

Aus dem Bereich
Translationale Kardio-Renale Medizin
der Medizinischen Fakultät
der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar

**MECHANISMEN DER AKTIVIERUNG DES NLRP3
INFLAMMASOMS BEI CHRONISCHER
NIERENERKRANKUNG UND KARDIOVASKULÄREN
ERKRANKUNGEN**

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
der Medizinischen Fakultät
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

November 2021

vorgelegt von
Mira Klug, geb. am 26.10.1988
In Homburg/Saar

Betreuer: Univ.-Prof. Dr. med. Dr. sc. nat. Thimoteus Speer

Homburg/Saar 2021

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	VI
Abkürzungsverzeichnis	VIII
1 Zusammenfassung	11
1.1 Zusammenfassung	11
1.2 Summary	12
2 Einleitung	13
2.1 Atherosklerose	13
2.2 Chronische Nierenerkrankung (CKD)	15
2.3 Immunsystem	16
2.3.1 Angeborenes Immunsystem	16
2.4 Pattern recognition Rezeptoren (PRRs)	17
2.5 Toll-like Rezeptoren (TLRs)	17
2.6 Klassische Signaltransduktion des TLR4	18
2.7 Interleukin IL-1 β (IL-1 β)	19
2.8 NLRP3 Inflammasom	20
2.9 Aktivierung des NLRP3 Inflammasoms	21
2.10 Aktivierung des angeborenen Immunsystems durch Lipoproteine	23
2.11 Zielsetzung der Arbeit	23
3 Material	24
3.1 Chemikalien	24
3.2 Verwendete Medien und Puffer	26
3.3 Primäre Antikörper	27
3.4 Sekundäre Antikörper und Immundetektionsreagenzien	28
3.5 Verwendete FACS („fluorescence-activated cell sorting“) -Antikörper	28
3.6 Verwendete ELISA Kits	28
3.7 Verwendete Stimulanzen und Blocker	29
3.8 Lösungen	30
3.9 Versuchstiere und Tierhaltung	34
3.9.1 Tierhaltung	34
3.9.2 Verwendete Knockout-Mäuse	34
4 Methoden	35
4.1 Isolation peripherer monozytärer Blutzellen (PBMCs)	35
4.1.1 Zählen der PBMCs	36
4.1.2 Stimulation der PBMCs	36
4.2 BMDM-Isolation	36
4.3 Kultivierung von HEK293-Reporter-Zellen	37
4.3.1 Selektion der HEK293-Reporterzellen	37
4.3.2 Aussaat der HEK293-Reporterzellen	37

4.4	Transfektion kultivierter HEK293-Zellen	38
4.4.1	Durchflusszytometrie humaner HEK293-Zellen nach Co-Transfektion und Inkubation mit Atto-488-markiertem ApoC3	38
4.5	HDL/LDL/VLDL-Isolation	39
4.5.1	Tag 1: Vorbereitung des Serums	39
4.5.2	HDL/LDL/VLDL-Isolation	39
4.5.3	Dichtemessung	39
4.5.4	Vorbereiten der Röhrchen	39
4.5.5	HDL/LDL/VLDL-Isolation Tag 3-LDL	40
4.5.6	HDL	40
4.5.7	HDL/LDL/VLDL-Isolation Tag 4	40
4.5.8	LDL	40
4.5.9	HDL	41
4.5.10	HDL/LDL/VLDL-Isolation Tag 5	41
4.5.11	HDL	41
4.5.12	LDL Tag 4, HDL Tag 5	41
4.6	Delipidiertes VLDL und aufgereinigtes humanes ApoC3	42
4.7	Western Blot	42
4.7.1	Zelllysate	42
4.7.2	Proteinbestimmung	42
4.7.3	20% Trichloressigsäure-Proteinfällung (TCA-Präzipitation)	43
4.7.4	SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-Page)	43
4.7.5	Wet-Blot	44
4.7.6	Semi-Dry-Blot	45
4.7.7	Antikörperdetektion von Proteintransfer auf Nitrozellulosemembran	45
4.8	Quanti-Blue Assay	45
4.8.1	Aussaat von HEK-Blue Null1 und HEK293-Blue hTLR2/4 für Quanti-Blue Assay	45
4.9	Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)	45
4.9.1	Vorbereitung der Reagenzien	45
4.9.2	Durchführung	46
4.9.3	Präparation des Quanti Blue Assays	47
4.9.4	Detektion von Secreted embryonic alkaline phosphatase-Aktivität (SEAP-Aktivität)	47
4.10	„LDH-release-Assay“	47
4.11	Immunozytologische Atto-488 ApoC3-Färbung	47
4.11.1	Aufkonzentrierung von ApoC3	48
4.11.2	Atto-488-Färbung von ApoC3	48
4.11.3	ApoC3-Internalisierung in PBMCs	48
4.11.4	Atto-488 Detektion in HEK293 Zellen mittels FACS	48
4.12	Assay zur Formation von ASC Specks	48
4.13	Reaktive Sauerstoffspezies- Messung (ROS) durch Elektronenspinresonanz-Spektroskopie (ESR)	49
4.13.1	Vorbereitung der ROS-Messung im Überstand von BMDMs	49
4.13.2	Diethyldithiocarbamat (DETC) Lösung:	49
4.13.3	Herstellen der Spintrap-Lösung (CMH, 1-Hydroxy-3-Methoxycarbonyl-2, 2, 5, 5-Tetramethylpyrrolidin):	49
4.14	Immunoprecipitation (IP)	50
4.15	Crosslinking	50
4.16	Murines perivaskuläres Carotisschädigungs-Modell	50
4.16.1	MACS-Protokoll zur Isolation CD14+ humaner PBMCs	50
4.16.2	Prozedurales Vorgehen	51
4.17	Modell der murinen unilateralen Ureterligatur	51

4.17.1	PKH67-Färbung für Zelltransplantationsexperimente	51
4.17.2	Prozedurales Vorgehen	52
4.18	Proteomanalyse	52
4.19	Hochgeschwindigkeit Fluoreszenz-Mikroskopie	52
4.20	Statistik	52
5	Ergebnisse	54
5.1	IL-1β-Sekretion humaner PBMCs nach Lipoprotein-Stimulation	54
5.2	Western Blot Nachweis von ApoC3 in nativen HDL, LDL und VLDL Lipoprotein-Präparationen	55
5.3	Immunozytologische Detektion von Atto 488-markiertem ApoC3 in PBMCs	55
5.4	Analyse der Sezernierung von Zytokinen nach konzentrationsabhängiger ApoC3-Stimulation von PBMCs	56
5.5	Untersuchung des zeitabhängigen Anstiegs der IL-1β-Konzentration nach ApoC3-Stimulation	57
5.6	Reinheitsanalyse von ApoC3.	57
5.7	Western Blot Nachweis von NLRP3-vermittelter IL-1β- und Caspase-1-Freisetzung nach ApoC3-Stimulation	58
5.8	Überprüfung der Inflammasom-vermittelten Aktivierung der Caspase-1-und IL-1β-Sekretion durch ApoC3-Stimulation	59
5.9	Untersuchung der ApoC3-vermittelten NLRP3-Aktivierung in murinen Makrophagen	60
5.10	Überprüfung von LDH-Freisetzung humaner PBMCs als Antwort auf eine ApoC3-vermittelte Stimulation	60
5.11	Analyse einer ApoC3-induzierten ASC Specks-Bildung	61
5.12	Analyse der Kalium-Abhängigkeit von ApoC3 vermittelter IL-1β-Freisetzung	62
5.13	Analyse der Caspase-8 Involvierung in ApoC3 vermittelter NLRP3-Aktivierung	62
5.14	Inhibition ApoC3 vermittelter NFκB-Phosphorylierung	63
5.15	Effekt von ApoC3 auf kanonische NFκB-Aktivierung und Phosphorylierung von MAPK in humanen PBMCs	64
5.16	ApoC3 als Priming-Ligand der klassischen NLRP3-Aktivierung	64
5.17	FACS-Nachweis der TLR2/4-abhängigen Internalisierung von ApoC3	65
5.18	Aufklärung des Effektes von ApoC3 auf die Aktivierung von TLR4	65
5.19	Quanti-Blue Nachweis der TLR2/4-abhängigen Aktivierung von NFκB nach Stimulation mit ApoC3	67
5.20	Beitrag von TLR2 und TLR4 zur ApoC3-vermittelten NFκB-Aktivierung	68
5.21	Analyse der Pam3CSK4 vermittelten IL-1β- und Caspase-1-Sekretion in PBMCs nach LPS-Priming	69
5.22	Überprüfung des Transfektionserfolges von Tlr2 und Tlr4 Plasmiden in HEK293-Zellen	69
5.23	Analyse der Co-Lokalisation von TLR2 und 4 nach ApoC3 Stimulation	70
5.24	Analyse der IL-1β-Freisetzung durch die Anwesenheit von Ca²⁺-Chelatoren und Inhibition des Ca²⁺-aktivierten Ionenkanals TRPM2	70
5.25	Überprüfung der Beteiligung von ApoC3-vermittelter Signaltransduktion bei der Induktion von Superoxid-Produktion in PBMCs	71
5.26	ApoC3-vermittelten Superoxid-Produktion in Anwesenheit von Ca²⁺-Chelatoren	72

5.27	Untersuchung des Beitrages von oxidativem Stress in der ApoC3-vermittelten Immunantwort	73
5.28	Analyse einer ApoC3-vermittelten Induktion von Thioredoxin-interacting protein (TXNIP)-Expression in PBMCs	74
5.29	Analyse der ApoC3-induzierten TXNIP-vermittelten NLRP3-Aktivierung	74
5.30	Untersuchung einer alternativen Inflammasom-Aktivierung durch Involvierung von Spleen tyrosine kinase (Syk)	75
5.31	Inhibition der aktivierten Proteinkinase Syk	75
5.32	Beitrag von Syk zur ApoC3-vermittelten ROS-Produktion	76
5.33	Aufklärung von zusätzlich involviertem Transmembranadaptor in ApoC3-vermittelter Syk-Aktivierung	77
5.34	SCIMP als Transmembranadaptor-Protein in ApoC3-vermitteltem TLR4 Signalling	77
5.35	SCIMP-Expression nach ApoC3-Stimulation	78
5.36	Interaktionsanalyse von Tyrosin-Kinase Lyn mit Syk nach ApoC3 vermittelter Stimulation	78
5.37	<i>In vivo</i> Nachweis von ApoC3-vermittelten Effekten bei der NLRP3-induzierten Immunantwort in humanisierten Mäusen	79
5.38	Effekt von ApoC3 auf normale Monocyten-Funktion bei der re-Endothelialisierung von geschädigtem Carotis-Gewebe	80
5.39	Untersuchung einer ApoC3-vermittelten Migration humaner Monocyten in murinem Nierengewebe nach unilateraler Ureterligatur	81
6	Diskussion	84
6.1	Zusammensetzung und Funktion von VLDL und ApoC3	84
6.2	Lipoproteine als Regulatoren der Inflammation	86
6.3	Mechanismen der Inflammasom-Aktivierung	90
6.4	TLR-Signalling (Signal 1)	93
6.5	Signal 2	95
6.6	Bedeutung der Ergebnisse	99
7	Literaturverzeichnis	103
8	Publikationen	119
9	Danksagung	120
10	Lebenslauf	121
11	Eidesstattliche Erklärung	123
12	Einverständniserklärung	123

Vorbemerkung

Die in dieser Arbeit erhobenen Daten wurden in Form einer Originalarbeit publiziert (Zewinger et al. Nat Immunol 2020). Bei der Durchführung der Arbeit und bei der Auswertung der Daten wurde ich von Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Dr. sc. nat. Thimoteus Speer betreut. Der Text und die Abbildungen dieser Dissertationsschrift sind daher in weiten Teilen eine deutsche Reproduktion der Originalarbeiten.

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Die Phasen in der Entstehung von atherosklerotischen Plaques.	14
Abb. 2: Zelluläre Signaltransduktionswege von TLR2 und TLR4.	18
Abb. 3: Das funktionelle NLRP3 Inflammasom.	20
Abb. 4: Aktivierung des NLRP3 Inflammasoms.	22
Abb. 5: Separation der PBMCs durch Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation.....	35
Abb. 6: IL-1 β -Konzentration in PBMCs nach Stimulation mit nativen Lipoproteinen.	54
Abb. 7: IL-1 β -Konzentrationen in PBMCs nach Stimulation mit nativem VLDL oder delipidiertem VLDL.	54
Abb. 8: IL-1 β -Konzentrationen in PBMCs nach Apolipoprotein-Inkubation.	55
Abb. 9: Western Blot Nachweis von ApoC3 aus repräsentativen HDL, LDL und VLDL Lipoprotein-Aufreinigungen.....	55
Abb. 10: Zytoplasmatisches ApoC3 in PBMCs.	56
Abb. 11: IL-1 β -, IL-6- und TNF- α -Konzentration in PBMCs nach ApoC3-Stimulation.....	57
Abb. 12: Konzentrations- und zeitabhängige IL-1 β -Konzentration in PBMCs.	57
Abb. 13: IL-1 β -Konzentration nach Stimulation mit aufgereinigtem ApoC3.....	58
Abb. 14: IL-1 β -Konzentration in Anwesenheit von Polymyxin B.....	58
Abb. 15: IL-1 β und Caspase-1 in PBMCs.....	59
Abb. 16: IL-1 β -Konzentration in PBMCs nach Blocken der Caspase-1-Aktivität.	59
Abb. 17: IL-1 β -Konzentration in Nlrp3- und Caspase-1-deletierten BMDMs.	60
Abb. 18: LDH-Aktivität im Überstand von PBMCs.....	61
Abb. 19: Immunofluoreszenz-Färbung von ASC in PBMCs.	61
Abb. 20: IL-1 β -Konzentration nach ApoC3-Stimulation in Anwesenheit von Kalium.	62
Abb. 21: Caspase-8 in humanen PBMCs nach Stimulation mit ApoC3.....	63
Abb. 22: IL-1 β -Konzentration in PBMCs nach Inhibition der NF κ B-Phosphorylierung.....	63
Abb. 23: MAPK in PBMCs nach zeitabhängiger ApoC3-Stimulation.	64
Abb. 24: IL-1 β -Konzentration nach Priming mit ApoC3.....	65
Abb. 25: Fluoreszenzintensität von Atto-488-markiertem ApoC3 in Tlr2 und Tlr4 transfizierten HEK293-Zellen.	65
Abb. 26: IL-1 β -Konzentration in PBMCs nach Blocken von TLR2 und TLR4.	66
Abb. 27: Spezifität verwendeter TLR-Blockierantikörper.....	66
Abb. 28: IL-1 β -Konzentration im Überstand von PBMCs nach Blocken von TLR1 und TLR6.	67
Abb. 29: SEAP-Aktivität in Tlr2 und Tlr4-HEK293-Blue Reporterzellen nach Stimulation mit ApoC3.....	68
Abb. 30: IL-1 β -Level in PBMCs nach Pam3CSK4-Stimulation.....	68
Abb. 31: IL-1 β und Caspase-1 in PBMCs nach Pam3CSK4-Stimulation.	69

Abb. 32: Tlr2 und Tlr4 in HEK293-Zellen.	70
Abb. 33: Tlr2-CFP und Tlr4-YFP-Fluoreszenzsignale nach ApoC3-Stimulation in HEK293-Zellen.	70
Abb. 34: IL-1 β -Konzentration im Überstand von PBMCs nach Inkubation mit Ca ²⁺ -Chelatoren und Inhibition des Ca ²⁺ -aktivierten Ionenkanals TRPM2.	71
Abb. 35: Superoxid-Produktion nach ApoC3-Stimulation.	72
Abb. 36: Superoxid-Produktion unter Anwesenheit von Ca ²⁺ -Chelatoren nach ApoC3-Stimulation.	73
Abb. 37: IL-1 β -Konzentration im Überstand von PBMCs nach ApoC3-Stimulation unter Anwesenheit verschiedener Inhibitoren.	73
Abb. 38: TXNIP-Expression nach ApoC3-Stimulation.	74
Abb. 39: TXNIP und NLRP3 nach ApoC3-Stimulation.	74
Abb. 40: Syk in humanen PBMCs nach LPS- und ApoC3-Stimulation.	75
Abb. 41: IL-1 β -Konzentration nach Blocken von Syk.	76
Abb. 42: ROS-Produktion nach Inhibition von Syk.	76
Abb. 43: BS3 Crosslinking nach ApoC3 Stimulation.	77
Abb. 44: Massenspektrometrische Analyse nach ApoC3-Stimulation und BS3 Crosslinking.	78
Abb. 45: SCIMP-Expression in PBMCs.	78
Abb. 46: Immunopräzipitation von SCIMP mit Lyn und Syk nach ApoC3-Stimulation in PBMCs.	79
Abb. 47: Reinheit von CD14+ humanen Monocyten.	79
Abb. 48: schematisches Vorgehen beim Modellversuch zur Untersuchung von Effekten auf humane CD14+ Monocyten durch ApoC3 bei der re-Endothelialisierung von geschädigter A. carotis.	80
Abb. 49: Re-Endothelialisierung nach perivaskulärer Carotisschädigung in Anwesenheit von ApoC3.	80
Abb. 50: Re-Endothelialisierung geschädigter Carotiden in Abwesenheit humaner Monocyten.	81
Abb. 51: schematisches Vorgehen nach unilateraler Ureterligatur zur Untersuchung von Effekten auf humane CD14+ Monocyten durch ApoC3 als Modellversuch für Nierenschädigung.	81
Abb. 52: PKH67-Fluoreszenzfärbung humaner CD14+ Monocyten.	82
Abb. 53: Nierenschädigung nach unilateraler Ureterligatur.	82
Abb. 54: PKH-67-markierte CD14+ Monocyten in murinem Nierengewebe nach unilateraler Ureterligatur.	83
Abb. 55: Alternative Inflammasom-Aktivierung durch ApoC3.	102

Abkürzungsverzeichnis

ADP	Adenosindiphosphat
ASC	Akutes Koronarsyndrom
ATP	Adenosintriphosphat
Apo	Apolipoprotein
ApoC3	Apolipoprotein CIII
Aqua _{dest.}	H ₂ O _{dest.}
Aqua _{bidest.}	H ₂ O _{bidest.}
BAPTA-AM	5,5'-Dimethyl-BAPTA-AM
BMDM	Bone marrow derived macrophages
BSA	Bovine Serum Albumin
CANTOS	Canakinumab Anti-Inflammatory Thrombosis Outcomes Study
CARD	Caspase-Rekrutierungs-Domäne
CM	Chylomikronen
CNI	chronische Niereninsuffizienz
CK-MB	Myocard-spezifische Kreatin-Kinase
C-Terminus	Carboxyl-Ende
CLR	C-Typ-Lecitin Rezeptor
DAMP	Damage-associated molecular patterns
DETC	Diethyldithiocarbamatre
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DPI	Diphenyleiodonium chloride Embryonal
ECs	Endothelzellen
EKG	Elektrokardiogramm
EtOH	Ethanol
EGTA	Ethylene Glycol-Bis (B-Aminoethyl*Ether) N
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
ERK	Extrazellular-signal Regulierte Kinase
FACS	Fluorescence-activated cell sorting
FBS	Fetales Kälberserum
FLIPR	Fluorescence Imaging Plate reader
GFR	Glomeruläre Filtrationsrate
HDL	High density lipoprotein
H ₂ O _{bd.}	Zweifach destilliertes Wasser
H ₂ O _{dest.}	Destilliertes Wasser

H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
IFNs	Typ-I-Interferonen IFNs
IL	Interleukin
IRF3	interferon regulatory transcription factor 3
IRAK4	IL-1 receptor-associated kinase 4
JNK	C-Jun N-terminal kinase
KDIGO	Kidney disease Improving Global Outcomes
KO	Knockout
LDL	Low density lipoprotein
LDLox	Oxidiertes low density Lipoprotein
LRR	Leucin-Rich-Repeat
LPS	Lipopolysaccharid
LPL	Lipoprotein Lipase
MAL	MyD88-adaptor-like protein
M-CSF	Macrophage colony-stimulating factor
MD2	Myeloid differentiation factor 2
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
MAPKs	Mitogen-activated protein kinase kinases
MNCs	Monocyten
MyD88	Myeloid differentiation primary response gene 88
NAC	N-Acetyl-L-Cystein
NF-κB	Kappa light chain enhancer aktivierter B-Zellen
NLRs	Nucleotide-binding oligomerization domain Rezeptoren
NSTEMI	Nicht-ST-Hebungsinfarkt
PAMPS	Pathogen-associated molecular patterns
PBMCs	Peripheral blood mononuclear cells
PBS	Phosphat-gepufferte Saline
Pen Strep	Penicillin Streptomycin
PYD	Pyrin- Domänen
PRR	Pattern recognition Rezeptor
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
RT	Raumtemperatur
SDS	Sodium dodecyl sulfat
SMCs	Glatte Muskelzellen

STEMI	ST-Hebungsinfarkt
TAK1	Transforming growth factor beta activated kinase-1
TBK1	TANK-binding kinase 1
TG	Triglyceride
TIR	TLR/Interleukin-1-Rezeptor
TLRs	Toll-like Rezeptoren
TNF	Tumor necrosis factor
TRAF6	TNF receptor-associated factor 6
TRIF	Toll/IL-1R domain-containing adaptor-inducing IFN- β
TRL	Triglycerid-reiche Lipoproteine
UA	Angina pectoris
VCAM	Vascular endothelial adhesion molecule
VLDL	Very low density lipoprotein
WT	Wildtyp

1 Zusammenfassung

1.1 Zusammenfassung

Eine sterile Inflammation spielt eine wichtige Rolle bei der Entstehung und Progression einer chronischen Nierenerkrankung als auch bei kardiovaskulären Erkrankungen. In Vorarbeiten konnte unsere Arbeitsgruppe zeigen, dass die Lipoproteine HDL und LDL auf unterschiedliche Weise das angeborene Immunsystem wie beispielsweise Toll-like Rezeptor-2 (TLR2) aktivieren und so eine systemische Inflammation induzieren. Das NLRP3 Inflammasom stellt einen weiteren wichtigen Bestandteil des angeborenen Immunsystems dar, welcher pro-IL-1 β in dessen aktive Form prozessiert. Ziel dieser Arbeit war es zu untersuchen, welche Rolle die verschiedenen Lipoproteinklassen bei der Aktivierung des NLRP3 Inflammasoms spielen.

In humanen Monozyten führte VLDL aber nicht HDL oder LDL zur Freisetzung von IL-1 β . Wir konnten nachweisen, dass die Hauptproteinkomponente in VLDL Apolipoprotein C3 hierfür verantwortlich ist. ApoC3 führt auf der Oberfläche humaner Monozyten zur Heterotrimerisierung von TLR2 und TLR4 zusammen mit dem Adapterprotein SCIMP. Dies aktiviert die Kinase Syk, führt zum Calcium-Einstrom in die Zelle über den TRPM2 Kanal und induziert die NADPH Oxidase-abhängige Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (ROS). Diese aktivieren Caspase-8, was zur Zusammenlagerung des NLRP3 Inflammasomkomplexes aus seinen Komponenten NLRP3, ASC und Caspase-1 führt. Das aktive NLRP3 Inflammasom prozessiert in der Folge pro-IL-1 β in matures IL-1 β , welches von den Monozyten sezerniert wird und eine systemische proinflammatorische Antwort auslöst. Wir konnten nachweisen, dass dieser Signalweg der alternativen NLRP3 Aktivierung auf das humane System beschränkt ist. Zur Überprüfung der pathophysiologischen Relevanz dieser experimentellen Befunde wurden humanisierte Mäuse generiert. D.h. in immuninkompetente NOD-SCID Mäuse wurden humane CD14+ Monozyten transplantiert. Im murinen Carotis-Schädigungsmodell führte die Injektion von ApoC3 in die humanisierten Mäuse zu einer deutlichen Hemmung der endothelialen Regeneration. Nach unilateraler Ureterligatur förderte ApoC3 die renale Schädigung. ApoC3 Plasmakonzentrationen sind bei Patienten mit chronischer Nierenerkrankung als auch bei Patienten nach akutem Myocardinfarkt im Vergleich zu gesunden Probanden signifikant erhöht und auch mit einer höheren Mortalität assoziiert.

Somit konnte in dieser Arbeit erstmals gezeigt werden, dass Triglycerid-reiche Lipoproteine via ApoC3 das NLRP3 Inflammasom aktivieren. Gleichzeitig konnte die alternative NLRP3 Aktivierung als ein pathophysiologisch relevanter Signalweg aufgeklärt werden. Diese Ergebnisse liefern somit wichtige Erkenntnisse über die Regulation des NLRP3 Inflammasoms

generell als auch über die Mechanismen einer kardioresalen Schädigung. ApoC3 und das NLRP3 Inflammasom stellen somit ein neues therapeutisches Target dar.

1.2 Summary

Sterile inflammation represents a hallmark in the initiation and progression of chronic kidney disease as well as cardiovascular diseases. In our previous, our group could show that the lipoproteins HDL and LDL activate the innate immune system via several distinct pathways such as toll-like receptor-2 (TLR2), which leads to systemic inflammation. The NLRP3 inflammasome represents another important component of the innate immune system by processing pro-IL-1 β into its biologically active form. The aim of the present thesis was to assess the effects of the different lipoprotein classes on the activation of the NLRP3 inflammasome.

In human monocytes, VLDL but not HDL or LDL induced the release of IL-1 β . We found that the major protein constituent of VLDL ApoC3 was responsible for this effect. On the surface of human monocytes, ApoC3 triggers heterotrimerization of TLR2, TLR4, together with the adapter protein SCIMP. This activates Syk kinase, leading to calcium influx via TRPM2, which induces NADPH oxidase-dependent production of reactive oxygen species (ROS). ROS activate caspase-8, which facilitates the assembly of the functional NLRP3 inflammasome complex from its components NLRP3, ASC, and caspase-1. The active NLRP3 inflammasome then processes pro-IL-1 β into mature IL-1 β , which is released from human monocytes and triggers a systemic pro-inflammatory response. We found that this pathway of alternative NLRP3 activation is restricted the human system. To prove the pathophysiological relevance of these experimental findings, humanized mice were generated. Therefore, immune incompetent NOD-SCID mice were transplanted with human CD14+ monocytes. In the murine carotid injury model in humanized mice, injection of ApoC3 substantially suppressed endothelial regeneration. After unilateral ureter ligation, ApoC3 promoted kidney injury. ApoC3 plasma levels were significantly higher in patients after acute myocardial infarction or chronic kidney disease as compared to healthy control subjects. Moreover, higher ApoC3 plasma concentrations were associated with higher mortality during follow-up.

In summary, this work provides first evidence that triglyceride-rich lipoproteins via ApoC3 activate the NLRP3 inflammasome. Moreover, we could describe alternative NLRP3 activation as a pathophysiologically relevant pathway. These results provide novel insights in the regulation of NLRP3 inflammasome in general as well as in the mechanisms of cardiorenal injury. Therefore, ApoC3 and the NLRP3 inflammasome represent a novel therapeutic target.

2 Einleitung

2.1 Atherosklerose

Atherosklerose ist eine progressive Krankheit der großen Arterien, welche in der westlichen Population die Hauptursache für Herzinfarkte und Schlaganfall darstellt (Lusis A.J., 2000). Aufgrund ihrer Entstehung und Symptome wird Atherosklerose als chronisch inflammatorische Erkrankung eingestuft (Ross R., 1999). Charakterisiert ist Atherosklerose durch die fortschreitende Akkumulation von Lipiden und Bindegewebe in der Wand der großen Arterien. Die Ausbildung atherosklerotischer Plaques, Läsionsherde in der Intima von kleinen und mittelgroßen Arterien, stellt dabei die ultimative Folge dar (Manduteanu I. und Simionescu M., 2012). Eine Ruptur von Plaques fördert die Ausbildung eines Thrombus und somit die Entstehung von kardiovaskulären Krankheiten, wie Herzinfarkt und Schlaganfall. Eine schematische Darstellung des Entstehungsprozesses von Atherosklerose ist in **Abb. 1** gezeigt.

