

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik II
der Universität Würzburg
Direktor: Prof. Dr. med. Hermann Einsele

**Die Rolle des AIM2 und NLRP3 Inflammasoms in Kolonadenom- und
Kolonkarzinomzelllinien**

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von
Franziska Peschke
aus Freiburg im Breisgau

Würzburg, Juli 2015

Referent: Priv.-Doz. Dr. Ralph Melcher

Korreferent: Prof. Dr. Henning Hamm

Dekan: Prof. Dr. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 14. Juli 2015

Die Promovendin ist Ärztin

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Das Immunsystem	1
1.1.1	Grundprinzipien.....	1
1.1.2	Die Pattern Recognition Rezeptoren (PRRs).....	2
1.1.2.1	Toll-like Rezeptoren (TLRs)	2
1.1.2.2	NOD-like Rezeptoren (NLRs).....	3
1.1.2.2.1	NLRP (NLR pyrin domain containing) Subfamilie	5
1.1.2.3	Zytosolische dsDNA Sensoren (CDSs).....	5
1.1.3	Die Inflammasome	5
1.1.3.1	NLRP3 Inflammasom	6
1.1.3.1.1	Hypothesen zu den molekularen Details der NLRP3 Inflammasomaktivierung	9
1.1.3.1.2	NLRP3 Inflammasom und assoziierte Pathologien.....	10
1.1.3.2	AIM2 Inflammasom	10
1.1.3.2.1	AIM2 Inflammasomaktivierung in Keratinozyten aus Psoriasisläsionen	12
1.1.3.2.2	Assoziation von Mutationen im AIM2 Gen mit dem Auftreten sporadischer Kolonkarzinome und Karzinomen im Rahmen des HNPCC (hereditäres, nichtpolypöses Kolonkarzinom-Syndrom).....	12
1.1.3.3	IL-1 β und IL-18.....	13
1.2	Chronisch entzündliche Darmerkrankungen (CEDs)	14
1.2.1	Epidemiologie.....	14
1.2.2	Genetik.....	14
1.2.3	Ätiologie und Pathogenese	15
1.2.4	Therapie	16
1.2.5	Assoziation der CEDs mit dem NLRP3 Inflammasom	16
1.2.6	Assoziation der CEDs mit Defekten der TLR Funktion	17
1.3	Zielsetzung der Arbeit	18
2	Material und Methoden	19
2.1	Material	19
2.1.1	Geräte	19

Inhaltsverzeichnis

2.1.2	Verbrauchsmaterialien	20
2.1.3	Chemikalien	21
2.1.4	Fertigsätze	24
2.1.5	Enzyme	24
2.1.6	Sonden und Primer für die qPCR.....	25
2.1.7	Zelllinien und Kulturmedien.....	25
2.2	Methoden	26
2.2.1	Zellkultur.....	26
2.2.1.1	Transfektion	27
2.2.1.1.1	Transfektion von poly(dA:dT) mittels Lipofectamine RNAiMAX.....	27
2.2.1.1.2	Transfektion mittels poly(dA:dT)/LyoVec	28
2.2.2	Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)	28
2.2.2.1	Prinzip des ELISA	28
2.2.2.2	Durchführung des ELISA	29
2.2.3	Quantitative Real-Time-PCR (qPCR).....	31
2.2.3.1	Prinzip der qPCR	31
2.2.3.2	Allgemeine Hinweise zur RNA-Aufbereitung.....	32
2.2.3.3	RNA Präparation	32
2.2.3.4	Aufreinigung und DNase-Behandlung.....	34
2.2.3.5	Photometrische Quantifizierung der RNA	35
2.2.3.6	cDNA-Synthese.....	36
2.2.3.7	Vorbereitung der qPCR.....	37
2.2.3.8	Genexpressionsanalyse	38
2.2.4	Western Blot.....	38
2.2.4.1	Vorbereitung der Proben und Konzentrationsbestimmung	38
2.2.4.2	Gelpräparation	40
2.2.4.3	Laden des Gels und SDS-PAGE	41
2.2.4.4	Transfer der Proteine auf die Polyvinylidenfluorid (PVDF) Membran und Blocking	43
2.2.4.5	Inkubation mit erstem und zweitem Antikörper	44
2.2.4.6	Detektion	45
3	Ergebnisse	46

Inhaltsverzeichnis

3.1	Induktion des AIM2 Inflammasoms	46
3.1.1	NHEKs als Modellbeispiel für die Transfektion von poly(dA:dT) mittels Lipofectamine RNAiMAX	47
3.1.2	THP-1 Zellen als Methodenkontrolle für die Transfektion von poly(dA:dT) mittels Lipofectamine RNAiMAX.....	50
3.1.3	IL-1 β Nachweis in THP-1 Zellen durch die Western Blot Methodik.....	51
3.1.4	Untersuchung der Kolonepithelzellen auf die Induzierbarkeit des AIM2 Inflammasoms	52
3.1.4.1	Stimulation der Kolonepithelzellen mit IFN- γ	52
3.1.4.2	AIM2 Proteinnachweis in Kolonepithelzellen durch die Western Blot Methodik	54
3.1.4.3	Transfektion der Kolonzelllinien GEKI-2 und HT-29 mit poly(dA:dT) mittels Lipofectamine RNAiMAX.....	56
3.1.4.4	Untersuchung der Genexpression weiterer Kolonzelllinien nach Zytokinstimulation in der RT-qPCR.....	59
3.1.5	Transfektion mittels poly(dA:dT)/LyoVec	61
3.1.5.1	THP-1 Zellen als Modellbeispiel für die Transfektion mittels poly(dA:dT)/LyoVec.....	61
3.1.5.2	Transfektion von Kolonzellen mittels poly(dA:dT)/LyoVec	62
3.1.6	Stimulation von THP-1 Zellen ohne Transfektion.....	62
3.2	Induktion des NLRP3 Inflammasoms	63
3.2.1	THP-1 Zellen als Modellbeispiel für die Induktion des NLRP3 Inflammasoms über verschiedene Stimuli im ELISA	64
3.2.2	Untersuchung der Kolonepithelzellen auf die Induzierbarkeit des NLRP3 Inflammasoms	65
4	Diskussion	67
4.1	Die Rolle des AIM2 und NLRP3 Inflammasoms in Kolonzellen	67
4.2	AIM2 Inflammasom	69
4.2.1	Die Rolle des AIM2 Inflammasoms in Keratinozyten in Psoriasisläsionen	69

4.2.2	Untersuchung der Kolonzelllinien auf Induzierbarkeit des AIM2 Inflammasoms	71
4.3	NLRP3 Inflammasom	74
5	Zusammenfassung	76
6	Literaturverzeichnis	77
7	Anhang	83
7.1	Abkürzungsverzeichnis	83
7.2	Abbildungsverzeichnis	86
7.3	Tabellenverzeichnis	87

1 Einleitung

1.1 Das Immunsystem

1.1.1 Grundprinzipien

Das Immunsystem der Säugetiere wird unterteilt in die unspezifische, angeborene Immunabwehr und in die spezifische, adaptive Immunabwehr. Beide Systeme sind funktionell eng miteinander verknüpft (Akira *et al.* 2006).

Die angeborene Immunität ist von Geburt an funktionstüchtig und verantwortlich für die jederzeit einsetzbare Sofortverteidigung gegen pathogene Keime. Hauptakteure sind phagozytäre Zellen wie Makrophagen, Dendritische Zellen, Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) und neutrophile Granulozyten. Sie verfügen über sog. Pattern Recognition Rezeptoren (PRRs), über welche sie in der Lage sind strukturelle Merkmale von Mikroorganismen, die sog. pathogen-associated molecular patterns (PAMPs, siehe 1.1.2), zu erkennen (Kawai and Akira 2009). Wichtige humorale Faktoren sind Komplementfaktoren und Zytokine (Lüllmann-Rauch 2012).

Das adaptive Immunsystem kommt nach der Geburt erst langsam in Gang, nimmt aber im Laufe des Lebens an Effektivität enorm zu (Lüllmann-Rauch 2012). Im Gegensatz zum angeborenen Immunsystem ist es hoch spezifisch und verfügt über ein immunologisches Gedächtnis (Kawai and Akira 2009). Es besteht aus 2 Systemen, die unterschiedliche Strategien benutzen, aber eng miteinander kooperieren: die humorale Immunabwehr, bestehend aus den B-Lymphozyten, die über Plasmazellen für die Bildung Antigen spezifischer Antikörper sorgen, und die zellvermittelte Immunabwehr, bestehend aus den T-Lymphozyten (Lüllmann-Rauch 2012).

Werden eindringende Pathogene durch die PAMPs des angeborenen Immunsystem erkannt, werden nicht nur Inflammation und Phagozytose sowie Mechanismen der unspezifischen Immunabwehr angestoßen, sondern gleichzeitig auch über komplexe und streng regulierte Signalwege die

spezifische Erregerabwehr des erworbenen Immunsystems initiiert. Dies geschieht u.a. über die Expression kostimulierender Faktoren auf antigenpräsentierenden Zellen, welche die Reifung Dendritischer Zellen induzieren (Kawai and Akira 2011).

1.1.2 Die Pattern Recognition Rezeptoren (PRRs)

Die angeborene Immunabwehr bedient sich evolutionär konservierter Mechanismen, welche eine frühe und effektive Antwort gegenüber eindringenden mikrobiellen Pathogenen ermöglichen. So basiert sie mitunter auf dem Vorhandensein einer limitierten Anzahl von PRRs, welche in der Lage sind Pathogen-assoziierte molekulare Muster, die sog. PAMPs, zu erkennen. Dies sind spezifische, dem mikrobiellen Organismus entstammende, hoch konservierte strukturelle Motive, welche ausschließlich in Mikroben exprimiert werden, nicht jedoch in Säugetieren (Shaw *et al.* 2010). Nach der Detektion der PAMPs triggern einige PRRs inflammatorische Immunantworten, die zu einer effizienten Zerstörung der eindringenden Pathogene führen (Akira *et al.* 2006).

Aktuell sind neben den vier wohl bekanntesten Familien der PRRs, den Toll-like Rezeptoren (TLRs), den NOD-like Rezeptoren (NLRs), den RIG-1-like Rezeptoren (RLRs) und den C-type Lectin Rezeptoren (CLRs), auch neuere PRRs, wie Zytosolische dsDNA Sensoren (CDSs) und NLRs, die bei der Bildung von Inflammasomen (1.1.3) beteiligt sind, Gegenstand intensiver Forschung (Schroder and Tschopp 2010).

1.1.2.1 Toll-like Rezeptoren (TLRs)

Die TLRs stellen die als erstes identifizierten und am besten charakterisierten Rezeptoren unter den PRRs dar (Akira *et al.* 2006, Beutler 2009). Alle 10 im Menschen bekannten TLRs sind Typ 1 Transmembranproteine (Kawai and Akira 2011). Sie erkennen eine große Auswahl an PAMPs von Bakterien, darunter auch das in dieser Arbeit eingesetzte Lipopolysaccharid (LPS) aus der Zellwand Gram-negativer Bakterien, außerdem Peptidoglykan, Flagellin, sowie PAMPs von Pilzen, Parasiten und Viren, z.B. doppelsträngige Virus-RNA (Stutz

et al. 2009, Barber 2011, Kawai and Akira 2011). Darüber hinaus sind die TLRs in der Lage endogene Gefahrensignale in Form von Molekülen, die aus nekrotischen oder sterbenden Zellen freigesetzt werden, sog. danger-associated molecular patterns (DAMPs), wahrzunehmen (Chen and Nunez 2011). Die TLRs werden von Immunzellen, wie Makrophagen, dendritischen Zellen, Mastzellen und Lymphozyten, sowie von Epithelzellen und Fibroblasten exprimiert (Akira *et al.* 2006).

Nach Stimulation der TLRs werden unterschiedliche Signalkaskaden angestoßen und Transkriptionsfaktoren, wie beispielsweise der Nuclear Factor κ B (NF- κ B), aktiviert. Diese induzieren die Sekretion von proinflammatorischen Zytokinen und Effektorzytokinen, über welche die adaptive Immunantwort gesteuert und reguliert wird.

1.1.2.2 NOD-like Rezeptoren (NLRs)

Die NLRs stellen eine große Familie von intrazellulären PRRs dar. Obgleich die Liganden und Funktionen von vielen dieser Rezeptoren noch nicht bekannt sind, besteht ihre Hauptaufgabe wohl darin zytoplasmatische PAMPs und/oder DAMPs, wie erhöhtes ATP (Mariathasan *et al.* 2006) oder Harnsäurekristalle (Martinon *et al.* 2006), zu erkennen und entsprechend Immunantworten zu induzieren.

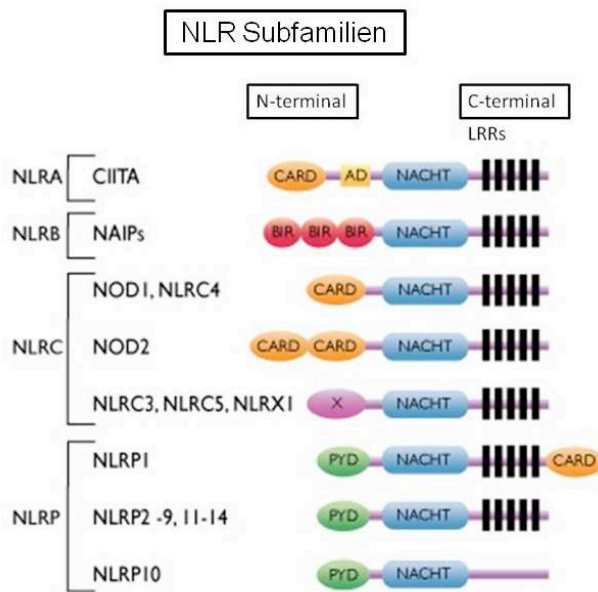


Abb. 1: Aufbau der NLR Subfamilien, modifiziert nach InvivoGen
 CIITA (class II transactivator), (Steimle *et al.* 2007); NAIP (NLR family, apoptosis inhibitory protein), (Kofoed and Vance 2012); LRR (leucin-rich repeats); NACHT/NOD (Nukleotid-bindende Domäne); AD (transactivator domain); PYD (pyrin domain); CARD (Caspase recruitment domain); BIR (baculoviral inhibitor of apoptosis repeat domain); NLRA (NLR containing AD); NLRB (NLR containing BIR); NLRC (NLR containing CARD); NLRP (NLR containing PYD)

Die NLRs sind durch ihren dreigliedrigen Aufbau charakterisiert. Er besteht aus C-terminalen leucin-rich repeats (LRR) Region, welche für das Erkennen der PAMPs essenziell ist (Kobe and Kajava 2001), einer zentralen Nukleotid-bindenden Domäne (NACHT, auch NOD) sowie einer von Familie zu Familie variierenden N-terminalen Effektorregion, die Protein-Proteininteraktionen vermittelt und aus einer Caspase recruitment domain (CARD), Pyrin-Domäne (PYD), transactivator domain (AD) oder baculoviral inhibitor of apoptosis repeat domain (BIR) zusammengesetzt ist (Schroder and Tschopp 2010).

Entsprechend ihrer jeweiligen Effektordomäne, werden die NLRs in 4 Subfamilien unterteilt: NLRC (ehemals „NODs“), NLRP (ehemals „NALPs“), NLRB (ehemals „NAIP“ oder „Birc“) und NLRA. Die Endungen C, P, B und A stellen die Anfangsbuchstaben der Effektordomänen CARD, PYD, BIR und AD dar (InvivoGen 2012).

1.1.2.2.1 NLRP (NLR pyrin domain containing) Subfamilie

Obgleich viele Funktionen dieser über 14 Mitglieder (Stutz *et al.* 2009) umfassenden NLRP (NOD-like receptor protein) Subfamilie, auch als NALP (NACHT, LRR and PYD domains-containing protein) Subfamilie bezeichnet, noch unbekannt sind, spielen einige NLRPs eine Schlüsselrolle in der Regulation der Caspase-1, indem sie die Bildung von Inflammasomen (1.1.3) und die in deren Folge stattfindende Produktion proinflammatorischer Zytokine, z.B. der Interleukine, induzieren.

1.1.2.3 Zytosolische dsDNA Sensoren (CDSs)

Zum Erkennen zytosolischer DNA bedarf es sehr komplizierter Mechanismen. Aktuell wird davon ausgegangen, dass über die bisher bekannten dsDNA-Sensoren hinaus, namentlich DAI (DNA-dependent activator of IFN-regulatory factors) (Takaoka *et al.* 2007), RIG-1 (retinoic acid-inducible gene-1, indirekt) (Yoneyama and Fujita 2007), LRRFIP1 (Leucine-rich repeat flightless-interacting protein 1) (Yang *et al.* 2010) und AIM2 (absent in melanoma 2) (Schroder and Tschopp 2010), noch weitere Erkennungssysteme existieren. Über die verschiedenen dsDNA Sensoren werden bei Vorhandensein zytosolischer DNA unterschiedliche, zellspezifische Signalwege angestoßen.

Unter den diversen bisher identifizierten CDSs soll im Rahmen der vorliegenden Arbeit der Fokus auf den Doppelstrang-DNA-Sensor AIM2 gerichtet werden. Dieser gehört zur HIN-200 (hematopoietic interferon-inducible nuclear protein) Familie und induziert in Anwesenheit intrazellulärer doppelsträngiger DNA die AIM2-Inflammasom Bildung (1.1.3.2).

1.1.3 Die Inflammasome

Inflammasome sind große intrazelluläre Multiproteinkomplexe. Sie spielen eine zentrale Rolle im angeborenen Immunsystem, indem sie auf das Vorhandensein einer großen Vielfalt von PAMPs (siehe 1.1.2) und DAMPs (siehe 1.1.2.1) reagieren (Schroder and Tschopp 2010).

Die Inflammasome umfassen u.a. Mitglieder der NLR Familie und werden in diesem Fall definiert und benannt nach dem NLR Protein, das sie beinhalten. Im Fokus dieser Arbeit stehen das NLRP3/NALP3 Inflammasom sowie das AIM2 Inflammasom, welches nach dem CDS AIM2 benannt wurde.

1.1.3.1 NLRP3 Inflammasom

Das NLRP3 Inflammasom gehört zu den bisher am besten untersuchten Inflammasomen und wird aktiviert durch eine Vielzahl mikrobieller Moleküle, Gefahrensignale und kristalliner Substanzen (Hornung and Latz 2010). Über die Pyrinomäne (PYD) des NLRP3 wird das Adapterprotein apoptosis-associated speck-like protein (ASC) rekrutiert, welches über eine CARD-CARD Interaktion mit dem Zymogen Pro-Caspase-1 zu dessen Prozessierung in seine aktive Form Caspase-1 führt (siehe Abb. 2). Einmal aktiviert, stimuliert Caspase-1 die Reifung der proinflammatorischen Zytokine IL-1 β und IL-18 durch Spaltung ihrer Vorstufen Pro-IL-1 β und Pro-IL-18, wie Abb. 3 verdeutlicht (Schroder and Tschopp 2010).

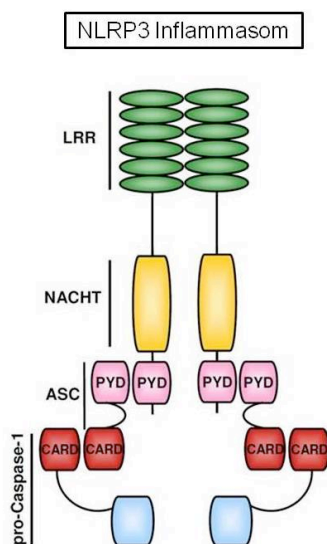


Abb. 2: Schematische Darstellung des NLRP3 Inflammasoms, modifiziert nach Eitel (Eitel *et al.* 2010)
LRR (leucin-rich repeats); NACHT (Nukleotid-bindende Domäne); PYD (pyrin domain); CARD (Caspase recruitment domain); ASC (apoptosis-associated speck-like protein)
Über die PYD des NLRP3 Inflammasoms wird das Adapterprotein ASC rekrutiert. ASC ermöglicht eine CARD-CARD Interaktion mit Pro-Caspase-1 und damit die autokatalytische Spaltung des Zymogens in die aktive Caspase-1.

NLRP3 aktiviert Caspase-1 als Antwort auf eine breite Anzahl von Stimuli. Zu diesen zählen Harnsäurekristalle (MSU, Monosodium Urate Crystals) (Martinon *et al.* 2006), extrazelluläres Adenosintriphosphat (ATP) (Perregaux and Gabel 1994, Bauernfeind *et al.* 2009), Cholesterolkristalle (Rajamaki *et al.* 2010) und Natriumdodecylsulfat (SDS, Sodium Dodecyl Sulfate) (Watanabe *et al.* 2008). Darüber hinaus führen auch Bakterien, wie *Listeria monocytogenes* (Eitel *et al.* 2010) oder *Staphylokokkus aureus*, sowie bakterielle RNA (Stutz *et al.* 2009) zu einer Caspase-1 Aktivierung.

Zwar scheint die NLRP3-induzierte Caspase-1-Aktivierung TLR-unabhängig zu verlaufen, jedoch geht man davon aus, dass es für eine effektive Sekretion von reifem IL-1 β zweier Stimuli bedarf (Schroder and Tschopp 2010).

Während die genauen Mechanismen und Auslöser *in vivo* noch nicht vollends verstanden sind, stellt man sich die Vorgänge *in vitro* wie folgt vor: In einem ersten Schritt triggert ein TLR Ligand, wie beispielsweise LPS, das Zytokin Tumornekrosefaktor (TNF)- α oder der Phorbol-Diester Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA) über die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B die IL-1 β Promotoraktivierung und dadurch die Expression von Pro-IL-1 β (Chang *et al.* 2005, Mills and Dunne 2009, Schroder and Tschopp 2010). In einem zweiten Schritt induziert dann ein Stimulus, wie z.B. MSU (Martinon *et al.* 2006) oder Cholesterolkristalle (Rajamaki *et al.* 2010), die Oligomerisation und den Zusammenbau des Inflammasoms (Bauernfeind *et al.* 2009). Dieses aktiviert, wie oben beschrieben, Caspase-1, welche daraufhin das durch den ersten Stimulus produzierte Pro-IL-1 β zum aktiven IL-1 β spaltet, das anschließend sezerniert wird (siehe Abb. 3). Obwohl eine Inflammasom-abhängige Aktivierung der Caspase-1 ebenso ohne ein solches Priming beobachtet werden kann, ist die IL-1 β Sekretion bei fehlendem ersten Stimulus minimal, da die meisten Zellen Pro-IL-1 β nicht konstitutiv exprimieren (Schroder and Tschopp 2010).

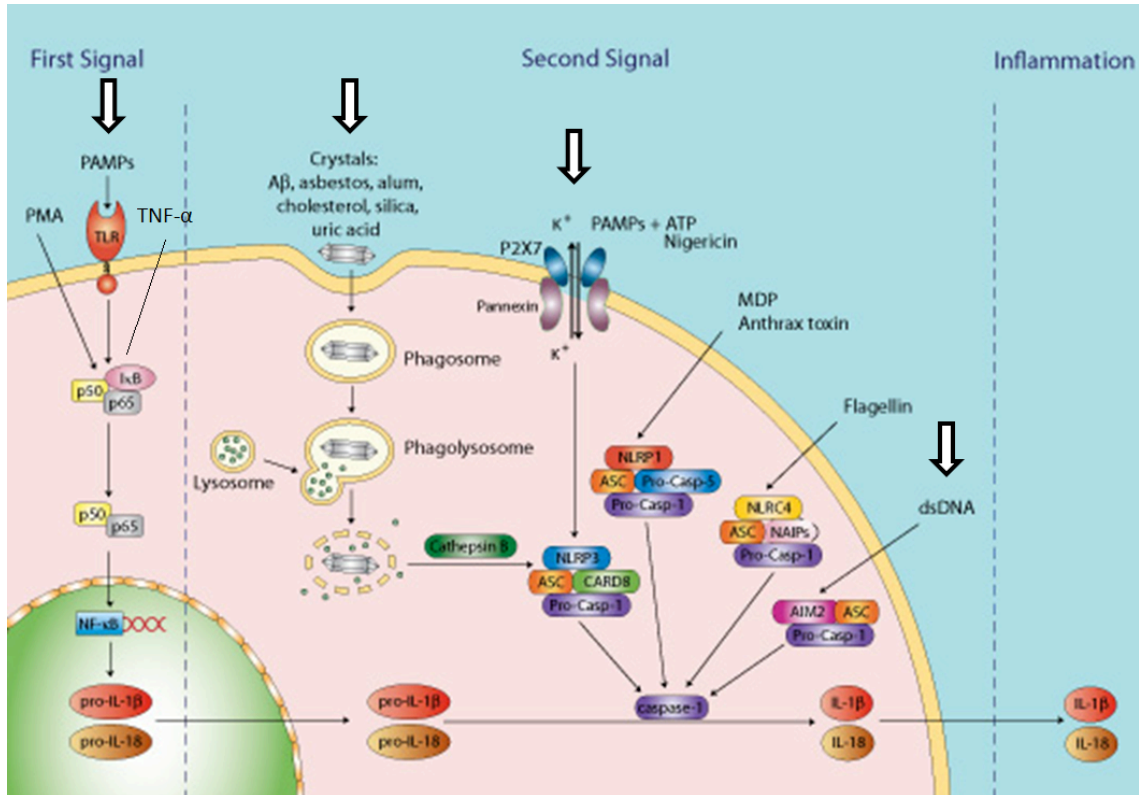


Abb. 3: Inflammasome und ihre Signalkaskaden, modifiziert nach InvivoGen
 Die Signalwege, welche die IL-1 β Sekretion über die Aktivierung des NLRP3 und AIM2 Inflammasoms induzieren, sind mit Pfeilen gekennzeichnet.
 Der Transkriptionsfaktor NF- κ B ist ein Dimer mit den Untereinheiten p50 und p65. In der nichtaktiven Form ist das p50/p65-Dimer an das Protein I κ B (Inhibitor of NF- κ B) gebunden. Durch PMA (Phorbol-12-Myristat-13-Acetat), Tumornekrosefaktor(TNF)- α oder die Aktivierung von TLRs (Toll-like Rezeptoren) über PAMPs (pathogen-associated molecular patterns) wird die I κ B-Kinase aktiviert. Sie phosphoryliert den Inhibitor I κ B und induziert damit dessen Ubiquitinierung und den anschließenden Abbau im Proteasom (Knippers). Das freie NF- κ B kann in den Zellkern transportiert werden und führt dort zur Transkription von Pro-IL-1 β . Inflammasom-spezifische Stimuli, wie Harnsäure- und Cholesterolkristalle sowie ATP beim NLRP3 Inflammasom (1.1.3.1), und dsDNA beim AIM2 Inflammasom (1.1.3.2), induzieren die Inflammasomformation, Caspase-1 wird aktiviert und das Zymogen Pro-IL-1 β in das aktive IL-1 β gespalten.
 NLRP1 Inflammasom, NLRC4 Inflammasom (Stutz *et al.* 2009, Schroder and Tschopp 2010).

