

Aus der Klinik für Kardiologie und dem Experimental and Clinical Research
Center der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Nlrp3-Deletion schützt vor inflammationsvermittelter Skelettmuskelatrophie

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Nora Rui Huang

aus Harbin, VR China

Datum der Promotion: 06.09.2019

Vorwort

Die Ergebnisse dieser Arbeit wurden in folgender internationaler Fachzeitschrift als Originalartikel veröffentlicht:

Huang N*, Kny M*, Riediger F*, Busch K, Schmidt S, Luft FC, Slevogt H, Fielitz J. Deletion of Nlrp3 protects from inflammation-induced skeletal muscle atrophy. Intensive Care Med Exp. 2017 Dec;5(1):3.

* geteilte Erstautorschaft

Die Ergebnisse dieser Arbeit wurden in Teilen als Poster präsentiert und teilweise als Abstract veröffentlicht:

Kny M, Huang N, Busch K, Schmidt S, Butter C, Riediger F, Luft FC, Slevogt H, Fielitz J. Deletion of Nlrp3 protects from inflammation-induced skeletal muscle atrophy. Posterpräsentation. 83. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie – Herz- und Kreislaufforschung e.V., 19.-22. April 2017, Mannheim, Deutschland. Clin Res Cardiol 106, Suppl 1, Apr. 2017.

Inhaltsangabe

Vorwort	2
Inhaltsangabe	3
Abbildungsverzeichnis	6
Tabellenverzeichnis	8
Abkürzungsverzeichnis	9
Zusammenfassung in Deutsch und Englisch	10
1. Einleitung	12
1.1 Der quergestreifte Skelettmuskel	12
1.2 Die auf der Intensivstation erworbene Schwäche (ICUAW)	14
1.2.1 Definition und Krankheitsbild	14
1.2.2 Diagnostikmöglichkeiten einer ICUAW	16
1.2.3 Pathophysiologie der ICUAW	17
1.3 Die Rolle des Ubiquitin-Proteasom-Systems in der inflammations- vermittelten Muskelatrophie	19
1.4 Das angeborene Immunsystem in der Sepsis	22
1.5 NLRP3-Inflammasom und IL-1β	23
1.6 Fragestellung	28
2. Material und Methoden	29
2.1 Material	29
2.1.1 Geräte und Labormaterialien	29
2.1.2 Chemikalien und Reagenzien.....	30
2.1.3 Antikörper, Oligonukleotide.....	32
2.1.4 Puffer und Lösungen	33
2.1.5 Versuchstiere.....	34
2.1.6 Zelllinie.....	34
2.2 Methoden	35
2.2.1 Zellbiologische Methoden	35
2.2.1.1 Kultivierung von C2C12-Zellen	35
2.2.1.2 Zellzahlbestimmung in der Neubauer-Zählkammer.....	35
2.2.1.3 Differenzierung von C2C12-Zellen	35
2.2.1.4 Stimulationsexperimente mit C2C12-Zellen	36
2.2.2 Tierexperimentelle Methoden	36

2.2.2.1	Genotypisierung der Versuchstiere	36
2.2.2.2	Sepsisinduktion in den Versuchstieren.....	38
2.2.2.3	Muskel- und Organentnahme	39
2.2.3	Molekularbiologische Methoden	40
2.2.3.1	RNA-Isolation aus Mausegeweben und kultivierten Zellen	40
2.2.3.2	Reverse Transkription (cDNA-Synthese)	40
2.2.3.3	Quantitative Polymerase-Kettenreaktion (qPCR)	41
2.2.3.4	Proteinisolation	43
2.2.3.5	SDS-PAGE und Western Blot	43
2.2.4	Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA).....	44
2.2.5	Histologische Färbungen und Auswertung	45
2.2.5.1	Hämatoxylin- und Eosin-Färbung (HE-Färbung)	45
2.2.5.2	Metachromatische ATPase-Färbung von Myosin.....	46
2.2.5.3	Messung von Myozytenquerschnittsflächen (MCSA)	47
2.2.5.4	Messung von C2C12-Myotubendurchmesser	47
2.3	Statistik	47
3.	Ergebnisse.....	48
3.1	Zellkulturexperiment.....	48
3.1.1	Veränderungen der Genexpression in C2C12-Zellen nach kurzzeitiger IL-1 β - Behandlung.....	48
3.1.1.1	Proinflammatorische Marker.....	48
3.1.1.2	Muskelspezifische Atrophiemarker	49
3.1.1.3	Fasertypspezifische Myosin-Isoformen	51
3.1.2	C2C12-Myotubendurchmesser nach 72-stündiger IL-1 β -Behandlung	52
3.1.3	Proteingehalt nach 72-stündiger IL-1 β -Behandlung	54
3.2	Basale Charakterisierung der <i>Nlrp3</i>-KO-Mäuse.....	54
3.2.1	Körper- und Organgewichtsanalysen von WT- und <i>Nlrp3</i> -KO-Mäusen.....	55
3.2.2	Genexpressionsanalysen im Skelettmuskel von WT- und <i>Nlrp3</i> -KO-Mäusen	56
3.2.2.1	Proinflammatorische Marker.....	56
3.2.2.2	Muskelspezifische Atrophiemarker	56
3.2.3	Proteinanalysen von MuRF1 und Myosinen im Skelettmuskel von WT- und <i>Nlrp3</i> -KO-Mäusen.....	57
3.3	Induktion von Sepsis bei WT- und <i>Nlrp3</i>-KO-Mäusen.....	58
3.3.1	Überlebensrate nach CLP-Operation	58

3.3.2	Körper- und Organgewichtsanalysen nach CLP-Operation.....	59
3.3.3	IL-1 β -Serumspiegel nach CLP-Operation	61
3.3.4	Genexpressionsanalysen im Skelettmuskel nach CLP-Operation	61
3.3.4.1	Proinflammatorische Marker.....	61
3.3.4.2	Muskelspezifische Atrophiemarker	63
3.3.4.3	Fasertyp-spezifische Myosinisoformen	64
3.3.5	Proteinanalysen im Skelettmuskel nach CLP-Operation	66
3.3.6	Histologische Beurteilung der Skelettmuskeln nach CLP-Operation.....	67
4.	Diskussion.....	73
4.1	IL-1β-Signaling ist in Myozyten aktiv und induziert Muskelatrophie	74
4.2	Der Skelettmuskel trägt zur systemischen Immunantwort bei.....	75
4.3	<i>Nlrp3</i>-Deletion schützt vor CLP-induzierter Sepsis	78
4.4	<i>Nlrp3</i>-Deletion schützt vor inflammationsvermittelter Muskelatrophie	80
4.5	Limitationen der Arbeit.....	84
	Literatur	86
	Eidesstattliche Versicherung	102
	Lebenslauf.....	104
	Publikationsliste	104
	Danksagung	107

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Histologischer und ultrastruktureller Aufbau von Skelettmuskeln	13
Abb. 2: Die Ubiquitinierungskaskade.....	20
Abb. 3: Beispielhafter Aufbau von Inflammasomen.....	24
Abb. 4: Regulation der NLRP3-Inflammasom-Aktivierung	26
Abb. 5: Agarosegel einer PCR-Genotypisierung	38
Abb. 6: Schematische Übersicht des Versuchaufbaus.....	39
Abb. 7: Zeitlicher Verlauf der <i>Il6</i> - und <i>Nlrp3</i> -mRNA-Expression nach IL-1 β -Behandlung in C2C12-Myotuben	49
Abb. 8: Zeitlicher Verlauf der <i>Trim63</i> - und <i>Fbxo32</i> -Expression nach IL-1 β -Behandlung in C2C12-Zellen	50
Abb. 9: Zeitlicher Verlauf der Myosinexpression nach IL-1 β -Behandlung in C2C12- Zellen	52
Abb. 10: Induktion von Atrophie in C2C12-Myotuben nach 72-stündiger IL-1 β - Behandlung.....	53
Abb. 11: Myosinexpression in C2C12 Zellen nach 72-stündiger IL-1 β -Behandlung	54
Abb. 12: Basale Gewichtsanalysen von WT- und <i>Nlrp3</i> -KO-Mäusen	55
Abb. 13: Basale Genexpression von proinflammatorischen Zytokinen im Skelettmuskel von WT- und <i>Nlrp3</i> -KO-Mäusen	56
Abb. 14: Basale Genexpression von <i>Trim63</i> und <i>Fbxo32</i> im Skelettmuskel von WT- und <i>Nlrp3</i> -KO-Mäusen	57
Abb. 15: Basaler Proteingehalt von Gesamtmyosin, schnellem Myosin und MuRF1 im GP-Skelettmuskel von WT- und <i>Nlrp3</i> -KO-Mäusen	58
Abb. 16: Prozentuale postoperative Überlebensrate von WT- und <i>Nlrp3</i> -KO-Mäusen nach CLP- oder Sham-Operation	59
Abb. 17: Veränderung der Körper- und Organgewichte von WT- und <i>Nlrp3</i> -KO-Mäusen nach CLP-Operation	60
Abb. 18: Veränderung des IL-1 β -Serumspiegels von WT- und <i>Nlrp3</i> -KO-Mäusen nach CLP-Operation.....	61
Abb. 19: Veränderung der Genexpression von proinflammatorischen Zytokinen im Skelettmuskel von WT- und <i>Nlrp3</i> -KO-Mäusen nach CLP-Operation	63
Abb. 20: Veränderung der Genexpression von <i>Trim63</i> und <i>Fbxo32</i> im Skelettmuskel von WT- und <i>Nlrp3</i> -KO-Mäusen nach CLP-Operation	64

Abb. 21: Veränderung der Genexpression von Fasertyp-spezifischen Myosinisoformen im Skelettmuskel von WT- und <i>Nlrp3</i> -KO-Mäusen nach CLP-Operation	66
Abb. 22: Veränderung des Proteingehalts von Gesamtmyosin, schnellem Myosin und MuRF1 im Western Blot im Skelettmuskel von WT- und <i>Nlrp3</i> -KO-Mäusen nach CLP-Operation	67
Abb. 23: Histologische Analyse des GP-Muskels von WT- und <i>Nlrp3</i> -KO-Mäusen nach CLP-Operation	69
Abb. 24: Histologische Analyse des TA-Muskels von WT- und <i>Nlrp3</i> -KO-Mäusen nach CLP-Operation	70
Abb. 25: Histologische Analyse des SOL-Muskels von WT- und <i>Nlrp3</i> -KO-Mäusen nach CLP-Operation	71
Abb. 26: Prozentuale Verteilung der Typ-I- und Typ-II-Fasern im SOL-Muskel von WT- und <i>Nlrp3</i> -KO-Mäusen nach CLP-Operation	72

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht über die humanen und murinen Myosinisoformen in der Skelettmuskulatur mit den korrespondierenden Gen- und Proteinnamen sowie Fasertypen.	14
Tabelle 2: Geräte und Labormaterialien	29
Tabelle 3: Chemikalien und Reagenzien	30
Tabelle 4: Primärer Antikörper	32
Tabelle 5: Sekundärer Antikörper	32
Tabelle 6: Primer für qPCR	33
Tabelle 7: Puffer und Lösungen	33
Tabelle 8: Primer zur Genotypisierung der Versuchstiere	37
Tabelle 9: PCR-Programm zur Genotypisierung der Versuchstiere	37
Tabelle 10: PCR-Programm für die Reverse Transkription	41
Tabelle 11: Programm für die qPCR.	42
Tabelle 12: Protokoll für die HE-Färbung von Gewebeschnitten.....	45
Tabelle 13: Protokoll für die ATPase-Färbung von Gewebeschnitten.....	46

Abkürzungsverzeichnis

KO, -/-	Knockout
WT, +/+	Wildtyp
Atrogin1	Atrogin1, auch <i>Muscle Atrophy F-box</i> (MAFbx)
CIM	<i>Critical Illness</i> Myopathie
CINM	<i>Critical Illness</i> Neuromyopathie
CIP	<i>Critical Illness</i> Polyneuropathie
CLP	Zökumligatur mit nachfolgender Punktion (engl. <i>cecal ligation and puncture</i>)
DAMP	Schaden-assoziierte molekulare Muster (engl. <i>danger associated molecular patterns</i>)
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDL	<i>Musculus extensor digitorum longus</i>
<i>Fbxo32</i>	F-box protein 32
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GP	<i>Musculi gastrocnemius/plantaris</i>
ICUAW	Auf der Intensivstation erworbene Schwäche (engl. <i>intensive care unit-acquired weakness</i>)
IL-1Ra	Interleukin-1-Rezeptorantagonist
IL-1 β , <i>Il1b</i>	Interleukin-1 β
IL-6, <i>Il6</i>	Interleukin-6
IL-18, <i>Il18</i>	Interleukin-18
IFN- γ	Interferon- γ
LPS	Lipopolysaccharid
MuRF1	engl. <i>muscle really interesting new gene (RING) - finger 1 protein</i>
MyHC, <i>Myh</i>	Myosin schwere Kette (engl. <i>myosin heavy chain</i>)
NF κ B	Nukleärer Faktor- κ B
NLR	NOD-ähnlichen Rezeptoren (engl. <i>Nod-like-receptors</i>)
NLRP	engl. <i>NLR family, pyrin domain containing</i>
NLRP3	engl. <i>NLR family, pyrin domain containing 3</i> , bzw. Cryopyrin, bzw. NALP3 (<i>NACHT, LRR and PYD domains-containing protein 3</i>)
PAMP	Pathogen-assoziierte molekulare Muster (engl. <i>pathogen associated molecular patterns</i>)
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (engl. <i>phosphate buffered saline</i>)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
qPCR	Quantitative Polymerase-Kettenreaktion
RNA	Ribonukleinsäure
SOL	<i>Musculus soleus</i>
TA	<i>Musculus tibialis anterior</i>
TNF- α , <i>Tnfa</i>	Tumornekrosefaktor- α
<i>Trim63</i>	<i>Tripartite Motif Containing 63</i>
UPS	Ubiquitin Proteasom System

Zusammenfassung in Deutsch und Englisch

Zusammenfassung

Hintergrund

Die auf der Intensivstation erworbene Muskelschwäche (engl. *intensive care unit-acquired weakness* (ICUAW)) ist eine häufige neuromuskuläre Komplikation bei kritisch kranken Patienten auf Intensivstationen und ist durch eine generalisierte Muskelschwäche charakterisiert. Die damit verbundene verminderte Muskelkraft und Ausdauer resultieren häufig in langen Aufenthalten auf Intensivstationen und erhöhen die Gefahr von Sekundärkomplikationen. Das proinflammatorische Zytokin Interleukin 1 β (IL-1 β) spielt in Inflammationsreaktionen eine wichtige Rolle. Allerdings ist es unklar, inwiefern IL-1 β an Muskelzellen wirkt und ob seine Inhibition eine Muskelatrophie verhindert. In dieser Arbeit soll der Einfluss der IL-1 β -Aktivierung durch das NLRP3-Inflammasom in inflammationsvermittelter Muskelatrophie untersucht werden.

Methoden

Die Wirkung von IL-1 β wurde in der Zellkultur an C2C12-Myotuben hinsichtlich einer Muskelatrophie auf Gen- und Proteinebene untersucht sowie die Atrophiereaktion morphologisch analysiert. Mittels Zökumligatur mit nachfolgender Punktion (CLP) wurde eine polymikrobielle Sepsis in Wildtyp- und *Nlrp3*-Knockout-Mäusen induziert. Anschließend wurde die Muskelatrophie anhand der Muskelmorphologie, der Genexpression und des Proteingehaltes der Atrophiemarker beurteilt.

Ergebnisse

Der IL-1 β Signalweg ist in C2C12 Myotuben vorhanden und aktiv. Die Behandlung mit IL-1 β führte zu einer gesteigerten Expression von muskelspezifischen Atrogenen und einer Atrophie von C2C12 Myotuben. Außerdem konnte gezeigt werden, dass *Nlrp3*-Knockout-Tiere, die eine verminderte Aktivierung von IL-1 β aufweisen, gegenüber Wildtyptieren vor CLP-induzierter Muskelatrophie geschützt sind. Neben einem verminderten Entzündungsgeschehen konnte mittels Muskelmorphologie, Organ-gewichte, Genexpression und Proteinanalyse 96 Stunden nach CLP-Operation eine signifikant reduzierte Skelettmuskelatrophie in *Nlrp3*-Knockout-Tieren festgestellt werden. Die vorliegenden Daten weisen darauf hin, dass IL-1 β direkt auf Muskelzellen einwirkt und in diesen Zellen Atrophie induziert. Die Hemmung der IL-1 β -Aktivierung durch das NLRP3-Inflammasom könnte daher ein neues Ziel einer medikamentösen Therapie in der Behandlung der septischen Myopathie bei kritisch Kranken darstellen.

Abstract

Background

Intensive care unit-acquired weakness (ICUAW) is a common neuromuscular complication occurring in critically ill ICU-patients and is characterized by generalized muscle weakness. The associated decreased muscle strength and endurance often results in long stays in intensive care units and increases the risk of secondary complications. The proinflammatory cytokine interleukin 1 β (IL-1 β) plays an important role in inflammatory reactions. However, it remains unclear whether IL-1 β acts directly on muscle cells and if its inhibition prevents muscle atrophy. In this work, the influence of IL-1 β activation through the NLRP3 inflammasome is involved in inflammation-induced atrophy will be investigated.

Methods

The effect of IL-1 β on C2C12 myotubes was examined *in vitro* for muscle atrophy at gene and protein level, and the atrophy response was analyzed morphologically. Polymicrobial sepsis was induced by celiac ligation followed by puncture (CLP) in wild-type and *Nlrp3* knockout mice. Subsequently, muscle atrophy was assessed by muscle morphology and gene expression and protein content of atrophy markers.

Results

IL-1 β signaling pathway is present and active in C2C12 myotubes. Treatment with IL-1 β induces muscle atrophy with elevated gene expression of *Irf6* and muscle specific atrogens in C2C12 myotubes. Additionally *Nlrp3* knockout mice with reduced IL-1 β -activation are protected from CLP-induced muscle atrophy compared to their wild-type littermates. Besides reduced inflammation muscle morphology, organ weights, gene expression and protein levels revealed significantly reduced skeletal muscle atrophy in *Nlrp3* knockout mice 96 hours after CLP surgery. These data indicate that IL-1 β acts directly on muscle cells to cause atrophy. The inhibition of IL-1 β activation by the NLRP3 inflammasome could therefore be a new drug target in the treatment of septic myopathy in critically ill patients.

1. Einleitung

Die Sepsis, welche im Volksmund auch als Blutvergiftung bezeichnet wird, ist eine komplexe systemische Immunantwort des Körpers auf eine Infektion. In den USA wird von über 750.000 Erkrankungen pro Jahr mit steigender Tendenz ausgegangen. Auch in Deutschland erkranken jährlich 154.000 Menschen an einer Sepsis und etwa 56.000 Menschen sterben an den Folgen dieser Erkrankung [1,2]. Obwohl die Sepsis weiterhin eine der häufigsten Gründe für die Aufnahme auf Intensivstationen ist, haben die Fortschritte der Intensivmedizin eine deutliche Reduktion der Mortalitätsrate von intensivpflichtigen Patienten bewirkt [3,4]. Aus diesem Grund rücken zunehmend die Folgen eines Intensivstationaufenthalts in den klinischen Fokus.

Insbesondere neuromuskuläre Komplikationen treten während einer schweren systemischen Inflammation auf und gehen mit einem massiven Muskelschwund und damit verbundener verminderter Muskelkraft und Ausdauer einher. Diese auf der Intensivstation erworbene Schwäche (engl. *intensive care unit (ICU)-acquired weakness* = ICUAW) resultiert häufig in lange Aufenthalte auf Intensivstationen und erhöht die Gefahr von Sekundärkomplikationen. Die fehlenden Kenntnisse über die Pathophysiologie der ICUAW und der Mangel an gezielten Therapiemöglichkeiten führen zu erheblichen Kosten für das Gesundheitswesen [5,6]. Demzufolge ist das tiefere Verständnis für die Ätiologie und Pathogenese unabdingbar, um Präventionsmaßnahmen und Therapieansätze für dieses Krankheitsbild zu entwickeln.

1.1 Der quergestreifte Skelettmuskel

Die Muskelfaser, auch Myozyt genannt, ist der grundlegende Baustein des Muskels und entsteht aus der Fusion von mehreren Vorläuferzellen, sogenannten Myoblasten. Sie besitzen eine längliche Form mit randständigen Zellkernen und werden von einer bindegewebigen Hülle, dem Endomysium, umgeben. Mehrere Muskelfasern werden zu sogenannten Faszikeln zusammengeschlossen. Dabei handelt es sich um Muskelfasernbündel, die jeweils von einer weiteren Bindegewebsschicht, dem Perimysium, umhüllt werden. Ein ganzer Muskel besteht aus mehreren Faszikeln und wird erneut von einer gemeinsamen Bindegewebsschicht, dem Epimysium, umgeben. Das Epimysium wird noch mal von einer sehr festen Bindegewebshülle, der Faszie, umhüllt und mündet in eine Sehne. Diese verbindet schlussendlich den Muskel mit dem Knochen [7].

Im Inneren der Muskelfaser finden sich die kontraktile Myofibrillen. Namensgebend für die quergestreifte Skelettmuskulatur ist ein lichtmikroskopisch sichtbares regelmäßiges Streifenmuster. Es basiert auf einer wiederkehrenden Anordnung von dicken und dünnen Filamenten. Eingefasst von zwei sogenannten Z-Scheiben bilden sie gemeinsam die kleinste, kontraktile Einheit des Skelettmuskels – das Sarcomer. Während die dicken Filamente aus den Myosinmolekülen bestehen, enthalten die dünnen Filamente die Proteine Aktin, Tropomyosin und den Troponin-Komplex. Das Myosinmolekül liegt als Dimer vor und besteht aus 6 Untereinheiten (2 schwere Ketten mit ATPase-Aktivität und vier leichte Ketten) und wird in einen Kopf-, Hals- und Schwanzabschnitt eingeteilt. Der Kopfabschnitt stellt die Verbindung zum Aktin her und ermöglicht über die ATPase-Aktivität die Kontraktilität, der Halsabschnitt dient als bewegliche Scharnierregion und über den Schwanzabschnitt können sich mehrere Myosinmoleküle zu sogenannten Myofilamenten zusammenlagern (Abb. 1) [8].

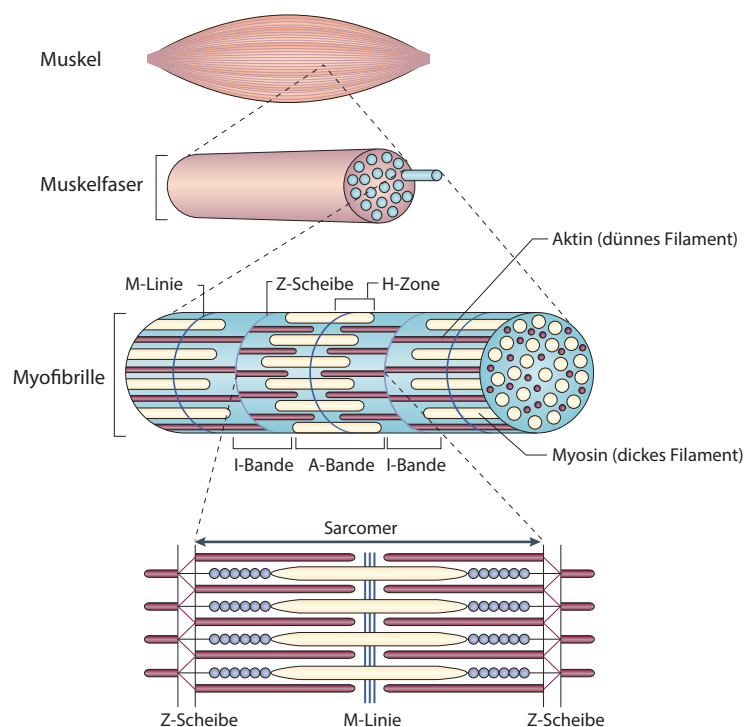


Abb. 1: Histologischer und ultrastruktureller Aufbau von Skelettmuskeln. Muskel, Muskelfaser, Myofibrille und Aufbau des Sarcomers. Die dicken Myosinfilamente und die dünnen Aktin-/ Tropomyosin-/Troponinfilamente können sich gegeneinander verschieben und somit die Kontraktion auslösen [9].

Über die verschiedenen Isoformen der schweren Myosinketten (engl. *myosin heavy-chain*, MyHC) können verschiedene Muskelfasertypen unterschieden werden. Die ATPase-Aktivität und die damit zusammenhängende Kontraktionsgeschwindigkeit ist ein wichtiges Kriterium zur Unterscheidung der MyHC-Isoformen. Wegen dieser

Eigenschaften unterscheidet man beim Menschen Typ-I-, Typ-IIA-, und Typ-IID-Fasern (Tabelle 1). Typ-I-Fasern enthalten das MyHC- β /slow mit einer geringeren ATPase-Aktivität und können daher nur langsam kontrahieren. Dem gegenüber stehen die Typ-IIA-, und Typ-IID-Fasern, welche MyHC-2a, beziehungsweise MyHC-2d mit einer höheren ATPase-Aktivität enthalten, und daher fähig sind, schnell zu kontrahieren. Bei Nagetieren ist noch eine Typ-IIB-Muskelfaserart bekannt, welche MyHC-2b enthält [10].

Tabelle 1: Übersicht über die humanen und murinen Myosinisoformen in der Skelettmuskulatur mit den korrespondierenden Gen- und Proteinnamen sowie Fasertypen.

Genname (human/murin)	Proteinname	Fasertyp
<i>MYH1/Myh1</i>	MyHC-2d	Typ-IID
<i>MYH2/Myh2</i>	MyHC-2a	Typ-IIA
<i>MYH4/Myh4</i>	MyHC-2b	Typ-IIB
<i>MYH7/Myh7</i>	MyHC- β /slow	Typ-I

1.2 Die auf der Intensivstation erworbene Schwäche (ICUAW)

1.2.1 Definition und Krankheitsbild

Unter dem Überbegriff ICUAW werden drei Erscheinungsbilder der auf der Intensivstation erworbenen Schwäche zusammengefasst. Je nachdem, ob primär der Nerv, der Muskel oder beide betroffen sind, werden sie als *Critical Illness* Polyneuropathie (CIP), *Critical Illness* Myopathie (CIM) oder die Mischform *Critical Illness* Neuromyopathie (CINM) bezeichnet [11-13].

Es wird davon ausgegangen, dass ca. 46 % der Patienten auf Intensivstationen eine ICUAW entwickeln. Je nach Studie weicht die Inzidenz mit 25-100 % jedoch stark voneinander ab [14-16]. Verschiedene Faktoren wie variable Studienpopulationen oder vorangegangene Medikamentengabe, aber auch unterschiedliche Diagnosekriterien, Untersuchungszeitpunkte und die Erfahrung des Untersuchers beeinflussen die Diagnose einer ICUAW erheblich [14,17,18]. Eine geschlechtsspezifische Verteilung ist nicht eindeutig bewiesen worden, wobei neuere Studien zeigen, dass das weibliche Geschlecht ein Risikofaktor für das Auftreten einer ICUAW darstellt [15,19]. Hinzu kommt, dass die Art der Erkrankung des Patienten einen maßgeblichen Effekt auf die Inzidenz hat. Während Patienten mit akutem Lungenversagen oder Multiorganversagen in bis zu 80 % eine neuromuskuläre Komplikation entwickeln, sind Patienten mit

septischem Schock oder schwerer Sepsis mit Koma bis zu 100 % betroffen **[16,20-23]**. Entgegen früheren Angaben, wird heute davon ausgegangen, dass die Patienten häufiger unter einer CIM als unter einer CIP leiden, allerdings treten Mischformen (CINM) sehr häufig auf **[23,24]**.

Nach dem derzeitigen wissenschaftlichen Stand zählen neben dem systemischen inflammatorischen Response-Syndrom (SIRS), die schwere Sepsis und das Multiorganversagen zu den stärksten Prädiktoren einer ICUAW **[14]**. In der Entstehung einer ICUAW spielt darüber hinaus eine hyperglykämie Stoffwechsellage und Insulinresistenz eine wichtige Rolle **[25]**. Katecholaminbehandlung, Nierenersatztherapie, Immobilisation und die Dauer der Beatmung werden als weitere Risikofaktoren diskutiert **[15,26]**. Auch wenn ältere Studien einen Zusammenhang zwischen der ICUAW und einer höher dosierten Glukokortikoid- oder Muskelrelaxanzgabe sehen, ist aktuell umstritten, inwieweit der Einsatz dieser Substanzen die Erkrankungswahrscheinlichkeit tatsächlich beeinflusst **[14,15,27]**.

Im Akutzustand erschwert die ICUAW nicht nur die Entwöhnung vom Beatmungsgerät, sondern auch die frühzeitige Mobilisation der Patienten. Klinisch fallen eine Schwäche der respiratorischen Muskulatur sowie eine symmetrische Schwäche der unteren Extremitäten auf, die im Extremfall als Tetraplegie imponieren kann. Dabei können sowohl distale als auch proximale Muskelgruppen betroffen sein und zu sichtbaren Atrophien führen **[11]**. Im Falle einer CIP kann die Sensibilität oftmals zusätzlich reduziert sein, dabei scheint die Schmerzwahrnehmung nur wenig davon betroffen zu sein **[28]**. In der Regel, aber nicht notwendigerweise, sind die von den Hirnnerven versorgten Muskeln, wie die mimische Muskulatur, ausgespart. Deshalb können sich Patienten auf adäquaten Schmerzreiz hin zwar nicht bewegen, jedoch grimassieren **[11]**. Wegen der verlängerten Verweildauer auf Intensivstationen sind die Patienten zusätzlichen sekundären Komorbiditäten, wie zum Beispiel Pneumonien, Lungenarterienembolien oder tiefer Beinvenenthrombosen ausgesetzt, die schließlich zu erhöhten Mortalitätsrate beitragen **[29,30]**. Nicht selten sind die Patienten auch nach der Entlassung aus dem Krankenhaus für lange Zeit erheblich beeinträchtigt und hilfebedürftig. Neben einer verlängerten Rehabilitation können permanente Paresen zu erheblichen Funktionseinschränkung führen, die langfristig zu einer reduzierten Lebensqualität führen **[31,32]**. Eine isolierte CIM scheint im Krankheitsverlauf früher aufzutreten und ist im Vergleich zu einer CIP mit einer günstigeren Prognose verbunden **[24]**. Dennoch können kritisch Kranke, selbst 5 Jahre nach Entlassung von

Intensivstationen, oftmals nur einen Kraftgrad entwickeln, der etwa 34 % unterhalb der Norm ist [5]. Die Gründe dafür sind unklar.

Gegenwärtig gibt es kein Therapieschema für die Behandlung der ICUAW, sodass die Prävention der Erkrankung durch Reduktion der bekannten Risikofaktoren entscheidend ist. Neben einer aggressiven und frühzeitigen Sepsistherapie hat sich insbesondere ein ausgeglichener Blutzuckerhaushalt mit Vermeidung von Hyperglykämien als positiv zur Vorbeugung der ICUAW erwiesen [25,33]. Außerdem sind eine möglichst geringe Sedierung, frühe Mobilisierung mit intensiver Physiotherapie bereits auf der Intensivstation und eine Vermeidung des kontinuierlichen Einsatzes von Glukokortikoiden und Muskelrelaxanzien anzustreben [15,26,34]. Die präventive intravenöse Applikation von Immunglobulinen als Therapieoption wurde in der Vergangenheit mit kontroversen Ergebnissen untersucht und ist zum aktuellen Zeitpunkt kein etabliertes Verfahren [35,36].

1.2.2 Diagnostikmöglichkeiten einer ICUAW

Angesichts dessen, dass die Patienten auf Intensivstationen häufig sediert oder bewusstlos sind, haben klinische Untersuchungen, die auf eine Mitarbeit des Patienten basieren, limitierte Aussagekraft. Oftmals ist die erschwerte Entwöhnung von Beatmungsmaschinen, ohne andere ersichtliche Ursachen, ein Hinweis auf eine ICUAW, weil die Schwäche der Atemhilfsmuskulatur und des Zwerchfells eine ausreichende Spontanatmung nicht zulässt [11,13]. Daher werden zur Unterscheidung der drei Unterformen der ICUAW in erster Linie elektrophysiologische und histologische Untersuchungsmethoden angewandt. Da elektrophysiologische Veränderungen frühzeitig auftreten, haben sich vor allem elektrophysiologische Untersuchungen für die Früherkennung der ICUAW als hilfreich erwiesen. Demgegenüber können andere Untersuchungsmethoden nur manifeste Muskelschäden nachweisen [37]. Außerdem können elektrophysiologische Untersuchungen auch am analgosedierten Patienten durchgeführt werden und geben wertvolle Hinweise zur Differenzierung einer neurogenen von einer muskulären Störung.

Mittels Elektroneurographie (ENG) und Elektromyographie (EMG) werden periphere Nervenläsionen sowie myogenen Schädigungen objektiviert. Allerdings wird in der konventionellen EMG-Untersuchung die Kooperation der Patienten benötigt, sodass bei bewusstlosen Patienten die direkte Muskelstimulation zu bevorzugen ist. Dabei wird der Muskel sowohl direkt als auch über den zugehörigen motorischen Nerv stimuliert und

die Muskelsummutationspotentiale (engl. *compound muscle action potential*, CMAP) mit Hilfe einer in den Muskel eingelassenen Nadelelektrode gemessen. Wegen der neurogenen Schädigung sind bei einer isolierten CIP die CMAPs nach nervaler Stimulation (neCMAP) verringert, während die CMAPs nach direkter muskulärer Stimulation (dmCMAP) unverändert bleiben [38,39].

In unklaren Fällen und zum Ausschluss anderer Myopathien können Nerven- und Muskelbiopsien entscheidende Hinweise geben. Das Hauptmerkmal der CIM ist die vorwiegende Atrophie von schnell kontrahierenden Typ-II-Fasern, die sich durch den selektiven Verlust von Myosin bei erhaltener Z-Scheibe und Aktinfilamente auszeichnet [40]. Im Querschnitt finden sich abgerundete atrophischen Fasern mit zentral liegenden Zellkernen, Fett- und Bindegewebeinlagerungen, vereinzelte Nekrosen und Vakuolen [23,41]. Nervenbiopsien sind bei der isolierten CIM in der Regel unauffällig, wohingegen sie bei der CIP axonale Degenerationen der motorischen und sensiblen Nervenfasern im distalen Bereich aufweisen können. Die daraus resultierende Atrophie wird als Denervierungsatrophie bezeichnet und geht histologisch mit einer Atrophie von sowohl langsam kontrahierenden Typ-I-, als auch schnell kontrahierenden Typ-II-Fasern einher [11,41].

1.2.3 Pathophysiologie der ICUAW

Da SIRS und Sepsis zu den wichtigsten Risikofaktoren der ICUAW gehören, ist eine inflammatorische Komponente in der Pathogenese naheliegend. Es wird angenommen, dass die durch die Inflammation hervorgerufene Immunantwort eine Reihe von systemischen zellulären und humoralen Mechanismen in Gang setzt, welche schlussendlich ein neuromuskuläres Organversagen herbeiführen [42,43]. Ob die ICUAW dabei ein eigenständiges Organversagen darstellt oder als eine neuromuskuläre Organmanifestation im Rahmen eines Multiorganversagens zu verstehen ist, bedarf weiterer Forschung [44].

Typischerweise findet sich bei der CIM eine verminderte, beziehungsweise aufgehobene Erregbarkeit der Muskelmembranen, die auf einen Defekt der spannungsabhängigen Natriumkanäle zurück zu führen ist [45]. Verstärkt wird dieser Zustand durch die veränderte Expression der neuronalen Stickstoffmonoxid-Synthase, die für die Aufrechterhaltung des Ruhemembranpotentials verantwortlich ist [46]. In den Biopsien zeigten sich außerdem verminderte Kalziumfreisetzungen aus dem sarkoplasmatischen Retikulum. Da Kalzium im Kontraktionsmechanismus eine wichtige

Rolle spielt, führt dies zu einer verminderten Kontraktionskraft [47]. Daneben ist die Störung der Muskelproteinhomöostase ein maßgebliches Merkmal der CIM. Es konnte gezeigt werden, dass es während der Sepsis zu einer Aktivierung proteinabbauender Enzyme, einschließlich des Ubiquitin-Proteasom-Systems, kommt. Bei gleichzeitig verminderter Proteinsynthese können die katabolen Vorgänge nicht mehr kompensiert werden, was sich klinisch in einer Muskelatrophie äußert [48,49].

Auch atrophiebegünstigende proinflammatorische Mediatoren spielen bei der CIM eine entscheidene Rolle. Bislang wurden in der Literatur vor allem Tumornekrosefaktor- α (TNF- α), Interleukin-1 (IL-1) und Interleukin-6 als Schlüsselmediatoren genannt [50]. Vor kurzem konnte auch der *growth and differentiation factor-15* (GDF-15) aus der Familie der *transforming growth factor- β* (TGF- β) als weiteres Stresszytokin identifiziert werden [51].

Kritisch kranke Patienten weisen häufig eine Insulinresistenz auf, die zu Hyperglykämien führt und selbst auf hohe Insulingaben nicht adäquat anspricht [52]. Darüber hinaus wurden bei kritisch Kranken zunehmende Resistenzen gegenüber dem Wachstumshormon (engl. *growth hormone*, GH) und Insulin beobachtet. Die Verschiebung des Hormongleichgewichts zugunsten der katabolen Hormone begünstigt den Muskelabbau zusätzlich [53]. Daneben gibt es Hinweise, dass der oxidative Stress bei fehlenden Antioxidantien sowie die vermehrte Produktion von Stickstoffmonoxid zur einer Hemmung der mitochondrialen Atmungskette führen und es intrazellulär zu einem bioenergetischen Versagen kommt [54]. Ob und inwieweit niedermolekulare Toxine für das Krankheitsbild verantwortlich sind, ist Gegenstand aktueller Forschung [55].

Grundlage für die Entstehung der CIP ist die Schädigung von motorischen Neuronen. Dabei wird vermutet, dass eine mikrovaskuläre Dysfunktion dem Nervenuntergang zugrunde liegt. Ähnlich wie bei der CIM zieht die Aktivierung von Makrophagen und Granulozyten eine Ausschüttung von proinflammatorischen Mediatoren wie TNF- α , Interleukinen, Proteasen, Gerinnungsfaktoren sowie freien Sauerstoffradikalen nach sich, die wiederum unter anderem die Expression von E-Selektin in Endothelzellen induzieren [56]. In Folge dessen steigt die Kapillarpermeabilität und endoneuriale Ödeme können entstehen. Der verminderte Blutfluss und die verlängerte Diffusionsstrecke bewirken schlussendlich eine Minderversorgung des Gewebes mit Sauerstoff und Nährstoffen, die zunächst zu funktionellen Ausfällen des Neurons und im weiteren Verlauf zum Untergang von Nervengewebe führen [23,57]. Es gibt zudem Hinweise darauf, dass Zytokine wie TNF- α und Interleukin-1 α intrazellulär die Atmungskette der

Mitochondrien inhibieren und somit die Energieproduktion zusätzlich reduzieren [58]. Obwohl konkrete Substanzen noch nicht identifiziert werden konnten, gibt es Indizien aus *in vitro*-Experimenten, dass niedermolekulare Substanzen aus dem Blut septischer Patienten direkt in das Endoneurium übertreten und neurotoxisch wirken können [59].

