

**Agonisten nikotinscher Acetylcholinrezeptoren hemmen die ATP-
induzierte Interleukin-1 β -Freisetzung aus Monozyten**

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

vorgelegt von Mira Küllmar
aus Gießen

Gießen 2020

Aus dem Fachbereich Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

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

Sektion Experimentelle Chirurgie

Gutachterin: Frau Prof. Dr. V. Grau

Gutachter: Herr Prof. Dr. T. Borggrefe

Tag der Disputation: 12.07.2021

Meiner Oma Ilse

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	IV
1 Einleitung.....	1
1.1 Das angeborene Immunsystem	1
1.1.1 Signalerkennung über Pattern recognition receptors (PRRs)	2
1.1.2 Der <i>Toll-like</i> -Rezeptor (TLR)4-Signalweg	4
1.1.3 Inflammasome.....	6
1.1.4 Interleukin (IL)-1 β	8
1.2 Cholinerge Aspekte des Immunsystems	11
1.2.1 Acetylcholin (ACh) und das cholinerge System – Ein Überblick	11
1.2.2 Der „cholinerge antiinflammatorische Reflex“	13
1.2.3 Effekte von non-neuronalem ACh auf das Immunsystem	14
1.2.4 Effekte anderer Liganden nikotinischer ACh-Rezeptoren (nAChRs) und strukturverwandter Moleküle auf das Immunsystem.....	16
1.3 Ziele der Arbeit	17
2 Material.....	20
2.1 Reagenzien	20
2.2 Puffer und Lösungen	22
2.3 Kits	22
2.4 Geräte und Verbrauchsmaterial	22
2.5 Software	24
3 Methoden	25
3.1 U937-Zellen	25
3.1.1 Kultivierung von U937-Zellen.....	25
3.1.2 Experimente mit U937-Zellen	25
3.2 Humane mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (PBMCs)	28
3.2.1 Isolierung der PBMCs.....	28
3.2.2 Experimente mit PBMCs	28
3.3 CD14 ⁺ primäre humane Monozyten	29
3.3.1 Isolierung CD14 ⁺ primärer humaner Monozyten	29
3.3.2 Experimente mit CD14 ⁺ primären humanen Monozyten	30
3.4 Intravasale mononukleäre Leukozyten aus allogenen transplantierten Rattennieren	31

3.4.1	Isolierung von intravasalen mononukleären Leukozyten aus allogenen transplantierten Rattennieren	31
3.4.2	Experimente mit intravasalen mononukleären Leukozyten aus allogenen transplantierten Rattennieren	32
3.5	Nachweis von mRNA	32
3.5.1	Isolierung von mRNA	33
3.5.2	Synthese von cDNA	33
3.5.3	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	34
3.5.4	Agarosegelelektrophorese	36
3.5.5	Sequenzierung	37
3.6	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)</i>	37
3.7	Messung der Zellviabilität	38
3.8	Statistik	38
4	Ergebnisse	39
4.1	U937-Zellen	39
4.1.1	ATP-induzierte IL-1 β -Freisetzung	39
4.1.2	NACHR-Agonisten	40
4.1.3	NACHR-Antagonisten	41
4.1.4	Transfektion mit siRNA	43
4.1.5	Phosphocholin (PC) und PC-modifizierte Makromoleküle	44
4.1.6	Nigericin-induzierte IL-1 β -Freisetzung	47
4.2	PBMCs	49
4.3	CD14 ⁺ primäre humane Monozyten	50
4.4	Intravasale mononukleäre Leukozyten aus allogenen transplantierten Rattennieren	52
4.5	Zellviabilität	53
5	Diskussion	57
5.1.1	NACHR-Agonisten hemmen die ATP-induzierte IL-1 β -Freisetzung aus U937-Zellen	58
5.1.2	Die nACHR-Untereinheiten $\alpha 7$, $\alpha 9$ und $\alpha 10$ vermitteln die Hemmung der ATP-induzierten IL-1 β -Freisetzung aus U937-Zellen	60
5.1.3	PC und PC-modifiziertes LOS aus <i>Haemophilus influenzae</i> hemmen die ATP-induzierte IL-1 β -Freisetzung aus U937-Zellen	62
5.1.4	NACHR-Agonisten hemmen die ATP-induzierte IL-1 β -Freisetzung aus primären humanen PBMCs und CD14 ⁺ Monozyten	64

5.1.5	Während der akuten Transplantatabstoßungsreaktion endogen produziertes ACh hemmt die ATP-induzierte IL-1 β -Freisetzung aus intravasalen mononukleären Leukozyten aus allogenen transplantierten Rattennieren	66
5.1.6	Schlußfolgerung	68
5.1.7	„Rückblick in die Zukunft“	70
6	Zusammenfassung	72
6.1	Agonisten nikotinischer Acetylcholinrezeptoren hemmen die ATP-induzierte IL-1 β -Freisetzung aus Monozyten	72
6.2	Agonists of nicotinic acetylcholine receptors inhibit ATP-induced IL-1 β release by monocytes	73
7	Abkürzungsverzeichnis	75
8	Literatur	80
9	Publikationsverzeichnis	102
10	Ehrenwörtliche Erklärung	107
11	Danksagung	108
12	Lebenslauf	109

1 Einleitung

1.1 Das angeborene Immunsystem

Das Überleben eines Organismus ist von einer funktionierenden Abwehr gegen potentielle Schädigung abhängig (148). Das humane Immunsystem ist ein komplexes Abwehrsystem, bei dem verschiedenste Abwehrmechanismen gleichzeitig ablaufen, einander beeinflussen und ergänzen (147). Das funktionierende Immunsystem unterscheidet nicht einfach nur eigen von fremd, sondern erkennt vielmehr verschiedenste Signale als potentielle Gefahr (19, 142, 146). Diese Signale sind einerseits molekulare Strukturen verschiedener Pathogene wie Bakterien, Viren, Parasiten, Pilze oder von ihnen infizierte Zellen (*pathogen-associated molecular patterns*, PAMPs). Andererseits können nicht-pathogene Strukturen wie entartete Zellen, Stoffwechselprodukte oder Mediatoren des nicht-infektiösen Gewebeschadens Gefahrensignale darstellen (*danger-associated molecular patterns*, DAMPs) (19, 153, 220). Evolutionär bedingt gibt es ein angeborenes Immunsystem, das innerhalb kürzester Zeit unspezifisch auf genetisch vorprogrammierte Gefahrensignale reagiert (98, 147). Das angeborene Immunsystem wird durch das erworbene Immunsystem ergänzt. Das erworbene Immunsystem reagiert mit spezifischeren Erkennungs- und Abwehrmechanismen, braucht jedoch länger, um diese auszubilden (147). Nach Bildung eines Immungedächtnisses kann es bei erneutem Kontakt mit demselben Gefahrensignal schneller und zielgerichteter reagieren (98).

Der Schwerpunkt dieser Arbeit liegt auf Aspekten des angeborenen Immunsystems. Vereinfacht dargestellt umfasst das angeborene Immunsystem folgende Komponenten: Physikalische Schutzbarrieren (wie Haut, Schleimhäute, Haare, Flimmerepithel), biochemische Schutzbarrieren (wie Magensäure oder antimikrobiell wirkende Defensine auf der Haut und inneren Körperoberflächen, Lysozym im Speichel und Schleim) und als Primärantwort auf PAMPs und DAMPs induzierte humorale und zelluläre Mechanismen (148). Überwinden Pathogene die Schutzbarrieren eines Organismus, wird auf humoraler Ebene das Komplementsystem aktiviert (147, 211). Die Aktivierung kann über den klassischen Weg (initiiert durch Immunkomplexe mit Hilfe von Antikörpern, durch apoptotische Zellen, verschiedene Viren- und Bakterienstrukturen), den alternativen Weg (initiiert durch die Erkennung von pathogenen Oberflächenstrukturen und Tumorzellen) oder

den Lektin-Weg (initiiert durch die Bindung von Mannose-bindendem Lektin (MBL) oder Ficolinen an entsprechende pathogene Strukturen) erfolgen. Alle Aktivierungswege führen zur Bildung von C3-Konvertasen, die dann über eine Endstreckenkaskade letztlich zur Opsonierung von Pathogenen, der Lyse infizierter Zellen und über die Freisetzung von Chemokinen zur Chemotaxis von Abwehrzellen führt (86, 181, 211).

Auf zellulärer Ebene können Zellen des angeborenen Immunsystems (wie Monozyten, die sich im Gewebe zu Makrophagen entwickeln, dendritische Zellen (*dendritic cells*, DCs), neutrophile Granulozyten) und Epithelzellen über genetisch vorgegebene Mustererkennungsrezeptoren (*pattern recognition receptors*, PRRs) verschiedene PAMPs und DAMPs identifizieren (19, 145). Einige Immunzellen können dann Pathogene phagozytieren, abtöten und eliminieren. Antigen-präsentierende Zellen (*antigen-presenting cells*, APCs) können Pathogenfragmente nach intrazellulärer Prozessierung auf ihrer Zelloberfläche über Haupthistokompatibilitätskomplexmoleküle (*major histocompatibility complex molecule*, MHC) den T-Lymphozyten präsentieren und somit das erworbene Immunsystem aktivieren (2, 103).

Nach Erkennung von PAMPs oder DAMPs wird über intrazelluläre Signalkaskaden die Produktion und Freisetzung von Zytokinen induziert. Zytokine als wichtige Botenstoffe der Immunreaktion rekrutieren beispielsweise über parakrine Mechanismen weitere Immunzellen und wirken autokrin auf die Eigenregulation der Zelle (18, 72, 153). In den nachfolgenden Kapiteln werden die für diese Arbeit relevanten Mechanismen des angeborenen Immunsystems dargestellt.

1.1.1 Signalerkennung über Pattern recognition receptors (PRRs)

Die zelluläre Erkennung von PAMPs und DAMPs erfolgt über PRRs, die unter anderem von verschiedenen Immunzellen exprimiert werden. Da es unzählige pathogene Erreger und Gefahrensignale gibt, sind PRRs genetisch auf die Erkennung bestimmter Muster programmiert. Diese Muster werden als PAMPs und DAMPs ubiquitär exprimiert. Auf diese Weise ist es möglich, mit einer begrenzten Anzahl PRRs eine sehr große Vielfalt an potentiellen Pathogenen und Gefahrensignalen zu erkennen, um dann innerhalb kürzester Zeit eine Immunantwort zu initiieren (148).

Im Fall der PAMPs ist diesen Mustern gemein, dass sie als überlebenswichtige Strukturen von einer Vielzahl von Pathogengruppen exprimiert werden. Klassische PAMPs sind Zellwandkomponenten wie das Lipopolysaccharid (LPS) Gram-negativer Bakterien,

Teichonsäuren Gram-positiver Bakterien, Peptidoglykan Gram-negativer und Gram-positiver Bakterien oder β -1,3-Glucane verschiedener Pilzarten (25, 144, 148). Die Erkennung einiger bakterieller, vor allem aber viraler Komponenten als PAMPs erfolgt weiterhin über die Identifizierung pathogener Nukleinsäuren (144). Sowohl Ribonukleinsäure (*ribonucleic acid*, RNA) als auch Desoxyribonukleinsäure (*deoxyribonucleic acid*, DNA) können von verschiedenen PRRs als PAMPs erkannt werden (13, 56, 132). Die Unterscheidung pathogener von eigenen Nukleinsäuren kann im gesunden Organismus aufgrund molekularer Strukturunterschiede bakterieller und viraler Nukleinsäuren zu eukaryotischen Nukleinsäuren getroffen werden (144). Einen Sonderfall stellt mitochondriale DNA (mtDNA) dar, die sich evolutionär bedingt in ihrer molekularen Struktur von der humanen DNA im Zellkern unterscheidet und bakterieller DNA ähnelt (82, 128, 196). Bei Zellschäden freigesetzte mtDNA kann aufgrund dieser strukturellen Ähnlichkeit eine identische Immunreaktion wie bakterielle PAMPs auslösen (226). Da sie jedoch nicht pathogenen Ursprungs ist, wird mtDNA vielmehr als DAMP eingeordnet.

Typischerweise sind DAMPs endogene, unter physiologischen Bedingungen meist intrazellulär vorkommende Strukturen, die als Indikator für den Zelluntergang eine Immunreaktion auslösen können (30, 76). Neben Nukleinsäuren sind klassische Beispiele hierfür Adenosintriphosphat (ATP), die Familie der Calcium-bindenden S100-Proteine, *high mobility group box protein 1* (HMGB1) oder Harnsäure (6, 28, 99, 104, 122, 125, 183). Extrazelluläre Strukturen wie beispielsweise Hyaluronsäuren, die durch Enzyme aus geschädigtem Gewebe freigesetzt werden, können ebenfalls als DAMPs erkannt werden (184). Weiterhin können exogene DAMPs wie Asbest oder Siliziumdioxid (*silica*) eine starke Immunantwort und folgenschwere Erkrankung auslösen (30).

Zur Erkennung der verschiedenartigen PAMPs und DAMPs sind die PRRs sinnvollerweise sowohl membranständig in der Plasmamembran und in intrazellulären Membranen als auch zytosolisch lokalisiert. Die großen Familien der PRRs sind die zumeist in der Plasmamembran und in Endosomen lokalisierten *Toll-like-Rezeptoren* (TLRs) und die C-Typ-Lektin-Rezeptoren (CLRs), sowie die zytoplasmatisch lokalisierten *retinoic acid-inducible gene* (RIG)-*I-like-Rezeptoren* (RLRs), *nucleotide-binding oligomerization domain* (NOD)-*like-Rezeptoren* (NLRs) und *absent in melanoma 2* (AIM2)-*like-Rezeptoren* (ALRs) (198, 213).

1.1.2 Der *Toll-like-Rezeptor* (TLR)4-Signalweg

Eine große Familie der PRRs sind die TLRs. Es konnten bis heute insgesamt 13 verschiedene TLRs identifiziert werden, davon TLR1 bis TLR10 im Menschen (113). Einer der am besten untersuchtesten TLRs ist der TLR4. Als transmembranöses Glykoprotein ist der TLR4 in der äußeren Zellmembran von Immunzellen lokalisiert, kann aber auch internalisiert werden. Er besteht zur Ligandenbindung aus einer extrazellulären Domäne mit leucinreichen Regionen (*leucine-rich repeats*, LRRs), einer transmembranen Domäne und einer intrazellulären Domäne zur Signaltransduktion, die eine *Toll/Interleukin-1-Rezeptor* (*Toll/interleukin-1 receptor*, TIR)-Domäne enthält (113, 208). Der Hauptligand des TLR4 ist LPS, das als Zellwandbestandteil Gram-negativer Bakterien heftige Immunantworten auslösen kann (4, 113). Zur Erkennung und Bindung von LPS werden das LPS-bindende Protein (*LPS binding protein*, LBP), das Glykoprotein *cluster of differentiation 14* (CD14) und das Lymphozytenantigen 96 (*myeloid differentiation factor 2*, MD2) als Korezeptoren benötigt. Das lösliche Plasmaprotein LBP bindet LPS (59, 113, 140). Das in der Zellmembran der Zielzelle verankerte Glykoprotein CD14 bindet und transportiert den LPS-LBP-Komplex zum TLR4 (3, 39, 113, 203). Zur Bindung des präsentierten LPS muss der TLR4 im Komplex mit MD2 vorliegen (3, 113, 152). Nach Ligandenbindung und Aktivierung des TLR4 erfolgt eine Dimerisierung der extrazellulären und intrazellulären Domänen. In der Folge werden für die intrazelluläre Signalkaskade notwendige Adaptermoleküle rekrutiert und zwei verschiedene Signalwege induziert, der *myeloid differentiation primary response protein 88* (MyD88)-abhängige und der MyD88-unabhängige Signalweg (159). Typisch für den aktivierten TLR4 ist, dass er als einziger TLR beide Signalwege induzieren kann.

Über das Adaptermolekül MyD88 und sein Verbindungsmolekül *TIR domain-containing adapter protein* (TIRAP) führt der MyD88-abhängige Signalweg zur Aktivierung von Transkriptionsfaktoren wie *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells* (NF- κ B) und *activator protein 1* (AP-1) (4, 113, 208). Hierbei kommt es zur Bildung des sogenannten Myddosoms, bestehend aus TIRAP, MyD88 und *interleukin-1 receptor-associated kinases* (IRAKs) (11, 26, 137). Durch IRAKs erfolgt die Aktivierung von *tumor necrosis factor receptor associated factor 6* (TRAF6), der durch eine Interaktion mit *transforming growth factor- β -activated kinase 1-binding proteins* (TAB) zur Aktivierung von *transforming growth factor- β -activated kinase 1* (TAK1) führt (113, 137, 208). Die aktive TAK1 führt letztlich zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B und über

mitogen-activated protein kinases (MAPK) zur Aktivierung von Transkriptionsfaktoren wie AP-1 (108, 113, 208). Die aktiven Transkriptionsfaktoren induzieren die Transkription verschiedener proinflammatorischer Zytokine wie Interleukin (IL)-1 β , IL-18, IL-6 oder Tumornekrosefaktor-alpha (TNF- α).

Der MyD88-unabhängige Signalweg erfolgt nach anschließender Internalisierung des TLR4 durch CD14-abhängige Endozytose und Transport zum Endosom (106, 113, 223). Hierbei wird das Mydosom vom TLR4 abgespalten, sodass eine erneute Bindung des TLR4 stattfinden kann (109, 137). Über das Adaptermolekül *TIR domain-containing adapter-inducing interferon- β* (TRIF) und sein Verbindungsmolekül *TRIF-related adapter molecule* (TRAM) wird im Endosom der TRIF-abhängige Signalweg aktiviert (113, 137, 208). Hierbei erfolgt einerseits nach Bindung von TRAF3 über TRAF *family member-associated NF- κ B activator* (TANK)-*binding kinase 1* (TBK1) und *I κ B kinases* (IKKs) vermittelt die Aktivierung des Transkriptionsfaktors *interferon regulatory factor-3* (IRF3) (113, 137, 208). IRF3 induziert die Transkription von Typ-I-Interferonen (IFNs). Andererseits aktiviert TRIF ähnlich dem MyD88-abhängigen Signalweg auch TAK1 über TRAF6, was zu einer späten Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B führt (113). Nachfolgend ist in Abbildung (Abb.) 1 schematisch der TLR4-Signalweg dargestellt.

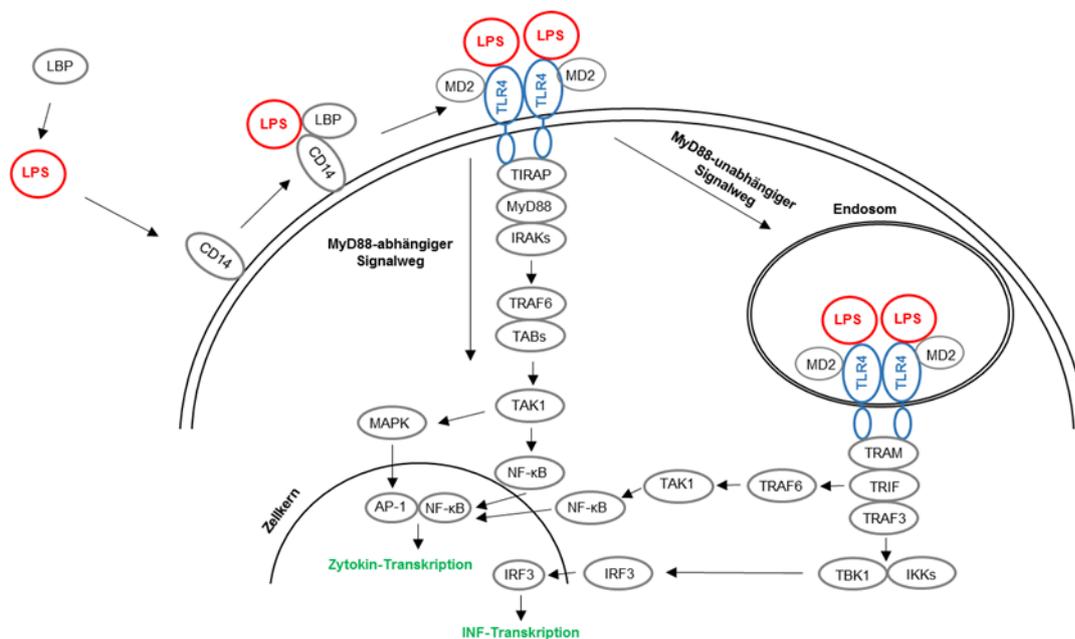


Abbildung 1: Schematische Darstellung des Toll-like-Rezeptor (TLR)4-Signalwegs. Das Lipopolysaccharid (LPS)-bindende Protein (LBP) bindet LPS, *cluster of differentiation 14* (CD14) transportiert den

LPS-LBP-Komplex zum TLR4, der im Komplex mit *myeloid differentiation factor 2* (MD2) vorliegt. Mit Bindung von LPS dimerisiert der TLR4. Der *myeloid differentiation primary response protein 88* (MyD88)-abhängige Signalweg erfolgt über Komplexbildung aus *Toll/interleukin-1 receptor* (TIR) *domain-containing adapter protein* (TIRAP), MyD88 und *interleukin-1 receptor-associated kinases* (IRAKs). IRAKs aktivieren *tumor necrosis factor receptor associated factor 6* (TRAF6), der durch Interaktion mit *transforming growth factor- β -activated kinase 1-binding proteins* (TAB) zur Aktivierung von *transforming growth factor- β -activated kinase 1* (TAK1) führt. TAK1 aktiviert den Transkriptionsfaktor *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells* (NF- κ B) und über *mitogen-activated protein kinases* (MAPK) den Transkriptionsfaktor *activator protein 1* (AP-1). Diese induzieren die Transkription proinflammatorischer Zytokine. Der MyD88-unabhängige Signalweg führt nach Internalisierung des TLR4 über *TIR domain-containing adapter-inducing interferon- β* (TRIF)-*related adapter molecule* (TRAM) und TRIF zur Bindung von TRAF3. Über *TRAF family member-associated NF- κ B activator-binding kinase 1* (TBK1) und *I κ B kinases* (IKKs) erfolgt die Aktivierung des Transkriptionsfaktors *interferon regulatory factor-3* (IRF3), der die Transkription von Typ-I-Interferonen (IFNs) induziert. Weiterhin aktiviert TRIF über TRAF6 auch TAK1, was zu einer späten NF- κ B-Aktivierung führt. (nach (137))

Für diese Arbeit relevant ist die über die TLR4-Signalkaskade induzierte Transkription von pro-IL-1 β , dem inaktiven Vorläufermolekül des Zytokins IL-1 β .

1.1.3 Inflammasome

Inflammasome sind intrazelluläre Proteinkomplexe, deren Bildung über verschiedene Stimuli induziert werden kann und die die Aktivierung und Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine wie IL-1 β vermitteln (84, 85, 126, 138, 185). Die Hauptkomponenten sind ein Sensorprotein, ein Adapterprotein *apoptosis-associated speck-like protein containing a caspase recruitment domain* (ASC) mit einer *caspase recruitment domain* (CARD) und einer *pyrin domain* (PYD) und eine inaktive Cysteinprotease Caspase-1 (pro-Caspase-1), die ebenfalls eine CARD besitzt. Das Sensorprotein ist ein intrazellulärer PRR, zumeist aus der Familie der NLRs. Es besteht aus einer zentralen *nucleotide-binding and oligomerization domain* (NACHT) sowie einer C-terminalen LRR-Domäne und einer N-terminalen CARD oder PYD (185). Die Sensorproteine der NLR-Familie sind nach ihrer Struktur benannt: NOD-, LRR- and PYD-containing (NLRP) 1, NLRP3, NLRP6, NLRP7, NLRP12 und NOD-, LRR- and CARD-containing (NLRC) 4, auch bekannt als *ice protease-activating factor* (IPAF) (126). Weiterhin sind als Sensorproteine auch AIM2 und *IFN γ -inducible protein 16* (IFI16) beschrieben (126).

Das am besten untersuchte Inflammasom ist das NLRP3-Inflammasom (15, 185). Es besitzt am N-terminalen Ende eine PYD. Im Rahmen der Inflammasombildung kann

NLRP3 somit nach Oligomerisierung das Adapterprotein ASC über eine PYD-PYD-Interaktion rekrutieren. Die Bindung der Caspase-1 erfolgt dann über eine CARD-CARD-Interaktion zwischen seiner Vorstufe pro-Caspase-1 und dem ASC. Durch proteolytische Autospaltung erfolgt die Aktivierung der Caspase-1 (15, 85, 131, 185). In Abb. 2 ist schematisch der Aufbau eines NLRP3-Inflammasoms dargestellt. Die aktive Caspase-1 prozessiert durch proteolytische Spaltung Zytokinvorläufermoleküle wie pro-IL-1 β , das zuvor wie unter 1.1.2 beschrieben über die TLR4-Signalkaskade induziert wurde. Aktives IL-1 β wird abgespalten und kann dann freigesetzt werden, um seine Wirkung im Organismus zu entfalten (Abb. 3) (15, 138, 185). Weitere Zytokine, die ähnlich dem IL-1 β Inflammasom-abhängig von der Caspase-1 aktiviert werden können, sind IL-18, IL-33 und IL-37 (45). Die Caspase-1 kann zudem Pyroptose, den programmierten Zelltod als Antwort auf Gefahrensignale, induzieren (17).

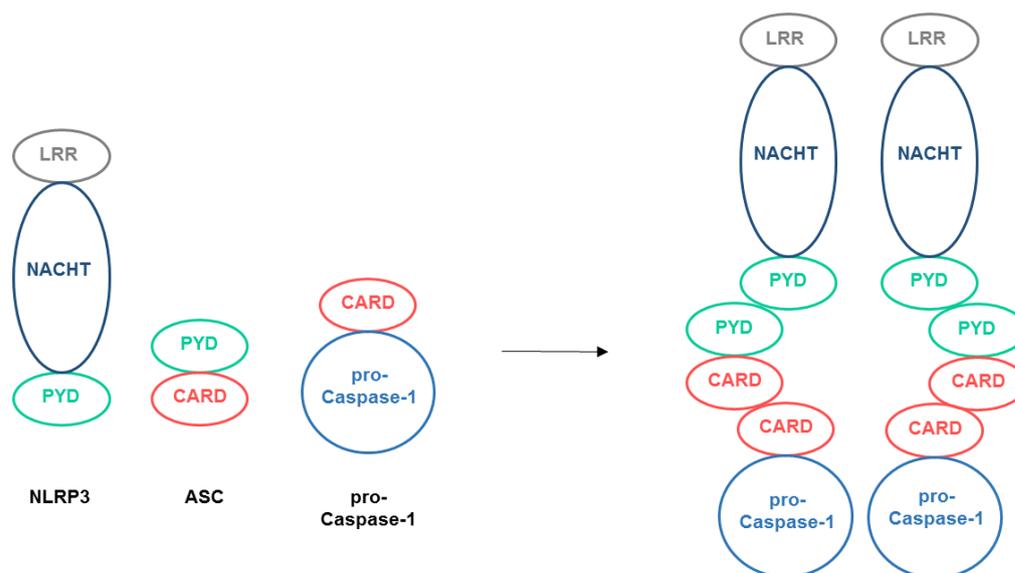


Abbildung 2: Schematische Darstellung eines Inflammasoms. Das Sensorprotein aus der Familie der *nucleotide-binding oligomerization domain* (NOD)-like-Rezeptoren besteht aus einer *nucleotide-binding and oligomerization domain* (NACHT)-Domäne, einer *leucine-rich repeats* (LRR)-Domäne und einer *pyrin domain* (PYD) und stellt das NOD-, LRR- and PYD-containing (NLRP) 3 dar. Das Adapterprotein *apoptosis-associated speck-like protein containing a caspase recruitment domain* (ASC) enthält eine PYD und eine *caspase recruitment domain* (CARD). Die pro-Caspase-1 enthält eine CARD. Bei Aktivierung bildet sich das Inflammasom. NLRP3 rekrutiert über PYD-PYD-Interaktion das ASC. Die inaktive pro-Caspase-1 wird über eine CARD-CARD-Interaktion mit dem ASC rekrutiert. Durch proteolytische Abspaltung wird dann die Caspase-1 aktiviert (siehe Abb. 3). (nach (15, 185))

Für das NLRP3-Inflammasom sind zahlreiche Stimuli bekannt, die die Formation des aktiven Inflammasoms induzieren (139). Eine Reihe der unter 1.1.1 erläuterten PAMPs wie beispielsweise Zellwandbestandteile und porenbildende Toxine verschiedener Pathogene (wie Streptolysin, Listerolysin, Nigericin) und DAMPs wie beispielsweise ATP, Harnsäurekristalle, Cholesterinkristalle, Nukleinsäuren, β -Amyloid, Siliziumdioxid oder Asbest können die NLRP3-Inflammasomformation stimulieren (15, 52, 54, 88, 90, 96, 101, 112, 136, 139, 164, 191). Die molekularen Mechanismen der Inflammasomformation und -aktivierung sind noch nicht umfassend aufgeklärt und werden teilweise kontrovers diskutiert. In der Literatur wird drei wesentlichen Prozessen eine Rolle zugeschrieben: 1. Kalium (K^+)-Ausstrom aus der Zelle, induziert durch Ionenkanalaktivierung oder porenbildende Toxine. 2. Lysosomaler Zerfall mit Cathepsin-B-abhängiger Prozessierung des lysosomalen Inhalts, physikalisch induziert durch Phagozytose kristalliner Stimuli. 3. Die Generierung reaktiver Sauerstoffspezies (*reactiveoxygen species*, ROS) durch eine Vielzahl verschiedener PAMPs und DAMPs (15, 52, 88, 101, 112, 151, 170, 185).

In dieser Arbeit wurden für die *in vitro*-Stimulierung der Inflammasombildung ATP und Nigericin verwendet (110, 136, 151). Bei Bindung von extrazellulärem ATP an den ionotropen Purinorezeptor P2X7 (P2X7R) findet eine Konformationsänderung des P2X7R statt, die zu einer Ionenkanalöffnung und unter anderem zu einem K^+ -Ausstrom führt (49, 110, 136). In der Literatur gibt es Hinweise, dass dieser Mechanismus durch einen PAMP-induzierten Ausstrom von intrazellulärem ATP über einen ATP-Kanal, Pannexin-1, autokrin verstärkt wird (139, 164). Nigericin ist ein Kaliumionophor, das ebenfalls einen K^+ -Ausstrom induziert (101, 136, 151, 164). Es gibt Hinweise, dass Nigericin zusätzlich einen lysosomalen Zerfall und die Inflammasomformation Cathepsin-B-abhängig induziert (95, 101). Weiterhin scheint Pannexin-1 neben seiner Bedeutung in der ATP-induzierten Inflammasomformation auch eine Rolle in der Nigericin-induzierten Inflammasomformation zu spielen (165).

1.1.4 Interleukin (IL)-1 β

IL-1 β ist ein potentes proinflammatorisches Zytokin des angeborenen Immunsystems. Es ist eins der elf Zytokine der IL-1-Familie, die alle an einem der zehn bekannten IL-1-Rezeptoren (IL-1R) binden (45). Hauptsächlich wird IL-1 β von Monozyten, Makrophagen und DCs produziert (48, 155). In kleinen Mengen können auch Lymphozyten und

Natürliche Killerzellen (*natural killer cells*, NKs) IL-1 β produzieren (155). Wie in 1.1.2 und 1.1.3 beschrieben, erfolgt die Synthese hauptsächlich als Immunantwort auf zwei verschiedene Stimuli. Durch einen ersten Stimulus wird die Transkription der Boten-Ribonukleinsäure (*messenger ribonucleic acid*, mRNA) und Synthese des inaktiven Vorläufermoleküls pro-IL-1 β induziert. Dies kann in Monozyten und Makrophagen durch LPS über die Aktivierung der TLR4-Signalkaskade ausgelöst werden (siehe 1.1.2). Durch einen zweiten Stimulus wird das Inflammasom gebildet und somit aktiviert. Das Inflammasom aktiviert die Caspase-1, die dann die Abspaltung der aktiven Form IL-1 β von seinem inaktiven Vorläufermolekül pro-IL-1 β katalysiert (siehe 1.1.3). Nachfolgend ist in Abb. 3 schematisch die Inflammasom-abhängige IL-1 β -Freisetzung dargestellt.

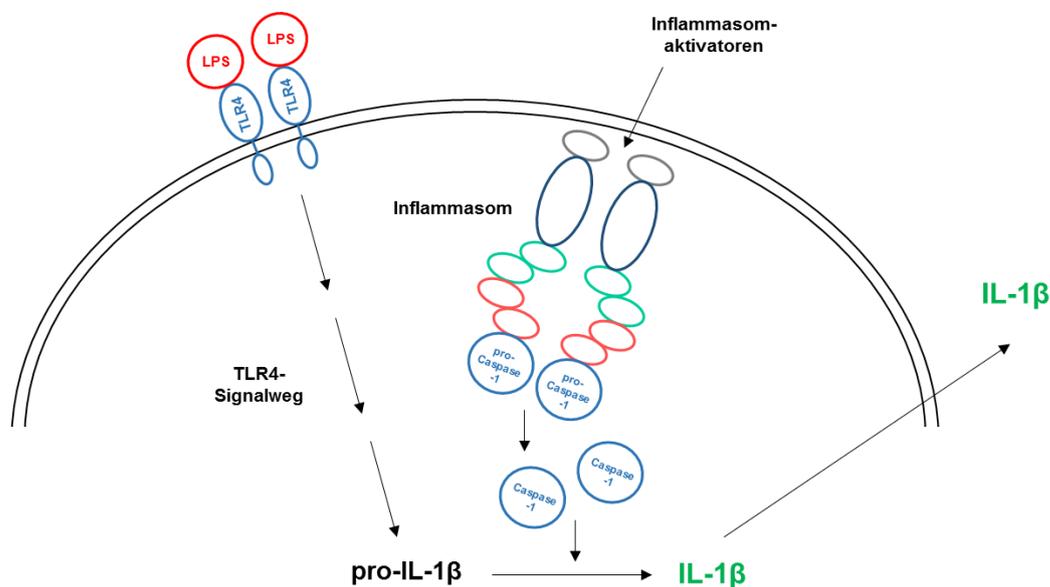


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Inflammasom-abhängigen Interleukin (IL)-1 β -Freisetzung. Durch einen ersten Stimulus wie Lipopolysaccharid (LPS) wird über den *Toll-like-Rezeptor* (TLR)4-Signalweg die Transkription des inaktiven Vorläufermoleküls pro-IL-1 β induziert. Durch einen zweiten Stimulus wird die Bildung des aktiven Inflammasoms aus seinen Komponenten induziert. Das Inflammasom aktiviert dann durch proteolytische Abspaltung von seinem Vorläufermolekül pro-Caspase-1 die Caspase-1. Die aktive Caspase-1 katalysiert die Abspaltung des IL-1 β von seinem inaktiven Vorläufermolekül pro-IL-1 β . IL-1 β kann dann aus der Zelle freigesetzt werden und seine Wirkung im Organismus entfalten. (nach (15, 93, 185))

Die Freisetzung des aktiven IL-1 β aus der Zelle kann über verschiedene Mechanismen erfolgen, unter anderem spielen lysosomale Calcium-abhängige Exozytose, aktiver Transport und programmierter Zelltod eine Rolle (8, 45, 53). Es soll hier angemerkt

werden, dass auch andere Zytokine sowie IL-1 β selbst seine Synthese induzieren können (36, 45, 47, 48). Weiterhin sind auch Caspase-1-unabhängige Prozessierungen des pro-IL-1 β bekannt, die vor allem extrazellulär über weitere Enzyme katalysiert werden (35, 45). Diese Mechanismen spielen jedoch zum Verständnis dieser Arbeit keine Rolle und werden daher nur der Vollständigkeit wegen erwähnt, aber nicht ausgeführt.

Als Komponente des angeborenen Immunsystems ist IL-1 β ein unspezifischer proinflammatorischer Mediator. Daher löst IL-1 β viele verschiedene Effekte aus und ist im Rahmen akuter und chronischer Erkrankungen in lokale und systemische Inflamationsreaktionen involviert (44, 48). IL-1 β vermittelt Immunantworten unter anderem über die Rekrutierung und Aktivierung von Immunzellen wie CD4⁺-T-Lymphozyten, B-Lymphozyten und NKs, die Differenzierung von T-Helferzellen oder die Ausreifung von DCs (43). Zudem kann IL-1 β inflammatorische Prozesse über eine vermehrte Synthese oder Stabilisierung proinflammatorisch wirkender Proteine, Proteine der Zellproliferation und Zelldifferenzierung und anderer Moleküle vermitteln (43). Hierzu gehören beispielsweise die Cyclooxygenase (COX)-2, Zelladhäsionsmoleküle wie *intercellular adhesion molecule 1* (ICAM-1), Wachstumsfaktoren wie *vascular endothelial growth factor* (VEGF) oder *Insulin-like growth factor* (IGF), verschiedene Chemokine und Zytokine wie TNF- α , IL-6, *granulocyte-colony stimulating factor* (G-CSF), Gerinnungsfaktoren wie Fibrinogen und andere Akute-Phase-Proteine wie das C-reaktive Protein (CRP), Komplementfaktor C3 oder Stickstoffmonoxid (NO) (43). Entsprechend der Liganden kann IL-1 β -vermittelt auch die Expression wesentlicher Oberflächenrezeptoren hoch- oder herunterreguliert werden (43). Mit einigen Proteinen wie IL-6 oder TNF- α wirkt IL-1 β synergistisch proinflammatorisch (43).

