
Aus der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie
der Ludwig – Maximilians – Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. Dr. h. c. T. Ruzicka

Aktivierung des AIM2-Inflammasoms durch mitochondriale DNA in
humanen epidermalen Keratinozyten nach Stimulation mit dem
Bienengiftbestandteil Melittin

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Vanessa Schmezer

aus
Heilbronn-Neckargartach

2014

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: PD Dr. med. J. Schauber

Mitberichterstatter: Priv. Doz. Dr. Christoph Walz
Priv. Doz. Dr. Dr. Harald Mückter

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Dr. rer. nat. Y. Dombrowski

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h. c. M. Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 13.03.2014

Für meine Eltern

Inhalt

A	Abkürzungsverzeichnis	III
B	Abbildungsverzeichnis	VII
C	Tabellenverzeichnis	VIII
1	Einleitung	1
1.1	Mitochondrien	1
1.2	Mitochondriale DNA in menschlichen Zellen	2
1.3	Das angeborene Immunsystem und allergische Sensibilisierung	3
1.4	Inflammasome	6
1.4.1	Das NLRP3-Inflammasom	7
1.4.2	Das AIM2-Inflammasom	8
1.4.3	Inflammasome und Keratinozyten	11
1.5	Zusammensetzung und Wirkung von Bienengift	12
1.5.1	Melittin	13
1.5.2	Sonstige Bestandteile	14
1.6	Allergien	15
1.6.1	Typ-I-Allergie	15
1.6.2	Typ-IV-Allergie	16
1.7	Ziele der Arbeit	17
2	Material und Methoden	19
2.1	Primäre humane epidermale Keratinozyten (NHEK)	19
2.2	Makrophagen	20
2.3	Behandlung der Zellen mit Melittin	20
2.4	Isolation des Zytosols aus NHEK	20
2.5	Isolation der Mitochondrien aus NHEK	21
2.6	Isolation von mitochondrialer DNA aus NHEK-Mitochondrien	22
2.7	Aufreinigen der DNA aus dem Zytosol von NHEK	23
2.8	Analyse der Zellsignalwege durch siRNA-Transfektion	24
2.9	Transfektion von ASC-CFP-Makrophagen	25
2.10	Polymerase Chain Reaction (PCR, Polymerase-Kettenreaktion)	26
2.11	Agarose-Gelelektrophorese	29
2.12	Interleukin-1 β ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay)	31
2.13	Durchflusszytometrie (FACS-Messung)	34
2.14	Statistik	35

3	Ergebnisse	36
3.1	Wirkung von körpereigener DNA auf die IL-1 β Freisetzung	36
3.1.1	Mitochondriale DNA bewirkt eine IL-1 β Freisetzung in NHEK	36
3.1.2	Mitochondriale DNA aktiviert das AIM2-Inflammasom	37
3.2	Eine Stimulation mit Melittin bewirkt eine Schädigung der Mitochondrien von NHEK und führt zu einer Freisetzung von mitochondrialer DNA ins Zytosol	39
3.2.1	Melittin führt zu einer Zerstörung von Mitochondrien (Nachweis mittels FACS)	39
3.2.2	Melittin führt zu einer Freisetzung von mitochondrialer DNA ins Zytosol	44
3.3	Die durch eine Stimulation mit Melittin freigesetzte mitochondriale DNA führt zur AIM2-Inflammasomaktivierung und IL-1 β Freisetzung	45
3.4	Die IL-1 β Produktion erfolgt AIM2 vermittelt und ist NLRP3 unabhängig	47
3.5	Nachweis der Inflammasomaktivierung in ASC-CFP-exprimierenden Makrophagen mittels Fluoreszenzmikroskopie	49
3.5.1	Transfektion der ASC-CFP-Makrophagen mit poly(dA:dT)	50
3.5.2	Transfektion der ASC-CFP-Makrophagen mit mtDNA	51
3.5.3	Transfektion der ASC-CFP-Makrophagen mit der aufgereinigten DNA aus zuvor nicht-Melittin behandelten Zellen	52
3.5.4	Transfektion der ASC-CFP-Makrophagen mit der aufgereinigten DNA aus zuvor mit Melittin behandelten Zellen	53
3.5.5	Transfektion der ASC-CFP-Makrophagen mit genomischer DNA	54
4	Diskussion	56
5	Zusammenfassung	63
6	Literaturverzeichnis	65
7	Bildernachweis	71
8	Danksagung	72

Teile der Arbeit wurden bereits publiziert:

DOMBROWSKI, Y., PERIC, M., KOGLIN, S., KAYMAKANOV, N., SCHMEZER, V., REINHOLZ, M., RUZICKA, T., SCHAUBER, J. (2012): Honey bee (*Apis mellifera*) venom induces AIM2 inflammasome activation in human keratinocytes. *Allergy*, 67 (11): 1400-7.

A Abkürzungsverzeichnis

Å	Ångström (Einheit); 1 Å = 0,1 nm
AIM2	Absent in melanoma 2
Arg	Arginin
ASC	apoptosis-associated speck like protein
ATP	Adenosintriphosphat
Bcl-2	B-cell lymphoma 2; Protein zur Regulation der Apoptose
°C	Temperaturangabe in Grad Celsius
Ca ²⁺	Calcium
CD	Cluster of Differentiation
CFP	Cyan Fluorescent Protein
cm ²	Quadratcentimeter
CO ₂	chemisches Zeichen für Kohlenstoffdioxid
CONH ₂	Carbonsäureamid; funktionelle Gruppe der Aminosäuren
COX	Cyclooxygenase
DAMPs	damage associated molecular patterns
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	desoxyribonucleid acid, dt: Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
dsDNA	doppelsträngige DNA

ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
FBS	engl.: fetal bovine serum; Fetales Kälberserum
FCS	forward scatter
g/l	Gramm/Liter
Gln	Glutamin
Gly	Glycin
h	hour, dt.: Stunde
H ₂ SO ₄	chemisches Zeichen für Schwefelsäure
H ₂ O	chemisches Zeichen für Wasser
H ₂ O ₂	chemisches Zeichen für Wasserstoffperoxid
HIN200	hematopoietic interferon-inducible nuclear antigens with 200 amino acid repeats
HRP	Horse Radish Peroxidase
IFN	Interferon
IgE	Immunglobulin E
IL	Interleukin
IL-1β	Interleukin 1β
Ile	Isoleucin
kb	Kilobase
kDa	Kilodalton
Leu	Leucin
LRR	leucin rich repeats; dt.: C-terminale Leucin-reiche Region
Lys	Lysin

MgCl ₂	chemisches Zeichen für Magnesiumchlorid
MHC	major histocompatibility complex
min	Minuten
ml	Milliliter
mM	= mmol/Liter
mRNA	messenger RNA
mtDNA	mitochondriale DNA
µg/ml	Mikrogramm/Milliliter
µm	Mikrometer
NBD	nucleotide-binding domain dt.: Nukleotid bindende Region
NH ₂	Amin; chemische Schreibweise der Aminogruppe der Aminosäuren
NHEK	Normal Human Epidermal Keratinocytes
NFκB	nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells, Transkriptionsfaktor
ng	Nanogramm
NLR	nucleotide-binding domain leucine-rich repeat-containing receptors
nm	Nanometer
PAMPs	pathogen-associated molecular patterns
PCR	Polymerase Chain Reaction, dt.: Polymerasekettenreaktion
RD	Reagent Diluent
pg/ml	Pikogramm pro Milliliter
PRRs	pattern-recognition receptors

Pro	Prolin
RNA	ribonucleid acid, dt.: Ribonukleinsäure
rRNA	ribosomale RNA
Thr	Threonin
TH-Zellen	T-Helferzellen
tRNA	transfer RNA
Trp	Tryptophan
s	Sekunde
SDS	Sodium Dodecyl Sulfat
Ser	Serin
siRNA	short interfering RNA
SSC	side scatter
TLR	Toll-like-Rezeptoren
TMB	Tetramethylbenzidin
TNF- α	Tumornekrosefaktor α
U/min	Umdrehungen/Minute
UV-Licht	Ultraviolettes Licht
Val	Valin
%	Prozent

B Abbildungsverzeichnis

Abb. 1	Querschnitt durch ein Mitochondrium	Seite 1
Abb. 2	Schematischer Aufbau der mtDNA einer menschlichen Zelle	Seite 2
Abb. 3	Darstellung des NLRP3-Inflammasomkomplexes	Seite 8
Abb. 4	Zustand im Zytosol vor Bindung zytosolischer DNA an AIM2	Seite 9
Abb. 5	Bindung der DNA an AIM2	Seite 9
Abb. 6	Bindung von AIM2 an Pro-Caspase über das ASC-Protein	Seite 10
Abb. 7	Induktion der IL-1 β Sekretion	Seite 11
Abb. 8	Freisetzung von Entzündungsmediatoren nach Allergenbindung	Seite 15
Abb. 9	Marker für die Gelelektrophorese	Seite 30
Abb. 10	ELISA: Coating der Mikrotiterplatte	Seite 31
Abb. 11	ELISA: Bindung an Capture-Antikörper	Seite 32
Abb. 12	ELISA: Zugabe und Bindung des zweiten Antikörpers	Seite 33
Abb. 13	FACS: Festlegung der Region der lebenden, intakten NHEK	Seite 35
Abb. 14	Mitochondriale DNA bewirkt eine Freisetzung von IL-1 β in NHEK	Seite 37
Abb. 15	Die durch mitochondriale DNA ausgelöste IL-1 β Freisetzung erfolgt über das AIM2-Inflammasom	Seite 38
Abb. 16	FACS: Negativkontrolle	Seite 39
Abb. 17	FACS: Negativkontrolle (unbehandelte Zellen) NHEK, Mitotracker gefärbt, nicht mit Melittin behandelt	Seite 40
Abb. 18	FACS: NHEK, Mitotracker gefärbt, behandelt mit 5 μ g/ml Melittin	Seite 41
Abb. 19	FACS: NHEK, Mitotracker gefärbt, behandelt mit 10 μ g/ml Melittin	Seite 42

Abb. 20	FACS: Positivkontrolle (10% SDS)	Seite 43
Abb. 21	PCR zur Amplifikation von COX3	Seite 44
Abb. 22	IL-1 β Sekretion aus humanen Keratinozyten nach Transfektion mit mtDNA	Seite 46
Abb. 23	siRNA: Negativkontrolle und Transfektion von siRNA + aufgereinigte mtDNA aus nicht-Melittin behandelten NHEK	Seite 47
Abb. 24	siRNA: Transfektion von siRNA + aufgereinigte mtDNA aus Melittin behandelten NHEK und Positivkontrolle	Seite 48
Abb. 25	Fluoreszenzmikroskopie: Negativkontrolle	Seite 49
Abb. 26	Fluoreszenzmikroskopie: Transfektion mit p(dA:dT)	Seite 50
Abb. 27	Fluoreszenzmikroskopie: Transfektion mit mtDNA	Seite 51
Abb. 28	Fluoreszenzmikroskopie: Transfektion mit der aufgereinigten DNA, die zuvor aus nicht-Melittin behandelten NHEK isoliert wurde	Seite 52
Abb. 29	Fluoreszenzmikroskopie: Transfektion der ASC-CFP-Makrophagen mit der aufgereinigten DNA aus zuvor mit Melittin behandelten Zellen	Seite 53
Abb. 30	Fluoreszenzmikroskopie: Transfektion mit genomischer DNA	Seite 54

C Tabellenverzeichnis

Tab. 1	Sequenzen der verwendeten siRNAs	Seite 24
Tab. 2	Sequenzen der eingesetzten Primer	Seite 26
Tab. 3	Zusammensetzung eines PCR-Ansatzes	Seite 26
Tab. 4	PCR-Protokoll	Seite 28
Tab. 5	Zusammensetzung einer Probe für die Gelelektrophorese	Seite 29
Tab. 6	Standardverdünnungsreihe	Seite 32

1 Einleitung

1.1 Mitochondrien

Mitochondrien sind mit einer durchschnittlichen Größe von etwa 1 – 2 μm ein wichtiger Bestandteil von eukaryontischen Zellen. Ihre Hauptaufgabe besteht in der ATP-Synthese, weshalb man Mitochondrien auch als die „Kraftwerke der Zelle“ bezeichnet (Hauser, 2006). Je stoffwechselaktiver ein Gewebe ist, desto höher ist auch die Anzahl an Mitochondrien, die sich in den Zellen des entsprechenden Gewebes befindet. So besteht beispielsweise eine Leberzelle zu 25% aus Mitochondrien, was einer Zahl von etwa 2000 Mitochondrien pro Zelle entspricht (Kurth et al., 2008).

Mitochondrien liegen im Zytosol einer Zelle vor und sind von einer Doppelmembran umgeben, die sich aus einer äußeren und einer inneren Zellmembran aufbaut (Abb. 1). Die äußere Zellmembran ist mit Porinen durchsetzt, die sie für Moleküle von bis zu einer Größe von 10 kDa permeabel macht. Die innere Membran dagegen ist nur mit Hilfe von Transportsystemen wie beispielsweise dem Malat-Aspartat Shuttle, zu passieren (Hauser, 2006).

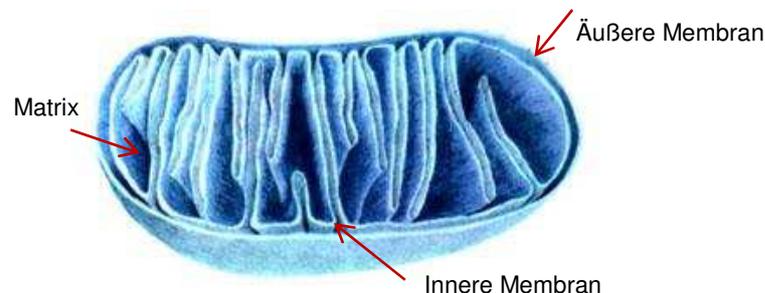


Abb. 1 Querschnitt durch ein Mitochondrium
 (ZENTRALE FÜR UNTERRICHTSMEDIEN IM INTERNET E.V.: Mitochondrium, URL:
<http://www.zum.de/Faecher/Materialien/beck/bilder/!laurie.jpg>
 (Stand: 28.12.2011))

Des Weiteren enthält die innere Mitochondrienmembran die Komplexe der Atmungskette und die ATP-Synthase.

Der mitochondriale Innenraum wird als Mitochondrienmatrix bezeichnet. Die Matrix enthält neben der mitochondrialen DNA (mtDNA) auch die zugehörigen Ribosomen, transfer RNA (tRNAs) und Enzyme, die für die mtDNA-Expression benötigt werden (Kurth et al., 2008).

1.2 Mitochondriale DNA in menschlichen Zellen

Die mtDNA des Menschen besteht aus einem leichten (L-Strang) und einem schweren (H-Strang) Einzelstrang, die sich ringförmig zusammenlagern.

Mitochondriale DNA hat eine Größe von 16,5 kb (Passarge, 2004) und besteht aus 37 Genen. Die Gene kodieren vor allem für die Proteine der Atmungskette und sind somit maßgeblich an der Energiegewinnung der Zelle beteiligt. Des Weiteren trägt die mitochondriale DNA die Erbinformation aller tRNAs und die zweier ribosomaler RNAs (rRNAs) (Janning et al., 2008).

Die zirkuläre mtDNA besitzt im Gegensatz zu der Kern-DNA keine Introns und wird rein maternal vererbt (Passarge, 2004), da bei der Befruchtung einer Oozyte allein der Zellkern, nicht aber die Mitochondrien eines Spermiums übertragen werden.

Die Mutationsrate der mtDNA ist im Vergleich zu der Mutationsrate der nukleären DNA etwa zehnmal so hoch, weshalb viele Erbkrankheiten auf eine Mutation im mitochondrialen Genom zurückzuführen sind (Janning et al., 2008).

Die nachfolgende Grafik (Abb. 2) soll eine Übersicht über den schematischen Aufbau der mtDNA geben:

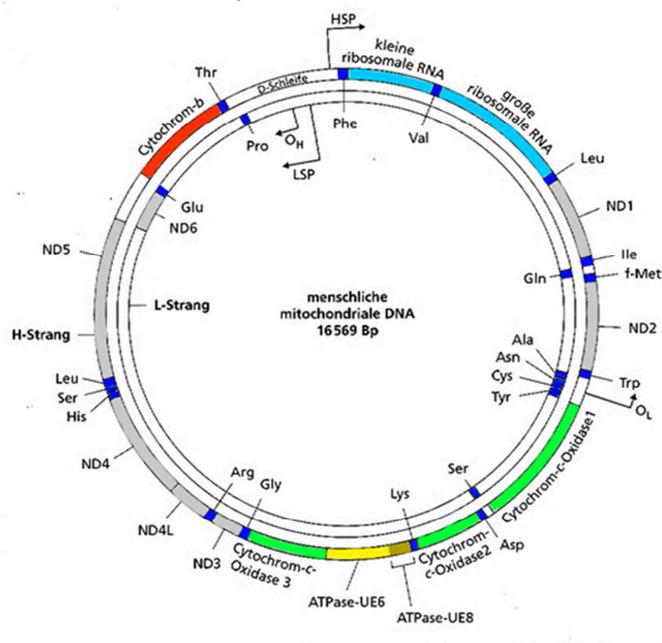


Abb. 2 Schematischer Aufbau der mtDNA einer menschlichen Zelle
 (BIOCHEMIE.WEB.UNI-MUENCHEN.DE: Das mitochondriale Genom des Menschen,
 URL: http://biochemie.web.med.uni-muenchen.de/biotutor_2004/Mito-DNA3.jpg
 (Stand: 28.12.2011)).

Das Vorhandensein dieser eigenen mitochondrialen DNA ist auch der Hinweis für die Entstehung der folgenden Theorie. Man geht davon aus, dass Mitochondrien durch die so genannte Endosymbiontentheorie entstanden sind. Hinweisend dafür ist, dass Mitochondrien viele Eigenschaften besitzen, die eigentlich typisch sind für Prokaryonten. So enthalten sie beispielsweise die typischen Ribosome mit ihren 30S- und 70S-Untereinheiten und vermehren sich durch Teilung. Das brachte die Idee auf, dass sie, ähnlich wie die Chloroplasten der Pflanzenzelle, durch die so genannte Endosymbiose entstanden sind. Dabei hat der anaerob lebende Eukaryont den Prokaryonten, ein Bakterium, aufgenommen und ist mit ihm verschmolzen. Dadurch erhielt der Prokaryont seine äußere Membran (die äußere Mitochondrienmembran). Die innere Membran (also die innere Mitochondrienmembran) stellt seine eigene ursprüngliche Außenmembran dar.

Im Laufe der Evolution verloren die beiden Partner zunehmend ihre Eigenständigkeit und lebten in einer Symbiose miteinander. Das Genom der bakteriellen DNA verkürzte sich über die Zeit, sodass die heutige mitochondriale DNA als Ergebnis blieb (Rassow, 2006).

1.3 Das angeborene Immunsystem und allergische Sensibilisierung

Das angeborene Immunsystem des menschlichen Körpers zeichnet sich durch die unmittelbare Bekämpfung von in den Organismus eingedrungenen Pathogenen aus. Das so genannte unspezifische Immunsystem besteht von Geburt an und reagiert auf eingedrungene schädliche Moleküle ohne zeitliche Verzögerung (Rassow, 2006). Der Mechanismus der Allergensensibilisierung ist dagegen bisher nur wenig untersucht. Es ist bekannt, dass bei Patienten, die unter einem Risiko stehen, sich auf ein bestimmtes Allergen zu sensibilisieren, die naiven CD 4+ T-Zellen in die letztlich Allergie auslösenden TH2-Zellen differenzieren. Zunächst muss das Allergen aber mit Hilfe von MHC II Molekülen über antigenpräsentierende Zellen, wie die dendritischen Zellen, den CD 4+-Zellen präsentiert werden. Während der Entwicklung einer Sensibilisierung gegen ein bestimmtes Allergen spielen die unterschiedlichsten Faktoren eine Rolle. Neben den verschiedenen Zytokinen, die in der Haut vorkommen, spielen auch endogene und exogene Signale eine Rolle.

Die Wichtigkeit des mikrobiellen Umfelds wird deutlich, wenn man betrachtet, dass dendritische Zellen nur dann eine T-Zellantwort einleiten, wenn zum Zeitpunkt der

Allergenexposition eine ganz bestimmte Aktivität vorherrscht (Willart et al., 2010). Diese Aktivität kann hervorgerufen werden durch die Anwesenheit von *pathogen associated molecular patterns* (PAMPs) oder *damage associated molecular patterns* (DAMPs), aber auch von Zytokinen, ausgeschüttet von Hautzellen, die eine Gewebeschädigung erlitten haben (Pelka et al., 2011). Als körperfremd erkannt werden die PAMPs mit Hilfe spezifischer Rezeptoren, den membrangebunden, den zytoplasmatischen oder den endosomalen *pattern recognition receptors* (PRRs). Zur Gruppe der PRRs zählen neben den Toll-like Rezeptoren (TLRs), auch die NOD-like Rezeptoren (NLRs) und die RIG-like Rezeptoren (RLRs).

Die Aktivierung der TLRs führt wiederum zu einer Aktivierung der dendritischen Zellen und der Expressierung costimulatorischer Moleküle wie CD 80 und CD 86, die neben der MHC-Präsentation von Antigenen nötig sind, um eine T-Antwort zu induzieren. Die Produktion proinflammatorischer Zytokine wie Interleukin (IL)-1, IL-6, IL-12 und Tumornekrosefaktor α (TNF- α) ist die Folge. PRRs stellen Rezeptoren für bakterielle Bestandteile, aber auch für DAMPs dar.

DAMPs sind im Gegensatz zu PAMPs nicht Bestandteil eingedrungener exogener Stoffe, sondern das Resultat einer Entzündungsreaktion auf dem Boden von oxidativem Stress oder Gewebsschädigung ohne das Vorliegen eines spezifischen Pathogens, also einer Infektion. Oxidativer Stress kann beispielsweise entstehen durch den Einfluss von Nikotin oder Ozon. Man bezeichnet sie deshalb auch als endogene Gefahrensignale. Hitzeschockproteine, Harnsäure und Adenosintriphosphat (ATP) sind nur einige Beispiele für DAMPs.

Neueren Forschungsergebnissen zufolge ist vor allem das Zusammenspiel aus dem Vorliegen von PAMPs und DAMPs entscheidend bei der Einleitung einer Immunantwort auf Allergene.

Die Aktivierung der dendritischen Zellen auf einem dieser Wege führt letztlich immer zu einer Freisetzung proinflammatorischer Zytokine. Eines dieser Zytokine ist das IL-1 β . Pro-IL-1 β kann mit Hilfe der so genannten Inflammasome und Caspase 1 als verantwortlichem Enzym in seine aktive Form IL-1 β überführt werden. Der Vorgang dieser Aktivierung wird zu einem späteren Zeitpunkt der vorliegenden Arbeit noch ausführlich besprochen. Des Weiteren sind neben der Caspase 1 noch andere Proteasen wie die Caspase 11 oder die Elastase in der Lage, die Umwandlung von Pro-IL-1 β in das biologisch aktive IL-1 β zu katalysieren. Man geht davon aus, dass IL-1 β eine wichtige Rolle in der Aktivierung und Regulation der Zellen spielt, die bei einer

Entzündungsreaktion beteiligt sind (Willart et al., 2010). Es bewirkt die Sensibilisierung eines Organismus auf ein bestimmtes Allergen, indem es antigenpräsentierende Zellen aktiviert und zusammen mit TNF- α und IL-18 die Abwanderung von den Langerhans' Zellen in die regionalen Lymphknoten fördert (Cumberbatch et al, 1997, Antonopoulos et al., 2008). Dort kommt es zu der üblichen Aktivierung von TH1- und zytotoxischen TH8-Zellen und der Bildung des Memory-Effekts mit Hilfe von Gedächtniszellen, die bei einer erneuten Allergenexposition für die heftige Reaktion des Immunsystems auf das Antigen verantwortlich sind (Coors et al., 2010).

IL-1 ruft als Entzündungsmediator auch die klassischen klinischen Zeichen einer Entzündung im Gewebe hervor: Tumor (Schwellung), Rubor (Rötung), Calor (Überwärmung), Dolor (Schmerz) und Functio laesa (eingeschränkte Funktion) (Stutz et al., 2009).

Keratinozyten stellen in unserem Organismus die erste Barriere dar, die ein Pathogen überwinden muss, um dem Organismus Schaden zufügen zu können (Dombrowski et al., 2012). Sie spielen also eine wichtige Rolle bei der Bekämpfung von Bakterien, Viren oder Pilzen und den Folgen, die durch das Eindringen dieser Erreger hervorgerufen werden. Aber genauso sind sie auch in der Lage auf endogene Stressoren wie DAMPs zu reagieren. Hierfür sind sie mit Inflammasomen ausgestattet, die diese Gefahrenstoffe erkennen und über die Bildung von Inflammasomkomplexen zu einer IL-1 β Freisetzung führen. IL-1 β aus Keratinozyten wiederum ist dann für die Aktivierung der T-Zellantwort verantwortlich und spielt damit eventuell eine Rolle bei der Sensibilisierung auf ein bestimmtes Allergen (Renne et al., 2010). Keratinozyten stellen auch die Grundlage für die Versuche dieser Arbeit dar.

Ein weiterer wichtiger Bestandteil der angeborenen Immunabwehr ist das Komplementsystem. Die etwa 30 Glykoproteine des Komplementsystems werden in der Leber synthetisiert und liegen so permanent im Blut vor. Über die Aktivierung dieser Proteine kommt es auf verschiedenen Wegen zu einer Porenbildung und damit Lyse der infizierten Zelle (Rassow, 2006).

Im Gegensatz zum unspezifischen Immunsystem reagiert das adaptive (spezifische) Immunsystem erst mit einer gewissen Latenz auf das Eindringen eines Pathogens.

Über die Bildung von Antikörpern ist diese Reaktion jedoch weitaus spezifischer (Rassow, 2006).