1.3 Die Rolle des Ubiquitin-Proteasom-Systems in der inflammationsvermittelten Muskelatrophie

Im physiologischen Zustand wird die Muskelmasse durch ein ausgeglichenes Verhältnis zwischen Proteinsynthese und Proteinabbau aufrechterhalten. Da der Muskel permanenten mechanischen Belastungen ausgesetzt ist, können so beschädigte Proteine ersetzt werden, ohne dass es dabei zu einer Veränderung der Nettomuskelmasse kommt [60]. Außerdem erlaubt es dem Körper durch einen vermehrten Proteinabbau in Stresssituationen, wie bei einer Sepsis oder einem Trauma, die Bereitstellung von Aminosäuren für die Glukoneogenese sowie die Bildung von Proteinen, welche für eine adäquate Immunantwort und die Energieversorgung erforderlich sind [61,62]. Liegt eine Muskelatrophie vor, ist die Proteinhomöostase gestört. Es kommt zu einem gesteigerten Proteinabbau und einer verminderten Neusynthese. Dies führt unter anderem zum Verlust von Muskelmasse mit resultierender Verringerung der Muskelkraft [60]. Besonders von der Degradation betroffen sind die für die Kontraktion wichtigen Strukturproteine Aktin und Myosin [63].

In Muskelzellen gibt es drei wesentliche Wege, die den Proteinabbau vermitteln. Dazu gehören das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS), der lysosomale Proteinabbau und die zytoplasmatischen nicht-lysosomalen Proteasen (Calpain). Nach dem heutigen Kenntnisstand wird der größte Teil des Proteinabbaus vom UPS realisiert [48,64]. Ubiquitin ist ein kleines Peptid das aus 76 Aminosäuren besteht. Es markiert die Zielproteine für den Proteinabbau durch das 26S-Proteasom. Die Proteindegradation durch das UPS ist ein mehrstufiger Prozess, in dem zunächst die Markierung des abzubauenen Substrates via Ubiquitinierung und anschließend der Abbau durch das 26S-Proteasom erfolgt. Die Ubiquitinierung des abzubauenen Proteins ist ein dreistufiger Vorgang, an dem drei hierarchisch angeordnete Enzyme, ein ubiquitinaktivierendes Enzym (E1), ein ubiquitinkonjugierendes Enzym (E2) und eine Ubiquitinligase (E3) beteiligt sind. Die Kaskade beginnt mit der ATP-abhängigen Aktivierung von Ubiquitin durch E1. Anschließend erfolgt die Übertragung des aktivierten Ubiquitinmoleküls auf E2. Das E3 sorgt für die Substratspezifität und stellt

die Verbindung zu E2 her, damit der Transfer von Ubiquitin auf das abzubauen Substrat erfolgen kann. Durch Wiederholungen des Vorgangs wird eine Polyubiquitinkette gebildet. Das Protein Ubiquitin enthält 7 Lysine (an Position 6, 11, 27, 29, 33, 48, 63 der Aminosäuresequenz), über die weitere Ubiquitinmoleküle an ein bereits gebundenes Ubiquitin verknüpft werden können [65]. Somit sind unterschiedliche Verknüpfungsmöglichkeiten mit Verzweigungen möglich. Man geht bislang davon aus, dass das Degradationssignal zum Abbau des polyubiquitinierten Substrates durch das 26S-Proteasom vor allem durch Ubiquitinketten mit Verbindungen über das Lysin 48 vermittelt wird. Aber auch Verbindungen mit Lysin 11 und Lysin 29 können die Degradation im Proteasom initiieren [66]. Ubiquitinketten, die mit anderen Lysinen verbunden sind, sind an anderen zellulären Prozesse wie zum Beispiel Aktivierung von Transkriptionsfaktoren, DNA-Reparaturmechanismen oder Endozytose beteiligt [67]. Das Proteasom ist ein Proteinkomplex, welches frei im Zytosol und Zellkern vorkommt. Es besteht aus zwei Subeinheiten: einem fassartigen 20S-Kernkomplex mit proteolytischer Aktivität und zwei regulatorischen 19S-Einheiten an den Enden des Fasses, die für die Erkennung und Bindung des polyubiquitinierten Substratproteins zuständig sind (Abb. 2) [68].

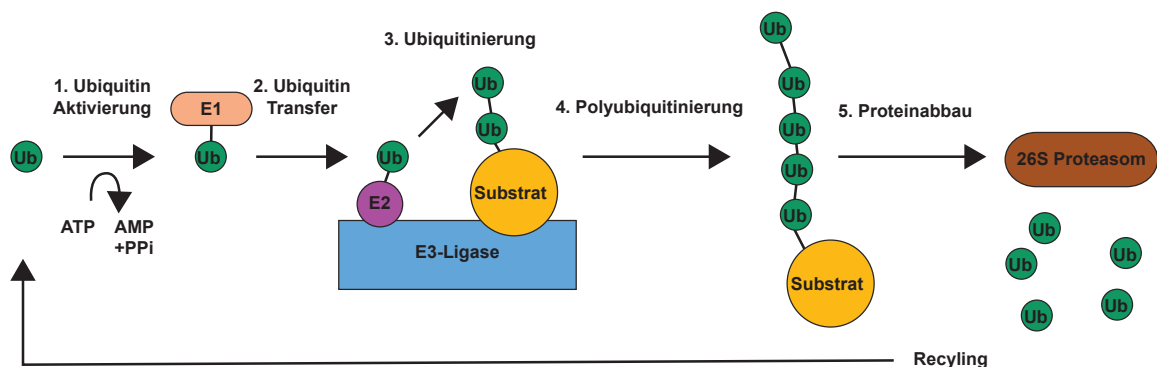


Abb. 2: Die Ubiquitinierungskaskade: (1.) In einer ATP-abhängigen Reaktion erfolgt mittels eines ubiquitinaktivierenden Enzyms (E1) die Ubiquitin-Aktivierung. (2.) Das aktivierte Ubiquitinmolekül wird anschließend auf ein ubiquitinkonjugierendes Enzym (E2) übertragen. (3.) Als nächstes erfolgt der Transfer von Ubiquitin auf ein spezifisches Substrat, das durch die E3-Ligase selektiert wird. (4.) Durch Wiederholungen der Schritte 1-3 entsteht eine Polyubiquitinkette. (5.) Polyubiquitinketten mit mindestens fünf Ubiquitinmolekülen können durch das 26S-Proteasom als Degradationssignal erkannt und anschließend abgebaut werden. Die dabei freigewordenen Ubiquitinproteine können für weitere Abbauprozesse recycelt werden. Ub = Ubiquitin. Abbildung modifiziert nach Kanehisa - „Ubiquitin mediated proteolysis“ [69,70].

Die wichtigste Regulation erfolgt dabei auf der Ebene der E3-Ligasen, da sie alleinig oder als Komplex mit E2-Enzymen das spezifische Substrat erkennen und einen unselektiven Abbau durch das Proteasom verhindern können. Die Tatsache, dass beim Menschen bislang zwei E1- und wenige Dutzend E2-Enzyme, aber mehrere hundert E3-Ligasen identifiziert wurden, unterstreicht die Wichtigkeit der E3-Ligasen in der Substratidentifizierung [71].

Unter den vielen E3-Ligasen konnten in den letzten Jahren einige identifiziert werden, die spezifisch im quergestreiftem Muskelgewebe exprimiert werden und in muskulären Proteinabbauprozessen involviert sind, darunter die E3-Ligase *Muscle RING-finger Protein-1* (MuRF1, codiert durch *Trim63*) und Atrogin1, auch *Muscle Atrophy F-box* (MAFbx, codiert durch *Fbxo32*) genannt, welches zur Gruppe der das F-box-Proteine gehört und ein Bestandteil der E3-Ligasen vom Typ SKP1-cullin-F-box (SCF) ist [72,73]. Im ruhenden Muskel werden *Trim63* und *Fbxo32* nur gering exprimiert. In Tierexperimenten konnte nachgewiesen werden, dass die Expression beider Gene bei einer Reihe von verschiedenen akuten und chronischen Erkrankungen, die mit verstärkter Muskelatrophie einhergehen, wie zum Beispiel Sepsis, Immobilisation, Diabetes, Hunger, Krebs, chronische Niereninsuffizienz, Dexamethasongabe, etc. signifikant ansteigt [72-77]. Auch bei Menschen konnten nach Ruhigstellung von Extremitäten erhöhte MuRF1-Werte im Musculus vastus lateralis gemessen werden [78]. Gleichzeitig sind Mäuse mit einer Keimbahndeletion von *Trim63*, bzw. *Fbxo32* vor einer denervierungsinduzierten Muskelatrophie geschützt [72].

Als E3-Ligase katalysiert insbesondere MuRF1 die Ubiquitinierung von muskulären Strukturproteinen. Es ist am Sarkomer, der motorischen Funktionseinheit des Muskels, lokalisiert und markiert muskuläre Strukturproteine wie Troponin I, Myosin schwere Ketten, Aktin, *Myosin binding protein c* und Myosin leichte Ketten 1 und 2 für den Abbau durch das Proteasom [79]. In Hinblick auf die Reduktion der Myosin schweren Ketten Typ II-Isoform bei CIM-Patienten ist es naheliegend, dass MuRF1 an der Entstehung der Skelettmuskelatrophie, wie sie bei der ICUAW auftritt, beteiligt ist [80,81]. Auch im Herzmuskel spielt MuRF1 eine Rolle in der Entstehung von kardialer Hypertrophie. *Trim63*-Knockout-Tiere zeigen im Vergleich zu Wildtyptieren eine gesteigerte Linksherzhypertrophie nach Ligation der Thoraxaorta (engl. *transverse aortic constriction*, TAC) und sind gegenüber einer Dexamethason-vermittelten kardialen Atrophie geschützt [82,83]. MuRF1 ist daher ein geeigneter Marker für die

Untersuchung von Atrophieprozessen am Herz- und Skelettmuskel und wird in der Literatur auch als „Atrogen“ bezeichnet [84].

1.4 Das angeborene Immunsystem in der Sepsis

Das angeborene Immunsystem ist in der Entstehung der Sepsis maßgeblich involviert und ist wichtig für die Erkennung und Bekämpfung von pathogenen Mikroorganismen. Kommt es zu einer bakteriellen Infektion, werden Pathogen-assoziierte molekulare Muster (engl. *pathogen associated molecular patterns*, PAMPs) wie zum Beispiel Lipopolysaccharid, Flaggelin oder mikrobielle Ribonukleinsäuren und Desoxyribonukleinsäuren von speziellen Rezeptoren als fremd erkannt. Diese Rezeptoren werden als *pattern recognition receptors* (PRRs) bezeichnet und sind unter anderem auf Monozyten, Makrophagen und dendritischen Zellen zu finden [85,86]. Über unterschiedliche Signalwege werden Antigen-präsentierende Immunzellen daraufhin aktiviert und es kommt zur Produktion von proinflammatorischen Zytokinen, Interferonen und Chemokinen sowie zur weiteren Rekrutierung von Makrophagen und Neutrophile an den Ort der Infektion [87]. PRRs sind aber nicht nur in der Lage extrazelluläre Pathogene zu identifizieren, sondern können auch endogene Schädigungsmuster, sogenannte *danger associated molecular patterns* (DAMPs), wie zum Beispiel Hyaluronsäure, Fibrinogen, Harnsäure und Hitzeschockproteine, die bei Gewebeschäden oder beim Zelniedergang frei gesetzt werden, erkennen [88]. Man geht davon aus, dass das die PRPs sowohl eindringende Erreger (PAMPs) als auch die Schäden des Wirtsorganismus (DAMPs), die mit den Pathogenen einhergehen, identifizieren und Apoptosevorgänge sowie Reparaturvorgänge gezielt einleiten können [89]. Darüber hinaus beeinflusst die Bindung der PAMPs/DAMPs an die PRRs ebenfalls die adaptive Immunantwort und trägt maßgeblich zur Entwicklung einer erregergerechten T-Zell-Antwort bei [90].

Es gibt mindestens 5 große PRR-Klassen, welche sich in ihrem Vorkommen, Aufbau, Signaltransduktionsweg und in ihren Liganden unterscheiden. *Toll-like receptors* (Toll-ähnliche Rezeptoren, TLR) und *C-Typ Lectin-Rezeptoren* (CLR) sind in der Regel auf Zelloberflächen und auf Endosomen lokalisiert und dienen der Erkennung von extrazellulären und phagozytierten Pathogenen. *Nucleotide-binding and oligomerization domain-like receptors* (NOD-ähnliche Rezeptoren, NLR), *retinoic acid-inducible protein 1-like* (RIG-I-ähnliche Rezeptoren, RLR) und *absent in melanoma 2-like receptors*

(AIM2-ähnliche Rezeptoren, ALR) sind üblicherweise zytoplasmatische Rezeptoren, die für die Identifizierung von intrazellulären PAMPs/DAMPs verantwortlich sind [86,91].

NLRs gehören neben den TLRs zu den am besten untersuchten Rezeptorgruppen. Beim Menschen wurden bereits mehr als 23 verschiedene zytosolische NLR-Proteine identifiziert, die aus drei Hauptkomponenten aufgebaut sind: eine C-terminale *leucine rich repeats* (LRR), welche an der Identifizierung von PAMPs und DAMPs beteiligt ist, eine zentrale *nucleotide oligomerization domain* (NOD) und eine variable N-terminale Effektor-domäne, die der Signalweiterleitung dient und deswegen maßgeblich entscheidend für die Nomenklatur der NLRs ist [92,93]. Somit lassen sich aktuell fünf Subfamilien unterscheiden: NLRA mit einer *acidic transactivation domain* (AD), NLRB mit einer *baculovirus inhibitory repeat* (BIR), NLRC mit einer *caspase-recruitment domain* (CARD) NLRP mit einer Pyrin-Domäne (PYD) sowie NLRX mit Domäne, die keine Ähnlichkeiten mit den anderen Domänen aufweisen [94].

1.5 NLRP3-Inflammasom und IL-1 β

Unter diesen NLRs sind einige in der Lage, große multimere Proteinkomplexe unter bestimmten Stimuli auszubilden. Diese zytosolischen Proteinkomplexe werden als Inflammasomen bezeichnet und können die Produktion verschiedener Zytokine auf posttranslationaler Ebene regulieren. Neben den NLRs wurde noch das *HIN200 protein absent in melanoma 2* (AIM2) identifiziert, das in Anwesenheit von intrazellulärer doppelsträngiger DNA in der Lage ist, Inflammasome zu bilden [95]. Grundsätzlich ist der Aufbau bei allen Inflammasomen identisch und setzt sich aus drei Grundbestandteilen zusammen: einem Rezeptormolekül, bestehend aus einem NLR oder AIM2, einem Adaptormolekül (engl. *apoptosis-associated speck-like protein*, ASC) und einer Pro-Caspase (Abb. 3) [96]. Caspasen gehören zu den Zymogenen und werden als inaktive Vorstufen synthetisiert, die erst nach spezifischer proteolytischer Spaltung ihre biologische Wirkung entfalten.

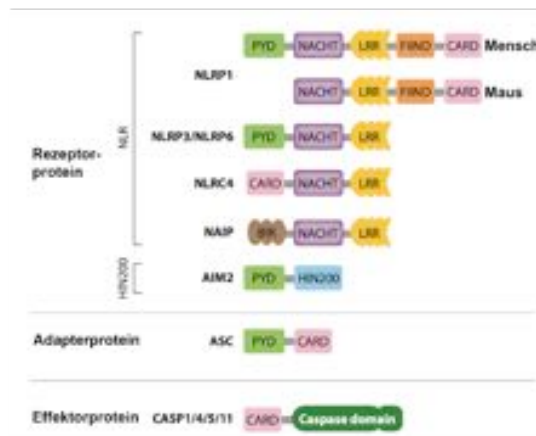


Abb. 3: Beispielhafter Aufbau von Inflammasomen: bestehend aus einem Rezeptorprotein, einem Adapterprotein und einem Effektorprotein [96].

Ausschlaggebend für die Namensgebung des Inflammasoms ist das jeweilige Rezeptormolekül. Insbesondere das NLRP3-Inflammasom wurde bereits intensiv untersucht. Es handelt sich hierbei um ein NLR mit einer N-terminalen Pyrin-Domäne (NLRP3, auch Cryopyrin oder NALP3 genannt), das über das ASC-Protein die Pro-Caspase-1 rekrutiert und ein Inflammasom-Komplex bildet. Durch die Ausbildung des NLRP3-Inflammasom-Komplexes kommt es zu dessen Aktivierung und damit via Autoproteolyse zur Maturierung der Pro-Caspase-1 zur biologisch aktiven Protease Caspase-1 (auch *Interleukin-1 converting enzyme*). Caspase-1 katalysiert die Umwandlung von inaktiven pro-Interleukin-1 β (pro-IL-1 β) und pro-Interleukin-18 (pro-IL-18), die als Präkursorformen in der Zelle synthetisiert werden, in ihre jeweiligen aktiven Formen IL-1 β und IL-18. Beide Zytokine gehören der Interleukin-1-Familie an und sind in pro-inflammatorische Prozesse agonistisch involviert [97,98].

Nach dem aktuellen Wissenstand sind zwei verschiedene Signale erforderlich, um eine Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms auszulösen (Abb. 4). Zunächst ist ein Priming notwendig. Hierfür wird ein nukleärer Faktor- κ B (NF κ B)-Transkriptionsfaktor-aktivierender Stimulus, wie zum Beispiel die Bindung von Lipopolysaccharid an einem TLR, benötigt. Dies induziert eine erhöhte Genexpression mit konsekutiv vermehrtem Proteingehalt von NLRP3 sowie pro-IL-1 β [99]. In neueren *in vitro*-Experimenten konnte außerdem gezeigt werden, dass unabhängig von der Proteinsynthese, das Priming die Deubiquitinierung von zytosolischem NLRP3 auslöst [100]. Neben dem Priming sind bestimmte Aktivierungssignale nötig, um die Oligomerisierung und damit Aktivierung des NLRP3-Inflammasomkomplexes zu induzieren. Zu den Auslösern gehören sowohl endogene Moleküle, wie zum Beispiel Adenosintriphosphat (ATP), Cholesterolkristalle,

β -Amyloid, Harnsäurekristalle, aber auch exogene Pathogene wie Bakterien, Viren und Pilze [101]. Bei der großen Vielfalt von Aktivatoren ist es eher unwahrscheinlich, dass diese alle direkt mit NLRP3 interagieren. Daher wird aktuell davon ausgegangen, dass die unterschiedlichen Aktivatoren eine nachgeschaltete Reaktion vermitteln, welche vom NLRP3 direkt oder indirekt wahrgenommen wird und zur Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms führt [102]. Als mögliche nachgeschaltete Reaktion werden insbesondere folgende Hypothesen diskutiert: ein erniedrigter intrazellulärer Kaliumspiegel, die mitochondriale Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS), mitochondriale DNA (mt-DNA) und des Phospholipids Cardiolipin, die Translokation von NLRP3 zu den Mitochondrien sowie die Freisetzung von Cathepsin aus Lysosomen [103].

Neben der IL-1 β - und IL-18-Maturierung kann die Caspase-1-Aktivierung zur Induktion der Pyroptose führen. Dabei handelt sich, anders als bei der Apoptose, um eine inflammationsbedingte, programmierte Form des Zelltodes, die mit osmotischer Schwellung und Verlust der Zellmembranintegrität einhergeht. Der genaue Mechanismus hierfür ist derzeit noch unbekannt. Das Resultat ist eine Ruptur der Zellmembran und die Freisetzung von proinflammatorischen Molekülen aus dem Zytosol, wie zum Beispiel ATP und das *High-Mobility Group-Protein 1* (HMGB-1). Unter den freigesetzten Molekülen befindet sich aber auch das pro-IL-1 β , welches anschließend von extrazellulären Proteasen maturiert werden kann [104]. Die Pyroptose scheint jedoch nicht Caspase-1 spezifisch zu sein. Es gibt Hinweise darauf, dass auch die murine Caspase-11 (humalog zur menschlichen Caspase-4 und -5) eine Rolle in der Induktion der Pyroptose hat [105].

Eine Fehlregulation dieser Mechanismen infolge eines *NLRP3*-Gendefektes kann gravierende Auswirkungen nach sich ziehen, wie am Beispiel der Cryopyrin-assoziierten periodischen Syndrome (CAPS) deutlich wird. Wegen einer *NLRP3*-Mutation kommt es bei dieser Gruppe von autoinflammatorischen Erkrankungen zu einer unkontrollierten Überproduktion des entzündungsauslösenden und entzündungsverstärkenden Zytokins IL-1 β , welche klinisch in generalisierte Entzündungsreaktionen mit unter anderem Fieber, Urtikaria-artigen Hautausschlägen, Arthritiden und Myalgien resultieren [106].

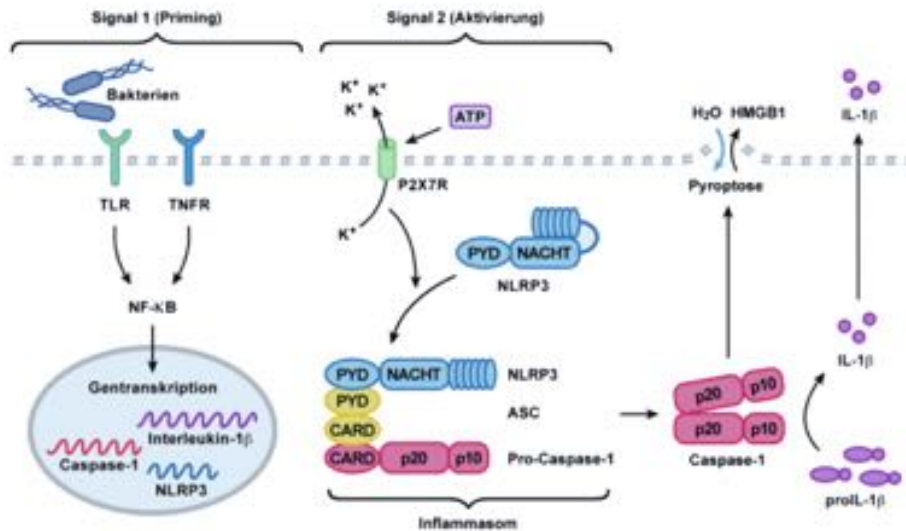


Abb. 4: Regulation der NLRP3-Inflammasom-Aktivierung. Zwei Signale sind für die IL-1 β -Sekretion nötig: Signal 1 führt via spezieller *pattern recognition receptors* (PRRs) zur verstärkten NF κ B-vermittelten Genexpression inflammasomrelevanter Gene (Priming). Signal 2 kann durch unterschiedliche Prozesse wie z. B. einen erniedrigten intrazellulären Kaliumspiegel ausgelöst werden. Das Resultat ist die Formierung des NLRP3-Inflammasomes mit Aktivierung der Caspase-1. Dieses wandelt nicht nur die Zytokine IL-1 β und IL-18 in ihre reife Form um, sondern induziert auch einen als Pyroptose bezeichneten Zelltod [107].

IL-1 β ist ein bedeutendes Schlüsselzytokin in der Pathogenese der Sepsis und wird insbesondere in den frühen Phasen der Sepsis sezerniert [108,109]. Caspase-1-defiziente Mäuse, die kein IL-1 β produzieren, sind im Vergleich zu Wildtypmäusen vor Lipopolysaccharid (LPS)-induziertem toxischen Schock geschützt [110]. IL-1 β wird als 31 kDa großes Vorläuferzytokin produziert und nach proteolytischer Spaltung durch die Caspase-1 als 18 kDa großes, biologisch aktives Enzym sezerniert. Sezerniertes IL-1 β bindet an den membranständigen IL-1-Rezeptor Typ 1 (IL-1R1), welcher neben IL-1 β auch IL-1 α erkennen kann. IL-1R1 besitzt eine zytoplasmatische Toll/IL-1-Rezeptor (TIR)-Domäne. Ist IL-1R1 aktiviert, kommt es dort zur Bindung des Adaptormoleküls myeloider Differenzierungsmarker 88 (MyD88), der wiederum mit den IL-1 assoziierten Kinasen 1 und 4 (IRAK1 und 4) assoziiert. Hierdurch kann sich die E3-Ligase TNF-Rezeptor assoziierter Faktor 6 (TRAF6) anlagern. Der Komplex aus IRAK-1, IRAK-4 und TRAF6 dissoziiert anschließend vom IL-1R1 und aktiviert mit Hilfe eines prä-assoziierten Komplexes, bestehend aus TGF- β -aktivierter Kinase 1 (TAK1) und den zwei Adaptorproteinen *TAK1-Binding Protein-1* (TAB1) und *TAK1-Binding Protein-2* (TAB2), sowohl die I κ B-Kinasen (IKK) als auch die Kinasen des Mitogen-

aktivierten Proteinkinase Signalwegs (MAPK). IKK wiederum leitet die Phosphorylierung des NF κ B-Inhibitors I κ B ein, welches daraufhin ubiquitiniert und durch das Ubiquitin-Proteasom-System abgebaut wird. Der an I κ B gebundene Transkriptionsfaktor NF κ B wird infolgedessen frei und transloziert in den Zellkern, wo er die Transkription seiner Zielgene beeinflusst [97].

Man geht aktuell davon aus, dass verschiedene Zellen des angeborenen Immunsystems, wie Makrophagen, Monozyten und dendritischen Zellen, für den größten Teil der IL-1 β -Produktion verantwortlich sind. Der Effekt von IL-1 β ist dementsprechend sehr pleiotrop: somit initiiert IL-1 β als klassisches Fieberzytokin unter anderem die Produktion von Akute-Phase-Proteinen, die Expression von weiteren Zytokinen und Chemokinen sowie die Rekrutierung von Leukozyten aus der Blutbahn durch die verstärkte Expression von Adhäsionsmolekülen. Neben der Ausbildung eines entzündlichen Gewebsinfiltrats durch das angeborene Immunsystem ist IL-1 β auch in der Regulation des adaptiven Immunsystems involviert und spielt unter anderem in der Induktion und Differenzierung von TH17-Lymphozyten eine Rolle [97]. Außerdem besitzt IL-1 β einen positiven Rückkopplungsmechanismus und kann über den IL-1-Rezeptor die Gentranskription von sich selbst induzieren [111,112].

IL-1 β wird nicht nur aktivierten Makrophagen und anderen Immunzellen sezerniert, sondern findet sich auch in niedriger Konzentration in nicht-immunologischen Geweben wie Muskelzellen. Durch immunhistologische Färbungen konnte gezeigt werden, dass IL-1 nach sportlicher Betätigung oder in inflammatorischen Myopathien vermehrt im Muskelgewebe zu finden ist [113,114]. Rawat *et al.* konnten zeigen, dass auch die Aktivität des NLRP3-Inflammasoms in Skelettmuskelproben von Mäusen mit Dysferlin-defizienter Muskeldystrophie erhöht war und primäre Skelettmuskelzellen nach LPS-Behandlung IL-1 β produzieren [115]. Eine Hochregulation der Genexpressionen von proinflammatorischen Zytokinen wie IL-1 β und Interleukin-6 (IL-6) konnten in *in vivo*-Studien mit LPS-induzierter Sepsis im Zwerchfell und in der Skelettmuskulatur nachgewiesen werden [116].

Die Rolle von NLRP3 in der inflammationsvermittelten Muskelatrophie ist bislang unbekannt. Es gibt im Rahmen von Muskelatrophiestudien Hinweise darauf, dass intravenös appliziertes IL-1 β ein starker Induktor von MuRF1 und von Ubiquitin *in vivo* ist [72,117]. Auch im Zellkulturexperiment induzierte IL-1 β die Expression von *Trim63* und *Fbxo32* in Myozyten [118]. Außerdem fanden sich sowohl erhöhte IL-1 β -Werte im Plasma als auch eine erhöhte MuRF1-Genexpression im Skelettmuskel von

tumortragenden Mäusen mit kachektischem Phänotyp [119]. Darüber hinaus scheint die Gabe eines rekombinanten IL-1-Rezeptorantagonisten zu einer Reduktion, beziehungsweise Normalisierung des Proteinabbaus nach CLP-induzierter Sepsis zu führen [120].

Für die Entstehung der Sepsis ist die NLRP3-abhängige Bildung von IL-1 β durch Caspase-1 besonders wichtig. So sind Caspase-1-defiziente Mäuse vor einem septischen Schock geschützt [110]. Da das im Muskel enthaltene NLRP3 die Synthese und Freisetzung von IL-1 β direkt durch den Muskel ermöglicht, ist die Annahme naheliegend, dass die NLRP3-abhängige IL-1 β -Aktivierung eine Rolle in der Entstehung der inflammationsvermittelten Muskelatrophie spielen könnte. Unterstützt wird diese Hypothese durch die Tatsache, dass *Nlrp3*-KO-Mäuse vor Sepsis geschützt sind [121].

1.6 Fragestellung

Im Rahmen dieser Promotionsarbeit soll die Bedeutung von NLRP3 in der inflammationsvermittelten Muskelatrophie näher untersucht werden. Der Schwerpunkt liegt dabei auf der Untersuchung des muskulären Proteinabbaus über das UPS. In einem *in vitro*-Ansatz soll zunächst der Einfluss von IL-1 β auf die molekularen Prozesse der inflammationsvermittelten Skelettmuskelatrophie untersucht werden. Anschließend werden an Hand der CLP-induzierten Sepsis folgende Arbeitshypothesen *in vivo* untersucht:

1. Konventionelle *Nlrp3*-KO-Mäuse weisen keine morphologische Veränderung der Skelettmuskulatur auf.
2. *Nlrp3*-KO-Mäuse sind vor CLP-induzierter Sepsis im Vergleich zu Kontrolltieren geschützt.
3. *Nlrp3*-KO-Mäuse weisen eine geringere Atrophie der Skelettmuskulatur im Vergleich zu Kontrolltieren auf.
4. Inhibition von *Nlrp3* reduziert die inflammationsvermittelte Aktivierung des UPSs und insbesondere der Ubiquitinligase MuRF1.

Die Erkenntnisse sollen dazu beitragen, die Entstehung von inflammatorischer Skelettmuskelatrophie besser zu verstehen und könnten eine Basis für die Entwicklung neuer Therapieschemata in der Behandlung intensivpflichtiger Patienten darstellen.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte und Labormaterialien

Tabelle 2: Geräte und Labormaterialien

Produkt	Hersteller
96 Well MultiPLY [®] Fast PCR-Platte	Sarstedt AG/Co, Nümbrecht
Adhäsive optisch hochtransparente qPCR Folie	Sarstedt AG/Co, Nümbrecht
CO ₂ -Brutschrank INCOmed	Memmert GmbH + Co. KG, Schabach
Digitaler Messschieber	Tchibo direct GmbH, Hamburg
EHEIM air pump 100	EHEIM GmbH & Co. KG, Deizisau
Elektrophoresekammer BlueMarine [™] 200	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Entwicklerlösung G153	Agfa-Gevaert N.V., Mortsel, Belgien
Entwicklungsmaschine Curix 60	Agfa-Gevaert N.V., Mortsel, Belgien
Ethibond EXCEL [®] 5-0 (P-3)	Johnson & Johnson Medical GmbH, Ethicon, Norderstedt
FastPrep [®] -24-Homogenisator	MP Biomedicals GmbH, Eschwege
Fixierlösung G354	Agfa-Gevaert N.V., Mortsel, Belgien
Fluoreszenzmikroskop CTR 650 HS und Digitalkamera DFC 425	Leica Microsystem GmbH, Wetzlar
Fluoreszenzplattenleser Fluo Star optima	BMG Labtech GmbH, Ortenberg
Hot Plate 062 – Wärmeplatte	Labotect Labor-Technik-Göttingen GmbH, Göttingen
Hybond [™] -ECL Nitrozellulosemembran	GE Healthcare GmbH, Freiburg
Hybond [™] -P PVDF-Membran	GE Healthcare GmbH, Freiburg
Hyperfilm [™] ECL	GE Healthcare GmbH, Freiburg
Inverses Mikroskop	Nikon GmbH, Düsseldorf
Kryostat Leica CM 3050 S	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar
Milli-Q Integral System	Merck KGaA, Darmstadt
Mini Trans-Blot Cell	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Mini-PROTEAN Tetra Elektrophorese System	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Nanodrop1000	Thermo Fischer Scientific Inc., Waltham, MA, USA
Neubauer-Zählkammer	Marienfeld, Lauda-Königshofen
peqSTAR 96 Universal Gradient Thermocycler	PEQLAB Biotechnology GmbH, Erlangen

Power Supply Model 1000/500	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
PowerPac Basic Power Supply	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Precellys Keramikkugeln 2,8 mm	PEQLAB Biotechnology GmbH, Erlangen
Sorvall RT6000D Zentrifuge	Thermo Fischer Scientific Inc., Waltham, MA, USA
SPECTRAMax M5	Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA
Step One Plus Real Time PCR System	Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, USA
Sterican [®] Kanülen (22 G)	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Sterilwerkbank FAZ3	Waldner Electronics GmbH & Co., Gräfelfing
Thermomixer comfort	Eppendorf AG, Hamburg
Univentor 400 – Narkosesystem	Univentor Limited, Zejtun, Malta
UV-Transilluminator	Phase, Lübeck
Wasserbad	GFL Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel, Germany
Zellkulturflasche T-75 cm ²	BD Biosciences, Heidelberg
Zellkulturplatte 6-well	BD Biosciences, Heidelberg
Zentrifuge Avanti J-26XP	Beckman Coulter GmbH, Krefeld
Zentrifuge CT15RE	VWR, Darmstadt

2.1.2 Chemikalien und Reagenzien

Tabelle 3: Chemikalien und Reagenzien

Produkt	Hersteller
2-Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe
2-Propanol	Roth, Karlsruhe
Acrylamid 30 %	Merck KGaA, Darmstadt
Agarose	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Ammoniumpersulfat (APS)	Roth, Karlsruhe
Adenosintriphosphat (ATP)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Calciumchlorid Dihydrat (CaCl ₂ ·2H ₂ O)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Chloroform	Roth, Karlsruhe
cOmplete Protease Inhibitor Cocktail Tablets	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Dexamethason, gelöst in Ethanol 100 %	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
DMEM mit 1 g/l Glukose und L-Glutamin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Eosin Y 1 %	Waldeck GmbH & Co. KG, Münster

Essigsäure	Roth, Karlsruhe
Ethanol 70 %, 99 %	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid 1 %	Roth, Karlsruhe
FastStart Universal SYBR Green Master (Rox)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Fetales Kälberserum (FBS)	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
Forene [®] 100 % (v/v) (Isofluran)	Abbott Laboratories, Green Oaks, IL, USA
Formalin 10 %, in PBS gepuffert	Merck KGaA, Darmstadt
Glycin	Roth, Karlsruhe
Gum Tragacanth	SYNOPHARM GmbH Pharmazeutische Feinchemikalien, Brunsbüttel
Hämatoxylinlösung modifiziert nach Gill II	Merck KGaA, Darmstadt
IL-1 β Mouse ELISA Kit (ab100704)	Abcam, Cambridge, Vereinigtes Königreich
Kaliumacetat	Roth, Karlsruhe
L-Glutamin 200 mM	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
Lithiumcarbonat	Roth, Karlsruhe
LPS von Escherichia coli 0111:B4, gelöst in PBS	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Magermilchpulver	Roth, Karlsruhe
Methanol	Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid (NaCl)	Roth, Karlsruhe
Natriumdeoxycholat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Natriumdodecylsulfat (SDS) Pellets	Roth, Karlsruhe
Natriummethylenamintetraacetat (Na ₂ -EDTA)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Natriumorthovanadat (Na ₃ VO ₄)	Roth, Karlsruhe
Nonidet P-40	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Nuklease-freies Wasser	Qiagen, Hilden
PageRuler Prestained Protein Ladder	Thermo Fischer Scientific Inc., Waltham, MA, USA
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Penicillin/Streptomycin (100x)	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
Phenylmethansulfonylfluorid (PMSF)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Pierce [™] BCA Protein Assay Kit	Thermo Fischer Scientific Inc., Waltham, MA, USA
Proteinase K	VWR, Darmstadt
Random Primers	Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, USA
Rekombinantes Maus Il-1 β , gelöst in H ₂ O	Absource Diagnostics

Ribonukleaseinhibitor RNaseOUT™	Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, USA
Salzsäure (HCl)	Roth, Karlsruhe
Super Signal® West Pico (ECL)	Thermo Fischer Scientific Inc., Waltham, MA, USA
Superfrost Objektträger	VWR International GmbH, Darmstadt
Superscript™ II Reverse Transcriptase	Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, USA
Taq DNA Polymerase	Roboklon GmbH, Berlin
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Roth, Karlsruhe
Toluidinblau	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Tris Base	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Triton X-100	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
TRIzol® Reagenz	Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, USA
Trypsin/EDTA (1x)	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
Tween® 20	Roth, Karlsruhe
Vitro-Clud® Einbettmedium	R. Langenbrinck, Teningen

2.1.3 Antikörper, Oligonukleotide

Tabelle 4: Primärer Antikörper

Name	Herkunft	Hersteller	Verwendete Verdünnung
GAPDH	Maus	Millipore	1 : 5.000 – 1 : 20.000
Gesamtmyosin, MyHC I/II (Klon MF-20)	Maus	Geschenk der AG Spuler	1 : 5.000
Langsames Myosin, MyHC I (Klon NOQ7)	Maus	Sigma	1 : 1.000
Schnelles Myosin, MyHC II (Klon My32)	Maus	Sigma	1 : 1.000
MURF1	Huhn	Geschenk der AG Labeit	1 : 1.000

Tabelle 5: Sekundärer Antikörper

Name	Herkunft	Hersteller	Verwendete Verdünnung
Anti-Huhn IgY HRP	Kaninchen	Abcam	1 : 5.000
Anti-Maus IgG HRP	Pferd	cell signaling	1 : 2.000 – 1 : 5.000

Tabelle 6: Primer für qPCR

Gen	Primersequenz
<i>Fbxo32</i>	Forward 5' – AGTGAGGACCGGCTACTGTG – 3' Reverse 5' – GATCAAACGCTTGCGAATCT – 3'
<i>Gapdh</i>	Forward 5' – ATGGTGAAGGTCGGTGTGA – 3' Reverse 5' – AATCTCCACTTTGCCACTGC – 3'
<i>Il1b</i>	Forward 5' – AGTTGACGGACCCCAAAG – 3' Reverse 5' – AGCTGGATGCTCTCATCAGG – 3'
<i>Il6</i>	Forward 5' – GCTACCAAACCTGGATATAATCAGGA – 3' Reverse 5' – CCAGGTAGCTATGGTACTCCAGAA – 3'
<i>Trim63</i>	Forward 5' – CCTGCAGAGTGACCAAGGA – 3' Reverse 5' – GCGTAGAGGGTGTCAAAC – 3'
<i>Myh2</i>	Forward 5' – AACTCCAGGCAAAAGTGAAATC – 3' Reverse 5' – TGGATAGATTTGTGTTGGATTGTT – 3'
<i>Myh4</i>	Forward 5' – GGAACATGAAATTCAAGCAA – 3' Reverse 5' – ATAGGCAGCCTTGTCAGCAA – 3'
<i>Myh7</i>	Forward 5' – CGCATCAAGGAGCTCACC – 3' Reverse 5' – CTGCAGCCGCAGTAGGTT – 3'
<i>Nlrp3</i>	Forward 5' – CCCTTGAGACACAGGACTC – 3' Reverse 5' – GAGGCTGCAGTTGTCTAATTCC – 3'

2.1.4 Puffer und Lösungen

Wenn nicht anders angegeben, wurden für alle Lösungen und Puffer Reinstwasser aus dem Milli-Q-Wassersystem (Millipore, Eschborn) verwendet.

