

INSTITUT FÜR BIOCHEMIE UND MOLEKULARBIOLOGIE
ZENTRUM FÜR MOLEKULARE MEDIZIN
MEDIZINISCHE UNIVERSITÄT GRAZ

2-Chlorohexadecanal als potentieller Aktivator Toll-Like Rezeptor vermittelter Signalwege in Endothelzellen des Gehirns

Master thesis

zum Erhalt des Akademischen Titels,
Master of Science
an der Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Technischen Universität Graz

eingereicht von

Nora Kogelnik

Graz, September 2013

Deklaration

Titel: 2-Chlorohexadecanal als potentieller Aktivator Toll-Like Rezeptor mediierter Signalwege in Endothelzellen des Gehirns
Autor: Nora Kogelnik
Award Master of Science (MSc)
Supervisor: A.o. Univ. Prof. Dr. Wolfgang Sattler

EIDESSTÄTLICHE ERKLÄRUNG

Ich erkläre an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst, andere als die angegebenen Quellen/Hilfsmittel nicht benutzt, und die den benutzten Quellen wörtlich und inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Graz, am

.....
(Unterschrift)

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen	6
Zusammenfassung	8
Abstract	10
1. Einleitung	11
1.1 Die Blut – Hirnschranke.....	11
1.1.1 Anatomie der Blut-Hirnschranke	13
1.1.2 Transportprozesse an der BHS.....	14
1.1.3 Störungen der BHS	16
1.2 Plasmalogene.....	18
1.2.1 Myeloperoxidase und 2-Chlorohexadecanal.....	19
1.3 Toll – Like Rezeptoren.....	22
1.3.1 Der Toll-like Rezeptor Signalweg.....	24
1.4 Das Inflammasom – ein Multiproteinkomplex.....	26
1.4.1 NOD Like Rezeptoren	26
1.4.2 Aktivierung und Regulation des Inflammasoms	28
1.4.3 Inflammasomklassen und seine Komponenten.....	30
1.4.4 Interleukin 1 β und IL-18	31
1.4.5 Die Pyroptose.....	32
2 Zielsetzung und Hypothese	33
3. Material und Methoden	34
3.1 Synthese von 2-Chlorohexadecanal.....	36

3.1.1 Enantioselektive Chlorierung.....	36
3.1.2 GC-MS Analytik von 2-Chlorohexadecanal	38
3.2 Zelllinien und Zellkultur.....	39
3.2.1 Isolierung primärer Schweinegehirnendothelzellen.....	40
3.2.2 Bestimmung der Zellzahl.....	41
3.3 Etablierung des HEK BLUE TLR4 und TLR2 Reportersystems	42
3.3.1 Aktivierung der HEK BLUE TLR4 und TLR2 Zellen mit 2-CIHDA.....	43
3.4. Analyse der Bildung von ROS in Gegenwart von 2-CIHDA.....	44
3.5. Analyse der Ceramidebildung in hCMEC/D3 Zellen in Gegenwart von 2-Chlorohexadecanal	45
3.6 Analyse der Genexpression CASP1, NLRP3	46
3.6.1 Synthese in cDNA für RT-PCR	47
3.6.2 Realtime – PCR	47
3.6.3 Statistische Anlyse der RT-PCR mit ©REST	48
3.7 Analyse der Cysteinprotease, Caspase -1	49
3.7.1 Analyse der Caspase-1 Aktivität	49
4. Resultate.....	51
4.1 Synthese von 2-CIHDA	51
4.1.1 Enantioselektive Chlorierung von Hexadecanal.....	51
4.2 Analytik von 2-Chlorohexadecanal	52
4.2.1 GC-MS Analytik von 2-CIHDA.....	52
4.2.2 Ausbeute der 2-CIHDA Synthese.....	53
4.3 Etablierung des HEK Blue TLR4 und TLR2 Reportersystems.....	54
4.4 Stimulierung des HEK Blue Reportersystem mit 2-Chlorohexadecanal	57
4.5 2-CIHDA induziert die Bildung ROS in Gehirn-Endothelzellen	61

4.6 Produktion von Ceramiden in Gegenwart von 2-Chlorohexadecanal in Endothelzellen des Gehirns	62
4.7 Analyse der Genexpression von CASP1 und NLRP3 in Endothelzellen des Gehirns.....	64
4.8 Analyse der Caspase- 1 Aktivität.....	67
5. Diskussion.....	69
6. Literatur	77

Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt meinen Betreuer und Mentor Herrn Univ.-Prof. Dr. Wolfgang Sattler, der mir ermöglichte in seiner Arbeitsgruppe meine Diplomarbeit zu schreiben und für die Vergabe diese schönen und interessanten Themas. Herr Prof. Sattler begleitete meine wissenschaftliche Arbeit zu jeder Zeit mit seinem Wissen und seiner Erfahrung. Es war mir eine Freude meine Diplomarbeit unter seiner Leitung schreiben zu dürfen.

Weiters möchte ich mich herzlichst bei Dr. Christoph Nußhold für die Betreuung bedanken. Er gab mir immer Ratschläge während der Durchführung meiner Experimente und unterstützte mich tatkräftig mit seinem Wissen.

Für die professionelle Hilfe bei der praktischen Arbeit möchte ich mich ebenfalls bei Frau Ing. Helga Reicher bedanken. Bei Fragestellungen hatte sie immer ein offenes Ohr und stand mir geduldig zur Seite.

Ebenfalls bedanke ich mich bei Herrn Dr. Andreas Üllen für die Weitergabe seinen Fachwissen und die Hilfe.

Bei Frau Doris Treier möchte ich mich auch für die technische Unterstützung und Hilfe während meiner Arbeit bedanken.

Für die seelische Unterstützung und für interessante Fachgespräche bedanke ich mich bei Frau Dr. Eva Bernhardt und Frau Mag. Joanna Plastira.

Es war mir eine große Freude in dieser Arbeitsgruppe meine Abschlusarbeit zu vollenden. Es herrschte immer ein angenehmes, freundschaftliches Arbeitsklima welches mich zusätzlich motivierte und aufbaute.

Abschließend möchte ich mich bei meiner Mutter bedanke, die mir dieses Studium ermöglichte und mich stets seelisch unterstützte. Ein Dank gilt auch meinen Freundeskreis die großes Interesse an meiner Arbeit zeigten und mich zu jeder Zeit zur Seite standen.

Abkürzungen

BHS	Blut Hirn Schranke
BMVEC	Brain Microvascular Endothelial Cells
CARD	Caspase Recruitment Domain
cDNA	Complementary DNA
2-CIHDA	2-Chlorohexadecanal
2-CIHOH	2-Chlorohexadecanol
2-CIHA	2-Chlorohexadecansäure
DAMPS	Damage associated molecular patterns
DC	Dünnschichtchromatographie
DCFDA	Dichlorofluorescein Diacetat
DMEM	Dulbecco's modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
FCS	Fetal Calf Serum
GC-MS	Gaschromatographie - Massensepektrometrie
IL-1	Interleukin-1
LTA	Lipoteichonsäure
LPS	Lipopolysaccharid
MEM199	Earls Salt's Medium
MPO	Myeloperoxidase
NICI	Negativionen Chemische Ionisierung
NCS	N-Chlorsuccinimide
NLRP3	NACHT, LRR and PYD domains-containing Protein 3
NLR	NOD Like Rezeptoren, Nucleotide-Binding Oligomerization Domain Receptors
PAMPS	Pathogen Associated Molecular Patterns
PBEC	primäre Endothelzellen des Schweinegehirns

PBS	Phosphate-buffered saline
PGN	Peptidoglycan
PRR	Pathogen Recognition Receptors
RT-PCR	Realtime PCR
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
SEAP	Secretoric embryonic alcalic phosphatase
TLR	Toll-Like Rezeptoren
TXNIP	Thiorexodin-Interaktions Protein

Zusammenfassung

Die Blut-Hirn Schranke (BHS) stellt eine physiologische Barriere dar, die das Zentralnervensystem von der peripheren Zirkulation abgrenzt. Tight Junctions bilden die morphologische Basis der neurovaskulären Einheit. Die komplexen Vorgänge des Gehirns erfordern ein ausgeglichenes, konstantes chemisches Milieu (Homöostase) Für die physiologische Funktion der Blut-Hirnschranke ist die Lipidzusammensetzung sehr wichtig. Modifikationen der Lipidzusammensetzungen durch Entzündungsreaktionen und/oder oxidativer Stress, führen zu neurodegenerativen Prozessen im Zentralnervensystem. Plasmalogene, Ether-Phospholipide, spielen eine zentrale Rolle im Zentralnervensystem. Das Enzym Myeloperoxidase von Phagozyten spielt eine wichtige Rolle in der Immunabwehr und ist fähig aus Wasserstoffperoxid und Chloridionen Hypochlorige Säure (HOCl) zu produzieren. HOCl ist ein potentes antimikrobielles Oxidationsmittel und wirkt bei chronischer Aktivierung zytotoxisch da es Proteine, Lipide und DNA angreift. Plasmalogene, die an der Plasmamembran lokalisiert sind bieten leichten Zugang für HOCl und werden leicht modifiziert. Bei dieser Reaktion greift HOCl die ungesättigte Vinyletherverbindung der Plasmalogene an, was zur Bildung eines chlorierten Aldehyds (2-Chlorohexadecanal) und des korrespondierenden Lysophospholipids führt. Toll – Like Rezeptoren gehören zur Familie der PRRs und erkennen verschiedene Liganden wie z.B. mikrobielle Motive aber sind auch fähig endogene Moleküle (DAMPs) zu erkennen, die von beschädigten Zellen freigesetzt werden. TLRs werden auch von Zellen welche nicht dem Immunsystem angehören exprimiert. Untersuchungen konnten zeigen, dass TLR4 und TLR2 im Gehirn funktionell exprimiert werden. Inflammasoms sind molekulare Plattformen welche nach Erkennung gefährlicher Signale (z.B. reaktive Sauerstoffpezies, extrazelluläres ATP, Hyaluron, amyloid- β Fibrillen, oder Harnsäure) assemblieren und das „Interleukin Converting Enzym“, Caspase-1 aktivieren. Caspase-1 spaltet pro-IL-1 β zum reifen IL-1 β . In vitro Experimente konnten zeigen, dass 2-Chlorohexadecanal fähig ist den Toll – Like Rezeptor 4 zu aktivieren, hingegen der Toll-Like Rezeptor 2 nicht stimuliert wird. Weiters produzieren Endothelzellen des Gehirns reaktive Sauerstoffspezies in Gegenwart von 2-ClHDA. Ebenfalls wird die Ceramid Synthese in BMVEC durch 2-Chlorohexadecanal aktiviert. Zusätzlich werden Komponenten des Inflammasoms (Procaspase-1 und NLRP3) in BMVEC Zellen exprimiert.

Zusammenfassend deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass 2-Chlohexadecanal eine Rolle bei der Inflammation in Gehirndothelzellen spielen könnte.

Abstract

Most regions of the brain operate within a well-controlled environment that is separated from the peripheral circulation by the neurovascular unit. There, brain microvascular endothelial cells form the morphological basis of the blood brain barrier (BBB) by formation of tight junctions that prevent uncontrolled paracellular transport of nutrients or cells. The lipid composition is very important for the physiological function of the brain. Plasmalogens, a subclass of ether-phospholipids, take a central role in the brain function. Our group could recently demonstrate that myeloperoxidase (an enzyme of the innate immune defense that is able to form hypochlorous acid) targets the vinyl ether bond of plasmalogens and produces 2-chlorohexadecanal (2-CIHDA). 2-CIHDA has deleterious effects on brain microvascular endothelial cell (BMVEC) barrier function and induces mitochondrial dysfunction, ATP depletion and apoptosis in BMVEC. In the mediation of systemic and central effects of pathogens Toll-like receptors (TLRs) play a significant role. These receptors recognize pathogen-associated- and damage associated molecular patterns (PAMPs and DAMPs) from invading pathogens mediating the inflammatory response. In response to TLR engagement, immune-competent cells are able to assemble a multimeric protein complex, termed the inflammasome, that leads to activation of Caspase-1. Caspase 1 cleaves pro IL-1 β to mature IL-1 β elevating the inflammatory response. The present study aimed to clarify whether 2-CIHDA could (as a plasmalogen derived DAMP) act as a ligand for TLR4. Here I was able to show that 2-CIHDA can activate TLR4-mediated signalling cascades. In contrast 2-CIHDA was without effects on TLR2. Further I could show two events that act as triggers of inflammasome assembly, namely increased formation of reactive oxygen species and ceramides synthesis in 2-CIHDA-treated BMVEC. In addition BMVEC express two important components of the inflammasome, namely NLRP3 and Caspase-1. Taking together results of the present diploma thesis gives first hints that 2-CIHDA could be involved in inflammasome activation/assembly at the BBB.

1. Einleitung

1.1 Die Blut – Hirnschranke

Die Blut-Hirn Schranke (BHS) stellt eine physiologische Barriere dar, die das Zentralnervensystem von der peripheren Zirkulation abgrenzt. Die komplexen Vorgänge des Gehirns erfordern ein ausgeglichenes, konstantes chemisches Milieu (Homöostase) um eine störungsfreie Kommunikation zwischen den unterschiedlichen Zelltypen des ZNS zu gewährleisten. Die Kommunikation der Neuronen erfolgt über eine Kombination aus chemischen (Neurotransmitter und Modulatoren) und elektrischen Signalen (Synaptisches Potential und Aktionspotential). Bei der Entstehung dieser Signale sind Ionenflüsse über neuronale Membranen involviert und geringe Schwankungen in der Kalium-Konzentration können zu schwerwiegenden Störungen des neuronalen Membranpotentials führen. Um einen reproduzierbaren, präzisen und zuverlässigen Informationsfluss zu gewähren ist die Aufrechterhaltung der Homöostase durch die BHS essentiell. Zusätzlich ist die BHS auch dafür verantwortlich, das Gehirn mit Nährstoffen zu versorgen und Stoffwechsel Abbauprodukte aus dem Gehirn in die Zirkulation zu entsorgen Für die Aufrechterhaltung der Homöostase spielt die Blut-Hirnschranke, die die Barriere zwischen dem Blutsystem und dem zentralen Nervensystem darstellt, eine lebenswichtige Rolle (Abbott 2013). Der Chemiker Paul Ehrlich beobachtete um das Jahr 1880, dass nach Injektion von wasserlöslichen Farbstoffen in den Kreislauf von Ratten alle Organe außer Hirn und Rückenmark gefärbt wurden. Er zog daraus den (falschen) Schluss, dass eine geringere Affinität des Gehirngewebes zu den verwendeten Farbstoffen der Grund für diese Befunde sind. Ein ehemaliger Mitarbeiter von Paul Ehrlich, Edwin Goldman konnte im Jahr 1913 zeigen, dass eine direkte Injektion derselben Vitalfarbstoffe in die Rückenmarkflüssigkeit von Hunden das Nervensystem anfärbt andere Gewebe aber ungefärbt bleiben. Die Begriff Blut-Hirnschranke wurde um 1990 das erstmals von Max Lewandowsky verwendet. Seine Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass neurotoxische Substanzen die Hirnfunktion nur dann beeinträchtigen wenn diese direkt in die Zerebrospinalflüssigkeit injiziert werden (<http://neuroscience.uth.tmc.edu>). Ein neues Konzept, das nicht mehr

Endothel-zentriert ist, definiert die unterschiedlichen Zelltypen (Pericyten, Astrocyten, Mikroglia und Neuronen) die am Aufbau und der Regulation der BHS beteiligt sind, als neurovaskuläre Einheit (neurovascular Unit) (Lo, Dalkara et al. 2003, Iadecola 2004, Hawkins and Davis 2005, Zlokovic 2005). Kleine Gasmoleküle z.B Sauerstoff und Kohlenstoff können durch die Lipidmembran frei diffundieren und auch kleine lipophile Stoffe wie z.B Drogen, Pharmaka (Barbiturate) und Ethanol. Der transzelluläre Transport kleiner hydrophiler Moleküle wird durch ein spezifisches Transportersystem an der luminalen und abluminalen Seite der Membran reguliert. Das System kontrolliert somit den Eintritt verschiedenster Stoffe durch das Schrankensystem (Ohtsuki and Terasaki 2007). Das periphere Nervensystem besitzen oftmals gleiche Neurotransmitter. Die Blut-Hirnschranke trägt ihren Teil dazu bei zentrale und periphere Neurotransmitter pools zu trennen um Kreuzantworten zu minimieren (Abbott, Ronnback et al. 2006, Bernacki, Dobrowolska et al. 2008). Weiter schützt das Schrankensystem das zentrale Nervensystem vor neurotoxischen Substanzen welche im Blutsystem zirkulieren. Diese Neurotoxine beinhalten endogene Metabolite, Proteine oder auch Umwelteinflüsse. Eine Reihe energieabhängiger ABC – Transporter pumpen neurotoxische Stoffe wieder aus dem Gehirn (Lim, Huang et al. 2007, Abbott, Patabendige et al. 2010). Eine ausreichende Versorgung des Gehirns mit Nährstoffen wird durch die Expression spezifische Transportersysteme an der Blut Hirnschranke garantiert (Abbott, Patabendige et al. 2010). Ebenfalls schützt das Barriersystem vor eintretenden Makromolekülen. Der Proteingehalt der Gehirn-Rückenmarks Flüssigkeit ist weit geringer als des Plasmas und die individuelle Proteinzusammensetzung ist verschieden. Plasmaproteine z.B. Albumin, Pro-Thrombin und Plasminogen können Nervengewebe schädigen (Nadal, Fuentes et al. 1995, Abbott, Patabendige et al. 2010).

1.1.1 Anatomie der Blut-Hirnschranke

Das Endothel

Morphologisch wird die BHS von zerebralen, mikrovaskulären Endothelzellen gebildet. Mikrovaskuläre Endothelzellen die am Aufbau der BHS beteiligt sind, unterscheiden sich durch einige herausragende Eigenschaften von Endothelzellen in peripheren Blutgefäßen. Mikrovaskuläre Endothelzellen des Gehirns bilden keine Fenestrierungen und Intrazellulärspalten aus, besitzen ausgeprägte zelluläre Polarität (d.h. die Expression von Proteinen und Transportern an der luminalen Membran unterscheidet sich stark von der abluminalen Membran), besitzen bis zu 10-mal mehr Mitochondrien und zeichnen sich durch nahezu abwesende Fähigkeit für Pinozytose aus. Dies zeigt, dass die BHS eine passive (kein parazellulärer Transport) und aktive (polarisierte Proteinexpression) Barrierefunktion erfüllt (Hawkins and Davis 2005). Endothelzellen sind über Tight Junctions (TJ), Zell-Zellverbindungen verbunden (Ballabh, Braun et al. 2004). Die TJ liefern einen wichtigen physikalischen Beitrag zur Barrierefunktion, da durch sie parazellulärer Transport (zwischen zwei benachbarten Zellen) unterbunden wird. Elektronenmikroskopisch stellen sich TJ als kontinuierliche, verbindende intramembranöse Stränge oder Fibrillen an der apikalen Membran und einer komplementären Einkerbung auf der basolateralen Seite dar. Die Junction Komplexe der Blut-Hirnschranke bestehen aus TJ und Adherens Junctions (AJ) (Ballabh, Braun et al. 2004). Über TJ verbinden Transmembranproteine wie Occludin, Claudine (Claudin-5 und -12) und die Junctional Adhesion Molecules benachbarte Endothelzellen an der apikalen Membran. Dadurch wird der parazelluläre Stofftransport weitestgehend unterbunden. Intrazelluläre Adapterproteine der Zonula Occludens (ZO1-3) Familie und Cingulin verbinden die TJ mit dem zellulären Aktin-Cytoskelett. Daraus resultiert die Fähigkeit, dynamisch auf Änderungen des Zytoskeletts zu reagieren (Ballabh, Braun et al. 2004). TJ sind aber nicht nur ‚Dichtungen‘ sondern spielen auch bei der Ausbildung von polarisierten Membrandomänen eine herausragende Rolle.

1.1.2 Transportprozesse an der BHS

Die Gesamtlänge der Kapillaren beträgt bei einem Erwachsenen ca. 600 km und bedeckt eine Gesamtfläche von ca. 12 – 20 m². Dies zeigt eindrucksvoll, dass an der Schnittstelle zwischen peripherer Zirkulation und Gehirn eine relativ grosse Oberfläche für den Stoffaustausch zur Verfügung steht. Dies ist nicht verwunderlich, da der Nährstoffbedarf des Gehirns (bei einem Anteil von 2 % der Körpermasse) bei ca. 20 % liegt. Im Gegensatz zur Leber oder der Muskulatur verfügt das Gehirn nur über sehr begrenzte Speicherreserven in Form von Glykogen, das hauptsächlich in Astrozyten lokalisiert ist. Das Gehirn erhält 20% des Herzzeitvolumens und bei Beendigung der Gehirndurchblutung erfolgt ein Stopp der Hirnfunktion in Sekunden und eine Schädigung der Neuronen innerhalb von Minuten. (Girouard and Iadecola 2006) Die neuronale-vaskuläre Kommunikation ist daher für normale Gehirnfunktion essentiell. Neueren Schätzungen zufolge wird fast jedes Neuron über eine eigene Blutkapillare versorgt (Zlokovic 2005).

Die einfachste Form des Transports über die BHS stellt die freie Diffusion entlang eines elektrochemischen Gradienten dar. Ob eine Verbindung mittels freier Diffusion über die BHS transportiert wird, hängt hauptsächlich von den lipophilen Eigenschaften und dessen Molekulargewicht ab. Ein wichtiger Indikator für die Transporteigenschaften stellt der Oktanol/Wasser Verteilungskoeffizient dar. Über die log-P Werte lässt sich mit Vorbehalt vorhersagen ob eine Substanz frei diffundiert oder nicht (Seelig, Gottschlich et al. 1994).

Kanalvermittelte Permeabilität stellt eine Transportform für kleine polare Moleküle dar. Wasser kann die hydrophoben Membranen des Endothels nur sehr eingeschränkt passieren, wird aber durch hydrophile Kanäle, sie sog. Aquaporine sehr effizient transportiert.

Das Barriersystem verhindert, dass polare Stoffe wie z.B. Glucose, Aminosäuren, welche für den Stoffwechsel aber essentiell sind, durch die Schranke parazellulär diffundieren können. Das Gehirn beinhaltet eine Vielzahl von spezifischen „solute carriers“ (SLC Transporter) für die Versorgung mit Nährstoffen. Die meisten polare Moleküle können nicht durch die Zellmembran diffundieren und benötigen einen Transporter (Zhang, Knipp et al. 2002). Manche der Transporter sind in der Expression polarisiert und befinden sich entweder an der abluminal oder luminalen

Seite und manche Transporter befinden sich an beiden Seiten der Membran in Endothelzellen. Das Endothelzellen des Gehirns exprimieren eine Vielzahl von Transporterproteinen für unterschiedliche Stoffe die entweder den Transport in das Gehirn oder heraus medieren (Abbott 2002, Ohtsuki and Terasaki 2007, Bernacki, Dobrowolska et al. 2008, Abbott, Patabendige et al. 2010).

Glucose, Ketonkörper und Aminosäuren werden über einen Mechanismus eigenschleust der als erleichterte Diffusion bezeichnet wird. Der Glucosetransporter GLUT-1 ist ein gutes Beispiel für polarisierte Expression da an der apikalen Membran ca. 4-mal mehr GLUT-1 exprimiert wird als an der basolateralen Membran.

Aktive Transporter, sogenannte Pumpen, können Nährstoffe oder Medikamente ATP-abhängig auch gegen einen Konzentrationsgradienten transportieren. Der ABC Transporter ABCA1 und ABCG1 transportieren Cholesterol. ABCA2 wird ebenfalls im ZNS exprimiert und ist mit Drug resistance assoziiert (Dean, Rzhetsky et al. 2001). Die wichtigste Rolle der ABC Transporter ist die Funktion als Pumpen unter ATP – Verbrauch. Potentielle neurotoxische Substanzen werden, wie zuvor in der Einleitung erwähnt, aus dem Gehirn gepumpt und besitzen daher eine schützende und eine entgiftende Funktion (Dallas, Miller et al. 2006).

Für ausgewählte grosse Moleküle steht die rezeptorvermittelte Transcytose zur Verfügung. Beispiele für Rezeptoren die Transcytose unterstützen sind der LDL-Transferrin-oder Insulin Rezeptor an der BHS. Dieser Mechanismus erfolgt über Rezeptor medierte Transcytose (RMT) oder adsorptive medierte Transcytose (AMT). Bei der RMT erfolgt die Bindung der Makromoleküle an spezifische Rezeptoren an der Zelloberfläche. Der Rezeptor und der gebundene Ligand bilden ein Cluster und dadurch wird ein Vesikel geformt. Rezeptor und Ligand werden in die Endothelzelle internalisiert und über eine Route durch das Cytoplasma an der anderen Seite mittels Exocytose ausgeschleust. Die Dissoziation des Liganden erfolgt während des zellulären Transports und der Exocytose. AMT benötigt eine positive Ladung des Moleküls und die Interaktion des Liganden mit der Bindungsseite an der Zelloberfläche führt zur Endozytose und Transcytose (Sauer, Dunay et al. 2005).