1.4 Inflammasome

Ein Inflammasom ist ein Multi-Proteinkomplex, der im Zytosol der Epithelzellen unserer Haut vorliegt und mit an erster Stelle steht, um Schadstoffe zu erkennen und zu bekämpfen (Iversen et al., 2008). Benannt sind Inflammasome nach ihrer Eigenschaft, dass sie nach ihrer Aktivierung für die Sekretion von Interleukin-1 β (IL-1 β) und Interleukin-18 (IL-18) verantwortlich sind und so eine Entzündungsreaktion in unserem Organismus auslösen. Sie gehören zur Gruppe der im vorherigen Abschnitt beschriebenen *nucleotide-binding domain leucine-rich repeat-containing receptors*, also der NOD-like Rezeptoren (NLRs), die genau wie die Toll-like Rezeptoren (TLRs) eingedrungene körperfremde Stoffe, wie zum Beispiel Lipide, Proteine und Nukleinsäuren, detektieren können. Derzeit sind mehr als 20 Untergruppen der NLRs bekannt, die jedoch alle eine C-terminale Leucin-reiche (LRRs) und eine Nukleotid bindende Region (NBD) gemeinsam haben. Mit Hilfe der LRRs werden körperfremde Stoffe erkannt und der Rezeptor aktiviert. Die eigentliche Unterscheidung der NLRs erfolgt an ihrem N-terminalen Ende. Die größte Gruppe besitzt an dieser Stelle eine Pyrin-Region und wird daher NLRP genannt. Die Aktivierung dieser NLRP Proteine führt zu einem Zusammenschluss mit anderen proinflammatorischen Proteinen, wie Caspase 1 (Alnemri, 2010, Stutz et al., 2009). Caspase 1 wiederum katalysiert die Reaktion der inaktiven Vorläuferformen Pro-IL-1 β und Pro-IL-18 in ihre biologisch aktive Form (Keller et al., 2008, Nickel et al., 2009). Aktiviertes IL-18 erhöht die Menge an IgE im Organismus (Sutterwala et al., 2006), was bei der Allergieentstehung eine Rolle spielt.

Die Rolle von IL-1 β wurde im vorhergehenden Abschnitt bereits ausführlicher beleuchtet. Es spielt eine Rolle bei der Migration von Langerhans' Zellen und der Präsentation von Antigenen sowie bei der Prägung von T-Zellen (Sutterwala et al., 2006). Des Weiteren bewirkt es letztlich eine Lymphozytenaktivierung und involviert damit neben dem unspezifischen Immunsystem auch das adaptive Immunsystem in der Bekämpfung des eingedrungenen Erregers (Stutz et al., 2009).

1.4.1 Das NLRP3-Inflammasom

Das NLRP3-Inflammasom ist das bisher am besten untersuchte Inflammasom. Es bindet mit Hilfe seines *apoptosis-associated speck like* Proteins (ASC-Protein) an das Enzym Pro-Caspase 1 (Latz, 2010). Diese Bindung überführt Pro-Caspase 1 in seine aktive Form Caspase 1, eine Cysteinprotease, welche wiederum Pro-IL-1 β in die aktive Form IL-1 β spaltet (Fernandes-Alnemri et al., 2009). Neben vielen Mikroorganismen, wie Viren (Influenza A, Adenoviren, u.a.), Bakterien (*Staphylokokkus aureus*, *E. coli*, u.a.) oder Pilzen (*Candida albicans*), können auch PAMPs und andere Substanzen, wie Asbest, zu einer Aktivierung dieses Inflammasomkomplexes führen. Aber nicht nur exogene Stimuli beeinflussen die Aktivität von NLRP3, sondern auch endogene Einflüsse, v.a. Stressfaktoren. Das wichtigste Molekül hierbei ist ATP, welches beim Vorgang der Apoptose freigesetzt wird. Des Weiteren sind auch ganze Kristalle in der Lage NLRP3 zu aktivieren. Dies geschieht dann, wenn normalerweise im Organismus gelöste Stoffe zu Kristallen ausfallen und akkumulieren, wie es zum Beispiel beim Krankheitsbild der Gicht der Fall ist. Dabei häuft sich Harnsäure im Körper an und fällt als Harnsäurekristalle aus. Über die Aktivierung von NLRP3 durch diese Kristalle kommt es zu der im Rahmen dieses Krankheitsbilds typischen Arthritis (Gelenkentzündung). Darüber hinaus ist für die NLRP3 Aktivierung eine niedrige intrazelluläre Kaliumkonzentration notwendig. Dies wird auf unterschiedlichen Wegen erreicht, z.B. durch in die Zellmembran porenbildende Substanzen oder durch ATP, welches über den Einbau von Pannexin-1 in die Membran ebenfalls zu einem Kaliumausstrom führt (Stutz et al., 2009). Abbildung 3 gibt einen Überblick über den Aufbau des NLRP3-Inflammasomkomplexes.

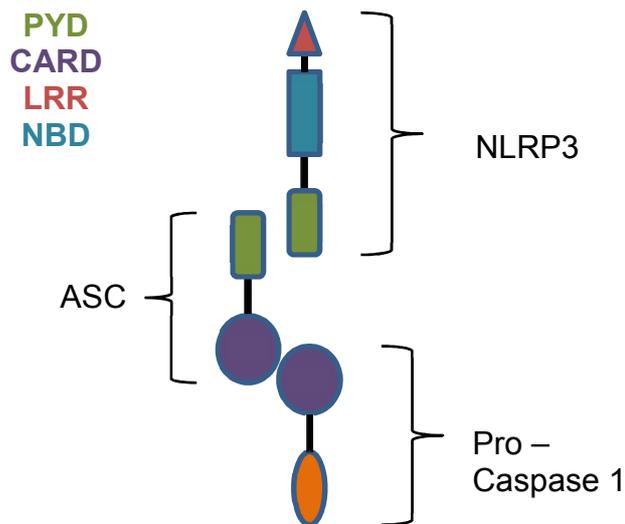


Abb. 3 Darstellung des NLRP3-Inflammasomkomplexes. Der Komplex besteht aus dem NLRP3-Protein, das über das Adaptorprotein ASC mit der Pro-Caspase 1 verbunden ist (nach Stutz et al., 2009).

1.4.2 Das AIM2-Inflammasom

Der Name AIM2 steht für *absent in melanoma 2* (Hornung et al., 2010) und es ist das erste entdeckte Inflammasom, das nicht zur Gruppe der NOD-like Rezeptoren (NLRs) gehört (Schroder et al., 2010). Es handelt sich bei diesem Inflammasom um einen zytosolischen Multi-Proteinkomplex, der in der Lage ist im Zytosol vorliegende doppelsträngige DNA (dsDNA) mit Hilfe seiner HIN200-Region zu erkennen und zu binden. Die Bindung von AIM2 an Pro-Caspase 1 erfolgt auch hier, wie beim NLRP3-Inflammasom, über das Adaptorprotein *apoptosis-associated speck like* Protein (ASC-Protein). Das AIM2-Inflammasom war in dieser Arbeit von besonderem Interesse, da v.a. die Funktion von AIM2 im Zusammenhang mit der Detektion doppelsträngiger mitochondrialer DNA untersucht werden sollte (Fernandes-Alnemri et al., 2009, Stutz et al., 2009). Nachfolgend ist der Signalweg von der Aktivierung von AIM2 durch doppelsträngige DNA bis zur Freisetzung des Zytokins IL-1 β dargestellt (nach Hornung et al., 2010, Stutz et al., 2009). Doppelsträngige DNA kann entweder exogener, also als ein von außen in die Zelle eindringender Stressor, oder endogener Natur im Zytosol der Zelle vorliegen und wird dort von AIM2 detektiert und gebunden (Abb. 4).

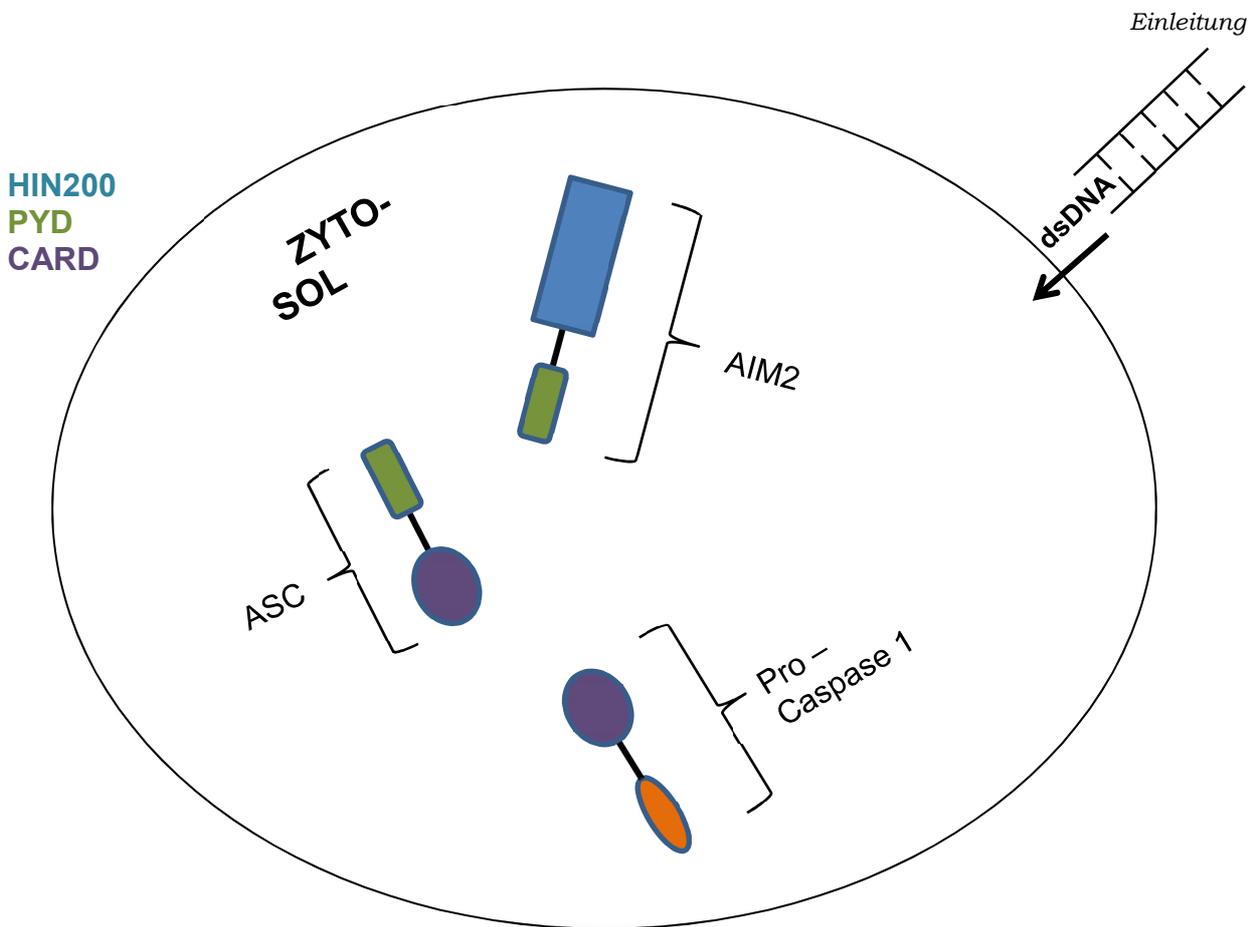


Abb. 4 Zustand im Zytosol vor Bindung zytosolischer DNA an AIM2 (nach Stutz et al., 2009)

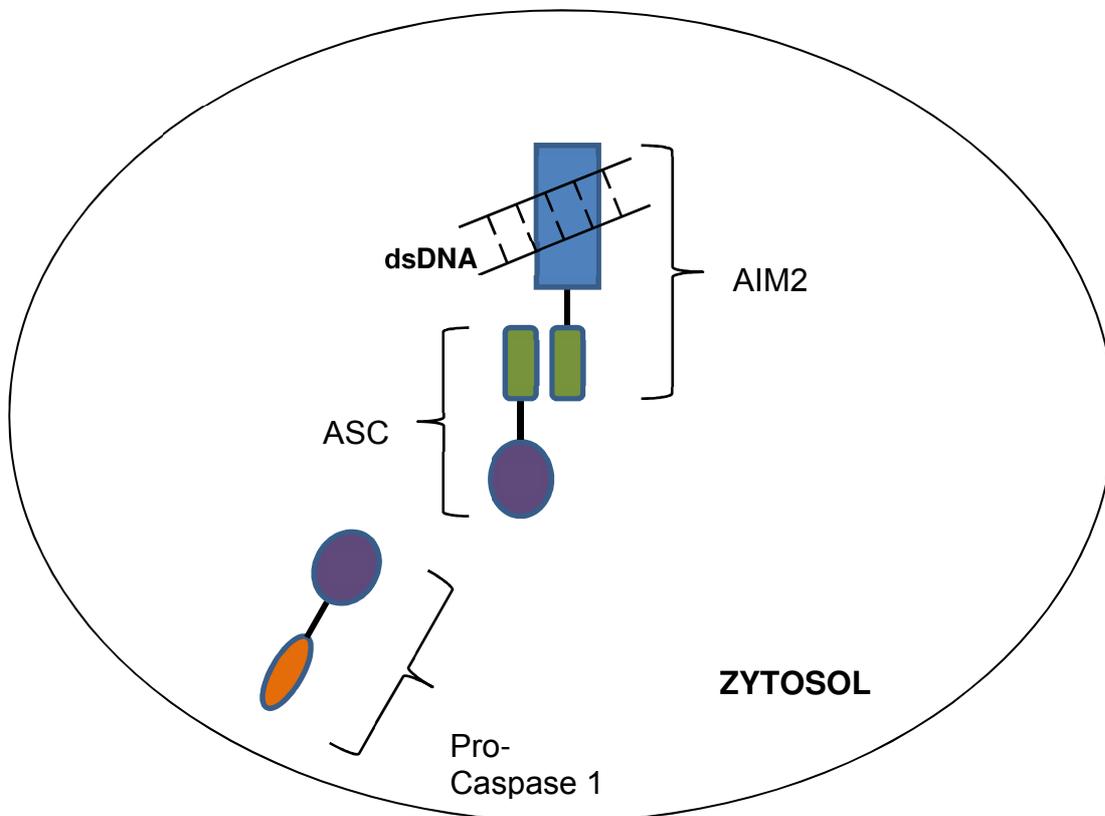


Abb. 5 Bindung der DNA an AIM2. Die DNA wird über die HIN200 Region des AIM2 gebunden und der Inflammasomkomplex aus AIM2 und ASC bildet sich (nach Stutz et al., 2009).

Daraufhin formt sich der Inflammasomkomplex (Abb. 5) aus AIM2 mit der gebundenen doppelsträngigen DNA und dem Adaptorprotein ASC. Über das ASC-Protein erfolgt dann die Bindung an die biologisch noch inaktive Form der Pro-Caspase 1 (Abb. 6), die durch die erfolgreiche Bindung an ASC durch Autokatalyse in die aktive Cysteinprotease Caspase 1 umgewandelt wird (Fernandes-Alnemri et al., 2009). Caspase 1 katalysiert die Reaktion von Pro-IL-1 β in die biologisch wirksame Form IL-1 β (Abb. 7) mit den entsprechenden Folgen für den Organismus, die im vorhergehenden Abschnitt ausführlich besprochen wurden (Stutz et al., 2009).

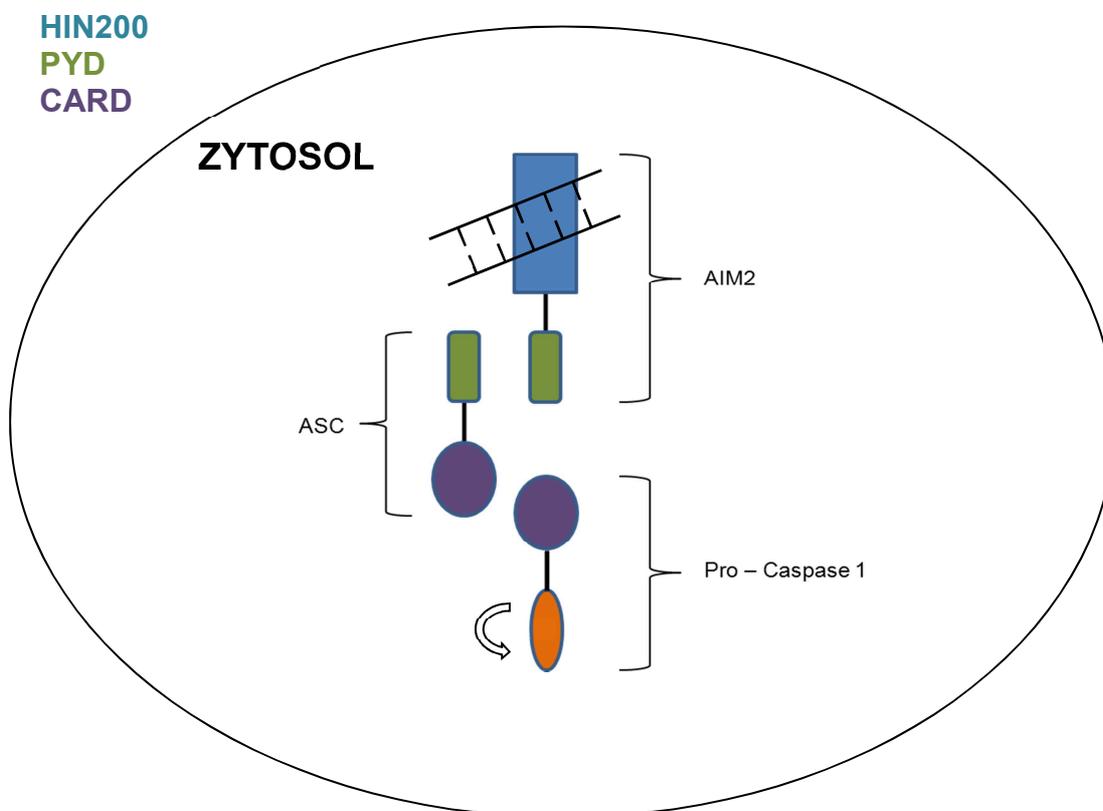


Abb. 6 Bindung von AIM2 an Pro-Caspase über das ASC-Protein. Pro-Caspase 1 wird so in seine aktive Form überführt (nach Stutz et al., 2009).

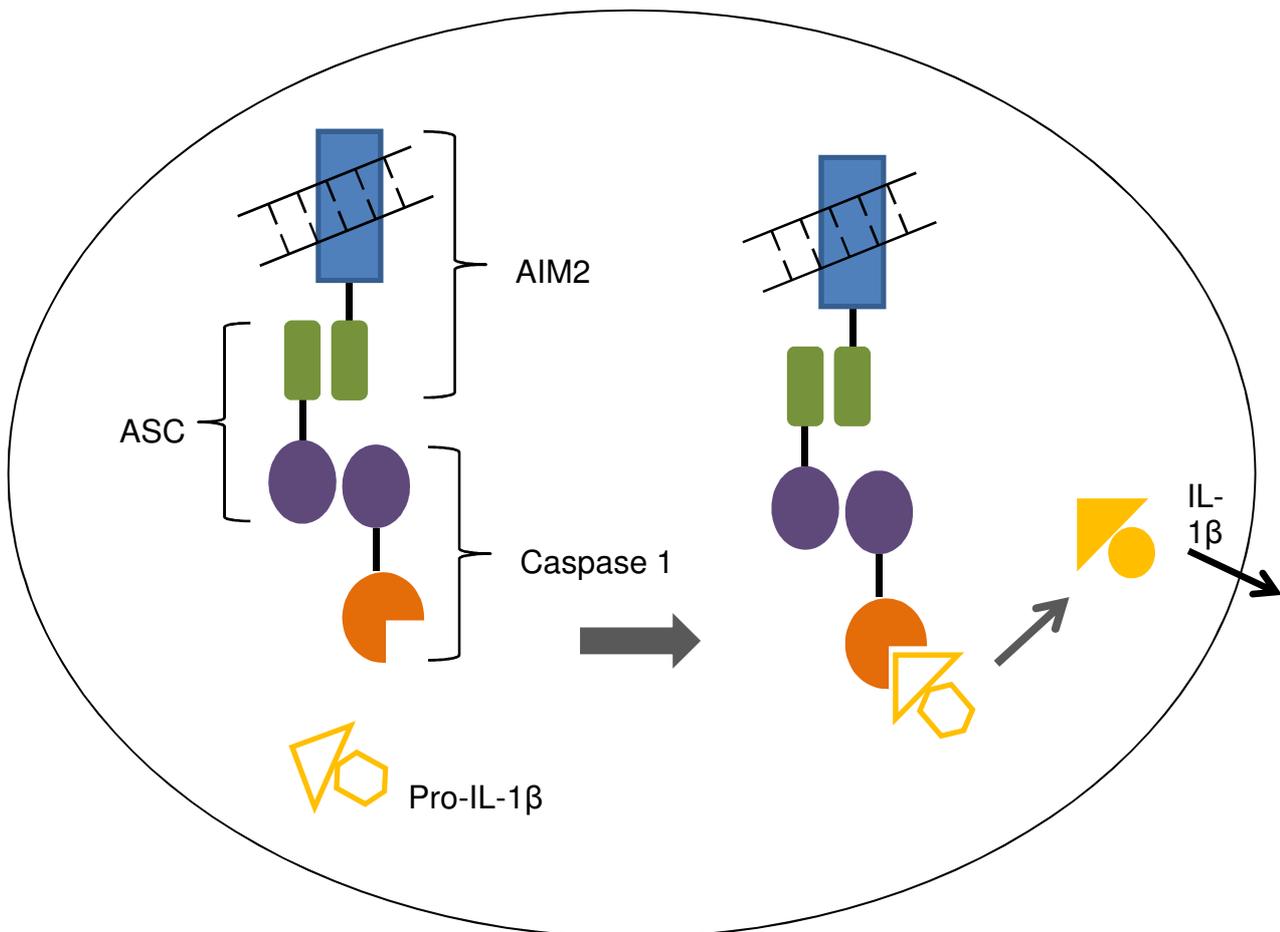


Abb. 7 Induktion der IL-1 β Sekretion. Die aktivierte Cysteinprotease Caspase 1 bindet in ihrer Substratbindungsstelle das proinflammatorische Zytokin Pro-IL-1 β und induziert dessen Umwandlung in die aktive Form IL-1 β (nach Stutz et al., 2009).

1.4.3 Inflammasome und Keratinozyten

Keratinozyten bilden die äußerste Barriere, die ein Pathogen überwinden muss, um unseren Organismus zu schädigen. Um ihre Schutzfunktion besonders effektiv erfüllen zu können, sind sie mit einer Vielzahl von Mechanismen ausgestattet, u.a. den Inflammasomen. Besonders gut charakterisiert ist in diesem Zusammenhang das AIM2-Inflammasom. Es ist bekannt, dass zytosolische DNA als Aktivator des AIM2-Inflammasoms dient. DNA liegt in gesunden Zellen ausschließlich im Zellkern und in den Mitochondrien vor. Exogene DNA wird mit Hilfe des Enzyms Desoxyribonuklease (DNase) beseitigt. Nicht jedoch im Falle des Krankheitsbildes der Psoriasis, bei der die Funktion des AIM2-Inflammasoms besonders gut untersucht ist. Die Psoriasis gehört zur Gruppe der entzündlichen Hauterkrankungen, bei denen eine Aktivierung des Inflammasoms zu einer Sekretion des Entzündungsmediators IL-1 β führt. Studienerkenntnisse lassen darauf schließen, dass IL-1 β wiederum für die Induktion der

TH17-Antwort verantwortlich ist und somit eine wichtige Rolle im Zusammenhang der Pathogenese des Krankheitsbildes der Psoriasis spielt (Dombrowski et al., 2011).

1.5 Zusammensetzung und Wirkung von Bienengift

Das Gift der Honigbiene (*Apis mellifera*) (Coors et al., 2010) besteht aus vielen unterschiedlichen Bestandteilen, darunter verschiedene Peptide, Enzyme und Amine wie Histamin (Tu et al., 2008). Es ist in der Lage eine Typ-I-Allergie auszulösen, die bei einer ausgeprägten Unverträglichkeit bis zum anaphylaktischen Schock führen kann. Die Symptome einer solchen Unverträglichkeit reichen von einem einfachen Juckreiz, über Dyspnoe und Unruhe bis hin zu Tachykardie, einem Blutdruckabfall und einem Atem- und Kreislaufstillstand (Coors et al., 2010). Die beiden Hauptbestandteile des Bienengifts stellen das Peptid Melittin (vgl. 1.5.1) und das Enzym Phospholipase A_2 dar. Melittin macht etwa 50% des gesamten Bienengifts aus, die Phospholipase A_2 etwa 10% (Kwon et al., 2002). Die schädigende Wirkung der Phospholipase A_2 ergibt sich aus ihrer Rolle im Abbau biologischer Membranen. Der wichtigste Bestandteil solcher Membranen ist das Lecithin und dieses ist damit auch Hauptangriffsort der Phospholipase A_2 . Die Esterbindungen der glycerinhaltigen Phospholipide des Lecithins werden durch das Enzym hydrolysiert, so dass das als Detergens wirkende Lysophosphatidylcholin entsteht. Über den Angriff von biologischen Membranen hinaus wirkt die Phospholipase A_2 im Rahmen einer allergischen Reaktion als Hauptallergen (Rassow, 2006). Des Weiteren spielt das Enzym eine bedeutende Rolle im Rahmen von Entzündungen. Mit Hilfe der Phospholipase A_2 wird Arachidonsäure aus Phosphatidylinositol freigesetzt, welche wiederum zu Prostaglandinen und Leukotrienen verstoffwechselt wird (Hauser, 2006). Prostaglandine wirken überwiegend auf das Blutgefäßsystem, wo sie durch eine Dilatation der Gefäße zu einem Senken des arteriellen Blutdrucks führen. Darüber hinaus erhöhen sie die Kapillarpermeabilität und führen zu Fieber. Bei einer Gewebsschädigung, die aus dem Kontakt mit dem Bienengift entsteht, wird durch die zusätzliche Induktion der zytosolischen Phospholipase A_2 innerhalb kürzester Zeit die Prostaglandinbiosynthese gesteigert. Dieser schnellen Phase der Biosynthese schließt sich eine mehrere Stunden dauernde langsame Phase an. Diese Phase läuft über die durch den Kontakt mit dem Bienengift freiwerdenden Zytokine IL-1 β (vgl. Ergebnisteil) und TNF- α , durch die es zu einer gesteigerten Expression von COX-2 und der Prostaglandin-

Synthese kommt. Über eine Sensibilisierung peripherer Schmerzrezeptoren steigern Prostaglandine die Schmerzempfindung. IL-1 β gelangt über das Blut in die Endothelzellen der Kapillaren des Gehirns und steigert dort die Prostaglandinsynthese. Da Prostaglandine lipophil sind, sind sie in der Lage die Blut-Hirn-Schranke zu überwinden und neuronale Rezeptoren und Gliazellen zu aktivieren. Diese Aktivierung steigert die Erregbarkeit der Neurone, woraus das erhöhte Schmerzempfinden resultiert (Deutzmann, 2006). Wie bereits oben beschrieben, wird mit Hilfe der Phospholipase A₂ Arachidonsäure aus Phosphatidylinositol freigesetzt, welche wiederum zu Prostaglandinen und Leukotrienen verstoffwechselt wird (Hauser, 2006). Leukotriene locken Leukozyten chemotaktisch an und begünstigen deren Anheftung an das Endothel. Sie spielen somit auch eine entscheidende Rolle vor allem in der unspezifischen Immunabwehr bei Entzündungen oder bei allergischen Reaktionen. Leukotriene, die in Mastzellen oder Eosinophilen gebildet werden, wirken stark bronchokonstriktorisch. Darüber hinaus bewirken sie eine Kapillarpermeabilitätssteigerung und eine vermehrte Schleimabsonderung (Deutzmann, 2006).