Die molekularbiologischen Effekte von IL-1 β führen neben lokalen Entzündungszeichen (Rötung (*rubor*), Schwellung (*tumor*), Schmerz (*dolor*), Überwärmung (*calor*), Funktionseinschränkung (*functio laesa*)) zu massiven systemischen Reaktionen wie Fieber, Hyperkoagulation, Hypotension bis hin zum Schock und Gewebeschäden (43, 44). Diese Symptome charakterisieren das klinische Bild verschiedenster akuter Geschehen, in die IL-1 β involviert ist: Zum Beispiel Ischämie-Reperfusionsschäden, akute Transplantatabstoßungsreaktionen, Schlaganfall, Myokardinfarkt und nachfolgendes Remodeling, akute Nierenschädigung, akutes Leberversagen oder Sepsis und Sepsis-induzierte Organdysfunktionen (1, 14, 22, 33, 46, 48, 75, 180, 214). In zahlreichen klinischen Studien konnte durch Hemmung der IL-1 β -Aktivität dessen Bedeutung für inflammatorische

Erkrankungen gezeigt werden (48). Inhibitoren des IL-1 β -Systems sind beispielsweise der humane rekombinante IL-1R-Antagonist Anakinra (Kineret[®]), humane monoklonale Antikörper wie Canakinumab (Ilaris[®]) oder das lösliche Protein Rilonacept (Arcalyst[®]; nicht in Deutschland zugelassen) (48). Damit konnte für IL-1 β auch eine Rolle bei einer Reihe von autoinflammatorischen Erkrankungen und chronischen Autoimmunerkrankungen gezeigt werden wie beispielsweise familiäres Mittelmeerfieber (FMF), Cryoporin-assoziierte periodische Syndrome (CAPS), das Schnitzler-Syndrom, das Still-Syndrom oder Rheumatoide Arthritis (24, 27, 29, 33, 38, 42, 48, 124, 161). Umgekehrt konnte durch Inhibition des IL-1 β -Systems dessen Rolle und damit eine inflammatorische Komponente in nicht-inflammatorisch-geglauten Erkrankungen wie Typ-II Diabetes mellitus, Gicht, dem multiplen Myelom oder kardiovaskulären Erkrankungen gezeigt werden (27, 48, 51, 127, 134, 143, 177, 225). Die Synthese, Freisetzung und Effekte von IL-1 β und potentielle Einflussfaktoren sind demnach hinsichtlich möglicher Therapieansätze von klinischer Bedeutung.

1.2 Cholinerge Aspekte des Immunsystems

1.2.1 Acetylcholin (ACh) und das cholinerge System – Ein Überblick

Acetylcholin (ACh) wurde als erster Neurotransmitter Anfang des 20. Jahrhunderts entdeckt und seither in dieser Funktion umfassend untersucht. ACh ist einer der häufigsten Neurotransmitter des zentralen Nervensystems (217). Im peripheren Nervensystem vermittelt ACh an der motorischen Endplatte die Erregungsweiterleitung auf die Muskeln. Im vegetativen Nervensystem kommt ACh als Neurotransmitter in parasympathischen sowie präganglionär auch in sympathischen Neuronen vor (62). Evolutionär betrachtet existierte ACh jedoch schon sehr lange vor seiner Entdeckung als Neurotransmitter, denn es wurde in verschiedenen Bakterien, Algen, Einzellern und Pflanzen nachgewiesen (100, 218). Andere Untersuchungen zeigten, dass ACh auch in vielen nicht-neuronalen Zellen und Geweben synthetisiert wird, das sogenannte non-neuronale ACh (115, 218). So konnte man non-neuronales ACh in Epithelzellen der Atemwege, der Haut oder des Urogenitaltraktes, in Endothelzellen, Mesothelzellen wie Pleura- und Perikardzellen, in Muskelzellen und in vielen Immunzellen wie Granulozyten, Lymphozyten und Monozyten/Makrophagen nachweisen (115, 218).

Die ACh-Synthese erfolgt neuronal und zumeist auch non-neuronal intrazellulär aus Cholin und Acetyl-CoenzymA (Acetyl-CoA), katalysiert durch das Schlüsselenzym Cholinacetyltransferase (ChAT) (16, 115, 123). In einigen non-neuronalen Strukturen wie Skelettmuskelfaserzellen und Urothelzellen wird ACh durch das Enzym Carnitinacetyltransferase (CarAT) synthetisiert (16, 115, 123, 129, 204). Während Acetyl-CoA als Stoffwechselprodukt intrazellulär vorhanden ist, muss Cholin zur ACh-Synthese erst aus dem Extrazellulärraum aufgenommen werden. Dies erfolgt in neuronalen Zellen mit Hilfe des hochaffinen Cholintransporters 1 (CHT1) (157). Dieser wird zwar auch von einigen non-neuronalen Zellen exprimiert, jedoch erfolgt die non-neuronale Cholinaufnahme oft unabhängig von CHT1 über *choline transporter-like proteins* (CTLs) und *organic cation transporters* (OCTs) (16, 123, 149, 202). Das synthetisierte ACh wird in neuronalen Zellen mittels dem *vesicular acetylcholine transporter* (VACHT) in Vesikeln gespeichert und über Exozytose freigesetzt (58, 206). In vielen non-neuronalen Zellen wird VACHT nicht exprimiert und ACh wird über OCTs oder das Protein Mediatophor direkt freigesetzt (16, 20, 102, 121, 123, 219). Der Abbau des freigesetzten ACh erfolgt innerhalb weniger Millisekunden durch die Acetylcholinesterase (AChE) (115). Frei werdendes Cholin steht dann wieder der ACh-Synthese zur Verfügung.

Der ACh-Effekt wird über muskarinische (mAChRs) und nikotinische ACh-Rezeptoren (nAChRs) vermittelt. mAChRs sind G-Protein-gekoppelte Rezeptoren. Bisher konnten fünf mAChR-Subtypen (M1-M5) identifiziert werden (116). M1, M3 und M5 sind $G_{q/11}$ -gekoppelte erregende Rezeptoren und führen über Aktivierung der Phospholipase-C zu einem intrazellulären Anstieg der Calciumkonzentration (116). M2 und M4 sind $G_{i/9}$ -gekoppelte inhibitorische Rezeptoren und führen über eine Hemmung der Adenylylcyclase zu einer verminderten Synthese des zyklischen Adenosinmonophosphates (116). nAChRs sind klassischerweise ligandengesteuerte Ionenkanäle, die als Homo- oder Heteropentamere aus fünf Untereinheiten gebildet werden (116). Bisher konnten zehn α -Untereinheiten ($\alpha 1$ - $\alpha 10$), vier β -Untereinheiten ($\beta 1$ - $\beta 4$) und außerdem γ -, δ - und ϵ -Untereinheiten identifiziert werden (67). Die $\alpha 7$ - und $\alpha 9$ -Untereinheiten können Homopentamere bilden (16, 116). Die $\alpha 9/\alpha 10$ -Untereinheiten können im Komplex vorliegen und reine α -Heteropentamere bilden (16, 63, 116, 190). Bei Aktivierung der nAChRs erfolgt durch eine schnelle Erhöhung der Membranpermeabilität für Natrium, Kalium und Calcium eine Membrandepolarisation. Bei $\alpha 9/\alpha 10$ -nAChR kommt es zu einer raschen Desensibilisierung. Neben ihrem neuronalen und muskulären Vorkommen konnte die

Expression von mAChRs und nAChRs auch in non-neuronalen Zellen und Organen nachgewiesen werden (80). Untersuchungen von Lymphozyten und anderen mononukleären Zellen des peripheren Blutes (*peripheral blood mononuclear cells*, PBMCs) zeigten, dass Immunzellen sowohl mAChRs als auch nAChRs exprimieren können (114, 115, 116, 182). Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass von Immunzellen exprimierte nAChsR nicht in jedem Fall klassische ligandengesteuerte Ionenkanäle sind, sondern metabotrop funktionieren und intrazelluläre Signalkaskaden induzieren können (94, 150, 166, 171).

Für diese Arbeit relevant sind bestimmte non-neuronale cholinerge Komponenten und ihre Bedeutung für das Immunsystem. In den folgenden Kapiteln werden die wichtigsten Aspekte zum Verständnis dieser Arbeit dargestellt.

1.2.2 Der „cholinerge antiinflammatorische Reflex“

Ein Meilenstein in der Erforschung der Effekte von ACh auf das Immunsystem und der Interaktion von Immun- und Nervensystem stellt der „cholinerge antiinflammatorische Reflex“ dar (21, 163, 201). Im experimentellen Modell der Sepsis in der Ratte führte die elektrische Stimulation des efferenten Teils des parasympathischen Nervus vagus zu verminderten TNF- α -Spiegeln und einem besseren Überleben im Vergleich zu septischen Ratten ohne Vagusstimulation (21). *In vitro* konnte an LPS-geprimeten humanen Makrophagen eine verminderte Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine in Anwesenheit von ACh gezeigt werden (21).

Für diesen antiinflammatorischen ACh-Effekt wurde der $\alpha 7$ -nAChR durch seine Blockade an Makrophagen *in vitro* und an $\alpha 7$ -defizienten Mäusen *in vivo* identifiziert (212). Dieser „cholinerge antiinflammatorische Reflex“ wurde als autoregulatorischer Mechanismus postuliert, bei dem durch eine IL-1-vermittelte immunologische Reaktion über IL-1R auf Neuronen des Nervus vagus eine vagale ACh-Ausschüttung induziert wird (163, 201). Durch antiinflammatorische ACh-Effekte auf Makrophagen soll dann die Immunreaktion kontrolliert werden (163, 201). Da eine vagale Innervation der Milz nicht besteht, wurde der „cholinerge antiinflammatorische Reflex“ in nachfolgenden Publikationen mit einer indirekten Vermittlung auf Makrophagen in der Milz erklärt: Über Verschaltung präganglionärer vagaler Neurone mit postganglionären sympathischen Neuronen des Nervus splenicus, die katecholaminerg T-Lymphozyten der Milz zur ACh-

Produktion stimulieren (158, 179). Das produzierte ACh kann dann antiinflammatorisch auf Makrophagen in der Milz wirken (158, 179).

Andere Publikationen zeigten jedoch, dass es keine anatomische oder physiologische Verschaltung vagaler efferenter Neurone mit sympathischen Neuronen des Nervus splenicus gibt (23). Weiterhin erfolgt der Abbau des ACh wie unter 1.2.1 dargestellt innerhalb weniger Millisekunden über die AChE. Die AChE ist ubiquitär in neuronalen und non-neuronalen Organen vorhanden (80, 115). Es bleibt somit zu hinterfragen, ob ACh lang-zeitig genug ist, um vor seinem Abbau *in vivo* diese Wirkung entfalten zu können. Die gezeigten Effekte des „cholinergen antiinflammatorischen Reflexes“ sind nicht von der Hand zu weisen, dennoch wird der zugrundeliegende Mechanismus kontrovers diskutiert und ist weiterhin Gegenstand der Forschung.

1.2.3 Effekte von non-neuronalem ACh auf das Immunsystem

Non-neuronales ACh und Teile des cholinergen Systems konnten schon vor Entdeckung des „cholinergen antiinflammatorischen Reflexes“ in Immunzellen nachgewiesen werden (114). Als Quelle des ACh konnte man PBMCs und unter ihnen insbesondere die Lymphozyten identifizieren (69, 114, 156). In Lymphozyten konnte ChAT- und CarAT-Aktivität nachgewiesen werden, wobei vor allem die ChAT-Aktivität bei der ACh-Synthese in Lymphozyten eine Rolle spielt. Zudem exprimieren Lymphozyten mAChRs und nAChRs auf der Zelloberfläche (68, 69, 182). Die ChAT-Expression und die ACh-Synthese sind in aktivierten Lymphozyten hochreguliert (70, 116). Das mAChR-Expressionsmuster auf der Zelloberfläche von Lymphozyten variiert ebenfalls mit dem Aktivierungsstatus der Zelle (116, 169). So konnte bei allergischen Atemwegserkrankungen eine verstärkte Expression bestimmter mAChRs gezeigt werden (32, 172, 173). Bei der Alzheimer-Erkrankung konnte eine Korrelation zwischen der kognitiven Beeinträchtigung und dem Expressionsmuster der mAChRs auf Lymphozyten identifiziert werden (199). Für die Aktivierung von mAChRs sind vorwiegend proinflammatorische Effekte beschrieben (16, 116): Beispielsweise vermitteln M1 und M5 mAChRs die Synthese proinflammatorischer Zytokine wie TNF- α , INF- γ und IL-6, die Aktivierung von M1, M3 und M5 mAChRs durch ACh induziert über einen intrazellulären Calciumanstieg Signalkaskaden zur Hochregulierung bestimmter Genexpressionen und die Aktivierung von M1 mAChRs spielt eine Rolle bei der Lymphozytendifferenzierung (67, 71, 116, 229).

In Monozyten und Makrophagen konnte ebenfalls ACh und als Hinweis auf intrazelluläre ACh-Synthese auch ChAT-Aktivität nachgewiesen werden, sowie mAChRs und nAChRs auf ihrer Zelloberfläche (67, 120, 216, 218). Dies konnte eindrücklich durch Hecker et al. *in vivo* bestätigt werden, indem die Expression von endogenem ACh, sowie CHT1, ChAT-mRNA und ChAT-Protein in intravasalen mononukleären Leukozyten aus allogenen transplantierten Rattennieren gezeigt wurde (94). Rund 70 % dieser intravasalen Leukozyten konnten immunhistochemisch und per Durchflusszytometrie als Monozyten identifiziert werden (81, 94). ACh und der ACh-Syntheseapparat waren unter massiver immunologischer Aktivierung während der akuten Transplantatabstoßungsreaktion hochreguliert (94). Weiterhin zeigten die Autoren, dass ein ATP-induzierter intrazellulärer Anstieg der Calciumkonzentration in intravasalen mononukleären Leukozyten aus allogenen transplantierten Rattennieren *in vitro* durch den nAChR-Antagonisten Methyllycaonitin, der spezifisch an den $\alpha 7$ - und $\alpha 9/\alpha 10$ -Untereinheiten der nAChRs bindet, signifikant verstärkt wird (94). Dies führte zu der Hypothese, dass während einer inflammatorischen Aktivierung wie der akuten Transplantatabstoßungsreaktion endogen synthetisiertes ACh einen inhibitorischen Effekt auf durch DAMPs wie ATP vermittelte proinflammatorische Signale haben könnte. Diese Hypothese wurde nachfolgend durch Arbeiten von Mikulski et al. weiter bekräftigt, was in Kapitel 1.2.4 erläutert wird (150). Für neuronale Zellen gibt es zudem Hinweise auf Interaktionen zwischen ATP-Rezeptoren und nAChRs (94, 118, 188). Dieser Mechanismus könnte eine auto- und/oder parakrine Regulation zur Vermeidung einer überschießenden Immunreaktion sein (94). Wie unter 1.2.2 aufgeführt, wurden schon nAChR-vermittelte antiinflammatorische Effekte beschrieben, vor allem für den $\alpha 7$ -nAChR (21, 163, 201, 212). Hecker et al. konnten den $\alpha 7$ -nAChR in den intravasalen mononukleären Leukozyten aus allogenen transplantierten Rattennieren auf mRNA-Ebene *in vivo* nicht nachweisen, was jedoch an der möglicherweise zu geringen Sensitivität des Nachweises liegen könnte (94).

Mit der Idee, antiinflammatorische ACh-Effekte über eine Erhöhung der ACh-Konzentration gezielt zu erreichen, wurde in verschiedenen experimentellen und klinischen Ansätzen die Wirkung von AChE-Inhibitoren untersucht (97, 158, 162, 168, 207). Beispielsweise konnten Physostigmin und Neostigmin im murinen Sepsismodell die Konzentration der proinflammatorischen Zytokine TNF- α , IL-6 und IL-1 β sowie die pulmonale Einwanderung neutrophiler Granulozyten reduzieren (97). Da die therapeutische Breite dieser Medikation sehr schmal ist und die Mechanismen noch nicht genau geklärt sind,

konnten sich diese Ansätze zwar zur Therapie der Alzheimer-Erkrankung, nicht jedoch zur Therapie akuter Inflammationsreaktionen wie beispielsweise der Sepsis durchsetzen.

1.2.4 Effekte anderer Liganden nikotinischer ACh-Rezeptoren (nAChRs) und strukturverwandter Moleküle auf das Immunsystem

Antiinflammatorische nAChR-vermittelte Effekte konnten in experimentellen und klinischen Ansätzen auch für andere nAChR-Agonisten gezeigt werden. Schon lange bekannt sind die antiinflammatorischen Effekte des exogenen und den nAChR benennenden Liganden Nikotin (*nicotine*, Nic). Trotz der gesundheitsschädigenden Wirkung, konnte bei immunologischen Erkrankungen wie beispielsweise Colitis ulcerosa oder Rheumatoider Arthritis ein protektiver Effekt des Nic gezeigt werden (64, 74, 87, 107, 133, 200). Im tierexperimentellen Modell des akuten Lungenversagens an Mäusen und Ratten zeigte Nic klinisch und molekularbiologisch antiinflammatorische Effekte (192). Die vollständigen Mechanismen sind noch nicht aufgeklärt. In verschiedenen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass Nic einen hemmenden Effekt auf die Produktion proinflammatorischer Zytokine wie beispielsweise TNF- α , IL-1 β , IL-2, IL-12 oder IL-6 sowie Prostaglandin E₂ und Mechanismen der Zellproliferation hat (5, 141, 197, 209, 212, 222). In humanen PBMCs konnte außerdem eine Herunterregulierung der Expression von CD14 und TLR4 gezeigt werden, die wie unter 1.1.2 beschrieben zur LPS-Bindung notwendig sind (89). Es konnte gezeigt werden, dass die Nic-induzierte Hemmung proinflammatorischer Gentranskription mit einer verminderten Aktivität des Transkriptionsfaktors NF- κ B einhergeht (222). Viele Autoren postulieren die Vermittlung antiinflammatorischer Nic-Effekte genau wie antiinflammatorische ACh-Effekte über den α 7-nAChR (64, 89, 192, 212, 222). In anderen Arbeiten konnte der antiinflammatorische Nic-Effekt jedoch auch α 7-nAChR-unabhängig gezeigt werden (141). Mikulski et al. konnten *in vitro* zeigen, dass Nic einen ATP-induzierten intrazellulären Anstieg der Calciumkonzentration in Alveolarmakrophagen der Ratte reduzierte. Dies wurde als Hinweis auf antiinflammatorische Effekte des Nic auf das Gefahrensignal ATP diskutiert, die über eine metabotrope nAChR-Funktion vermittelt werden. ACh oder Nic allein hatten keinen Effekt auf die intrazelluläre Calciumkonzentration, was gegen eine klassische ionotrope Rezeptorfunktion sprach (150). Die Autoren konnten in diesen Alveolarmakrophagen den α 7-nAChR nicht nachweisen, dafür aber α 9/ α 10-nAChR (150).

Neben ACh ist auch der ACh-Baustein Cholin (Cho) ein nAChR-Ligand. Cho konnte als Agonist der nAChR-Untereinheiten $\alpha 7$ und $\alpha 9/10$ identifiziert werden (7, 160, 167, 210). Für Cho wurden in älteren Arbeiten antiinflammatorische Effekte im tierexperimentellen Modell der Endotoxämie postuliert (178). Als Baustein ist Cho nicht nur Bestandteil des ACh, sondern auch des Phosphocholins (PC) (synonym verwendet wird auch Phosphorylcholin) (224). PC ist Bestandteil vieler Strukturen und wird beispielsweise zur Synthese von Phosphatidylcholinen benötigt, die einen wichtigen Teil von Zellmembranen darstellen (224). Viele Bakterien und Parasiten synthetisieren PC-modifizierte Moleküle als Virulenzfaktoren, die sie zur Immunevasion nutzen (34, 79). Die Einwanderung von Bakterien wie *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* oder verschiedener *Neisseria*-Stämme erfolgt beispielsweise durch molekulare Mimikry mittels auf ihrer Oberfläche exprimierter PC-modifizierter Moleküle (34). *Haemophilus influenzae*-Stämme synthetisieren mit Hilfe des *lic*-Operons PC-modifiziertes LPS (187, 215), was in dieser Arbeit für *in vitro*-Stimulationsexperimente verwendet wurde. Zum Überleben im Wirt kann dessen Immunantwort außerdem durch sezernierte PC-modifizierte Moleküle, wie beispielsweise das Protein ES-62 aus Parasiten wie *Acanthocheilonema viteae*, abgeschwächt oder unterdrückt werden (34, 77, 92). ES-62 wirkt antiinflammatorisch im Wirt über Mechanismen wie eine verminderte Produktion von IL-12 und TNF- α (34, 77, 78). Für diese Effekte der PC-modifizierten Moleküle wurden eine Beteiligung des *platelet-activating factor receptor* (PAFR) und des TLR4 gezeigt, die genauen Mechanismen sind jedoch noch nicht vollständig aufgeklärt (34, 37, 77, 78, 83, 189, 195). Interessanterweise konnten für das parasitäre Molekül ES-62 antiinflammatorische Effekte in Rheumatoider Arthritis gezeigt werden (91). Die Autoren diskutieren dies als Begründung für die Beobachtung, dass in Ländern mit endemischem Auftreten parasitären Befalls, weniger autoinflammatorische Erkrankungen auftreten (91).

1.3 Ziele der Arbeit

In vivo produzieren intravasale mononukleäre Leukozyten aus allogenen transplantierten Rattennieren während ihrer immunologischen Aktivierung bei der akuten Transplantatabstoßungsreaktion ACh. Rund 70 % dieser intravasalen mononukleären Leukozyten sind Monozyten. *In vitro* verstärkte der nAChR-Antagonist Methyllycaconitin einen ATP-induzierten intrazellulären Anstieg der Calciumkonzentration dieser intravasalen mononukleären Leukozyten aus allogenen transplantierten Rattennieren. Dies erlaubt den

Rückschluss, dass endogen produziertes ACh intravasaler mononukleärer Leukozyten aus allogenen transplantierten Rattennieren einen autokrinen inhibitorischen nAChR-vermittelten Effekt auf ATP-induzierte Signale hat, der durch einen nAChR-Antagonisten aufhebbar ist. Für ACh, seinen Baustein Cho sowie den nAChR-Liganden Nic wurden bereits antiinflammatorische Effekte in verschiedenen klinischen Kontexten beschrieben. Cho ist weiterhin auch ein Baustein des PC. Für PC-modifizierte Moleküle wurden ebenfalls antiinflammatorische Effekte beschrieben, die Bakterien und Parasiten zur Immunevasion nutzen. ATP ist ein DAMP, was über einen bekannten Mechanismus die Bildung des Inflammasoms und folglich die Synthese proinflammatorischer Zytokine wie IL-1 β induzieren kann. In Neuronen gibt es Hinweise für Interaktionen zwischen ATP-Rezeptoren und nAChR. Es stellt sich in der Zusammenschau all dieser Aspekte die Frage, ob und wie ACh aus Monozyten parakrine und autokrine inhibitorische Effekte auf ATP-induzierte proinflammatorische Signale auslöst.

In dieser Arbeit sollen folgende Hypothesen überprüft werden:

- 1) Die nAChR-Agonisten ACh, Nic und Cho hemmen die ATP-induzierte IL-1 β -Freisetzung aus Monozyten.
- 2) Bakterielle PC-modifizierte Moleküle hemmen die ATP-induzierte IL-1 β -Freisetzung aus Monozyten. Dieser Effekt wird durch PC über nAChR vermittelt.
- 3) Endogenes ACh aus intravasalen mononukleären Leukozyten, die aus allogenen transplantierten Rattennieren isoliert werden können, hemmt autokrin die ATP-induzierte IL-1 β -Freisetzung.

Nachfolgend ist in Abb. 4 schematisch die Fragestellung dieser Arbeit veranschaulicht.

Zur Überprüfung dieser Hypothesen soll *in vitro* an Monozyten der Effekt der nAChR-Agonisten ACh, Nic und Cho sowie der Effekt von PC und PC-modifizierten Molekülen auf die ATP-induzierte IL-1 β -Freisetzung untersucht werden. Dies soll auch an einer ATP-unabhängigen IL-1 β -Freisetzung, die mit Nigericin induziert wird, überprüft werden. Zur Überprüfung, ob ein möglicher Effekt über nAChRs vermittelt wird, sollen spezifische nAChR-Antagonisten eingesetzt und Transfektionsversuche mit *small interfering RNA* (siRNA) zur Identifizierung bestimmter Rezeptoruntereinheiten durchgeführt werden. Der Effekt von endogenem ACh aus intravasalen mononukleären Leukozyten aus allogenen transplantierten Rattennieren auf die ATP-induzierte IL-1 β -Freisetzung soll mit Hilfe von AChE detektiert werden.

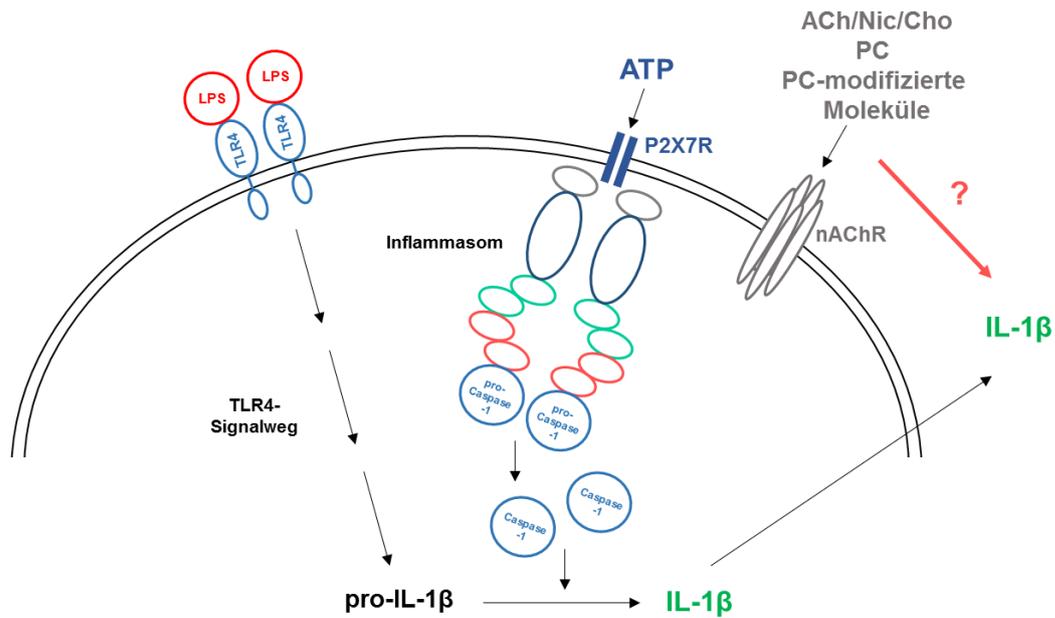


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Fragestellung dieser Arbeit. Über Lipopolysaccharid (LPS) soll der *Toll-like* Rezeptor (TLR)4-Signalweg induziert werden, der die Transkription des inaktiven Vorläufermoleküls pro-Interleukin (IL)-1β induziert. Über den P2X7-Rezeptor (P2X7R) soll durch den zweiten Stimulus Adenosintriphosphat (ATP) die Bildung des Inflammasoms induziert werden. Das aktive Inflammasom kann von dem inaktiven Vorläufermolekül pro-Caspase-1 proteolytisch die aktive Caspase-1 abspalten. Die Caspase-1 katalysiert die Abspaltung des aktiven IL-1β von seinem inaktiven Vorläufermolekül pro-IL-1β. Der Einfluss der Agonisten nikotinischer Acetylcholinrezeptoren (nAChRs) Acetylcholin (ACh), Nikotin (Nic) und Cholin (Cho) sowie außerdem Phosphocholin (PC) und PC-modifizierter Moleküle auf die ATP-induzierte IL-1β-Freisetzung soll überprüft werden. (nach (15, 93, 185))

2 Material

2.1 Reagenzien

2'(3')-O-(4-Benzoylbenzoyl)adenosin 5'-triphosphat, 2'(3')-O-(4-Benzoylbenzoyl)adenosine 5'-triphosphate triethylammonium salt (BzATP) (Sigma-Aldrich, Steinheim; B6396)

α -Bungarotoxin (Tocris Bioscience, Bristol, UK; 2133)

Acetylcholine chloride (Sigma-Aldrich; A6625)

Acetylcholinesterase (from *Electrophorus electricus*) (Sigma-Aldrich; C2888)

Aqua ad injectabilia (Baxter, Lessines, USA; 001428)

Bovines Serumalbumin (BSA), *Albumin bovine fraction V* (Serva, Heidelberg; 11930)

Choline chloride (Sigma-Aldrich; C7017)

Deionisiertes Wasser

Dynabeads[®] CD14 (Invitrogen, Carlsbad, USA; 11149D)

Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) (Serva; 11280)

Fetal calf serum gold (FCS gold) (PAA Laboratories, Cölbe; A15-151)

FITC anti-human CD14 antibody M5E2 (BioLegend, San Diego, USA; 301803)

GelRed[®] (Biotium, Hayward, USA; 41001-41003-T)

GeneRuler[™] 100 bp DNA Ladder Plus (Fermentas, Sankt Leon-Rot; SM0321)

HCl, Salzsäure (Merck, Darmstadt; 1090571000)

KCl, Kaliumchlorid (Merck; 1049360250)

KH₂PO₄, Kaliumdihydrogenphosphat (Merck; 1048730250)

L-Alanyl-L-Glutamin (200 mM) (PAA Laboratories; M11-006)

Lipopolysaccharide (LPS) from *Escherichia coli* (Sigma-Aldrich; L2654)

Loading Dye Solution (6x TriTrack[™]) (Fermentas; R1161)

Mecamylamine hydrochloride (Sigma-Aldrich; M9020)

M-MLV Reverse Transcriptase (Promega, Madison, USA; M170A)

M-MLV RT 5 x buffer (Promega; M531A)

NaCl, Kochsalz (Sigma-Aldrich; 31434-M)

NaH₂PO₄*2H₂O, Natriumdihydrogenphosphat-Dihydrat (Merck; 1063451000)

NaOH, Natriumhydroxid (Merck; 1091371000)

Nicotine hydrogen tartrate salt (Sigma-Aldrich; N5260)

Nigericin (Sigma-Aldrich; N7143)

ON-TARGETplus human CHRNA7, CHRNA9, CHRNA10 siRNA SMARTpool (Thermo Fisher Scientific, Schwerte)

ON-TARGETplus Non-Targeting Control Pool (Thermo Fisher Scientific)

PCR Nucleotide Mix (dNTP) (Promega; C114G)

Penicillin/Streptomycin 100 x (PAA Laboratories; P11-010)

Percoll™ (GE Healthcare Bio Science, Uppsala, Schweden; 17-0891-01)

Phosphate buffered saline (PBS) (PAA Laboratories; H15-002)

Phosphocholine chloride calcium salt tetrahydrate (Sigma-Aldrich; P0378)

Platinum® SYBR® Green qPCR SuperMix-UDG (Invitrogen; 11733-038)

Primer (Tabelle 8) (MWG Biotech, Ebersberg)

Random Primers (Promega; C118A)

Recombinant RNasin® Ribonuclease Inhibitor (Promega; N251A)

RNase-freies Wasser (Qiagen, Hilden; 1017979)

Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 Medium (PAA Laboratories; E-15-039)

Strychnine hydrochloride (Sigma-Aldrich; S8753)

Trypan blue solution 0,4 % (Sigma-Aldrich; T8154)

Türks Lösung (Merck; HX954438)

2.2 Puffer und Lösungen

Tabelle 1: Verwendete Puffer und Lösungen und ihre Zusammensetzung.

Puffer/Lösung	Zusammensetzung
<i>Phosphate buffered saline</i> (PBS) Gebrauchslösung (1 x PBS)	PBS-Stammlösung 1:10 mit deionisiertem Wasser verdünnt und den pH auf 7,2 eingestellt (mit 1 N HCl).
PBS Stammlösung (10 x PBS)	80 g NaCl (1,37 M), 2 g KCl (27 mM), 14,24 g Na ₂ HPO ₄ *2 H ₂ O (80 mM) und 2 g KH ₂ PO ₄ (15 mM) in 1 l deionisiertem Wasser gelöst und den pH auf 7,2 eingestellt (mit 1 N HCl).
Percolllösung	Pro Gradient (14 ml): Mischung aus 4,4 ml deionisiertem Wasser, 1,4 ml NaCl (0,9 %), 8,2 ml Percoll™ und 30 µl HCl (1 M).

2.3 Kits

CytoTox 96® *Non-Radioactive Cytotoxicity Assay* (Promega; G1780)

PCR Purification Kit, MinElute (Qiagen; 28004)

Quantikine® *ELISA Human IL-1β/IL-1F2 Immunoassay* (R&D Sytems, Minneapolis, USA; DLB50)

Quantikine® *ELISA Rat IL-1β/IL-1F2 Immunoassay* (R&D Sytems; RLB00)

RNeasy® *Mini Kit* (Qiagen; 74104)

2.4 Geräte und Verbrauchsmaterial

24-Well-Platten *CellStar*™ (Greiner Bio-One, Frickenhausen; 662160)

96-Well Mikrotiterplatten, flacher Boden (Greiner Bio-One; 655101)

ABI 7700 Sequence Detection System (Applied Biosystems, Foster City, USA)

FACSCalibur (Becton Dickinson, Heidelberg)

Inkubator Heracell™ 240i, *CO₂-Incubator* (Thermo Scientific, Waltham, USA)

Laborwaage (Kern und Sohn, Balingen-Frommern)

LeucoSep™ Röhren (Greiner Bio-One; 227288)

Mikroskop Laborlux D (Leitz, Wetzlar)

Mikroskop Laborvert BX511F (Leitz)

Mikrowelle (LG Electronics, Seoul, Südkorea)

Multipette® (Eppendorf, Hamburg)

Neubauer-Zählkammer Improved (LO - Laboroptik, Lancing, England)

Parafilm M Verschlussfolie (Brand, Wertheim)

pH-Meter *UltraBasic* UB-10 (Denver Instrument, Göttingen)

Pipette Research 0,5-10 µl (Eppendorf)

Pipetten Reference 100-1000 µl, 10-100 µl, 0,5-10 µl (Eppendorf)

Pipettenspitzen 1000 µl, 200 µl, 10 µl (Sarstedt, Nümbrecht, Germany; 70.762; 70.760.002; 70.1115),

Pipettenspitzen *Combitips advanced* 5 ml (Eppendorf Biopur®, Hamburg; 003 008 9669)

Pipettenspitzen SafeSealTips 1000 µl, 100 µl, 10 µl (Biozym)

Pipetus (Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt)

Reaktionsgefäße 1,5 ml *Multi® SafeSeal® Tubes* (Roth; 7080.1)

Real-Time PCR Cycler *StepOne Plus™* (Applied Biosystems)

Röhren 50 ml; 15 ml *CellStar®* (Greiner Bio-One; 227270; 188271)

Serologische Pipetten, 10 ml *CellStar®* (Greiner Bio-One; 607180)

Sicherheitswerkbank (NuAire, Plymouth, USA)

Spektralphotometer Epoch (BioTek, Bad Friedrichshall)

Spektralphotometer FLUOStar OPTIMA (BMG Labtechnologies, Ortenberg)

Spektralphotometer NanoDrop™ 1000 (Thermo Fisher Scientific)

Thermal Cycler, G-Storm™ (AlphaMetrix Biotech, Rödermark; GS482)

Vortex Mixer Reax 2000 (Heidolph, Schwabach)

Zellkulturflaschen T-75 für Suspensionszellen (Sarstedt; 83.1813.502)

Zentrifugen Mikro 200 R und Rotina 420 R (Hettich, Tuttlingen)

2.5 Software

AlphaEase FC™ 3.3.0 (Alpha Innotech, San Leandro, USA)

Excel (Microsoft, Redmond, USA)

SPSS (IBM, Armonk, USA)

3 Methoden

Alle Arbeiten mit Zellen wurden unter einer Sterilwerkbank mit sterilen Labormaterialien durchgeführt. Verwendete Kulturmedien und Lösungen wurden vor Gebrauch auf 37 °C erwärmt. Soweit nicht anders angegeben, erfolgten alle Arbeitsschritte bei Raumtemperatur (RT).

3.1 U937-Zellen

3.1.1 Kultivierung von U937-Zellen

Die humane Zelllinie U937 wurde über das Leibniz-Institut DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH bezogen. Es handelt sich um Suspensionszellen aus einem generalisierten histiozytären Lymphom eines 37-jährigen männlichen Patienten. Für die U937-Zellen sind monozytäre Eigenschaften und Marker beschrieben (193). Die Kultivierung der U937-Zellen erfolgte in RPMI 1640-Medium mit 10 % fötalem Kälberserum (*fetal calf serum*, FCS), 2 mM L-Glutamin, 100 U/ml Penicillin und 0,1 mM Streptomycin versetzt. Das FCS wurde vor Gebrauch hitzeinaktiviert und sterilfiltriert. Die Kultivierung erfolgte im Brutschrank bei 37 °C, 5 % CO₂. Die Zellen wurden in sterilen 50 ml-Zellkulturflaschen für Suspensionszellen (75 cm²) mit Filter kultiviert. Dreimal pro Woche wurden die Zellen passagiert und auf eine Zellzahl von 2 x 10⁶ Zellen/50 ml eingestellt. Die Bestimmung der Zellzahl und regelmäßige Prüfung der Zellviabilität erfolgte mikroskopisch in der Neubauer-Zählkammer mit Trypanblau 0,4 %.