Ursache für die Ausbildung der komplexen Erkrankung stellt insbesondere eine qualitative Veränderung der einschichtigen Endothelschicht der innersten arteriellen Oberfläche dar. Vor allem geschuldet durch das Einwirken einer veränderten Plasma-Homöostase, als Konsequenz von Dyslipidämie, Hypertonie und proinflammatorischen Mediatoren. Die veränderte Plasma-Homöostase wirkt sich zunächst auf die Endothelial-Zellen (ECs) aus, welche nach einer Aktivierung vor allem Adhäsionsmoleküle, wie Vascular endothelial cell adhesion molecule (VCAM) und chemotaktischen Faktoren, sowie Wachstumsfaktoren wie Macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) produzieren. Folglich werden innerhalb kürzester Zeit zirkulierende Leukozyten aktiviert (Libby P., 2012; Li H. et al., 1993; Cybulsky M.I. und Gimbrone M., 1991; Lusis A.J., 2000). Die Interaktion der Monocyten (MNCs) und Lymphozyten mit der endothelialen Oberfläche wird vor allem durch Selektine vermittelt, an welche Leukozyten binden. Gleichzeitig verändert sich auf Grund der geänderten Parameter die Permeabilität und Zusammensetzung der extrazellulären Matrix unterhalb der Endothelschicht. Dies begünstigt den Eintritt und Verbleib von Low density lipoprotein (LDL) (Tabas I. et al., 2007).

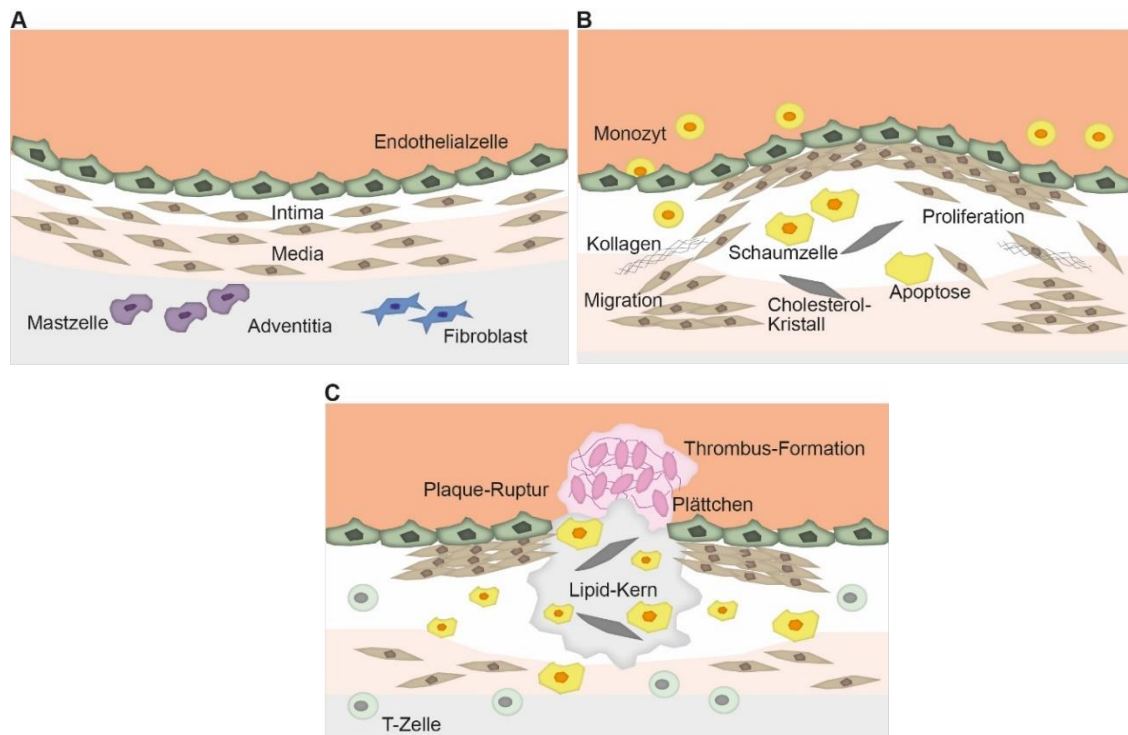


Abb. 1: Die Phasen in der Entstehung von atherosklerotischen Plaques. (A) Das Endothel bildet die äußerste Schicht der Arterienwand über der Intima und verhindert die Adhäsion von Immunzellen. Darunter befinden sich die Media mit den in extrazellulärer Matrix enthaltenen glatten Muskelzellen und die Adventitia. (B) Endotheliale Dysfunktion führt zu einer Rekrutierung von Immunzellen in den subendothelialen Raum. Differenzierte Makrophagen nehmen dort akkumulierte Lipide auf und entwickeln sich zu Schaumzellen. Glatte Muskelzellen aus der Tunica media migrieren in die Tunica intima. Dort proliferieren sie und sezernieren extrazelluläre Matrixmoleküle (Proteoglykane, Kollagen, Elastin). (C) Als Folge apoptotischer glatter Muskelzellen und Makrophagen häufen sich Zelldebris und Lipide unter den intakten glatten Muskelzellen an. Die fibröse Kappe der initialen Plaques bricht als Folge einer Ruptur auf. Der Kontakt von Plasmagerinnungsproteinen und Gewebefaktoren führt zur Bildung eines Thrombus. (eigene Abb., modifiziert nach Libby P. et al., 2011).

Die MNCs wandern in die Subendothelial-Schicht, wo sie zu Makrophagen differenzieren. Nach der Aufnahme von Lipiden und Lipoproteinen entwickeln sie sich zu Schaumzellen (Weber C. et al., 2008). Ein Auslöser für diesen Prozess ist vor allem die biologische Wirkung der Phospholipid-Fraktion nach Akkumulation von oxidiertem LDL (oxLDL) in der *Tunica Intima* (Watson A.D. et al., 1997). Aus der *Tunica Media* migrieren glatte Muskelzellen (SMCs) in die *Tunica Intima*. Die SMCs proliferieren und sezernieren extrazelluläre Matrixmoleküle wie Kollagen, Elastin und Proteoglycan, welche eine fibröse Kappe um die Plaques bilden. Durch Apoptose der umschlossenen Schaumzellen akkumulieren Zelldebris, extrazelluläre Lipide und Cholesterolkristalle im Inneren der Plaques und bilden dort den nekrotischen Kern (Tabas I., 2010). Fibröse Plaques wachsen in ihrer Größe und bewegen sich in Richtung der *Adventitia* wo sie nach physikalischer Ruptur, besonders bei einer dünnen fibröseren Plaque-Kappe, prokoagulatorische Substanzen und extrazelluläre Matrixkomponenten in die Blutbahn freisetzen. Die Interaktion mit Gerinnungsproteinen im Plasma führt zu der Ausbildung eines Thrombus. Die ultimative Folge sind kardiovaskuläre Erkrankungen wie Herzinfarkt und Schlaganfall (Lusis A.J., 2000; Rader D.J. und Daugherty A., 2008).

2.2 Chronische Nierenerkrankung (CKD)

Chronische Nierenerkrankung (CKD) ist die generelle Bezeichnung heterogener Störungen, welche eine irreversible Beeinträchtigung oder Schädigung der Nierenstruktur- und Funktion hervorrufen. Diese sind vor allem eine Abnahme der glomerulären Filtrationsrate (GFR), Hypo- bzw. Isosthenurie, die Retention harnpflichtiger Substanzen und Störungen endokriner Funktionen. Das Krankheitsbild variiert im Hinblick auf die Ursache und Pathologie sowie Schwere und Progressionsrate der Erkrankung. Die Definition der CKD ist basierend auf der vorliegenden Nierenschädigung, d.h. einer erhöhten Albuminurie oder einer erniedrigten Nierenfunktion, gekennzeichnet durch eine verminderte GFR. Diese liegt bei Betroffenen für einen Zeitraum von länger als drei Monate bei unter $<60 \text{ mL/min pro } 1,73 \text{ m}^2$, unabhängig von einer klinischen Diagnose (National Kidney Foundation, 2002; Vassalotti J.A., 2007; Stevens L.A. und Levey A.S., 2009). Die Einteilung der Nierenfunktion nach der eGFR, mit Hilfe der Serumkreatinin-Konzentration, gründet auf ihrer zentralen Rolle in der Pathophysiologie und den mit ihr einhergehenden Komplikationen der Krankheit. Ermittelt wurde sie auf Grundlage der „Kidney Disease Improving Global Outcomes“ (KDIGO) und in die fünf Stadien der CKD (**Tabelle 1**) eingeteilt.

Tabelle 1 Stadien der CKD.

eGFR-Stadium	Definition
G1	Nierenschädigung mit normaler oder erhöhter GFR
G2	Leichte Niereninsuffizienz
G3a	Leicht bis mäßige Niereninsuffizienz
G3b	Mäßig starke Niereninsuffizienz
G4	Schwere Niereninsuffizienz
G5	Nierenversagen

Im Endstadium einer CKD und damit dem Versagen der Niere benötigen Patienten eine Nierenersatztherapie oder eine Nierentransplantation. Zusätzlich können gastrointestinale, zentralnervöse Intoxikationssymptome, kognitive Beeinträchtigungen und verschlechterte physische Funktionen mit dem finalen Stadium einhergehen. Außerdem steigt das Risiko kardiovaskulärer Ereignisse signifikant an (Levey A.S. et al., 2005; Simon J. et al., 2011).

Die Ursache kardiovaskulärer Erkrankungen bei CKD gründet nicht nur auf den klassischen Risikofaktoren wie dem Alter, Nikotinkonsum, Hypercholesterinämie, Fettleibigkeit, Diabetes mellitus und diabetischer Glomerulosklerose sowie hypertensiver Nephrosklerose (Ortiz A. et al., 2014). Neben diesen klassischen Risikofaktoren ist die Inflammation oder der urämische Immundefekt, als nicht-klassischer Risikofaktor, mit einem gesteigerten kardiovaskulären Risiko von CKD-Patienten assoziiert (Pinkau T. et al., 2005; Weiner D.E., 2008).

2.3 Immunsystem

Das Immunsystem befähigt den Menschen, durch Erkennung von körpereigenen und körperfremden Substanzen, Erreger wie Bakterien, Viren, Pilze und andere Pathogene zu erkennen und zu eliminieren (Medzhitov R., 2008; Alberts B. et al., 2011). Die Immunantworten können in die zwei Teilsysteme, die angeborene, unspezifische und die erworbene, spezifische (synonym: adaptiv, induzierte) Abwehr unterteilt werden. Beide setzen sich aus einem zellvermittelten und einem humoralen nicht zellulären Teil zusammen (Romo M. et al., 2016; Alberts B. et al., 2011).

Die spezifische Abwehr gründet auf der Bildung und stetigen Weiterentwicklung von Gedächtniszellen. Im Vergleich zu den Mechanismen der angeborenen Immunantwort sind diese adaptiven Immunantworten hoch spezifisch für den induzierenden Erreger. Außerdem bieten sie einen langanhaltenden Schutz. Adaptive Immunantworten werden von den Lymphozyten, einer Subpopulation der weißen Blutzellen ausgeführt. Nachdem die Lymphozyten mit einem spezifischen Erreger konfrontiert wurden, kann dieser Erreger nach erneutem Kontakt schneller und effektiver erkannt und bekämpft werden. Zwei unterschiedliche Klassen der Lymphozyten, die B-Lymphozyten (B-Zellen) und T-Lymphozyten (T-Zellen) sind hierfür verantwortlich. Diese exprimieren ungleiche Typen von Antigenrezeptoren und erfüllen sehr unterschiedliche Funktionen im Immunsystem. B-Lymphozyten, die sich zu Plasmazellen entwickeln können und Antikörper produzieren, bilden das erworbene humorale Immunsystem (Alberts B. et al., 2011; Murphy K. und Weaver C., 2018). Das zellvermittelte erworbene Immunsystem bildet sich aus den T-Lymphozyten. Diese unterscheidet man wiederum nach den Oberflächenmolekülen, die zu ihrer Differenzierung genutzt werden und als Korezeptoren dienen. Man unterscheidet CD4-positive T-Helfer Zellen, (T_H0 , T_H1 , T_H2 , T_H3 , T_H9 , T_H17 , T_H22 , T_{reg} und T_{FH}), welche vor allem durch die Sekretion von Zytokinen ihre Effektorfunktion auf andere Zellen erfüllen sowie die zytotoxischen CD8-positiven T-Zellen (Alberts B. et al., 2011; Saravia J. et al., 2019). Diese erkennen und lysieren infizierte und maligne körpereigene Zellen. Durch die hochspezifischen T- und B-Zell-Rezeptoren erkennen diese individuell an den Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC, „major histocompatibility-complex“) gebundene Antigene (Murphy K. und Weaver C., 2018).

2.3.1 Angeborenes Immunsystem

Die erste Barriere für körperfremde Substanzen bildet das entwicklungs geschichtlich ältere angeborene, aber unspezifische Immunsystem (Fearon D.T. et al., 1996). Ihre Abwehr besteht aus leukozytären Phagozyten (Makrophagen, Neutrophile und Dendritische Zellen), Mastzellen, Granulozyten (eosinophile, neutrophile und basophile Granulozyten) und Lymphozyten (natürliche Killerzellen, NK). Von apoptotischen Zellen und nekrotischem Gewebe werden außerdem Damage-associated molecular patterns (DAMPs) freigesetzt (Tosi

M.F., 2005; Kurts C. et al., 2013). Diese unspezifisch, konservierten exo- und endogenen Muster werden durch sogenannte Pattern recognition Receptors (PRR) erkannt (Takeuchi O. und Akira S., 2010).

2.4 Pattern recognition Rezeptoren (PRRs)

PRR werden auf einer Vielzahl von Zellen wie Monocyten, Makrophagen, dendritischen Zellen und Granulozyten exprimiert. Unterteilt werden sie nach ihren Funktionen in die vier Unterklassen der Toll-like Rezeptoren (TLRs), C-Typ Lectin-Rezeptor (CLR), Retinoic acid inducible gene (RIG)-I-like Rezeptoren (RLRs) und die Nucleotide-binding oligomerization domain Rezeptoren, (NOD)-like Rezeptoren (NLRs). Durch ihre Aktivierung kommt es zu einer unmittelbaren Zellaktivierung. Dies resultiert in der Aktivierung des Komplementsystems und der damit einhergehenden Opsonierung und Koagulation (Leemans J.C. et al., 2014).

2.5 Toll-like Rezeptoren (TLRs)

Die zuerst entdeckten PRRs stellen die zugleich am besten charakterisierten TLRs dar (Akira S. et al., 2006; Beutler B.A., 2009; Hoffmann H.M., 2003; Medzhitov R., 2007). Sie erkennen einen umfangreichen Bereich von PAMPs. Die Familie der TLRs umfasst im Menschen 10 Mitglieder (TLR 1-10), wohingegen in der Maus 12 Mitglieder (TLR1-9, 11-13) identifiziert wurden (Verstak B. et al., 2007; De Nardo D., 2015). Die TLR-Rezeptoren sind Typ I Membranrezeptoren mit extrazellulären Liganden-Bindedomänen. Sie besitzen ein membranumspannendes Segment und eine zytosolische Toll/IL-1R (TIR)-Domäne (Gay N.J. et al., 2014).

Die Bindung von Liganden erfolgt zum Teil durch die Interaktion mit Co-Rezeptoren, wie beispielsweise CD14 (Cohan J., 2002). Liganden für die Plasmamembranrezeptoren TLR1, TLR2, TLR4 und TLR5 sind vor allem mikrobielle Membrankomponenten, wie Lipopolysaccharid (LPS), bakterielle Lipoproteine oder fungale Saccharide. Die in intrazellulären Kompartimenten exprimierten TLR3, TLR7, TLR8 und TLR9 erkennen hingegen virale und bakterielle DNA und RNA.

Die Aktivierung von TLR-Rezeptoren induziert eine Signaltransduktionskaskade (**Abb. 2**). Dabei wird eine verstärkte Genexpression von proinflammatorischen Zytokinen, Chemokinen, Typ-I-Interferonen (IFNs) oder anti-mikrobiellen Peptiden induziert (Kawai T. und Akira S., 2010).

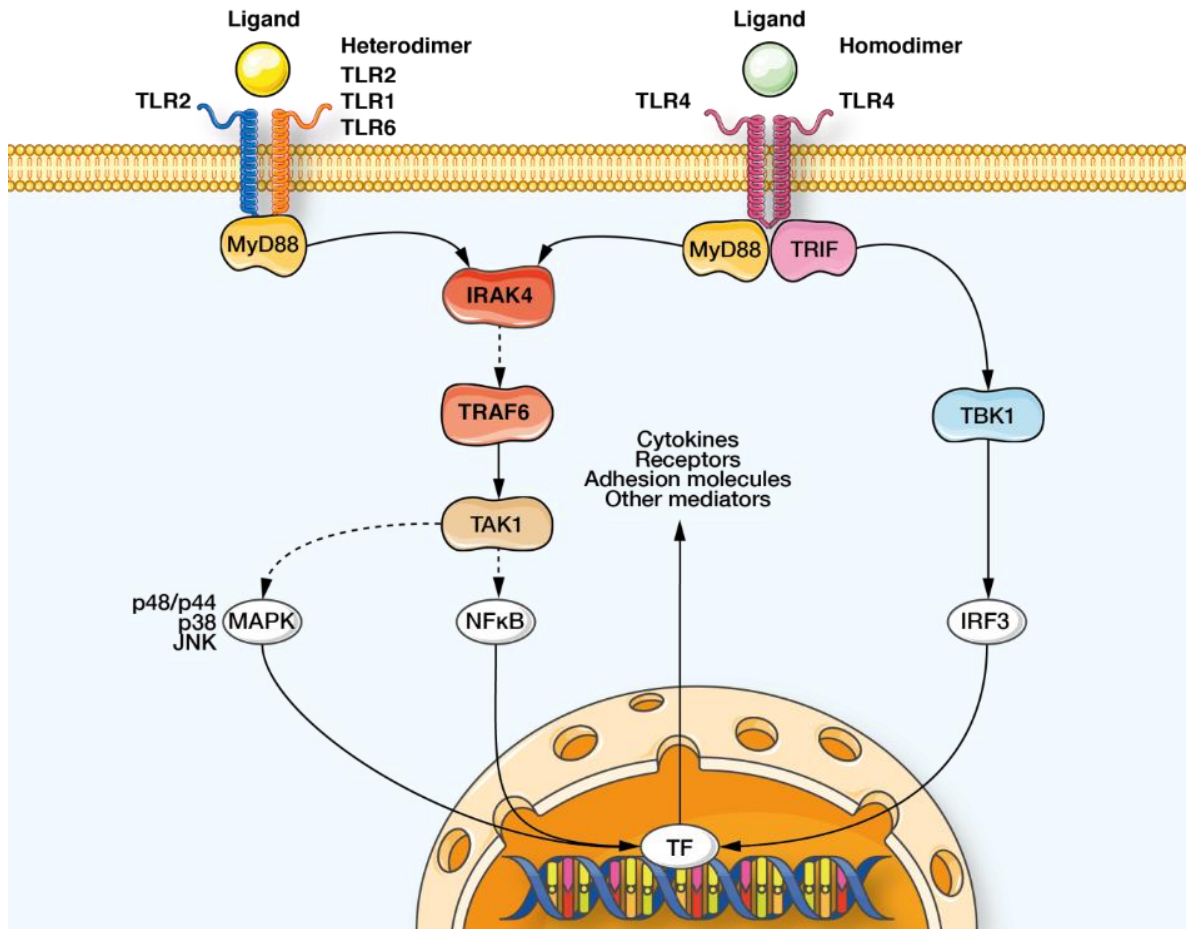


Abb. 2: Zelluläre Signaltransduktionswege von TLR2 und TLR4. Die Aktivierung von TLR2 oder 4 vermittelt die Aktivierung von IRAK4 durch sein Adaptormolekül MyD88. Angegliedert ist die TRAF6- und TAK1-abhängige Aktivierung von NF-κB und MAPK und damit vermittelnde Induktion der Expression von Zytokinen, Rezeptoren, Adhäsionsmolekülen und anderen Mediatoren. TLR4-Aktivierung, führt im Gegensatz zu TLR2, zur zusätzlichen Stimulation des Transkriptionsfaktors IRF3. (Abb. aus Zewinger S. et al., 2015b).

2.6 Klassische Signaltransduktion des TLR4

Der aktivierende Stimulus LPS bindet beispielsweise mit Hilfe des Co-Rezeptors Myeloid differentiation factor 2 (MD2) an die Leucin-reiche Rezeptor-Ektodomäne von TLR4 und induziert eine Dimerisierung der intrazellulären TIR-Domäne (TLR/Interleukin-1-Rezeptor) (Shimazu R. et al., 1999; Ohto U. et al., 2007). TIR Adaptor Proteine haben zusätzlich TIR-Domänen und assoziieren spezifisch mit Rezeptor-Dimeren durch TIR-TIR-Interaktionen. Nach Zusammenschluss von TIR kommt es klassischerweise zur Aktivierung des Myddosome genannten Komplexes. Dieser entsteht durch Interaktion von MyD88 (Myeloid differentiation primary response 88) mit Interleukin (IL)-1 Rezeptor-assoziiierter Kinase 4 (IRAK) und weiterer Rekrutierung von Tollip/IRAK1 Komplexen. (Gay N.J. et al., 2014). Der Adaptor MyD88 dient dabei als Signalüberträger für die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF-κB (Burns K. et al., 1998). Nach Rekrutierung durch MyD88 kommt es zur Phosphorylierung von IRAK1 durch IRAK4. Dies führt zur vorübergehenden Assoziation von Tumor necrosis factor (TNF)

receptor-associated factor 6 (TRAF6) mit IRAK1. Nach Dissoziation vom Rezeptor kommt es zur Rekrutierung des Adaptermoleküls Transforming growth factor beta-activated kinase-1 (TAK1). Aktiviertes TAK1 phosphoryliert die Inhibition des NF κ B- (IKK) Komplexes und Mitogenaktivierten Proteinkinasen (Mitogen-activated protein kinase kinases, MAPKs) 3, 4, 6, welche wiederum Mitglieder der c-Jun N-terminal kinase (JNK) und p38 MAPKK Familie aktivieren. Folglich kommt es zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B und dessen Translokation in den Nukleus, zur anschließenden Modulation der Genexpression (Akira S. und Takeda K., 2004; Kawagoe T. et al., 2008; Ajibade A.A., 2013). Daraus resultiert eine gesteigerte Expression proinflammatorischer Zytokine und/oder Typ I IFN.

2.7 Interleukin IL-1 β (IL-1 β)

Ein wichtiges Interleukin dessen Expression durch vorgeschaltete Signaltransduktionsmechanismen aktiviert wird ist Interleukin-1 β (IL-1 β). Als proinflammatorisches Mitglied der Interleukin-1 Familie ist es bei der Induktion wichtiger inflammatorischer Prozesse beteiligt. Dabei obliegt es IL-1 β bei der Generierung von systemischen und lokalen Antworten mitzuwirken. Bei einer Infektion und Verletzung ist IL-1 β die primäre Ursache für die chronische und akute Inflammation (Dinarello C.A., 1998). Als endogenes Pyrogen ist es außerdem ein Schlüsselprotein für die fiebrige Antwort (Dinarello C.A. et al., 1999). Eine erhöhte IL-1 β -Aktivität wird zudem mit diversen auto-inflammatorischen Krankheiten wie Atherosklerose und Gicht in Zusammenhang gebracht (Gabay C. et al., 2013; Sheedy F.J. und Moore K.J., 2013). Vorrangig wird IL-1 β in aktivierten MNCs, Gewebsmakrophagen und dendritischen Zellen exprimiert. Außerdem produzieren B-Lymphozyten und NK-Zellen IL-1 β (Dinarello C.A., 2009). Zunächst wird IL-1 β in seiner bioinaktiven, zytoplasmatischen Vorläuferform exprimiert (pro IL-1 β , p35), welche anschließend in die mature, aktive Form von IL-1 β (p17) prozessiert wird. Für die Abspaltung der Amino-terminalen Aminosäuren (N-Terminus) ist die Aktivität des IL-1 β -konvertierenden Enzyms Caspase-1 notwendig (Alnemri E.S. et al., 1996; Cerretti D.P. et al., 1992; Thornberry N.A. et al., 1992). Obwohl fast alle PAMPs IL-1 β über TLR-Liganden induzieren, kann IL-1 β seine Expression auch selbst induzieren, wie in MNCs *in vivo* und *in vitro* gezeigt wurde (Dinarello C.A. et al., 1987). IL-1 β interagiert mit dem IL-1 Rezeptor 1 (IL-1R1) und induziert dabei Signalkaskaden, wie die inflammatorischen Kinasen MyD88, ERK, JNK und NF- κ B, was zur Transkription inflammatorischer Gene, wie IL-1 β selbst führt (Dinarello C.A., 2011; Cooney R.N. und Shumate M., 2006). Wichtiger Weise überlappen diese Signalmoleküle auf Grund der übereinstimmenden Toll-like Rezeptor (TIR) Signaldomäne, in IL-1R und TLRs (Akira S. et al., 2001). Während einer Inflammation ist der endogene IL-1 Rezeptor Agonist (IL-1Ra) erhöht, um durch das Binden an den IL-1R1 einer IL-1 Signaltransduktion entgegenzuwirken (Hannum C.H. et al., 1990). Unabhängig vom Stimulus führt eine spezifische Inhibition der

Cystein Protease Caspase-1 in MNCs und Makrophagen zu einer reduzierten Sekretion von prozessiertem IL-1 β . Gleichzeitig akkumuliert Vorläufer IL-1 β innerhalb der Zelle. Der limitierende Schritt des Prozessierens und der Sekretion von IL-1 β gründet dabei in der Aktivierung der intrazellulären NLRs und der Bildung des Inflammasoms (Dinarello C.A., 2009).

2.8 NLRP3 Inflammasom

Bevor IL-1 β durch Caspase-1 von seiner inaktiven Vorläuferform in seine aktive sezernierte Form gespalten wird, muss die inaktive pro-Caspase-1 ebenfalls zur aktiven Caspase-1 konvertiert werden. Verantwortlich für diesen Prozess ist das Inflammasom.

Die NLR-Familie besteht aus den Subfamilien der NODs (NOD1-2, NOD3/NLRC3, NOD4/NLRC5, NOD5/NLRX1, CIITA), den NLRPs (NLRP1-14) und der IPAF Subfamilie, bestehend aus IPAF und (NLRC4) und NAIP. Charakteristischerweise beinhalten NLR-Familienmitglieder eine zentrale Nukleotid-Binde- und Oligomerisierungs- (NACHT) Domäne. Diese wird flankiert durch C-terminale Leucin-reiche Wiederholungen (LRRs) und einer N-terminalen Caspase-Rekrutierungs-Domäne (CARD) oder Pyrin- Domänen (PYD) (Schroder K. und Tschopp J., 2010).

Eine Stimulation von NOD1/2, durch Abbauprodukte bakterieller Zellwände und anschließendem Zusammenschluss zu NOD1/2 Signalosomen, führt zu einer unmittelbaren Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B und anschließender Induktion proinflammatorischer Gene (Kufer et al., 2006).

Die Mitglieder der NLRP-Subfamilie hingegen können nach einer Aktivierung durch PAMPs und DAMPs einen zytosolischen Proteinkomplex bilden. Dieser als Inflammasom bezeichnete Komplex (**Abb. 3**) entsteht nach einem Zusammenschluss mit dem PYD-CARD Adapter-Protein ASC und Caspase-1 (Martinon F. et al., 2002; Kayagaki N. et al., 2011).