Tabelle 7: Puffer und Lösungen

Puffer	Zusammensetzung
Lysepuffer für Genotypisierung	100 mM Tris pH 8,5; 5 mM EDTA pH 8,0; 200 mM NaCl; 0,2 % SDS; 0,2 mg/ml Proteinase K
Lysepuffer für Tibiaverdau	50 mM Tris pH 8,0; 100 mM EDTA pH 8,0; 100 mM NaCl; 1 % SDS; 0,5 mg/ml Proteinase K
6x Laemmli Probenpuffer	300 mM TRIS-HCl pH 6,8; 12 % SDS; 0,1 % Bromphenolblau; 50 % Glycerol
Sammelgel 5 %	2,75 ml H ₂ O; 3,3 ml 30 % Acrylamid; 0,5 M Tris pH 6,8; 40 µl 10 % SDS; 40 µl 10 % APS; 4 µl TEMED
Trenngel 10 %	4 ml H ₂ O; 3,3 ml 30 % Acrylamid; 2,5 M Tris pH 8,8; 100 µl 10 % SDS; 100 µl 10 % APS; 4 µl TEMED
Laufpuffer	25 mM Tris; 192 mM Glycin; 0,1 % SDS
Transferpuffer	25 mM Tris; 192 mM Glycin; 10 % Methanol
1x TBST	20 mM Tris; 150 mM NaCl pH 7,6; 0,1 % Tween20
5 % Magermilchpulverlösung	5 g Magermilchpulver in 100 ml 1x TBST
1x RIPA	20 mM Tris-HCl pH 7,6; 150 mM NaCl; 1 mM Na ₂ EDTA; 1 mM EGTA; 1 % Nonidet P-40; 1 % Natriumdeoxycholate; 2,5 mM Natriumpyrophosphat;

	1 mM Na ₃ VO ₄ ; 1 mM PMSF; 1x cOmplete Protease Inhibitor
Phosphatlysepuffer	50 mM Phosphatpuffer pH 7,4; 150 mM NaCl; 1x cOmplete Protease Inhibitor; 0,5 % Triton X-100
Phosphatpuffer	1 M KH ₂ PO ₄ mit K ₂ HPO ₄ auf pH 7,4 titriert
Gum Tragacanth	5 % Gum Tragacanth Pulver, einige Thymolkristalle
Saurer Alkohol	0,8 % Eisessig in 80 % Methanol
Saures Differenzierungsmedium (für 7 Objektträger)	60 ml dH ₂ O; 0,392 g Kaliumacetat; 0,208 g CaCl ₂ -2H ₂ O; pH mit Essigsäure auf 4,4 einstellen und mit dH ₂ O auf 80 ml auffüllen
Tris-Waschpuffer (für 7 Objektträger)	180 ml dH ₂ O; 2,904 g Trizma Base; 0,624 g CaCl ₂ -2H ₂ O; pH mit 10 N Salzsäure auf 7,8 einstellen und mit dH ₂ O auf 240 ml auffüllen
ATP-Inkubationsmedium (für 7 Objektträger)	60 ml dH ₂ O; 0,316 g Glycin; 0,336 g CaCl ₂ -2H ₂ O; 0,304 g NaCl; 0,152 g NaOH; pH mit 10 N Salzsäure auf 9,4 einstellen und mit dH ₂ O auf 80 ml auffüllen; unmittelbar vor Färbung 0,16 g ATP hinzugeben und pH 9,4 überprüfen
1 % CaCl ₂ -2H ₂ O-Lösung (für 7 Objektträger)	240 ml dH ₂ O; 2,4 g CaCl ₂ -2H ₂ O

2.1.5 Versuchstiere

Die verwendeten Wildtyp- und *Nlrp3*-Knockout-Mäuse mit dem genetischen Hintergrund der C57BL/6J-Mauslinie stammen von der Arbeitsgruppe Fasel aus der Universität Lausanne [122]. Sie wurden unter standardisierten Bedingungen des MDC-Berlins mit konstantem Tag/Nacht-Zyklus, Raumtemperatur und Luftfeuchtigkeit im keimfreien Bereich gehalten und gezüchtet und erhielten jederzeit freien Zugang zu Futter und Wasser. Alle Experimente erfolgten nach den Richtlinien des deutschen Tierschutzgesetzes und wurden vom Landesamt für Gesundheit und Soziales Berlin (LAGeSo) unter dem Aktenzeichen G 020713 genehmigt.

2.1.6 Zelllinie

Alle zellulären Experimente wurde mit den murinen C2C12-Zellen von der Firma ATCC (LGC Standards GmbH, Wesel) durchgeführt. Dabei handelt es sich um eine adhärente C3H-Maus-Skelettmuskelmyoblasten-Zelllinie, welche die Fähigkeit besitzt, unter bestimmten Voraussetzungen zu Myotuben zu differenzieren.

2.2 Methoden

2.2.1 Zellbiologische Methoden

2.2.1.1 Kultivierung von C2C12-Zellen

Die murinen C2C12-Skelettmuskelmeyoblasten wurden in Basismedium (Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) mit 1 g/l Glucose, 10 % FBS, 2 mM L-Glutamin, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin) bei 37 °C und 5 % CO₂-Gehalt kultiviert. Die Zellen wurden bei Erreichen von maximal 80 % Konfluenz passagiert. Dazu wurden die Zellen nach einmaligem Waschen mit PBS mit 2 ml Trypsin/EDTA bei 37 °C für 5 min abgelöst. Zur Inaktivierung von Trypsin wurde 8 ml Basismedium hinzugefügt und die Zellsuspension anschließend bei Raumtemperatur für 3 min bei 700 x g zentrifugiert. Nach dem Absaugen des Überstands wurde das dabei gewonnene Sediment in Basismedium resuspendiert und nach einer Verdünnung von 1:10 bis 1:20 je nach geplantem Experiment subkultiviert.

2.2.1.2 Zellzahlbestimmung in der Neubauer-Zählkammer

Die Bestimmung der Zellzahl für geplante Zellkulturexperimente erfolgte in Neubauer-Zählkammern. Dafür wurde eine Zellsuspension aus kultivierten C2C12-Myoblasten hergestellt (s. Kapitel 2.2.1.1). Das Befüllen der Zählkammer mit etwa 10 µl Zellsuspension wurde durch die Kapillarkräfte zwischen dem Deckplättchen und der Neubauer-Zählkammer bewirkt. Anschließend wurden die vier großen Quadrate unter dem Mikroskop ausgezählt und die Zellzahl nach der folgenden Formel determiniert:
$$\text{Zellzahl / ml} = \text{Anzahl der gezählten Zellen} / 4 \times 10^4$$

2.2.1.3 Differenzierung von C2C12-Zellen

Für die Differenzierung von C2C12-Myoblasten zu Myotuben wurden 100.000 Zellen pro Vertiefung in 6-well-Zellkulturplatten ausgesät. Bei mindestens 90 % Konfluenz der Zellen wurde die Differenzierung durch Ersetzen des Basismediums durch das Differenzierungsmedium (DMEM, 2 % FBS, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin) initiiert. Beginnend mit Tag 3 konnte die Formation von Myotuben beobachtet werden. Ein täglicher Mediumwechsel hielt die fortschreitende Differenzierung aufrecht.

2.2.1.4 Stimulationsexperimente mit C2C12-Zellen

Im ersten Ansatz wurden für die Genexpressionsuntersuchungen 8 Tage lang differenzierte Myotuben verwendet. Diese wurden für 2, 4, 8 und 24 Stunden mit Il-1 β (10 ng/ml) im Differenzierungsmedium stimuliert. Zusätzlich wurde eine Atrophie-Kontrollbehandlung mit Dexamethason (10 μ M/ml) und eine weitere Kontrollbehandlung mit Lipopolysaccharid (1 μ g/ml) durchgeführt, um Inflammations-reaktionen während des Experiments im Vergleich beurteilen zu können [123,124]. Als Referenz für die relative Quantifizierung der Genexpression dienten zu jedem Zeitpunkt unbehandelte Myotuben.

Für die Beurteilung der Tubenmorphologie und der Proteinanalyse wurden in einem zweiten Ansatz Myotuben ebenfalls 8 Tage lang differenziert und anschließend für 72 Stunden mit Il-1 β (10 ng/ml, 20 ng/ml und 50 ng/ml), LPS (1 μ g/ml) und Dexamethason (10 μ M) im Differenzierungsmedium behandelt. Hier wurde nach 24 Stunden immer erneut stimuliert, um dem Stimulanzienverbrauch und -abbau entgegenzuwirken. Zusätzlich wurde die langfristige Wirkung des jeweiligen Solvens auf die Atrophieinduktion untersucht, um zusätzliche Effekte auszuschließen. Somit dienten unbehandelte Myotuben der Il-1 β -Behandlung als Kontrolle. Für LPS und Dexamethason wurde das jeweilige Solvens (PBS, bzw. Ethanol) in äquivalenten Volumen eingesetzt.

2.2.2 Tierexperimentelle Methoden

Die tierexperimentellen Arbeiten (Genotypisierung, CLP-Operation, Visitation der Versuchstiere und Organentnahme) wurden in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. med. Jens Fielitz gemeinsam durchgeführt.

2.2.2.1 Genotypisierung der Versuchstiere

Zur genotypischen Identifizierung der verpaarten Knockout-Mäuse wurde eine Polymerase-Kettenreaktion (PCR) zum spezifischen Nachweis der wildtypischen Allele beziehungsweise Knockout-spezifischen Allele durchgeführt. Die dafür benötigte genomische DNA wurde aus Ohrbiopsien der Versuchstiere gewonnen. Zusätzlich wurde der Genotyp aller Versuchstiere nach Abschluss des Experiments verifiziert. Hierfür wurde die identische PCR mit DNA-Lysaten aus 0,5 cm großen Schwanzbiopsien wiederholt. Die Biopsate wurden für 12 Stunden bei 55 °C in 50 μ l Lysepuffer für Genotypisierung inkubiert und anschließend für 45 min auf 85 °C erhitzt. Nach Abkühlen der Proben auf Raumtemperatur wurden diese 1:100 für Ohrbiopsien,

beziehungsweise 1:200 für Schwanzbiopsien mit Wasser verdünnt und anschließend kurz abzentrifugiert, um lose Gewebsreste und Haare zu entfernen. Die erhaltenen Überstände (= Lysate) wurden bis zur weiteren Verarbeitung bei 4 °C gelagert. Der Mastermix für den PCR-Ansatz enthielt pro Ansatz:

- 2,5 µl Puffer C (10x)
- 0,2 µl Desoxyribonukleosidtriphosphate (= dNTP's; 10 mM)
- 0,3 µl Taq DNA Polymerase
- 0,5 µl Vorwärtsprimer (5 pmol/µl)
- 0,5 µl Rückwärtsprimer (je 5 pmol/µl)
- 19,5 µl Wasser.

Die verwendeten Primerpaare im Mastermix sind in Tabelle 8 aufgelistet. Als Negativkontrolle wurde Wasser verwendet.

Tabelle 8: Primer zur Genotypisierung der Versuchstiere. bp = Basenpaare.

Mauslinie	Primersequenz	Länge des PCR Produkts
<i>Nlrp3</i> -WT	5' – TCAAGCTAAGAGAACTTTCTG – 3' 5' – ACACTCGTCATCTTCAGCA – 3'	250 bp für WT-Allel
<i>Nlrp3</i> -KO	5' – TCAAGCTAAGAGAACTTTCTG – 3' 5' – AAGTCGTGCTGCTTCATGT – 3'	500 bp für KO-Allel

Pro Reaktionsansatz wurde zum vorgelegten Mastermix noch 1,5 µl von der vorverdünnten DNA-Lysat-Lösung zugefügt. Jedes Tier wurde sowohl auf das WT- als auch auf das KO-Allel mit dem in Tabelle 9 dargestellten PCR-Programm untersucht.

Tabelle 9: PCR-Programm zur Genotypisierung der Versuchstiere. ∞ = unendlich.

	Temperatur [°C]	Dauer	Anzahl der Zyklen
Initiale Denaturierung	95	5 min	
Denaturierung	95	45 sec	40x
Anlagerung	55	30 sec	
Elongation	72	40 sec	
Letzte Elongation	72	5 min	
Lagerung	8	∞	

Abschließend wurden die PCR-Produkte auf einem 1,2 %igen Agarosegel mit 4 % Ethidiumbromid bei 150 Volt aufgetrennt und in einem UV-Transilluminator visualisiert und dokumentiert (Abb. 5).

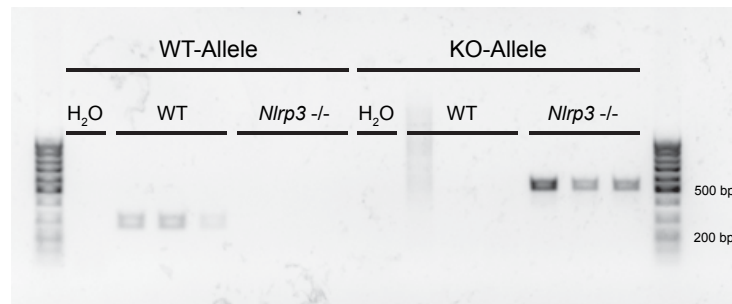


Abb. 5: Agarosegel einer PCR-Genotypisierung. Dargestellt ist eine exemplarische PCR-Auswertung. Überprüfung des WT- und KO-Allels von 3 WT- (Spur 2-4 und 9-11) und 3 *Nlrp3*-KO-Tieren (Spur 5-7 und 12-14) mit jeweiliger Wasserkontrolle (Spur 1 und 8). WT-Allel wird bei 250 bp (Basenpaare) und KO-Allel bei 500 bp erwartet.

2.2.2.2 Sepsisinduktion in den Versuchstieren

Für die Induktion von Sepsis in den Versuchstieren wurde die Methode der Zökumligatur mit nachfolgender Punktion (CLP) verwendet. Dazu wurden ausschließlich männliche Geschwistertiere im Alter von 12–16 Wochen eingesetzt.

Zwei Tage vor Versuchsbeginn wurden sie zur Eingewöhnung in die neue Umgebung von dem weißen keimfreien Bereich, der ausschließlich der Zucht dient, in den grauen keimreduzierten Bereich des MDC-Tierhauses transferiert. 30 Minuten vor Operation bekamen die Tiere präemptiv einmalig Metamizol (200 mg/kg KG) subkutan gegen den Wundschmerz appliziert. Zur Narkoseeinleitung wurde das Tier in eine Kleintier-narkoskammer gesetzt, die zuvor mit einem 2-3 %igen Isofluran-Fischluftgemisch (Fluss: 350 ml/min) angereichert wurde. Die Narkoseerhaltung wurde während der gesamten Prozedur per Maske sichergestellt. Nach Prüfung der vollständigen Sedierung, durch das Fehlen des Zwischenzehreflexes, wurde das Tier in Rückenlage auf einer Wärmeplatte (37 °C) fixiert. Als nächstes erfolgte die Desinfizierung des Abdomens mit 70 %igem Ethanol. Anschließend wurde zunächst die Haut und dann das Peritoneum via mediane Laparotomie um etwa 1,5 cm eröffnet. Vorsichtig und ohne umliegende Strukturen zu schädigen, wurde das Zökum aufgesucht und aus der Bauchhöhle mobilisiert. Nach eindeutiger Identifizierung der Ileozökalklappe wurde das Zökum distal dieser im mittleren Drittel mit einem 6-0 Ethibond-Faden ligiert und der Zökumapex mit einer 22 G-Kanüle auf der antimesenterialen Seite einmal punktiert. Nach visuellem Ausschluss von Blutungen wurde der Darm anschließend reponiert und

0,5 ml auf 37 °C vorgewärmte isotone NaCl-Lösung zur Volumensubstitution in die Bauchhöhle appliziert. Abschließend wurde sowohl das Peritoneum, als auch die Haut durch Einzelknopfnähte mit 6-0 Ethibond-Fäden verschlossen. Die Sham-operierten (*sham* = engl. Vortäuschung) Tiere, welche als Kontrollgruppe dienten, erhielten die gleiche Behandlung ohne Ligatur und Punktion. Um die Tiere vor einer etwaigen Hypothermie zu schützen, wurden sie nach der Operation während der Aufwachphase mittels Rotlichtlampe weiterhin warm gehalten und bis zur vollständigen Mobilisierung kontinuierlich überwacht. Postoperativ erfolgte eine regelmäßige Visitation der Tiere und eine dreimal tägliche Gabe von Metamizol (200 mg/kg KG) subkutan als Schmerztherapie. Der Versuchsaufbau wurde in dargestellt.

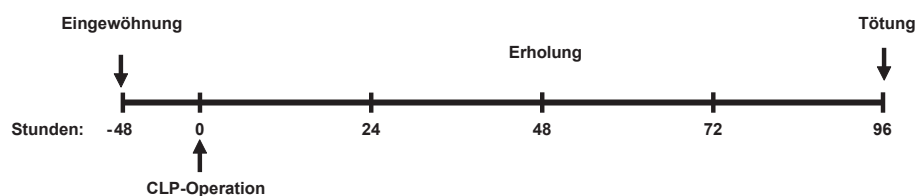


Abb. 6: Schematische Übersicht des Versuchsaufbaus. Nach einer 48-stündigen Eingewöhnung, erfolgte die CLP- und Sham-Operationen zum Zeitpunkt Null. Danach folgte eine Erholungsphase, in der die Entwicklung und Ausbreitung der multimikrobiellen Sepsis stattfand. Nach 96 Stunden wurden das Experiment beendet und die Tiere mittels zervikaler Dislokation getötet.

2.2.2.3 Muskel- und Organentnahme

96 Stunden nach der CLP-Operation wurden die Tiere mittels zervikaler Dislokation getötet und anschließend gewogen. Die Skelettmuskeln *Mm. gastrocnemius/plantaris* (GP), *M. tibialis anterior* (TA), *M. soleus* (SOL) und *M. extensor digitorum longus* (EDL) des einen Hinterlaufs wurden entnommen, gewogen und in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bei -80 °C bis zur weiteren Analyse gelagert. Skelettmuskelproben des anderen Hinterlaufs, die für die histologischen Analysen vorgesehen waren, wurden in Gum Tragacanth eingebettet, in Stickstoff gekühltem Isopentan vorgekühlt und anschließend ebenfalls bei -80 °C gelagert. Zusätzlich wurden Herz, Lunge, Leber, Milz und beide Nieren entnommen, gewogen, schockgefroren, bzw. eingebettet und bei -80 °C gelagert. Zur Gewinnung von Serumproben wurde eine Punktion des Herzens mit nachfolgender Aspiration des Blutes mit einer Kanüle durchgeführt. Die geronnenen Blutproben wurden abschließend bei 1000 x g für ca. 1-2 min zentrifugiert, um die zellulären Bestandteilen abzutrennen. Der Überstand wurde in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und bei -20 °C gelagert. Alle Gewichte wurden zur

Normalisierung auf die Tibialänge bezogen. Dafür wurde ein Unterschenkel über Nacht in Lysepuffer für Tibiaverdau bei 55 °C inkubiert. Nach Entfernung von anhaftenden Geweberesten wurde die Länge der Tibia in Millimetern vermessen.

2.2.3 Molekularbiologische Methoden

2.2.3.1 RNA-Isolation aus Mausgeweben und kultivierten Zellen

Für die RNA-Isolierung der Gesamt-RNA aus Mausgewebe wurde ein stecknadelkopfgroßes Stück Gewebe in 1 ml TRIzol®-Reagenz aufgenommen und unter Verwendung von Keramikkügelchen im FastPrep®-24-Homogenisator mit 4 m/s für zweimal 1 min homogenisiert. Danach wurde das Homogenat in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und nach Herstellerangaben weiter verarbeitet.

Zur Extraktion von RNA aus kultivierten Zellen wurde direkt nach Ende des jeweiligen Experiments 1 ml TRIzol®-Reagenz pro Vertiefung einer 6-well-Zellkulturplatte dazugegeben und unter Bewegung für 1 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Proben wurden danach für mindestens 6 Stunden bei -80 °C eingefroren, bevor eine weitere Bearbeitung erfolgte. Nach dem Auftauen wurde die Probe aus der Platte in ein neues Reaktionsgefäß überführt und ebenfalls entsprechend der Herstellerangaben aufgearbeitet. Die Resuspension der RNA erfolgte für Gewebe in 30 µl und für Zellen in 50 µl RNAsen-freiem Wasser. Die Quantifizierung der RNA-Konzentrationen in den Proben erfolgte anschließend mit Hilfe eines Nanodrop-Spektrophotometers. Dieser erzeugt eine Flüssigkeitssäule zwischen den Messelektroden und misst die Lichtabsorption bei der Wellenlänge $\lambda=260$ nm. Anhand des Lambert-Beerschen Gesetzes kann danach die RNA-Konzentration ermittelt werden.

2.2.3.2 Reverse Transkription (cDNA-Synthese)

Da die RNA wegen ubiquitären RNAsen äußerst instabil ist, wurde ein komplementärer DNA-Strang (cDNA) für weitere Arbeitsschritte synthetisiert. Je nach Ausgangskonzentration wurden 500-1000 ng RNA für die reverse Transkription eingesetzt. Für die Anlagerung der Random Primer an die RNA wurde je Reaktionsansatz zunächst die gewünschte Menge RNA, Nuklease-freies Wasser (ad 10 µl), 1 µl Random Primers und 1 µl dNTPs (10 mM) für 5 min auf 65 °C erhitzt und anschließend für mindestens 5 min auf Eis abgekühlt. Währenddessen wurde ein weiterer Mastermix hergestellt, welcher der Synthese der cDNA diente. Dieser enthielt pro Ansatz:

- 4 µl First Strand Buffer (5x)

- 2 µl DTT (= Dithiothreitol; 0,1 M)
- 1 µl RNaseOUT™ (40 units/µL)
- 1 µl SuperScript™ II RT (200 U)

Nach der Zugabe des Mastermixes wurden die Proben vorsichtig gemischt und kurz abzentrifugiert. Die cDNA-Synthese erfolgte anschließend im peqSTAR 96 Universal Gradient Thermocycler nach dem in Tabelle 10 aufgeführten Programm. Die neu hergestellte cDNA wurde für den unmittelbaren Gebrauch bei 4 °C und für die Langzeitlagerung bei -20 °C aufbewahrt.

Tabelle 10: PCR-Programm für die Reverse Transkription. ∞ = unendlich.

Temperatur	Dauer
25 °C	12 min
42 °C	50 min
70 °C	15 min
8 °C	∞

2.2.3.3 Quantitative Polymerase-Kettenreaktion (qPCR)

Die quantitative Polymerase-Kettenreaktion (qPCR) mit FastStart Universal SYBR Green Master erlaubte, neben einer herkömmlichen Vervielfältigung, die Quantifizierung von PCR-Produkten direkt nach jedem Vermehrungszyklus (in Echtzeit). Dies erfolgte über die Fluoreszenzmessung des Farbstoffes SYBR-Green, das spezifisch an doppelsträngiger DNA bindet und dessen Fluoreszenzintensität mit der Menge der Amplifikate korrelierte. Die Genauigkeit der qPCR war der Endpunktbestimmung deutlich überlegen, da die Detektion während der frühen exponentiellen Phase der Amplifikation mit den optimalen Reaktionsbedingungen erfolgte und damit weniger Störfaktoren wie zum Beispiel Reagenzienverbrauch ausgesetzt war. Zusätzlich gab die Messung nach jedem Zyklus die Reaktionskinetik wieder und ermöglichte somit eine Aussage zur DNA-Ausgangsmenge. Für die qPCR wurden Doppelbestimmungen mit folgendem Ansatz je Probe durchgeführt:

- 10 µl FastStart Universal SYBR Green Master
- 0,8 µl Vorwärtsprimer (5 pmol/µl)
- 0,8 µl Rückwärtsprimer (5 pmol/µl)
- 6,4 µl Nuklease-freies Wasser

- 10 ng cDNA-Template

Als Negativkontrolle diente Nuklease-freies Wasser. Die qPCR erfolgte nach dem in Tabelle 11 abgebildeten Zeit-Temperatur-Profil.

Tabelle 11: Programm für die qPCR.

	Temperatur [°C]	Dauer	Anzahl der Zyklen
Initiale Denaturierung	95	10 min	
Denaturierung	95	15 sec	40x
Anlagerung und Elongation	60	1 min	
Schmelzkurve	0,3 °C/s ansteigend bis 95 °C		

Mit einer Schmelzkurve nach jedem qPCR-Lauf wurde die Spezifität der PCR-Produkte überprüft und etwaige Primerdimerbildungen ausgeschlossen.

Für die Auswertung wurde eine relative Quantifizierung mit Standardkurven (cDNA-Verdünnungsreihe) durchgeführt. Zu diesem Zweck wurden jeweils 5 µl cDNA aller Proben eines Experiments gepoolt und dann seriell 1:2 verdünnt. Diese Verdünnungsreihe mit unbekannter Ausgangskonzentration wurde anschließend sowohl für die untersuchten Zielgene als auch für eine endogene Kontrolle (Housekeeping-Gen) in jedem qPCR-Lauf amplifiziert. Aus diesen Bezugswerten wurden dann jeweils mit der Software StepOne™ (Version 2.3, Life Technologies Corporation, Carlsbad, California, USA) für jedes Gen relative Standardkurven generiert und die Genmenge der Proben errechnet. Um Unterschiede in der eingesetzten cDNA-Menge auszugleichen, wurden die Zielgenexpression auf die Expression des Housekeeping-Gens normalisiert. Für die vorliegende Arbeit wurde das Housekeeping-Gen Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) verwendet, welches in unserer Arbeitsgruppe für das Sepsismodell als valides Housekeeping-Gen getestet worden war. Die errechneten Genmengen stellten keine Absolutwerte dar. Um mehrere Proben trotzdem miteinander vergleichen zu können, wurden die normalisierten mRNA-Werte der Proben zusätzlich auf einen sogenannten Kalibrator bezogen. Dabei handelte es sich um interne Kontrollen des Experiments, wie zum Beispiel unbehandelte Zellen. Die Genwerte des Kalibrators wurden ebenfalls auf *Gapdh* normalisiert und dann gleich 1 gesetzt, sodass die Proben später als deren Vielfaches dargestellt wurden. Somit konnten unterschiedliche Proben trotz mangelnder Absolutwerte miteinander verglichen werden.

2.2.3.4 Proteinisolation

Zur Extraktion von Proteinen aus Mausgewebe wurde je ein stecknadelkopfgroßes Stück Gewebe in 500 µl 1x RIPA ohne Natriumdesoxycholat aufgenommen und unter Verwendung des FastPrep®-24-Homogenisator für zweimal 1 min durch Keramik-kügelchen homogenisiert. Die Proben wurden anschließend 5-10 min zur Reduktion der Schaumbildung auf Eis stehen gelassen. Danach wurde 450 µl des Homogenisats in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß mit bereits 50 µl Natriumdesoxycholat (10 %) überführt, gut gemischt und dann für 30 min auf Eis inkubiert. Die Proben wurden anschließend bei 15.000 x g für 20 min zentrifugiert, um unlösliche Zellbestandteile abzutrennen. Der Überstand wurde in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und die Proteinkonzentration mit dem PierceTM BCA Protein Assay Kit nach Herstellerangaben bestimmt.

Für die Protein-Isolierung aus kultivierten Zellen wurde der Phosphatlysepuffer zum Zellaufschluss und Lösen der zytoplasmatischen Proteinen genutzt. Hierbei bleiben die Zellkerne intakt und die Kontamination mit genomischer DNA wird verhindert.

Dafür wurden direkt nach Ende des jeweiligen Experiments 200 µl des Phosphatlysepuffers in jede Vertiefung einer 6-well-Platte pipettiert und bei -80 °C eingefroren. Nach dem Auftauen wurden die Zellen abgeschabt und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Die anschließende Inkubation mit dem Lysepuffer fand auf einem Drehrad mit 15 rpm/min bei 4 °C statt. Die Proben wurden dann bei 15.000 x g für 15 min zentrifugiert um unlösliche Zellbestandteile abzutrennen. Der Überstand und die Pellets wurden danach getrennt bei -80 °C eingefroren.

2.2.3.5 SDS-PAGE und Western Blot

Die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE) diente der Auftrennung von Proteingemischen anhand ihrer Größe in einem Polyacrylamidgel. Die aufgetrennten Proteinbanden wurden im nächsten Schritt durch ein senkrecht zum Gel angelegtes elektrisches Feld auf eine Nitrozellulose- oder PVDF-Membran geblottet und konnten durch Antikörperbindungen spezifisch detektiert werden. Ein Sekundärantikörper, an den ein Enzym gekoppelt war, erlaubte nach Substratgabe die Visualisierung des spezifischen Zielproteins.

Für die Gelelektrophorese wurden gleiche Mengen von Protein mit 6x Laemmli-Probenpuffer versetzt und für 10 min bei 95 °C denaturiert. Die Auftrennung der Proteine erfolgte zunächst bei 80 Volt im 5 %igen Sammelgel und später bei 160 V im

10 %igen Trenngel. Nachdem alle Bestandteile des Blots im Transferpuffer äquilibriert wurden, wurden das Trenngel und die Nitrozellulose-, beziehungsweise PVDF-Membran luftblasenfrei zwischen 4 Whatman-Filterpapieren und 4 Kunststoffschwämmen in eine Transferkassette gebettet (je 2 Filterpapiere und Schwämme pro Seite). Die PVDF-Membranen wurden zuvor mit Methanol aktiviert. Anschließend wurden im Tank-Blot-System die aufgetrennten Proteine bei 100 Volt für 75 min lang aus dem Gel auf die Membran geblottet. Um freie Bindungsstellen auf der Membran zu blockieren, wurde die Membran nach dem Transfer 1 Stunde bei Raumtemperatur mit 5 %iger Magermilchpulverlösung auf einem Rollmischer inkubiert. Die Inkubation mit dem Primärantikörper fand bei 4 °C über Nacht auf einem Rollmischer statt. Zur Entfernung überschüssiger Antikörper wurde die Membran dreimal in 1x Tris-Puffer mit 0,1 % Tween 20 (1x TBST) gewaschen und anschließend mit einem Meerrettich-Peroxidase (engl. *horseradish peroxidase*, HRP)-gekoppelten Sekundärantikörper für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einem erneuten dreimaligen Waschprozess wurde die spezifische Antikörperbindung mit dem Super Signal®-Chemilumineszenzsystem, nach Angaben des Herstellers, sichtbar gemacht und auf Röntgenfilmen dokumentiert. Als Ladekontrolle wurde das Enzym GAPDH verwendet, welches auf derselben Membran nachgewiesen wurde. Für die Differenzierung der einzelnen MyHC-Isoformen, insbesondere der Isoformen MyHC-IIA, -IIB und -IIC, mittels Western Blot sind spezielle niedrigprozentige Trenngele erforderlich [125]. In dieser Arbeit wurde auf eine derartige Subspezifizierung verzichtet. Die Verwendung spezifischer Antikörper erlaubt dennoch die Quantifizierung des Proteingehalts von MyHC I und des globalen MyHC II, sowie entsprechender Atrophie-bedingter Veränderungen im Western Blot. Die im Western Blot detektieren Doppelbanden sind auf Kreuzreaktionen der primären Antikörper zurückzuführen und wurden durch den Hersteller und in Publikationen anderer Arbeitsgruppen beschrieben. Diese Blots erlauben weder die Identifikation von spezifischen Myosinisoformen noch deren Quantifizierung [126-128].

2.2.4 Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Enzyme linked immunosorbent assay ist eine Methode zur Bestimmung von Antigenkonzentrationen. Die ELISA-Messungen der Serumproben wurden entsprechend der Anleitungen des Hersteller Abcam (ab100704) durchgeführt. Dabei waren spezifische

Antikörper gegen das gesuchte Antigen chemisch fest am Boden einer 96-well Platte verbunden. Nach Hinzugabe der Proben wurde ein Sekundärantikörper zur Detektion des Antigens hinzugefügt. An diesem Sekundärantikörper war ein Enzym konjugiert, welches nach Substratgabe einen Farbnachweis erlaubte. Für die photometrische Auswertung wurde das Plattenlesegerät SPECTRAMax M5 bei einer Wellenlänge von 450 nm verwendet. Die Antigenkonzentrationen ließen sich anschließend an Hand einer ebenfalls mitlaufenden Standardreihe mit bekannten Konzentrationen berechnen.

2.2.5 Histologische Färbungen und Auswertung

Für die histologische Analyse wurden Kryostatschnitte mit einer Dicke von 6 µm angefertigt und auf Superfrost-Objektträger aufgebracht. Die Schnitte wurden über Nacht bei Raumtemperatur luftgetrocknet und bis zur weiteren Färbung bei -20 °C gelagert. Die Herstellung der histologischen Schnitte und deren Färbungen wurden mit Unterstützung von Fr. S. Schmidt durchgeführt.

2.2.5.1 Hämatoxylin- und Eosin-Färbung (HE-Färbung)

Als Standardübersichtsfärbungen wurden HE-Färbungen der Gewebsschnitte angefertigt. Grundlage für diese Methode war die unterschiedliche Anfärbung von Zellstrukturen mit zwei Farbstoffen. Dabei wurden saure Bestandteile der Zelle (z. B. Zellkerne, Ribosomen) durch Hämatoxylin blau und basische Anteile (z. B. Zytoplasma, Kollagen) durch Eosin rot gefärbt. Das verwendete Färbeprotokoll wurde in Tabelle 12 beschrieben.

Tabelle 12: Protokoll für die HE-Färbung von Gewebeschnitten

Schritt	Zeit
Fixierung in 10 % gepuffertem Formalin	1 min
Spülen in Leitungswasser	kurzes Spülen, dabei Schnitte bewegen
Kernfärbung mit Hämatoxylinlösung	1 min
Bläuen im warmen Leitungswasser	4 min, dabei Schnitte bewegen
Differenzieren in saurem Alkohol	2x 30 sec
Spülen in Leitungswasser	kurzes Spülen, dabei Schnitte bewegen
Intensivierung der Bläuung in 2,5 % gesättigtem Lithiumcarbonat	10 sec
Fixierung in Methanol (80 %)	10x eintauchen
Fixierung in Methanol (100 %)	10x eintauchen

Färben in Eosin Lösung 0,5 % alkoholisch	3 min
Entwässern in Ethanol 100 %	3x, je 10x eintauchen
Klären mit Xylol	3x, je 10x eintauchen
Eindecken mit Vitro-Clud® Einbettmedium	

2.2.5.2 Metachromatische ATPase-Färbung von Myosin

Zum Nachweis der unterschiedlichen Fasertypen und einer etwaigen veränderten Faserkomposition nach Schädigung wurde eine ATPase-Färbung durchgeführt. Hierbei machte man sich zunutze, dass unterschiedliche Fasertypen unterschiedliche ATPase-Isoformen besitzen. Dabei wurden säurestabile und basenstabile ATPasen unterschieden, deren Aktivität von unterschiedlichen pH-Werten gehemmt wurden. Eine saure Präinkubation bewirkte, dass Typ-I-Fasern mit säurestabiler ATPase dunkler und Typ-II-Fasern mit säurelabiler ATPase heller gefärbt wurden. Umgekehrt wurde bei einer Inkubation bei pH 9,4 die Aktivität der basenlabilen ATPase in Typ-I-Fasern gehemmt und damit heller und Typ-II-Fasern mit basenstabiler ATPase dunkler gefärbt. Die Subklassifizierung der Typ-II-Fasern erfolgte ebenfalls im sauren pH-Bereich. In der vorliegenden Arbeit wurde mit Toluidineblau nachgefärbt, sodass sich Typ-I dunkelblau, Typ-IIA türkis-hellblau und Typ-IIB/IIIX-Fasern in einem mittleren Blauton darstellten. Das verwendete Färbeprotokoll wurde in Tabelle 13 beschrieben.

Tabelle 13: Protokoll für die ATPase-Färbung von Gewebeschnitten

Schritt	Zeit
Präinkubation in saurem Differenzierungsmedium (pH 4,4)	8 min, auf einem Schüttler
Waschen in Tris-Waschpuffer (pH 7,8)	3x 2 min
Inkubation in ATP-Inkubationsmedium (pH 9,4)	25 min, auf einem Schüttler
Entwickeln 1 % CaCl ₂ -2H ₂ O-Lösung	3x, je 3-4x eintauchen
Färben in 0,1 % Toluidinblau	1 min
Spülen in dH ₂ O	2x 5 sec
Überschüssiges Wasser mit Papertüchern abnehmen	
Entwässern und Bläuen in Ethanol 95 %	1x 5 sec
Entwässern in Ethanol 100 %	2x, 5-10 sec
Klären mit Xylol	2x 5 min
Eindecken mit Vitro-Clud® Einbettmedium	

2.2.5.3 Messung von Myozytenquerschnittsflächen (MCSA)

Die histologische Dokumentation wurden am Leica-Mikroskop (Leica CTR 6500 HS Mikroskop) und der Leica-Digitalkamera (DFC 425) durchgeführt.

Die Myozytenquerschnittsflächen (MCSA) wurde mit ImageJ (Version 1.46, NIH, Bethesda, USA) vermessen. Dafür wurden mindestens 100 quer geschnittene Fasern von insgesamt 3 Tieren pro Versuchsgruppe ausgewertet.

2.2.5.4 Messung von C2C12-Myotubendurchmesser

72 Stunden nach Inkubation mit den Stimulanzen wurden histologische Bilder von C2C12-Myotuben am Leica-Mikroskop aufgenommen. In 10 zufällig ausgewählten Bildausschnitten wurden 100 Myotubendurchmesser bestimmt. Ebenfalls mit dem Programm ImageJ wurde jede Tube dafür an unterschiedlichen Stellen dreimal vermessen und gemittelt, um Kaliberschwankungen auszugleichen.

2.3 Statistik

Die statistische Auswertung und die Erstellung der Diagramme erfolgten mit der Software GraphPad Prism 6.0c (GraphPad Software, La Jolla California, USA). Die Daten wurden, wenn nicht anders gekennzeichnet, als Mittelwert und Standardfehler dargestellt. Als signifikant wurde bei allen Tests ein p-Wert kleiner-gleich 0,05 definiert. Zunächst wurden alle erhobenen Daten aus den Zellkultur- und Tierexperimenten per Kolmogorow-Smirnow-Test auf deren Normalverteilung überprüft. Während bei normal verteilten Werten anschließend ein T-Test für ungepaarte Stichproben durchgeführt wurde, wurde bei fehlender Normalverteilung der Mann-Whitney-Test für ungepaarte Stichproben angewendet. Zum Vergleich von mehreren unterschiedlichen Gruppen wurde eine ANOVA-Varianzanalyse mit anschließendem Tukey post-hoc Test bei Varianzhomogenität durchgeführt. Die Überlebenszeiten der operierten Tiere wurde mittels Kaplan-Meier-Kurven dargestellt und die unterschiedlichen Versuchsgruppen per Mantel-Cox-Test (Log-Rank-Test) miteinander verglichen. Alle Zellkulturexperimente wurden in mindestens drei voneinander unabhängigen Ansätzen durchgeführt. Dabei wurde in dieser Arbeit je ein repräsentatives Experiment abgebildet.