3.1.2 Experimente mit U937-Zellen

Zur Versuchsdurchführung wurden die Zellen in ihrer exponentiellen Wachstumsphase (log-Phase) in 24-Well-Patten mit planem Boden ausgesät. Pro Well wurden 1 x 10⁶ Zellen/ml RPMI 1640-Medium ausplattiert. Die Zellen wurden mit 1 µg/ml LPS aus *Escherichia coli* primär stimuliert (*Priming*) und für fünf Stunden (*hours*, h) bei 37 °C, 5 % CO₂ inkubiert. Anschließend wurde als sekundärer Stimulus entweder 100 µM 2'-(3'-O-(4-Benzoylbenzoyl)adenosin 5'-triphosphat (BzATP), ein P2X7R-Agonist und ATP-Analogon, oder alternativ 50 µM Nigericin hinzugegeben und für 30 Minuten (min) bei 37 °C, 5 % CO₂ inkubiert. Dies erfolgte in An- oder Abwesenheit verschiedener nAChR-

Agonisten und nAChR-Antagonisten, die zeitgleich zugegeben wurden. Verwendete nAChR-Agonisten waren Nic, ACh (*acetylcholine chloride*) und Cho (*choline chloride*). Außerdem wurden PC (*phosphocholine chloride calcium salt tetrahydrate*) und PC-modifizierte Makromoleküle eingesetzt. PC-modifiziertes bovines Serumalbumin (PC-BSA) wurde nach einem Standardprotokoll (12) freundlicherweise von Prof. Günther Lochnit, Gießen, produziert und zur Verfügung gestellt. In Kontrollansätzen wurden nicht-modifiziertes BSA sowie mit Fluorwasserstoffsäure-behandeltes PC-BSA (*hydrofluoric acid*, HF-PC-BSA), bei dem die PC-Moleküle durch Behandlung mit Fluorwasserstoffsäure wieder entfernt wurden, als Negativkontrollen eingesetzt. PC-modifiziertes Lipooligosaccharid (LOS) wurde aus den bakteriellen *Haemophilus influenzae*-Stämmen RM118 (RMPC) und NTHi1233 (NTHiPC) aufbereitet. In Kontrollansätzen wurde nicht-modifiziertes LOS dieser Stämme als Negativkontrolle eingesetzt (NTHi, LOS des *lic1*-mutanten Stammes NTHi1233*lic1*; RM, LOS des *lic1*-mutanten Stammes RM7004-Lic1). Die Aufbereitung erfolgte nach einem bereits veröffentlichten Protokoll (186) und wurde freundlicherweise von Frau Prof. Dr. Elke Schweda von der Linköping Universität, Linköping, Schweden, durchgeführt und uns das LOS zur Verfügung gestellt. Verwendete nAChR-Antagonisten waren Mecamylamin (*Mecamylamine hydrochloride*; Mec), α -Bungarotoxin (α -Bun) und Strychnin (*Strychnine hydrochloride*; Stry). Soweit nicht anders angegeben, wurden die Stimulanzien in den in Tabelle (Tab.) 2 aufgeführten Konzentrationen eingesetzt. Als Kontrollansätze wurden unbehandelte Zellen, mit LPS stimulierte Zellen und mit LPS und BzATP stimulierte Zellen mitgeführt.

Tabelle 2: Verwendete Konzentrationen von Liganden nikotinischer Acetylcholinrezeptoren und Substanzen mit Phosphocholingruppe.

nAChR Agonisten		PC und PC-modifizierte Makromoleküle		nAChR Antagonisten	
Nic	100 μ M	PC	100 μ M	Mec	100 μ M
ACh	100 μ M	RMPC	10 μ g/ml	α -Bun	1 μ M
Cho	100 μ M	NTHiPC	10 μ g/ml	Stry	10 μ M
		RM	10 μ g/ml		
		NTHi	10 μ g/ml		
		PC-BSA	100 μ g/ml		

NACHR = nikotinischer Acetylcholinrezeptor; Nic = Nikotin; ACh = Acetylcholin; Cho = Cholin; PC = Phosphocholin; RMPC = PC-modifiziertes Lipooligosaccharid (LOS) aus dem *Haemophilus influenzae*-Stamm RM118; NTHiPC = PC-modifiziertes LOS aus dem *Haemophilus influenzae*-Stamm NTHi1233; RM = LOS des *lic1*-mutanten Stammes RM7004-Lic1; NTHi = LOS des *lic1*-mutanten Stammes NTHi1233*lic1*; PC-BSA= PC-modifiziertes bovines Serumalbumin; Mec = Mecamylamin; α -Bun = α -Bungarotoxin; Strych = Strychnin.

Nach der Inkubationszeit wurden durch Zentrifugation bei 500 x g für 8 min die Zellüberstände gewonnen und bei -20 °C gelagert. Die Zellen wurden weiterverwendet oder in flüssigem Stickstoff eingefroren. Der zeitliche Ablauf der Stimulation der U937-Zellen ist in Abb. 5 veranschaulicht.

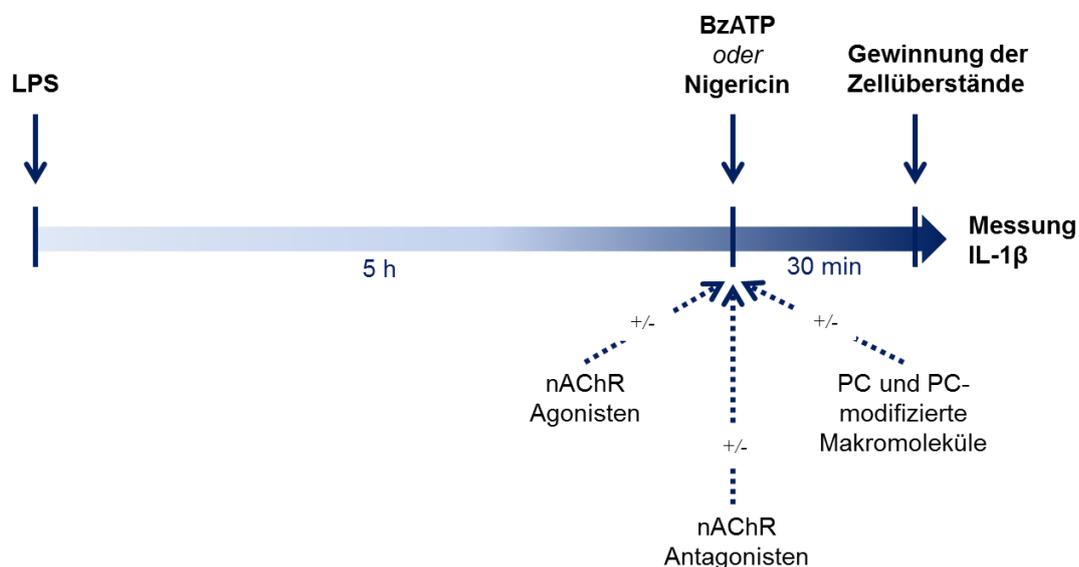


Abbildung 5: Schematische Darstellung des zeitlichen Ablaufs der Stimulation von U937-Zellen.

Nach 5 h Inkubation mit Lipopolysaccharid (LPS) bei 37 °C, 5 % CO₂ erfolgte eine Stimulation für 30 min mit 2'(3')-O-(4-Benzoylbenzoyl)adenosin 5'-triphosphat (BzATP) oder Nigericin in An- und Abwesenheit nikotinischer Acetylcholinrezeptor (nAChR)-Agonisten, nAChR-Antagonisten sowie Phosphocholin (PC) oder PC-modifizierter Makromoleküle. Anschließend wurden die Zellüberstände gewonnen und die Interleukin-1 β (IL-1 β)-Freisetzung quantitativ im *Enzyme-linked Immunosorbent Assay* (ELISA) bestimmt. Die Zellen wurden weiterverwendet oder eingefroren.

In weiteren Experimenten mit U937-Zellen wurde die mRNA-Expression der α 7 (*CHRNA7*)-, α 9 (*CHRNA9*)- und α 10 (*CHRNA10*)-nAChR-Untereinheiten herunterreguliert. Die Herunterregulierung der Genexpression erfolgte mit der siRNA-Technik. Die siRNA-Transfektionen wurden freundlicherweise von Frau Dr. Anna Zakrzewicz, Gießen, durchgeführt (unter Verwendung von *ON-TARGETplus human CHRNA7*, *CHRNA9*

oder *CHRNA10 siRNA SMARTpool* oder mit der Negativkontrolle *ON-TARGETplus Non-Targeting Control Pool* (Thermo Fisher Scientific, Schwerte)). In der Echtzeit-Reverse-Transkriptase-Polymerasekettenreaktion (*real time RT-PCR*) wurde 6 h nach Transfektion der siRNA auf Herunterregulierung der entsprechenden Zielgene geprüft. 48 h nach siRNA-Transfektion wurden die transfizierten Zellen den Stimulationsexperimenten wie oben beschrieben unterzogen.

3.2 Humane mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (PBMCs)

3.2.1 Isolierung der PBMCs

Die verwendeten humanen PBMCs stammten von gesunden, männlichen Probanden. Alle Probanden waren Nichtraucher. Die Experimente mit PBMCs unterlagen der Zustimmung der Ethikkommission der Justus-Liebig-Universität Gießen (Aktenzeichen 81/13). Die freiwilligen Probanden wurden aufgeklärt und willigten durch Unterzeichnen einer schriftlichen Einverständniserklärung ein. Die Isolierung der PBMCs erfolgte mittels Dichtegradientenzentrifugation in LeucoSepTM Rörchen. Die Verwendung erfolgte nach Herstelleranleitung: 15-30 ml frisch entnommenes, heparinisiertes Vollblut wurden auf die LeucoSepTM Rörchen gegeben und bei 800 x g für 15 min in einer Zentrifuge mit Ausschwingrotor ohne Bremse zentrifugiert. Die Plasmafraktion über dem entstandenen Zellring wurde bis auf 5-10 mm über der Interphase abgenommen. Der Zellring mit den PBMCs wurde geerntet und dreimal mit phosphatgepufferter Salzlösung (*phosphate buffered saline*, PBS) mit 0,5 % BSA gewaschen. Zwischen den Waschschritten erfolgte die Zentrifugation bei 250 x g für 15 min. Anschließend wurden die PBMCs in RPMI 1640-Medium mit 10 % FCS und 2 mM L-Glutamin aufgenommen. Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte mikroskopisch in der Neubauer-Zählkammer mit Türks Lösung in einem 1:10-Verdünnungsverhältnis.

3.2.2 Experimente mit PBMCs

Zur Versuchsdurchführung wurden die Zellen direkt nach der Aufbereitung in 24-Well-Platten mit planem Boden ausgesät. Pro Well wurden 5×10^5 Zellen/0,5 ml RPMI 1640-Medium ausplattiert. Die Zellen wurden für 3 h bei 37 °C, 5 % CO₂ inkubiert. Nach der Inkubation erfolgte ein Mediumwechsel und nicht-adhärente Zellen wurden entfernt. Anschließend wurden die Zellen mit 100 µM BzATP in An- oder Abwesenheit der nAChR-

Agonisten Nic (100 μM) und ACh (10 μM) stimuliert und für 30 min bei 37 °C, 5 % CO₂ inkubiert. Anschließend wurden die Zellüberstände gewonnen und bei -20 °C gelagert. Die Zellen wurden weiterverwendet oder in flüssigem Stickstoff eingefroren. Der zeitliche Ablauf der Stimulation der PBMCs ist in Abb. 6 veranschaulicht.

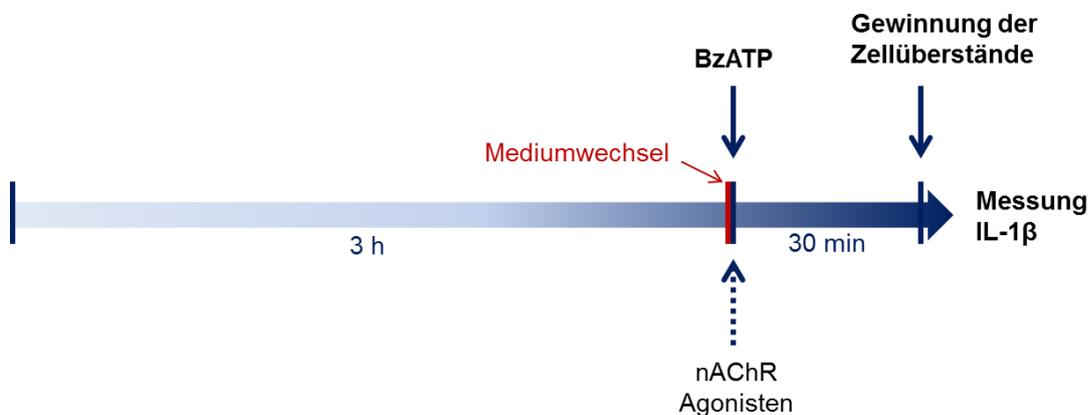


Abbildung 6: Schematische Darstellung des zeitlichen Ablaufs der Stimulation von humanen mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMCs). Nach 3 h Inkubation bei 37 °C, 5 % CO₂ erfolgte nach einem ein Mediumwechsel eine Stimulation für 30 min mit 2'(3')-O-(4-Benzoylbenzoyl)adenosin 5'-triphosphat (BzATP) in An- und Abwesenheit nikotinischer Acetylcholinrezeptor (nAChR)-Agonisten. Anschließend wurden die Zellüberstände gewonnen und die Interleukin-1 β (IL-1 β)-Freisetzung quantitativ im *Enzyme-linked Immunosorbent Assay* (ELISA) bestimmt. Die Zellen wurden weiterverwendet oder eingefroren.

3.3 CD14⁺ primäre humane Monozyten

3.3.1 Isolierung CD14⁺ primärer humaner Monozyten

Aus den humanen PBMCs wurden CD14-positive (CD14⁺) Monozyten durch positive Selektion mittels *Dynabeads*[®] separiert. Die Durchführung erfolgte gemäß dem Protokoll des Herstellers: In 15 ml-Röhrchen wurden 25 μl der *Dynabeads*[®] auf 1 x 10⁷ Zellen/ml gegeben und für 20 min bei 4 °C unter Rotation inkubiert. Während der Inkubationsphase erfolgte die Antikörperbindung an die CD14⁺-Monozyten. Anschließend wurden die Röhrchen für 2 min in eine Magnetsäule gegeben. Durch das Magnetfeld sammelten sich die *Dynabeads*[®]-gebundenen Zellen an den Wänden der Röhrchen. Zur Entfernung ungebundener Zellen wurden die Überstände nach der Inkubation noch in der Magnetsäule abgenommen und verworfen. Zum Waschen der *Dynabeads*[®]-gebundenen Zellen wurden

sie außerhalb der Magnetsäule in *isolation buffer* resuspendiert und erneut 2 min in der Magnetsäule separiert. Um eine möglichst hohe Reinheit der isolierten Zellen zu erzielen, wurde dieser Schritt noch zweimal wiederholt. Anschließend wurden die isolierten Zellen in RPMI 1640-Medium mit 10 % FCS und 2 mM L-Glutamin aufgenommen. Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte mikroskopisch in der Neubauer-Zählkammer mit Trypanblau, 0,4 %. Die Reinheit der isolierten CD14⁺ Monozyten wurde mittels Durchflusszytometrie geprüft. Die durchflusszytometrische Prüfung wurde freundlicherweise durch das Forschungslabor der Klinik für Anästhesiologie, operative Intensivmedizin und Schmerztherapie des Universitätsklinikums Gießen unter der damaligen Leitung von Prof. Dr. M. A. Weigand durchgeführt (unter Verwendung des FACSCalibur, Becton Dickinson und FITC anti-human CD14 antibody M5E2, BioLegend).

3.3.2 Experimente mit CD14⁺ primären humanen Monozyten

Zur Versuchsdurchführung wurden die Zellen direkt nach der Aufbereitung in 24-Well-Platten mit planem Boden ausgesät. Pro Well wurden 5×10^5 Zellen/0,5 ml RPMI 1640-Medium ausplattiert. Die Zellen wurden für 3 h bei 37 °C, 5 % CO₂ inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit 100 µM BzATP in An- oder Abwesenheit der nAChR-Agonisten Nic (100 µM), ACh (10 µM), Cho (100 µM) und PC (100 µM) stimuliert und für 30 min bei 37 °C, 5 % CO₂ inkubiert. Anschließend wurden die Zellüberstände gewonnen und bei -20 °C gelagert. Der zeitliche Ablauf der Stimulation der CD14⁺-Monozyten ist in Abb. 7 veranschaulicht.

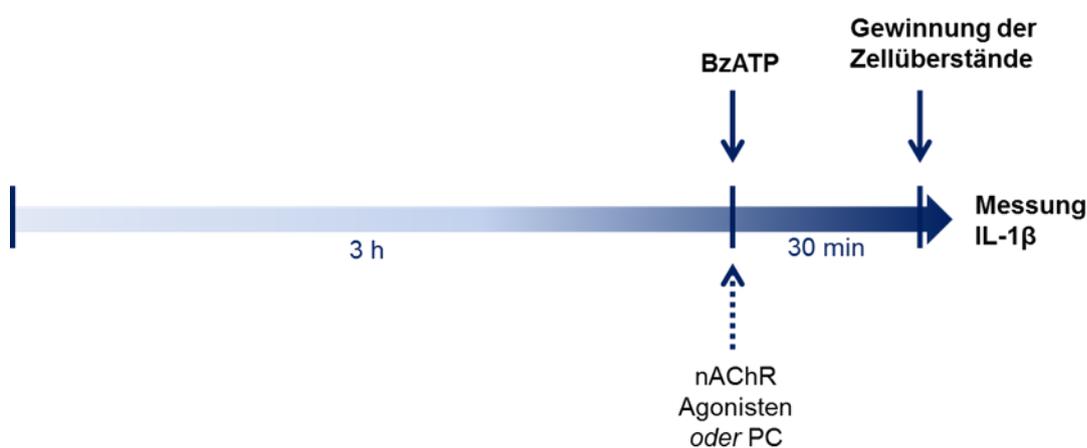


Abbildung 7: Schematische Darstellung des zeitlichen Ablaufs der Stimulation von CD14⁺ primären humanen Monozyten. Nach 3 h Inkubation bei 37 °C, 5 % CO₂ erfolgte eine Stimulation für 30 min mit 2'(3')-O-(4-Benzoylbenzoyl)adenosin 5'-triphosphat (BzATP) in An- und Abwesenheit nikotinischer

Acetylcholinrezeptor (nAChR)-Agonisten oder Phosphocholin (PC). Anschließend wurden die Zellüberstände gewonnen und die Interleukin-1 β (IL-1 β)-Freisetzung quantitativ im *Enzyme-linked Immunosorbent Assay* (ELISA) bestimmt.

3.4 Intravasale mononukleäre Leukozyten aus allogenen transplantierten Rattennieren

3.4.1 Isolierung von intravasalen mononukleären Leukozyten aus allogenen transplantierten Rattennieren

Als Versuchstiere dienten männliche *Lewis* (LEW)- und *Dark Agouti* (DA)-Ratten der Firma Janvier Labs, Saint-Berthevin, Frankreich. Die Versorgung der Tiere erfolgte nach den Richtlinien des *National Institute of Health* (NIH). Die Tierexperimente unterlagen gemäß dem Deutschen Tierschutzgesetz der Zustimmung des Regierungspräsidiums Gießen (Genehmigungsnr. G20/10 Nr. 23/2008). Die Nierentransplantationen wurden freundlicherweise von Frau Prof. Dr. Veronika Grau, Gießen, nach einer publizierten Methode durchgeführt (60). Für die allogene Nierentransplantation wurde die Niere von DA-Ratten in LEW-Ratten orthotop transplantiert. Postoperativ erhielten die transplantierten Tiere keine immunsuppressive Therapie. Zur Infektionsprophylaxe erhielten die transplantierten Tiere das Antibiotikum Ampicillin. Am zweiten postoperativen Tag (*day 2*, d2) erfolgte die Narkotisierung und Heparinisierung der Tiere sowie die Perfusion des Transplantatblutgefäßes. Die Organperfusionen wurden freundlicherweise von Frau Kathrin Petri, Gießen, nach einer publizierten Methode durchgeführt (81). Durch die Aorta erfolgte die Applikation von 100 ml kaltem PBS (calcium- und magnesiumfrei) mit 27 mM Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) und 0,1 % BSA. Über einen Katheter in der Vena cava inferior wurde das Perfusat aufgefangen und sofort eisgekühlt. Die Perfusate wurden bei 500 x g für 10 min bei 4 °C abzentrifugiert und in PBS mit 0,1 % BSA resuspendiert. Zur Isolierung der mononukleären Leukozyten mittels Dichtegradientenzentrifugation wurden 25 ml der Perfusat/PBS-Lösung auf eine Percollphase geschichtet (Dichte 1,082) und bei 500 x g für 30 min bei 4 °C in einer Zentrifuge mit Ausschwingrotor ohne Bremse zentrifugiert. Die entstandene Interphase wurde geerntet und einmalig in 50 ml PBS gewaschen. Die Zentrifugation erfolgte bei 500 x g für 10 min bei 4 °C. Anschließend wurde der Überstand verworfen und die Zellen in RPMI 1640-Medium mit 10 % FCS und 2mM L-Glutamin resuspendiert. Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte

mikroskopisch in der Neubauer-Zählkammer mit Türks Lösung in einem 1:10-Verdünnungsverhältnis.

3.4.2 Experimente mit intravasalen mononukleären Leukozyten aus allogenen transplantierten Rattennieren

Zur Versuchsdurchführung wurden die Zellen direkt nach der Aufbereitung in 24-Well-Platten mit planem Boden ausgesät. Pro Well wurden $0,5 \times 10^6$ Zellen/0,5 ml RPMI 1640-Medium ausplattiert. Die Zellen wurden für 3 h bei 37 °C, 5 % CO₂ inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit 100 µM BzATP in An- oder Abwesenheit von AChE aus *Electrophorus electricus* (1 U/ml) stimuliert und für 30 min bei 37 °C, 5 % CO₂ inkubiert. Danach wurden die Zellüberstände gewonnen und bei -20 °C gelagert. Die Zellen wurden weiterverwendet oder in flüssigem Stickstoff eingefroren. Der zeitliche Ablauf der Stimulation der intravasalen mononukleären Leukozyten aus allogenen transplantierten Rattennieren ist in Abb. 8 veranschaulicht.

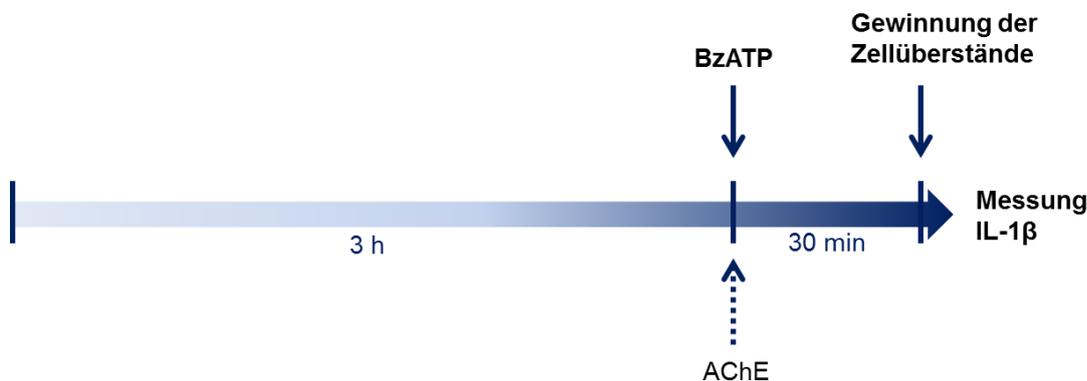


Abbildung 8: Schematische Darstellung des zeitlichen Ablaufs der Stimulation von intravasalen mononukleären Leukozyten aus allogenen transplantierten Rattennieren. Nach 3 h Inkubation bei 37 °C, 5 % CO₂ erfolgte eine Stimulation für 30 min mit 2'(3')-O-(4-Benzoylbenzoyl)adenosin 5'-triphosphat (BzATP) in An- und Abwesenheit von Acetylcholinesterase (AChE). Anschließend wurden die Zellüberstände gewonnen und die Interleukin-1β (IL-1β)-Freisetzung quantitativ im *Enzyme-linked Immunosorbent Assay* (ELISA) bestimmt. Die Zellen wurden weiterverwendet oder eingefroren.

3.5 Nachweis von mRNA

Zur Untersuchung von mRNA-Expressionen wurde die reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (*reverse transcription polymerase chain reaction*, RT-PCR)

verwendet. Bei dieser Methode wird aus mRNA eine komplementäre Desoxyribonukleinsäure (*complementary deoxyribonucleic acid*, cDNA) synthetisiert, die als Vorlage für die PCR dient. Bei der PCR wird mRNA anhand der cDNA-Vorlage exponentiell vervielfältigt, um das Produkt dann mittels Fluoreszenzfarbstoff und Gelelektrophorese identifizieren zu können. Somit lassen sich Rückschlüsse auf die Genexpression schließen. Im Folgenden ist die Durchführung der einzelnen Schritte erläutert. Die Durchführung erfolgte freundlicherweise entweder mit Hilfe von oder durch Frau Dr. Anna Zakrzewicz, Gießen, und Frau Dr. Srebrena Atanasova-Koch, Gießen.

3.5.1 Isolierung von mRNA

Zur Isolierung von mRNA wurde das RNeasy Mini Kit verwendet. Die Durchführung erfolgte gemäß dem Protokoll des Herstellers: Mit den in dem Kit enthaltenen Puffern und Lösungen wurden zunächst die Zellen lysiert und homogenisiert. RNasen wurden hierbei inaktiviert. Nach der Zugabe von Ethanol wurden je 700 µl der Ansätze auf eine RNeasy Mini-Säule gegeben. An die Säule gebundene mRNA wurde abschließend mit 40 µl RNase-freiem Wasser abgelöst. Die Menge der isolierten mRNA wurde mittels Spektralphotometer (NanoDrop™) bei 260 nm bestimmt.

3.5.2 Synthese von cDNA

Die Synthese von cDNA erfolgt mit Hilfe RNA-abhängiger DNA-Polymerasen, den reversen Transkriptasen. Es wurde die *M-MLV Reverse Transcriptase* verwendet. Die Durchführung erfolgte gemäß dem Protokoll des Herstellers. Zum Start der Synthese werden Oligonukleotide (*Primer*) benötigt. Zur Durchführung der Synthese benötigt die reverse Transkriptase als Substrat Desoxynukleosidtriphosphat (dNTP). Je Ansatz wurden pro 1 µg mRNA die in Tab. 3 aufgeführten Komponenten zugegeben. Die synthetisierte cDNA wurde dann für die PCR weiterverwendet.

Tabelle 3: Komponenten der cDNA-Synthese pro 1 µg mRNA.

<i>Primer</i> -Mischung (<i>random primers</i>)	0,5 µg
RNase-freies Wasser	auf 10 µl Gesamtvolumen aufgefüllt
→ Inkubation im Thermal Cycler für 5 min bei 70 °C und für 5 min bei 4 °C	
<i>PCR Nucleotide Mix</i> (dNTP)	1,5 µl

<i>M-MLV RT buffer</i>	5 μ l
<i>M-MLV Reverse Transcriptase</i>	200 Units
<i>Recombinant RNasin Ribonucelase Inhibitor</i>	25 Units
RNase-freies Wasser	auf 25 μ l Gesamtvolumen aufgefüllt

→ Inkubation im Thermal Cycler für 10 min bei 25 °C, für 60 min bei 40 °C und für 15 min bei 70 °C

DNTP = Desoxynukleosidtriphosphat.

3.5.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Jeder PCR-Zyklus besteht aus mehreren Teilschritten, die in spezifischen Temperaturbereichen stattfinden. Die DNA-Stränge werden bei 95 °C in Einzelstränge aufgetrennt (Denaturierung). Abhängig von ihrer mittleren Schmelztemperatur erfolgt die Anlagerung der Primer (*annealing*) als Startpunkt der DNA-Synthese. Bei 72 °C kann dann die DNA-Polymerase komplementär zu den Einzelsträngen aus dNTPs neue DNA synthetisieren (Elongation). Alle benötigten Substanzen waren in dem verwendeten *Platinum SYBR Green qPCR Super-Mix UDG* enthalten, lediglich die Primer mussten zugesetzt werden (Tab. 4). Die Durchführung erfolgte gemäß dem Protokoll des Herstellers. Die Quantifizierung der PCR-Produkte erfolgte in Echtzeit (*real time PCR*). Die Fluoreszenz wurde mit dem *ABI 7700 Sequence Detection System* der Firma Applied Biosystems detektiert. Nach Abschluss der PCR wurde automatisiert zur Homogenitätsprüfung eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt. Die Durchführung erfolgte gemäß dem Protokoll des Herstellers.

Tabelle 4: Komponenten des PCR-Ansatzes.

Primer for	0,5 μ l
Primer rev	0,5 μ l
<i>Platinum SYBR Green qPCR Super-Mix UDG</i> , enthält:	13 μ l
<ul style="list-style-type: none"> • Platinum® Taq DNA Polymerase • SYBR® Green I dye • dNTP (dGTP, dATP, dCTP, dUTP) 	

<ul style="list-style-type: none"> • MgCl₂ • Uracil DNA Glycosylase (UDG) • Tris-HCl, KCl, Stabilisierer 	
cDNA	2 µl
RNase-freies Wasser	auf 25 µl Gesamtvolumen aufgefüllt

For = *forward*; rev = *reverse*; dNTP = Desoxynukleosidtriphosphat; dATP = Desoxyadenosintriphosphat; dCTP = Desoxycytidintriphosphat; dGTP = Desoxyguanosintriphosphat; dUTP = Desoxyuridintriphosphat.

Die Primer sind in Tab. 5 aufgeführt. Als Referenzgen wurde Porphobilinogen-Deaminase (*PBGD*, Synonym *hydroxymethylbilane synthase*, *HMBS*; nachfolgend wird weiterhin die Abkürzung *PBGD* verwendet) mitgeführt. Als Negativkontrolle wurde RNase-freies Wasser mitgeführt. Die Genexpression der Zielgene wurde gegen *PBGD* normalisiert und mittels $2^{-\Delta Ct}$ Methode analysiert. Der *cycle threshold* (Ct)-Wert beschreibt den Zyklus, in dem ein bestimmter Schwellenwert des Signals überschritten wird (130).

Tabelle 5: Verwendete Primer der PCR.

Primer	Sequenz (5'-3')	Genbank- Nummer	Produkt- länge (bp)
<i>Human</i>			
<i>IL1B</i> for	TCCAGGGACAGGATATGGAG	NM_000576.2	133
<i>IL1B</i> rev	TCTTTCAACACGCAGGACAG		
<i>CHRFAM7A</i> for	CAATTGCTAATCCAGCATTGT	NM_148911.1	102
<i>CHRFAM7A</i> rev	CCCAGAAGAATTCACCAACACG		
<i>CHRNA7</i> for	AGATGGCCAGATTTGGAAACC	NM_000746.4	142
<i>CHRNA7</i> rev	GCAGGAACCTTGAATATGCCT		
<i>CHRNA9</i> for	GATCAGTACGATGGCCTAGACT	NM_017581.3	116
<i>CHRNA9</i> rev	ACATTGGTGTTACAGGCTC		
<i>CHRNA10</i> for	TCACCGTCTTCCAGTTGCT	NM_020402.2	121
<i>CHRNA10</i> rev	AGGATGGTGAGTGCTGTTGAG		

<i>HMBS</i> for	TGTCTGGTAACGGCAATGCG	NM_000190.3	70
<i>HMBS</i> rev	CCCACGCGAATCACTCTCAT		
Ratte			
<i>Il1b</i> for	CCTGTTCTTTGAGGCTGACA	NM_031512.2	101
<i>Il1b</i> rev	GCTGTGAGATTTGAAGCTGGA		
<i>Chrna7</i> for	TATAACAGTGCTGATGAGCGC	NM_012832.3	173
<i>Chrna7</i> rev	GACCAGGACCCAAACTTCAG		
<i>Chrna9</i> for	ATCTGGTGTGGAGGCCGACA	NM_022930.1	119
<i>Chrna9</i> rev	GGCCGGTGAGTCCAGGTGAT		
<i>Chrna10</i> for	ACCAGTGGCAGATACAGACCAGAC	NM_022639.1	124
<i>Chrna10</i> rev	TGTCCACTCTTGCCGGATCCAC		
<i>Hmbs</i> for	GGCGCAGCTACAGAGAAAGT	NM_013168.2	115
<i>Hmbs</i> rev	AGCCAGGATAATGGCACTGA		

For = *forward*; rev = *reverse*; bp = Basenpaare; folgende Gennamen bezeichnen humane Gene: *IL1B* = Interleukin-1 β ; *CHRNA* = *cholinergic receptor nicotinic alpha subunit*; *CHRFAM7A* = *CHRNA-FAM7A* Fusion wobei *FAM7A* = *family with sequence similarity 7A, exons A-E* ; *HMBS* = *hydroxymethylbilane synthase*, Synonym Porphobilinogen-Deaminase (*PBGD*); folgende Gennamen bezeichnen Gene der Ratte: *Il1b* = Interleukin-1 β ; *Chrna* = *cholinergic receptor nicotinic alpha subunit*; *Hmbs* = *hydroxymethylbilane synthase*, Synonym Porphobilinogen-Deaminase (*PBGD*).

3.5.4 Agarosegelelektrophorese

Zur Sichtbarmachung kann die synthetisierte DNA mittels Gelelektrophorese im Agarosegel ihrer Größe nach aufgetrennt und durch Färbung dargestellt werden. 1,5 g Agarose wurden durch Aufkochen in 100 ml Tris-Acetat-EDTA-Puffer (TAE)-Puffer gelöst und mit 10 μ l des Nukleinsäurefarbstoffs *GelRed* versetzt. Mit einem eingesetzten Kamm zur Bildung der Probenaschen erfolgte in der Gelkammer für 30 min bei RT die Härtung des Gels. Zu 10 μ l synthetisierter DNA wurden 2 μ l *loading dye solution* zugegeben und die Probenaschen mit je 10 μ l bestückt. Zur Bestimmung der Fragmentgröße wurde ein Basenpaarmarker (*GeneRuler*) mitgeführt. Die elektrische Auftrennung erfolgte für 20-30 min bei 100 V in TAE-Puffer. Die Auswertung erfolgte mit der *AlphaEase FC Software*.

3.5.5 Sequenzierung

Die Sequenzierung zur Bestätigung der Spezifität der PCR erfolgte durch die Firma SeqLab, Göttingen. Die in der PCR synthetisierte DNA wurde mit dem *PCR purification kit* aufgereinigt, die Konzentration bestimmt (im *NanoDrop* Gerät) und mit RNase-freiem Wasser für die Sequenzierung verdünnt.

3.6 *Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)*

Zur Quantifizierung der Konzentration von IL-1 β in den Zellüberständen wurde die *Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)*-Methode verwendet. Die Durchführung erfolgte gemäß den Protokollen des Herstellers. Die 96 Vertiefungen (Wells) der Mikrotiterplatten waren mit einem monoklonalen, für humanes IL-1 β bzw. einem polyklonalen, für Ratten-IL-1 β spezifischen Antikörper vorbeschichtet. Die zu quantifizierenden Proben (Zellüberstände) wurden in die Wells pipettiert. Aus einer in dem Kit enthaltenen Standardlösung wurde eine Verdünnungsreihe mit bekannten IL-1 β -Konzentrationen erstellt und wie die Proben mitgeführt. Während der Inkubationsphase erfolgte die Bindungsreaktion zwischen dem in den Proben und der Standardreihe vorhandenen Antigen IL-1 β und dem auf der Platte immobilisierten Antikörper. Ungebundenes und unspezifisch gebundenes Antigen wurde in nachfolgenden Waschschritten entfernt. Anschließend wurde ein polyklonaler, für IL-1 β spezifischer Antikörper in jedes Well pipettiert. An diesen sogenannten Detektorantikörper war das Enzym Peroxidase (*horseradish peroxidase*, HRP) gekoppelt. Überschüssiger Detektorantikörper wurde nachfolgenden Waschschritten entfernt. Anschließend wurde ein chromogenes Substrat aus Wasserstoffperoxid und Tetramethylbenzidin in jedes Well pipettiert. Die HRP katalysierte eine blaue Farbreaktion. Der Farbumschlag erfolgte direkt proportional zur vorhandenen IL-1 β -Konzentration. Nach der Inkubationszeit wurde die enzymatische Reaktion durch Zugabe einer Schwefelsäure enthaltenden Stopplösung beendet. Es erfolgte ein gelber Farbumschlag. Abschließend wurde die optische Dichte bei einer Hauptwellenlänge von 450 nm und einer Kontrollwellenlänge von 540 nm im Spektralphotometer gemessen. Die IL-1 β -Konzentrationen der Proben konnten anhand der mitgeführten Standardreihe errechnet werden.