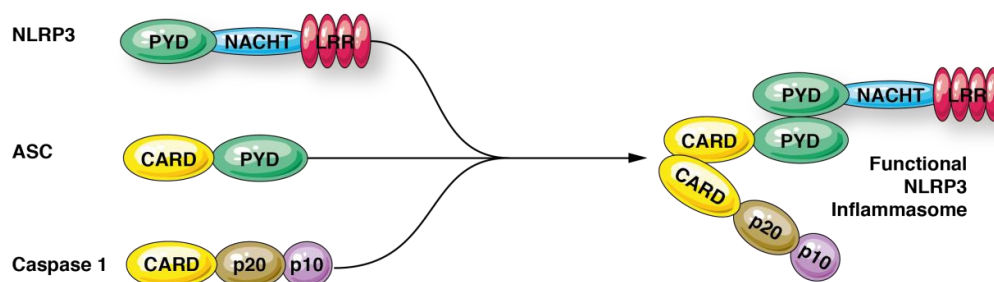


Abb. 3: Das funktionelle NLRP3 Inflammasom. NLRP3, sein Adapterprotein ASC und Caspase-1 schließen sich zusammen und bilden das funktionelle NLRP3-Inflammasom. NLRP3 und ASC interagieren über die PYD-Domänen. Außerdem kommt es zu einer CARD-CARD-Interaktion zwischen ASC und Caspase-1. (Abb. aus Zewinger S. et al., 2015b).

Das bislang am besten untersuchte Inflammasom ist das ursprünglich als Cryopyrin bezeichnete NLRP3 Inflammasom (Hoffman H.M. et al., 2001; Martinon F. und Tschopp J., 2007). NLRP3 setzt sich zusammen aus dem NLRP3-Gerüst (Scaffold), ASC- (PYCARD)

Adapter und Caspase-1. Neben strukturell diversen DAMPs und PAMPs wird NLRP3 zusätzlich von einer Reihe wirtseigener Moleküle aktiviert, die mit zellulärer Schädigung in Zusammenhang gebracht werden. (**Tabelle 2**) Neben IL-1 β , spaltet Caspase-1 nach der Rekrutierung durch NLRP3 auch die pro-Formen der inflammatorischen Zytokine IL-18 und IL-33. In ihrer bioaktiven Form werden diese nach NLRP3-Aktivierung ebenfalls sezerniert (Dinarello C.A., 2009).

Tabelle 2 Aktivatoren des NLRP3 Inflammasoms.

Aktivatoren des NLRP3-Inflammasoms (CIAS1, CLR1.1, PYPAF1)	Publikation
PAMPs/Pathogene	
Sendai virus	(Kanneganti et al., 2006a)
Influenza	(Allen et al., 2009; Kanneganti et al., 2006a)
Adenovirus	(Muruve et al., 2008)
Encephalomyocarditis Virus	(Poeck et al., 2010)
Candida albicans	(Gross et al., 2009)
Saccharomyces cerevisiae	(Gross et al., 2009)
Staphylococcus aureus	(Mariathasan et al., 2006)
Listeria monocytogenes	(Mariathasan et al., 2006; Warren et al., 2008)
Neisseria gonorrhoeae	(Duncan et al., 2009)
Bakterielle Poren-bildende Toxine	(Craven et al., 2009; Gurcel et al., 2006; Mariathasan et al., 2006; Walev et al., 1995)
DAMPs	
Extrazelluläres ATP	(Mariathasan et al., 2006)
Lösliche Hyaluronsäure	(Yamasaki et al., 2009)
Glukose	(Zhou et al., 2010)
Monosodium Urat (MSU)	(Martinon et al., 2006)
Amyloid- β	(Halle et al., 2008)
Hautreizstoffe; Trinitrophenylchlorid, Trinitrochlorbenzol, 1-Fluor-2,4-dinitrobenzol	(Sutterwala et al., 2006; Watanabe et al., 2007)
Imidazoquinolin Komponenten (R837, R848)	(Kanneganti et al., 2006b)
Silica	(Cassel et al., 2008; Dostert et al., 2008; Hornung et al., 2008)
Asbest	(Cassel et al., 2008; Dostert et al., 2008)
Alum	(Eisenbarth et al., 2008; Franchi and Núñez, 2008; Hornung et al., 2008; Kool et al., 2008; Li et al., 2008)
Uromodulin	Anders H.J. und Schaefer L., (2014)
Serum Amyloid A	Zewinger S. et al., (2015)
Cholesterol Kristalle	Duewell P. et al., (2010)

(Eigene Abb. modifiziert nach Schroder und Tschopp, 2010)

2.9 Aktivierung des NLRP3 Inflammasoms

Zur NLRP3-Aktivierung sind zwei unabhängige Signale notwendig. Signal 1, in Form von TLR-Liganden, führt zur NF- κ B vermittelnden Expression der Zytokin-pro-Formen sowie NLRP3 Inflammasom-Komponenten NLRP3, dem Adapter ASC und Caspase-1 (Bauernfeind F.G. et al., 2009; Man S.M. und Kanneganti T.D., 2015). Anschließend induziert ein Signal 2, bereitgestellt durch ein DAMP oder PAMP, den Zusammenschluss des NLRP3-Proteinkomplexes. Caspase-1 wird durch NLRP3 rekrutiert und vermittelt die Spaltung und

anschließende Sezernierung der Zytokine IL-1 β , IL-18 und IL-33 (Lamkanfi M. und Dixit V.M., 2012).

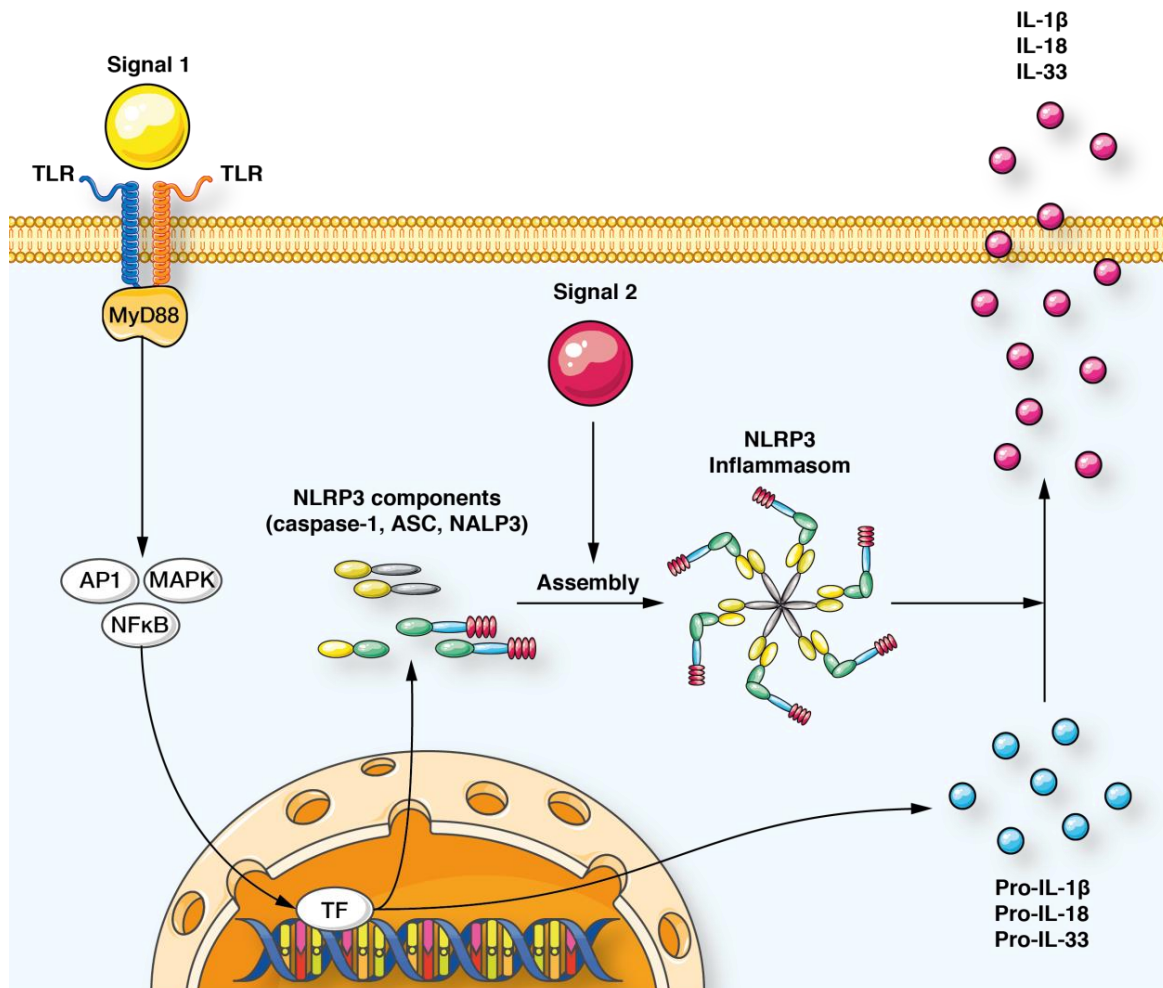


Abb. 4: Aktivierung des NLRP3 Inflammasoms. Signal 1 ist verantwortlich für die Aktivierung des TLR und der damit einhergehenden Expression der NLRP3 Komponenten (NLRP3, ASC, Caspase-1). Außerdem kommt es zur Expression der Zytokin Pro-Formen von IL-1 β , IL-18 und IL-33. Ein Signal 2 führt zur Zusammenlagerung des funktionellen NLRP3-Inflammasom Komplexes. Diese Komplexbildung ermöglicht die Caspase-1 abhängige Spaltung der Zytokin-Pro-Formen in ihre biologisch aktiven Formen und die anschließende Sezernierung. (Abb. aus Zewinger S. et al., 2015b).

Mittlerweile sind fünf unterschiedliche Mechanismen der Aktivierung von NLRP3 beschrieben: K⁺-Efflux (Muñoz-Planillo R. et al., 2013), die Generierung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) (Zhou R. et al., 2011), phagolysosomale Destabilisierung und zytosolische Freisetzung von Cathepsinen nach Verdau großer, partikulärer Agonisten (Hornung V. et al., 2008). Außerdem sind die mitochondriale Dysfunktion (Misawa T. et al., 2013; Subramanian N. et al., 2013; Zhou R. et al., 2011), sowie die Freisetzung mitochondrialer DNA oder des mitochondrialen Phospholipids Cardiolipin bekannt (Iyer S.S. et al., 2013; Nakahira K. et al., 2011; Shimada K. et al., 2012).

2.10 Aktivierung des angeborenen Immunsystems durch Lipoproteine

Epidemiologische Studien konnten belegen, dass eine inverse Korrelation zwischen HDL-Level und dem Auftreten von koronaren Herzkrankheiten vorliegt (Miller N.E., 1977; Gordon D.J. und Rifkind B.M., 1989). Dieser anti-atherogene Effekt ist der Rolle von HDL in dem reversen Cholesterol-Transport von peripheren Geweben zur Leber und der anschließenden biliären Sekretion geschuldet (Glomset J.A., 1968). LDL hingegen ist für seine pro-atherogene Wirkung bekannt. Speer T. und Kollegen konnten in einer 2013 veröffentlichten Studie zeigen, dass das normalerweise vasoprotektive HDL bei CKD Patienten, durch die Akkumulation von SMDA im HDL, reverse Eigenschaften eines schädlichen Partikels aufweist. HDL von CKD Patienten erzeugte daher einen erhöhten Blutdruck im Mausmodell. Induziert wird die physiologisch gefäßschädigende Wirkung über den Mechanismus der TLR2-Aktivierung. Zudem konnte eine TLR-vermittelte Aktivierung nicht-kanonischer Signaltransduktion durch die Induktion der NADPH-Oxidase (NOX)-abhängigen Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) nachgewiesen werden (Speer T. et al., 2013). In einer weiteren Veröffentlichung konnten Duewell et al. Cholesterol-Kristalle als Induktoren der NLRP3 Inflammasom-Aktivierung identifizieren (Duewell P. et al., 2010). Ebenso konnten das Atherosklerose-induzierende oxidiertes LDL, als Stimulus für die NLRP3 vermittelnde IL-1 β Sekretion identifiziert werden. (Duewell P. et al., 2010; Jiang Y., 2012)

2.11 Zielsetzung der Arbeit

Ziel dieser Arbeit ist es nun zu untersuchen, wie Lipoproteine und deren Bestandteile die Aktivierung des NLRP3 Inflammasoms in humanen Monocyten regulieren, welche molekularen Mechanismen dem zugrunde liegen und inwieweit dies von Relevanz bei kardio-renalen Erkrankungen ist.

3 Material

3.1 Chemikalien

Alle in der Studie verwendeten Chemikalien und Kits, sowie die zugehörigen Firmen sind in Tabelle 3 aufgeführt.

Tabelle 3 Chemikalienliste

Name	Firma
Agarose	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Seelze, D
Ammoniumchlorid	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D
Ammoniumpersulfat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Seelze, D
Azeton	Fisher Chemicals, Schwerte, D
Bovine serum albumin (BSA)	PAA Laboratories, Cölbe, D
Beta-Mercaptoethanol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D
Bradford-Reagenz (Protein Assay Dye Reagent Concentrate)	BioRad, München, D
Bromphenolblau	Serva, D
BS3 (bis (sulfosuccinimidyl) suberate)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
CD14 MicroBeads, human	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, D
Coomassie Brilliant Blue G-250	BioRad, München, D
Chloroform	Fluka Chemie AG, Buchs, D
Dako Fluorescent mounting medium	Dako North America Inc., Carpinteria, USA Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Seelze, D
Deferoxamin	Noxygen Science Transfer & Diagnostics GmbH, Elzach, D
Diethyldithiocarbamat (DETC)	Noxygen Science Transfer & Diagnostics GmbH, Elzach, D
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Seelze, D
Dithiothreitol (DTT)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Seelze, D
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Seelze, D
Entellan	Merck, Darmstadt, D
Eosinlösung	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D
Ethanol	Apotheker des Universitätsklinikums des Saarlandes, Homburg/Saar, D
FBS (Bovine fetal serum)	Gibco /Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
Glycin	Fisher Scientific, Schwerte, D
Halt 100 x Protease/Phosphatase-Inhibitor	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
HEPES	Gibco /Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
Hämalaun, sauer	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D
IGEPAL CA-630	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Seelze, D
Kaliumchlorid	Fluka Chemie AG, Buchs, D
Kaliumcyanat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Seelze, D
Krebs-Hepes-Puffer	Noxygen Science Transfer & Diagnostics GmbH, Elzach, D
LAL assay	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Pierce™ LDH Cytotoxicity Assay Kit	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
L-Glutamin	Gibco /Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
LS magnetic separation columns	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, D
Lymphocyte Separation Medium 1077	PromoCell bioscience alive GmbH, Heidelberg, D
Lysepuffer FACS BD Pharm Lyse	BD (Becton, Dickinson Company), Franklin Lakes, NJ, USA
Marker (PageRuler Plus Prestained Protein Ladder, 10-250 kDa)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Methanol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D
Natriumazid	Merck Millipore GmbH, Schwalbach, D
Natriumbicarbonat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Seelze, D

Natriumchlorid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Seelze, D
Natriumdihydrogenphosphat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Seelze, D
Odyssey Blocking buffer	Licor Biosciences, Lincoln, NE, USA
Paraformaldehyd	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Seelze, D
Phosphate buffered saline (PBS)	Gibco /Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
Penicillin/Streptomycin (Pen Strep)	Gibco /Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
PKH67 green fluorescent Cell linker kit	Sigma-Aldrich, Chemie GmbH, Seelze, D
Schwefelsäure	Fisher Scientific, Schwerte, D
SDS Pellets (Natriumlaurylsulfat)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D
Temed	AppliChem GmbH, Darmstadt, D
Trichloressigsäure (TCA)	Acros organics, part of Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Tris Base	Fisher Scientific, Schwerte, D
Trypanblau	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Seelze, D
Tween-20	AppliChem GmbH, Darmstadt, D
Wasserfreies Natriumacetat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Seelze, D
Xylol	Fischar Otto GmbH & Co. KG, D

Tabelle 4 Materialliste

Name	Firma
Amicon Ultra-Zentrifugen Filtereinheiten	Merck Millipore GmbH, Schwalbach, D
Amicon Ultra 0,5 mL Zentrifugenfiltermembran 3 kDa	Merck Millipore GmbH, Schwalbach, D
C-Chip Einweg Hemozytometer	NanoEnTek USA Inc., Pleasanton, CA, USA
Lab Tek Chamber slide	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
Ligandenplatten (Mikrotestplatte)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, D
FACS-Röhrchen	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, D
Filterpapier	VWR, Radnor, PA, USA
ELISA-Platten, Micolon, F-Bottom, high binding, half-area	Greiner Bio-One International GmbH Frickenhausen, D
Kapillare für ESR-Messung (for temperature and gas controller Bio-II and Bio-III)	Noxygen Science Transfer und Diagnostik GmbH, Elzach, D
Membranfilter 0,2 µm	VWR, Radnor, PA, USA
Nitocellulosemembran 0,2 µm 300 mm x 4 m	GE Healthcare life science, Little Chalfont, UK
Quick Seal Ultrazentrifugationsröhrchen Polypropylene, 16 x 76 mm	Beckmann Coulter Inc., Brea, CA; USA
Reaktionsröhrchen	Greiner Bio-One International GmbH, Frickenhausen, D
Stabpipetten	Greiner Bio-One International GmbH, Frickenhausen, D
Reagiergefäße	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, D
Parafilm	Bemis Company, USA
Sephadex G-200	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Seelze, D
Sterile Kanülen	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, D
Spritzen 10 mL	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, D
Spritzenfilter Filtropur S 0,2 µm	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, D
Zellkulturplatten	Techno Plastic Products AG, Trasadingen, CHE
Zellkulturplatten, unbeschichtet	Greiner Bio-One International GmbH Frickenhausen, D
Zellkulturplatten, schwarz/transparent	Greiner Bio-One International GmbH Frickenhausen, D
Zellsieb 70µm	Corning, Inc. über Fisher Scientific

Tabelle 5 Geräteliste

Name	Firma
Autoklav 2540 EL	Biomedis Vertriebsgesellschaft mbH, Gießen, D
BioRad Mini PROTEAN Tetra Cell Kammer	BioRad, München, D
BioRad Power Pac Basic Netzgerät	BioRad, München, D
Biozero BZ Viewer Software	Keyence Deutschland GmbH, Neu-Isenburg, D
Durchflusszytometer FACSCanto II	BD (Becton, Dickinson Company), Franklin Lakes, NJ, USA
Dichtemessgerät Densitymeter DMA500	Anton Paar ProveTec GmbH, Blankenfelde-Mahlow, D
Eismaschine AF80	Scotsman Ice Systems, Vernon Hills, IL
ESR eScan	Bruker Corporation, Billerica, MA, USA
Fluoreszenzmikroskop Biozero BZ-8000	Keyence Deutschland GmbH, Neu-Isenburg, D
Feinwaage ABJ	KERN & SOHN GmbH, Balingen, D
Inkubator	Binder GmbH, Tuttlingen, D
Heizblock/Theromixer comfort	Eppendorf AG, Hamburg, D
Inverses Lichtmikroskop	Nikon Corporation, Tokio, JPN
Magnetrührer IKAMAG REO Drehzahl electronic	KA-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, D
Mikrotitrierplatten-Photometer Sunrise	Tecan Trading AG, CH
pH-Meter Seven Compact	Mettler-Toledo GmbH, Gießen, D
Präzisionswaage PCB	KERN & SOHN GmbH, Balingen, D
Schüttler	neoLab Migge GmbH, Heidelberg, D
Sicherheitswerkbank Airstream Esco class II BSC	Biomedis Vertriebsgesellschaft GmbH, Gießen, D
Semi-Dry-Blotkammer TE77XP	Hoefler, Inc., Holliston, MA, USA
Tischzentrifuge 5424 R	Eppendorf AG, Hamburg, D
Vortex MS1 Minishaker (Rotationsschüttler)	IKA-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, D
Ultraschallbad	Blackstone-NEY Ultrasonics Jamestown, NY, USA
Ultrazentrifuge Optima XPN 90K	Beckmann Coulter Inc., Brea, CA; USA
Verschweisgerät Cordless Tube Topper	Beckmann Coulter Inc., Brea, CA; USA
Wasserbad	Köttermann GmbH & Co. KG Labortechnik, Ueze, D
Westernblot-Fluoreszenzscanner Odyssey	Licor Biosciences, Lincoln, NE, USA
Zentrifuge Megafuge 1.0 R	Heraeus Holding GmbH, Hanau, D
Zentrifuge 5804 R	Eppendorf AG, Hamburg, D

3.2 Verwendete Medien und Puffer

Tabelle 6 verwendete Medien

Medium	Zusätze	Firma
DMEM high glucose [4.5 g/l]	L-Glutamine 10 % FBS 1 % Pen Strep	Gibco /Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
DMEM high glucose [4.5 g/l]	L-Glutamine 10 % FBS 0,5 % Pen Strep 100 µg/mL Normocin, 2 mM L-Glutamin	Gibco /Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
RPMI	Pyruvat 10 % FBS 1 % Pen Strep	Gibco /Life Technologies, Carlsbad, CA, USA

RPMI GlutaMax	Pyruvat 10 % FBS 1 % Pen Strep 10 mM HEPES	Gibco /Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
---------------	---	--

3.3 Primäre Antikörper

Die Antikörperlösungen wurden in einer 1:1 Mischung aus Odyssey Reagenz (Licor) und PBS mit 0,01 % Tween und 0,01 % Natriumazid angesetzt.

Tabelle 7 verwendete Primärantikörper

Immunogen	Kat.Nr.	Bezug	Sekundär-antikörper	Verdünnung
ASC (N-15) -R:	sc-22514-R	Santa Cruz Biotechnology	Anti-Rabbit	1:1000
ApoC3	ab 108205	abcam	Anti-Rabbit	1:1000
β-Aktin (c4)	sc-47778	Cell Signaling	Anti-Mouse	1:1000
Caspase-1 (A19)	sc-622	Santa Cruz Biotechnology	Anti-Rabbit	1:1000
cleaved Caspase-1	D57A2	Cell Signaling	Anti-Rabbit	1:1000
Caspase-1 (p20) mAb	AG-20B-0048	Adipogen	Anti-Mouse	1:1000
anti Caspase-1 n-terminal	ab189796	Abcam	Anti-Rabbit	1:1000
Caspase-8	ALX-804-242-C100	Enzo Life Sciences	Anti-Mouse	1:1000
IL-1β (3A6) Mouse mAb	12703	Cell Signaling	Anti-Rabbit	1:1000
IL-1β (3A6) Mouse mAb	AF-401-NA	R&D	Anti-Goat	1:1000
ERK p-p44/42	4370S	Cell Signaling	Anti-Rabbit	1:1000
ERK p44/42 (Total)	4695	Cell Signaling	Anti-Rabbit	1:1000
Lyn	2796	Cell Signaling	Anti-Rabbit	1:1000
NLRP3	D2P5E	Cell Signaling	Anti-Rabbit	1:500
p-SAPK/JNK (Thr183/Tyr185)	9251S	Cell Signaling	Anti-Rabbit	1:1000
SAPK/JNK (Total)	9258	Cell Signaling	Anti-Rabbit	1:1000
SCIMP	HPA006117-100UL	Sigma-Aldrich	Anti-Rabbit	1:1000
p-p38 MAPK (Thr180/Tyr182)	9215S	Cell Signaling	Anti-Rabbit	1:1000

p38 MAPK (Total)	9212	Cell Signaling	Anti-Rabbit	1:1000
p-Syk (Tyr525/526)	C87C1	Cell Signaling	Anti-Rabbit	1:1000
Syk (Total)	2712	Cell Signaling	Anti-Rabbit	1:1000
TLR2	sc-10739	Santa Cruz Biotechnology	Anti-Rabbit	1:1000
TLR4	AF 1487	R&D	Anti-Goat	1:1000
TXNIP	14715	Cell Signaling	Anti-Rabbit	1:1000

3.4 Sekundäre Antikörper und Immundetektionsreagenzien

Für den Western Blot wurden die fluoreszierenden Sekundärantikörper IRDye 680RD für den 700 nm Kanal des Odyssey Detektionssystem verwendet. Diese Antikörper sind kombinierbar mit den IRDye 800CW Sekundärantikörpern des 800 nm Kanals. Zur Verdünnung wurde jeweils die empfohlene Konzentration von 1:10.000 eingesetzt. Die folgenden Sekundärantikörper wurden eingesetzt:

IRDye 680RD Goat anti-Mouse IgG (H+L) (Licor, #P/N 926-32280)

IRDye 800CW Donkey anti-Goat IgG (H+L) (Licor, #P/N 926-32214)

IRDye 800CW Donkey anti-Rabbit (H+L) (Licor, #P/N 926-32213)

Goat-anti-rabbit IgG Alexa Fluor 488 (Invitrogen, #A-11036)

3.5 Verwendete FACS („fluorescence-activated cell sorting“) -Antikörper

CD14-PerCP/Cy5.5 (Biolegend, # 301823)

PE anti-mouse Ly-6G Antibody (Biolegend, # 127608)

APC anti-mouse Ly-6C Antibody (Biolegend, # 128016)

3.6 Verwendete ELISA Kits

Tabelle 8 verwendete ELISA Kits

Immunogen	Spezies	Kat. Nr.	Bezug
IL-1 β /IL-1F2	human	DY201-05	R&D Systems, Inc., Minneapolis, MN, USA
IL-6	human	DY206-05	R&D Systems, Inc., Minneapolis, MN, USA
IL-1 β /IL-1F2	mouse	DY401	R&D Systems, Inc., Minneapolis, MN, USA
IL-6	mouse	DY406-05	R&D Systems, Inc., Minneapolis, MN, USA

TNF- α	human	DY210	R&D Systems, Inc., Minneapolis, MN, USA
---------------	-------	-------	---

Reagenzien Verdüner: (R&D Systems, Inc., Minneapolis, MN, USA #DY995)

Substrat Lösung: 1:1 Mischung von Farbreagenz A (H₂O₂) und Farbreagenz B (Tetramethylbenzidine) (R&D Systems, Inc., Minneapolis, MN, USA # DY999)

Stopplösung: 2 N H₂SO₄

3.7 Verwendete Stimulanzen und Blocker

Tabelle 9 verwendete Stimulanzen

Substanz	Eingesetzte Konzentration	Kat. Nr.	Bezug
ApoC3	50 μ g/mL	33P-102	Academy Biomedical
ApoC2	50 μ g/mL	A7910-50UG	Sigma-Aldrich
ApoE	50 μ g/mL	A3234-100UG	Sigma-Aldrich
ATP	5 mM	t1rl-atp	Invivogen
LPS Ultrapure	10 ng/mL	th1rl-3pelps	Invivogen
M-CSF	50 ng/mL	14-8983	eBioscience
Nigericin	2 mg/mL (2.68 mM)	t1rl-nig	Invivogen
Pam3CSK4	300 ng/mL	t1rl-pms	Invivogen
PMA	0,5 mM	BML-PE160-0001	Enzo Life Sciences

Tabelle 10 Verwendete Blocking Antikörper oder pharmakologische Inhibitoren

Substanz	Eingesetzte Konzentration	Kat. Nr.	Bezug
Anti-hCD14-IgG	1:1000	MAB3882	R&D Systems
Anti-TLR2-IgA	40 μ g/mL	maba2-h1tlr2	Invivogen
Anti-TLR4-IgG	20 μ g/mL	mabg-h1tlr4	Invivogen
BAPTA-AM	10 μ M	BCBQ1114V	Sigma-Aldrich
Bay11-7082	10 μ M	11B14	Invivogen
BTP-2	30 nM	223499-30-7	Sigma-Aldrich

EGTA	2 mM	E4378-10G	Sigma-Aldrich
GSK963	3 μ M	AOB9775	AOBIOUS
GSK872	3 μ M	GSK-872	BioCat
Flufenaminsäure	100 μ M	F9005	Sigma-Aldrich
DPI	10 μ M	BML-CN240-0010	Enzo Life Sciences
MitoTEMPO	200 μ M	SML0737	Sigma-Aldrich
NAC	20 mM	A7250	Sigma-Aldrich
R406	5 μ M	inh-r406	Invivogen
Rottlerin	10 μ M	ab120377	Abcam Biochemicals
TRIF inhibitory peptide	25 μ M	tlrl-pitrif	Invivogen
U-73122	3 μ M	U6756	Sigma-Aldrich
VAS-2870	5 μ M	722456-31-7	Merck Millipore
Z-IETD-FMK	5 μ M	FMK007	R&D Systems
Z-LEVD-FMK	10 μ M/20 μ M	ALX-260-142	Enzo Life Sciences
Z-YVAD	20 μ M	ALX-260-074-M001	Enzo Life Sciences

3.8 Lösungen

Als Lösungsmittel wurde, falls nicht abweichend angegeben $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$ oder $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$ verwendet.