Es ist denkbar, dass die Erfordernis eines zweiten Signals eine Art Absicherungsmechanismus darstellt, der eine effektive Inflammasomaktivierung nur in Anwesenheit eines angemessenen Stimulus, wie z.B. Infektion durch ein Pathogen oder Gewebsverletzung, zulässt (InvivoGen 2012). Sinn dieses dualen Mechanismus könnte es sein, eine zufällige oder unkontrollierte Inflammasom-Induktion zu verhindern.

1.1.3.1.1 Hypothesen zu den molekularen Details der NLRP3 Inflammasomaktivierung

Die Mechanismen, die es möglich machen, dass strukturell unterschiedliche Substanzen, wie beispielsweise MSU, Cholesterolkristalle, SDS oder extrazelluläres ATP eine NLRP3 Inflammasomaktivierung induzieren, sind bis heute nicht vollständig verstanden und Gegenstand intensiver Forschung (Stutz *et al.* 2009).

Aufgrund der unterschiedlichen physikalischen und chemischen Natur der verschiedenen NLRP3 Aktivatorsubstanzen, scheint eine direkte Interaktion zwischen NLRP3 und seinen Triggern eher unwahrscheinlich (Hornung and Latz 2010). Eine Hypothese geht davon aus, dass die NLRP3 Aktivatoren die Entstehung reaktiver Sauerstoffmetaboliten (ROS) induzieren, welche indirekt über NLRP3 erkannt werden und dadurch zu seiner Aktivierung führen (Dostert *et al.* 2008). Eine andere Hypothese nimmt an, dass NLRP3 Aktivatoren eine Lysosomenschädigung induzieren und ins Zytosol entlassene lysosomale Inhalte wiederum indirekt durch das NLRP3 Inflammasom wahrgenommen werden und dieses aktivieren (Hornung *et al.* 2008).

Darüber hinaus scheint eine NLRP3 Inflammasomaktivierung auch über das Eindringen bakterieller Bestandteile in das Zytosol möglich zu sein (Kanneganti *et al.* 2006). Dabei wird die Passage der bakteriellen Moleküle in die Wirtszelle vermutlich über den P2X₇ Rezeptor und den transmembranösen Hemikanal Pannexin-1 vermittelt (Pelegriin and Surprenant 2006). Der P2X₇ Rezeptor gehört zur Familie der ATP-aktivierten P2X purinergen Rezeptoren und ist für monovalente Anionen und Kationen permeabel. Bei Aktivierung, beispielsweise durch extrazelluläres ATP, welches in Bereichen von Inflammation und Verletzung durch die untergegangenen Zellen in hoher Konzentration vorhanden ist, kommt es zur Interaktion zwischen dem P2X₇ Rezeptor und Pannexin-1. Dadurch wird im Transmembranprotein Pannexin-1 das Öffnen einer größeren, für Makromoleküle permeablen Pore induziert, welche das Eindringen bakterieller Moleküle und damit die Aktivierung des NLRP3 Inflammasoms ermöglicht (siehe Abb. 3) (North 2002). Darüber hinaus führen hohe

Konzentrationen an extrazellulärem ATP zu einem starken Kaliumefflux über den P2X₇ Rezeptor, was ebenso eine NLRP3 Inflammasomaktivierung zur Folge hat (Mariathasan *et al.* 2006).

Die Expression des P2X₇ Rezeptors konnte neben Makrophagen und anderen Immunzellen auch in Epithelzellen des Darmes nachgewiesen werden. Dies legt die Vermutung nahe, dass der Mechanismus der purinergen Signaltransduktion nicht nur in den Zellen des Immunsystems, sondern auch im Darmepithel selbst eine Rolle spielt und Mutationen im Bereich dieser Signalkaskade zu Dysregulation und Inflammation, beispielsweise in Form chronisch entzündlicher Darmerkrankungen (1.2), führen können (de Campos *et al.* 2012).

1.1.3.1.2 NLRP3 Inflammasom und assoziierte Pathologien

Welche Auswirkungen eine Fehlregulation dieser Mechanismen zur Folge haben kann, wird am Beispiel von Patienten mit Autoimmunkrankheiten deutlich (Bauernfeind *et al.* 2009). So sind Defekte des NLRP3 Gens im Zusammenhang mit dem Auftreten des Cryopyrin-assoziierten Periodischen Syndroms (CAPS) pathogenetisch relevant (Ting *et al.* 2006). Zu diesem werden autoinflammatorische Systemkrankheiten, wie das Familiäre kälteinduzierte autoinflammatorische Syndrom (FCAS) oder das Muckle-Wells-Syndrom (MWS), gezählt. Bei beiden führt die durch die Mutation entstandene Überproduktion von IL-1 β zu generalisierten Entzündungsreaktionen wie Urtikaria, Fieber, Myalgie und Arthralgie (Posch *et al.* 2012). Darüber hinaus spielen Defekte des NLRP3 Gens auch eine Rolle bei der Entstehung der Atherosklerose (Duewell *et al.* 2010), der Urikopathie (Martinon *et al.* 2006) sowie der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (CEDs) (Näheres siehe Kapitel 1.2) (Villani *et al.* 2009).

1.1.3.2 AIM2 Inflammasom

AIM2 (absent in melanoma 2) gehört zur HIN-200 (hematopoietic interferon-inducible nuclear protein) Familie der Interferon-induzierbaren Gene, welche

auf Chromosom 1 lokalisiert sind (DeYoung *et al.* 1997). Mitglieder dieser Familie kodieren für Proteine, die durch eine konservierte Sequenzdomäne von ca. 200 Aminosäuren charakterisiert sind, die sog. HIN-200 Domäne (Patsos *et al.* 2010). Über diese Domäne findet die nicht-sequenzspezifische zytosolische DNA Erkennung über elektrostatische Anziehung zwischen der positiv geladenen HIN-200 Domäne und dem Zucker-Phosphat-Rücken der dsDNA statt (Jin *et al.* 2012).

AIM2 verfügt neben der C-terminalen Oligonukleotid/Oligosaccharid-bindenden HIN-200 Domäne über eine N-terminale PYD. Findet eine Bindung intrazytoplasmatischer dsDNA über die HIN-200 Domäne statt, kommt es zum Zusammenbau des Inflammasoms (Jin *et al.* 2012). Anschließend wird über die PYD, analog dem NLRP3 Inflammasom, ASC rekrutiert und Caspase-1 aktiviert. Daraufhin kommt es, wie unter 1.1.3.1 beschrieben, zur Spaltung von Pro-IL-1 β in seine aktive Form und schließlich zu dessen Sekretion (Fernandes-Alnemri *et al.* 2009, Hornung *et al.* 2009).

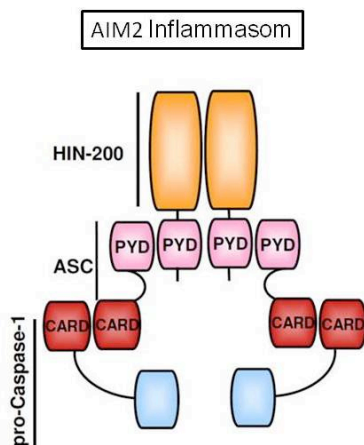


Abb. 4: Schematische Darstellung des AIM2 Inflammasoms, modifiziert nach Eitel (Eitel *et al.* 2010)

HIN-200 (hematopoietic interferon-inducible nuclear protein); PYD (pyrin domain); CARD (Caspase recruitment domain); ASC (apoptosis-associated speck-like protein) Analog dem NLRP3 Inflammasom (Abb. 2) wird über die PYD des AIM2 Inflammasoms das Adapterprotein ASC rekrutiert. ASC induziert eine CARD-CARD Interaktion mit Pro-Caspase-1 und die autokatalytische Spaltung des Zymogens in die aktive Caspase-1.

Die Mitglieder der HIN-200 Genfamilie können, wie der Name sagt, durch unterschiedliche Interferone (IFN) induziert werden (DeYoung *et al.* 1997). Die Induktion des AIM2 Gens findet über IFN- γ (DeYoung *et al.* 1997, Dombrowski *et al.* 2011) statt. Andere HIN-200 Mitglieder können zusätzlich über IFN- α oder IFN- β induziert werden (DeYoung *et al.* 1997).

1.1.3.2.1 AIM2 Inflammasomaktivierung in Keratinozyten aus Psoriasisläsionen

Dombrowski *et al.* konnten 2011 intrazytoplasmatische DNA in Keratinozyten aus Psoriasisläsionen nachweisen und eine dadurch induzierte AIM2 Inflammasomaktivierung als pathogenetischen Faktor für die bei der Psoriasis bestehende chronische Entzündung identifizieren. Physiologischerweise findet sich intrazelluläre DNA im Zellkern sowie in den Mitochondrien, nicht jedoch im Zytosol. Die genauen Mechanismen dieser DNA Translokation sind nicht bekannt, vorstellbar ist jedoch ein Entweichen der DNA aus dem Zellkern in das Zytosol oder eine Aufnahme von aus sterbenden Zellen der Umgebung stammender extrazellulärer DNA (Dombrowski *et al.* 2011).

1.1.3.2.2 Assoziation von Mutationen im AIM2 Gen mit dem Auftreten sporadischer Kolonkarzinome und Karzinomen im Rahmen des HNPCC (hereditäres, nichtpolypöses Kolonkarzinom-Syndrom)

Mutationen im Mismatch Repair System gehören zu den wichtigsten Faktoren der kolorektalen Tumorgenese und werden in 10-15% der sporadischen Kolonkarzinome sowie bei Karzinomen, die mit dem hereditären, nichtpolypösen Kolonkarzinom-Syndrom (HNPCC) assoziiert sind, nachgewiesen. Störungen im Mismatch Repair System führen dabei zur Akkumulation von Mutationen vorwiegend im Bereich kurzer repetitiver Sequenzen, den sog. Mikrosatelliten. Das AIM2 Gen beherbergt solche Mikrosatelliten im Bereich seiner kodierenden Regionen und Woerner *et al.* gelang es bei der Untersuchung primärer Kolonkarzinome und Zelllinien mit Mikrosatelliteninstabilität eine hohe Dichte sog. Frameshift- und Missense-

Mutationen in den Mikrosatellitenregionen des AIM2 Gens nachzuweisen. Diese Ergebnisse lassen also eine Assoziation von AIM2 Genmutationen und der Entstehung von kolorektalen Karzinomen mit Satelliteninstabilität vermuten (Woerner *et al.* 2007).

1.1.3.3 IL-1 β und IL-18

Die zu den Zytokinen zählenden Interleukine induzieren eine Vielzahl von biologischen Effekten, die mit Infektion, Inflammation und Autoimmunprozessen in Zusammenhang stehen. Sie regulieren die Kommunikation zwischen Makrophagen, B- und T-Zellen und anderen an der Immunantwort beteiligten Zellen und spielen somit eine wichtige Rolle in der Regulation des angeborenen und erworbenen Immunsystems (Monteleone *et al.* 1999, Song *et al.* 2012).

IL-1 β wird überwiegend von aktivierten Makrophagen synthetisiert und induziert systemische sowie lokale Antworten auf Infektion und Verletzung, indem es Fieber generiert, Lymphozyten aktiviert und die Leukozyteninfiltration der infizierten oder geschädigten Gewebe stimuliert. Die von IL-1 β induzierte Signalkaskade führt zur Aktivierung von NF- κ B und mitogen-activated protein-Kinasen (MAP-Kinasen), die die Sekretion weiterer inflammatorischer Zytokine bewirken. Das IL-1 β Genprodukt Pro-IL-1 β ist ein 30,7 kDa messendes Zymogen und wird über die Spaltung durch aktivierte Caspase-1, auch IL-1 β converting enzyme genannt, in seine 17 kDa schwere biologisch aktive Form IL-1 β überführt (Pelegriin and Surprenant 2007). Die Pro-IL-1 β Transkription wird durch eine Vielzahl von Faktoren induziert, u.a. durch PAMPs wie LPS, durch PMA oder durch Zytokine wie TNF- α (siehe 1.1.3.1, Abb. 3).

IL-18, auch als IFN- γ -induzierender Faktor (IGIF) bezeichnet, aktiviert TH1-Zellen und induziert die IFN- γ Produktion sowie die Lymphozytenproliferation (Robinson *et al.* 1997, Lebel-Binay *et al.* 2000). Außerdem stimuliert IL-18 die Produktion von TNF- α sowie des Granulozyten- und Monozyten-Kolonie-stimulierenden Faktors (Song *et al.* 2012). IL-18 wird vornehmlich von Monozyten und Makrophagen als Antwort auf virale und bakterielle Stimuli synthetisiert (Boraschi and Dinarello 2006). Wie auch im Falle von IL-1 β wird

zunächst ein inaktives Vorläufermolekül synthetisiert, welches durch Caspase-1 in seine aktive Form gespalten wird (Ghayur *et al.* 1997, Gu *et al.* 1997).

Es wird vermutet, dass Fehlsteuerungen der angeborenen Immunabwehr, die mit einer übermäßigen IL-18 Produktion einhergehen, bei der Pathogenese von Autoimmunkrankheiten eine Rolle spielen (Boraschi and Dinarello 2006).

Zur möglicherweise protektiven Rolle von IL-18 in Bezug auf Kolitis und Kolitis-assoziierte Tumore siehe Kapitel 1.2.5.

1.2 Chronisch entzündliche Darmerkrankungen (CEDs)

Es wird angenommen, dass Inflammasome die Abwehr gegen mikrobielle Pathogene und die Gewebemöostase im Darm vermitteln. Darum könnte ihre Dysregulation zur Entstehung intestinaler Erkrankungen, wie z.B. der CEDs, beitragen (Chen and Nunez 2011).

Bei den CEDs kommt es durch eine ätiologisch bisher noch ungeklärte chronische Dysregulation des mukosalen Immunsystems zu schubförmig remittierenden Entzündungen des Gastrointestinaltraktes bei vorhandener genetischer Suszeptibilität (Podolsky 2002, Villani *et al.* 2009).

1.2.1 Epidemiologie

Zu den CEDs zählen M. Chron (MC), mit einer Inzidenz von 5/100.000/Jahr, und Colitis ulcerosa (CU), mit einer Inzidenz von 4/100.000/Jahr. Der Häufigkeitsgipfel liegt zwischen dem 20. – 40. Lebensjahr, wobei weiße Bevölkerungsgruppen 4 x häufiger an CU erkranken als schwarze Bevölkerungsgruppen. Die CU geht im Gegensatz zum MC mit einem deutlich erhöhten Kolonkarzinomrisiko einher (Herold 2011).

1.2.2 Genetik

Bei den CEDs, insbesondere bei MC, besteht eine familiäre Häufung. So können z.B. oftmals Genmutationen der NLRs NOD2 (= CARD15) (Baumgart

and Carding 2007) und NLRP3 (Schoultz *et al.* 2009, Villani *et al.* 2009) bei an MC erkrankten Patienten nachgewiesen werden.

NOD2 erkennt das aus dem bakteriellen Peptidoglykan stammende Muramyldipeptid und aktiviert den NF- κ B Signalweg, was eine inflammatorische Reaktion nach sich zieht (Hugot *et al.* 2001, Ogura *et al.* 2001). Eine NOD2 Genmutation kann in 50 % der MC Fälle festgestellt werden (Herold 2011).

In der NLRP3 Genregion sind es single nucleotide polymorphisms (SNPs), die mit der Empfänglichkeit für MC assoziiert zu sein scheinen. Allerdings lieferten Studien der vergangenen Jahre widersprüchliche Ergebnisse. So konnten Villani *et al.* 2009 einen signifikanten Zusammenhang zwischen dem Vorhandensein bestimmter SNPs und dem Risiko an MC zu erkranken nachweisen (Villani *et al.* 2009) und Schoultz *et al.* zeigten, dass Varianten im NLRP3 Gen in Kombination mit Varianten in den Genen NOD2 und CARD8 mit einer gesteigerten Suszeptibilität schwedischer Männer gegenüber MC einhergehen (Schoultz *et al.* 2009). Demgegenüber stehen die Ergebnisse von Lewis *et al.*, die 2011 die Indexstudie von Villani *et al.* in Großbritannien replizierten und eine sehr viel geringere Assoziation zwischen SNPs des NLRP3 Gens und der MC Suszeptibilität nachwiesen (Lewis *et al.* 2011).

Demnach sind weitere Studien notwendig, um mehr über die Rolle verschiedener Varianten des NLRP3 Gens in der Pathogenese des MC herauszufinden.

1.2.3 Ätiologie und Pathogenese

Die Ätiologie der CEDs ist nach wie vor unbekannt. Diskutiert werden eine autoimmune Genese, die Auslösung durch Infektionen sowie die Störung der Immunreaktion auf dem Boden einer genetischen Disposition. Man geht davon aus, dass sowohl genetische als auch Umwelteinflüsse eine Rolle spielen (Herold 2011).

Pathogenetisch kommt es zunächst zur Aktivierung lymphatischer Zellen in der Darmwand durch noch unbekannte Auslöser. Bei den aktivierten Zellen handelt

es sich bei MC v.a. um TH1-Lymphozyten, bei CU vorwiegend um TH2-Lymphozyten. In der Folge werden Entzündungsmediatoren gebildet und es kommt zu lokalen Gewebsschädigungen mit Erosionen, Nekrosen und Ulzerationen (Herold 2011).

Während die Entzündung bei MC diskontinuierlich segmental auftritt und am häufigsten im Bereich des terminalen Ileums und proximalen Kolons lokalisiert ist, findet die Ausbreitung bei der CU kontinuierlich, meist im distalen Rektum beginnend und sich nach proximal ausbreitend, statt. Die Entzündung bei MC betrifft auch die tiefen Wandschichten und kann an jeder Stelle des Verdauungstraktes auftreten. Folge sind ödematöse, fibrotische Verdickungen der Darmwand und die Gefahr von Fistelbildungen und Stenosen. Im Gegensatz dazu sind bei der CU nur die oberflächlichen Schleimhautschichten ulzerös verändert (Herold 2011).

1.2.4 Therapie

Konservative Maßnahmen zur therapeutischen Behandlung sind ballaststofffreie Diät im akuten Schub sowie Substitution von Vitaminen, Eiweiß, Kalorien und anderen Bedarfsstoffen. Medikamentös finden sowohl topisch als auch systemisch Steroide Anwendung, bei CU werden standardmäßig Salicylate verabreicht. Bei schwereren Verläufen oder Steroidrefraktärität kommen Immunsuppressiva, wie beispielsweise Azathioprin oder Methotrexat, sowie Biologicals, wie der TNF-Antikörper Infliximab, zum Einsatz. Chirurgisch kann im Falle der CU durch eine kontinenzerhaltende Proktokolektomie mit Anlage eines ileoanalen Pouch eine Heilung erreicht werden. Da MC im Gegensatz zur CU operativ nicht heilbar ist, besteht hier eine chirurgische Indikation nur beim Auftreten von Komplikationen (Herold 2011).

1.2.5 Assoziation der CEDs mit dem NLRP3 Inflammasom

In Tiermodellen, bei denen durch Dextran-Natrium-Sulfat (DSS)-Gabe experimentell Koliden ähnlich den CEDs induziert wurden, konnte gezeigt werden, dass die proinflammatorischen Zytokine IL-1 β und IL-18 eine wichtige

Rolle in der Pathogenese der CEDs spielen (Bauer *et al.* 2010). Da die akute inflammatorische Antwort initial unabhängig von B- und T-Zellen verläuft (Dieleman *et al.* 1994), können mithilfe des DSS Modells Mechanismen der angeborenen Immunabwehr bei der intestinalen Entzündung untersucht werden.

Bauer *et al.* konnten zeigen, dass *in vitro* mit DSS inkubierte Makrophagen Caspase-1 abhängig hohe Level an IL-1 β sezernierten (Bauer *et al.* 2010). Diese Sekretion fand jedoch nicht mehr statt, wenn die Gene für NLRP3, ASC oder Caspase-1 fehlten, was darauf schließen ließ, dass DSS Caspase-1 über das NLRP3 Inflammasom aktiviert. Außerdem konnte gezeigt werden, dass NLRP3^{-/-} Mäuse weniger schwere Kolitiden nach oraler DSS Gabe entwickelten als Wildtyp-Mäuse und zudem geringere Level an proinflammatorischen Zytokinen in Kolongewebeproben exprimierten (Bauer *et al.* 2010). Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die Aktivierung des NLRP3 Inflammasoms einen entscheidenden Mechanismus in der Entstehung intestinaler Entzündung im DSS Kollitismodell darstellt und dadurch einen potentiell neuen Angriffspunkt für die Therapie der CEDs.

Andere Beobachtungen lassen hingegen auf eine protektive Rolle des NLRP3 Inflammasoms bei Kolitis und Kolitis-assoziiierter Tumorgenese (Siegmond 2010) schließen, wobei insbesondere die Produktion von IL-18 einen entscheidenden Effektormechanismus darzustellen scheint (Dupaul-Chicoine *et al.* 2010, Zaki *et al.* 2010a). Dabei wird ein modulierender Einfluss von IL-18 auf die Permeabilität des Darmepithels (Dupaul-Chicoine *et al.* 2010, Zaki *et al.* 2010a), auf die Produktion antimikrobieller Peptide (Hirota *et al.* 2011) und die Aktivierung der Tumorsuppressoren IFN- γ und STAT1 (Zaki *et al.* 2010b) angenommen.

1.2.6 Assoziation der CEDs mit Defekten der TLR Funktion

Im Jahr 2004 fanden Rakoff-Nahoum *et al.* heraus, dass TLRs, welche kommensale Bakterien erkennen, an der Aufrechterhaltung und Regulation einer intakten Epithelfunktion des Gastrointestinaltraktes (GIT) beteiligt sind.

Defekte der TLR Funktion führen zu einer verminderten Resistenz gegenüber Verletzung und zu einer eingeschränkten Fähigkeit zur Epithelreparatur. Veränderungen der TLRs könnten also für die Pathogenese der CEDs von Belang sein (Rakoff-Nahoum *et al.* 2004).

1.3 Zielsetzung der Arbeit

Inflammasome sind ein wichtiger Bestandteil des angeborenen Immunsystems und die Mechanismen ihrer Regulation sind hochkomplex. Defekte, die diese Regulation stören, können z.B. zur Pathogenese von CEDs beitragen. So wurden Mutationen der NLRs NOD2 und NLRP3 und die dadurch veränderte Inflammasomaktivierung in Makrophagen in den vergangenen Jahren bereits als relevante Faktoren für die Entstehung von CEDs identifiziert (Bauer *et al.* 2010).

Inwieweit Inflammasome ebenso in den Kolonepithelzellen selbst induziert werden und ob die Aktivierung mit einer subsekventen IL-1 β Sekretion einhergeht, sollte im Rahmen dieser Arbeit überprüft werden. Hierzu wurden Kolonadenom und –karzinomzelllinien auf die Funktionalität des AIM2 und NLRP3 Inflammasoms untersucht. Entsprechend der Inflammasom-typischen Signalwege wurden die Zellen stimuliert, bzw. mit dsDNA transfiziert, um dann mittels RT-qPCR, ELISA und Western Blot eine mögliche Inflammasomaktivierung nachzuweisen.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Tab. 1: Geräte

Gerät	Hersteller
Autoklav	Fedegari, Pavia, Italien
Akku-Pipette <i>accu-jet</i>	Brand, Wertheim
CO ₂ -Inkubator <i>HERAcell</i>	Heraeus, Hanau
Elektrophoresekammer <i>Mini-PROTEAN II</i>	Bio-Rad, Hercules, Kalifornien, USA
Elektrophorese-Transferkammer <i>Mini Trans-Blot</i>	Bio-Rad, Hercules, Kalifornien, USA
Filmprozessor <i>M35 X-Omat</i>	Kodak Health Imaging, Rochester, New York, USA
Finnpipette (4 µl; 25 µl)	Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA
Gefrierschrank – 20°C	Liebherr, Bulle, Schweiz
Gefrierschrank – 70°C	Heraeus, Hanau
GeneAmp PCR System 9700	Applied Biosystems, Darmstadt (Life Technologies, Kalifornien, USA)
Heizmagnetrührer <i>Ikamag Reo</i>	IKA-Labortechnik, Staufen
iCycler iQ	Bio-Rad, München
Kodak M35 X-omat Processor	Eastman Kodak Company, Rochester N.Y., USA
Kühlschrank 7°C <i>glassline</i>	Liebherr, Bulle, Schweiz
Kühlzentrifuge <i>Laborfuge 400R</i>	Heraeus, Hanau
Laborabzug	Köttermann, Uetze/Hänigsen
Mikroskop Leitz DM IL	Leica, Bensheim
Mehrkanalpipette Research	Eppendorf, Hamburg
Microplate Reader <i>ThermoMax</i>	Molecular Devices, Biberach an der Riss
Multipipette Plus	Eppendorf, Hamburg
N ₂ -Behälter	Taylor-Wharton, Husum
Quarzküvette, 10mm Schichtdicke	Hellma Analytics, Müllheim

2 Material und Methoden

Schüttler <i>IKA Vibrax</i>	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Serologische Pipetten, <i>Cellstar</i>	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich
Spannungsgeber <i>Power Pac 200</i>	Bio-Rad, Hercules, Kalifornien, USA
Sterilwerkbank <i>HERAsafe</i>	Heraeus, Hanau
Tiefkühlzentrifuge <i>Biofuge fresco</i>	Heraeus, Hanau
Tischzentrifuge	Sigma-Laborzentrifugen, Osterode
Ultraschall Sonopuls GM70	Bandelin, Berlin
UV-Photometer <i>Ultrospec 2100pro</i>	Amersham Biosciences, Freiburg
Vakuumpumpe	KNF Neuberger, Freiburg
Vortex <i>MS2 Minishaker</i>	IKA Labortechnik, Staufen
Waage	Sartorius, Göttingen
Wasserbad	GFL, Burgwedel
Zellzählkammer Neubauer	Noras, Würzburg

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Tab. 2: Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial	Hersteller
Cap Strips Ultra Clear	ABgene, Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA
Frischhaltefolie	Toppits, Minden
Gelladepipetten <i>200 µl MultiFlex Round</i>	Sorenson™ BioSciences, Inc., Salt Lake City UT, USA
Glaspasteurpipetten, 225 mm	Brand, Wertheim
Hyperfilm ECL	Amersham Biosciences, Freiburg
Immuno 96 MicroWell Solid Plates MaxiSorp F8	Nunc, Thermo Scientific, Langenselbold
Klebefolien	Nunc, Thermo Fisher Scientific, Langenselbold
Kulturflaschen <i>Cellstar, 25 cm², 75 cm²</i>	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Mikrotiterplatte <i>Cellstar</i> (6-, 12-, 24-, 96-well)	Greiner Bio-One, Frickenhausen
PCR Plates	ABgene, Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA

2 Material und Methoden

Pipettenspitzen <i>epT.I.P.S.</i> (0,1-20; 2-200; 50-1000 μ l)	Eppendorf, Hamburg
Polystyrol Einmal-Küvetten	Sarstedt, Nümbrecht
Finnpipettenspitzen (4 μ l; 25 μ l)	Thermo Fisher Scientific, Waltham MA, USA
Präzisionswischtücher	Kimberly-Clark Professional, Kimtech Science, Koblenz-Rheinhafen
Polyvinylidenfluorid (PVDF) Blottingmembran <i>Immobilon Transfer Membranes</i>	Millipore, Billerica MA, USA
Reaktionsgefäße 50 ml 15 ml 3,5 ml 2 ml 1,5 ml 0,2 ml Micro AmpReaction Tube	Falcon, Heidelberg Falcon, Heidelberg Sarstedt, Nümbrecht Eppendorf, Hamburg Eppendorf, Hamburg Life Technologies, Darmstadt
RöntgenfilmFuji Medical X-Ray Film 100 NIF <i>Super RX</i>	Fujifilm Europe, Düsseldorf
WhatmanFilterpapier <i>Whatman Absorbent Protector Sheets</i>	Whatman International Ltd., Maidstone, UK
Zellschaber	SPL Life Sciences, Korea

2.1.3 Chemikalien

Tab. 3: Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
Acrylamid 30% (Acrylamid:Bisacrylamid = 30:0,8)	Carl Roth, Karlsruhe
Aprotinin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
APS	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
ATP	InvivoGen, Toulouse, Frankreich
β -Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Bromophenol Blue	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Butanol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Chloroform	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Cholesterol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
dH ₂ O	B. Braun, Sempach, Schweiz

2 Material und Methoden

ddH ₂ O	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Defined Trypsin Inhibitor	Invitrogen, Gibco, Karlsruhe (Life Technologies, Kalifornien, USA)
DMEM	Invitrogen, Gibco, Karlsruhe (Life Technologies, Kalifornien, USA)
DPBS	Invitrogen, Gibco, Karlsruhe (Life Technologies, Kalifornien, USA)
EDGS	Invitrogen, Gibco, Karlsruhe (Life Technologies, Kalifornien, USA)
EGTA	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Ethanol	J.T. Baker, Deventer, Niederlande
EpiLife Medium	Invitrogen, Gibco, Karlsruhe (Life Technologies, Kalifornien, USA)
Fungizone	Invitrogen, Gibco, Karlsruhe (Life Technologies, Kalifornien, USA)
Gentamycin	Invitrogen, Gibco, Karlsruhe (Life Technologies, Kalifornien, USA)
Glycerol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
HEPES Buffer Solution	Invitrogen, Gibco, Karlsruhe (Life Technologies, Kalifornien, USA)
Human GAPDH	Applied Biosystems, Darmstadt (Life Technologies, Kalifornien, USA)
Isopropanol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
IFN- γ	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
L-Glutamine	Invitrogen, Gibco, Karlsruhe (Life Technologies, Kalifornien, USA)
Lipofectamine RNAiMAX	Invitrogen, Gibco, Karlsruhe (Life Technologies, Kalifornien, USA)
MEM	Invitrogen, Gibco, Karlsruhe (Life Technologies, Kalifornien, USA)
MEM Amino Acids	Invitrogen, Gibco, Karlsruhe (Life Technologies, Kalifornien, USA)
MEM Vitamins	Invitrogen, Gibco, Karlsruhe (Life Technologies, Kalifornien, USA)
MEM Non-Essential Amino Acids	Invitrogen, Gibco, Karlsruhe (Life Technologies, Kalifornien, USA)
MITO+ Serum Extender	BD Biosciences, Bedford, Massachusetts, USA
MSU	InvivoGen, Toulouse, Frankreich
NaCl	Merck, Darmstadt

2 Material und Methoden

NaF	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Na ₃ VO ₄	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Nuclease-Free Water	Qiagen, Hilden
OptiMEM	Invitrogen, Gibco, Karlsruhe (Life Technologies, Kalifornien, USA)
PBS	Invitrogen, Gibco, Karlsruhe (Life Technologies, Kalifornien, USA)
Penicillin-Streptomycin	Invitrogen, Gibco, Karlsruhe (Life Technologies, Kalifornien, USA)
PMA	InvivoGen, Toulouse, Frankreich
PMSF	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Poly(dA:dT) (P0883-10UN)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Poly(dA:dT)/LyoVec	InvivoGen, Toulouse, Frankreich
Pyronin Y	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
rhEGF	Promega, Mannheim
RNaseZap	Ambion (Life Technologies, Kalifornien, USA)
RPMI 1640 Medium	Invitrogen, Gibco, Karlsruhe (Life Technologies, Kalifornien, USA)
SDS	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Skim Milk Powder	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
TEMED	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
TGF- α	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
TNF- α	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
TriFast peqGOLD (Guanidinisoithiocyanat+Phenol)	peqLab, Erlangen
Tris base	Merck, Darmstadt
Tris-HCl	Merck, Darmstadt
Trypsin/EDTA Solution	Invitrogen, Gibco, Karlsruhe (Life Technologies, Kalifornien, USA)
Trypsin Neutralisator Solution	Invitrogen, Gibco, Karlsruhe (Life Technologies, Kalifornien, USA)
Tween 20	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

2.1.4 Fertigsätze

Tab. 4: Fertigsätze

Fertigsatz	Hersteller
ABsolute QPCR Mix	ABgene, Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA
Coating Matrix Kit	Invitrogen, Gibco, Karlsruhe (Life Technologies, Kalifornien, USA)
DuoSet ELISA, human IL-1 β /IL-1F2	R&D Systems, Minneapolis, USA
ECL Western blotting detection reagents and analysis system	Amersham Biosciences, Little Chalfont, UK
Protein Assay	Bio-Rad, Hercules, Kalifornien, USA
Reagent Diluent (1% BSA in PBS)	R&D Systems, Minneapolis, USA
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden
RNase-Free DNase Set	Qiagen, Hilden
Stop Solution (2 N H ₂ SO ₄)	R&D Systems, Minneapolis, USA
Substrate Solution (H ₂ O ₂ und Tetramethylbenzidine 1:1)	R&D Systems, Minneapolis, USA
Wash Buffer (0,05% Tween 20 in PBS)	R&D Systems, Minneapolis, USA

2.1.5 Enzyme

Tab. 5: Enzyme

Enzym	Hersteller
Aprotinin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Pepstatin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Trypsin/EDTA	Invitrogen, Gibco, Karlsruhe (Life Technologies, Kalifornien, USA)

2.1.6 Sonden und Primer für die qPCR

Tab. 6: Sonden und Primer für die qPCR

Pre-Developed TaqMan Assay Reagents Control Kit Applied Biosystems, Darmstadt (Life Technologies, Kalifornien, USA)
Human GAPDH (VIC Reporterfarbstoff), Part Number 4310884E
AIM2 (FAM Reporterfarbstoff), Assay ID Hs00175457_m1
IL-1 β (FAM Reporterfarbstoff), Assay ID Hs01555410_m1

2.1.7 Zelllinien und Kulturmedien

Wenn nicht anders vermerkt, handelt es sich bei den Zellen um adhären wachsende Monolayerzellen.

Tab. 7: Zelllinien und Kulturmedien

Zelllinie	Beschreibung	Kulturmedium
Caco-2	Humane kolorektale Adenokarzinomzelllinie	85,6 % MEM, 1 % Glutamin, 2 % Pen-Strep, 1 % NEAA, 0,4 % HEPES Buffer, 10 % FBS
COLO-206F	Humane Kolonkarzinomzelllinie (aus Aszites) 80 % adhären te Zellen 20 % Suspensionszellen	89 % RPMI 1640, 1 %, Pen-Strep 10 % FBS
COLO-320	Humane Kolonadenokarzinomzelllinie	89 % RPMI 1640, 1 %, Pen-Strep 10 % FBS
COLO-678	Humanes Kolonkarzinomzelllinie (Lymphknotenmetastase)	89 % RPMI 1640, 1 %, Pen-Strep 10 % FBS
CX-1	Humane Kolonadenokarzinomzelllinie	86,6 % DMEM, 2 % Pen-Strep, 1 % NEAA, 0,4 % HEPES Buffer, 10 % FBS
GEKI-2	Kolonadenomzelllinie	84,4 % DMEM, 1 % MEM Amino Acids, 1 % MEM Vitamins, 0,1 % MITO+ Serum Extender, 2 % Pen-Strep, 1,25 % Gentamycin, 0,24 % Fungizone, 10 % FBS, 0,02 % rhEGF, 0,01 % TGF α
HCT-15	Humane Kolonadenokarzinomzelllinie	88 % RPMI 1640, 2 % Pen-Strep, 10 % FBS

HT-29	Humane kolorektale Karzinomzelllinie	85,6 % MEM, 1 % Glutamin, 2 % Pen-Strep, 1 % NEAA, 0,4 % HEPES Buffer, 10 % FBS
LOVO	Humane Kolonadenokarzinomzelllinie	88 % RPMI 1640, 2 % Pen-Strep, 10 % FBS
NHEK	Humane epidermale Keratinozyten	EpiLife Medium, EDGS, Coating Matrix Kit
SW-480	Humane Kolonadenokarzinomzelllinie	89 % RPMI 1640, 1 %, Pen-Strep 10 % FBS
T84	Humane Kolonkarzinomzelllinie (Lungenmetastase)	43,5 % Ham's F12, 43,5 % DMEM, 1 % Glutamin, 2 % Pen-Strep, 10 % FBS
THP-1	Humane Monozytische Leukämiezelllinie Suspensionszellen	88 % RPMI 1640, 2 % Pen-Strep, 10 % FBS
U-937	Humanes histiozytisches Lymphom Suspensionszellen	89 % RPMI 1640, 1 %, Pen-Strep 10 % FBS

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

Die Kultivierung der Zelllinien erfolgte mit den in Tab. 7 aufgelisteten Medien bei 5 % CO₂ und einer Temperatur von 37°C. Alle 2 bis 3 Tage wurde ein Medienwechsel vorgenommen. Die Subkultivierung erfolgte bei Zellkonfluenz.

Die Zellen für den Western Blot wurden in 75 cm² Zellkulturflaschen ausgesät, zu transfizierende Zellen auf 12-well Platten und nicht zu transfizierende Zellen auf 6-well Platten. Die Anzahl der ausgesäten Zellen und die Menge des Wachstumsmediums variierten je nach Zellart und Wachstumsfläche.

Für die qPCR wurden die Zellen mittels TriFast geerntet, für den Western Blot wurden die adhärent wachsenden Zellen trypsinisiert und in flüssigem Stickstoff als Trockenpellets kryokonserviert. In beiden Fällen fand die Lagerung bei -70°C statt. Die Überstände wurden im ELISA sowie im Western Blot eingesetzt und bei -20°C gelagert.

2.2.1.1 Transfektion

Transfektion bezeichnet das Einbringen von Fremd-DNA in eine eukaryotische Zelle. Bei der in dieser Arbeit vorgenommenen transienten Transfektion findet keine Integration der Nukleinsäure in das Genom der Empfängerzelle statt.

Die Zellen wurden mit poly(dA:dT) (poly(deoxyadenylic-thymidylic) acid sodium salt), einer repetitiven synthetischen doppelsträngigen DNA-Sequenz von poly(dA-dT)·poly(dT-dA), transfiziert. Für die Transfektion wurden zwei Reagenzien eingesetzt: Lipofectamine RNAiMAX der Firma Invitrogen zusammen mit „nackter“ poly(dA:dT) dsDNA (2.2.1.1.1) sowie mit poly(dA:dT) komplexiertes poly(dA:dT)/LyoVec der Firma InvivoGen (2.2.1.1.2). In beiden Fällen führt die positive Ladung der enthaltenen Lipide zu einer DNA Bindung und durch die Phospholipidstruktur kommt es zur Fusion der zellulären Membranen mit den DNA-enhaltenden Lipidvesikeln.

2.2.1.1.1 Transfektion von poly(dA:dT) mittels Lipofectamine RNAiMAX

Die Zellen einer 12-well Platte wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen an TNF- α (Stimulation der Pro-IL-1 β Expression) und IFN- γ (Stimulation der AIM2 Expression) über 24 h vorstimuliert und bei einer Konfluenz von 30 – 50 % transfiziert.

Für die Transfektion wurden für Probe P und Negativkontrolle NK je 2 Ansätze $A_{(P/NK)}$ und $B_{(P/NK)}$ vorbereitet. Lipofectamine \triangleq RNAiMAX. Poly(dA:dT) lag in einer Stocklösung von 1 mg/ml vor.

Tab. 8: Ansätze poly(dA:dT) Transfektion mittels RNAiMAX

Ansatz A, Menge pro 12-well (500 μ l Volumen)	Ansatz B, Menge pro 12-well (500 μ l Volumen)
A_P : 2 μ l poly(dA:dT) + 41,67 μ l Optimem	B_P : 0,42 μ l RNAiMAX 41,67 μ l Optimem
A_{NK} : 2 μ l PBS + 41,67 μ l Optimem	B_{NK} : 0,42 μ l RNAiMAX 41,67 μ l Optimem

Nachdem die Ansätze vorsichtig gemischt und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert wurden, wurde Ansatz A in Ansatz B überführt, wieder behutsam gemischt und weitere 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Während dieser Zeit wurde das verbrauchte Medium abgesaugt und durch 416,7 µl neues, TNF- α und IFN- γ enthaltendes Medium ersetzt. Anschließend wurden 83,3 µl Transfektionsgemisch pro well tropfenweise hinzupipettiert und die Platte leicht geschwenkt.

Nach 24-stündiger Inkubation im Brutschrank folgten das Abnehmen des Überstandes sowie die Zellernte mittels TriFast oder Trypsin.

2.2.1.1.2 Transfektion mittels poly(dA:dT)/LyoVec

Zellen einer 12-well Platte wurden nach Erreichen einer 50 – 60 %igen Konfluenz mit Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA) ($0,5 \mu\text{M} \triangleq 300 \text{ ng/ml}$) über 3 h vorstimuliert, wodurch die Pro-IL1 β Produktion über den NF- κB Signalweg (Abb. 3) induziert wurde. Es folgte das Waschen der Zellen mit PBS, das Hinzugeben frischen Mediums und eine 24-stündige Inkubation der Zellen bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank. Am Folgetag wurden die Zellen abermals mit PBS gewaschen und 1 ml frisches Medium sowie unterschiedliche Konzentrationen (1-5 µg/ml) poly(dA:dT)/LyoVec in Medium hinzugegeben. Daraufhin wurde sowohl 6 h als auch 24 h im Brutschrank inkubiert und die IL-1 β Sekretion im Überstand per ELISA gemessen.

2.2.2 Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

2.2.2.1 Prinzip des ELISA

Der ELISA gehört zu der Gruppe der Immunassays und dient dem quantitativen Nachweis eines Analyten mittels enzymatischer Markierung. In dieser Arbeit wurde das DuoSet ELISA Development System human IL-1 β /IL-1F2 der Firma R&D Systems im Sinne eines Sandwich ELISAs verwendet. Hierbei wurde durch enzymatische Umsetzung von H₂O₂ durch HRP das Chromogen Tetramethylbenzidin zum farbigen, und dadurch mittels Standard und Messung

der OD quantifizierbaren, Produkt umgewandelt. Der Standard bestand aus rekombinantem humanen IL-1 β .

2.2.2.2 Durchführung des ELISA

Die gefriergetrockneten Capture Antibody, Detection Antibody und Standard wurden, wie im Handbuch beschrieben, gelöst und aliquotiert. Bei -20 bis -70°C waren die Stock-Lösungen bis zu 6 Monate haltbar.

Alle Reagenzien wurden vor ihrer Verwendung auf Raumtemperatur gebracht.

Zunächst wurde der Capture Antibody mit PBS auf die Gebrauchskonzentration von $4\ \mu\text{g/ml}$ verdünnt und eine 96-Mikrotiter-Platte mit $100\ \mu\text{l}$ pro well mit dem Antikörper benetzt. Die Platte wurde im Anschluss mit Klebefolie bedeckt und über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert.

Am nächsten Tag wurden die wells mit Hilfe einer Mehrkanalpipette 3-mal mit $300\ \mu\text{l}$ Wash Buffer gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift wurde die Platte auf sauberem Zellstoff ausgeklopft, um eine bestmögliche Trockenheit zu erreichen.

Zum Blocken wurden $300\ \mu\text{l}$ Reagent Diluent, welches zuvor im Verhältnis 1:10 mit Aquadest verdünnt wurde, in die wells pipettiert, diese dann mit Klebefolie verschlossen und für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert.

Im Anschluss wurden die wells wie oben beschrieben erneut 3-mal mittels Wash Buffer gewaschen.

Es folgte der Auftrag der Standardverdünnungsreihe sowie der Proben. Für erstere wurden in dieser Arbeit 1:2 Verdünnungen des Standards in Reagent Diluent vorgenommen. Diese reichten von $100\ \text{pg/ml}$ bis $0,39\ \text{pg/ml}$ und wurden ergänzt durch einen Leerwert aus reinem Reagent Diluent. Schließlich wurden pro Verdünnungsstufe je 2 Kavitäten mit jeweils $100\ \mu\text{l}$ gefüllt. Im Anschluss wurden die Proben aufgetragen. Zu diesem Zweck wurden sie zunächst kurz gevortext und dann ebenfalls $100\ \mu\text{l}$ pro Probe in die wells pipettiert. Es folgte

eine weitere 2-stündige Inkubation der mit Klebefolie bedeckten Platte bei Raumtemperatur.

Daraufhin wurde erneut gewaschen und anschließend der Biotin-markierte Detection Antibody aufgebracht. Dazu wurde dieser auf eine Gebrauchskonzentration von 300 ng/ml mit Reagent Diluent verdünnt, wovon dann jeweils 100 µl auf die Wells überführt wurden. Abgedeckt schloss sich eine Inkubationszeit von 2 h bei Raumtemperatur an.

Nach weiterem 3-maligem Waschen und Ausklopfen wurden daraufhin 100 µl der im Verhältnis 1:200 in Reagent Diluent verdünnten Streptavidin-HRP in die Kavitäten pipettiert. Hiernach wurde abgedeckt für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, wobei ein direkter Lichteinfall auf die Platte vermieden wurde. Daraufhin wurde ein weiteres Mal wie gewohnt gewaschen.

Im Anschluss wurden 100 µl Substrate Solution pro well pipettiert und die Platte über 20 Minuten mit Klebefolie bedeckt inkubiert. Auch hier wurde darauf geachtet, die Platte keinem direkten Licht auszusetzen. Durch Oxidation der in der Substrate Solution enthaltenen Tetramethylbenzidine entstand eine blaue Farbe.

Abschließend wurden 50 µl der H₂SO₄ enthaltenden Stop Solution pro Kavität hinzugeben und die Platte vorsichtig geschwenkt um ein gründliches Vermischen zu gewährleisten. H₂SO₄ bewirkte nun einen Farbumschwung von blau nach gelb.

Die Messung der OD erfolgte direkt im Anschluss mittels eines Microplate Readers bei einer Wellenlänge von 450 nm und einer Wellenlängenkorrektur von 550 nm.

2.2.3 Quantitative Real-Time-PCR (qPCR)

2.2.3.1 Prinzip der qPCR

Basierend auf dem Prinzip der herkömmlichen PCR, bietet die qPCR zusätzlich die Möglichkeit der gleichzeitigen Quantifizierung der amplifizierten Zielsequenz.

Zur Quantifizierung werden TaqMan-Sonden, auch als Hydrolyse-Sonden bezeichnet, verwendet. Diese speziellen fluorogenen Sonden bestehen aus einem Oligonukleotid, dessen 5'-Ende mit einem fluoreszenten Reporter-Farbstoff und dessen 3'-Ende mit einem („Fluoreszenz-löschenden“) Quencher-Farbstoff markiert ist. Die Sonden lagern sich während der Annealing- und Elongationsphase zwischen den beiden Primern an. Der Reporter-Farbstoff, in unserem Falle FAM für AIM2 und IL-1 β sowie VIC für GAPDH, wird bei einer spezifischen Wellenlänge zur Fluoreszenz angeregt. Bei intakter Sonde wird diese Fluoreszenz jedoch durch einen Fluoreszenz-Energietransfer (FET) aufgrund der räumlichen Nähe zum Quencher unterdrückt. Wird die Sonde durch die 5'-3'-Exonuklease-Aktivität der DNA-Polymerase während der Elongationsphase hydrolysiert, wird diese räumliche Nähe aufgehoben, der FET findet somit nicht mehr statt und die Fluoreszenz des Reporter-Farbstoffes steigt an. Freie, nicht hybridisierte Sonden werden dagegen nicht geschnitten. Somit ist der Anstieg der Fluoreszenz proportional zum Anstieg des PCR-Produkts (Livak *et al.* 1995, Gangisetty and Reddy 2009).

Zur relativen Quantifizierung der Zielsequenzen wird das Housekeeping-Gen GAPDH (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase) als endogene Kontrolle eingesetzt (Gangisetty and Reddy 2009). Voraussetzung für die Verwendung des Housekeeping-Gens ist seine konstante Expression in allen Proben, also das Vorliegen einer stets konstanten RNA-Kopienzahl in jeder Zelle, unabhängig von den auf die Zelle wirkenden Einflüssen. Für die relative Quantifizierung spielen so Unterschiede in der Ausgangsmenge der mRNA in den Proben, bedingt durch eine unterschiedliche Anzahl ausgesäter und gewachsener Zellen pro well, keine Rolle mehr, da die Quantifizierung über das

Housekeeping-Gen normalisiert wird. Als Ergebnis kann dann das Verhältnis von Ziel- zu Housekeeping-Gen in Probe A als x-mal größer als in Probe B ermittelt, und somit die Expression des Zielgens relativ verglichen werden.

Zur Genexpressionsanalyse mittels qPCR musste die mRNA zunächst extrahiert und aufgereinigt und im Anschluss mittels Reverser Transkriptase (RT) in cDNA umgeschrieben werden.

2.2.3.2 Allgemeine Hinweise zur RNA-Aufbereitung

Beim Arbeiten mit RNA ist es von besonderer Wichtigkeit, Verunreinigungen zu vermeiden. So kann es vor allem über Haut- und Staubpartikel, die Bakterien oder Pilzsporen tragen können, zur Kontamination durch RNasen kommen. Diese sehr stabilen Enzyme katalysieren die Hydrolyse von RNA, benötigen hierfür keine Kofaktoren und sind zudem bereits in kleinsten Konzentrationen enzymatisch aktiv.

Alle Arbeitsflächen sollten daher mit RNase-inaktivierenden Formulierungen behandelt sein, beispielsweise RNaseZap von Ambion, Handschuhe sollten immer getragen sowie häufig gewechselt werden und Tubes, wann immer möglich, geschlossen gehalten und gekühlt werden (nach Qiagen Bench Guide).

Da das für die Zellyse verwendete TriFast die gesundheitsschädlichen Stoffe Phenol und Guanidinisothiocyanat enthält, sollte das Arbeiten nur mit Handschuhen, Schutzbrille und unter einem Abzug erfolgen (nach peqGOLD TriFast Datenblatt)

2.2.3.3 RNA Präparation

Zunächst wurde eine Homogenisierung der Zellen vorgenommen.

Bei den Monolayerzellen wurde der Überstand abgenommen und, falls gewünscht, für den ELISA bzw. den Western Blot verwendet. Im Anschluss wurde 1 ml TriFast pro 6- oder 12-well auf den Zellrasen hinzugegeben. Nach 3-5-minütigem Einwirken wurde der Inhalt jedes wells mehrmals mit einer

Pipette aufgezogen und der Boden gespült, um eine vollständige Lösung der Zellen zu erreichen. Daraufhin wurden die in TriFast gelösten Zellen in 1,5 ml Eppendorf Tubes überführt und bis zur weiteren Verwendung bei -70°C eingefroren.

Die in Suspension wachsenden Zellen wurden zunächst mitsamt Überstand aus den wells in 15 ml Polypropylen Röhrchen überführt und abzentrifugiert. Daraufhin wurde der Überstand abgenommen, 1 ml TriFast hinzugegeben und das TriFast-Zell-Gemisch in 1,5 ml Eppendorf-Tubes pipettiert und ebenso bei -70°C gelagert.

Für die Phasentrennung wurden die gefrorenen Ansätze zunächst für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurden je eingesetztem Milliliter TriFast 0,2 ml Chloroform zugegeben, die Proben 15 sec mittels Vortexer vermischt und anschließend wieder für 3-10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Schließlich wurden die Proben bei 13000 rpm über 5 min zentrifugiert, um eine Trennung in 3 Phasen zu erreichen. Dabei enthielt die obere wässrige Phase die RNA, während sich die DNA vornehmlich in der Interphase und die Proteine in der unteren organischen Phase befanden.

Für die RNA-Präzipitation wurde die wässrige Phase, die ca. 60 % des Probenvolumens ausmachte, in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 0,5 ml Isopropanol pro eingesetzten Milliliter TriFast versetzt. Im Anschluss wurden die Proben kurz gevortext und die Nukleinsäuren 5-15 min bei Raumtemperatur gefällt. Es folgte die 10-minütige Zentrifugation der Proben bei 13000 rpm und 4°C .

Anschließend wurde der Isopropanolüberstand vorsichtig abgenommen und das Pellet durch Zugabe von 1 ml 75 % Ethanol, kurzem Vortexen und anschließender Zentrifugation bei 13 000 rpm und 4°C gewaschen. Das Eluat wurde verworfen und der Waschschrift noch ein zweites Mal durchgeführt.

Letztlich folgt das Lösen der RNA. Hierzu wurde das RNA-Pellet für 5 min bei Raumtemperatur getrocknet, um ein vollständiges Verdampfen des Alkohols zu

garantieren. Im Anschluss wurde das Pellet in 100 µl Nuclease-Free Water gelöst und konnte nun bei -70°C gelagert werden.

2.2.3.4 Aufreinigung und DNase-Behandlung

Für die Aufreinigung wurde das „RNeasy Mini Kit“ und für die DNase-Behandlung das „RNase-Free DNase Set“ der Firma Qiagen verwendet.

Mit dem RNeasy Mini Kit Verfahren werden RNA Moleküle, die mehr als 200 Nukleotide umfassen, durch Binden an eine Silicagel-Säule angereichert. Hierbei handelt es sich hauptsächlich um mRNA, da die meisten rRNAs und tRNAs, die zusammen 15-20 % der Gesamt-RNA ausmachen, unter 200 Nukleotide enthalten und somit selektiv entfernt werden (nach RNeasy Mini Handbook).

Die Arbeitsschritte wurden unter dem Laborabzug durchgeführt. Vor Beginn wurde zunächst der RLT-Puffer mit 10 µl β -Mercaptoethanol pro Milliliter versetzt. β -Mercaptoethanol führt durch Reduktion von Disulfidbrücken zusammen mit dem stark denaturierend wirkenden Guanidinthiocyanat-enthaltenden RLT-Puffer zur Inaktivierung eventuell noch vorhandener RNasen, die die RNA Ausbeute reduzieren könnten. Außerdem wurden dem RPE-Pufferkonzentrat vor Erstgebrauch 4 Vol. absolutes Ethanol zugegeben.

Alle Zentrifugationsschritte wurden bei Raumtemperatur vorgenommen, die Zentrifuge sollte nicht unter 20°C abgekühlt werden.