1.1.3 Störungen der BHS

Die Gesamtlänge des Kapillarsystems im Gehirn ist bei neurodegenerativen Erkrankungen deutlich reduziert (Bailey, Rivara et al. 2004, Chen, Breckwoldt et al. 2008). Zahlreiche Forschungsergebnisse belegen, dass neurovaskuläre Mechanismen und ein Versagen der BHS Funktion chronischen Krankheitsprozessen bei neurodegenerativen Störungen und Alterungsprozessen vorausgehen und diese beschleunigen (Zlokovic 2008). Ein Defekt des Schrankensystems führt oftmals zur Entstehung und/oder Progression verschiedenster Krankheiten welche das Zentralnervensystem betreffen. Eine erhöhte Permeabilität der Blut-Hirnschranke ist in manchen Fällen die Folge pathologischer Veränderungen wie zum Beispiel bei einem ischämischen Schlaganfall (Ilzecka 1996) oder einem Schädel-Hirn Trauma (Morganti-Kossmann, Rancan et al. 2002), wohingegen bei Multipler Sklerose ein Verlust der Barrierefunktion ein sekundärer Prozess zu sein scheint. Eine Vielzahl verschiedenster Forschungsstudien, in welchen in vitro Modelle der Blut-Hirnschranke untersucht wurden, konnten zeigen, dass Hypoxie zu einer erhöhten Permeabilität der Blut-Hirnschranke führt und Tight Junctions beeinträchtigt werden (Hawkins and Davis 2005). Oxidativer Stress spielt bei verschiedensten pathologischen Prozessen des zentralen Nervensystems eine wichtige Rolle, zum Beispiel Alzheimer, Parkinson, Amyotrophe Lateralsklerose und Multiple Sklerose (Freeman and Keller 2012). Ein Ungleichgewicht des normalen Redoxstatus führt zur Produktion freier Radikale und Peroxide (reaktive Sauerstoffspezies oder Stickstoffspezies), welche Proteine, Lipide und DNA der Zelle schädigen können. Das Gehirn besitzt einen hohen Sauerstoffbedarf, aber beinhaltet wenige Enzyme welche reaktive Sauerstoff-oder Stickstoffspezies Verbindungen in unschädliche Spezies verstoffwechseln können (Shukla, Mishra et al. 2011). Zusammenfassend zeigten eine Reihe von Studien, dass die Zerebrovaskulatur sowohl eine Quelle als auch einen Angriffspunkt für oxidativen Stress in verschiedensten neurodegenerativen Erkrankungen darstellen kann (Freeman and Keller 2012).

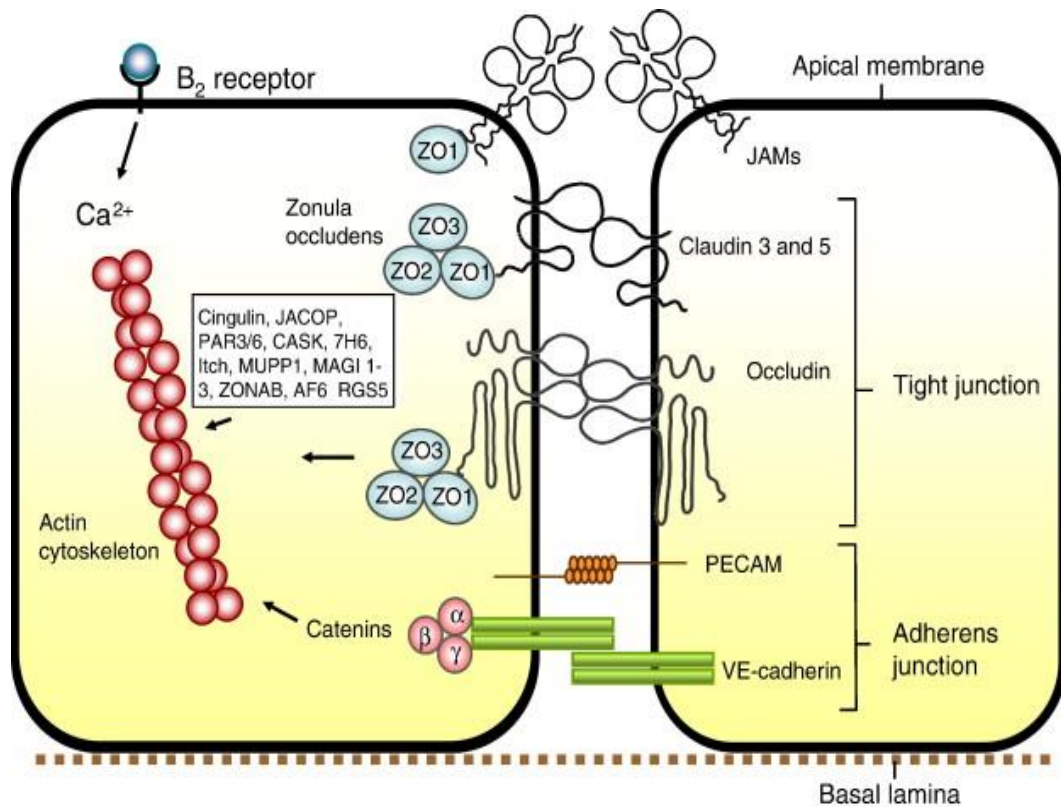


Abbildung 1: Struktur der Tight Junctions der Blut Hirnschranke. Endothelzellen sind über Tight Junctions verbunden. Tight Junction Komplex beinhaltet Occludin, Claudin 3 und 5 und andere Claudins. Für die strukturelle Integrität des Schrankensystems und der Haftung der Zellen sind Cadherine der Adherens Junctions verantwortlich (Abbott, Patabendige et al. 2010)

1.2 Plasmalogene

Als Plasmalogen werden Etherlipide bezeichnet, die strukturell den klassischen Phospholipiden ähneln. Feulgen und Voigt (Snyder 1999, Braverman and Moser 2012) bezeichneten 1942 eine bisher unbekannte Substanz welche nach Säurebehandlung zur Produktion eines Aldehyds im Cytoplasma führte als Plasmalogen. Marinetti und Erbland charakterisierten diese Substanz als Glycerophospholipid, welches eine säurelabile Vinylether Gruppe an der sn-1 Position beinhaltet (Braverman and Moser 2012). Ford bezeichnet in seiner Arbeit diese Vinylether Verbindung als „maskierten“ Aldehyd welcher säurelabil ist (Ford 2010). Der C1-Substituent bei Plasmalogenen ist nicht über eine Esterbindung mit dem Glycerinrückgrad verbunden, sondern über eine α,β -ungesättigte Etherbindung (Abb.2) (D. Voet, J.G. Voet, Lehrbuch der Biochemie 2002).

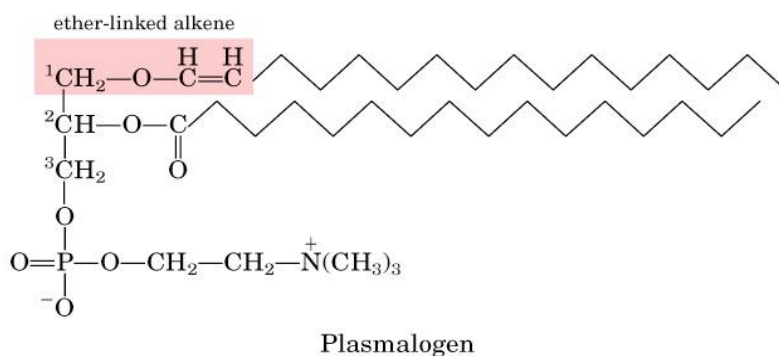


Abbildung 2 links: Struktur der Plasmalogene (<http://www.flickr.com>)

In der Zellmembran beträgt der Plasmalogenanteil 15-20% der Phospholipidmenge. Das Gehirn weist die höchste Plasmalogenkonzentration auf und bei neurodegenerativen Krankheiten (Alzheimer, Parkinsons, Neimann Pick Typ C, Down Syndrom, Enzephalomyelitis) ist die zerebrale Plasmalogenkonzentration erniedrigt (Braverman and Moser 2012). Gewebe des kardiovaskulären Systems sowie zahlreiche andere Zelltypen, wie z.B. Endothelzellen, glatte Muskelzellen, zirkulierende Neutrophile, Monocyten aber auch Lipoproteine zeichnen sich durch relativ hohe Plasmalogenkonzentrationen aus. Zoeller und seine Mitarbeiter konnten zeigen, dass Plasmalogene durch antioxidative Eigenschaften Zellen vor Radikalen schützen und reaktive Sauerstoffspezies unschädlich machen (Ford 2010).

1.2.1 Myeloperoxidase und 2-Chlorohexadecanal

Neutrophile sind die häufigsten weißen Blutkörperchen in der Blutzirkulation und bilden die vorderste Front der Immunantwort. Sie besitzen phagozytierende Eigenschaften und sind dadurch fähig Bakterien in ein Phagosom einzuschließen, in welchem die meisten Bakterien eliminiert und verdaut werden. Neutrophile besitzen ein großes Repertoire Häm-haltiger Enzyme, darunter das Enzym Myeloperoxidase (Klebanoff, Kettle et al. 2013). Dieses Protein befindet sich dicht gepackt in den Granula und ist mit einem Matrix ähnlichem Material welches aus polyanionischen Glycosaminoglycanen besteht, assoziiert.

Es wird angenommen, dass die hoch kationischen Granulaproteine das Matrixmaterial binden und dadurch das Enzym in einem inaktiven Zustand gehalten wird (Davies 2011). Die Aktivierung von Neutrophilen während einer Immunantwort führt zum sogenannten „respiratory burst“. Dieser Vorgang führt zur Produktion von Wasserstoffperoxid und begleitend dazu wird ebenfalls Myeloperoxidase aus den azurophilen Granula der Immunzellen freigesetzt (Anbukumar, Shornick et al. 2010). MPO ist ein kationisches Protein mit einer Molekülmasse von 146 kD. Es besteht aus zwei monomeren Untereinheiten (73 kDa pro Untereinheit) welche durch eine Disulfidbrücke verbunden sind. Jedes Monomer besteht aus einer schweren und einer leichten Kette. Das aktive Zentrum des Enzyms befindet sich auf der schweren Kette (Davis 2011). Die Freisetzung von MPO und des Substrats Wasserstoffperoxid führt in Gegenwart von Chloridionen zur Produktion hypochloriger Säure (HOCl), welche antimikrobielle Eigenschaften besitzt. HOCl spielt eine wichtige Rolle bei der Immunabwehr, kann aber bei chronischer Aktivierung zytotoxisch wirken, da HOCl in der Lage ist, Proteine, Lipide, Nukleinsäuren anzugreifen (Wildsmith, Albert et al. 2006). Plasmalogene, die in der Plasmamembran lokalisiert sind können von HOCl leicht erreicht und modifiziert werden. Bei dieser Reaktion reagiert HOCl mit der ungesättigten Vinyletherbindung der Plasmalogene, was zur Bildung eines langkettigen chlorierten Aldehyds (2-Chlorohexadecanal) und des korrespondierenden Lysophospholipids führt (Albert, Crowley et al. 2001).

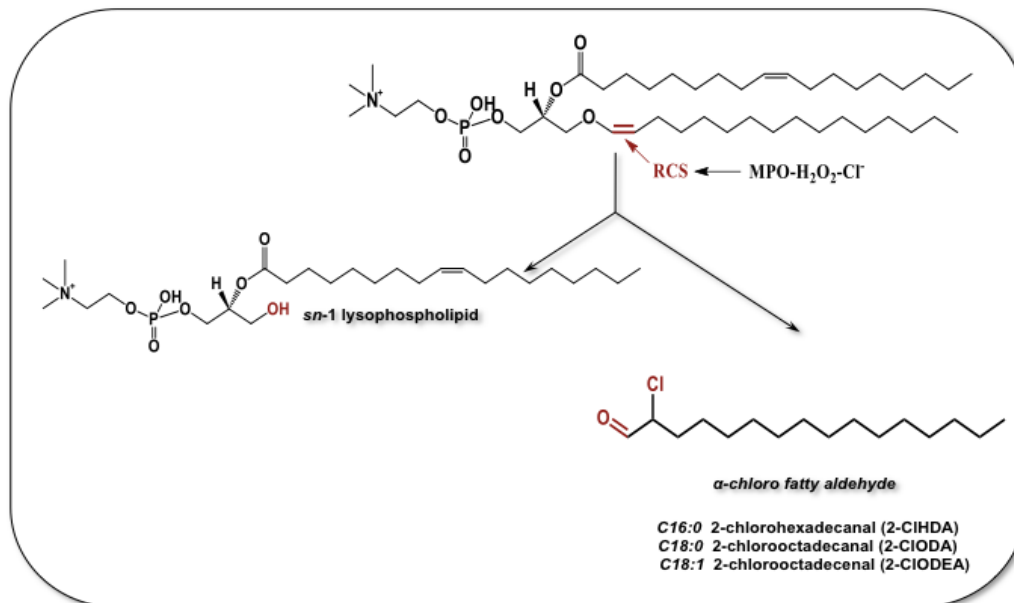


Abbildung 3: Aktivierte Phagozyten sind fähig potente antimikrobielle Oxidantien zu produzieren, inkludierend Hypochlorige Säure (HOCL). Das Myeloperoxiase-H₂O₂-Cl-System greift die Vinyltether Verbindung der Plasmalogenen an und generiert 2-CIHDA und das korrespondierende Lysophospholipid.

Untersuchungen der Ford Gruppe befassten sich mit dem zellulären Metabolismus von 2-CIHDA. Wildsmith et al konnte zeigen, dass Neutrophile und Endothelzellen fähig sind 2-Chlorohexadecanal zu 2-Chlorohexadecanol (2-CIHOH) und 2-Chlorohexadecanoic Säure (2-CIHA) zu reduzieren bzw. zu oxidieren. Weitere Studien mit dem Enzym Fatty Aldehyde Dehydrogenase (FALDH: ein Enzym das in den Fettsäure-Fettalkohol Zyklus involviert ist) zeigten, dass die Bildung von 2-CIHOH und 2-CIHA FALDH abhängig ist (Ford 2010).

Das Gehirn besitzt einen hohen Sauerstoffbedarf und einen hohen Gehalt ungesättigter Fettsäuren und ist dadurch sehr sensitiv gegenüber Schädigungen durch oxidativen Stress (Halliwell 2006). Plasmalogene sind Hauptbestandteile des Nervengewebes mit einen Anteil von ca. 50-80% der Glycerophosphoethanolamine in der grauen und weißen Substanz (Han, Holtzman et al. 2001). Laut Literatur existieren Hinweise, dass die chronische Aktivierung von MPO den neurodegenerativen Krankheitsverlauf beschleunigt (Yap, Whiteman et al. 2007). Bei Multipler Sklerose ist MPO in Mikroglia und Makrophagen präsent (Chen, Breckwoldt et al. 2008) und eine kortikale Demyelinsierung ist mit einer erhöhten MPO Aktivität verbunden (Marik, Felts et al. 2007, Gray, Thomas et al. 2008). Eine chronische

MPO Aktivierung führt zu erhöhten Konzentrationen von HOCl und in weiterer Folge zur Bildung von Protein gebundenen Chloraminen, welche zu Gewebe- und Organschäden führen. Bei Artherosklerose (Thukkani, McHowat et al. 2003), im ischämischen Rattenherz (Thukkani, Martinson et al. 2005) und bei neuroinflammatorischen Erkrankungen (Ullen, Fauler et al. 2010) ist die 2-ClHDA Konzentration erhöht. 2-ClHDA wirkt chemoattraktiv auf Neutrophile und ist ein potenter Inhibitor der endothelialen NO-Synthase (Marsche, Heller et al. 2004). Neuere Befunde aus unserer Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass 2-ClHDA die Barrierefunktion der Blut-Hirnschranke konzentrationsabhängig beeinträchtigt. Ebenfalls erfolgt eine Veränderung der Morphologie der Tight und Adherens junctions in Gegenwart von 2-ClHDA. Bei einer insitu Perfusion mit 2-ClHDA des Rattenhirns wird die Permeabilität des Schrankensystems in vivo ebenfalls beeinträchtigt (Ullen, Singewald et al. 2013).

1.3 Toll – Like Rezeptoren

Eine Entzündung stellt einen Schutzmechanismus des Körpers zur Beseitigung schädlicher Stoffe einerseits und zur Heilung von geschädigtem Gewebe andererseits dar (Medzhitov 2008). Das angeborene Immunsystem spielt bei Entzündungen und Gewebeschädigungen eine zentrale Rolle. Toll-like Rezeptoren sind Rezeptoren des angeborenen Immunsystems und zählen zur Gruppe der Pathogen Associated Recognition Receptors (PRR). PRR sind für die Erkennung eindringender Mikroorganismen verantwortlich. Die Erkennung erfolgt über konservierte Strukturen der Zellwand der Mikroorganismen, welche in der Literatur als Pathogen Associated Molecular Patterns (PAMPs) bezeichnet werden. Neueste Untersuchungen zeigen, dass PRRs auch endogene Moleküle erkennen, welche von beschädigten Zellen freigesetzt werden und als Damage Associated Molecular Patterns (DAMPs) bezeichnet werden. Die Familie der PRRs beinhaltet 4 Klassen, Transmembranproteine (TLRs und C-Typ Lectin Rezeptoren), cytoplasmatische Proteine (Retinoic acid-inducible gene (RIG)-I-like receptors) und NOD-like receptors (NLRs) (Takeuchi and Akira 2010). Die Toll-like Rezeptor Familie beinhaltet 13 Mitglieder in der Maus und 11 im Menschen und kann bezüglich ihrer subzellulären Lokalisation in zwei Kategorien eingeteilt werden: Die Mitglieder TLR1, TLR2, TLR4, TLR5 und TLR6 werden an der Zelloberfläche exprimiert und erkennen Regionen extrazellulärer Liganden, hingegen sind TLR3, TLR7 und TLR9 im endosomalen Kompartiment lokalisiert und erkennen pathogene Nukleinsäure Motive. Virale Infektionen führen zur Generierung doppelsträngiger RNA oder Einzelstrang DNA

TLR4 und TLR2 sind die am besten charakterisierten TLR Mitglieder und erkennen mikrobielle Motive wie z.B. PGN (Peptidoglycan), bakteriellen Lipoproteine, und Lipopolysaccharid. TLR1 und TLR6 bilden Heterodimere mit TLR2 zur Unterscheidung von triacetylierten und diacetylierten bakteriellen Lipoproteinen. Für die Erkennung von Flagellen der motilen Bakterienspezies ist TLR5 verantwortlich. TLR11 erkennt pathogene Bakterien welche mit Uropathien wie z.B. *E. coli* assoziiert werden (Hanke and Kielian 2011). TLRs erkennen aber nicht nur mikrobielle oder virale Motive sondern werden durch eine Reihe weiterer Liganden stimuliert. Die

Arbeitsgruppe von Daniel Hwang konnte zeigen, dass gesättigte Fettsäuren (nicht aber nicht ungesättigte Fettsäuren) die TLR4-vermittelte Aktivierung von COX-2 in Makrophagen (RAW264.7) und Monocyten (THP-1) stimuliert. Diese Resultate deuten darauf hin, dass die Aktivierung der Monocyten/Makrophagen über TLR4 mittels unterschiedlicher Fettsäurespezies stimuliert wird und durch Nahrungslipide moduliert werden könnte (Huang, Rutkowsky et al. 2012). Freie Fettsäuren stimulieren Entzündungen des Fettgewebes (initiiert durch TLR4) was zu Insulinresistenz führen kann. Es existieren Hinweise, dass freie Fettsäuren nicht direkt an den TLR4 binden sondern die Bindung über ein Adapterprotein mediiert wird. Hier konnte gezeigt werden, dass Fetuin-A(FetA) eine mögliche Rolle als Adapterprotein spielt und eine Schlüsselrolle bei der Ausbildung von Insulinresistenz einnehmen könnte. FetA ist ein Glycoprotein, das von der Leber sekretiert wird und die Produktion proinflammatorischer Cytokine aus Adipocyten und Makrophagen stimuliert (Pal, Dasgupta et al. 2012).

TLRs werden weitgehend von Zellen des Immunsystems exprimiert und fungieren als primäre Sensoren eindringender Pathogene. Wissenschaftliche Untersuchungen konnten aber zeigen, dass TLR ebenfalls von nicht myeloiden Zellen exprimiert werden welche nicht dem Immunsystem angehören z.B. Epithel und Endothelzellen. Es existieren wenige Daten über die Funktion und Expression der Toll-Like Rezeptoren in Endothelzellen des Gehirns. Untersuchungen der Arbeitsgruppe Krizbai und auch anderer Arbeitsgruppen konnten zeigen, dass TLR2, TLR3, TLR4 und TLR6 in Zellkulturen (hCMEC/D3 Zelllinie) humaner Gehirndothelzellen exprimiert werden (Nagyoszi, Wilhelm et al. 2010). Nach Erkennung von PAMPs oder DAMPs lösen TLR´s einen intrazellulären Signalweg aus, welcher zur Induktion von inflammatorischen Cytokinen, Typ 1 Interferon und Chemokinen führt. TLR´s aktivieren einen Signaltransduktionsweg welcher zur Produktion von inflammatorischen Cytokinen, Tumornekrosefaktor (TNF), IL-6, IL-1 β und IL-12. führt (Kawai and Akira 2007).

1.3.1 Der Toll-like Rezeptor Signalweg

Stimulierung der TLRs durch mikrobielle Komponenten aktiviert die Expression verschiedenster Gene welche in die Immunantwort involviert sind. Nach der Bindung eines spezifischen Liganden dimerisieren TLRs und lösen dadurch die assoziierte Signaltransduktions-Kaskade aus (Takeda and Akira 2005). Die Aktivierung des TLR Signalwegs erfolgt an der cytoplasmatischen Toll/Interleukin-1 receptor homology domain (TIR) Domäne. Dabei werden zwei unterschiedliche Wege aktiviert. Der myeloid differentiation factor (MyD88) abhängige Signalweg, welche alle Klassen von TLR's besitzen und der MyD88 unabhängige Weg in der Signaltransduktion von TLR3 und TLR4 (Takeda and Akira 2004).

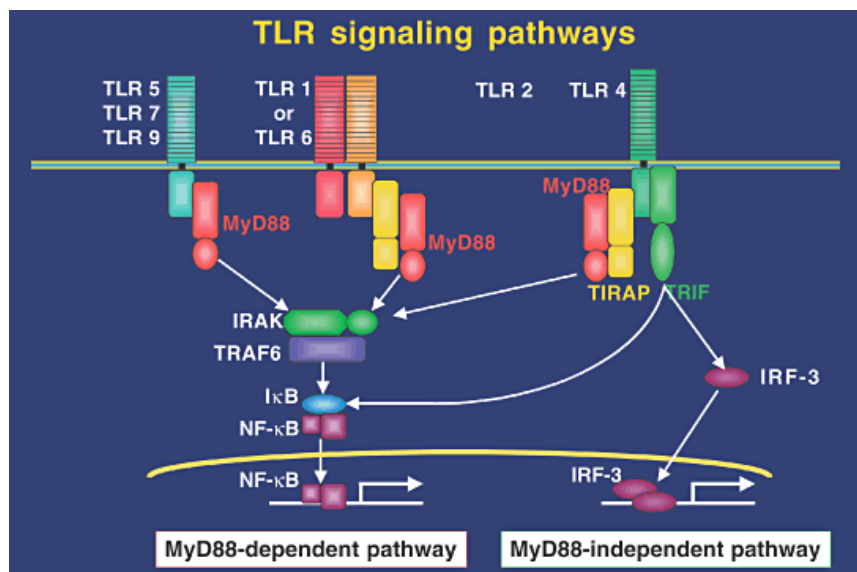


Abbildung 4: Der MyD88 abhängige und unabhängige Toll-Like Rezeptor Signalweg. www.osaka-u.ac.jp

- Der MyD88 abhängige Signalweg

Für manche TLR wird die Bindung des Liganden durch die Co-Rezeptoren CD14 und MD2 ermöglicht. MyD88 beinhaltet eine C-terminale TIR Domäne und eine N-terminale Todes Domäne die mit der TIR Domäne des TLR assoziiert. Nach Stimulierung rekrutiert MyD88 den Faktor IRAK-4 zum TLR Rezeptor durch Interaktion mit der Death Domäne und vermittelt die IRAK-4 mediiert

Phosphorylierung von IRAK-1. TRAF6 assoziiert mit aktiviertem IRAK-1 wodurch zwei unabhängige Signalwege aktiviert werden. Ein Signaltransduktionsweg führt zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors AP-1 durch die Aktivierung der MAP Kinase Kaskade.

Mittels eines zweiten Signalwegs wird der TAK1/TAB Komplex aktiviert, welcher die I κ B Kinase (IKK) aktiviert (Takeda and Akira 2005). TRAF-6 agiert als E2-Ubiquitin Protein Ligase. Zusammen mit dem E2 Ubiquitin konjugiertem Enzymkomplex bestehend aus Ubc13 und Uev1A, katalysiert TRAF-6 die Bildung einer Lysin 63(K63)- gebundenen Polyubiquitinkette an TRAF6 und die Generierung einer unkonjugierten freien Polyubiquitinkette (Xia, Sun et al. 2009, Takeuchi and Akira 2010). Ein Komplex von TGF- β -activated kinase 1 (TAK1), TAK1-binding protein 1 (TAB1), TAB2 und TAB3 aktiviert durch die unkonjugierte freie K63 Polyubiquitinkette, phosphoryliert I κ B Kinase (IKK)- β und MAP – Kinase 6. Der IKK Komplex, bestehend aus IKK- α , IKK- β und NF κ B essential modulator (NEMO) phosphoryliert I κ Ba und NF κ B Inhibitor Protein. Das phosphorylierte I κ B wird durch das Ubiquitin-Proteasom System degradiert wodurch NF κ B freigesetzt wird und in den Nucleus transloziert wo NF κ B die Transkription proinflammatorischer Cytokine einleitet (Takeuchi and Akira 2010; Negishi, Fujita et al. 2006).