Ammoniumchloridlösung Zellkultur

0,155 M NH_4Cl	MW 53,49	4,15 g/500 mL
0,01 M KHCO_3	MW 100,12	0,5006 g/500 mL
0,1 mM EDTA 0,5 M	100 μ L/500 mL	
pH 7,4		

Antikörperlösungen Western Blot

Odyssey Blockier-Puffer (Licor Biosciences, Lincoln, NE, USA)
 1:1 verdünnt mit PBS
 0,01 % Tween-20 und 0,01 % Natriumazid

Blocker Western Blot

Odyssey Blockier-Puffer (Licor Biosciences, Lincoln, NE, USA)

1:1 verdünnt mit PBS

Dialysepuffer zur HDL/LDL-Isolation

438,3 g NaCl

5,6 g EDTA

in 5 L H₂O_{bidest.} lösen

pH 7,4 einstellen

steril filtrieren

Dichtelösungen zur HDL-/LDL-Bestimmung

KBr-Lösung 1,006

4,37 g KBr und 500 mL H₂O_{dest.}

KBr-Lösung 1,063

47,13 g KBr und 500 mL H₂O_{dest.}

KBr-Lösung 1,210

168,68 g KBr und 500 mL H₂O_{dest.}

EDTA-Lösung Zellkultur

186,1 g Disodiummethylenediaminetetracetat 2H₂O (EDTA)

800 mL H₂O_{dest.}

mit NaOH auf pH 8,0 einstellen

EDTA löst sich ab pH 8,0

in 1 L H₂O_{dest.}

Autoklavieren der Lösung

Aufbewahren bei RT

Evans-Blue-Lösung (5 %)

0,15 g Evans-Blue

3 mL 0,9 % NaCl-Lösung lösen

Steril filtrieren

FACS-Puffer

500 mL PBS

1 % FBS

0,01 % Natriumazid

Hämatoxylin/Eosin-Lösung

Hämalaunlösung gebrauchsfertig (s.o)

Eosinlösung: 200ml plus 2-3 Tropfen Eisessig

Krebs-Hepes-Puffer (Noxygen 20 mM)

in H₂O_{bidest.} lösen
pH 7,4
steril filtrieren

Laufpuffer Western Blot

25 mM Tris → 3,028 g/L
192 mM Glycin → 14,41 g/L
0,1 % SDS, pH 8,3 → 1 g/L
in H₂O_{bidest.} lösen

Lämmli-Puffer (10 x)

5 mL 1 M Tris, pH 6,8
2 mL Glycerol
20 mg Bromphenolblau
2 g SDS
1 mL β-Mercaptoethanol
auf 10 mL mit H₂O_{dest.} auffüllen
ü/N rühren lassen

Lämmli-Puffer Überstände (1 x)

6,25 mL Tris HCl (1 M, pH 6,8)
25 mL Glycerol
2 g SDS
10 mg Bromphenolblau
5 mL beta-Mercaptoethanol
auf 100 mL mit H₂O_{bidest.} auffüllen

Lysepuffer

5 mL 1 M Tris, pH 8,0
3 mL 5 M NaCl
200 µL 0,5 M EDTA, pH 8,0
100 µL 1 M DTT
5 mL 10 % IGEPAL CA-630
83,5 mL H₂O_{dest.}
vor Verwendung 1:1000 Halt 100 x Protease/Phosphatase-Inhibitor zugeben

Lysepuffer Immunoprecipitation

20 mM Tris (pH 7,5)
150 mM NaCl
1 mM EDTA
1 mM EGTA
1 % Triton X-100 x Protease-/Phosphatase Inhibitor

MACS-Puffer (steril) PBS pH 7,2

0,5 % BSA

2 mM EDTA

→ vor dem Experiment im Ultraschallbad entgasen

Paraformaldehyd (PFA) Stammlösung 8 %

8 % Paraformaldehyd (PFA)

in $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$ lösen und auf 65 °C erwärmen

1 N NaOH hinzugeben, bis Lösung klar ist, dann abkühlen
für Gebrauchslösung mit 1:2 Phosphatpuffer verdünnen

Paraformaldehyd (PFA) 4 %

4 % (w/v) PFA

in PBS (0,2 M)

Natriumbicarbonat Puffer

Stock 1: 0,05 M NaHCO_3 → 2,2 g in 500 mL

Stock 2: 0,1 M NaOH → 2 g in 500 mL

pH 9,6

50 mL Stock 1 plus 2,5 mL Stock 2 auf 50 mL $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$

Transferpuffer Western Blot (10 x)

390 mM Glycine → 29,27 g

480 mM Tris → 58,15 g

0,037 % SDS → 3,7 g

auf 1 L $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$ auffüllen

Lagerung bei 4 °C

Transferpuffer Gebrauchslösung Western Blot (1 x)

100 mL 10 x Transferpuffer

200 mL Ethanol (20 %)

auf 1 L $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$ auffüllen

Lagerung bei 4 °C, max 4 x verwenden

Waschpuffer für Westernblot

PBS

0,05 % Tween-20

3.9 Versuchstiere und Tierhaltung

3.9.1 Tierhaltung

Die Mäuse wurden in der Tierzucht Homburg, am Institut für Experimentelle Chirurgie der Universität des Saarlandes gezüchtet und aufgezogen. Die Tiere wurden dabei unter einem 12-stündigen Tag- und Nachtzyklus bei Wasser und Futter *ad libitum* in individuellen Käfigen gehalten. Alle Tierexperimente wurden durch die zuständige Landesbehörde genehmigt.

3.9.2 Verwendete Knockout-Mäuse

Die für die Analysen verwendeten IL-1 β -Knockout-Mäuse (KO) wurden von Prof. Dr. M. Kopf, ETH Zürich (Schweiz) bezogen. Ursprung: Iwakura I., 1998 (PMID: 9565638). Der genetische Hintergrund der KO-Mäuse entstammt C57BL/6J. Die Caspase-1- (B6N.129S2-Casp1tm1Flv/J), NLRP3- (B6.129S6-Nlrp3tm1Bhk/J) und NOD.CB17/AlhrJ-Prkdc^{scid} (NOD-SCID) defizienten Mäuse, sowie verwendete Kontrolltiere C57Bl/6J wurden von Jackson Laboratory bezogen.

4 Methoden

4.1 Isolation peripherer monozytärer Blutzellen (PBMCs)

Zur Isolation von PBMCs wurden zunächst zwei EDTA-versetzte Blutröhrchen (9 mL) in ein 50 mL Reaktionsröhrchen überführt. Anschließend wurden die beiden Blutröhrchen mit jeweils 9 mL sterilem PBS mit 0,5 mM EDTA, pH 8,0 (ohne Ca^{2+} und Mg^{2+}) gespült und ebenfalls in das 50 mL Reaktionsröhrchen überführt. Das Gesamtvolumen von 36 mL Blut/PBS/EDTA-Gemisch wurde im Folgenden in ein mit 15 mL Separationsmedium befülltes 50 mL Reaktionsröhrchen überführt. Dabei wurde das Separationsmedium mit dem Blut/PBS/EDTA-Gemisch vorsichtig überschichtet. Die Erhaltung der Phasen war dabei notwendig, um eine ausreichende Separation der enthaltenen Blutzellen nach ihrer Dichte zu gewährleisten. Das Blut/PBS/EDTA-Gemisch wurde über 30 min bei 400 x g, ohne Bremse, bei Raumtemperatur (RT) zentrifugiert. Dabei wurden folgende Phasen erhalten:

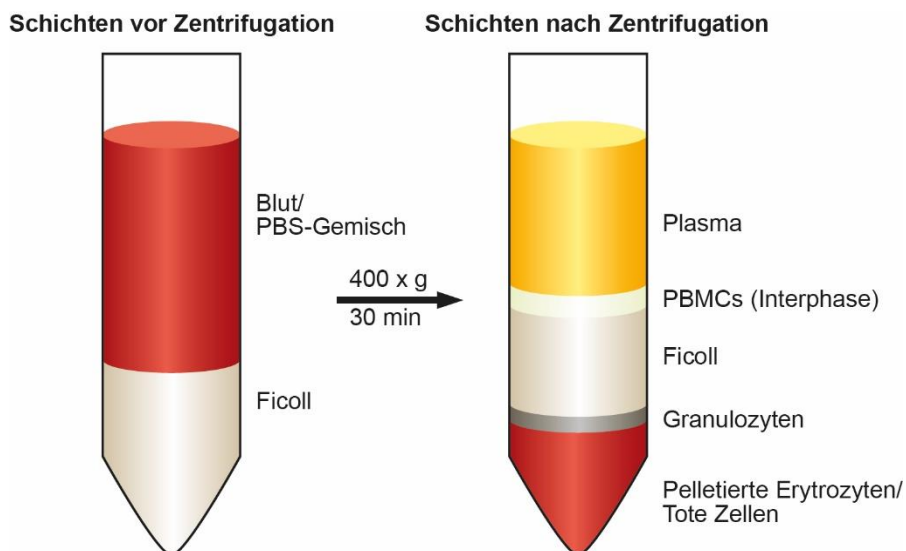


Abb. 5: Separation der PBMCs durch Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation. (eigene Abb.).

1. Phase: Plasma + PBS
2. Phase: monozytäre Zellen
3. Phase: klare Flüssigkeit = Ficoll (Lymphozytenseparationsmedium)
4. Phase: Granulozyten
5. Phase: Erythrozyten

Zur Separation der monozytären Schicht, wurde zunächst überschüssiges Plasma und PBS/EDTA bis etwa 2 cm über die Interphase, mit den dort angelagerten PBMCs abgenommen. Mit einer 10 mL Spritze und einer 8-9 cm langen 20 G x 2³/₄“ Kanüle wurden die PBMCs gründlich aufgenommen und in ein neues 50 mL Reaktionsröhrchen überführt. Das Röhrchen wurde mit PBS/EDTA auf 50 mL aufgefüllt und die Zellen im Anschluss bei 400 x g, 10 min und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgesaugt und das Pellet mit 2 mL PBS/EDTA resuspendiert, um die Zellsuspension in ein neues 15 mL Reaktionsröhrchen zu überführen. Erneut wurde das Gefäß mit PBS/EDTA zur Zentrifugation

der Zellen bei 300 x g für 10 min und 4°C aufgefüllt. Ein weiteres Mal wurde das Pellet mit 2 mL resuspendiert und auf 15 mL mit PBS/EDTA gefüllt, um die Zellen einem letzten Waschschrift über 10 min bei 140 x g und 4 °C zu unterziehen. Anschließend wurde das Pellet zur Lyse der restlichen Erythrozyten mit 2 mL PBS/EDTA resuspendiert und mit 6 mL Ammoniumchloridlösung, pH 7,4 bei 4 °C für 10 min inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen erneut 15 min bei 400 x g und 4 °C zentrifugiert. Nach dem Absaugen des Ammoniumchlorid/PBS-Gemisches wurde das Zellpellet in 2 mL RPMI Glutamax Vollmedium mit 10 % fetalem Kälber Serum (FBS), 1 % Penicilin-Streptomycin (PS) und 10 mM Hepes resuspendiert und zum Zählen der Zellen auf 10 mL mit Vollmedium aufgefüllt.

4.1.1 Zählen der PBMCs

Von der Zellsuspension wurden 10 µL mit 90 µL Trypanblau gemischt und 10 µL von dem Zell/Trypanblaugemisch zur Berechnung der Zellzahl in einen Einweg Hemozytometer appliziert. Berechnet wurde die Zellzahl durch das Mittel der 4 großen Quadranten und Multiplizieren des Kammerfaktors 10.000, dem Verdünnungsfaktor sowie dem Volumen der Zellsuspension. Zur Aussaat der Zellen auf den Polystyrene-beschichteten 96 Well Zellkulturplatten, wurden pro Well eine Mio. Zellen in 200 µL Medium ausgesät. Für Western Blot Lysate und Überstände wurden je 10 Mio. Zellen auf 6 Well Zellkulturplatten in 3 mL Medium ausgesät. In 8 Well Kammerobjektträgern wurden pro Well 100.000 Zellen in 500 µL Medium ausgesät. Die Zellen wurden im Inkubator bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert.

4.1.2 Stimulation der PBMCs

Nach einer Stunde Adhärenz wurden die PBMCs für 3 h mit und ohne 10 ng/mL LPS Ultrapure versetztem Hungermedium (RPMI, Glutamax mit 1 % PS) inkubiert. Anschließend erfolgte die Stimulation nach Applikation der entsprechenden Stimulanzen (Tabelle 10 und 11) bei 37 °C und 5 % CO₂. Darauf folgend wurden die 96 Well Zellkulturplatten zur Gewinnung der Überstände bei 1400 RPM für 10 min und 4 °C zentrifugiert und der Überstand in eine neue Zellkulturplatte überführt. Der Überstand wurde bis zur Verwendung bei -20 °C gelagert. Die 6 Well Platten wurden zur Gewinnung von Überstand und Zelllysate (4.7.1) auf Eis gelagert.

4.2 BMDM-Isolation

Nach zervikaler Dislokation zum Töten der Mäuse, wurden Femur und Tibia von der Haut und Muskelgewebe befreit. Femur und Tibia der beiden Hinterläufe wurden mittels Schere von der Maus abgetrennt. Die Gelenkköpfe wurden vorsichtig aufgetrennt und das Knochenmark mittels einer Spritze (26 G x Nadel) und eiskaltem PBS in ein 15 mL Reaktionsröhrchen gespült. Unter sterilen Bedingungen wurde das Knochenmark durch einen 70 µm Zellsieb in ein 50 mL Röhrchen gespült und mit PBS auf 50 mL aufgefüllt. Die Zellen wurden bei 300 x g, 5 min bei 4° C zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 2 mL DMEM mit [4.5 g/l] Glukose (Gibco),

10 % FBS und 1 % PS resuspendiert und auf 10 mL aufgefüllt. Die Zellzahl für die Aussaat auf 8 Well Kammerobjektträger betrug 70.000 Zellen pro Well in 500 µL Vollmedium mit 50 ng/mL M-CSF. Die Anzahl der Zellen auf Polystyrene-beschichteten 96 Well Zellkulturplatten betrug 40.000 pro Well in 200 µL Vollmedium mit 50 ng/mL M-CSF. Die Differenzierung der Knochenmarkszellen zu BMDMs (Bone marrow derived macrophages) dauerte eine Woche im Inkubator bei 37 °C und 5 % CO₂. Der Mediumwechsel erfolgte jeden zweiten Tag. Bei dem ersten Mediumwechsel wurden die Zellen zusätzlich einmal mit Vollmedium gewaschen.

4.3 Kultivierung von HEK293-Reporter-Zellen

HEK293-Blue-hTLR2 und hTLR4-Zelllinien, sowie die Kontrolllinie HEK293-Blue Null1 wurden von Invivogen bezogen. HEK293-Blue-hTLR2 und hTLR4 wurden mit humanen Genen für TLR2 oder TLR4 und SEAP (secreted embryonic alkaline phosphatase) transfiziert. In diesen Zellen steht das SEAP-Gen unter der Kontrolle des IFN-β Promotors, welcher mit fünf NF-κB und AP-1 Bindungsstellen in Verbindung steht. Das Vollmedium bestand aus DMEM mit [4.5 g/l] Glukose mit 10 % FBS, 50 U/mL Pen/ 50 µg/mL Step, 100 µg/mL Normocin sowie 2 mM L-Glutamin. Die Zellen wurden anschließend in eine T25 Flasche mit 8 mL Vollmedium ohne Blue-Selection für die HEK293-Blue-hTLR2 und hTLR2, sowie Zeocin für die HEK-Blue Null1 gegeben. Die Kultivierung der Zellen erfolgte bei 37 °C und 5 % CO₂ im Inkubator. Sobald die Zellen eine Konfluenz zwischen 70-80 % erreicht hatten, wurden sie in T75 Flaschen ausgesät. Dazu wurden die Zellen mit etwa 3 mL vorgewärmtem PBS für max. 5 min abgelöst. Zum Stoppen der Reaktion wurde dieselbe Menge an Vollmedium hinzu pipettiert und die Zellen in einem 15 mL Röhrchen bei 1000 RPM für 5 min und RT pelletiert. Danach wurden die Zellen in 1 mL Vollmedium resuspendiert und in eine T75 Flasche mit 20 mL Vollmedium überführt. Der Mediumwechsel erfolgte zweimal die Woche einhergehend mit dem Splitten der Zellen in einem Verhältnis von 1:8 bis 1:10. Dazu wurden die Zellen mit 5 mL PBS für 5 min von der Flasche gelöst und die Reaktion anschließend mit 5 mL Vollmedium gestoppt.

4.3.1 Selektion der HEK293-Reporterzellen

Das Selektionsmedium aus Vollmedium für HEK293-Blue-hTLR2 und hTLR4 beinhaltete zusätzlich 0,4 % 1 X HEK-Blue selection 250 X Lösung. Die HEK-Blue-Null1 Kontrollzellen wurden zur Selektion mit Vollmedium, zugesetzt mit 100 µg/mL Zeocin kultiviert. Zur vollständigen Selektion mussten die Zellen vor Verwendung mindestens zweimal mit Selektionsmedium passagiert werden. Zur Kontrolle einer ausreichenden Selektion wurden Westernblot- und FACS-Analysen durchgeführt.

4.3.2 Aussaat der HEK293-Reporterzellen

Die benötigte Zellzahl für den Quanti-Blue Assay betrug 50.000 Zellen pro Well einer 96 Well Polystyrene-beschichteten Zellkulturplatte mit 200 µL Vollmedium und entsprechendem

Selektionsmedium. Die Aussaat der Zellen für den Quanti-Blue-Assay erfolgte einen Tag vor der Stimulation der Zellen. Die Stimulation der HEK293-Blue-hTLR2 und hTLR4 sowie HEK293-Null1 Zellen erfolgte in 100 μ L Medium ü/N. Für die Kultivierung der HEK-Zellen zur immunocytochemischen Färbung wurden je 70.000 Zellen pro 8 Well Kammerobjektträger in 500 μ L Medium ausgesät. Für die FACS-Färbung wurden 150.000 Zellen pro 24 Well-Platte in 1 mL des jeweiligen Selektionsmediums ü/N bei 37 °C und 5 % CO₂ zur Stimulation am darauffolgenden Tag inkubiert. Für die Transfektion wurden 750.000 HEK293-Null1 Zellen pro 6 Well für 2 Tage bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert.

4.4 Transfektion kultivierter HEK293-Zellen

Für die Transfektion wurde Plasmid-DNA aus den TLR2 und TLR4 Plasmid-haltigen E. coli Stämmen DH5alpha (Addgene, Cambridge), mit Hilfe des GeneJET Plasmid Midiprep Kit (Thermo Scientific, #K0481) isoliert. Bei der Transfektion wurde die Fremd-DNA (Plasmide) durch Zuhilfenahme des Transfektions-Reagenz jetPEI®, einem linearen Polyethylenimin-Derivat (Polyplus Transfection, # 101-01N) in HEK293-Null1 Zellen (Invivogen) eingebracht. Diese waren beim Zeitpunkt der Transfektion ca. 80-90 % konfluent und wurden in Vollmedium ohne Antibiotika bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert.

Von der Plasmid-DNA wurden 3 μ g pro Well in 150 mM NaCl in einem finalen Volumen von 100 μ L vorsichtig mit dem Rotationsschüttler durchmischt und kurz herunterzentrifugiert. Für die Co-Transfektion von TLR2- und TLR4- haltigen Plasmiden, wurde eine Gesamtmenge von 3 μ g DNA, das heißt 1,5 μ g pro Plasmid-DNA eingesetzt. Pro Well wurden zusätzlich 6 μ L des jetPEI® Reagenz in einem finalen Volumen von 100 μ L 150 mM NaCl eingesetzt. Dieses wurde ebenfalls mittels Rotationsschüttler vorsichtig durchmischt und kurz herunterzentrifugiert. Anschließend wurden die 100 μ L jetPEI® Lösung zu 100 μ L DNA-Lösung hinzupipetiert. Dabei wurde die Reihenfolge eingehalten, um die Transfektionswahrscheinlichkeit nicht zu minimieren. Der Ansatz wurde direkt vorsichtig mit dem Rotationsschüttler vermischt und kurz herunterzentrifugiert. Es folgte eine Inkubation für 15-30 min bei RT. Pro 6 Well-Platte wurden 200 μ L des jetPEI®/DNA-Ansatz tröpfchenweise zu den Zellen in Vollmedium gegeben und durch leichtes Schwenken der Platte homogenisiert. Die Zellen wurden zur Transfektion für 24-48 h bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Zur Überprüfung des Transfektionserfolges wurden Western Blot Lysate angefertigt (4.7.1).

4.4.1 Durchflusszytometrie humaner HEK293-Zellen nach Co-Transfektion und Inkubation mit Atto-488-markiertem ApoC3

Die Co-transfizierten HEK293-Zellen mit hTLR2- oder hTLR4-Genen wurden für 1 h mit 50 μ g/mL Atto-488-markiertem ApoC3 (4.11.2) inkubiert. Die Zellen wurden anschließend dreimal mit PBS gewaschen, um eine mögliche Internalisierung von ApoC3 mittels

Durchflusszytometrie zu analysieren (BD FACSCanto II). Das Binden beziehungsweise die Internalisierung von Atto-488-markiertem ApoC3 wurde mittels FlowJo Software analysiert.

4.5 HDL/LDL/VLDL-Isolation

4.5.1 Tag 1: Vorbereitung des Serums

Zur HDL-, LDL-, und VLDL-Isolation wurde Serum aus Vollblut durch eine Zentrifugation in Serum-Gel-Röhrchen bei 4000 U/min für 15 min bei 20 °C separiert. Die weitere Aufbereitung wurde wie im Folgenden beschrieben nach bereits etablierter sequentieller Dichtgradient-Ultrazentrifugation durchgeführt (vgl. Speer T., 2013, Shroff R. et al., 2014, Zewinger S. et al., 2014, 2015). Das Serum (5 mL) wurde jeweils in ein 15 mL Reaktionsröhrchen überführt und anschließend mit einer 10 mL Spritze und einer langen 20 G x 2¾“ Kanüle in ein 13 mL Zentrifugationsröhrchen für die Ultrazentrifuge (UZ) injiziert. Mit der Dichtelösung (1,006 g/cm³) wurden die Röhrchen bis unter den Konus aufgefüllt. Vorhandene Luftblasen wurden herausgedrückt und mit einem Tuch aufgefangen. Mit Hilfe einer kleinen Kanüle wurde das Restvolumen mit der Dichtelösung befüllt. Zum Austarieren einer gleichmäßigen Beladung der UZ wurden die Röhrchen gewogen. Dabei durfte die maximale Gewichts-Differenz von 0,02 g nicht überschritten werden. Mit einer Verschlusskappe und einem Ring wurden die Röhrchen verschlossen und im Anschluss mit einem Tube-Topper verschweißt. Waren die Röhrchen dicht, erfolgte eine Zentrifugation mittels UZ bei 4 °C, 50.000 RPM über 15 h.

4.5.2 HDL/LDL/VLDL-Isolation

Nach dem Entnehmen der Röhrchen aus der UZ wurden diese kurz unterhalb der Chylomikronen geschnitten und anschließend der Überstand zum weiteren Aufbereiten, d.h. Aufkonzentrieren und Sterilisieren von VLDL verwendet. Der Unterstand der Röhrchen wurde zur weiteren Verwendung in einen Messzylinder zur Volumenmessung überführt, anschließend in einem 50 mL Reaktionsröhrchen auf Eis gelagert.

4.5.3 Dichtemessung

Mit einem Dichtemessgerät wurde die Dichte der Flüssigkeit festgestellt (Anton Paar ProveTec GmbH) und mittels KBr-Lösung eingestellt. Die angestrebte Zieldichte war 1,063 g/cm³. Die benötigte KBr-Menge wurde dabei wie folgt berechnet:

Berechnung der benötigten KBr-Lösung [mL]:

$$\frac{\text{Volumen} * (\text{Zieldichte} - \text{Messdichte})}{1 - (0,312 * \text{Zieldichte})}$$

4.5.4 Vorbereiten der Röhrchen

Nach Zugabe der entsprechenden KBr-Menge und Rühren mittels Magnetrührer in einem 50 mL Reaktionsröhrchen erfolgte eine Kontroll-Dichtemessung. Die Flüssigkeit wurde

anschließend erneut mittels 20 G x 2¾ Kanüle in ein 13 mL Zentrifugationsröhrchen befüllt. Mit der Dichtelösung (1,063 g/cm³) wurden die Röhrchen bis zum Konus aufgefüllt, die Luftblasen herausgedrückt und mit einem Tuch aufgefangen. Das fehlende Volumen wurde wieder mit Hilfe einer kleinen Kanüle nachgefüllt und wie an Tag 1 verschweißt. Nach der Dichtigkeitsprüfung folgte eine Zentrifugation in der UZ bei 4 °C, 50.000 RPM über 24 h.

4.5.5 HDL/LDL/VLDL-Isolation Tag 3-LDL

Nach dem Entnehmen der Röhrchen aus der UZ wurde eine kleine 24 G x 1 Kanüle im oberen Teil des Röhrchens eingebracht. Der Deckel wurde danach mit einer Rasierklinge vorsichtig abgetrennt. Im Anschluss konnte der Überstand mit einer Pipette vom Rand her abgesaugt und in ein Reaktionsröhrchen überführt werden. Mit der Dichtelösung wurde das Volumen auf 5 mL aufgefüllt. Anschließend erfolgte eine Dichtemessung. Durch Zugabe der entsprechenden Menge an KBr-Lösung in einem 50 mL Reaktionsröhrchen, wurde die Dichte auf 1,063 g/cm³ bei stetigem Rühren angepasst. Nach einer weiteren Dichte-Kontrollmessung wurden die 13 mL Zentrifugationsröhrchen erneut mit dem weiter zu bearbeitendem Serum mittels 20 GS x 2¾ Kanüle und 10 mL Spritze befüllt. Mit der Dichtelösung (1,063 g/cm³) wurde das Restvolumen bis zum Konus aufgefüllt. Eventuelle Luftblasen wurden herausgedrückt und das fehlende Volumen mit einer kleinen Nadel nachgefüllt. Wie zuvor wurden die Röhrchen wieder gewogen, wobei die Gewichts-Differenz der Röhrchen von 0,02 g nicht überschritten werden durfte. Nach dem Verschließen der Röhrchen und der Dichtigkeitsprüfung wurden diese bei 4 °C und 50.000 RPM für 24 h in der UZ zentrifugiert.

4.5.6 HDL

Nach der Zentrifugation wurde das HDL aus dem unteren Teil abgenommen und in ein 50 mL Reaktionsröhrchen überführt. Das Volumen wurde gemessen und die Dichte bestimmt. Durch Zugabe von H₂O_{bidest.} wurde eine Dichte von 1,063 g/cm³ eingestellt.

Berechnung der benötigten H₂O_{bidest.}-Menge [mL]:

$$\frac{\text{Volumen} * (\text{Messdichte} - \text{Zieldichte})}{(\text{Zieldichte} - 1)}$$

Nachdem die entsprechende Menge H₂O_{bidest.} hinzugegeben wurde, erfolgte erneut die Befüllung der Röhrchen und das Anpassen der Dichte auf 1,063 g/cm³. Im Anschluss erfolgte eine Zentrifugation bei 4°C und 50.000 RPM über 24 h.