3. Ergebnisse

3.1 Zellkulturexperiment

Um die molekularen Prozesse der IL-1 β vermittelten Skelettmuskelatrophie auf Zellebene zu untersuchen, wurde die Maus-Skelettmuskel-Zell-Linie C2C12 zunächst in Myotuben differenziert und danach mit rekombinantem IL-1 β behandelt. C2C12-Zellen differenzieren unter Reduktion des Serumanteils im Nährmedium zu langgezogenen mehrkernigen Myotuben, welche letztendlich Vorgänger der definitiven Muskelfasern darstellen.

3.1.1 Veränderungen der Genexpression in C2C12-Zellen nach kurzzeitiger IL-1 β -Behandlung

Zunächst wurde das frühe Expressionsniveau verschiedener Gene in C2C12-Myotuben untersucht. Die Myotuben wurde mit rekombinanten murinen IL-1 β [10 ng/ml] behandelt und die Probenentnahme erfolgte nach 2, 4, 8 und 24 Stunden. Zwei weitere Behandlungen mit LPS [1 μ g/ml] und Dexamethason [10 μ M/ml] dienten als Positivkontrollen für Inflammations-, beziehungsweise für Atrophieprozesse. Normiert wurde für jeden Zeitpunkt gegen Solvens-behandelte Myotuben.

3.1.1.1 Proinflammatorische Marker

Um die IL-1 β -induzierte Entzündungssituation zu ermitteln, wurde mittels qPCR die Expression des IL-1 β -Zielgens *Il6* quantifiziert. Des Weiteren wurde die Expression von *Nlrp3*-mRNA in Skelettmuskelzellen unter Inflammationsbedingungen untersucht.

Bereits nach 2 Stunden führte sowohl die IL-1 β - als auch die LPS-Behandlung zu einer signifikanten Erhöhung der *Il6*-Genexpression. Damit wurde nachgewiesen, dass IL-1 β einen direkten Effekt auf Muskelzellen hat. Die stärkste Induktion wurde in beiden Fällen nach 8 Stunden erreicht, dabei kam es unter IL-1 β zu einer 181-Fachen und unter LPS zu einer 155-Fachen Steigerung der *Il6*-mRNA-Expression gegenüber den Vehikel behandelten Kontrollen ($p \leq 0,05$, Abb. 7A+B).

Diese Arbeit konnte zum ersten Mal in murinen Skelettmuskelzellen die Induktion der *Nlrp3*-mRNA-Expression durch LPS- und IL-1 β -Behandlung zeigen (Abb. 7D+E). Dabei führten die IL-1 β -Behandlung nach 2 Stunden zu einer 300-Fachen und die LPS-Behandlung zu einer 1076-Fachen Induktion der *Nlrp3*-Expression. An den nachfolgenden Zeitpunkten nahm die Expression von *Nlrp3* kontinuierlich ab und erreichte nach 24 Stunden annähernd Basalniveau.

Das künstliche Kortisol-Derivat Dexamethason ist ein etablierter Atrophieinduktor und wurde daher als Atrophiekontrolle eingesetzt. Dexamethason führte zu einer signifikanten Reduktion der *Il6*-Expression ($p \leq 0,01$, Abb. 7C). Jedoch zeigte Dexamethason keinen Einfluss auf die *Nlrp3*-Genexpression in C2C12-Zellen (Abb. 7F).

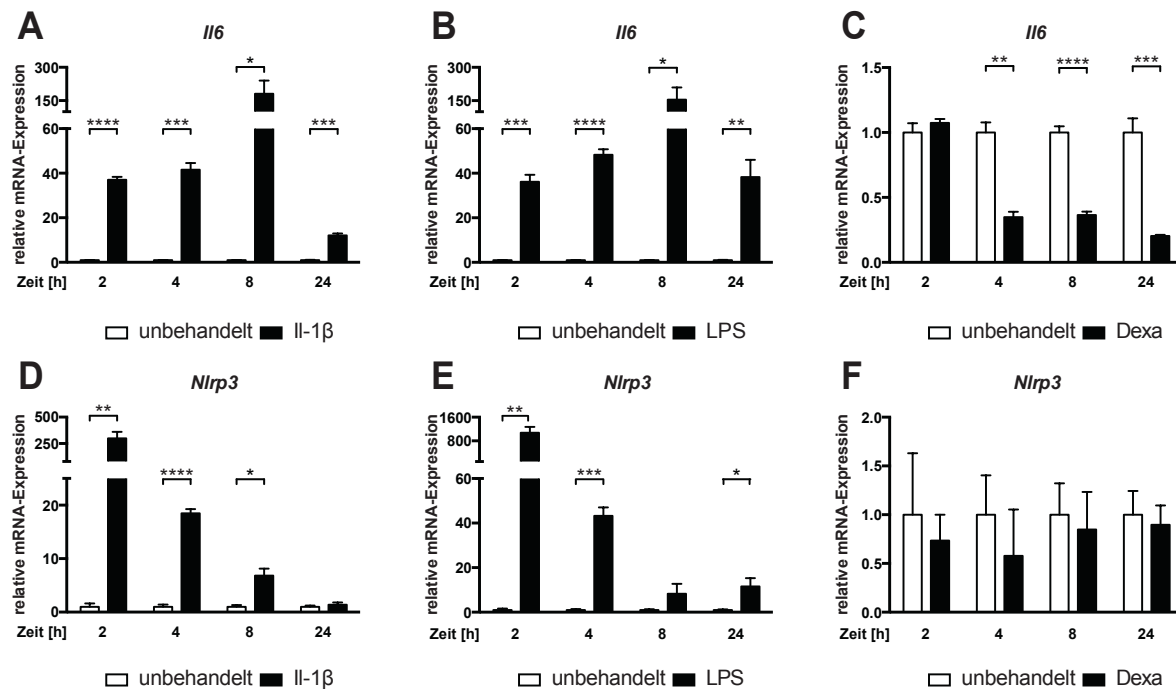


Abb. 7: Zeitlicher Verlauf der *Il6*- und *Nlrp3*-mRNA-Expression nach IL-1 β -Behandlung in C2C12-Myotuben. qPCR-Untersuchungen der *Il6*- und *Nlrp3*-Expression nach Behandlung mit IL-1 β [10 ng/ml] (A, D), LPS [1 μ g/ml] (B, E) Dexamethason [10 μ M/ml] (C, F) über 24 h. Solvens-behandelte C2C12-Myotuben dienten als Kontrollen. Die Genexpressionen wurden auf *Gapdh* normalisiert und als Mittelwerte \pm SEM dargestellt. Die dargestellten Ergebnisse repräsentieren drei unabhängige, in Triplikaten durchgeführte Experimente. * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$; **** $p \leq 0,0001$. Multipler ungepaarter T-Test.

3.1.1.2 Muskelspezifische Atrophiemarker

Weiterhin wurde die Veränderung der muskelspezifischen Atrophiemarker MuRF1 und Atrogin1 im Zeitverlauf untersucht. Li *et al.* zeigten, dass IL-1 β zu einem Anstieg beider Atrophiemarker nach 120 min in C2C12-Zellen führt (MuRF1: 1,7-Fach; Atrogin1: 4-Fach) [118]. Jedoch war die IL-1 β -Behandlung in deren Experiment auf einen Zeitraum von 30 min bis 120 min beschränkt. Aus diesem Grund wurde für die vorliegende Arbeit die Genexpression über einen längeren Zeitraum beobachtet, um die Veränderungen zu einem späteren Zeitpunkt ebenfalls zu erfassen.

Die IL-1 β -Behandlung führte bereits nach 2 Stunden zu einem Anstieg der *Trim63*- (1,4-Fach, $p \leq 0,05$) und der *Fbxo32*-Expression (2,9-Fach, $p \leq 0,001$) in C2C12-Myotuben (Abb. 8A+D). Im weiteren Zeitverlauf näherten sich deren Genexpression wieder den Basalwerten an. Darüberhinaus konnte nach 24 Stunden sogar eine signifikante Reduktion der *Trim63*-Expression detektiert werden, die im Trend auch für *Fbxo32* zutraf ($p \leq 0,01$).

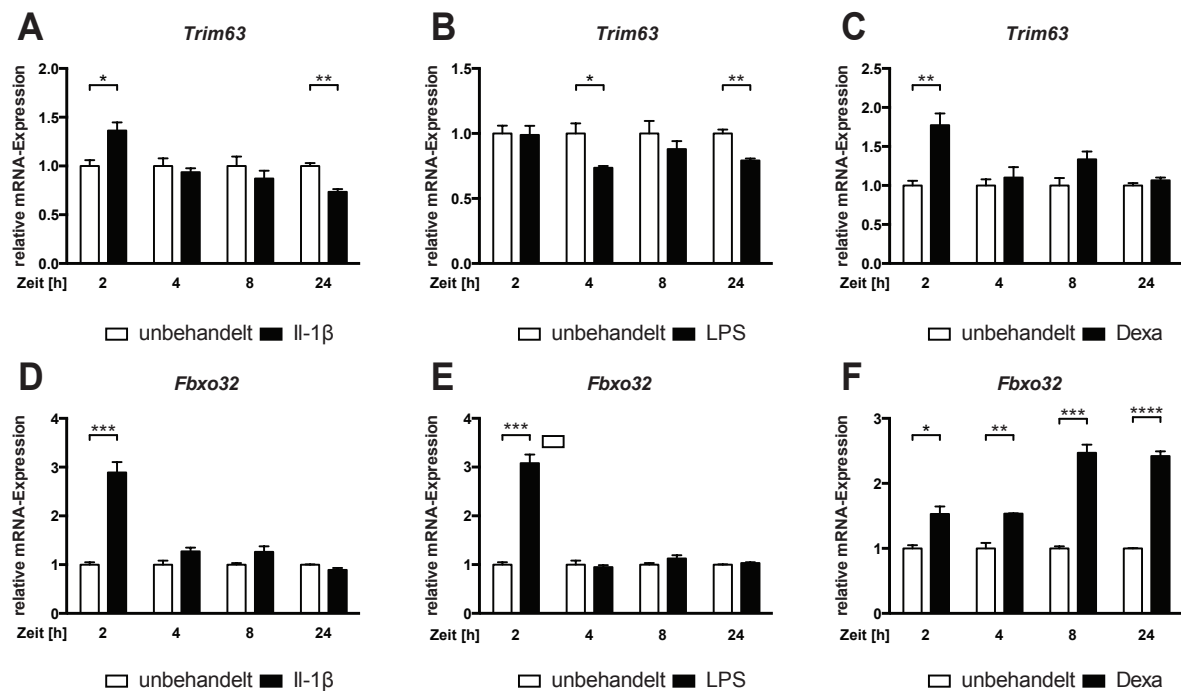


Abb. 8: **Zeitlicher Verlauf der *Trim63*- und *Fbxo32*-Expression nach IL-1 β -Behandlung in C2C12-Zellen.** qPCR-Untersuchungen der *Trim63*- und *Fbxo32*-Expression nach Behandlung mit IL-1 β [10 ng/ml] (A, D), LPS [1 μ g/ml] (B, E) Dexamethason [10 μ M/ml] (C, F) über 24 h. Solvens-behandelte C2C12-Myotuben dienen als Kontrollen. Die Genexpressionen wurden auf *Gapdh* normalisiert und als Mittelwerte \pm SEM dargestellt. Die dargestellten Ergebnisse repräsentieren drei unabhängige, in Triplikaten durchgeführte Experimente. * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$; **** $p \leq 0,0001$. Multipler ungepaarter T-Test.

Die LPS-Behandlung von C2C12-Myotuben führte ausschließlich nach 2 Stunden zu einer signifikanten Erhöhung der *Fbxo32*-Expression (3,1-Fach, $p \leq 0,001$, Abb. 8E). Allerdings kam es hier zu keinem Anstieg der *Trim63*-Expression (Abb. 8B). Vielmehr wurde nach LPS-Behandlung *Trim63*-mRNA ab dem Zeitpunkt von 4 Stunden vermindert exprimiert ($p \leq 0,05$).

Dexamethason bewirkte eine gesteigerte Expression beider Atrophiegene (Abb. 8C+F). Sowohl *Trim63* als auch *Fbxo32* wurden nach 2 Stunden signifikant induziert ($p \leq 0,05$, $p \leq 0,01$). Während die Expression von *Trim63* nach 2 Stunden ihr Maximum (1,8-Fach)

erreichte, danach wieder bis auf Kontrollniveau abnahm, stieg die *Fbxo32*-Expression unter Dexamethasonbehandlung weiterhin an und erreichte nach 8 Stunden ein Plateau ($p \leq 0,0001$).

3.1.1.3 Fasertypspezifische Myosin-Isoformen

Bei der Generierung von C2C12-Zellen wurden C3H-Mäusen Oberschenkelverletzungen zugefügt um später Myoblasten daraus zu gewinnen[129]. Daher ist eine klare Muskel- und damit Fasertypklassenzuordnung dieser Zellen nicht möglich. Infolgedessen wurde, entsprechend des murinen Experiments, repräsentativ eine Myosinisoform für jeden Fasertyp untersucht, um die fasertypspezifische Myosinsynthese einzuschätzen.

Die Genexpression von *Myh2*, *Myh4* und *Myh7* war im Verlauf der Inkubation mit IL-1 β zum Zeitpunkt 8 bzw. 24 h signifikant verringert (Abb. 9A+D+G); zum Zeitpunkt 24 h auf 40 % für *Myh4* und *Myh7* ($p \leq 0,01$), und auf 65 % für *Myh2* ($p \leq 0,001$).

Die Behandlung mit LPS führte nach 24 Stunden zu einer signifikanten Verringerung der *Myh2*- und *Myh4*-Expression (Abb. 9B+E). Die mRNA-Expression war im Vergleich zu den Kontrollen auf etwa 70 % ($p \leq 0,05$) bis 80 % ($p \leq 0,01$) reduziert. Die *Myh7*-Expression war bereits nach 4 Stunden signifikant verringert ($p \leq 0,05$, Abb. 9H). Nach 24 Stunden war die Genexpression im Vergleich zur Kontrollgruppe auf etwa 60 % reduziert ($p \leq 0,001$).

Die Behandlung mit Dexamethason führte zu unterschiedlichen Veränderungen der Expression von Myosin-Schwerketten kodierenden Genen. Während die Genexpression von *Myh4* ($p \leq 0,05$) und *Myh7* ($p \leq 0,001$) nach spätestens 8 Stunden signifikant um das 1,5-Fache erhöht war (Abb. 9F, I), blieb die mRNA-Menge von *Myh2* im Vergleich zur Kontrollgruppe unverändert (Abb. 9C).

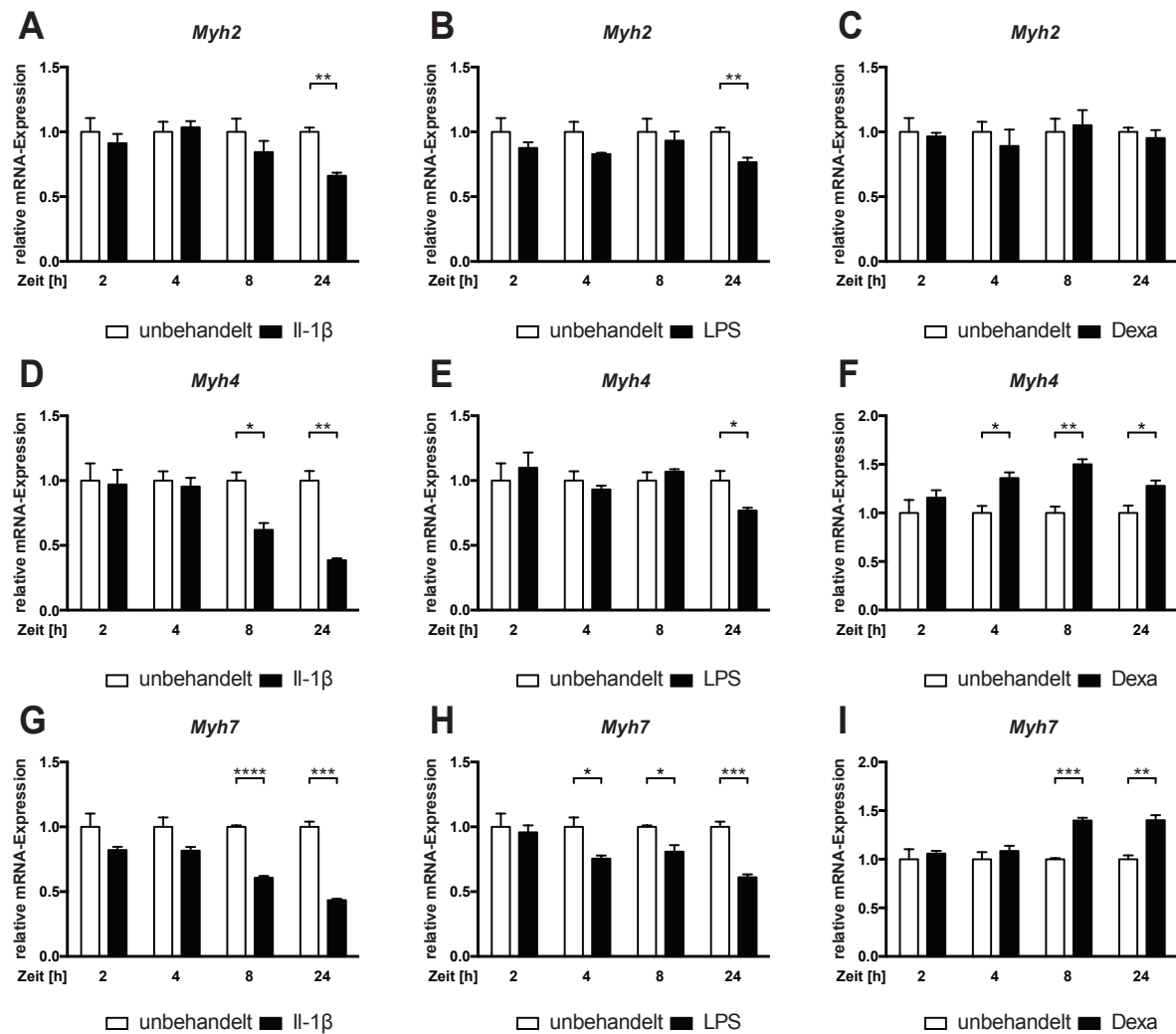


Abb. 9: Zeitlicher Verlauf der Myosinexpression nach IL-1 β -Behandlung in C2C12-Zellen. qPCR-Untersuchungen der Myh2-, Myh4- und Myh7-Expression nach Behandlung mit IL-1 β [10 ng/ml] (A, D), LPS [1 μ g/ml] (B, E) Dexamethason [10 μ M/ml] (C, F) bis zu 24 h. Solvens-behandelte C2C12-Myotuben dienten als Kontrollen. Die Genexpressionen wurden auf Gapdh normalisiert und als Mittelwerte \pm SEM dargestellt. Die dargestellten Ergebnisse repräsentieren drei unabhängige, in Triplikaten durchgeführte Experimente. * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$; **** $p \leq 0,0001$. Multipler ungepaarter T-Test.

3.1.2 C2C12-Myotubendurchmesser nach 72-stündiger IL-1 β -Behandlung

Um zu untersuchen, ob IL-1 β zu einer Atrophie führt, wurden C2C12-Myotuben mit unterschiedlichen IL-1 β -Mengen für 72 Stunden behandelt. Nach 72 Stunden wurden Bilder von den Myotuben aufgenommen und deren Durchmesser, als Indikator für Atrophie, quantifiziert (Abb. 10A).

Die Vermessung der Durchmesser von 100 Myotuben je Gruppe im mikroskopischen Durchlicht-Bild zeigte eine signifikante Atrophie der Myotuben nach IL-1 β -Behandlung. Die Häufigkeitsverteilung der Größen wies für alle IL-1 β -Konzentrationen eine

Linksverschiebung der Kurve, d. h. eine Häufigkeitszunahme von Myotuben mit geringerem Durchmesser, nach IL-1 β -Behandlung auf ($p \leq 0,0001$, Abb. 10B-D). Der Vergleich der Messmittelwerte zeigte, dass der Grad der Myotubenatrophie positiv mit der IL-1 β -Menge korrelierte ($p \leq 0,05$, Abb. 10F).

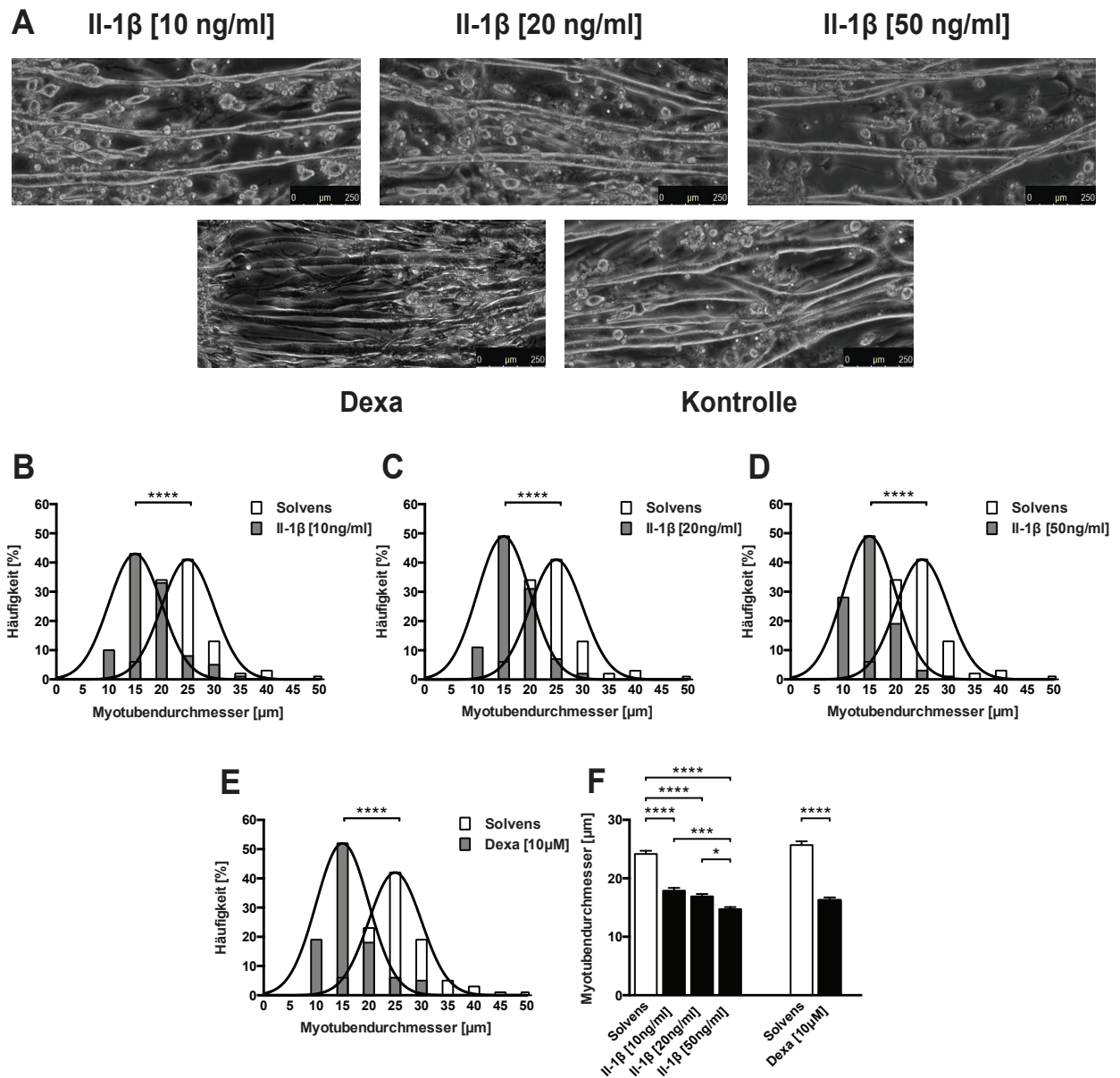


Abb. 10: Induktion von Atrophie in C2C12-Myotuben nach 72-stündiger IL-1 β -Behandlung. Behandlung mit IL-1 β [10, 20 und 50 ng/ml] und Dexamethason [10 μ M/ml]. Solvens-behandelte C2C12-Myotuben dienten als Kontrollen. Morphologie von Myotuben nach 72-stündiger Behandlung (A). Messungen von 100 Myotubendurchmessern je Behandlungsgruppe. Häufigkeitsverteilung der gemessenen Myotubendurchmesser (B-E) und Mittelwerte von Myotubendurchmesser (F). Die Myotubendurchmesser wurden als Mittelwert \pm SEM dargestellt. * $p \leq 0,05$; *** $p \leq 0,001$; **** $p \leq 0,0001$. Mann-Whitney-Test und ANOVA mit Tukey post-hoc Test. Messbalken = 100 μ m.

Als Atrophiekontrolle diente die Behandlung mit Dexamethason. Dexamethason induzierte eine signifikante Atrophie der Myotuben mit einer Linksverschiebung der Häufigkeitsverteilungskurve ($p \leq 0,0001$, Abb. 10E+F).

3.1.3 Proteingehalt nach 72-stündiger IL-1 β -Behandlung

Die Zellysate nach 72-stündiger IL-1 β -Behandlung wurden anschließend mittels entsprechender Antikörper im Western Blot-Verfahren auf den Proteingehalt der Myosin-Isoformen und MuRF1 hin untersucht.

Nach 72 Stunden IL-1 β -Behandlung (10 ng/ml) wurde deutlich weniger langsames und schnelles Myosin (MyHC I und MyHC II) im Vergleich zur Kontrolle detektiert (Abb. 11). Der MuRF1-Proteingehalt wurde durch die IL-1 β -Behandlung *in vitro* nicht verändert.

Die Kontrollbehandlung mit Dexamethason führte nach 72 Stunden zu einer Verminderung des Myosins Typ-I und Typ-II. Des Weiteren führte die Inkubation mit Dexamethason zu einem leichten Anstieg des MuRF1-Proteingehalts.

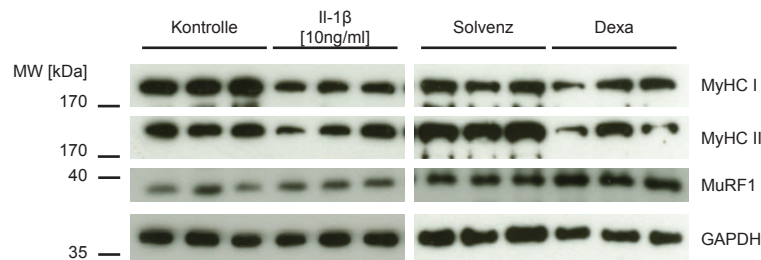


Abb. 11: Myosinexpression in C2C12 Zellen nach 72-stündiger IL-1 β -Behandlung. Behandlung mit IL-1 β [10 ng/ml] und Dexamethason [10 μ M/ml]. Alle 24 h wurde das Inkubationsmedium erneuert. Solvens-behandelte C2C12-Myotuben dienten als Kontrollen. Proteinextrakt aus Zellysaten wurden durch SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt. Anschließend wurden Western Blot-Analysen unter Verwendung von spezifischen Antikörpern für langsames Myosin (NOQ7 für MyHC I), schnelles Myosin (My32 für MyHC II) und MuRF1 durchgeführt. Als Ladekontrolle wurde GAPDH verwendet. Die gezeigten Abbildungen sind repräsentative Ergebnisse von drei unabhängigen in Triplikaten durchgeführten Experimenten.

3.2 Basale Charakterisierung der *Nlrp3*-KO-Mäuse

Bei den *Nlrp3*-KO-Mäusen handelt es sich um eine Keimbahndeletion des *Nlrp3* Genes. Das führt zu einem Maturierungsdefizit von IL-1 β . *Nlrp3*-KO-Mäuse wurden in der Vergangenheit bereits verwendet, um die Pathogenese unterschiedlicher Krankheitsbilder, wie zum Beispiel Gicht, Colitis ulcerosa, chronisches Nierenversagen und chronische Herzinsuffizienz zu studieren, jedoch lagen zum Zeitpunkt der Arbeit keine Angaben darüber vor, ob diese Tiere Veränderungen des Skelettmuskels aufwiesen [122,130-132]. Um den Einfluss des *Nlrp3*-Knockouts im Skelettmuskel zu

untersuchen, wurden zunächst die basalen Phänotypen der *Nlrp3*-KO- und *Nlrp3*-WT-Tiere miteinander verglichen. Für diese Charakterisierung wurde eine Gruppe von männlichen WT-Tieren im Alter von 5–21 Wochen einer entsprechenden Gruppe von *Nlrp3*-KO-Tieren gegenübergestellt.

3.2.1 Körper- und Organgewichtsanalysen von WT- und *Nlrp3*-KO-Mäusen

Der Vergleich von gesunden WT- und *Nlrp3*-KO-Tieren zeigte keinen Unterschied des Körpergewichts (Abb. 12A) sowie des Leber- und Milzgewichtes (Abb. 12B). Auch im Hinblick auf die Muskelgewichte konnte beim *Mm. gastrocnemius/plantaris* (GP), *M. tibialis anterior* (TA), *M. soleus* (SOL) und *M. extensor digitorum longus* (EDL) zwischen den beiden Mauslinien keine signifikanten Unterschiede gefunden werden (Abb. 12C).

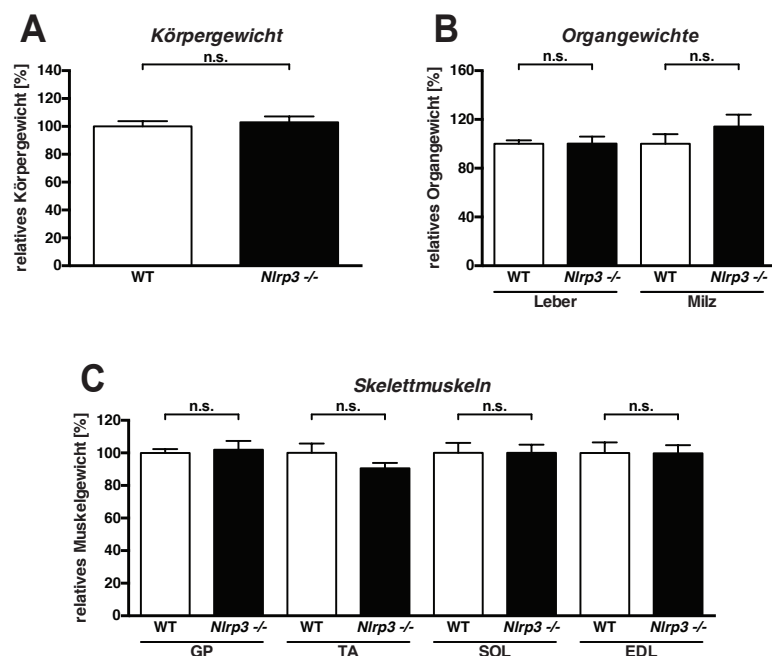


Abb. 12: Basale Gewichtsanalysen von WT- und *Nlrp3*-KO-Mäusen. Relatives Körpergewicht (A), Leber-/Milzgewicht (B) Skelettmuskelgewichte von *Mm. gastrocnemius/plantaris* (GP), *M. tibialis anterior* (TA), *M. soleus* (SOL) und *M. extensor digitorum longus* (EDL) (C) von männlichen WT- und KO-Mäusen (n=6 je Gruppe). Alle Gewichte wurden auf die Tibiallänge normalisiert und als prozentuale Gewichtsveränderung ± SEM dargestellt. n.s. = nicht signifikant. Ungepaarter T-Test.

3.2.2 Genexpressionsanalysen im Skelettmuskel von WT- und *Nlrp3*-KO-Mäusen

3.2.2.1 Proinflammatorische Marker

Mittels qPCR wurde die *Nlrp3*- und *Il1b*-Genexpression im Skelettmuskel bestimmt. Das Ziel war, neben der Verifizierung des Knockouts, die Überprüfung, ob die Abwesenheit von *Nlrp3* eine Auswirkung auf die basale *Il1b*-Genexpression im Skelettmuskel hat. Um basale Inflammationsprozesse in *Nlrp3*-KO-Tieren zu untersuchen, wurde die muskuläre *Il6*-Genexpression quantifiziert.

In allen drei untersuchten Muskeln wurde *Nlrp3* nur im WT, nicht aber im *Nlrp3*-KO nachgewiesen (Abb. 13A). Auch die basale Genexpression von *Il1b* war in *Nlrp3*-KO-Tieren vermindert, wobei dieser Unterschied im GP- und TA-Muskel stärker ausgeprägt war als im SOL-Muskel (Abb. 13B). Jedoch waren die Unterschiede bei allen drei Muskeln statistisch nicht signifikant. Die quantitative Untersuchung von *Il6* zeigte keine Unterschiede im GP-, TA- und SOL-Muskel zwischen den beiden Mauslinien. (Abb. 13C).

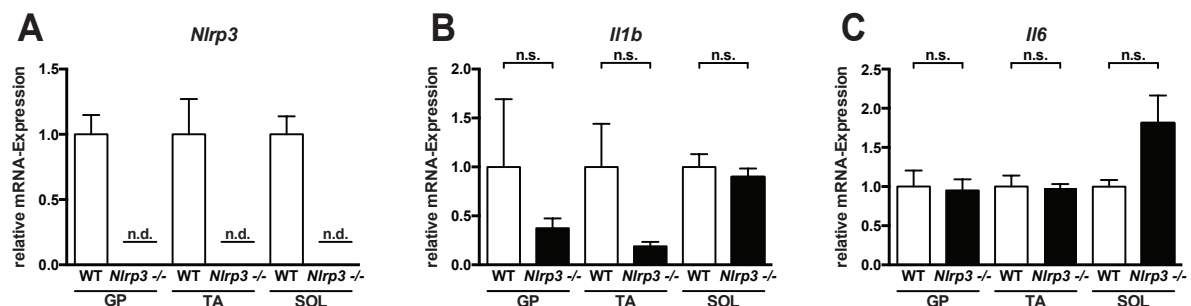


Abb. 13: Basale Genexpression von proinflammatorischen Zytokinen im Skelettmuskel von WT- und *Nlrp3*-KO-Mäusen. qPCR-Untersuchungen der Gene *Nlrp3* (A), *Il1b* (B) und *Il6* (C) im *Mm. gastrocnemius/plantaris* (GP), *M. tibialis anterior* (TA) und *M. soleus* (SOL) von männlichen WT- und *Nlrp3*-KO-Mäusen (n=6 je Gruppe). Genexpressionen wurden auf *Gapdh* normalisiert und als Mittelwerte \pm SEM in Relation zur WT-Gruppe dargestellt. n.d. = nicht detektierbar; n.s. = nicht signifikant. Mann-Whitney-Test.

3.2.2.2 Muskelspezifische Atrophiemarker

Die E3-Ligase MuRF1 und das F-Box-Protein Atrogin1 vermitteln den Abbau von muskulären Proteinen durch das UPS und werden unter atrophischen Bedingungen vermehrt synthetisiert. Die basale Expression dieser Atrogene wurde in Skelettmuskeln von WT und *Nlrp3*-KO-Tieren mittels qPCR quantifiziert.

Bei der Genexpressionsanalyse von *Trim63* im GP- und SOL-Muskel konnten keine signifikanten Veränderungen zwischen der *Nlrp3*-KO- und der WT-Gruppe gefunden werden (Abb. 14A). Der Vergleich des TA-Muskels beider Gruppen hingegen ergab eine 0,35-Fach, signifikant erniedrigte *Trim63*-Expression bei den *Nlrp3*-KO-Tieren ($p \leq 0,05$). Die Genexpression von *Fbxo32* war beim GP- und SOL-Muskel nicht signifikant verändert zwischen WT- und *Nlrp3*-KO-Gruppe. Im TA-Muskel war die *Fbxo32*-Expression bei der *Nlrp3*-KO-Gruppe vermindert (Abb. 14B).

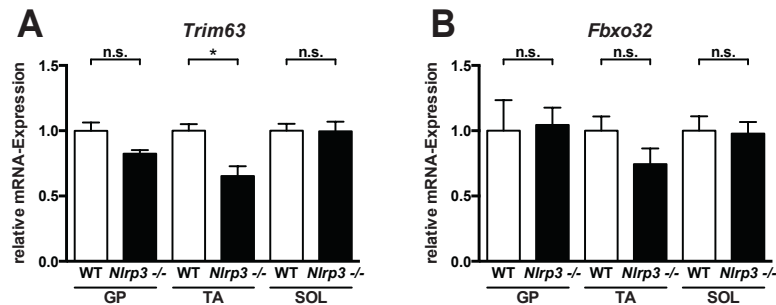


Abb. 14: Basale Genexpression von *Trim63* und *Fbxo32* im Skelettmuskel von WT- und *Nlrp3*-KO-Mäusen. qPCR-Untersuchungen der Gene *Trim63* (A) und *Fbxo32* (B) im *Mm. gastrocnemius/plantaris* (GP), *M. tibialis anterior* (TA) und *M. soleus* (SOL) von männlichen WT- und *Nlrp3*-KO-Mäusen (n=6 je Gruppe). Die Genexpressionen wurden auf *Gapdh* normalisiert und als Mittelwerte \pm SEM in Relation zur WT-Gruppe dargestellt. * = $p \leq 0,05$; n.s. = nicht signifikant. Mann-Whitney-Test.

3.2.3 Proteinanalysen von MuRF1 und Myosinen im Skelettmuskel von WT- und *Nlrp3*-KO-Mäusen

Mittels Western Blot wurde der MuRF1 Proteingehalt in den Muskelgewebeproben beider Mauslinien analysiert. Außerdem wurde untersucht, ob der *Nlrp3*-Knockout Einfluss auf die Myosinmenge nimmt. Hierbei wurde zwischen Gesamtmyosin (MyHC I/II) und schnellem Myosin (MyHC II) unterschieden, um eine Fasertypveränderung innerhalb des Muskels zu erfassen.

Exemplarisch für die Skelettmuskeln wurde der GP-Muskel analysiert (Abb. 15). WT- und *Nlrp3*-KO-Tiere wiesen die gleiche basale Proteinmenge von MyHC I/II- und MyHC II auf. Auch die Untersuchung des basalen Proteingehalts von MuRF1 zeigte keine Unterschiede zwischen den beiden Genotypen.