Für das Binden der RNA (aus 2.2.3.3) an die Silicagel-Matrix wurden pro 100 µl RNA-Lösung zunächst 350 µl RLT-Puffer sowie 250 µl absolutes Ethanol hinzugegeben und durch Pipettieren vermischt. Das Ethanol sorgt hierbei für eine optimierte Bindung. Im Anschluss wurde der Ansatz auf die RNeasy Mini Spin Column überführt und 1 min bei 10000 rpm zentrifugiert. Das Eluat wurde verworfen.

Für den DNase-Verdau wurden 350 µl RW1-Puffer hinzugegeben, 1 min bei 10000 rpm zentrifugiert und das Eluat verworfen.

Daraufhin wurden 10 µl DNase-Stammlösung vorsichtig mit 70 µl RDD-Puffer vermischt und 80 µl des DNase-Mix auf die Fritte getropft. Nach 30 min Inkubation bei Raumtemperatur wurden dann 350 µl RW1-Puffer hinzugeben und 1 min bei 10000 rpm zentrifugiert. Im Anschluss wurde das Eluat wieder verworfen.

Zum Waschen der RNA wurde die Säule in ein neues Collection Tube gesetzt, 500 µl RPE-Puffer hinzugegeben, bei 10000 rpm 1 min zentrifugiert und das Eluat verworfen. Der Waschschritt wurde ein weiteres Mal durchgeführt. Schließlich wurde die Säule getrocknet, indem sie 2-mal 2 min bei 13000 rpm zentrifugiert wurde.

Für das Herauslösen der RNA aus der Silicagel-Matrix wurde zunächst das Collection Tube mit dem Eluat verworfen und die Säule in ein frisches 1,5 ml Reaktionsgefäß eingesetzt. Schließlich wurden 30 µl Nuclease-Free Water auf die Fritte getropft und 2 mal 2 min bei 13000rpm zentrifugiert, um eine vollständige Elution der gereinigten RNA aus der Silicagel-Matrix zu erreichen. Diese wurde im Anschluss bei -70°C gelagert.

2.2.3.5 Photometrische Quantifizierung der RNA

Die Konzentration der RNA-Lösung wurde bei einer Wellenlänge von 260 nm und einer Untergrundkorrektur von 320 nm in einer Quarzküvette mit 10 mm Schichtdicke bestimmt. Die Küvette wurde vor den einzelnen Messungen gründlich mit dH_2O gespült, um die Ergebnisse nicht zu verfälschen.

Nach der Referenzmessung mit Nuklease freiem Wasser wurde der RNA-Gehalt jeder einzelnen Probe in µg/µl bestimmt. Zu diesem Zweck wurde die Probe mittels Vortex zunächst kurz gemischt. Nach Erstellen einer 1:100 Verdünnung aus RNA und dH_2O in einem neuen Eppendorf-Reaktionsgefäß wurde der Inhalt in die Quarzküvette pipettiert und die Messung durchgeführt.

2.2.3.6 cDNA-Synthese

Für die cDNA-Synthese wurde das „iScript cDNA Synthesis Kit“ der Firma BioRad verwendet. Die „iScript Reverse Transcriptase“ ist eine modifizierte, dem Moloney Murine Leukemia Virus abgeleitete H⁺ Reverse Transkriptase. Um den vorzeitigen Abbau des RNA Templates zu verhindern ist sie mit einem RNase Inhibitor vorgemischt. Im „5x iScript Reaction Mix“ sind Oligo-d(T)-Primer und verschiedenste Hexamer-Oligonukleotid Primer enthalten.

Tab. 9: Reaktionsansatz cDNA-Synthese

Reaktionsansatz cDNA-Synthese	
Reagenz	Menge je Probe
5x iScript Reaction Mix	4 µl
iScript Reverse Transcriptase	1 µl
Nuclease-Free Water	x µl
RNA (1 µg)	x µl
Gesamtvolumen	20 µl

In dieser Arbeit wurden 1 µg RNA zur cDNA-Synthese eingesetzt und die entsprechende Mikroliteranzahl auf 15 µl mit Nuclease-Free Water aufgefüllt. Es wurden je 20 µl des Ansatzes in 0,2 ml Tubes pipettiert, diese daraufhin fest verschlossen und die cDNA-Synthese mit dem folgenden Protokoll durchgeführt.

Tab. 10: PCR-Parameter

PCR-Parameter	
5 min	25°C
30 min	42°C
5 min	85°C
∞	4°C

Die cDNA wurde im Anschluss bei –20°C im Gefrierschrank gelagert.

2.2.3.7 Vorbereitung der qPCR

Für die qPCR wurde der „Absolute QPCR Mix“ der Firma ABgene verwendet. Dieser beinhaltet eine hot start Taq-DNA-Polymerase und einen für die qPCR optimierten Puffer.

Tab. 11: Reaktionsansatz AIM2/GAPDH für qPCR

Reaktionsansatz AIM2/GAPDH	
Reagenz	Menge je well
ABsolute QPCR Mix	12,5 µl
AIM2/FAM Taqman Gene Expression Assay	1,25 µl
GAPDH/VIC Taqman Gene Expression Assay	1,25 µl
Nuclease-Free water	10 µl
Gesamtvolumen	25 µl

Tab. 12: Reaktionsansatz IL-1β/GAPDH für qPCR

Reaktionsansatz IL-1β/GAPDH	
Reagenz	Menge je well
ABsolute QPCR Mix	12,5 µl
IL-1β/FAM Taqman Gene Expression Assay	1,25 µl
GAPDH/VIC Taqman Gene Expression Assay	1,25 µl
Nuclease-Free Water	10 µl
Gesamtvolumen	25 µl

Der Ansatz wurde für jede cDNA Probe sowie NTC (Non Template Control) 4-fach hergestellt. In einem Eppendorfcap wurden dann jeweils 96 µl des Reaktionsansatzes mit 4 µl cDNA der entsprechenden Probe, bzw. 4 µl Nuclease-Free Water bei den NTCs, vermischt. Die Caps wurden gevortext und bei 8000 rpm/min 2 Minuten zentrifugiert. Daraufhin wurden je 3 Kavitäten der 96-well Platte pro Probe mit je 25 µl des cDNA bzw. H₂O enthaltenden Reaktionsansatzes geladen. Nach dem Verschließen der Platten wurden sie in Alufolie verpackt und bis zur Messung aufbewahrt. Vor der qPCR wurden die Platten noch einmal kurz zentrifugiert.

2.2.3.8 Genexpressionsanalyse

Die Genexpressionsanalyse erfolgte über das iCycler iQ Real-Time-PCR Detection System und der Optical System Software.

Das qPCR Protokoll des iCyclers wurde wie folgt gewählt:

Tab. 13: qPCR Protokoll

Cycle	Repeats	Step	Ramp Rate	Dwell Time (min)	Set Point (°C)
1	1	1	MAX	09:00	95
2	50	1	MAX	00:15	95
		2	MAX	01:00	60
3	1	1	MAX	∞	15

Die Ergebnisse wurden mittels der ddCt Methode statistisch in Microsoft Excel ausgewertet und relativ quantifiziert.

2.2.4 Western Blot

2.2.4.1 Vorbereitung der Proben und Konzentrationsbestimmung

Die Zellen wurden, wie unter 2.2.1 beschrieben, in 75 cm² Zellkulturflaschen ausgesät, bei Konfluenz mittels Trypsin geerntet und als Trockenpellets bei -70°C aufbewahrt. Die Überstände wurden mit Sample Buffer versetzt und auf das Gel geladen.

Zunächst wurde jedes Zellpellet in 200 µl Lysis Buffer (Tab. 14) mittels Vortex gelöst und im Anschluss durch 10-sekündige Ultraschallbehandlung lysiert. Es folgte eine Zentrifugation bei 4°C und 7500 rpm über 5 min und das Überführen des Überstands in ein neues silikonisiertes 1,5 ml fassendes Eppendorfcap.

2 Material und Methoden

Tab. 14: Zusammensetzung Lysis Buffer

Lysis Buffer	
Tris-HCl, pH 7,4	20 mM
EGTA	1 mM
Na ₃ VO ₄	50 µM
NaF	50 mM
Aprotinin	0,01 U/ml
PMSF	1 µM
Pepstatin	10 µg/ml
in ddH ₂ O	

Für die Konzentrationsbestimmung nach Bradford wurde der Protein Assay von Bio-Rad verwendet. Darin enthalten sind das „Protein Assay Dye Reagent Concentrate“ (enthält den Farbstoff Coomassie Brilliant Blue G-250) und BSA.

Für die Standardkurve wurden die folgenden Zusammensetzungen gewählt und in 3,5 ml Tubes vermischt:

Tab. 15: Konzentrationen für BSA Standardkurve

BSA		dH ₂ O	Dye Reagent Concentrate
Leerwert	0 µl	800 µl	200 µl
2 µg	1 µl	799 µl	200 µl
4 µg	2 µl	798 µl	200 µl
6 µg	3 µl	797 µl	200 µl
8 µg	4 µl	796 µl	200 µl
10 µg	5 µl	795 µl	200 µl
12 µg	6 µl	794 µl	200 µl

Für die Konzentrationsbestimmung der Proben wurden je 2 µl einer Probe zu 798 µl dH₂O und 200 µl Dye Reagent Concentrate hinzugegeben. Anschließend wurden die Proben gevortext, der Inhalt in Polystyrol Küvetten umgefüllt und daraufhin die Extinktion bei 595 nm im Photometer gemessen. Je nach Menge der anwesenden Proteine findet ein unterschiedlich starker

Farbwechsel des Dye Reagent statt, der auf diese Weise detektiert wird. Anhand Verrechnung der Probenwerte mit den Werten der Standardkurve konnten nun die für die SDS-PAGE benötigten Probenvolumina berechnet werden.

Die Proben wurden bei -70°C gelagert.

2.2.4.2 Gelpräparation

Am nächsten Tag wurden zunächst die Glasplatten der Elektrophoresekammer der Reihe nach mit ddH_2O , Aceton und Ethanol gründlich abgewaschen und schließlich das Gelgießsystem, wie in den Herstellerangaben aufgezeigt, zusammengebaut.

Im Anschluss wurde das Running Gel (zu Deutsch Trenngel) (Tab. 16) hergestellt, wobei darauf zu achten ist, dass Ammoniumperoxodisulfat (APS) und Tetramethylethylendiamin (TEMED) zuletzt zugegeben werden, da sie die Polymerisation des Gels initiieren. Da AIM2 ein Molekulargewicht von 39 kDa besitzt, wurde für die SDS-Page zunächst eine Acrylamidkonzentration von 12,5 % gewählt. In nachfolgenden Versuchen kamen auch Acrylamidkonzentrationen von 15 % zum Einsatz. Im Allgemeinen gilt, je kleiner das zu detektierende Protein, desto höher die zu verwendende Acrylamid-/Bisacrylamidkonzentration.

Tab. 16: Zusammensetzungen von Running Buffer und Running Gel

Running Buffer, 4x		Running Gel, 12,5 %	
Tris base	1,5 M	Acrylamid 30 %	7,5 ml
SDS (10 % in H_2O)	0,8 %	Running Buffer, 4x	4,5 ml, 1x
in ddH_2O		ddH_2O	6,0 ml
		APS 10 %	110 μl
		TEMED	13 μl

Hiernach wurde die Gellösung zwischen die Glasplatten pipettiert, wobei darauf geachtet wurde, dass sich keine Blasen bildeten. Anschließend wurde das Gel

mit gewaschenem n-Butanol überschichtet. Während der mindestens 30-minütigen Polymerisation wurde das Stacking Gel (zu Deutsch Sammelgel) (Tab. 17) hergestellt.

Tab. 17: Zusammensetzungen von Stacking Buffer und Stacking Gel

Stacking Buffer, 4x		Stacking Gel	
Tris base	0,5 M	Acrylamid 30 %	1,0 ml
SDS (10 % in H ₂ O)	0,8 %	Stacking Buffer, 4x	1,5 ml, 1x
in ddH ₂ O		ddH ₂ O	3,5 ml
		APS 10 %	90 µl
		TEMED	9 µl

Nach ausreichender Festigung des Running Gels folgte das Ausgießen des Butanols, das Aufpipettieren des Stacking Gels und das Positionieren des Geltaschenkamms.

2.2.4.3 Laden des Gels und SDS-PAGE

Der Kamm wurde vorsichtig aus dem Stacking Gel entfernt und die Glasplatten mit dem dazwischen befindlichen Gel in die Elektrophoresekammer eingebaut. Diese wurde daraufhin in die mit 1x Reservoir Buffer gefüllte Elektrophoresewanne eingesetzt.

Tab. 18: Zusammensetzung Reservoir Buffer

Reservoir Buffer, 10x	
Tris base	0,25 M
Glycin	1,92 M
SDS (10 % in H ₂ O)	1 %
in ddH ₂ O	

Bevor die Proben in die Geltaschen geladen werden, müssen die Proteine zunächst vollständig denaturiert werden. Dies erreicht man durch das im Sample Buffer (Tab. 19) enthaltene SDS, die Zugabe von β -Mercaptoethanol,

sowie durch 5 minütiges Erwärmen der Proben auf 95°C. Das anionische Detergens SDS sorgt dafür, dass alle in den Proben enthaltenen Proteine eine stark negative Ladung annehmen, die Eigenladung somit überdeckt wird, und deren Auftrennung in der PAGE nicht nach Ladung, sondern nach der Molekülmasse erfolgt. β -Mercaptoethanol bewirkt die Reduktion der Disulfidbrücken. Zu diesem Zweck wurden 1 vol. β -Mercaptoethanol zu 4 vol. Sample Buffer 4x gegeben und schließlich 3 vol. Probe mit 1 vol. Sample Buffer 4x + β -Mercaptoethanol vermischt. Die Proben wurden dann bei 95°C über 3 min gekocht und daraufhin 5 min auf Eis gelagert (nach Abcam Western blotting – A beginner's guide).

Tab. 19: Zusammensetzung Sample Buffer

Sample Buffer	
Stacking Buffer, 4x	2,5x
Glycerol	25 %
SDS (10 % in H ₂ O)	10 %
Bromophenol Blue	0,075 %
Pyronin Y	0,05 %
in ddH ₂ O filtriert durch 0,2 μ m Filter	

Nun konnten die Geltaschen mittels Gelloader Pipettenspitzen mit den vorher bestimmten Proteinmengen geladen werden.

Neben den Proben wurden Molecular weight Marker der Firma Bio-Rad (Tab. 20) sowie Fetal Lung Lysate der Firma Abcam als Positivkontrolle aufgebracht.

Tab. 20: Molecular weight marker

Molecular weight marker Bio-Rad, Hercules, Kalifornien, USA	Catalog Number
Prestained SDS-PAGE Standards, Low Range	161-0305
Kaleidoscope Polypeptide Standards	161-0325

Die Elektrophorese benötigt bei 120 V ca. 1-2 h. Das Wandern der Proteine kann anhand der im Sample Buffer enthaltenen Farbstoffe nachvollzogen werden.

2.2.4.4 Transfer der Proteine auf die Polyvinylidenfluorid (PVDF) Membran und Blocking

Das Überführen der Proteine auf die PVDF-Membran geschah mittels Elektroblothing bei 400 mA über 60 min in einer mit Transfer Buffer gefüllten Elektrophorese-Transferkammer. Der Transfer Buffer setzt sich zusammen aus 1 vol. 1x Blotting Buffer (Tab. 21) + 2 vol. Methanol + 7 vol. ddH₂O.

Tab. 21: Zusammensetzung Blotting Buffer

Blotting Buffer, 10x	
Tris base	0,25 M
Glycin	1,92 M
in H ₂ O	

Um unspezifisches Binden der Antikörper an die Membran zu vermeiden wird diese mittels Dry Milk-blocking Buffer (Tab. 22) 1 h bei Raumtemperatur geblockt.

Tab. 22: Zusammensetzung Dry Milk-blocking Buffer

Dry Milk-blocking Buffer	
Dry Milk	5 %
in TBS, 1x (Zusammensetzung siehe Tab. 23)	

Tab. 23: Zusammensetzung TBS

TBS, 1x	
Tris-HCl	10 mM
NaCl	150 mM
in ddH ₂ O	

2.2.4.5 Inkubation mit erstem und zweitem Antikörper

Nach dem Blocken wurde der Dry Milk-blocking Buffer verworfen und die Membran mit dem in frischem Dry Milk-blocking Buffer verdünnten ersten Antikörper (Tab. 24, Tab. 25) bei 4°C und auf einem Schüttler rotierend, über Nacht inkubiert. Im Anschluss wurde 2-mal jeweils 10 min mit 1x TBS (Tab. 23) gewaschen.

Der zweite, HRP-gekoppelte Antikörper (Tab. 26) wurde am darauffolgenden Tag in den unten angegebenen Verdünnungen in Dry Milk-blocking Buffer gelöst, auf die Membran gegeben und 1 h bei Raumtemperatur auf dem Schüttler inkubiert. Ein weiteres Mal wurde 2-mal à 10 min in 1x TBS gewaschen.

Tab. 24: Verwendete AIM2 Primärantikörper und Verdünnungen

AIM2 Primärantikörper	Verdünnungen, Verhältnis AK : Dry Milk-blocking Buffer
Rabbit Anti-AIM2 IgG Abcam, Cambridge, UK	1:1000, 1:2000
Rabbit Anti-AIM2 IgG, Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg	1:100, 1:500
Mouse Anti-AIM2 IgG AdipoGen, Epalinges, Schweiz	1:500, 1:1000

Tab. 25: Verwendete IL-1 β Primärantikörper und Verdünnungen

IL-1 β Primärantikörper	Verdünnungen, Verhältnis AK : Dry Milk-blocking Buffer
Rabbit Anti-IL-1 β IgG Cell Signaling/New England Biolabs, Frankfurt am Main	1:1000
Rabbit Anti-IL-1 β IgG, Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg	1:200

Tab. 26: Verwendete Sekundärantikörper und Verdünnungen

Sekundärantikörper	Verdünnungen, Verhältnis AK : Dry Milk-blocking Buffer
Goat Anti-Rabbit IgG HRP Conjugate, Promega, Mannheim	1:2000
Goat Anti-Rabbit IgG HRP Conjugate, Abcam, Cambridge, UK	1:5000
Sheep Anti-Mouse IgG HRP linked, GE Healthcare, Little Chalfont, UK	1:1000

2.2.4.6 Detektion

Um die gebundenen Sekundärantikörper mittels ECL sichtbar zu machen, schloss sich das Aufbringen zweier Detektionslösungen an, welche Luminol, H_2O_2 , sowie Phenole als Verstärker („Enhancer“) enthalten. Sie wurden im Verhältnis 1:1 gemischt und die Membran für 1 min in ihnen getränkt. Die an den Sekundärantikörper gekoppelte HRP katalysiert daraufhin die Oxidation von Luminol, in deren Folge eine Lichtemission stattfindet. Ursache für diese Lumineszenz ist der Übergang eines Elektrons aus seinem angeregten Zustand in einen energetisch niedrigeren Zustand (nach Amersham ECL Western blotting detection reagents and analysis system Product Booklet).

Nachdem die Blotting-Membran auf Whatman Filterpapier getrocknet wurde, wurde sie in Ceran-Folie gewickelt, auf ein Papierblatt geklebt und in eine Belichtungskassette gelegt. In einer Dunkelkammer wurde dann der die Chemilumineszenz detektierende Hyperfilm ECL auf der Membran plaziert und der Blot entwickelt. Hierbei wurden die Belichtungszeiten variiert von einigen Sekunden bis zu mehreren Minuten.

3 Ergebnisse

3.1 Induktion des AIM2 Inflammasoms

Dombrowski *et al.* zeigten am Beispiel der NHEKs, dass es für die Aktivierung des AIM2 Inflammasoms eines Primings der Zellen mit proinflammatorischen Stimuli wie TNF- α und IFN- γ bedarf. Ersteres induziert über die Aktivierung von NF- κ B die Pro-IL-1 β Transkription, letzteres die Transkription von AIM2. Bei erfolgter Transfektion kommt es dann zur Spaltung des Zymogens Pro-IL-1 β mittels Caspase-1 und somit zur IL-1 β Freisetzung (Dombrowski *et al.* 2011). Die IL-1 β Genexpression wurde auf mRNA Ebene mittels RT-qPCR und die Sekretion auf Proteinebene mittels ELISA gemessen. Dabei wurde ein signifikanter Anstieg der IL-1 β Proteinkonzentration als Korrelat für eine erfolgte Inflammasomaktivierung gewertet.

Um Kolonzellen auf eine mögliche Induzierbarkeit des AIM2 Inflammasoms zu untersuchen, wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit zunächst mittels RT-qPCR die Frage untersucht, welche Kolonzellen nach Stimulation mit IFN- γ (1.1.3.2) im Vergleich zu nicht-stimulierten Zellen mit einer vermehrten AIM2 Genexpression reagieren. Die ermittelten AIM2-exprimierenden Zelllinien wurden mit TNF- α und IFN- γ stimuliert und anschließend mit der synthetischen dsDNA Sequenz poly(dA:dT) (2.2.1.1) transfiziert, um eine AIM2 Inflammasombildung (1.1.3.2) zu induzieren. Eine solche wurde u.a. in Makrophagen (Hornung *et al.* 2009), in der humanen monozytischen Leukämiezelllinie THP-1 (Burckstummer *et al.* 2009) sowie in humanen epidermalen Keratinozyten (NHEKs) (Dombrowski *et al.* 2011) nachgewiesen.

Untersucht wurden die Kolonadenomzelllinie GEKI-2, die Kolonkarzinomzelllinien HT-29, T84, SW-480, COLO-320 und Caco-2, sowie die Zelllinie eines histiozytischen Lymphoms, U-937. Als Modellbeispiele zum Nachweis der korrekten Methodendurchführung dienten NHEKs sowie THP-1 Zellen.

3.1.1 NHEKs als Modellbeispiel für die Transfektion von poly(dA:dT) mittels Lipofectamine RNAiMAX

Die Zellen der humanen Keratinozytenzelllinie NHEK wurden analog dem späteren Vorgehen bei den Kolonzellen über 24 h mit unterschiedlichen Konzentrationen an IFN- γ und/oder TNF- α vorstimuliert und anschließend mittels Lipofectamine RNAiMAX über 24 h transfiziert.

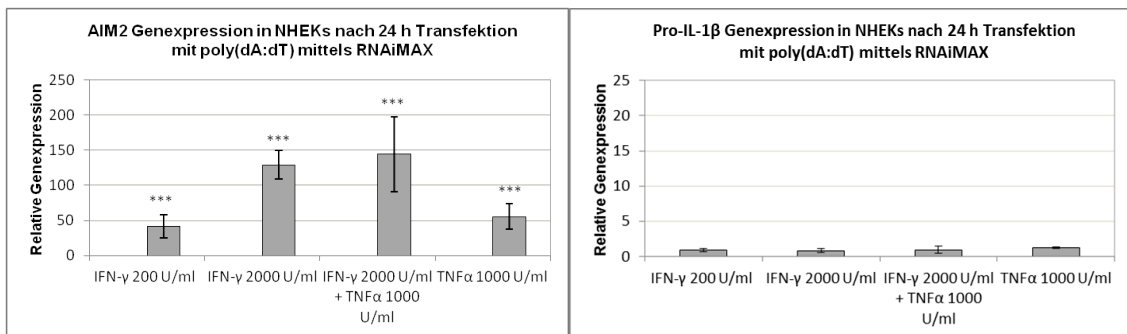


Abb. 5: RT-qPCR Analyse der AIM2 (links) und IL-1 β Genexpression (rechts) in NHEKs. Die Zellen wurden bei 37°C und 5 % CO₂ über 24 h mit 200 U/ml IFN- γ , 2000 U/ml IFN- γ , 2000 U/ml IFN- γ + 1000 U/ml TNF- α , sowie 1000 U/ml TNF- α alleine vorstimuliert und im Anschluss 24 h mit poly(dA:dT) mittels Lipofectamine RNAiMAX transfiziert. Die exprimierte mRNA wurde mittels Real-Time Reverser Transkriptase-PCR für IL-1 β und GAPDH ausgewertet, die relative Genexpression in Bezug auf mit Medium behandelte Kontrollzellen dargestellt. Mittelwerte +/- SD. *p<0,05, ***p<0,001; n=6.

Wie Abb. 5 zeigt, wurden die höchsten AIM2 Expressionswerte, mit einer nahezu 150-fachen Steigerung, nach gemeinsamer TNF- α und IFN- γ Stimulation gemessen.

Jedoch konnte keine Erhöhung der relativen IL-1 β Genexpression in der RT-qPCR nachgewiesen werden.

Außerdem wurde die Steigerung der Genexpression von AIM2 und IL-1 β nach alleiniger Stimulation durch IFN- γ und/oder TNF- α ohne anschließende Transfektion bestimmt. Zu diesem Zweck wurden die Zellen über 6, 24 und 48 h mit IFN- γ (200 U/ml, 2000 U/ml), IFN- γ + TNF α (2000 U/ml; 1000 U/ml) und TNF α stimuliert.

3 Ergebnisse

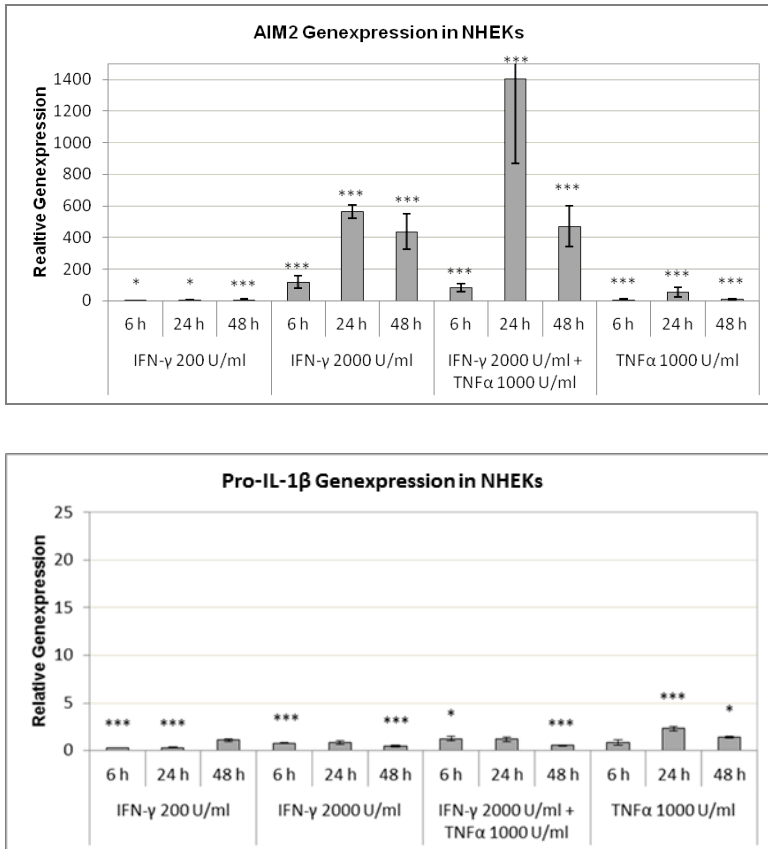


Abb. 6: RT-qPCR Analyse der AIM2 (oben) und IL-1β Genexpression (unten) in NHEKs. Die Zellen wurden bei 37°C und 5 % CO₂ über 6, 24 und 48 h mit 200 U/ml IFN-γ, 2000 U/ml IFN-γ, 2000 U/ml IFN-γ + 1000 U/ml TNF-α, sowie mit 1000 U/ml TNF-α alleine stimuliert. Die exprimierte mRNA wurde mittels Real-Time Reverser Transkriptase-PCR für AIM2 und GAPDH, bzw. IL-1-β und GAPDH, ausgewertet, die relative Genexpression in Bezug auf mit Medium behandelte Kontrollzellen graphisch dargestellt. Mittelwerte +/- SD. *p<0,05, ***p<0,001; n=9.