4.5.7 HDL/LDL/VLDL-Isolation Tag 4

4.5.8 LDL

Nach dem Entnehmen der Zentrifugationsröhrchen aus der UZ wurde der Überstand abgenommen und in 1,5 mL Reagiergefäße zur weiteren Aufbereitung von LDL verwendet.

4.5.9 HDL

Nach der Entnahme der Röhrcchen aus der Zentrifuge wurden die Röhrcchen aufgeschnitten und der Unterstand verwendet. Das Volumen wurde gemessen und die Dichte bestimmt. Anschließend wurde der Unterstand in ein 50 mL Reaktionsröhrcchen überführt. Die Zieldichte betrug $1,21 \text{ g/cm}^3$ und wurde durch die Zugabe der entsprechenden Menge KBr-Lösung eingestellt. Eventuell gebildete Salzkristalle wurden durch Rühren aufgelöst. Die Flüssigkeit wurde in 13 mL Zentrifugationsröhrcchen überführt und die entsprechende Menge Dichtelösung ($1,21 \text{ g/cm}^3$) ergänzt. Die Röhrcchen wurden gewogen und verschweißt. Nach Prüfen der Dichtigkeit erfolgte eine erneute Zentrifugation für 24 h bei 50.000 RPM und 4°C in der UZ.

4.5.10 HDL/LDL/VLDL-Isolation Tag 5

4.5.11 HDL

Im Anschluss an die Zentrifugation wurde der Überstand in 1,5 mL Reagiergefäße überführt und weiter zur HDL-Präparation verwendet.

4.5.12 LDL Tag 4, HDL Tag 5

Nach dem Überführen des LDL beziehungsweise HDL erfolgte eine Konzentrierung der Proben mittels Filtrerröhrcchen (Amicon). Dabei wurden die Proben bis zur Markierung mit Dialysepuffer aufgefüllt, um restliche Salze aus den Proben zu waschen. Es folgte eine dreimalige Zentrifugation für jeweils 10 min bei 3000 U/min und 4°C . Nach jeder Wiederholung wurden die Proben über dem Filter resuspendingiert, um einen Volumenverlust zu vermeiden. Zur Sterilisation des LDL und HDL wurden die Proben in Filtrerröhrcchen für 3 min bei 3000 U/min und 4°C mit der Tischzentrifuge zentrifugiert. Protein- und Reinheitsbestimmung, Quantifizierung von ApoC3

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurde die benötigte Menge an Bradford-Reagenz über die Anzahl der Proben * 1 mL + 11 mL für die Standardreihe berechnet. Das Bradfordreagenz wurde in dem Mischungsverhältnis 1:5 mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$ verdünnt. Zum Aufnehmen der Standardkurve ($1 \mu\text{g/mL}$) wurde eine aufsteigende Konzentrationsreihe mit entsprechender Menge von BSA als Referenzprotein aufgetragen.

BioRAD [mL]	1,000	0,998	0,996	0,994	0,992	0,990
BSA [μL]	0	2	4	6	8	10

BioRAD [mL]	0,988	0,986	0,984	0,982	0,980	
BSA [μL]	12	14	16	18	20	

Die Ansätze wurden nach dem Mischen für 5 min bei RT inkubiert. Von den Proben wurden anschließend je $1 \mu\text{L}$ in je $999 \mu\text{L}$ des vorgelegten Bradford-Reagenz gegeben. Diese wurden

gut gemischt und ebenfalls für 5 min bei RT inkubiert. Zur Konzentrationsmessung wurden je 200 µL der aufsteigenden Standardreihe und der zu messenden Proben in Duplikaten in unbehandelte Zellkulturplatten appliziert. Die Messung wurde im Mikroplatten-Leser (Magellan, Tecan) durchgeführt.

Die Reinheit der Lipoproteinfraktionen wurde durch SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (4.7.4) und anschließender Färbung mit Coomassie Brilliant Blue geprüft.

Um ApoC3 in HDL, LDL oder VLDL zu quantifizieren wurden jeweils 5 µg Protein mittels SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese aufgetrennt und ApoC3 nach Western Blot Transfer und anschließender Anti-ApoC3 Antikörperinkubation (4.7.7) detektiert.

4.6 Delipidiertes VLDL und aufgereinigtes humanes ApoC3

Delipidiertes VLDL und aufgereinigtes humanes ApoC3 wurde von Prof. Kostner, Universität Graz zur Verfügung gestellt.

4.7 Western Blot

Nach der Stimulation (Tabelle 9) der verschiedenen Zell-Typen (4.1, 4.2, 4.3) und eventueller Inkubation mit eingesetzten Blockern (Tabelle 10), wurden Proteine aus Zelllysaten und Überständen mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt. Für die weitere Spezifizierung wurden die Proteine im anschließenden Western Blot auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Darauf konnte die Expression Abundanz der untersuchten Proteine mit fluoreszierenden Sekundärantikörpern nachgewiesen werden.

4.7.1 Zelllysat

Nach dem Ende der Stimulationszeit wurden die Zellen in 6 Well Platten auf Eis gestellt, um den Metabolismus der Zellen herunterzufahren. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und in ein 1,5 mL Reaktionsgefäß überführt. Im Anschluss erfolgte eine Zentrifugation über 10 min bei 13.0000 x RPM und 4 °C, um zurückbleibende Zelldebris zu entfernen. Die Überstände wurden in neue 1,5 mL Reaktionsgefäße aliquotiert und bis zur Trichloressigsäure-Proteinfällung (4.7.3) bei -80 °C gelagert. Die lysierten Zellen wurden nach der Inkubationszeit mittels Zellscharber von den Platten losgelöst und ebenfalls in ein 1,5 mL Reaktionsgefäß überführt. Die Lysate wurden bei 4 °C für 10 min und 13.000 RPM zentrifugiert. Der Überstand der Lysate wurde vom Zellpellet abgenommen und in ein neues 1,5 mL Reaktionsgefäß überführt. Von den Lysaten wurde für die folgenden Proteinbestimmung 4 µL entnommen.

4.7.2 Proteinbestimmung

Zur Quantifizierung der Gesamtproteinmenge erfolgte eine photometrische Proteinbestimmung durch eine Färbemethode nach M. Bradford wie oben beschrieben. Nach Bestimmung der Proteinkonzentration wurden die Proben mit je 10 % 10-fach Lämmli-Puffer

versetzt und für 10 min bei 95 °C gekocht. Die Proben wurden anschließend direkt auf Eis gekühlt und bis zur Verwendung bei -80 °C gelagert.

BioRAD [mL]	1,000	0,998	0,996	0,994	0,992	0,990
BSA [μL]	0	2	4	6	8	10

Zu dem in 1,5 mL Reaktionsgefäßen vorgelegten Volumen an Bradford-Reagenz wurde das benötigte Volumen von BSA hinzupipettiert. Der Ansatz wurde jeweils auf einem Rotationsschüttler vermischt und für 5 min bei RT inkubiert. Danach wurden die Proben in einen Bradford-Ansatz für 4 μ L Probenvolumen pipettiert. Nach 5 min wurden je 200 μ L der aufsteigenden Standardreihe in Duplikaten sowie nachfolgend die zu messenden Proben in eine unbeschichtete 96 Well-Platte pipettiert. Die Konzentrationsmessung erfolgte in einem Mikroplatten-Leser (Magellan, Tecan). Nach Beendigung der Messung wurden die Proben mit je 10 % 10-fach Lämmli-Puffer versetzt, auf einem Rotationsschüttler vermischt und für 10 min bei 95 °C gekocht. Die Proben wurden anschließend direkt auf Eis gekühlt und bis zur Verwendung bei -80 °C gelagert.

4.7.3 20% Trichloressigsäure-Proteinfällung (TCA-Präzipitation)

Zu jeweils 500 μ L Überstand wurden 500 μ L 20 % Trichloressigsäure gegeben und für ca. 30 Sek auf einem Rotationsschüttler vermischt. Die Proben wurden für 30 min auf Eis inkubiert. Eine Zentrifugation bei 12.000 x g für 15 min bei 4°C folgte. Die Proben wurden danach dreimal gewaschen. Dazu wurde jeweils 1 mL eiskaltes Azeton hinzugegeben und resuspendiert. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation bei 12.000 x g für 5 min bei 4 °C. Nach dem Waschen wurde der Überstand vorsichtig entfernt und das Pellet 10 min luftgetrocknet. Das Pellet wurde in 50 μ L Überstand-Proben-Puffer resuspendiert und nachfolgend einige Sek bei 13.000 x g und 4 °C herunterzentrifugiert. Die Proben wurden für 5 min bei 95 °C inkubiert, anschließend eine min auf einem Rotationsschüttler vermischt und auf Eis heruntergekühlt.

4.7.4 SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-Page)

Nach dem Vorbereiten der Westernblot-Proben wurde zunächst die SDS-Gelelektrophorese (Laemmli, 1970) zum Trennen der in den Lysaten oder Zell-Überständen enthaltenen Proteine durchgeführt. Dazu wurden die Proben auf ein denaturierendes, diskontinuierliches SDS-Polyacrylamidgel (sodium dodecyl sulfat polyacrylamide gel) aufgetragen, um sie im elektrischen Feld aufzutrennen. In die Laufkammer wurde die entsprechende Anzahl an Gelen in den Haltern befestigt und die Kammer bis zur Markierung mit Laufpuffer gefüllt. Die Taschen wurden mit den Proben geladen und die Gelelektrophorese gestartet. Die verwendeten Gele wurden zur Auftrennung der Lysate als 10 % SDS-Polyacrylamidgel sowie für die Überstände als 10-15 % SDS-Polyacrylamid-Gradientengel (Tabelle 11 und 12) entsprechend angesetzt. Die Stromstärke beim Gellauf betrug für ein Gel 35 mA konstant, für zwei Gele entsprechend

70 mA konstant. Das Molekulargewicht konnte durch den aufgetragenen Größenstandard (PageRuler Plus Prestained Protein Ladder, 10-250 kDa, Thermo Fisher Scientific) ermittelt werden.

Tabelle 11 Zusammensetzung 10 % SDS-Polyacrylamidgel

Reagenzien	Trenngel (10 % Acrylamide) [mL]	Sammelgel (5 % Acrylamide) [mL]
H ₂ O _{bidest.}	7,9	6,8
Sammel-/Trenngelpuffer	5,0	1,25
Acrylamide/Bisacrylamide (30 %)	6,7	1,7
SDS (10 %)	0,2	0,1
APS (10 %)	0,2	0,1
TEMED	0,008	0,01

Tabelle 12 Zusammensetzung 10-15 % SDS-Polyacrylamid-Gradientengel

Reagenzien	Trenngel (15 % Acrylamide) [mL]	Intermediäres Gel (10% Acrylamide) [mL]	Sammelgel (5 % Acrylamide) [mL]
H ₂ O _{bidest.}	3,68	7,93	5,44
Sammel-/Trenngelpuffer	4,0	5,0	1,04
Acrylamide/Bisacrylamide (30 %)	8,0	6,6	1,36
SDS (10 %)	0,16	0,2	0,08
APS (10 %)	0,16	0,2	0,08
TEMED	0,016	0,008	0,008

Trenngelpuffer: 1,5 M Tris-HCL, pH 8,8

Sammelgelpuffer: 1,0 M Tris-HCL, pH 6,8

Im Anschluss an die Gelelektrophorese wurde der Western Blot mit Semi-Dry Kammer für den Transfer der Proteine aus Lysaten oder Wet-Blot-Kammer für den Transfer der Proteine aus dem Überstand durchgeführt. Die Proteinbanden von dem SDS-Polyacrylamidgel werden über ein senkrecht angelegtes elektrisches Feld auf eine Nitrozellulosemembran transferiert.

4.7.5 Wet-Blot

Nach der Auftrennung der Proteine aus dem Überstand auf ein 10-15 % Gel wurden dieses zunächst für 5 min in Transferpuffer gelegt. Im Anschluss wurde das Sandwich für den Transfer zusammengebaut. Dazu wurden die in Transferpuffer getränkten Filter auf die schwarze Seite der Halter gelegt. Danach wurden drei getränkte Filterpapiere daraufgelegt und darüber das Gel. Über das Gel wurde die zuvor für 5 min in H₂O_{bidest.} inkubierte und in Transferpuffer geschwenkte Nitrozellulosemembran gelegt. Erneut wurde eine dreischichtige Lage des getränkten Filterpapiers über die Membran geschichtet. Zuletzt wurde noch einmal ein in Transferpuffer getränkter Filter daraufgelegt. Der Halter wurde in die für den Wet-Blot

vorgesehene Vorrichtung gebracht und bis zur Markierung mit Transferpuffer aufgefüllt. Der Transfer erfolgte bei 100 V für 85 min und 4 °C.

4.7.6 *Semi-Dry-Blot*

Der Transfer von Protein-Lysaten auf 10 % Gele erfolgte in der Semi-Dry Transferkammer. Das Gel wurde ebenfalls für 5 min in Transferpuffer inkubiert und die jeweils dreilagigen Filterpapiere mit Transferpuffer getränkt. Für den Transfer wurden zunächst die Filterpapiere auf die Transferkammer gelegt und glattgestrichen. Danach wurde die zuvor in H₂O_{bidest.} aktivierte und in Transferpuffer geschwenkte Nitrozellulosemembran darübergerlegt. Über die Membran wurde das Gel platziert. Zuletzt wurden erneut drei Lagen des getränkten Filterpapiers aufgelegt und glattgestrichen. Der Transfer erfolgte bei 250 mA für 60 min.

4.7.7 *Antikörperdetektion von Proteintransfer auf Nitrozellulosemembran*

Nach dem Transfer der Proteine vom SDS-Gel auf die Nitrozellulosemembran mittels Wet- und Semi-Dry Blot wurde diese zunächst für 1 h bei RT auf dem Schüttler in Blockier-Puffer inkubiert, um ein unspezifisches Binden des primären Antikörpers zu verhindern. Die anschließende Antikörperinkubation für die Primärantikörper (Tabelle 7) erfolgte stets ü/N bei 4 °C auf dem Schüttler. Die Membran wurde für 1 h bei RT auf dem Schüttler im Dunkeln inkubiert. Die Detektion der fluoreszierenden Sekundärantikörper erfolgte mit Hilfe des Odyssey-Scanner und der Software Image Studio Lite. Der Scan erfolgte bei einer Einstellung von 2,0 mm Glasdicke und 300 µm Membrandicke im 700 nm Fluoreszenz-Kanal für rot und 800 nm Fluoreszenz-Kanal für grün.

4.8 **Quanti-Blue Assay**

4.8.1 *Aussat von HEK-Blue Null1 und HEK293-Blue hTLR2/4 für Quanti-Blue Assay*

Die humanen TLR2 und TLR4 HEK293-Zellen wurden nach der Selektion (4.3.1) a 50.000 Zellen pro Well in dem jeweiligen Selektionsmedium mit Zeocin (100 µg/mL) oder HEK-Blue Selektionsmedium ausgesät.

4.9 **Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)**

Die in 3.6 aufgeführten ELISA Kits und Reagenzien wurden nach Angabe des jeweiligen Kits verwendet.

4.9.1 *Vorbereitung der Reagenzien*

Beschichtungs-Puffer

1 x PBS

1 x Waschpuffer

1x PBS

0,05 % Tween 20

1 x Reagenzien-Verdünner

5 mL 10x Reagenzien-Verdünner (# DY995)

40 mL in PBS

Substrat-Lösung

1:1 Mischung von Farbreagenz A (H₂O₂) und Farbreagenz B (Tetramethylbenzidine) (# DY999)

Stop-Lösung

1N H₂SO₄

4.9.2 Durchführung

4.9.2.1 Primärantikörper-Inkubation

Am Vortag wurde die hochaffine Halbtiter-ELISA Platte (Greiner) mit 50 µL/Well Primärantikörper-Lösung („Capture-Antibody“) beschichtet und ü/N bei 4 °C auf dem Schüttler inkubiert. Zum Blocken, um unspezifischen Bindestellen zu besetzen, wurden je 100 µL des 1 x Reagenz-Verdünners aufgetragen und die Platte versiegelt für 1 h bei RT im Dunkeln inkubiert.

4.9.2.2 Verdünnungsreihe ansetzen

Das Vorbereiten des Top-Standards wurde durch das Ansetzen der im Kit vorgegebenen Konzentration in 1 mL Reagenz-Verdünner vorgenommen. Durch Vorlegen von 500 µL Reagenz-Verdünner in 7 weitere 1,5 mL Reaktionsgefäße wurde eine Verdünnungsreihe des Top-Standards vorbereitet. Nach dem Vorbereiten der Standardreihe und eventuellem Verdünnen der Proben mit Reagenz-Verdünner wurde die Platte wie zuvor dreimal mit Waschpuffer gewaschen und mit 50 µL der Standard-Verdünnungsreihe in Duplikaten, sowie den Proben bei RT aufgetragen und für 2 h bei RT im Dunkeln inkubiert.

4.9.2.3 Applikation Detektions-Antikörper

Die Platte wurde erneut dreimal mit je 200 µL Waschpuffer gewaschen, um die ungebundenen Bestandteile der Proben und der Standardreihe zu entfernen und mit 50 µL pro Well Detektions-Antikörper für 2 h bei RT inkubiert. Dabei kann der zweite ebenfalls unmarkierte, biotinylierte Detektionsantikörper das immobilisierte Antigen binden und das ELISA Sandwich komplettieren.

Nach einem weiteren Waschschrift wurden je 50 µL der „horseradish peroxidase“ (HRP) konjugierten Avidin-Lösung appliziert, die Platte versiegelt und im Dunkeln bei RT für 20 min inkubiert.

4.9.2.4 Umsetzung des Substrates und Detektion

Wie zuvor wurde die Platte dreimal mit 200 µL Waschpuffer gewaschen und mit je 50 µL pro Well der farblosen Substrat-Lösung aus Tetramethylbenzidine (TMB) und H₂O₂ inkubiert. Um eine quantifizierbare, lösliche Färbung zu erhalten und die komplette Umsetzung des Reagenzes durch das Enzym zu vermeiden, wurde die Katalyse des Enzyms durch eine Applikation von 25 µL Stoplösung unterbrochen. Die optische Dichte auf den Platten wurde zur Quantifizierung photometrisch bei 450 nm und 570 nm im Mikroplatten-Leser (Magellan, Tecan) gemessen.

4.9.3 Präparation des Quanti Blue Assays

Der Inhalt des Beutels wurde in eine 250 mL Flasche gegeben und in 100 mL deionisiertem Wasser gelöst. Das gelöste Medium wurde danach mit einem 0,2 µm Membranfilter in eine neue Flasche filtriert. Die Quanti-Blue-Lösung wurde vor der Verwendung bei 37 °C im Wasserbad erwärmt.

4.9.4 Detektion von Secreted embryonic alkaline phosphatase-Aktivität (SEAP-Aktivität)

Das vorgewärmte Medium wurde vor der Detektion der SEAP-Aktivität im Überstand zu 180 µL pro Well einer 96 Well-Platte pipettiert. Zu der Quanti-Blue Lösung wurden in Triplikaten jeweils 20 µL des zuvor für 10 min bei 1400 RPM bei RT abzentrifugierten Überstandes der HEK293-Reporterzellen hinzupipettiert. Zudem wurde als Kontrolle Zellkulturmedium verwendet. Die Platte wurde im Anschluss für 5 h bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Mittels Mikroplatten-Leser (Magellan, Tecan) wurde die SEAP-Aktivität durch eine Absorbionsmessung bei einer Wellenlänge von 570 nm und der Referenz-Wellenlänge von 630 nm gemessen.

4.10 „LDH-release-Assay“

Zur Untersuchung einer möglichen LDH-Freisetzung, wurde das „Pierce™ LDH Cytotoxicity Assay Kit“ nach Anleitung des Herstellers (Thermo Fisher Scientific, # 88954) verwendet. Die relative LDH-Freisetzung wurde durch folgende Rechnung ermittelt:

$$\frac{\text{Gemessene LDH-Freisetzung} - \text{unstimulierte Zellen}}{\text{Lysepuffer behandelte Zellen} - \text{unstimulierte Zellen}} * 100$$

4.11 Immunozytologische Atto-488 ApoC3-Färbung

Um die Internalisierung von ApoC3 in humane Zellen zu visualisieren, wurde dieses unter Verwendung eines Kits (Atto 488 Protein Labeling kit # FP-201-488, Jena Bioscience GmbH) zunächst mittels Atto-488 markiert.

4.11.1 Aufkonzentrierung von ApoC3

Von ApoC3 (1 mg/mL) wurde 1 mL für 30 min bei 14.000 g und 4 °C in einem Konzentrations-Röhrchen (3 kDa, Amicon Ultra 0,5 mL) zentrifugiert, um es im Anschluss für die weitere Fluoreszenz-Färbung zu verwenden.

4.11.2 Atto-488-Färbung von ApoC3

Das aufkonzentrierte ApoC3 wurde zu 170 µL mit 17 µL Atto-488 in Natriumbicarbonat-Puffer (pH 8,5) für 1 h auf dem Schüttler inkubiert. Im Anschluss erfolgte eine 30-minütige Zentrifugation bei 14.000 g und 4 °C in einem Konzentrationsröhrchen mit 3 kDa Filtermembran.

4.11.3 ApoC3-Internalisierung in PBMCs

Die verwendeten Zellen wurden nach einer Kultivierung in 8 Well Kammerobjektträger (4.1.1) für 1 h mit Atto-488-markiertem ApoC3 (50 µg/mL) inkubiert. Dabei sollte die Internalisierung von Atto-488-markiertem ApoC3 gewährleistet werden. Nach Ende der Inkubationszeit wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen und anschließend mit 200 µL 4 % PFA fixiert. Nach erneutem dreimaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen für 5 min in Permeabilisierungspuffer (0,5 % Triton X 100) inkubiert. Erneut wurde dreimal mit PBS gewaschen und zur Vermeidung einer unspezifischer Antikörperbindung für 30 min mit 1 % BSA geblockt. Zur Visualisierung des Aktin-Zytoskeletts, wurden die Zellen für 20 min mit 1 µL Phalloidin in 500 µL Methanol inkubiert. Abschließend wurden die 8 Well Kammerobjektträger mit DAPI Vecta eingedeckt. Die mikroskopischen Bilder wurden an dem Fluoreszenzmikroskop Biozero BZ-8000 (Keyence) mit der Biozero BZ Viewer Software (Keyence) aufgenommen.

4.11.4 Atto-488 Detektion in HEK293 Zellen mittels FACS

HEK293-Blue-hTLR2 und hTLR4, sowie die Kontrolllinie HEK293-Blue Null1 (4.3) wurden am Vortag ausgesät (4.3). Am darauffolgenden Tag wurden die Zellen in 300 µL Hungermedium für 1 h mit 50 µg/mL Atto-488-markiertem ApoC3 inkubiert. Nach Ende der Inkubationszeit wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen und anschließend im FACS mittels Durchflusszytometrie das Binden beziehungsweise die Internalisierung von ApoC3 untersucht.

4.12 Assay zur Formation von ASC Specks

Humane PBMCs wurden nach Aussaat stimuliert (4.1.2). Anschließend wurden die PBMCs für 15 min bei -20 °C mit eiskaltem Methanol inkubiert. Nach dem Waschen wurden die Zellen für 1 h in 1 % BSA geblockt und mit anti-ACS Antikörper (1:300) inkubiert. Nachfolgend wurden die PBMCs für 30 min mit einem Texas-Red Sekundärantikörper inkubiert. Nach dem Eindecken mit Eindeckmedium mit DAPI wurde die Anzahl von ASC Specks mittels Aufnahmen quantifiziert.

4.13 Reaktive Sauerstoffspezies-Messung (ROS) durch Elektronenspinresonanz-Spektroskopie (ESR)

4.13.1 Vorbereitung der ROS-Messung im Überstand von BMDMs

Die nach 4.1 isolierten PBMCs in 96 Well-Platten wurden für die Messung reaktiver Sauerstoffspezies (Reactive oxygen Species, ROS) aus dem Überstand verwendet. Die Messung von ROS erfolgte mit Hilfe von Elektronenspinresonanz-Spektroskopie (ESR, *electron paramagnetic resonance*, Bruker). Als Lösungspuffer für die ESR-Spektroskopie wurde ein Krebs-Hepes-Puffer (KHB-Puffer) verwendet.

4.13.2 Diethyldithiocarbamat (DETC) Lösung:

DETC hat ein Molekulargewicht (MW) von 225.31 g/mol davon wurden ca. 3 mg in ein 1,5 mL Reagiergefäß abgewogen. DETC wurde in 1 mL KHB gelöst. Zur Einstellung der richtigen Endkonzentration wurde das einzusetzende Volumen von DETC in die Chelatorenlösung berechnet, um ebenfalls mögliche Wägefehler auszugleichen.

Deferoxamin (DF) Lösung:

Von Deferoxamin wurden ebenfalls 3 mg abgewogen (MW= 225.31 g/mol). Zunächst wurde die Menge ebenfalls in 1 mL KHB-Puffer gelöst und die richtige Endkonzentration für die Chelatorenlösung berechnet.

Herstellen der Chelatoren Lösung:

Zur Herstellung der Chelatorenlösung wurden die berechneten Volumina von DETC und DF in der entsprechenden Menge KHB gelöst. Die Lösung wurde vor dem Gebrauch für mindestens 20 min entgast.

4.13.3 Herstellen der Spintrap-Lösung (CMH, 1-Hydroxy-3-Methoxycarbonyl-2, 2, 5, 5-Tetramethylpyrrolidin):

In einem 1,5 mL Reagiergefäß wurden ca. 1,8 mg CMH abgewogen. Zum Erreichen der Endkonzentration von 200 μ M wurde das benötigte Volumen der Chelatorenlösung wie folgt berechnet.

Stimulation der Zellen für die ROS-Messung

Nach 3 h Stimulation mit und ohne 10 ng/mL LPS in Hungermedium wurden die Zellen für die ESR-Spektroskopie einmal in Chelatorenlösung gewaschen. Daraufhin wurden die PBMCs in je 200 μ L Chelatorenlösung mit jeweiligem Stimulanz und Zugabe von 6 μ L CMH stimuliert. Nach der Stimulation wurde der zellfreie Überstand in eine neue 96 Well-Platte übertragen und die Platten zur Analyse auf Eis gelagert. Zur Analyse im ESR-Spektrometer wurde je 50 μ L Überstand in eine Kapillare aufgezogen und versiegelt. Die Messung erfolgte im Bruker e-scan spektrometer (Bruker Biospin) mit der „center field“ Einstellung 3484.5 g unter physiologischen Bedingungen bei 37 °C und 5 % CO₂.

4.14 Immunoprecipitation (IP)

Nach Zugabe von 500 µL 1x IP-Lysepuffer wurden die Zellen für 5 min auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden von der Platte abgeschabt und in ein 1,5 mL Reaktionsröhrchen überführt. Nach 3 x 5 Sek Ultraschall auf Eis erfolgte eine Zentrifugation für 10 min bei 14.000 x g und 4 °C. Das Volumen des Überstandes wurde mit eiskaltem Lysepuffer auf 1 mL aufgefüllt (Zugabe von 500 µL Lysepuffer). Anschließend erfolgte die Zugabe von 10 µL Primärantikörper bei einer ü/N Inkubation bei 4 °C unter kontinuierlichem Rühren. Am darauffolgenden Tag wurden 20 µL der resuspendierten Protein G PLUS-Agarose Beads hinzugegeben und bei 4 °C unter kontinuierlichem Rühren für 4 h inkubiert. Zur Pelletierung erfolgte eine Zentrifugation bei 2500 RPM für 5 min und 4 °C. Das Pellet wurde im Anschluss 4 x mit je 1 mL eiskaltem Lysepuffer gewaschen und nach dem letzten Waschschrift in 40 µL Lysepuffer resuspendiert. Anschließend erfolgte eine erneute Proteinbestimmung. Zur Verwendung im Western Blot wurden 4 µL 10 x Lämmli-Puffer hinzugegeben und die Proben bei 95 °C gekocht.