3.7 Messung der Zellviabilität

Die Zellviabilität wurde indirekt über die Enzymaktivität der Laktatdehydrogenase (LDH) in den Zellüberständen gemessen. Zur LDH-Aktivitätsmessung wurde der Cyto-Tox96[®] Non-Radioactive Cytotoxicity Assay verwendet. Die Durchführung erfolgte gemäß dem Protokoll des Herstellers. Die Zellüberstände und das im Kit enthaltene Substrat wurden in einem Mischungsverhältnis von 1:1 auf unbeschichtete 96-Well Mikrotiterplatten pipettiert und bei Raumtemperatur 30 min inkubiert. Es erfolgte ein roter Farbumschlag. Die Menge der roten Farbe war direkt proportional der Menge lysierter Zellen. Durch Zugabe der im Kit enthaltenen Stopplösung wurde die enzymatische Reaktion beendet und die Absorption bei 490 nm im Spektralphotometer gemessen. Der Anteil lysierter Zellen wurde auf die totale LDH-Aktivität in durch Einfrieren und Auftauen (*freeze-thaw*-Methode) lysierten Zellen eines Kontrollansatzes bezogen und prozentual berechnet.

3.8 Statistik

Die statistische Datenauswertung erfolgte mit der *SPSS software*. Zunächst wurde mit dem nicht-parametrischen Kruskal-Wallis-Test geprüft, ob sich zwischen den untersuchten Datengruppen statistisch signifikante Unterschiede zeigen. Falls sich im Kruskal-Wallis-Test ein $p \leq 0,05$ zeigte, wurde der nicht-parametrische Mann-Whitney-U-Test zum paarweisen Vergleich der Gruppen angewendet. Für Daten aus Experimenten mit primären Leukozyten wurde der Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test verwendet. Präsentiert werden Daten aus n unabhängigen Experimenten. Dargestellt werden die einzelnen Messdatenpunkte, der Median sowie die 25 %- und 75 %-Perzentile.

4 Ergebnisse

Die nachfolgend gezeigten Ergebnisse sind bereits von Hecker und Küllmar et al. publiziert (93).

4.1 U937-Zellen

4.1.1 ATP-induzierte IL-1 β -Freisetzung

In der RT-PCR wurde zunächst die mRNA-Expression des IL-1 β -Vorläufermoleküls pro-IL-1 β (*IL1B*) in U937-Zellen geprüft. Die im gefärbten Gel dargestellte Bande entsprach mit 133 Basenpaaren (bp) der erwarteten Produktlänge (Abb. 9, A). Pro-IL-1 β konnte sowohl in unbehandelten U937-Zellen als auch in LPS-behandelten U937-Zellen nachgewiesen werden. Als Negativkontrolle wurde RNase-freies Wasser eingesetzt, das keine Bande zeigte. Der Vergleich in *arbitrary units* (AU) zeigte, dass die LPS-Stimulation der U937-Zellen (LPS) zu einer signifikant gesteigerten mRNA-Expression von pro-IL-1 β (*IL1B*) im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen (C_1) führte (Abb. 9, B; $p = 0,03$).

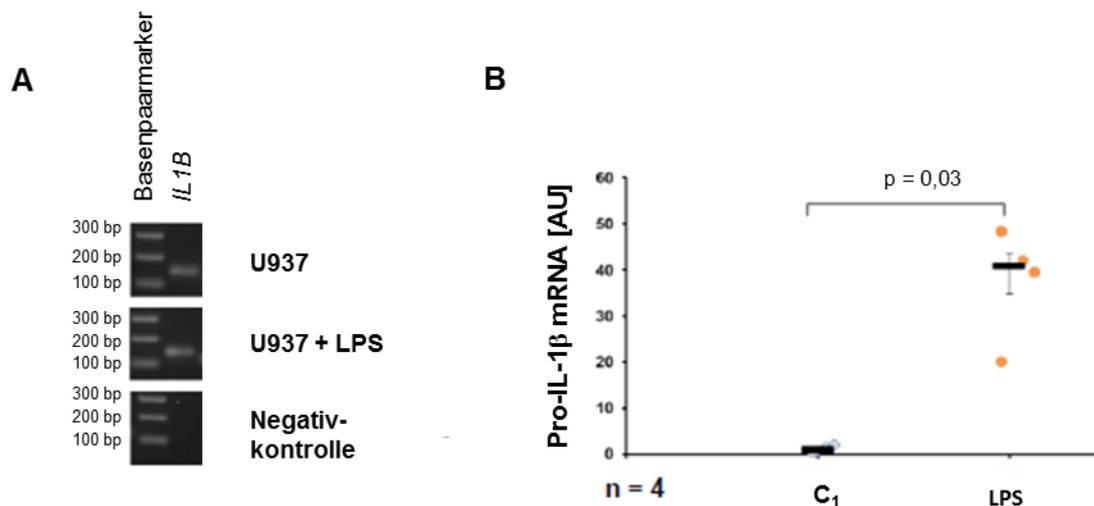


Abbildung 9: Die mRNA-Expression von pro-Interleukin (IL)-1 β (*IL1B*) in U937-Zellen. Mittels RT-PCR konnte die mRNA-Expression von pro-IL-1 β (*IL1B*) im gefärbten Gel mit einer Bande bei 133 Basenpaaren (bp) in unbehandelten U937-Kontrollzellen und in Lipopolysaccharid (LPS)-behandelten U937-Zellen nachgewiesen werden (A). Die Negativkontrolle (RNase-freies Wasser) zeigte keine Banden (A). Der Vergleich in *arbitrary units* (AU) zeigt eine signifikant gesteigerte mRNA-Expression in LPS-behandelten U937-Zellen (LPS) versus unbehandelten U937-Zellen (C_1) ($p=0,03$) (B). Die statistische

Auswertung erfolgte durch den Kruskal-Wallis-Test, gefolgt vom Mann-Whitney-U-Test. Gezeigt sind die einzelnen Messdatenpunkte, als Balken der Median und die 25 %- sowie die 75 %-Perzentile.

Im ELISA wurde aus den U937-Zellen freigesetztes IL-1 β quantitativ in den Zellüberständen gemessen. Die Stimulation der U937-Zellen mit LPS führte zu keiner vermehrten IL-1 β -Freisetzung aus den U937-Zellen (Abb. 10, C₂) im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen (Abb. 10, C₁). Die LPS-behandelten U937-Zellen wurden im Anschluss wie unter 3.1.2 beschrieben mit BzATP stimuliert. Die Stimulation der LPS-behandelten Zellen mit BzATP zeigte erwartungsgemäß eine erhöhte IL-1 β -Freisetzung aus den U937-Zellen (Abb.10, C₃) im Vergleich zu den Kontroll- und LPS-behandelten Zellen (Abb. 10, C₁ und C₂).

4.1.2 NACHR-Agonisten

Die Stimulation mit BzATP wurde weiterhin in An- und Abwesenheit der nAChR-Agonisten ACh, Cho oder Nic durchgeführt. Aus den Zellüberständen wurde im ELISA die IL-1 β -Freisetzung gemessen. Die Anwesenheit der nAChR-Agonisten ACh, Cho oder Nic zeigte jeweils eine dosisabhängige signifikante Hemmung der BzATP-induzierten IL-1 β -Freisetzung (im Vergleich zu C₃) (Abb. 10; $p \leq 0,05$).

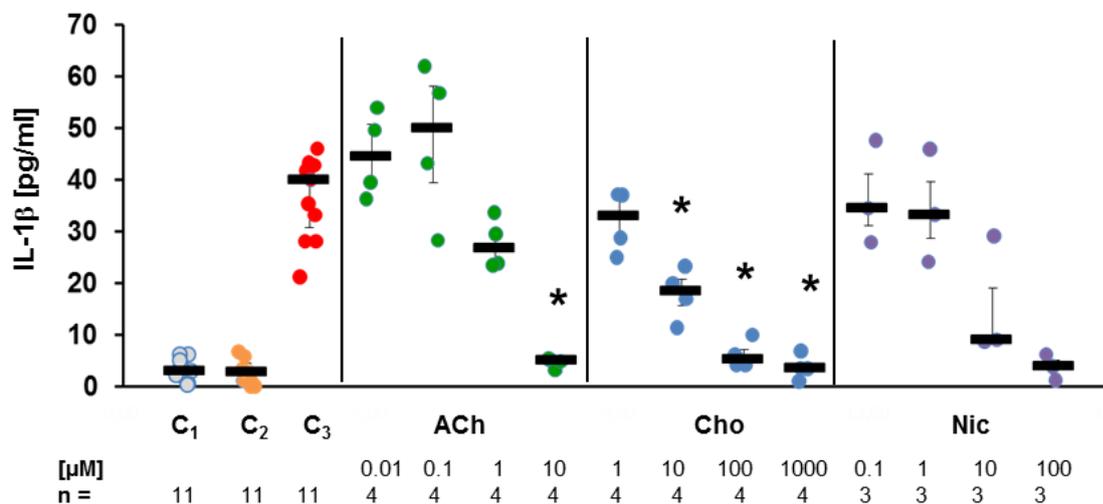


Abbildung 10: Die Interleukin (IL)-1 β -Konzentrationen nach BzATP-induzierter Freisetzung aus U937-Zellen in Anwesenheit von Agonisten nikotinischer Acetylcholinrezeptoren (nAChRs). 2'(3')-O-(4-Benzoylbenzoyl)adenosin 5'-triphosphat (BzATP) induzierte die IL-1 β -Freisetzung aus Lipopolysaccharid (LPS)-behandelten U937-Zellen (C₃) im Vergleich zu unbehandelten U937-Zellen (C₁) und zu LPS-behandelten U937-Zellen (C₂). Die nAChR-Agonisten Acetylcholin (ACh), Cholin (Cho) und Nikotin

(Nic) hemmten jeweils dosisabhängig die BzATP-induzierte IL-1 β -Freisetzung. Die statistische Auswertung erfolgte durch den Kruskal-Wallis-Test, gefolgt vom Mann-Whitney-U-Test. Gezeigt sind die einzelnen Messdatenpunkte, als Balken der Median und die 25 %- sowie die 75 %-Perzentile. * $p \leq 0,05$ versus C₃.

4.1.3 NACHR-Antagonisten

Die Hemmung der BzATP-induzierten IL-1 β -Freisetzung aus U937-Zellen durch nAChR-Agonisten wurde in zusätzlicher Anwesenheit von nAChR-Antagonisten untersucht. Hierzu wurde die Stimulation der LPS-behandelten U937-Zellen mit BzATP in zeitgleicher An- und Abwesenheit des nAChR-Agonisten Nic sowie der nAChR-Antagonisten Mec, α -Bun oder Stry durchgeführt. Aus den Zellüberständen wurde im ELISA die IL-1 β -Freisetzung gemessen. Der signifikant hemmende Effekt des nAChR-Agonisten Nic auf die BzATP-induzierte IL-1 β -Freisetzung aus U937-Zellen ($p \leq 0,05$) konnte jeweils mit Mec, α -Bun oder Stry aufgehoben werden (Abb. 11). Die als Negativkontrolle einzeln eingesetzten nAChR-Antagonisten hatten keinen Effekt auf die IL-1 β -Freisetzung (Daten nicht gezeigt).

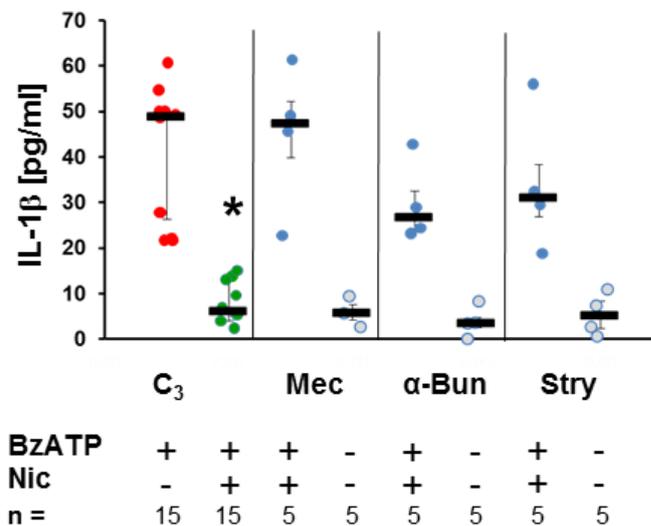


Abbildung 11: Die Interleukin (IL)-1 β -Konzentrationen nach BzATP-induzierter Freisetzung aus U937-Zellen in Anwesenheit des Agonisten nikotinischer Acetylcholinrezeptoren (nAChRs) Nikotin (Nic) und nAChR-Antagonisten. 2'(3')-O-(4-Benzoylbenzoyl)adenosin 5'-triphosphat (BzATP) induzierte die IL-1 β -Freisetzung aus Lipopolysaccharid (LPS)-behandelten U937-Zellen (C₃). Der nAChR-Agonist Nic hemmte die BzATP-induzierte IL-1 β -Freisetzung. Die nAChR-Antagonisten Mecamylamin (Mec), α -Bungarotoxin (α -Bun) und Strychnin (Stry) hoben jeweils den Nic-Effekt auf. Die statistische Auswertung erfolgte durch den Kruskal-Wallis-Test, gefolgt vom Mann-Whitney-U-Test. Gezeigt sind die

einzelnen Messdatenpunkte, als Balken der Median und die 25 %- sowie die 75 %-Perzentile. * $p \leq 0,05$ versus C_3 .

Die eingesetzten nAChR-Antagonisten haben verschiedene Rezeptoraffinitäten. Mec ist ein allgemeiner nAChR-Antagonist, α -Bun und Stry sind $\alpha 7$ -nAChR- und $\alpha 9$ -nAChR-Antagonisten (10, 40, 65). Mittels RT-PCR wurde daher die vorhandene mRNA-Expression für den $\alpha 7$ -nAChR (*CHRNA7*), den $\alpha 9$ -nAChR (*CHRNA9*) und den $\alpha 10$ -nAChR (*CHRNA10*) in den U937-Zellen geprüft. In Abb. 12 sind die im gefärbten Gel nachgewiesenen Banden gezeigt. Die dargestellten Banden entsprachen für *CHRNA7* mit 142 bp, für *CHRNA9* mit 116 bp und für *CHRNA10* mit 121 bp den erwarteten Produktlängen. Die inaktive humane Duplikatform des $\alpha 7$ -nAChR (*CHRFAM7A*) wurde zur Vollständigkeit mit einer erwarteten Bande bei 102 bp nachgewiesen. Die Expression von *CHRNA7*, *CHRNA9*, *CHRNA10* und *CHRFAM7A* konnte sowohl in unbehandelten U937-Zellen als auch in LPS-behandelten U937-Zellen nachgewiesen werden. Als Negativkontrolle wurde RNase-freies Wasser eingesetzt, das keine Bande zeigt. In den untersuchten U937-Zellen wurde außerdem wiederholt die mRNA-Expression von pro-IL-1 β nachgewiesen (vergleiche 4.1.1).

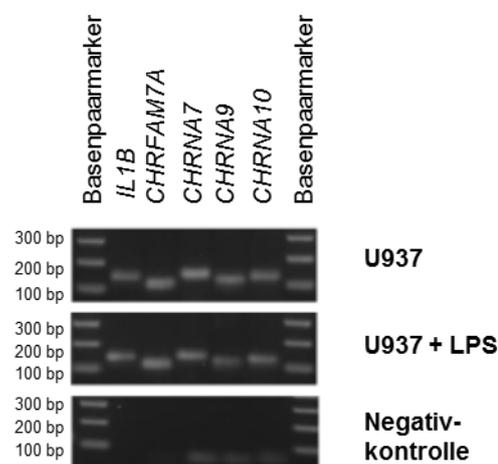


Abbildung 12: Die mRNA-Expression der nikotinischen Acetylcholinrezeptoren (nAChRs) Untereinheiten $\alpha 7$ (*CHRNA7*), $\alpha 9$ (*CHRNA9*) und $\alpha 10$ (*CHRNA10*) in U937-Zellen. Mittels RT-PCR wurde die mRNA-Expression im gefärbten Gel mit Banden für *CHRNA7* bei 142 bp, für *CHRNA9* bei 116 bp und für *CHRNA10* bei 121 bp nachgewiesen. Dargestellt sind ebenfalls die mRNA-Expressionen von pro-IL-1 β bei 133 bp und des inaktiven *CHRNA7*-Duplikats *CHRFAM7A* bei 102 bp. Alle Banden waren sowohl in unbehandelten U937-Kontrollzellen als auch in Lipopolysaccharid (LPS)-behandelten U937-Zellen

nachweisbar. Die Negativkontrolle (RNase-freies Wasser) zeigte keine Banden. Die unten randnah sichtbaren Banden sind vermutlich Primerdimere.

4.1.4 Transfektion mit siRNA

In siRNA-Transfektionsexperimenten wurde die Expression von *CHRNA7*, *CHRNA9* und *CHRNA10* durch Transfektionen entsprechender siRNA herunterreguliert (siehe 3.1.2). Die siRNA-Transfektion mit Kontroll-siRNA diente als Negativkontrolle. Anschließend wurden die Zellen wie in 3.1.2. beschrieben stimuliert und die IL-1 β -Freisetzung im ELISA gemessen (nachfolgend in Abb. 13 dargestellt).

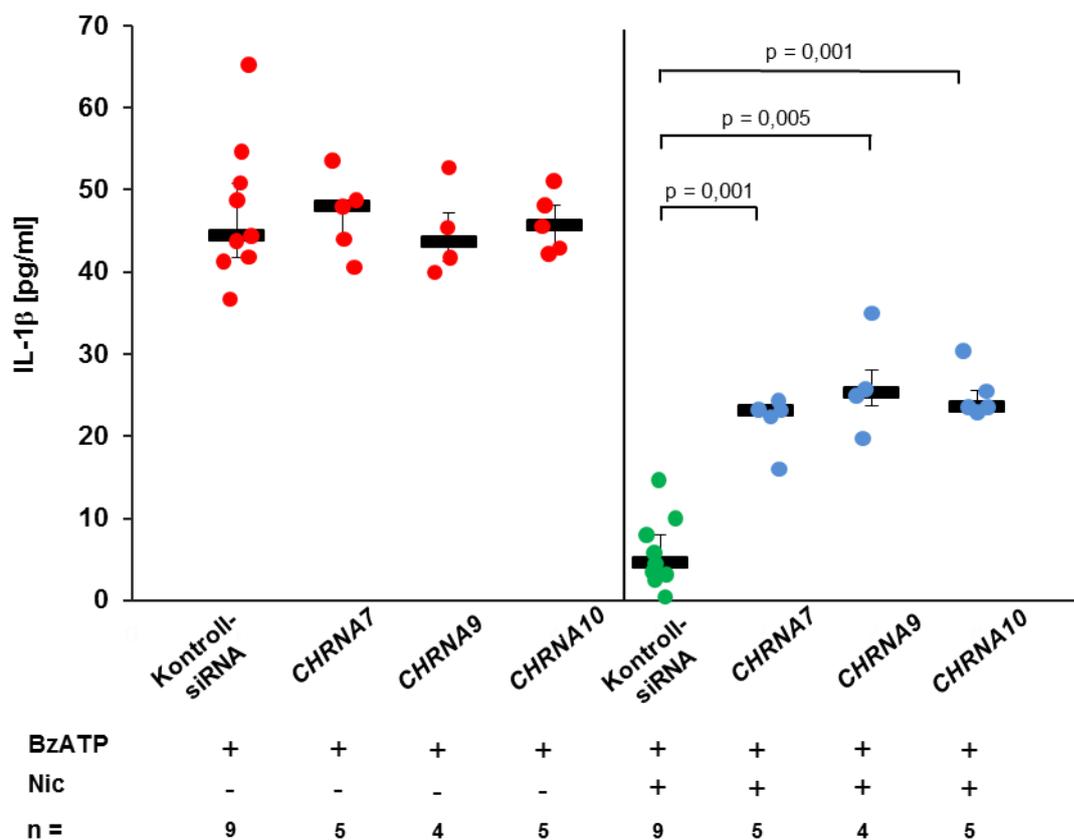


Abbildung 13: Die Interleukin (IL)-1 β -Konzentrationen nach BzATP-induzierter Freisetzung aus siRNA-transfizierten U937-Zellen in Ab- und Anwesenheit von Nikotin (Nic). 2'(3')-O-(4-Benzoylbenzoyl)adenosin 5'-triphosphat (BzATP) induzierte die IL-1 β -Freisetzung aus allen Ansätzen Lipopolysaccharid (LPS)-behandelter siRNA-transfizierter U937-Zellen (links). In zusätzlicher Anwesenheit des Agonisten nikotinischer Acetylcholinrezeptoren (nAChRs) Nikotin (Nic) war die IL-1 β -Freisetzung nur in denen als Negativkontrolle mit Kontroll-siRNA transfizierten U937-Zellen gehemmt. Die siRNA-transfizierten U937-Zellen mit Herunterregulierung von α 7-nAChR (*CHRNA7*), α 9-nAChR (*CHRNA9*) oder α 10-nAChR (*CHRNA10*) zeigten eine signifikant abgeschwächte Hemmung der BzATP-induzierten IL-1 β -Freisetzung durch Nic im Vergleich zu den mit Kontroll-siRNA transfizierten U937-Zellen. Die

statistische Auswertung erfolgte durch den Kruskal-Wallis-Test, gefolgt vom Mann-Whitney-U-Test. Gezeigt sind die einzelnen Messdatenpunkte, als Balken der Median und die 25 %- sowie die 75 %-Perzentile. *CHRNA7*: $p = 0,001$ versus Kontroll-siRNA; *CHRNA9*: $p = 0,005$ versus Kontroll-siRNA; *CHRNA10*: $p = 0,001$ versus Kontroll-siRNA.

Entsprechend den in 4.1.1 dargestellten Ergebnissen der U937-Zellen, ließ sich in allen Ansätzen siRNA-transfizierter LPS-behandelter U937-Zellen mit BzATP eine IL-1 β -Freisetzung induzieren (Abb. 13, links). Bei zusätzlicher Anwesenheit des nAChR-Agonisten Nic konnte für die siRNA-transfizierten U937-Zellen der in 4.1.2 dargestellte hemmende Nic-Effekt auf die BzATP-induzierte IL-1 β -Freisetzung jedoch nur bei den mit Kontroll-siRNA transfizierten Zellen gezeigt werden (Abb. 13, rechts). Verglichen mit den Kontroll-siRNA-transfizierten U937-Zellen war der die IL-1 β -Freisetzung hemmende Nic-Effekt nach der Heruntermodulation der nAChRs durch siRNA in allen Fällen signifikant abgeschwächt (Abb. 13, rechts; *CHRNA7*: $p = 0,001$ versus Kontroll-siRNA; *CHRNA9*: $p = 0,005$ versus Kontroll-siRNA; *CHRNA10*: $p = 0,001$ versus Kontroll-siRNA).

4.1.5 Phosphocholin (PC) und PC-modifizierte Makromoleküle

In weiteren Experimenten wurden PC und PC-modifizierte Makromoleküle eingesetzt (beschrieben in 3.1.2). Die LPS-behandelten U937-Zellen wurden mit BzATP in An- und Abwesenheit von PC oder PC-modifizierten Makromolekülen zur IL-1 β -Freisetzung stimuliert. Aus den Zellüberständen wurde im ELISA die IL-1 β -Freisetzung gemessen. PC hemmte dosisabhängig signifikant die BzATP-induzierte IL-1 β -Freisetzung aus den U937-Zellen (Abb. 14, A, links; $p \leq 0,05$). Dieser hemmende Effekt konnte mit den nAChR-Antagonisten Mec, α -Bun oder Stry aufgehoben werden (Abb. 14, A, rechts). PC-BSA hemmte ebenfalls dosisabhängig signifikant die BzATP-induzierte IL-1 β -Freisetzung (Abb. 14, A, links; $p \leq 0,05$). Dieser hemmende Effekt konnte mit den nAChR-Antagonisten Mec, α -Bun oder Stry aufgehoben werden (Abb. 14 A, rechts). Das als Negativkontrolle eingesetzte nicht-modifizierte BSA sowie HF-PC-BSA zeigten keinen Effekt auf die BzATP-induzierte IL-1 β -Freisetzung (Abb. 14, B).

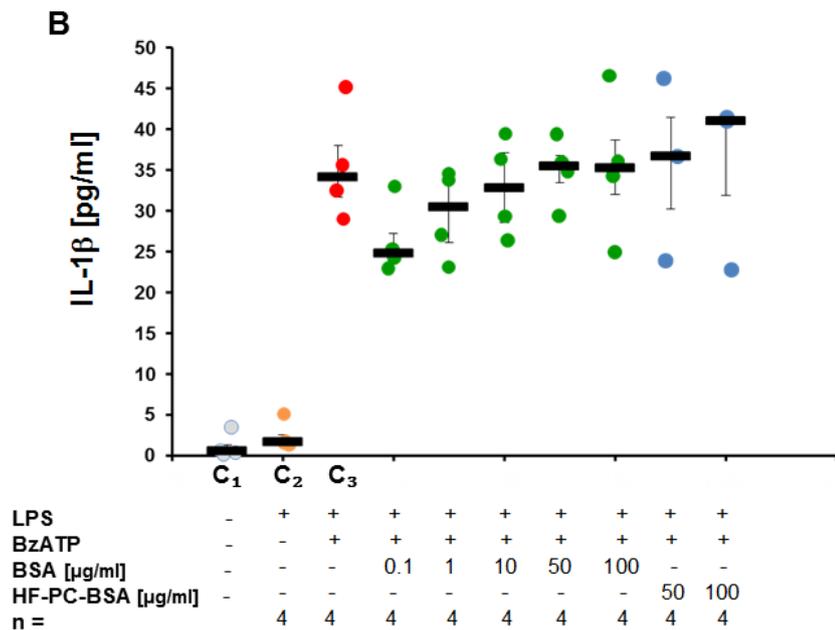
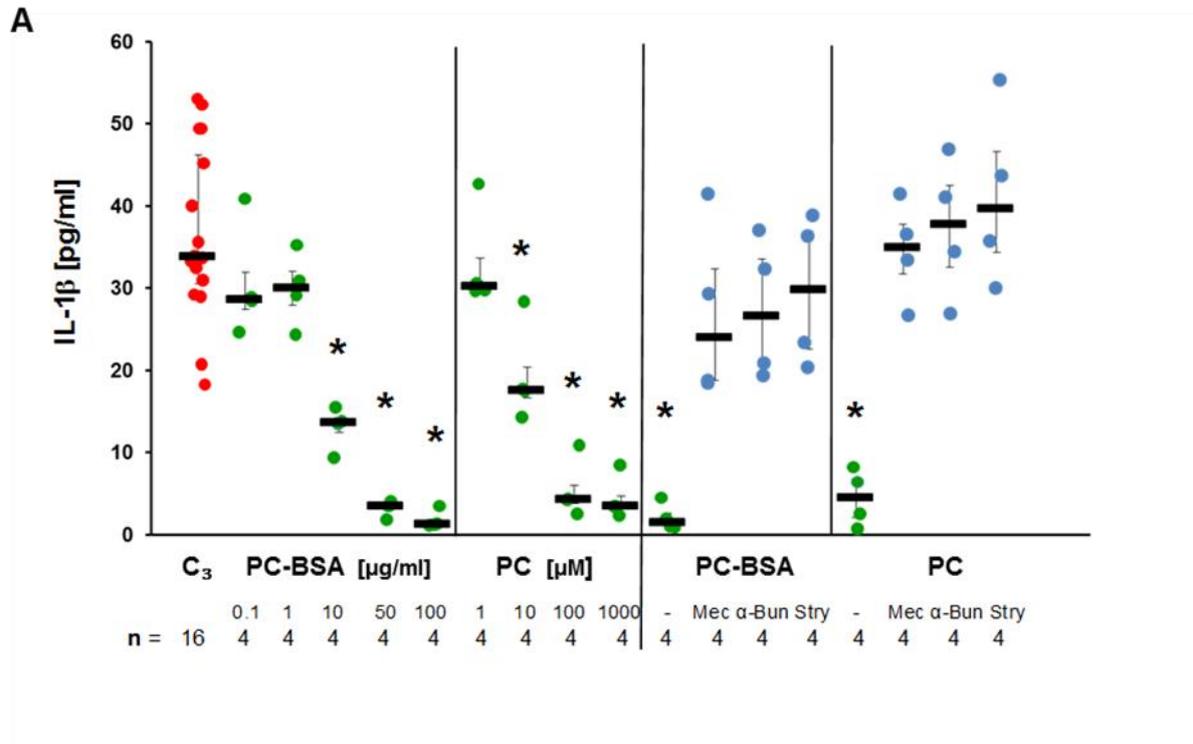
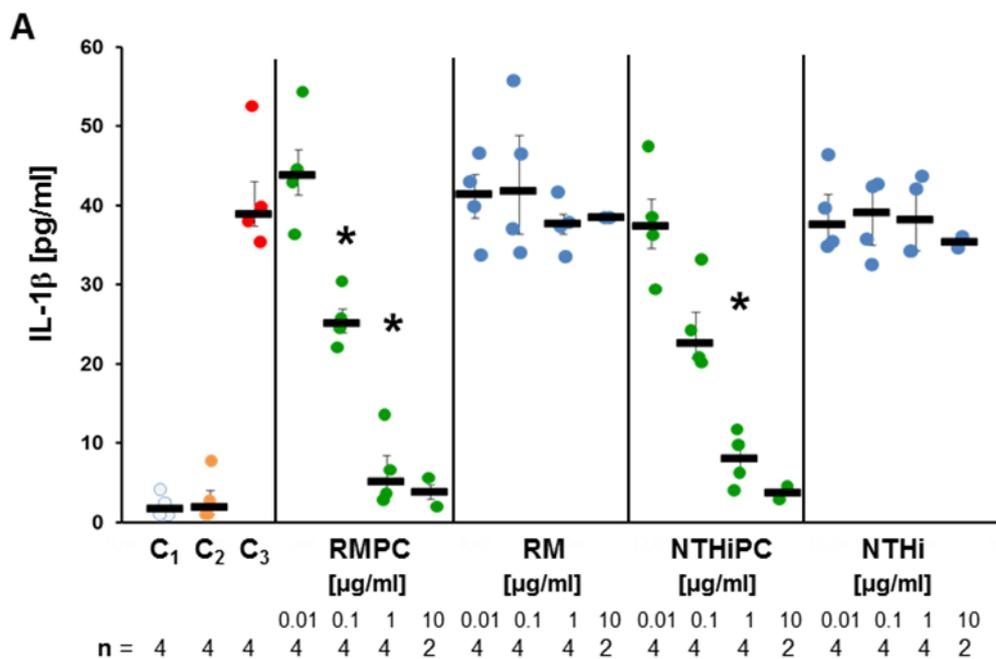


Abbildung 14: Die Interleukin (IL)-1 β -Konzentrationen nach BzATP-induzierter Freisetzung aus U937-Zellen in Anwesenheit von Phosphocholin (PC) und PC-modifiziertem bovinem Serum Albumin (PC-BSA). 2'(3')-O-(4-Benzoylbenzoyl)adenosin 5'-triphosphat (BzATP) induzierte die IL-1 β -Freisetzung aus Lipopolysaccharid (LPS)-behandelten U937-Zellen (C₃). PC-BSA und PC hemmten jeweils dosisabhängig die BzATP-induzierte IL-1 β -Freisetzung (A, links). Der Effekte beider Substanzen konnte mit den Antagonisten nikotinischer Acetylcholinrezeptoren (nAChR) Mecamylamin (Mec), α -

Bungarotoxin (α -Bun) oder Strychnin (Stry) jeweils aufgehoben werden (A, rechts). Nicht-modifiziertes bovines Serum Albumin (BSA) sowie Flusssäure (*hydrofluoric acid*, HF) -behandeltes PC-BSA (HF-PC-BSA) hatten keinen Effekt auf die BzATP-induzierte IL-1 β -Freisetzung (B). Die statistische Auswertung erfolgte durch den Kruskal-Wallis-Test, gefolgt vom Mann-Whitney-U-Test. Gezeigt sind die einzelnen Messdatenpunkte, als Balken der Median und die 25 %- sowie die 75 %-Perzentile. * $p \leq 0,05$ versus C₃.

PC-modifiziertes LOS (RMPC und NTHiPC) aus den beiden in 3.1.2 aufgeführten *Haemophilus influenzae*-Stämmen hemmte ebenfalls jeweils dosisabhängig signifikant die BzATP-induzierte IL-1 β -Freisetzung (Abb. 15, A; $p \leq 0,05$). Dieser hemmende Effekt konnte mit den nAChR-Antagonisten Mec, α -Bun oder Stry aufgehoben werden (Abb.15, B). Das als Negativkontrolle eingesetzte nicht-modifizierte LOS (RM und NTHi) aus den beiden mutierten *Haemophilus influenzae*-Stämmen (vergleiche 3.1.2) zeigte keinen Effekt auf die BzATP-induzierte IL-1 β -Freisetzung (Abb.15, A).



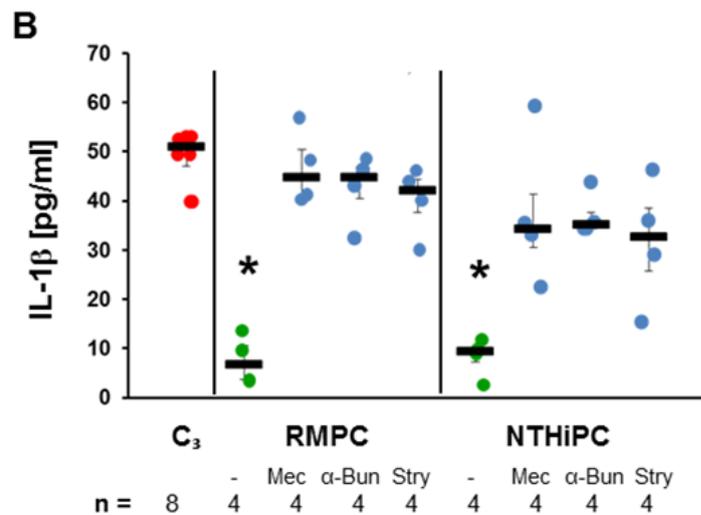


Abbildung 15: Die Interleukin (IL)-1 β -Konzentrationen nach BzATP-induzierter Freisetzung aus U937-Zellen in Anwesenheit von Phosphocholin (PC)-modifiziertem Lipooligosaccharid (LOS) (RMPC und NTHiPC). 2'(3')-O-(4-Benzoylbenzoyl)adenosin 5'-triphosphat (BzATP) induzierte die IL-1 β -Freisetzung aus LPS-behandelten U937-Zellen (A und B, C₃) im Vergleich zu unbehandelten U937-Zellen (A, C₁) und zu LPS-behandelten U937-Zellen (A, C₂). PC-modifiziertes LOS aus den *Haemophilus influenzae*-Stämmen RM118 (RMPC) und NTHi1233 (NTHiPC) hemmten jeweils dosisabhängig die BzATP-induzierte IL-1 β -Freisetzung (A). Der Effekte beider Substanzen konnte mit den Antagonisten nikotinischer Acetylcholinrezeptoren Mecamylamin (Mec), α -Bungarotoxin (α -Bun) oder Strychnin (Stry) aufgehoben werden (B). Nicht-modifiziertes LOS RM und NTHi hatten keinen Effekt auf die BzATP-induzierte IL-1 β -Freisetzung (A). Die statistische Auswertung erfolgte durch den Kruskal-Wallis-Test, gefolgt vom Mann-Whitney-U-Test. Gezeigt sind die einzelnen Messdatenpunkte, als Balken der Median und die 25 %- sowie die 75 %-Perzentile. * $p \leq 0,05$ versus C₃.

4.1.6 Nigericin-induzierte IL-1 β -Freisetzung

In weiteren Experimenten wurde die IL-1 β -Freisetzung alternativ zu BzATP mit dem porenbildenden bakteriellen Toxin Nigericin induziert. Die Stimulation der LPS-behandelten U937-Zellen mit Nigericin wurden in An- und Abwesenheit der nAChR-Agonisten Nic, ACh oder Cho sowie außerdem von PC und PC-modifiziertem LOS RMPC oder NTHiPC durchgeführt. Aus den Zellüberständen wurde im ELISA die IL-1 β -Freisetzung gemessen. Wie in Abb. 16 gezeigt, induzierte Nigericin in LPS-behandelten U937-Zellen erwartungsgemäß die IL-1 β -Freisetzung (Abb. 16, A). Die Anwesenheit von Nic, ACh, Cho oder PC hatte jeweils keinen Effekt auf die Nigericin-induzierte IL-1 β -Freisetzung (Abb. 16, A). Gleichermäßen hatte auch die Anwesenheit von RMPC oder NTHiPC

keinen Effekt auf die Nigericin-induzierte IL-1 β -Freisetzung (Abb. 16, B). Unmodifiziertes LOS RM oder NTHi hatte ebenfalls keinen Effekt (Abb. 16, B).