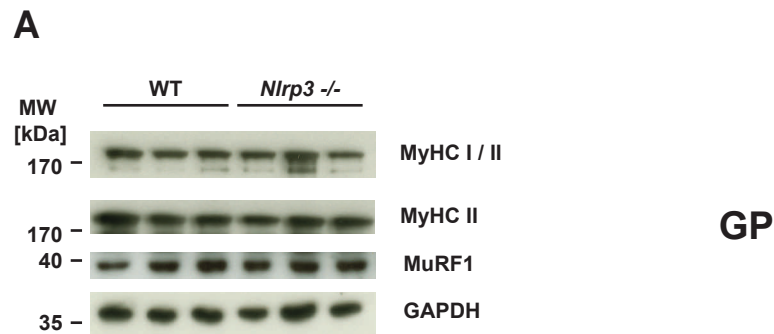


Abb. 15: Basaler Proteingehalt von Gesamtmyosin, schnellem Myosin und MuRF1 im GP-Skelettmuskel von WT- und *Nlrp3*-KO-Mäusen. Die extrahierten Proteine aus *Mm. gastrocnemius/plantaris* (GP) (A) von männlichen WT- und *Nlrp3*-KO-Mäusen wurden durch SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt. Anschließend wurden Western Blot-Analysen unter Verwendung von spezifischen Antikörpern für Gesamtmyosin (MF-20 für MyHC I/II), schnelles Myosin (My32 für MyHC II) und MuRF1 durchgeführt. Als Ladekontrolle wurde GAPDH verwendet. Dargestellt ist eine repräsentative Auswahl von n=3 je Gruppe. MW = Molekulargewicht; kDa = kilo-Dalton.

3.3 Induktion von Sepsis bei WT- und *Nlrp3*-KO-Mäusen

3.3.1 Überlebensrate nach CLP-Operation

Männliche WT- und *Nlrp3*-KO-Tiere im Alter von 12–16 Wochen wurden einer Sham-, bzw. einer CLP-Operation unterzogen. Für die Überlebenszeitanalyse wurden Tiere aus zwei unabhängigen Experimenten verwendet. Entsprechend ihres Genotyps und der Operationsart wurden die Tiere in vier Gruppen unterteilt: WT-Sham (n=16), WT-CLP (n=33), *Nlrp3*-KO-Sham (n=11), *Nlrp3*-KO-CLP (n=27). Alle CLP-operierten Tiere wiesen innerhalb von wenigen Stunden typische Krankheitszeichen wie Schonhaltung, Apathie, struppiges Fell, reduzierte Nahrungsaufnahme und Durchfall auf. Im Vergleich dazu erholten sich die Sham-operierten Tiere rasch von der Laparotomie und wiesen bereits nach wenigen Stunden keine Nachwirkungen der Operation mehr auf. Die Überlebenskurven der einzelnen Gruppen zeigen den prozentualen Anteil der überlebenden Tiere nach 24, 48, 72 und 96 Stunden (Abb. 16).

Unabhängig vom Genotyp haben alle Tiere, die einer Sham-Operation unterzogen wurden, 96 Stunden überlebt, wodurch sich eine Überlebensrate von 100 % ergab. Im Gegensatz dazu überlebten nur 42,42 % der CLP-operierten WT-Mäuse 96 Stunden. Bei der entsprechenden *Nlrp3*-KO-Gruppe fiel die Mortalität signifikant geringer aus. Zum Zeitpunkt 96 Stunden lebten noch 70,37 % der *Nlrp3*-KO-Tiere. Die Überlebenskurven der CLP-operierten Tiere unterschieden sich signifikant von der Überlebenskurve der Sham-operierten Kontrollgruppe im Mantel-Cox-Test (WT-CLP: $p < 0,001$;

Nlrp3-KO-CLP: $p \leq 0,05$). Der Vergleich der beiden Sepsisgruppen ergab eine signifikant verbesserte Überlebensrate der *Nlrp3*-KO-Tiere gegenüber den gleich behandelten WT-Tieren ($p \leq 0,05$).

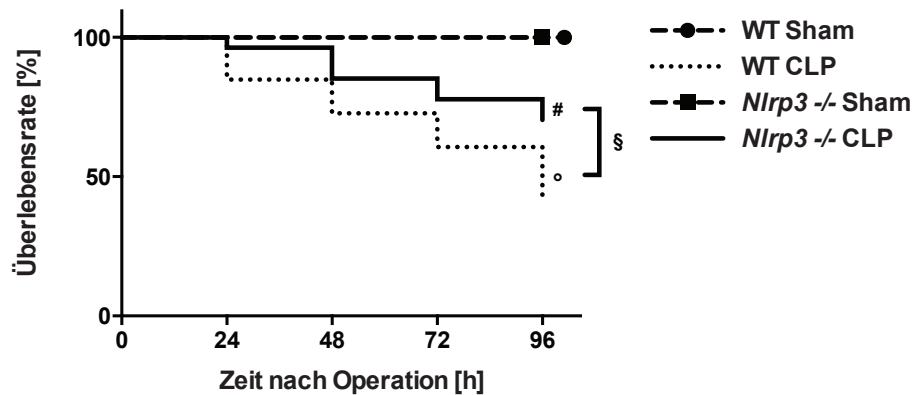


Abb. 16: Prozentuale Überlebensrate von WT- und *Nlrp3*-KO-Mäusen nach CLP- oder Sham-Operation. Männliche WT- und *Nlrp3*-KO-Mäuse im Alter von 12–16 Wochen wurden einer Sham-, bzw. CLP-Operation unterzogen (WT-Sham $n=16$, WT-CLP $n=33$, *Nlrp3*-KO-Sham $n=11$, *Nlrp3*-KO-CLP $n=27$). Das Gesamtüberleben aus zwei unabhängigen Experimenten wurde mit Hilfe von Kaplan-Meier-Kurven dargestellt und die Überlebenskurven mittels Mantel-Cox-Test miteinander verglichen. WT-Sham vs. WT-CLP: $p < 0,001$ (o), *Nlrp3*-KO-Sham vs. *Nlrp3*-KO-CLP: $p \leq 0,05$ (#), WT-CLP vs. *Nlrp3*-KO-CLP $p \leq 0,05$ (§). Mantel-Cox-Test.

3.3.2 Körper- und Organgewichtsanalysen nach CLP-Operation

Zur klinischen Einschätzung der Mäuse wurde die Bestimmung des Körpergewichts sowie der Organ- und Muskelgewichte von *Nlrp3*-KO- und WT-Tieren mit und ohne CLP-Behandlung herangezogen.

Im Schnitt nahmen WT-CLP-Tiere, im Vergleich zu WT-Sham-Tieren, 20 % an Körpergewicht ab ($p \leq 0,001$, Abb. 17A). Mit nur 4,5 % Gewichtsabnahme wiesen *Nlrp3*-KO-CLP-Tiere, im Vergleich zu *Nlrp3*-KO-Sham-Tieren, nur eine geringe Gewichtsveränderung auf und zeigten auch im Vergleich zur WT-CLP-Gruppe signifikant geringere Gewichtsabnahmen ($p \leq 0,0001$).

Ähnliche Resultate fanden sich in der Analyse der Lebergewichte (Abb. 17B). Während sich das Lebergewicht von WT-CLP-Tieren, im Vergleich zu WT-Sham-Tieren, durchschnittlich um 32,27 % reduzierte ($p \leq 0,0001$), hielten die *Nlrp3*-KO-CLP-Tiere ihr Lebergewicht nahezu aufrecht (4,4 % Gewichtsreduktion im Vergleich zu *Nlrp3*-KO-Sham-Gruppe) und nahmen somit signifikant weniger Gewicht ab als die CLP-operierte WT-Gruppe ($p \leq 0,0001$).

Unter der systemischen Inflammation kam es in den WT-CLP-Tieren, im Vergleich zu den WT-Sham-Tieren, zu einem Anstieg des Milzgewichts um 15,7 % (Abb. 17C).

Interessanterweise zeigten die *Nlrp3*-KO-CLP-Tiere eine starke Erhöhung des Milzgewichts im Vergleich zu *Nlrp3*-KO-Sham (75,1 %, $p \leq 0,001$). Auch gegenüber der WT-CLP-Gruppe war die prozentuale Milzgewichtszunahme signifikant ($p \leq 0,001$).

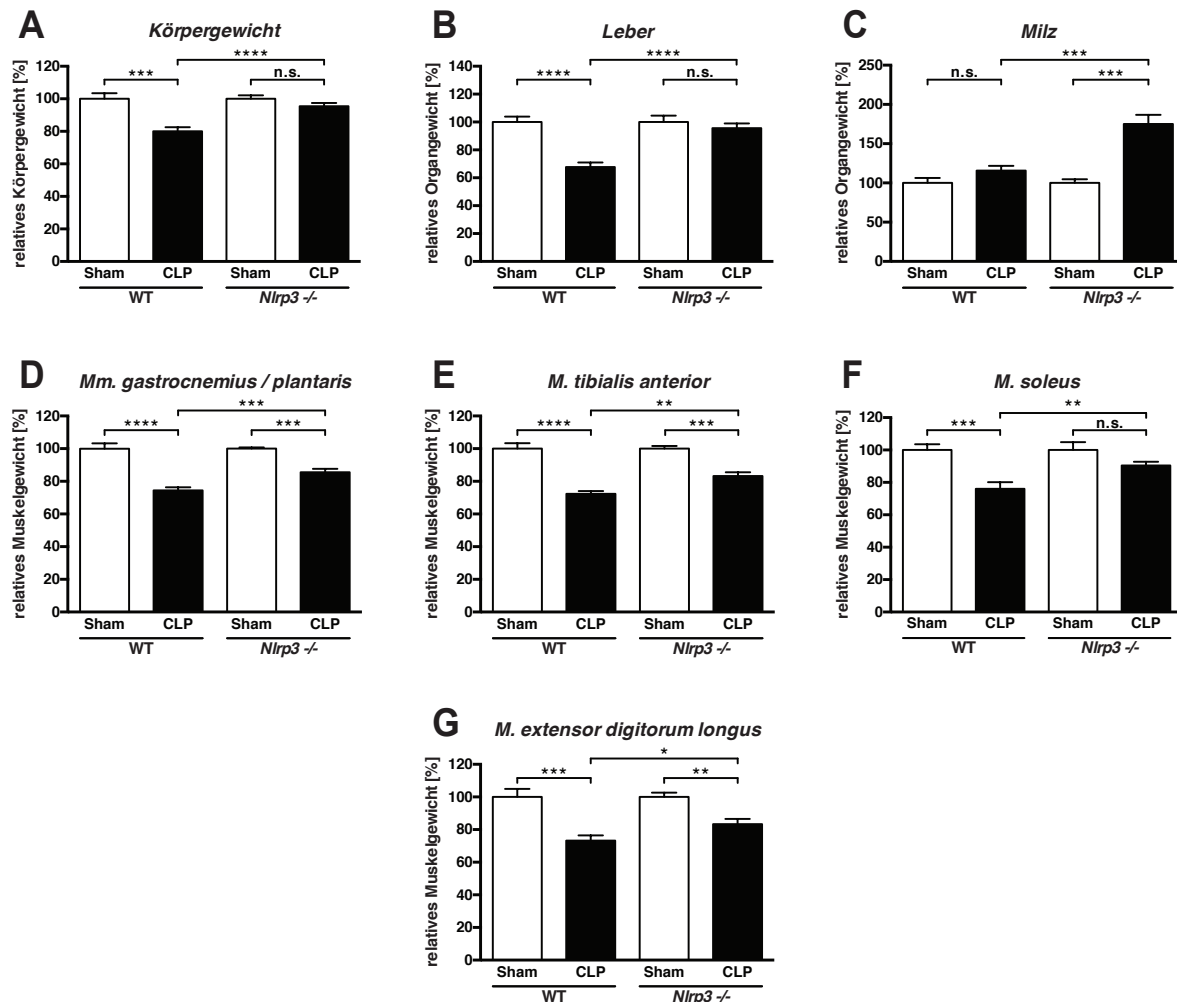


Abb. 17: Veränderung der Körper- und Organgewichte von WT- und *Nlrp3*-KO-Mäusen nach CLP-Operation. Quantitative Bestimmung des Körpergewichts (A), des Lebergewichts (B), Milzgewichts (C) und der Muskelgewichte *Mm. gastrocnemius/plantaris* (GP) (D), *M. tibialis anterior* (TA) (E), *M. soleus* (SOL) (F) und *M. extensor digitorum longus* (EDL) (G) von männlichen WT- und *Nlrp3*-KO-Mäusen nach Sham-, bzw. CLP-Operation (WT-Sham n=13, WT-CLP n=12, *Nlrp3*-KO-Sham n=8, *Nlrp3*-KO-CLP n=16). Alle Gewichte wurden auf die Tibiallänge normalisiert und als prozentuale Gewichtsveränderung \pm SEM zur jeweiligen Kontrollgruppe dargestellt. * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$; **** $p \leq 0,0001$; n.s. = nicht signifikant. Ungepaarter T-Test.

Die Analyse der Skelettmuskelgewichte (Abb. 17D-G) ergab Folgendes: In WT-CLP-Tieren konnte, im Vergleich zu den *Nlrp3*-KO-CLP-Tieren, eine signifikante Gewichtsabnahme von 25,5 % des GP-Muskel ($p \leq 0,0001$), 24,1 % des SOL-Muskels ($p \leq 0,001$) und 26,7 % des EDL-Muskels erfasst werden ($p \leq 0,001$). Am meisten war in

dieser Gruppe das Gewicht des TA-Muskels mit 27,7 % reduziert ($p \leq 0,0001$). Bei den *Nlrp3*-KO-CLP-Tieren war die Gewichtsabnahme des GP- (14,5 %, $p \leq 0,001$), des TA- (16,8 %, $p \leq 0,001$) und des EDL-Muskels (16,7 %, $p \leq 0,01$), verglichen mit der *Nlrp3*-KO-Sham-Gruppe, ebenfalls signifikant reduziert. Das Gewicht des SOL-Muskels war in dieser Gruppe unverändert. Der Vergleich der septischen Gruppen beider Mauslinien miteinander zeigt, dass die prozentuale Gewichtsabnahme aller vier Muskeln bei den *Nlrp3*-KO-Tieren signifikant geringer war als bei den WT-Tieren (GP: $p \leq 0,001$, TA und SOL: $p \leq 0,01$, EDL: $p \leq 0,05$).

3.3.3 IL-1 β -Serumspiegel nach CLP-Operation

Da es sich bei dem *Nlrp3*-Knockout um eine Keimbahndeletion handelt, wurden Zytokinspiegel von IL-1 β im Serum bestimmt.

Bereits die basale IL-1 β -Konzentration im Serum war in den KO-Tieren, im Vergleich zu WT-Tieren, um 37,0 % signifikant reduziert ($p \leq 0,05$; Abb. 18A). Nach CLP Operation zeigte sich ein signifikanter Anstieg der Serumkonzentration von IL-1 β in WT-Tieren (18-Fach, $p \leq 0,01$). Im Vergleich dazu zeigte sich zwar auch ein geringer Anstieg von IL-1 β im Serum (3-Fach, $p \leq 0,01$) in den *Nlrp3*-KO-Tieren nach CLP-Operation, jedoch war dieser im Vergleich zum *Nlrp3*-KO-CLP deutlich geringer ($p \leq 0,01$; Abb. 18B).

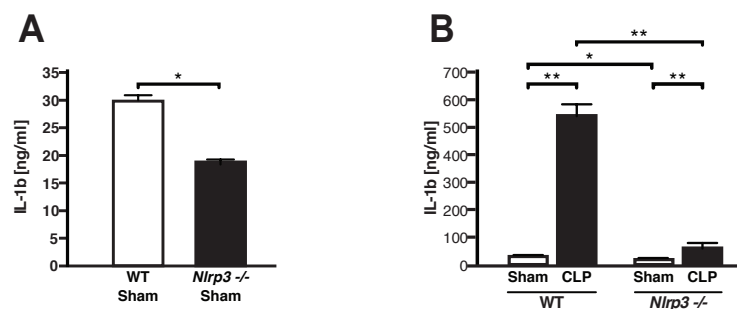


Abb. 18: Veränderung des IL-1 β -Serumspiegels von WT- und *Nlrp3*-KO-Mäusen nach CLP-Operation. ELISA-Untersuchung von IL-1 β im Serum. (A) Basale IL-1 β -Konzentration im Serum nach Sham-Operation und (B) IL-1 β -Konzentration im Serum von männlichen WT- und *Nlrp3*-KO-Mäusen nach Sham-, bzw. CLP-Operation untersucht (WT-Sham n=15, WT-CLP n=12, *Nlrp3*-KO-Sham n=14, *Nlrp3*-KO-CLP n=14). Die Daten sind als Mittelwerte \pm SEM dargestellt. * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$. Ungepaarter T-Test.

3.3.4 Genexpressionsanalysen im Skelettmuskel nach CLP-Operation

3.3.4.1 Proinflammatorische Marker

Insbesondere in der Akutphase der Sepsis ist das angeborene Immunsystem in der Bekämpfung der Erreger stark involviert und geht mit erhöhten Werten von

proinflammatorischen Markern im Blut und Gewebe einher. Mittels qPCR wurde untersucht, ob die polymikrobielle Sepsis die *Nlrp3*- und *Il1b*-Genexpression im Skelettmuskel induziert. Das Zytokin *Il6* diente als Positivkontrolle, da dessen Expression im Muskel septischer Tiere bekanntlich gesteigert ist.

Die CLP-Operation führte in den WT-Skelettmuskeln zu einem signifikanten Anstieg der *Nlrp3*-Expression um das 2-Fache für TA ($p \leq 0,01$), bzw. das 1,5-Fache für GP ($p \leq 0,05$; Abb. 19A+B). Auch der SOL-Muskel von CLP-operierten WT-Tieren zeigte einen Anstieg von *Nlrp3*, dieser war jedoch nicht signifikant (Abb. 19C). Erwartungsgemäß war *Nlrp3* in den Skelettmuskeln der *Nlrp3*-KO-Tiere nicht exprimiert (Abb. 19A+B+C). Auch die *Il1b*-Genexpression war nach Sepsisinduktion in allen 3 untersuchten Skelettmuskeln (GP-, TA-, SOL-Muskel) beider Mauslinien signifikant erhöht ($p \leq 0,05$, Abb. 19D+E+F). Dabei exprimierten *Nlrp3*-KO-CLP-Tiere nur etwa halb soviel *Il1b* wie die WT-CLP-Tiere im GP- und TA-Muskel. Im SOL-Muskel fanden sich in beiden Genotypen etwa gleichermaßen erhöhte *Il1b*-Werte nach Sepsisinduktion ($p \leq 0,05$, Abb. 19F).

Die *Il6*-Genexpression war im GP- und TA-Muskel von WT-CLP-Tieren im Vergleich zu ihrer Kontrollgruppe 72-, beziehungsweise 80-Fach signifikant erhöht (GP: $p \leq 0,05$; TA: $p \leq 0,01$; Abb. 19G+H). GP- und TA-Muskeln von *Nlrp3*-KO-CLP-Tieren zeigten im Vergleich zu *Nlrp3*-KO-Sham zwar auch eine leichte Erhöhung, allerdings von nur 1,3-Fach, bzw. 3-Fach (TA: $p \leq 0,05$). Der Vergleich von WT-CLP mit *Nlrp3*-KO-CLP in diesen Muskeln zeigte zudem die signifikant verminderte mRNA-Expression von *Il6* in *Nlrp3*-KO-CLP-Tieren (GP: $p \leq 0,01$, TA: $p \leq 0,001$). Während der SOL-Muskel mit einem hohen Anteil an langsamen Muskelfasern (Typ-I-Fasern) von WT-CLP im Vergleich zu WT-Sham keine veränderte *Il6*-Expression zeigte, war die *Il6*-Expression bei *Nlrp3*-KO-CLP im Vergleich zu *Nlrp3*-KO-Sham 19-Fach ($p \leq 0,05$, Abb. 19I) und somit auch signifikant gegenüber WT-CLP erhöht ($p \leq 0,01$).

Mm. gastrocnemius / plantaris

M. tibialis anterior

M. soleus

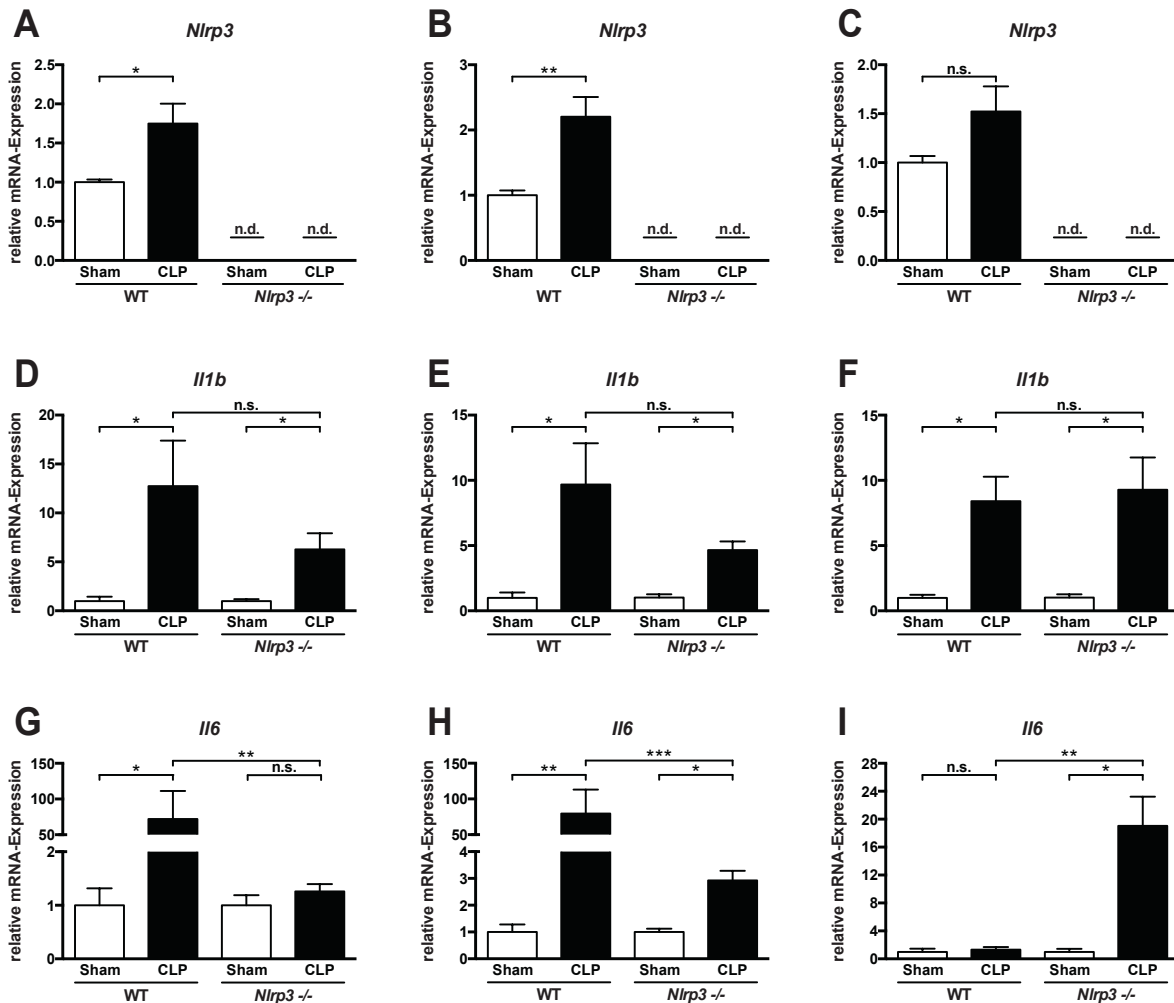


Abb. 19: Veränderung der Genexpression von proinflammatorischen Zytokinen im Skelettmuskel von WT- und *Nlrp3*-KO-Mäusen nach CLP-Operation. qPCR-Untersuchungen der Gene *Nlrp3* (A, B, C), *Il1b* (D, E, F) und *Il6* (G, H, I) im *Mm. gastrocnemius/plantaris* (GP), *M. tibialis anterior* (TA) und *M. soleus* (SOL) von männlichen WT- und *Nlrp3*-KO-Mäusen nach Sham-, bzw. CLP-Operation (WT-Sham n=3, WT-CLP n=9, *Nlrp3*-KO-Sham n=4, *Nlrp3*-KO-CLP n=6). Die Genexpressionen wurden auf *Gapdh* normalisiert und als Mittelwerte \pm SEM in Relation zur jeweiligen Sham-Gruppe dargestellt. n.d. = nicht detektierbar; * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$; n.s. = nicht signifikant. Mann-Whitney-Test.

3.3.4.2 Muskelspezifische Atrophiemarker

Vorherige Arbeiten unserer Arbeitsgruppe zeigten, dass unter CLP-induzierter Sepsis die Genexpressionen der beiden muskelspezifischen Atrophiemarker *Trim63* und *Fbxo32* in GP- und TA-Muskeln von C57BL/6 N-Mäusen erhöht waren [133].

Zur Beurteilung des UPSs vermittelten muskulären Proteinabbaus wurde die Expression dieser beiden Atrogene analysiert.

Trim63 war im GP-, TA- und SOL-Muskel der WT-CLP im Vergleich zu WT-Sham 7,9-Fach, 9,6-Fach, beziehungsweise 3,1-Fach exprimiert ($p \leq 0,01$, Abb. 20A+B+C)).

Ähnliche Beobachtungen konnten für die Genexpression von *Fbxo32* festgestellt werden. Auch hier war *Fbxo32* im GP-, TA- und SOL-Muskel von WT-CLP im Vergleich zu ihrer Kontrollgruppe 15,3-Fach, 9,7-Fach beziehungsweise 3-Fach signifikant erhöht ($p \leq 0,01$, Abb. 20D+E+F).

Im Gegensatz dazu war die *Trim63*- bzw. *Fbxo32*-Expression in allen untersuchten Muskeln der *Nlrp3*-KO-CLP-Tiere im Vergleich zu den Sham-operierten *Nlrp3*-KO-Tieren signifikant geringer exprimiert ($p \leq 0,001$; außer *Fbxo32* im SOL: $p \leq 0,01$).

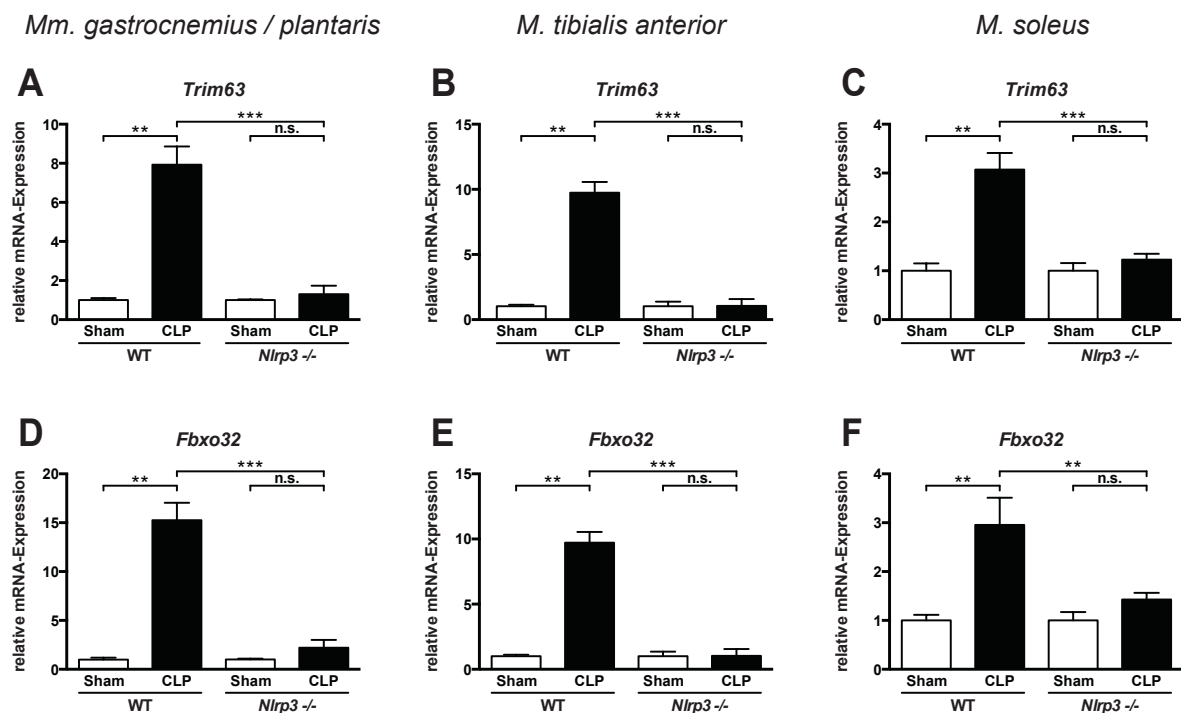


Abb. 20: Veränderung der Genexpression von *Trim63* und *Fbxo32* im Skelettmuskel von WT- und *Nlrp3*-KO-Mäusen nach CLP-Operation. qPCR-Untersuchungen der Gene *Trim63*, welches MuRF1 kodiert (A, B, C) und *Fbxo32*, welches Atrogin1 kodiert (D, E, F) im *M. gastrocnemius/plantaris* (GP), *M. tibialis anterior* (TA) und *M. soleus* (SOL) von männlichen WT- und *Nlrp3*-KO-Mäusen nach Sham-, bzw. CLP-Operation (WT-Sham n=3, WT-CLP n=9, *Nlrp3*-KO-Sham n=4, *Nlrp3*-KO-CLP n=6). Die Genexpressionen wurden auf *Gapdh* normalisiert und als Mittelwerte \pm SEM in Relation zur jeweiligen Sham-Gruppe dargestellt. ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$; n.s. = nicht signifikant. Mann-Whitney-Test.

3.3.4.3 Fasertyp-spezifische Myosinisoformen

Das Proteingleichgewicht im Skelettmuskel wird durch die Feinregulation von Proteinaufbau und -abbau bestimmt. Patientendaten konnten zeigen, dass während der Sepsis nicht nur die muskelspezifischen Atrophiemarker verstärkt exprimiert werden, sondern zusätzlich auch die Myosinexpression per se im Skelettmuskelbiopsien reduziert waren [134]. Daher wurde hier die Genexpression von faserspezifischen

Myosinisoformen überprüft, um die Sepsis-induzierte Myosinsynthese beurteilen zu können. Repräsentativ für Typ-II-A-, Typ-II-B- und Typ-I-Skelettmuskel-fasern wurden die Expression der entsprechenden Gene *Myh2*, *Myh4* und *Myh7* untersucht.

Die Analyse des gemischt-faserigen GP-Muskels von WT-CLP im Vergleich zu WT-Sham zeigte eine Herabregulation der *Myh2*- und *Myh7*-Genexpression um etwa 80 % ($p \leq 0,05$). Interessanterweise wies der *Nlrp3*-KO während der Sepsis eine entgegengesetzte Genregulation von *Myh2* und *Myh7* auf (Abb. 21A+G). Beide Gene wurden im GP von *Nlrp3*-KO-CLP im Vergleich zur Kontrollgruppe verstärkt exprimiert (*Myh2*: 2,6-Fach, $p \leq 0,05$; *Myh7*: 3,3-Fach) und zeigten auch gegenüber WT-CLP einen signifikanten Anstieg ($p \leq 0,01$).

Im TypII-Faser-reichen TA-Muskel konnten dem GP ähnliche Beobachtungen bezüglich der *Myh2* mRNA Expression gemacht werden (Abb. 21B); in WT-CLP war im Vergleich zu WT-Sham die *Myh2*-mRNA-Expression um 60 % reduziert, während in den *Nlrp3*-KO-CLP-Tieren die *Myh2*-Expression im Vergleich zu *Nlrp3*-KO-Sham 2-Fach erhöht war. Die *Myh2*-mRNA Expression in *Nlrp3*-KO-CLP gegenüber WT-CLP war im TA etwa 4-Fach erhöht ($p \leq 0,01$). Auf die *Myh7*-Expression im TA-Muskel scheint die CLP-induzierte Inflammation keinen Einfluss zu haben (Abb. 21H)

Im SOL-Muskel der septischen WT- und *Nlrp3*-KO-Tiere ließen sich keine signifikanten Veränderungen der Genexpression von *Myh2* und *Myh4* nachweisen (Abb. 21C+F). In beiden Mauslinien scheint es eine tendenzielle Erhöhung der *Myh7*-Expression unter Sepsisbedingungen zu geben (Abb. 21I).

Eine durch Sepsis bedingte Veränderung der *Myh4*-Genexpression konnte in allen untersuchten Skelettmuskeln beider Genotypen nicht nachgewiesen werden (Abb. 21D+E+F).

Mm. gastrocnemius / plantaris

M. tibialis anterior

M. soleus

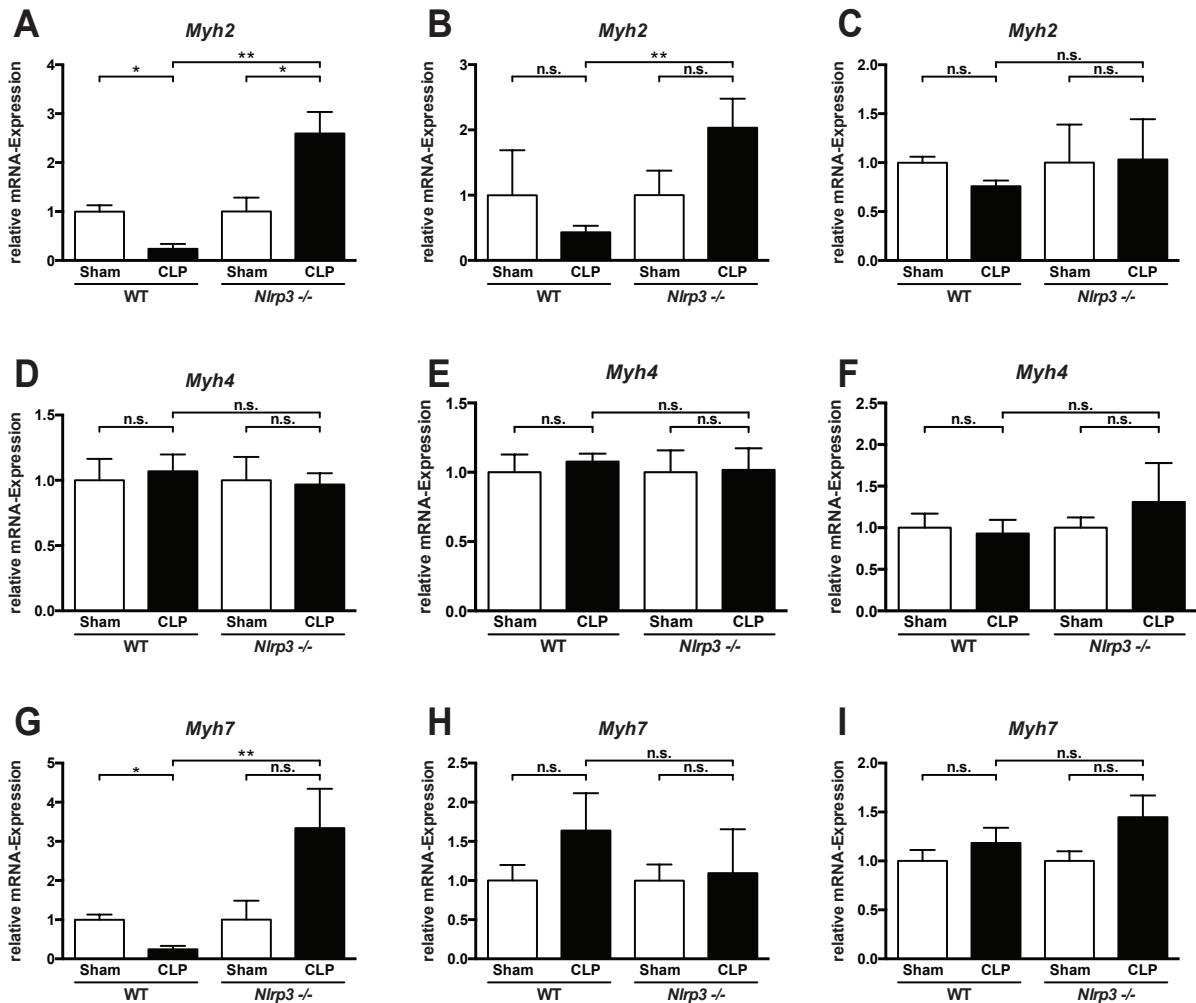


Abb. 21: Veränderung der Genexpression von Fasertyp-spezifischen Myosinisoformen im Skelettmuskel von WT- und *Nlrp3*-KO-Mäusen nach CLP-Operation. qPCR-Untersuchungen der Gene *Myh2* (A, B, C), *Myh4* (D, E, F) und *Myh7* (G, H, I) im *Mm. gastrocnemius/plantaris* (GP), *M. tibialis anterior* (TA) und *M. soleus* (SOL) von männlichen WT- und *Nlrp3*-KO-Mäusen nach Sham-, bzw. CLP-Operation (WT-Sham n=3, WT-CLP n=9, *Nlrp3*-KO-Sham n=4, *Nlrp3*-KO-CLP n=6). Die Genexpressionen wurden auf *Gapdh* normalisiert und als Mittelwerte ± SEM in Relation zur jeweiligen Sham-Gruppe dargestellt. *p≤0,05; **p≤0,01; n.s. = nicht signifikant. Mann-Whitney-Test.

3.3.5 Proteinanalysen im Skelettmuskel nach CLP-Operation

Um den Einfluss der *Nlrp3*-Keimbahndeletion auf die Muskelatrophie zu untersuchen, wurden Skelettmuskelproben hinsichtlich des Proteingehaltes während der Sepsis untersucht. Dazu wurden Western Blot-Analysen mit Gewebslysaten der vier Behandlungsgruppen durchgeführt.

Im GP- und TA-Muskel von WT-CLP-Tieren konnte eine deutliche Abnahme von sowohl Gesamtmyosin (MyHC I/II) als auch von schnellem Myosin (MyHC II) gegenüber der

WT-Sham-Gruppe detektiert werden (Abb. 22A+B). Unterdessen schien vor allem der septische TA-Muskel von *Nlrp3*-KO-CLP-Tieren keine Abnahme des schnellen und des Gesamtmyosins aufzuweisen. Der Proteingehalt von Gesamtmyosin war im GP- und TA-Muskel sogar erhöht.