4.15 Crosslinking

Für das Crosslinking wurden je 10 Mio. PBMCs in 6 Well Zellkulturplatten verwendet. Die Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen und mit 0,5 mM BS3 für 45 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte das 15-minütige Quenschen durch Zugaben von 50 mM Glycin. Nach zweimal Waschen mit PBS wurden Lysate hergestellt.

4.16 Murines perivaskuläres Carotisschädigungs-Modell

4.16.1 MACS-Protokoll zur Isolation CD14+ humaner PBMCs

Nach Isolation humaner PBMCs (2.1) wurden die Zellen einmal für 5 min bei 300 g mit MACS-Puffer gewaschen. Zusätzlich wurden PBMCs nach der Isolation als unmarkierte Kontrollzellen entnommen. Die PBMCs wurden in 8 mL MACS-Puffer resuspendiert. Nach Zugabe von 2 mL CD14 MicroBeads (human, Miltenyi Biotec) wurde der Ansatz mit einem Rotationsschüttler durchmischt und für 15 min bei 4 °C inkubiert. Die Zellen wurden anschließend einmal für 5 min bei 300 g mit MACS-Puffer gewaschen. Der Überstand wurde abgenommen und in 500 µL MACS-Puffer resuspendiert. Die Suspension wurde im Anschluss durch einen 30 µL Pre-Separation-Filter gefiltert, welcher zuvor mit 500 µL MACS-Puffer befeuchtet wurde. Die Isolation humaner CD14+-PBMCs wurde unter Zuhilfenahme einer LS-Säule (Miltenyi Biotec) vorgenommen. Dazu wurde die Säule zunächst in einen MACS-Halter platziert und mit 3 mL MACS-Puffer äquilibriert. Die Säule wurde dreimal mit 3 mL MACS-Puffer gespült. Der Durchfluss wurde als Negativkontrolle für die CD14+-markierten PBMCs verwendet. Die Säule wurde aus dem MACS-Halter entfernt und ein neues Röhrchen darunter platziert. Im Anschluss wurden 3 mL MACS-Puffer auf die Säule pipettiert und sofort mit dem Stempel ausgedrückt um CD14+-Zellen zu erhalten. Für das weitere Vorgehen (4.16.2) wurden 10 Mio

CD14⁺-Zellen in einem Ansatz, bestehend aus 150 µL ApoC3 beziehungsweise PBS und 50 µL Zellsuspension verwendet.

4.16.2 *Prozedurales Vorgehen*

Das murine, perivaskuläre Carotisschädigungs-Modell wurde nach bereits etablierter Methode durchgeführt (Speer T. et al., 2013). Zu diesem Zweck wurden NOD-SCID oder WT-Mäuse (C57Bl/6) mit Isofluran anästhesiert. Die linke Arteria carotis communis (A. carotis) wurde mit einem bipolaren Microregulator verletzt. Dazu wurde ein elektrischer Strom von 2 W für 2 Sek an jedem Millimeter der A. carotis über eine Länge von exakt 4 mm angelegt. Anschließend wurden CD14⁺ humane PBMCs (4.1) zusammen mit PBS oder ApoC3 (50 µg/mL Blutvolumen) in die Schwanzvene von NOD-SCID Mäusen injiziert. Nach 3 Tagen wurde den Mäusen zur Perfusion eine 5 %ige Evans Blue-Lösung in die Schwanzvene injiziert, um de-endothelialisierte Bereiche der A. carotis einzufärben. Nach 30 min Inkubation wurden die Mäuse getötet, die A. carotis exzidiert und re-endothelialisierte Bereiche quantifiziert.

4.17 Modell der murinen unilateralen Ureterligatur

4.17.1 *PKH67-Färbung für Zelltransplantationsexperimente*

PBMCs von peripherem Blut gesunder Spender wurden wie bereits beschrieben isoliert (4.1) Anschließend wurden isolierte PBMCs mit einer magnetischen Zellseparation, durch Verwendung von LS Säulen und humanen CD14 Mikrobeads unterzogen (4.16.1). Eine anschließende durchflusszytometrische-Analyse nach einer CD14 PerCp/Cy5.5-Färbung diente zur Reinheitsprüfung von isolierten Zellen. Die separierten humanen CD14⁺ Monocyten wurden mit kommerziell erhältlichem PKH67 Färbe-Kit nach Herstellerangaben immunofluoreszent markiert (Sigma-Aldrich, # MINI67-1KT). Ein Ansatz von $2 \cdot 10^7$ Zellen wurde dazu in ein 50 mL Reaktionsröhrchen überführt und einmal mit MACS-Puffer gewaschen. Danach erfolgte eine Zentrifugation bei 400 g für 5 min und RT. Der Überstand wurde bis auf 25 µL abgenommen. Durch Zugabe und vorsichtiges resuspendieren von 1 mL Diluent C zum Zellpellet wurde eine 2 x Zellsuspension hergestellt. Zur Fluoreszenzfärbung wurden 2 x Zellsuspension mit 2 x Farbstofflösung (4 µL PKH67-Färbelösung in 1 mL Diluent C) hinzugegeben und vorsichtig durchmischt. Nach einer Inkubationszeit von max 5 min und zwischenzeitlichem Durchmischen, wurde die Färbung durch Zugabe von 2 mL 1 % BSA gestoppt. Nach 1 min Inkubation wurde die Suspension bei 400 g für 10 min und RT zentrifugiert. Anschließend erfolgte ein zweimaliges Waschen in MACS-Puffer, wobei die Zellen in PBS aufgenommen wurden. Von den PKH67-markierten Zellen wurden 100 µL zusammen mit 100 µL ApoC3/PBS unverzüglich zur Transplantation (i.v.) in NOD-SCID-Mäuse (4.16.2) verwendet.

4.17.2 Prozedurales Vorgehen

NOD-SCID-Mäuse und WT-Mäuse (C57Bl/6) wurden mit Isofluran anästhesiert. Nach Inzision entlang der tief gelegenen linken Mitte auf abdominaler Seite, wurde der linke Ureter mit 2/0 Prolene Nahtmaterial ligiert. Anschließend wurden 10^7 PKH67-markierte CD14+ humane Monocyten, zusammen mit PBS oder ApoC3 (50 µg/mL Blutvolumen) in die Schwanzvene von NOD-SCID Mäusen injiziert. Nach einer Woche wurden die Mäuse euthanasiert und die geschädigte Nieren für histologische Analysen entnommen. Nach dem Eindecken von Kryoschnitten mit DAPI-versetztem Eindeckmedium, wurde die Anzahl von PKH67+-Zellen durch zwei unabhängige Untersuchende quantifiziert. Des Weiteren wurden dilatierte Tubuli in Hämatoxylin/Eosin-gefärbten Ausschnitten (5.39) als der Anteil dilatierter Tubuli, verglichen zum gesamten Oberflächenareal unter Verwendung der Software Image J quantifiziert.

4.18 Proteomanalyse

Die proteomische Analyse nativer Lipoproteine wurde vom Labor von Prof. Dr. Vera Jankowski, Institut für Molekulare Herz Kreislaufforschung („Institute for Molecular Cardiovascular Research IMCAR“) in Aachen durchgeführt.

4.19 Hochgeschwindigkeit Fluoreszenz-Mikroskopie

Die Mikroskopische Co-Lokalisationsanalyse von TLR2 und TLR4 nach ApoC3 Stimulation, sowie die dazu vorab nötige Co-Transfektion der HEK-Zellen mit pcDNA3-Tlr2-CFP oder pcDNA3-Tlr4-YFP Konstrukten, wurde durch die Zusammenarbeit mit Dr. Dalia Alansary und Prof. Dr. Barbara Niemeyer aus dem Center for Integrative Physiology and Molecular Medicine (CIPMM) der Universität des Saarlandes ermöglicht. 24 h nach der Transfektion (2.13) wurden die HEK-Zellen mit 50 µg/mL ApoC3 oder zur Kontrolle mit PBS für 1 h in Serum-freiem Medium bei 37 °C inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen mit Ringerlösung gewaschen und in Ringer-Puffer mit einem Cell Observer High Speed (Zeiss) Mikroskop aufgenommen, ausgestattet mit einem 40 x Ölfluor (N.A.1.3) Objektiv, CFP (Semrock HC), YFP (Zeiss) Einzelband-Filter 420, 505 nm und weißem LED Licht (Colibri, Zeiss), sowie einer evolve 512 EMCCD Kamera (Photometrics).

4.20 Statistik

Die statistischen Analysen wurden mittels GraphPad PRISM 5.0, SPSS und STATA durchgeführt. Soweit nicht anders angegeben, wurden die Ergebnisse als Mittelwert±SEM dargestellt. Dabei wurde der *One-Way* ANOVA zur statistischen Varianz-Analyse verwendet. Als *Post-hoc-Test*, zum Abgleich von Mehrfachvergleichen bei Analysen von >2 Gruppen, wurde der *Dunnet's multiple comparison Test* verwendet. Der zweiseitig, unabhängige t-Test wurde angewendet, um das Signifikanz-Level zwischen zwei normalverteilten, unverbundenen

Gruppen zu überprüfen. Alle Messungen wurden von unterschiedlichen Stichproben entnommen und zweiseitige P-Werte angegeben mit * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$.

5 Ergebnisse

5.1 IL-1 β -Sekretion humaner PBMCs nach Lipoprotein-Stimulation

Zunächst wurden humane PBMCs mit den Lipoproteinen HDL, LDL und VLDL inkubiert. LPS diente als Kontrolle. Die **Abb. 6** zeigt einen Anstieg der IL-1 β Level in Überständen von PBMCs nach VLDL-Stimulation. Hingegen bewirkt eine Stimulation mit nativem HDL oder LDL keine erhöhte IL-1 β Sekretion.

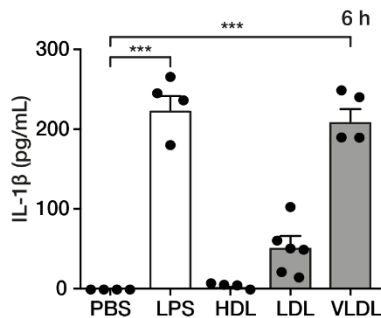


Abb. 6: IL-1 β -Konzentration in PBMCs nach Stimulation mit nativen Lipoproteinen. Gezeigt sind durch ELISA ermittelte IL-1 β -Konzentrationen in Überständen von PBMCs nach Stimulation mit LPS (10 ng/mL, 6h), HDL, LDL und VLDL (50 μ g/mL, 6 h) (N=4). ***, P<0.001 verglichen zu PBS behandelten PBMCs. (Abb. entnommen aus Zewinger et al. Nat Immunol 2020).

Durch eine Delipidierung von VLDL konnte untersucht werden, ob die Lipid- oder Proteinfraktion von VLDL für die IL-1 β -stimulierende Wirkung von VLDL in PBMCs verantwortlich ist. Die IL-1 β Level im Überstand von PBMCs, nach Stimulation mit nativem VLDL und delipidiertem VLDL, sind dabei vergleichbar (**Abb. 7**).

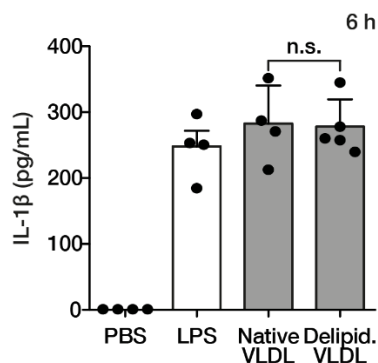


Abb. 7: IL-1 β -Konzentrationen in PBMCs nach Stimulation mit nativem VLDL oder delipidiertem VLDL. Zu sehen sind durch ELISA ermittelte IL-1 β -Konzentrationen in Überständen von PBMCs nach Stimulation mit LPS (10 ng/mL, 6h), nativem VLDL und delipidiertem VLDL (50 μ g/mL, 6 h) (N=4-5). (Abb. entnommen aus Zewinger et al. Nat Immunol 2020).

Durch Proteomanalysen von VLDL-Partikeln konnten ApoC3, ApoE und ApoC2 als die häufigsten in VLDL enthaltenen Proteine nachgewiesen werden (Lepedda A.J. et al., 2013). Daher wurden PBMCs mit diesen Apolipoproteinen inkubiert. Dabei konnte lediglich nach einer

Inkubation mit ApoC3 eine signifikante Erhöhung des IL-1 β -Levels im Überstand von PBMCs nachgewiesen werden (**Abb. 8**).

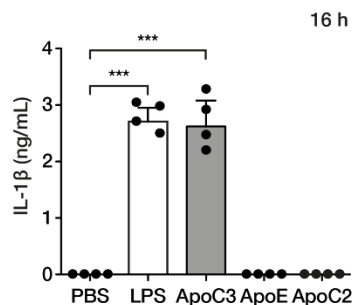


Abb. 8: IL-1 β -Konzentrationen in PBMCs nach Apolipoprotein-Inkubation. Gezeigt sind durch ELISA ermittelte IL-1 β -Konzentrationen in Überständen von PBMCs nach Stimulation mit LPS (10 ng/mL, 16 h), ApoC3, ApoE oder ApoC2 (50 μ g/mL, 16 h) (N=4). (Abb. entnommen aus Zewinger et al. Nat Immunol 2020).

5.2 Western Blot Nachweis von ApoC3 in nativen HDL, LDL und VLDL Lipoprotein-Präparationen

Um ApoC3 in unterschiedlichen HDL, LDL und VLDL Lipoprotein-Präparationen nachzuweisen, wurden die Lipoproteine mittels SDS-Page aufgetrennt. Durch anschließenden Western Blot-Transfer und Antikörper-Inkubation konnte ApoC3 in allen sechs VLDL-Präparationen detektiert werden (**Abb. 9**). Hingegen wiesen die Lipoprotein-Präparationen von nativem HDL und LDL in allen Fällen eine sehr schwache oder keine ApoC3-Bande auf.

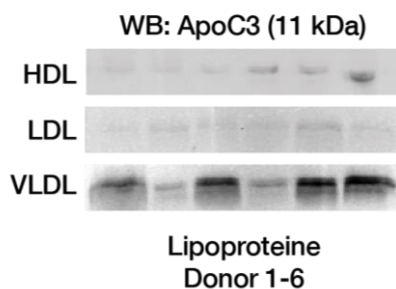
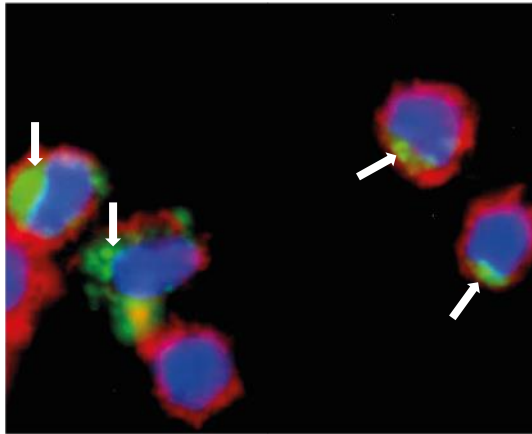


Abb. 9: Western Blot Nachweis von ApoC3 aus repräsentativen HDL, LDL und VLDL Lipoprotein-Aufreinigungen. Die Lipoprotein-Präparationen von VLDL, HDL und LDL wurden zu 5 μ g aufgetragen. Lipoprotein-Aufreinigungen von jeweils sechs gesunden Probanden (N=6). (Abb. entnommen aus Zewinger et al. Nat Immunol 2020).

5.3 Immunozytologische Detektion von Atto 488-markiertem ApoC3 in PBMCs

Zur Aufklärung der *in vitro* Internalisierung von ApoC3 in humanen PBMCs wurden diese einer Atto-488-Färbung unterzogen (2.21.2). Nach erfolgreicher Internalisierung in PBMCs konnte ApoC3 mittels Fluoreszenz-Mikroskopie detektiert werden. Die **Abb. 10** zeigt PBMCs nach einer Inkubationszeit von 30 min mit Atto-488-markiertem ApoC3. Das grün-fluoreszierende ApoC3 ist dabei deutlich im Zytoplasma der Zellen zu sehen.



ApoC3 **DAPI** **Phalloidin**

Abb. 10: Zytoplasmatisches ApoC3 in PBMCs. Die weißen Pfeile zeigen auf Atto-488-markiertes ApoC3 (50 µg/mL, 30 min, grün) im Zytoplasma von PBMCs. Das Aktin-Zytoskelett wurde zusätzlich mit Phalloidin (rot), sowie der Zellkern mit DAPI (blau) gefärbt (Repräsentative Aufnahme von N=3 unabhängigen Experimenten). (Abb. entnommen aus Zewinger et al. Nat Immunol 2020).

5.4 Analyse der Sezernierung von Zytokinen nach konzentrationsabhängiger ApoC3-Stimulation von PBMCs

Zur Untersuchung eines proinflammatorischen Effektes, durch die Inkubation von PBMCs mit einer aufsteigenden ApoC3-Konzentration, wurden die IL-1 β -Konzentrationen mittels ELISA im Überstand gemessen (**Abb. 11 A**). Zudem wurden die Konzentrationen der Inflammasom-unabhängig sezernierten Zytokine IL-6 und TNF nach einer konzentrationsabhängigen Inkubation mit ApoC3 im Überstand von PBMCs untersucht (**Abb. 11 B, C**). Nach einer ApoC3-Stimulation konnte in allen Fällen ein konzentrationsabhängiger Anstieg von IL-1 β , als auch IL-6 und TNF- α im Überstand von PBMCs gemessen werden.

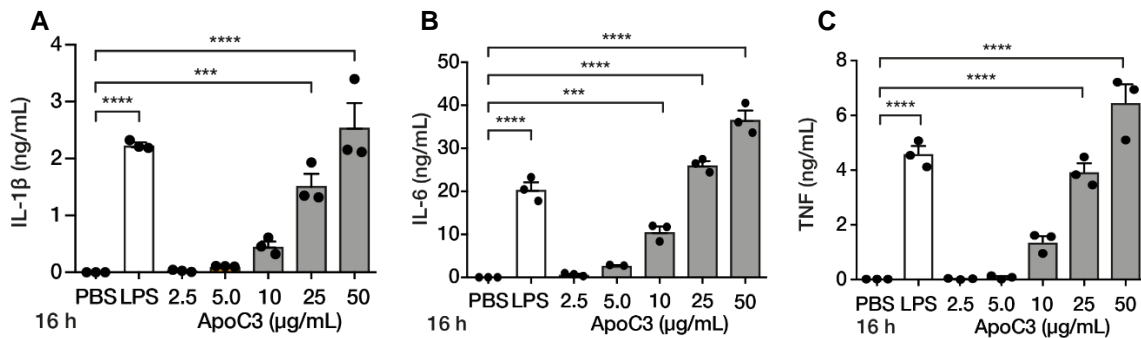


Abb. 11: IL-1 β -, IL-6- und TNF- α -Konzentration in PBMCs nach ApoC3-Stimulation. Gezeigt sind die ermittelten Konzentrationen von IL-1 β (A), IL-6 (B) und TNF- α (C) im Überstand von PBMCs nach einer Stimulation mit ApoC3 in aufsteigenden Konzentrationen (2.5 $\mu\text{g/mL}$, 5 $\mu\text{g/mL}$, 10 $\mu\text{g/mL}$, 50 $\mu\text{g/mL}$, 16 h), sowie nach LPS-Inkubation (10 ng/mL). Als Negativkontrolle wurde PBS verwendet. Gemessen durch ELISA (N=3). ***, P<0.001; ****, P<0.0001 verglichen zu PBS behandelten PBMCs. (Abb. entnommen aus Zewinger et al. Nat Immunol 2020).

5.5 Untersuchung des zeitabhängigen Anstiegs der IL-1 β -Konzentration nach ApoC3-Stimulation

Abb. 12 zeigt den Effekt unterschiedlicher Inkubationszeiten mit ApoC3 auf die IL-1 β -Konzentrationen im Zellkulturüberstand (1, 3, 6, 24 h). Dabei steigt die IL-1 β -Konzentration, nach der Stimulation mit ApoC3 und LPS-Priming bis zu dem Zeitpunkt von 6 h stetig an und stagniert bis zum abschließend betrachteten Zeitpunkt von 24 h. Bei ungeprimten PBMCs setzt die IL-1 β Sekretion nach ApoC3-Stimulation erst nach 3 h ein.

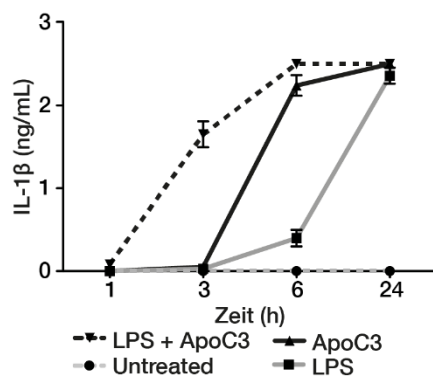


Abb. 12: Konzentrations- und zeitabhängige IL-1 β -Konzentration in PBMCs. Gezeigt ist ein Zeitverlaufsexperiment zur Untersuchung der IL-1 β -Konzentration im Überstand von PBMCs nach Stimulation mit LPS (10 ng/mL) oder ApoC3 (50 $\mu\text{g/mL}$), mit und ohne LPS-Priming (10 ng/ μL , 3 h) über die Zeit (1 h, 3 h, 6 h, 24 h). Als Negativkontrolle wurde PBS verwendet. Gemessen mit ELISA (N=4). (Abb. entnommen aus Zewinger et al. Nat Immunol 2020).

5.6 Reinheitsanalyse von ApoC3.

Um die Reinheit von kommerziell erhältlichem ApoC3 zu überprüfen, wurde dieses einer Proteom-Analyse unterzogen. Dabei konnte jegliche Kontamination mit anderen Proteinen ausgeschlossen werden. Die Wirksamkeit von eigens, aus humanem Plasma, isoliertem ApoC3, wurde mit dem in der Studie verwendeten ApoC3 verglichen. Dazu wurden humane

PBMCs wie zuvor mit aufgereinigtem ApoC3 inkubiert. Die IL-1 β -stimulierende Wirkung von aufgereinigtem ApoC3 (**Abb. 13**) war mit dem Effekt von kommerziell erworbenem ApoC3 übereinstimmend. Zudem konnte keine veränderte Wirkung in Anwesenheit von Polymyxin B, einem Lipopolysaccharid-bindenden Polypeptid-Antibiotikum, festgestellt werden (**Abb. 14**). Somit wurde eine relevante Endotoxin-Kontamination des verwendeten ApoC3 ausgeschlossen.

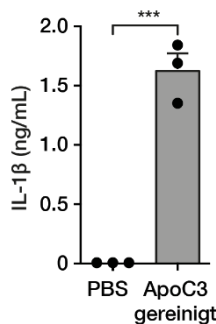


Abb. 13: IL-1 β -Konzentration nach Stimulation mit aufgereinigtem ApoC3. Durch ELISA ermittelte IL-1 β -Konzentration im Überstand humaner PBMCs nach Inkubation (16 h) mit 50 μ g/mL eigens aufgereinigtem ApoC3 aus humanem Plasma. (N=3). (Abb. entnommen aus Zewinger et al. Nat Immunol 2020).

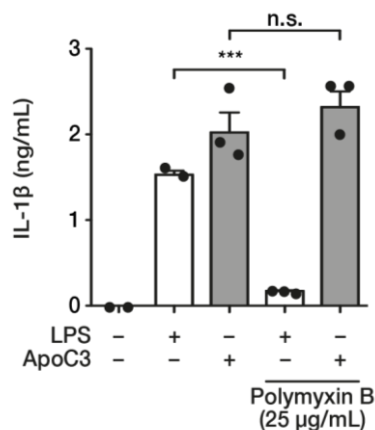


Abb. 14: IL-1 β -Konzentration in Anwesenheit von Polymyxin B. Quantifizierte IL-1 β -Konzentration im Überstand humaner PBMCs nach einer Stimulation mit LPS (10 ng/mL) oder ApoC3 (50 μ g/mL, 16 h) in Anwesenheit von Polymyxin B (25 μ g/mL). Gemessen mit ELISA (N=2-3). (Abb. entnommen aus Zewinger et al. Nat Immunol 2020).

5.7 Western Blot Nachweis von NLRP3-vermittelter IL-1 β - und Caspase-1-Freisetzung nach ApoC3-Stimulation

Eine ApoC3-vermittelte NLRP3-Inflammasom-Aktivierung wurde durch die Freisetzung von IL-1 β und Caspase-1 aus dem Zytosol von PBMCs in den Überstand untersucht. Als Nachweis einer wirksamen Aktivierung wurden die zu untersuchenden Proteine vor und nach der Stimulation im Zelllysate und Überstand mittels Western Blot und anschließender Antikörperinkubation detektiert. In den oberen Lysat-Banden der **Abb. 15** sind deutliche Banden von Pro-IL-1 β und Pro-Caspase-1, nach Stimulation mit ApoC3, mit und ohne LPS-

Priming zu sehen. Ebenfalls sind nach einer ApoC3-Stimulation, mit und ohne LPS-Priming, die jeweils prozessierten Formen von IL-1 β und Caspase-1 als Banden im Überstand von PBMCs detektierbar.

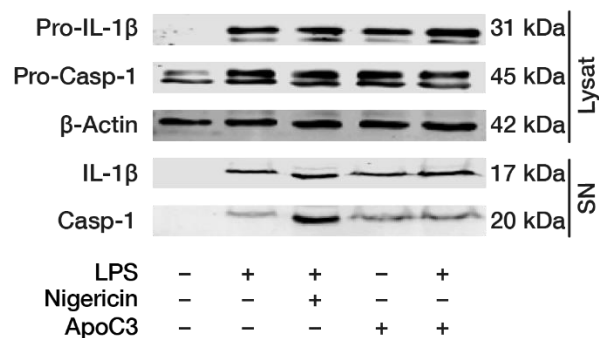


Abb. 15: IL-1 β und Caspase-1 in PBMCs. Western Blot Nachweis von Pro-IL-1 β (31 kDa) und Pro-Caspase-1 (45 kDa) im Zelllysat, sowie IL-1 β (17 kDa) und Caspase-1 im Überstand von PBMCs nach Stimulation mit ApoC3 (50 ng/mL, 16 h) mit und ohne LPS-Priming (10 ng/mL, 3 h). Als Positivkontrolle wurde Nigericin (10 μ M, 1 h) nach LPS-Priming (10 ng/mL, 3 h), eingesetzt. β -Aktin wurde als Ladekontrolle verwendet (Repräsentativer Western Blot von mindestens N=3 unabhängigen Experimenten). (Abb. entnommen aus Zewinger et al. Nat Immunol 2020).

5.8 Überprüfung der Inflammasom-vermittelten Aktivierung der Caspase-1- und IL-1 β -Sekretion durch ApoC3-Stimulation

Eine Beteiligung des NLRP3-Inflammasoms bei der IL-1 β -Sekretion in PBMCs wurde durch eine Inkubation mit dem irreversiblen Caspase-1-Inhibitor Z-YVAD-FMK vor der Stimulation mit ApoC3 getestet. In der **Abb. 16** ist eine signifikante Abnahme der IL-1 β -Sekretion, nach Verwendung von zyVAD und anschließender Stimulation mit ApoC3, verglichen zur ApoC3-Stimulation, mit und ohne LPS-Priming gezeigt.

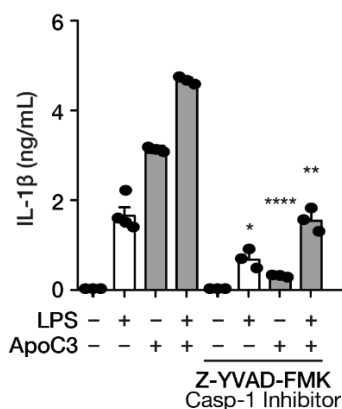


Abb. 16: IL-1 β -Konzentration in PBMCs nach Blocken der Caspase-1-Aktivität. Durch ELISA gemessene IL-1 β -Konzentration nach irreversiblen Blocken von Caspase-1 in humanen PBMCs mit Z-YVAD (20 μ M) und nachfolgender Stimulation mit ApoC3 (50 μ g/mL, 16 h), mit und ohne LPS-Priming (10 ng/mL, 3h) (N=3-4). *, P<0.05; **, P<0.01; ****, P<0.0001 verglichen zu PBMCs in Abwesenheit von Z-YVAD-FMK. (Abb. entnommen aus Zewinger et al. Nat Immunol 2020).