- TRIF abhängige Signaltransduktionsweg

Makrophagen und dendritische Zellen, welche mit TLR3/4 spezifischen-PAMPS stimuliert werden lösen den TRIF abhängigen Signalweg aus. Dieser führt durch Aktivierung von NF κ B, MAP Kinase und IRF3 Wegs zur Produktion von proinflammatorischen Cytokinen und Typ1 Interferonen. Der TRIF abhängige Transduktionsweg wird durch die Rekrutierung von TRAF6 und RIP1 zur unabhängigen Domäne von TRIF initiiert. Ähnlich dem MyD88 Weg führt die Interaktion von TRAF6 mit TRIF zur Aktivierung von TAK1. RIP1 interagiert mit TRIF und wird einer K63 – abhängigen Polyubiquitinierung unterzogen. Für die Aktivierung von NF κ B ist ein Multiproteinkomplex erforderlich, welcher durch die Interaktion von RIP1 mit TRADD entsteht. IKKs (TBK1 und IKKi) werden mittels TRIF durch TRAF3 rekrutiert und phosphorylieren IFR3. Die Transkription des Typ 1 Interferons wird durch die Translokation von IFR3 in den Nucleus initiiert (Kumagai, Takeuchi et al. 2008).

1.4 Das Inflammasom – ein Multiproteinkomplex

Das Immunsystem unterscheidet nicht nur körpereigene Stoffe von fremden, sondern agiert ebenfalls als Sensor gefährlicher Signale, welche durch pathogene Mikroben, zellulären Stress oder durch eindringende Fremdkörper ausgelöst werden. Inflammasome sind molekulare Plattformen, welche durch Infektionen oder Stress aktiviert werden und die Reifung proinflammatorischer Cytokine (Interleukin-1 β und IL-18) beschleunigen um das angeborene Immunsystem einzuschalten (Schroder and Tschopp 2010).

1.4.1 NOD Like Rezeptoren

NOD-Like Rezeptoren (NLR) stellen ein intrazelluläres Set cytosolischer PRRs dar, welche dazu in der Lage sind PAMPs und DAMPs zu erkennen (Schroder and Tschopp 2010). Die Domänen der NLR beinhalten eine N-terminale Bindungsdomäne welche eine Protein Protein Interaktionsdomäne, eine Caspase Recruitment Domäne (CARD), sowie eine Pyrin (PYD) und eine Baculovirus Inhibitor repeat (BIR) Domäne beinhaltet. Weiters besitzen NLRs eine NOD Domäne für die Nucleotidbindung und Oligomerisierung und eine C-terminale Leucin reiche Domäne (LRR) für die Erkennung konservierter mikrobieller Strukturen und zur Modulation der NLR Aktivität (Kanneganti, Lamkanfi et al. 2007).

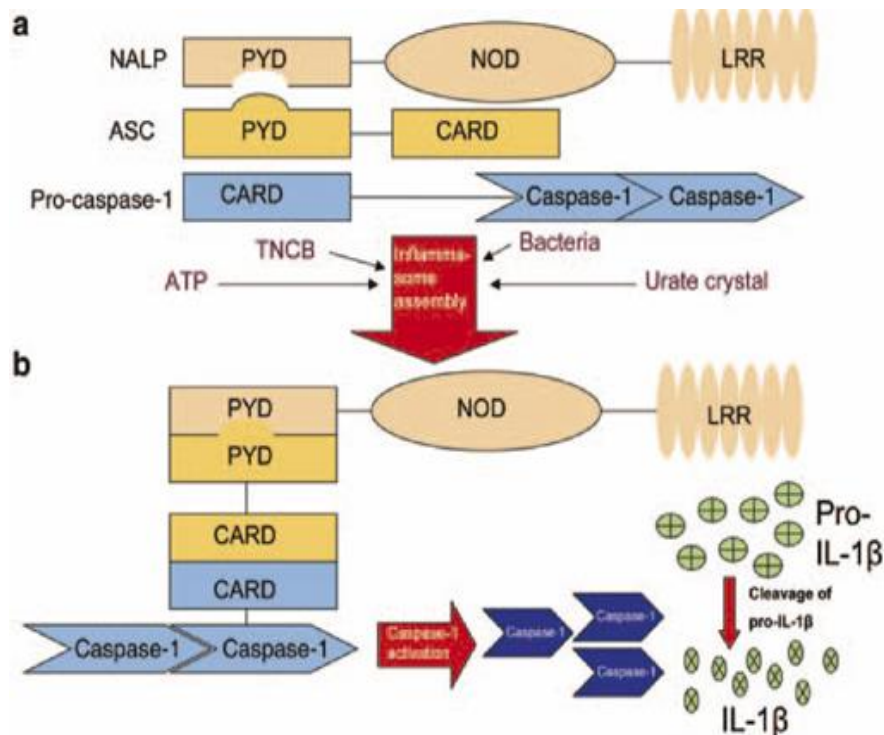


Abbildung 5 :Struktur der Aktivierung des Inflammasoms. A.)NALP3 beinhaltet eine pyridine Domäne (PYD), eine Nukleosid Oligomerisierungs Domäne (NOD), eine Leucin reiche Domäne(LRR). Weiters das Adapterprotein (ASC) welches eine Caspase-Rekrutment Domäne enthält (CARD) und die Procaspase-1. B.) Bei Aktivierung durch gefährliche Signale (Bakterien, Urate) assembliert das Inflammasome und die aktive Caspase-1 wird freigelassen. Dies führt zur Spaltung von pro-Interleukin 1-beta zum aktiven Interleukin 1 beta. (Syazdi, Inflammasome Activation in Delayed Type Hypersensitivity Reactions, Journal of Investigative Dermatology;Nature, 2013)

Die NLR Familie besteht aus 22 cytoplasmatischen Proteinen, welche fünf Mitglieder der NOD Subfamilie beinhaltet. NLRs können entweder direkt an die Caspase-1 durch eine CARD-CARD Domäne binden wie z.B. IPAF (Rubartelli 2012) oder durch Assoziation mit der Caspase-1 mittels eines Adapterproteins, welches als apoptosis-associated speck-like protein (ACS) bezeichnet wird und eine Caspase Recruitment Domäne beinhaltet (NLRP1 und NLRP3 Inflammasome). Ergebnisse zeigen, dass unterschiedliche NLR Mitglieder zum Multiproteinkomplex- Inflammasome assemblieren (NLRP1, NLRP3, NLRC4 (IPAF), NLRP6 und NLRP12) Diese NLRs erkennen verschiedenste exogene und endogene Signale (Yin, Pastrana et al. 2013). Das Inflammasom reguliert die Aktivierung der Caspase 1. Caspase 1 führt zur Prozessierung der proinflammatorischen Cytokine IL-1beta und IL-18 und weitere Substrate (Davis, Wen et al. 2011).

1.4.2 Aktivierung und Regulation des Inflammasoms

Abhängig von der Klasse des NLR ist der Multiproteinkomplex – Inflammasome mit der Fähigkeit ausgestattet, eine Bandbreite verschiedenster Signale zu erkennen und entsprechend zu reagieren. Das am besten untersuchte Inflammasome ist das NLRP3. Dieses wird durch unterschiedlichste Signale wie z.B. verschiedenste Pathogene (Staphylococcus aureus oder Candida albicans), endogene gefährliche Signal-Moleküle welche während Verletzungen des Gewebes (z.B. extrazelluläres ATP, Hyaluron, Amyloid- β fibrillen und Harnsäure) freigesetzt werden aktiviert (Rathinam, Vanaja et al. 2012). Zwei Schritte sind für die Sekretion von IL-1 β erforderlich. Im ersten Schritt induzieren TLR Agonisten die Expression und Synthese von pro-IL-1 β , welches intrazellulär akkumuliert. In einem zweiten Schritt wird durch physikalische Reize und diverse chemischer Substanzen, welche mikrobiellen Ursprungs sind oder durch Umwelteinflüsse hervorgerufen werden, die Inflammasom Aktivierung getriggert (Bauernfeind, Ablasser et al. 2011, Rathinam, Vanaja et al. 2012).

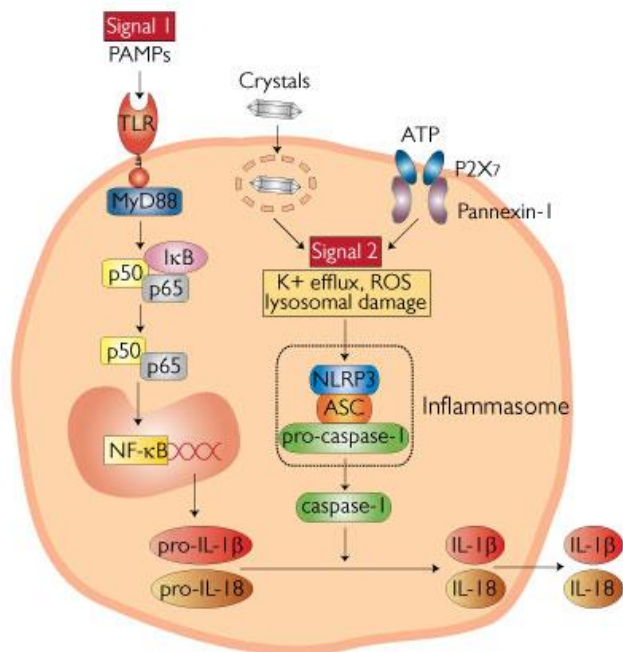


Abbildung 6: Aktivierung des NLRP3 Inflammasoms. Die Assemblierung des Inflammasome Komplexes erfolgt über zwei Signale. Das erste Signal entsteht durch Aktivierung des TLR medierten Signalweges, welcher in einer Produktion des proinflammatorischen Cytokins pro-Interleukin 1- β erfolgt. Gefährlich Signale, ROS oder Urinkristalle erzeugen das zweite Signal. Es erfolgt die Inflammasom Asemblierung und die Aktivierung der Caspase-1. (<http://www.invivogen.com/review-nlrp3-inflammasome>)

Drei unterschiedliche Modelle der Aktivierung werden derzeit in der Literatur beschrieben. Das „Kanal Modell“ beschreibt die Aktivierung des NLRP3 – Inflammasoms durch extrazelluläres ATP, welches bei Nekrose oder Schädigung der Zelle sekretiert wird. Die ATP medierte Aktivierung des Inflammasoms basiert auf der Stimulation des ATP spezifischen Ionenkanals P2X7 welcher den Kaliumstrom und die Rekrutierung von Pannexin (ein Porin) beschleunigt. In dieser Konstellation wirkt Pannexin 1 als Membrankanal welcher Ionen und Signalmoleküle zwischen dem Cytoplasma und dem extrazellulären Raum transportiert. Dadurch werden extrazelluläre Moleküle welche NLRP3 aktivieren können in die Zelle eingeschleust und interagieren mit NLRP3. Die Bildung der Poren führt zu Kalium Efflux, wodurch NLRP3 ebenfalls aktiviert werden kann.

Das zweite Modell beschreibt die Aktivierung des Inflammasoms welche durch eine Ruptur des Lysosoms hervorgerufen wird. Aluminium oder Silikate sind große Partikel und bei ineffizienter Entgiftung dieser Partikel durch Phagozytose kann eine Destabilisierung des Phagosoms erfolgen. Bei einer Ruptur des Lysosoms wird das lysosomale Protein Cathepsin B in das Cytoplasma freigesetzt, welches direkt oder indirekt die Aktivierung des Inflammasoms mittels eines bis jetzt noch nicht bekannten Weges initiiert.

Das dritte Modell beschreibt NLRP3 als generellen Sensor für zellulären Stress, der durch ROS ausgelöst wird. Die ROS Generierung ist von einem Kalium Efflux begleitet. Eine Möglichkeit wäre, dass eine niedrige intrazelluläre Kalium Konzentration die ROS Produktion fördert und vice versa (Tschopp and Schroder 2010). Die Redoxhypothese entstand durch Befunde, die zeigen, dass Myeloidzellen wenn sie Inflammasome Signalen ausgesetzt werden die Aktivierung der NADPH Oxidase und die Produktion von ROS initiieren. Wenn die Bildung von ROS in vitro durch Inhibitoren unterdrückt wird oder die NADPH Oxidase pharmakologisch inhibiert wird, ist die Caspase-1 Aktivierung und die IL-1 β Sekretion beeinträchtigt. Diese Ergebnisse zeigen, dass eine Inflammasom Aktivierung von der ROS Produktion und der NADPH Oxidase abhängig ist (Rubartelli 2012). Neueste Studien zeigen, dass NLRP3 Agonisten, abhängig von ROS, die Dissoziation des Thioredoxin-Interaktions Protein (TXNIP) vom Thioredoxin initiieren. Freies TXNIP bindet dann an NLRP3 und führt zur Aktivierung des NLRP3 Inflammasoms. Bei

einer TXNIP Defizienz ist die Aktivierung teilweise beeinträchtigt (Yin, Pastrana et al. 2013).

1.4.3 Inflammasomklassen und seine Komponenten

Das NLRC4 Inflammasome wird durch bakterielles Flagellin und PrgJ, eine Komponente des Typ III Sekretionssystems (T3SS) aktiviert und die Assemblierung erfolgt direkt über CARD-CARD homotypische Interaktion mit Caspase-1 (Miao, Mao et al. 2010, Rathinam, Vanaja et al. 2012). Das Adapterprotein ACS wird somit nicht benötigt (Miao, Alpuche-Aranda et al. 2006). NLRP1 ist das erste Inflammasom, welches beschrieben wurde und wird hauptsächlich durch das letale Toxin von *Bacillus anthracis* aktiviert. In Gegensatz zum humanen NLRP1 ist das NLRP1 codierende Gen der Maus polymorph mit drei Homologen: NLRP1a, NLRP1b und NLRP1c. Durch Variation in NLRP1b wird eine Resistenz verhindert und die Sensitivität gegenüber dem Toxin erhöht (Newman, Printz et al. 2010). Bakteriell Muramin-Dipeptid ist ebenfalls ein Stimulator. Das Adapterprotein ACS ist nicht notwendig, da NLRP1 eine CARD Domäne für die Interaktion mit Caspase-1 beinhaltet allerdings erhöht ACS die Aktivität des Inflammasoms (Faustin, Lartigue et al. 2007). Nonhämatopoetische Kompartimente exprimieren NLRP6 und regulieren die intestinale Homöostase. Das NLRP6 Inflammasom ist laut Puplicationen bei der Ausbildung von Adipositas, intestinalen Entzündungen und Tumorgenese involviert. Für die Regulation der Mikroflora und die Erkennung eindringender Bakterien ist ebenfalls das NLRP6 Inflammasom verantwortlich. Studien zeigen, dass NLRP6 knockout Mäuse ein verändertes intestinales mikrobielles Milieu aufweisen und eine Prädisposition für Colitis, eine entzündliche Darmerkrankung, aufweisen (Vladimer, Marty-Roix et al. 2013).

1.4.4 Interleukin 1 β und IL-18

Inflammatorische Caspasen (auch bekannt als Gruppe 1 Caspasen) werden beim Menschen durch drei Gene, humane Caspase-1, Caspase-4 und Caspase-5 codiert. In der Maus codieren ebenfalls drei Gene nämlich, Caspase-1, Caspase-11 und Caspase-12. In Säugetiere sind Caspasen durch Anwesenheit einer N-Terminus CARD Domäne charakterisiert. Diese Caspasen werden „inflammatorische Caspasen“ genannt da die Hauptsubstrate proIL-1 β und proIL-18 sind. (Martinon and Tschopp 2007) Interleukin- 1 β ist ein essentielles proinflammatorisches Cytokin und spielt eine wichtige Rolle in Entzündungsprozessen. Die Produktion wird sowohl auf transkriptioneller als auch auf post-translationeller Ebene reguliert. Die Aktivierung und Freisetzung wird durch die Cysteinprotease, Caspase-1 kontrolliert. Caspase-1 ist auch für die Prozessierung und Sekretion von Interleukin-18 und anderer Proteine wie z.B. Interleukin- α und Fibroblasten Wachstumsfaktor 2 verantwortlich. Caspase-1 wird als inaktives Zymogen (pro-Caspase-1) synthetisiert und erst nach einer kontrolliert Dimersierung im Inflammasome katalytisch aktiviert (Strowig, Henao-Mejia et al. 2012).

Die Interleukin-1 Superfamilie beinhaltet 11 Cytokine, darunter IL-18 und IL-1 β , welche ein komplexes Netzwerk von proinflammatorischen Cytokinen regulieren. (Dinarello 2011) IL-1 β wird wie bereits erwähnt, als Proform (31kD) synthetisiert und durch eine spezifische Protease in die reife Form (17kD) gespalten. (Dinarello 1996)

Viele Zelltypen einschließlich Monocyten und Makrophagen sekretieren die aktive IL-1 β Form. IL-1 β wird in die Zirkulation freigelassen und stimuliert den IL-1 Rezeptor im Hypothalamus wodurch die Cyclooxygenase-2 (COX2) Synthese ansteigt und Prostaglandin E2 vermehrt gebildet wird. Das Resultat dieser Schritte ist die Aktivierung des thermoregulatorischen Zentrums wodurch Fieber entsteht. Die Produktion von IL-6 wird in der Peripherie durch Aktivierung des IL-1 Rezeptors im Endothel aktiviert. Hepatocyten der Leber synthetisieren, angeregt durch zirkulierendes IL-6 verschiedene Akut-Phasen Proteine. Ebenfalls wird die Mobilisierung von Vorläufer Granulocyten und reifer Neutrophiler gefördert was zu

einer peripheren Neutrophilie führt. Ebenfalls steigert IL-6 (induziert durch IL-1) die Produktion von Blutplättchen. Dies führt zu einer Thrombocytose in der Peripherie. Anämie ist ebenfalls eine Folge von IL-1 Stimulierung. (Dinarello 2005)

Interleukin-18 wurde in früheren Publikationen als „IFN- γ -inducing factor“ bezeichnet (Tominaga, Yoshimoto et al. 2000) IL-18 wird bei chronischen Entzündungen, Autoimmunerkrankungen, bei verschiedenen Krebsarten und Infektionen exprimiert. IL-18 wird analog zu IL-1 β als inaktive Proläuferform (24kD) ohne Signalpeptid (pro-IL-18) gebildet. Interleukin 1 β converting enzyme (Caspase-1) spaltet pro-IL18 in die biologisch aktive Form, IL-18 (18kD) (Ghayur, Banerjee et al. 1997, Gracie, Robertson et al. 2003). IL-18 steigert die Reifung von T- und NK Zellen, die Produktion von Cytokinen und Cytotoxizität (Okamura, Tsutsi et al. 1995, Micallef, Ohtsuki et al. 1996, Dao, Mehal et al. 1998, Yoshimoto, Takeda et al. 1998).

IL-18 wird in hämatopoetischen und nicht hämatopoetischen Zellen identifiziert. Makrophagen, Dentritische Zellen, Kupffer Zellen, Keratinocyten, Osteoblasten, intestinale Epithelzellen, Mikroglia und synoviale Fibroblasten exprimieren IL-18. Ergebnisse zeigen, dass IL-18 in der Immunabwehr und bei Entzündungen durch Kooperation mit einer Kaskade von Cytokinen wie z.B. IL-12 und IL-15 involviert ist (Gracie, Robertson et al. 2003).

1.4.5 Die Pyroptose

Caspase-1 ist für Pyroptose, eine Form des Zelltods, verantwortlich, welcher durch eine Kombination aus der charakteristischen Apoptose und Nekrose gekennzeichnet ist (Strowig, Henao-Mejia et al. 2012).

Die Pyroptose unterscheidet sich morphologisch und mechanisch von anderen Formen des Zelltods. Caspase-1 ist nicht in die Apoptose involviert und Caspase-1 knockout Mäuse zeigen keine Defekte in der Apoptose. Die Caspasen welche Apoptose auslösen (Caspase-3, Caspase-6 und Caspase-8) sind auch nicht in der Pyroptose beteiligt. Weiter findet bei der Pyroptose in Gegensatz zur Apoptose kein Verlust der mitochondrial Integrität sowie keine Freisetzung von Cytochrom C statt, welches zur Aktivierung der apoptotischen Caspasen führt. Bei der Pyroptose findet eine sehr schnelle Ruptur der Plasmamembran und eine Lyse der Zelle statt. Begleitend dazu werden proinflammatorischer intrazellulärer Inhalte (Bergsbaken, Fink et al. 2009).

2 Zielsetzung und Hypothese

Aufbauend auf der Hypothese, dass 2-Chlorhexadecanal als Strukturanalog von Palmitinsäure einen TLR-Liganden darstellen könnte, versuchte ich in der vorliegenden Arbeit folgende Fragen abzuklären:

- 1.) Dient 2-ClHDA als Ligand für TLRs?
- 2.) Expressieren BMVEC Inflammasomkomponenten?
- 3.) Kann 2-ClHDA das Inflammasome aktivieren und die Prozessierung von Procaspase-1 induzieren.?
- 4.) Führt 2-ClHDA in BMVEC zur Synthese von inflammatorischen IL-1 β ?

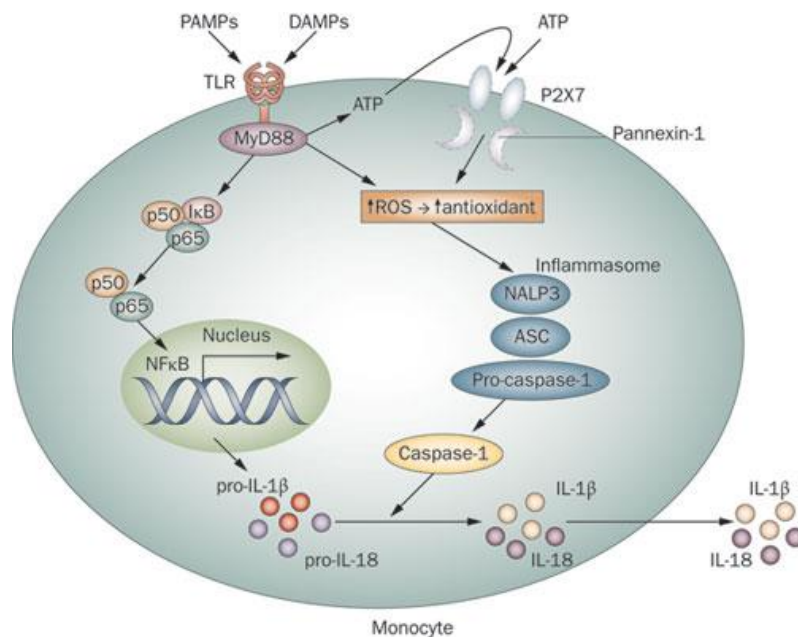


Abbildung 7: Aktivierung des Multiproteinkomplex- Inflammasom durch Aktivierung des Toll-Like Rezeptor 4 Signalweges und der Produktion reaktiver Sauerstoffspezies. Nature,2011

3. Material und Methoden

Die Materialien welche bei den Experimenten verwendet wurden sind in den folgenden Tabellen (Tab.1-4) aufgelistet.

Tabelle 1: Synthese von 2-CIHDA

Bezeichnung	Firma
Hexadecanal	Toronto Research Chemicals Inc. Kanada
Silicagel60	Merck Deutschland
PFB Hydroxylamin	Merck Deutschland
Prolin	Merck Deutschland
Ethanol	Merck Deutschland
Weitere Chemikalien	Roth und Sigma Aldrich Österreich

Tabelle 2: Medien und Zellkulturmaterialien

Bezeichnung	Firma
Dulbecco´s modified Eagle medium (DMEM)/High Glucose	Gibco Life Technologies
Earl´s Salts (MEM 199),	Gibco Life Technologies
RPMI 1640 Medium	Gibco Life Technologies
Trypsin, Fetal calf serum (FCS)	Gibco Life Technologies
Streptomycin, Penicillin (P/S)	Gibco Life Technologies
CD Lipid Concentrate	Gibco Life Technologies
HEPES Buffer Solution	Gibco Life Technologies
Gentamycin	Gibco Life Technologies
Ascorbinsäure	Sigma Aldrich, Wien, Österreich
Normocin	Invivogen, San Diego, USA
Zellkultur Plastik	Greiner, Österreich, Kremsmünster
Lipopolysaccharid crude	Sigma Aldrich, Österreich
Lipoteichonsäure (LTA-SA Ultrapure)	Invivogen, San Diego, USA
Lipopolysaccharid (LPS-EB Ultrapure),	Invivogen, San Diego, USA
Cli-095	Invivogen, San Diego, USA
Quanti-Blue Reagent	Invivogen, San Diego, USA

Tabelle 3: Isolierung primärer Endothelzellen des Schweinegehirns

Bezeichnung	Firma
Percoll Minimal Essential Medium	Gibco Life Technologies
Earl´s Salts (10x),	Gibco Life Technologies
Collagenase	Sigma Aldrich, Österreich
Dispase	Invivogen, San Diego, USA
Dextran	Invivogen, San Diego, USA

Tabelle 4: Kits

Bezeichnung	Firma
RNAeasy Mini plus Kit	Qiagen Company
Superscript III Reverse Transcriptase	Invitrogen, Life Technologies
QuantiFast SYBR Green PCR	Qiagen Company
QuantiTect Primer Assay Casp1 (QT00001568)	Qiagen Company
QuantiTect Primer Assay NLRP3 (QT01666343)	Qiagen Company
Caspase1 colorometric Assay	Biovision, Kalifornien, USA
BCA – Protein Assay	Thermo Scientific, Rockford, USA

3.1 Synthese von 2-Chlorohexadecanal

3.1.1 Enantioselektive Chlorierung

Die Synthese von 2-Chlorohexadecanal (2-ClHDA) wurde analog der Synthese von 2-Chloroheptanal laut Protokoll, Supplementary Material (ESI) for Chemical Communications, The Royal Society of Chemistry 2010, durchgeführt.