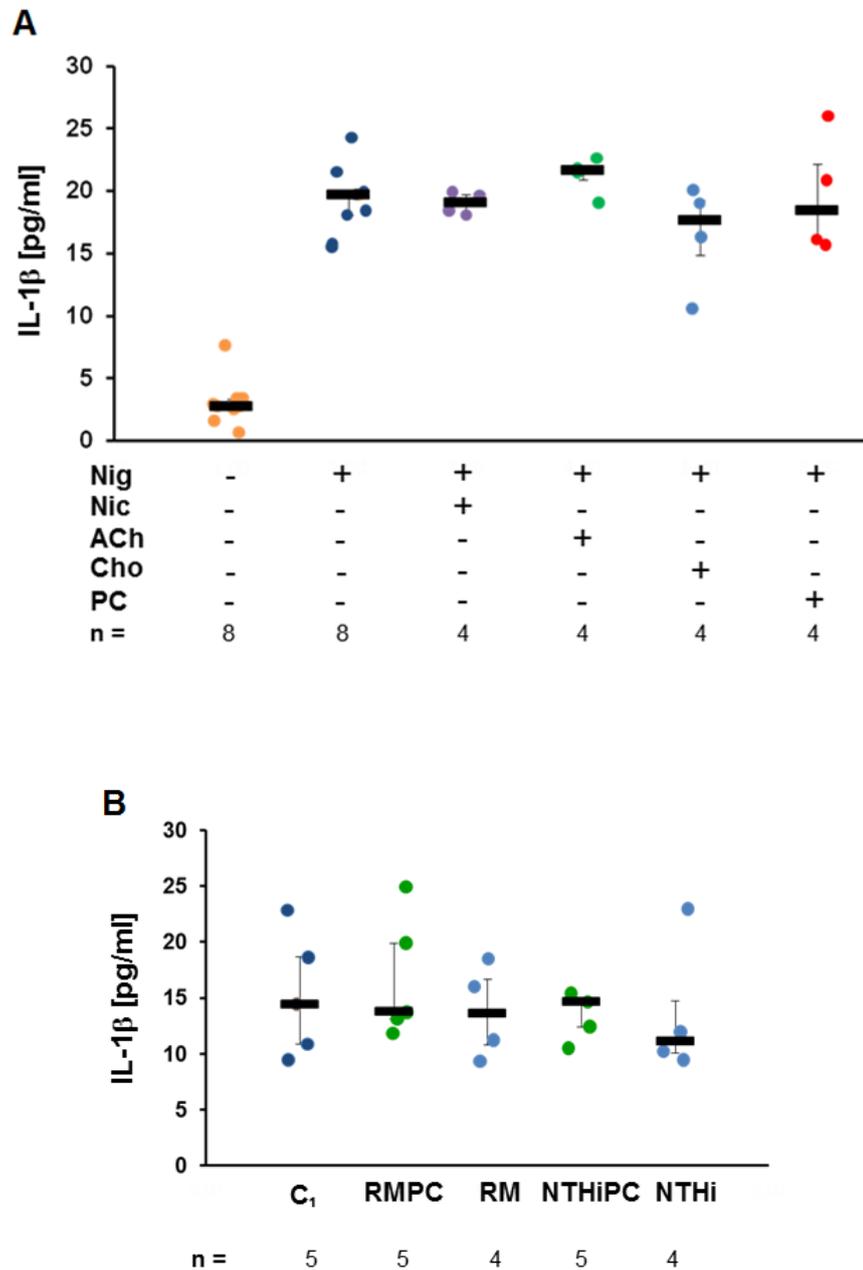


Abbildung 16: Die Interleukin (IL)-1 β -Konzentrationen nach Nigericin (Nig)-induzierter Freisetzung aus U937-Zellen in Anwesenheit von Agonisten nikotinischer Acetylcholinrezeptoren (nAChR). Nigericin induzierte die IL-1 β -Freisetzung aus Lipopolysaccharid (LPS)-behandelten U937-Zellen (A und B, C₁). Die Anwesenheit von Nikotin (Nic), Acetylcholin (ACh), Cholin (Cho) oder Phosphocholin (PC) hatte keinen Effekt auf die Nigericin-induzierte IL-1 β -Freisetzung (A). Die Anwesenheit von PC-modifiziertem LOS aus den *Haemophilus influenzae*-Stämmen RM118 (RMPC) und NTHi1233 (NTHiPC) hatte ebenfalls keinen Effekt auf die Nigericin-induzierte IL-1 β -Freisetzung (B). Unmodifiziertes LOS (RM und

NTHi) hatte keinen Einfluss auf die Nigericin-induzierte IL-1 β -Freisetzung (B). Die statistische Auswertung erfolgte durch den Kruskal-Wallis-Test, gefolgt vom Mann-Whitney-U-Test. Gezeigt sind die einzelnen Messdatenpunkte, als Balken der Median und die 25 %- sowie die 75 %-Perzentile.

4.2 PBMCs

Aus gesunden, männlichen, nichtrauchenden Spendern wurden wie unter 3.2.1 beschriebenen PBMCs isoliert. Die isolierten PBMCs zeigten nach 3 h Inkubation bei 37 °C, 5 % CO₂ in der RT-PCR bereits die mRNA-Expression von pro-IL-1 β (*IL1B*), ohne vorherige Stimulation der Zellen mit LPS (Abb. 17). Außerdem war die mRNA-Expression der nAChR-Untereinheiten α 7 (*CHRNA7*), α 9 (*CHRNA9*) und α 10 (*CHRNA10*) nachweisbar (Abb. 17). Die in Abb. 17 im gefärbten Gel dargestellten Banden entsprachen für *IL1B* mit 133 bp, für *CHRNA7* mit 142 bp, für *CHRNA9* mit 116 bp und für *CHRNA10* mit 121 bp den erwarteten Produktlängen. Die inaktive humane Duplikatform *CHRFAM7A* wurde zur Vollständigkeit mit einer erwarteten Bande bei 102 bp nachgewiesen. Als Positivkontrolle wurden HeLa-Zellen verwendet, für die alle Banden entsprechend nachgewiesen werden konnten. Als Negativkontrolle wurde RNase-freies Wasser eingesetzt, das keine Bande zeigte.

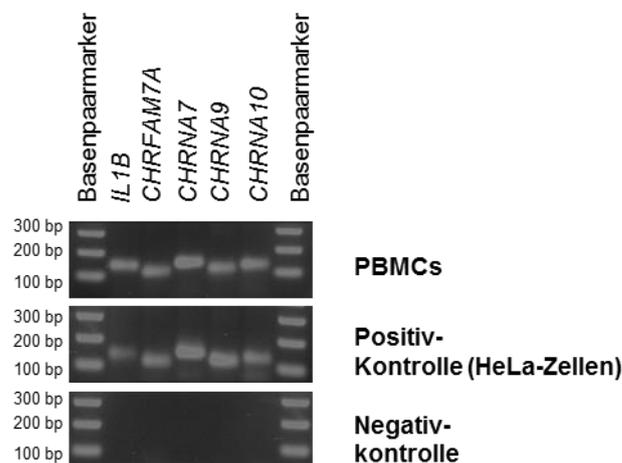


Abbildung 17: Die mRNA-Expression von pro-Interleukin (IL)-1 β (*IL1B*) und den nikotinischen Acetylcholinrezeptor (nAChR) Untereinheiten α 7 (*CHRNA7*), α 9 (*CHRNA9*) und α 10 (*CHRNA10*) in humanen mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMCs). In unbehandelten PBMCs wurde mittels RT-PCR die mRNA-Expression im gefärbten Gel mit Banden für *IL1B* bei 133 bp, für *CHRNA7* bei 142 bp, für *CHRNA9* bei 116 bp und für *CHRNA10* bei 121 bp nachgewiesen. Das inaktive humane *CHRFAM7A* zeigte eine Bande bei 102 bp. Für die Positivkontrolle (HeLa-Zellen) wurden alle Banden entsprechend nachgewiesen. Die Negativkontrolle (RNase-freies Wasser) zeigte keine Banden.

In Stimulationsexperimenten konnte mit BzATP eine IL-1 β -Freisetzung aus den PBMCs induziert werden, die mittels ELISA aus den Zellüberständen quantitativ gemessen wurde (Median: 1559 pg/ml, Minimum: 736 pg/ml, Maximum: 7325 pg/ml, n=5). Die zusätzliche Anwesenheit der nAChR-Agonisten ACh oder Nic führte zu einer signifikanten Hemmung der BzATP-induzierten IL-1 β -Freisetzung ($p \leq 0,001$). Die ELISA-Ergebnisse sind in Abb. 18 dargestellt. Die IL-1 β -Freisetzung ist als prozentualer Anteil der BzATP-induzierten IL-1 β -Freisetzung angegeben, welche als 100 % definiert wurde.

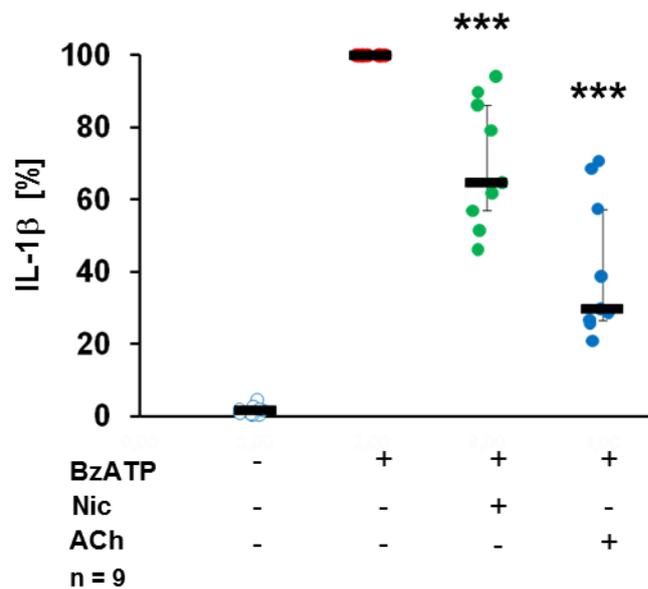


Abbildung 18: Normalisierte Interleukin (IL)-1 β -Konzentration nach BzATP-induzierter Freisetzung aus humanen mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMCs) in Anwesenheit von Agonisten nikotinischer Acetylcholinrezeptoren (nAChRs). 2'(3')-O-(4-Benzoylbenzoyl)adenosin 5'-triphosphat (BzATP) induzierte die IL-1 β -Freisetzung aus unbehandelten, zuvor für 3 h bei 37 °C, 5 % CO₂ inkubierten PBMCs. Die nAChR-Agonisten Nikotin (Nic) und Acetylcholin (ACh) hemmten jeweils signifikant die BzATP-induzierte IL-1 β -Freisetzung. Die IL-1 β -Freisetzung ist als prozentualer Anteil der BzATP-induzierten IL-1 β -Freisetzung dargestellt, die als 100 % definiert wurde. Die statistische Auswertung erfolgte durch den Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test. Gezeigt sind die einzelnen Messdatenpunkte, als Balken der Median und die 25 %- sowie die 75 %-Perzentile. *** $p \leq 0,001$.

4.3 CD14⁺ primäre humane Monozyten

Aus isolierten PBMCs wurden wie unter 3.3.1 beschrieben die CD14⁺ Monozyten separiert. Die isolierten, nicht mit LPS behandelten CD14⁺ Monozyten zeigten nach 3 h Inkubation bei 37 °C, 5 % CO₂ eine spontane IL-1 β -Freisetzung (Median: 105 pg/ml,

Minimum: 22 pg/ml, Maximum: 181 pg/ml, n=6). Durch anschließende Stimulation mit BzATP konnte eine verstärkte IL-1 β -Freisetzung aus den CD14⁺ Monozyten induziert werden (Median: 5.088 pg/ml, Minimum: 1.058 pg/ml, Maximum: 14.907 pg/ml, n=6) (Abb. 19). Die zusätzliche Anwesenheit der nAChR-Agonisten Nic, ACh oder Cho zeigte eine signifikante Hemmung der BzATP-induzierten IL-1 β -Freisetzung (Abb. 19; p \leq 0,01). Gleichmaßen führte auch die zusätzliche Anwesenheit von PC zu einer signifikanten Hemmung der BzATP-induzierten IL-1 β -Freisetzung (Abb. 19; p \leq 0,01). Die IL-1 β -Freisetzung ist als prozentualer Anteil der BzATP-induzierten IL-1 β -Freisetzung angegeben, welche als 100 % definiert wurde.

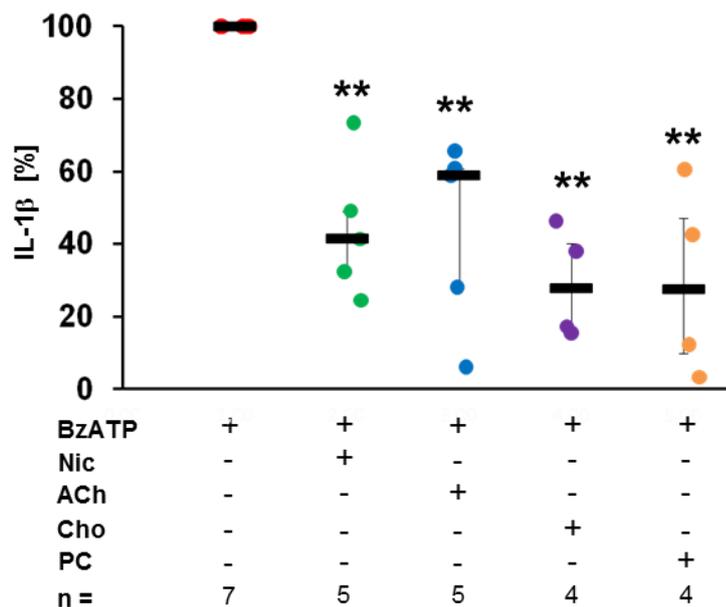


Abbildung 19: Normalisierte Interleukin (IL)-1 β -Konzentration nach BzATP-induzierter Freisetzung aus CD14⁺ primären humanen Monozyten in Anwesenheit von Agonisten nikotinischer Acetylcholinrezeptoren (nAChR) und Phosphocholin (PC). 2'(3')-O-(4-Benzoylbenzoyl)adenosin 5'-triphosphat (BzATP) induzierte die IL-1 β -Freisetzung aus unbehandelten, zuvor für 3 h bei 37 °C, 5 % CO₂ inkubierten CD14⁺ Monozyten. Die nAChR-Agonisten Nikotin (Nic), Acetylcholin (ACh) und Cholin (Cho) hemmten jeweils signifikant die BzATP-induzierte IL-1 β -Freisetzung. Gleichmaßen hemmte auch Phosphocholin (PC) signifikant die BzATP-induzierte IL-1 β -Freisetzung. Die IL-1 β -Freisetzung ist als prozentualer Anteil der BzATP-induzierte IL-1 β -Freisetzung dargestellt, die als 100 % definiert wurde. Die statistische Auswertung erfolgte durch den Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test. Gezeigt sind die einzelnen Messdatenpunkte, als Balken der Median und die 25 %- sowie die 75 %-Perzentile. ** p \leq 0,01.

4.4 Intravasale mononukleäre Leukozyten aus allogen transplantierten Rattennieren

Intravasale mononukleäre Leukozyten aus allogen transplantierten Rattennieren wurden wie unter 3.4 beschrieben aus Organperfusaten isoliert und *ex vivo* stimuliert. Mittels RT-PCR wurde nach 3 h Inkubation bei 37 °C und 5 % CO₂ die vorhandene mRNA-Expression für pro-IL-1 β (*Il1b*) sowie für die nAChR-Untereinheiten α 7 (*Chrna7*), α 9 (*Chrna9*) und α 10 (*Chrna10*) nachgewiesen. Die in Abb. 20 im gefärbten Gel dargestellten Banden entsprachen für *Il1b* mit 101 bp, für *Chrna7* mit 173 bp, für *Chrna9* mit 119 bp und für *Chrna10* mit 124 bp den erwarteten Produktlängen. Die inaktive humane *CHRFAM7A* Duplikatform *CHRFAM7A* wurde zur Vollständigkeit geprüft, es zeigte sich jedoch keine Bande. Als Positivkontrolle wurde RNA der Haut verwendet, in der die Banden für *Chrna7*, *Chrna9* und *Chrna10* nachgewiesen werden konnten. Als Negativkontrolle wurde RNase-freies Wasser eingesetzt, das keine Bande zeigte.

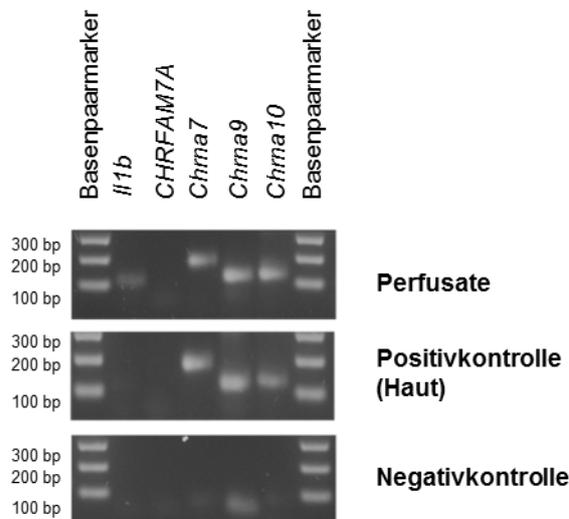


Abbildung 20: Die mRNA-Expression von pro-Interleukin (IL)-1 β (*Il1b*) und den nikotinischen Acetylcholinrezeptor (nAChR)-Untereinheiten α 7 (*Chrna7*), α 9 (*Chrna9*) und α 10 (*Chrna10*) in intravasalen mononukleären Leukozyten aus allogen transplantierten Rattennieren (Perfusate der Blutgefäße). Mittels RT-PCR wurde die mRNA-Expression im gefärbten Gel mit Banden für *Il1b* bei 101 bp, für *Chrna7* bei 173 bp, für *Chrna9* bei 119 bp und für *Chrna10* bei 124 bp nachgewiesen. Das inaktive humane *CHRFAM7A* zeigte keine Bande. Die Positivkontrolle (Haut) zeigte die Banden für *Chrna7*, *Chrna9* und *Chrna10*. Die Negativkontrolle (RNase-freies Wasser) zeigte keine Banden. Die unten randnah sichtbaren Banden sind vermutlich Primerdimere.

Die unbehandelten Zellen zeigten eine spontane IL-1 β -Freisetzung (Median: 32 pg/ml, Minimum: 14 pg/ml, Maximum: 56 pg/ml, n=5). Durch die Stimulation mit BzATP konnte nur eine äußerst geringe, nicht signifikante IL-1 β -Freisetzung induziert werden (Median: 41 pg/ml, Minimum: 31 pg/ml, Maximum: 71 pg/ml, n=5). In zusätzlicher Anwesenheit von AChE konnte hingegen ein signifikanter Anstieg der BzATP-induzierten IL-1 β -Freisetzung detektiert werden (Median: 71 pg/ml, Minimum: 44 pg/ml, Maximum: 116 pg/ml, n=5) (Abb. 21; $p \leq 0,05$).

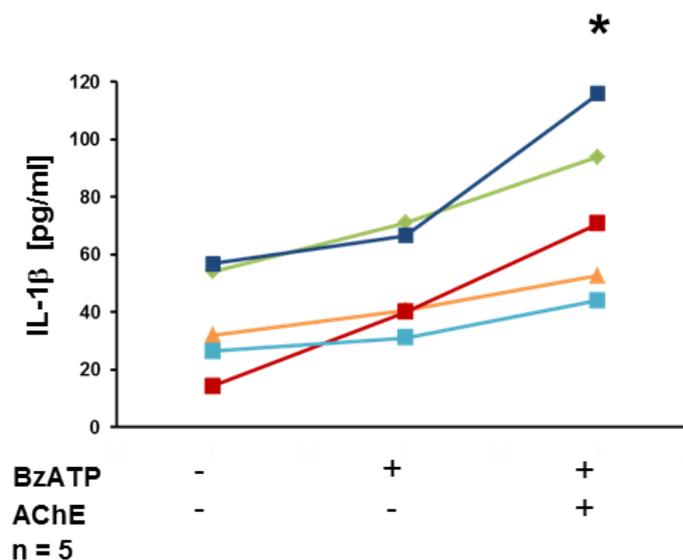


Abbildung 21: Die Interleukin (IL)-1 β -Konzentration nach Freisetzung aus intravasalen mononukleären Leukozyten aus allogenen transplantierten Rattennieren in An- und Abwesenheit von BzATP und Acetylcholinesterase (AChE). Die unbehandelten Zellen zeigten eine spontane IL-1 β -Freisetzung. 2'(3')-O-(4-Benzoylbenzoyl)adenosin 5'-triphosphat (BzATP) induzierte die IL-1 β -Freisetzung im Vergleich zu unbehandelten Zellen nur gering. In zusätzlicher Anwesenheit von AChE stieg die BzATP-induzierte IL-1 β -Freisetzung signifikant an. Die statistische Auswertung erfolgte durch den Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test. Gezeigt sind die einzelnen Messdatenpunkte. * $p \leq 0,05$ versus BzATP allein.

4.5 Zellviabilität

In einigen der gewonnenen Zellüberstände der unter 3.1 bis 3.4 beschriebenen Experimente wurde die Zellviabilität indirekt über die Enzymaktivität der LDH gemessen. Die LDH-Freisetzung ist nachfolgend jeweils als prozentualer Anteil der totalen LDH-Freisetzung angegeben. Tab. 6 zeigt die LDH-Freisetzung aus stimulierten U937-Zellen (siehe 3.1.2), Tab. 7 zeigt die LDH-Freisetzung aus stimulierten PBMCs (siehe 3.2.2),

Tab. 8 zeigt die LDH-Freisetzung aus stimulierten CD14⁺ Monozyten (siehe 3.3.2) und Tab. 9 zeigt die LDH-Freisetzung aus stimulierten intravasalen mononukleären Leukozyten aus allogenen transplantierten Rattennieren (siehe 3.4.2).

Tabelle 6: LDH-Freisetzung (als prozentualer Anteil der totalen LDH-Freisetzung) aus U937-Zellen nach Stimulation mit LPS, BzATP und Liganden nikotinischer Acetylcholinrezeptoren oder Substanzen mit einer Phosphocholingruppe.

Substanzen	Mittelwert ± SD	n
-	3,4 ± 2,2 %	23
LPS	5,6 ± 3,7 %	23
LPS, BzATP	9,1 ± 2,2 %	4
LPS, BzATP, ACh 0,01 µM	8,4 ± 2,2 %	4
LPS, BzATP, ACh 0,1 µM	8,3 ± 2,3 %	4
LPS, BzATP, ACh 1 µM	9,7 ± 2,4 %	4
LPS, BzATP, ACh 10 µM	9,6 ± 2,6 %	4
LPS, BzATP, Nic 0,1 µM	1,5 ± 1,0 %	4
LPS, BzATP, Nic 1 µM	1,5 ± 0,8 %	3
LPS, BzATP, Nic 10 µM	2,2 ± 1,2 %	3
LPS, BzATP, Nic 100 µM	2,0 ± 0,6 %	3
LPS, BzATP, Cho 1 µM	4,0 ± 1,5 %	4
LPS, BzATP, Cho 10 µM	3,6 ± 0,9 %	4
LPS, BzATP, Cho 100 µM	3,3 ± 0,8 %	4
LPS, BzATP, Cho 1000 µM	4,0 ± 1,2 %	4
LPS, BzATP, PC 1 µM	3,8 ± 0,9 %	4
LPS, BzATP, PC 10 µM	3,2 ± 1,4 %	4
LPS, BzATP, PC 100 µM	3,3 ± 1,2 %	4
LPS, BzATP, PC 1000 µM	3,0 ± 0,9 %	4
LPS, BzATP, RMPC 0,01 µg/ml	2,5 ± 1,2 %	4
LPS, BzATP, RMPC 0,1 µg/ml	2,4 ± 1,0 %	4
LPS, BzATP, RMPC 1 µg/ml	2,4 ± 0,9 %	4

LPS, BzATP, RMPC 10 µg/ml	2,7 ± 1,7 %	4
LPS, BzATP, RM 0,01 µg/ml	2,1 ± 0,6 %	4
LPS, BzATP, RM 0,1 µg/ml	2,2 ± 0,7 %	4
LPS, BzATP, RM 1 µg/ml	2,3 ± 1,0 %	4
LPS, BzATP, RM 10 µg/ml	2,5 ± 1,5 %	4
LPS, BzATP, NTHiPC 0,01 µg/ml	2,0 ± 0,7 %	4
LPS, BzATP, NTHiPC 0,1 µg/ml	2,1 ± 0,6 %	4
LPS, BzATP, NTHiPC 1 µg/ml	1,8 ± 0,9 %	4
LPS, BzATP, NTHiPC 10 µg/ml	2,4 ± 0,9 %	4
LPS, BzATP, NTHi 0,01 µg/ml	2,0 ± 1,0 %	4
LPS, BzATP, NTHi 0,1 µg/ml	2,0 ± 1,0 %	4
LPS, BzATP, NTHi 1 µg/ml	2,0 ± 1,2 %	4
LPS, BzATP, NTHi 10 µg/ml	2,4 ± 1,1 %	4

LDH = Laktatdehydrogenase; LPS = Lipopolysaccharid; BzATP = 2'(3')-O-(4-Benzoylbenzoyl)adenosin 5'-triphosphat; ACh = Acetylcholin; Nic = Nikotin; Cho = Cholin; PC = Phosphocholin; RMPC = PC-modifiziertes Lipooligosaccharid (LOS) aus dem *Haemophilus influenzae*-Stamm RM118; RM = LOS des *lic1*-mutanten Stammes RM7004-Lic1; NTHiPC = PC-modifiziertes LOS aus dem *Haemophilus influenzae*-Stamm NTHi1233; NTHi = LOS des *lic1*-mutanten Stammes NTHi1233*lic1*.

Tabelle 7: LDH-Freisetzung (als prozentualer Anteil der totalen LDH-Freisetzung) aus PBMCs nach Stimulation mit BzATP und Liganden nikotinischer Acetylcholinrezeptoren.

Substanzen	Mittelwert ± SD	n
-	5,1 ± 3,4 %	5
BzATP	4,6 ± 2,0 %	5
BzATP, ACh	4,8 ± 2,4 %	5
BzATP, Nic	3,3 ± 1,1 %	5

LDH = Laktatdehydrogenase; BzATP = 2'(3')-O-(4-Benzoylbenzoyl)adenosin 5'-triphosphat; ACh = Acetylcholin; Nic = Nikotin.

Tabelle 8: LDH-Freisetzung (als prozentualer Anteil der totalen LDH-Freisetzung) aus CD14⁺ Monozyten nach Stimulation mit BzATP und Liganden nikotinischer Acetylcholinrezeptoren oder Substanzen mit Phosphocholingruppe.

Substanzen	Mittelwert ± SD	n
-	3,9 ± 2,6 %	6
BzATP	3,3 ± 3,7 %	6
BzATP, ACh	6,2 ± 3,5 %	3
BzATP, Nic	4,7 ± 2,9 %	3
BzATP, Cho	2,8 ± 1,3 %	5
BzATP, PC	3,0 ± 2,7 %	5

LDH = Laktatdehydrogenase; BzATP = 2'(3')-O-(4-Benzoylbenzoyl)adenosin 5'-triphosphat; ACh = Acetylcholin; Nic = Nikotin; Cho = Cholin; PC = Phosphocholin.

Tabelle 9: LDH-Freisetzung (als prozentualer Anteil der totalen LDH-Freisetzung) aus intravasalen mononukleären Leukozyten aus allogenen transplantierten Rattennieren nach Stimulation mit BzATP und AChE.

Substanzen	Mittelwert ± SD	n
-	10,4 ± 5,2 %	4
BzATP	11,5 ± 4,7 %	4
BzATP, AChE	10,0 ± 4,5 %	4

LDH = Laktatdehydrogenase ; BzATP = 2'(3')-O-(4-Benzoylbenzoyl)adenosin 5'-triphosphat; AChE = Acetylcholinesterase.

5 Diskussion

Cholinerge Mechanismen im Immunsystem sind seit langem bekannt. Mit dem „cholinergen antiinflammatorischen Reflex“ wurde ein neuronaler cholinerg antiinflammatorischer Mechanismus beschrieben (21, 158, 201). In vielen Arbeiten wurden jedoch auch non-neuronale cholinerge Mechanismen im Immunsystem ohne Beteiligung des Nervensystems detektiert (16, 67, 116). Für cholinerge antiinflammatorische Mechanismen wird in der Literatur hauptsächlich eine Beteiligung des $\alpha 7$ -nAChR postuliert (158, 212). Hecker et al. konnten zeigen, dass während der akuten Transplantatabstoßungsreaktion ACh von intravasalen mononukleären Leukozyten in allogenen transplantierten Rattennieren produziert wird (94). Rund 70 % dieser Zellen konnten als Monozyten identifiziert werden (94). *In vitro*-Messungen der intrazellulären Calciumkonzentration dieser Zellen zeigten einen Anstieg der Calciumkonzentration nach Stimulation mit ATP. In Anwesenheit eines nAChR-Antagonisten wurde der ATP-induzierte Anstieg der Calciumkonzentration jedoch deutlich verstärkt (94). ATP induziert als DAMP bekanntermaßen die Inflammation, was zur Synthese und Freisetzung von Zytokinen wie IL-1 β führt (110, 136, 139, 185). In dieser Arbeit wurden diese Aspekte zusammengeführt und der Effekt von ACh und anderen nAChR-Agonisten auf die ATP-induzierte IL-1 β -Freisetzung aus Monozyten untersucht. Dafür wurde die Zelllinie U937 verwendet, für die monozytäre Eigenschaften beschrieben sind (193). Da für PC-modifizierte Moleküle, wie sie von verschiedenen Bakterien und Parasiten synthetisiert werden, antiinflammatorische Effekte bekannt sind (34), wurden auch PC und PC-modifizierte Moleküle eingesetzt.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die nAChR-Liganden ACh, Nic und Cho sowie außerdem PC und PC-modifizierte Moleküle die BzATP-induzierte IL-1 β -Freisetzung aus Monozyten signifikant hemmen. Das verwendete BzATP ist ein P2X7-Ligand und ein ATP-Analogon (nachfolgend werden die Begrifflichkeiten BzATP und ATP zu Vereinfachung gleichbedeutend verwendet). Die Nigericin-induzierte IL-1 β -Freisetzung hingegen blieb von den konventionellen und den neu entdeckten nAChR-Agonisten uneinträchtigt. Der hemmende Effekt konnte durch die nAChR-Antagonisten Mec, α -Bun und Stry wieder aufgehoben werden, was auf eine Beteiligung der nAChR-Untereinheiten $\alpha 7$, $\alpha 9$ und $\alpha 10$ hinweist. Dies wurde durch die Herunterregulation der Expression dieser Untereinheiten per siRNA bestätigt. Der hemmende Effekt von nAChR-Agonisten auf die ATP-induzierte IL-1 β -Freisetzung konnte weiterhin auch an primären humanen PBMCs und CD14⁺ Monozyten gezeigt werden. In intravasalen mononukleären

Leukozyten aus allogenen transplantierten Rattennieren konnte eine ATP-induzierte IL-1 β -Freisetzung nur in Anwesenheit von AChE provoziert werden, was auf eine autokrine und/oder parakrine Hemmung der ATP-induzierten IL-1 β -Freisetzung durch endogenes ACh hinweist. Nachfolgend sollen diese Ergebnisse diskutiert und bewertet werden.

5.1.1 NACHR-Agonisten hemmen die ATP-induzierte IL-1 β -Freisetzung aus U937-Zellen

Um die Hypothese zu prüfen, dass ACh und andere nAChR-Agonisten einen hemmenden Effekt auf die ATP-induzierte IL-1 β -Freisetzung aus Monozyten haben, wurde zunächst die monozytäre Zelllinie U937 verwendet und die Inflammasom-abhängige IL-1 β -Freisetzung induziert. Hierzu sind wie unter 1.1.3 beschrieben zwei konsekutive Signale notwendig (126, 139, 185). Zum *Priming* der Zellen wurde LPS verwendet, was zu einer gesteigerten mRNA-Expression von pro-IL-1 β (*IL1B*) führte, nicht jedoch zu einer vermehrten IL-1 β -Freisetzung (siehe 4.1.1, Abb. 9 und 4.1.2, Abb.10). Erwartungsgemäß führte erst die Stimulation mit ATP als zweitem Signal zu einer signifikanten IL-1 β -Freisetzung (siehe 4.1.2, Abb. 10). Dies entspricht der in der Literatur hinreichend beschriebenen P2X7R-vermittelten ATP-induzierten Bildung des Inflammasoms, die dann durch das aktive Inflammasom vermittelt zu einer IL-1 β -Freisetzung führt (110, 136, 139, 185). Die ATP-induzierte IL-1 β -Freisetzung bildet die Basis der Experimente und wurde bei jedem Experiment als Kontrollansatz mitgeführt. In Anwesenheit von ACh konnte eine dosisabhängige Hemmung der ATP-induzierten IL-1 β -Freisetzung beobachtet werden (siehe 4.1.2, Abb. 10). Dieser Effekt zeigte sich gleichermaßen in Anwesenheit von Cho oder Nic. Die Zellviabilität der stimulierten Zellen wurde indirekt über die LDH-Freisetzung bestimmt. Der Zelltod lag im Mittel unter 10 % (siehe 4.5, Tab. 6). Dies erlaubt den Rückschluss, dass die beobachteten IL-1 β -Freisetzungen nicht durch Zytotoxizität der eingesetzten Substanzen zu begründen sind. Die Hypothese, dass ACh und andere nAChR-Agonisten die ATP-induzierte IL-1 β -Freisetzung aus Monozyten hemmen, konnte für U937-Zellen bestätigt werden. Für ACh als *in vivo* vorkommender nAChR-Agonist kann somit ein direkter antiinflammatorischer Effekt auf Monozyten gezeigt werden.

Um zu überprüfen, auf welcher Ebene der Signalkaskade die nAChR-Agonisten die ATP-induzierte IL-1 β -Freisetzung aus Monozyten regulieren, wurde die Inflammasom-abhängige IL-1 β -Freisetzung aus Monozyten alternativ zu ATP mit Nigericin induziert. Wie

einleitend unter 1.1.3 dargestellt, ist Nigericin ein porenbildendes Toxin und ein bekannter Stimulus der Inflammasombildung (101, 136, 151, 164). Erwartungsgemäß konnte die IL-1 β -Freisetzung aus LPS-geprimeten U937-Zellen mit Nigericin induziert werden (siehe 4.1.6, Abb. 16, A und B). In Anwesenheit der nAChR-Agonisten ACh, Cho oder Nic konnte jedoch keine Hemmung der Nigericin-induzierten IL-1 β -Freisetzung erzielt werden (Abb. 16, A). Dieses Ergebnis zeigt, dass eine ATP-unabhängige Nigericin-induzierte IL-1 β -Freisetzung aus Monozyten durch nAChR-Agonisten nicht beeinflusst wird. Dies erlaubt den Rückschluss, dass die Bildung des Inflammasoms *per se* durch Ligandenbindung am nAChR in Monozyten offenbar nicht beeinflusst wird. Daraus resultiert die Hypothese, dass die Hemmung der Inflammasom-abhängigen IL-1 β -Freisetzung durch nAChR-Agonisten möglicherweise über eine Rezeptorinteraktion zwischen P2X7R und nAChR reguliert wird und die Ionenkanalfunktion des P2X7R gehemmt wird. Diese Hypothese stützt sich auf die vorangehenden Ergebnisse von Hecker et al. und Mikulski et al. (94, 150). Wie einleitend unter 1.2.3 und 1.2.4 erläutert, konnte in beiden Arbeiten über Messungen des ATP-induzierten intrazellulären Anstiegs der Calciumkonzentration ein Effekt für ACh und Nic auf die ATP-induzierten Signale in Monozyten/Makrophagen der Ratte gezeigt werden (94, 150). Dies wurde als antiinflammatorischer Effekt diskutiert. Da nAChR-Agonisten allein keinen Calciumkonzentrationsanstieg induzierten, spekulierten die Autoren, dass diese nAChR in Monozyten/Makrophagen der Ratte metabotrop funktionieren (94, 150). Für nAChR, die klassischerweise ionotrope Rezeptoren sind, sind metabotrope Funktionen bereits vorbeschrieben (41, 119, 171, 194, 227, 228).

Dieses Ergebnis und die resultierende Hypothese ergänzen die Ergebnisse einiger anderer Arbeiten (192, 222). Yoshikawa et al. postulierten, dass antiinflammatorische $\alpha 7$ -vermittelte Nic-Effekte in Monozyten auf transkriptionaler Ebene stattfinden (222). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit weisen darauf hin, dass unter den hier untersuchten experimentellen Bedingungen, die transkriptionale Ebene sowie die Bildung des Inflammasoms durch antiinflammatorische Effekte der nAChR-Agonisten nicht beeinflusst werden. Das liegt vermutlich daran, dass der Einfluss der nikotinischen Agonisten auf die Transkription nicht innerhalb von einer halben Stunde zum Tragen kommt. Vielmehr scheint die Aktivierung des nAChR die Ionenkanalfunktion des P2X7R zu hemmen. Diese Effekte könnten parallel oder hintereinander mit den in anderen Arbeiten beschriebenen Effekten auf transkriptionaler Ebene ablaufen.

Für neuronale Zellen ist eine Interaktion zwischen ATP-Rezeptoren und nAChR in der Literatur bereits beschrieben (118, 188), daher ist eine direkte Interaktion des P2X7R mit nAChR auch in non-neuronalen Zellen denkbar und müsste in weiteren experimentellen Untersuchungen geprüft werden. Der dargestellte nAChR-vermittelte Effekt auf andere Inflammation-abhängige Zytokine wie IL-18 sowie auf Inflammation-unabhängige Zytokine wie IL-6 oder TNF- α müsste untersucht werden (dazu siehe 5.1.7). Die ATP-unabhängige IL-1 β -Freisetzung aus Monozyten könnte zudem mit weiteren Stimulatoren der Inflammation-bildung induziert und der hemmende nAChR-vermittelte Effekt auf die Inflammation-abhängige IL-1 β -Freisetzung geprüft werden.