1.5.1 Melittin

Melittin ist der Bestandteil von Bienengift, der den größten Anteil in der Zusammensetzung bildet (Kwon et al., 2002). Es ist ein hydrophobes Hexacosan-Peptid, das aus folgenden Aminosäuren aufgebaut ist: H₂N – Gly – Ile – Gly – Ala – Val – Leu – Lys – Val – Leu – Thr – Thr – Gly – Leu – Pro – Ala – Leu – Ile – Ser – Trp – Ile – Lys – Arg – Lys – Arg – Gln – Gln – CONH₂ (Matsuzaki et al., 1997).

Es entsteht während der Synthese des Bienengifts aus seinem Vorläuferpeptid Pro-Melittin und ist aufgrund seiner amphiphilen Eigenschaften sowohl wasserlöslich wie auch in Methanol zu lösen (Raghuraman et al., 2007). Die zytolytische Wirkung von Melittin auf Eukaryonten und prokaryontische Zellen beruht darauf, dass das Toxin Melittin mit der Lipiddoppelschicht der Zellmembran interagiert und den Einbau von Ionenkanälen bewirkt. Des Weiteren kommt es zu einer Porenbildung in der Membran (Matsuzaki et al., 1997). Aufgrund dieser Eigenschaften von Melittin führt eine Intoxikation mit Melittin zu einem Zusammenbrechen der Lipiddoppelschicht der Zellmembran in Mizellen (Toraya et al., 2005). Als eine weitere Eigenschaft von Melittin wird dessen Wirkung auf den Apoptoseweg einer Zelle diskutiert. Man geht davon aus, dass Melittin eine Herunterregulation des anti-apoptotischen Faktors Bcl-2

und eine Aktivierung von Caspase-3 bewirkt und so die Zelle in den kontrollierten Selbsttod führt (Moon et al., 2008).

1.5.2 Sonstige Bestandteile

Ein weiteres wichtiges Peptid, das Bestandteil von Bienengift ist, ist das Apamin. Apamin macht in etwa 2% des gesamten Gifts aus und wirkt überwiegend auf das zentrale Nervensystem. Es löst dort muskuloskelettale Bewegungen aus, die nicht koordiniert verlaufen und sich bis zu einem kompletten Krampf ausdehnen können (Habermann, 1984).

Adolapin als weiterer Teil des Bienengifts hat eine entzündliche und schmerzstillende Wirkung. Es blockiert die Cyclooxygenasen, die beiden Isoformen der Prostaglandin-Synthase und damit letztlich die Prostaglandinsynthese. So kann die entzündliche und schmerzstillende Wirkung von Adolapin erklärt werden. Darüber hinaus blockiert es auch die Phospholipase A₂, sodass es nicht zu einer Freisetzung von Arachidonsäure aus den Membranen kommt und somit der Ausgangsstoff für die Prostaglandin- und Leukotriensynthese fehlt (Koburova et al., 1985, Deutzmann, 2006).

Zu den oben genannten Bestandteilen von Bienengift kommen noch Amine wie Histamin oder Epinephrin hinzu. Des Weiteren sind auch Nicht-Peptide wie Lipide, Kohlenhydrate oder freie Aminosäuren Teil des Gifts. Auch ein Peptid, das zur Mastzelldegranulation führt, das Mastzelldegranulationspeptid, spielt eine Rolle in der Gesamtwirkung von Bienengift (Kwon et al., 2002). Darüber hinaus ist auch die Hyaluronidase ein weiterer Bestandteil (Pschyrembel, 2004).

1.6 Allergien

„Die Allergie ist eine immunologisch bedingte Reaktion auf exogene Substanzen. Nach einer asymptomatischen Sensibilisierungsphase nach Erstkontakt kommt es beim nächsten Kontakt zu einer allergischen Reaktion.“ (Coors et al., 2010).

Es werden zwei Arten an Überempfindlichkeitsreaktionen unterschieden: Der Fröhlytyp, bei dem die körperlichen Symptome innerhalb weniger Minuten bis Stunden auftreten und der Spätlytyp, bei dem es erst nach 12-72 Stunden zu körperlichen Erscheinungen kommt (Terhorst, 2009). Da für die zu Grunde liegende Arbeit vor allem die Reaktionen des Fröhlytyps von Bedeutung sind, wird im Folgenden ausschließlich diese Reaktion näher erläutert.

1.6.1 Typ-I-Allergie

Die Typ-I-Allergie gehört zur Gruppe der Fröhlytyp-Reaktionen. Die Reaktion verläuft Immunglobulin E (IgE) vermittelt. Dabei binden zwei Antikörper an Mastzellen bzw. basophile Granulozyten („Bridging“). Über die zwei Antikörper wird das eingedrungene Antigen gebunden und bewirkt daraufhin eine Freisetzung unterschiedlichster Botenstoffe (Mediatoren) aus der Zelle.

Die wichtigsten Mediatoren hierbei sind Histamin, Serotonin und Bradykinin (Abb. 8) (Coors et al., 2010, Terhorst, 2009).

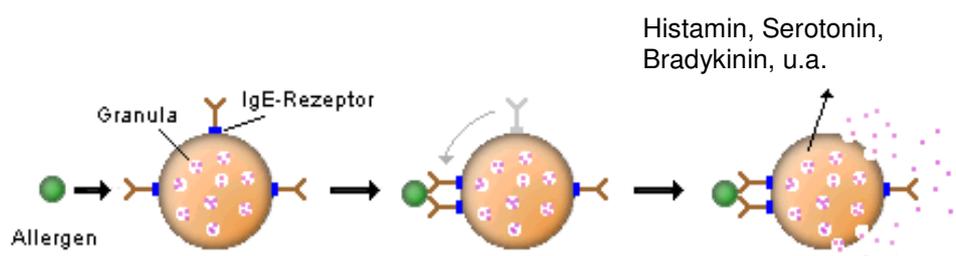


Abb. 8 Freisetzung von Entzündungsmediatoren nach Allergenbindung. nach HAL ALLERGIE: Die Sensibilisierung des Immunsystems, URL: <http://www.hal-allergy.at/images/sensi2.gif> (Stand: 28.12.2011)

Im Rahmen der Typ-I-Allergie kommt es zu einer unmittelbaren Reaktion des Körpers auf das eingedrungene Allergen. Die körperlichen Symptome entwickeln sich in aller Regel innerhalb der ersten 30 Minuten bis spätestens 6-12 Stunden nach der Exposition.

Zu den möglichen Symptomen gehören neben der allergischen Rhinokonjunktivitis (Heuschnupfen), dem allergischen Asthma bronchiale und der Urtikaria (Nesselsucht) auch das Angioödem bis hin zum anaphylaktischen Schock (Coors et al., 2010).

Zu den Typ-I-Allergien zählt man die Pollenallergie, die Tierallergie, die Hausstauballergie, die Allergie gegen Latex und Nahrungsmittel und vor allem die Insektengiftallergie.

Überempfindlichkeitsreaktionen auf Insektenstiche zeigen sich überwiegend bei einem Kontakt mit dem Gift der Biene (*Apis mellifera*) und der Wespe (*Vespula vulgaris*). Die Symptome reichen von lokalen Hautveränderungen wie Rötungen über respiratorische und kardiovaskuläre Erscheinungen wie Stridor und Blutdruckabfall bis hin zum kompletten anaphylaktischen Schock.

In der Therapie der Typ-I-Allergien steht an erster Stelle die Allergenkenz. Pharmakotherapeutisch kommen vor allem Antihistaminika, die sowohl systemisch als auch topisch eingesetzt werden, zum Einsatz.

In der Therapie der Insektengift- und Nahrungsmittelallergie mit Anaphylaxie spielt auch die Selbstbehandlung der Patienten mit einem Notfall-Set eine große Rolle. Das Notfall-Set besteht aus einem Antihistaminikum, einem Kortikosteroid und Adrenalin. Darüber hinaus steht vor allem bei diesen beiden Allergien die spezifische Immuntherapie zur Verfügung. Grundlage dieser Therapie ist die Hyposensibilisierung, bei der dem Patienten über einen längeren Zeitraum kontinuierlich geringe Mengen des Allergens zugeführt werden, sodass der Körper im Laufe der Zeit mit weniger ausgeprägten allergischen Reaktionen reagiert (Coors et al., 2010).

1.6.2 Typ-IV-Allergie

Die zellulär bedingte Typ-IV-Allergie wird durch sensibilisierte T-Lymphozyten ausgelöst.

Neben den Transplantatabstoßungsreaktionen und zahlreichen Arzneimittelreaktionen zählt auch das allergische Kontaktekzem zu dieser Allergiegruppe. Letzteres kommt v.a. gegen Nickel, Salbengrundlagen oder Konservierungsstoffe in Salben, aber auch gegen Duftstoffe und Desinfektionsmittel vor (Coors et al., 2010).

Grundsätzlich verläuft die Typ-IV-Allergie in zwei Phasen. In der ersten Phase der Sensibilisierung bindet das Kontaktallergen, das so genannte Hapten, an ein Protein

und wird so zu einem Vollantigen. Bei einem Erstkontakt des Organismus mit dem Allergen wird dieses von den Langerhans' Zellen bzw. den dermalen dendritischen Zellen aufgenommen und prozessiert. Im regionalen Lymphknoten wird das Antigen dann den T-Zellen präsentiert und von dem passenden T-Zell-Rezeptor erkannt. In der Folge entstehen so spezifische TH1-Zellen und zytotoxische TH8-Zellen. Auch proinflammatorische Moleküle wie IL-1 β , TNF- α und Interferon- γ (IFN- γ) spielen hierbei eine große Rolle. Neben den zytotoxischen Eigenschaften besteht auch ein so genannter „Memory-Effekt“, d.h. kommt es zu einem Zweitkontakt mit demselben Antigen, kann die Reaktion des Immunsystems noch schneller aktiviert werden.

Zu der zweiten Phase, der Auslöse- bzw. Effektorphase, kommt es bei einem erneuten Kontakt mit demselben Allergen. Die antigenpräsentierenden Langerhans' bzw. dendritischen Zellen treffen dann auf eine große Anzahl an für genau dieses Antigen spezifische TH1-Gedächtniszellen. Die Folge ist eine Sekretion verschiedener Zytokine, wie IL-1, IL-2 und IFN- γ und eine Anlockung von anderen Immunzellen, wie Basophilen und Neutrophilen.

Außerdem werden Typ-IV-Allergien im Gegensatz zur Typ-I-Allergie genetisch über das *Human Leukocyte Antigen-System* (HLA-System) kontrolliert (Coors et al., 2010).

1.7 Ziele der Arbeit

Wie unter 1.4.2 beschrieben ist das AIM2-Inflammasom in der Lage im Zytosol vorliegende doppelsträngige DNA zu erkennen und zu binden.

Ziel meiner Forschungsarbeit war es zu untersuchen, ob nach einer Stimulation mit dem Bienengiftbestandteil Melittin das AIM2-Inflammasom aktiviert wird und es dadurch zu einer IL-1 β Freisetzung kommt.

Vorarbeiten haben bereits gezeigt, dass Bienengift zu einer IL-1 β Sekretion in Keratinozyten führt. Dabei war die Menge an entstandenem IL-1 β proportional zur eingesetzten Menge an Bienengift. Des Weiteren zeigte die Injektion von Bienengift in menschliche Hautstanzbiopsien, in einem *ex vivo* Modell, ein vermehrtes Absterben der Zellen (Kaymakanov, 2012).

Der Gedanke hinter der vorliegenden Arbeit ist es zu untersuchen, wie diese Schädigung und IL-1 β Sekretion vermittelt wird. Die Überlegung ist, dass Melittin aufgrund seiner lytischen Eigenschaften die Hautzelle so schädigt, dass doppelsträngige mito-

chondriale DNA aus den Mitochondrien ins Zytosol gelangt und dort als „*Danger associated molecular pattern*“ zu einer Inflammation führt.

Die klinische Bedeutung dieser Mechanismen und auch die Wichtigkeit eines potenziellen therapeutischen Nutzens wird deutlich, wenn man die Häufigkeit und auch die Gefährlichkeit einer Bienengiftunverträglichkeit betrachtet. IL-1 β spielt eine bedeutende Rolle bei der Aktivierung und dem *Priming* von T-Zellen. Diese Prägung wiederum ist wichtig für die Sensibilisierung des Organismus auf ein bestimmtes Allergen und somit für die eigentliche Entwicklung der Bienengiftallergie (Coors et al., 2010). Versteht man die Signalwege in den Hautzellen, die durch Bienengiftbestandteile aktiviert werden und für die IL-1 β Sekretion verantwortlich sind, besser, ist der Ansatz für einen therapeutischen Nutzen dieses Wissens möglicherweise gegeben.

2 Material und Methoden

2.1 Primäre humane epidermale Keratinozyten (NHEK)

Sämtliche Zellkulturarbeiten erfolgten unter der Sterilwerkbank (Herasafe, Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland). Die Zellen wurden unter Standardbedingungen (37°C, 5% CO₂, 100% Luftfeuchtigkeit) im Brutschrank (Heraeus instruments, Hanau, Deutschland) kultiviert. Für die vorliegende Arbeit wurde mit primären humanen epidermalen Keratinozyten (NHEK) (Cascade Biologics, Karlsruhe, Deutschland) gearbeitet. Die Zellen wurden in EpiLife® Zellkulturmedium mit 0,6 mM Ca²⁺ und 1x EpiLife® defined growth supplement (EDGS, Cascade Biologics) unter Standardbedingungen (37°C, 5% CO₂, 100% Luftfeuchtigkeit) in 75 cm²-Flaschen, 6-, oder 12-Wellplatten kultiviert. Dem Medium wurden außerdem noch 10 µg/ml Gentamicin und 0,25 µg/ml Amphotericin B zugesetzt. Für die Experimente konnten die Ausgangskulturen bis zu fünf Mal passagiert werden.

Die Kulturgefäße der NHEK mussten vor deren Überführung mit einer Coating-Matrix (Kollagen) (Cascade Biologics) beschichtet werden. Dabei wurde die Coating-Matrix im Verhältnis 1:100 im Dilution Medium verdünnt. Bei 12-Wellplatten wurden 150 µl des Ansatzes in jedes Well gegeben. Bei 6-Wellplatten waren es 300 µl und bei einer 75 cm²-Flasche 5 ml der Coating Matrix.

Danach wurde das alte Medium der 75 cm²-Flaschen von den Zellen abgesaugt und diese mit 5 ml PBS gewaschen.

Mit Hilfe von 2 ml 1x Trypsin EDTA (Cascade Biologics) wurden die Zellen unter Mikroskopkontrolle vom Boden des Kulturgefäßes abgelöst. Nach der Ablösung wurden 2 ml Trypsininhibitor (Cascade Biologics) zur Neutralisation dazugegeben und die Zellen in 8 ml EpiLife® in einen 50 ml Falcon überführt.

Die NHEK wurden bei 900 U/min bei Raumtemperatur 10 min lang zentrifugiert und der Überstand vorsichtig abgenommen. Die pelletierten Zellen wurden daraufhin in 10 ml EpiLife® mit Zusätzen resuspendiert. Je nach geplantem Experiment wurden 100 µl - 2 ml Zellsuspension in das beschichtete und mit frischem Medium befüllte Kulturgefäß übertragen. Des Weiteren wurde stets ein Aliquot zur Weiterkultivierung der übrigen Zellsuspension in eine neue T-75 cm²-Flasche überführt.

2.2 Makrophagen

C57BL/6 Wildtyp-Makrophagen wurden in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (PAA Laboratories, Pasching, Österreich) kultiviert und im Fluoreszenzmikroskop betrachtet. Dem Medium wurde außerdem 4,5 g/l Glucose, 10% fötales Kälberserum (FBS), 50 U/ml Penicillin und 50 µg/ml Streptomycin beigemischt. Die Besonderheit dieser aus der Maus stammenden Makrophagen war, dass das ASC-Protein dieser C57BL/6 Wildtyp-Makrophagen mit CFP (*cyan fluorescent protein*) fusioniert worden war. Die ASC-CFP-Makrophagen wurden in 75cm²-Zellkulturflaschen und in Chamber Slides (vier Kammern) kultiviert.

Das Passagieren der Makrophagen erfolgte ähnlich wie bei den NHEK mit der Ausnahme, dass ein Beschichten der Kulturgefäße hier nicht notwendig war. Das Ablösen der Zellen erfolgte mit Trypsinlösung 0,05% (PAA Laboratories). Sowohl zum Passagieren als auch zum Kultivieren wurde DMEM - Medium mit den oben genannten Zusätzen verwendet.

2.3 Behandlung der Zellen mit Melittin

Zur Behandlung der Zellen mit Melittin (Sigma-Aldrich) wurde dieses in einer Konzentration von 5 µg/ml (Stock: 5 mg/ml) eingesetzt.

Die NHEK wurden stets in einer 75 cm²-Flasche mit Melittin behandelt.

Zunächst wurde das alte Medium von den Zellen abgesaugt und mit 5 ml 1x PBS gewaschen. Danach wurden 5 ml frisches EpiLife® Medium mit 5 µl Melittin versetzt und auf die Zellen gegeben. Die Inkubation erfolgte für 6 Stunden unter Standardbedingungen (37°C, 5% CO₂, 100% Luftfeuchtigkeit).

2.4 Isolation des Zytosols aus NHEK

Die Zytosolisolierung aus NHEK erfolgte mit Hilfe des Mitochondria Isolation Kit for Cultured Cells (Pierce). Das Kit bestand aus drei Bestandteilen (Reagenz A, B und C).

Die Isolation des Zytosols erfolgte unter der Sterilwerkbank. Für die Zytosolisolierung wurde stets eine 75 cm²-Flasche verwendet.

Zunächst wurde das alte Medium abgenommen und die Zellen mit 5 ml 1x PBS gewaschen, um abgestorbene Zellen zu entfernen.

Daraufhin erfolgte die Ablösung der NHEK vom Boden der 75 cm²-Kulturflasche wie oben beschrieben. Die gelösten Zellen wurden in 8 ml EpiLife® Medium aufgenommen und bei 12000 U/min bei Raumtemperatur 10 min lang pelletiert. Der Überstand wurde abgenommen, die Zellen in 2 ml 1x PBS resuspendiert und in ein 2 ml Eppendorf Reaktionsgefäß überführt.

Die nachfolgenden Arbeitsschritte erfolgten alle auf Eis.

Die Zellen wurden erneut 10 min bei 900 U/min und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Zellpellet in 800 µl kaltem Reagenz A aus dem Kit resuspendiert und 5 s bei mittlerer Stufe gevortext. Die Zellsuspension inkubierte für maximal 2 min auf Eis, bevor 10 µl des Reagenz B dazugegeben wurden. Das erneute Vortexen für 5 s erfolgte nun bei maximaler Stufe. Die Lösung inkubierte für weitere 5 min auf Eis, wobei jede Minute bei maximaler Stufe gevortext wurde.

Danach wurden 800 µl des Reagenz C hinzupipettiert und die Suspension bei 700 U/min für 10 min zentrifugiert (4°C). Die genannten Schritte dienten dazu, die Integrität der Zellmembran aufzulösen, sodass nun der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt werden konnte und das zurückbleibende Pellet somit die Kernfraktion darstellte. Das Kernpellet wurde in 100 µl 1x PBS resuspendiert und bei -20°C gelagert.

Der abgenommene Überstand wurde erneut zentrifugiert (3000 U/min / 4°C / 15 min), um vorhandene Zelltrümmer und Zellorganellen zu pelletieren. Der nach diesem Zentrifugationsschritt resultierende Überstand stellte die zytosolische Fraktion dar und wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

Das Zytosol konnte bei -20°C eingefroren werden.

2.5 Isolation der Mitochondrien aus NHEK

Die Isolation der Mitochondrien aus NHEK erfolgte ebenfalls mit Hilfe des Mitochondria Isolation Kit for Cultured Cells (Pierce).

Die Mitochondrienisolation verlief identisch wie die Zytosolisolierung (vgl. 2.4) mit der Ausnahme, dass bei dieser Methode das im letzten Arbeitsschritt zurückbleibende Pellet einem weiteren Waschschrift unterzogen werden musste. Dabei wurden 500 µl kaltes Reagenz C zum Pellet gegeben und die Suspension wurde für weitere 5 min

bei 12000 U/min (4°C) zentrifugiert. Der Waschschrift stellte sicher, dass das Pellet nur aus den isolierten Mitochondrien bestand und eventuell noch vorhandene Zelltrümmer mit dem Überstand abgesaugt wurden.

Die isolierten Mitochondrien wurden je nach geplantem Experiment in dem entsprechenden Volumen (50–200 µl) 1x PBS aufgenommen und bei -20°C gelagert.

2.6 Isolation von mitochondrialer DNA aus NHEK-Mitochondrien

Die Isolation der mitochondrialen DNA aus den Mitochondrien erfolgte mittels des DNeasy Blood & Tissue Kit (50) (Qiagen).

Zunächst wurden die Mitochondrien aus NHEK wie unter 2.5 beschrieben isoliert und in 200 µl 1x PBS resuspendiert.

Anschließend wurde zu den isolierten Mitochondrien zunächst 20 µl Proteinase K aus dem Kit gegeben.

Um ein Auflösen der Doppelmembran der Mitochondrien zu erreichen, wurden 200 µl Puffer AL hinzupipettiert, gevortext und daraufhin für 10 min bei 56°C inkubiert. 200 µl absolutes Ethanol wurden dazugegeben und erneut gevortext.

Die Lösung wurde dann auf eine DNeasy Mini spin column, eine Säule aus dem Kit, pipettiert und bei 8000 U/min 1 min lang bei Raumtemperatur zentrifugiert.

Die Säule wurde auf ein neues Reaktionsgefäß aus dem Kit gestellt und 500 µl Puffer AW1 auf die Membran gegeben. Ein weiterer Zentrifugationsschritt (8000 U/min / 1 min / Raumtemperatur) schloss sich an.

Die Säule wurde in ein neues Reaktionsgefäß gestellt. 500 µl des Puffers AW2 wurden nun auf die Membran gegeben und bei 14000 U/min 3 min lang bei Raumtemperatur zentrifugiert.

Im Anschluss wurde die Säule mit der auf der Membran gebundenen DNA in ein normales steriles 1,5 ml Eppendorf Reaktionsgefäß gegeben und 50 µl des Puffers AE direkt auf die Membran pipettiert. Vor dem folgenden Zentrifugationsschritt (8000 U/min / 1 min / Raumtemperatur) inkubierte der Puffer AE für 1 min auf der Membran. Nach der Zentrifugation wurde die Säule erneut in ein neues 1,5 ml Eppendorf Reaktionsgefäß gegeben und um sicherzustellen, dass alle DNA-Reste gebunden waren, wurde die zuletzt beschriebene Zentrifugation erneut durchgeführt.

Die isolierte mitochondriale DNA lag nun im Puffer AE gelöst vor.

Die Konzentration in $\mu\text{g/ml}$ der gelösten mitochondrialen DNA in den beiden Reaktionsgefäßen wurde mit Hilfe des Nano Photometers (Implen) in einem Volumen von 5 μl ermittelt. Das Volumen der beiden Reaktionsgefäße wurde in einem vereinigt und erneut gemessen. Als Blank wurde der Puffer AE (ebenfalls 5 μl) eingesetzt.

Die mitochondriale DNA wurde bei -20°C gelagert.