Die Reaktion wurde mit $4,16 \cdot 10^{-4}$ mol Hexadecanal und $8,3 \cdot 10^{-5}$ mol Prolin (0,2 equiv.) und $6,2 \cdot 10^{-4}$ mol N-Chlorosuccinimid (1,5 equiv.) in Hexan auf Eis gestartet. Anschließend wurde die Reaktion langsam unter Rühren über Nacht auf RT gebracht. Die Syntheseprodukte wurden anschließend mit Dünnschichtchromatographie (DC) überprüft.

Die Dünnschichtchromatographie (DC) ist ein physikalisch-chemisches Trennverfahren. Die stationäre Phase besteht aus einer dünnen Schicht eines feinkörnigen Materials in diesem Fall Kieselgel (Normalphasenchromatographie) welches auf einer Aluminiumschicht aufgebracht ist. Als mobile Phase (Laufmittel) dient ein Gemisch in welchem der Analyt gelöst ist. Die Chromatographie basiert auf der unterschiedlichen Wechselwirkung des Analyten mit der stationären und der mobilen Phase.

Die NCS – Synthese von 2-ClHDA wurde mittels DC überprüft. Hexan/Ethylether (8:1, v/v) diente als Laufmittel. Anhand des Vergleichs der Laufstrecke (R_f -Wert) der Probe mit dem Standard kann überprüft werden ob die Synthese von 2-ClHDA erfolgreich durchgeführt werden konnte. Als Standard wurden je 10 μ l Hexadecanal (1 mg/ml) und 2-ClHDA (1 μ g/ml) aufgetragen.

Zur Abtrennung von Syntheserückständen wurde das Produkt mittels einer Pasteurpipette und einem Filtertuch filtriert. 2-CIHDA wurde nachfolgend mittels Festphasenextraktion auf einer Silica60 Säule gereinigt

Für die Extraktion von 2-CIHDA wurde Silicgel60 in Hexan/Ethylether (8:1, v/v) suspendiert und die Chromatographiesäule mit der stationären Phase (Silicagel60) dicht gepackt. Das Syntheseprodukt wurde im Laufmittel Hexan/Ethylether (8:1, v/v) gelöst und auf die Säule aufgetragen. Die Elution von 2-CIHDA erfolgte mit Hexan/Ethylether (8:1, v/v). Die Fraktionen wurden mittels DC überprüft. Die Fraktionen welche eine hohe Reinheit von 2-CIHDA aufwiesen wurden vereint und mit einer DC überprüft. Anschließend erfolgte die Vereinigung der Fraktionen und die Aufreinigung mittels einer Pasteurpipette und einem Filtertuch zur Abtrennung des Kieselgels. Das Syntheseprodukt wurde unter Stickstoff getrocknet. Zur Abschätzung der Ausbeute der Synthese wurde die Probe gewogen. Anschließend wurde die Fraktion in Toluol gelöst und zu je 250 µg 2-CIHDA in 50 µl Toluol aliquotiert und bei -70°C aufbewahrt.

3.1.2 GC-MS Analytik von 2-Chlorohexadecanal

Die Überprüfung der Reinheit von 2-ClHDA erfolgte mit GC-MS. Hierfür wurden die Proben laut eines bereits beschriebenen Protokolls derivatisiert. Für die Derivatisierung wurde 2-ClHDA (1 µg) in 100 µl Ethanol gelöst und mit 100 µl PFB Hydroxylamin in Ethanol (6mg/ml) versetzt. Nach einer Stunde Inkubation bei 25°C wurde 1ml dest. Wasser zugegeben und das PFB Oxim Derivat mit Hexan/Diethylether (4:1, v/v) extrahiert und unter Stickstoff getrocknet. Die Probe wurde in 100 µl Hexan gelöst und in ein Autosampler Vial überführt. (Ullen, Fauler et al. 2010)

Die Probe wurde auf einer Thermo Scientific Trace GC Ultra (mit Helium als Trägergas, 2ml/min) mit einer SSGE BPX5 Kapillarsäule (15°m, beschichtet mit 0,25 µm Methyl silikon) aufgetrennt und analysiert. Ein DSQII Massenspektrometer (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) wurde zur Detektion verwendet.

Die Analyse erfolgte durch negativ chemische Ionisierung (NCI) mit Methan als Reaktantengas und im Full Scan Modus.

3.2 Zelllinien und Zellkultur

Bei den HEK BLUE TLR2/TLR4 Zelllinien handelt es sich um humane embryonale Nierentumorzellen (HEK 293 Zellen) welche mit den Genen die für den humanen Toll-like Rezeptors 2 (TLR2) bzw. des TLR4, die MD-2/CD14 Corezeptoren und der sekretierten, alkalischen Phosphatase (SEAP) kodieren, cotransfiziert wurden. HEK BLUE Zellen wurden in DMEM Medium, welches 4,5 g/l Glucose, 10% (v/v) FCS, 1% (v/v) Penicillin-Streptomycin, 100 µg/ml Normocin und 2 mM L-Glutamin enthielt bei 37 °C und 5% CO₂ kultiviert.

Die hCMEC/D3_Zelllinie dient als Blut-Hirnschranken Modell und wurde uns freundlicherweise von Prof. O. Couraud (INSERM, Paris) zur Verfügung gestellt. Dieses Modell eignet sich zur Untersuchung zellulärer und molekularer, pathogener Prozesse und Stofftransportanalysen. hCMEC/D3 Zellen wurden von microvasculären Gefäßen des humanen Temporallappens während eines chirurgischen Eingriffs isoliert. Anschließend wurden die Zellen durch Transduktion eines lentiviralen Vektors mit der katalytischen Untereinheit der humanen Telomerase (hTERT) und dem SV40 T Antigen, immortalisiert. Die hCMEC/D3 Zellen wurden selektiv isoliert und die Klone charakterisiert (Weksler et al 2005 2013).

hCMEC/D3 Zellen wurden in mit Rattenkollagen (150 µg/ml in PBS) beschichteten Zellkulturflaschen bei 37 °C und 5% CO₂ kultiviert. Als Nährmedium diente Earl's Salts (MEM199) Medium welches 10% (v/v) FCS, Ascorbinsäure (5 µg/ml), Hydrocortisone (1,4 µM), 1% (v/v) Chemically Defined Lipid Concentrate, 1% (v/v) Penicillin-Streptomycin, HEPES (10 mM) und bFGF (1ng/ml) enthielt/beinhaltete.

TH-P1 Zellen/Monocyten wurden aus dem Blut eines Patienten (männlich, 1 Jahr, welcher an akuter monocytitischer Leukämie litt, isoliert. Die Zelllinie exprimiert hohe Mengen der NLRP3 Inflammasom Komponenten und wurde in dieser Studie als Modellsystem zur Untersuchung der LPS induzierten Aktivierung von Caspase-1 verwendet. TH-P1 Zellen wurden in RPMI 1640 Medium, welches 4,5 g/l Glucose, 2 mM L-Glutamin, 10% (v/v) FCS und 1% (v/v) Penicillin-Streptomycin enthielt bei 37 °C und 5% CO₂ kultiviert.

3.2.1 Isolierung primärer Schweinegehirndothelzellen

Präparationsmedium: Earl's Salts (MEM199), 1% (v/v) Penicillin-Streptomycin, 1% (v/v) Gentamycin, 1% (v/v), 1 mM Glutamin.

Medium A: Präparationsmedium mit 10% (v/v) FCS.

Medium B: Medium A ohne Gentamycin.

BMVEC (Zellen) wurden durch eine Kombination aus mechanischer Zerkleinerung, enzymatischen Verdau und Zentrifugationsschritten aus frisch entnommenen Schweinehirnen (vom Schlachthof) isoliert. Oberflächliche Gefäße und Gehirnhäute wurden unter sterilen Bedingungen entfernt und der Cortex (graue und weiße Substanz) anschließend mit einem Skalpell (spezielles Rollskalpell) zerkleinert und homogenisiert. Daraufhin wurde das zerkleinerte/homogenisierte Gewebe in Präparationsmedium unter kontinuierlichem Rühren bei 37 °C einem proteolytischen Verdau mit 0,1% (w/v) Dispase unterzogen (Dauer: 1-2 h). Das Homogenat wurde mit 150 ml Dextranlösung (16%, w/v) versetzt um eine Endkonzentration von 10% (w/v) Dextran zu erreichen und anschließend bei 6800 x g zentrifugiert (10 min 4 °C). Mittels eines Zellsschabers wurde das Myelin entfernt und das Zellpellet in Medium A resuspendiert. Für die Entfernung größerer Gefäße wurde die Zellsuspension durch ein 180 µm Nylon-Netz filtriert. Mikrovaskuläre Gefäße wurden anschließend mit 0,03% (w/v) Collagenase/Dispase für 5 min bei 37 °C unter kontinuierlichem Rühren verdaut. Freigesetzte BMVEC-Aggregate wurden durch Zentrifugation (140 x g für 10 min bei Raum Temperatur (RT)) pelletiert. Das Zellpelett wurde in 5 ml Medium A aufgenommen und die Zellen mittels Gradientenzentrifugation (1300 x g für 10 min bei RT) in einem Percollgradienten (untere Phase: 20 ml mit 10,3 g/ml; obere Phase: 15ml mit 1,07 g/ml) weiter gereinigt. BMVEC-Aggregate aus der Interphase wurden mit Medium A gewaschen, durch Zentrifugation (900 x g für 10 min bei RT) pelletiert und je nach Ausbeute in Medium A aufgenommen. Danach wurden die Zellsuspension in mit Kollagen (60 µg/ml) beschichteten 75 cm² großen Zellkulturflaschen ausgesät und die Zellen bei 37 °C kultiviert. Am darauffolgenden Tag wurden die Zellen mit PBS gewaschen und anschließend in Medium B bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. BMVEC wurden maximal 1 mal passagiert (Üllen et al 2012).

3.2.2 Bestimmung der Zellzahl

Die Zellzahl wurde mit dem Countess® Automated Cell Counter (Life Technologies) bestimmt. Durch vorhergehende Trypan-Blau Färbung kann dabei sowohl die Zellzahl als auch die Viabilität gemessen werden.

Hierfür wurden 10 µl der Zellsuspension mit 10 µl Trypan-Blau versetzt. Die gefärbte Zellsuspension wurde anschließend in ein Countess®Chamber Slide überführt und für 30 s im Cell Counter/in der Zählmaschine vermessen/gemessen..

3.3 Etablierung des HEK BLUE TLR4 und TLR2 Reportersystems

Das Gen, welches für die sekretierte alkalische Phosphatase (SEAP) kodiert befindet sich bei HEK BLUE Zellen unter der Kontrolle eines IL-12 p40 Minimalpromoters und ist an fünf NF- κ B und einer AP-1 Bindungsseite fusioniert. Bei Stimulation des jeweiligen TLR-Rezeptors mit einem spezifischen Liganden wird NF- κ B und AP-1 aktiviert und es erfolgt die Expression der SEAP. Der Überstand wurde mit 180 μ l Quanti-Blue Reagenz versetzt. In Anwesenheit von SEAP erfolgt ein Farbumschlag von Quanti Blue von rosa auf dunkelviolett und die Auswertung wird photometrisch bei 620-655 nm durchgeführt.

In einer ersten Versuchsreihe wurden HEK BLUE Zellen in Gegenwart spezifischer TLR2 und TLR4 Agonisten inkubiert. Dabei wurden die Zellen in einer 24-Well Platte (250.000 Zellen/Well) ausgesät und anschließend mit Lipopolysaccharid (LPS; TLR4 Agonist) oder Lipoteichonsäure (LTA; TLR2 Agonist) stimuliert. Nach 24 h wurden 180 μ l Quanti Blue Reagenz in eine 96-Well Platte vorgelegt und mit 20 μ l des Zell-Überstandes vermischt. Die photometrische Quantifizierung erfolgte mit einem Viktor 1420 Multiplattenlesegerät (Wallac).

In einigen Versuchen wurden LPS-induzierte HEK BLUE TLR4 Zellen unter An- oder Abwesenheit des TLR4 spezifischen Inhibitor/Antagonisten Cli-095 vorinkubiert (Endkonzentration: 3 μ M; 24 h).



Abbildung 8: Farbumschlag de Quanti-Blue Substrats von rosa auf violett nach Expression (und anschließender Sekretion) der SEAP in LPS-stimulierten HEK Blue TLR4 Zellen.
www.invivogen.com

3.3.1 Aktivierung der HEK BLUE TLR4 und TLR2 Zellen mit 2-CIHDA

Zur Untersuchung ob 2-CIHDA ein potentieller TLR4 oder TLR2 Ligand ist wurden HEK Blue TLR4/TLR2 Zellen in 24-Well Platten (250.000 Zellen/Well) ausplattiert. Anschließend wurden die Zellen in Gegenwart von 2-CIHDA für 8, 17 und 24 h inkubiert. Als Vehikelkontrolle fungierte DMSO (Endkonzentration: 0,2% (v/v)). Die Quantifizierung der Expression der SEAP erfolgte wie bereits beschrieben.

Der Versuch wurde in Gegenwart von 2-Chloro Palmitinsäure (2-CIHA) bzw. 2-Chloro Hexadecanol (2-CIHOH) anstelle von 2-CIHDA unter den gleichen Bedingungen durchgeführt.

3.4. Analyse der Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) in Gegenwart von 2-CIHDA

Die Bildung von ROS in hCMEC/D3 Zellen in Gegenwart von 2-CIHDA wurde durch Verwendung eines fluoreszierenden Dichlorfluorescein- (DCF) Farbstoffs untersucht. Das nicht fluoreszierende Derivat Dichlorfluorescein Diacetat (H_2DCFDA) wird nach Internalisierung und erfolgter Hydrolyse durch ROS zum fluoreszierenden DCF oxidiert (Wang and Joseph 1999). Der Versuch wurde von Dr. Andreas Ullen (Institut für Biochemie und Molekularbiologie, Medizinische Universität, Graz) durchgeführt (Ullen, Fauler et al. 2012)

Konfluente BMVEC in 6-Well Platten wurden in PBS in Gegenwart von H_2DCFDA (Endgültige Konzentration: 10-25 μM) für 1 h bei 37 °C im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurde PBS durch Serum freies Medium ersetzt und mit 2-CIHDA (15 und 15 μM) für 1 und 5 h bei 37 °C im Dunkeln behandelt. Daraufhin wurden die Zellen mit eiskalten PBS gewaschen und die Platten auf Eis für 10 min inkubiert. Die Zelllyse erfolgte mit 300 μl 3% (v/v) TritonX-100 in PBS am Schüttler (1350rpm) bei 4 °C für 60 min im Dunkeln. Anschließend erfolgte die Zugabe von 50 μl Ethanol und die Platten wurden weitere 15 min geschüttelt um eine komplette Solubilisierung des deacetylierten und oxidierten DCF zu gewährleisten. Anschließend wurde zur Entfernung von Zelltrümmern die Zelllysate in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und zentrifugiert (13.000 rpm für 10 min bei 4° C). Für die Auswertung wurden 200 μl des Überstandes in eine schwarze 96-Well Platte überführt und die Fluoreszenz bei 485/535 nm (Extinktion/Emission) mit einem Viktor1420 Multiplattenlesegerät gemessen. Aliquots wurden für die Bestimmung der Proteinkonzentration mittels BCA Protein Assay verwendet

3.5. Analyse der Ceramidebildung in hCMEC/D3 Zellen in Gegenwart von 2-Chlorohexadecanal

Die Bildung von Ceramiden in hCMEC/D3 infolge der Behandlung der Zellen mit 2-CIHDA wurde von Dr. Christoph Nußhold (Institut für Biochemie und Molekularbiologie, Medizinische Universität, Graz) durchgeführt.

hCMEC/D3 Zellen wurden in 6-Well Platten ausplattiert und bei 37°C kultiviert. Konfluente hCMEC/D3 wurden in serumfreien MEM199 Medium über Nacht synchronisiert und anschließend mit 2-CIHDA (Endkonzentration: 25 µM) für 1, 3 und 5 h behandelt. Danach wurden die Zellen 2 mal mit eiskaltem PBS gewaschen und mit einem Zellschaber in 500 µl PBS geerntet. Nach der Zentrifugation der Zellsuspension (1500 x g für 5 min bei 4 °C) wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet bei -80 °C für den weiteren Gebrauch aufbewahrt.

Für die Lipidextraktion wurde das Zellpellet in 300 µl H₂O (4 °C) aufgenommen und die Zellen anschließend unter der Verwendung eines Ultraschall-Stabs (2x15 s auf Eis) homogenisiert. Danach wurden je zwei 15 µl Aliquots für die Proteinbestimmung, welche nach der Methode von Bradford durchgeführt wurde, entnommen. Die restliche Zellsuspension wurde mit 1 ml CHCl₃/MeOH (2:1, v/v) versetzt und nach Zugabe des internen Standards (Ceramid (d18:1/17:0)) erfolgte die Lipidextraktion nach der Methode von Folch (Folch and Lies, 1957). Die unter N₂ getrockneten Lipidextrakte wurden für die nachfolgende LC-MS Analyse (durchgeführt von Gerald Rechberger, Institut für Biochemie, ZMB Graz) bei -20°C aufbewahrt.

3.6 Analyse der Genexpression *CASP1*, *NLRP3*

Ziel dieses Experiments war, mittels RT-PCR zu überprüfen, ob hCMEC/D3 (Zellen) Komponenten des Inflammasoms exprimieren. Für die Analyse der Genexpression von *CASP1* und *NLRP3* wurden hCMEC/D3 in 6-Well Platten ausplattiert und bei 37 °C inkubiert. Konfluente Zellen wurden über Nacht mit Serumfreien Medium MEM199 synchronisiert/inkubiert. Danach wurden die Zellen mit LPS-EB Ultrapure (Enkonzentrationen: 200, 500 und 1000 ng/ml) für 0,5, 3 und 5 h stimuliert.

Die Isolierung der RNA aus hCMEC/D3 Zellen erfolgte mit dem RNAeasy mini Präp plus Kit (Qiagen) laut dem beigelegten Protokoll.

Die Zellen wurden mit 600 µl Puffer RPM lysiert. Das Lysat wurde auf QIAShredder Säulchen überführt und durch Zentrifugation (13.000 rpm, 2 min) homogenisiert. Zur Entfernung genomischer DNA wurde das Eluat auf gDNA Eliminator Säulchen überführt und bei 10.000 rpm für 10 min zentrifugiert. Anschließend wurde die Membran RNAeasy Säulchen mit 70%-igen Ethanol gewaschen (Zentrifugation: 10.000 rpm für 15 s). Darauffolgend wurde die Membran zuerst mit 700 µl Puffer RW1 und anschließend 2x mit 500 µl Puffer RPE gewaschen (Zentrifugation: je 10.000 rpm für 15 s). Um Puffer-Reste vollständig zu entfernen wurde nach dem letzten Waschschrift 2 min bei 10.000 rpm zentrifugiert. Anschließend wurde die RNeasy Säule auf ein RNase-freies 1,5 ml Reaktionsgefäß platziert und die RNA wurde nach Zugabe von H₂O bidest. (Volumen: 30 – 50 µl) durch Zentrifugation (10.000 rpm für 1 min) eluiert.

Die Quantifizierung der RNA erfolgte mittels Nanodrop

Der Nanodrop (NanoDrop® Spectrophotometer ND-1000, peQLab Biotechnology GmbH, Erlangen/Germany) ist ein Spektrophotometer zur Quantifizierung von Nukleinsäuren und Proteinen. RNase freies Wasser wurde als Blank verwendet. Jeweils 2 µl Probe wurde auf die Probenplatte aufgebracht und die Konzentration automatisch berechnet. Ebenfalls wird bei dieser Methode durch

Bestimmung des Quotienten von OD260/OD280 die Reinheit der isolierten RNA überprüft. Der Quotient sollte in einem Bereich zwischen 1,8 und 2,1 liegen.

3.6.1 Synthese in cDNA für RT-PCR

Für die RT-PCR wurde RNA von hCMEC/D3 Zellen in cDNA mit dem SuperscriptIII Reverse Transcriptase Kit umgeschrieben. Die Durchführung erfolgte nach dem beiliegenden Herstellerprotokoll von Invitrogen, Life Technologies. Für die Synthese der cDNA wurde folgender Mastermix I (3 µg RNA, 1 µl dNTP Mix (10 mM), 1 µl random Hexamer Primer (50 - 250 ng)) vorbereitet. Die Mischung wurde bei 65°C für 5 Minuten erhitzt und anschließend für eine Minute auf Eis gekühlt.

Anschließend erfolgte die Zugabe des Mastermix II (4 µl First Strand Buffer (5x), 1 µl DTT (0,1 M), 1 µl SuperScriptIII (200 Units/µl)). Es folgte eine Inkubation bei 50°C für 30-60 Minuten und die Reaktion wurde anschließend bei 70° für 15 Minuten gestoppt. Die cDNA wird bei -70 °C gelagert

3.6.2 Realtime – PCR

Die RT-PCR wurde mit dem QuantiFast SYBR Green PCR Kit laut Herstellerprotokoll (Qiagen) durchgeführt. Der QuantiFast SYBR Green PCR Kit von Qiagen liefert eine hohe Spezifität und sensitive Resultate. Der Fluoreszenz Dye SYBR Green I Master Mix erlaubt eine Analyse vieler verschiedener Targets ohne, dass eine Targetspezifische Synthese einer markierten Probe durchgeführt werden muss. Für die RT PCR wurde der QuantiTec Primer Assay (QT Nummern (Casp1 und NLRP3 siehe Tabelle Materialien) verwendet. Die Primer sind von der Firma „bench tested“ und daher war es nicht notwendig die PCR Effizienz zu testen. Die Spezifität der Primer wurde mittels einer Dissoziationskurve überprüft.

Für die PCR wurde ein Mastermix hergestellt in einem Volumen von 10 µl mit den folgenden Komponenten: 2 µl einer cDNA Verdünnung, 5 µl 2x Quanti FastSYBR GreenPuffer, 1 µl Primerassay (1 µM), H₂O. Die RT-PCR wurde mit dem

nachfolgenden Temperaturprogramm (2 Stufenprogramm) im Thermocycler durchgeführt.

Tabelle 5: Temperaturprogramm der RT-PCR zur Quantifizierung von *Casp1* und *Nlrp3* in BMVEC Zellen nach LPS Stimulation. Stufe 3 ist das Temperaturprogramm für die Dissoziationskurve

Stufe		Zeit	Temperatur	Cyclen
Stufe 1	Schritt 1	5:00	95.0	
Stufe 2				50
	Schritt 1	0:10	95.0	
	Schritt 2	0:30	55.0	
Stufe 3	Schritt 1	0:15	95.0	
	Schritt 2	0:15	60.0	
	Schritt 3	0:15	95.0	

3.6.3 Statistische Analyse der RT-PCR mit ©REST

Die Software ©REST fasst die Gruppen als Mittelwerte zusammen und berechnet daraus die mittleren Expressionsunterschiede (r) der Gruppen, normalisiert auf ein bestimmtes Houskeeping Gen wie z.B. *HRPT*, sowie die Varianzen der einzelnen Expressionen. Die Ergebnisse werden statistisch getestet und die Expressionsunterschiede werden in einem Ausgabefenster mit ihren Signifikanzlevels ausgegeben. Die Statistik basiert auf einem sehr robusten und von einer Normalverteilung unabhängigen Randomisierungstest, bei dem beliebig viele tausend Randomisierungen und Wiederholungen durchgeführt werden (Pfaffl, Horgan et al. 2002).

3.7 Analyse der Cysteinprotease, Caspase -1

3.7.1 Analyse der Caspase-1 Aktivität

In weiteren Experimenten wurde überprüft ob 2-CIHDA das Enzym Caspase-1 in BMVEC aktiviert. Für diese Versuchsreihe wurde ein kolorimetrischer Caspase-1 Aktivitätstest verwendet.

Diese Methode bietet eine einfache Möglichkeit die Aktivität aller Caspasen, welche die Aminosäuresequenz YVAD als Schnittstelle erkennen, zu bestimmen. Die Quantifizierung erfolgt spektrophotometrisch bei 405 nm über die Detektion des freien Chromophors p-nitroanilide (pNA) nach dessen Abspaltung vom YVAD-pNA Substrat.