5.1.2 Die nAChR-Untereinheiten $\alpha 7$, $\alpha 9$ und $\alpha 10$ vermitteln die Hemmung der ATP-induzierten IL-1 β -Freisetzung aus U937-Zellen

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass der nAChR-Agonist Cho die ATP-induzierte IL-1 β -Freisetzung aus Monozyten hemmt (siehe 4.1.2). Cho ist ein selektiver Agonist des $\alpha 7$ -nAChR sowie des $\alpha 9$ -nAChR (7, 160, 167, 210), der mit dem $\alpha 10$ -nAChR im Komplex vorliegen und α -Heteropentamere bilden kann (16, 63, 116, 190). Dies kann als pharmakologischer Hinweis auf die mögliche Beteiligung der nAChR-Untereinheiten $\alpha 7$ und/oder $\alpha 9/\alpha 10$ am gezeigten antiinflammatorischen Effekt interpretiert werden. Wie einleitend unter 1.2.3 und 1.2.4 erläutert, werden nAChR-vermittelte antiinflammatorische Effekte in der Literatur häufig dem $\alpha 7$ -nAChR zugeschrieben (21, 163, 201, 212). Andere Arbeiten konnten nAChR-vermittelte antiinflammatorische Effekte auch $\alpha 7$ -nAChR-unabhängig zeigen (141). Mikuskli et al. konnten Hinweise für eine Beteiligung der $\alpha 9/\alpha 10$ -nAChR an antiinflammatorischen Effekten zeigen (150). Daher wurden in dieser Arbeit die U937-Zellen auf Expression der nAChR-Untereinheiten $\alpha 7$ (*CHRNA7*), $\alpha 9$ (*CHRNA9*) und $\alpha 10$ (*CHRNA10*) geprüft. Sowohl in unbehandelten als auch in LPS-behandelten U937-Zellen konnte die Expression aller drei Untereinheiten nachgewiesen werden (siehe 4.1.3, Abb. 12). Dies entsprach Daten aus der Literatur, in denen die Expression von *CHRNA7*, *CHRNA9* und *CHRNA10* in U937-Zellen ebenfalls gezeigt werden konnten (31, 111).

Zur weiteren pharmakologischen Prüfung der Beteiligung der Untereinheiten $\alpha 7$ und $\alpha 9/\alpha 10$ an der nAChR-vermittelten Hemmung der ATP-induzierten IL-1 β -Freisetzung aus Monozyten wurden in Zellkulturexperimenten zusätzlich verschiedene spezifische nAChR-Antagonisten eingesetzt. Die IL-1 β -Freisetzung aus LPS-geprimeten U937-

Zellen wurde mit ATP in An- und Abwesenheit von Nic sowie der nAChR-Antagonisten Mec, α -Bun oder Stry induziert. Mec ist ein allgemeiner nAChR-Antagonist, während α -Bun und Stry spezifische $\alpha 7$ -nAChR- und $\alpha 9$ -nAChR-Antagonisten sind (10, 40, 65). In Anwesenheit von Mec, α -Bun oder Stry wurde der Nic-Effekt jeweils antagonisiert und somit die Hemmung der IL-1 β -Freisetzung aufgehoben (siehe 4.1.3, Abbildung 11). Dieses Ergebnis bestätigt eine Beteiligung der $\alpha 7$ - und/oder $\alpha 9$ -nAChR-Untereinheiten, die wie einleitend unter 1.2.1 beschrieben auch als Homopentamere vorliegen können. Da die $\alpha 10$ -nAChR-Untereinheiten wie beschrieben mit $\alpha 9$ -nAChR-Untereinheiten im Komplex vorliegen und reine α -Heteropentamere bilden können (16, 63, 116, 190), ist auch eine Beteiligung von koexprimierten $\alpha 9/\alpha 10$ -nAChR-Untereinheiten möglich. Denkbar wäre auch, dass die nAChR-Untereinheiten $\alpha 7$, $\alpha 9$ und $\alpha 10$ Heteromere bilden, wobei die Bildung von reinen Pentameren in monozytären Zellen noch nicht umfassend bewiesen ist.

Durch Transfektion spezifischer siRNA wurde die Expression von *CHRNA7*, *CHRNA9* oder *CHRNA10* in U937-Zellen herunterreguliert. Anschließend wurde der nAChR-vermittelte hemmende Effekt auf die ATP-induzierte IL-1 β -Freisetzung aus siRNA-transfizierten LPS-geprimeten U937-Zellen untersucht. Hier zeigte sich nach Herunterregulierung der Expression von *CHRNA7*, *CHRNA9* oder *CHRNA10* in allen Fällen jeweils ein signifikant verringerter Nic-Effekt (siehe 4.1.4, Abb. 13). Dieses Ergebnis bestätigt die oben beschriebene Schlußfolgerung aus Experimenten mit Cho und mit nAChR-Antagonisten, dass $\alpha 7$ -, $\alpha 9$ - und $\alpha 10$ -nAChR-Untereinheiten zur Hemmung der ATP-induzierten IL-1 β -Freisetzung aus LPS-geprimeten U937-Zellen beitragen. Es zeigt zudem, dass nicht nur eine nAChR-Untereinheit diese cholinerge Hemmung vermittelt, sondern dass alle drei untersuchten nAChR-Untereinheiten beteiligt sind. Dieses Ergebnis impliziert einerseits, dass der hier beschriebene antiinflammatorische cholinerge Effekt auch über die $\alpha 7$ -nAChR-Untereinheit vermittelt wird. Antiinflammatorische $\alpha 7$ -nAChR-vermittelte Effekte haben viele andere Arbeiten bereits gezeigt, doch handelt es sich dabei höchstwahrscheinlich um andere Mechanismen als in der vorliegenden Arbeit (21, 163, 201, 212). Andererseits zeigt dieses Ergebnis, dass ein antiinflammatorischer cholinergischer Effekt zugleich auch über $\alpha 9$ - und $\alpha 10$ -nAChR-Untereinheiten vermittelt wird und nicht nur die $\alpha 7$ -nAChR-Untereinheit von Bedeutung ist. Es bleibt zu spekulieren, wie die in die cholinerge Hemmung der ATP-induzierten IL-1 β -Freisetzung involvierten nAChR-Untereinheiten miteinander kooperieren und ob weitere nAChR-Untereinheiten auch eine

Rolle spielen. Diese Fragen müssten Gegenstand weiterer experimenteller und *in vivo*-Untersuchungen mit gendefizienten Tieren sein.

Aus der Schlußfolgerung, dass die Hemmung der ATP-induzierten IL-1 β -Freisetzung aus Monozyten durch die nAChR-Untereinheiten $\alpha 7$ und $\alpha 9/\alpha 10$ vermittelt wird, resultiert ein weiterer Aspekt. Der gezeigte hemmende Effekt konnte mit Nic induziert werden. Interessanterweise konnte Nic in vorbeschriebenen Daten an ionotropen $\alpha 9/\alpha 10$ -nAChR als Antagonist identifiziert werden (57, 135, 190, 210). Mit den Ergebnissen dieser Arbeit wird für Nic jedoch eine Funktion als nAChR-Agonist an den Untereinheiten $\alpha 7/\alpha 9/\alpha 10$ gezeigt. Hieraus lässt sich schließen, dass sich die monozytären nAChR deutlich von den klassischen ionotropen nAChR unterscheiden. Dies ergänzt die Ergebnisse von Hecker et al. und Mikulski et al. (siehe 1.2.4 und 5.1.1) (94, 150), sowie die Ergebnisse einiger anderer Arbeiten (41, 166, 171), in denen Hinweise auf metabotrope Funktionen von nAChR in Immunzellen beschrieben wurden. Ob ein Antagonist ionotroper nAChR an metabotropen nAChR als Agonist funktionieren kann (171) oder ob die nAChR-Untereinheiten in Komplexen vorliegen und nicht-klassische Funktionen aufweisen, bleibt zu spekulieren und muss Gegenstand weitere Untersuchungen sein (dazu siehe 5.1.7).

5.1.3 PC und PC-modifiziertes LOS aus *Haemophilus influenzae* hemmen die ATP-induzierte IL-1 β -Freisetzung aus U937-Zellen

Die Bildung des Inflammasoms spielt bei der Immunantwort des angeborenen Immunsystems auf PAMPs eine wichtige Rolle (siehe 1.1.3) (66, 139). Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen einen antiinflammatorischen Effekt der nAChR-Agonisten ACh, Nic und Cho auf die Inflammasom-vermittelte IL-1 β -Freisetzung aus U937-Zellen, die durch ATP induziert wird. Cho ist ein Baustein des PC. PC wird unter anderem von vielen Bakterien und Parasiten in Form PC-modifizierter Moleküle synthetisiert und zur Immunevasion benutzt (siehe 1.2.4) (34, 79). Über einen antiinflammatorischen Effekt PC-modifizierter Moleküle wird die Immunantwort des Wirtes gedämpft, die genauen Mechanismen sind allerdings noch unklar. In dieser Arbeit wurde die Hypothese geprüft, dass bakterielle PC-modifizierte Moleküle die ATP-induzierte IL-1 β -Freisetzung hemmen und PC für diesen Effekt verantwortlich ist.

Wie unter 3.1.2 beschrieben wurde dazu PC-modifiziertes LOS aus den beiden *Haemophilus influenzae*-Stämmen RM118 und NTHi1233 verwendet. Die Ergebnisse zeigen, dass sowohl RMPC als auch NTHiPC dosisabhängig die ATP-induzierte IL-1 β -

Freisetzung aus U937-Zellen hemmen (siehe 4.1.5; Abb. 15, A). Dieser Effekt war in Anwesenheit der nAChR-Antagonisten Mec, α -Bun und Stry aufgehoben (Abb. 15, B). Diese Ergebnisse erlauben den Rückschluss, dass der hemmende Effekt von RMPC und NTHiPC auf die ATP-induzierte IL-1 β -Freisetzung über die nAChR-Untereinheiten α 7, α 9 und/oder α 10 vermittelt wird. Unmodifiziertes RM und NTHi hatten hingegen keinen hemmenden Effekt auf die ATP-induzierte IL-1 β -Freisetzung (Abb. 15, A). Zur Überprüfung der Hypothese, dass PC diese Hemmung induziert, wurde der Effekt von ungebundenem PC sowie PC-modifiziertem BSA auf die ATP-induzierte IL-1 β -Freisetzung geprüft. PC und PC-BSA hemmten jeweils dosisabhängig die ATP-induzierte IL-1 β -Freisetzung aus U937-Zellen (siehe 4.1.5; Abb. 14, A). Dieser Effekt war ebenfalls in Anwesenheit der nAChR-Antagonisten Mec, α -Bun und Stry aufgehoben (Abb. 14, A). Unmodifiziertes BSA und HF-PC-BSA, bei dem die PC-Moleküle durch Behandlung mit HF entfernt wurden, hatten keinen Effekt (Abb. 14, B). Die Nigericin-induzierte IL-1 β -Freisetzung aus U937-Zellen blieb in Anwesenheit von PC (siehe 4.1.6, Abb. 16, A) sowie RMPC und NTHiPC (Abb. 16, B) unbeeinträchtigt. Die Zellviabilität der mit PC oder PC-modifiziertem LOS stimulierten Zellen wurde indirekt über die LDH-Freisetzung bestimmt. Der Zelltod lag im Mittel unter 10 % (siehe 4.5, Tab. 6). Dies erlaubt den Rückschluss, dass die beobachteten IL-1 β -Freisetzungen nicht durch Zytotoxizität der eingesetzten Substanzen zu begründen sind.

Zusammengefasst zeigen diese Ergebnisse, dass PC und PC-modifizierte Moleküle die ATP-induzierte IL-1 β -Freisetzung aus U937-Zellen hemmen. PC kann somit als nAChR-Agonist monozytärer Zellen identifiziert werden. Die Antagonisierbarkeit des PC-Effektes mit Mec, α -Bun und Stry legt wie unter 5.1.2 diskutiert eine Beteiligung der nAChR-Untereinheiten α 7 und α 9/ α 10 nah. Es darf weiterhin geschlußfolgert werden, dass PC den gezeigten antiinflammatorischen Effekt bakterieller PC-modifizierter Moleküle vermittelt, da die gleichen Moleküle ohne PC-Modifizierung keinen hemmenden Effekt auf die ATP-induzierte IL-1 β -Freisetzung hatten. Da PC und PC-modifizierte Moleküle nur die ATP-induzierte, nicht jedoch die Nigericin-induzierte IL-1 β -Freisetzung hemmen, scheint dieser Mechanismus die Inflammation *per se* nicht zu beeinflussen, sondern die Ionenkanalfunktion des P2X7R zu hemmen (wie entsprechend unter 5.1.1 diskutiert). Verschiedene Autoren postulieren eine Beteiligung des PAFR oder TLR4 (34, 37, 77, 78, 83, 189, 195) oder eine Vermittlung des antiinflammatorischen Effektes PC-modifizierter Moleküle über eine Verminderung Inflammation-unabhängiger Zytokine

(34, 77, 78). Die Ergebnisse dieser Arbeit liefern neue Hinweise auf einen antiinflammatorischen PC-Effekt, der über nAChRs vermittelt wird und möglicherweise über eine Interaktion mit dem P2X7R abläuft. In wie weit verschiedene Mechanismen parallel oder synergistisch ablaufen, bleibt Gegenstand zukünftiger Untersuchungen. Die Hemmung der ATP-induzierten IL-1 β -Freisetzung aus U937-Zellen wurde beispielhaft mit PC-modifiziertem LOS aus *Haemophilus influenzae*-Stämmen gezeigt. Die Ergebnisse erlauben die Schlußfolgerung, dass der gezeigte antiinflammatorische Effekt auch von anderen Bakterien und Parasiten, die PC-modifizierte Moleküle synthetisieren, zur Dämpfung der Immunantwort des Wirts genutzt werden könnte. Dies ist zum Verständnis pathophysiologischer Mechanismen von Relevanz und in der Folge hinsichtlich therapeutischer Ansätze bei bakteriellen oder parasitären Erkrankungen von klinischem Interesse.

5.1.4 NACHR-Agonisten hemmen die ATP-induzierte IL-1 β -Freisetzung aus primären humanen PBMCs und CD14⁺ Monozyten

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass verschiedene nAChR-Agonisten die ATP-induzierte IL-1 β -Freisetzung aus Monozyten hemmen. Dies wurde an der monozytären Zelllinie U937 untersucht. In weiteren Experimenten mit humanen PBMCs und CD14⁺ Monozyten wurde geprüft, ob dieser Effekt auch auf primäre humane Monozyten übertragbar ist. Die Zellen wurden aus Vollblut gesunder, männlicher, Nichtraucher isoliert. Die PBMCs zeigten nach Isolierung eine spontane mRNA-Expression des Vorläufermoleküls pro-IL-1 β (*IL1B*) (siehe 4.2; Abb. 17). Mit ATP konnte die IL-1 β -Freisetzung induziert werden, die in Anwesenheit von ACh oder Nic signifikant gehemmt werden konnte (Abb. 18). Die CD14⁺ Monozyten zeigten nach Separation eine spontane IL-1 β -Freisetzung, die mit ATP verstärkt wurde und in Anwesenheit von ACh, Nic und Cho signifikant gehemmt werden konnte (siehe 4.3; Abb. 19). Weiterhin konnte dieser hemmende Effekt in CD14⁺ Monozyten auch mit PC induziert werden (siehe 4.3; Abb. 19). Die Zellviabilität der stimulierten PBMCs und CD14⁺ Monozyten wurde indirekt über die LDH-Freisetzung bestimmt. Der Zelltod lag im Mittel unter 10 % (siehe 4.5, Tab. 7 und 8). Dies erlaubt den Rückschluss, dass die beobachteten IL-1 β -Freisetzungen nicht durch Zytotoxizität der eingesetzten Substanzen und/oder erhöhten Zelltod durch die Separationsprozeduren zu begründen sind. Diese Ergebnisse zeigen, dass sowohl die nAChR-Agonisten Ach, Nic und Cho, als auch PC als nAChR-Agonist in primären humanen CD14⁺ Monozyten wirken. Die für U937-Zellen gezeigte nAChR-vermittelte

Hemmung der ATP-induzierten IL-1 β -Freisetzung kann auch auf primäre humane PBMCs und CD14⁺ Monozyten übertragen werden.

In den humanen PBMCs wurde mRNA der nAChR-Untereinheiten $\alpha 7$ (*CHRNA7*), $\alpha 9$ (*CHRNA9*) und $\alpha 10$ (*CHRNA10*) exprimiert (siehe 4.2, Abb. 17). Die Idee liegt nah, dass diese nAChR-Untereinheiten, wie für U937-Zellen gezeigt (siehe 4.1.3 und 4.1.4, diskutiert in 5.1.2), den hemmenden Effekt der nAChR-Agonisten auf die ATP-induzierte IL-1 β -Freisetzung in PBMCs vermitteln. Diese Hypothese wird durch den pharmakologischen Hinweis gestützt, dass Cho als $\alpha 7$ - und $\alpha 9$ -nAChR-Agonist die ATP-induzierte IL-1 β -Freisetzung aus CD14⁺ Monozyten hemmt. Dies müsste in weiteren Experimenten mit spezifischen nAChR-Antagonisten untersucht werden. Weiterhin müsste geprüft werden, ob der gezeigte hemmende Effekt auf die IL-1 β -Freisetzung auch in einer ATP-unabhängigen Bildung des Inflammasoms induziert werden kann, oder ob auch in PBMCs und CD14⁺ Monozyten von einer Hemmung der P2X7R-Ionenkanalfunktion ausgegangen werden darf.

In der Literatur wird die Inflammasom-abhängige IL-1 β -Freisetzung über zwei konsekutive Signale beschrieben (45, 185, 139). Interessanterweise war in den beschriebenen Experimenten sowohl bei PBMCs als auch bei CD14⁺ Monozyten kein Priming mit LPS notwendig, sondern lediglich ATP als „zweites“ Signal induzierte eine verstärkte IL-1 β -Freisetzung. Eine mögliche Erklärung könnte sein, dass die primären humanen Zellen bei Separation aus dem Vollblut über die Dichtegradientenzentrifugation oder bei Inkubation in Plastikschalen bereits aktiviert werden (105, 117). Es kann spekuliert werden, auf welche Weise der gezeigte Effekt *in vivo* im Menschen eine Relevanz hat. Im Rahmen einer Immunantwort während einer Inflammationsreaktion werden Monozyten *in vivo* aktiviert und ein zweites Signal wie ATP kann dann die Inflammasombildung und vermehrte IL-1 β -Freisetzung induzieren (154). ATP kann hierbei im Rahmen von Infektion, Trauma oder Nekrose endogen freigesetzt werden und autokrin und/oder parakrin wirken (61, 154). Netea et al. zeigten abseits der sonstigen Anschauung der Inflammasom-abhängigen IL-1 β -Freisetzung, dass lediglich Makrophagen die beiden konsekutiven Signale benötigen (154). Monozyten hingegen benötigen zur Aktivierung und Zytokinfreisetzung nur ein Signal über PRRs (154). Dies geht einher mit der Beobachtung dieser Arbeit, dass primäre humane PBMCs und vorallem CD14⁺ Monozyten kein LPS-Priming benötigten. Die Zellen waren schon voraktiviert und zeigten eine spontane mRNA-Expression des pro-IL-1 β (*IL1B*), die CD14⁺ Monozyten sogar eine spontane IL-1 β -Freisetzung. ATP als

zweites Signal führte lediglich noch zu einer gesteigerten Induktion der IL-1 β -Freisetzung. Inwieweit die PBMCs und CD14⁺ Monozyten der in dieser Arbeit beschriebenen Experimente nach Isolierung makrophagenähnliche Eigenschaften annehmen und welche Rolle Voraktivierungen durch mechanische Stimuli, durch Pyrogenverunreinigungen der Blutabnahmesysteme oder Gradientenmaterialien bzw. die Gradientenmaterialien selbst spielen, bleibt somit in dieser Arbeit unbeantwortet und müsste in zukünftigen Experimenten genauer untersucht werden. Eine weitere zentrale Frage wäre zudem, ob ein autokriner antiinflammatorischer Mechanismus über endogen synthetisiertes ACh im Rahmen einer Immunantwort stattfindet, wie es an Monozyten der Ratte gezeigt wurde (94).

5.1.5 Während der akuten Transplantatabstoßungsreaktion endogen produziertes ACh hemmt die ATP-induzierte IL-1 β -Freisetzung aus intravasalen mononukleären Leukozyten aus allogenen transplantierten Rattennieren

Hecker et al. zeigten, dass während der akuten Transplantatabstoßungsreaktion intravasale mononukleäre Leukozyten aus allogenen transplantierten Rattennieren, wovon rund 70 % Monozyten sind, endogen ACh produzieren (94). Weiterhin konnte *in vitro* ein ATP-induzierter intrazellulärer Calciumkonzentrationsanstieg in intravasalen mononukleären Leukozyten aus allogenen transplantierten Rattennieren durch den nAChR-Antagonisten Methyllycaconitin verstärkt werden (94). Dies führte zur in dieser Arbeit geprüften Hypothese, dass endogen synthetisiertes ACh autokrin und/oder parakrin die ATP-induzierte IL-1 β -Freisetzung hemmen könnte. Intravasale mononukleäre Leukozyten aus allogenen transplantierten Rattennieren wurden aus Organperfusaten isoliert. Eine mRNA-Expression des Vorläufermoleküls pro-IL-1 β (*Il1b*) konnte erwartungsgemäß ohne vorheriges LPS-Priming nachgewiesen werden (siehe 4.4; Abb. 20), da die mononukleären Leukozyten (darunter der größte Teil Monozyten) *in vivo* im Rahmen der beginnenden akuten Transplantatabstoßungsreaktion bereits aktiviert wurden. ATP induzierte nur eine sehr geringe IL-1 β -Freisetzung im Vergleich zu unstimulierten Zellen (siehe 4.4; Abb. 21). In zusätzlicher Anwesenheit von AChE zeigte sich jedoch eine signifikant vermehrte IL-1 β -Freisetzung (Abb. 21). Das ist vermutlich dadurch zu erklären, dass AChE endogen produziertes ACh abbaut und folglich die verstärkte IL-1 β -Freisetzung ermöglicht. Hieraus lässt sich im Umkehrschluss ableiten, dass endogenes ACh *in vitro* die ATP-induzierte IL-1 β -Freisetzung aus isolierten intravasalen mononukleären Leukozyten aus allogenen

transplantierten Rattennieren hemmt. Die Zellviabilität der stimulierten intravasalen mononukleären Leukozyten aus allogenen transplantierten Rattennieren wurde indirekt über die LDH-Freisetzung bestimmt. Der Zelltod lag im Mittel unter 15 % (siehe 4.5, Tab. 9). Dies erlaubt den Rückschluss, dass die beobachteten IL-1 β -Freisetzungen nicht durch Zytotoxizität der eingesetzten Substanzen und/oder erhöhten Zelltod durch die Separationsprozeduren zu begründen sind. Der leicht erhöhte Zelltod im Vergleich zu humanen Monozyten liegt wahrscheinlich in der massiven Voraktivierung während der akuten Transplantatabstoßungsreaktion begründet.

Es lässt sich schlußfolgern, dass die *in vitro* für U937-Zellen und an primären humanen PBMCs und CD14⁺ Monozyten gezeigte nAChR-vermittelte Hemmung der ATP-induzierten IL-1 β -Freisetzung vermutlich auf intravasale mononukleäre Leukozyten aus allogenen transplantierten Rattennieren übertragbar ist. Es darf spekuliert werden, dass dieser Mechanismus auch *in vivo* stattfindet. Nach Aktivierung von Monozyten im Rahmen der akuten Transplantatabstoßungsreaktion wird ATP, was im Zusammenhang von Inflammation und Trauma freigesetzt wird, als DAMP erkannt (61, 110, 136). Endogen produziertes ACh kann dann autokrin auf die Zelle selbst und parakrin auf andere Monozyten sowie möglicherweise auf andere Immunzellen und Epithelzellen antiinflammatorisch wirken. Dies geht einher mit bereits beschriebenen nAChR-vermittelten antiinflammatorischen Effekten (5, 21, 141, 197, 201, 209, 212, 222). Welche nAChR-Untereinheiten diesen Effekt vermitteln, kann aus diesen Ergebnissen nicht direkt abgeleitet werden. Die Expression der nAChR-Untereinheiten $\alpha 7$ (*Chrna7*), $\alpha 9$ (*Chrna9*) und $\alpha 10$ (*Chrna10*) war in den intravasalen mononukleären Leukozyten aus allogenen transplantierten Rattennieren nachweisbar (siehe 4.4, Abb. 20). Weitere Untersuchungen wären notwendig, um eindeutig die nAChR-Untereinheiten zu bestimmen, die den gezeigten Effekt vermitteln. Hecker et al. konnten in ihren Untersuchungen die Expression des $\alpha 7$ -nAChR (*Chrna7*) nicht eindeutig nachweisen. Dies könnte für eine Rezeptorexpression in Abhängigkeit vom Aktivierungsgrad der Zelle sprechen, wie es Hinweise aus anderen Daten vermuten lassen (73, 205, 221). Es könnte jedoch auch sein, dass die durchgeführte PCR nicht sensitiv genug war.

In weiteren Untersuchungen wäre zu prüfen, ob dieser Mechanismus auch im Menschen *in vivo* eine Rolle spielt. Dies könnte einerseits zum weiteren pathophysiologischen Verständnis immunologischer Erkrankungen beitragen. Andererseits könnte dies klinisch einen neuen therapeutischen Ansatzpunkt bieten.

5.1.6 **Schlußfolgerung**

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die nAChR-Agonisten ACh, Nic und Cho die ATP-induzierte IL-1 β -Freisetzung aus Monozyten *in vitro* hemmen, wohingegen die ATP-unabhängige IL-1 β -Freisetzung nicht beeinträchtigt wurde. Der Effekt erfolgt möglicherweise über eine nAChR-vermittelte Hemmung der Ionenkanalfunktion des P2X7R. Für diesen hemmenden Effekt konnte in dieser Arbeit eine Beteiligung der nAChR-Untereinheiten $\alpha 7$, $\alpha 9$ und $\alpha 10$ gezeigt werden. Diese Arbeit zeigt weiterhin, dass die nAChR-vermittelte Hemmung der ATP-induzierten IL-1 β -Freisetzung auf primäre humane PBMCs und primäre humane CD14⁺ Monozyten übertragbar ist. Dieser antiinflammatorische Effekt könnte auch *in vivo* von klinischer Relevanz sein.

Weiterhin zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit, dass endogen produziertes ACh aus intravasalen mononukleären Leukozyten aus allogenen transplantierten Rattennieren *in vitro* die ATP-induzierte IL-1 β -Freisetzung autokrin und/oder parakrin hemmt. Es darf geschlossen werden, dass dieser Mechanismus auch *in vivo* in der Ratte im Rahmen einer Immunaktivierung wie der akuten Transplantatabstoßungsreaktion zur Autoregulation der Immunantwort stattfinden könnte. Zielzellen könnten hier die Monozyten selbst, sowie andere Immunzellen und Epithelzellen sein. Es darf hypothetisiert werden, dass ein solcher Mechanismus auch im Menschen stattfinden könnte.

Anhand der Ergebnisse dieser Arbeit kann PC als nAChR-Agonist identifiziert werden. PC und PC-modifizierte Moleküle hemmen ebenfalls die ATP-induzierte IL-1 β -Freisetzung aus Monozyten. Es darf spekuliert werden, dass Bakterien und Parasiten, die PC-modifizierte Moleküle synthetisieren, diesen antiinflammatorischen Effekt zur Immunevasion benutzen und so die Immunantwort des Wirtes dämpfen. Es könnte sich um einen evolutionär sehr alten cholinergen Mechanismus handeln, der nicht nur dem Organismus selbst dient, sondern auch „von außen“ genutzt wird.

Abb. 22 stellt schematisch den in dieser Arbeit gezeigten antiinflammatorischen Effekt auf zellulärer Ebene dar.

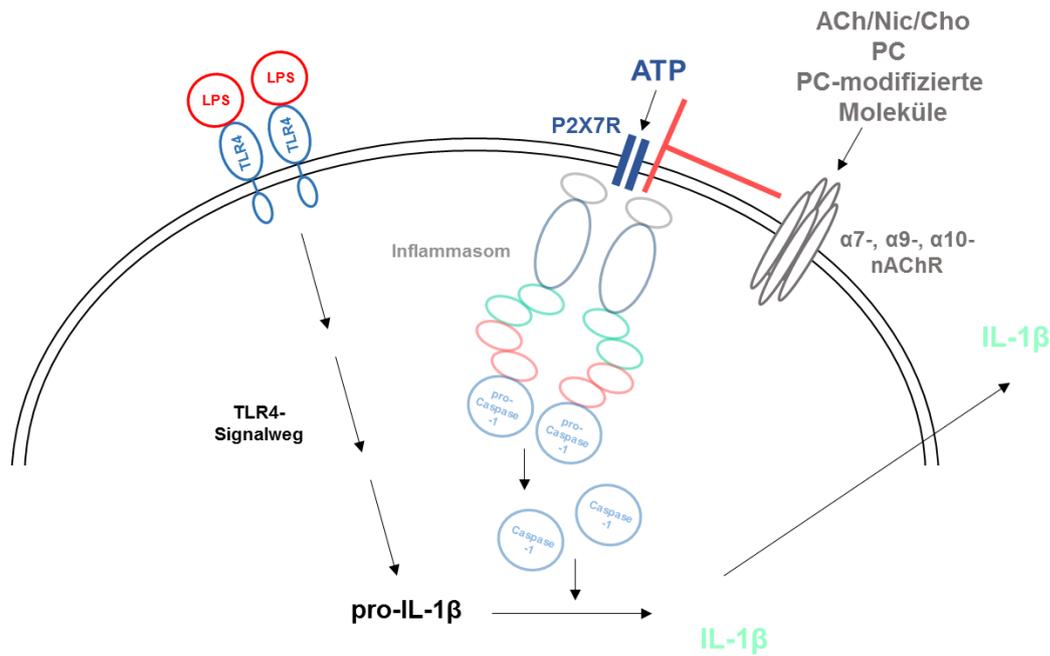


Abbildung 22: Schematische Darstellung des in dieser Arbeit gezeigten antiinflammatorischen Effektes. Über Lipopolysaccharid (LPS) wird der *Toll-like* Rezeptor (TLR)4-Signalweg aktiviert, der die Transkription des inaktiven Vorläufermoleküls pro-Interleukin (IL)-1 β induziert. Über den P2X7-Rezeptor (P2X7R) wird durch Adenosintriphosphat (ATP) die Formation des aktiven Inflammasoms induziert. Dies resultiert in einer Caspase-1-katalysierten Abspaltung des IL-1 β vom pro-IL-1 β und letztlich in einer IL-1 β -Freisetzung. Die Agonisten nikotinischer Acetylcholinrezeptoren (nAChR) Acetylcholin (ACh), Nikotin (Nic), Cholin (Cho) sowie außerdem Phosphocholin (PC) und PC-modifizierte Moleküle hemmen die ATP-induzierte IL-1 β -Freisetzung, wohingegen die ATP-unabhängige IL-1 β -Freisetzung nicht beeinträchtigt wird. Es wird spekuliert, dass dieser Effekt möglicherweise über eine Hemmung der Ionenkanalfunktion des P2X7R durch die nAChR stattfindet und es nicht zur Signalweiterleitung und Bildung des Inflammasoms kommt (in Pastellfarben dargestellt). An diesem Effekt sind die nAChR-Untereinheiten $\alpha 7$, $\alpha 9$ und $\alpha 10$ beteiligt. (nach (15, 93, 185))

Weitere experimentelle und klinische Untersuchungen müssen folgen, um den genauen Mechanismus *in vitro* und *in vivo* aufzuklären. Mögliche Rezeptorinteraktionen zwischen nAChR und dem P2X7R, sowie die Wirkungsweise von nAChR in Immunzellen müssten genauer untersucht werden. Dies könnte einen möglichen Ansatzpunkt hinsichtlich therapeutischer Strategien bieten, der sowohl bei der Therapie von (Auto-) Immunerkrankungen als auch bei der Therapie bakterieller oder parasitärer Erkrankungen eine Rolle spielen könnte.

5.1.7 „Rückblick in die Zukunft“

Dieses Kapitel ist ein Exkurs. Zwischen der Fertigstellung der in dieser Arbeit präsentierten Ergebnisse und der Niederschrift als Dissertationsarbeit ist einige Zeit vergangen. In der Zwischenzeit sind weitere Ergebnisse publiziert worden. Die nachfolgend dargestellten Aspekte gehören nicht im eigentlichen Sinne zu dieser Arbeit, sind jedoch bewusst in den Diskussionsteil eingefügt, da diese weiterführenden spannenden Ergebnisse durch ihre klinische Relevanz der Thematik weiter Leben einhauchen und daher nicht unbeachtet bleiben sollen.

Im Zuge der Experimente dieser Arbeit wurden neben der IL-1 β -Freisetzung auch die Freisetzungen der Inflammasom-unabhängigen proinflammatorischen Zytokine IL-6 und TNF- α aus U937-Zellen und primären humanen CD14⁺ Monozyten gemessen (93). Hier zeigte sich kein Effekt der nAChR-Agonisten auf die IL-6- oder TNF- α -Freisetzung. Dies ist ein weiterer Hinweis dafür, dass sich der gezeigte antiinflammatorische Effekt auf die nAChR-vermittelte Hemmung der Inflammasom-abhängigen ATP-induzierten IL-1 β -Freisetzung bezieht. Weiterhin wurden *patch-clamp*-Experimente mit LPS geprimeten U937-Zellen durchgeführt (93). Es konnte gezeigt werden, dass Nic die ATP-induzierten Ionenströme hemmt (93). Dieser Effekt war durch Mec antagonisierbar (93). Dieses Ergebnis unterstützt die Schlußfolgerung, dass die nAChR-vermittelte Hemmung der ATP-induzierten IL-1 β -Freisetzung die Inflammasombildung *per se* nicht beeinflusst, sondern eher auf Rezeptorebene über eine mögliche Interaktion der nAChRs mit dem P2X7R stattfindet. Interessanterweise konnte zudem gezeigt werden, dass Nic alleine keine Ionenströme induziert (93). Dies unterstützt die Hypothese, dass α 7- und α 9/ α 10-nAChR in U937-Zellen keine klassischen Ionenkanäle sind, sondern metabotrope Funktionen haben (93). Die Frage, welche nAChR in welchen Zellen welche Funktion haben und in welcher Weise nAChR-Agonisten und -Antagonisten wirken, öffnet somit ein neues weites Feld.

Richter et al. konnten später an *Xenopus laevis*-Oozyten, die die humanen nAChR-Untereinheiten α 9 und α 10 exprimierten, zeigen, dass PC an diesen ionotropen Rezeptoren keine Ionenströme auslöst, sondern als „*silent agonist*“ oder gar Antagonist wirkt (174).

In nachfolgenden Arbeiten konnte eindrücklich eine klinische Relevanz des präsentierten antiinflammatorischen Effektes gezeigt werden. Backhaus et al. zeigten, dass in pulmonalem Surfactant enthaltenes Dipalmitoylphosphatidylcholin (DPPC) die ATP-induzierte IL-1 β -Freisetzung aus Monozyten hemmt (9). Für Patienten mit akuten

Lungenerkrankungen wie dem *Acute Respiratory Distress Syndrome* (ARDS) sind erniedrigte DPPC-Konzentrationen und eine erhöhte Inflammation beschrieben (50, 55). Hier könnte ein möglicher neuer therapeutischer Ansatzpunkt sein. Zudem zeigten die Autoren, dass auch dieser Effekt nicht über klassische ionotrope Funktionen der nAChR vermittelt wird (9). Der $\alpha 9$ -nAChR konnte als maßgebliche Untereinheit identifiziert werden und interagiert vermutlich mit $\alpha 7$ - und/oder $\alpha 10$ -nAChR-Untereinheiten (9).

Richter et al. konnten für das Akute-Phase-Protein CRP eine mögliche protektive Funktion zeigen (176). CRP wird in der Leber durch zirkulierendes IL-1 β und IL-6 induziert und ist ein klinisch verwendeter unspezifischer Inflammationsmarker. CRP kann PC binden. Für CRP-PC-Komplexe konnte ein hemmender Effekt auf die ATP-induzierte IL-1 β -Freisetzung aus Monozyten gezeigt werden (176). Dieser Effekt wurde über metabotrope nAChR-Funktionen der nAChR-Untereinheiten $\alpha 7$, $\alpha 9$ und $\alpha 10$ vermittelt. In Traumapatienten konnte eine negative Korrelation von IL-1 β und CRP identifiziert werden, wohingegen andere proinflammatorische Zytokine diese negative Korrelation mit CRP nicht zeigten. Die Autoren gehen von einem negativen *feedback*-Mechanismus des CRP auf die IL-1 β -Freisetzung aus.

Erst kürzlich konnte gezeigt werden, dass Amyloid- β -Peptide (A β_{1-42}), die im Pathomechanismus der Alzheimer Erkrankung eine Rolle spielen, die nAChR-vermittelte Hemmung der ATP-induzierten IL-1 β -Freisetzung antagonisieren und zu einer IL-1 β -Freisetzung führen (175).