2.7 Aufreinigen der DNA aus dem Zytosol von NHEK

Die Aufreinigung der DNA aus dem Zytosol von NHEK erfolgte mit Hilfe des QIAquick PCR Purification Kit (250) von Qiagen. Das Zytosol wurde wie in 2.4 beschrieben aus NHEK isoliert und in einen 50 ml Falcon überführt. Danach wurden 10 ml des Puffers PBI aus dem Kit zu der zytosolischen Fraktion gegeben, gut gemischt und zentrifugiert (1000 U/min / 20 s / Raumtemperatur). Anschließend wurden 750 μl der Suspension auf die entsprechende Säule gegeben und bei 13000 U/min 1 min bei Raumtemperatur zentrifugiert. Ziel dieses Arbeitsschrittes war es, die Suspension über die Membran zu filtern, so dass die im Zytosol vorhandene DNA auf der Membran der Säule zurückblieb und so von den übrigen Bestandteilen des Zytosols getrennt wurde. Die abzentrifugierte Flüssigkeit wurde verworfen und der eben beschriebene Vorgang so oft wiederholt, bis die komplette Suspension aus dem 50 ml Falcon aufgereinigt war. Im Anschluss wurden 750 μl des Waschpuffers PE aus dem Kit auf die Membran gegeben und erneut bei 13000 U/min für 1 min zentrifugiert. Um sicherzustellen, dass alle Ethanolreste entfernt wurden, schloss sich ein letzter Zentrifugationsschritt an, bei dem das Reaktionsgefäß ohne Zugabe einer Lösung zentrifugiert wurde. Die Säule wurde dann in ein 1,5 ml Eppendorf Reaktionsgefäß gegeben und 50 μl steriles H_2O bidest. darauf pipettiert. Das H_2O wurde zuvor auf 50°C erwärmt und inkubierte auf der Membran für 1 min, bevor erneut zentrifugiert wurde (13000 U/min / 1 min / Raumtemperatur). Das H_2O löste die DNA von der Membran der Säule, so dass die DNA nach der Zentrifugation im H_2O gelöst vorlag. Die aufgereinigte DNA wurde bei -20°C gelagert.

2.8 Analyse der Zellsignalwege durch siRNA-Transfektion

Die Translation dient in der Zelle dazu Proteine zu bilden. Dabei wird die DNA zunächst transkribiert und die so genannte Boten-Ribonukleinsäure (mRNA) entsteht. Diese mRNA ist eine komplementäre Kopie der Basenabfolge, die das Endprotein codiert. Am Ribosom wird dann mit Hilfe der mRNA ein Polypeptid aus verschiedenen Aminosäuren gebildet.

Die mRNA liegt einsträngig vor, so dass die dazu spezifische siRNA (short interfering RNA) komplementär daran binden kann und so die Translation des Proteins unterbricht.

Auf diesem Weg kann also die Bildung bestimmter Proteine in der Zelle verhindert werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Synthese folgender Proteinkomplexe (Inflammasome) blockiert: AIM2, NLRP3 und Caspase 1.

Die nachfolgende Tabelle 1 stellt die Sequenzen der eingesetzten siRNAs dar.

siRNA	Sequenz 5' → 3'
AIM2 (Eurofins MWG Operon)	GAA ACG AGG ACA CAA UGA ATT (21)
NLRP3 (Eurofins MWG Operon)	CAA CAG GAG AGA CCU UUA U (19)
Caspase 1 (Eurofins MWG Operon)	GAA GAC UCA UUG AAC AUA U (19)
CO3 (Eurofins MWG Operon)	GCG CAU UCC AGC UUA CGU AUU (21)

Tab. 1 Sequenzen der verwendeten siRNAs

Für die siRNA-Transfektion hatten die Zellen eine Konfluenz von etwa 60%.

Die Transfektion der NHEK erfolgte in 12-Wellplatten unter der Sterilwerkbank. Für die Transfektion eines Wells der 12-Wellplatte wurden in einem Eppendorf Reaktionsgefäß 0,75 µl der jeweiligen siRNA (20 µM) mit 62,5 µl Optimem Reduced Serum Medium (GIBCO) verdünnt.

In einem weiteren Reaktionsgefäß wurden 0,625 µl Lipofectamin RNAimax (Invitrogen) mit 62,5 µl Optimem Reduced Serum Medium (GIBCO) gemischt.

Beide Ansätze inkubierten 5 min bei Raumtemperatur.

Anschließend wurde der Ansatz mit dem Transfektionsreagenz RNAimax zu dem Ansatz mit der siRNA pipettiert, vorsichtig gemischt und weitere 20 min bei Raumtemperatur inkubiert.

Derweil wurde das alte Medium von den Zellen abgenommen und 625 µl frisches EpiLife® Medium pro Well vorgelegt.

125 µl des Transfektionsansatzes wurden pro Well dazugegeben und für 48 h unter Standardbedingungen (37°C, 5% CO₂, 100% Luftfeuchtigkeit) inkubiert.

Die Transfektion der NHEK mit mitochondrialer DNA und poly(dA:dT) erfolgte identisch. Als Medium wurde hier erneut EpiLife® eingesetzt. Die Inkubationszeit betrug hierbei nur 24 h unter Standardbedingungen.

2.9 Transfektion von ASC-CFP-Makrophagen

Die Makrophagen wurden in 4-Kammern Chamber Slides mit poly(dA:dT) (1 µg/ml, Sigma-Aldrich), mitochondrialer DNA (0,5 µg/ml), genomischer DNA (0,5 µg/ml) und der aufgereinigten DNA aus dem Zytosol Melittin behandelter und unbehandelter Zellen transfiziert.

Für die Transfektion einer Kammer der Chamber Slides wurden in einem 1,5 ml Eppendorf Reaktionsgefäß 42 µl Optimem Reduced Serum Medium (GIBCO) mit 1 µl RNAimax gemischt. In einem weiteren Reaktionsgefäß wurden 42 µl Optimem Reduced Serum Medium (GIBCO) mit dem Volumen der jeweiligen Probe zusammen pipettiert und beide Ansätze für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde der RNAimax-Ansatz zu dem Ansatz mit der Probe gegeben und weitere 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Das alte Medium wurde von den Zellen abgenommen und 416 µl frisches DMEM Medium und 84 µl des Transfektionsansatzes je Kammer dazugegeben. Die Inkubation erfolgte für 24 h unter Standardbedingungen (37°C, 5% CO₂, 100% Luftfeuchtigkeit). Im Anschluss daran wurde das Medium abgenommen und die Zellen drei Mal mit 1 x PBS gewaschen (1 ml). 1 ml Formaldehyd (4%) pro Kammer wurde für 10 min auf die Zellen gegeben, bevor erneut drei Mal mit 1x PBS (1 ml) gewaschen wurde. Um alle PBS-Reste zu entfernen, wurde ein Waschschrift mit 1 ml destilliertem H₂O je Kammer durchgeführt.

Die Objektträgeraufsätze der Chamber Slides wurden entfernt und etwas Prolong Gold Antifade Dapi (Invitrogen), welches die Zellkerne anfärbt, auf ein Deckgläschen gegeben und auf den Objektträger gelegt. Der Trockenvorgang dauerte 24 h und erfolgte lichtgeschützt.

Anschließend wurden die Zellen im Fluoreszenzmikroskop analysiert und mit Hilfe der CellQuest Software ausgewertet.

2.10 Polymerase Chain Reaction (PCR, Polymerase-Kettenreaktion)

Die Polymerase-Kettenreaktion ist eine Arbeitsmethode, bei der DNA exponentiell amplifiziert wird. Das zu Grunde liegende Prinzip sind vielfach ablaufende DNA-Replikationen in vitro. Mit Hilfe dieser Methode ist es möglich, kleinste Mengen an DNA nachzuweisen und zu vervielfältigen. Essenziell hierfür ist ein hitzestabiles Enzym, die Taq-Polymerase (1 u/μl, Fermentas) und zwei Primer, die es ermöglichen, auf den beiden Einzelsträngen der DNA die gewünschte, spezifische Stelle des Genoms abzulesen und so zu vervielfältigen.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden folgende Primer (Tab. 2) in einer Konzentration von 10 μM eingesetzt:

Oligoname	Sequenz (5' → 3')	Hersteller
MitoDNA For	ATGACCCACCAATCACAT GCCTATCAT (27)	Eurofins MWG Ope- ron
MitoDNA Rev	AAGACCCTCATCAATAGA TGGAGACATA (28)	Eurofins MWG Ope- ron
BioTEG300DNA For	AACCCAGTCAGCCTCATGAG (20)	Eurofins MWG Ope- ron
BioTEG DNA Rev	TTGTCCTGGTGGGAAGCACCC (20)	Eurofins MWG Ope- ron

Tab. 2 Sequenzen der eingesetzten Primer

Als PCR-Puffer diente der 10x Taq Buffer mit KCl (Fermentas).

Darüber hinaus wurde MgCl₂ (25mM, Fermentas) in einer Konzentration von 1,8 mM eingesetzt. Das Endvolumen eines PCR-Ansatzes betrug 25 μl und setzte sich wie folgt (Tab. 3) zusammen:

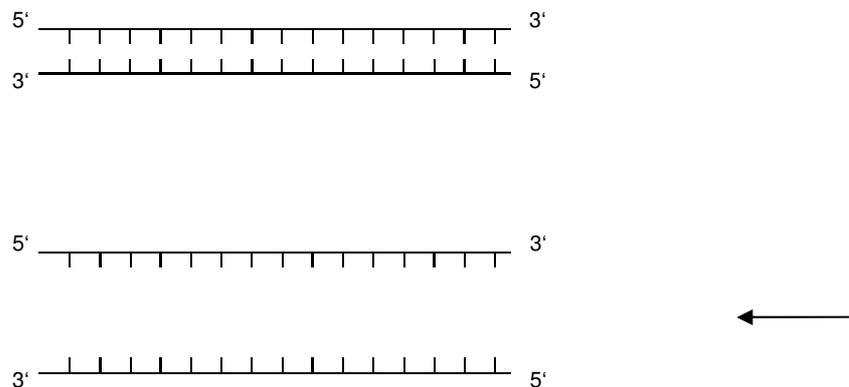
	Volumen für einen PCR-Ansatz
Aqua bidest.	9,95 μl
10x PCR-Puffer	2,5 μl
MgCl ₂ (1,8 mM)	1,8 μl
Template	5 μl
Primer MitoDNA For bzw. BioTEG300DNA For (25 pM)	2,5 μl
Primer MitoDNA Rev bzw. BioTEG DNA Rev (25 pM)	2,5 μl
dNTP (0,2 mM)	0,5 μl
Taq-Polymerase	0,25 μl

Tab.3 Zusammensetzung eines PCR-Ansatzes

Jeder PCR-Zyklus bestand aus drei Arbeitsschritten:

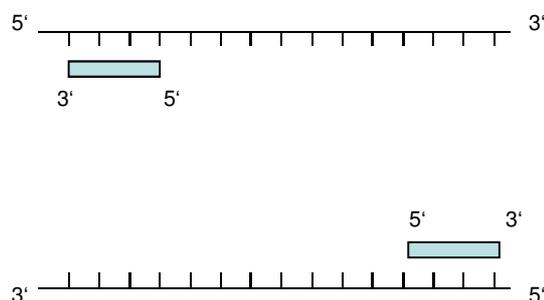
1. Denaturierung

Die PCR-Probe wurde auf 95°C erhitzt. Dabei wurden die Bindungen des Matrizen-DNA-Doppelstranges aufgelöst, so dass die DNA nun in zwei zueinander komplementären Einzelsträngen vorlag.



2. Annealing

In diesem Schritt lagerten sich die Primer an ihren jeweiligen DNA-Einzelstrang an und markierten so den Startpunkt der Replikation für die Taq-Polymerase. Die optimale Temperatur für die Hybridisierung der für diese Arbeit gewählten Primer lag zwischen 50°C und 60°C.

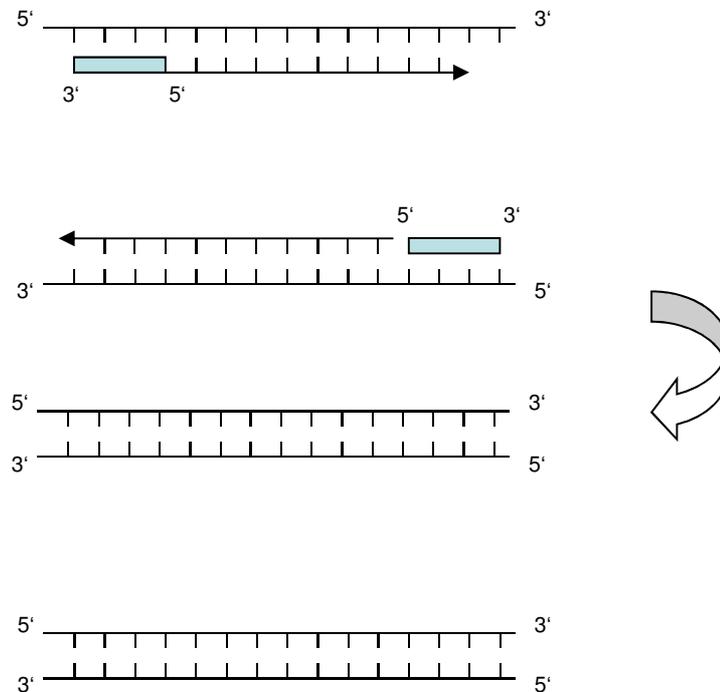


3. Elongation

Nun synthetisierte die hitzestabile Taq-Polymerase den komplementären Strang der DNA, indem sie die jeweils passenden dNTPs (0,2 mM , PCR Grade Nucleotide Mix 200 µl dATP, dCTP, dGTP, dTTP, Roche) anlagerte.

Die Syntheserichtung erfolgte von 5' nach 3' bei 72°C.

Durch die Verlängerung der eingesetzten Primer entstanden so zwei identische DNA-Doppelstränge, die in einem neuen PCR-Zyklus erneut vervielfältigt werden konnten.



Schritt	Temperatur	Zeit	Anmerkung
1	95°C	5min	Denaturierung
2	95°C	30s	Denaturierung
3	50°C	30s	Annealing
4	72°C	1min	→ Schritt 2, 10 Zyklen
5	95°C	30s	Denaturierung
6	60°C	30s	Annealing
7	72°C	1min	→ Schritt 5, 100 Zyklen
8	72°C	7min	finale Elongation
9	4°C		Kühlen

Tab. 4 PCR-Protokoll zur Vervielfältigung von doppelsträngiger DNA im Thermocycler (Veriti 96 wells Thermal Cycler, Applied Biosystems)

2.11 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese diente dazu, die DNA aus dem PCR-Produkt anhand ihrer molekularen Größe zu identifizieren.

Grundlage hierfür war, dass die DNA aufgrund ihrer Phosphatreste ein negativ geladenes Teilchen darstellte und daher im elektrischen Feld der Gelelektrophorese von der Kathode zur Anode wanderte. Je nach Größe des DNA-Fragments wanderten die Teilchen unterschiedlich schnell durch das Gel zur Anode.

Die Gelelektrophoresen der vorliegenden Arbeit liefen stets für 45 min bei 150 V.

Zu Beginn wurde ein 1% - iges Agarosegel hergestellt, indem 1,6 g Agarose (peqGOLD Universal Agarose, peqlab Biotechnologie GmbH) mit 160 ml 1x TAE – Puffer (Tris-Acetat-EDTA Puffer: 40 mM Tris (ICN), 1 mM EDTA (ICN), 20 mM Eisessig (Merck)) gemischt und in der Mikrowelle zum Kochen gebracht wurden, bis die Suspension eine klare Farbe angenommen hatte. Der 1x TAE-Puffer wurde auch als Puffer in der Elektrophoresekammer eingesetzt.

Nach kurzem Abkühlen wurde das Gel zügig in die Kammer gegossen und der Kamm eingesetzt.

Die Geltaschen wurden nach Erhärten des Gels mit einem Volumen von 12 µl befüllt, das sich wie folgt (Tab. 5) zusammensetzte:

PCR-Probe	10 µl
6x Orange Loading Dye Solution (Fermetas)	2 µl
Endvolumen pro Geltasche	12 µl

Tab. 5 Zusammensetzung einer Probe für die Gelelektrophorese

Der Ladungspuffer (6x Orange Loading Dye Solution, 10mM Tris-HCl (pH 7,6), 0,03% bromophenol blue, 60% glycerol, 60mM EDTA, Fermentas) diente dazu, die Proben zu beschweren, damit diese besser in die Geltaschen gleiten konnten.

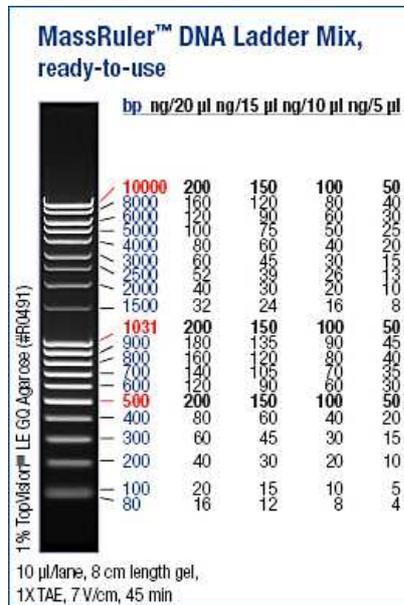


Abb. 9 Marker für die Gelelektrophorese.
(FERMENTAS: MassRuler™ DNA Ladder Mix, ready-to-use, 80-10,000 bp, URL: <http://www.fermentas.com/en/products/all/dna-electrophoresis/massruler-dna-ladders/sm040-massruler-mix>)
(Stand: 28.12.2011)

Um die resultierenden Banden einer bestimmten Basenpaargröße zuordnen zu können, lief gemeinsam mit den Proben auch immer ein Standard im Gel mit.

Für diese Arbeit wurde der Mass Ruler DNA Ladder, Mix (Fermentas) als Marker (Abb. 9) benutzt.

Nach Abschluss der elektrischen Auftrennung der PCR-Probe wurde die DNA im Gel mit Hilfe von Ethidiumbromid (Sigma - Aldrich) sichtbar gemacht.

Ethidiumbromid ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der sich zwischen den Basen der DNA anlagert und unter UV – Licht sichtbar wird.

Das Agarosegel wurde in die UV – Kammer (BioDoc Analyzer, Biometra) gelegt und fotografiert.

2.12 Interleukin-1 β ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay)

Der Enzyme Linked Immunoabsorbent Assay (ELISA) ist eine Nachweismethode, die auf einer enzymatisch vermittelten Farbreaktion basiert.

Die bei dieser Arbeit angewandte Technik ist der so genannte Double-Antibody-Sandwich-ELISA (R&D Systems IL-1 β ELISA Duo Set). Hierbei wird Interleukin 1 β (IL-1 β) spezifisch zwischen zwei Antikörpern gebunden.

Zu Beginn wurde die 96-well Mikrotiterplatte (NUNC MaxiSorp Strips) mit 100 μ l je Well des ersten Antikörpers (Capture-Antikörper, 4 μ g/ml) beschichtet und für 24 h lichtgeschützt inkubiert (Abb. 10).

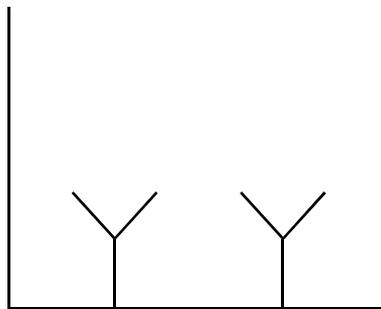


Abb. 10 Coating der Mikrotiterplatte mit je 100 μ l/Well mit Capture-Antikörper, 4 μ g/ml. Danach erfolgte die Inkubation für 24 h.

Danach schloss sich der erste Waschschrift an. Gewaschen wurde drei Mal mit jeweils 300 μ l PBS – T (PBS mit 0.05% Tween) pro Well, bevor 300 μ l Reagent Diluent (RD, PBS mit 1% BSA, sterilfiltriert) pro Well zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen auf die Mikrotiterplatte gegeben wurden. Das RD inkubierte für 1 h bei Raumtemperatur auf der Platte.

Ein weiterer wie oben beschriebener Waschschrift schloss sich an.

Im Folgenden wurden 100 μ l der Probe pro Well dazugegeben. Als Referenz wurde eine Standardverdünnungsreihe mit IL-1 β , gelöst in Reagent Diluent (RD) (Stock: 100 ng/ml) (Tab. 6), hergestellt.

	IL-1 β Konzentration pg/ml
Well 1	200
Well 2	100
Well 3	50
Well 4	25
Well 5	12,5
Well 6	6,25
Well 7	3,125
Well 8	Reines RD

Tab. 6 Standardverdünnungsreihe

Sowohl Standard als auch die Probe inkubierten für 2 h bei Raumtemperatur. Dabei wurde das Antigen (IL-1 β) von dem bereits an der Platte haftenden Antikörper gebunden (Abb. 11).

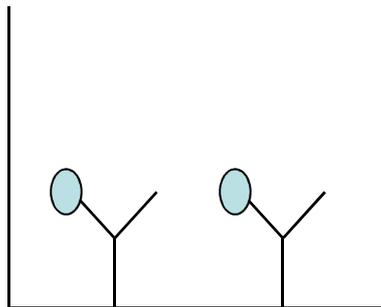


Abb. 11 Bindung an Capture-Antikörper. Nach Zugabe von 100 μ l der Probe wurde das Antigen von den an der Platte haftenden Capture-Antikörpern gebunden.

Im Anschluss wurde erneut gewaschen und 100 μ l pro Well des zweiten Antikörpers (Detektions-Antikörper, 300 ng/ml) wurden dazugegeben.

Dieser Antikörper band eine weitere Stelle des Antigens (Abb. 12), sodass das Protein nun, ähnlich wie ein Sandwich, zwischen den beiden Antikörpern gebunden war. Die Inkubation bei Raumtemperatur betrug auch hier 2 h.

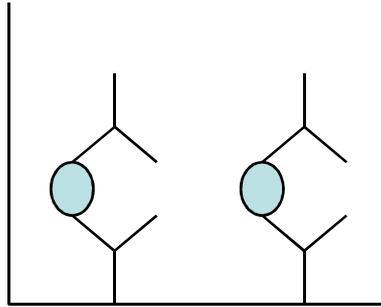


Abb. 12 Zugabe und Bindung des zweiten Antikörpers (Detektions-Antikörper in der Konzentration 300 ng/ml). Die anschließende Inkubation betrug 2 h.

Der folgende Waschschrift entfernte alle nicht gebundenen Antikörper.

Danach wurde das Enzym Horse Radish Peroxidase (HRP) gekoppelt an Streptavidin für 30 min (1:200 in RD verdünnt, 100 μ l je Well) zugegeben, welches im weiteren Versuchsverlauf ein spezifisches Substrat umsetzte. Das Reaktionsprodukt konnte als Farbumschlag detektiert werden.

Danach wurde erneut gewaschen.

Im Anschluss erfolgte die Zugabe von 100 μ l / Well Tetramethylbenzidin (TMB, 10 ml TMB-Solution + 2 μ l H_2O_2). Dieses Substrat bewirkte einen Farbumschlag nach Blau, der nach 25 min durch die Zugabe von 50 μ l Schwefelsäure (H_2SO_4) je Well abgestoppt wurde.

Die Proben wurden anschließend im Photometer (Spectra MR, Dynex Technologies) bei 450 nm Wellenlänge und einer Wellenlängenkorrektur von 540 nm mit dem zugehörigen Computerprogramm (Spectra MR) gemessen und interpretiert.

2.13 Durchflusszytometrie (FACS-Messung)

Mit Hilfe des FACS (Fluorescence Activated Cell Sorting) werden Zellen anhand ihrer Größe, Form und spezifischen Markierung detektiert.

In der vorliegenden Arbeit sollten die Auswirkungen von Melittin auf die Integrität von Mitochondrien untersucht werden.

Daher wurden die NHEK zunächst 5 h unter Standardbedingungen mit 5 µg/ml und 10 µg/ml Melittin behandelt. Es wurde jeweils für Duplikate der wie unter 2.3 beschriebene Mastermix hergestellt und auf die NHEK in die 6-Lochplatten gegeben. Des Weiteren wurde ein weiterer Ansatz hergestellt, der als Positivkontrolle (=Lysekontrolle) diente. Dabei wurden die NHEK mit 10 % SDS (Sodium Dodecyl Sulfat), in EpiLife® Medium verdünnt, behandelt.

Nach 5-stündiger Inkubationszeit unter Standardbedingungen wurden die Mitochondrien der NHEK mit Hilfe des Mitotracker Red CMXRos (Invitrogen) gefärbt.

Durch das spezifische Anfärben der Mitochondrien konnte im weiteren Versuchsaufbau gemessen werden, wie viele NHEK mit intakten Mitochondrien in dem jeweiligen Ansatz relativ zur unbehandelten Kontrolle in Prozent vorhanden waren.

Der Mitotracker Red CMXRos wurde in einer Konzentration von 200 nM eingesetzt, aufgenommen in Dimethylsulfoxid (DMSO).

Für die Mitotrackerbehandlung wurden die Überstände der Zellen abgenommen und ein Mastermix aus 2750 µl EpiLife® und 5,5 µl Mitotracker Red CMXRos (1:10 verdünnt) hergestellt. Es wurden jeweils 500 µl des Ansatzes in jedes Well gegeben und für weitere 30 min unter Standardbedingungen inkubiert.

Danach wurden die Zellen wie unter 2.1 beschrieben mit Hilfe von Trypsin vom Boden der Kulturgefäße abgelöst, im Anschluss einmal in Medium und einmal in 1x PBS gewaschen und letztlich in jeweils 250 µl 1x PBS aufgenommen und im FACS gemessen.

Am FACSCanto (BD) wurde zunächst im Forward Scatter (FSC, detektiert die Größe der Zelle) und im Side Scatter (SSC, detektiert die Granularität der Zelle) die Region der lebenden, intakten Zellpopulation anhand unbehandelter und ungefärbter NHEK festgelegt (Abb. 13).

Da die Zellen mit dem Mitotracker-Farbstoff gefärbt waren, wurden die Zellen aus der Region P1 des jeweiligen Ansatzes in der Einstellung SSC gegen den Farbkanal FL2-PE (detektiert die gefärbten Mitochondrien) gemessen.

Die resultierenden Prozentzahlen bezogen sich auf die Anzahl der Zellen in der Region P1 im jeweiligen Ansatz (=100%).