In einer ersten Versuchsreihe wurde die Caspase-1 Aktivität in mit LPS behandelten TH-P1 Makrophagen bestimmt. Die Differenzierung von THP-1 Monozyten zu Makrophagen erfolgte anhand eines publizierten Protokolls (Park et al). Dabei wurden 2×10^6 Zellen in 9 cm² Petrischalen ausplattiert und in Gegenwart von Phorbol Myristat Acetat in Ethanol (Endkonzentration: 5 ng/ml) für 48h bei 37 °C inkubiert. Ausdifferenzierte THP-1 Makrophagen wurden für 2 bzw. 18 h mit 500 ng/ml LPS crude behandelt. Daraufhin wurden die Zellen 1 mal mit PBS gewaschen und anschließend mit einem Zellschaber in 2 ml PBS geerntet. Die Zellsuspension wurde 5 min bei 1000 rpm zentrifugiert, der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet wurde in 50 µl Cell lysis Buffer lysiert und 10 min bei RT inkubiert. Nach der Zentrifugation des Lysats (10.000 x g, 1 min) wurde der Überstand in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und die Proteinkonzentration wurde mit dem BCA Proteinassay bestimmt. Anschließend wurden 100-200 µg Protein in 50 µl Cell lysis Puffer verdünnt. Es folgte die Zugabe von je 50 µl des mit DTT (Endkonzentration: 200 µM) versetzten 2x-Reaktionspuffers. Daraufhin wurde je Ansatz 5 µl Substrat (Endkonzentration: 4 mM) zugegebenen. Als Positivkontrolle wurde ein Ansatz mitgeführt, welcher rekombinante Caspase-1 (1 Unit/µl Endkonzentration) anstelle

des Proteinlysats beinhaltetete. Die Ansätze wurden bei 37 °C inkubiert und in 10 min Intervallen über einen Zeitraum von 4 h bei 405 nm spektrophotometrisch gemessen.

Für die Analyse der Caspase 1 Aktivität wurden BMVEC Zellen in 2510x20mm Petrischalen ausplattiert und bis zur Konfluenz kultiviert und für das Experiment für ca. 15h in MEM mit 1% (v/v) Penicillin, Streptomycin ohne FCS synchronisiert. In einem ersten Vorversuch wurden humane Endothelzellen in Abhängigkeit der Zeit (3, 12, 18, und 24h) mit 10 µM 2-CIHDA in DMSO oder LPS (500ng/ml) in H₂O behandelt. Negativkontrolle 0,4% (v/v) DMSO.

4. Resultate

4.1 Synthese von 2-ClHDA

4.1.1 Enantioselektive Chlorierung von Hexadecanal

Prolin aktiviert die Aldehydgruppe von Hexadecanal unter Bildung einer Schiffbase – Imin.

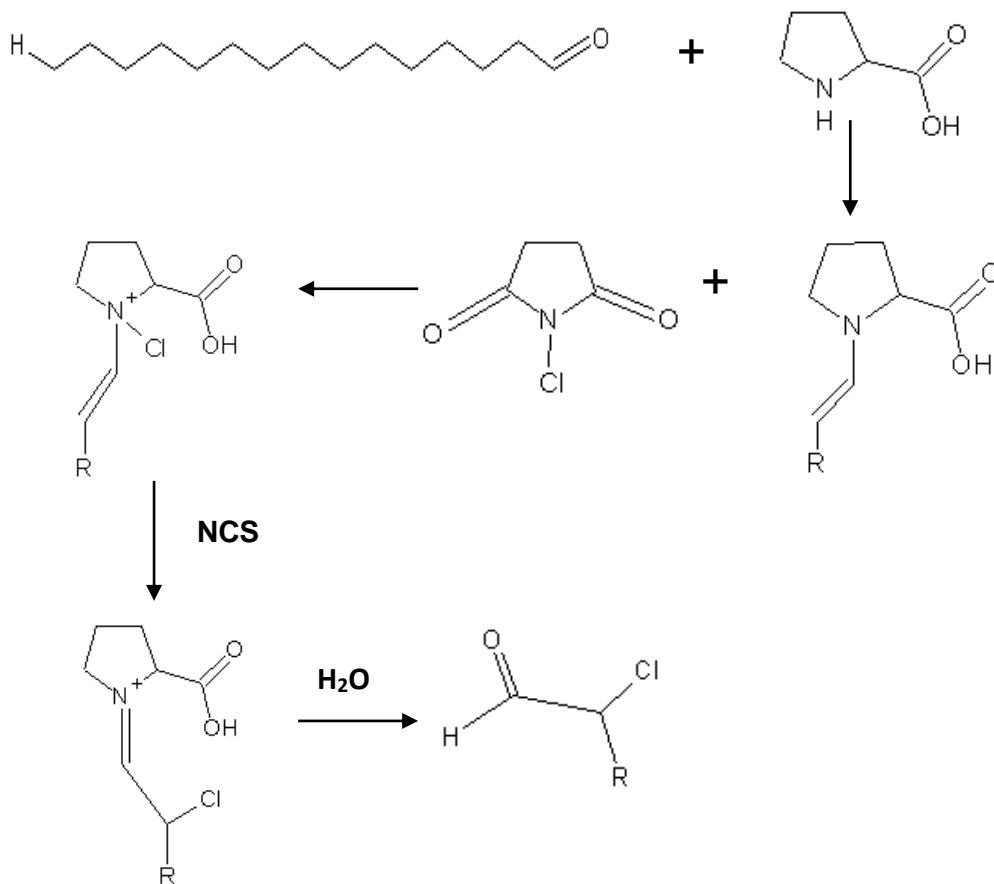


Abbildung 9: Darstellung der Synthesereaktion von 2-ClHDA

Zur enantioselektiven Darstellung von 2-ClHDA aus HDA wurde Prolin als Katalysator und N-Chlorsuccinimid als Chlorierungsmittel eingesetzt. Bei dieser Reaktion findet keine direkte Chlorierung am α -Kohlenstoffatom statt, sondern die Reaktion verläuft zweistufig: Zunächst erfolgt eine Chlorierung am Stickstoffatom des Enamin-Übergangskomplexes und darauf eine rasche [1.3]-sigmatrope Umlagerung (Melchiorre P et al 2008, „*Asymmetrich aminocatalytics – gold rush in organic chemistry.*“).

4.2 Analytik von 2-Chlorohexadecanal

4.2.1 GC-MS Analytik von 2-ClHDA

Das Syntheseprodukt aus den beschriebenen Untersuchungsablauf wurde mittels NICI-GC-MS als Oximderivat analysiert.

Das Hauptprodukt eluiert bei einer Retentionszeit von 9.7 min. Die Hauptfragmente wurden bei m/z 288, 196 und 178 detektiert, die mit der erwarteten Fragmentierung des PFB-Oxims (siehe Abb. 10) übereinstimmen. Der Peak bei 9.5 min. stellt das cis/trans Produkt dar.

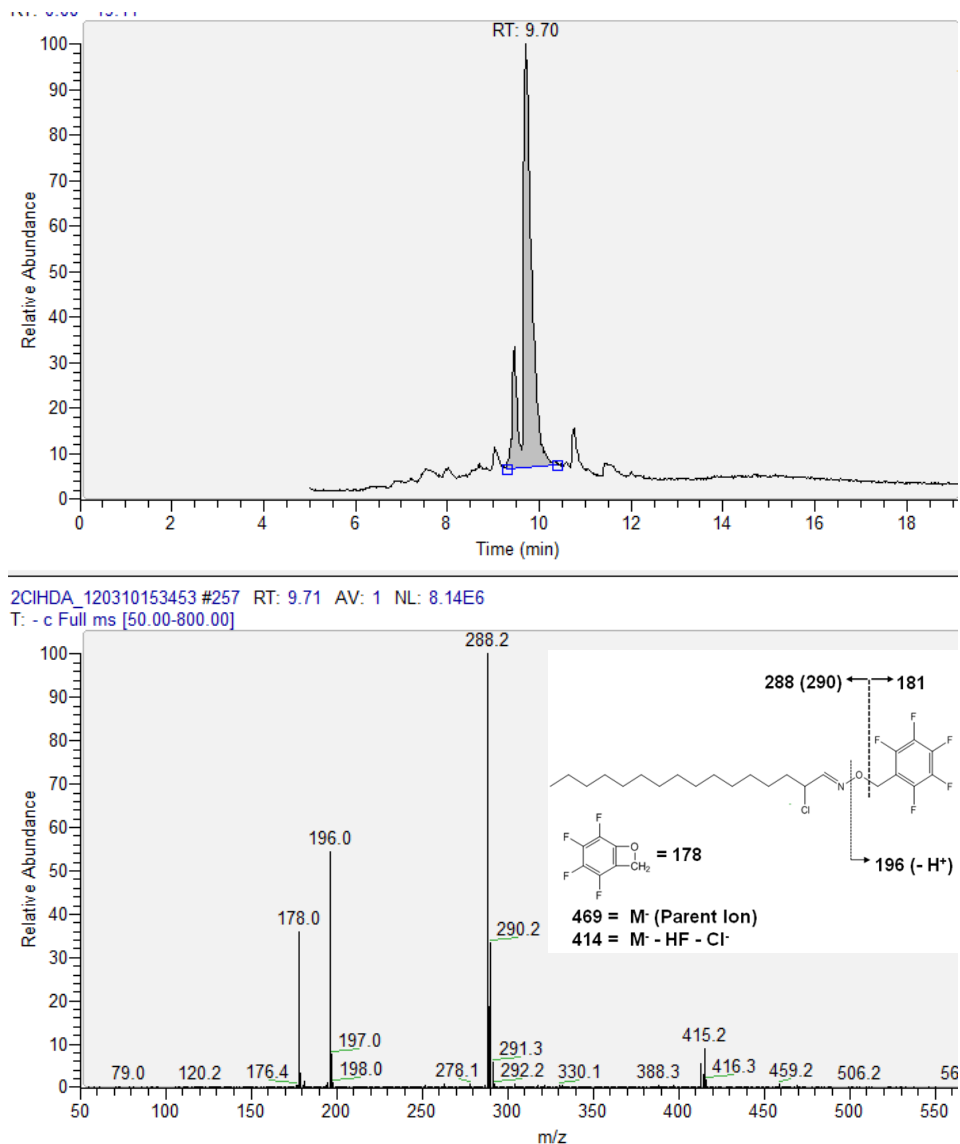


Abbildung 10: NICI-GC MS Analyse von 2-ClHDA. Chromatogramm (A) und MS-Spektrum (B) von 2-ClHDA (NCS Synthese)

4.2.2 Ausbeute der 2-CIHDA Synthese

Nach der Festphasenextraktion von 2-CIHDA über eine Silica60 Säule betrug die Ausbeute 30,5%

$$\text{Ausbeute} = \frac{\text{Tatsächliche Stoffmenge an Produkt}}{\text{Maximal mögliche Stoffmenge an Produkt}} \cdot 100\%$$

$$\text{Ausbeute} = (0,127 \text{ mmol 2-CIHDA} / 0,416 \text{ mmol HDA}) \times 100\%$$

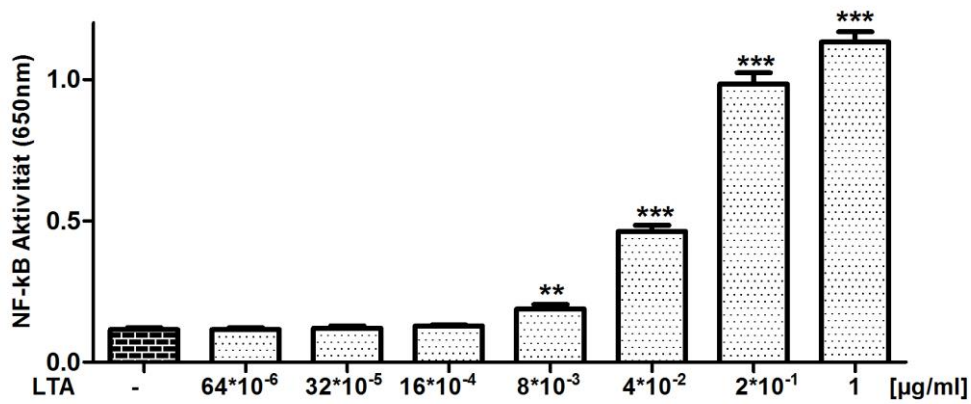
$$\text{Ausbeute} = 30,5\%$$

4.3 Resultate der Etablierung des HEK Blue TLR4 und TLR2 Reportersystems

In einem ersten Versuchsansatz wurden HEK Blue TLR4/TLR2 Zellen mit verschiedenen Konzentrationen des TLR4 spezifischen Liganden Lipopolysaccharid und des TLR2 spezifischen Agonisten Lipoteichonsäure stimuliert. Bei Stimulation des Toll – Like Rezeptors mit einem spezifischen Liganden wie z.B LPS wird NFκB und AP-1 aktiviert was zur Expression der sekretorischen alkalischen Phosphatase (SEAP) in diesem Reportersystem führt. Die Aktivität der SEAP im Zellüberstand ist der Aktivierung des Rezeptors proportional. Die Auswertung erfolgt mittels Photometrie bei 650 nm am Plattenphotometer. In der nachfolgenden Abbildung 1A ist ersichtlich, dass Lipoteichonsäure den TLR2 Rezeptor konzentrationsabhängig aktiviert. Ebenfalls erfolgt die Aktivierung des Rezeptors zeitabhängig. Die Aktivierung des TLR2-abhängigen Signaltransduktionswegs wird bei einer LTA Konzentration von 8 ng/ml induziert und erreicht ein Maximum bei 1 µg/ml (Abb. 11A).

Um die Spezifität des HEK TLR2 Reportersystems zu überprüfen wurden die Zellen in der Gegenwart von steigenden LPS Konzentrationen (1pg – 1µg/ml) inkubiert. Wie aus Abb. 11B ersichtlich ist, hat LPS im untersuchten Konzentrationsbereich wie erwartet keinen Einfluss auf TLR2-medierte Signaltransduktion. Die Positivkontrolle (LTA; 1 µg/ml) induziert die Aktivität der SEAP.

A



B

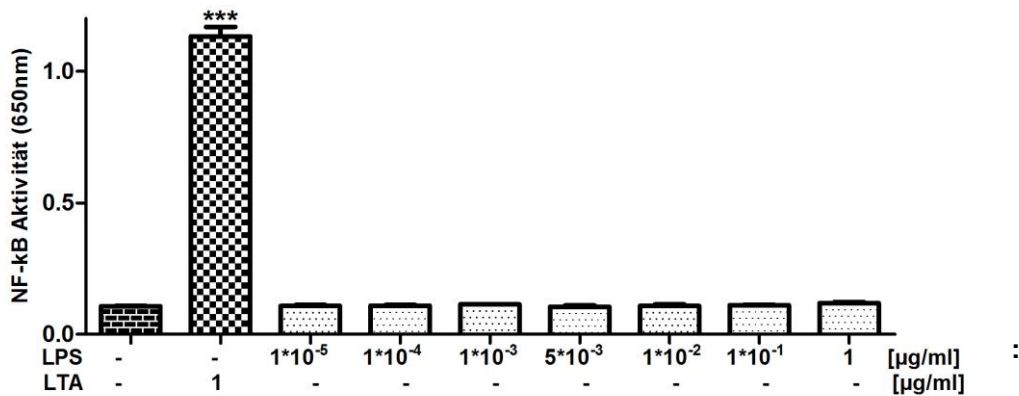


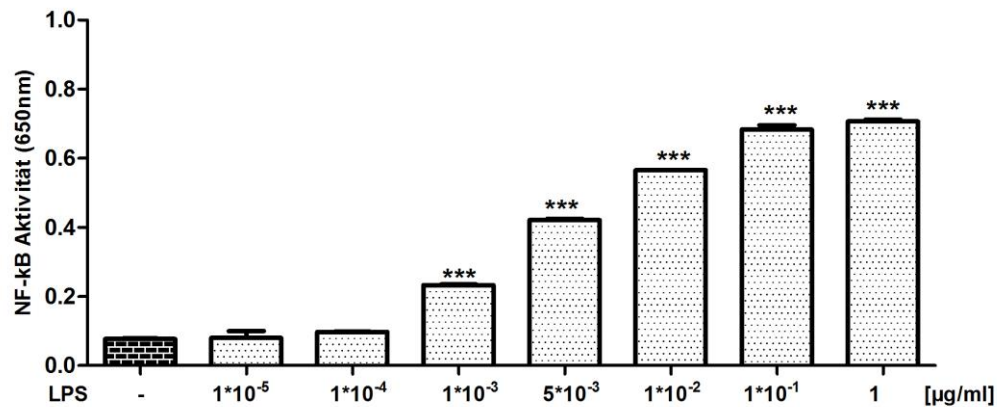
Abbildung 11: Aktivierung des TLR-2 abhängigen Signaltransduktionswegs durch Lipoteichonsäure in HEK BLUE TLR2 Zellen.

HEK Blue TLR4 Zellen wurden in einer 24 Well Platte mit einer Zellzahl von 250.000 Zellen/Well ausplattiert und in High Glucose Medium mit 10% FCS kultiviert. LTA oder LPS wurde in Endotoxin freiem sterilen Wasser gelöst und eine Verdünnungsreihe vorbereitet: Die Zellen wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen LTA (64 ng/ml - 1 µg/ml LTA; **A**) oder LPS (1 pg – 1 µg/ml; **B**) für 24h behandelt. Der Überstand (Medium) wurde abgehoben und mit Quanti Blue Reagenz (Invivogen) versetzt. Die Aktivität der alkalischen Phosphatase im Überstand wurde – wie in Material und Methoden beschrieben - photometrisch bei 650 nm am Viktor Plattenphotometer vermessen. Jedes Experiment wurde in Dreifachbestimmungen durchgeführt und die Standardabweichung mittels GraphPad Prism berechnet und graphisch dargestellt, **p < 0,01, ***p < 0,001 in Vergleich zur Kontrolle (keine Zugabe)

Die HEK Blue Toll-Like Rezeptor 4 Zelllinie wurde mit unterschiedlichen Konzentrationen Lipopolysaccharid, ein spezifischer TLR4 Ligand für 8, 17 und 24 h bei 37°C bei stimuliert. Die Aktivität wird photometrisch bei 650 nm vermessen. In der nachfolgenden Abbildung 4A ist ersichtlich, dass die Aktivierung des Rezeptors konzentrationsabhängig erfolgt. TLR4 Aktivierung erfolgt bereits ab einer LPS

Konzentration von 1 ng/ml und erreicht eine Sättigung bei 0.1 µg/ml. Der TLR-2 Ligand LTA führt zu keiner Aktivierung (Abb. 12B).

A



B

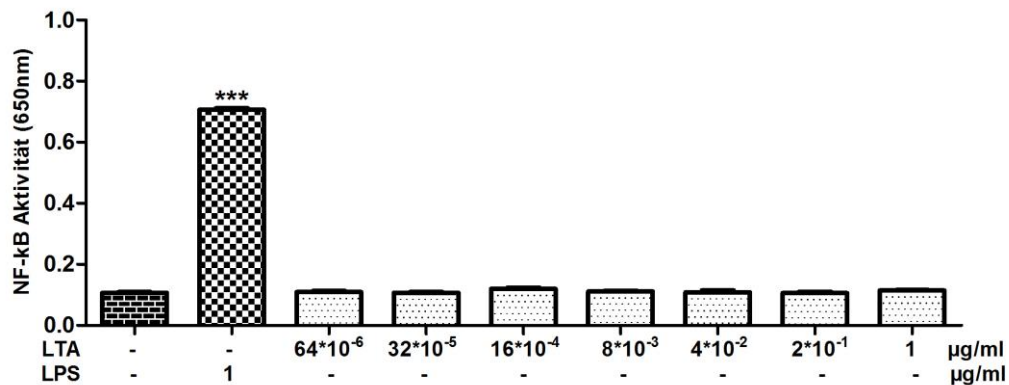


Abbildung 12: Aktivierung des TLR-2 abhängigen Signaltransduktionswegs durch Lipoteichonsäure in HEK BLUE TLR2 Zellen

HEK Blue TLR4 Zellen wurden in einer 24 Well Platte mit einer Zellzahl von 250.000 Zellen/Well ausplattiert und in High Glucose Medium mit 10% FCS kultiviert. LTA oder LPS wurde in Endotoxin freiem sterilen Wasser gelöst und eine Verdünnungsreihe vorbereitet: Die Zellen wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen LTA (64 ng/ml - 1 µg/ml LTA; **A**) oder LPS (1 pg - 1 µg/ml; **B**) für 24h behandelt. Der Überstand (Medium) wurde abgehoben und mit Quanti Blue Reagenz (Invivogen) versetzt. Die Aktivität der alkalischen Phosphatase im Überstand wurde – wie in Material und Methoden beschrieben - photometrisch bei 650 nm am Viktor Plattenphotometer vermessen. Jedes Experiment wurde in Dreifachbestimmungen durchgeführt und die Standardabweichung mittels GraphPad Prism berechnet und graphisch dargestellt, **p < 0,01, ***p < 0,001 in Vergleich zur Kontrolle (keine Zugabe)

Die Zellen wurden auch mit LPS in der Ab- oder Anwesenheit des TLR4-spezifischen Antagonisten CLI-095 (3 µM) inkubiert. Die Resultate dieser Untersuchungen (Abb. 13) zeigen, dass CLI-095 die LPS-vermittelte Signaltransduktion über TLR4 quantitativ unterbindet und damit einen geeigneten pharmakologischen Antagonisten darstellt, der in weiteren Untersuchungen eingesetzt werden kann. Mit dieser

Versuchsserie wurde das HEK BLUE TLR-2/4 Reportersystem etabliert, und die Spezifität validiert.

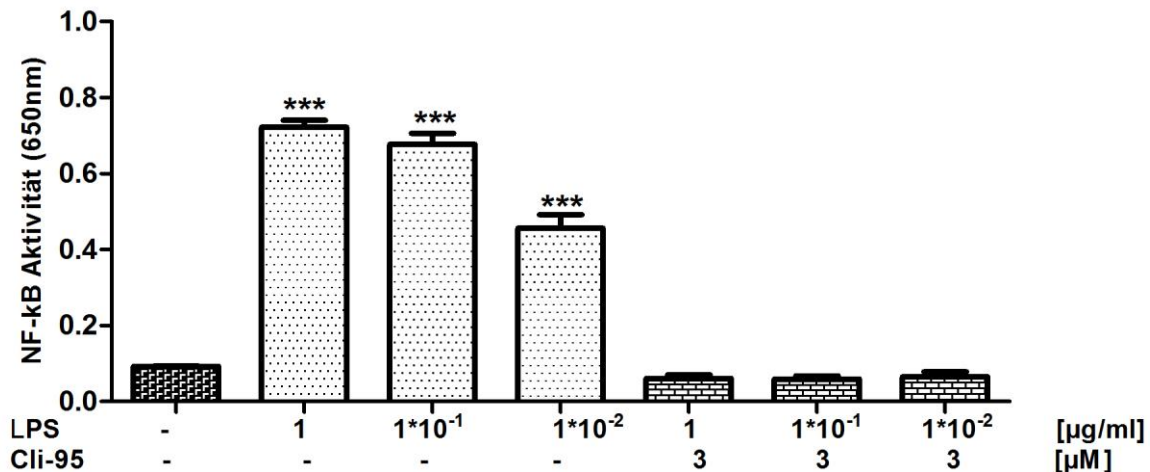


Abbildung 13: Der TLR-4 Antagonist CLI-095 inhibiert LPS-induzierte Signaltransduktion über TLR-4

HEK Blue TLR4 Zellen wurden in einer 24 Well Platte mit einer Zellzahl von 250.000 Zellen/Well ausplattiert und in High Glucose Medium mit 10% FCS kultiviert. Die Zellen wurden mit LPS (10 ng – 1 µg) in der Ab- oder Anwesenheit von CLI-095 (3 µM) 24 h inkubiert. Der Überstand wurde abgehoben und die Aktivität der alkalischen Phosphatase vermessen.

Jeder Punkt repräsentiert den Mittelwert ± SD (n=3). **p < 0,01, ***p < 0,001 in Vergleich zur Kontrolle (keine Zugabe)

Das HEK BLUE TLR4/ TLR2 Reportersystem bietet hiermit eine optimale Möglichkeit zur Identifizierung von TLR4 und TLR2 spezifischen Agonisten.