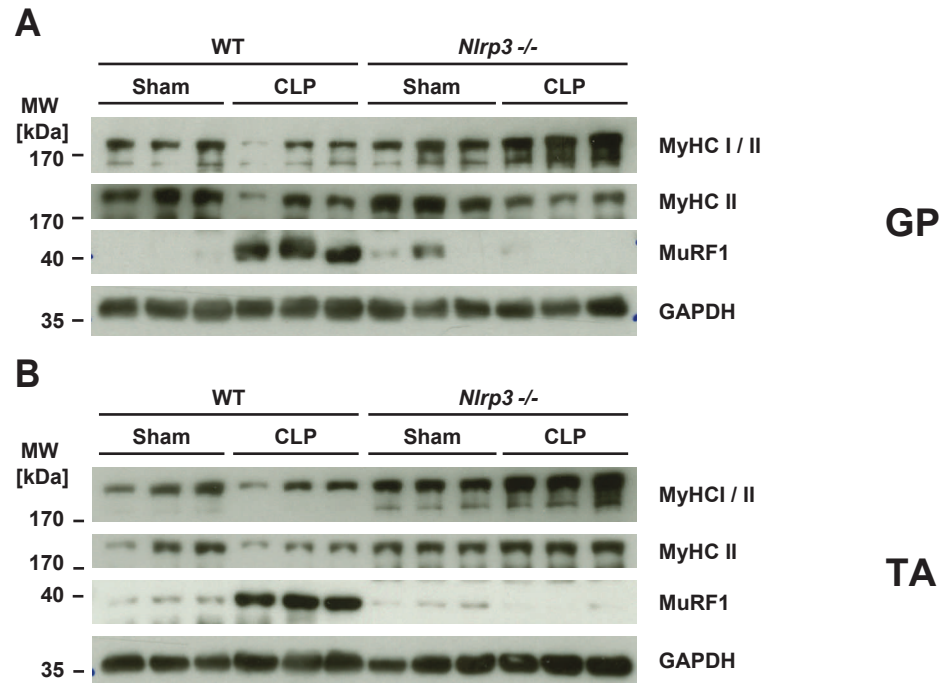


Abb. 22: Veränderung des Proteingehalts von Gesamtmyosin, schnellem Myosin und MuRF1 im Western Blot im Skelettmuskel von WT- und *Nlrp3*-KO-Mäusen nach CLP-Operation. Die extrahierten Proteine aus *Mm. gastrocnemius/plantaris* (GP) (A) und *M. tibialis anterior* (TA) (B) von männlichen WT- und *Nlrp3*-KO-Mäusen nach Sham-, bzw. CLP-Operation wurden durch SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt. Anschließend wurden Western Blot-Analysen unter Verwendung von spezifischen Antikörpern für Gesamtmyosin (MF-20 für MyHC I/II), schnelles Myosin (My32 für MyHC II) und MuRF1 durchgeführt. Als Ladekontrolle wurde GAPDH verwendet. Dargestellt ist eine repräsentative Auswahl von n=3 je Gruppe. MW = Molekulargewicht; kDa = kilo-Dalton.

Die Analyse der MuRF1-Proteingehalt in beiden untersuchten Muskeln verifiziert die Ergebnisse der *Trim63*-Genexpressions-Analyse von 3.3.4.2 (Abb. 22A+B). Während WT-CLP im Vergleich zu WT-Sham in beiden untersuchten Muskeln einen deutlichen Anstieg des MuRF1-Proteingehalts aufwies, war der MuRF1-Proteingehalt von *Nlrp3*-KO-CLP im Vergleich zur Kontrollgruppe deutlich reduziert.

3.3.6 Histologische Beurteilung der Skelettmuskeln nach CLP-Operation

Um zu überprüfen, ob die zuvor beschriebene Skelettmuskelatrophie auf eine Atrophie der Myozyten zurückzuführen ist, wurden die Skelettmuskeln histologisch untersucht.

Zunächst wurden HE-Übersichtsfärbungen aus Kryogewebschnitten vom GP-, TA- und SOL-Muskel aller Behandlungsgruppen angefertigt, um einen allgemeinen Überblick über die Morphologie zu erhalten. Zur histologischen Verifizierung und Quantifizierung der Atrophie wurden Myozytenquerschnittsflächen (MCSA) gemessen. Die fasertyp-spezifische Atrophie der Gefrierschnitte wurde mittels ATPase-Färbungen genauer untersucht. Diese Methode ermöglicht durch eine unterschiedliche Reaktion auf pH-Veränderungen der ATPase der drei Myosin-Isoformen die Unterscheidung der einzelnen Fasertypen und damit die Detektion gestörter Verteilungsmuster.

Unabhängig von der Operationsart konnte nach Sepsisinduktion in keinem der untersuchten Muskeln von WT- und *Nlrp3*-KO-Tieren auffälligen Nekrosen, Narben oder lokale Infiltrationen von Lymphozyten im Rahmen einer Inflammation in den HE-Übersichtsfärbungen gefunden werden (Abb. 23A, Abb. 24A, Abb. 25A).

Sowohl in den GP-, als auch in den TA-Muskeln konnte eine signifikante Abnahme der MCSA der Typ-II-Fasern bei sowohl WT- als auch *Nlrp3*-KO-Tieren nach Sepsisinduktion festgestellt werden (WT: $p \leq 0,0001$; *Nlrp3*-KO: $p \leq 0,01$). Die entsprechende Häufigkeitsverteilung der MCSA zeigte bei beiden untersuchten Muskeln eine deutliche Linksverschiebung der Kurve mit einer Zunahme der Häufigkeit von Muskelfasern mit einer geringeren Querschnittsfläche nach CLP-Operation (WT: $p \leq 0,0001$; *Nlrp3*-KO: $p \leq 0,01$; Abb. 23B, Abb. 24B). Dabei war bei *Nlrp3*-KO-Tieren die Linksverschiebung zwischen CLP und Sham zwar auch signifikant verändert, aber die Höhe der Kurve und somit die Häufigkeit kleinerer MCSA fiel deutlich geringer aus als bei WT-Tieren. Dies spiegelte sich auch im Mittelwert der Querschnittsflächen wieder (Abb. 23C, Abb. 24C), der eine 38 %ige Abnahme bei WT-Tieren ($p \leq 0,0001$) und eine 9 %ige Abnahme bei *Nlrp3*-KO-Tieren ($p \leq 0,01$) im GP-Muskel, beziehungsweise eine 37 %ige Abnahme bei WT-Tieren ($p \leq 0,0001$) und eine 10 %ige Abnahme bei *Nlrp3*-KO-Tieren ($p \leq 0,01$) im TA-Muskel aufwies. Allerdings war die mittlere Abnahme der MCSA beider Muskeln bei *Nlrp3*-KO-CLP-Tieren signifikant geringer als bei den WT-CLP-Tieren ($p \leq 0,0001$).

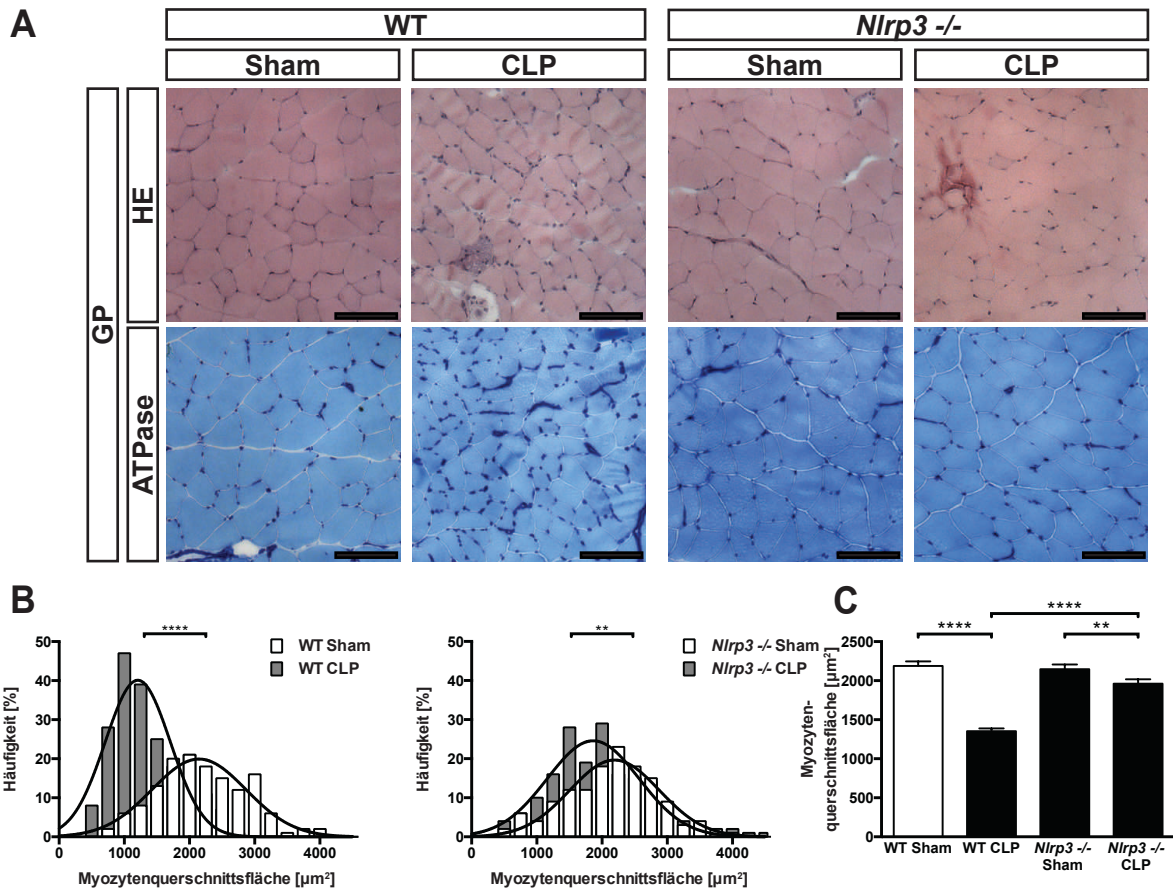


Abb. 23: Histologische Analyse des GP-Muskels von WT- und *Nlrp3*-KO-Mäusen nach CLP-Operation. HE und ATPase gefärbte Gefrierschnitte des *Mm. gastrocnemius/plantaris* von männlichen WT- und *Nlrp3*-KO-Mäusen nach Sham-, bzw. CLP-Operation. In der ATPase-Färbung stellen die dunkelblau gefärbten Myozyten Typ-I-Fasern und die hellblau gefärbten Myozyten Typ-II-Fasern dar. Messbalken = 100 µm (A). Häufigkeitsverteilung (B) sowie Quantifizierung (C) der Myozytenquerschnittsfläche von Typ-II-Fasern des GP-Muskels WT- und *Nlrp3*-KO-Mäusen nach Sham-, bzw. CLP-Operation. Mindestens 100 Myozyten pro Gruppe wurden mittels Image J Software vermessen. MCSA wurden als Mittelwerte \pm SEM dargestellt. ** $p \leq 0,01$; **** $p \leq 0,0001$. Mann-Whitney-Test.

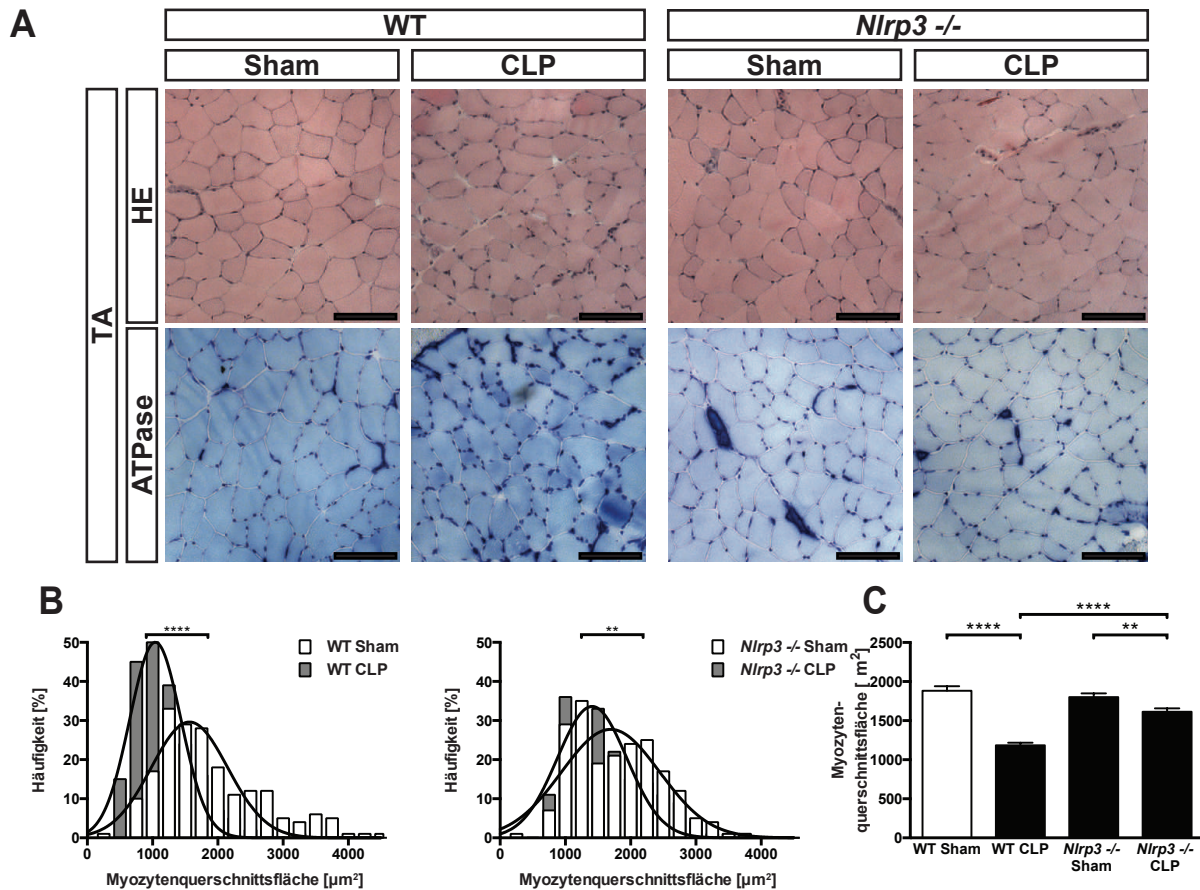


Abb. 24: Histologische Analyse des TA-Muskels von WT- und *Nlrp3*-KO-Mäusen nach CLP-Operation. HE und ATPase gefärbte Gefrierschnitte des *M. tibialis anterior* (TA) von männlichen WT- und *Nlrp3*-KO-Mäusen nach Sham-, bzw. CLP-Operation. In der ATPase-Färbung stellen die dunkelblau gefärbten Myozyten Typ-I-Fasern und die hellblau gefärbten Myozyten Typ-II-Fasern dar. Messbalken = 100 μm (A). Häufigkeitsverteilung (B) sowie Quantifizierung (C) der Myozyten-querschnittsfläche von Typ-II-Fasern des TA-Muskels WT- und *Nlrp3*-KO-Mäusen nach Sham-, bzw. CLP-Operation. Mindestens 100 Myozyten pro Gruppe wurden mittels Image J Software vermessen. MCSA wurden als Mittelwerte \pm SEM dargestellt. ** $p \leq 0,01$; **** $p \leq 0,0001$. Mann-Whitney-Test.

Da der SOL-Muskel sowohl langsame Typ-I-Fasern als auch schnelle Typ-II-Fasern enthält, wurde die histologische Analyse entsprechend beider Fasergruppen aufgeteilt. Ähnlich wie beim GP- und TA-Muskel konnte unter Sepsisbedingungen im SOL eine Abnahme der MCSA von Typ-II-Fasern sowohl bei WT-Tieren um 14 % als auch bei den *Nlrp3*-KO-Tieren um 5 % festgestellt werden. Jedoch war sie nur bei den WT-Tieren statistisch signifikant ($p \leq 0,0001$, Abb. 25E). Ähnlich wie beim GP- und TA-Muskeln wurde im SOL bei den WT-Tieren eine Linksverschiebung der Häufigkeitsverteilung beobachtet, allerdings konnte diese bei *Nlrp3*-KO-Tieren nach CLP-Operation nicht festgestellt werden (Abb. 25D).

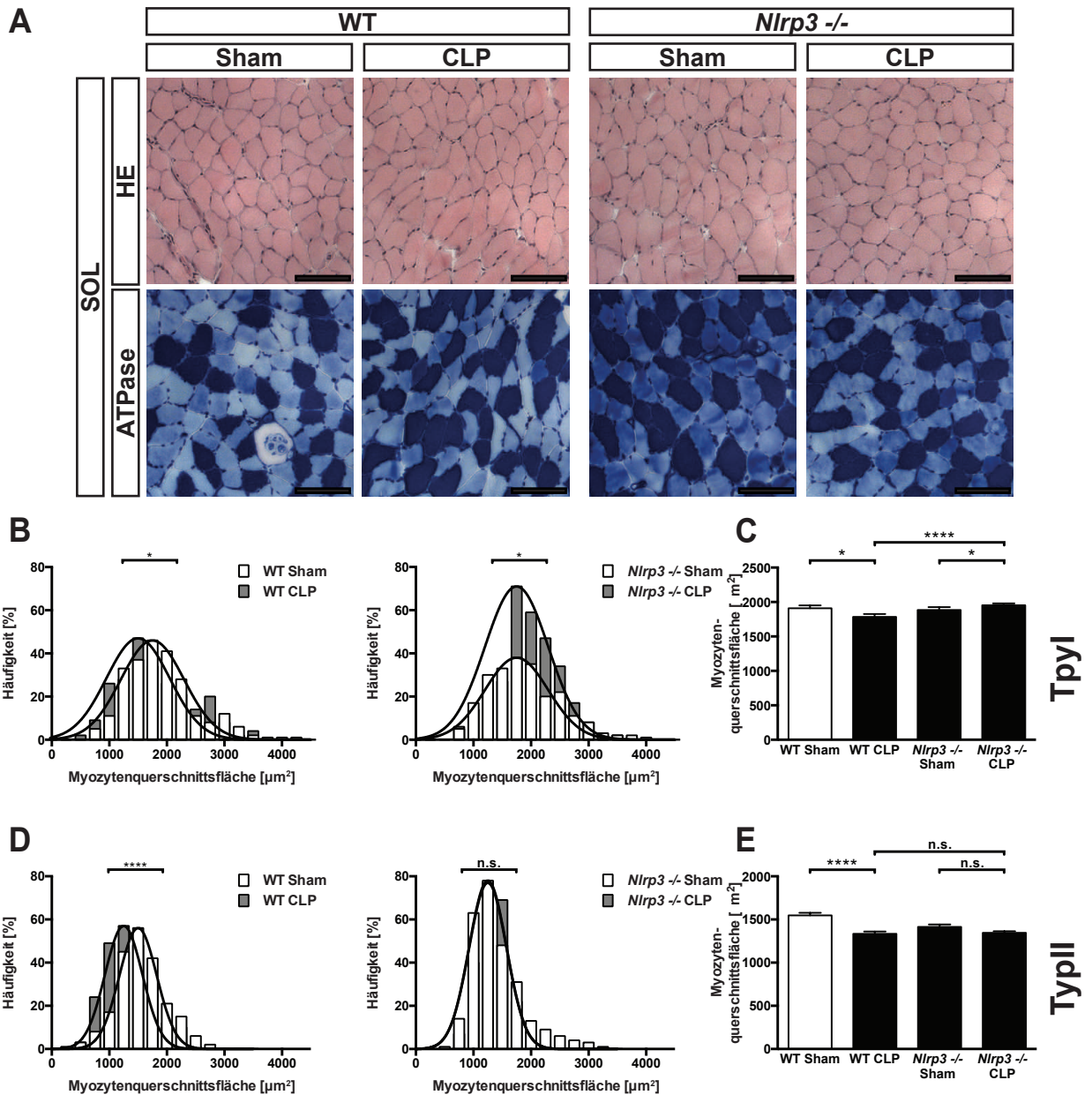


Abb. 25: Histologische Analyse des SOL-Muskels von WT- und *Nlrp3*-KO-Mäusen nach CLP-Operation. HE und ATPase gefärbte Gefrierschnitte des *M. soleus* (SOL) von männlichen WT- und *Nlrp3*-KO-Mäusen nach Sham-, bzw. CLP-Operation. In der ATPase-Färbung stellen die dunkelblau gefärbten Myozyten Typ-I-Fasern und die hellblau gefärbten Myozyten Typ-II-Fasern dar. Messbalken = 100 μm (A). Häufigkeitsverteilung (B) sowie Quantifizierung (C) der Myozyten-querschnittsfläche von Typ-I-Fasern sowie Häufigkeitsverteilung (D) sowie Quantifizierung (E) der Myozytenquerschnittsfläche von Typ-II-Fasern des SOL-Muskels WT- und *Nlrp3*-KO-Mäusen nach Sham-, bzw. CLP-Operation. Mindestens 100 Myozyten pro Gruppe wurden mittels Image J Software vermessen. MCSA wurden als Mittelwerte ± SEM dargestellt. * $p \leq 0,05$; **** $p \leq 0,0001$; n.s. = nicht signifikant. Mann-Whitney-Test.

Auch bei den langsamen Typ-I-Fasern zeigte sich bei den WT-Tieren nach Sepsisinduktion eine signifikante Abnahme der MCSA um 6,6 % ($p \leq 0,05$; Abb. 25C). Bei den *Nlrp3*-KO-Tieren konnte nach Sepsisinduktion eine minimale Zunahme der MCSA um ca. 4 % nachgewiesen werden ($p \leq 0,05$). Auch gegenüber der WT-CLP-Gruppe war die Zunahme der MCSA der Typ-I-Fasern von *Nlrp3*-KO-CLP-Tieren statistisch signifikant ($p \leq 0,0001$). In der Häufigkeitsverteilung war bei *Nlrp3*-KO-Tieren eine Häufigkeitszunahme von Muskelfasern mit größeren Querschnittsflächen nach CLP-Operation festzustellen ($p \leq 0,05$, Abb. 25B).

Um eine Veränderung der Fasertypzusammensetzung detektieren zu können, wurde auch die prozentuale Verteilung der langsamen Typ-I-Fasern und der schnellen Typ-II-Fasern nach CLP-Operation untersucht. Bei WT-Tieren konnte nach Sepsisinduktion festgestellt werden, dass der Anteil von Typ-I-Fasern im SOL zunimmt. Dazu passend wurde ein inverses Verhalten der Typ-II-Fasern beobachtet; deren Anteil nahm ab ($p \leq 0,05$; Abb. 26A+B). Bei KO-Tieren blieb die Fasertypverteilung durch die Sepsisinduktion weitgehend unbeeinflusst.

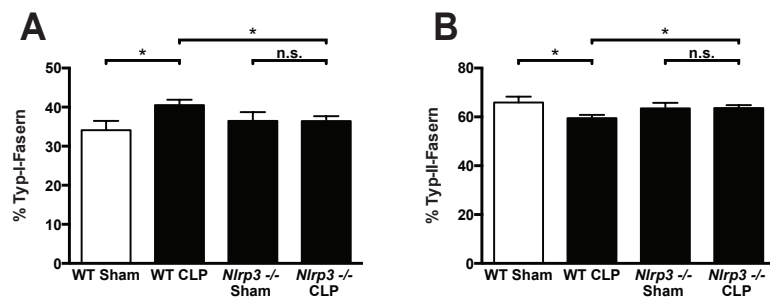


Abb. 26: **Prozentuale Verteilung der Typ-I- und Typ-II-Fasern im SOL-Muskel von WT- und *Nlrp3*-KO-Mäusen nach CLP-Operation.** Auszählung von Typ-I- (A) und Typ-II-Fasern (B) der SOL-Muskeln von WT- und *Nlrp3*-KO-Mäusen nach Sham-, bzw. CLP-Operation. Mindestens 8 Gesichtsfelder wurden pro Gruppe ausgewertet. Die prozentualen Anteile von Typ-I- und Typ-II-Fasern wurden als Mittelwerte \pm SEM dargestellt. * $p \leq 0,05$; n.s. = nicht signifikant. Ungepaarter T-Test.

4. Diskussion

Die Fortschritte der Intensivmedizin haben die Mortalität von kritisch kranken Patienten reduziert [3,4]. Allerdings wird die Lebensqualität der Patienten, die schwere Erkrankungen überleben, oftmals weiterhin erheblich beeinträchtigt. ICUAW ist eine neuromuskuläre Komplikation, die häufig während einer schweren systemischen Inflammation auftritt und mit ausgeprägter allgemeiner Schwäche und Muskelatrophie einhergeht. Etwa die Hälfte der Patienten auf Intensivstationen ist von dieser Erkrankung betroffen. Hauptrisikofaktoren für die Entstehung der ICUAW sind die schwere Sepsis und der septische Schock. ICUAW ist assoziiert mit verlängertem Krankenhausaufenthalt und erhöhter Mortalität. Auch Jahre nach der Entlassung leiden viele Patienten immer noch unter reduzierter Gehfähigkeit und damit verbundener verminderter Lebensqualität. Auf Grund mangelnder Kenntnisse über die Pathophysiologie und damit fehlender fokussierter Therapiemöglichkeit, stellt die ICUAW eine erhebliche wirtschaftliche Belastung für das Gesundheitswesen dar [5,14,30-32].

In der Sepsis werden vermehrt proinflammatorische Moleküle exprimiert und sezerniert. IL-1 β ist ein bedeutendes Schlüsselzytokin in der Pathogenese der Sepsis und wird insbesondere in der Anfangsphase der Sepsis sezerniert [108,109]. Frühere Arbeiten zeigen, dass das NLRP3-Inflammasom für die Aktivierung des Zytokins IL-1 β essentiell ist [97,98]. Es gibt Hinweise darauf, dass IL-1 β in der Entstehung der inflammatorischen Muskelatrophie involviert ist und über die Aktivierung des UPSs den Proteinabbau im Skelettmuskel induziert [118].

Es besteht daher die Möglichkeit, dass das NLRP3-Inflammasom nicht nur in der Entstehung einer Sepsis von Bedeutung ist, sondern durch die Aktivierung IL-1 β auch zur inflammationsvermittelten Muskelatrophie beiträgt. In der vorliegenden Arbeit wurde die Bedeutung von NLRP3 in der inflammationsvermittelten Muskelatrophie im Tiermodell der polymikrobiellen Sepsis näher untersucht. Die Hypothese der vorliegenden Arbeit war, dass die Gendeletion von *Nlrp3* im Mausmodell und die damit verbundene verminderte IL-1 β -Aktivierung in ein verbessertes Überleben und einer Reduktion von Muskelatrophie nach CLP-induzierter Sepsis resultieren. Auf dieser Grundlage sollten neue Erkenntnisse über die Entstehung von inflammatorischer Skelettmuskelatrophie und über die Funktion des Muskels in akuten systemischen Entzündungsreaktionen gewonnen werden.

4.1 IL-1 β -Signaling ist in Myozyten aktiv und induziert Muskelatrophie

Frühere Arbeiten zeigten, dass die Komponenten des NLRP3-Inflammasoms auch in nicht-hämatopoetischen Zellen exprimiert werden. Neben Caspase-1 wurden ASC und NLRP3 im Muskelgewebe von Dysferlin-defizienten Mäusen gefunden. Zudem konnte gezeigt werden, dass primäre Muskelzellen fähig sind, IL-1 β nach LPS-Behandlung zu sezernieren [115]. Die Kenntnisse über den IL-1 β -Signalweg wurden dennoch überwiegend aus Experimenten mit immunkompetenten Zellen gewonnen [97]. Aus den *in vitro*-Daten unserer Arbeitsgruppe geht hervor, dass der IL-1 β -Signalweg auch in Myozyten aktiv ist. Mittels Immunhistochemiefärbungen konnte eine verstärkte Translokation von IRAK-1 in den Zellkern sowie eine vermehrte NF- κ B-Promoteraktivität in NF- κ B-Reporter-Gen-Assays nach IL-1 β -Behandlung in C2C12-Zellen beobachtet werden. Dies zeigt, dass IL-1 β zur Aktivierung von NF κ B-abhängigen Prozessen im Skelettmuskel führt [135]. Die gesteigerte Genexpression von *Irf6* und *Nlrp3* nach IL-1 β -Behandlung von Muskelzellen unterstützt diese Vermutung. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Behandlung von Skelettmuskelzellen mit IL-1 β Atrophie und die Induktion von muskelspezifischen Atrophie markern *in vitro* induziert. Die Ergebnisse dieser Arbeit sind in Übereinstimmung mit bereits publizierten Arbeiten und bestätigen die Annahme, dass MuRF1 und Atrogin1 in IL-1 β -induzierter Muskelatrophie eine Rolle spielen [72,118]. Zur weiteren Verifizierung der Muskelatrophie wurden der Myosinproteingehalt und der Myotubendurchmesser nach IL-1 β -Behandlung bestimmt. Hier konnte sowohl eine Verminderung des Proteingehalts von langsamem und schnellem Myosin als auch des Myotubendurchmessers nachgewiesen werden. Jedoch wurde *in vitro* keine Veränderung des MuRF1-Proteingehalts festgestellt. Da weitere Zeitpunkte in dieser Arbeit nicht untersucht wurden, erlaubt das hier dargestellte Experiment keine Aussage darüber, ob nicht zu einem anderen Untersuchungszeitpunkt der MuRF1-Proteingehalt durch IL-1 β -Behandlung erhöht gewesen wäre.

Da die Proteinhomöostase im Skelettmuskel sowohl vom Proteinabbau als auch vom Proteinaufbau beeinflusst wird, wurde zudem die Genexpression der verschiedenen Myosinisoformen untersucht. Es ist bereits beschrieben worden, dass IL-1 β die Bildung von schweren Myosinketten während der Differenzierung von Myoblasten zu Myotuben über die Hemmung des Insulin-ähnlichen Wachstumsfaktor I (IGF-I) hemmt [136]. Andere Arbeitsgruppen fanden heraus, dass IL-1 die

Phosphorylierung des eukaryotischen Initiationsfaktors 4A (eIF4E) reduziert. Dieser vermittelt während der Translation die Bindung der mRNA mit dem 43S-Präinitiationskomplex. Da ein proportionales Verhältnis zwischen eIF4E und der Proteinsynthese besteht, verringerte sich durch die Phosphorylierung von eIF4E die Proteinsynthese [137]. Auch in der vorliegenden Arbeit wurde die mRNA-Expression von sowohl schnellem als auch langsamem Myosin durch IL-1 β reduziert, sodass bestätigt wurde, dass IL-1 β die Myosinsynthese *in vitro* reduziert.

Mit dem vorliegenden Versuchsaufbau kann jedoch keine Aussage darüber gemacht werden, ob die Proteindegradation oder die verminderte Proteinsynthese überwiegt. Denn wenn auch die Genexpression von *Trim63* und *Fbxo32* nach IL-1 β -Inkubation gesteigert war, wurden die weiteren Komponenten des UPSs nicht weiter untersucht. Es bleibt daher in zukünftigen *in vitro*-Experimenten zu klären, ob eine IL-1 β -Behandlung auch das UPS in Skelettmuskelzellen verstärkt aktiviert und wie groß tatsächlich der Einfluss des UPS in der Sepsis an der Proteinhomeostase ist.

4.2 Der Skelettmuskel trägt zur systemischen Immunantwort bei

Die wichtigste Aufgabe von Zytokinen, wie zum Beispiel IL-1 β oder IL-6, ist die Steuerung der Immunantwort während Inflammationsprozessen im Körper. Da Zytokine auch Auswirkungen auf andere Prozesse, wie zum Beispiel der Zellproliferation, Differenzierung, Zellmigration und Apoptose haben, sind sie im Auf- und Abbau verschiedener Gewebearten und Organen beteiligt [138]. In vielen chronischen Erkrankungen, die mit einer erhöhter Muskelatrophie einhergehen, wurden gesteigerte Zytokinwerte gefunden. Auch in der Sepsis scheint ein Zusammenhang zwischen gesteigerten Zytokinspiegeln von TNF- α , IL-1 β und IL-6 und der Schwere der Sepsis sowie der Letalität zu bestehen [139]. Es ist bekannt, dass die Proteinhomeostase im Muskel von verschiedenen humoralen Faktoren reguliert wird. Zum Beispiel entwickelten gesunde Tiere, die proinflammatorischen Zytokinen wie TNF- α , IL-1 β oder Interferon- γ (IFN- γ) ausgesetzt wurden, eine Muskelatrophie mit sowohl gesteigerter Ubiquitin-Expression als auch vermehrter enzymatischer Aktivität des Proteasoms [117]. Im Gegenzug waren Tumor-tragenden Tiere, die eine Antikörpertherapie gegen die Zytokine IL-6, TNF- α , or IFN- γ erhalten haben, vor Muskelatrophie und gesteigerter Ubiquitin-Aktivität geschützt [140-142].

Es gibt darüber hinaus aber immer mehr Indizien dafür, dass der Muskel selbst fähig ist, Zytokine zu produzieren und zu sezernieren. Mehrere Arbeiten zeigen, dass nach

Skelettmuskelbeanspruchung durch Sport erhöhte IL-6-Konzentrationen im Serum von Probanden messbar sind. Interessanterweise korreliert dabei die Menge der Muskelmasse mit der IL-6-Konzentration nach den Übungen. So finden sich zwar erhöhte IL-6-Spiegel nach exzentrischem Krafttraining einzelner Extremitäten, jedoch sind die höchsten Werte nach dem Laufen zu finden, wo multiple Muskelgruppen beansprucht werden. Dabei ist der Zytokinanstieg allein auf die Kontraktion zurückzuführen und ist nicht durch Sport-induzierte Muskelschäden zu erklären [143,144].

Der Skelettmuskel scheint auch in der Immunantwort nach einer bakteriellen Infektion involviert zu sein. Valenzuela *et al.* konnten in Experimenten mit Steinbutten zeigen, dass nach einer bakteriellen Infektion mit *Vibrio ordalii* der Skelettmuskel zur Expression und Produktion verschiedener Faktoren der Immunantwort inklusiver proinflammatorischer Zytokine (TNF- α , IL-1 β , IL-8), *Toll-like*-Rezeptoren und anderer Effektormoleküle fähig ist. Da der Skelettmuskel von Fischen mehr als 50 % ihrer Körpermasse ausmacht, bekräftigt dieses Ergebnis die Vermutung, dass der Skelettmuskel ein wichtiges immunologisches aktives Organ ist [145].

In unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass das Akute-Phase-Protein Serum Amyloid A1 (SAA1) im Skelettmuskel synthetisiert und im Muskel von sowohl kritisch kranken Patienten als auch septischen Mäusen freigesetzt wird [146]. SAA1-mRNA ist in einer Vielzahl verschiedenen Gewebsarten, inklusive dem Skelettmuskel, zu finden und wird durch TNF- α und IL-6 induziert [147]. In Immunzellen induziert SAA1 die Genexpression und Sekretion von IL-1 β . Dabei wird die Aktivierung des NLRP3-Inflammasom über die lysosomale Protease Cathepsin B und den ATP-Rezeptor P2X₇R vermittelt [148]. Es ist bekannt, dass das NLRP3-Inflammasom auch in C2C12-Myozyten enthalten und aktiv ist und dass die Inkubation mit SAA die Genexpression von *Il6* und *Tnfa* in C2C12-Myotuben erhöht [149,150]. Basierend auf Experimenten unserer Arbeitsgruppe, in denen nachgewiesen wurde, dass der IL-1 β -Signalweg in Myozyten vorhanden und aktiv ist, konnte mittels IL-1 β -Behandlung eine Muskelatrophie *in vitro* induziert und erhöhte *Il6* und *Nlrp3* mRNA-Werte in Myozyten gemessen werden [135]. Da auch im Skelettmuskel von septischen WT-Mäusen die Genexpression von *Il1b*, *Il6* und *Nlrp3* gesteigert war, ergeben sich Hinweise, dass Rückkopplungsschleifen zwischen IL-1 β , IL-6, SAA1 und NLRP3 bestehen, die zur systemischen Inflammations- und Akute-Phase-Reaktion beitragen und weiter unterhalten. Wie die genannten Moleküle und deren Signalwege im inflammatorischen Muskel mechanistisch zusammenwirken, ist Gegenstand laufender Untersuchungen.

Außerdem könnte die Unterscheidung der myogenen versus leukozytären Zytokinproduktion in Zukunft eine entscheidende Rolle in der Pathogenese von inflammatorischen Myopathien einnehmen. Gegebenenfalls ist zur Klärung dieser Fragestellung die Wahl anderer Untersuchungszeitpunkte nötig, da die systemische und lokale Inflammations- und Akute-Phase-Reaktion möglicherweise zu einem früheren Zeitpunkt ihren Höhepunkt aufweist.

In der vorliegenden Arbeit konnte *in vitro* interessanterweise nach einem rasanten Anstieg die Erhöhung der Genexpression von *Il6* nach bereits 24 Stunden nicht mehr nachgewiesen werden. Allerdings fanden sich im Tiermodell auch 96 Stunden später noch deutlich erhöhte Expressionen dieses Entzündungsparameters. Auch bei kritisch kranken Patienten wurden im späteren Verlauf der Erkrankung erhöhte IL-6-Serumspiegel gemessen [134]. Die Diskrepanz zwischen dem Zellkulturexperiment und dem Tierexperiment kann durch die fehlende Interaktion zwischen verschiedenen Organsystemen *in vitro* erklärt werden. Bei der Untersuchung des Zytokins IL-1 β in unterschiedlichen Krankheitsmodellen ist es wichtig, dass zirkulierende Konzentrationen von IL-1 β , selbst bei schweren Erkrankungen, wie bei den Cryoporin-assoziierten periodischen Syndrome (CAPS), nur im Nanogramm-Bereich zu messen sind [151]. So brachten Zytokinmessungen im Serum von Patienten mit septischen Schock keine messbaren Werte von IFN- γ , TNF- α und IL-1 β , da die Zytokinlevel unterhalb der Nachweisgrenze lagen. Lediglich hohe IL-6-Serumspiegel konnten bestimmt werden [152]. Es ist daher davon auszugehen, dass der Zeitpunkt der IL-1 β -Messung ein entscheidender Faktor ist. Voisin *et al.* untersuchten die Kinetik verschiedener Zytokine im Plasma von septischen Ratten, die eine intravenöse Injektion von *Escherichia coli* erhalten hatten. Der Höhepunkt des TNF- α -Anstiegs ließ sich bereits nach ca. 1,5 Stunden feststellen, während im Vergleich IL-1 β und IL-6 erst nach 3 Stunden ihr Maximum erreichten. Anschließend kam es bei allen drei Zytokinen zu einem raschen Abfall der Zytokinkonzentration [153]. Besonders in klinischen Studien mit septischen Patienten gestaltet sich die Untersuchung der Zytokine und der Akut-Phase-Proteine als schwierig, da zu diesem frühen Zeitpunkt die Diagnose einer Sepsis in der Klinik häufig noch nicht gestellt werden kann. Zum anderen verbleibt ein Großteil von IL-1 β intrazellulär oder liegt im Kreislauf an anderen großen Proteinen, wie zum Beispiel α 2-Makroglobulin oder Komplementfaktoren, gebunden vor [154,155].

In der vorliegenden Arbeit konnten 96 Stunden nach CLP-Operation noch erhöhte IL-1 β Serumspiegel in septischen WT-Mäusen, nicht aber in KO-Tieren nachgewiesen

werden. Es ist wahrscheinlich, dass der verminderte IL-1 β -Spiegel im Serum von *Nlrp3*-KO-Mäusen eine verminderte systemische Inflammationsreaktion nach sich zieht und dass diese generelle verminderte Inflammationsreaktion zur Reduktion der Muskelatrophie bei *Nlrp3*-KO-Mäusen führte. Da die inflammationsvermittelte Muskelatrophie nicht nur mit der Sepsis assoziiert ist, ist es nicht auszuschließen, dass auch andere Muskelatrophieformen von der IL-1 β -/NLRP3-Inhibierung profitieren. Als Beispiel wären hierfür die rheumatoide Arthritis oder die entzündliche Darmerkrankung zu nennen, die ebenso mit hohen systemischen IL-1 β -Werten einhergehen [156].