Aus Abb. 6 geht hervor, dass auch bei den transfizierten Zellen die stärkste Höherregulation nach gemeinsamer Stimulation mit IFN-γ und TNF-α erreicht wurde. Dabei wurde mit einer 1400-fach gesteigerten Expression im Vergleich zum Medium der höchste Wert bei den Zellen nach 24-stündiger Vorstimulation mit IFN-γ + TNFα gemessen, was einer über 9-fach höheren AIM2 Genexpression im Vergleich zu den transfizierten Zellen mit 24-stündiger Vorstimulation (ca. 150-fache relative Genexpression, siehe Abb. 5) entspricht. Eine Steigerung der IL-1β Genexpression blieb, gleich den transfizierten Zellen, auch bei den nicht-transfizierten NHEKs aus.

Dahingegen konnte auf Proteinebene in den im Anschluss durchgeführten ELISAs eine deutliche Steigerung der IL-1β Sekretion nach Transfektion

nachgewiesen werden (Abb. 7). Auch hier wurde mit ca. 80 pg/ml die mit Abstand höchste Konzentration an IL-1 β Protein in denjenigen Zellen gemessen, welche zuvor mit IFN- γ und TNF- α zusammen stimuliert wurden (siehe Abb. 7).

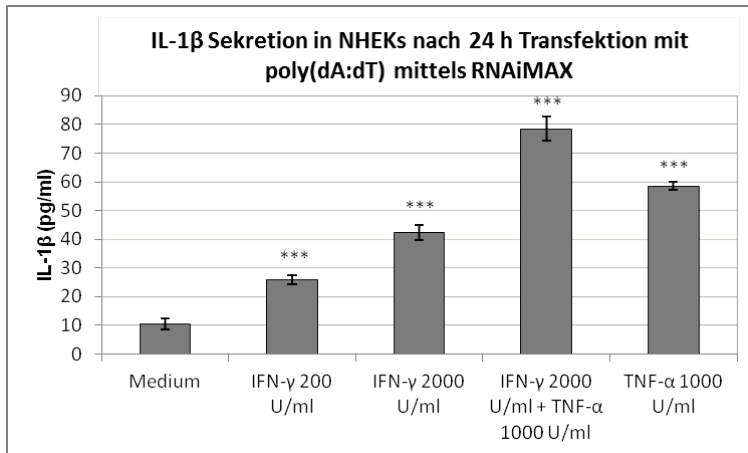


Abb. 7: ELISA: IL-1 β Sekretion in NHEKs nach Transfektion mit poly(dA:dT) mittels RNAiMAX.

Die Zellen wurden bei 37°C und 5 % CO₂ über 24 h mit 200 U/ml IFN- γ , 2000 U/ml IFN- γ , 2000 U/ml IFN- γ + 1000 U/ml TNF- α und 1000 U/ml TNF- α vorstimuliert und im Anschluss über 24 h mit poly(dA:dT) mittels Lipofectamine RNAiMAX transfiziert. Mittelwerte +/- SD. *p<0,05, ***p<0,001; n=4.

Außerdem konnten bei schrittweiser Erhöhung der IFN- γ und TNF- α Konzentrationen subsequente Steigerungen der IL-1 β Sekretion in den Keratinozyten im ELISA detektiert werden.

Zum Vergleich wurden, wie bereits bei der RT-qPCR, auch im Rahmen des ELISAs Zytokinstimulationen ohne anschließende Transfektion durchgeführt und die IL-1 β Proteinkonzentrationen bestimmt (siehe Abb. 8).

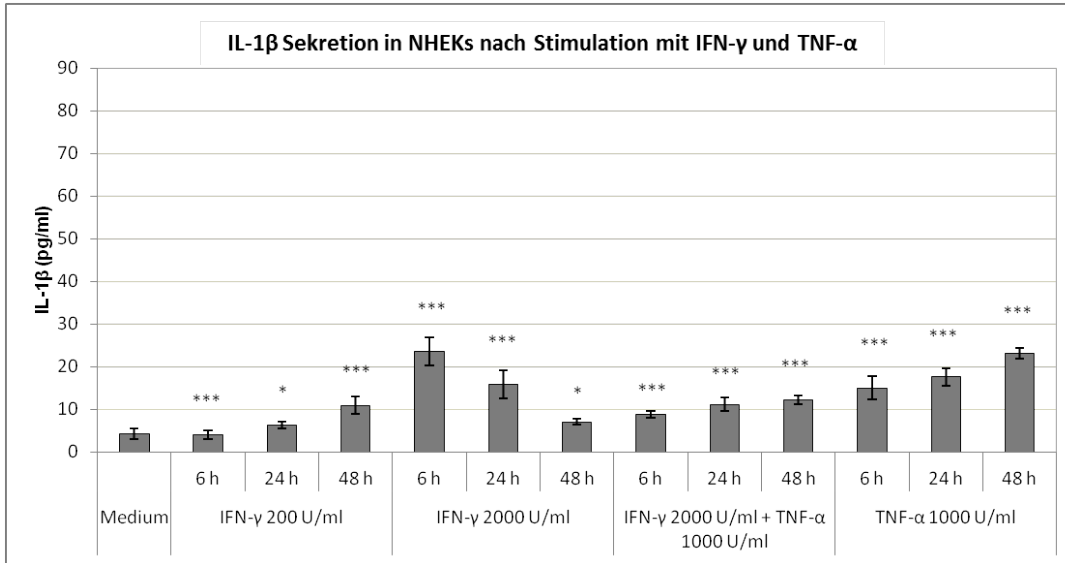


Abb. 8: ELISA: IL-1 β Sekretion in NHEKs nach Stimulation mit IFN- γ und TNF- α . Die Zellen wurden bei 37°C und 5 % CO₂ über 6, 24 und 48 h mit 200 U/ml IFN- γ , 2000 U/ml IFN- γ , 2000 U/ml IFN- γ + 1000 U/ml TNF- α und 1000 U/ml TNF- α stimuliert. Mittelwerte +/- SD. *p<0,05, ***p<0,001; n=6.

Anders als bei den transfizierten Zellen wurden dabei die höchsten Werte nach alleiniger Inkubation mit IFN- γ (ca. 24 pg/ml nach 6 h) bzw. TNF- α (ca. 24 pg/ml nach 48 h) erreicht. Dies entspricht jedoch nur knapp einem Viertel der IL-1 β Menge, die nach erfolgter Transfektion samt Priming mit beiden Zytokinen von den Zellen gebildet wird (ca. 80 pg/ml nach 24-stündiger Vorstimulation und 24-stündiger Transfektion, siehe Abb. 7).

3.1.2 THP-1 Zellen als Methodenkontrolle für die Transfektion von poly(dA:dT) mittels Lipofectamine RNAiMAX

Auch die Monozytische Leukämiezelllinie THP-1 eignet sich als Methodenkontrolle für die Transfektion mittels Lipofectamine RNAiMAX.

Entsprechend wurden die Zellen über 24 h mit unterschiedlichen Konzentrationen an IFN- γ und TNF- α allein, sowie in Kombination vorstimuliert und im Anschluss über 24 h transfiziert. Die IL-1 β Proteinkonzentration wurde mittels ELISA bestimmt (Abb. 9).

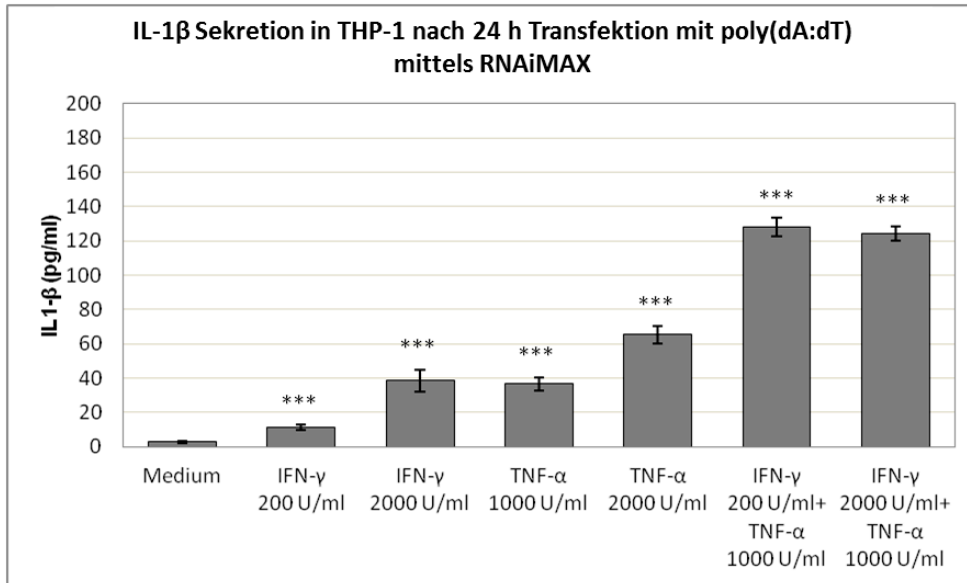


Abb. 9: ELISA: IL-1 β Sekretion in THP-1 Zellen nach Transfektion mit poly(dA:dT) mittels RNAiMAX. Die Zellen wurden bei 37°C und 5 % CO₂ über 24 h mit 200 U/ml IFN- γ , 2000 U/ml IFN- γ , 1000 U/ml TNF- α , 2000 U/ml TNF- α , 200 U/ml IFN- γ + 1000 U/ml TNF- α sowie 2000 U/ml IFN- γ + 1000 U/ml TNF- α vorstimuliert und im Anschluss über 24 h mit poly(dA:dT) mittels Lipofectamine RNAiMAX transfiziert. Mittelwerte +/- SD. * p <0,05, *** p <0,001; n=4.

Wie in Abb. 9 zu sehen, findet sich auch im Falle der THP-1 Zellen mit über 120 pg/ml die mit Abstand höchste IL-1 β Proteinsekretion in denjenigen Zellen, welche sowohl mit IFN- γ als auch mit TNF- α vorstimuliert wurden. Die Vorstimulation mit IFN- γ allein führt nur zu einem Zehntel (200 U/ml) bzw. einem Drittel (2000 U/ml) dieser Sekretion, die Vorstimulation mit TNF- α zu einem Drittel (1000 U/ml) bzw. der Hälfte (2000 U/ml).

3.1.3 IL-1 β Nachweis in THP-1 Zellen durch die Western Blot Methodik

Zum IL-1 β Nachweis im Western Blot wurden Zellen der monozytischen Leukämiezelllinie THP-1 über 6- bzw. 48 h mit IFN- γ sowie mit IFN- γ + TNF- α vorstimuliert und im Anschluss über 24 h mittels Lipofectamine RNAiMAX mit poly(dA:dT) transfiziert (Abb. 10). Im Western Blot wurde schließlich auf das Vorhandensein des 17 kDa schweren aktiven IL-1 β Proteins (siehe 1.1.3.3) untersucht.

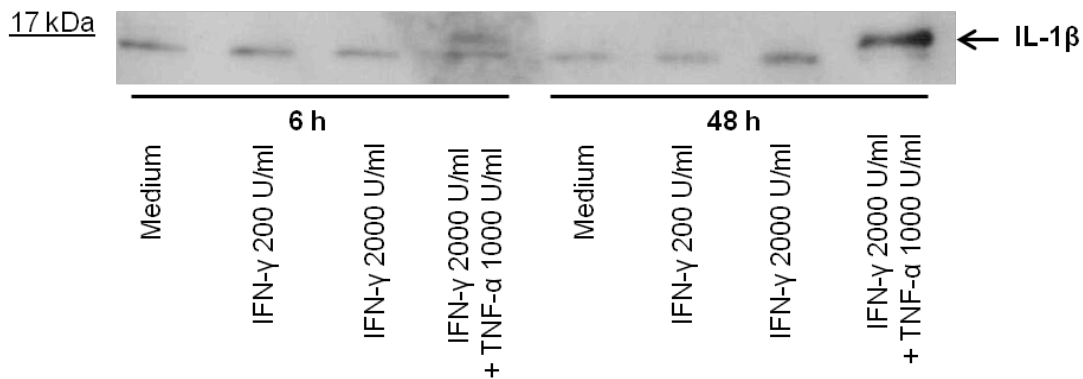


Abb. 10: IL-1 β Western Blot aus den Überständen von THP-1 Zellen nach Transfektion von poly(dA:dT) mittels RNAiMAX. Die Vorstimulation erfolgte mit 200 U/ml IFN- γ , 2000 U/ml IFN- γ sowie 2000 U/ml IFN- γ + 1000 U/ml TNF- α über 6 und 48 h. Die Transfektion erfolgte über 24 h. Bei gemeinsamer Stimulation mit IFN- γ und TNF- α zeigt sich eine leichte Bande nach 6 h, eine deutlichere Bande nach 48 h. Primärantikörper: Rabbit Anti-IL-1 β IgG, Cell Signaling, 1:1000. Sekundärantikörper: Goat Anti-Rabbit IgG HRP Conjugate, Promega, 1:2000.

Nach gemeinsamer Stimulation durch IFN- γ + TNF- α ist nach 6 bzw. 48-stündiger Vorstimulation jeweils eine Bande zu erkennen. Dieses Ergebnis deckt sich mit dem in Abb. 9 dargestellten IL-1 β ELISA transfizierter THP-1 Zellen, in dem die mit Abstand höchste IL-1 β Konzentration mit ca. 130 pg/ml ebenso nach gemeinsamer IFN- γ und TNF- α Vorstimulation gemessen werden konnte.

3.1.4 Untersuchung der Kolonepithelzellen auf die Induzierbarkeit des AIM2 Inflammasoms

3.1.4.1 Stimulation der Kolonepithelzellen mit IFN- γ

Um zunächst die Frage zu klären, welche der Kolonzelllinien grundsätzlich auf IFN- γ Stimulation mit einer Erhöhung der AIM2 Genexpression reagieren, wurden die Zelllinien GEKI-2, HT-29, T84, SW-480, COLO-320 und Caco-2 über 24 h mit 2000 U/ml IFN- γ stimuliert und die relative AIM2 und IL-1 β Genexpression in der RT-qPCR gemessen. Genauso wurde mit der Zelllinie des humanen histiozytären Lymphoms, U-937, verfahren (Abb. 11).

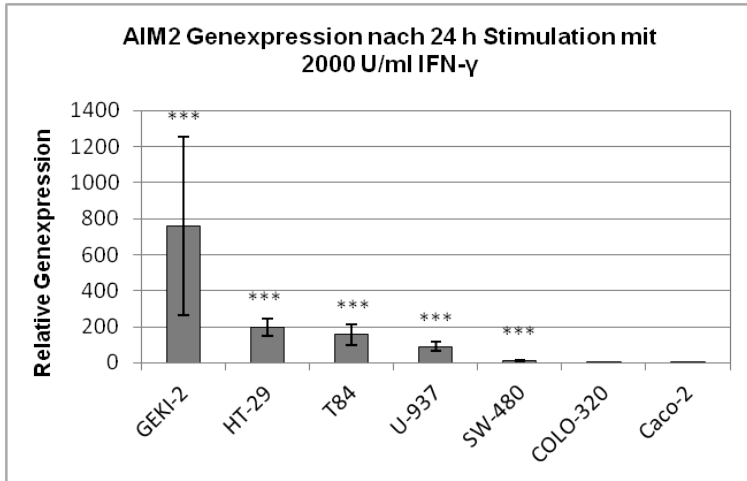


Abb. 11: RT-qPCR Analyse der AIM2 Genexpression in Kolonadenom- bzw. Kolonkarzinomzellen und einer Zelllinie eines Histiocyären Lymphoms. GEKI-2, HT-29, T84, U-937, SW-480, COLO-320 und Caco-2 wurden bei 37°C und 5 % CO₂ über 24 h mit 2000 U/ml IFN- γ stimuliert. Die exprimierte mRNA wurde mittels Real-Time Reverser Transkriptase-PCR für AIM2 und GAPDH ausgewertet, die relative Genexpression in Bezug auf mit Medium behandelte Kontrollzellen graphisch dargestellt. Die Zelllinien GEKI-2, HT-29, T84 und U-937 zeigten eine deutliche Erhöhung der relativen AIM2-Genexpression. Mittelwerte +/- SD. *p<0,05, ***p<0,001; n=9.

Es zeigte sich eine erhöhte AIM2 Genexpression in der Kolonadenomzelllinie GEKI-2 (über 700-fach, jedoch mit großer Standardabweichung), in den Kolonkarzinomzelllinien HT-29 und T84 AIM2 (nahezu 200-fach) sowie in der Lymphomzelllinie U-937 (nahezu 100-fach). In SW-480 erfolgte nur eine etwa 10-fache Expression, COLO-320 und Caco-2 zeigten keinerlei Höherexpression.

Bei keiner der untersuchten Zelllinien konnte eine wesentlich erhöhte IL-1 β Genexpression in der RT-qPCR nachgewiesen werden (siehe Abb. 12).

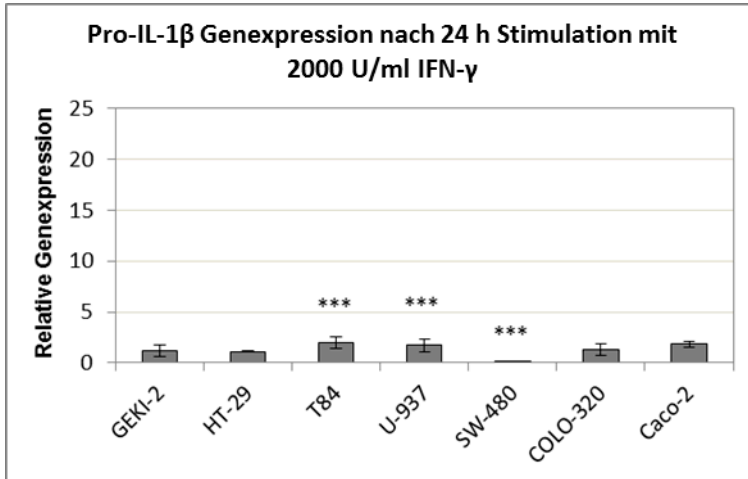


Abb. 12: RT-qPCR Analyse der IL-1 β Genexpression in Kolonadenom- bzw. Kolonkarzinomzellen. Die Zelllinien GEKI-2, HT-29, T84, U-937, SW-480, COLO-320 und Caco-2 wurden bei 37°C und 5 % CO₂ über 24 h mit 2000 U/ml IFN- γ stimuliert. Die exprimierte mRNA wurde mittels Real-Time Reverser Transkriptase-PCR für IL-1 β und GAPDH ausgewertet, die relative Genexpression in Bezug auf mit Medium behandelte Kontrollzellen graphisch dargestellt. Eine deutliche Steigerung der IL-1 β Genexpression nach IFN- γ Stimulation blieb bei allen untersuchten Kolonzelllinien aus. Mittelwerte +/- SD. *p<0,05, ***p<0,001; n=9.

Bei den Zelllinien GEKI-2, HT-29, T84 und U-937 wurde zusätzlich ein IL-1 β ELISA durchgeführt. Hierbei wurden die Zellen über 24 h mit 2000 U/ml INF- γ stimuliert. Es konnte kein IL-1 β Protein im Medium detektiert werden.

3.1.4.2 AIM2 Proteinnachweis in Kolonepithelzellen durch die Western Blot Methodik

Der AIM2 Proteinnachweis per Western Blot gestaltete sich problematisch. In allen durchgeführten Blots entstanden viele unspezifische Banden, die auch nach mehrmaligem Wechseln der AK Herstellerfirmen sowie Variieren der AK- und Proteinkonzentrationen (2.2.4.5, Tab. 24 und Tab. 26), bestehen blieben.

Auch von anderen Forschungsgruppen konnte diese eingeschränkte Spezifität verschiedener AIM2 Antikörper bisher beobachtet werden (Kopfnagel *et al.* 2011, de Koning *et al.* 2012).

Zunächst untersucht wurden die Zelllinien GEKI-2, HT-29, T84, SW-480, COLO-320 und Caco2. Diese wurden über 24 und 48 h mit 200 U/ml IFN- γ

inkubiert. In den im Anschluss durchgeführten Western Blots ließen sich keine AIM2 Banden ausmachen.

Des Weiteren wurden die Kolonzelllinien GEKI-2 und T84 über 24 und 48 h mit 2000 U/ml IFN- γ allein, sowie mit 2000 U/ml IFN- γ + 1000 U/ml TNF- α in Kombination stimuliert. Diesmal zeigte die Kolonadenomzelllinie GEKI-2 passende Banden nach 48-stündiger Stimulation mit IFN- γ und TNF- α (Abb. 13 und Abb. 14), nach 24-stündiger Stimulation mit IFN- γ + TNF- α (Abb. 14) und nach 48-stündiger Stimulation mit IFN- γ allein (Abb. 14).

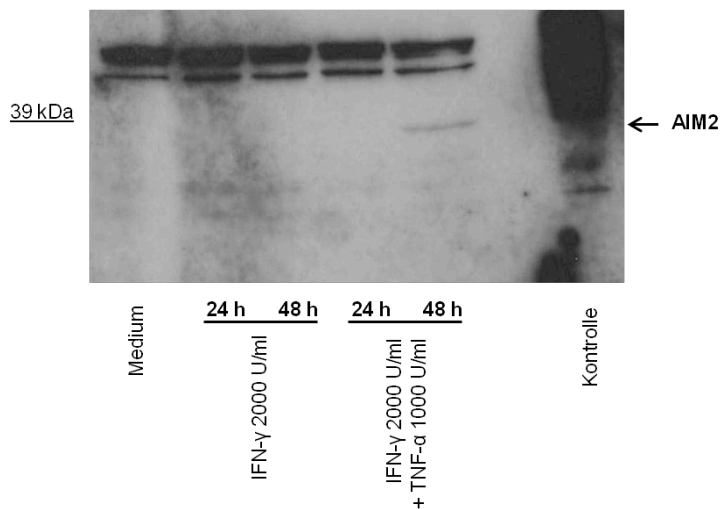


Abb. 13: AIM2 Western Blot aus dem Überstand der Kolonadenomzelllinie GEKI-2. Die Stimulation erfolgte mit 2000 U/ml IFN- γ sowie 2000 U/ml IFN- γ + 1000 U/ml TNF- α über 24 und 48 h. Es ist eine deutliche Bande bei gemeinsamer Stimulation mit IFN- γ und TNF- α nach 48 h zu erkennen. Primärantikörper: Rabbit Anti-AIM2 IgG, Abcam. Sekundärantikörper: Goat Anti-Rabbit IgG HRP Conjugate, Abcam. Kontrolle = Fetal Lung Lysate, Abcam.

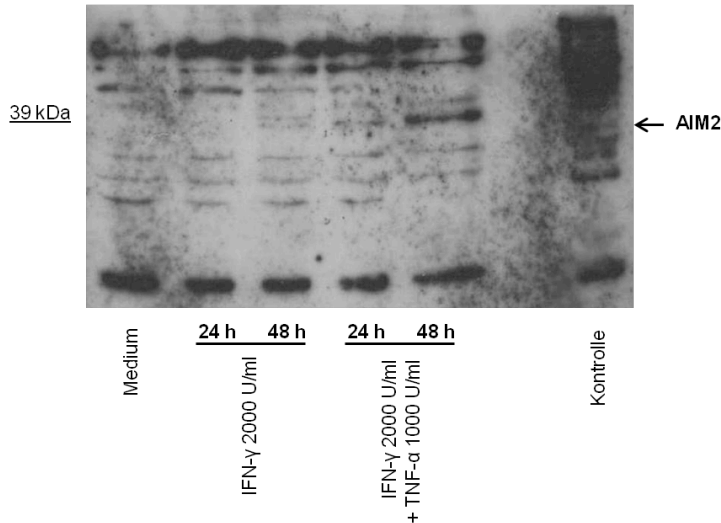


Abb. 14: AIM2 Western Blot aus dem Überstand der Kolonadenomzelllinie GEKI-2. Die Stimulation erfolgte mit 2000 U/ml IFN- γ sowie 2000 U/ml IFN- γ + 1000 U/ml TNF- α über 24 und 48 h. Neben vielen unspezifischen Bindungen ist eine deutliche Bande bei gemeinsamer Stimulation mit IFN- γ und TNF- α nach 48 h zu sehen, eine weniger starke nach 24 h. Eine weitere leichte Bande zeigt sich nach 48-stündiger Stimulation mit IFN- γ allein. Primärantikörper: Rabbit Anti-AIM2 IgG, Abcam, 1:2000. Sekundärantikörper: Goat Anti-Rabbit IgG HRP Conjugate, Abcam, 1:5000. Kontrolle = Fetal Lung Lysate, Abcam.

3.1.4.3 Transfektion der Kolonzelllinien GEKI-2 und HT-29 mit poly(dA:dT) mittels Lipofectamine RNAiMAX

Beispielhaft für die 4 Zelllinien GEKI-2, HT-29, T84 und U-937, die eine erhöhte AIM2 Genexpression auf den IFN- γ Stimulus zeigten (Abb.5), wurden die Zelllinien GEKI-2 und HT-29 zur Transfektion herangezogen. Es sollte untersucht werden, ob durch die Transfektion eine AIM2 Inflammasombildung, und damit die posttranslationale Spaltung von Pro-IL-1 β in IL-1 β , induziert werden kann (1.1.3.2).

Zunächst wurde eine 24-stündige Vorstimulation mit unterschiedlichen Konzentrationen an IFN- γ sowie IFN- γ und TNF- α in Kombination durchgeführt. IFN- γ sollte dabei die Transkription von AIM2-mRNA und die anschließende Proteintranslation induzieren (1.1.3.2) (DeYoung *et al.* 1997, Dombrowski *et al.* 2011), TNF- α die Pro-IL-1 β -mRNA Transkription und die Translation des Zymogens (1.1.3.3) (Dinarello *et al.* 1986, Franchi *et al.* 2009). Die nachfolgende Transfektion von poly(dA:dT) mittels Lipofectamine RNAiMAX

(2.2.1.1.1) wurde ebenfalls über 24 h durchgeführt. War die Inflammasombildung erfolgreich, sollte es, wie in 1.1.3.2 beschrieben, zur Spaltung des synthetisierten Pro-IL-1 β zum aktiven IL-1 β und zu dessen Sekretion kommen. AIM2 mRNA und IL- β mRNA wurden mittels RT-qPCR (Abb. 15), das aktive IL-1 β mittels ELISA (Abb. 16) gemessen.