5.9 Untersuchung der ApoC3-vermittelten NLRP3-Aktivierung in murinen Makrophagen

In isolierten murinen BMDMs von *Nlrp3*^{-/-} oder *Casp1*^{-/-} Mäusen wurde eine Beteiligung der ApoC3-vermittelten NLRP3-Aktivierung untersucht. Insgesamt ist die gemessene IL-1 β -Konzentration im Überstand muriner Makrophagen im Vergleich zu humanen PBMCs 10-fach reduziert (**Abb. 17**).

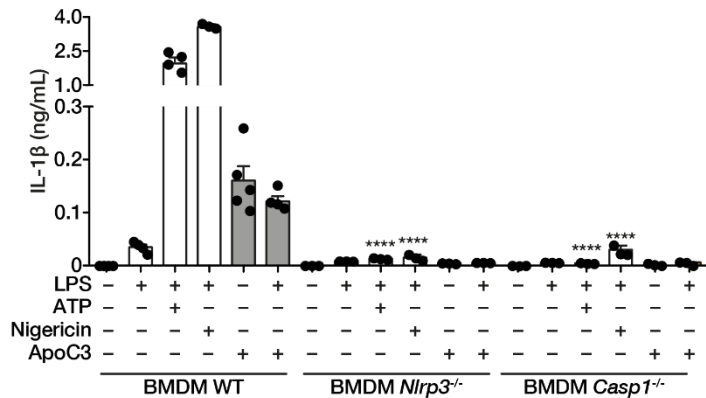


Abb. 17: IL-1 β -Konzentration in *Nlrp3*^{-/-} und Caspase-1-deletierten BMDMs. Ermittelte IL-1 β -Konzentration im Überstand von *Nlrp3*^{-/-} oder Caspase-1^{-/-}-BMDMs nach ApoC3-Stimulation (50 μ g/mL, 16 h) mit und ohne LPS-Priming (100 ng/mL, 3 h). Als Positivkontrolle wurden ATP (5 mM, 1 h) und Nigargin (10 μ M, 1 h) nach LPS-Priming eingesetzt. Gemessen mit ELISA (N=3-5). ****, P<0.0001 verglichen zu BMDMs von WT-Mäusen. (Abb. entnommen aus Zewinger et al. Nat Immunol 2020).

5.10 Überprüfung von LDH-Freisetzung humaner PBMCs als Antwort auf eine ApoC3-vermittelte Stimulation

Zum Ausschluss eines pyroptischen Effektes in PBMCs nach Inkubation mit ApoC3 wurde ein LDH (Laktatdehydrogenase) Release-Assay durchgeführt (**Abb. 18**). Dabei konnte keine LDH-Freisetzung in den Überstand von PBMCs nach einer Stimulation mit ApoC3 nachgewiesen werden. Eine Inkubation mit der Positivkontrolle ATP induzierte hingegen eine deutliche Freisetzung von LDH. Folglich lässt sich eine pyroptische Wirksamkeit des verwendeten ApoC3 ausschließen.

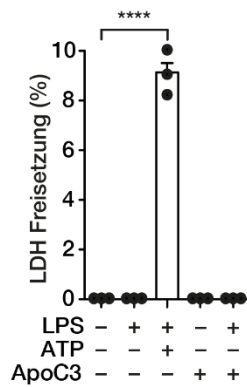


Abb. 18: LDH-Aktivität im Überstand von PBMCs. Zu sehen ist der gemessene LDH-Level im Überstand von PBMCs nach einer Inkubation mit LPS (10 ng/mL, 16 h), ApoC3 (50 µg/mL, 16 h), sowie ApoC3 nach LPS-Priming (10 ng/mL, 3 h). ATP (5 mM, 16 h) nach LPS-Priming (10 ng/mL, 3 h) wurde als Positivkontrolle verwendet (N=3). ****, $P < 0.0001$ verglichen zu PBS behandelten PBMCs. (Abb. entnommen aus Zewinger et al. Nat Immunol 2020).

5.11 Analyse einer ApoC3-induzierten ASC Specks-Bildung

Als Folge einer klassischen NLRP3-Aktivierung und der damit einhergehenden Phosphorylierung des Adaptor-Proteins ASC ist bereits die Bildung von *Speck* ähnlichen ASC-Aggregaten beschrieben. Die Anwesenheit von *ASC-Specks* kann folglich als Hinweis für eine klassische Aktivierung von NLRP3 herangezogen werden (Hara H. et al., 2013). Es wurde deshalb eine Fluoreszenzfärbung von ASC nach ApoC3-Stimulation von PBMCs durchgeführt. Die **Abb. 19** zeigt, dass nach einer Inkubation mit ApoC3 keine *ASC Specks* in den PBMCs vorliegen. Nach einer Inkubation mit dem klassischen NLRP3-Stimulus Nigericin nach LPS-Priming kann hingegen eine Bildung von *ASC Specks* nachgewiesen werden.

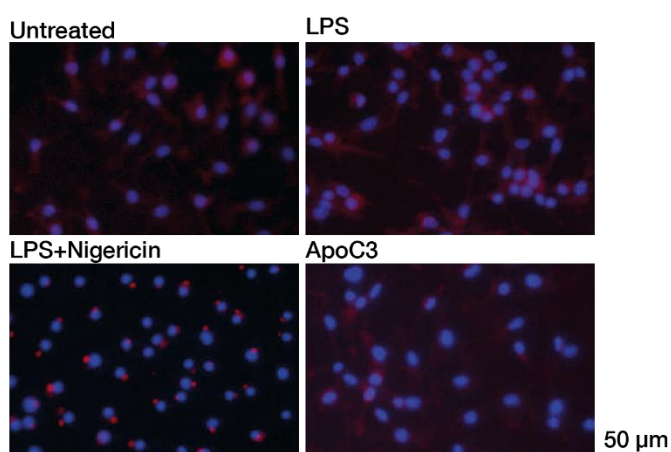


Abb. 19: Immunofluoreszenz-Färbung von ASC in PBMCs. Repräsentative fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von PBMCs zur Detektion von *ASC Specks* (rot) nach einer Inkubation mit LPS (10 ng/mL), sowie ApoC3 (50 µg/mL, 16 h) und Nigericin (10 µM) nach LPS-Priming (10 ng/mL, 3 h). Zellkerne von PBMCs wurden durch DAPI (blau) visualisiert. (Repräsentative Aufnahme von N=3 unabhängigen Experimenten). (Abb. entnommen aus Zewinger et al. Nat Immunol 2020).

5.12 Analyse der Kalium-Abhängigkeit von ApoC3 vermittelter IL-1 β -Freisetzung

Kalium-Efflux ist ein bekannter Effekt in der NLRP3-vermittelten IL-1 β -Sekretion und folglich ein wichtiger Nenner bei der Inflammasom-Aktivierung. Um einen möglichen Einfluss von Kalium-Efflux bei der ApoC3-vermittelten IL-1 β -Sekretion zu überprüfen, wurden PBMCs in Anwesenheit von Kalium mit ApoC3 inkubiert. Die Anwesenheit einer physiologisch relevanten Kalium-Konzentration im Medium von PBMCs hat bei gleichzeitiger Inkubation mit LPS oder ApoC3 keinen Effekt auf die IL-1 β -Sekretion in PBMCs (**Abb. 20**).

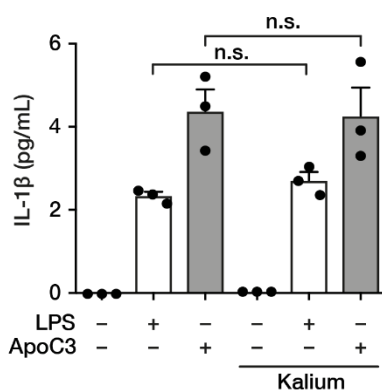


Abb. 20: IL-1 β -Konzentration nach ApoC3-Stimulation in Anwesenheit von Kalium. Zu sehen sind die ermittelten IL-1 β -Level nach einer Inkubation von PBMCs mit LPS (50 μ g/mL, 16 h) oder ApoC3 (50 μ g/mL, 16 h) in Anwesenheit von Kalium (30 mM). Gemessen durch ELISA. (N=3). (Abb. entnommen aus Zewinger et al. Nat Immunol 2020).

5.13 Analyse der Caspase-8 Involvierung in ApoC3 vermittelter NLRP3-Aktivierung

Als Antwort der LPS-vermittelten Inflammasom-Aktivierung, wurde kürzlich gezeigt, dass humane PBMCs auch einen alternativen Weg, unabhängig von Kalium-Efflux oder Pyroptose aufweisen. Dabei ist TLR-abhängiges Signalling durch TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β (TRIF), Receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 1 (RIPK1) und Caspase-8 involviert (Gaidt M.M. et al., 2016). **Abb. 21 A** zeigt, dass eine ApoC3-Stimulation mit und ohne LPS-Priming zu einem Cleavage von Caspase-8 führt. Durch eine katalytische Inhibition von Caspase-8 wird die ApoC3 vermittelte IL-1 β -Sekretion signifikant reduziert (**Abb. 21 B**). Des Weiteren reduziert eine spezifische Inhibition von RIPK1 und TRIF die IL-1 β -Sekretion von PBMCs als Antwort auf eine Stimulation mit ApoC3 (**Abb. 21 C**).

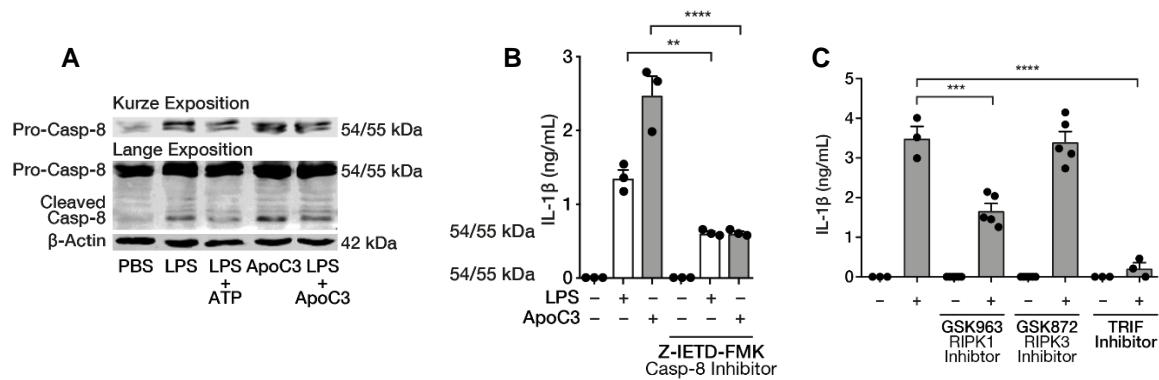


Abb. 21: Caspase-8 in humanen PBMCs nach Stimulation mit ApoC3. (A) Pro-Caspase-8 (54/55 kDa) und Cleaved-Caspase-8 (42 kDa) nach Inkubation mit LPS (10 ng/mL, 16 h), ATP (5 mM, 16 h) nach LPS-Priming (10 ng/mL, 3 h), ApoC3 (50 µg/mL, 16 h) und ApoC3 (50 µg/mL, 16 h) nach LPS-Priming (10 ng/mL, 3 h). Visualisiert durch Antikörper-Inkubation nach Western Blot-Transfer (B) IL-1β-Konzentration im Überstand von PBMCs nach ApoC3-Stimulation und Vorinkubation mit Z-IETD-FMK (5 µM) (Caspase-8-Blocker). (C) PBMC-Stimulation mit ApoC3 (50 µg/mL, 16 h) unter Anwesenheit des RIPK1 Inhibitors GSK963 (3 µM), dem RIPK3 Inhibitor GSK872 (3 µM) oder TRIF inhibitory peptide (25 µM). (B) und (C) gemessen mit ELISA (N=3-5). **, P<0.01; ***, P<0.001; ****, P<0.0001 verglichen zu PBMCs in der Abwesenheit von entsprechenden Inhibitoren. (Abb. entnommen aus Zewinger et al. Nat Immunol 2020).

5.14 Inhibition ApoC3 vermittelter NFκB-Phosphorylierung

Aufgrund der LPS-ähnlichen Wirkung von ApoC3 auf die IL-1β-Sekretion in PBMCs, ist die Signalvermittlung über eine TLR-abhängige Effektorwirkung wahrscheinlich. Um die Induktion von NF-κB-vermittelter Transkription nach einer ApoC3-Stimulation zu untersuchen, wurden PBMCs zusätzlich mit dem NFκB Inhibitor Bay11-7082 inkubiert. Ein Blocken mit Bay11-7082 (**Abb. 22**) bewirkt eine signifikante Reduktion der IL-1β-Level im Überstand von PBMCs nach einer Stimulation mit ApoC3.

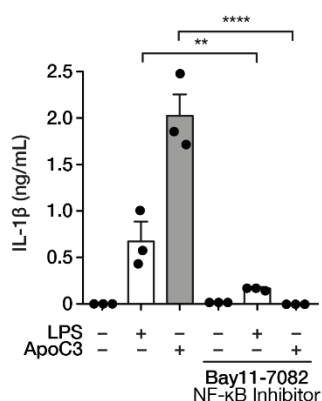


Abb. 22: IL-1β-Konzentration in PBMCs nach Inhibition der NFκB-Phosphorylierung. IL-1β-Konzentration im Überstand von PBMCs unter Anwesenheit von Bay11-7082 (10 µM, 1 h) nach Stimulation mit ApoC3 (50 µg/mL, 16 h), mit und ohne LPS-Priming (10 ng/µL, 3 h). Gemessen mit ELISA (N=3). **, P<0.01; ****, P<0.0001 verglichen zu PBMCs in Abwesenheit von Bay11-7082. (Abb. entnommen aus Zewinger et al. Nat Immunol 2020).

5.15 Effekt von ApoC3 auf kanonische NFκB-Aktivierung und Phosphorylierung von MAPK in humanen PBMCs

Durch die zeitabhängige ApoC3-Stimulation konnte eine Phosphorylierung von am NFκB Signalweg beteiligten MAPK-Signaltransduktionskinasen der NFκB-Aktivierung in Western Blot-Lysaten (**Abb. 23**) nachgewiesen werden. Im Zeitverlauf ist ein deutlicher Anstieg der jeweils phosphorylierten Proteine p-p65, p-p38, p-42/44 ERK, p-SAPK/JNK über den Inkubationszeitraum von 60 min zu sehen.

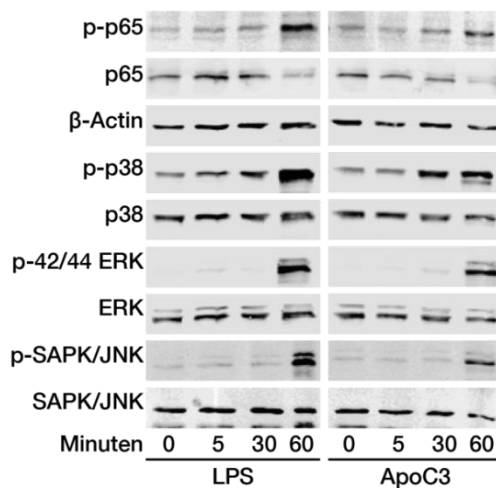


Abb. 23: MAPK in PBMCs nach zeitabhängiger ApoC3-Stimulation. Antikörper-Detektion nach Western Blot-Transfer von p-p65, p-p38, p-42/44 ERK, p-SAPK/JNK sowie p-p65, p-p38, p-42/44 ERK, p-SAPK/JNK nach zeitabhängiger Stimulation (0 min, 5 min, 30 min, 60 min) mit ApoC3 (50 µg/mL) oder LPS (10 ng/mL). Als Ladekontrolle wurde zusätzlich β-Aktin verwendet (Repräsentativer Western Blot von mindestens N=3 unabhängigen Experimenten). (Abb. entnommen aus Zewinger et al. Nat Immunol 2020).

5.16 ApoC3 als Priming-Ligand der klassischen NLRP3-Aktivierung

Um zu prüfen, ob eine Vorinkubation mit ApoC3 den gleichen Priming-Effekt der klassischen Inflammasom-Aktivierung liefert wie LPS, wurden PBMCs nach ApoC3-Priming mit dem etablierten NLRP3-Stimulus Nigericin inkubiert. Dabei wurde eine deutliche Zunahme der IL-1β-Konzentration im Überstand von PBMCs gemessen (**Abb. 24**).

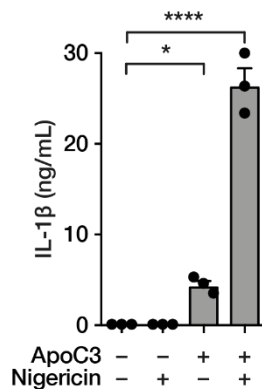


Abb. 24: IL-1 β -Konzentration nach Priming mit ApoC3. IL-1 β -Level im Überstand von PBMCs nach Priming mit ApoC3 (50 μ g/mL, 3 h) und anschließender Nigericin-Stimulation (1 μ M, 1 h). Gemessen durch ELISA (N=3). *, P<0.5; ****, P<0.0001 verglichen zu PBS behandelten PBMCs. (Abb. entnommen aus Zewinger et al. Nat Immunol 2020).

5.17 FACS-Nachweis der TLR2/4-abhängigen Internalisierung von ApoC3

Durch eine Inkubation mit Atto-488-markiertem ApoC3 sollte die Aufnahme von ApoC3 in TLR2 oder TLR4 Plasmid-transfizierten HEK293-Zellen überprüft werden. Gezeigt in **Abb. 25** ist eine FACS-Messung von Atto488-markiertem ApoC3 in Tlr2 und Tlr4 HEK293-Zellen. Dabei ist eine deutliche Erhöhung der Atto-488-Fluoreszenzintensität im Vergleich zu den Mock-Kontrollen zu sehen.

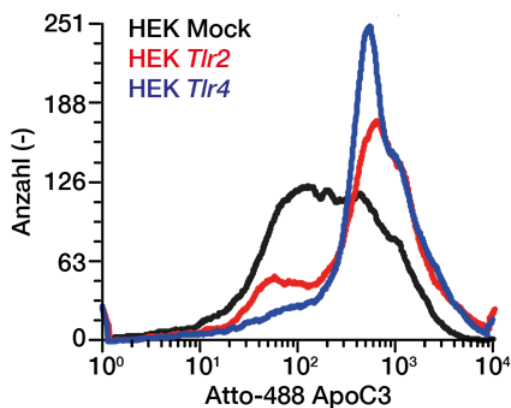


Abb. 25: Fluoreszenzintensität von Atto-488-markiertem ApoC3 in Tlr2 und Tlr4 transfizierten HEK293-Zellen. FACS-Histogramm von Atto-488-markiertem ApoC3 in Tlr-2 und Tlr-4 transfizierten HEK293-Zellen verglichen zu den Kontrollen HEK-Mock (Repräsentatives Histogramm von mindestens N=3 unabhängigen Experimenten). (Abb. entnommen aus Zewinger et al. Nat Immunol 2020).

5.18 Aufklärung des Effektes von ApoC3 auf die Aktivierung von TLR4

Um zu untersuchen, welcher TLR-Rezeptor durch ApoC3 aktiviert wird, wurden PBMCs vor einer Stimulation durch ApoC3 mit anti-TLR2- oder anti-TLR4 Blocking-Antikörpern inkubiert. Der Einsatz eines anti-TLR4 Blocking-Antikörpers verringerte signifikant die IL-1 β -Konzentration im Überstand von PBMCs verglichen zu einer ApoC3-Stimulation ohne Blocker sowohl mit als auch ohne LPS-Priming (**Abb. 26**). Mit geringerer Wirksamkeit verringerte

ebenso anti-TLR2 einen Anstieg der IL-1 β -Konzentration verglichen zu der Kontrolle ohne Blockerinkubation.

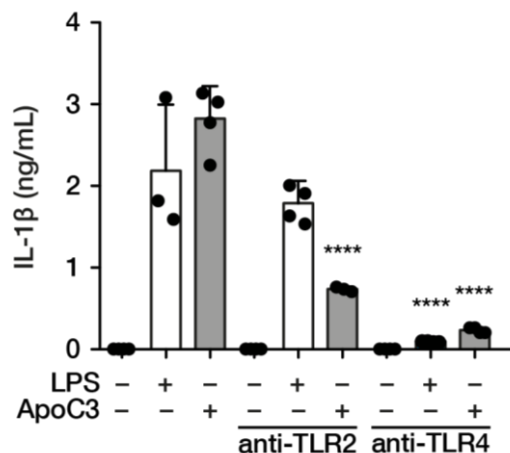


Abb. 26: IL-1 β -Konzentration in PBMCs nach Blocken von TLR2 und TLR4. Gemessene IL-1 β -Konzentration in Anwesenheit von anti-TLR2 (5 μ g/mL, 1 h) und anti-TLR4 (5 μ g/mL, 1 h), vor der Stimulation mit ApoC3 (50 μ g/mL, 16 h) mit und ohne LPS-Priming (10 ng/ μ L, 3 h). Gemessen mit ELISA (N=2-4). ****, P<0.0001 verglichen zu PBMCs in Abwesenheit von Blockier-Antikörpern. (Abb. entnommen aus Zewinger et al. Nat Immunol 2020).

Die Spezifität der eingesetzten Blocking-Antikörper anti-TLR2, anti-TLR4, sowie anti-TLR1, und anti-TLR6, wurde nach LPS- (TLR4-Ligand) beziehungsweise Pam3CSK4-(TLR2-Ligand) Stimulation von Tlr4 oder Tlr2 transfizierten HEK293-Blue Reporterzellen, durch ein Quanti-Blue-Assay überprüft. Durch die SEAP-Aktivität der verwendeten Zellen konnte eine TLR-abhängige Aktivierung von NF κ B nachgewiesen werden. Die **Abb. 27** zeigt eine deutlich geringere SEAP-Aktivität für Tlr4-HEK293-Blue Reporterzellen nach LPS-Stimulation mit vorheriger anti-TLR4-Blockierantikörper-Inkubation. Zudem zeigen Tlr2-HEK293-Blue Reporterzellen durch die Stimulation mit Pam3CSK4 unter Anwesenheit von anti-TLR1 und anti-TLR2 eine deutlich verringerte SEAP-Aktivität.

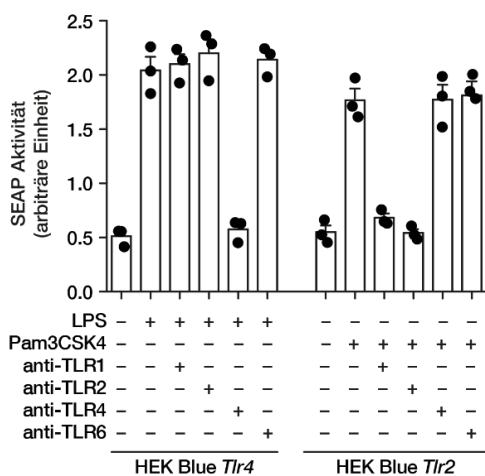


Abb. 27: Spezifität verwendeter TLR-Blockierantikörper. Gemessene SEAP-Aktivität in Tlr2- und Tlr4-HEK293-Blue Reporterzellen nach Stimulation mit LPS (10 ng/mL) oder Pam3CSK4 (300 ng/mL) unter Anwesenheit der verwendeten Blockierantikörper anti-TLR1, anti-TLR2, anti-TLR4 und anti-TLR6 (je 5 μ g/mL) (N=3). (Abb. entnommen aus Zewinger et al. Nat Immunol 2020).

Um eine Beteiligung der TLR2 Co-Rezeptoren TLR1 und TLR6, bei der ApoC3-vermittelten IL-1 β -Sekretion zu überprüfen, wurden PBMCs vor einer Stimulation mit ApoC3 mit anti-TLR1 und anti-TLR6 Blocking-Antikörpern inkubiert (**Abb. 28**). Die IL-1 β -Konzentration nach Stimulation mit ApoC3 ist unter Anwesenheit von anti-TLR1 beziehungsweise anti-TLR6 nicht vermindert.

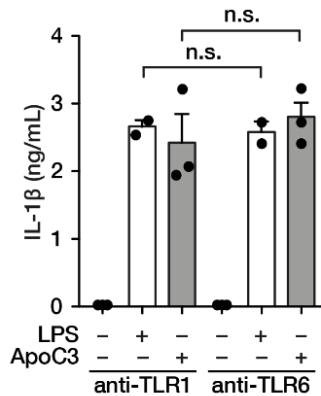


Abb. 28: IL-1 β -Konzentration im Überstand von PBMCs nach Blocken von TLR1 und TLR6. Ermittelte IL-1 β -Konzentrationen im Überstand von PBMCs nach einer Stimulation mit ApoC3 (50 μ g/mL, 16 h) und Vorinkubation mit Blockier-Antikörpern gegen die TLR2-Co-Rezeptoren TLR1 (5 μ g/mL, 1 h) und TLR6 (5 μ g/mL, 1 h). Gemessen mit ELISA (N=2-4). (Abb. entnommen aus Zewinger et al. Nat Immunol 2020).

5.19 Quanti-Blue Nachweis der TLR2/4-abhängigen Aktivierung von NF κ B nach Stimulation mit ApoC3

Durch eine ApoC3-Stimulation von HEK293-Blue Reporterzellen für TLR2 und TLR4 sowie entsprechender HEK293-Blue-Null1 Kontrollzellen konnte eine TLR-abhängige Aktivierung von NF κ B durch eine SEAP-Aktivität nachgewiesen werden. Zur Quantifizierung der SEAP-Aktivität wurde ein Quanti-Blue-Assay durchgeführt. Die **Abb. 29** zeigt eine signifikant gesteigerte SEAP-Aktivität bei Tlr2-HEK293-Blue Reporterzellen, durch eine Stimulation mit dem Tlr2-Stimulus Pam3CSK4. Die Tlr4-HEK293-Blue Reporterzellen zeigen hingegen einen signifikanten Anstieg der SEAP-Aktivität nach einer Stimulation mit ApoC3 mit und ohne LPS-Priming.

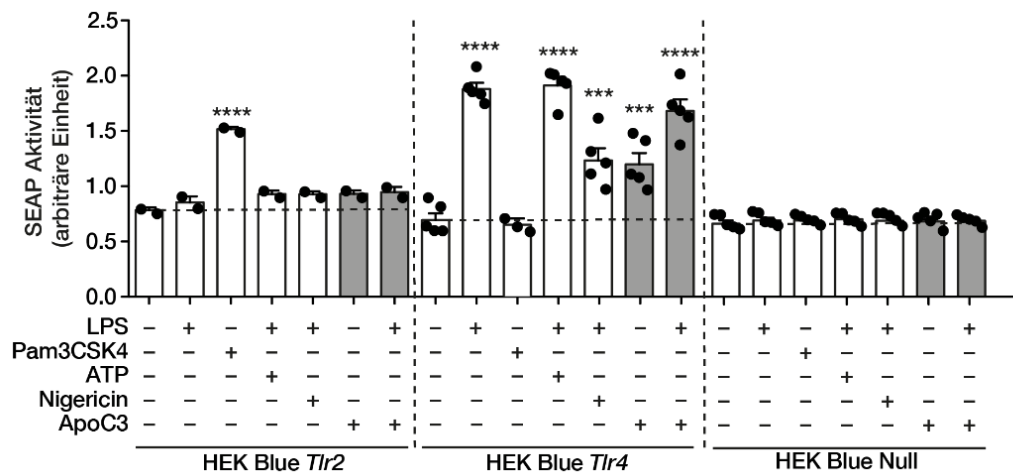


Abb. 29: SEAP-Aktivität in Tlr2 und Tlr4-HEK293-Blue Reporterzellen nach Stimulation mit ApoC3. Gemessene SEAP-Aktivität von Tlr2- und Tlr4-HEK293-Blue Reporterzellen nach Stimulation durch LPS (10 ng/mL, 16 h), Pam3CSK4 (300 ng/mL, 16 h) oder ApoC3 (50 µg/mL, 16 h) mit und ohne LPS-Priming (10 ng/µL, 3 h), verglichen zur Kontrolle HEK293-Blue-Null1. Als Kontrollstimuli der TLR4 vermittelten NF-κB -Aktivierung wurde mit ATP (5 mM) und Nigericin (10 µM) nach LPS-Priming stimuliert (N=3-5). ***, P<0.001, ****, P<0.0001 verglichen zu PBS behandelten HEK293-Zellen. (Abb. entnommen aus Zewinger et al. Nat Immunol 2020).