Insgesamt waren *Nlrp3*-KO-Mäuse vor den Folgen einer CLP-induzierten Sepsis geschützt und wiesen einen milderen Sepsisverlauf als WT-Mäuse auf. Neben der verminderten IL-1 β -Produktion konnte auch die verminderte *Il6*-Genexpression in septischen *Nlrp3*-KO-Tieren gemessen werden. Frühere Experimente zeigten, dass die IL-6-Freisetzung über IL-1 β vermittelt wird und IL-1 β die *Il6*-Genexpression direkt beeinflusst [154,157]. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass der Sepsisschutz sowohl auf erniedrigte IL-1 β -Spiegel als auch auf eine generell verminderte systemische Inflammationsreaktion zurückzuführen ist. Um diese Hypothese zu untersuchen wären weiterführende Untersuchungen anderer inflammatorischer Mediatoren bei septischen *Nlrp3*-KO-Tieren nötig.

4.3 *Nlrp3*-Deletion schützt vor CLP-induzierter Sepsis

Während einer Sepsis erkennt das angeborene Immunsystem mittels spezieller Rezeptoren (PRRs) sowohl exogene Pathogene (PAMPs) als auch endogene Moleküle (DAMPs) [158,159]. In der Gruppe der PRRs stellen die intrazellulär lokalisierten NLRs eine Besonderheit dar, da sie sich zu multimeren Proteinkomplexen zusammenschließen und sogenannte Inflammasome bilden können. Diese wiederum regulieren die Produktion verschiedener Zytokine auf posttranslationaler Ebene. Das NLRP3-Inflammasom wurde in der Literatur bislang am ausführlichsten charakterisiert und ist nach seiner Formierung für die Aktivierung der Caspase-1 zuständig. Caspase-1 wiederum katalysiert unter anderem die Proteolyse des Präkursors pro-IL-1 β in seine biologisch aktive Form IL-1 β [97,98]. Da Caspase-1-defiziente Mäuse vor einem septischen Schock geschützt sind, ist für die Entstehung der Sepsis eine NLRP3-abhängige Bildung von IL-1 β durch Caspase-1 von Bedeutung [110].

Die vorliegenden Daten zeigen, dass Mäuse mit einer *Nlrp3*-Keimbahndeletion vor CLP-induzierter Sepsis geschützt sind. Nach 96 Stunden war im Vergleich zu den CLP-

operierten WT-Mäusen ein deutlich höherer Anteil von *Nlrp3*-KO-Mäusen vital. Diese Daten stehen im Einklang mit einer neueren Arbeit von Jin *et al.*, die ebenfalls zeigen konnte, dass *Nlrp3*-KO-Tiere im Vergleich zu WT-Tieren vor CLP-induzierter Sepsis geschützt sind. In deren Arbeit waren 10 Tage nach CLP-induzierter Sepsis sogar noch 100 % der *Nlrp3*-KO-Tiere am Leben [121]. Es ist bekannt, dass die Intensität der CLP-induzierten Sepsis von der Lokalisation der Zökumligatur, der Häufigkeit der Punktion und der Nadelgröße, mit der die Punktion durchgeführt wird, abhängig ist [160]. Diese vom Untersucher abhängigen Variablen können die Diskrepanz der unterschiedlichen Mortalitätsraten nach CLP-Operation zwischen den beiden Arbeiten erklären. Des Weiteren konnten sie zeigen, dass die Gabe des NLRP3-Inhibitors Glibenclamid die Mortalität der WT-Tiere im Vergleich zu unbehandelten WT-Tieren nach CLP-induzierter Sepsis signifikant reduziert. Auch *Caspase1*-KO-Mäuse, die kein IL-1 β und IL-18 produzieren können, sind im Gegensatz zu WT-Mäusen vor *Escherichia coli* induzierter Sepsis geschützt.

Nlrp3-KO-Mäuse und WT-Mäuse unterschieden sich nicht nur in ihrer Mortalität, auch andere klinische Parameter waren während der Sepsis von einer Deletion von *Nlrp3* betroffen. Auf basaler Ebene konnten keine Unterschiede im Körpergewicht und Lebergewicht von WT- und *Nlrp3*-KO-Mäusen gesehen werden. Diese Ergebnisse decken sich mit den Daten von Ringling *et al.*, die ebenso keine Gewichtsunterschiede zwischen den beiden Phänotypen bei normaler Ernährung feststellen konnten [161]. Nach CLP-Operation zeigte sich jedoch eine deutliche Abnahme der Körper-, Leber- und Skelettmuskelgewichte in WT-Tieren im Vergleich zu den Sham-operierten WT-Tieren. *Nlrp3*-KO-Mäusen hingegen wiesen keine Änderung des Körpergewichts und Lebergewichts auf. Bezüglich des Milzgewichts konnte in WT-Tieren nach CLP-Operation ein deutlicher Gewichtsanstieg verzeichnet werden. Diese Art der Splenomegalie wird auch bei septischen Patienten beobachtet und ist Ausdruck einer generalisierten Abwehrreaktion des Immunsystems [162]. Interessanterweise war die Splenomegalie nach CLP-induzierter Sepsis bei *Nlrp3*-KO-Mäusen noch stärker ausgeprägt. Bereits Song Zhao *et al.* beschreibt eine Splenomegalie in *Nlrp3*-KO-Mäusen nach *C. rodentium*-Infektion, welche mit einer erhöhten Bakterienlast und einer verstärkten Granulozytenakkumulation in der Milz einhergeht [163]. Daher liegt die Vermutung nahe, dass die Abwesenheit von NLRP3 eine wichtige Rolle in der Verhinderung von exzessiven systemischen Reaktionen spielt und andererseits die Anwesenheit von NLRP3 einen prognostisch ungünstigen Faktor in der CLP-induzierten

Sepsis darstellt. Anakinra, ein Interleukin-1-Rezeptorantagonist (IL-1Ra), wurde in der Vergangenheit bereits in mehreren Studien bei septischen Patienten sowie in Tierexperimenten eingesetzt. Bislang waren die Ergebnisse aber eher enttäuschend, da kein Überlebensvorteil in der Gruppe mit Anakinra-Therapie gegenüber der *Placebo*-Gruppe nachgewiesen werden konnte [164]. Ali *et al.* zeigten sogar eine Verschlechterung der septischen Arthritis sowie der Gesamtmortalität nach Anakinra-Behandlung im Mausexperiment [165]. Weitere Studien mit dem bereits auf dem Markt gebrachten IL-1 β -Antikörper Canakinumab oder des IL-1 β -Antagonisten Rilonacept sind in Zusammenhang mit einer Sepsistherapie noch ausstehend. Interessanterweise konnte ein Mortalitätsschutz bei Mäusen mit *IL1b*-Knockout und *Il1b/Il18*-Doppelknockout nach *Escherichia coli* induzierter Sepsis nicht nachgewiesen werden. Sarkar *et al.* führten hierfür als Erklärung die fehlende Lymphozytenapoptosis in der Milz auf [166]. Nach aktueller Studienlage ist somit nicht klar, ob der Einsatz eines IL-1 β -Blockers einen Vorteil in der Sepsistherapie haben wird. Vor kurzem zeigte eine Subgruppenanalyse jedoch, dass Patienten, die während der Sepsis Anakinra erhielten und gleichzeitig eine hepatobiliäre Dysfunktion sowie eine disseminierte intravasale Koagulopathie aufwiesen, ein signifikant besseres Ergebnis gegenüber der *Placebo*-Gruppe hatten [167]. Es bleibt also weiterhin zusätzliche Untersuchungen abzuwarten, um den genauen Pathomechanismus zu erklären und eine neue Therapieoption zu entwickeln.

4.4 *Nlrp3*-Deletion schützt vor inflammationsvermittelter Muskelatrophie

Von der Atrophie induzierenden Wirkung von IL-1 β auf C2C12-Zellen ausgehend, war der Einfluss der homozygoten *Nlrp3*-Keimbahndeletion auf die inflammationsbedingte Muskelatrophie in der Sepsis von Interesse. Eine besondere Bedeutung kommt hierbei dem UPS-vermittelten Abbau von schweren Myosinketten zu [48]. Die muskelspezifischen E3-Ligasen MuRF1 und Atrogin1 sind im atrophierten Skelettmuskel stark hochreguliert und auch bei kritisch kranken Patienten finden sich erhöhte Werte dieser Atrogene im Skelettmuskel [72,73]. Man kann dabei eine zeitliche Diskrepanz zwischen dem Eintritt der Skelettmuskelatrophie und der Genexpression der Atrogene beobachten. Da die vollständige Manifestation der Skelettmuskelatrophie erst nach Rückkehr der Atrogenwerte auf Ausgangswerte eintritt, wird ein kontinuierlicher Atrophiestimulus, zum Beispiel in Form einer akuten oder chronischen Inflammation

diskutiert. Es wurde daher die NLRP3-vermittelte Aktivierung von IL-1 β auf die Skelettmuskelatrophie im murinen Sepsismodell untersucht.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass bei WT-Tieren sowohl das Körpergewicht als auch die Skelettmuskelgewichte nach CLP-Operation deutlich reduziert waren. Die verminderte Myozytenquerschnittsfläche, die Hochregulation der *Trim63*- und *Fbox32*-Genexpressionen sowie der erhöhte Proteingehalt von MuRF1 in WT-CLP-Tieren bestätigen die vorhandene Muskelatrophie sowohl auf histologischer, als auch auf Gen- und Proteinebene. Dies wird unterstützt durch frühere Arbeiten, die ebenso eine Erhöhung der Genexpressionen von *Trim63* und *Fbox32* nach CLP-Operation zeigten [74]. Übereinstimmende Ergebnisse wurden ebenso bei Ratten, deren Immunsystem mit LPS stimuliert wurde, gefunden. Auch hier ließen sich eine verminderte Myozytenquerschnittsfläche und eine erhöhte Genexpression der muskelspezifischen E3-Ligasen *Trim63* und *Fbox32* dokumentieren [168]. Mäuse mit einer *Nlrp3*-Keimbahndeletion wiesen dagegen eine signifikant verminderte Atrophie der Skelettmuskeln nach CLP-Operation auf. Die Atrophiemarker *Trim63* und *Fbox32* waren bei den CLP-*Nlrp3*-KO-Mäusen nach 96 Stunden ebenfalls nicht erhöht. Eine frühere Arbeit steht in Einklang mit dieser Beobachtung und berichtet über die Reduktion, beziehungsweise Normalisierung des Proteinabbaus im Skelettmuskel nach Gabe eines rekombinanten IL-1-Rezeptorantagonisten (rIL-1 α) in der Sepsis [120]. Erstaunlicherweise wurde im Rahmen von Sarkopenieuntersuchungen mit *Nlrp3*-KO-Mäusen ähnliche Ergebnisse gefunden. Ältere KO-Tiere waren vor Sarkopenie geschützt und wiesen keine Reduktion der Muskelmasse und -funktion gegenüber älteren WT-Tieren auf. Da keine altersbedingten Unterschiede der Zytokinlevel im Serum festgestellt werden konnten, ist davon auszugehen, dass die Pathogenese vielmehr eine andere ist. Die Autoren nahmen an, dass ursächlich hierfür die verminderte Aktivität von Enzymen der Glykolyse in *Nlrp3*-KO-Tieren ist [169]. Diese Ergebnisse legen nahe, dass die NLRP3-abhängige IL-1 β -Aktivierung eine Rolle in der Induktion von muskelspezifischen Atrogenen während der Sepsis hat, aber nicht notwendig auf andere Atrophieformen übertragbar ist. Neben der bekannten Genexpressionerhöhung der E3-Ligasen *Trim63* und *Fbox32* nach CLP-Operationen konnten neuere Arbeiten nachweisen, dass weitere E3-Ligasen wie *Nedd4* und *Fbox30* im Skelettmuskel während der Sepsis verstärkt exprimiert werden [170]. Bislang wurde *Nedd4* vor allem eine Rolle in der Entwicklung einer irreversiblen Langzeitatrophie in der Denervierungsatrophie zugeschrieben, während *Fbox30* die Denervierungsatrophie

in *Smad4*-KO-Mäusen vermittelt [171,172]. In wie fern diese E3-Ligasen von NLRP3 beziehungsweise IL-1 β beeinflusst werden, ist unklar.

Die unterschiedlichen Muskelfasertypen unterscheiden sich in der Art der Energiebereitstellung und dem strukturellen Aufbau. Während langsam kontrahierende Typ-I-Fasern ihre Energie über die aerobe Energiebereitstellung gewinnen und das MyHC- β /slow mit einer geringeren ATPase-Aktivität enthalten, beziehen die schnell kontrahierenden Typ-II-Fasern ihrer Energiegewinnung über den anaeroben Weg und enthalten je nach Subgruppe das MyHC-2a beziehungsweise MyHC-2d mit einer höheren ATPase-Aktivität [10]. In früheren Arbeiten wurde ein fasertyp-spezifischer Unterschied in der Expression von MuRF1 und Atrogin1 beobachtet und dementsprechend eine Regulation über unabhängige Mechanismen vermutet [74,76]. In der vorliegenden Arbeit konnte in allen untersuchten Muskeln eine verstärkte Expression von MuRF1 und Atrogin1 in WT-Tieren nach CLP-Operation nachgewiesen werden. Entgegen vorherigen Arbeiten konnten auch im SOL-Muskel, der Typ-I-Fasern beinhaltet, erhöhte Atrogenwerte gemessen werden. Bislang wurde vermutet, dass die Abweichungen auf den unterschiedlichen Energiemetabolismus zurückzuführen sei, jedoch haben die Autoren bislang nur kürzere Zeitpunkte (16 und 24 Stunden) nach CLP-Sepsisinduktion untersucht [74,76]. In einem anderen murinen Sepsismodell konnte 6 Tage nach Sepsiseinleitung durch Zymosaninjektionen eine deutliche Reduktion von Typ-IIA und Typ IIB/X-Fasern im Vergleich zu Typ-I-Fasern im TA-Muskel nachgewiesen werden. Dabei konnten sie weder einen fasertypspezifischen Atrophieunterschied noch eine erhöhte Aktivität des 20S Proteasoms im SOL-Muskel feststellen [173]. Die vorliegenden Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass 96 Stunden nach CLP-Operation die UPS-vermittelten Atrophieprozesse im SOL-Muskel, wie in den schnell kontrahierenden Muskeln, ebenfalls eintreten. Diese Beobachtung ähnelt den Biopsieergebnissen bei Patienten mit *Critical Illness* Polyneuropathie, die sowohl Atrophie von Typ-I- als auch Typ-II-Fasern ergab [11]. In wie fern der unterschiedliche Energiemetabolismus mit dem verspäteten Eintritt der Atrophie des SOL-Muskels zusammenhängt, ist noch zu untersuchen.

In der Sepsis-induzierten Muskelatrophie findet sich allerdings nicht nur ein verstärkter Proteinabbau, sondern auch eine verminderte Proteinsynthese [49,134]. In der vorliegenden Arbeit konnte bereits im Zellkulturexperiment eine verminderte Proteinsynthese in C2C12-Zellen nach IL-1 β -Behandlung festgestellt werden. Auch im murinen Sepsisexperiment zeigten WT-CLP-Mäuse im Vergleich zu den WT-Sham-Tieren eine

Herabregulation der *Myh2*- und *Myh7*-Genexpression im gemischt-faserigen GP-Muskel und eine Herabregulation der *Myh2*-Genexpression im TypII-Faser-reichen TA-Muskel. Dieser Effekt war bei *Nlrp3*-KO-Mäusen aufgehoben. Eine eindeutige Aussage bezüglich der Myosinexpression im SOL-Muskel beider Mauslinien konnte nicht getroffen werden. Es schien zwar eine Neigung zur *Myh7*-Erhöhung unter Sepsisbedingung zu geben, diese war jedoch statistisch nicht signifikant. Auch ein Effekt auf die *Myh4*-Genexpression konnte bei keinem der untersuchten Skelettmuskeln beider Genotypen nach Sepsisinduktion nachgewiesen werden. Interessanterweise ist nicht nur die Myosinexpression beider Genotypen in der Sepsis verschieden, auch die Fasertypzusammensetzung unterscheidet sich. Um eine Veränderung dieser zu untersuchen, wurde der SOL-Muskel, der aus langsamen Typ-I- und schnellen Typ-II-Fasern aufgebaut ist, herangezogen. Nach Sepsisinduktion konnte bei WT-Tieren eine deutliche Abnahme der Typ-II- und eine Zunahme der Typ-I-Fasern festgestellt werden. Auch Bloise *et al.* konnte keinen fasertypspezifischen Unterschied in der Myosin-Genexpression im SOL-Muskel nach *Streptococcus pneumoniae*-induzierter Sepsis feststellen. Jedoch sahen die Kollegen einen signifikanten Anstieg der *Myh7*-Genexpression im GP-Muskel nach 40 Stunden sowie im gemischtfasrigen Zwerchfellmuskel nach 24 Stunden bei fehlender Veränderung der Myosinisoformen von Typ-II-Fasern. Ursächlich hierfür soll laut Autoren ein veränderter Schilddrüsenhormonmetabolismus im Skelettmuskel sein, welcher letztenendlich einem erhöhten Anteil von Typ-I-Fasern in Skelettmuskeln bedingt [174]. Es wäre möglich, dass die Diskrepanz in den Ergebnissen der Genexpression sowohl auf die unterschiedlichen Untersuchungszeitpunkte als auch verschiedenen Sepsismodelle zurückzuführen sind. Eine Verschiebung der Fasertypzusammensetzung von schnellen zu langsamen Fasern ist auch bei anderen Formen der Muskelatrophie, wie zum Beispiel beim Fasten oder unter Glukokortikoidgabe, beschrieben worden [175]. Es gibt jedoch auch andere Arbeiten, die zwar nach LPS-Stimulation eine Reduktion der Myosinsynthese im *Musculus longissimus* von Ferkeln zeigen, allerdings handelte es sich dabei um eine Abnahme schwerer Myosinketten von Typ-I-Fasern und eine Zunahme schwerer Myosinketten von Typ-II-Fasern [176]. In der vorliegenden Arbeit wurde nach der Sepsisinduktion im SOL-Muskel keine Veränderung der Fasertypverteilung bei *Nlrp3*-KO-Tieren festgestellt. Aktuell ist der genaue Mechanismus hinter der Regulation der Faserzusammensetzung in der inflammationsbedingten Muskelatrophie noch unklar, aber zusammen mit den Zellkulturergebnissen besteht die Vermutung, dass die NLRP3-

vermittelte IL-1 β -Maturierung die Myosinsynthese auf Genebene beeinflusst und diese je nach Myosinisoform und untersuchtem Skelettmuskel unterschiedlichen Regulationsmechanismen unterworfen ist. Weitere Studien sind nötig, um diese Hypothese näher zu untersuchen.

4.5 Limitationen der Arbeit

Unsere Daten unterstützten die These, dass IL-1 β in der Entstehung der inflammationsvermittelten Muskelatrophie maßgeblich involviert ist. Da jedoch NLRP3 ubiquitär exprimiert wird, ist die NLRP3-vermittelte verminderte Produktion von IL-1 β im Serum von *Nlrp3*-KO-Tieren auf verschiedene Zell- und Gewebearten zurückzuführen und ist nicht durch den Muskel allein zu erklären. Um dagegen die Wirkung von Muskelgeneriertem IL-1 β zu untersuchen, bedarf es *in vitro*-Zellkulturexperimente mit NLRP3-defizienten Skelettmuskelzellen, Verwendung von siRNA oder NLRP3-Inhibitoren. *In vivo* wäre für vergleichbare Untersuchungen eine Skelettmuskel-spezifische Deletion von *Nlrp3* nötig. Zusätzlich sollte die Rolle von IL-18, das ebenso wie IL-1 β NLRP3-vermittelt produziert und sezerniert wird, untersucht werden. IL-18 wird ähnlich wie IL-1 β von verschiedenen Immunzellen gebildet und induziert in Anwesenheit von IL-12 die Produktion von IFN- γ . Darüber hinaus kann es die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen wie TNF- α , IL-1 β , IL-6 und IL-8 sowie die Aktivität von natürlichen Killerzellen und T-Zellen verstärken [97,177]. Es gibt aber auch Hinweise darauf, dass IL-18 in Myozyten exprimiert wird. Patienten mit Dermatomyositis und Polymyositis weisen deutlich erhöhte IL-18-Spiegel sowohl in Muskelbiopsien als auch im Serum auf. Dabei korrelierte der IL-18-Gehalt mit dem Schweregrad der Krankheitsaktivität [178,179].

Die *in vivo*-Sepsisdaten dieser Arbeit basieren auf dem Modell der CLP-induzierten Sepsis. Durch die Perforation des Darmes wird eine polymikrobielle Sepsis ausgelöst, sodass eine genaue Differenzierung des Pathomechanismus (Bakterienart, spezifische Zytokine etc.) nicht möglich ist. In der Sepsisforschung gilt die CLP-induzierte Sepsis jedoch immer noch als Goldstandard und kommt den menschlichen Pathomechanismen in der Sepsis am nächsten [160]. Überdies ist sie in Hinblick auf die Muskelatrophieforschung einer Endotoxin-Injektion überlegen, da bekannterweise Endotoxin-Injektionen nur vorübergehende Veränderungen der Proteinhomöostase induzieren und eine Resistenzentwicklung nach multiplen Gaben entstehen kann [180,181]. Man sollte auch nicht vernachlässigen, dass die Regulation der

Muskelatrophie in der Sepsis hoch komplex ist und neben dem Zytokinsturm in der akuten und chronischen Phase der Sepsis auch andere Faktoren wie Glukokortikoide, Glukosemetabolismus und Inaktivität eine Rolle in der Entstehung einer Muskelatrophie haben [182]. Neuere Arbeiten zeigen sogar, dass eine zinkarme Ernährung in der Sepsis mit höheren MuRF1-Werten einhergeht als eine normale Ernährung [183]. Es werden daher weiterführende Untersuchungen benötigt, um die genauen Pathomechanismen der inflammations-bedingten Muskelatrophie zu identifizieren. Hierbei empfiehlt sich auch der zusätzliche Einsatz von weiblichen Tieren, da es Hinweise darauf gibt, dass männliche Tiere anfälliger für eine CLP-induzierte Sepsis sind und folglich die Ergebnisse auf weibliche Tiere nicht zwangsläufig übertragbar sind [184]. Ferner sollte berücksichtigt werden, dass das Alter der eingesetzten Mäuse einen Einfluss auf das Überleben nach CLP-induzierter Sepsis zu haben scheint [185].

Proteolyse im Skelettmuskel kann auf verschiedenen Wegen vonstatten gehen. Zu den wichtigsten Mechanismen gehören das UPS, die lysosomale Degradation und die Protease Calpain. Bislang ging man davon aus, dass der Abbau von Proteinen größtenteils Teil vom UPS übernommen wird und das lysosomale Autophagie-System für die Muskelatrophie eher unbedeutend ist [68]. Bei näherer Untersuchung konnte gezeigt werden, dass das UPS und Calpain vornehmlich für den Proteinabbau von Myofilamenten und das lysosomale Autophagie-System für den Abbau von zytosolischen Proteinen und Organellen verantwortlich sind [65,186,187]. Zunehmend rückt auch die lysosomale Autophagie in den Fokus der inflammationsvermittelten Muskelatrophie. Stana *et al.* konnten vor Kurzem demonstrieren, dass sowohl Gene des UPS als auch des Autophagiesystems im TA-Muskel von CLP-WT-Tieren hochreguliert waren [170]. Gleichzeitig konnte Jin *et al.* zeigen, dass NLRP3 eine wichtige Rolle in der Modulation von Autophagie und Phagozytose von Neutrophilen in der CLP-induzierten Sepsis hat [121]. Es ist daher nicht auszuschließen, dass NLRP3-vermittelte IL-1 β -Freisetzung die Autophagie-vermittelte Muskelatrophie und damit einen weiteren Mechanismus der inflammationsvermittelten Muskelatrophie beeinflusst. Es werden weitere Studien benötigt um diese Hypothese zu untersuchen.

Zusammenfassend zeigte die Arbeit, dass die NLRP3-vermittelte Produktion und Sekretion von IL-1 β eine wesentliche Rolle in der inflammationsvermittelten Muskelatrophie einnimmt. Ein besseres Verständnis dieser Mechanismen könnte in Zukunft Eingriffe in diese Signalkaskade durch gezielte therapeutische Maßnahmen ermöglichen und eine ICUAW bei kritisch Kranken verhindern.

Literatur

1. Lagu T, Rothberg MB, Shieh M-S, Pekow PS, Steingrub JS, Lindenauer PK. Hospitalizations, costs, and outcomes of severe sepsis in the United States 2003 to 2007. *Crit Care Med*. 2012 Mar;40(3):754–61.
2. Engel C, Brunkhorst FM, Bone H-G, Brunkhorst R, Gerlach H, Grond S, Gruendling M, Huhle G, Jaschinski U, John S, Mayer K, Oppert M, Olthoff D, Quintel M, Ragaller M, Rossaint R, Stuber F, Weiler N, Welte T, Bogatsch H, Hartog C, Loeffler M, Reinhart K. Epidemiology of sepsis in Germany: results from a national prospective multicenter study. *Intensive Care Med*. 2007 Apr;33(4):606–18.
3. Blanco J, Muriel-Bombín A, Sagredo V, Taboada F, Gandía F, Tamayo L, Collado J, García-Labattut A, Carriedo D, Valledor M, De Frutos M, López M-J, Caballero A, Guerra J, Alvarez B, Mayo A, Villar J, Grupo de Estudios y Análisis en Cuidados Intensivos. Incidence, organ dysfunction and mortality in severe sepsis: a Spanish multicentre study. *Crit Care*. BioMed Central Ltd; 2008;12(6):R158.
4. Martin GS, Mannino DM, Eaton S, Moss M. The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. *N Engl J Med*. 2003 Apr 17;348(16):1546–54.
5. Herridge MS, Tansey CM, Matté A, Tomlinson G, Diaz-Granados N, Cooper A, Guest CB, Mazer CD, Mehta S, Stewart TE, Kudlow P, Cook D, Slutsky AS, Cheung AM, Canadian Critical Care Trials Group. Functional disability 5 years after acute respiratory distress syndrome. *N Engl J Med*. 2011 Apr 7;364(14):1293–304.
6. Angus DC, Clermont G, Linde-Zwirble WT, Musthafa AA, Dremsizov TT, Lidicker J, Lave JR, NO-06 Investigators. Healthcare costs and long-term outcomes after acute respiratory distress syndrome: A phase III trial of inhaled nitric oxide. *Crit Care Med*. 2006 Dec;34(12):2883–90.
7. Tajbakhsh S. Skeletal muscle stem cells in developmental versus regenerative myogenesis. *J Intern Med*. 2009 Oct;266(4):372–89.
8. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Walter P, Raff M, Roberts K. *Molecular Biology of the Cell* 4th Edition. Garland Science; 2002. 1 p.
9. Argilés JM, Busquets S, Stemmler B, López-Soriano FJ. Cancer cachexia: understanding the molecular basis. *Nat Rev Cancer*. Nature Publishing Group; 2014 Oct 9;14(11):754–62.
10. Schiaffino S, Reggiani C. Fiber types in mammalian skeletal muscles. *Physiol Rev*. 2011 Oct;91(4):1447–531.
11. Bolton CF, Gilbert JJ, Hahn AF, Sibbald WJ. Polyneuropathy in critically ill patients. *J Neurol Neurosurg Psychiatr*. 1984 Nov;47(11):1223–31.
12. Bolton CF. Electrophysiologic studies of critically ill patients. *Muscle Nerve*.

Wiley Subscription Services, Inc., A Wiley Company; 1987 Feb;10(2):129–35.

13. Stevens RD, Marshall SA, Cornblath DR, Hoke A, Needham DM, De Jonghe B, Ali NA, Sharshar T. A framework for diagnosing and classifying intensive care unit-acquired weakness. *Crit Care Med*. 2009 Oct;37(10 Suppl):S299–308.
14. Stevens RD, Dowdy DW, Michaels RK, Mendez-Tellez PA, Pronovost PJ, Needham DM. Neuromuscular dysfunction acquired in critical illness: a systematic review. *Intensive Care Med*. Springer-Verlag; 2007 Oct 31;33(11):1876–91.
15. De Jonghe B, Sharshar T, Lefaucheur J-P, Authier F-J, Durand-Zaleski I, Boussarsar M, Cerf C, Renaud E, Mesrati F, Carlet J, Raphaël J-C, Outin H, Bastuji-Garin S, Groupe de Réflexion et d'Etude des Neuromyopathies en Réanimation. Paresis acquired in the intensive care unit: a prospective multicenter study. *JAMA*. 2002 Dec 11;288(22):2859–67.
16. Tennilä A, Salmi T, Pettilä V, Roine RO, Varpula T, Takkunen O. Early signs of critical illness polyneuropathy in ICU patients with systemic inflammatory response syndrome or sepsis. *Intensive Care Med*. 2000 Sep;26(9):1360–3.
17. Latronico N, Peli E, Botteri M. Critical illness myopathy and neuropathy. *Curr Opin Crit Care*. 2005 Apr;11(2):126–32.
18. Oehmichen F, Pohl M, Schlosser R, Stogowski D, Toppel D, Mehrholz J. Critical illness polyneuropathy und polymyopathy. *Nervenarzt*. 2011 Aug 17;83(2):220–5.
19. Leijten FS, de Weerd AW. Critical illness polyneuropathy. A review of the literature, definition and pathophysiology. *Clin Neurol Neurosurg*. 1994 Feb;96(1):10–9.
20. Bercker S, Weber-Carstens S, Deja M, Grimm C, Wolf S, Behse F, Busch T, Falke KJ, Kaisers U. Critical illness polyneuropathy and myopathy in patients with acute respiratory distress syndrome. *Crit Care Med*. 2005 Apr;33(4):711–5.
21. Witt CC, Witt SH, Lerche S, Labeit D, Back W, Labeit S. Cooperative control of striated muscle mass and metabolism by MuRF1 and MuRF2. *EMBO J*. 2008 Jan 23;27(2):350–60.
22. Bednarík J, Vondracek P, Dusek L, Moravcova E, Cundrle I. Risk factors for critical illness polyneuromyopathy. *J Neurol*. 2005 Mar;252(3):343–51.
23. Latronico N, Fenzi F, Recupero D, Guarneri B, Tomelleri G, Tonin P, De Maria G, Antonini L, Rizzuto N, Candiani A. Critical illness myopathy and neuropathy. *Lancet*. 1996 Jun 8;347(9015):1579–82.
24. Koch S, Spuler S, Deja M, Bierbrauer J, Dimroth A, Behse F, Spies CD, Wernecke K-D, Weber-Carstens S. Critical illness myopathy is frequent: accompanying neuropathy protracts ICU discharge. *J Neurol Neurosurg Psychiatr*. BMJ Publishing Group Ltd; 2011 Mar;82(3):287–93.

25. van den Berghe G, Wouters P, Weekers F, Verwaest C, Bruyninckx F, Schetz M, Vlasselaers D, Ferdinande P, Lauwers P, Bouillon R. Intensive insulin therapy in critically ill patients. *N Engl J Med*. 2001 Nov 8;345(19):1359–67.
26. Schweickert WD, Pohlman MC, Pohlman AS, Nigos C, Pawlik AJ, Esbrook CL, Spears L, Miller M, Franczyk M, Deprizio D, Schmidt GA, Bowman A, Barr R, McCallister KE, Hall JB, Kress JP. Early physical and occupational therapy in mechanically ventilated, critically ill patients: a randomised controlled trial. *The Lancet*. 2009 May;373(9678):1874–82.
27. Papazian L, Forel J-M, Gacouin A, Penot-Ragon C, Perrin G, Loundou A, Jaber S, Arnal J-M, Perez D, Seghboyan J-M, Constantin J-M, Courant P, Lefrant J-Y, Guérin C, Prat G, Morange S, Roch A, ACURASYS Study Investigators. Neuromuscular blockers in early acute respiratory distress syndrome. *N Engl J Med*. 2010 Sep 16;363(12):1107–16.
28. Müllges W, Stoll G. Critical illness polyneuropathy and myopathy. *Dtsch Med Wochenschr*. 2011 Apr;136(15):769–74.
29. Hund E. Neurological complications of sepsis: critical illness polyneuropathy and myopathy. *J Neurol*. 2001 Nov;248(11):929–34.
30. Garnacho-Montero J, Madrazo-Osuna J, García-Garmendia JL, Ortiz-Leyba C, Jiménez-Jiménez FJ, Barrero-Almodóvar A, Garnacho-Montero MC, Moyano-Del-Estad MR. Critical illness polyneuropathy: risk factors and clinical consequences. A cohort study in septic patients. *Intensive Care Med*. 2001 Aug;27(8):1288–96.
31. Fletcher SN, Kennedy DD, Ghosh IR, Misra VP, Kiff K, Coakley JH, Hinds CJ. Persistent neuromuscular and neurophysiologic abnormalities in long-term survivors of prolonged critical illness. *Crit Care Med*. 2003 Apr;31(4):1012–6.
32. Hermans G, Van Mechelen H, Clerckx B, Vanhullebusch T, Mesotten D, Wilmer A, Casaer MP, Meersseman P, Debaveye Y, Van Cromphaut S, Wouters PJ, Gosselink R, Van den Berghe G. Acute Outcomes and 1-Year Mortality of Intensive Care Unit-acquired Weakness. A Cohort Study and Propensity-matched Analysis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2014 Aug 15;190(4):410–20.
33. Dellinger RP, Levy MM, Rhodes A, Annane D, Gerlach H, Opal SM, Sevransky JE, Sprung CL, Douglas IS, Jaeschke R, Osborn TM, Nunnally ME, Townsend SR, Reinhart K, Kleinpell RM, Angus DC, Deutschman CS, Machado FR, Rubenfeld GD, Webb S, Beale RJ, Vincent J-L, Moreno R, Surviving Sepsis Campaign Guidelines Committee including The Pediatric Subgroup. Surviving Sepsis Campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock, 2012. Vol. 39, *Intensive Care Medicine*. 2013. pp. 165–228.
34. Needham DM. Mobilizing patients in the intensive care unit: improving neuromuscular weakness and physical function. *JAMA*. American Medical Association; 2008 Oct 8;300(14):1685–90.
35. Wijdicks EF, Fulgham JR. Failure of high dose intravenous immunoglobulins to alter the clinical course of critical illness polyneuropathy. *Muscle Nerve*. 1994

Dec;17(12):1494–5.

36. Mohr M, Englisch L, Roth A, Burchardi H, Zielmann S. Effects of early treatment with immunoglobulin on critical illness polyneuropathy following multiple organ failure and gram-negative sepsis. *Intensive Care Med.* Springer-Verlag; 1997;23(11):1144–9.
37. Latronico N. Monitoring of peripheral nerves and muscle function in patients with multiple organ dysfunction syndrome. *Crit Care Med.* 2000 Sep;28(9):3375.
38. Rich MM, Teener JW, Raps EC, Schotland DL, Bird SJ. Muscle is electrically inexcitable in acute quadriplegic myopathy. *Neurology.* 1996 Mar;46(3):731–6.
39. Rich MM, Bird SJ, Raps EC, McCluskey LF, Teener JW. Direct muscle stimulation in acute quadriplegic myopathy. *Muscle Nerve.* 1997 Jun;20(6):665–73.
40. Danon MJ, Carpenter S. Myopathy with thick filament (myosin) loss following prolonged paralysis with vecuronium during steroid treatment. *Muscle Nerve.* Wiley Subscription Services, Inc., A Wiley Company; 1991 Nov;14(11):1131–9.
41. Sander HW, Golden M, Danon MJ. Quadriplegic areflexic ICU illness: selective thick filament loss and normal nerve histology. *Muscle Nerve.* 2002 Oct;26(4):499–505.
42. Witt NJ, Zochodne DW, Bolton CF, Grand'Maison F, Wells G, Young GB, Sibbald WJ. Peripheral nerve function in sepsis and multiple organ failure. *Chest.* 1991 Jan;99(1):176–84.
43. Bolton CF. Neuromuscular manifestations of critical illness. *Muscle Nerve.* 2005 Aug;32(2):140–63.
44. Judemann K, Lunz D, Zausig YA, Graf BM, Zink W. Intensive care unit-acquired weakness in the critically ill : critical illness polyneuropathy and critical illness myopathy. *Anaesthesist.* Springer-Verlag; 2011 Oct;60(10):887–901.
45. Rich MM, Pinter MJ. Crucial role of sodium channel fast inactivation in muscle fibre inexcitability in a rat model of critical illness myopathy. *J Physiol.* 2003 Mar 1;547(Pt 2):555–66.
46. Capasso M, Di Muzio A, Pandolfi A, Pace M, Di Tomo P, Ragno M, Uncini A. Possible role for nitric oxide dysregulation in critical illness myopathy. *Muscle Nerve.* 2008 Feb;37(2):196–202.
47. Zink W, Kaess M, Hofer S, Plachky J, Zausig YA, Sinner B, Weigand MA, Fink RHA, Graf BM. Alterations in intracellular Ca²⁺-homeostasis of skeletal muscle fibers during sepsis. *Crit Care Med.* 2008 May;36(5):1559–63.
48. Tiao G, Hobler S, Wang JJ, Meyer TA, Luchette FA, Fischer JE, Hasselgren PO. Sepsis is associated with increased mRNAs of the ubiquitin-proteasome proteolytic pathway in human skeletal muscle. *J Clin Invest.* 1997 Jan 15;99(2):163–8.