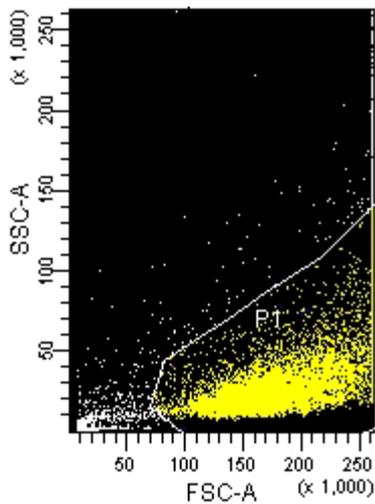


Abb. 13 Festlegung der Region der lebenden, intakten NHEK in der FSC/SSC- Darstellung zu Beginn der Messung.

2.14 Statistik

Die statistische Analyse der Ergebnisse erfolgte mit GraphPad Prism 4.0 (GraphPad Software Inc., La Jolla, USA). Alle Versuche waren unabhängig und $n = 3$ oder mehr. Der Student's t-Test diente zur Berechnung der statistischen Unterschiede. Als Signifikanzniveau galt $p < 0,05$.

3 Ergebnisse

Melittin, der Hauptbestandteil von Bienengift, aktiviert in Zellen die Apoptose und führt über Aktivierung des AIM2-Inflammasoms zu einer IL-1 β Produktion (Kaymakanov, 2012). Bislang ungeklärt ist der Mechanismus der AIM2-Aktivierung. Da das AIM2-Inflammasom ein Sensor für dsDNA ist, sollte in der vorliegenden Arbeit untersucht werden, ob durch die Stimulation mit Melittin dsDNA aus Mitochondrien von NHEK ins Zytosol freigesetzt wird und dort das AIM2-Inflammasom aktiviert.

3.1 Wirkung von körpereigener DNA auf die IL-1 β Freisetzung

In den letzten Jahren wurde vielfach bestätigt, dass dsDNA, die im Zytosol vorliegt, in der Lage ist das AIM2-Inflammasom zu aktivieren und somit letztlich eine IL-1 β Freisetzung bewirkt (Dombrowski et al., 2011, Jones et al., 2010). Dabei wird die DNA zunächst von der HIN200-Domäne des Inflammasoms erkannt und gebunden. Der entstandene HIN200/DNA-Komplex wiederum aktiviert das Adaptorprotein ASC. ASC bindet über seine PYD-Region an die CARD-Region der Pro-Caspase 1 und bewirkt so die autokatalytische Spaltung von Pro-Caspase 1 in seine aktive Form Caspase 1. Dieses aktive Enzym führt daraufhin zu einer Freisetzung von IL-1 β (Alnemri, 2010, Fernandes-Alnemri et al., 2009, Stutz et al., 2009).

Auch wir konnten in Vorarbeiten zeigen, dass die künstlich hergestellte poly(dA:dT) zu einer IL-1 β Freisetzung führt, wenn diese ins Zytosol gelangt (Dombrowski et al., 2011). Da mitochondriale DNA ebenfalls doppelsträngig ist, sollte nun untersucht werden, ob diese genauso in der Lage ist das AIM2-Inflammasom zu aktivieren und möglicherweise der Auslöser für die durch Melittin beobachtete AIM2 Aktivierung und die IL-1 β Sekretion in Keratinozyten ist.

3.1.1 Mitochondriale DNA bewirkt eine IL-1 β Freisetzung in NHEK

Mitochondriale DNA (mtDNA) besteht, genau wie genomische DNA, aus zwei zueinander komplementären Einzelsträngen, bildet also einen Doppelstrang (vgl. 1.2). Somit sollte mtDNA grundsätzlich theoretisch in der Lage dazu sein, eine Inflammasomaktivierung zu bewirken. Um dies auch *in vitro* zu prüfen, wurde zunächst wie unter 2.6 beschrieben die mtDNA aus NHEK isoliert.

Anschließend wurden verschiedene Konzentrationen der mtDNA mit Hilfe des Transfektionsreagenz RNAimax in eine neue Population von *normal human epidermal keratinocytes* (NHEK) transfiziert.

Der Nachweis der IL-1 β Sekretion in dem Zellkulturüberstand erfolgte mittels IL-1 β ELISA.

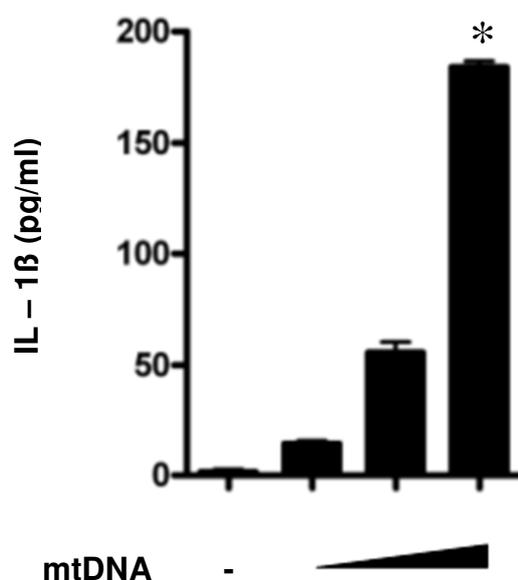


Abb. 14 Mitochondriale DNA bewirkt eine Freisetzung von IL-1 β in NHEK. Die Zellen wurden in unterschiedlichen Konzentrationen (2,5/25/250 ng/ml) mit mitochondrialer DNA transfiziert und für 24 h unter Standardbedingungen inkubiert. Danach wurden die Überstände abgenommen und mit Hilfe des ELISA auf IL-1 β untersucht.

Der IL-1 β ELISA wurde nach einer Inkubationszeit von 24 h durchgeführt.

Wie in Abbildung 14 zu sehen ist, bewirkte die Transfektion der NHEK mit mtDNA eine IL-1 β Sekretion. Je nach Konzentration der eingesetzten mtDNA kam es zu einer IL-1 β Freisetzung von bis zu 180 pg/ml (= konzentrationsabhängige IL-1 β Sekretion).

3.1.2 Mitochondriale DNA aktiviert das AIM2-Inflammasom

Die IL-1 β Sekretion wird durch so genannte Inflammasome gesteuert. Um zu prüfen, welches Inflammasom durch mitochondriale DNA (mtDNA) aktiviert wird, wurden die NHEK vor der Transfektion der mtDNA mit den entsprechenden siRNAs behandelt (vgl. 2.8).

In diesem Versuchsansatz diente die Behandlung mit Control-siRNA als Negativkontrolle. Des Weiteren wurden AIM2, Caspase 1 und NLRP3 siRNA transfiziert. Nach einer Inkubationszeit von 48 h wurde die mtDNA in die Zellen transfiziert und die IL-1 β Produktion mittels ELISA ermittelt.

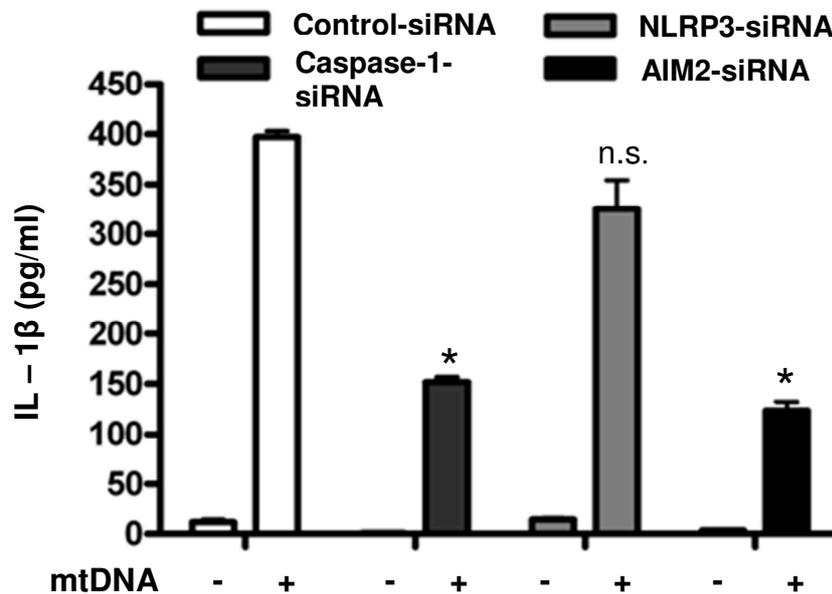


Abb. 15 Die durch mitochondriale DNA ausgelöste IL-1 β Freisetzung erfolgt über das AIM2-Inflammasom und ist Caspase 1 abhängig. Die Freisetzung ist dagegen unabhängig von NLRP3. Eine Blockade des AIM2 bzw. Caspase 1 Gens durch die entsprechende siRNA bewirkt einen Rückgang der IL-1 β Produktion von etwa 60% im Vergleich zu dem Kontrollansatz mit Control-siRNA. Die NHEK wurden vor der Transfektion mit mtDNA mit den jeweiligen siRNAs transfiziert und für 48 h bei Standardbedingungen inkubiert. Anschließend wurde mit den Überständen der Zellen ein IL-1 β ELISA durchgeführt.

Durch die siRNAs ist es möglich, die Translation der entsprechenden Inflammasome in den jeweiligen Ansätzen zu blockieren.

Das Ergebnis dieses Versuchs (Abb. 15) zeigte deutlich, dass eine Blockade der Translation von AIM2 einen Rückgang der IL-1 β Produktion um etwa 60% bewirkte. Da Caspase 1 Teil des AIM2-Inflammasoms ist, hat auch das Ausschalten dieses Gens denselben Effekt auf die IL-1 β Freisetzung und führte ebenfalls zu einer Verminderung. Dagegen war die IL-1 β Freisetzung unabhängig von NLRP3.

3.2 Eine Stimulation mit Melittin bewirkt eine Schädigung der Mitochondrien von NHEK und führt zu einer Freisetzung von mtDNA ins Zytosol

3.2.1 Melittin führt zu einer Zerstörung von Mitochondrien (Nachweis mittels FACS)

Wie in 3.1.2 gezeigt, ist mtDNA in der Lage, das AIM2-Inflammasom zu aktivieren.

Um zu prüfen, ob Melittin auch die Mitochondrien von NHEK schädigt und so möglicherweise zu einer Freisetzung von mtDNA ins Zytosol führt, wurden die Mitochondrien mit einem spezifischen Farbstoff, dem Mitotracker Red CMXRos, gefärbt, nachdem sie mit Melittin behandelt wurden.

Die Anzahl der intakten Mitochondrien konnte dann mittels FACS-Messung ermittelt werden.

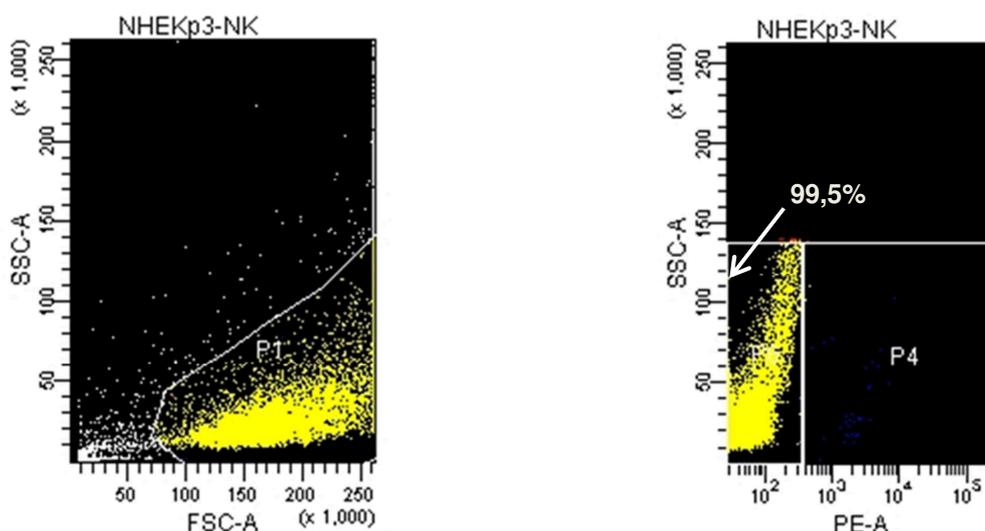


Abb. 16 **Negativkontrolle (ungefärbte Zellen).** Das linke Bild stellt die eingestellte Zellpopulation dar. Auf diese Region P1 beziehen sich alle gemessenen Prozentzahlen der folgenden Versuchsansätze. In der Negativkontrolle wurden die Mitochondrien weder gefärbt, noch wurden die NHEK mit Melittin behandelt. Daher detektiert der Farbkanal PE kaum Zellen in der Region P4. Nahezu alle Zellen liegen im linken unteren Bildteil, der die ungefärbten, Mitotracker negativen Zellen darstellt.

Der SSC, der Kanal der die Granularität der Zelle erfasst, wurde gegen den Farbkanal PE gemessen. Daher lagen alle Zellen, die mit Mitotracker Red CMXRos gefärbt wurden, in der rechten Bildhälfte, wohingegen ungefärbte Zellen in der linken Bildhälfte zu sehen waren.

Der Mitotracker Red CMXRos ist ein Farbstoff, der spezifisch nur Mitochondrien anfärbt. Daher waren alle Zellen, die in der Region P4 zu finden waren, letztlich mit intakten Mitochondrien gleichzusetzen.

Die Negativkontrolle (ungefärbte Zellen) bestand aus Zellen, die weder mit dem Mitotracker gefärbt, noch mit Melittin behandelt wurden (Abb. 16).

99,5% der Zellen waren somit in der Farbmessung im linken Bildteil zu sehen.

Der nächste Versuchsansatz wurde mit NHEK durchgeführt, die mit dem Mitotracker-Farbstoff gefärbt wurden, jedoch zuvor nicht mit Melittin behandelt wurden (Negativkontrolle (unbehandelte Zellen)).

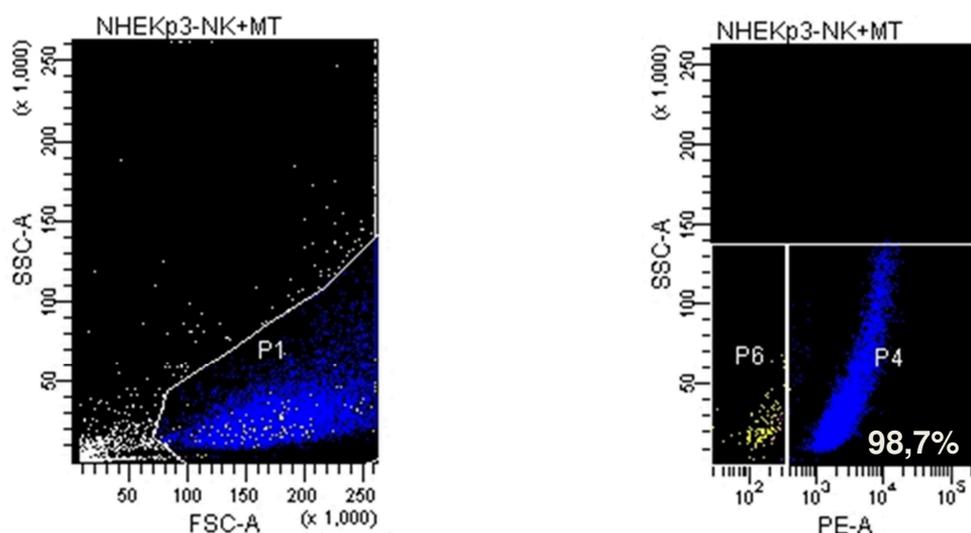


Abb. 17 Negativkontrolle (unbehandelte Zellen) NHEK, Mitotracker gefärbt, nicht mit Melittin behandelt. Die NHEK wurden in diesem Ansatz nicht mit Melittin behandelt und nur die Mitochondrien mittels des Mitotracker angefärbt. Das Ergebnis zeigt, dass 98,7% der Zellen in der Region P4 liegen und somit intakte Mitochondrien besitzen.

Durch das spezifische Anfärben der Mitochondrien waren nun 98,7% der Zellen in der Farbmessung in der Region P4 zu sehen (Abb. 17).

Nur 1,3% der Zellen waren ungefärbt (Region P6) und besaßen somit nicht mehr intakte Mitochondrien.

Um zu prüfen, ob Melittin einen Einfluss auf die Mitochondrien-Integrität hat, wurden die NHEK im nächsten Ansatz wie unter 2.3 beschrieben zunächst für 5 h mit einer

Melittinkonzentration von 5 $\mu\text{g/ml}$ behandelt. Anschließend wurden die Zellen mit dem Mitotracker gefärbt.

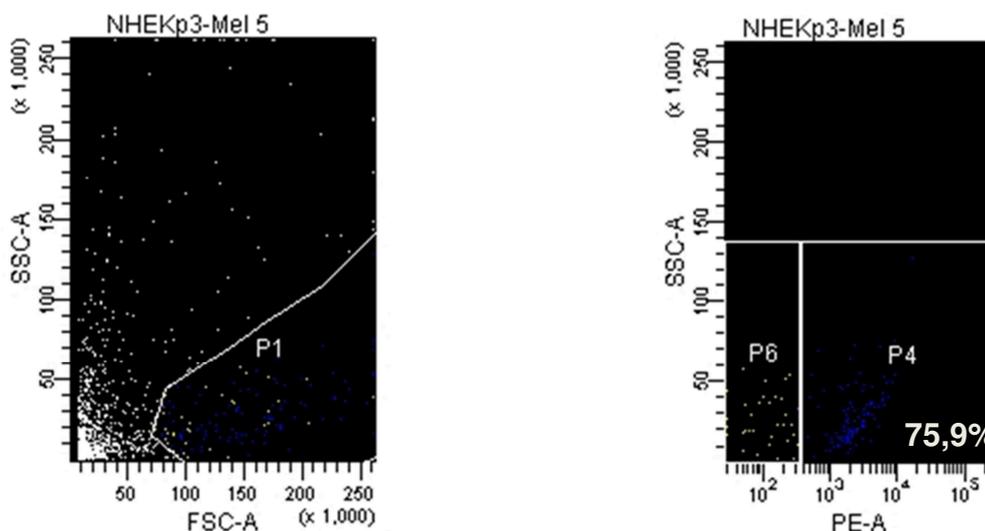


Abb. 18 NHEK, Mitotracker gefärbt, behandelt mit 5 $\mu\text{g/ml}$ Melittin. Bei diesem Ansatz wurden die NHEK vor der Mitotracker-Färbung für 5h mit 5 $\mu\text{g/ml}$ Melittin behandelt. Im Anschluss wurde die Farbintensität des Mitotracker-Farbstoffs gemessen, der proportional zu den noch aktiven und somit intakten Mitochondrien ist.

Die FACS-Messung zeigte einen Rückgang der lebenden, intakten Mitochondrien um 22,8% im Vergleich zu dem unbehandelten Ansatz (Abb. 18). Grundsätzlich fällt auf, dass in diesem Versuchsansatz weniger intakte Zellen im FSC/SCC zu messen waren, was darauf schließen lässt, dass Melittin generell NHEK schädigt. Darüber hinaus zeigten sich von den wenigen noch intakten Zellen nur 75,9 % Mitotracker positiv.

Der nächste Versuchsansatz der FACS-Messung diene dazu, zu untersuchen, ob die doppelte Konzentration an Melittin (10 $\mu\text{g/ml}$) auch eine zahlreichere Zerstörung von Mitochondrien mit sich brachte.

Die NHEK wurden hierfür für 5 h mit 10 $\mu\text{g/ml}$ Melittin behandelt und erneut mit dem Mitotracker-Farbstoff gefärbt.

Im Ergebnis (Abb. 19) zeigte sich tatsächlich ein weiterer Rückgang der Zahl intakter Mitochondrien auf nur noch 33,3%.

Dies lässt sich auch darauf zurückführen, dass Melittin an sich schon eine so hohe Toxizität auf die NHEK ausübt, dass kaum noch intakte Zellen im FACS zu messen sind.

In Region P6 liegen dagegen 66,7% der Zellen, deren Mitochondrien nicht angefärbt wurden. Mehrere Gründe können zu diesem Ergebnis führen: Entweder wurden die Mitochondrien nicht angefärbt oder die Mitochondrien sind zerstört, so dass sie nicht mehr angefärbt werden konnten. Generell war in diesem Ansatz die Konzentration von Melittin so hoch, dass kaum noch lebende Zellen zu messen waren.

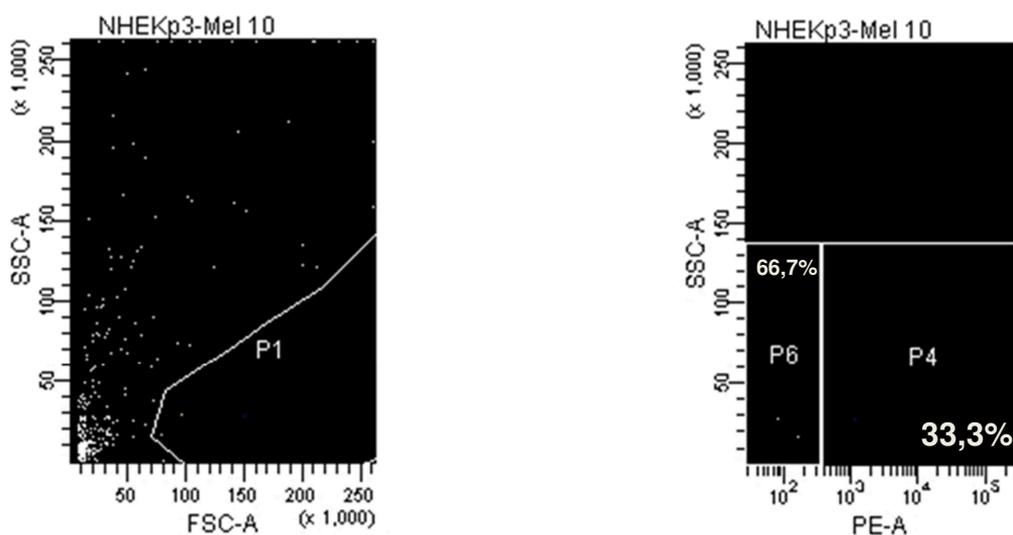


Abb. 19 NHEK, Mitotracker gefärbt, behandelt mit 10 µg/ml Melittin. Um nachzuweisen, dass eine Steigerung der Konzentration an Melittin auch zu einem weiteren Rückgang der Anzahl intakter Mitochondrien führt, wurde in diesem Ansatz 10 µg/ml Melittin eingesetzt.

Der letzte Ansatz der FACS-Messung diente als Positivkontrolle (Abb. 20). Hierbei wurden die NHEK mit 10% SDS behandelt. SDS führt dazu, dass Proteine denaturieren und Zellen so apoptotisch werden. In diesem Ansatz sollten folglich kaum gefärbte Mitochondrien in der Region P4 zu finden sein, da kaum noch Zellen nach der Behandlung intakt sind.

Tatsächlich waren letztlich wenige lebende Zellen zu messen, von denen nur noch 11,1% angefärbte, also intakte Mitochondrien aufwiesen.

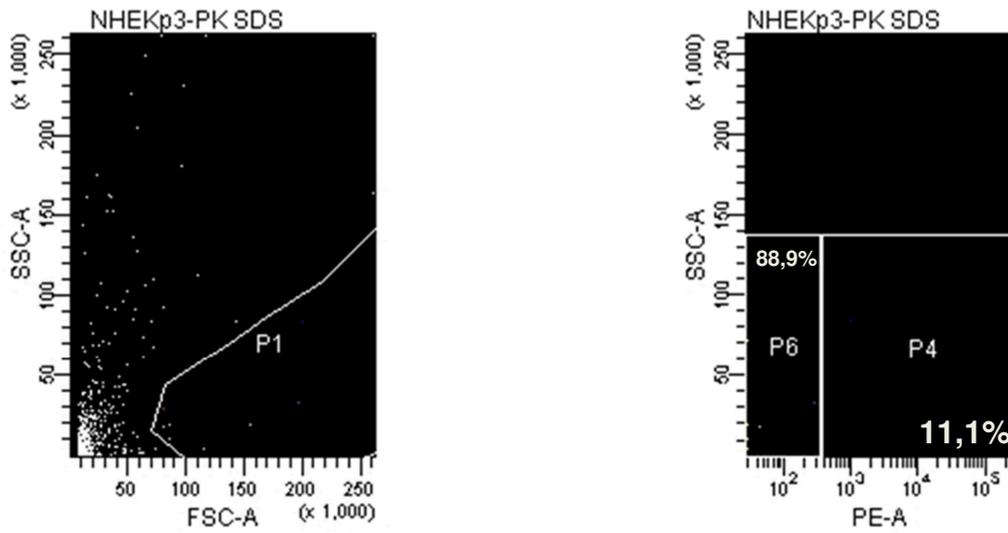


Abb. 20 **Positivkontrolle (10% SDS).** Die NHEK wurden in diesem Ansatz mit 10% SDS behandelt. SDS denaturiert Proteine und zwingt Zellen so in die Zytolyse. Dementsprechend sind hier nur noch 11,1% der Mitochondrien intakt.

3.2.2 Melittin führt zu einer Freisetzung von mitochondrialer DNA ins Zytosol

Der vorangegangene FACS-Versuch zeigte, dass Melittin in unterschiedlichen Konzentrationen zu einer Zerstörung von Mitochondrien in NHEK führt.

Darüber hinaus konnte in 3.1.2 gezeigt werden, dass mtDNA das AIM2-Inflammasom aktiviert und eine IL-1 β Produktion bewirkt.

Um nachzuweisen, dass durch die Zerstörung der Mitochondrien auch deren DNA ins Zytosol gelangt, wurden die NHEK wie unter 2.3 beschrieben mit Melittin in einer Konzentration von 5 $\mu\text{g/ml}$ behandelt. Im FACS-Versuch wurde gezeigt, dass 5 $\mu\text{g/ml}$ Melittin bereits zu einer Dezimierung der Anzahl intakter Mitochondrien führte, so dass diese Konzentration als ausreichend zum Nachweis von mtDNA im Zytosol angesehen wurde. Ein weiterer Grund 5 $\mu\text{g/ml}$ als Konzentration zu wählen war, dass 10 $\mu\text{g/ml}$ sich im FACS-Versuch bereits als zu zytotoxisch gezeigt haben (Abb. 19).