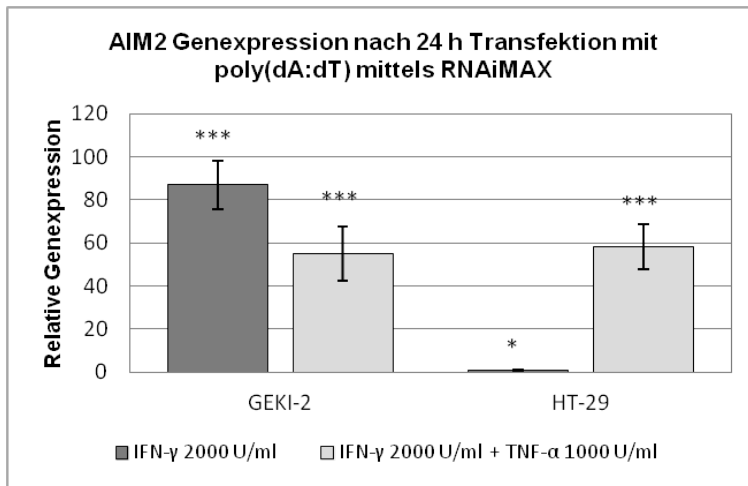


Abb. 15: RT-qPCR Analyse der AIM2 Genexpression in GEKI-2 und HT-29. Die Zellen wurden bei 37°C und 5 % CO₂ über 24 h mit 2000 U/ml IFN- γ , bzw. 2000 U/ml IFN- γ und 1000 U/ml TNF- α vorstimuliert und im Anschluss 24 h mit poly(dA:dT) mittels Lipofectamine RNAiMAX transfiziert. Die exprimierte mRNA wurde mittels Real-Time Reverser Transkriptase-PCR für AIM2 und GAPDH ausgewertet, die relative Genexpression in Bezug auf mit Medium behandelte Kontrollzellen graphisch dargestellt. Mittelwerte +/- SD. *p<0,05, ***p<0,001; n=15.

Nach Vorstimulation mit INF- γ und darauffolgender Transfektion von poly(dA:dT) mittels Lipofectamine RNAiMAX erbrachte die RT-qPCR Analyse entsprechend der Darstellung in Abb. 15 (dunkelgraue Balken) bei beiden Kolonzelllinien eine geringere relative AIM2 Genexpressionen als nach alleiniger Stimulation mit IFN- γ ohne Transfektion (siehe 3.1.4.1, Abb. 11). So konnte bei der Zelllinie GEKI-2 eine nur 80-fach erhöhte Expression nach Stimulation mit 2000 U/ml IFN- γ alleine gemessen werden. Im Vergleich dazu wurde, wie in Abb. 11 zu erkennen, bei den nicht-transfizierten GEKI-2 Zellen eine knapp über 700-fache Genexpression detektiert, jedoch mit großer Standardabweichung.

Die Kolonkarzinomzelllinie HT-29 zeigte nach Transfektion keine Erhöhung der AIM2 Genexpression in der RT-qPCR. Zum Vergleich: die Stimulation mit IFN- γ

3 Ergebnisse

ohne anschließende Transfektion ergab eine relative Erhöhung der Genexpression um das 200-Fache (siehe 3.1.4.1, Abb. 11).

Nach Vorstimulation der beiden Zelllinien mit IFN- γ sowie TNF- α in Kombination und anschließender Transfektion zeigten die Kolonadenomzelllinie GEKI-2 und die Kolonkarzinomzelllinie HT-29 mit einer 55- bis ca. 60-fachen relativen AIM2 Genexpression ähnliche Werte (siehe Abb. 15, hellgraue Balken).

Die ebenso in der RT-qPCR gemessene relative Pro-IL-1 β Genexpression nach Zytokinstimulation und Transfektion ist in Abb. 16 dargestellt. Es konnte keine Höheregulation von IL-1 β auf Genebene in den beiden Kolonzelllinien detektiert werden.

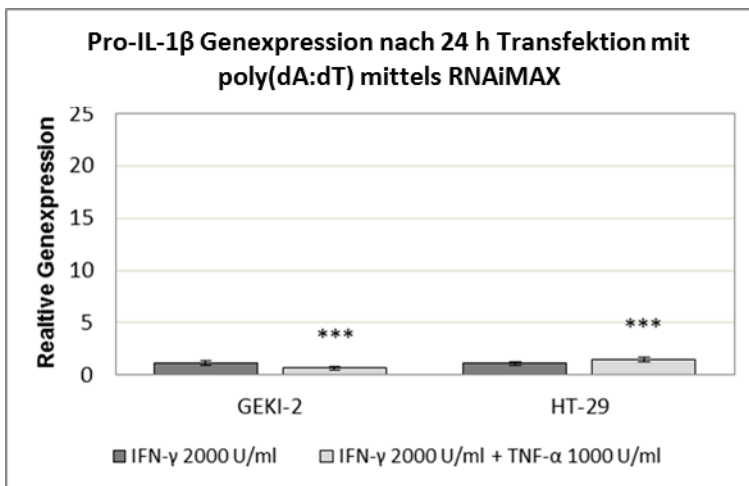


Abb. 16: RT-qPCR Analyse der IL-1 β Genexpression in GEKI-2 und HT-29. Die Zellen wurden bei 37°C und 5 % CO₂ über 24 h mit 2000 U/ml IFN- γ , bzw. 2000 U/ml IFN- γ + 1000 U/ml TNF- α vorstimuliert und im Anschluss 24 h mit poly(dA:dT) mittels Lipofectamine RNAiMAX transfiziert. Die exprimierte mRNA wurde mittels Real-Time Reverser Transkriptase-PCR für IL-1 β und GAPDH ausgewertet, die relative Genexpression in Bezug auf mit Medium behandelte Kontrollzellen dargestellt. Mittelwerte \pm SD. * p <0,05, *** p <0,001; n=15.

Es folgte die Untersuchung der transfizierten Zelllinien GEKI-2, HT-29, T84 und U-937 im IL-1 β ELISA. Die Transfektion wurde erneut mittels Lipofectamine RNAiMAX über 24 h durchgeführt, nachdem die Zellen über 24 Stunden mit 2000 U/ml IFN- γ allein, sowie mit einer Kombination aus 2000 U/ml IFN- γ + 1000 U/ml TNF- α geprimed wurden. Es konnte in keiner der untersuchten Zelllinien eine gesteigerte IL-1 β Proteinsekretion nachgewiesen werden.

3.1.4.4 Untersuchung der Genexpression weiterer Kolonzelllinien nach Zytokinstimulation in der RT-qPCR

Um die Frage, in welcher Weise die Kolonzelllinien auf verschiedene Konzentrationen an IFN- γ und/oder TNF- α sowie auf unterschiedliche Stimulationsdauern auf der Ebene der Genexpression reagieren, näher zu untersuchen, wurden weitere RT-qPCR Messungen durchgeführt.

Hierzu wurden die Kolonkarzinomzelllinien HT-29, T84 und CX-1 mit 200 U/ml und 2000 U/ml IFN- γ , sowie mit einer Kombination aus 1000 U/ml TNF- α und 2000 U/ml IFN- γ über 6, 24 und 48 h stimuliert (Abb. 17).

Wie in Abb. 17 zu erkennen, wurde bei allen drei Zelllinien die höchste AIM2 Genexpression jeweils nach gemeinsamer Stimulation durch IFN- γ und TNF- α nach 48 h gemessen. V.a. die HT-29 Zelllinie zeigte eine sehr hohe Expressionssteigerung bis auf das über 60000-Fache. Bei T84 stieg die relative Expression 1700-fach, bei CX-1 ca. 170-fach. Nach 24-stündiger Stimulation mit 2000 U/ml IFN- γ allein, zeigte sich bei HT-29 und T84 eine 200-fache Expressionserhöhung. Ähnliche Werte wurden bereits in 3.1.4.1 (Abb. 11) gemessen.

3 Ergebnisse

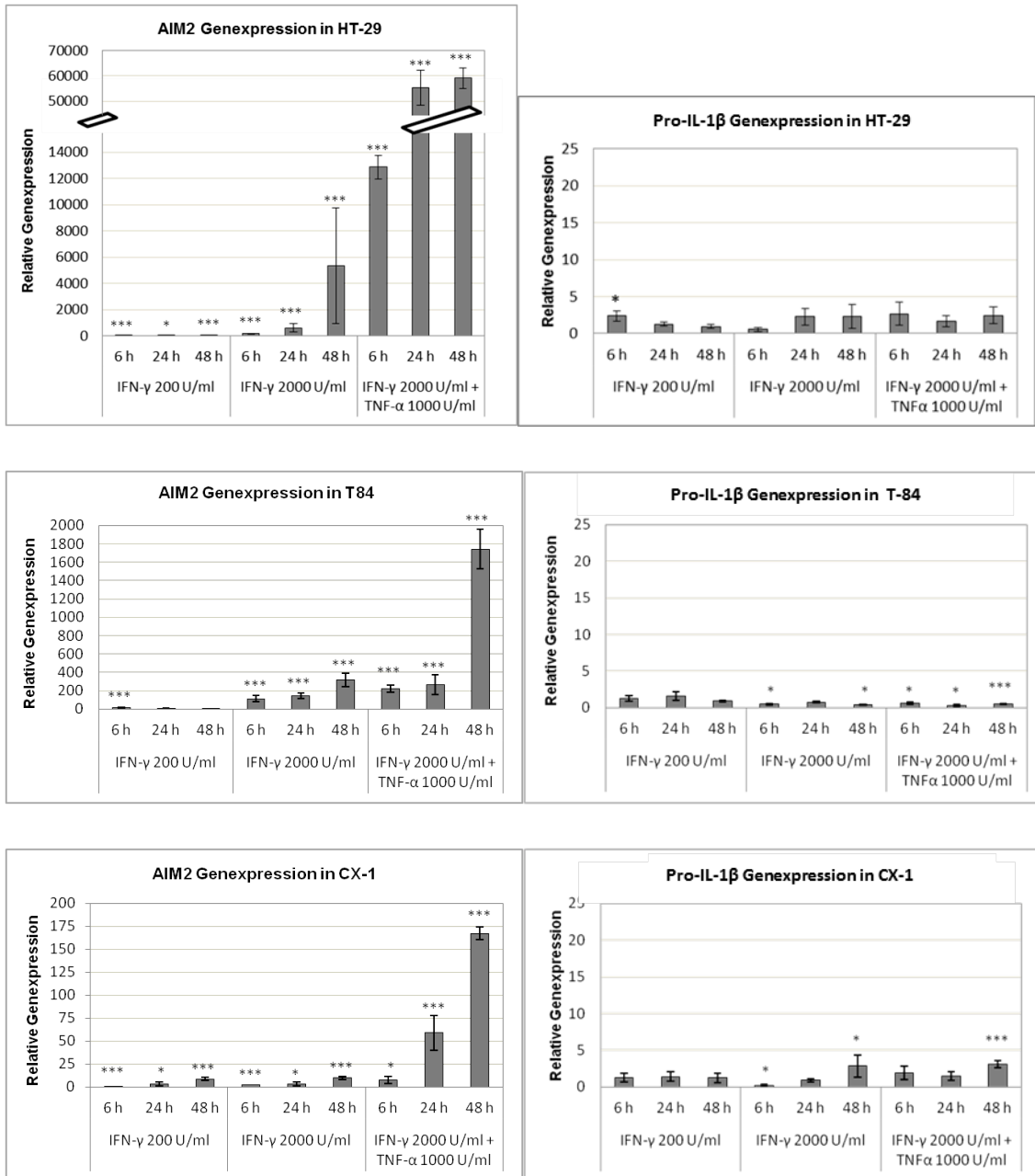


Abb. 17: RT-qPCR Analyse der AIM2 (links) und IL-1β Genexpression (rechts) in Kolonkarzinomzellen. HT-29, T84 und CX-1 wurden bei 37°C und 5 % CO₂ über 6, 24 und 48 h mit 200 U/ml IFN-γ, 2000 U/ml IFN-γ und 2000 U/ml IFN-γ + 1000 U/ml TNF-α stimuliert. Die exprimierte mRNA wurde mittels Real-Time Reverser Transkriptase-PCR für AIM2 und GAPDH, bzw. IL-1β und GAPDH, ausgewertet, die relative Genexpression in Bezug auf mit Medium behandelte Kontrollzellen graphisch dargestellt. Mittelwerte +/- SD. *p<0,05, ***p<0,001; n=3.

Bei den untersuchten Zelllinien konnte zu keinem Zeitpunkt und bei keiner der gewählten Konzentrationen eine deutliche Erhöhung der IL-1β Genexpression gemessen werden.

3.1.5 Transfektion mittels poly(dA:dT)/LyoVec

Alternativ zur Transfektion von „nacktem“ poly(dA:dT) mittels Lipofectamine RNAiMAX gibt es die Möglichkeit der Transfektion mittels poly(dA:dT)/LyoVec der Firma InvivoGen, bei welcher die dsDNA bereits im Komplex mit den kationischen Lipiden vorliegt (2.2.1.1.2). Um zu untersuchen, ob in den Darmzellen über diesen alternativen Weg eine AIM2 Inflammasomaktivierung induziert werden kann, wurden an verschiedenen Kolonzelllinien zusätzlich Transfektionen mittels der poly(dA:dT)/LyoVec Methode vorgenommen.

3.1.5.1 THP-1 Zellen als Modellbeispiel für die Transfektion mittels poly(dA:dT)/LyoVec

Als Methodenkontrolle für die Transfektion mittels poly(dA:dT)/LyoVec diente die Monozytische Leukämiezelllinie THP-1.

Die Zellen wurden über 3 h mit PMA, welches über den NF- κ B Signalweg zur IL-1 β Transkription führen soll (Abb. 3), stimuliert und im Anschluss über 6 und 24 h mit 1, 1,5, 2, 2,5 und 5 μ g/ml Medium poly(dA:dT)/Lyovec inkubiert. Aus den Überständen wurde mittels ELISA die IL-1 β Konzentration anhand einer Standardkurve bestimmt (Abb. 18).

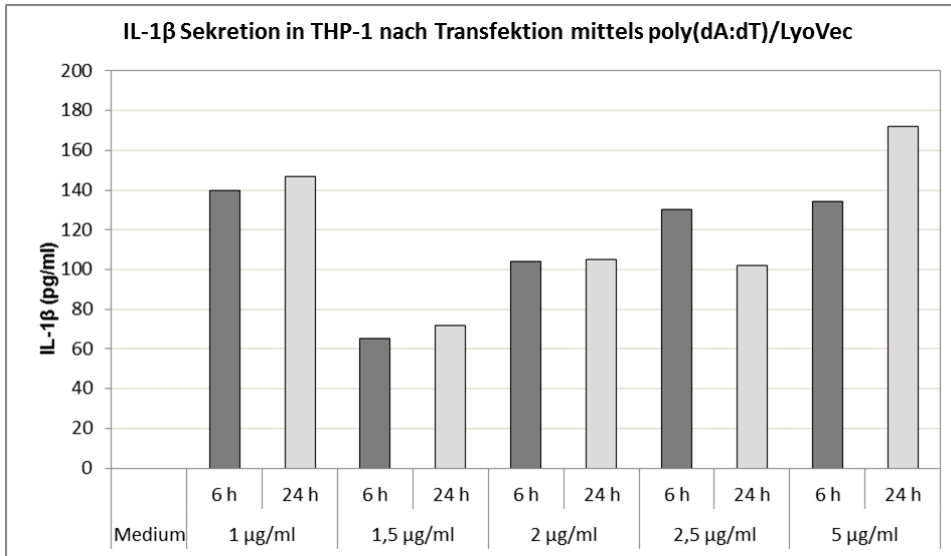


Abb. 18: ELISA: IL-1 β Expression in THP-1 Zellen nach Transfektion mittels poly(dA:dT)/Lyovec. Die Zellen wurden bei 37°C und 5 % CO₂ über 3 h mit Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA) vorstimuliert und im Anschluss über 6 und 24 h mit 1, 1,5, 2, 2,5 und 5 µg/ml Medium poly(dA:dT)/Lyovec inkubiert. n=1

Wie in Abb. 18 ersichtlich, zeigten die mit poly(dA:dT)/Lyovec transfizierten Zellen eine deutliche Erhöhung der IL-1 β Proteinkonzentration mit Werten zwischen 60 und 170 pg/ml. Bei den nicht-transfizierten Zellen („Medium“) konnte kein IL-1 β nachgewiesen werden.

3.1.5.2 Transfektion von Kolonzellen mittels poly(dA:dT)/LyoVec

Für die Transfektion mittels der poly(dA:dT)/LyoVec Methode wurden die Kolonzelllinien GEKI-2, HT-29 und LOVO gewählt.

Hierbei wurde nach 3-stündiger Vorstimulation mittels PMA über 6 und 24 h mit poly(dA:dT)/LyoVec Konzentrationen zwischen 1 µg/ml und 5 µg/ml transfiziert. In den anschließend durchgeführten ELISAs konnte bei jeweils guter Standardkurve kein IL-1 β in den Medien nachgewiesen werden.

3.1.6 Stimulation von THP-1 Zellen ohne Transfektion

Bei Stimulation der THP-1 Zellen mit IFN- γ , sowie IFN- γ und TNF- α über 6, 24 und 48 h ohne anschließende Transfektion sahen die Werte in der RT-qPCR wie folgt aus:

3 Ergebnisse

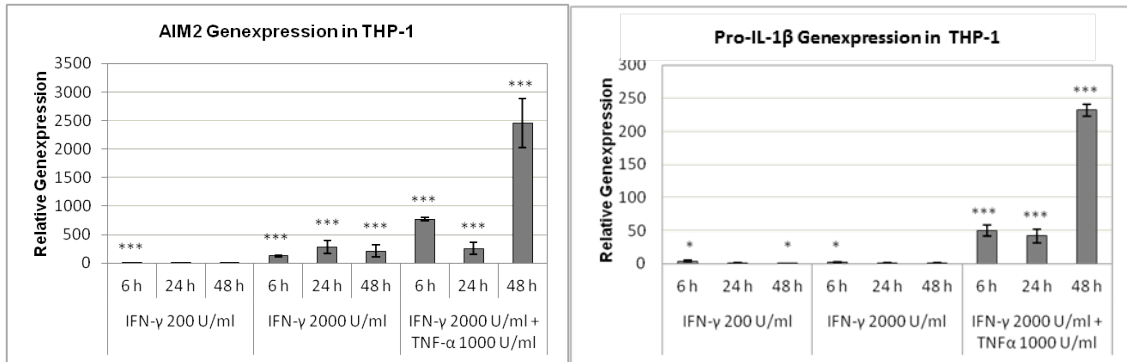


Abb. 19: RT-qPCR Analyse der AIM2 (links) und IL-1β Genexpression (rechts) in THP-1 Zellen. Die Zellen wurden bei 37°C und 5 % CO₂ über 6, 24 und 48 h / über 24 h mit 200 U/ml IFN-γ, 2000 U/ml IFN-γ und 2000 U/ml IFN-γ + 1000 U/ml TNF-α stimuliert. Die exprimierte mRNA wurde mittels Real-Time Reverser Transkriptase-PCR für AIM2 und GAPDH, bzw. IL-1β und GAPDH, ausgewertet, die relative Genexpression in Bezug auf mit Medium behandelte Kontrollzellen graphisch dargestellt. Mittelwerte +/- SD. *p<0,05, ***p<0,001; n=3.

Die AIM2 Genexpression stieg ab einer IFN-γ Konzentration von 2000 U/ml bis auf das 250-Fache an. Nach einer Stimulation durch IFN-γ und TNF-α zusammen über 48 h erhöhte sich die Expression sogar bis auf das 2500-Fache. Durch gemeinsame IFN-γ und TNF-α Stimulation wird außerdem eine deutliche Steigerung der IL-1β Genexpression erreicht. Nach 6 bis 24 h ist die Expression 50- bzw. 40-fach erhöht, nach 48 h sogar über 230-fach.

3.2 Induktion des NLRP3 Inflammasoms

In einem zweiten Schritt wurden die Darmzellen auf das Vorhandensein bzw. die Induzierbarkeit des NLRP3 Inflammasoms (1.1.3.1) untersucht. Eine etablierte Zelllinie, in der als Reaktion auf unterschiedliche Stimuli das NLRP3 Inflammasom formiert und über die aktivierte Caspase-1 IL-1β gebildet wird, stellt die THP-1 Zelllinie dar. Diese diente als Methodenkontrolle.

Während das AIM2 Inflammasom spezifisch zytosolische dsDNA erkennt, reagiert das NLRP3 Inflammasom auf viele sich sowohl strukturell wie auch chemisch unterscheidende Trigger (Hornung and Latz 2010). So wurde in diversen Publikationen beschrieben, dass Stimulantien wie ATP (Mariathasan *et al.* 2006), MSU (Martinon *et al.* 2006), Cholesterolkristalle (Rajamaki *et al.* 2010) und SDS (Watanabe *et al.* 2008) die NLRP3 Inflammasomaktivierung

nach Vorstimulation mit PMA oder LPS induzieren (Chang *et al.* 2005, Schroder and Tschopp 2010). Zu den Hypothesen über die Mechanismen der NLRP3 Inflammasomaktivierung siehe Abschnitt 1.1.3.1.1.

Die Zellen wurden über 3 h mit PMA vorstimuliert, um die Pro-IL-1 β Synthese zu induzieren.

3.2.1 THP-1 Zellen als Modellbeispiel für die Induktion des NLRP3 Inflammasoms über verschiedene Stimuli im ELISA

Die Aktivierung des NLRP3 Inflammasoms wurde durch Stimulation der THP-1 Zellen mittels MSU (Abb. 20) und SDS (Abb. 21) nachgewiesen. Hierbei erreichten die Proben IL-1 β Sekretionen von bis zu 200 pg/ml.

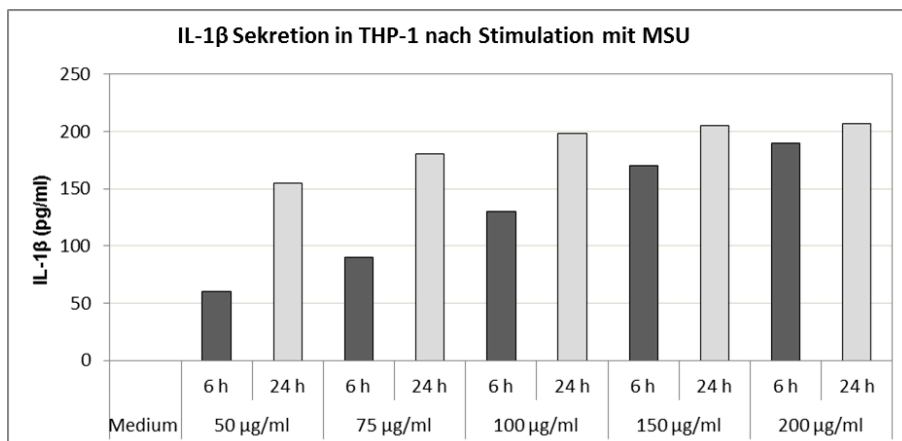


Abb. 20: ELISA: IL-1 β Sekretion in THP-1 Zellen nach Stimulation mit Harnsäurekristallen (Monosodium Urate Crystals, MSU). Die Zellen wurden bei 37°C und 5 % CO₂ über 3 h mit Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA) vorstimuliert und im Anschluss über 6 und 24 h mit 50, 75, 100, 150 und 200 μ g/ml Medium MSU inkubiert. n=1.

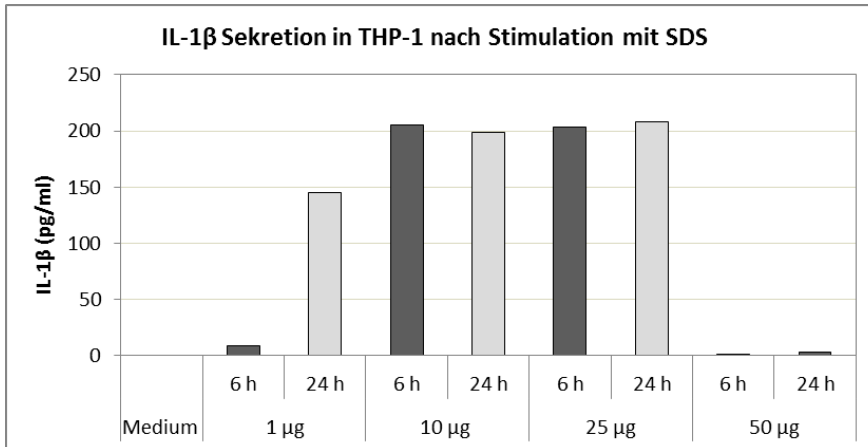


Abb. 21: ELISA: IL-1 β Sekretion in THP-1 Zellen nach Stimulation mit Natriumdodecylsulfat (SDS). Die Zellen wurden bei 37°C und 5 % CO₂ über 3 h mit Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA) vorstimuliert und im Anschluss über 6 und 24 h 1, 10, 25 und 50 μ g/ml Medium SDS inkubiert. n=1.

3.2.2 Untersuchung der Kolonepithelzellen auf die Induzierbarkeit des NLRP3 Inflammasoms

Die Kolonzelllinien GEKI-2, HT-29, T84, Caco-2 und LOVO wurden über 3 h mit PMA (300 ng/ml) bzw. LPS (1 μ g/ml) vorstimuliert und mit unterschiedlichen Induktoren des NLRP3 Inflammasoms inkubiert.

Tab. 27 gibt einen Überblick über die mittels ELISA untersuchten Kolonadenom bzw –karzinomzelllinien und die jeweils eingesetzten Stimulantien.

3 Ergebnisse

Tab. 27: Zelllinien und Stimulantien zum Versuch der Induktion des NLRP3 Inflammasoms

Zelllinie	Stimulans	Konzentration	Zeitpunkte	Vorstimulation
GEKI-2	ATP	5 mM	5, 10, 20, 30, 45, 60 min	LPS
	MSU	50, 75, 100, 150, 200 μ g/ml	6, 16 h	LPS
	Cholesterolkristalle	0,1, 0,25, 0,5, 1, 1,5, 2 mg/ml	4, 24 h	LPS
HT-29	ATP	5 mM	10, 20, 30 min	PMA
	MSU	50, 75, 100, 150, 200 μ g/ml	6, 16 h	LPS
	Cholesterolkristalle	0,1, 0,25, 0,5, 1, 1,5, 2 mg/ml	4, 24 h	PMA
	SDS	0,0001, 0,001, 0,0025, 0,005 %	6, 24 h	PMA
T84	ATP	5 mM	10, 20, 30 min	PMA
	MSU	50, 75, 100, 150, 200 μ g/ml	6, 24 h	PMA
	SDS	0,0001, 0,001, 0,0025, 0,005 %	6, 24 h	PMA
Caco-2	ATP	4, 5, 10 mM	6, 24 h	PMA
	MSU	50, 75, 100, 150, 200 μ g/ml	6, 24 h	PMA
LOVO	MSU	50, 75, 100, 150, 200 μ g/ml	6, 24 h	PMA

Die durchgeführten ELISAs ergaben zu keinem der gewählten Zeitpunkte und bei keiner der gewählten Konzentration einen IL-1 β Nachweis in den Medien.