Diese Ergebnisse, die auf der nAChR-vermittelten Hemmung der ATP-induzierten IL-1 β -Freisetzung basieren, zeigen die verschiedenen pathophysiologischen Zusammenhänge, bei denen dieser antiinflammatorische Effekt eine Rolle zu spielen scheint. Dies verdeutlicht die klinische Relevanz und die „Lebensnähe“ dieses grundlagenwissenschaftlichen Themas.

6 Zusammenfassung

6.1 Agonisten nikotinischer Acetylcholinrezeptoren hemmen die ATP-induzierte IL-1 β -Freisetzung aus Monozyten

Interleukin (IL)-1 β ist als potentes proinflammatorisches Zytokin in viele Immunreaktionen und Erkrankungen involviert. Seine Freisetzung benötigt klassischerweise zwei konsekutive Gefahrensignale. Ein erstes Signal wie Lipopolysaccharid (LPS) aus der Zellwand Gram-negativer Bakterien induziert die Synthese des Vorläufermoleküls pro-IL-1 β . Ein zweites Signal wie Adenosintriphosphat (ATP) induziert die Bildung des intrazellulären Inflammasoms, das die IL-1 β -Synthese und -Freisetzung vermittelt. Die IL-1 β -Freisetzung unterliegt komplexen Regulationsmechanismen, um überschießende Immunreaktionen und damit einhergehende Schäden zu vermeiden. Non-neuronale cholinerge Kontrollmechanismen im Immunsystem sind schon lange Zeit bekannt. Acetylcholin (ACh) und andere Agonisten nikotinischer Acetylcholinrezeptoren (nAChRs) können antiinflammatorisch wirken. In dieser Arbeit wurde der Einfluss von nAChR-Agonisten, nAChR-Antagonisten sowie Phosphocholin (PC) und PC-modifizierter Moleküle auf die ATP-induzierte IL-1 β -Freisetzung aus Monozyten untersucht. Die IL-1 β -Freisetzung wurde im ELISA gemessen. Mittels RT-PCR und *small interfering ribonucleic acid* (siRNA)-Transfektionsexperimenten wurden beteiligte nAChR-Untereinheiten geprüft. Der Einfluß von nAChR-Agonisten und PC auf die ATP-induzierte IL-1 β -Freisetzung wurde außerdem an primären humanen mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMCs) und CD14⁺ Monozyten sowie an intravasalen mononukleären Leukozyten aus allogenen transplantierten Rattennieren, die endogen ACh produzieren, untersucht. Die nAChR-Agonisten ACh, Nikotin (Nic) und Cholin (Cho) hemmen signifikant die ATP-induzierte IL-1 β -Freisetzung aus Monozyten. Die ATP-unabhängige IL-1 β -Freisetzung wird nicht beeinflusst. PC kann als nAChR-Agonist identifiziert werden und hemmt gleichwie PC-modifizierte Moleküle, wie sie von Bakterien und Parasiten zur Immunevasion synthetisiert werden, ebenfalls die ATP-induzierte IL-1 β -Freisetzung aus Monozyten. Die nAChR-Untereinheiten $\alpha 7$, $\alpha 9$ und $\alpha 10$ sind an diesem Effekt beteiligt. Dieser Effekt ist auf primäre humane PBMCs und CD14⁺ Monozyten übertragbar. In intravasalen mononukleären Leukozyten aus allogenen transplantierten Rattennieren hemmt vermutlich endogen produziertes ACh die ATP-induzierte IL-1 β -Freisetzung autokrin und/oder parakrin. Damit wird ein antiinflammatorischer Mechanismus gezeigt, der

sowohl im Organismus selbst eine Immunantwort modulieren, als auch von Bakterien und Parasiten zur Immunevasion genutzt werden könnte. Dies ist zum Verständnis pathophysiologischer Mechanismen und hinsichtlich therapeutischer Strategien von klinischem Interesse.

6.2 Agonists of nicotinic acetylcholine receptors inhibit ATP-induced IL-1 β release by monocytes

Interleukin (IL)-1 β is a potent proinflammatory cytokine which is involved in various immune responses. IL-1 β release generally requires two consecutive danger signals. A first signal like lipopolysaccharide (LPS), which is a component of the cell wall of Gram-negative bacteria, induces the synthesis of the precursor pro-IL-1 β . A second signal such as adenosine triphosphate (ATP) induces inflammasome assembly, a cytosolic multiprotein complex inducing synthesis and release of mature IL-1 β . Release of IL-1 β is strictly controlled to prevent exceeding immune responses and concomitant damage. Non-neuronal cholinergic mechanisms controlling immunity have been reported long ago. Acetylcholine (ACh) and other agonists of nicotinic acetylcholine receptors (nAChRs) are known for their antiinflammatory effects. In this study we investigated the effect of agonists and antagonists of nAChRs as well as phosphocholine (PC) and PC-modified molecules on ATP-induced IL-1 β release by monocytes. IL-1 β concentrations were measured by ELISA. To analyze the nAChR subunits involved, RT-PCR and transfection experiments with small interfering ribonucleic acid (siRNA) were performed. The effect of agonists of nAChRs and PC on ATP-induced IL-1 β release was also investigated in primary human peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) and CD14⁺ monocytes as well as in intravascular leukocytes of rat renal allografts, which endogenously produce ACh. The agonists of nAChR ACh, nicotine (Nic) and choline (Cho) significantly inhibit ATP-induced IL-1 β release by monocytes whereas the ATP-independent release of IL-1 β remained unimpaired. PC was identified as a nAChR agonist. PC as well as PC-modified molecules synthesized by various bacteria and parasites, inhibit the ATP-induced IL-1 β release by monocytes. The nAChR subunits α 7, α 9 und α 10 are involved in this mechanism. This effect is also applicable to primary human PBMCs and CD14⁺ monocytes. ACh, which is endogenously produced by intravascular mononuclear leukocytes from rat renal allografts, inhibits the ATP-induced IL-1 β release in an autocrine and/or paracrine manner. Here we report an antiinflammatory mechanism, which plays a role in

modulating the immune response *in vivo*. It might as well be used by bacteria and parasites to dampen the host's immune response. This might give new insights into possible pathophysiological mechanisms and might be a target of future therapeutic approaches.

7 Abkürzungsverzeichnis

α 7-nAChR	nikotinischer Acetylcholinrezeptor, Untereinheit α 7
α 9-nAChR	nikotinischer Acetylcholinrezeptor, Untereinheit α 9
α 10-nAChR	nikotinischer Acetylcholinrezeptor, Untereinheit α 10
α -Bun	α -Bungarotoxin
Abb.	Abbildung
Acetyl-CoA	Acetyl-Coenzym-A
ACh	Acetylcholin
AChE	Acetylcholinesterase
AIM2	<i>absent in melanoma 2</i>
ALRs	<i>absent in melanoma 2 (AIM2)-like-Rezeptoren</i>
AP-1	<i>activator protein 1</i>
APCs	<i>antigen-presenting cells</i>
Aqua ad inj.	Aqua ad injectabilia
ARDS	<i>acute respiratory distress syndrome</i>
ASC	<i>apoptosis-associated speck-like protein containing a caspase recruitment domain</i>
ATP	Adenosintriphosphat
Bp	<i>base pairs</i> ; Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin
BzATP	2'(3')-O-(4-Benzoylbenzoyl)adenosin 5'-triphosphat, 2'(3')-O-(4-Benzoylbenzoyl)adenosine 5'-triphosphate triethylammonium salt
CAPS	Cryoporin-assoziiertes periodisches Syndrom
CarAT	Carnitinacetyltransferase
CARD	<i>caspase recruitment domain</i>
Casp1	Caspase-1

CD14	<i>cluster of differentiation 14</i>
cDNA	<i>complementary desoxyribonucleic acid</i>
ChAT	Cholinacetyltransferase
Cho	Cholin
CHRFAM7A	CHRNA-FAM7A Fusion
CHRNA	<i>cholinergic receptor nicotinic alpha subunit</i>
CHT1	Cholintransporter-1
CLRs	C-Typ-Lektin-Rezeptoren
CRP	C-reaktives Protein
CTL	<i>choline transporter-like protein</i>
COX	Cyclooxygenase
DA	Dark Agouti
DAMP	<i>danger-associated molecular pattern</i>
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
DCs	<i>dendritic cell</i> ; dendritische Zelle
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i> ; Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DPPC	Dipalmitoylphosphatidylcholin
dUTP	Desoxyuridintriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
FAM7A	<i>family with sequence similarity 7A, exons A-E</i>
FCS	<i>fetal calf serum</i>
FMF	familiäres Mittelmeerfieber

G-CSF	<i>granulocyte-colony stimulating factor</i>
HCl	Hydrogenchlorid, Salzsäure
HF	<i>hydrofluoric acid</i>
HMGB1	<i>high mobility group box protein 1</i>
ICAM	<i>intercellular adhesion molecule</i>
IFI16	<i>IFNγ-inducible protein 16</i>
IFN	Typ-I-Interferon
IGF	<i>Insulin-like growth factor</i>
IKK	<i>IκB kinase</i>
IL	Interleukin
IL-1R	Interleukin-1-Rezeptor
IPAF	<i>ice protease-activating factor</i>
IRAKs	<i>interleukin-1 receptor-associated kinases</i>
IRF3	<i>interferon regulatory factor-3</i>
K ⁺	Kalium
KCl	Kaliumchlorid
LBP	Lipopolysaccharid (LPS)-bindendes Protein, <i>LPS binding protein</i>
LEW	Lewis
LOS	Lipooligosaccharid
LPS	Lipopolysaccharid
LRRs	<i>leucine-rich repeats</i>
mAChR	muskarinischer Acetylcholinrezeptor
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinase</i>
MBL	Mannose-bindendes Lektin
MD2	<i>myeloid differentiation factor 2</i> , Lymphozytenantigen 96
Mec	Mecamylamin

MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i> ; Boten-Ribonukleinsäure
mtRNA	mitochondriale Ribonukleinsäure
MyD88	<i>myeloid differentiation primary response protein 88</i>
nAChR	nikotinischer Acetylcholinrezeptor
NACHT	<i>nucleotide-binding and oligomerization domain</i>
NF- κ B	<i>nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells</i>
Nic	<i>nicotine</i> ; Nikotin
NK	Natürliche Killerzelle; <i>natural killer cell</i>
NLR	<i>nucleotide-binding oligomerization domain (NOD)-like-Rezeptor</i>
NLRP	<i>NOD-, LRR- and PYD-containing</i>
NO	<i>nitric oxide</i> ; Stickstoffmonoxid
NOD	<i>nucleotide-binding oligomerization domain</i>
OCT	<i>organic cation transporter</i>
P2X7R	P2X7-Rezeptor
PAFR	<i>platelet-activating factor receptor</i>
PAMPs	<i>pathogen-associated molecular patterns</i>
PBMCs	<i>peripheral blood mononuclear cells</i> ; mononukleäre Zellen des peripheren Blutes
PBS	<i>phosphate-buffered saline</i>
PC	Phosphocholin
Pro-casp1	Pro-Caspase-1
PRR	<i>pattern recognition receptor</i>
PVDF	Polyvinylidendifluorid
PYD	<i>pyrin domain</i>
RIG	<i>retinoic acid-inducible gene</i>

RLR	<i>retinoic acid-inducible gene (RIG)-I-like-Rezeptor</i>
RNA	<i>ribonucleic acid</i> ; Ribonukleinsäure
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies; <i>reactive oxygen species</i>
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i>
siRNA	<i>small interfering ribonucleic acid</i>
Stry	Strychnin
Tab.	Tabelle
TAB	<i>transforming growth factor-β-activated kinase 1-binding protein</i>
TAK1	<i>transforming growth factor-β-activated kinase 1</i>
TANK	<i>TRAF family member-associated NF-κB activator</i>
TBK1	<i>TANK-binding kinase 1</i>
TIR	<i>Toll/interleukin-1 receptor</i>
TIRAP	<i>TIR domain-containing adapter protein</i>
TLRs	<i>Toll-like-Rezeptoren</i>
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
TRAF	<i>tumor necrosis factor receptor associated factor</i>
TRAM	<i>TRIF-related adapter molecule</i>
TRIF	<i>TIR domain-containing adapter-inducing interferon-β</i>
VAcHT	<i>vesicular acetylcholine transporter</i>
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>

8 Literatur

- (1) Abbate A, Salloum FN, Vecile E, Das A, Hoke NN, Straino S, et al. Anakinra, a recombinant human interleukin-1 receptor antagonist, inhibits apoptosis in experimental acute myocardial infarction. *Circulation*. 2008;117(20):2670-83.
- (2) Aderem A, Underhill DM. Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annu Rev Immunol*. 1999;17:593-623.
- (3) Akashi-Takamura S, Miyake K. TLR accessory molecules. *Curr Opin Immunol*. 2008;20(4):420-5.
- (4) Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*. 2006;124(4):783-801.
- (5) Aldhous MC, Drummond HE, Anderson N, Baneshi MR, Smith LA, Arnott ID, et al. Smoking habit and load influence age at diagnosis and disease extent in ulcerative colitis. *Am J Gastroenterol*. 2007;102(3):589-97.
- (6) Alexopoulou L, Holt AC, Medzhitov R, Flavell RA. Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature*. 2001;413(6857):732-8.
- (7) Alkondon M, Pereira EFR, Cortes WS, Maelicke A, Albuquerque EX. Choline is a selective agonist of alpha7 nicotinic acetylcholine receptors in the rat brain neurons. *Eur J Neurosci*. 1997;9(12):2734-42.
- (8) Andrei C, Margiocco P, Poggi A, Lotti LV, Torrisi MR, Rubartelli A. Phospholipases C and A2 control lysosome-mediated IL-1 beta secretion: Implications for inflammatory processes. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2004;101(26):9745-50.
- (9) Backhaus S, Zakrzewicz A, Richter K, Damm J, Wilker S, Fuchs-Moll G, et al. Surfactant inhibits ATP-induced release of interleukin-1beta via nicotinic acetylcholine receptors. *J Lipid Res*. 2017;58(6):1055-66.
- (10) Baker ER, Zwart R, Sher E, Millar NS. Pharmacological properties of alpha 9 alpha 10 nicotinic acetylcholine receptors revealed by heterologous expression of subunit chimeras. *Mol Pharmacol*. 2004;65(2):453-60.

- (11) Balka KR, De Nardo D. Understanding early TLR signaling through the myddosome. *J Leukoc Biol.* 2019;105(2):339-51.
- (12) Baltar P, Romaris F, Estevez J, Leiro J, Ubeira FM. Carrier-dependent suppression of the anti-phosphorylcholine plaque-forming cell response in *Trichinella*-infected mice is mediated by anti-hapten IgG1 antibodies. *Exp Parasitol.* 1998;90(1):95-102
- (13) Barbalat R, Ewald SE, Mouchess ML, Barton GM. Nucleic acid recognition by the innate immune system. *Annu Rev Immunol.* 2011;29:185-214.
- (14) Barbier L, Ferhat M, Salame E, Robin A, Herbelin A, Gombert JM, et al. Interleukin-1 family cytokines: Keystones in liver inflammatory diseases. *Front Immunol.* 2019;10:2014.
- (15) Bauernfeind F, Ablasser A, Bartok E, Kim S, Schmid-Burgk J, Cavlar T, et al. Inflammasomes: current understanding and open questions. *Cell Mol Life Sci.* 2011;68(5):765-83.
- (16) Beckmann J, Lips KS. The non-neuronal cholinergic system in health and disease. *Pharmacology.* 2013;92(5-6):286-302.
- (17) Bergsbaken T, Fink SL, Cookson BT. Pyroptosis: host cell death and inflammation. *Nat Rev Microbiol.* 2009;7(2):99–109.
- (18) Bezbradica JS, Medzhitov R. Integration of cytokine and heterologous receptor signaling pathways. *Nat Immunol.* 2009;10(4):333-9.
- (19) Bianchi ME. DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. *J Leukoc Biol.* 2007;81(1):1-5.
- (20) Bloc A, Bugnard E, Dunant Y, Falk-Vairant J, Israel M, Loctin F, et al. Acetylcholine synthesis and quantal release reconstituted by transfection of mediatophore and choline acetyltransferase cDNAs. *Eur J Neurosci.* 1999;11(5):1523-34.
- (21) Borovikova LV, Ivanova S, Zhang M, Yang H, Botchkina GI, Watkins LR, et al. Vagus nerve stimulation attenuates the systemic inflammatory response to endotoxin. *Nature.* 2000;405(6785):458-62.

- (22) Boutin H, LeFeuvre RA, Horai R, Asano M, Iwakura Y, Rothwell NJ. Role of IL-1alpha and IL-1beta in ischemic brain damage. *J Neurosci*. 2001;21(15):5528-34.
- (23) Bratton BO, Martelli D, McKinley MJ, Trevaks D, Anderson CR, McAllen RM. Neural regulation of inflammation: no neural connection from the vagus to splenic sympathetic neurons. *Exp Physiol*. 2012;97(11):1180-5.
- (24) Bresnihan B, Newmark R, Robbins S, Genant HK. Effects of anakinra monotherapy on joint damage in patients with rheumatoid arthritis. Extension of a 24-week randomized, placebo-controlled trial. *J Rheumatol*. 2004;31(6):1103-11.
- (25) Brown GD, Gordon S. Immune recognition. A new receptor for beta-glucans. *Nature*. 2001;413(6851):36-7.
- (26) Bryant CE, Symmons M, Gay NJ. Toll-like receptor signalling through macromolecular protein complexes. *Mol Immunol*. 2015;63(2):162-5.
- (27) Cavalli G, Dinarello CA. Anakinra therapy for non-cancer inflammatory diseases. *Front Pharmacol*. 2018;9:1157.
- (28) Cekic C, Linden J. Purinergic regulation of the immune system. *Nat Rev Immunol*. 2016;16(3):177-92.
- (29) Chae JJ, Aksentijevich I, Kastner DL. Advances in the understanding of familial Mediterranean fever and possibilities for targeted therapy. *Br J Haematol*. 2009;146(5):467-78.
- (30) Chen GY, Nunez G. Sterile inflammation: sensing and reacting to damage. *Nat Rev Immunol*. 2010;10(12):826-37.
- (31) Chernyavsky AI, Arredondo J, Skok M, Grando SA. Auto/paracrine control of inflammatory cytokines by acetylcholine in macrophage-like U937 cells through nicotinic receptors. *Int Immunopharmacol*. 2010;10(3):308-15.
- (32) Cherubini E, Tabbi L, Scozzi D, Mariotta S, Galli E, Carello R, et al. Modified expression of peripheral blood lymphocyte muscarinic cholinergic receptors in asthmatic children. *J Neuroimmunol*. 2015;284:37-43.
- (33) Church LD, Cook GP, McDermott MF. Primer: inflammasomes and interleukin 1beta in inflammatory disorders. *Nat Clin Pract Rheumatol*. 2008;4(1):34-42.

- (34) Clark SE, Weiser JN. Microbial modulation of host immunity with the small molecule phosphorylcholine. *Infect Immun*. 2013;81(2):392-401.
- (35) Coeshott C, Ohnemus C, Pilyavskaya A, Ross S, Wieczorek M, Kroona H, et al. Converting enzyme-independent release of tumor necrosis factor alpha and IL-1beta from a stimulated human monocytic cell line in the presence of activated neutrophils or purified proteinase 3. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1999;96(11):6261-6.
- (36) Conti P, Stellin L, Caraffa A, Gallenga CE, Ross R, Kritas SK, et al. Advances in mast cell activation by IL-1 and IL-33 in Sjogren's Syndrome: Promising inhibitory effect of IL-37. *Int J Mol Sci*. 2020;21(12).
- (37) Cundell DR, Gerard NP, Gerard C, Idanpaan-Heikkila I, Tuomanen EI. Streptococcus pneumoniae anchor to activated human cells by the receptor for platelet-activating factor. *Nature*. 1995;377(6548):435-8.
- (38) Cunnane G, Madigan A, Murphy E, FitzGerald O, Bresnihan B. The effects of treatment with interleukin-1 receptor antagonist on the inflamed synovial membrane in rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)*. 2001;40(1):62-9.
- (39) da Silva Correia J, Soldau K, Christen U, Tobias PS, Ulevitch RJ. Lipopolysaccharide is in close proximity to each of the proteins in its membrane receptor complex - transfer from CD14 to TLR4 and MD-2. *J Biol Chem*. 2001;276(24):21129-35.
- (40) Deckmann K, Filipinski K, Krasteva-Christ G, Fronius M, Althaus M, Rafiq A, et al. Bitter triggers acetylcholine release from polymodal urethral chemosensory cells and bladder reflexes. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2014;111(22):8287-92.
- (41) de Jonge WJ, Ulloa L. The alpha7 nicotinic acetylcholine receptor as a pharmacological target for inflammation. *Br J Pharmacol*. 2007;151(7):915-29.
- (42) de Koning HD, Schalkwijk J, van der Meer JW, Simon A. Successful canakinumab treatment identifies IL-1beta as a pivotal mediator in Schnitzler syndrome. *J Allergy Clin Immunol*. 2011;128(6):1352-4.
- (43) Dinarello CA. Biologic basis for interleukin-1 in disease. *Blood*. 1996;87(6):2095-147.

- (44) Dinarello CA. A clinical perspective of IL-1beta as the gatekeeper of inflammation. *Eur J Immunol*. 2011;41(5):1203-17.
- (45) Dinarello CA. Overview of the IL-1 family in innate inflammation and acquired immunity. *Immunol Rev*. 2018;281(1):8-27.
- (46) Dinarello CA, Gelfand JA, Wolff SM. Anticytokine strategies in the treatment of the systemic inflammatory response syndrome. *JAMA*. 1993;269(14):1829-35.
- (47) Dinarello CA, Ikejima T, Warner SJ, Orencole SF, Lonnemann G, Cannon JG, et al. Interleukin 1 induces interleukin 1. I. Induction of circulating interleukin 1 in rabbits in vivo and in human mononuclear cells in vitro. *J Immunol*. 1987;139(6):1902-10.
- (48) Dinarello CA, Simon A, van der Meer JW. Treating inflammation by blocking interleukin-1 in a broad spectrum of diseases. *Nat Rev Drug Discov*. 2012;11(8):633-52.
- (49) Di Virgilio F, Dal Ben D, Sarti AC, Giuliani AL, Falzoni S. The P2X7 receptor in infection and inflammation. *Immunity*. 2017;47(1):15-31.
- (50) Dolinay T, Kim YS, Howrylak J, Hunninghake GM, An CH, Fredenburgh L, et al. Inflammasome-regulated cytokines are critical mediators of acute lung injury. *Am J Respir Crit Care Med*. 2012;185(11): 1225–1234.
- (51) Donath MY, Shoelson SE. Type 2 diabetes as an inflammatory disease. *Nat Rev Immunol*. 2011;11(2):98-107.
- (52) Dostert C, Petrilli V, Van Bruggen R, Steele C, Mossman BT, Tschopp J. Innate immune activation through Nalp3 inflammasome sensing of asbestos and silica. *Science*. 2008;320(5876):674-7.
- (53) Dubyak GR. P2X7 receptor regulation of non-classical secretion from immune effector cells. *Cell Microbiol*. 2012;14(11):1697-706.
- (54) Duewell P, Kono H, Rayner KJ, Sirois CM, Vladimer G, Bauernfeind FG, et al. NLRP3 inflammasomes are required for atherogenesis and activated by cholesterol crystals. *Nature*. 2010;464(7293):1357-61.

- (55) Dushianthan A, Cusack R, Goss V, Postle AD, Grocott MP. Clinical review: Exogenous surfactant therapy for acute lung injury/acute respiratory distress syndrome-where do we go from here? *Crit Care*. 2012;16(6):238.
- (56) Eigenbrod T, Dalpke AH. Bacterial RNA: An underestimated stimulus for innate immune responses. *J Immunol*. 2015;195(2):411-8.
- (57) Elgoyhen AB, Johnson DS, Boulter J, Vetter DE, Heinemann S. Alpha 9: an acetylcholine receptor with novel pharmacological properties expressed in rat cochlear hair cells. *Cell*. 1994;79(4):705-15.
- (58) Erickson JD, Varoqui H, Schafer MK, Modi W, Diebler MF, Weihe E, et al. Functional identification of a vesicular acetylcholine transporter and its expression from a "cholinergic" gene locus. *J Biol Chem*. 1994;269(35):21929-32.
- (59) Esparza GA, Teghanemt A, Zhang D, Giannini TL, Weiss JP. Endotoxin-albumin complexes transfer endotoxin monomers to MD-2 resulting in activation of TLR4. *Innate Immun*. 2012;18(3):478-91.
- (60) Fabre J, Lim SH, Morris PJ. Renal transplantation in the rat: details of a technique. *Aust N Z J Surg*. 1971;41(1):69-75.
- (61) Ferrari D, Chiozzi P, Falzoni S, Hanau S, Di Virgilio F. Purinergic modulation of interleukin-1 beta release from microglial cells stimulated with bacterial endotoxin. *J Exp Med*. 1997;185(3):579-82.
- (62) Ferreira-Vieira TH, Guimaraes IM, Silva FR, Ribeiro FM. Alzheimer's disease: Targeting the Cholinergic System. *Curr Neuropharmacol*. 2016;14(1):101-15.
- (63) Filchakova O, McIntosh JM. Functional expression of human $\alpha 9^*$ nicotinic acetylcholine receptors in *X. laevis* oocytes is dependent on the $\alpha 9$ subunit 5' UTR. *PLoS One*. 2013;8(5):e64655.
- (64) Filippini P, Cesario A, Fini M, Locatelli F, Rutella S. The Yin and Yang of non-neuronal alpha7-nicotinic receptors in inflammation and autoimmunity. *Current drug targets*. 2012;13(5):644-55.
- (65) Finkin-Groner E, Moradov D, Shifrin H, Bejar C, Nudelman A, Weinstock M. Indoline-3-propionate and 3-aminopropyl carbamates reduce lung injury and pro-

inflammatory cytokines induced in mice by LPS. *Br J Pharmacol.* 2015;172(4):1101-13.

(66) Franchi L, Munoz-Planillo R, Nunez G. Sensing and reacting to microbes through the inflammasomes. *Nat Immunol.* 2012;13(4):325-32.

(67) Fujii T, Mashimo M, Moriwaki Y, Misawa H, Ono S, Horiguchi K, et al. Physiological functions of the cholinergic system in immune cells. *J Pharmacol Sci.* 2017;134(1):1-21.

(68) Fujii T, Tajima S, Yamada S, Watanabe Y, Sato KZ, Matsui M, et al. Constitutive expression of mRNA for the same choline acetyltransferase as that in the nervous system, an acetylcholine-synthesizing enzyme, in human leukemic T-cell lines. *Neurosci Lett.* 1999;259(2):71-4.

(69) Fujii T, Tsuchiya T, Yamada S, Fujimoto K, Suzuki T, Kasahara T, et al. Localization and synthesis of acetylcholine in human leukemic T cell lines. *J Neurosci Res.* 1996;44(1):66-72.

(70) Fujii T, Yamada S, Watanabe Y, Misawa H, Tajima S, Fujimoto K, et al. Induction of choline acetyltransferase mRNA in human mononuclear leukocytes stimulated by phytohemagglutinin, a T-cell activator. *J Neuroimmunol.* 1998;82(1):101-7.

(71) Fujii YX, Tashiro A, Arimoto K, Fujigaya H, Moriwaki Y, Misawa H, et al. Diminished antigen-specific IgG1 and interleukin-6 production and acetylcholinesterase expression in combined M1 and M5 muscarinic acetylcholine receptor knockout mice. *J Neuroimmunol.* 2007;188(1-2):80-5.

(72) Garlanda C, Dinarello CA, Mantovani A. The interleukin-1 family: back to the future. *Immunity.* 2013;39(6):1003-18.

(73) Gentry CL, Lukas RJ. Regulation of nicotinic acetylcholine receptor numbers and function by chronic nicotine exposure. *Curr drug targets CNS Neurol Disord.* 2002;1(4):359-85.

(74) Gomes JP, Watad A, Shoenfeld Y. Nicotine and autoimmunity: The lotus' flower in tobacco. *Pharmacol Res.* 2018;128:101-9.

- (75) Goncalves GM, Zamboni DS, Camara NO. The role of innate immunity in septic acute kidney injuries. *Shock*. 2010;34 Suppl 1:22-6.
- (76) Gong T, Liu L, Jiang W, Zhou R. DAMP-sensing receptors in sterile inflammation and inflammatory diseases. *Nat Rev Immunol*. 2020; 20(2):95-112.
- (77) Goodridge HS, Marshall FA, Else KJ, Houston KM, Egan C, Al-Riyami L, et al. Immunomodulation via novel use of TLR4 by the filarial nematode phosphorylcholine-containing secreted product, ES-62. *J Immunol*. 2005;174(1):284-93.
- (78) Goodridge HS, McGuinness S, Houston KM, Egan CA, Al-Riyami L, Alcocer MJ, et al. Phosphorylcholine mimics the effects of ES-62 on macrophages and dendritic cells. *Parasite Immunol*. 2007;29(3):127-37.
- (79) Grabitzki J, Lochnit G. Immunomodulation by phosphocholine--biosynthesis, structures and immunological implications of parasitic PC-epitopes. *Mol Immunol*. 2009;47(2-3):149-63.
- (80) Grando SA, Kawashima K, Kirkpatrick CJ, Wessler I. Recent progress in understanding the non-neuronal cholinergic system in humans. *Life Sci*. 2007;80(24-25):2181-5.
- (81) Grau V, Stehling O, Garn H, Steiniger B. Accumulating monocytes in the vasculature of rat renal allografts: phenotype, cytokine, inducible nitric oxide synthase, and tissue factor mRNA expression. *Transplantation*. 2001;71(1):37-46.
- (82) Gray MW, Burger G, Lang BF. Mitochondrial evolution. *Science*. 1999;283(5407):1476-81.
- (83) Grigg J. The platelet activating factor receptor: a new anti-infective target in respiratory disease? *Thorax*. 2012;67(9):840-1.
- (84) Gross O, Thomas CJ, Guarda G, Tschopp J. The inflammasome: an integrated view. *Immunol Rev*. 2011;243(1):136-51.
- (85) Guo H, Callaway JB, Ting JP. Inflammasomes: mechanism of action, role in disease, and therapeutics. *Nat Med*. 2015;21(7):677-87.
- (86) Guo RF, Ward PA. Role of C5a in inflammatory responses. *Annu Rev Immunol*. 2005;23:821-52.

- (87) Guslandi M. Nicotine treatment for ulcerative colitis. *Br J Clin Pharmacol.* 1999;48(4):481-4.
- (88) Halle A, Hornung V, Petzold GC, Stewart CR, Monks BG, Reinheckel T, et al. The NALP3 inflammasome is involved in the innate immune response to amyloid-beta. *Nat Immunol.* 2008;9(8):857-65.
- (89) Hamano R, Takahashi HK, Iwagaki H, Yoshino T, Nishibori M, Tanaka N. Stimulation of alpha7 nicotinic acetylcholine receptor inhibits CD14 and the toll-like receptor 4 expression in human monocytes. *Shock.* 2006;26(4):358-64.
- (90) Harder J, Franchi L, Munoz-Planillo R, Park JH, Reimer T, Nunez G. Activation of the Nlrp3 inflammasome by *Streptococcus pyogenes* requires streptolysin O and NF-kappa B activation but proceeds independently of TLR signaling and P2X7 receptor. *J Immunol.* 2009;183(9):5823-9.
- (91) Harnett MM, Kean DE, Boitelle A, McGuinness S, Thalhamer T, Steiger CN, et al. The phosphorycholine moiety of the filarial nematode immunomodulator ES-62 is responsible for its anti-inflammatory action in arthritis. *Ann Rheum Dis.* 2008;67(4):518-23.
- (92) Harnett W, Houston KM, Amess R, Worms MJ. *Acanthocheilonema viteae*: phosphorylcholine is attached to the major excretory-secretory product via an N-linked glycan. *Exp Parasitol.* 1993;77(4):498-502.
- (93) Hecker A, Küllmar M, Wilker S, Richter K, Zakrzewicz A, Atanasova S, et al. Phosphocholine-modified macromolecules and canonical nicotinic agonists inhibit ATP-induced IL-1beta release. *J Immunol.* 2015;195(5):2325-34.
- (94) Hecker A, Mikulski Z, Lips KS, Pfeil U, Zakrzewicz A, Wilker S, et al. Pivotal Advance: Up-regulation of acetylcholine synthesis and paracrine cholinergic signaling in intravascular transplant leukocytes during rejection of rat renal allografts. *J Leukoc Biol.* 2009;86(1):13-22.
- (95) Hentze H, Lin XY, Choi MS, Porter AG. Critical role for cathepsin B in mediating caspase-1-dependent interleukin-18 maturation and caspase-1-independent necrosis triggered by the microbial toxin nigericin. *Cell Death Differ.* 2003;10(9):956-68.

- (96) Hise AG, Tomalka J, Ganesan S, Patel K, Hall BA, Brown GD, et al. An essential role for the NLRP3 inflammasome in host defense against the human fungal pathogen *Candida albicans*. *Cell Host Microbe*. 2009;5(5):487-97.
- (97) Hofer S, Eisenbach C, Lukic IK, Schneider L, Bode K, Brueckmann M, et al. Pharmacologic cholinesterase inhibition improves survival in experimental sepsis. *Crit Care Med*. 2008;36(2):404-8.
- (98) Hoffmann JA, Kafatos FC, Janeway CA, Ezekowitz RA. Phylogenetic perspectives in innate immunity. *Science*. 1999;284(5418):1313-8.
- (99) Hofmann MA, Drury S, Fu C, Qu W, Taguchi A, Lu Y, et al. RAGE mediates a novel proinflammatory axis: a central cell surface receptor for S100/calgranulin polypeptides. *Cell*. 1999;97(7):889-901.
- (100) Horiuchi Y, Kimura R, Kato N, Fujii T, Seki M, Endo T, et al. Evolutional study on acetylcholine expression. *Life Sci*. 2003;72(15):1745-56.
- (101) Hornung V, Bauernfeind F, Halle A, Samstad EO, Kono H, Rock KL, et al. Silica crystals and aluminum salts activate the NALP3 inflammasome through phagosomal destabilization. *Nat Immunol*. 2008;9(8):847-56.
- (102) Israel M, Dunant Y. Acetylcholine release. Reconstitution of the elementary quantal mechanism. *J Physiol Paris*. 1998;92(2):123-8.
- (103) Iwasaki A, Medzhitov R. Control of adaptive immunity by the innate immune system. *Nat Immunol*. 2015;16(4):343-53.
- (104) Iyer SS, Pulsikens WP, Sadler JJ, Butter LM, Teske GJ, Ulland TK, et al. Necrotic cells trigger a sterile inflammatory response through the Nlrp3 inflammasome. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2009;106(48):20388-93.
- (105) Jahr H, Pfeiffer G, Hering BJ, Federlin K, Bretzel RG. Endotoxin-mediated activation of cytokine production in human PBMCs by collagenase and Ficoll. *J Mol Med*. 1999;77(1):118-20.
- (106) Jiang Z, Georgel P, Du X, Shamel L, Sovath S, Mudd S, et al. CD14 is required for MyD88-independent LPS signaling. *Nat Immunol*. 2005;6(6):565-70.

- (107) Johnson GJ, Cosnes J, Mansfield JC. Review article: smoking cessation as primary therapy to modify the course of Crohn's disease. *Aliment Pharmacol Ther.* 2005;21(8):921-31.
- (108) Kagan JC, Medzhitov R. Phosphoinositide-mediated adaptor recruitment controls Toll-like receptor signaling. *Cell.* 2006;125(5):943-55.
- (109) Kagan JC, Su T, Horng T, Chow A, Akira S, Medzhitov R. TRAM couples endocytosis of Toll-like receptor 4 to the induction of interferon-beta. *Nat Immunol.* 2008;9(4):361-8.
- (110) Kahlenberg JM, Dubyak GR. Mechanisms of caspase-1 activation by P2X7 receptor-mediated K⁺ release. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2004;286(5):C1100-8.
- (111) Kalashnyk OM, Gergalova GL, Komisarenko SV, Skok MV. Intracellular localization of nicotinic acetylcholine receptors in human cell lines. *Life Sci.* 2012;91(21-22):1033-7.
- (112) Kanneganti TD, Ozoren N, Body-Malapel M, Amer A, Park JH, Franchi L, et al. Bacterial RNA and small antiviral compounds activate caspase-1 through cryopyrin/Nalp3. *Nature.* 2006;440(7081):233-6.
- (113) Kawai T, Akira S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Immunol.* 2010;11(5):373-84.
- (114) Kawashima K, Fujii T. Extraneuronal cholinergic system in lymphocytes. *Pharmacol Ther.* 2000;86(1):29-48.
- (115) Kawashima K, Fujii T. Basic and clinical aspects of non-neuronal acetylcholine: overview of non-neuronal cholinergic systems and their biological significance. *J Pharmacol Sci.* 2008;106(2):167-73.
- (116) Kawashima K, Fujii T, Moriwaki Y, Misawa H. Critical roles of acetylcholine and the muscarinic and nicotinic acetylcholine receptors in the regulation of immune function. *Life Sci.* 2012;91(21-22):1027-32.
- (117) Kelley JL, Rozek MM, Suenram CA, Schwartz CJ. Activation of human blood monocytes by adherence to tissue culture plastic surfaces. *Exp Mol Pathol.* 1987;46(3):266-78.