Nach der 6-stündigen Inkubation unter Standardbedingungen wurde aus den NHEK mit Hilfe des Mitochondria Isolation Kit for Cultured Cells (Pierce) das Zytosol isoliert (vgl. 2.4). Als Positivkontrolle diente mtDNA, die zuvor aus intakten NHEK isoliert wurde.

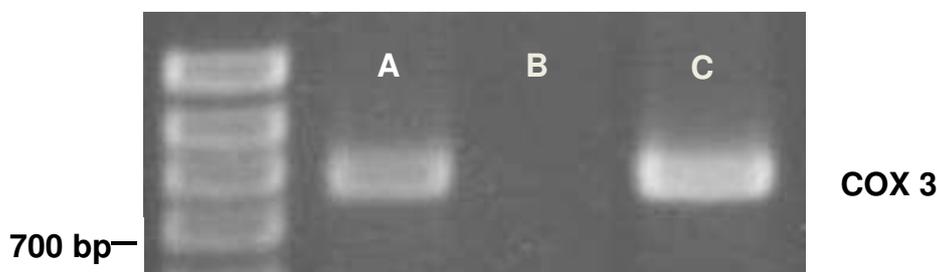


Abb. 21 PCR zur Amplifikation von COX3 mit zytosolischen Fraktionen als Template unbehandelter NHEK, bzw. aus NHEK die zuvor 6 h mit Melittin behandelt wurden. In der PCR sollte geprüft werden, ob die im FACS detektierte Zerstörung der Mitochondrien zu einer Freisetzung von mtDNA ins Zytosol führt, wo diese eventuell das Inflammasom aktivieren kann.
A: Positivkontrolle. Nachweis des COX3-Gens, welches spezifisch nur in mtDNA codiert wird.
B: PCR-Produkt aus dem isolierten Zytosol aus unbehandelten NHEK.
C: PCR-Produkt aus dem Zytosol, das aus NHEK isoliert wurde, die zuvor 6 h mit Melittin behandelt wurden.

Um zu prüfen, ob mtDNA im Zytosol vorliegt, wurde mit den isolierten zytosolischen Fraktionen als PCR-Template eine PCR wie unter 2.10 beschrieben durchgeführt. Das PCR Produkt wurde im Anschluss auf ein Agarosegel aufgetragen und unter

Anlage einer elektrischen Spannung in die einzelnen Fragmente anhand deren Größe aufgetrennt (vgl. 2.11).

Als Resultat nach der Ethidiumbromidfärbung (Abb. 21) sieht man eine Bande auf Höhe des gewünschten PCR-Produkts COX3, welches nur in mtDNA vorhanden ist.

Die erste Bande (A) in Abbildung 10 zeigt die Positivkontrolle. Die eingesetzten Primer weisen spezifisch das COX 3 Gen nach, welches nur in mtDNA codiert wird.

(B) zeigt das PCR-Produkt aus dem isolierten Zytosol aus unbehandelten NHEK. Es ließ sich keine mtDNA nachweisen.

Die letzte sichtbare Bande (C) dagegen ist das Ergebnis aus dem PCR-Ansatz mit dem Zytosol, das aus NHEK isoliert wurde, die zuvor 6 h mit Melittin behandelt wurden. Auch hier ist ein deutliches Signal auf Höhe des COX 3 Gens zu sehen, sodass davon ausgegangen werden kann, dass die durch die Stimulation mit Melittin geschädigten Mitochondrien tatsächlich ihre DNA ins Zytosol entlassen.

Ob diese Menge an DNA letztlich ausreichend ist, um den Inflammasomkomplex zu aktivieren, sollte im nachfolgenden Versuch geklärt werden.

3.3 Die durch eine Stimulation mit Melittin freigesetzte mitochondriale DNA führt zur AIM2-Inflammasomaktivierung und IL-1 β Freisetzung

In 3.2.2 konnte die DNA aus Mitochondrien im Zytosol von NHEK nachgewiesen werden, die zuvor mit Melittin behandelt wurden. Es gilt allerdings die Frage zu analysieren, ob diese Menge an DNA letztlich auch ausreichend ist, um einen Inflammasomkomplex zu aktivieren und eine IL-1 β Produktion zu bewirken.

Für den vorliegenden Versuch wurde folglich nicht nur das Zytosol aus Melittin behandelten NHEK isoliert, sondern auch die DNA, die im Zytosol vorhanden ist, in einem weiteren Arbeitsschritt zusätzlich noch aufgereinigt, um die vorhandene Menge an DNA von den übrigen Bestandteilen zu trennen und somit zu konzentrieren (vgl. 2.7). Im Anschluss wurde die aufgereinigte mtDNA erneut in eine NHEK-Population transfiziert (vgl. 2.8). Für den Versuch wurden vier Ansätze gewählt: (A) stellt die Negativkontrolle dar. In diesem Ansatz waren die Zellen vollkommen unbehandelt. Im Ansatz (B) wurde die aufgereinigte DNA aus NHEK, die nicht mit Melittin behandelt wurden, transfiziert. Physiologisch sollte sich hier also keine DNA im Zytosol befinden. (C) stellt den Transfektionsansatz mit aufgereinigter DNA aus Melittin behandelten NHEK dar. Die NHEK aus Ansatz (D) wurden mit mtDNA (Konzentration 250 ng/ml) transfiziert, die zuvor aus intakten NHEK isoliert wurde. Dieser Ansatz diente

somit als Positivkontrolle. 24 Stunden nach der Transfektion wurde der Überstand von jeder Probe abgenommen und für den folgenden IL-1 β ELISA zur Versuchsauswertung vorbereitet. Ansatz (A) als Negativkontrolle zeigte keine IL-1 β Produktion. Ebenso war das Ergebnis in Ansatz (B) ohne Nachweis einer IL-1 β Produktion. In diesem Versuchsansatz war davon auszugehen, dass sich keine DNA im Zytosol befindet, da die Zellen aus denen das Zytosol isoliert wurde, unbehandelt waren. Das Resultat aus diesem Ansatz macht es folglich unwahrscheinlich, dass es, etwa durch die vielen Aufreinigungsschritte in der Versuchsdurchführung, zu einer Verunreinigung durch Organellen kommt. Eine solche Verunreinigung mit beispielsweise Mitochondrien oder Kernen hätte in diesem Versuchsansatz ein Signal gegeben. In Ansatz (C) dagegen zeigte sich eine Freisetzung von 450 pg/ml an IL-1 β . Die Menge an mtDNA, die durch die Behandlung der NHEK mit Melittin in deren Zytosol frei wird, muss folglich ausreichend sein, um einen Inflammasomkomplex zu aktivieren und eine IL-1 β Freisetzung bewirken. Die IL-1 β Freisetzung in Ansatz (D) war erwartungsgemäß hoch und diente als Positivkontrolle (vgl. 3.1.1)

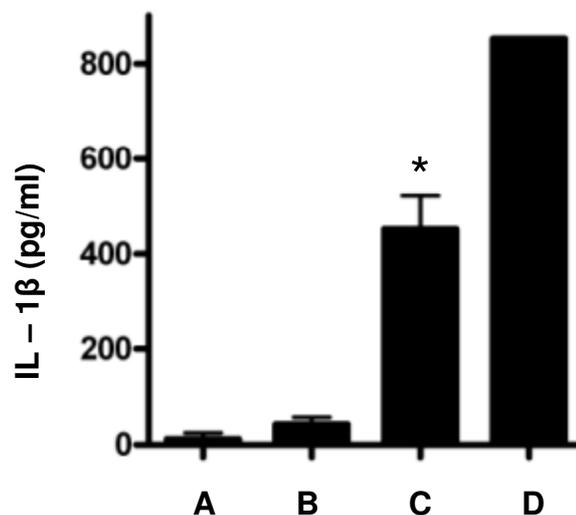


Abb. 22

Um zu prüfen, ob die durch die Stimulation mit Melittin frei werdende Konzentration an mtDNA ausreichend ist, um den Inflammasomkomplex zu aktivieren, wurde das isolierte Zytosol aus NHEK zunächst aufgereinigt und das Produkt erneut in NHEK transfiziert. Die Inkubationszeit betrug anschließend 24 h bei Standardbedingungen. Die Menge der IL-1 β Produktion wurde mittels IL-1 β ELISA ermittelt.

- (A) Negativkontrolle. In diesem Ansatz waren die Zellen vollkommen unbehandelt.
 (B) Hier wurde die aufgereinigte DNA aus NHEK, die nicht mit Melittin behandelt wurden, transfiziert.
 (C) Transfektionsansatz mit aufgereinigter DNA aus Melittin behandelten NHEK.
 (D) Positivkontrolle. Transfektion mit mtDNA (Konzentration 250 ng/ml).

3.4 Die IL-1 β Produktion erfolgt AIM2 vermittelt und ist NLRP3 unabhängig

Im vorhergehenden Abschnitt 3.3 konnte gezeigt werden, dass die aufgereinigte mtDNA aus dem Zytosol von NHEK, die zuvor mit Melittin behandelt wurden, zu einer IL-1 β Produktion führt und damit in der Lage sein muss, einen Inflammasomkomplex zu aktivieren. Es gibt mehrere Inflammasome, die letztlich zu einer IL-1 β Produktion führen (vgl. 1.4). Für die vorliegende Arbeit waren vor allem das AIM2-Inflammasom und das NLRP3-Inflammasom von Interesse. Welches der in Frage kommenden Inflammasome für die unter 3.3 beobachtete IL-1 β Freisetzung verantwortlich ist, sollte in diesem Versuchsansatz geklärt werden. Hierfür wurden die NHEK vor der Transfektion der entsprechenden Ansätze (vgl. auch 3.3) mit verschiedenen siRNAs behandelt. Als Negativkontrolle wurden die NHEK mit einer nicht zielgerichteten siRNA (Control-siRNA) transfiziert, die keine Wirkung auf die NHEK hat. Des Weiteren wurde ein Ansatz mit Caspase-1-siRNA gewählt, da Caspase 1 ein wichtiger Bestandteil des AIM2-Inflammasomkomplexes ist. Nach der Inkubationszeit der siRNAs von 48 h wurden die NHEK erneut mit mtDNA, die aus dem Zytosol von Melittin behandelten NHEK isoliert wurde und den entsprechenden Kontrollen transfiziert (vgl. auch 3.3). Nach weiteren 24 h konnte der IL-1 β ELISA zur Versuchsauswertung durchgeführt werden.

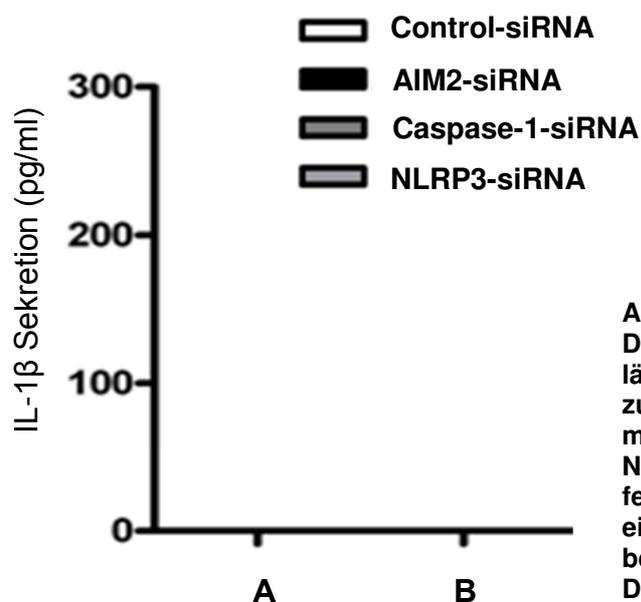


Abb. 23

Die in 3.3 gemessene IL-1 β Produktion verläuft über ein Inflammasom. Um bestimmen zu können, welches Inflammasom durch die mitochondriale DNA aktiviert wird, wurden die NHEK mit den entsprechenden small interfering RNA (siRNA) vorbehandelt und nach einer Inkubationszeit von 48 h unter Standardbedingungen erneut mit der aufgereinigten DNA aus dem Zytosol unbehandelter und mit Melittin behandelten NHEK transfiziert. Die IL-1 β Produktion wurde erneut durch einen ELISA gemessen.

(A) Negativkontrolle.

(B) Transfektion von siRNA + aufgereinigte mtDNA aus nicht-Melittin behandelten NHEK.

Bei (A) wurden die NHEK nach der Behandlung mit den entsprechenden siRNAs mit keinem anderen Ansatz mehr transfiziert. Es zeigte sich keine IL-1 β Induktion. Ebenfalls keine IL-1 β Induktion lieferte Ansatz (B). Hierbei wurden die NHEK zusätzlich zu den siRNAs noch mit der aufgereinigten mtDNA aus nicht – Melittin behandelten NHEK transfiziert. Da aufgrund der nicht erfolgten Behandlung mit Melittin von einer Intaktheit der Mitochondrien ausgegangen wurde, war dieses Ergebnis zu erwarten.

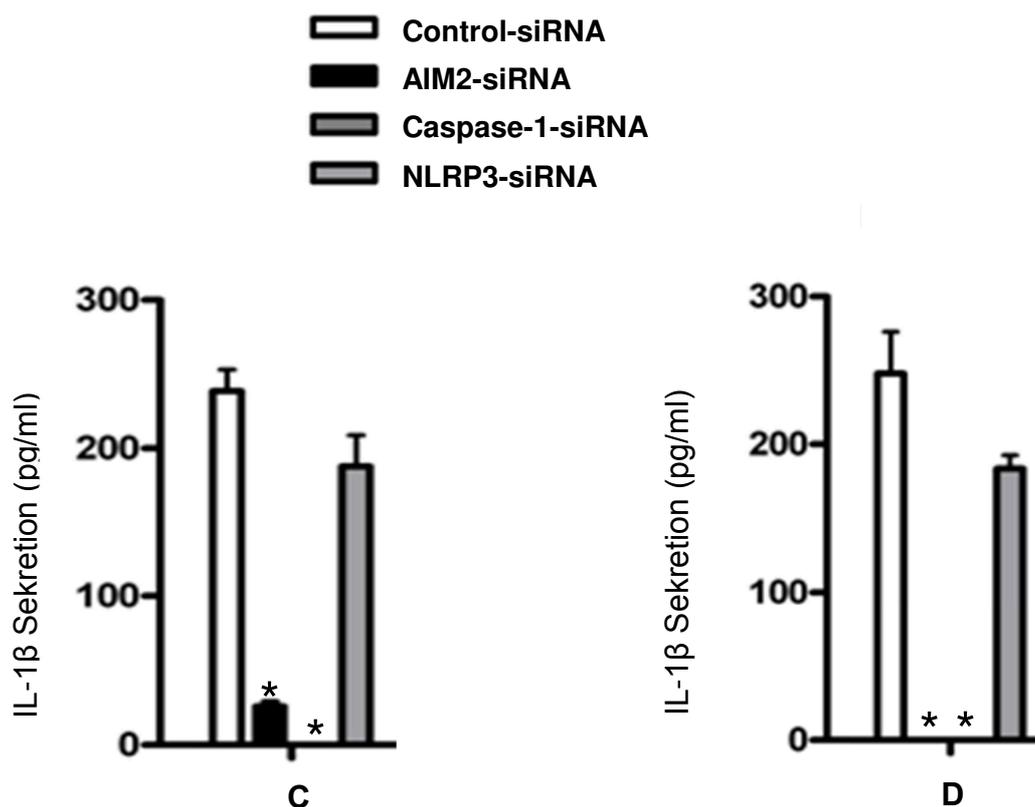


Abb. 24

Die in 3.3 gemessene IL-1 β Produktion verläuft über ein Inflammasom. Um bestimmen zu können, welches Inflammasom durch die mitochondriale DNA aktiviert wird, wurden die NHEK mit den entsprechenden small interfering RNA (siRNA) vorbehandelt und nach einer Inkubationszeit von 48 h unter Standardbedingungen erneut mit der aufgereinigten DNA aus dem Zytosol unbehandelter und mit Melittin behandelter NHEK transfiziert. Die IL-1 β Produktion wurde erneut durch einen ELISA gemessen.

(C) Transfektion von siRNA + aufgereinigter mtDNA aus Melittin behandelten NHEK

(D) Positivkontrolle.

(C) stellt die Ergebnisse des Transfektionsansatzes mit mtDNA aus Melittin behandelten NHEK dar. Es zeigt sich eine IL-1 β Freisetzung bei den NHEK, die mit der Kontroll-siRNA (Control-siRNA) behandelt wurden. Dieses Ergebnis war zu erwarten. Eine Herunterregulation von AIM2 und Caspase 1 Expression dagegen führt gleich-

falls zu einer signifikanten Abnahme der IL-1 β Produktion, wohingegen ein Abschalten des NLRP3-Gens keine signifikante Minderung der IL-1 β Induktion bewirkt. Das gleiche Bild zeigt sich in der Positivkontrolle (D) isolierter mtDNA aus intakten Mitochondrien von unbehandelten NHEK.

Die Ergebnisse lassen somit den Schluss zu, dass die unter 3.3 beobachtete IL-1 β Produktion auf das AIM2-Inflammasom zurückzuführen ist und unabhängig vom NLRP3-Inflammasom abläuft. Damit ist die endogene mtDNA im Zytosol ausreichend, um das Inflammasom zu aktivieren.

3.5 Nachweis der Inflammasomaktivierung in ASC-CFP-exprimierenden Makrophagen mittels Fluoreszenzmikroskopie

Der nachfolgende Versuch dient dazu, die Inflammasomaktivierung mittels Fluoreszenzmikroskopie nachzuweisen. Für diesen Versuch wurden Makrophagen eingesetzt, deren ASC-Protein mit CFP (*cyan fluorescent protein*) gekoppelt war (vgl. 2.2). Die verschiedenen Ansätze wurden wie unter 2.9 beschrieben, hergestellt und mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskops (TissueFAXS) ausgewertet.

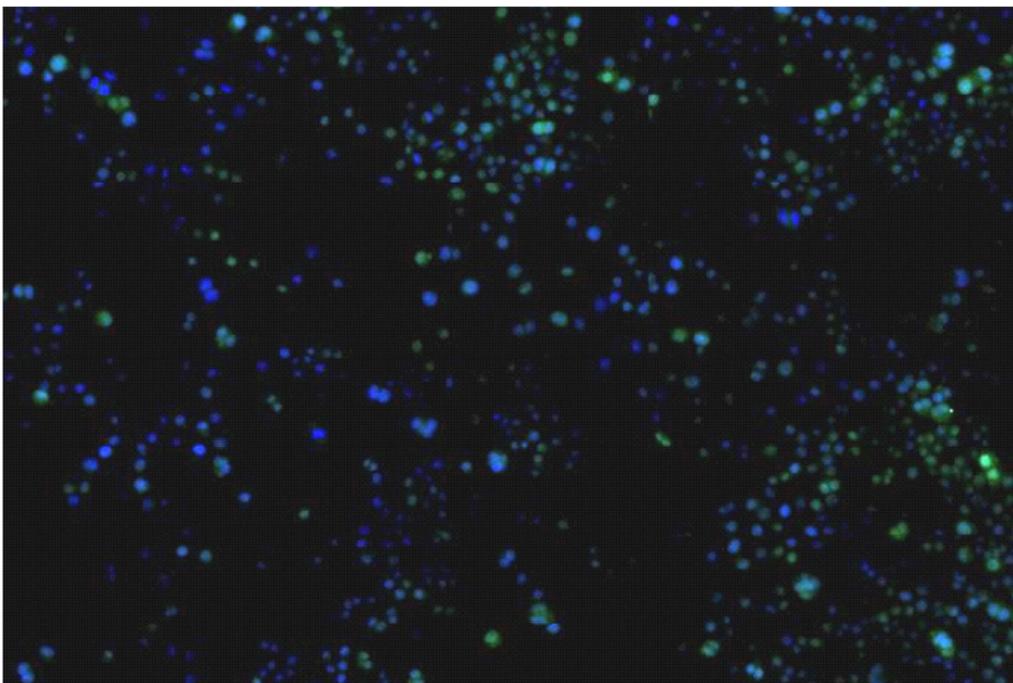


Abb. 25 **Negativkontrolle. Die Makrophagen wurden lediglich mit dem Transfektionsreagenz RNAimax behandelt.**

Abbildung 25 stellt die Negativkontrolle des Versuches dar. Die ASC-CFP-Makrophagen wurden hierbei ausschließlich mit dem Transfektionsreagenz RNAimax behandelt. Es stellen sich somit vor allem die mit Dapi blau gefärbten Zellkerne dar.

3.5.1 Transfektion der ASC-CFP-Makrophagen mit poly(dA:dT)

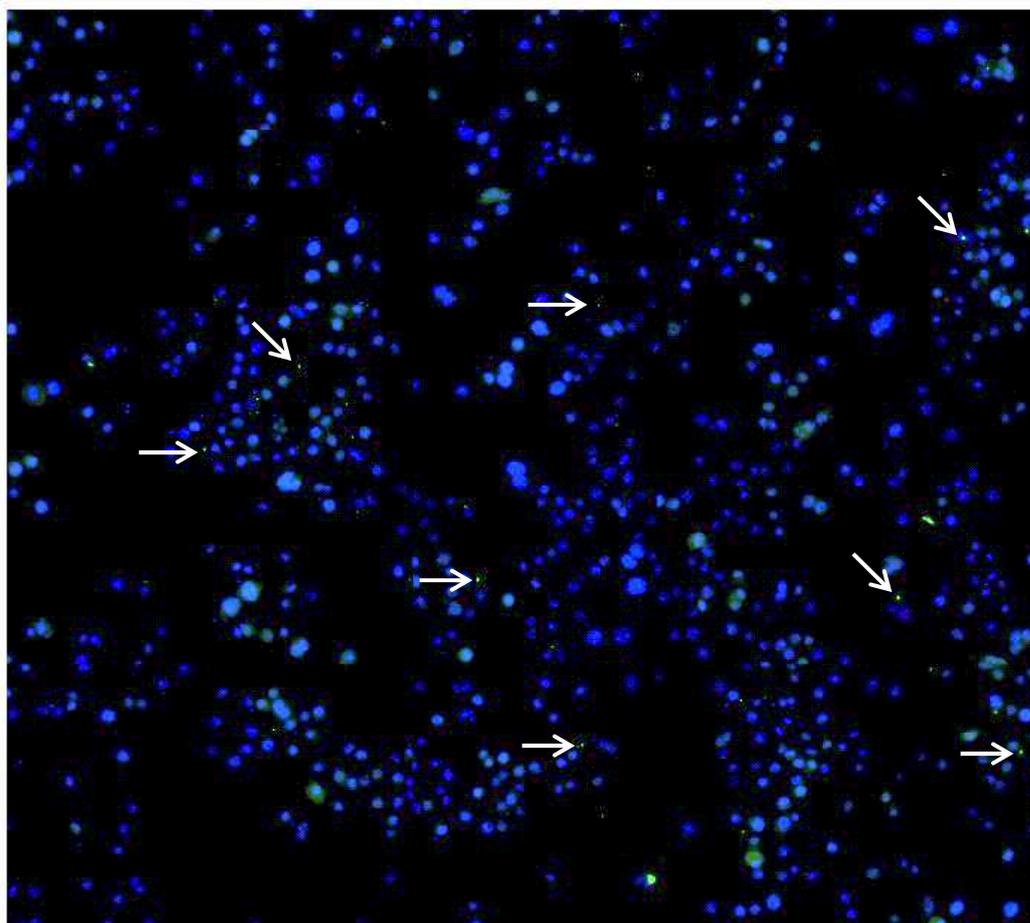


Abb. 26 Die ASC-CFP-Makrophagen wurden in diesem Ansatz mit p(dA:dT) in der Konzentration 1 $\mu\text{g/ml}$ transfiziert und nach 3 sich anschließenden Waschschritten in ProLong Anti-Fade Reagenz (Molecular Probes) gelegt, das 4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI) enthielt. Anschließend wurden die Zellen mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskops TissueFAXS System microscope (TissueGnostics) betrachtet und fotografiert.

Die Transfektion der ASC-CFP-Makrophagen mit der artifiziiellen p(dA:dT) führte, wie Abbildung 26 entnommen werden kann, erwartungsgemäß zu einer Inflammasomaktivierung.

Das ASC-Protein dieser Makrophagenpopulation wurde technisch so verändert (Kim et al., 2010), dass es sich im Falle einer Komplexbildung aus mehreren ASC-

Proteinen, also einer Inflammasomaktivierung, im CFP-Kanal des Fluoreszenzmikroskops grün darstellt. Somit sind Inflammasomaktivierungen in diesem Versuch als leuchtend grüne „Punkte“, hier zusätzlich mit Pfeilen markiert, sichtbar.