49. Vary TC, Kimball SR. Sepsis-induced changes in protein synthesis: differential effects on fast- and slow-twitch muscles. *Am J Physiol*. 1992 Jun;262(6 Pt 1):C1513–9.
50. Friedrich O, Reid MB, van den Berghe G, Vanhorebeek I, Hermans G, Rich MM, Larsson L. The Sick and the Weak: Neuropathies/Myopathies in the Critically Ill. *Physiol Rev*. 2015 Jul;95(3):1025–109.
51. Bloch SAA, Lee JY, Syburra T, Rosendahl U, Griffiths MJD, Kemp PR, Polkey MI. Increased expression of GDF-15 may mediate ICU-acquired weakness by down-regulating muscle microRNAs. *Thorax*. BMJ Publishing Group Ltd; 2015 Mar;70(3):219–28.
52. Weber-Carstens S, Schneider J, Wollersheim T, Assmann A, Bierbrauer J, Marg A, Hasani Al H, Chadt A, Wenzel K, Koch S, Fielitz J, Kleber C, Faust K, Mai K, Spies CD, Luft FC, Boschmann M, Spranger J, Spuler S. Critical illness myopathy and GLUT4: significance of insulin and muscle contraction. *Am J Respir Crit Care Med*. 2013 Feb 15;187(4):387–96.
53. Lang CH, Hong-Brown L, Frost RA. Cytokine inhibition of JAK-STAT signaling: a new mechanism of growth hormone resistance. *Pediatr Nephrol*. 2005 Mar;20(3):306–12.
54. Brealey D, Brand M, Hargreaves I, Heales S, Land J, Smolenski R, Davies NA, Cooper CE, Singer M. Association between mitochondrial dysfunction and severity and outcome of septic shock. *Lancet*. 2002 Jul 20;360(9328):219–23.
55. Friedrich O, Hund E, Weber C, Hacke W, Fink RHA. Critical illness myopathy serum fractions affect membrane excitability and intracellular calcium release in mammalian skeletal muscle. *J Neurol*. 2004 Jan;251(1):53–65.
56. Fenzi F, Latronico N, Refatti N, Rizzuto N. Enhanced expression of E-selectin on the vascular endothelium of peripheral nerve in critically ill patients with neuromuscular disorders. *Acta Neuropathol*. 2003 Jul;106(1):75–82.
57. Bolton CF. Sepsis and the systemic inflammatory response syndrome: neuromuscular manifestations. *Crit Care Med*. 1996 Aug;24(8):1408–16.
58. Carré JE, Orban J-C, Re L, Felsmann K, Iffert W, Bauer M, Suliman HB, Piantadosi CA, Mayhew TM, Breen P, Stotz M, Singer M. Survival in critical illness is associated with early activation of mitochondrial biogenesis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2010 Sep 15;182(6):745–51.
59. Druschky A, Herkert M, Radespiel-Tröger M, Druschky K, Hund E, Becker CM, Hilz MJ, Erbguth F, Neundörfer B. Critical illness polyneuropathy: clinical findings and cell culture assay of neurotoxicity assessed by a prospective study. *Intensive Care Med*. 2001 Mar 16;27(4):686–93.
60. Schiaffino S, Dyar KA, Ciciliot S, Blaauw B, Sandri M. Mechanisms regulating skeletal muscle growth and atrophy. *FEBS J*. 2013 Sep;280(17):4294–314.
61. Wannemacher RW. Key role of various individual amino acids in host response

- to infection. *Am J Clin Nutr.* 1977 Aug;30(8):1269–80.
62. Long CL, Birkhahn RH, Geiger JW, Betts JE, Schiller WR, Blakemore WS. Urinary excretion of 3-methylhistidine: an assessment of muscle protein catabolism in adult normal subjects and during malnutrition, sepsis, and skeletal trauma. *Metab Clin Exp.* 1981 Aug;30(8):765–76.
 63. Hasselgren PO, James JH, Benson DW, Hall-Angerås M, Angerås U, Hiyama DT, Li S, Fischer JE. Total and myofibrillar protein breakdown in different types of rat skeletal muscle: effects of sepsis and regulation by insulin. *Metab Clin Exp.* 1989 Jul;38(7):634–40.
 64. Rock KL, Gramm C, Rothstein L, Clark K, Stein R, Dick L, Hwang D, Goldberg AL. Inhibitors of the proteasome block the degradation of most cell proteins and the generation of peptides presented on MHC class I molecules. *Cell.* 1994 Sep 9;78(5):761–71.
 65. Bodine SC, Baehr LM. Skeletal muscle atrophy and the E3 ubiquitin ligases MuRF1 and MAFbx/atrogen-1. *AJP: Endocrinology and Metabolism.* 2014 Sep 15;307(6):E469–84.
 66. Passmore LA, Barford D. Getting into position: the catalytic mechanisms of protein ubiquitylation. *Biochem J.* Portland Press Limited; 2004 May 1;379(Pt 3):513–25.
 67. Pickart CM, Fushman D. Polyubiquitin chains: polymeric protein signals. *Current Opinion in Chemical Biology.* 2004 Dec;8(6):610–6.
 68. Mitch WE, Goldberg AL. Mechanisms of muscle wasting. The role of the ubiquitin-proteasome pathway. *N Engl J Med.* 1996 Dec 19;335(25):1897–905.
 69. Kanehisa M, Goto S. KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic Acids Research.* 2000 Jan 1;28(1):27–30.
 70. Kanehisa M, Goto S, Sato Y, Kawashima M, Furumichi M, Tanabe M. Data, information, knowledge and principle: back to metabolism in KEGG. *Nucleic Acids Research.* 2014 Jan;42(Database issue):D199–205.
 71. Skaar JR, Pagan JK, Pagano M. Mechanisms and function of substrate recruitment by F-box proteins. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2013 Jun;14(6):369–81.
 72. Bodine SC, Latres E, Baumhueter S, Lai VK, Nunez L, Clarke BA, Poueymirou WT, Panaro FJ, Na E, Dharmarajan K, Pan ZQ, Valenzuela DM, DeChiara TM, Stitt TN, Yancopoulos GD, Glass DJ. Identification of ubiquitin ligases required for skeletal muscle atrophy. *Science.* 2001 Nov 23;294(5547):1704–8.
 73. Gomes MD, Lecker SH, Jagoe RT, Navon A, Goldberg AL. Atrogen-1, a muscle-specific F-box protein highly expressed during muscle atrophy. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2001 Dec 4;98(25):14440–5.
 74. Frost RA, Nystrom GJ, Jefferson LS, Lang CH. Hormone, cytokine, and nutritional regulation of sepsis-induced increases in atrogen-1 and MuRF1 in

- skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2007 Jan 31;292(2):E501–12.
75. Lecker SH, Jagoe RT, Gilbert A, Gomes M, Baracos V, Bailey J, Price SR, Mitch WE, Goldberg AL. Multiple types of skeletal muscle atrophy involve a common program of changes in gene expression. *FASEB J*. 2004 Jan;18(1):39–51.
 76. Wray CJ, Mammen JMV, Hershko DD, Hasselgren P-O. Sepsis upregulates the gene expression of multiple ubiquitin ligases in skeletal muscle. *Int J Biochem Cell Biol*. 2003 May;35(5):698–705.
 77. Jamart C, Gomes AV, Dewey S, Deldicque L, Raymackers J-M, Francaux M. Regulation of ubiquitin-proteasome and autophagy pathways after acute LPS and epoxomicin administration in mice. *BMC Musculoskelet Disord*. 2014 May 22;15(1):166.
 78. Gustafsson T, Osterlund T, Flanagan JN, Walden von F, Trappe TA, Linnehan RM, Tesch PA. Effects of 3 days unloading on molecular regulators of muscle size in humans. *J Appl Physiol*. 2010 Sep;109(3):721–7.
 79. Baehr LM, Furlow JD, Bodine SC. Muscle sparing in muscle RING finger 1 null mice: response to synthetic glucocorticoids. *J Physiol*. 2011 Oct 1;589(Pt 19):4759–76.
 80. Bierbrauer J, Koch S, Olbricht C, Hamati J, Lodka D, Schneider J, Luther-Schröder A, Kleber C, Faust K, Wiesener S, Spies CD, Spranger J, Spuler S, Fielitz J, Weber-Carstens S. Early type II fiber atrophy in intensive care unit patients with nonexcitable muscle membrane. *Crit Care Med*. 2012 Feb;40(2):647–50.
 81. Ochala J, Gustafson A-M, Diez ML, Renaud G, Li M, Aare S, Qaisar R, Banduseela VC, Hedström Y, Tang X, Dworkin B, Ford GC, Nair KS, Perera S, Gautel M, Larsson L. Preferential skeletal muscle myosin loss in response to mechanical silencing in a novel rat intensive care unit model: underlying mechanisms. *J Physiol*. 2011 Apr 15;589(Pt 8):2007–26.
 82. Willis MS, Ike C, Li L, Wang D-Z, Glass DJ, Patterson C. Muscle ring finger 1, but not muscle ring finger 2, regulates cardiac hypertrophy in vivo. *Circ Res*. 2007 Mar 2;100(4):456–9.
 83. Willis MS, Rojas M, Li L, Selzman CH, Tang R-H, Stansfield WE, Rodriguez JE, Glass DJ, Patterson C. Muscle ring finger 1 mediates cardiac atrophy in vivo. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2009 Apr;296(4):H997–H1006.
 84. Satchek JM, Hyatt J-PK, Raffaello A, Jagoe RT, Roy RR, Edgerton VR, Lecker SH, Goldberg AL. Rapid disuse and denervation atrophy involve transcriptional changes similar to those of muscle wasting during systemic diseases. *FASEB J*. 2007 Jan;21(1):140–55.
 85. Janeway CA. Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 1989;54 Pt 1:1–13.
 86. Takeuchi O, Akira S. Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell*. 2010

Mar 19;140(6):805–20.

87. van der Poll T, Opal SM. Host-pathogen interactions in sepsis. *Lancet Infect Dis*. Elsevier; 2008 Jan;8(1):32–43.
88. Castellheim A, Brekke OL, Espevik T, Harboe M, Mollnes TE. Innate immune responses to danger signals in systemic inflammatory response syndrome and sepsis. *Scand J Immunol*. 2009 Jun;69(6):479–91.
89. Martinon F, Mayor A, Tschopp J. The Inflammasomes: Guardians of the Body. *Annu Rev Immunol*. 2009 Apr;27(1):229–65.
90. Schnare M, Barton GM, Holt AC, Takeda K, Akira S, Medzhitov R. Toll-like receptors control activation of adaptive immune responses. *Nat Immunol*. 2001 Oct;2(10):947–50.
91. Unterholzner L, Keating SE, Baran M, Horan KA, Jensen SB, Sharma S, Sirois CM, Jin T, Latz E, Xiao TS, Fitzgerald KA, Paludan SR, Bowie AG. IFI16 is an innate immune sensor for intracellular DNA. *Nat Immunol*. 2010 Oct 3;11(11):997–1004.
92. Ting JP-Y, Davis BK. CATERPILLER: A Novel Gene Family Important in Immunity, Cell Death, and Diseases. *Annu Rev Immunol*. 2005 Apr;23(1):387–414.
93. Franchi L, Park J-H, Shaw MH, Marina-Garcia N, Chen G, Kim Y-G, Núñez G. Intracellular NOD-like receptors in innate immunity, infection and disease. *Cell Microbiol*. 2008 Jan;10(1):1–8.
94. Ting JP-Y, Lovering RC, Alnemri ES, Bertin J, Boss JM, Davis BK, Flavell RA, Girardin SE, Godzik A, Harton JA, Hoffman HM, Hugot J-P, Inohara N, MacKenzie A, Maltais LJ, Núñez G, Ogura Y, Otten LA, Philpott D, Reed JC, Reith W, Schreiber S, Steimle V, Ward PA. The NLR gene family: a standard nomenclature. *Immunity*. 2008 Mar;28(3):285–7.
95. Hornung V, Bauernfeind F, Halle A, Samstad EO, Kono H, Rock KL, Fitzgerald KA, Latz E. Silica crystals and aluminum salts activate the NALP3 inflammasome through phagosomal destabilization. *Nat Immunol*. 2008 Aug;9(8):847–56.
96. Lamkanfi M, Dixit VM. Inflammasomes and their roles in health and disease. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2012;28:137–61.
97. Dinarello CA. Immunological and Inflammatory Functions of the Interleukin-1 Family. *Annu Rev Immunol*. 2009;27:519–50.
98. Martinon F, Tschopp J. Inflammatory caspases and inflammasomes: master switches of inflammation. *Cell Death Differ*. 2007 Jan;14(1):10–22.
99. Bauernfeind FG, Horvath G, Stutz A, Alnemri ES, MacDonald K, Speert D, Fernandes-Alnemri T, Wu J, Monks BG, Fitzgerald KA, Hornung V, Latz E. Cutting edge: NF-kappaB activating pattern recognition and cytokine receptors

- license NLRP3 inflammasome activation by regulating NLRP3 expression. *J Immunol.* 2009 Jul 15;183(2):787–91.
100. Juliana C, Fernandes-Alnemri T, Kang S, Farias A, Qin F, Alnemri ES. Non-transcriptional priming and deubiquitination regulate NLRP3 inflammasome activation. *J Biol Chem.* 2012 Oct 19;287(43):36617–22.
 101. Bauernfeind F, Hornung V. Of inflammasomes and pathogens--sensing of microbes by the inflammasome. *EMBO Mol Med.* 2013 Jun;5(6):814–26.
 102. Lamkanfi M, Dixit VM. Mechanisms and functions of inflammasomes. *Cell.* 2014 May 22;157(5):1013–22.
 103. Guo H, Callaway JB, Ting JP-Y. Inflammasomes: mechanism of action, role in disease, and therapeutics. *Nat Med.* 2015 Jun 29;21(7):677–87.
 104. Moltke von J, Ayres JS, Kofoed EM, Chavarría-Smith J, Vance RE. Recognition of bacteria by inflammasomes. *Annu Rev Immunol.* 2013;31:73–106.
 105. Shi J, Zhao Y, Wang Y, Gao W, Ding J, Li P, Hu L, Shao F. Inflammatory caspases are innate immune receptors for intracellular LPS. *Nature.* 2014 Oct 9;514(7521):187–92.
 106. Krause K, Feist E, Maurer M, Kallinich T. Cryopyrin-associated periodic syndromes. *Kinder- und Jugendmedizin.* 2011;(11):349–57.
 107. Winkler S, Hedrich CM, Rösen-Wolff A. Caspase-1 regulates autoinflammation in rheumatic diseases. *Z Rheumatol.* 2nd ed. 2016 Apr;75(3):265–75.
 108. Cannon JG, Tompkins RG, Gelfand JA, Michie HR, Stanford GG, van der Meer JW, Endres S, Lonnemann G, Corsetti J, Chernow B. Circulating interleukin-1 and tumor necrosis factor in septic shock and experimental endotoxin fever. *J Infect Dis.* 1990 Jan;161(1):79–84.
 109. van Deuren M. Kinetics of tumour necrosis factor-alpha, soluble tumour necrosis factor receptors, interleukin 1-beta and its receptor antagonist during serious infections. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 1994;13 Suppl 1:S12–6.
 110. Li P, Allen H, Banerjee S, Franklin S, Herzog L, Johnston C, McDowell J, Paskind M, Rodman L, Salfeld J, Towne E, Tracey D, Wardwell S, Wei F-Y, Wong W, Kamen R, Seshadri T. Mice deficient in IL-1 β -converting enzyme are defective in production of mature IL-1 β and resistant to endotoxic shock. *Cell.* 1995 Feb;80(3):401–11.
 111. Dinarello CA, Ikejima T, Warner SJ, Orencole SF, Lonnemann G, Cannon JG, Libby P. Interleukin 1 induces interleukin 1. I. Induction of circulating interleukin 1 in rabbits in vivo and in human mononuclear cells in vitro. *J Immunol.* 1987 Sep 15;139(6):1902–10.
 112. Warner S, Auger KR, Libby P. Human Interleukin-1 Induces Interleukin-1 Gene-Expression in Human Vascular Smooth-Muscle Cells. *J Exp Med.* 1987;165(5):1316–31.

113. Cannon JG, Fielding RA, Fiatarone MA, Orencole SF, Dinarello CA, Evans WJ. Increased Interleukin-1-Beta in Human Skeletal-Muscle After Exercise. *Am J Physiol.* 1989 Aug;257(2):R451–5.
114. Authier FJ, Mhiri C, Chazaud B, Christov C, Cherin P, BarlovatzMeimon G, Gherardi RK. Interleukin-1 expression in inflammatory myopathies: Evidence of marked immunoreactivity in sarcoid granulomas and muscle fibres showing ischaemic and regenerative changes. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 1997 Apr;23(2):132–40.
115. Rawat R, Cohen TV, Ampong B, Francia D, Henriques-Pons A, Hoffman EP, Nagaraju K. Inflammasome up-regulation and activation in dysferlin-deficient skeletal muscle. *Am J Pathol.* 2010 Jun;176(6):2891–900.
116. Demoule A, Divangahi M, Yahiaoui L, Danialou G, Gvozdic D, Labbe K, Bao W, Petrof BJ. Endotoxin triggers nuclear factor-kappaB-dependent up-regulation of multiple proinflammatory genes in the diaphragm. *Am J Respir Crit Care Med.* 2006 Sep 15;174(6):646–53.
117. Llovera M, Carbo N, Lopez-Soriano J, Garcia-Martinez C, Busquets S, Alvarez B, Agell N, Costelli P, Lopez-Soriano FJ, Celada A, Argiles JM. Different cytokines modulate ubiquitin gene expression in rat skeletal muscle. *Cancer Letters.* Elsevier; 1998 Nov 13;133(1):83–7.
118. Li W, Moylan JS, Chambers MA, Smith J, Reid MB. Interleukin-1 stimulates catabolism in C2C12 myotubes. *Am J Physiol, Cell Physiol.* 2009 Sep;297(3):C706–14.
119. Cannon T, Shores C, Yin X, Dahlman J, Guttridge D, Lai V, George J, Buzkova P, Couch M. Immunocompetent murine model of cancer cachexia for head and neck squamous cell carcinoma. *Head Neck.* 2008 Mar;30(3):320–6.
120. Zamir O, O'Brien W, Thompson R, Bloedow DC, Fischer JE, Hasselgren PO. Reduced Muscle Protein Breakdown in Septic Rats Following Treatment with Interleukin-1 Receptor Antagonist. *Int J Biochem.* 1994 Jul;26(7):943–50.
121. Jin L, Batra S, Jeyaseelan S. Deletion of Nlrp3 Augments Survival during Polymicrobial Sepsis by Decreasing Autophagy and Enhancing Phagocytosis. *J Immunol.* 2017 Feb 1;198(3):1253–62.
122. Martinon F, Pétrilli V, Mayor A, Tardivel A, Tschopp J. Gout-associated uric acid crystals activate the NALP3 inflammasome. *Nature.* 2006 Mar 9;440(7081):237–41.
123. Menconi M, Gonnella P, Petkova V, Lecker S, Hasselgren P-O. Dexamethasone and corticosterone induce similar, but not identical, muscle wasting responses in cultured L6 and C2C12 myotubes. *J Cell Biochem.* 2008 Oct 1;105(2):353–64.
124. Frost RA, Nystrom GJ, Lang CH. Lipopolysaccharide regulates proinflammatory cytokine expression in mouse myoblasts and skeletal muscle. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2002 Sep;283(3):R698–709.

125. Mizunoya W, Wakamatsu J-I, Tatsumi R, Ikeuchi Y. Protocol for high-resolution separation of rodent myosin heavy chain isoforms in a mini-gel electrophoresis system. *Analytical Biochemistry*. 2008 Jun;377(1):111–3.
126. Allegra S, Li JY, Saez JM, Langlois D. Terminal differentiation of Sol 8 myoblasts is retarded by a transforming growth factor-beta autocrine regulatory loop. *Biochem J*. Portland Press Limited; 2004 Jul 15;381(Pt 2):429–36.
127. Sigma-Aldrich. Monoclonal Anti-Myosin (Skeletal, Fast) antibody produced in mouse [Internet]. [cited 2018 Nov 14]. Available from: <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/m4276?lang=de®ion=DE>
128. Sigma-Aldrich. Monoclonal Anti-Myosin (Skeletal, Slow) antibody produced in mouse [Internet]. [cited 2018 Nov 14]. Available from: <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/m8421?lang=de®ion=DE>
129. Yaffe D, Saxel O. Serial passaging and differentiation of myogenic cells isolated from dystrophic mouse muscle. *Nature*. 1977 Dec;270(5639):725–7.
130. Bauer C, Duewell P, Mayer C, Lehr HA, Fitzgerald KA, Dauer M, Tschopp J, Endres S, Latz E, Schnurr M. Colitis induced in mice with dextran sulfate sodium (DSS) is mediated by the NLRP3 inflammasome. *Gut*. 2010 Sep;59(9):1192–9.
131. Vilaysane A, Chun J, Seamone ME, Wang W, Chin R, Hirota S, Li Y, Clark SA, Tschopp J, Trpkov K, Hemmelgarn BR, Beck PL, Muruve DA. The NLRP3 inflammasome promotes renal inflammation and contributes to CKD. *J Am Soc Nephrol*. 2010 Oct;21(10):1732–44.
132. Bracey NA, Beck PL, Muruve DA, Hirota SA, Guo J, Jabagi H, Wright JR, MacDonald JA, Lees-Miller JP, Roach D, Semeniuk LM, Duff HJ. The Nlrp3 inflammasome promotes myocardial dysfunction in structural cardiomyopathy through interleukin-1 β . *Exp Physiol*. The Physiological Society; 2013 Feb;98(2):462–72.
133. Schmidt F, Kny M, Zhu X, Wollersheim T, Persicke K, Langhans C, Lodka D, Kleber C, Weber-Carstens S, Fielitz J. The E3 ubiquitin ligase TRIM62 and inflammation-induced skeletal muscle atrophy. *Crit Care*. 2014;18(5):545.
134. Wollersheim T, Woehlecke J, Krebs M, Hamati J, Lodka D, Luther-Schroeder A, Langhans C, Haas K, Radtke T, Kleber C, Spies C, Labeit S, Schuelke M, Spuler S, Spranger J, Weber-Carstens S, Fielitz J. Dynamics of myosin degradation in intensive care unit-acquired weakness during severe critical illness. *Intensive Care Med*. 2014 Apr;40(4):528–38.
135. Huang N, Kny M, Riediger F, Busch K, Schmidt S, Luft FC, Slevogt H, Fielitz J. Deletion of Nlrp3 protects from inflammation-induced skeletal muscle atrophy. *Intensive Care Med Exp*. 2017 Dec;5(1):3.
136. Broussard SR, McCusker RH, Novakofski JE, Strle K, Shen WH, Johnson RW, Dantzer R, Kelley KW. IL-1 Impairs Insulin-Like Growth Factor I-Induced

- Differentiation and Downstream Activation Signals of the Insulin-Like Growth Factor I Receptor in Myoblasts. *J Immunol.* 2004 Jun 8;172(12):7713–20.
137. Vary TC, Deiter G, Lang CH. Cytokine-triggered decreases in levels of phosphorylated eukaryotic initiation factor 4G in skeletal muscle during sepsis. *Shock.* 2006 Dec;26(6):631–6.
 138. Peake JM, Gatta Della P, Suzuki K, Nieman DC. Cytokine expression and secretion by skeletal muscle cells: regulatory mechanisms and exercise effects. *Exerc Immunol Rev.* 2015;21:8–25.
 139. Bozza FA, Salluh JI, Japiassu AM, Soares M, Assis EF, Gomes RN, Bozza MT, Castro-Faria-Neto HC, Bozza PT. Cytokine profiles as markers of disease severity in sepsis: a multiplex analysis. *Crit Care. BioMed Central;* 2007;11(2):R49.
 140. Matthys P, Heremans H, Opdenakker G, Billiau A. Anti-interferon- γ antibody treatment, growth of Lewis lung tumours in mice and tumour-associated cachexia. *Eur J Cancer.* 1991;27(2):182–7.
 141. Costelli P, Carbo N, Tessitore L, Bagby GJ, Lopez-Soriano FJ, Argiles JM, Baccino FM. Tumor necrosis factor-alpha mediates changes in tissue protein turnover in a rat cancer cachexia model. *J Clin Invest.* 1993 Dec;92(6):2783–9.
 142. Strassmann G, Fong M, Freter CE, Windsor S, D'Alessandro F, Nordan RP. Suramin interferes with interleukin-6 receptor binding in vitro and inhibits colon-26-mediated experimental cancer cachexia in vivo. *J Clin Invest.* 1993 Nov;92(5):2152–9.
 143. Fischer CP. Interleukin-6 in acute exercise and training: what is the biological relevance? *Exerc Immunol Rev.* 2006;12:6–33.
 144. Steensberg A, van Hall G, Osada T, Sacchetti M, Saltin B, Klarlund Pedersen B. Production of interleukin-6 in contracting human skeletal muscles can account for the exercise-induced increase in plasma interleukin-6. *J Physiol.* 2000 Nov 15;529 Pt 1:237–42.
 145. Valenzuela CA, Zuloaga R, Poblete-Morales M, Vera-Tobar T, Mercado L, Avendaño-Herrera R, Valdés JA, Molina A. Fish skeletal muscle tissue is an important focus of immune reactions during pathogen infection. *Dev Comp Immunol.* 2017 Aug;73:1–9.
 146. Langhans C, Weber-Carstens S, Schmidt F, Hamati J, Kny M, Zhu X, Wollersheim T, Koch S, Krebs M, Schulz H, Lodka D, Saar K, Labeit S, Spies C, Hubner N, Spranger J, Spuler S, Boschmann M, Dittmar G, Butler-Browne G, Mouly V, Fielitz J. Inflammation-induced acute phase response in skeletal muscle and critical illness myopathy. *PLoS ONE.* 2014;9(3):e92048.
 147. Uhlar CM, Whitehead AS. Serum amyloid A, the major vertebrate acute-phase reactant. *Eur J Biochem.* 1999 Oct;265(2):501–23.
 148. Niemi K, Teirilä L, Lappalainen J, Rajamäki K, Baumann MH, Öörni K, Wolff H,

- Kovanen PT, Matikainen S, Eklund KK. Serum amyloid A activates the NLRP3 inflammasome via P2X7 receptor and a cathepsin B-sensitive pathway. *J Immunol*. 2011 Jun 1;186(11):6119–28.
149. Cho KA, Kang PB. PLIN2 inhibits insulin-induced glucose uptake in myoblasts through the activation of the NLRP3 inflammasome. *Int J Mol Med*. 2015 Sep;36(3):839–44.
150. Passey SL, Bozinovski S, Vlahos R, Anderson GP, Hansen MJ. Serum Amyloid A Induces Toll-Like Receptor 2-Dependent Inflammatory Cytokine Expression and Atrophy in C2C12 Skeletal Muscle Myotubes. *PLoS ONE*. 2016;11(1):e0146882.
151. Lachmann HJ, Lowe P, Felix SD, Rordorf C, Leslie K, Madhoo S, Wittkowski H, Bek S, Hartmann N, Bosset S, Hawkins PN, Jung T. In vivo regulation of interleukin 1beta in patients with cryopyrin-associated periodic syndromes. *Journal of Experimental Medicine*. 2009 May 11;206(5):1029–36.
152. van Hees HWH, Schellekens W-JM, Linkels M, Leenders F, Zoll J, Donders R, Dekhuijzen PNR, van der Hoeven JG, Heunks LMA. Plasma from septic shock patients induces loss of muscle protein. *Crit Care*. 2011;15(5):R233.
153. Voisin L, Breuille D, Ruot B, Ralliere C, Rambourdin F, Dalle M, Obled C. Cytokine modulation by PX differently affects specific acute phase proteins during sepsis in rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 1998 Nov;275(5):R1412–9.
154. Dinarello CA. Biologic basis for interleukin-1 in disease. *Blood*. 1996;87(6):2095–147.
155. Borth W, Urbanski A, Prohaska R, SUSANI M, Luger TA. Binding of Recombinant Interleukin-1-Beta to the 3rd Complement Component and Alpha-2-Macroglobulin After Activation of Serum by Immune-Complexes. *Blood*. 1990;75(12):2388–95.
156. Roubenoff R, Roubenoff RA, Cannon JG, Kehayias JJ, Zhuang H, Dawson-Hughes B, Dinarello CA, Rosenberg IH. Rheumatoid cachexia: cytokine-driven hypermetabolism accompanying reduced body cell mass in chronic inflammation. *J Clin Invest*. 1994 Jun;93(6):2379–86.
157. LeMay LG, Otterness IG, Vander AJ, Kluger MJ. In vivo evidence that the rise in plasma IL 6 following injection of a fever-inducing dose of LPS is mediated by IL 1 β . *Cytokine*. 1990;2(3):199–204.
158. Medzhitov R, Janeway CA. Innate immunity: impact on the adaptive immune response. *Current Opinion in Immunology*. 1997;9(1):4–9.
159. Vance RE, Isberg RR, Portnoy DA. Patterns of pathogenesis: discrimination of pathogenic and nonpathogenic microbes by the innate immune system. *Cell Host Microbe*. 2009 Jul 23;6(1):10–21.
160. Rittirsch D, Huber-Lang MS, Flierl MA, Ward PA. Immunodesign of experimental

- sepsis by cecal ligation and puncture. *Nat Protoc.* 2009;4(1):31–6.
161. Ringling RE, Gastecki ML, Woodford ML, Lum-Naihe KJ, Grant RW, Pulakat L, Vieira-Potter VJ, Padilla J. Loss of Nlrp3 Does Not Protect Mice from Western Diet-Induced Adipose Tissue Inflammation and Glucose Intolerance. *PLoS ONE.* 2016;11(9):e0161939.
 162. Dietel M, Suttorp N, Zeitz M. *Harrisons Innere Medizin.* ABW Wissenschaftsverlag GmbH; 2012. 8 p.
 163. Song-Zhao GX, Srinivasan N, Pott J, Baban D, Frankel G, Maloy KJ. Nlrp3 activation in the intestinal epithelium protects against a mucosal pathogen. *Mucosal Immunol.* 2014 Jul;7(4):763–74.
 164. Fisher CJ. Recombinant Human Interleukin 1 Receptor Antagonist in the Treatment of Patients With Sepsis Syndrome. *JAMA.* 1994 Jun 15;271(23):1836.
 165. Ali A, Na M, Svensson MND, Magnusson M, Welin A, Schwarze J-C, Mohammad M, Josefsson E, Pullerits R, Jin T. IL-1 Receptor Antagonist Treatment Aggravates Staphylococcal Septic Arthritis and Sepsis in Mice. *PLoS ONE.* 2015;10(7):e0131645.
 166. Sarkar A, Hall MW, Exline M, Hart J, Knatz N, Gatson NT, Wewers MD. Caspase-1 Regulates Escherichia coli Sepsis and Splenic B Cell Apoptosis Independently of Interleukin-1 β and Interleukin-18. *Am J Respir Crit Care Med.* 2006 Nov;174(9):1003–10.
 167. Shakoory B, Carcillo JA, Chatham WW, Amdur RL, Zhao H, Dinarello CA, Cron RQ, Opal SM. Interleukin-1 Receptor Blockade Is Associated With Reduced Mortality in Sepsis Patients With Features of Macrophage Activation Syndrome: Reanalysis of a Prior Phase III Trial. *Crit Care Med.* 2016 Feb;44(2):275–81.
 168. Wan J, Chen D, Yu B, Luo Y, Mao X, Zheng P, Yu J, Luo J, He J. Leucine Protects Against Skeletal Muscle Atrophy in Lipopolysaccharide-Challenged Rats. *J Med Food.* 2017 Jan;20(1):93–101.
 169. McBride MJ, Foley KP, D'souza DM, Li YE, Lau TC, Hawke TJ, Schertzer JD. The NLRP3 inflammasome contributes to sarcopenia and lower muscle glycolytic potential in old mice. *AJP: Endocrinology and Metabolism.* 2017 May 23;:ajpendo.00060.2017.
 170. Stana F, Vujovic M, Mayaki D, Leduc-Gaudet J-P, Leblanc P, Huck L, Hussain SNA. Differential Regulation of the Autophagy and Proteasome Pathways in Skeletal Muscles in Sepsis. *Crit Care Med.* 2017 May;:1.
 171. Batt J, Bain J, Goncalves J, Michalski B, Plant P, Fahnestock M, Woodgett J. Differential gene expression profiling of short and long term denervated muscle. *FASEB J.* 2006 Jan;20(1):115–7.
 172. Sartori R, Schirwis E, Blaauw B, Bortolanza S, Zhao J, Enzo E, Stantzou A, Mouisel E, Toniolo L, Ferry A, Stricker S, Goldberg AL, Dupont S, Piccolo S,

- Amthor H, Sandri M. BMP signaling controls muscle mass. *Nat Genet.* 2013 Sep 29;45(11):1309–18.
173. Minnaard R, Drost MR, Wagenmakers AJM, van Kranenburg GP, Kuipers H, Hesselink MKC. Skeletal Muscle wasting and contractile performance in septic rats. *Muscle Nerve.* 2005 Mar;31(3):339–48.
174. Bloise FF, van der Spek AH, Surovtseva OV, Ortiga-Carvalho TM, Fliers E, Boelen A. Differential Effects of Sepsis and Chronic Inflammation on Diaphragm Muscle Fiber Type, Thyroid Hormone Metabolism, and Mitochondrial Function. *Thyroid.* 2016 Apr;26(4):600–9.
175. Ciciliot S, Rossi AC, Dyar KA, Blaauw B, Schiaffino S. Muscle type and fiber type specificity in muscle wasting. *Int J Biochem Cell Biol.* 2013 Oct;45(10):2191–9.
176. Jia AF, Feng JH, Zhang MH, Chang Y, Li ZY, Hu CH, Zhen L, Zhang SS, Peng QQ. Effects of immunological challenge induced by lipopolysaccharide on skeletal muscle fiber type conversion of piglets. *J Anim Sci.* 2015 Nov;93(11):5194–203.
177. Puren AJ, Fantuzzi G, Gu Y, Su MS, Dinarello CA. Interleukin-18 (IFN γ -inducing factor) induces IL-8 and IL-1 β via TNF α production from non-CD14 $^{+}$ human blood mononuclear cells. *J Clin Invest.* 1998 Feb 1;101(3):711–21.
178. Tucci M, Quatraro C, Dammacco F, Silvestris F. Increased IL-18 production by dendritic cells in active inflammatory myopathies. *Annals of the New York Academy of Sciences.* 2007 Jun;1107:184–92.
179. Tucci M, Quatraro C, DAMMACCO F, Silvestris F. Interleukin-18 overexpression as a hallmark of the activity of autoimmune inflammatory myopathies. *Clin Exp Immunol.* 2006 Oct;146(1):21–31.
180. Jepson MM, Pell JM, Bates PC, Millward DJ. The effects of endotoxaemia on protein metabolism in skeletal muscle and liver of fed and fasted rats. *Biochem J.* 1986 Apr 15;235(2):329–36.
181. Ash SA, Griffin GE. Effect of parenteral nutrition on protein turnover in endotoxaemic rats. *Clin Sci.* 1989 Jun;76(6):659–66.
182. Cohen S, Brault JJ, Gygi SP, Glass DJ, Valenzuela DM, Gartner C, Latres E, Goldberg AL. During muscle atrophy, thick, but not thin, filament components are degraded by MuRF1-dependent ubiquitylation. *J Cell Biol.* 2009 Jun 15;185(6):1083–95.
183. Crowell KT, Kelleher SL, Soybel DI, Lang CH. Marginal dietary zinc deprivation augments sepsis-induced alterations in skeletal muscle TNF- α but not protein synthesis. *Physiol Rep.* 2016 Nov;4(21).
184. Zellweger R, Wichmann MW, Ayala A, Stein S, DeMaso CM, Chaudry IH. Females in proestrus state maintain splenic immune functions and tolerate

- sepsis better than males. *Crit Care Med.* 1997 Jan;25(1):106–10.
185. Turnbull IR, Wizorek JJ, Osborne D, Hotchkiss RS, Coopersmith CM, Buchman TG. Effects of age on mortality and antibiotic efficacy in cecal ligation and puncture. *Shock.* 2003 Apr;19(4):310–3.
 186. Huang J, Forsberg NE. Role of calpain in skeletal-muscle protein degradation. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1998;95(21):12100–5.
 187. Sandri M. Autophagy in skeletal muscle. *FEBS Lett.* 2010 Apr 2;584(7):1411–6.

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Nora Rui Huang, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „*Nlrp3*-Deletion schützt vor inflammationsvermittelter Skelettmuskelatrophie“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

14. Februar 2019

Datum

Unterschrift

Anteilerklärung an etwaigen erfolgten Publikationen

Nora Rui Huang hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

1. **Huang N***, Kny M*, Riediger F*, Busch K, Schmidt S, Luft FC, Slevogt H, Fielitz J. Deletion of Nlrp3 protects from inflammation-induced skeletal muscle atrophy. Intensive Care Med Exp. 2017 Dec;5(1):3.

* geteilte Erstautorschaft

Beitrag im Einzelnen (bitte kurz ausführen):

Leistungen der Promovendin bestanden in der Planung und Durchführung der Versuche unter Supervision, in der Auswertung und Interpretation der Daten, der Präsentation der Ergebnisse sowie der Erstellung des Manuskriptes unter Anleitung. Aus meiner statistischen Auswertung sind die Abbildungen 1C-H, 2, 3, 4 und 5 sowie die Abbildungen in den „Additional Files“ 5, 6, 7 und 8A-D in der Publikation entstanden.

2. Kny M, Huang N, Busch K, Schmidt S, Butter C, Riediger F, Luft FC, Slevogt H, Fielitz J. Deletion of Nlrp3 protects from inflammation-induced skeletal muscle atrophy. Posterpräsentation. 83. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie – Herz- und Kreislaufforschung e.V., 19.-22. April 2017, Mannheim, Deutschland. Clin Res Cardiol 106, Suppl 1, Apr. 2017.

Beitrag im Einzelnen (bitte kurz ausführen):

Leistungen der Promovendin bestanden in der Planung und Durchführung der Versuche unter Supervision, in der Auswertung und Interpretation der Daten, die Erstellung von Grafiken.

Prof. Dr. med. Jens Fielitz
Unterschrift, Datum und Stempel des betreuenden Hochschullehrers

Nora Huang
Unterschrift der Doktorandin

Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Publikationsliste

Publikationen:

1. Huang N*, Kny M*, Riediger F*, Busch K, Schmidt S, Luft FC, Slevogt H, Fielitz J. Deletion of Nlrp3 protects from inflammation-induced skeletal muscle atrophy. *Intensive Care Med Exp*. 2017 Dec;5(1):3.
2. Chiu CY, Gomolka B, Dierkes C, Huang NR, Schroeder M, Purschke M, Manstein D, Dangi B, Weylandt KH. Omega-6 docosapentaenoic acid-derived resolvins and 17- hydroxydocosahexaenoic acid modulate macrophage function and alleviate experimental colitis. *Inflamm Res*. 2012 Sep;61(9):967–76.

Posterpräsentationen:

1. Huang N, Krimnitz J, Möller V, Seifert M, Hölschermann F, Butter C. Prädiktoren für einen vollständigen Explantationserfolg. Posterpräsentation. 83. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie – Herz- und Kreislaufforschung e.V., 19.-22. April 2017, Mannheim, Deutschland. *Clin Res Cardiol* 106, Suppl 1, Apr. 2017.
2. Kny M, Huang N, Busch K, Schmidt S, Butter C, Riediger F, Luft FC, Slevogt H, Fielitz J. Deletion of Nlrp3 protects from inflammation-induced skeletal muscle atrophy. Posterpräsentation. 83. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie – Herz- und Kreislaufforschung e.V., 19.-22. April 2017, Mannheim, Deutschland. *Clin Res Cardiol* 106, Suppl 1, Apr. 2017.

Danksagung

Ich bedanke mich bei Herrn Prof. Dr. med. Jens Fielitz für die freundliche Überlassung der Fragestellung und für die kompetente Betreuung, konstruktiven Diskussionen sowie ausdauernde Geduld bis zur Fertigstellung der Arbeit.

Des Weiteren möchte ich mich bei allen ehemaligen und derzeitigen Laborkolleginnen und -kollegen der Arbeitsgruppe Fielitz für wichtige Hilfestellungen sowie Anregungen bedanken. Dabei geht insbesondere mein Dank an Dr. Melanie Kny und Katharina Busch für die vielen gemeinsamen Arbeitsstunden und gegenseitige Unterstützung, die maßgeblich zum Gelingen der vorliegenden Arbeit beigetragen haben. Ebenso bedanken möchte ich mich bei Sibylle Schmidt für ihre helfende technische Assistenz.

Der größte Dank gilt meinen Eltern, Johannes und meinen Freunden für die immer währende Unterstützung und die ständige Motivation zur Fertigstellung dieser Arbeit.