4.4 Stimulierung des HEK Blue Reportersystem mit 2-Chlorohexadecanal

Ziel dieser Experimente war es, zu verifizieren ob der langkettige chlorierte Aldehyd 2-Chlorohexadecanal (2-ClHDA) TLR-2 und/oder TLR-4 vermittelte Signaltransduktion auslösen kann. Da 2-ClHDA auch zum Oxidationsprodukt 2-chlorohexadecansäure (2-ClHA) und dem Reduktionsprodukt 2-chlorohexadecanol (2-ClHOH) metabolisiert werden kann, wurden auch diese Verbindungen in meine Untersuchungen einbezogen. Hierfür werden HEK Blue TLR4/TLR-2 Zellen konzentrationen (1-15 µM) und zeitabhängig (0 – 24 h) mit den angeführten Analyten

inkubiert. Als Vehikelkontrolle wurde DMSO (0.2 % im Medium) verwendet. Als Positivkontrolle zur Überprüfung der Aktivierung des TLR-4 Rezeptors wurden die Zellen mit 1µg/ml LPS aktiviert. Weiter erfolgt eine Inkubation des Zellreportersystems mit 2-CIHDA in Gegenwart des TLR-4-spezifischen CLI-095 Inhibitors. Das Experiment wird in Dreifachbestimmungen durchgeführt und die Resultate sind in Abb14. graphisch dargestellt

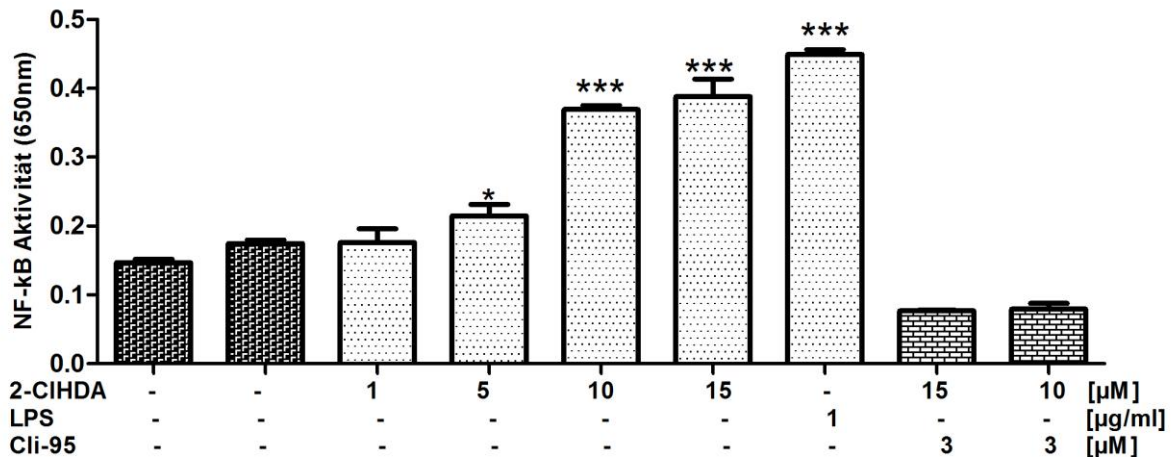


Abbildung 14: 2-CIHDA induziert TLR-4 abhängige Signaltransduktion

HEK Blue TLR4 Zellen wurden in einer 24 Well Platte mit einer Zellzahl von 250.000 Zellen/Well ausplattiert und in High Glucose Medium mit 0,5 % (v/v) FCS kultiviert. Die Zellen wurden mit 2-CIHDA (1 – 15 µM) in der Ab- oder Anwesenheit von CLI-095 (3 µM) 24 h inkubiert. Der Überstand wurde abgehoben und die Aktivität der alkalischen Phosphatase vermessen. LPS (1 µg/ml) diente als Positivkontrolle. Jeder Punkt repräsentiert den Mittelwert ± SD (n=3). **p < 0,01, ***p < 0,001 im Vergleich zur Vehikelkontrolle (DMSO, 0.2 %; v/v)

Anhand der Abbildung 14 ist ersichtlich, dass das HEK Blue Toll-Like Rezeptor 4 Reportersystem in Abhängigkeit von der 2-CIHDA Konzentration aktiviert wird. Eine signifikante Stimulation des Rezeptors erfolgte zwischen 5 und 15 µM 2-CIHDA. Bei einer Konzentration bei 1 µM 2-CIHDA erfolgt hingegen keine signifikante Aktivierung des Reportersystems. In Gegenwart von CLI-095 ist die NfκB Aktivierung des Toll-Like Rezeptors 4 inhibiert und weist keine Aktivierung der alkalischen Phosphatase auf.

Zusätzlich wurden HEK Blue TLR- 2 Zellen mit 2-Chlorohexadecanal für 17h behandelt und die Aktivität der alkalischen Phosphatase bei 650 nm vermessen. Als Positivkontrolle erfolgte die Stimulation des TLR-2 Rezeptors mit 1µg/ml Lipoteichonsäure. Das Experiment wurde in Dreifachbestimmungen durchgeführt und die Standardabweichung mit GraphPrism berechnet und dargestellt. Anhand der

nachfolgenden Abbildung (Abb.15) ist ersichtlich, dass 2-CIHDA keinen TLR-2 Liganden darstellt, der TLR-2 spezifische Ligand LTA hingegen aktiviert NF- κ B und führt zur Expression der alkalischen Phosphatase führt.

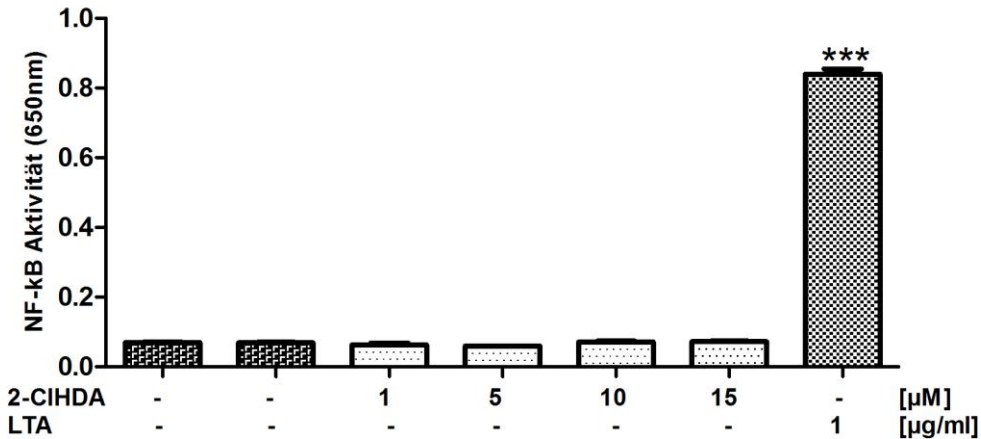
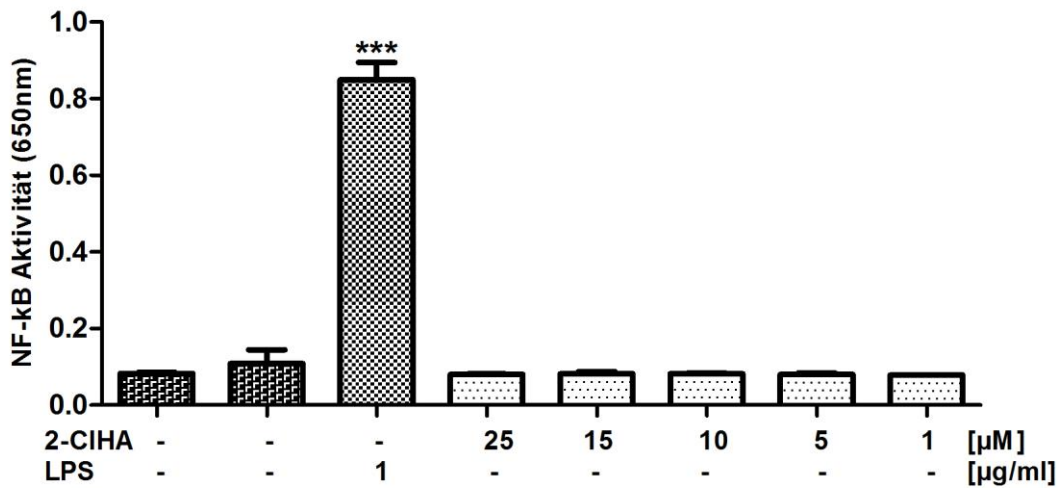


Abbildung 15: 2-CIHDA induziert keine TLR-2 abhängige Signaltransduktionskaskade
 HEK Blue TLR-2 Zellen wurden in einer 24 Well Platte mit einer Zellzahl von 250.000 Zellen/Well ausplattiert und in High Glucose Medium mit 0,5% (v/v) FCS kultiviert. Die Zellen wurden mit 2-CIHDA (1 – 15 μ M) 17 h inkubiert. Der Überstand wurde abgehoben und die Aktivität der alkalischen Phosphatase vermessen. LTA (1 μ g/ml) diente als Positivkontrolle. Jeder Punkt repräsentiert den Mittelwert \pm SD (n=3). ***p < 0,001 im Vergleich zur Vehikelkontrolle (DMSO, 0,2 %; v/v)

In einem weiteren Experiment erfolgte die Überprüfung ob 2-CIHA und/oder 2-CIHOH als Liganden für TLR-4 dienen. Hierfür werden die HEK Blue Zellen mit 2-CIHA oder 2-CIHOH für 17 h inkubiert. Die Expression der alkalischen Phosphatase wurde bei 650 nm gemessen. Das Experiment wurde in Dreifachbestimmungen durchgeführt und ist in Abb. 16 dargestellt.

A



B

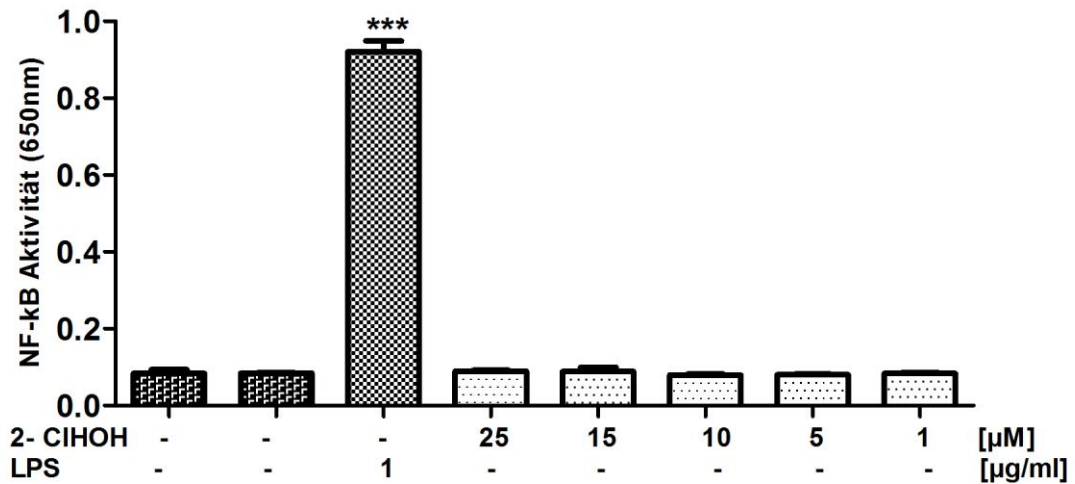


Abbildung 16: 2-CIHA (A) und 2-CIHOH (B) induzieren keine TLR-4 abhängige Signaltransduktionskaskade

HEK Blue TLR-4 Zellen wurden in einer 24 Well Platte mit einer Zellzahl von 250.000 Zellen/Well ausplattiert und in High Glucose Medium mit 0,5% (v/v) FCS kultiviert. Die Zellen wurden mit 2-CIHA (1 – 25 μM) oder 2-CIHOH (1 – 25 μM) für 17 h inkubiert. Der Überstand wurde abgehoben und die Aktivität der alkalischen Phosphatase vermessen. LPS (1 μg/ml) wurde als Positivkontrolle verwendet. Jeder Punkt repräsentiert den Mittelwert ± SD (n=3). ***p < 0,001 im Vergleich zur Vehikelkontrolle (DMSO, 0,2 %; v/v)

Anhand der Abbildung 16 ist ersichtlich, dass weder 2-CIHA noch 2-CIHOH als Liganden für TLR-4 dienen. Die Positivkontrolle mit LPS als Stimulator aktiviert hingegen NF-κB und damit die Aktivität der alkalischen Phosphatase signifikant.

4.5 2-CIHDA induziert die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) in Gehirn-Endothelzellen

Ein weiterer Mechanismus, welcher die Inflammasome-Assemblierung unterstützen oder auslösen („triggern“) könnte, ist die Bildung von intrazellulären Sauerstoffradikalen. Um diese Möglichkeit zu überprüfen wurden humane BMVEC in der Gegenwart von 2-CIHDA inkubiert und die Bildung von reaktiven Spezies mittels der Redox-sensitiven Sonde 2',7'-Dichlorodihydrofluorescein-diacetat (H₂DCF-DA). H₂DCFDA ist ein nicht fluoreszierendes Molekül, das über die Zellmembran diffundieren kann, durch intrazelluläre Esterasen werden die beiden Acetatgruppen abgespalten und die Sonde ist nicht mehr membrangängig. Durch intrazelluläre ROS wird H₂DCF zu 2',7'-Dichlorofluorescein (DCF) oxidiert und über eine Fluoreszenzmessung quantifiziert. Die Resultate dieser Experimente zeigten, dass die Inkubation von BMVEC mit 2-CIHDA (15 und 50 µM) nach einer 5 stündigen Inkubation zu einem signifikanten Anstieg an intrazellulären ROS Konzentrationen führt (Abb. 17). Diese Befunde wären mit einer Co-Aktivierung des Inflammasomes durch intrazelluläre ROS kompatibel (Üllen, Fauler et al. 2012).

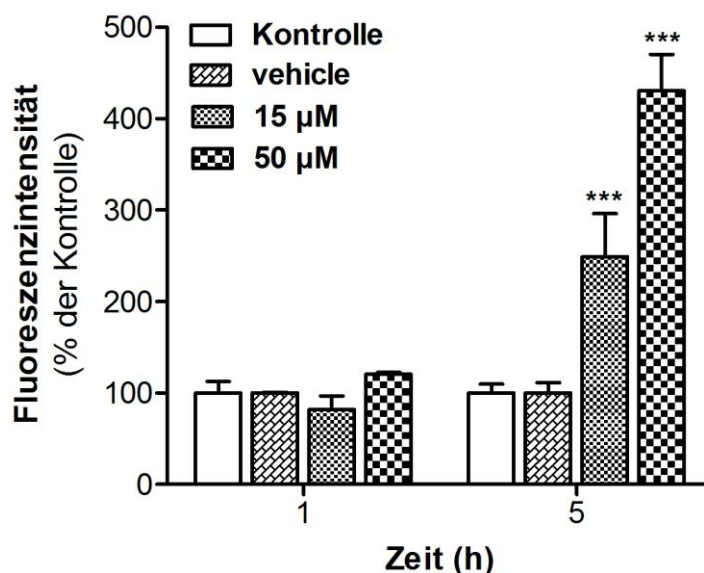


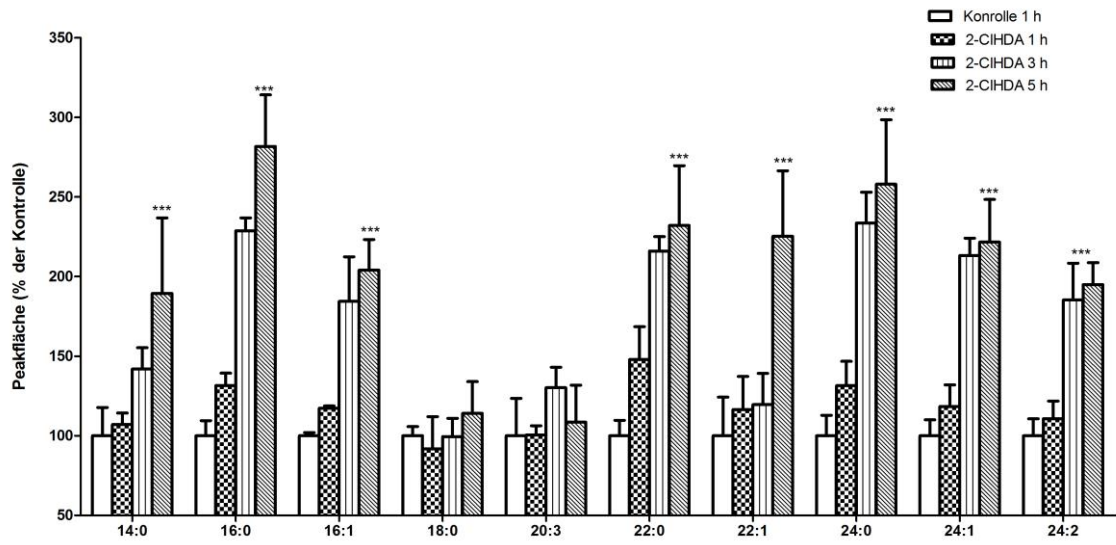
Abbildung 17: Analyse des zellulären Redoxstatus mittels einer redox sensitiven Sonde, H₂-DCFDA in BMVEC in Gegenwart von 2-CIHDA. Die Zellen wurden mit nicht fluoreszierenden carboxy-H₂DCFDA vorinkubiert und anschließend mit 2-CIHDA behandelt. DMSO diente als Vehikel. Die Intensität der Fluoreszenz wurde als % der Kontrolle berechnet. Das Experiment wurde in Dreifachbestimmungen durchgeführt und die Standardabweichung $p < 0.001$; two-wayANOVA). Kontrolle: Keine Behandlung der Zellen; Vehicle: 0,4% DMSO (Üllen, Fauler et al. 2012)

4.6 Produktion von Ceramiden in Gegenwart von 2-Chlorohexadecanal in Endothelzellen des Gehirns

Das Inflammasom von Makrophagen wird auch durch Ceramide aktiviert.
(Vandanmagsar, Youm et al. 2011)

Um zu überprüfen, ob 2-ClHDA die Bildung von Ceramiden in BMVEC induziert wurden die Zellen zeit- und konzentrationsabhängig mit dem Aldehyd inkubiert, die Lipidfraktion nach den angegebenen Zeiten extrahiert und von Dr. Gerald Rechberger (Institut für Biochemie, Zentrum für molekulare Biowissenschaften, Graz) mittels LC-MS Analytik quantifiziert. Die Resultate dieser Untersuchungen zeigen, dass 2-ClHDA dazu in der Lage ist, die Bildung von fast allen untersuchten Ceramidspezies (ausser 18:0 und 20:3) zeitabhängig und statistisch signifikant zu stimulieren. Parallel zur Induktion der Ceramidkonzentrationen erfolgt auch eine Abnahme der intrazellulären Sphingomyelinkonzentrationen (Abb. 18B).

A



B

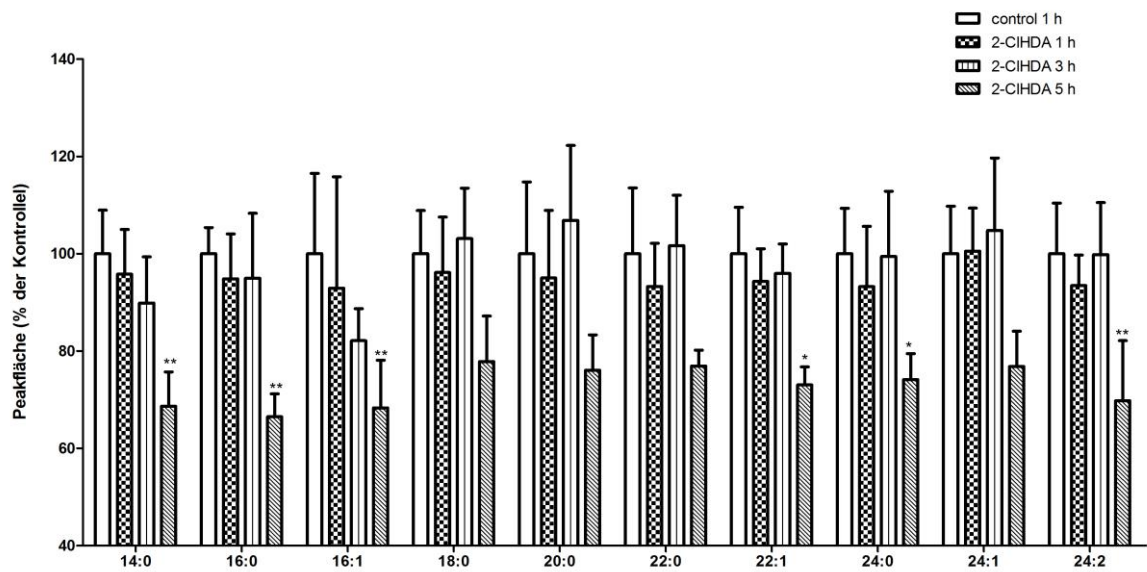


Abbildung 18: Analyse der Ceramide (A) und der Sphingomyeline (B) in BMVEC Zellen in Gegenwart von 2-CIHDA.

4.6 Analyse der Genexpression von *CASP1* und *NLRP3* in Endothelzellen des Gehirns

Ziel dieses Teils meiner Arbeit war es mittels qPCR abzuklären ob BMVEC Zellen *NLRP3* und *CASP1* auf mRNA Ebene exprimieren. Die Cysteinprotease Caspase-1 wird nach Assemblierung eines Multiproteinkomplexes wie in der Einleitung beschrieben aktiviert. In einem ersten Experiment wurde mittels quantitativer PCR die Expression der Gene, *CASP1* und *NLRP3* im Endothel des Gehirns überprüft. Hierfür wurden hCMEC/D3 Zellen mit 100, 500 und 1000ng/ml LPS für 0,5, 3 und 5h stimuliert. Mittels RT-PCR wurde die Expression der Procaspase-1 (*CASP1*) und des *NLRP3* auf RNA - Ebene in Ab bzw. Anwesenheit von LPS quantifiziert. Ebenfalls wurde die Expression des housekeeping Genes Hypoxanthin Guanin Phosphoribosyltransferase (HPRT) analysiert.

Tabelle 6: Auswertung qPCR zur Expressionsanalyse von *CASP1* und *NLRP3* nach LPS (1µg/ml) in Abhängigkeit der Zeit (0,5, 3, 5h). Behandlung in hCMEC/D3 Zellen. Die Auswertung der RT-PCR erfolgte mit ©REST

Behandlung	0,5h, 1µg/ml LPS			3h, 1µg/ml LPS			5h, 1µg/ml LPS		
Genes	<i>HPRT</i>	<i>CASP1</i>	<i>NLRP3</i>	<i>HPRT</i>	<i>CASP1</i>	<i>NLRP3</i>	<i>HPRT</i>	<i>CASP1</i>	<i>NLRP3</i>
PCR Efficiencies	2,000	2,000	2,000	2,000	2,000	2,000	2,000	2,000	2,000
Control Means	20,629	24,629	30,186	20,629	24,629	30,186	20,629	24,629	30,186
Sample Means	21,638	24,571	30,016	20,659	23,926	29,979	21,537	24,369	30,599
Expression Ratios Gen/HRPT		2,093	2,262		1,662	1,179		2,246	1,409
p-Values		0,001	0,001		0,001	0,175		0,002	0,041

Tabelle 7: Auswertung qPCR zur Expressionsanalyse von CASP1 und NLRP3 nach LPS (500 ng/ml) Behandlung in Abhängigkeit der Zeit (0,5, 3, 5h) in hCMEC/D3 Zellen. Die Auswertung der RT-PCR erfolgte mit ©REST

Behandlung	0,5h, 500 ng/ml LPS			3h, 500ng/ml LPS			5h, 500ng/ml LPS		
Genes	<i>HPRT</i>	<i>CASP1</i>	<i>NLRP3</i>	<i>HPRT</i>	<i>CASP1</i>	<i>NLRP3</i>	<i>HPRT</i>	<i>CASP1</i>	<i>NLRP3</i>
PCR Efficiencies	2,000	2,000	2,000	2,000	2,000	2,000	2,000	2,000	2,000
Control Means	20,629	24,629	30,186	20,629	24,629	30,186	20,629	24,629	30,186
Sample Means	22,965	25,696	30,920	23,240	25,472	31,257	20,922	23,839	29,954
Expression Ratios Gen/HPRT		2,410	3,036		3,406	2,908		2,118	1,439
p-Values		0,003	0,003		0,001	0,003		0,001	0,001

Tabelle 8: Auswertung qPCR zur Expressionsanalyse von CASP1 und NLRP3 nach LPS (250 ng/ml) Behandlung in Abhängigkeit der Zeit (0,5, 3, 5h) in hCMEC/D3 Zellen. Die Auswertung der RT-PCR erfolgte mit ©REST

Treatment	0,5h, 250ng/ml LPS			3h, 250ng/ml LPS			5h, 250ng/ml LPS		
Genes	<i>HPRT</i>	<i>CASP1</i>	<i>NLRP3</i>	<i>HPRT</i>	<i>CASP1</i>	<i>NLRP3</i>	<i>HPRT</i>	<i>CASP1</i>	<i>NLRP3</i>
PCR Efficiencies	2,000	2,000	2,000	2,000	2,000	2,000	2,000	2,000	2,000
Control Means	20,629	24,629	30,186	20,629	24,629	30,186	20,629	24,629	30,186
Sample Means	21,660	24,816	30,494	20,659	24,395	30,335	20,729	23,500	29,783
Expression Ratios Gen/HPRT		1,795	1,651		1,289	0,988		2,343	1,417
p-Values		0,007	0,030		0,004	0,871		0,002	0,001

Anhand der Resultate in Abb. 19A lässt sich festhalten, dass bei den gewählten Versuchsbedingungen keine klare Konzentrationsabhängigkeit der Casp-1 Expression beobachtet wurde. Nach 30 min. erfolgte bei allen LPS Konz. eine signifikante Erhöhung der Casp1 mRNA Regulation zwischen 1.8 und 3fach. Am Ende des Experiments war das Verhältnis Casp1/HRPT immer noch 2 fach erhöht. Komplementäre Resultate wurden bei der Analyse der Genexpression von NLRP3 erhalten. Anhand der Abbildung 19B kann der Schluss gezogen werden, dass die NLRP3 Expression nicht konzentrationsabhängig verläuft. Nach 30 min LPS Behandlung erfolgt eine signifikante Erhöhung der NLRP3 Expression bei allen Konz. Zwischen 1,5 und 3,5. Ebenfalls findet nach 5h LPS Stimulation noch immer eine 1,5 fache Steigung der Expression statt im Vergleich zu HPRT.

