. J., Wong, J., Ding, S., Seki, E., Schnabl, B., Hevener, A. L., Greenberg, H. B., Kisseleva, T. und Karin, M. (2018) 'New mitochondrial DNA synthesis enables nlrp3 inflammasome activation', *Nature*, 560(7717), pp. 198-203.

Zhou, R., Tardivel, A., Thorens, B., Choi, I. und Tschopp, J. (2010) 'Thioredoxin-interacting protein links oxidative stress to inflammasome activation', *Nat Immunol*, 11(2), pp. 136-140.

Zoli, M., Pucci, S., Vilella, A. und Gotti, C. (2018) 'Neuronal and extraneuronal nicotinic acetylcholine receptors', *Curr Neuropharmacol*, 16(4), pp. 338-349.

10. Publikationsverzeichnis

10.1. Originalarbeiten

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

10.2. Vorträge

Conference: Novel Concepts in Innate Immunity (NCII) (Tübingen, 09/2015): **S. Hiller**, A. Zakrzewicz, S. Wilker, I. Jurastow, A. Hecker, W. Kummer, W. Padberg, V. Grau. *ATP-induced interleukin-1 β release by human monocytes cells is inhibited by β -NAD.*

10.3. Posterpräsentationen

132. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Chirurgie (DGCH) (München, 05/2015): **Hiller S**, Zakrzewicz A, Sigrid W, Jurastow I, Hecker A, Kummer W, Padberg W, Grau V *Inhibition of ATP-mediated release of interleukin-1 β by β -NAD.*

4. Internationales Symposium des Deutschen Zentrums für Lungenforschung (DZL) (Heidelberg, 06/2015): **Sebastian Hiller**, Anna Zakrzewicz, Sigrid Wilker, Innokentij Jurastow, Andreas Hecker, Wolfgang Kummer, Winfried Padberg, Veronika Grau. *β -NAD inhibits ATP-induced interleukin-1 β release.*

Excellence Cluster Cardio-Pulmonary System (ECCPS) Retreat (Bad Nauheim, 06/2015): **Sebastian Hiller**, Anna Zakrzewicz, Sigrid Wilker, Innokentij Jurastow, Andreas Hecker, Wolfgang Kummer, Winfried Padberg, Veronika Grau. *β -NAD inhibits ATP-induced interleukin-1 β release.*

11. Danksagung

Zum Abschluss möchte ich mich bei denen bedanken, die es mir ermöglicht haben diese Arbeit durchzuführen und abzuschließen.

Allen voran möchte ich mich bei Prof. Dr. Veronika Grau für die Vergabe des Dissertationsthemas und die Bereitstellung des Labors bedanken. Ihre stetige und geduldige Unterstützung haben diese Arbeit sowie die damit zusammenhängenden Vorträge erst möglich gemacht. Außerdem möchte ich mich bei ihr für die schnelle und unkomplizierte Integration in ihre Arbeitsgruppe bedanken.

Großer Dank gilt zudem Sigrid Wilker. Neben der ausführlichen Einarbeitung in die umfangreiche Methodik hatte sie auch immer einen Rat, wenn es zu unerwarteten Schwierigkeiten im Labor gekommen ist.

Vielen Dank auch an Dr. Anna Zakrzewicz für die Mitbetreuung des Projekts und dafür, dass ich sie jederzeit mit meinen Fragen und Problemen kontaktieren konnte.

Selbstverständlich möchte ich mich hiermit auch bei allen anderen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe bedanken. Durch die kollegiale und freundschaftliche Art habe ich mich sehr gut aufgenommen gefühlt und weiß die Zeit die ich mit euch verbracht habe sehr zu schätzen.

Dem Land Hessen möchte ich mich für die finanzielle Unterstützung im Rahmen des LOEWE-Stipendiums bedanken.

Der Justus-Liebig-Universität möchte ich mich für die Möglichkeit der Dissertationen und das Rahmenprogramm des Prägraduierten-Kollegs bedanken.

Zum Abschluss bedanke ich mich bei meiner Familie und meiner Freundin Caroline, die mich jederzeit unterstützt und auch in schwierigen Zeiten motiviert haben weiter zu machen.