3.5.2 Transfektion der ASC-CFP-Makrophagen mit mtDNA

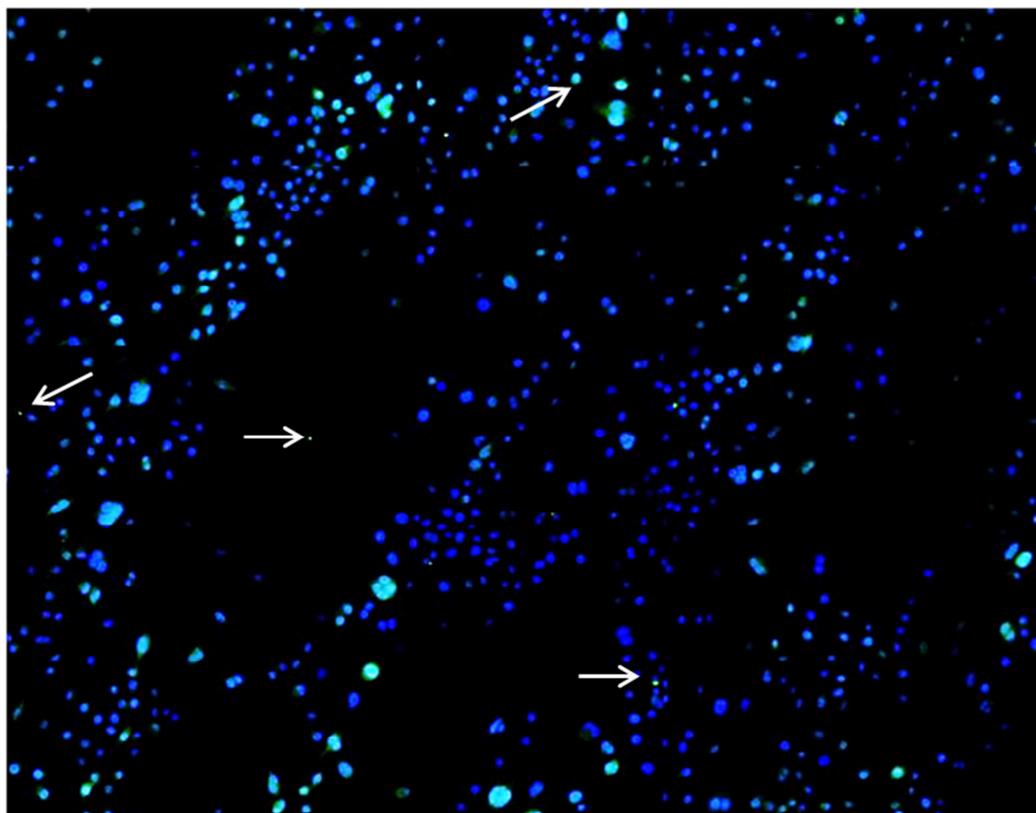


Abb. 27 Die ASC-CFP-Makrophagen wurden in diesem Ansatz mit mtDNA (0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) transfiziert und nach 3 sich anschließenden Waschschrinen in ProLong Anti-Fade Reagenz (Molecular Probes) gelegt, das 4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI) enthielt. Anschließend wurden die Zellen mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskops TissueFAXS System microscope (TissueGnostics) betrachtet und fotografiert.

Abbildung 27 zeigt, dass auch eine Transfektion der Makrophagen mit mtDNA in einer Konzentration von 0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ zu einer Inflammasomaktivierung führt. Die Pfeile zeigen die Inflammasomkomplexe auf.

3.5.3 Transfektion der ASC-CFP-Makrophagen mit der aufgereinigten DNA aus zuvor nicht-Melittin behandelten Zellen

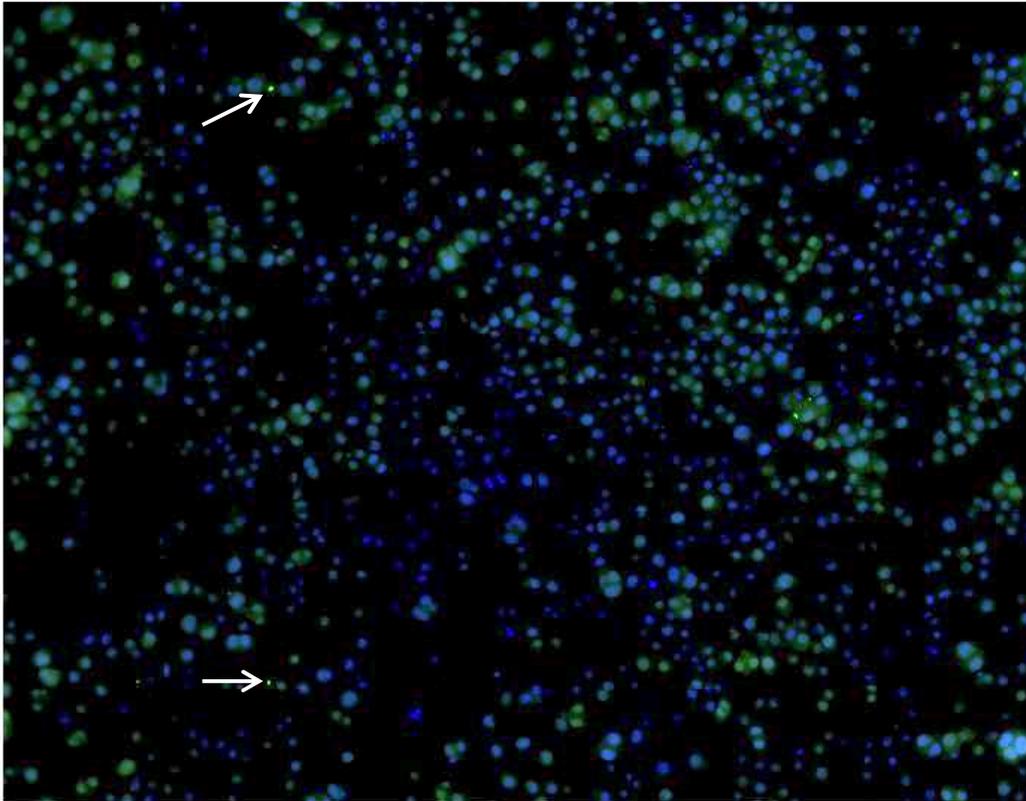


Abb. 28 Die ASC-CFP-Makrophagen wurden in diesem Ansatz mit der aufgereinigten DNA, die zuvor aus nicht-Melittin behandelten NHEK isoliert wurde, transfiziert und nach 3 sich anschließenden Waschschritten in ProLong Anti-Fade Reagenz (Molecular Probes) gelegt, das 4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI) enthielt. Anschließend wurden die Zellen mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskops Tissue FAXS System microscope (TissueGnostics) betrachtet und fotografiert.

In Abbildung 28 zeigt sich das Fluoreszenzresultat aus der Transfektion der Makrophagen mit der aufgereinigten DNA aus dem Zytosol von NHEK, die zuvor nicht mit Melittin behandelt wurden. Da es sich um unbehandelte Zellen handelt, ist davon auszugehen, dass keine DNA in dem Zytosol vorhanden ist. Dennoch sind auch hier vereinzelt aktivierte Inflammasomkomplexe zu erkennen. Dieses Ergebnis harmoniert mit dem Ergebnis des Versuchs, der unter 3.3. beschrieben wurde. Auch im ELISA zeigte sich, dass die Transfektion der Zellen mit der aufgereinigten DNA aus dem isolierten Zytosol aus nicht-Melittin behandelten Zellen eine geringe IL-1 β Freisetzung bewirkt. Die freigesetzte Menge an IL-1 β ist jedoch im Vergleich mit der Menge, die bei der DNA-Transfektion der mit Melittin behandelten Zellen entsteht, nur als unwesentlich anzusehen. Dieser Eindruck bestätigt sich, wenn man gleichermaßen

das Gegenstück dieses Versuchsteils im Makrophagenversuch (Abb. 28) betrachtet. Da es sehr wahrscheinlich ist, dass es in den unbehandelten Zellen zu keiner Freisetzung von DNA ins Zytosol kommt, kann eine mögliche Erklärung für die geringe Inflammasomaktivierung die Menge an eingesetzten Transfektionsreagenzien sein, die eventuell schon alleine leicht toxisch auf die Zelle wirken könnte.

3.5.4 Transfektion der ASC-CFP-Makrophagen mit der aufgereinigten DNA aus zuvor mit Melittin behandelten Zellen

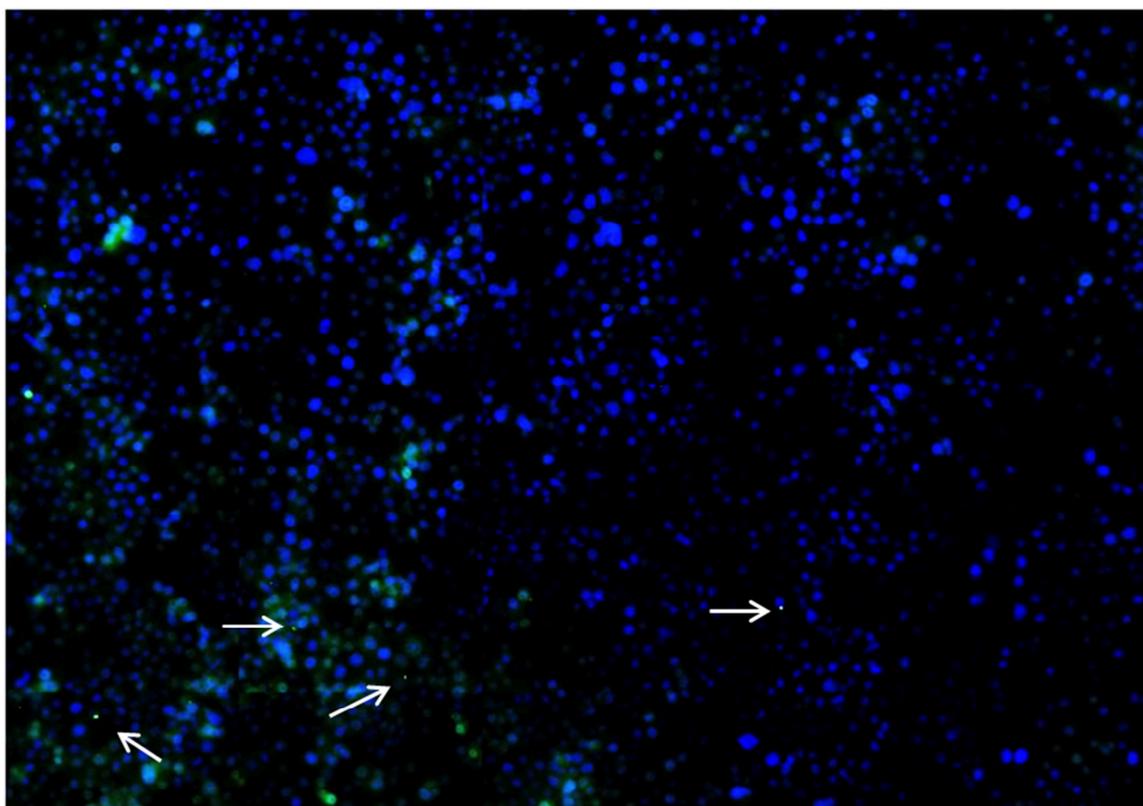


Abb. 29 Die ASC-CFP-Makrophagen wurden in diesem Ansatz mit der aufgereinigten DNA, die zuvor aus mit Melittin behandelten NHEK isoliert wurde, transfiziert und nach 3 sich anschließenden Waschschrritten in ProLong Anti-Fade Reagenz (Molecular Probes) gelegt, das 4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI) enthielt. Anschließend wurden die Zellen mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskops TissueFAXS System microscope (TissueGnostics) betrachtet und fotografiert.

Auch in diesem Versuchsansatz ist eine Inflammasomaktivierung zu erkennen. Im Vergleich mit dem vorhergehend beschriebenen Versuchsteil (Abb. 28) ist bei der Transfektion der ASC-CFP-Makrophagen mit der aufgereinigten DNA aus dem Zytosol von zuvor mit Melittin behandelten NHEK eine höhere Anzahl an Inflammasomkomplexen zu erkennen.

3.5.5 Transfektion der ASC-CFP-Makrophagen mit genomischer DNA

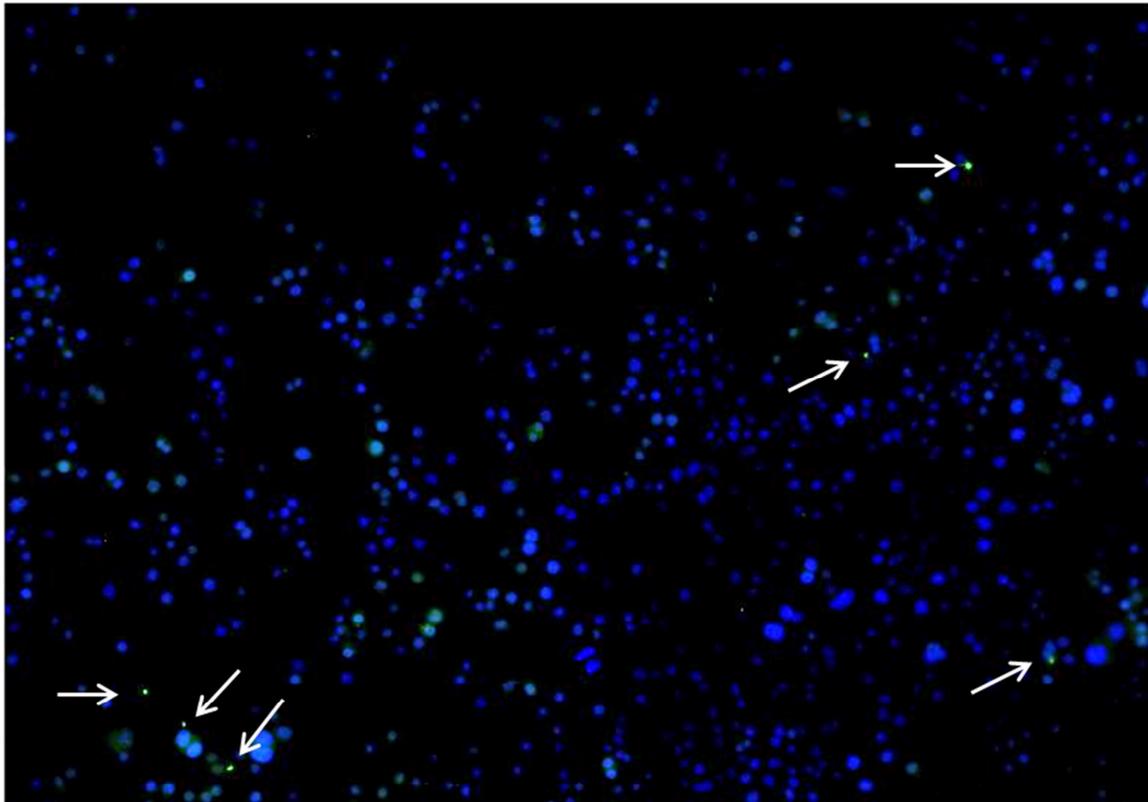


Abb. 30 Die ASC-CFP-Makrophagen wurden in diesem Ansatz mit genomischer DNA (0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) transfiziert und nach 3 sich anschließenden Waschschritten in ProLong Anti-Fade Reagenz (Molecular Probes) gelegt, das 4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI) enthielt. Anschließend wurden die Zellen mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskops TissueFAXS System microscope (TissueGnostics) betrachtet und fotografiert.

In diesem Versuchsansatz (Abb. 30) wurden die ASC-CFP-Makrophagen mit genomischer DNA, welche zuvor mit Hilfe des Quick-gDNATM MiniPrep Kit (Zymo Research) entsprechend der Herstelleranleitung aus humanen epidermalen Keratinozyten isoliert wurde, in einer Konzentration von 0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ transfiziert. Die gewohnten drei Waschschriffe schlossen sich an, bevor die Probe in ProLong Anti-Fade Reagenz mit 4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI) gelegt wurde. Bei der abschließenden Betrachtung unter dem TissueFAXS System microscope (TissueGnostics) wurde eine deutliche Inflammasomkomplexbildung sichtbar.

Diese deutliche Aktivierung war so zu erwarten, da das Inflammasom ein Sensor für doppelsträngige DNA ist und somit von genomischer DNA aktiviert werden kann.

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass Melittin höchstwahrscheinlich aufgrund seiner lytischen, porenbildenden Eigenschaft die Balance einer Zelle stört und darüber hinaus zu einer Schädigung der Mitochondrien und damit zu der Freisetzung von mitochondrialer DNA (mtDNA) ins Zytosol der Zelle führt. Dort kann die doppelsträngige mtDNA vom AIM2-Inflammasom als Gefahr detektiert werden, welches daraufhin aktiv IL-1 β produziert. Als für die Reaktion verantwortliches Inflammasom wurde eindeutig das AIM2-Inflammasom erkannt, NLRP3 spielt bei der Aktivierung durch mtDNA keine Rolle.

4 Diskussion

In unserer Haut bildet die Keratinozytenschicht die erste Barriere, die ein Pathogen überwinden muss, um in unseren Organismus eindringen zu können. Die Hauptfunktion von Keratinozyten ist es dieses Eindringen zu verhindern und ggf. das Immunsystem zu alarmieren. Um diese Aufgabe möglichst effektiv erfüllen zu können, verfügen sie über verschiedene Möglichkeiten und Mechanismen zur Erkennung dieser pathogenen Erreger. In Keratinozyten besonders gut charakterisiert und in der Einleitung dieser Arbeit bereits ausführlich besprochen sind die Inflammasome, insbesondere das AIM2- und das NLRP3-Inflammasom (Dombrowski et al., 2012).

NLRP3 wird durch verschiedenste Pathogene aktiviert, wie z.B. das Milbenallergen (Dai et al., 2011), aber auch Viren und Bakterien (Stutz et al., 2009). Das AIM2-Inflammasom dagegen wird über doppelsträngige DNA, die sowohl exogener (z.B. vom Pathogen selbst) oder endogener (körpereigen, aus dem Zytosol) Herkunft sein kann, aktiviert (Dombrowski et al., 2011, Jones et al., 2010).

Im Rahmen dieser Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass der Bienengiftbestandteil Melittin über die Freisetzung von mtDNA ebenfalls eine Formation des AIM2-Inflammasoms in Keratinozyten bewirkt und somit letztlich zu einer IL-1 β Produktion und einer Entzündungsreaktion führt. Die toxische Wirkung von Melittin führt über eine Schädigung der Zellmembran zu deren Instabilität und zu einer Porenbildung in der Membran mit einer Größe von bis zu 20 Å. Diese Porengröße ist ausreichend groß, so dass DNA aus Mitochondrien und auch aus dem Zellkern passiv ins Zytosol diffundieren kann (Matsuzaki et al., 1997, Raghuraman et al., 2007).

Tatsächlich konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass Melittin eine Schädigung von Mitochondrien und auch eine Freisetzung mitochondrialer DNA (mtDNA) ins Zytosol der Zelle bewirkt. Diese mtDNA wiederum ist in der Lage, das AIM2-Inflammasom zu aktivieren und eine IL-1 β Produktion hervorzurufen. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass die freigesetzte Menge an IL-1 β abhängig ist von der Konzentration der eingesetzten mtDNA. Je höher die Konzentration der mtDNA, desto höher ist auch die resultierende Menge an IL-1 β .

IL-1 β ist ein Zytokin der angeborenen Immunabwehr, das über mehrere Wege sezerniert werden kann. Ein möglicher Weg führt über die Inflammasome. Sowohl NLRP3, als auch AIM2 und Caspase 1 als ein Teil des AIM2-Inflammasoms, führen letztlich zu einer Ausschüttung von IL-1 β (Stutz et al., 2009). AIM2 ist ein Sensor für doppelsträngige DNA im Zytosol (Alnemri, 2010, Fernandes-Alnemri et al., 2009, Stutz et al., 2009). Unsere Ergebnisse zeigen darüber hinaus, dass nicht nur genomische DNA, sondern auch doppelsträngige mitochondriale DNA das AIM2-Inflammasom aktivieren kann. Vom NLRP3-Inflammasom ist die Sekretion dagegen unabhängig. Im Vergleich zum AIM2-Inflammasom führt die Herunterregulation des NLRP3-Inflammasoms mit der entsprechenden siRNA nur zu einem geringen Abfall der freigesetzten IL-1 β Menge um etwa 10%, wohingegen die Ausschaltung des AIM2-Inflammasoms zu einem Rückgang der IL-1 β Konzentration um etwa 60% führt. Obwohl die Ausschaltung von NLRP3 nur einen Rückgang von etwa 10% in der IL-1 β Sekretion zeigte und somit AIM2 deutlich als verantwortliches Inflammasom identifiziert werden konnte, ist im Rahmen dieser Arbeit dennoch die Rolle von NLRP3 zu diskutieren.

NLRP3 gehört zur Gruppe der NOD-like Rezeptoren (NLRs) und somit zur Familie der *pattern recognition receptors*, den PRRs, die körperfremde Stoffe oder geschädigtes Gewebe aufspüren und Mechanismen zu deren Reparatur auslösen (Tschopp, 2011). Neben den *pathogen-associated molecular patterns* (PAMPs), können auch endogene Signale oder *damage-associated molecular patterns* (DAMPs) wie ATP das NLRP3-Inflammasom aktivieren. Nach neuesten Erkenntnissen scheint es aber unwahrscheinlich zu sein, dass NLRP3 durch direkte Bindung an die eingedrungenen Erreger aktiviert wird, wie es z.B. bei den *Toll-like-Rezeptoren* (TLRs) der Fall ist. Dafür ist das Spektrum der möglichen Aktivatoren und auch ihre Struktur zu vielseitig. Viel wahrscheinlicher und letztlich auch bestätigt ist es, dass die eingedrungenen Erreger eine bestimmte Organelle der Zelle beeinflussen und die Reaktion dieser Organelle darauf NLRP3 aktiviert. Der gemeinsame Endpunkt aller möglichen Aktivatoren von NLRP3 endet in der Bildung von *reactive oxygen species* (ROS). ROS ist in der Lage das NLRP3-Inflammasom zu aktivieren und eine IL-1 β Sekretion zu bewirken. Die Hauptquelle von ROS in der Zelle stellen die Mitochondrien dar. Unterschiedlichste Stressoren, darunter auch eine Störung der Membranintegrität oder Hypoxie, führen zu einer mitochondrialen ROS-Produktion.

Normalerweise werden nicht mehr intakte Mitochondrien durch Autophagozytose beseitigt, sodass keine ROS-Produktion mehr stattfindet. Es konnte in Versuchen von Zhou et al. gezeigt werden, dass eine Unterbindung der Autophagozytose zu einer Ansammlung kaputter Mitochondrien und demzufolge einem Ansteigen der gemessenen mitochondrialen ROS-Produktion und einem parallelen Ansteigen der Inflammasom-produzierten IL-1 β Menge führt (Tschopp, 2011, Zhou et al., 2011). Dieser Aktivierungsweg scheint bei der Stimulation der Zelle mit Melittin keine Rolle zu spielen. Eine Blockierung des NLRP3-Inflammasoms in unseren Versuchen zeigte nur ein geringes Abfallen der IL-1 β Produktion. Demzufolge scheint Melittin die Mitochondrien nicht zur ROS-Produktion anzuregen, so dass davon ausgegangen werden kann, dass allein die doppelsträngige mtDNA die tragende und wohl auch alleinige Rolle für die Inflammasomaktivierung spielt.

Doch nicht nur IL-1 β , sondern auch IL-18 wird Caspase-vermittelt nach der Inflammasomaktivierung freigesetzt. Beide Zytokine spielen eine wichtige Rolle in der TH2-Aktivierung. IL-18 vermittelt zudem neben der Aktivierung von IL-13 und IL-4, auch die IgE-Produktion (Enoksson et al., 2011, Nakanishi et al., 2001). IL-1 β dagegen spielt durch die Aktivierung von Antigen-präsentierenden Zellen (APCs) eine bedeutende Rolle bei der allergischen Sensibilisierung und vermittelt gemeinsam mit TNF- α und IL-18 die Einwanderung von Langerhans' Zellen von der Epidermis in die zugehörigen Lymphknoten bei Kontakt mit einem Allergen (Cumberbatch et al., 1997, Antonopoulos et al., 2008).

Die toxische Wirkung von Melittin auf die Keratinozyten besteht aus einer Schädigung der Zellmembran mit folglich Instabilität und Porenbildung, durch die sowohl mitochondriale DNA (mtDNA) als auch genomische DNA (gDNA) ins Zytosol diffundieren können (Matsuzaki et al., 1997, Raghuraman et al., 2007). Mit Hilfe des Mitotracker Farbstoffs wurden (Nachweis der Mitochondrienzerstörung mittels FACS) Mitochondrien angefärbt, nachdem Keratinozyten mit dem Bienengiftbestandteil Melittin behandelt wurden. In diesem Versuch machte man sich zu Nutzen, dass der Farbstoff spezifisch intakte Mitochondrien anfärbt, indem er entlang deren Membranpotenzial passiv in die Mitochondrien diffundiert. Mitochondrien, die durch Melittin in ihrer Membranstabilität gestört sind, werden somit nicht durch den Farbstoff angefärbt. In der FACS-Auswertung zeigt sich dies in der Proportionalität zwischen der

Menge an Farbstoff, die in die Mitochondrien diffundieren konnte, und dem ermittelten Fluoreszenzsignal. Je weniger stabil das Mitochondrienmembranpotential war, desto geringer war auch das Fluoreszenzsignal in der FACS-Auswertung. D.h. je geringer das Signal in der FACS-Messung war, desto „durchlässiger“ waren auch die Mitochondrien. Dabei wurde nicht nur eine deutliche Verringerung der Anzahl intakter Mitochondrien, sondern auch die Korrelation mit der Höhe der Melittinkonzentration sichtbar: Je höher die Konzentration des Gifts war, desto geringer war das ermittelte Fluoreszenzsignal.

Mit ansteigenden Konzentrationen der mtDNA nahm auch die sezernierte Menge an IL-1 β zu. Geht man davon aus, dass IL-1 β das Produkt aus der Aktivierung von AIM2 durch mtDNA ist, liegt die Vermutung nahe, dass die Menge an mtDNA mit der Anzahl an zerstörten Mitochondrien zunimmt und dementsprechend zu einer höheren Freisetzung von IL-1 β führt. Es konnte bereits mehrfach nachgewiesen werden, dass Melittin durch die Herunterregulation von anti-apoptotischen Elementen, wie dem Bcl-2 Gen, die Zellapoptose induziert (Moon et al., 2008). Im Rahmen dieser Arbeit konnte nun gezeigt werden, dass Melittin nicht nur zu einer Zellapoptose führt, sondern auch direkt toxisch auf die Mitochondrien wirkt, indem es vermutlich die Membrintegrität der Mitochondrien zerstört und im Zuge dessen die Freisetzung von deren DNA ins Zytosol bewirkt. Diese konnte mittels PCR amplifiziert werden, mit Hilfe der Gelelektrophorese über das mitochondrienspezifische COX3 Gen sicher als mtDNA identifiziert werden und so direkt im Zytosol sichtbar gemacht werden.