- (118) Khakh BS, Fisher JA, Nashmi R, Bowser DN, Lester HA. An angstrom scale interaction between plasma membrane ATP-gated P2X₂ and α 4 β 2 nicotinic channels measured with fluorescence resonance energy transfer and total internal reflection fluorescence microscopy. *J Neurosci.* 2005;25(29):6911-20.
- (119) King JR, Gillevet TC, Kabbani N. A G protein-coupled α 7 nicotinic receptor regulates signaling and TNF- α release in microglia. *FEBS Open Bio.* 2017;7(9):1350-1361.
- (120) Koarai A, Traves SL, Fenwick PS, Brown SM, Chana KK, Russell RE, et al. Expression of muscarinic receptors by human macrophages. *Eur Respir J.* 2012;39(3):698-704.
- (121) Koepsell H, Lips K, Volk C. Polyspecific organic cation transporters: structure, function, physiological roles, and biopharmaceutical implications. *Pharm Res.* 2007;24(7):1227-51.
- (122) Kono H, Chen CJ, Ontiveros F, Rock KL. Uric acid promotes an acute inflammatory response to sterile cell death in mice. *J Clin Invest.* 2010;120(6):1939-49.
- (123) Kummer W, Lips KS, Pfeil U. The epithelial cholinergic system of the airways. *Histochem Cell Biol.* 2008;130(2):219-34.
- (124) Lachmann HJ, Lowe P, Felix SD, Rordorf C, Leslie K, Madhoo S, et al. In vivo regulation of interleukin 1 β in patients with cryopyrin-associated periodic syndromes. *J Exp Med.* 2009;206(5):1029-36.
- (125) Lamphier MS, Sirois CM, Verma A, Golenbock DT, Latz E. TLR9 and the recognition of self and non-self nucleic acids. *Ann N Y Acad Sci.* 2006;1082:31-43.
- (126) Latz E, Xiao TS, Stutz A. Activation and regulation of the inflammasomes. *Nat Rev Immunol.* 2013;13(6):397-411.
- (127) Larsen CM, Faulenbach M, Vaag A, Volund A, Ehses JA, Seifert B, et al. Interleukin-1-receptor antagonist in type 2 diabetes mellitus. *N Engl J Med.* 2007;356(15):1517-26.
- (128) Lee SR, Han J. Mitochondrial Nucleoid: Shield and Switch of the Mitochondrial Genome. *Oxid Med Cell Longev.* 2017;2017:8060949.

- (129) Lips KS, Wunsch J, Zarghooni S, Bschiepfer T, Schukowski K, Weidner W, et al. Acetylcholine and molecular components of its synthesis and release machinery in the urothelium. *Eur Urol.* 2007;51(4):1042-53.
- (130) Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods.* 2001;25(4):402-8.
- (131) Lu A, Magupalli VG, Ruan J, Yin Q, Atianand MK, Vos MR, et al. Unified polymerization mechanism for the assembly of ASC-dependent inflammasomes. *Cell.* 2014;156(6):1193-206.
- (132) Luecke S, Paludan SR. Molecular requirements for sensing of intracellular microbial nucleic acids by the innate immune system. *Cytokine.* 2017;98:4-14.
- (133) Lunney PC, Leong RW. Review article: Ulcerative colitis, smoking and nicotine therapy. *Aliment Pharmacol Ther.* 2012;36(11-12):997-1008.
- (134) Lust JA, Lacy MQ, Zeldenrust SR, Dispenzieri A, Gertz MA, Witzig TE, et al. Induction of a chronic disease state in patients with smoldering or indolent multiple myeloma by targeting interleukin 1 β -induced interleukin 6 production and the myeloma proliferative component. *Mayo Clin Proc.* 2009;84(2):114-22.
- (135) Lustig LR, Peng H, Hiel H, Yamamoto T, Fuchs PA. Molecular cloning and mapping of the human nicotinic acetylcholine receptor alpha10 (CHRNA10). *Genomics.* 2001;73(3):272-83.
- (136) Mariathasan S, Weiss DS, Newton K, McBride J, O'Rourke K, Roose-Girma M, et al. Cryopyrin activates the inflammasome in response to toxins and ATP. *Nature.* 2006;440(7081):228-32.
- (137) Marongiu L, Gornati L, Artuso I, Zanoni I, Granucci F. Below the surface: The inner lives of TLR4 and TLR9. *J Leukoc Biol.* 2019;106(1):147-60.
- (138) Martinon F, Burns K, Tschopp J. The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta. *Mol Cell.* 2002;10(2):417-26.
- (139) Martinon F, Mayor A, Tschopp J. The inflammasomes: guardians of the body. *Annu Rev Immunol.* 2009;27:229-65.

- (140) Mathison JC, Tobias PS, Wolfson E, Ulevitch RJ. Plasma lipopolysaccharide (LPS)-binding protein. A key component in macrophage recognition of gram-negative LPS. *J Immunol.* 1992;149(1):200-6.
- (141) Matsunaga K, Klein TW, Friedman H, Yamamoto Y. Involvement of nicotinic acetylcholine receptors in suppression of antimicrobial activity and cytokine responses of alveolar macrophages to *Legionella pneumophila* infection by nicotine. *J Immunol.* 2001;167(11):6518-24.
- (142) Matzinger P. The danger model: a renewed sense of self. *Science.* 2002;296(5566):301-5.
- (143) McGonagle D, Tan AL, Shankaranarayana S, Madden J, Emery P, McDermott MF. Management of treatment resistant inflammation of acute on chronic tophaceous gout with anakinra. *Ann Rheum Dis.* 2007;66(12):1683-4.
- (144) Medzhitov R. Recognition of microorganisms and activation of the immune response. *Nature.* 2007;449(7164):819-26.
- (145) Medzhitov R. Approaching the asymptote: 20 years later. *Immunity.* 2009;30(6):766-75.
- (146) Medzhitov R, Janeway CA, Jr. How does the immune system distinguish self from nonself? *Semin Immunol.* 2000;12(3):185-8; discussion 257-344.
- (147) Medzhitov R, Janeway C, Jr. Innate immunity. *N Engl J Med.* 2000;343(5):338-44.
- (148) Medzhitov R, Janeway C, Jr. Innate immune recognition: mechanisms and pathways. *Immunol Rev.* 2000;173:89-97.
- (149) Michel V, Yuan Z, Ramsbir S, Bakovic M. Choline transport for phospholipid synthesis. *Exp Biol Med.* 2006;231(5):490-504.
- (150) Mikulski Z, Hartmann P, Jositsch G, Zaslona Z, Lips KS, Pfeil U, et al. Nicotinic receptors on rat alveolar macrophages dampen ATP-induced increase in cytosolic calcium concentration. *Respir Res.* 2010;11:133.
- (151) Munoz-Planillo R, Kuffa P, Martinez-Colon G, Smith BL, Rajendiran TM, Nunez G. K(+) efflux is the common trigger of NLRP3 inflammasome activation by bacterial toxins and particulate matter. *Immunity.* 2013;38(6):1142-53.

- (152) Nagai Y, Akashi S, Nagafuku M, Ogata M, Iwakura Y, Akira S, et al. Essential role of MD-2 in LPS responsiveness and TLR4 distribution. *Nat Immunol.* 2002;3(7):667-72.
- (153) Nathan C. Points of control in inflammation. *Nature.* 2002;420(6917):846-52.
- (154) Netea MG, Nold-Petry CA, Nold MF, Joosten LA, Opitz B, van der Meer JH, et al. Differential requirement for the activation of the inflammasome for processing and release of IL-1beta in monocytes and macrophages. *Blood.* 2009;113(10):2324-35.
- (155) Netea MG, van de Veerdonk FL, van der Meer JW, Dinarello CA, Joosten LA. Inflammasome-independent regulation of IL-1-family cytokines. *Annu Rev Immunol.* 2015;33:49-77.
- (156) Neumann S, Razen M, Habermehl P, Meyer CU, Zepp F, Kirkpatrick CJ, et al. The non-neuronal cholinergic system in peripheral blood cells: effects of nicotinic and muscarinic receptor antagonists on phagocytosis, respiratory burst and migration. *Life Sci.* 2007;80(24-25):2361-4.
- (157) Okuda T, Haga T, Kanai Y, Endou H, Ishihara T, Katsura I. Identification and characterization of the high-affinity choline transporter. *Nat Neurosci.* 2000;3(2):120-5.
- (158) Olofsson PS, Rosas-Ballina M, Levine YA, Tracey KJ. Rethinking inflammation: neural circuits in the regulation of immunity. *Immunol Rev.* 2012;248(1):188-204.
- (159) O'Neill LA, Bowie AG. The family of five: TIR-domain-containing adaptors in Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol.* 2007;7(5):353-64.
- (160) Papke RL, Bencherif M, Lippiello P. An evaluation of neuronal nicotinic acetylcholine receptor activation by quaternary nitrogen compounds indicates that choline is selective for the alpha 7 subtype. *Neurosci Lett.* 1996;213(3):201-4.
- (161) Pascual V, Allantaz F, Arce E, Punaro M, Banchereau J. Role of interleukin-1 (IL-1) in the pathogenesis of systemic onset juvenile idiopathic arthritis and clinical response to IL-1 blockade. *J Exp Med.* 2005;201(9):1479-86.

- (162) Pavlov VA, Parrish WR, Rosas-Ballina M, Ochani M, Puerta M, Ochani K, et al. Brain acetylcholinesterase activity controls systemic cytokine levels through the cholinergic anti-inflammatory pathway. *Brain Behav Immun*. 2009;23(1):41-5.
- (163) Pavlov VA, Tracey KJ. The cholinergic anti-inflammatory pathway. *Brain Behav Immun*. 2005;19(6):493-9.
- (164) Pelegrin P, Surprenant A. Pannexin-1 mediates large pore formation and interleukin-1beta release by the ATP-gated P2X7 receptor. *EMBO J*. 2006;25(21):5071-82.
- (165) Pelegrin P, Surprenant A. Pannexin-1 couples to maitotoxin- and nigericin-induced interleukin-1beta release through a dye uptake-independent pathway. *J Biol Chem*. 2007;282(4):2386-94.
- (166) Peng H, Ferris RL, Matthews T, Hiel H, Lopez-Albaitero A, Lustig LR. Characterization of the human nicotinic acetylcholine receptor subunit alpha (alpha) 9 (CHRNA9) and alpha (alpha) 10 (CHRNA10) in lymphocytes. *Life Sci*. 2004;76(3):263-80.
- (167) Pereira EFR, Hilmas C, Santos MD, Alkondon M, Maelicke A, Albuquerque EX. Unconventional ligands and modulators of nicotinic receptors. *J Neurobiol*. 2002;53(4):479-500.
- (168) Peter C, Schmidt K, Hofer S, Stephan M, Martin E, Weigand MA, et al. Effects of physostigmine on microcirculatory alterations during experimental endotoxemia. *Shock*. 2010;33(4):405-11.
- (169) Qian J, Galitovskiy V, Chernyavsky AI, Marchenko S, Grando SA. Plasticity of the murine spleen T-cell cholinergic receptors and their role in in vitro differentiation of naive CD4 T cells toward the Th1, Th2 and Th17 lineages. *Genes Immun*. 2011;12(3):222-30.
- (170) Rathinam VA, Vanaja SK, Fitzgerald KA. Regulation of inflammasome signaling. *Nat Immunol*. 2012;13(4):333-42.
- (171) Razani-Boroujerdi S, Boyd RT, Davila-Garcia MI, Nandi JS, Mishra NC, Singh SP, et al. T cells express alpha7-nicotinic acetylcholine receptor subunits that require a

functional TCR and leukocyte-specific protein tyrosine kinase for nicotine-induced Ca²⁺ response. *J Immunol.* 2007;179(5):2889-98.

(172) Ricci A, Amenta F, Bronzetti E, Mannino F, Mariotta S, Tayebati SK. Expression of peripheral blood lymphocyte muscarinic cholinergic receptor subtypes in airway hyperresponsiveness. *J Neuroimmunol.* 2002;129(1-2):178-85.

(173) Ricci A, Mariotta S, Amenta F, Tayebati SK, Terzano C. Changes in muscarinic cholinergic receptor expression in human peripheral blood lymphocytes in allergic rhinitis patients. *Pulm Pharmacol Ther.* 2008;21(1):79-87.

(174) Richter K, Mathes V, Fronius M, Althaus M, Hecker A, Krasteva-Christ G, et al. Phosphocholine - an agonist of metabotropic but not of ionotropic functions of alpha9-containing nicotinic acetylcholine receptors. *Sci Rep.* 2016;6:28660.

(175) Richter K, Ogiemwonyi-Schaefer R, Wilker S, Chaveiro AI, Agne A, Hecker M, et al. Amyloid beta peptide (A β 1-42) reverses the cholinergic control of monocytic IL-1 β release. *J Clin Med.* 2020;9(9):E2887.

(176) Richter K, Sagawe S, Hecker A, Küllmar M, Askevold I, Damm J, et al. C-reactive protein stimulates nicotinic acetylcholine receptors to control ATP-mediated monocytic inflammasome activation. *Front Immunol.* 2018;9:1604.

(177) Ridker PM, Everett BM, Thuren T, MacFadyen JG, Chang WH, Ballantyne C, et al. Antiinflammatory therapy with Canakinumab for atherosclerotic disease. *N Engl J Med.* 2017;377(12):1119-31.

(178) Rivera CA, Wheeler MD, Enomoto N, Thurman RG. A choline-rich diet improves survival in a rat model of endotoxin shock. *Am J Physiol.* 1998;275(4):G862-7.

(179) Rosas-Ballina M, Ochani M, Parrish WR, Ochani K, Harris YT, Huston JM, et al. Splenic nerve is required for cholinergic antiinflammatory pathway control of TNF in endotoxemia. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2008;105(31):11008-13.

(180) Rusai K, Huang H, Sayed N, Strobl M, Roos M, Schmaderer C, et al. Administration of interleukin-1 receptor antagonist ameliorates renal ischemia-reperfusion injury. *Transpl Int.* 2008;21(6):572-80.

- (181) Sarma JV, Ward PA. The complement system. *Cell Tissue Res.* 2011;343(1):227-35.
- (182) Sato KZ, Fujii T, Watanabe Y, Yamada S, Ando T, Kazuko F, et al. Diversity of mRNA expression for muscarinic acetylcholine receptor subtypes and neuronal nicotinic acetylcholine receptor subunits in human mononuclear leukocytes and leukemic cell lines. *Neurosci Lett.* 1999;266(1):17-20.
- (183) Scaffidi P, Misteli T, Bianchi ME. Release of chromatin protein HMGB1 by necrotic cells triggers inflammation. *Nature.* 2002;418(6894):191-5.
- (184) Scheibner KA, Lutz MA, Boodoo S, Fenton MJ, Powell JD, Horton MR. Hyaluronan fragments act as an endogenous danger signal by engaging TLR2. *J Immunol.* 2006;177(2):1272-81.
- (185) Schroder K, Tschopp J. The inflammasomes. *Cell.* 2010;140(6):821-32.
- (186) Schweda EK, Richards JC. Structural profiling of short-chain lipopolysaccharides from *Haemophilus influenzae*. *Methods Mol Med.* 2003;71:161-83.
- (187) Schweda EK, Richards JC, Hood DW, Moxon ER. Expression and structural diversity of the lipopolysaccharide of *Haemophilus influenzae*: implication in virulence. *Int J Med Microbiol.* 2007;297(5):297-306.
- (188) Searl TJ, Redman RS, Silinsky EM. Mutual occlusion of P2X ATP receptors and nicotinic receptors on sympathetic neurons of the guinea-pig. *J Physiol.* 1998;510(Pt 3):783-91.
- (189) Serino L, Virji M. Genetic and functional analysis of the phosphorylcholine moiety of commensal *Neisseria* lipopolysaccharide. *Mol Microbiol.* 2002;43(2):437-48.
- (190) Sgard F, Charpentier E, Bertrand S, Walker N, Caput D, Graham D, et al. A novel human nicotinic receptor subunit, alpha10, that confers functionality to the alpha9-subunit. *Mol Pharmacol.* 2002;61(1):150-9.
- (191) Shi Y, Evans JE, Rock KL. Molecular identification of a danger signal that alerts the immune system to dying cells. *Nature.* 2003;425(6957):516-21.

- (192) Su X, Lee JW, Matthay ZA, Mednick G, Uchida T, Fang X, et al. Activation of the alpha7 nAChR reduces acid-induced acute lung injury in mice and rats. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2007;37(2):186-92.
- (193) Sundstrom C, Nilsson K. Establishment and characterization of a human histiocytic lymphoma cell line (U-937). *Int J Cancer.* 1976;17(5):565-77.
- (194) Suzuki T, Hide I, Matsubara A, Hama C, Harada K, Miyano K, et al. Microglial alpha7 nicotinic acetylcholine receptors drive a phospholipase C/IP3 pathway and modulate the cell activation toward a neuroprotective role. *J Neurosci Res.* 2006;83(8):1461-70.
- (195) Swords WE, Buscher BA, Ver Steeg Ii K, Preston A, Nichols WA, Weiser JN, et al. Non-typeable *Haemophilus influenzae* adhere to and invade human bronchial epithelial cells via an interaction of lipooligosaccharide with the PAF receptor. *Mol Microbiol.* 2000;37(1):13-27.
- (196) Taanman JW. The mitochondrial genome: structure, transcription, translation and replication. *Biochim Biophys Acta.* 1999;1410(2):103-23.
- (197) Takahashi HK, Iwagaki H, Hamano R, Yoshino T, Tanaka N, Nishibori M. Effect of nicotine on IL-18-initiated immune response in human monocytes. *J Leukoc Biol.* 2006;80(6):1388-94.
- (198) Takeuchi O, Akira S. Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell.* 2010;140(6):805-20.
- (199) Tayebati SK, Amenta F, Amici S, El-Assouad D, Gallai V, Ricci A, et al. Peripheral blood lymphocytes muscarinic cholinergic receptor subtypes in Alzheimer's disease: a marker of cholinergic dysfunction? *J Neuroimmunol.* 2001;121(1-2):126-31.
- (200) Thomas GA, Rhodes J, Green JT, Richardson C. Role of smoking in inflammatory bowel disease: implications for therapy. *Postgrad Med J.* 2000;76(895):273-9.
- (201) Tracey KJ. The inflammatory reflex. *Nature.* 2002;420(6917):853-9.
- (202) Traiffort E, Ruat M, O'Regan S, Meunier FM. Molecular characterization of the family of choline transporter-like proteins and their splice variants. *J Neurochem.* 2005;92(5):1116-25.

- (203) Tsukamoto H, Fukudome K, Takao S, Tsuneyoshi N, Kimoto M. Lipopolysaccharide-binding protein-mediated Toll-like receptor 4 dimerization enables rapid signal transduction against lipopolysaccharide stimulation on membrane-associated CD14-expressing cells. *Int Immunol.* 2010;22(4):271-80.
- (204) Tucek S. The synthesis of acetylcholine in skeletal muscles of the rat. *J Physiol.* 1982;322:53-69.
- (205) Ueda M, Matsuura Y, Hosoda R, Saji H. In vivo imaging of nicotinic acetylcholine receptors in the central nervous system. In: Akaike A, Shimohama S, Misu Y, editors. *Nicotinic acetylcholine receptor signaling in neuroprotection.* Singapore2018. p. 17-44.
- (206) Usdin TB, Eiden LE, Bonner TI, Erickson JD. Molecular biology of the vesicular ACh transporter. *Trends Neurosci.* 1995;18(5):218-24.
- (207) Valdes-Ferrer SI, Crispin JC, Belaunzaran PF, Cantu-Brito CG, Sierra-Madero J, Alcocer-Varela J. Acetylcholine-esterase inhibitor pyridostigmine decreases T cell overactivation in patients infected by HIV. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 2009;25(8):749-55.
- (208) Vallance TM, Zeuner MT, Williams HF, Widera D, Vaiyapuri S. Toll-like receptor 4 signalling and its impact on platelet function, thrombosis, and haemostasis. *Mediators Inflamm.* 2017;2017:9605894.
- (209) van Dijk AP, Meijssen MA, Brouwer AJ, Hop WC, van Bergeijk JD, Feyereabend C, et al. Transdermal nicotine inhibits interleukin 2 synthesis by mononuclear cells derived from healthy volunteers. *Eur J Clin Invest.* 1998;28(8):664-71.
- (210) Verbitsky M, Rothlin CV, Katz E, Elgoyhen AB. Mixed nicotinic-muscarinic properties of the alpha9 nicotinic cholinergic receptor. *Neuropharmacol.* 2000;39(13):2515-24.
- (211) Walport MJ. Complement. First of two parts. *N Engl J Med.* 2001;344(14):1058-66.

- (212) Wang H, Yu M, Ochani M, Amella CA, Tanovic M, Susarla S, et al. Nicotinic acetylcholine receptor alpha7 subunit is an essential regulator of inflammation. *Nature*. 2003;421(6921):384-8.
- (213) Wang X, Antony V, Wang Y, Wu G, Liang G. Pattern recognition receptor-mediated inflammation in diabetic vascular complications. *Med Res Rev*. 2020;40(6):2466-2484.
- (214) Weigt SS, Palchevskiy V, Belperio JA. Inflammasomes and IL-1 biology in the pathogenesis of allograft dysfunction. *J Clin Invest*. 2017;127(6):2022-9.
- (215) Weiser JN, Lindberg AA, Manning EJ, Hansen EJ, Moxon ER. Identification of a chromosomal locus for expression of lipopolysaccharide epitopes in *Haemophilus influenzae*. *Infect Immun*. 1989;57(10):3045-52.
- (216) Wessler I, Kirkpatrick CJ. The Non-neuronal cholinergic system: an emerging drug target in the airways. *Pulm Pharmacol Ther*. 2001;14(6):423-34.
- (217) Wessler I, Kirkpatrick CJ. Cholinergic signaling controls immune functions and promotes homeostasis. *Int Immunopharmacol*. 2020;83:106345.
- (218) Wessler I, Kirkpatrick CJ, Racke K. The cholinergic 'pitfall': acetylcholine, a universal cell molecule in biological systems, including humans. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 1999;26(3):198-205.
- (219) Wessler I, Roth E, Deutsch C, Brockerhoff P, Bittinger F, Kirkpatrick CJ, et al. Release of non-neuronal acetylcholine from the isolated human placenta is mediated by organic cation transporters. *Br J Pharmacol*. 2001;134(5):951-6. PubMed PMID: 11682442.
- (220) Woo SR, Corrales L, Gajewski TF. Innate immune recognition of cancer. *Annu Rev Immunol*. 2015;33:445-74.
- (221) Yeboah MM, Xue X, Javdan M, Susin M, Metz CN. Nicotinic acetylcholine receptor expression and regulation in the rat kidney after ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2008;295(3):F654-61.
- (222) Yoshikawa H, Kurokawa M, Ozaki N, Nara K, Atou K, Takada E, et al. Nicotine inhibits the production of proinflammatory mediators in human monocytes by suppression of I-kappaB phosphorylation and nuclear factor-kappaB transcriptional

activity through nicotinic acetylcholine receptor alpha7. *Clin Exp Immunol.* 2006;146(1):116-23.

(223) Zanoni I, Ostuni R, Marek LR, Barresi S, Barbalat R, Barton GM, et al. CD14 controls the LPS-induced endocytosis of Toll-like receptor 4. *Cell.* 2011;147(4):868-80.

(224) Zeisel SH. Gene response elements, genetic polymorphisms and epigenetics influence the human dietary requirement for choline. *IUBMB life.* 2007;59(6):380-7.

(225) Zewinger S, Schumann T, Fliser D, Speer T. Innate immunity in CKD-associated vascular diseases. *Nephrol Dial Transplant.* 2016;31(11):1813-21.

(226) Zhang Q, Raoof M, Chen Y, Sumi Y, Sursal T, Junger W, et al. Circulating mitochondrial DAMPs cause inflammatory responses to injury. *Nature.* 2010;464(7285):104-7.

(227) Zhong C, Du C, Hancock M, Mertz M, Talmage DA, Role LW. Presynaptic type III neuregulin 1 is required for sustained enhancement of hippocampal transmission by nicotine and for axonal targeting of alpha7 nicotinic acetylcholine receptors. *J Neurosci.* 2008;28(37):9111-6.

(228) Zhong C, Talmage DA, Role LW. Nicotine elicits prolonged calcium signaling along ventral hippocampal axons. *PLoS One.* 2013;8(12):e82719.

(229) Zimring JC, Kapp LM, Yamada M, Wess J, Kapp JA. Regulation of CD8+ cytolytic T lymphocyte differentiation by a cholinergic pathway. *J Neuroimmunol.* 2005;164(1-2):66-75.

9 Publikationsverzeichnis

Aus den Ergebnissen dieser Arbeit entstandene Originalarbeit:

Hecker A¹, Küllmar M¹, 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 EK, Lochnit G, Grau V. Phosphocholine-modified macromolecules and canonical nicotinic agonists inhibit ATP-induced IL-1 β release. *J Immunol.* 2015;195(5):2325-34.

(¹ = Die Autoren teilen die Erstautorenschaft.)

Kongressbeiträge im Rahmen dieser Arbeit:

Vorträge:

ATP-mediated inflammasome activation is regulated by cholinergic agonists. *Chirurgische Forschungstage 2012, Regensburg, 04.-06.10.12.*

Phosphorylcholine-modified macromolecules inhibit the ATP-dependent IL-1 β release in human monocytes. *22. Jahrestagung der Deutschen Transplantationsgesellschaft, Frankfurt/Main, 24.-26.10.13.*

Poster:

ATP-mediated release of interleukin-1 β is inhibited by activation of nicotinic acetylcholine receptors containing subunit $\alpha 9$. *ISAN-EFAS, Gießen, 29.07.-02.08.13.*

ATP-mediated inflammasome activation is efficiently inhibited by acetylcholine. *15th International Congress of Immunology, Mailand, 22.08.-27.08.13.*

ATP-mediated release of interleukin-1 β is inhibited by acetylcholine. *Weimarer Sepsis Update 2013, 04.-06.09.13.*

Phosphorylcholine-modified macromolecules inhibit ATP-dependent interleukin-1 β release by human monocytes. *Weimarer Sepsis Update 2013, 04.-06.09.13.*

ATP-mediated release of interleukin-1 β is inhibited by acetylcholine. *101. Jahrestagung der Vereinigung Mittelrheinischer Chirurgen, Tübingen, 26.-27.09.13.*

Phosphocholine-modified LPS from *Haemophilus influenzae* inhibits ATP-induced inflammasome activation via nicotinic acetylcholine receptor $\alpha 9$. *3rd Munich Lung Conference, München, 04.-05.10.13.*

Preise:

ATP-mediated release of interleukin-1 β is inhibited by acetylcholine. *101. Jahrestagung der Vereinigung Mittelrheinischer Chirurgen, Tübingen, 26.-27.09.13.* Posterpreis.

Weitere Publikationen:

Originalarbeiten:

Zarbock A¹, Küllmar M¹, Kindgen-Milles D, Wempe C, Gerss J, Brandenburger T, Dimski T, Tyczynski B, Jahn M, Mülling N, Mehrländer M, Rosenberger P, Marx G, Simon TP, Jaschinski U, Deetjen P, Putensen C, Schewe JC, Kluge S, Jarczak D, Slowinski T, Bodenstein M, Meybohm P, Wirtz S, Moerer O, Kortgen A, Simon P, Bagshaw SM, Kellum JA, Meersch M; RICH Investigators and the Sepnet Trial Group. Effect of regional citrate anticoagulation vs systemic heparin anticoagulation during continuous kidney replacement therapy on dialysis filter life span and mortality among critically ill patients with acute kidney injury: a randomized clinical trial. *JAMA.* 2020;324(16):1629-1639.

Meersch M¹, Küllmar M¹, Pavenstädt H, Rossaint J, Kellum JA, Martens S, Klausmeyer P, Schmidt EA, Kerschke L, Zarbock A. Effects of different doses of remote ischemic preconditioning on kidney damage among patients undergoing cardiac surgery: a single-center mechanistic randomized controlled trial. *Crit Care Med.* 2020;48(8):e690-e697.

Küllmar M¹, Massoth C¹, Ostermann M, Campos S, Grau Novellas N, Thomson G, Haffner M, Arndt C, Wulf H, Iqbal M, Monaco F, Di Prima A, Garcia Alvarez M, Italiano S, Cegarra SanMartin V, Kunst G, Nair S, L'Acqua C, Hoste EAJ, Vandenberghe W, Honore PM, Kellum J, Forni L, Grieshaber P, Weiss R, Gerss J, Wempe C, Meersch M, Zarbock A. Biomarker-guided implementation of the KDIGO guidelines to reduce the occurrence of acute kidney injury in patients after cardiac surgery (PrevAKI-multicentre): protocol for a multicentre, observational study followed by randomised controlled feasibility trial. *BMJ Open.* 2020;10(4):e034201.

Küllmar M¹, Weiß R¹, Ostermann M, Campos S, Grau Novellas N, Thomson G, Haffner M, Arndt C, Wulf H, Irsqusi M, Monaco F, Di Prima AL, García-Alvarez M, Italiano S, Felipe Correoso M, Kunst G, Nair S, L'Acqua C, Hoste E, Vandenberghe W, Honore PM, Kellum JA, Forni L, Grieshaber P, Wempe C, Meersch M, Zarbock A. A multinational observational study exploring adherence with the kidney disease: improving global outcomes recommendations for prevention of acute kidney injury after cardiac surgery. *Anesth Analg.* 2020;130(4):910-916.

Meersch M¹, **Küllmar M**¹, Renfurm R, Margraf A, Bormann E, Zarbock A. Vascular adhesion protein-1 is associated with acute kidney injury in high-risk patients after cardiac surgery. *Anesth Analg.* 2019;129(6):1474-1481.

Schunk SJ, Zarbock A, Meersch M, **Küllmar M**, Kellum JA, Schmit D, Wagner M, Triem S, Wagenpfeil S, Gröne HJ, Schäfers HJ, Fliser D, Speer T, Zewinger S. Association between urinary dickkopf-3, acute kidney injury, and subsequent loss of kidney function in patients undergoing cardiac surgery: an observational cohort study. *Lancet.* 2019;394(10197):488-496.

Meersch M¹, **Küllmar M**¹, Wempe C, Kindgen-Milles D, Kluge S, Slowinski T, Marx G, Gerss J, Zarbock A; SepNet Critical Care Trials Group. Regional citrate versus systemic heparin anticoagulation for continuous renal replacement therapy in critically ill patients with acute kidney injury (RICH) trial: study protocol for a multicentre, randomised controlled trial. *BMJ Open.* 2019;9(1):e024411.

Richter K, Sagawe S, Hecker A, **Küllmar M**, Askevold I, Damm J, Heldmann S, Pöhlmann M, Ruhrmann S, Sander M, Schlüter KD, Wilker S, König IR, Kummer W, Padberg W, Hone AJ, McIntosh JM, Zakrzewicz AT, Koch C, Grau V. C-reactive protein stimulates nicotinic acetylcholine receptors to control ATP-mediated monocytic inflammasome activation. *Front Immunol.* 2018;9:1604.

Siebers K, Fink B, Zakrzewicz A, Agné A, Richter K, Konzok S, Hecker A, Zukunft S, **Küllmar M**, Klein J, McIntosh JM, Timm T, Sewald K, Padberg W, Aggarwal N, Chamulitrat W, Santoso S, Xia W, Janciauskiene S, Grau V. Alpha-1 antitrypsin inhibits ATP-mediated release of interleukin-1 β via CD36 and nicotinic acetylcholine receptors. *Front Immunol.* 2018;9:877.

Hiller SD, Heldmann S, Richter K, Jurastow I, **Küllmar M**, Hecker A, Wilker S, Fuchs-Moll G, Manzini I, Schmalzing G, Kummer W, Padberg W, McIntosh JM, Damm J,

Zakrzewicz A, Grau V. β -Nicotinamide adenine dinucleotide (β -NAD) inhibits ATP-dependent IL-1 β release from human monocytic cells. *Int J Mol Sci.* 2018;19(4):1126.

Meersch M¹, **Küllmar M**¹, Schmidt C, Gerss J, Weinhage T, Margraf A, Ermert T, Kellum JA, Zarbock A. Long-term clinical outcomes after early initiation of RRT in critically ill patients with AKI. *J Am Soc Nephrol.* 2018;29(3):1011-1019.

Backhaus S, Zakrzewicz A, Richter K, Damm J, Wilker S, Fuchs-Moll G, **Küllmar M**, Hecker A, Manzini I, Ruppert C, McIntosh JM, Padberg W, Grau V. Surfactant inhibits ATP-induced release of interleukin-1 β via nicotinic acetylcholine receptors. *J Lipid Res.* 2017;58(6):1055-1066.

Zarbock A, Kellum JA, Van Aken H, Schmidt C, **Küllmar M**, Rosenberger P, Martens S, Görlich D, Meersch M. Long-term effects of remote ischemic preconditioning on kidney function in high-risk cardiac surgery patients: follow-up results from the RenalRIP trial. *Anesthesiology.* 2017;126(5):787-798.

(für alle: ¹ = Die Autoren teilen die Erstautorenschaft.)

Übersichtsarbeiten, Buchbeiträge und Editorials:

Küllmar M, Zarbock A, Engelman DT, Chatterjee S, Wagner NM. Prevention of acute kidney injury. *Crit Care Clin.* 2020;36(4):691-704.

Rossaint J, **Küllmar M**, Zarbock A. Prärenale Nierenschädigung. In Gernot Marx, Kai Zacharowski, Stefan Kluge (Hrsg.): Referenz Intensivmedizin. Georg Thieme Verlag KG. 2020;1:32-37.

Küllmar M, Zarbock A. Renal replacement therapy in acute kidney injury: from the indications to cessation. *Anaesthesist.* 2019;68(7):485-496.

Küllmar M, Meersch M. Perioperative acute kidney injury. *Anaesthesist.* 2019;68(4):194-201.

Küllmar M, Meersch M. Intraoperative oliguria: physiological or beginning acute kidney injury? *Anesth Analg.* 2018;127(5):1109-1110.

Meersch M, Zarbock A, **Küllmar M**. Renal biomarkers for the initiation of renal replacement therapy-is this the future? *J Thorac Dis.* 2018;10(Suppl 26):S3229-S3232.

Küllmar M, Zarbock A. Renal replacement therapy in acute kidney injury - indication and implementation. *Anesthesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther.* 2018;53(2):150-157.

Küllmar M, Zarbock, A. Acute kidney injury and information technology. *Contrib Nephrol.* 2018;193:81-88.

10 Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der JustusLiebig-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

11 Danksagung

Ich bedanke mich ganz herzlich bei Frau Prof. Dr. Veronika Grau für die Überlassung dieses Promotionsthemas, ihr Vertrauen, die wissenschaftliche Förderung und die hervorragende Betreuung über die komplette Zeit. Die sehr positiven und interessanten Erfahrungen und Einblicke, die ich dank ihrer Hilfe bei dieser Promotionsarbeit sammeln durfte, haben meinen weiteren beruflichen Werdegang maßgeblich beeinflusst. Dafür bin ich ihr sehr dankbar.

Großer Dank gilt Herrn PD Dr. Andreas Hecker für die herzliche Betreuung und Unterstützung und natürlich für lustige Kongressausflüge mit paniertem Schnitzel. Ich danke ihm sehr, dass er auch nach Jahren unseren Kontakt aufrechterhalten und mich auch immer wieder ermuntert hat, endlich diese Arbeit zu verschriftlichen. Selbstverständlich ist ihm wie versprochen das ELISA-Kapitel gewidmet.

Frau Sigrid Wilker danke ich von Herzen für die tolle Betreuung, Geduld und Unterstützung im Labor. Von ihr habe ich sehr viel gelernt und ohne sie und ihre Ideen wäre diese Arbeit in dieser Form nicht zustande gekommen.

Ein großes Dankeschön gilt dem damaligen Team der Sektion Experimentelle Chirurgie für die tolle Zusammenarbeit und Unterstützung. Dank euch bin ich jeden Tag sehr gerne ins Labor gekommen. Ich bedanke mich herzlich bei Gabriele Fuchs-Moll, Sabine Stumpf, Laetitia Rabin, Dr. Anna Zakrzewicz, Dr. Srebrena Atanasova-Koch und Dr. Katrin Richter. Ein ganz besonderer Dank gilt Kathrin Petri und meinen damaligen Doktoranden-Kollegen Dr. Alena Evers, Jessica Schmitz, Dr. Dorothee Kopf und Dr. Sören Backhaus. Ein großer Dank für ihre Freundschaft und Ermunterungen gilt Dr. Astrid Schulte. Ich danke euch für die wunderbare und lustige Zeit im Labor und außerhalb des Labors.

Ich bedanke mich für die Förderung meiner Promotionsarbeit durch das Landes-Offensive zur Entwicklung Wissenschaftlich-Ökonomischer Exzellenz (LOEWE)-Projekt „Non-neuronale cholinerge Systeme (NNCS)“, hier gilt ein besonderer Dank Herrn Prof. Dr. Wolfgang Kummer.

12 Lebenslauf

**Der Lebenslauf wurde aus Datenschutzgründen aus der elektronischen
Version dieser Arbeit entfernt.**