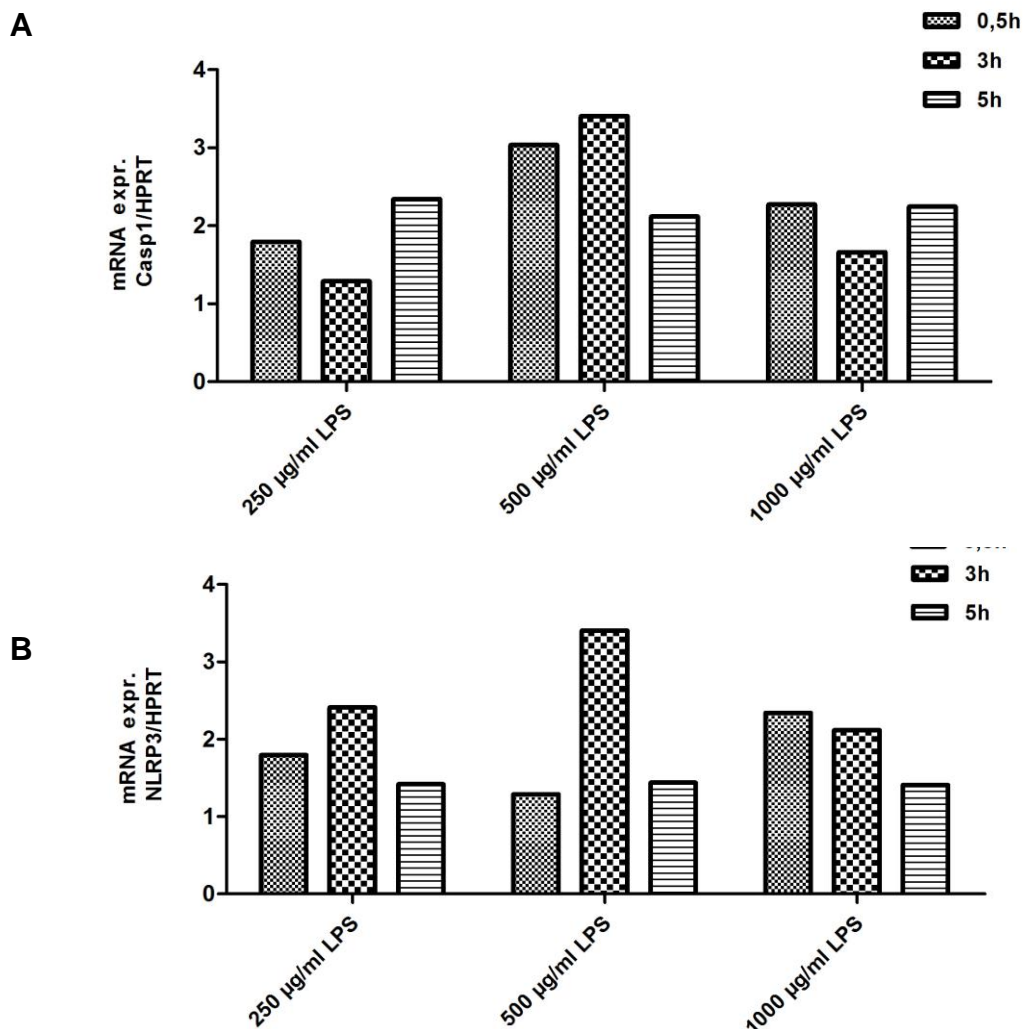


Abbildung 19: Quantifizierung von Procaspase-1 (A) und NLRP3 (B) mit RT-PCR in BMVEC nach LPS Stimulation. BMVEC wurden in 6-Well Platten bis zur Konfluenz bei 37°C kultiviert. Die Stimulation der humanen Endothelzellen erfolgt mit Lipopolysaccharid in Abhängigkeit der Konzentration (1µg/ml, 500ng/ml, 250ng/ml) und der Zeit (0,5, 3 und 5h).

4.8 Analyse der Caspase- 1 Aktivität

Ziel dieser Studie war es zu verifizieren, ob in Gegenwart von 2-CIHDA in BMVEC Zellen die Caspase-1 aktiviert wird. Als Caspase-1 Substrat dient in diesem Assay yVAD-p-nitroanilin.

In einem ersten Vorversuch wurde die Aktivität der Caspase-1 in Makrophagen mittels eines kolorimetrischen Aktivitätsassays (Biovision, Kalifornien) analysiert. Hierfür wurden TH-P1 Zellen mit 5ng/ml PMA für 48h wie in Material und Methoden beschrieben in Makrophagen differenziert und nachfolgend für unterschiedliche Zeitpunkte mit Lipopolysaccharid (Sigma Aldrich) behandelt. Die Aktivität der Caspase-1 wurde über einen Zeitverlauf von 4h bei 405nm gemessen.

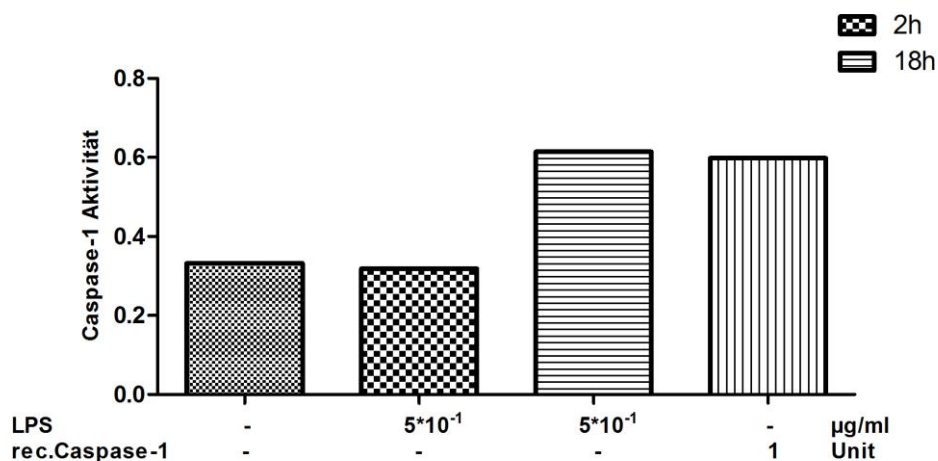


Abbildung 20: Caspase-1 Aktivität in Makrophagen nach LPS Stimulation.

TH-P1 Zellen wurden in 100x20 mm Petrischalen mit einer Zellzahl von $2 \cdot 10^6$ Zellen in RPMI1640 Medium mit 10%FCS ausplattiert und für 48h mit 5ng/ml PMA zu Makrophagen differenziert. Nach Waschen der Zellen mit PBS folgt die Behandlung mit 500 ng/ml LPS (Sigma Aldrich) bei unterschiedlichen Zeitpunkten. Die Aktivität der Caspase-1 wird bei 405nm analysiert. Für diesen Vorversuch wurden Einfachbestimmungen durchgeführt. Positivkontrolle: humane rekombinante Caspase-1 (1 Unit). Kontrolle: keine LPS Behandlung

Aus der Abbildung 20 ist ersichtlich, dass die Aktivierung der Caspase-1 zeitabhängig erfolgt. Nach 2h Behandlung mit 500ng/ml LPS crude erfolgt keine Aktivierung während nach 18h LPS Inkubation eine signifikante Aktivierung der Caspase -1 im Vergleich zur Kontrolle erfolgt. Die Positivkontrolle zur Überprüfung

des Caspase-1 kolorimetrischen Assays mit 1 Unit der rekombinanten Caspase-1 weist ebenfalls eine signifikante Aktivität der Cystein-Protease auf.

In einem nächsten Vorversuch werden primäre Endothelzellen aus dem Schweinehirn mit LPS Ultrapure (Invivogen) und 15 μ M 2-CIHDA behandelt. Die rekombinante Caspase-1 dient als Positivkontrolle.

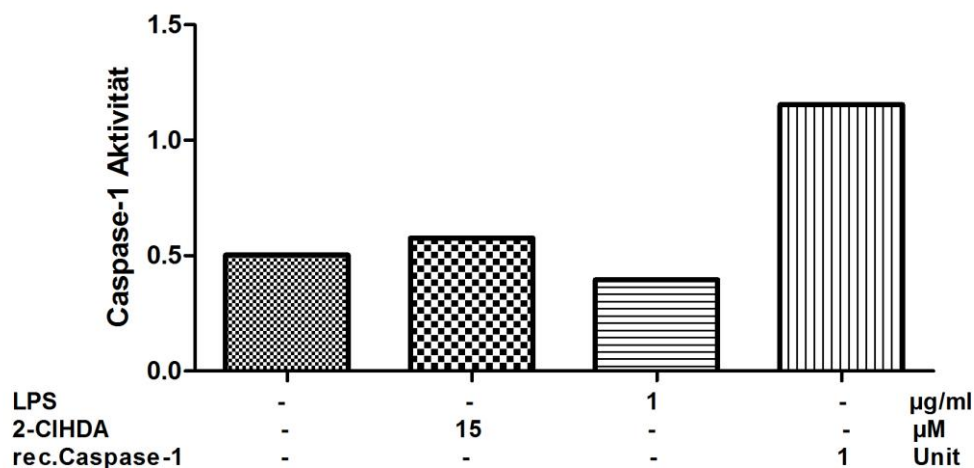


Abbildung 21: Analyse der Caspase-1 Aktivität in BMVEC in Gegenwart von 2-CIHDA und LPS. Primäre Schweinehirnendothelzellen werden in 100-20 mm Petrischalen in MEM199 Medium ohne FCS ausplattiert und bis zur Konfluenz kultiviert. Zur Bestimmung der Caspase-1 Aktivität werden PBEC für 3h mit LPS Ultrapure (Invivogen) als Positivkontrolle oder 15 μ M 2-CIHDA behandelt. Die Aktivität der Caspase-1 wurde bei 405nm analysiert. Für diesen Vorversuch wurden Einfachbestimmungen durchgeführt. Negativkontrolle: 0,4%DMSO, Positivkontrolle: humane rec. Caspase-1 (1 Unit).

Aus der Abbildung 21 ist ersichtlich, dass nach einer Behandlung mit 15 μ M 2-CIHDA keine Aktivierung der Caspase-1 erfolgt. Dies ist darauf zurückzuführen dass bei den gewählten 2-CIHDA Konzentrationen Zelltod ausgelöst wurde. Die Behandlung mit 1 μ g/ml LPS Ultrapure löst ebenfalls keine Caspase-1 Aktivität auf.

5. Diskussion

Der menschliche Organismus besitzt eine Reihe von Mechanismen, durch die schädigende Einflüsse wie mikrobielle oder virale Erreger, fremde Zellen, oder toxische Substanzen abgewehrt werden können. Die erste Abwehrlinie wird von der Haut gebildet, die eine natürliche Barriere gegen äussere Einflüsse bildet. Nach Schädigung dieser ersten Barriere und dem Eindringen von Erregern wird das angeborene Immunsystem in Gang gesetzt und dadurch Pathogene eliminiert. Dieses System wirkt sehr effizient und ist flexibel. Einer der Gründe liegt darin, dass eine Familie von Rezeptoren, die sog. PRR dazu in der Lage sind, DAMPS und/oder PAMPS zu detektieren und die notwendigen Abwehrmechanismen zu aktivieren. Zu diesen Rezeptoren zählen Komplementrezeptoren, die Toll-Like Rezeptoren (TLRs), Mannose Rezeptoren, die RIG-like Helikasen, und die NOD-like Rezeptoren. Einige dieser Rezeptoren induzieren nach Signalerkennung die Assemblierung von grossen Multienzymkomplexen, die als Inflammasome bezeichnet werden. Die Inflammasome sind dazu in der Lage ein Gefahrensignal zu erkennen und entsprechend darauf zu reagieren. Die Inflammasome werden, je nach Interaktionspartner in vier Gruppen unterteilt, nämlich NLRP1-, NLRP3, NLRC4- und das AIM2 Inflammasome. Allen gemeinsam ist die Bindung von Caspase-1, die nach Bindung an ein Adaptermolekül (ASC) aktiviert wird. Dabei wird durch Autoproteolyse proCaspase-1 in aktive Caspase-1 überführt, die jetzt dazu in der Lage ist, proIL-1 β in aktives IL-1 β überzuführen. Biologisch aktives IL-1 β stellt ein Hauptzytokin dar, das für inflammatorische Immunreaktionen, Fieber und metabolische Erkrankungen verantwortlich ist.

Unter neuroinflammatorischen Bedingungen konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung des NLRP3 Inflammasom's eine massgebliche Rolle bei der Ausbildung von Gewebsschädigungen bei der Alzheimer'schen Erkrankung spielt (Halle Nat Immunol. 2008). Die Autoren dieser Studie konnten zeigen, dass fibrilläres Amyloid β die Freisetzung von IL-1 β aus Mikroglia (die immunkompetenten Zellen des Gehirns) stimuliert. Diese IL-1 β Freisetzung wird durch die Aktivierung des NLRP3 Inflammasomes nach lysosomaler Ruptur und Cathepsin B Freisetzung bedingt. In einem neuroinflammatorischen Mausmodell (Cuprizon-induzierte Demyelinisierung)

konnte gezeigt werden, dass genetischer knock-out des NLRP3 Gen's zu reduzierter Demyelinisierung führt. Die Autoren dieser Untersuchungen (Jha, Srivastava et al. 2010) leiteten aus diesen Befunden ab, dass das NLRP3 Inflammasome im Gehirn als potentieller pharmakologischer Angriffspunkt für die Behandlung von neuroinflammatorischen Erkrankungen wie zB Multipler Sklerose darstellen könnte. Weiters konnte auch gezeigt werden, dass das NLRP3 Inflammasome bei der Ausbildung von Meningitis (Hoegen, Tremel et al. 2011) und Schlaganfall (Abulafia, de Rivero Vaccari et al. 2009) beteiligt ist. Diese Befunde untermauern dass die Inflammasome Aktivierung eine ganz zentrale Rolle bei neurologischen Erkrankungen spielen kann.

Eine weitere Komponente des angeborenen Immunsystems die bei neurodegenerativen Erkrankungen eine Rolle spielt, ist das Hämenzym Myeloperoxidase. Wie in der Einleitung ausgeführt, bildet MPO in der Gegenwart von H_2O_2 und Cl^- das starke Oxidationsmittel HOCl zu bilden. HOCl kann Proteine, Lipide und Nukleinsäuren modifizieren und deren Funktion beeinträchtigen. Unsere Gruppe konnte zeigen, dass unter neuroinflammatorischen Bedingungen Plasmalogene des Gehirns durch MPO modifiziert werden (Üllen 2010). Bei dieser Reaktion wird ein Lysophospholipid und 2-ClHDA gebildet. 2-ClHDA ruft in koronaren, arteriellen Endothelzellen Entzündungsreaktionen hervor wobei die COX-2 Expression ansteigt, die Prostaglandinsynthese erhöht und der NF- κ B Signalweg aktiviert wird. In mikrovaskulären Gehirndothelzellen induziert 2-ClHDA ATP Depletion, Caspase-3 vermittelte Apoptose, und den Verlust der Barrierefunktion (Üllen 2012, 2013).

In letzter Zeit verdichten sich die Hinweise darauf, dass die Aktivierung der Inflammasome auch eine zentrale Rolle in Endothelzellen einnimmt. Xiang und Mitarbeiter konnten zeigen, dass in einem Mausmodell hämorrhagischer Schock (eine Form des hypovolämischen Schocks, die durch starke Blutverluste entsteht das NLRP3 Inflammasom in Lungenendothelzellen aktiviert wird (Xiang, Shi et al. 2011). Die Aktivierung in diesem Modell erfolgt über TLR-2 und -4, zusätzlich trägt auch die endothelial NADPH-Oxidase (NOX4) zur Assemblierung des Inflammoms bei. Dieselbe Gruppe konnte kürzlich nachweisen dass hämorrhagischer Schock im Mausmodell zu einer Reduktion der IL-10 Synthese führt und dadurch die Produktion von Pynin inhibiert wird (Xu, Wen et al. 2013). Pynin ist ein Inhibitor der

Inflammasome Aktivierung. Durch die Inhibierung der Pyrin Synthese geht ein feedback Mechanismus verloren und das endotheliale Inflammasome kann vollständig aktiviert werden und dadurch pathophysiologisch wirksam werden (Xu, Wen et al. 2013). Kürzlich konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung des Inflammasomes in vaskulären Endothelzellen einen wichtigen Beitrag zur Ausbildung von atherosklerotischen Läsionen die durch oszillierenden Blutfluss ausgelöst werden, liefert (Abe and Berk 2013, Xiao, Lu et al. 2013).

Basierend auf diesen Befunden versuchte ich in der vorliegenden Arbeit Anhaltspunkte dafür zu finden, dass auch mikrovaskuläre Gehirnendothelzellen wichtige Komponenten des NLRP3 Inflammasoms exprimieren. Als potentieller Aktivator mittels TLR-4 vermittelter Mechanismen wurde 2-Chlorohexadecanal verwendet. 2-CIHDA ist ein Abbauprodukt von Plasmalogenen, das durch MPO-vermittelte Modifikation gebildet wird und einen potentieller DAMP darstellt (Ford 2010).

Um zu untersuchen ob 2-CIHDA ein potentieller Aktivator von Toll-Like Rezeptor medierten Signalwege ist, wurde in der vorliegenden Arbeit ein HEK BLUE TLR2 und TLR4 Reportersystem etabliert. HEK BLUE Zellen (Invivogen) wurden durch Transfektion des TLR4 oder TLR2 und den Corezeptoren MD2 und CD14 hergestellt. Als Reportersystem wird in diesen Zellen sekretorische embryonische alkalische Phosphatase unter der Kontrolle eines IL-12 p40 Minimalpromotors, der an fünf regulatorischen Nf- κ B und AP-1 Elemente fusioniert ist, eingesetzt. Somit bietet diese Zelllinie eine optimale Möglichkeit um potentielle Liganden für diese beiden TLRs zu identifizieren.

In ersten Vorversuchen wurde HEK BLUE TLR2 und TLR4 Zellen mit den spezifischen Liganden, LPA und LTA zeit- und konzentrationsabhängig stimuliert. Pattern Recognition Receptors befinden sich an vorderster Linie der Immunantwort und der Abwehr, somit ist für die Immunabwehr eine hohe Sensitivität des Rezeptors essentiell um körperfremde Moleküle auch in geringer Konzentration zu erkennen und das Abwehrsystem zu aktivieren. Aus den Ergebnissen in Abb. 12. ist ersichtlich, dass LPS den TLR4 im Konzentrationsbereich von 1ng/ml – 1 μ g/ml stimuliert wobei eine Sättigung bei 100 ng/ml erreicht wird. Auch bei Konzentrationen von 1ng/ml LPS erfolgt eine signifikante Aktivierung von NF- κ B und somit eine Expression der

alkalischen Phosphatase im Vergleich zur Negativkontrolle. Dieses Ergebnis lässt schließen dass, dieses Reportersystem eine sehr hohe Sensitivität aufweist.

Zu Überprüfung der Spezifität der TLR4 Rezeptors wurden die HEK Blue TLR4 Reporterzellen mit LPS in Gegenwart des TLR4 spezifischen Antagonisten, CLI-095 inkubiert. Wie in Abb.13 zu erkennen ist, wurde die LPS-abhängige Signaltransduktion in Gegenwart von CLI-095 keine komplett unterbunden was auch die Spezifität des Systems zeigt. CLI-095 inhibiert die Aktivität von TLR4 spezifisch indem es an die intrazelluläre Domäne von TLR4 bindet und so die Signaltransduktion über die entsprechenden Adapterproteine verhindert (Kawando 2008, Eur and Pharmacol 584, 40).

Diese Experiment wurde auch mit HEK Blue TLR2 Zelle durchgeführt (Abb.11) um sicherzustellen, dass der Inhibitor spezifisch den TLR4 inhibiert und nicht auf den TLR2 wirkt.

Identische Experiment wurden auch mit der HEK BLUE TLR2 Zelllinie durchgeführt. Dafür wurden HEK Blue TLR2 Zellen mit LTA konzentrationsabhängig stimuliert. Aus Abbildung 11 ist ersichtlich, dass LTA den TLR2-Rezeptor nach 24h signifikant in Abhängigkeit der Konzentration stimuliert.

Bei diesen Ergebnissen hat sich herausgestellt, dass die minimale Ligandenkonzentration die zur Aktivierung des TLR2 Systems nötig ist, bei ca. 8ng/ml LTA liegt. Präliminäre Untersuchungen, die von mir mit einer LPS Rohfraktion (*E.coli* OB:1114B) durchgeführt wurde, haben gezeigt dass diese Fraktion sowohl TLR4 als auch TLR2 aktiviert. Deshalb wurden alle hier gezeigten Versuche mit LPS Ultrapure-EB durchgeführt. Viele LPS Präparationen beinhalten geringe Konzentrationen endotoxischer Proteine und es wird angenommen, dass diese Kontaminationen den TLR2 aktivieren können. Eine Arbeitsgruppe untersuchte diese Hypothese indem sie herkömmliches LPS mittels einer modifizierten Phenol Extraktion nochmals aufreinigten um Endotoxine zu entfernen. Die Resultate dieser Gruppe haben gezeigt, dass weder der humane TLR2 noch der TLR2 in der Maus durch LPS in Abwesenheit der Endotoxine stimuliert wird (Hirschfeld, Ma et al. 2000).

In ersten Experimenten wurde überprüft ob 2-CIHDA den TLR4 Signalweg aktivieren kann. Diese Experimente haben klar gezeigt (Abb.14) dass 2-CIHDA den TLR4 Signalweg in Abhängigkeit der Konzentration und der Zeit aktiviert. Eine signifikante Aktivierung erfolgt bei Konzentrationen zwischen 5 μM und 15 μM 2-CIHDA, Konzentrationen die in atherosklerotischen Plaques (Thukkani, McHowat et al. 2003) im ischämischen Herzen (Thukkani, Martinson et al. 2005) oder im Gehirn unter neuroinflammatorischen Bedingungen (Ullen, Fauler et al. 2010) nachgewiesen wurde. Bei einer Konzentration von 1 μM 2-CIHDA erfolgt keine NF- κB Aktivierung in HEK Blue TLR4 Zellen. In Gegenwart des TLR4 spezifischen CLI-095 Inhibitors und 2-CIHDA konnte keine Aktivierung der alkalischen Phosphatase nachgewiesen werden (Abb.14). Daraus ist zu schließen, dass die Stimulierung der TLR4 Signaltransduktion durch 2-CIHDA rezeptorspezifisch ist. Weiters kann man aus diesen Resultaten ableiten, dass 2-CIHDA dieselben Effekte auslösen kann wie klassische DAMPs.

In Analogie zur Aktivierung des TLR4 Wegs durch gesättigte Fettsäuren wie z.B. Palmitat (Huang, Rutkowsky et al. 2012) waren die Resultate für 2-CIHA nicht unerwartet. Überraschenderweise konnte ich jedoch keine stimulierende Wirkung von 2-CIHDA auf den TLR4 weg nachweisen – diese Ergebnisse müssen in einer eigenen Versuchsreihe nochmals abgeklärt werden.

Bei Behandlung von TLR2 HEK Blue Zellen mit 2-CIHDA konnte keine Aktivierung des downstream Signaltransduktionswegs nachgewiesen werden. Diese Resultate legen den Schluss nahe, dass 2-CIHDA keinen Liganden für TLR2 darstellt.

In einem weiteren Experiment wurde die Produktion von ROS in Gegenwart von 2-CIHDA in BMVEC untersucht, da ROS zusätzlich zur Aktivierung von TLRs als Triggersignal zur Assemblierung des Inflammasoms wirken können. Die Analyse erfolgte mit einem redoxsensitiven Fluoreszenzfarbstoff 2,7 Dichlorodihydrofluorescein-diacetat ($\text{H}_2\text{DCF-DA}$) welcher durch ROS zu 2,7-Dichlorfluorescein oxidiert wird. Die Ergebnisse aus Abbildung 17 im Ergebnisteil zeigen, dass nach 5h 2-CIHDA Behandlung die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies in BMVEC bei einer Konzentration von 15 μM 2-CIHDA signifikant aktiviert wird und konzentrationsabhängig verläuft. In zerebrovaskulären EC konnte

gezeigt werden, dass das Enzym NADP oxidase 4 (NOX4) zuständig ist (Takac, Schroder et al. 2011). Nox4 zeigt im Gehirn die höchste Expression im Endothel und in Neuronen (Kleinschnitz, Grund et al. 2010) Nox4 könnte auch für die H₂O₂ Produktion in BMVEC verantwortlich sein, das als Cosubstrat für HOCl Produktion für MPO zur Verfügungen steht. Dieses Ergebnis weist ebenfalls auf eine mögliche Triggerfunktion des Inflammasom hin.