4 Diskussion

4.1 Die Rolle des AIM2 und NLRP3 Inflammasoms in Kolonzellen

Als wichtiger Baustein des angeborenen Immunsystems sind die Inflammasome seit Jahren Gegenstand intensiver Forschung. Hierbei gibt es vor allem Studien über die Inflammasomaktivität in Makrophagen und anderen Immunzellen. Im Fokus dieser Arbeit stand deshalb die Frage, inwieweit Inflammasome auch in Kolonepithelzellen selbst induziert werden können. Zu diesem Zweck wurden verschiedene Kolonzelllinien auf die Aktivierbarkeit des AIM2 und des NLRP3 Inflammasoms mittels der Methoden RT-qPCR, ELISA und Western Blot untersucht. Das übereinstimmende Ergebnis aller durchgeführten Methoden ergab, dass unter den gewählten Versuchsmodalitäten weder eine funktionelle AIM2 Inflammasomaktivierung über das Vorhandensein intrazytoplasmatischer DNA nach Transfektion, noch eine funktionelle NLRP3 Inflammasomaktivierung nach Stimulation durch ATP, MSU, Cholesterolkristalle oder SDS in den verwendeten Darmzelllinien nachgewiesen werden konnte. Es zeigte sich also zu keinem Zeitpunkt und weder auf mRNA- noch auf Proteinebene eine signifikante IL-1 β Expressions- bzw. Sekretionssteigerung und entsprechend keine Aktivierung des AIM2 oder NLRP3 Inflammasoms in den Kolonzelllinien.

Eine Erklärung hierfür könnte sein, dass die verwendeten Kolonzelllinien, anders als THP-1 Zellen oder Keratinozyten, aufgrund ihrer zellulären „Ausstattung“ nicht dazu in der Lage sind, über die Formation eines AIM2 oder NLRP3 Inflammasoms IL-1 β in größeren Mengen zu sezernieren. Die Mechanismen, die zum Zusammenbau eines Inflammasoms führen, sind hochkomplex und es ist möglich, dass bereits das Nicht-Vorhandensein eines einzelnen Proteins das Zustandekommen der benötigten Signalkaskade unmöglich macht. In diesem Zusammenhang ist es also denkbar, dass die stärkere Entdifferenzierung der verwendeten Kolonadenom- und -karzinomzelllinien im Vergleich zu Kolonzellen in der Zellkultur der Grund für

das Nichtzustandekommen der Inflammasomaktivierung und IL-1 β Produktion ist und eine Inflammasomaktivierung beispielsweise in Primärzellen aus Biopsien oder Darmresektaten mittels der durchgeführten Stimulationen möglich wäre.

Eine weitere Möglichkeit ist, dass für eine funktionelle Aktivierung des AIM2 Inflammasoms im Falle der Kolonzellen die Transfektionszeit variiert werden muss. Für den poly(dA:dT) Transfer mittels Lipofectamine RNAiMAX wurden ausschließlich 24-stündige Transfektionen vorgenommen, was bei NHEKs und THP-1 Zellen mit der erwünschten Erhöhung der IL-1 β Proteinkonzentrationen als Beweis für die Aktivierung des AIM2 Inflammasoms einherging. Weitere Versuche mit entsprechend variierenden Transfektionszeiten könnten sich also anschließen.

Darüber hinaus gibt es neben dem AIM2 und NLRP3 Inflammasom eine Vielzahl weiterer Inflammasome, die über unterschiedlichste Mechanismen zu einer Caspase-1 Aktivierung und damit IL-1 β Sekretion führen (Schroder and Tschopp 2010). Vorstellbar wäre also auch, dass es in den Kolonzellen über eines dieser anderen Inflammasome zu einem IL-1 β Release kommt.

Beispielsweise wurde eine Assoziation des NLRP6 Inflammasoms mit den chronisch entzündlichen Darmerkrankungen in Mausmodellen beschrieben (Chen *et al.* 2011, Normand *et al.* 2011). Hierbei konnte im Knockout-Modell eine Störung der Regeneration der Kolonmuskosa nach Verletzung und somit ein Zusammenhang zwischen der Epithelerneuerung und dem NLRP6 Inflammasom festgestellt werden (Chen *et al.* 2011, Normand *et al.* 2011). Das Vorhandensein des NLRP6 Inflammasoms konnte hierbei u.a. in Myofibroblasten sowie in den Kolonepithelzellen selbst nachgewiesen werden (Normand *et al.* 2011).

Ein weiteres Inflammasom, das im Zusammenhang mit intestinaler Entzündung postuliert wurde, ist das NLRC4 Inflammasom. Diesbezüglich zeigten Franchi *et al.* im Mausmodell, dass das in intestinalen Makrophagen aktivierbare NLRC4 Inflammasom eine wichtige Rolle spielt bei der Unterscheidung zwischen

pathogenen und kommensalen Bakterien und mittels IL-1 β Sekretion zur Erregerabwehr im Bereich des Intestinums beiträgt. Mäuse mit NLRC4- oder IL-1 β Rezeptor-Defizienz zeigten sich hierbei deutlich empfindlicher gegenüber einer Infektion im Bereich des Darmtraktes (Franchi *et al.* 2012).

Außerdem konnten Inflammasome identifiziert werden, welche ohne IL-1 β bzw. IL-18 Produktion ihre Wirkung entfalten. So führt eine systemische Inflammasomaktivierung durch Flagellin durch Aktivierung eines NAIP5/NLRC4 Inflammasomenkomplexes in Mäusen zu einem Flüssigkeitsverlust in den Darm und den Peritonealraum und dem bald darauf eintretenden Tod der Mäuse. Diese massive Reaktion resultiert aus einem „Eikosanoid-Sturm“ und ist IL-1 β und IL-18 unabhängig (von Moltke *et al.* 2012).

Überdies werden inzwischen auch weitere Wege der Caspase-1 Aktivierung diskutiert, die Inflammasom-unabhängig zu einer IL-1 β Bildung führen sollen (Muller *et al.* 2010). Natürlich könnte ebenso eine dieser alternativen Aktivierungsmechanismen in Kolonzellen eine Rolle spielen.

4.2 AIM2 Inflammasom

4.2.1 Die Rolle des AIM2 Inflammasoms in Keratinozyten in Psoriasisläsionen

Dombrowski *et al.* gelang es 2011 intrazytoplasmatische DNA und erhöhte AIM2 Expressionslevel in Keratinozyten in Psoriasisläsionen nachzuweisen, welche in gesunder Haut nicht detektiert werden konnten. Darüber hinaus zeigten sie in kultivierten Keratinozyten, dass IFN- γ die AIM2 Expression induziert und zytosolische DNA die Freisetzung von IL-1 β über das AIM2 Inflammasom triggert. Somit konnte zytosolische DNA als ein entscheidendes Krankheits-assoziiertes molekulares Muster (PAMP, pathogen associated molecular pattern, siehe 1.1.2) bei der Psoriasis identifiziert werden, das die AIM2 Inflammasomformation und IL-1 β Aktivierung via Caspase-1 induziert. Dabei findet sich intrazytoplasmatische DNA physiologischerweise ausschließlich im Nukleus und in den Mitochondrien, nicht jedoch im Zytosol.

Dombrowski *et al.* gelang es jedoch zytosolische DNA Fragmente in Keratinozyten aus Psoriasisläsionen nachzuweisen. Dieser Nachweis gelang nicht in gesunder Haut und ebenso wenig in Haut bei atopischer Dermatitis und die Herkunft der zytosolischen DNA in Keratinozyten aus Psoriasisläsionen bleibt bisweilen unklar. Eine Möglichkeit könnte sein, dass DNA in erkrankter Haut aus dem Nukleus ins Zytosol entweicht oder dass extrazelluläre DNA aus untergehenden Zellen der Umgebung in das Zytosol aufgenommen wird. Die genomische DNA wird daraufhin von AIM2 erkannt und das Inflammasom somit aktiviert. Über den gleichen Mechanismus triggert auch bakterielle DNA bei Infektion mit intrazellulären Bakterien die Formation des AIM2 Inflammasoms (Dombrowski *et al.* 2011).

Neben erhöhten AIM2 Expressionswerten detektierte die Arbeitsgruppe um Dombrowski auch erhöhte Expressionswerte von Pro-IL-1 β mRNA sowie erhöhte Level an aktiviertem, also gespaltenem, IL-1 β Protein in Psoriasisläsionen. Um die Faktoren dieser Höherregulation zu ermitteln, stimulierten Dombrowski *et al.* primäre Keratinozyten mit proinflammatorischen Zytokinen, die typischerweise in Psoriasisläsionen in erhöhten Konzentrationen vorliegen. Ihre Untersuchungen ergaben, dass IFN- γ die Expression von AIM2 in den Keratinozyten erhöht, wohingegen die Stimulation mit TNF- α alleine zu keiner AIM2 Expressionssteigerung führte. TNF- α induzierte jedoch die Pro-IL-1 β Genexpression in den Keratinozyten (Dombrowski *et al.* 2011).

Um herauszufinden, unter welchen Bedingungen zytosolische DNA die IL-1 β Sekretion über das AIM2 Inflammasom induziert, stimulierte die Arbeitsgruppe die Keratinozyten mit den proinflammatorischen Zytokinen TNF- α und IFN- γ sowie mittels Transfektion von poly(dA:dT). Dabei zeigte sich keine Steigerung des IL-1 β Release bei Stimulation mit TNF- α oder IFN- γ oder Transfektion allein und ebenso wenig bei Kombinationen aus TNF- α + IFN- γ , bzw. TNF- α + Transfektion oder IFN- γ + Transfektion. Dahingegen kam es zu einer Steigerung der IL-1 β Proteinsekretion um ein 4-Faches nach Priming der Keratinozyten mit TNF- α und IFN- γ in Kombination und anschließender Transfektion. Dieser IL-1 β Release konnte bei Knockdown von AIM2 mittels

siRNA (small interfering RNAs) komplett unterbunden werden, was die entscheidende Rolle des AIM2 Inflammasoms bei der Antwort der Keratinozyten auf zytosolische DNA deutlich macht. Dombrowski *et al.* konnten somit zeigen, dass es für eine AIM2 abhängige IL-1 β Aktivierung in Keratinozyten neben einer Transfektion zur Aktivierung der Caspase-1 eines Primings mittels IFN- γ bedarf, welches die AIM2 Expression erhöht, sowie eines Primings mit TNF- α , welches die Pro-IL-1 β Expression erhöht (Dombrowski *et al.* 2011).

4.2.2 Untersuchung der Kolonzelllinien auf Induzierbarkeit des AIM2 Inflammasoms

Um die Frage näher zu untersuchen, inwiefern das AIM2 Inflammasom auch in Kolonzellen induziert werden kann, bzw. auf welche Art und Weise Kolonadenom- bzw. Kolonkarzinomzelllinien auf unterschiedliche Zytokinstimulationen und/oder Transfektion reagieren, wurden im Rahmen dieser Arbeit die AIM2 und Pro-IL-1 β Expression mithilfe der RT-qPCR, sowie die Sekretion des aktiven, also gespaltenen, IL-1 β im ELISA ermittelt. Außerdem wurde AIM2 und reifes IL-1 β im Western Blot bestimmt. Als Methodenkontrollen dienten die NHEK und THP-1 Zelllinie.

Interessanterweise zeigte sich bei den durchgeführten Untersuchungen in der RT-qPCR sowohl bei den Kolonzellen (3.1.4.4, Abb. 17) als auch bei der NHEK (3.1.1: Abb. 6) und THP-1 Zelllinie (3.1.6, Abb. 19) nach gemeinsamer Stimulation mit IFN- γ und TNF- α eine teilweise höhere relative AIM2 Genexpression als nach Stimulation durch IFN- γ alleine (im Detail: HT-29, CX-1: nach 24 h und 48 h; T84: nach 48 h; NHEK: nach 24 h, THP-1: nach 6 h und 48 h). AIM2 (1.1.3.2) gehört zu den Interferon-induzierbaren Genen, jedoch lassen die Ergebnisse vermuten, dass TNF- α im Zusammenspiel mit IFN- γ dessen AIM2-induzierende Wirkung noch weiter verstärken kann. Eine Konsistenz dieser Ergebnisse, sowie möglicherweise zugrunde liegende Mechanismen könnten in weiteren Studien untersucht werden, da bezüglich eines möglichen Zusammenhangs zum aktuellen Zeitpunkt noch keine Literatur gefunden werden konnte. Auch in den Untersuchungen von Dombrowski *et al.*

wurden keine Messung der AIM2 Genexpression nach Stimulation mit IFN- γ und TNF- α in Kombination durchgeführt, weshalb auch hier eine entsprechende Vergleichsmöglichkeit fehlt.

Ebenfalls stellt sich die Frage, warum die AIM2 Genexpression in NHEKs und Kolonzellen nach Zytokinstimulation und anschließender Transfektion geringer ausfällt als ohne Transfektion (Vergleiche: 3.1.1, Abb. 5: NHEKs nach Transfektion; 3.1.1, Abb. 6: NHEKs ohne Transfektion; 3.1.4.3, Abb. 15: HT-29 nach Transfektion; 3.1.4.4, Abb. 17: HT-29 ohne Transfektion). Eine Erklärung könnte sein, dass die Zellen durch die 24 Stunden länger andauernde Zytokinexposition während der Transfektion stärkeren Schaden genommen haben als nach Stimulation durch IFN- γ und TNF- α über 6, 24 oder 48 h allein. Denkbar ist aber auch, dass der Vorgang der Transfektion an sich zu einer Schädigung der Zellen geführt hat. Tatsächlich zeigten die Zellen auch morphologisch bei der mikroskopischen Begutachtung Zeichen der Zellschädigung je höher die Zytokinkonzentration bzw. je länger die Stimulation war, sowie nach durchgeführter Transfektion. Diese Zellschädigung könnte ab einem gewissen Grad zum Abbau bereits gebildeter AIM2 mRNA geführt haben und somit ein Grund für die geringere Expression nach Transfektion sein.

Wie in 1.1.3.1 beschrieben, soll TNF- α die IL-1 β Transkription über die Aktivierung von NF- κ B stimulieren (Mills and Dunne 2009, Dombrowski *et al.* 2011). Interessanterweise konnte jedoch bei der Keratinozytenzelllinie NHEK keine erhöhte IL-1 β Genexpression nach TNF- α Stimulation in der RT-qPCR gemessen werden. Auch nach Stimulation durch IFN- γ allein oder in Kombination mit TNF- α konnte keine IL-1 β mRNA Expressionserhöhung detektiert werden (3.1.1: Abb. 5, Abb. 6). Der IL-1 β Nachweis auf Proteinebene nach Priming und Transfektion gelang jedoch, womit eine AIM2 Inflammasomaktivierung entsprechend bewiesen werden konnte (3.1.1: Abb. 7).

Weshalb die Expressionssteigerung auf mRNA-Ebene bei der NHEK Zelllinie ausbleibt, bzw. in der RT-qPCR nicht detektiert werden kann, bleibt

Gegenstand weiterer Untersuchungen und konnte auch im Rahmen intensiver Literaturrecherche nicht näher erklärt werden.

Vielleicht muss für eine signifikante IL-1 β Genexpressionserhöhung auch eine längere Stimulation mit IFN- γ und TNF- α durchgeführt werden. Im Falle der NHEKs wurde im Rahmen dieser Arbeit eine Vorstimulation über 24 h vorgenommen. Weitere Versuche mit Variationen der Inkubationszeit wären diesbezüglich vonnöten, um ggf. näheren Aufschluss über diese Fragestellung zu geben.

Ebenso könnte das Verhalten der NHEKs nach alleiniger TNF- α Stimulation in der RT-qPCR in Folgestudien genauer untersucht werden, um der Frage weiter nachzugehen, in welchem Maße die IL-1 β Genexpression bei unterschiedlichen Stimulationszeiten in den Zellen höherreguliert wird.

Im Gegensatz zu den Ergebnissen bei den NHEKs konnte bei der Monozytischen Leukämiezelllinie THP-1 neben einer IL-1 β Sekretionssteigerung auf Proteinebene ebenso eine deutliche Steigerung der IL-1 β Expression auf Genebene nachgewiesen werden. Erstere wurde im Rahmen dieser Arbeit an transfizierten THP-1 Zellen untersucht (3.1.2, Abb. 9), letztere an nicht-transfizierten THP-1 Zellen (3.1.6, Abb. 19).

Dabei erfolgte eine IL-1 β Genexpressionssteigerung in den THP-1 Zellen besonders deutlich nach gemeinsamer Stimulation durch IFN- γ und TNF- α . Die Expressionserhöhung war am höchsten nach 24-stündiger Stimulation (50-fach nach 6 h, 40-fach nach 24 h, 230-fach nach 48 h) (3.1.6: Abb. 19), was die Theorie unterstützt, dass im Falle der an den NHEKs vorgenommenen Zytokinstimulationen mit einer Erhöhung der Stimulationszeiten ggf. ebenso eine Steigerung der IL-1 β Genexpression hätte gemessen werden können.

Auch auf Proteinebene fand sich im Falle der transfizierten THP-1 Zellen mit über 120 pg/ml die mit Abstand höchste IL-1 β Proteinsekretion in denjenigen Zellen, welche sowohl mit IFN- γ als auch mit TNF- α vorstimuliert wurden (3.1.2: Abb. 9). Die Vorstimulation mit IFN- γ allein führt nur zu einem Zehntel (200

U/ml) bzw. einem Drittel (2000 U/ml) dieser Sekretion, die Vorstimulation mit TNF- α zu einem Drittel (1000 U/ml) bzw. der Hälfte (2000 U/ml). Diese Ergebnisse decken sich folglich mit der Theorie, dass es für eine wirksame AIM2 Inflammasomaktivierung nach Transfektion zuvor einer Induktion der AIM2 Genexpression über IFN- γ (DeYoung *et al.* 1997, Dombrowski *et al.* 2011) sowie einer Induktion der Pro-IL-1 β Genexpression durch beispielsweise TNF- α bedarf (Mills and Dunne 2009). Durch die in der Transfektion eingeschleuste dsDNA wird Caspase-1 aktiviert und es kommt, wie unter 1.1.3.1 beschrieben, zur Spaltung von Pro-IL-1 β in das aktive IL-1 β und zu dessen Sekretion.

4.3 NLRP3 Inflammasom

In keiner der untersuchten Kolonzelllinien (GEKI-2, HT-29, T84, Caco-2 und LOVO) konnte eine Induzierbarkeit des NLRP3 Inflammasoms nachgewiesen werden. Die Kolonzelllinien zeigten keinerlei IL-1 β Sekretionssteigerung nach Stimulation mit ATP, MSU, SDS und Cholesterolkristallen im ELISA. Dies legt die Vermutung nahe, dass die verwendeten Kolonzelllinien nicht zur NLRP3 Inflammasombildung in der Lage sind, jedoch könnten sich auch hier Studien, die die Wirkung anderer NLRP3 Aktivatorssubstanzen, wie beispielsweise Nigericin, Hemozoin oder Aluminiumkristalle, untersuchen, anschließen.

Die Aktivierung des NLRP3 Inflammasoms umfasst hoch komplexe Mechanismen, weshalb die Ergebnisse am ehesten vermuten lassen, dass die verwendeten Kolonzelllinien einen zu hohen Grad der Entdifferenzierung aufweisen, welcher sie nicht mehr dazu befähigt, auf entsprechende Stimuli mit einer konsekutiven IL-1 β Produktion und Sekretion zu reagieren. Vermutlich geht eine *in vivo* ablaufende Stimulation sehr wohl mit einer NLRP3 Inflammasomformation und einer daraufhin stattfindenden Caspase-1 Aktivierung und Pro-IL-1 β Spaltung einher. Die Expression des P2X₇ Rezeptors und des NLRP3 Inflammasoms konnte nämlich neben Makrophagen und anderen Immunzellen ebenso in Epithelzellen des Darmes nachgewiesen werden (Zaki *et al.* 2010a). Interessant wäre es also in diesem Zusammenhang die durchgeführten Stimulationen nicht an Zelllinien, wie im vorliegenden Fall,

sondern an Kolonepithelzellen aus Biopsien oder Operationsresektaten im Sinne einer Primärkultur zu untersuchen.

5 Zusammenfassung

Inflammasome sind große intrazelluläre Multiproteinkomplexe und stellen einen wichtigen Bestandteil des angeborenen Immunsystems dar. Sie werden durch eine Vielzahl mikrobieller Moleküle, Gefahrensignale und kristalliner Substanzen aktiviert und führen zur Produktion von reifem IL-1 β . In dieser Arbeit wurde der Fokus auf zwei Vertreter dieser Inflammasome gelegt, dem AIM2 und NLRP3 Inflammasom. Ersteres wird über intrazytoplasmatische DNA aktiviert und Defekte in seiner Regulation sind beispielsweise pathogenetisch relevant bei der chronischen Entzündung im Rahmen einer Psoriasis (Dombrowski *et al.* 2011) oder bei der Entstehung von Kolonkarzinomen mit Mikrosatelliteninstabilität (Woerner *et al.* 2007). Das NLRP3 Inflammasom kann durch unterschiedlichste Substanzen, wie z.B. Cholesterolkristalle, ATP, SDS oder Uratkristalle aktiviert werden. Pathogenetisch von Bedeutung ist eine Fehlregulation u.a. bei der Entstehung von CEDs.

Ziel dieser Arbeit war es, Kolonadenom und -karzinomzelllinien auf die Induzierbarkeit des AIM2 und NLRP3 Inflammasoms zu untersuchen. Zu diesem Zweck wurden die Zelllinien entsprechend der Inflammasom-typischen Signalwege stimuliert, bzw. mit dsDNA transfiziert, und anschließend mittels RT-qPCR, ELISA und Western Blot die AIM2- und/oder IL-1 β Genexpression, sowie die IL-1 β Proteinsekretion bestimmt.

In den untersuchten Darmzelllinien konnte unter den gewählten Versuchsmodalitäten weder eine funktionelle AIM2, noch eine funktionelle NLRP3 Inflammasomaktivierung nachgewiesen werden. Ein möglicher Grund hierfür könnte das Fehlen von für die Signalkaskade wichtigen Proteinen in den Kolonzelllinien sein. Dieses könnte erklärt werden durch die Überlegung, dass sich die verwendeten Kolonadenom- und -karzinomzelllinien im Vergleich zu normalen Kolonzellen in einem zu stark entdifferenzierten Zustand befanden und somit zur Inflammasomaktivierung nicht mehr in der Lage waren. Vielleicht bedarf es auch anderer Zytokinstimulations- bzw. Transfektionszeiten, um eine IL-1 β Sekretion in den Kolonzelllinien zu induzieren.

6 Literaturverzeichnis

- Akira, S., Uematsu, S., Takeuchi, O., 2006. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 124 (4), 783-801.
- Barber, G.N., 2011. Innate immune DNA sensing pathways: Sting, aim2 and the regulation of interferon production and inflammatory responses. *Curr Opin Immunol* 23 (1), 10-20.
- Bauer, C., Duesell, P., Mayer, C., Lehr, H.A., Fitzgerald, K.A., Dauer, M., Tschopp, J., Endres, S., Latz, E., Schnurr, M., 2010. Colitis induced in mice with dextran sulfate sodium (dss) is mediated by the nlrp3 inflammasome. *Gut* 59 (9), 1192-9.
- Bauernfeind, F.G., Horvath, G., Stutz, A., Alnemri, E.S., Macdonald, K., Speert, D., Fernandes-Alnemri, T., Wu, J., Monks, B.G., Fitzgerald, K.A., Hornung, V., Latz, E., 2009. Cutting edge: Nf-kappaB activating pattern recognition and cytokine receptors license nlrp3 inflammasome activation by regulating nlrp3 expression. *J Immunol* 183 (2), 787-91.
- Baumgart, D.C., Carding, S.R., 2007. Inflammatory bowel disease: Cause and immunobiology. *Lancet* 369 (9573), 1627-40.
- Beutler, B.A., 2009. TLRs and innate immunity. *Blood* 113 (7), 1399-407.
- Boraschi, D., Dinarello, C.A., 2006. IL-18 in autoimmunity: Review. *Eur Cytokine Netw* 17 (4), 224-52.
- Burckstummer, T., Baumann, C., Bluml, S., Dixit, E., Durnberger, G., Jahn, H., Planyavsky, M., Bilban, M., Colinge, J., Bennett, K.L., Superti-Furga, G., 2009. An orthogonal proteomic-genomic screen identifies aim2 as a cytoplasmic DNA sensor for the inflammasome. *Nat Immunol* 10 (3), 266-72.
- Chang, M.S., Chen, B.C., Yu, M.T., Sheu, J.R., Chen, T.F., Lin, C.H., 2005. Phorbol 12-myristate 13-acetate upregulates cyclooxygenase-2 expression in human pulmonary epithelial cells via ras, raf-1, erk, and nf-kappaB, but not p38 mapk, pathways. *Cell Signal* 17 (3), 299-310.
- Chen, G.Y., Liu, M., Wang, F., Bertin, J., Nunez, G., 2011. A functional role for nlrp6 in intestinal inflammation and tumorigenesis. *J Immunol* 186 (12), 7187-94.
- Chen, G.Y., Nunez, G., 2011. Inflammasomes in intestinal inflammation and cancer. *Gastroenterology* 141 (6), 1986-99.
- De Campos, N.E., Marques-Da-Silva, C., Correa, G., Castelo-Branco, M.T., De Souza, H.S., Coutinho-Silva, R., 2012. Characterizing the presence and sensitivity of the p2x7 receptor in different compartments of the gut. *J Innate Immun* 4 (5-6), 529-41.
- De Koning, H.D., Bergboer, J.G., Van Den Bogaard, E.H., Van Vlijmen-Willems, I.M., Rodijk-Olthuis, D., Simon, A., Zeeuwen, P.L., Schalkwijk, J., 2012. Strong induction of aim2 expression in human epidermis in acute and chronic inflammatory skin conditions. *Exp Dermatol* 21 (12), 961-4.
- Deyoung, K.L., Ray, M.E., Su, Y.A., Anzick, S.L., Johnstone, R.W., Trapani, J.A., Meltzer, P.S., Trent, J.M., 1997. Cloning a novel member of the