Die Freisetzung der mtDNA ins Zytosol als Voraussetzung für eine AIM2-Inflammasomaktivierung wurde somit nachgewiesen. Ungeklärt bleibt dabei jedoch die Frage, ob die Zellen in Folge der Melittinbehandlung und der daraus resultierenden DNA-Freisetzung sterben. Die IL-1 β Sekretion könnte in diesem Zusammenhang dann als „letzter Alarmruf“ verstanden werden. Eine weitere Möglichkeit wäre allerdings auch noch, dass sich die Zellen nach der Stimulation wieder erholen. Was allerdings wirklich nach der IL-1 β Sekretion mit den Zellen geschieht, bleibt Inhalt weiterer Forschung.

Dass mtDNA in der Lage ist, eine Inflammasomaktivierung zu bewirken, konnte gezeigt werden, gleichfalls dass Melittin zu einer mtDNA-Freisetzung führt. Ob die

Menge an frei werdender mtDNA aus den Mitochondrien der NHEK nach Stimulation mit Melittin jedoch tatsächlich ausreichend hoch ist, um das AIM2-Inflammasom endogen zu aktivieren, war zunächst unklar.

Deshalb wurden NHEK zunächst mit Melittin behandelt und im Anschluss die DNA aus dem Zytosol der Zellen gewonnen. Diese aufgereinigte DNA wurde daraufhin in eine neue Population NHEK transfiziert und mittels ELISA die IL-1 β Freisetzung gemessen. Auch hier zeigte sich eine deutliche IL-1 β Sekretion, so dass davon ausgegangen werden kann, dass die Menge an freigesetzter DNA (bestehend aus mtDNA, aber wohl auch genomischer DNA), die bei der Stimulation der Keratinozyten mit Melittin ins Zytosol gelangt, ausreichend ist, um von AIM2 erkannt zu werden, eine Inflammasomaktivierung auszulösen und somit eine Entzündungsreaktion durch IL-1 β zu initiieren.

Hornung et al. beschrieben bereits 2009, dass das AIM2-Inflammasom mittels seiner HIN200-Domäne DNA bindet (Hornung et al., 2009). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass AIM2 in Keratinozyten nicht nur durch virale, mikrobielle oder synthetische DNA aktiviert werden kann, sondern dass auch endogene mtDNA dazu in der Lage ist, vorausgesetzt sie gelangt in ausreichender Menge ins Zytosol.

Die bislang beschriebenen Versuche haben vor allem mittels PCR und ELISA gezeigt, dass durch eine Stimulation von NHEK mit Melittin eine Freisetzung von mitochondrialer DNA (mtDNA) ins Zytosol der Zellen erfolgt, die wiederum über die Aktivierung des AIM2-Inflammasoms zu einer IL-1 β Freisetzung führt. In weiteren Versuchen konnte der Zusammenhang zwischen Melittin, mtDNA und Inflammasomaktivierung auch mittels ASC-CFP-Makrophagen in der Fluoreszenzmikroskopie bildlich gemacht werden. Kritisch in diesen Versuchsteilen zu betrachten ist, dass sich eine geringere Inflammasomaktivierung auch bei den Makrophagen, die mit DNA aus nicht-Melittin behandelten NHEKs transfiziert wurden, gezeigt hat. Die Mitochondrien in unbehandelten NHEKs sollten intakt sein. Demzufolge sollte auch keine mtDNA aus dem Zytosol zu isolieren sein, welche man anschließend in die ASC-CFP-Makrophagen transfizieren kann. Dennoch zeigte sich eine dezente Inflammasomaktivierung in diesem Versuchsabschnitt. Eine mögliche Erklärung wäre eventuell das

Transfektionsreagenz, welches selbst eine Inflammasomaktivierung bewirken könnte. Festzuhalten bleibt jedoch, dass die Aktivierung der Inflammasome in den Makrophagen, die mit der DNA aus unbehandelten Zellen transfiziert wurden, deutlich geringer war als die Inflammasomaktivierung in den Makrophagen, die mit der aufgereinigten DNA aus dem Zytosol von mit Melittin behandelten Zellen transfiziert wurden.

Darüber hinaus erfolgten alle vorhergehenden Versuche mit NHEK, der Fluoreszenzmikroskopieversuch jedoch mit Makrophagen. Der Grund für die Durchführung der Versuche mit Makrophagen und nicht mit NHEK war, dass NHEKs nur sehr instabil und transient mit dem Plasmid (das ASC-CFP kodiert) zu transfizieren waren und es nicht möglich war, in diesen Zellen das Plasmid erfolgreich zu exprimieren.

Bleibt zu diskutieren, wie die gewonnenen Ergebnisse zukünftig genutzt und angewandt werden können: Bienengift mit seinem Hauptbestandteil Melittin spielt in der heutigen Medizin eine große Rolle. Viele Menschen leiden unter einer allergischen Unverträglichkeit gegenüber dem Gift der Honigbiene, die bei besonders ausgeprägten Krankheitsbildern bis hin zum anaphylaktischen Schock reichen kann (Coors et al., 2010). Die Möglichkeit dieses lebensbedrohlichen Krankheitsbildes macht bereits die Wichtigkeit deutlich, den Signalweg in der Haut nach einer Stimulation mit Bienengift, bzw. Melittin, zu erforschen und zu verstehen, um so letztlich die bestehenden therapeutischen Ansatzpunkte zu optimieren. Der derzeitige Goldstandard in der Therapie der Typ-I-Allergie, zu der auch die Insektengiftallergie zählt, besteht in der Allergenkarrenz. Bei besonders schweren Unverträglichkeiten und vor allem im Rahmen der Insektengiftallergie mit der Möglichkeit des anaphylaktischen Schocks kommt neben einem Antihistaminikum und Adrenalin auch ein Kortikosteroid zum Einsatz (Coors et al., 2010).

Ein noch besserer Therapieansatz wäre jedoch nicht die Bekämpfung des bereits bestehenden Problems, nämlich den Folgen der Bienengiftunverträglichkeit, sondern die Unterbindung der Sensibilisierung des Patienten gegen das Gift der Honigbiene mit all seinen Bestandteilen. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, was genau sich im Zytosol einer Zelle abspielt, nachdem es zu einem Kontakt mit Bienengift gekommen ist. Durch die Inflammasomaktivierung entsteht ein Zytokinmikromilieu, welches ein perfektes Umfeld für eine allergische Sensibilisierung darstellt. Die Frei-

setzung von IL-1 β und IL-18 bewirkt eine Aktivierung von TH2-Zellen. TH2-Zellen produzieren dann wiederum Zytokine und Botenstoffe, welche die B-Lymphozyten zur Ausschüttung von IgE stimulieren. Dieser Reaktionsweg spielt eine bedeutende Rolle im Rahmen von Autoimmunerkrankungen, aber auch bei der Sensibilisierung von prädisponierten Personen auf bestimmte Allergene. Demzufolge sind Inflammasomaktivierung, TH2-Anlockung und allergische Sensibilisierung miteinander verbunden. Könnte man die Freisetzung von IL-1 β verhindern, wäre auch der Weg zur allergischen Sensibilisierung unterbunden. Dies ist allerdings nur hypothetisch möglich, dennoch ist es von großer Bedeutung die Entzündungsmechanismen in der Haut nach einem Bienenstich besser zu verstehen. Durch die im Rahmen dieser Arbeit gemachte Entdeckung, dass mtDNA dabei eine Inflammasomaktivierung bewirkt und für das oben beschriebene Zytokinmikromilieu sorgt, konnte deutlich zu einem besseren Verständnis der Entzündungsmechanismen beigetragen werden (Dombrowski et al., 2012).

Eine hypothetische Überlegung bezüglich der Anwendbarkeit der beschriebenen Ergebnisse wäre beispielsweise eine Stabilisierung der Mitochondrienmembran gegenüber dem Bienengift zu bewirken. Auslösender Faktor für die AIM2-Aktivierung ist die frei werdende mtDNA aus den durch das Melittin zerstörten Mitochondrien. Könnte es gelingen, die Mitochondrienmembran gegen den Bienengiftbestandteil Melittin zu stabilisieren, würde ein Übertreten der mtDNA ins Zytosol verhindert werden und somit AIM2 nicht aktiviert werden können. Folglich bliebe auch eine IL-1 β Sekretion aus. Diese Möglichkeit macht man sich auf der Ebene der normalen Zellmembran mit dem Einsatz der Kortikoide bereits zu Nutze: Diese führen über eine Einlagerung in die Lipiddoppelschicht der Zellmembran zu einer Änderung der Membraneigenschaft und stabilisieren u.a. über Erhöhung der osmotischen Resistenz die Membran (Herdegen, 2008). Ob Kortikoide auch einen Einfluss auf die Mitochondrienmembran haben, ist jedoch unklar.

Schlussendlich ist festzuhalten, dass das Verständnis der Inflammasomaktivierung und das daraus resultierende Zytokinmikromilieu aus IL-1 β und IL-18 grundlegend dafür ist, der Sensibilisierung einzelner Patienten auf das Gift der Honigbiene entgegenwirken zu können.

5 Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Frage nach der AIM2-Inflammasomaktivierung in der Haut nach Stimulation mit dem Bienengifthauptbestandteil Melittin. Vorversuche zeigten bereits, dass doppelsträngige (ds), genomische DNA in der Lage dazu ist, eine Inflammasomaktivierung zu verursachen, die letztlich zu einer Freisetzung der Entzündungsmediatoren IL-1 β und IL-18 führt. Beide Zytokine spielen eine wichtige Rolle bei der allergischen Sensibilisierung. Die Überlegung hinter den Versuchen zu dieser Arbeit war, ob eine Inflammasomaktivierung auch durch die ebenfalls doppelsträngige, mitochondriale DNA (mtDNA) gelingt und ob die Stimulation der Zellen mit Melittin zu einer ausreichend hohen Menge an freigesetzter mtDNA führt, um eine solche Aktivierung überhaupt zu ermöglichen. Die Versuche erfolgten mit primären humanen epidermalen Keratinozyten (NHEK) und ASC-CFP-exprimierenden Makrophagen. Methodisch kamen der IL-1 β ELISA, PCR, FACS-Messungen und die Fluoreszenzmikroskopie zum Einsatz. Die Ergebnisse der Arbeit zeigten, dass nicht nur genomische, virale und mikrobielle DNA, sondern auch mtDNA in der Lage dazu ist, das AIM2-Inflammasom zu aktivieren, vorausgesetzt sie gelangt ins Zytosol. Diese Inflammasomaktivität führt wiederum zu einer Aktivierung der Caspase 1 und so über die Produktion von IL-1 β zu einer Entzündungsreaktion. Des Weiteren ließ sich mit Hilfe der FACS-Messung erkennen, dass Melittin direkt toxisch auf Mitochondrien wirkt und diese in ihrer Membranstabilität stört. Die Melittinwirkung auf die Mitochondrien bewirkt eine Freisetzung der mtDNA ins Zytosol, wo diese mittels PCR nachgewiesen werden konnte. Der sich anschließende IL-1 β ELISA bestätigte, dass diese frei werdende Menge an mtDNA ausreichend ist, um das AIM2-Inflammasom zu aktivieren. Schlussfolgernd kann festgehalten werden, dass der Bienengifthauptbestandteil Melittin toxisch auf Mitochondrien in humanen Keratinozyten wirkt und so zu einer Freisetzung von mtDNA ins Zytosol führt, wo die dsDNA anschließend von dem AIM2-Inflammasomkomplex detektiert und gebunden wird und so letztlich über eine Caspase 1 Aktivierung zu einer Freisetzung der Entzündungsmediatoren IL-1 β und IL-18 führt. Dieses Zytokinmikromilieu bildet die perfekte Umgebung, um über eine Aktivierung von TH2-Zellen eine allergische Sensibilisierung zu begünstigen. Die klinische Relevanz, den Signalweg in der Haut und das daraus resultierende Zytokinmilieu nach einem Bienenstich im Rahmen dieser Forschungsarbeit zu analysieren, wird deutlich, wenn man neben der Häufigkeit der Bie-

nengiftunverträglichkeit in der Bevölkerung, auch deren Gefährlichkeit mit der Möglichkeit eines lebensbedrohlichen anaphylaktischen Schocks betrachtet. Umso wichtiger ist es, die Bedeutung der Inflammasome in diesem Zusammenhang zu verstehen und so die Möglichkeit zu eröffnen, der Sensibilisierung einzelner Patienten auf das Gift der Biene zukünftig entgegen zu wirken.

6 Literaturverzeichnis

ALNEMRI, E.S. (2010): Sensing Cytoplasmic Danger Signals by the Inflammasome. *J Clin Immunol*, 30 (4): 512-519.

ANTONOPOULOS, C., CUMBERBATCH, M., MEE, J. B., DEARMAN, R. J., WEI, X. Q., LIEW, F. Y, et al. (2008): IL-18 is a key proximal mediator of contact hypersensitivity and allergen-induced Langerhans cell migration in murine epidermis. *J Leukoc Biol*, 83 (2): 361-7.

BAUER, C., WALZOG, B. (2005): Blut: Ein flüssiges Organsystem. In: Klinke, R., Pape, H.-C., Silbernagl, S. (Hrsg.): *Physiologie*, 5. Auflage, Thieme, Stuttgart, 233-237.

COORS, E., BAYERL, CH., WEBBECHER, R., VOIGTLÄNDER, V. (2010): Allergische Krankheiten. In: Moll, I. (Hrsg.): *Duale Reihe Dermatologie*, 7. Auflage, Thieme, Stuttgart, 139-157.

CUMBERBATCH, M., DEARMAN, R. J., KIMBER, I. (1997): Langerhans cells require signals from both tumour necrosis factor alpha and interleukin 1 beta for migration. *Adv Exp Med Biol*, 417:125-8.

DAI, X., SAYAMA, K., TOHYAMA, M., SHIRAKATA, Y., HANAKAWA, Y., TOKUMARU, S., YANG, L., HIRAKAWA, S., HASHIMOTO, K. (2011): Mite allergen is a danger signal for the skin via activation of inflammasome in keratinocytes. *J Allergy Clin Immunol*, 127 (3): 806-14 e1-4.

DEUTZMANN, R. (2006): Mediatoren. In: Bob, A. und K. (Hrsg.): *Duale Reihe Biochemie*, Thieme, Stuttgart, 627-633.

DOMBROWSKI, Y., PERIC, M., KOGLIN, S., KAMMERBAUER, C., GÖSS, C., ANZ, D., SIMANSKI, M., GLÄSER, R., HARDER, J., HORNING, V., GALLO, R. L., RUZICKA, T., BESCH, R., SCHAUBER, J. (2011): Cytosolic DNA triggers inflammasome activation in keratinocytes in psoriatic lesions. *Sci Transl Med*, 3 (82): 82ra38.

DOMBROWSKI, Y., PERIC, M., KOGLIN, S., KAYMAKANOV, N., SCHMEZER, V., REINHOLZ, M., RUZICKA, T., SCHAUBER, J. (2012): Honey bee (*Apis mellifera*) venom induces AIM2 inflammasome activation in human keratinocytes. *Allergy*, 67 (11): 1400-7.

ENOKSSON, SL., GRASSET, EK., HAGGLOF, T., MATTSON, N., KAISER, Y., GABRIELSSON, S., ET AL. (2011): The inflammatory cytokine IL-18 induces self-reactive innate antibody responses regulated by natural killer T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108 (51): E1399-E1407.

FERNANDES-ALNEMRI, T., YU, J. W., DATTA, P., WU, J., ALNEMRI, E. S. (2009): AIM2 activates the inflammasome and cell death in response to cytoplasmic DNA. *Nature*, 458 (7237): 509-513.

HABERMANN, E. (1984): Apamin. *Pharmacol Ther*, 25 (2), 255-270.

HAUSER, K. (2006): Zellorganellen. In: Bob, A. und K. (Hrsg.): *Duale Reihe Biochemie*, Thieme, Stuttgart, 363-381.

HAUSER, K. (2006): Aufbau biologischer Membranen. In: Bob, A. und K. (Hrsg.): *Duale Reihe Biochemie*, Thieme, Stuttgart, 343.

HERDEGEN, T. (2008): Immunmodulatoren und Immunsuppressiva. In: Herdegen, T. (Hrsg.): *Kurzlehrbuch Pharmakologie und Toxikologie*, Thieme, Stuttgart, 307-331.

HORNING, V., LATZ, E. (2010): Intracellular DNA recognition. *Nat Rev Immunol*, 10 (2): 123-130.

HORNUNG, V., ABLASSER, A., CHARREL-DENNIS, M., BAUERNFEIND, F., HORVATH, G., CAFFREY, D. R., LATZ, E., FITZGERALD, K. A. (2009): AIM2 recognizes cytosolic dsDNA and forms a caspase-1-activating inflammasome with ASC. *Nature*, 458 (7237): 514-8.

IVERSEN, L., JOHANSEN, C. (2008): Inflammasomes and inflammatory caspases in skin inflammation. *Expert Rev Mol*, 8 (6): 697-705.

JANNING, W., KNUST, E. (2008): Genetik: Allgemeine Genetik – Molekulare Genetik – Entwicklungsgenetik, 2. Auflage, Thieme, Stuttgart, 135-137

JONES, J. W., KAYAGAKI, N., BROZ, P., HENRY, T., NEWTON, K., O'ROURKE, K., CHAN, S., DONG, J., QU, Y., ROOSE-GIRMA, M., DIXIT, V. M., MONACK, D. M. (2010): Absent in melanoma 2 is required for innate immune recognition of *Francisella tularensis*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107 (21): 9771-6.

KAYMAKANOV, N. (2012): Aktivierung des AIM2 Inflammasoms in menschlichen Keratinozyten durch Bienengift (Dissertation). München: Ludwig-Maximilians-Universität.

KELLER, M., RUEGG, A., WERNER, S., BEER, H. D. (2008): Active caspase-1 is a regulator of unconventional protein secretion. *Cell*, 132 (5): 818-31.

KIM, S., BAUERNFEIND, F., ABLASSER, A., HARTMANN, G., FITZGERALD, K. A., LATZ, E., HORNUNG, V. (2010): *Listeria monocytogenes* is sensed by the NLRP3 and AIM2 inflammasome. *Eur. J. Immunol*, 40 (6): 1545-1551.

KOBUROVA, K. L., MICHAILOVA, S. G., SHKENDEROV, S. V. (1985): Further investigation on the antiinflammatory properties of adolapin-bee venom polypeptide. *Acta Physiol Pharmacol Bulg*, 11 (2): 50-55.

- KOOL, M., PETRILLI, V., DE SMEDT, T., ROLAZ, A., HAMMAD, H., VAN NIMWEGEN, M., et al.** (2008): Cutting edge: alum adjuvant stimulates inflammatory dendritic cells through activation of the NALP3 inflammasome. *J Immunol*, 181 (6): 3755-9.
- KURTH, T., SCHULTZE, B.** (2008): Die eukaryotischen Zellkompartimente. In: Munk, K. (Hrsg.): Taschenlehrbuch Biologie Biochemie-Zellbiologie, Thieme, Stuttgart, 387-442.
- KWON, Y. B., LEE, H. J., HAN, H. J., MAR, W. C., KANG, S. K., YOON, O. B., BEITZ, A. J., LEE, J. H.** (2002): The water-soluble fraction of bee venom produces antinociceptive and anti-inflammatory effects on rheumatoid arthritis in rats. *Life Sci*, 71 (2): 191-204.
- LATZ, E.** (2010): The inflammasomes: mechanisms of activation and function. *Curr Opin Immunol*, 22 (1): 28-33.
- MATSUZAKI, K., YONEYAMA, S., MIYAJIMA, K.** (1997): Pore formation and translocation of melittin. *Biophys J*, 73 (2): 831-838.
- MOON, D. O., PARK, S. Y., CHOI, Y. H., KIM, N. D., LEE, C., KIM, G. Y.** (2008): Melittin induces Bcl-2 and caspase-3-dependent apoptosis through downregulation of Akt phosphorylation in human leukemic U937 cells. *Toxicon*, 51 (1): 112-120.
- NAKANISHI, K., YOSHIMOTO, T., TSUTSUI, H., OKAMURA, H.** (2001): Interleukin-18 is a unique cytokine that stimulates both Th1 und Th2 responses depending on its cytokine milieu. *Cytokine Growth Factor Rev*, 12 (1): 53-72.
- NICKEL, W., RABOUILLE, C.** (2009): Mechanisms of regulated unconventional protein secretion. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 10 (2): 148-55.
- PASSARGE, E.** (2004): Taschenatlas der Genetik, 2. Auflage, Thieme, Stuttgart, 110.

PELKA, K., LATZ, E. (2011): Getting closer to the dirty little secret. *Immunity* 34 (4): 455-8.

PSCHYREMBEL, W. (2004): Pschyrembel Klinisches Wörterbuch. Walter de Gruyter, Berlin, 260. Auflage, 221.

RAGHURAMAN, H., CHATTOPADHYAY, A. (2007): Melittin: a membrane-active peptide with diverse functions. *Biosci Rep*, 27 (4-5):189-223.

RASSOW, J. (2006): Die Bereitstellung von Fettsäuren, Triacylglycerinen und Ketonkörpern. In: Bob, A. und K. (Hrsg.): *Duale Reihe Biochemie*, Thieme, Stuttgart, 222-223.

RASSOW, J. (2006): Die Unterscheidung von Selbst und Fremd im Immunsystem. In: Bob, A. und K. (Hrsg.): *Duale Reihe Biochemie*, Thieme, Stuttgart, 692-701; 731.

RENNE, J., SCHAFER, V., WERFEL, T., WITTMANN, M. (2010): Interleukin-1 from epithelial cells fosters T cell-dependent skin inflammation. *Br J Dermatol*, 162 (6):1198-205.

SCHRODER, K., TSCHOPP, J. (2010): The Inflammasomes. *Cell*, 140 (6): 821-832.

STUTZ, A., GOLENBOCK, D. T., LATZ, E. (2009): Inflammasomes: too big to miss. *J Clin Invest*, 119 (12): 3502-3511.

SUTTERWALA, F. S., OGURA, Y., SZCZEPANIK, M., LARA-TEJERO, M., LICHTENBERGER, G. S., GRANT, E. P., et al. (2006): Critical role for NALP3/CIAS1/Cryopyrin in innate and adaptive immunity through its regulation of caspase-1. *Immunity*, 24 (3): 317-27.

TERHORST, D. (2009): *Basics Dermatologie*, 2. Auflage, Elsevier, Urban & Fischer, München, 8-9.

TORAYA, S., NAGAO, T., NORISADA, K., TUZI, S., SAITO, H., IZUMI, S., NAITO, A. (2005): Morphological behavior of lipid bilayers induced by melittin near the phase transition temperature. *Biophys J*, 89 (5): 3214-3222.

TSCHOPP, J. (2011): Mitochondria: Sovereign of inflammation?. *Eur. J. Immunol*, 41 (5): 1196-202.

TU, W. C., WU, C. C., HSIEH, H. L., CHEN, C. Y., HSU, S. L. (2008): Honeybee venom induces calcium-dependent but caspase-independent apoptotic cell death in human melanoma A2058 cells. *Toxicon*, 52 (2): 318-329.

WILLART, M. A., HAMMAD, H. (2010): Alarming dendritic cells for allergic sensitization. *Allergol Int*, 59(2):95-103.

ZHOU, R., YAZDI, A., MENU, P., TSCHOPP, J. (2011): A role for mitochondria in NLRP3 inflammasome activation. *Nature*, 469 (7329): 221-5.

7 Bildernachweis

FERMENTAS: MassRuler™ DNA Ladder Mix, ready-to-use, 80-10,000 bp, URL:
<http://www.fermentas.com/en/products/all/dna-electrophoresis/massruler-dna-ladders/sm040-massruler-mix> (Stand: 28.12.2011)

ZENTRALE FÜR UNTERRICHTSMEDIEN IM INTERNET E.V.: Mitochondrium, URL:
<http://www.zum.de/Faecher/Materialien/beck/bilder/llaurie.jpg>
(Stand: 28.12.2011)

BIOCHEMIE.WEB.UNI-MUENCHEN.DE: Das mitochondriale Genom des Menschen,
URL: http://biochemie.web.med.uni-muenchen.de/biotutor_2004/Mito-DNA3.jpg (Stand: 28.12.2011)

HAL ALLERGIE: Die Sensibilisierung des Immunsystems, URL: <http://www.hal-allergy.at/images/sensi2.gif> (Stand: 28.12.2011)

8 Danksagung

Zunächst möchte ich meinem Doktorvater PD Dr. med. Jürgen Schauber für die Überlassung des Themas und die offene und herzliche Aufnahme in seine Arbeitsgruppe danken. Ohne seine zahlreichen Ideen, seine Hilfe und sein großes Engagement wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Mein Dank gilt auch Herrn Prof. Dr. med. Dr. h. c. T. Ruzicka für die Möglichkeit der Arbeit in der Klinik für Dermatologie und Allergologie.

Dr. rer. nat. Yvonne Dombrowski möchte ich für die große Unterstützung während der Laborarbeit danken; vor allem ihre Geduld und ihre Ausdauer, nicht nur bei der Korrektur der Arbeit, waren von unschätzbarem Wert für mich.

Sarah Koglin war eine unverzichtbare Hilfe bei der Durchführung der Versuche. Sie stand mir in allen Bereichen mit Rat und Tat zur Seite.

Dr. rer. nat. Marc Peric danke ich für die anfängliche Einarbeitung und für die Vermittlung der grundlegenden Fähigkeiten zu Beginn der Arbeit.

Meinen Freunden danke ich für die stetige Ermutigung und Unterstützung außerhalb des Labors.

Meiner Schwester Milena und meiner Freundin Carolin danke ich für die Hilfe in allen orthografischen Fragen und für die Geduld bei der Korrektur der Arbeit.

Meinem Verlobten Vinzent danke ich für seine Motivation und seine Unterstützung während der Zeit meines Examens bis zur Fertigstellung meiner Doktorarbeit.

Vor allem aber für seine Liebe.

Ein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern für ihre unermüdliche Unterstützung und die zahlreichen wertvollen Ratschläge während meines Studiums bis hin zur Fertigstellung meiner Doktorarbeit und noch weit darüber hinaus. Ohne sie wäre das alles nicht möglich gewesen.