Weitere Untersuchungen von anderen Gruppen haben gezeigt, dass intrazelluläre Ceramide das NLRP3 Inflammasom in Makrophagen aktivieren könnte. (Vandanmagsar, Youm et al. 2011). Um erste Hinweise darauf zu erhalten ob 2-CIHDA auch die Ceramidproduktion in BMVEC stimuliert. Hierfür wurden BMVEC Zellen in Abhängigkeit der Zeit und der Konzentration mit 2-CIHDA behandelt und anschließend wurden die Lipide extrahiert und mittels LC – MS am Institut für Biochemie, Zentrum für molekulare Biowissenschaften, Karl-Franzens Universität Graz von Dr. Gerald Rechberger, analysiert. Die Ergebnisse in Abbildung 8 zeigen, dass 2-CIHDA die Bildung von fast allen Ceramidspezies bis auf die 18:0 und 20:3 Spezies signifikant erhöht. Die Ceramidbildung erfolgt rasch (innerhalb von 180 min) und steigt auf das 2-bis 3- Werte der Kontrollen an. Parallel zur Induktion der Ceramidkonzentrationen erfolgt auch eine Abnahme der intrazellulären Sphingomyelinkonzentrationen (Abb. 18B). Dies spricht dafür dass durch 2-CIHDA die Aktivität von Sphingomyelinasen induziert wird, dieser Schluss bedarf allerdings noch experimenteller Verifizierung.

Die bisherigen Daten konnten zeigen, dass 2-CIHDA in BMEV zwei wichtige Triggersignale zur Assemblierung des Inflammasoms, nämlich die Bildung von intrazellulären ROS und Ceramiden auslöst. Deshalb habe ich in den nächsten Experimenten mittels qPCR untersucht, ob die Hauptkomponenten des endothelialen Inflammasoms (NLRP3 und Casp-1) in BMVEC exprimiert werden.

Die Ergebnisse der Expressionanalyse von CASP1 und NLRP3 zeigen, dass BMVEC Zellen sowohl die Procaspase-1 als auch NLRP3 exprimieren und die Expression nach LPS Behandlung ansteigt. Die Graphen aus der Abbildung 9 zeigen, dass die Expression der Procaspase-1 in Abhängigkeit von LPS nicht konzentrationsabhängig erfolgt. Die höchste Expression konnte bei bei 500 ng/ml nach 3h LPS beobachtet werden. Das Expressionsmuster von NLRP3 verläuft ähnlich. Die höchste Expression von NLRP3 in LPS behandelten BMVEC erfolgt bei 500 ng/ml LPS nach

3h. Ebenfalls erfolgt das NLRP3 Expressionsmuster nach LPS Stimulation wie bei der Procaspase-1 nicht in Abhängigkeit der Konzentration. Die Resultate dieser Experimente sind preliminärer Natur und müssen alle wiederholt werden um diese Befunde zu verifizieren.

Die Arbeitsgruppe von Yin konnte zeigen, dass die Expression der Inflammasomkomponenten gewebspezifisch erfolgt. Die proinflammatorischen Cytokine IL1 β und IL-18 werden im Gehirn, Lymphknoten und Thymus nicht konstitutiv exprimiert. In Bezug auf die Expressionsmuster von NALP1, NALP3 und IPAF können die Gewebe welche bei dieser Untersuchung analysiert wurden in drei Klassen unterteilt werden: i.) Gehirn, Placenta, Blut und Thymus exprimieren die Komponenten des Inflammasoms konstitutiv. II.) Die zweite Gewebeklasse exprimiert Komponenten des Inflammasoms nicht konstitutiv aber in einem Status in welchen jederzeit eine Expression stattfindet wenn eine Komponente aufreguliert wird (nearly ready status). iii.) Die letzte Klasse, welche Herz und Knochenmark inkludiert benötigt einen Stimulus um Komponenten des Inflammasoms exprimieren zu können (Yin, Yan et al. 2009).

Weiter konnte gezeigt werden, dass die Expression der Inflammasomkomponenten, NLRP1, NLRP3, ACS und der proinflammatorischen Cytokine, TNF- α und MCP-1 im Gehirn von Mäusen welche mit Alkohol gefüttert wurden, erhöht. NLRP3 und ACS defiziente Mäuse zeigen keine Caspase-1 Aktivität und es erfolgt ebenfalls keine IL-1 β Produktion in Gehirn nach Stimulierung mit Alkohol (Lippai, Bala et al. 2013). Diese Autoren legten nahe, dass Ethanol-supplementierung in Mäusen eine ausgeprägte neuroinflammatorische Komponente hervorruft. Leider gibt es aus dieser Untersuchung keine Hinweise auf die Zerebrovaskulatur.

In einem nächsten Schritt wurde untersucht ob LPS Ultrapure als Inflammasom-Trigger und 2-CIHDA als Plasmalogen-abgeleitetes DAMP, Casp-1 Aktivität in BMVEC induzieren kann. In ersten Vorexperimenten wurden BMVEC in Gegenwart von LPS Ultrapure für 3h inkubiert. Aus Abbildung 21 im Ergebnisteil ist ersichtlich, dass nach dieser kurzen Inkubation mit LPS und 2-CIHDA keine Aktivierung der Caspase-1 erfolgt. Die Gründe für diese Beobachtungen könnten einerseits in zu kurzen Inkubationszeiten und andererseits in fehlender Inflammasom Aktivierung durch LPS Ultrapure liegen. Dies wäre im Einklang mit einer Studie, die zeigen konnte, dass LPS Ultrapure in THP-1 Makrophagen nur in Gegenwart von Muramyl-

Dipeptid als Aktivator des Inflammasomes fungieren kann. (Martinon, Agostini et al. 2004). während LPS crude die Caspase-1 Aktivität in THP-1 Makrophagen sehr wohl aktiviert (Ohira, Fujioka et al. 2012). Deshalb versuchte ich in einem nachfolgenden Experiment die Caspase-1 Aktivität nach LPS crude Behandlung in differenzierten THP-1 Zellen zu analysieren. Die Ergebnisse in Abbildung 20 zeigen, dass die Aktivierung der Caspase-1 in THP-1 Zellen in Abhängigkeit der Zeit erfolgt. Nach 2h LPS (500ng/ml) Behandlung erfolgt keine Aktivierung der Caspase-1, während nach 5h Inkubation mit 500ng/ml LPS eine signifikante Aktivierung der Caspase-1 im Vergleich zur Positiv- (1 Unit humane recombinante Caspase-1) und Negativkontrolle (keine Zusätze) erfolgt. Somit kann festgehalten werden, dass erst in Makrophagen nach einem kurzen Zeitpunkt keine Aktivierung der Caspase-1 nach LPS Stimulation erfolgt.

Zusammenfassen lässt sich sagen, 2-CIHDA in Endothelzellen des Gehirns einen Liganden für TLR4, nicht aber für TLR2 darstellt. Die 2-CIHDA medierte Signaltransduktion über TLR4 kann mittels CLI-095 spezifisch inhibiert werden. Weiters löst 2-CIHDA die Ausbildung von reaktiven Sauerstoffspezies aus und erhöht die intrazelluläre Ceramidkonzentrationen. Beide Verbindungsklassen wirken als Triggersignale für die Inflammasomaktivierung. Letztendlich konnte ich zeigen, dass BMVEC NLRP3 und Casp1 auf mRNA Ebene exprimieren und dass LPS dazu in der Lage ist, Caspase-1 zu aktivieren.

6. Literatur

- Abbott, N. J. (2002). "Astrocyte-endothelial interactions and blood-brain barrier permeability." J Anat **200**(6): 629-638.
- Abbott, N. J. (2013). "Blood-brain barrier structure and function and the challenges for CNS drug delivery." J Inherit Metab Dis **36**(3): 437-449.
- Abbott, N. J., et al. (2010). "Structure and function of the blood-brain barrier." Neurobiol Dis **37**(1): 13-25.
- Abbott, N. J., et al. (2006). "Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier." Nat Rev Neurosci **7**(1): 41-53.
- Abe, J. and B. C. Berk (2013). "Atheroprone flow activation of the sterol regulatory element binding protein 2 and nod-like receptor protein 3 inflammasome mediates focal atherosclerosis." Circulation **128**(6): 579-582.
- Abulafia, D. P., et al. (2009). "Inhibition of the inflammasome complex reduces the inflammatory response after thromboembolic stroke in mice." J Cereb Blood Flow Metab **29**(3): 534-544.
- Albert, C. J., et al. (2001). "Reactive chlorinating species produced by myeloperoxidase target the vinyl ether bond of plasmalogens: identification of 2-chlorohexadecanal." J Biol Chem **276**(26): 23733-23741.
- Anbukumar, D. S., et al. (2010). "Chlorinated lipid species in activated human neutrophils: lipid metabolites of 2-chlorohexadecanal." J Lipid Res **51**(5): 1085-1092.
- Bailey, T. L., et al. (2004). "The nature and effects of cortical microvascular pathology in aging and Alzheimer's disease." Neurol Res **26**(5): 573-578.
- Ballabh, P., et al. (2004). "The blood-brain barrier: an overview: structure, regulation, and clinical implications." Neurobiol Dis **16**(1): 1-13.
- Bauernfeind, F., et al. (2011). "Inflammasomes: current understanding and open questions." Cell Mol Life Sci **68**(5): 765-783.
- Bergsbaken, T., et al. (2009). "Pyroptosis: host cell death and inflammation." Nat Rev Microbiol **7**(2): 99-109.
- Bernacki, J., et al. (2008). "Physiology and pharmacological role of the blood-brain barrier." Pharmacol Rep **60**(5): 600-622.
- Braverman, N. E. and A. B. Moser (2012). "Functions of plasmalogen lipids in health and disease." Biochim Biophys Acta **1822**(9): 1442-1452.
- Chen, J. W., et al. (2008). "Myeloperoxidase-targeted imaging of active inflammatory lesions in murine experimental autoimmune encephalomyelitis." Brain **131**(Pt 4): 1123-1133.
- Dallas, S., et al. (2006). "Multidrug resistance-associated proteins: expression and function in the central nervous system." Pharmacol Rev **58**(2): 140-161.
- Dao, T., et al. (1998). "IL-18 augments perforin-dependent cytotoxicity of liver NK-T cells." J Immunol **161**(5): 2217-2222.

Davies, M. J. (2011). "Myeloperoxidase-derived oxidation: mechanisms of biological damage and its prevention." J Clin Biochem Nutr **48**(1): 8-19.

Davis, B. K., et al. (2011). "The inflammasome NLRs in immunity, inflammation, and associated diseases." Annu Rev Immunol **29**: 707-735.

Dean, M., et al. (2001). "The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily." Genome Res **11**(7): 1156-1166.

Dinarello, C. A. (1996). "Biologic basis for interleukin-1 in disease." Blood **87**(6): 2095-2147.

Dinarello, C. A. (2005). "Blocking IL-1 in systemic inflammation." J Exp Med **201**(9): 1355-1359.

Dinarello, C. A. (2011). "Interleukin-1 in the pathogenesis and treatment of inflammatory diseases." Blood **117**(14): 3720-3732.

Faustin, B., et al. (2007). "Reconstituted NALP1 inflammasome reveals two-step mechanism of caspase-1 activation." Mol Cell **25**(5): 713-724.

Ford, D. A. (2010). "Lipid oxidation by hypochlorous acid: chlorinated lipids in atherosclerosis and myocardial ischemia." Clin Lipidol **5**(6): 835-852.

Freeman, L. R. and J. N. Keller (2012). "Oxidative stress and cerebral endothelial cells: regulation of the blood-brain-barrier and antioxidant based interventions." Biochim Biophys Acta **1822**(5): 822-829.

Ghayur, T., et al. (1997). "Caspase-1 processes IFN-gamma-inducing factor and regulates LPS-induced IFN-gamma production." Nature **386**(6625): 619-623.

Girouard, H. and C. Iadecola (2006). "Neurovascular coupling in the normal brain and in hypertension, stroke, and Alzheimer disease." J Appl Physiol **100**(1): 328-335.

Gracie, J. A., et al. (2003). "Interleukin-18." J Leukoc Biol **73**(2): 213-224.

Gray, E., et al. (2008). "Elevated activity and microglial expression of myeloperoxidase in demyelinated cerebral cortex in multiple sclerosis." Brain Pathol **18**(1): 86-95.

Halliwell, B. (2006). "Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now?" J Neurochem **97**(6): 1634-1658.

Han, X., et al. (2001). "Plasmalogen deficiency in early Alzheimer's disease subjects and in animal models: molecular characterization using electrospray ionization mass spectrometry." J Neurochem **77**(4): 1168-1180.

Hanke, M. L. and T. Kielian (2011). "Toll-like receptors in health and disease in the brain: mechanisms and therapeutic potential." Clin Sci **121**(9): 367-387.

Hawkins, B. T. and T. P. Davis (2005). "The blood-brain barrier/neurovascular unit in health and disease." Pharmacol Rev **57**(2): 173-185.

Hirschfeld, M., et al. (2000). "Cutting edge: repurification of lipopolysaccharide eliminates signaling through both human and murine toll-like receptor 2." J Immunol **165**(2): 618-622.

Hoegen, T., et al. (2011). "The NLRP3 inflammasome contributes to brain injury in pneumococcal meningitis and is activated through ATP-dependent lysosomal cathepsin B release." J Immunol **187**(10): 5440-5451.

Huang, S., et al. (2012). "Saturated fatty acids activate TLR-mediated proinflammatory signaling pathways." J Lipid Res **53**(9): 2002-2013.

Iadecola, C. (2004). "Neurovascular regulation in the normal brain and in Alzheimer's disease." Nat Rev Neurosci **5**(5): 347-360.

Ilzecka, J. (1996). "The structure and function of blood-brain barrier in ischaemic brain stroke process." Ann Univ Mariae Curie Sklodowska Med **51**: 123-127.

Jha, S., et al. (2010). "The inflammasome sensor, NLRP3, regulates CNS inflammation and demyelination via caspase-1 and interleukin-18." J Neurosci **30**(47): 15811-15820.

Kanneganti, T. D., et al. (2007). "Intracellular NOD-like receptors in host defense and disease." Immunity **27**(4): 549-559.

Kawai, T. and S. Akira (2007). "TLR signaling." Semin Immunol **19**(1): 24-32.

Klebanoff, S. J., et al. (2013). "Myeloperoxidase: a front-line defender against phagocytosed microorganisms." J Leukoc Biol **93**(2): 185-198.

Kleinschnitz, C., et al. (2010). "Post-stroke inhibition of induced NADPH oxidase type 4 prevents oxidative stress and neurodegeneration." PLoS Biol **8**(9): 1000479.

Kumagai, Y., et al. (2008). "Pathogen recognition by innate receptors." J Infect Chemother **14**(2): 86-92.

Lim, D. A., et al. (2007). "The adult neural stem cell niche: lessons for future neural cell replacement strategies." Neurosurg Clin N Am **18**(1): 81-92.

Lim, K. H. and L. M. Staudt (2013). "Toll-like receptor signaling." Cold Spring Harb Perspect Biol **5**(1): a011247.

Lippai, D., et al. (2013). "Alcohol-induced IL-1beta in the brain is mediated by NLRP3/ASC inflammasome activation that amplifies neuroinflammation." J Leukoc Biol **94**(1): 171-182.

Lo, E. H., et al. (2003). "Mechanisms, challenges and opportunities in stroke." Nat Rev Neurosci **4**(5): 399-415.

Marik, C., et al. (2007). "Lesion genesis in a subset of patients with multiple sclerosis: a role for innate immunity?" Brain **130**(Pt 11): 2800-2815.

Marsche, G., et al. (2004). "2-chlorohexadecanal derived from hypochlorite-modified high-density lipoprotein-associated plasmalogen is a natural inhibitor of endothelial nitric oxide biosynthesis." Arterioscler Thromb Vasc Biol **24**(12): 2302-2306.

Martinon, F., et al. (2004). "Identification of bacterial muramyl dipeptide as activator of the NALP3/cryopyrin inflammasome." Curr Biol **14**(21): 1929-1934.

Martinon, F. and J. Tschopp (2007). "Inflammatory caspases and inflammasomes: master switches of inflammation." Cell Death Differ **14**(1): 10-22.

Medzhitov, R. (2008). "Origin and physiological roles of inflammation." Nature **454**(7203): 428-435.

Melchiorre P, et al. (2008). "Asymmetric aminocatalysis - gold rush in organic chemistry." Angew Chem Int Ed Engl **47**(33):6138-71

Miao, E. A., et al. (2006). "Cytoplasmic flagellin activates caspase-1 and secretion of interleukin 1beta via Ipaf." Nat Immunol **7**(6): 569-575.

Miao, E. A., et al. (2010). "Innate immune detection of the type III secretion apparatus through the NLRC4 inflammasome." Proc Natl Acad Sci U S A **107**(7): 3076-3080.

Micallef, M. J., et al. (1996). "Interferon-gamma-inducing factor enhances T helper 1 cytokine production by stimulated human T cells: synergism with interleukin-12 for interferon-gamma production." Eur J Immunol **26**(7): 1647-1651.

Morganti-Kossmann, M. C., et al. (2002). "Inflammatory response in acute traumatic brain injury: a double-edged sword." Curr Opin Crit Care **8**(2): 101-105.

Nadal, A., et al. (1995). "Plasma albumin is a potent trigger of calcium signals and DNA synthesis in astrocytes." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(5): 1426-1430.

Nagyoszi, P., et al. (2010). "Expression and regulation of toll-like receptors in cerebral endothelial cells." Neurochem Int **57**(5): 556-564.

Negishi, H., et al. (2006). "Evidence for licensing of IFN-gamma-induced IFN regulatory factor 1 transcription factor by MyD88 in Toll-like receptor-dependent gene induction program." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(41): 15136-15141.

Newman, Z. L., et al. (2010). "Susceptibility to anthrax lethal toxin-induced rat death is controlled by a single chromosome 10 locus that includes rNlrp1." PLoS Pathog **6**(5): 1000906.

Nusshold, C., et al. (2013). "Endocytosis and intracellular processing of BODIPY-sphingomyelin by murine CATH.a neurons." Biochim Biophys Acta.

Ohira, H., et al. (2012). "Butyrate enhancement of interleukin-1beta production via activation of oxidative stress pathways in lipopolysaccharide-stimulated THP-1 cells." J Clin Biochem Nutr **50**(1): 59-66.

Ohtsuki, S. and T. Terasaki (2007). "Contribution of carrier-mediated transport systems to the blood-brain barrier as a supporting and protecting interface for the brain; importance for CNS drug discovery and development." Pharm Res **24**(9): 1745-1758.

Okamura, H., et al. (1995). "Cloning of a new cytokine that induces IFN-gamma production by T cells." Nature **378**(6552): 88-91.

Pal, D., et al. (2012). "Fetuin-A acts as an endogenous ligand of TLR4 to promote lipid-induced insulin resistance." Nat Med **18**(8): 29.

Pfaffl, M. W., et al. (2002). "Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR." Nucleic Acids Res **30**(9): e36.

Rathinam, V. A., et al. (2012). "Regulation of inflammasome signaling." Nat Immunol **13**(4): 333-332.

Rubartelli, A. (2012). "Redox control of NLRP3 inflammasome activation in health and disease." J Leukoc Biol **92**(5): 951-958.

Sauer, I., et al. (2005). "An apolipoprotein E-derived peptide mediates uptake of sterically stabilized liposomes into brain capillary endothelial cells." Biochemistry **44**(6): 2021-2029.

Schroder, K. and J. Tschopp (2010). "The inflammasomes." Cell **140**(6): 821-832.

Seelig, A., et al. (1994). "A method to determine the ability of drugs to diffuse through the blood-brain barrier." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(1): 68-72.

Shukla, V., et al. (2011). "Oxidative stress in neurodegeneration." Adv Pharmacol Sci **2011**: 572634.

Snyder, F. (1999). "The ether lipid trail: a historical perspective." Biochim Biophys Acta **4**(3): 265-278.

Strowig, T., et al. (2012). "Inflammasomes in health and disease." Nature **481**(7381): 278-286.

Takac, I., et al. (2011). "The E-loop is involved in hydrogen peroxide formation by the NADPH oxidase Nox4." J Biol Chem **286**(15): 13304-13313.

Takeda, K. and S. Akira (2004). "TLR signaling pathways." Semin Immunol **16**(1): 3-9.

Takeda, K. and S. Akira (2005). "Toll-like receptors in innate immunity." Int Immunol **17**(1): 1-14.

Takeuchi, O. and S. Akira (2010). "Pattern recognition receptors and inflammation." Cell **140**(6): 805-820.

Thukkani, A. K., et al. (2005). "Neutrophil-mediated accumulation of 2-ClHDA during myocardial infarction: 2-ClHDA-mediated myocardial injury." Am J Physiol Heart Circ Physiol **288**(6): 28.

Thukkani, A. K., et al. (2005). "Neutrophil-mediated accumulation of 2-ClHDA during myocardial infarction: 2-ClHDA-mediated myocardial injury." Am J Physiol Heart Circ Physiol **288**(6): H2955-2964.

Thukkani, A. K., et al. (2003). "Identification of alpha-chloro fatty aldehydes and unsaturated lysophosphatidylcholine molecular species in human atherosclerotic lesions." Circulation **108**(25): 3128-3133.

Tominaga, K., et al. (2000). "IL-12 synergizes with IL-18 or IL-1beta for IFN-gamma production from human T cells." Int Immunol **12**(2): 151-160.

Tschopp, J. and K. Schroder (2010). "NLRP3 inflammasome activation: The convergence of multiple signalling pathways on ROS production?" Nat Rev Immunol **10**(3): 210-215.

Ullen, A., et al. (2012). "Phloretin ameliorates 2-chlorohexadecanal-mediated brain microvascular endothelial cell dysfunction in vitro." Free Radic Biol Med **53**(9): 1770-1781.

Ullen, A., et al. (2010). "Mouse brain plasmalogens are targets for hypochlorous acid-mediated modification in vitro and in vivo." Free Radic Biol Med **49**(11): 1655-1665.

Ullen, A., et al. (2013). "Myeloperoxidase-derived oxidants induce blood-brain barrier dysfunction in vitro and in vivo." PLoS One **8**(5).

Vandanmagsar, B., et al. (2011). "The NLRP3 inflammasome instigates obesity-induced inflammation and insulin resistance." Nat Med **17**(2): 179-188.

Vladimer, G. I., et al. (2013). "Inflammasomes and host defenses against bacterial infections." Curr Opin Microbiol **16**(1): 23-31.

Wang, H. and J. A. Joseph (1999). "Quantifying cellular oxidative stress by dichlorofluorescein assay using microplate reader." Free Radic Biol Med **27**(5-6): 612-616.

Weksler B, Romero IA, Couraud PO (2013). "The hCMEC/D3 cell line as model of the human blood brain barrier." Fluids Barriers CNS **26** ;10 (1):16

Weksler BB (2005). "Blood - brain barrier - specific properties of a human adult brain endothelial cell line." FASEB J **19** (13): 1872-4

Wildsmith, K. R., et al. (2006). "Metabolism of myeloperoxidase-derived 2-chlorohexadecanal." J Biol Chem **281**(25): 16849-16860.

Xia, Z. P., et al. (2009). "Direct activation of protein kinases by unanchored polyubiquitin chains." Nature **461**(7260): 114-119.

Xiang, M., et al. (2011). "Hemorrhagic shock activation of NLRP3 inflammasome in lung endothelial cells." J Immunol **187**(9): 4809-4817.

Xiao, H., et al. (2013). "Sterol Regulatory Element Binding Protein 2 Activation of NLRP3 Inflammasome in Endothelium Mediates Hemodynamic-Induced Atherosclerosis Susceptibility." Circulation **128**(6): 632-642.

Xu, P., et al. (2013). "Hemorrhagic shock augments Nlrp3 inflammasome activation in the lung through impaired pyrin induction." J Immunol **190**(10): 5247-5255.

Yap, Y. W., et al. (2007). "Chlorinative stress: an under appreciated mediator of neurodegeneration?" Cell Signal **19**(2): 219-228.

Yin, Y., et al. (2013). "Inflammasomes: sensors of metabolic stresses for vascular inflammation." Front Biosci (Landmark Ed) **18**: 638-649.

Yin, Y., et al. (2009). "Inflammasomes are differentially expressed in cardiovascular and other tissues." Int J Immunopathol Pharmacol **22**(2): 311-322.

Yoshimoto, T., et al. (1998). "IL-12 up-regulates IL-18 receptor expression on T cells, Th1 cells, and B cells: synergism with IL-18 for IFN-gamma production." J Immunol **161**(7): 3400-3407.

Zhang, E. Y., et al. (2002). "Structural biology and function of solute transporters: implications for identifying and designing substrates." Drug Metab Rev **34**(4): 709-750.

Zhang, Y., et al. (2006). "Porcine brain microvessel endothelial cells as an in vitro model to predict in vivo blood-brain barrier permeability." Drug Metab Dispos **34**(11): 1935-1943.

Zlokovic, B. V. (2005). "Neurovascular mechanisms of Alzheimer's neurodegeneration." Trends Neurosci **28**(4): 202-208.

Zlokovic, B. V. (2008). "The blood-brain barrier in health and chronic neurodegenerative disorders." Neuron **57**(2): 178-201.

D. Voet, J.G. Voet (2002) "*Lehrbuch der Biochemie*." Wiley-VCH

<http://neuroscience.uth.tmc.edu>