- human interferon-inducible gene family associated with control of tumorigenicity in a model of human melanoma. *Oncogene* 15 (4), 453-7.
- Dieleman, L.A., Ridwan, B.U., Tennyson, G.S., Beagley, K.W., Bucy, R.P., Elson, C.O., 1994. Dextran sulfate sodium-induced colitis occurs in severe combined immunodeficient mice. *Gastroenterology* 107 (6), 1643-52.
- Dinarello, C.A., Cannon, J.G., Wolff, S.M., Bernheim, H.A., Beutler, B., Cerami, A., Figari, I.S., Palladino, M.A., Jr., O'connor, J.V., 1986. Tumor necrosis factor (cachectin) is an endogenous pyrogen and induces production of interleukin 1. *J Exp Med* 163 (6), 1433-50.
- Dombrowski, Y., Peric, M., Koglin, S., Kammerbauer, C., Goss, C., Anz, D., Simanski, M., Glaser, R., Harder, J., Hornung, V., Gallo, R.L., Ruzicka, T., Besch, R., Schaubert, J., 2011. Cytosolic DNA triggers inflammasome activation in keratinocytes in psoriatic lesions. *Sci Transl Med* 3 (82), 82ra38.
- Dostert, C., Petrilli, V., Van Bruggen, R., Steele, C., Mossman, B.T., Tschopp, J., 2008. Innate immune activation through nalp3 inflammasome sensing of asbestos and silica. *Science* 320 (5876), 674-7.
- Duewell, P., Kono, H., Rayner, K.J., Sirois, C.M., Vladimer, G., Bauernfeind, F.G., Abela, G.S., Franchi, L., Nunez, G., Schnurr, M., Espevik, T., Lien, E., Fitzgerald, K.A., Rock, K.L., Moore, K.J., Wright, S.D., Hornung, V., Latz, E., 2010. Nlrp3 inflammasomes are required for atherogenesis and activated by cholesterol crystals. *Nature* 464 (7293), 1357-61.
- Dupaul-Chicoine, J., Yeretssian, G., Doiron, K., Bergstrom, K.S., Mcintire, C.R., Leblanc, P.M., Meunier, C., Turbide, C., Gros, P., Beauchemin, N., Vallance, B.A., Saleh, M., 2010. Control of intestinal homeostasis, colitis, and colitis-associated colorectal cancer by the inflammatory caspases. *Immunity* 32 (3), 367-78.
- Eitel, J., Suttorp, N., Opitz, B., 2010. Innate immune recognition and inflammasome activation in listeria monocytogenes infection. *Front Microbiol* 1, 149.
- Fernandes-Alnemri, T., Yu, J.W., Datta, P., Wu, J., Alnemri, E.S., 2009. Aim2 activates the inflammasome and cell death in response to cytoplasmic DNA. *Nature* 458 (7237), 509-13.
- Franchi, L., Eigenbrod, T., Nunez, G., 2009. Cutting edge: Tnf-alpha mediates sensitization to atp and silica via the nlrp3 inflammasome in the absence of microbial stimulation. *J Immunol* 183 (2), 792-6.
- Franchi, L., Kamada, N., Nakamura, Y., Burberry, A., Kuffa, P., Suzuki, S., Shaw, M.H., Kim, Y.G., Nunez, G., 2012. Nlrc4-driven production of il-1beta discriminates between pathogenic and commensal bacteria and promotes host intestinal defense. *Nat Immunol* 13 (5), 449-56.
- Gangisetty, O., Reddy, D.S., 2009. The optimization of taqman real-time rt-pcr assay for transcriptional profiling of gaba-a receptor subunit plasticity. *J Neurosci Methods* 181 (1), 58-66.
- Ghayur, T., Banerjee, S., Hugunin, M., Butler, D., Herzog, L., Carter, A., Quintal, L., Sekut, L., Talanian, R., Paskind, M., Wong, W., Kamen, R., Tracey, D., Allen, H., 1997. Caspase-1 processes ifn-gamma-inducing

- factor and regulates lps-induced ifn-gamma production. *Nature* 386 (6625), 619-23.
- Gu, Y., Kuida, K., Tsutsui, H., Ku, G., Hsiao, K., Fleming, M.A., Hayashi, N., Higashino, K., Okamura, H., Nakanishi, K., Kurimoto, M., Tanimoto, T., Flavell, R.A., Sato, V., Harding, M.W., Livingston, D.J., Su, M.S., 1997. Activation of interferon-gamma inducing factor mediated by interleukin-1beta converting enzyme. *Science* 275 (5297), 206-9.
- Herold, G., 2011. *Innere medizin*.
- Hirota, S.A., Ng, J., Lueng, A., Khajah, M., Parhar, K., Li, Y., Lam, V., Potentier, M.S., Ng, K., Bawa, M., Mccafferty, D.M., Rioux, K.P., Ghosh, S., Xavier, R.J., Colgan, S.P., Tschopp, J., Muruve, D., Macdonald, J.A., Beck, P.L., 2011. Nlrp3 inflammasome plays a key role in the regulation of intestinal homeostasis. *Inflamm Bowel Dis* 17 (6), 1359-72.
- Hornung, V., Ablasser, A., Charrel-Dennis, M., Bauernfeind, F., Horvath, G., Caffrey, D.R., Latz, E., Fitzgerald, K.A., 2009. Aim2 recognizes cytosolic dsdna and forms a caspase-1-activating inflammasome with asc. *Nature* 458 (7237), 514-8.
- Hornung, V., Bauernfeind, F., Halle, A., Samstad, E.O., Kono, H., Rock, K.L., Fitzgerald, K.A., Latz, E., 2008. Silica crystals and aluminum salts activate the nalp3 inflammasome through phagosomal destabilization. *Nat Immunol* 9 (8), 847-56.
- Hornung, V., Latz, E., 2010. Critical functions of priming and lysosomal damage for nlrp3 activation. *Eur J Immunol* 40 (3), 620-3.
- Hugot, J.P., Chamaillard, M., Zouali, H., Lesage, S., Cezard, J.P., Belaiche, J., Almer, S., Tysk, C., O'morain, C.A., Gassull, M., Binder, V., Finkel, Y., Cortot, A., Modigliani, R., Laurent-Puig, P., Gower-Rousseau, C., Macry, J., Colombel, J.F., Sahbatou, M., Thomas, G., 2001. Association of nod2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to crohn's disease. *Nature* 411 (6837), 599-603.
- Invivogen, 2012. *Tlr's & innate immunity*.
- Jin, T., Perry, A., Jiang, J., Smith, P., Curry, J.A., Unterholzner, L., Jiang, Z., Horvath, G., Rathinam, V.A., Johnstone, R.W., Hornung, V., Latz, E., Bowie, A.G., Fitzgerald, K.A., Xiao, T.S., 2012. Structures of the hin domain:DNA complexes reveal ligand binding and activation mechanisms of the aim2 inflammasome and ifi16 receptor. *Immunity* 36 (4), 561-71.
- Kanneganti, T.D., Ozoren, N., Body-Malapel, M., Amer, A., Park, J.H., Franchi, L., Whitfield, J., Barchet, W., Colonna, M., Vandenabeele, P., Bertin, J., Coyle, A., Grant, E.P., Akira, S., Nunez, G., 2006. Bacterial rna and small antiviral compounds activate caspase-1 through cryopyrin/nalp3. *Nature* 440 (7081), 233-6.
- Kawai, T., Akira, S., 2009. The roles of tlrs, rlrs and nlrs in pathogen recognition. *Int Immunol* 21 (4), 317-37.
- Kawai, T., Akira, S., 2011. Toll-like receptors and their crosstalk with other innate receptors in infection and immunity. *Immunity* 34 (5), 637-50.
- Knippers, R., *Molekulare genetika* Georg Thieme Verlag.
- Kobe, B., Kajava, A.V., 2001. The leucine-rich repeat as a protein recognition motif. *Curr Opin Struct Biol* 11 (6), 725-32.

- Kofoed, E.M., Vance, R.E., 2012. Naips: Building an innate immune barrier against bacterial pathogens. Naips function as sensors that initiate innate immunity by detection of bacterial proteins in the host cell cytosol. *Bioessays* 34 (7), 589-98.
- Kopfnagel, V., Wittmann, M., Werfel, T., 2011. Human keratinocytes express aim2 and respond to dsdna with il-1beta secretion. *Exp Dermatol* 20 (12), 1027-9.
- Lebel-Binay, S., Berger, A., Zinzindohoue, F., Cugnenc, P., Thiounn, N., Fridman, W.H., Pages, F., 2000. Interleukin-18: Biological properties and clinical implications. *Eur Cytokine Netw* 11 (1), 15-26.
- Lewis, G.J., Massey, D.C., Zhang, H., Bredin, F., Tremelling, M., Lee, J.C., Berzuini, C., Parkes, M., 2011. Genetic association between nlrp3 variants and crohn's disease does not replicate in a large uk panel. *Inflamm Bowel Dis* 17 (6), 1387-91.
- Livak, K.J., Flood, S.J., Marmaro, J., Giusti, W., Deetz, K., 1995. Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting pcr product and nucleic acid hybridization. *PCR Methods Appl* 4 (6), 357-62.
- Lüllmann-Rauch, R., 2012. *Histologie Georg Thieme Verlag*.
- Mariathasan, S., Weiss, D.S., Newton, K., McBride, J., O'Rourke, K., Roose-Girma, M., Lee, W.P., Weinrauch, Y., Monack, D.M., Dixit, V.M., 2006. Cryopyrin activates the inflammasome in response to toxins and atp. *Nature* 440 (7081), 228-32.
- Martinon, F., Petrilli, V., Mayor, A., Tardivel, A., Tschopp, J., 2006. Gout-associated uric acid crystals activate the nalp3 inflammasome. *Nature* 440 (7081), 237-41.
- Mills, K.H., Dunne, A., 2009. Immune modulation: Il-1, master mediator or initiator of inflammation. *Nat Med* 15 (12), 1363-4.
- Monteleone, G., Trapasso, F., Parrello, T., Biancone, L., Stella, A., Iuliano, R., Lizza, F., Fusco, A., Pallone, F., 1999. Bioactive il-18 expression is up-regulated in crohn's disease. *J Immunol* 163 (1), 143-7.
- Muller, A.J., Hoffmann, C., Hardt, W.D., 2010. Caspase-1 activation via rho gtpases: A common theme in mucosal infections? *PLoS Pathog* 6 (2), e1000795.
- Normand, S., Delanoye-Crespin, A., Bressenot, A., Huot, L., Grandjean, T., Peyrin-Biroulet, L., Lemoine, Y., Hot, D., Chamailard, M., 2011. Nod-like receptor pyrin domain-containing protein 6 (nlrp6) controls epithelial self-renewal and colorectal carcinogenesis upon injury. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108 (23), 9601-6.
- North, R.A., 2002. Molecular physiology of p2x receptors. *Physiol Rev* 82 (4), 1013-67.
- Ogura, Y., Bonen, D.K., Inohara, N., Nicolae, D.L., Chen, F.F., Ramos, R., Britton, H., Moran, T., Karaliuskas, R., Duerr, R.H., Achkar, J.P., Brant, S.R., Bayless, T.M., Kirschner, B.S., Hanauer, S.B., Nunez, G., Cho, J.H., 2001. A frameshift mutation in nod2 associated with susceptibility to crohn's disease. *Nature* 411 (6837), 603-6.

- Patsos, G., Germann, A., Gebert, J., Dihlmann, S., 2010. Restoration of absent in melanoma 2 (aim2) induces g2/m cell cycle arrest and promotes invasion of colorectal cancer cells. *Int J Cancer* 126 (8), 1838-49.
- Pelegriin, P., Surprenant, A., 2006. Pannexin-1 mediates large pore formation and interleukin-1beta release by the atp-gated p2x7 receptor. *EMBO J* 25 (21), 5071-82.
- Pelegriin, P., Surprenant, A., 2007. Pannexin-1 couples to maitotoxin- and nigericin-induced interleukin-1beta release through a dye uptake-independent pathway. *J Biol Chem* 282 (4), 2386-94.
- Perregaux, D., Gabel, C.A., 1994. Interleukin-1 beta maturation and release in response to atp and nigericin. Evidence that potassium depletion mediated by these agents is a necessary and common feature of their activity. *J Biol Chem* 269 (21), 15195-203.
- Podolsky, D.K., 2002. Inflammatory bowel disease. *N Engl J Med* 347 (6), 417-29.
- Posch, C., Kaulfersch, W., Rappersberger, K., 2012. Cryopyrin-associated periodic syndrome. *Pediatr Dermatol*.
- Rajamaki, K., Lappalainen, J., Oorni, K., Valimaki, E., Matikainen, S., Kovanen, P.T., Eklund, K.K., 2010. Cholesterol crystals activate the nlrp3 inflammasome in human macrophages: A novel link between cholesterol metabolism and inflammation. *PLoS One* 5 (7), e11765.
- Rakoff-Nahoum, S., Paglino, J., Eslami-Varzaneh, F., Edberg, S., Medzhitov, R., 2004. Recognition of commensal microflora by toll-like receptors is required for intestinal homeostasis. *Cell* 118 (2), 229-41.
- Robinson, D., Shibuya, K., Mui, A., Zonin, F., Murphy, E., Sana, T., Hartley, S.B., Menon, S., Kastelein, R., Bazan, F., O'garra, A., 1997. Igif does not drive th1 development but synergizes with il-12 for interferon-gamma production and activates irak and nfkappab. *Immunity* 7 (4), 571-81.
- Schoultz, I., Verma, D., Halfvarsson, J., Torkvist, L., Fredrikson, M., Sjoqvist, U., Lordal, M., Tysk, C., Lerm, M., Soderkvist, P., Soderholm, J.D., 2009. Combined polymorphisms in genes encoding the inflammasome components nalp3 and card8 confer susceptibility to crohn's disease in swedish men. *Am J Gastroenterol* 104 (5), 1180-8.
- Schroder, K., Tschopp, J., 2010. The inflammasomes. *Cell* 140 (6), 821-32.
- Shaw, P.J., Lamkanfi, M., Kanneganti, T.-D., 2010. Nod-like receptor (nlr) signaling beyond the inflammasome. *European Journal of Immunology* 40 (3), 624-627.
- Siegmund, B., 2010. Interleukin-18 in intestinal inflammation: Friend and foe? *Immunity* 32 (3), 300-2.
- Song, G.G., Choi, S.J., Ji, J.D., Lee, Y.H., 2012. Association between interleukin-18 polymorphisms and systemic lupus erythematosus: A meta-analysis. *Mol Biol Rep*.
- Steimle, V., Otten, L.A., Zufferey, M., Mach, B., 2007. Complementation cloning of an mhc class ii transactivator mutated in hereditary mhc class ii deficiency (or bare lymphocyte syndrome). 1993. *J Immunol* 178 (11), 6677-88.
- Stutz, A., Golenbock, D.T., Latz, E., 2009. Inflammasomes: Too big to miss. *J Clin Invest* 119 (12), 3502-11.

- Takaoka, A., Wang, Z., Choi, M.K., Yanai, H., Negishi, H., Ban, T., Lu, Y., Miyagishi, M., Kodama, T., Honda, K., Ohba, Y., Taniguchi, T., 2007. Dai (dIm-1/zbp1) is a cytosolic DNA sensor and an activator of innate immune response. *Nature* 448 (7152), 501-5.
- Ting, J.P., Kastner, D.L., Hoffman, H.M., 2006. Caterpillars, pyrin and hereditary immunological disorders. *Nat Rev Immunol* 6 (3), 183-95.
- Villani, A.C., Lemire, M., Fortin, G., Louis, E., Silverberg, M.S., Collette, C., Baba, N., Libioulle, C., Belaiche, J., Bitton, A., Gaudet, D., Cohen, A., Langelier, D., Fortin, P.R., Wither, J.E., Sarfati, M., Rutgeerts, P., Rioux, J.D., Vermeire, S., Hudson, T.J., Franchimont, D., 2009. Common variants in the nlrp3 region contribute to crohn's disease susceptibility. *Nat Genet* 41 (1), 71-6.
- Von Moltke, J., Trinidad, N.J., Moayeri, M., Kintzer, A.F., Wang, S.B., Van Rooijen, N., Brown, C.R., Krantz, B.A., Leppla, S.H., Gronert, K., Vance, R.E., 2012. Rapid induction of inflammatory lipid mediators by the inflammasome in vivo. *Nature* 490 (7418), 107-11.
- Watanabe, H., Gehrke, S., Contassot, E., Roques, S., Tschopp, J., Friedmann, P.S., French, L.E., Gaide, O., 2008. Danger signaling through the inflammasome acts as a master switch between tolerance and sensitization. *J Immunol* 180 (9), 5826-32.
- Woerner, S.M., Kloor, M., Schwitalle, Y., Youmans, H., Doeberitz, M.K., Gebert, J., Dihlmann, S., 2007. The putative tumor suppressor aim2 is frequently affected by different genetic alterations in microsatellite unstable colon cancers. *Genes Chromosomes Cancer* 46 (12), 1080-9.
- Yang, P., An, H., Liu, X., Wen, M., Zheng, Y., Rui, Y., Cao, X., 2010. The cytosolic nucleic acid sensor Irrfip1 mediates the production of type i interferon via a beta-catenin-dependent pathway. *Nat Immunol* 11 (6), 487-94.
- Yoneyama, M., Fujita, T., 2007. Function of rig-i-like receptors in antiviral innate immunity. *J Biol Chem* 282 (21), 15315-8.
- Zaki, M.H., Boyd, K.L., Vogel, P., Kastan, M.B., Lamkanfi, M., Kanneganti, T.D., 2010a. The nlrp3 inflammasome protects against loss of epithelial integrity and mortality during experimental colitis. *Immunity* 32 (3), 379-91.
- Zaki, M.H., Vogel, P., Body-Malapel, M., Lamkanfi, M., Kanneganti, T.D., 2010b. Il-18 production downstream of the nlrp3 inflammasome confers protection against colorectal tumor formation. *J Immunol* 185 (8), 4912-20.

7 Anhang

7.1 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AIM2	Absent in melanoma 2
AK	Antikörper
APS	Ammoniumperoxodisulfat, Ammoniumpersulfat
ASC	apoptosis-associated speck-like protein
ATP	Adenosintriphosphat
BIR	baculoviral inhibitor of apoptosis repeat
CARD	caspase recruitment domain
CLR	C-type lectin Rezeptor
CDS	Cytosolic dsDNA Sensor
CU	Colitis ulcerosa
DAI	DNA-dependent activator of IFN-regulatory factors
dH ₂ O	destilliertes Wasser
ddH ₂ O	bidestilliertes Wasser
dsDNA	Doppelstrang-DNA
DSS	Dextran-Sodium-Sulfat
DAMP	damage-associated molecular patterns
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	deoxyribonucleic acid, Desoxyribonukleinsäure
DPBS	Dulbecco's PBS
d(T)	desoxy-Thymidin
FBS	Fetal Bovine Serum, Fötales Bovines Serum
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GIT	Gastrointestinaltrakt
h	Stunde
HIN	hematopoietic interferon-inducible nuclear protein
HNPCC	Hereditäres, nichtpolypöses Kolonkarzinom-Syndrom
ECL	Enhanced chemiluminescence
EDGS	EpiLife Defined Growth Supplement
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay

7 Anhang

et al.	„et alii“, und andere
FITC	Fluorescein Isothiocyanate
IFN	Interferon
LRR	leucine-rich repeats
LRRIFIP1	leucine-rich repeat flightless-interacting protein 1
M.	Morbus
MAP	mitogen-activated protein
MC	Morbus Chron
MEM	Minimum Essential Media
MSU	Monosodium Urate Crystals, Harnsäurekristalle
NaCl	Natriumchlorid, Kochsalz
NACHT	Nucleotid-bindende Domäne, die in NAIP, CIITA, HET-E und TP1 gefunden wurde
NaF	Natriumfluorid
NAIP	NLR family, apoptosis inhibitory protein
Na ₃ VO ₄	Natriumorthovanadat
NF-κB	Nuclear Factor κB
NTC	Non Template Control
NEAA	Non-Essential Amino Acids
NLR	NOD-like receptor
NLRA	NOD-like receptor containing transactivating domain
NLRB	NOD-like receptor containing baculoviral inhibitor of apoptosis repeat domain
NLRC	NOD-like receptor containing Caspase recruitment domain
NLRCX	NOD-like receptor X
NLRP = NALP	NOD-like receptor pyrin domain-containing = NACHT, LRR and PYD domains-containing protein
NOD	nucleotide oligomerization domain
OD	Optische Dichte
PAMP	pathogen-associated molecular pattern
PBS	Phosphate Buffered Saline, phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase Chain Reaction, Polymerase-Kettenreaktion
Pen-Strep	Penicillin-Streptomycin
PMA	Phorbol-12-Myristat-13-Acetat
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
Poly(dA:dT)	Poly(deoxyadenylic-thymidylic) acid sodium salt

7 Anhang

PRR	pattern recognition receptor
PVDF	Polyvinylidenfluorid
PYD	Pyrin domain
qPCR	Quantitative Real-Time-PCR
RIG-1	retinoid-acid inducible protein 1
RLR	RIG-1-like Rezeptor
rhEGF	Recombinant Human Epidermal Growth Factor
RNA	ribonucleic acid, Ribonukleinsäure
ROS	reactive oxygen species, reaktive Sauerstoffmetaboliten
rpm	“revolutions per minute”, Umdrehungen pro Minute
RT-PCR	Reverse Transkriptase-PCR
RT-qPCR	Reverse Transkriptase quantitative Real-Time-PCR
SD	Standardabweichung
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate, Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis
sog.	sogenannt/e/n
Tab.	Tabelle
TBS	Tris-buffered saline, Tris-gepufferte Salzlösung
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TGF	Transforming Growth Factor
TH1 / TH2-Zelle	T-Helferzelle Typ 1 / 2
TNF	Tumornekrosefaktor
TLR	Toll-like Rezeptor
Tris, Tris base	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
Tris-HCl	Tris(hydroxymethyl)-aminomethanhydrochlorid
U	Units
u.a.	unter anderem
V	Volt
v.a.	vor allem
Vol.	Volumina
z.B.	zum Beispiel

7.2 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	Aufbau der NLR Subfamilien, modifiziert nach InvivoGen	4
Abb. 2:	Schematische Darstellung des NLRP3 Inflammasom, modifiziert nach Eitel (Eitel <i>et al.</i> 2010).....	6
Abb. 3:	Inflammasome und ihre Signalkaskaden, modifiziert nach InvivoGen.....	8
Abb. 4:	Schematische Darstellung des AIM2 Inflammasoms, modifiziert nach Eitel (Eitel <i>et al.</i> 2010).....	11
Abb. 5:	RT-qPCR Analyse der AIM2 (links) und IL-1 β Genexpression (rechts) in NHEKs.	47
Abb. 6:	RT-qPCR Analyse der AIM2 (oben) und IL-1 β Genexpression (unten) in NHEKs.	48
Abb. 7:	ELISA: IL-1 β Sekretion in NHEKs nach Transfektion mit poly(dA:dT) mittels RNAiMAX.....	49
Abb. 8:	ELISA: IL-1 β Sekretion in NHEKs nach Stimulation mit IFN- γ und TNF- α	50
Abb. 9:	ELISA: IL-1 β Sekretion in THP-1 Zellen nach Transfektion mit poly(dA:dT) mittels RNAiMAX.	51
Abb. 10:	IL-1 β Western Blot aus den Überständen von THP-1 Zellen nach Transfektion von poly(dA:dT) mittels RNAiMAX.	52
Abb. 11:	RT-qPCR Analyse der AIM2 Genexpression in Kolonadenom- bzw. Kolonkarzinomzellen und einer Zelllinie eines Histiocytären Lymphoms....	53
Abb. 12:	RT-qPCR Analyse der IL1- β Genexpression in Kolonadenom- bzw. Kolonkarzinomzellen.....	54
Abb. 13:	AIM2 Western Blot aus dem Überstand der Kolonadenomzelllinie GEKI-2.	55
Abb. 14:	AIM2 Western Blot aus dem Überstand der Kolonadenomzelllinie GEKI-2.	56
Abb. 15:	RT-qPCR Analyse der AIM2 Genexpression in GEKI-2 und HT-29.	57
Abb. 16:	RT-qPCR Analyse der IL-1 β Genexpression in GEKI-2 und HT-29.	58
Abb. 17:	RT-qPCR Analyse der AIM2 (links) und IL-1 β Genexpression (rechts) in Kolonkarzinomzellen.....	60
Abb. 18:	ELISA: IL-1 β Expression in THP-1 Zellen nach Transfektion mittels poly(dA:dT)/Lyovect.	62

Abb. 19:	RT-qPCR Analyse der AIM2 (links) und IL-1 β Genexpression (rechts) in THP-1 Zellen.....	63
Abb. 20:	ELISA: IL-1 β Sekretion in THP-1 Zellen nach Stimulation mit Harnsäurekristallen (Monosodium Urate Crystals, MSU).	64
Abb. 21:	ELISA: IL-1 β Sekretion in THP-1 Zellen nach Stimulation mit Natriumdodecylsulfat (SDS).....	65

7.3 Tabellenverzeichnis

Tab. 1:	Geräte	19
Tab. 2:	Verbrauchsmaterialien	20
Tab. 3:	Chemikalien	21
Tab. 4:	Fertigsätze	24
Tab. 5:	Enzyme	24
Tab. 6:	Sonden und Primer für die qPCR	25
Tab. 7:	Zelllinien und Kulturmedien.....	25
Tab. 8:	Ansätze poly(dA:dT) Transfektion mittels RNAiMAX	27
Tab. 9:	Reaktionsansatz cDNA-Synthese	36
Tab. 10:	PCR-Parameter	36
Tab. 11:	Reaktionsansatz AIM2/GAPDH für qPCR	37
Tab. 12:	Reaktionsansatz IL-1 β /GAPDH für qPCR.....	37
Tab. 13:	qPCR Protokoll	38
Tab. 14:	Zusammensetzung Lysis Buffer.....	39
Tab. 15:	Konzentrationen für BSA Standardkurve	39
Tab. 16:	Zusammensetzungen von Running Buffer und Running Gel.....	40
Tab. 17:	Zusammensetzungen von Stacking Buffer und Stacking Gel.....	41
Tab. 18:	Zusammensetzung Reservoir Buffer	41
Tab. 19:	Zusammensetzung Sample Buffer.....	42
Tab. 20:	Molecular weight marker	42

Tab. 21:	Zusammensetzung Blotting Buffer	43
Tab. 22:	Zusammensetzung Dry Milk-blocking Buffer	43
Tab. 23:	Zusammensetzung TBS	43
Tab. 24:	Verwendete AIM2 Primärantikörper und Verdünnungen	44
Tab. 25:	Verwendete IL-1 β Primärantikörper und Verdünnungen	44
Tab. 26:	Verwendete Sekundärantikörper und Verdünnungen	45
Tab. 27:	Zelllinien und Stimulantien zum Versuch der Induktion des NLRP3 Inflammasoms.....	66

Danksagung

Mein Dank gilt all denjenigen, die zum Gelingen dieser Dissertation in verschiedenster Weise beigetragen haben. Besonders möchte ich mich bedanken bei

Herrn Priv.-Doz. Dr. med. Ralph Melcher, Leiter des Gastroenterologischen Labors des Universitätsklinikums Würzburg, für die Möglichkeit meine Promotionsarbeit in seinem Labor durchzuführen. Ich habe mich stets hervorragend betreut gefühlt.

Frau Dr. rer. nat. Dorothee Rogoll für die Bereitstellung des Themas und die freundliche Unterstützung über den gesamten Schaffensprozess hinweg.

Den Mitarbeiterinnen des Gastroenterologischen Labors, Frau Antje Volk, Frau Elisabeth Kelber, Frau Kerstin Backhaus und Frau Donata Dorbath für Ihre Unterstützung.