5.20 Beitrag von TLR2 und TLR4 zur ApoC3-vermittelten NFκB-Aktivierung

Um die individuelle Beteiligung von TLR2 und TLR4 bei der ApoC3-vermittelten NFκB-Aktivierung abschätzen zu können, wurden PBMCs unter Anwesenheit des TLR4-Liganden LPS sowie dem TLR2-Liganden Pam3CSK4 beziehungsweise beiden Liganden gleichzeitig inkubiert. In **Abb. 30** ist eine leichte Zunahme der IL-1β-Konzentration im Überstand von PBMCs nach einer Stimulation mit LPS zu sehen. Hingegen bewirkt eine Stimulation mit Pam3CSK4 lediglich in Kombination mit LPS eine signifikant gesteigerte IL-1β-Konzentration im Überstand von PBMCs.

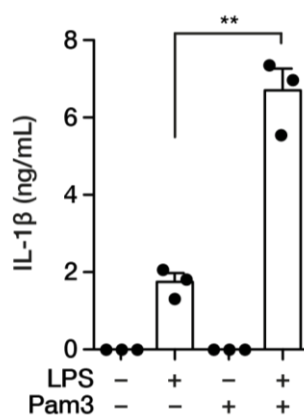


Abb. 30: IL-1β-Level in PBMCs nach Pam3CSK4-Stimulation. Ermittelte IL-1β-Konzentrationen im Überstand von PBMCs nach einer Stimulation mit Pam3CSK4 (300 ng/mL, 16 h) mit oder ohne LPS-Priming (10 ng/mL, 3 h). Gemessen mit ELISA (N=3). (Abb. entnommen aus Zewinger et al. Nat Immunol 2020).

5.21 Analyse der Pam3CSK4 vermittelten IL-1 β - und Caspase-1-Sekretion in PBMCs nach LPS-Priming

Mittels Western Blot wurde das ELISA-Ergebnis aus **Abb. 30** verifiziert. Die in **Abb. 31** gezeigten Antikörperdetektionen von Pro-IL-1 β und Pro-Caspase-1 im Lysat lassen deutliche Banden nach einer Stimulation mit LPS, Pam3CSK4 und Pam3CSK4 nach LPS-Priming erkennen. In den entsprechenden Überständen ist eine schwach ausgeprägte Bande von IL-1 β und Caspase-1 nach LPS-Stimulation zu sehen. Hingegen kann eine deutliche Bande von IL-1 β und Caspase-1 nach der Stimulation mit Pam3CSK4 und LPS-Priming detektiert werden. Kein Signal ist bei der Pam3CSK4-Stimulation ohne LPS-Priming zu sehen.

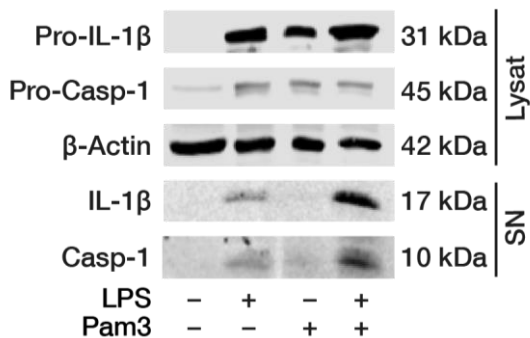


Abb. 31: IL-1 β und Caspase-1 in PBMCs nach Pam3CSK4-Stimulation. Gezeigt ist der Antikörper-Nachweis von Pro-IL-1 β (31 kDa) und Pro-Caspase-1 (45 kDa) im Lysat, sowie IL-1 β (17 kDa) und Caspase-1 (10 kDa) im Überstand nach Western Blot-Transfer. PBMCs wurden mit Pam3CSK4 (300 ng/mL, 16 h) mit und ohne LPS Priming (10 ng/mL, 3 h) stimuliert. Als Ladekontrolle wurde β -Aktin (43 kDa) verwendet (Repräsentativer Western Blot von mindestens N=3 unabhängigen Experimenten). (Abb. entnommen aus Zewinger et al. Nat Immunol 2020).

5.22 Überprüfung des Transfektionserfolges von Tlr2 und Tlr4 Plasmiden in HEK293-Zellen

Die Assoziation von TLR2 zu TLR4 in Form einer Heterodimerisierung wurde weiterhin in HEK293-Zellen aufgeklärt. Um eine erfolgreiche Insertion von Tlr2 und Tlr4 Plasmiden nach einer Transfektion in HEK293-Zellen zu untersuchen, wurden 48 h nach der Transfektion Western Blot-Lysate angefertigt (**Abb. 32**).

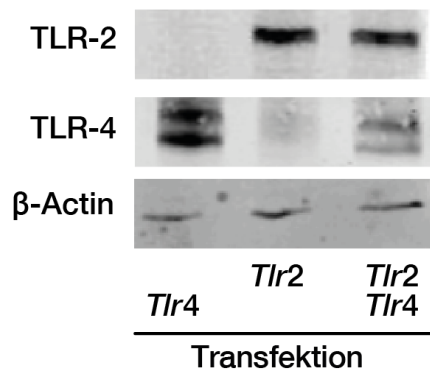


Abb. 32: Tlr2 und Tlr4 in HEK293-Zellen. Antikörperdetektion von TLR2 (90kDa) nach Tlr2 Transfektion und TLR4 (95kDa) nach Tlr4 Transfektion sowie nach Co-Transfektion von Tlr2 und Tlr4 in HEK293-Zellen. Als Ladekontrolle wurde β -Aktin (43 kDa) verwendet (Repräsentativer Western Blot von mindestens N=3 unabhängigen Experimenten). (Abb. entnommen aus Zewinger et al. Nat Immunol 2020).

5.23 Analyse der Co-Lokalisation von TLR2 und 4 nach ApoC3 Stimulation

Um eine Co-Lokalisation von TLR2 und TLR4 in Folge einer ApoC3-Stimulation nachzuweisen, wurden HEK293-Zellen mit transfizierten Plasmid-Vektoren, welche ein Tlr2-CFP- und Tlr4-YFP-Konstrukt exprimieren, verwendet. In unstimulierten Zellen waren die CFP- und YFP-Fluoreszenz vor allem im Zytoplasma lokalisiert, wohingegen nach einer Stimulation mit ApoC3 die CFP- und YFP-Fluoreszenzsignale in der Plasmamembran detektiert werden konnten, was anhand der Co-Lokalisation im Overlay der **Abb. 33** gezeigt ist.

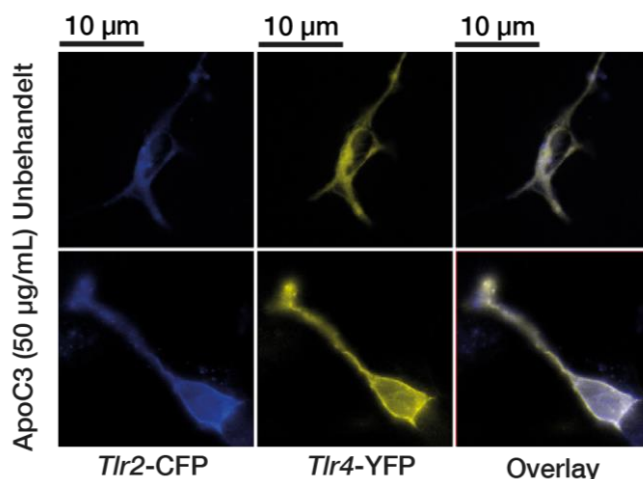


Abb. 33: Tlr2-CFP und Tlr4-YFP-Fluoreszenzsignale nach ApoC3-Stimulation in HEK293-Zellen. Gezeigt sind repräsentative Z-Stacks von HEK293-Zellen, nach einer Co-Transfektion mit pcDNA3-Tlr2-CFP- oder pcDNA3-Tlr4-YFP-Konstrukten nach einer Stimulation mit ApoC3 (50 μ g/ μ L, 1 h) oder PBS. (Abb. entnommen aus Zewinger et al. Nat Immunol 2020).

5.24 Analyse der IL-1 β -Freisetzung durch die Anwesenheit von Ca²⁺-Chelatoren und Inhibition des Ca²⁺-aktivierten Ionenkanals TRPM2

Um den Mechanismus der ApoC3-vermittelten, intrazellulären Signaltransduktion weiter aufzuklären, wurde eine mögliche Relevanz erhöhter Ca²⁺-Level für den

Konzentrationsanstieg von IL-1 β im Überstand von PBMCs untersucht. Dazu wurden PBMCs nach Vorinkubation mit dem Zellmembran-permeablen Ca²⁺-Chelator BAPTA-AM und EGTA inkubiert. Nach einer Stimulation mit ApoC3 wurde IL-1 β im ELISA gemessen. Zu sehen in **Abb. 34 A** ist eine signifikant reduzierte IL-1 β -Konzentration im Überstand von PBMCs nach Vorinkubation mit BAPTA-AM. Unter Anwesenheit von EGTA ist kein IL-1 β im Überstand messbar. Um die Herkunft freigesetzter Ca²⁺-Ionen zu untersuchen, wurden PBMCs mit verschiedenen Blockern inkubiert. Flufenaminsäure, ein Inhibitor des Transient receptor potential cation channel (TRPM2-Kationenkanäle) verringerte signifikant die IL-1 β -Konzentrationen im Überstand von PBMCs (**Abb. 34 B**). Jedoch konnten der store operated calcium entry (SOCE) Inhibitor BTP-2 oder der Phospholipase C Inhibitor U-73122 keine verringerte IL-1 β Freisetzung nach ApoC3 Stimulation bewirken.

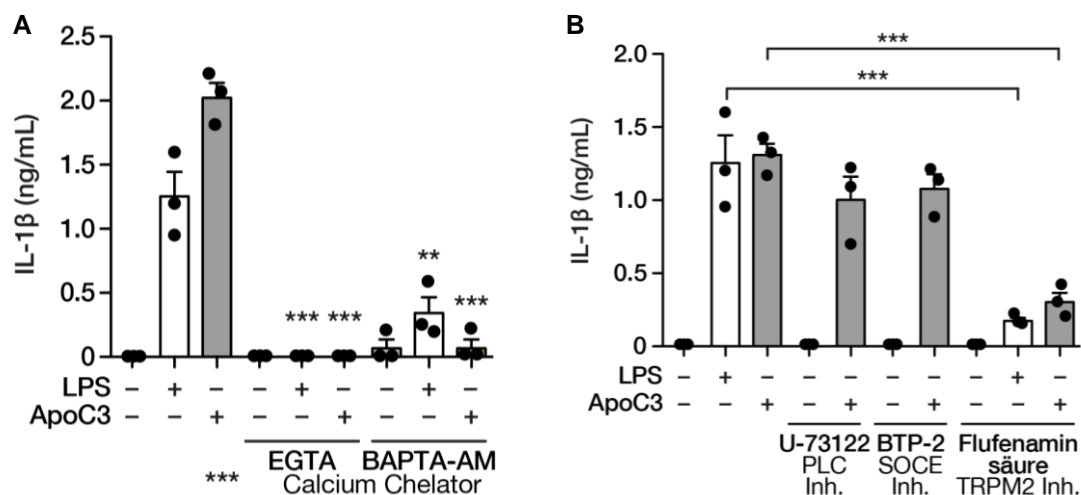


Abb. 34: IL-1 β -Konzentration im Überstand von PBMCs nach Inkubation mit Ca²⁺-Chelatoren und Inhibition des Ca²⁺-aktivierten Ionenkanals TRPM2. (A) Gemessene IL-1 β -Level im Überstand von PBMCs nach Vorinkubation mit den Ca²⁺-Chelatoren EGTA (2 mM, 1 h) und BAPTA-AM (10 μ M, 1 h) und Stimulation mit ApoC3 (50 μ g/mL, 16 h), im Vergleich zur Stimulation mit ApoC3 ohne Blocker mit und ohne LPS Priming (10 ng/mL, 3 h) (N=3). (B) IL-1 β -Konzentration im Überstand von PBMCs unter Anwesenheit der Ca²⁺-Chelatoren U-73122 (3 μ M, 1 h) und BTP-2 (30 nM, 1 h) nach ApoC3-Stimulation (50 μ g/mL, 16 h). Gemessen durch ELISA (N=3). **, P<0.01, ***, P<0.001 verglichen zu PBMCs in Abwesenheit entsprechender Inhibitoren. (Abb. entnommen aus Zewinger et al. Nat Immunol 2020).

5.25 Überprüfung der Beteiligung von ApoC3-vermittelter Signaltransduktion bei der Induktion von Superoxid-Produktion in PBMCs

Aufgrund der bereits bekannten Beteiligung von TRPM2-vermitteltem Ca²⁺-Influx bei der NADPH-Oxidase² und ROS-abhängigen Inflammasom-Aktivierung (Tseng H.H. et al., 2016), wurde nach einer Behandlung von PBMCs mit ApoC3 und LPS die Superoxid-Produktion gemessen. Die Entstehung von Superoxid-Radikalen in Folge einer ApoC3-vermittelten Inflammasom-Aktivierung wurde mit Hilfe von ESR-spektroskopischen Messungen nach einer

ApoC3-Stimulation von PBMCs untersucht. Sowohl ApoC3 als auch LPS führen zur signifikanten Erhöhung der Superoxid-Produktion in PBMCs (**Abb. 35**).

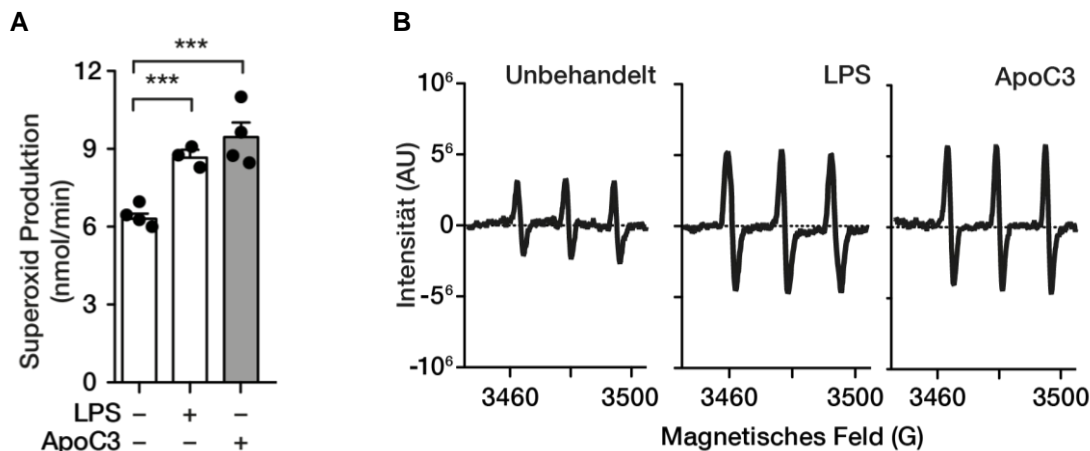


Abb. 35: Superoxid-Produktion nach ApoC3-Stimulation. (A) Quantifizierte Superoxid-Produktion von PBMCs nach Stimulation mit LPS (100 ng/mL, 1 h) oder ApoC3 (50 µg/mL, 1 h). Gemessen im ESR-Spektrometer unter Verwendung des Spin-Trap 1-Hydroxy-3-Methoxycarbonyl-2, 2, 5, 5-Tetramethylpyrrolidin (CMH) (N=3-4). ***, P<0.001 verglichen zu unbehandelten Zellen. (B) Repräsentatives Spektrum einer ESR-Messung und Quantifizierung der Superoxid-Produktion von PBMCs stimuliert mit LPS (100 ng/mL, 1h) oder ApoC3 (50 µg/mL, 1h). (Abb. entnommen aus Zewinger et al. Nat Immunol 2020).

5.26 ApoC3-vermittelten Superoxid-Produktion in Anwesenheit von Ca²⁺-Chelatoren

Um den Mechanismus der ApoC3-vermittelten, intrazellulären Signaltransduktion weiter aufzuklären, wurde die Superoxid-Produktion nach ApoC3-Stimulation unter Anwesenheit von Ca²⁺-Chelatoren gemessen. Die Anwesenheit der Ca²⁺-Chelatoren BAPTA-AM und EGTA führte zu einer signifikanten Reduktion der Superoxid-Produktion nach ApoC3-Stimulation im Vergleich zur Kontrolle (**Abb. 36**).

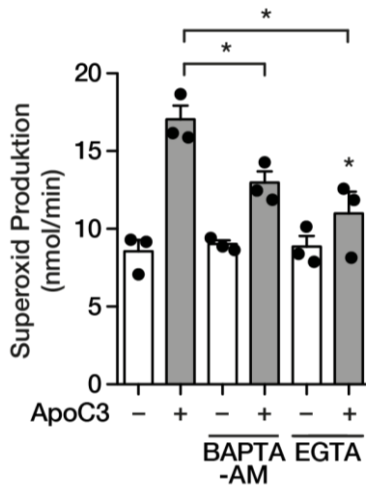


Abb. 36: Superoxid-Produktion unter Anwesenheit von Ca²⁺-Chelatoren nach ApoC3-Stimulation. Quantifizierte Superoxid-Produktion nach der Stimulation mit ApoC3 (50 µg/mL, 1 h) in Anwesenheit von BAPTA-AM oder EGTA, gemessen durch ESR-Spektroskopie (N=3). *, P<0.05 verglichen zu Zellen in Abwesenheit von BAPTA-AM oder EGTA. (Abb. entnommen aus Zewinger et al. Nat Immunol 2020).

5.27 Untersuchung des Beitrages von oxidativem Stress in der ApoC3-vermittelten Immunantwort

Die Anwesenheit des Antioxidans N-acetylcysteine (NAC, COX2-Inhibitor), sowie der Inhibitoren NOX-abhängiger Superoxid-Produktion DPI und VAS-2870 erniedrigte die IL-1β-Konzentration im Überstand von PBMCs nach ApoC3-Stimulation signifikant (**Abb. 37**). Hingegen konnte durch die Verwendung von MitoTEMPO keine Verringerung des IL-1β-Levels im Überstand von PBMCs nachgewiesen werden.

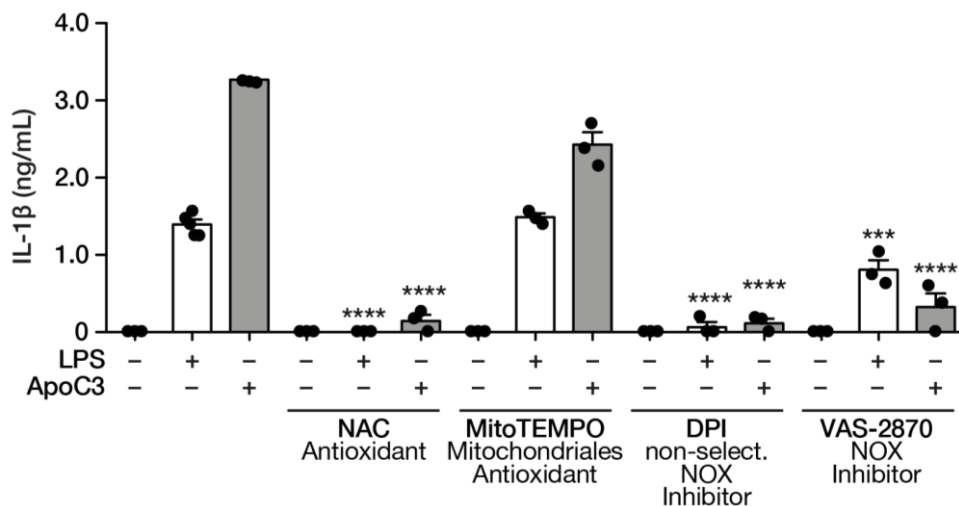


Abb. 37: IL-1β-Konzentration im Überstand von PBMCs nach ApoC3-Stimulation unter Anwesenheit verschiedener Inhibitoren. Gemessene IL-1β-Konzentrationen im Überstand von PBMCs nach Stimulation mit LPS (10 ng/mL) oder ApoC3 (50 µg/mL, 16 h) nach Vorinkubation mit NAC (20 mM), MitoTEMPO (200 µM), DPI (10 µM) oder VAS-2870 (5 µM). Gemessen mit ELISA (N=3). ***, P<0.001; ****, P<0.0001 verglichen zu PBMCs in Abwesenheit der entsprechenden Inhibitoren. (Abb. entnommen aus Zewinger et al. Nat Immunol 2020).

5.28 Analyse einer ApoC3-vermittelten Induktion von Thioredoxin-interacting protein (TXNIP)-Expression in PBMCs

Im Vorfeld konnte bereits gezeigt werden, dass erhöhte ROS-Level zu einer Dissoziation von Thioredoxin interacting protein (TXNIP), einem Mitglied der α -Arrestin Proteinfamilie und dem damit assoziierten Thioredoxin führen. Unter der Bedingung von oxidativem Stress kommt es der Dissoziation nachfolgend zum direkten Binden von TXNIP an NLRP3, wodurch dessen Aktivierung induziert wird (Zhou R. et al., 2010). Nach der Stimulation mit ApoC3 zeigt sich eine erhöhte Expression von TXNIP in PBMCs (Abb. 38 A), welche in Anwesenheit von BAPTA-AM bzw. NAC signifikant geringer war (Abb. 38 B).

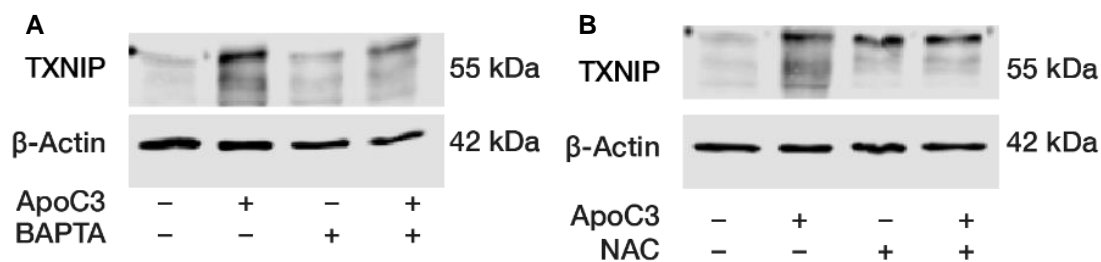


Abb. 38: TXNIP-Expression nach ApoC3-Stimulation. (A) Antikörperdetektion von TXNIP (55 kDa), nach einer Stimulation mit ApoC3 (50 μ g/mL, 1 h), mit oder ohne Vorinkubation des Ca^{2+} -Chelators BAPTA-AM (10 μ M, 1 h) (Repräsentativer Western Blot von mindestens N=3 unabhängigen Experimenten). (B) Antikörperdetektion von TXNIP nach ApoC3-Stimulation (50 μ g/mL, 16 h) und Vorinkubation mit NAC (20 mM, 1 h) Als Ladekontrolle wurde β -Aktin (43 kDa) eingesetzt (Repräsentativer Western Blot von mindestens N=3 unabhängigen Experimenten). (Abb. entnommen aus Zewinger et al. Nat Immunol 2020).

5.29 Analyse der ApoC3-induzierten TXNIP-vermittelten NLRP3-Aktivierung

Eine ApoC3-vermittelte Inflammasom-Aktivierung durch die Bindung von TXNIP an NLRP3 wurde nachfolgend mit Hilfe einer Immunpräzipitation (IP) in PBMCs untersucht. Der Effekt wurde anschließend in Western Blot-Lysaten überprüft. Eine Stimulation mit ApoC3 bewirkt eine Verstärkung des TXNIP-Signals, verglichen zur TXNIP-Bande ohne IP (**Abb. 39**).

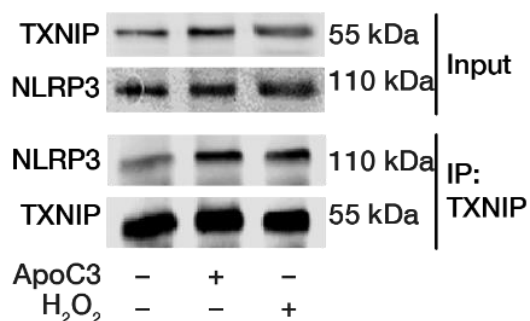


Abb. 39: TXNIP und NLRP3 nach ApoC3-Stimulation. Co-Präzipitation von NLRP3 (110 kDa) und TXNIP (55 kDa) in Immunpräzipitationen von TXNIP aus PBMCs nach ApoC3-Stimulation (50 μ g/mL, 1 h). Visualisiert durch Antikörper-Detektion nach Western Blot-Transfer. Als Positivkontrolle wurden PBMCs zusätzlich mit H₂O₂ (10 mM, 1 h) inkubiert. (Repräsentatives Experiment von mindestens N=3 unabhängigen Experimenten). (Abb. entnommen aus Zewinger et al. Nat Immunol 2020).

5.30 Untersuchung einer alternativen Inflammasom-Aktivierung durch Involvierung von Spleen tyrosine kinase (Syk)

Eine alternative NLRP3-Aktivierung nach TLR-Induktion mit Involvierung von Spleen tyrosine kinase (Syk) (Gross O. et al., 2009) konnte bereits gezeigt werden. Die Beteiligung von Syk bei der ApoC3-vermittelten NLRP3-Aktivierung, wurde nach Stimulation von PBMCs in Western Blot-Lysaten untersucht. Hierbei zeigt sich eine signifikante Phosphorylierung von Syk durch Inkubation mit ApoC3 (**Abb. 40**).

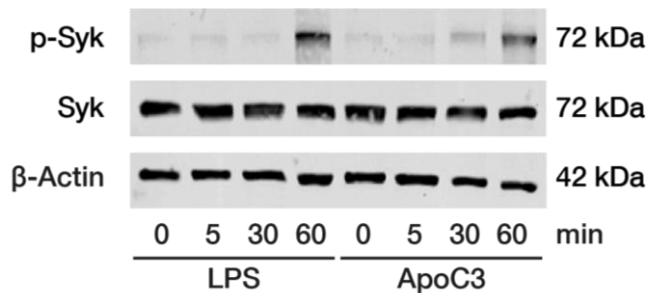


Abb. 40: Syk in humanen PBMCs nach LPS- und ApoC3-Stimulation. Antikörperdetektion von p-Syk (72 kDa) sowie Syk (72 kDa) in humanen PBMCs nach LPS- (10 ng/mL) oder ApoC3-Stimulation (50 µg/mL) über ein Zeitintervall von 5, 30, und 60 min. (Repräsentativer Western Blot von mindestens N=3 unabhängigen Experimenten). (Abb. entnommen aus Zewinger et al. Nat Immunol 2020).

5.31 Inhibition der aktivierten Proteinkinase Syk

Um eine Beteiligung der aktivierten Proteinkinase Syk bei der ApoC3-vermittelten IL-1 β Sekretion zu überprüfen, wurde die Konzentration von IL-1 β nach einer ApoC3-Stimulation im Überstand von PBMCs mittels ELISA quantifiziert. Die IL-1 β -Konzentration im Überstand von PBMCs war durch eine Vorinkubation mit R406 und anschließender ApoC3-Stimulation signifikant reduziert (**Abb. 41**).

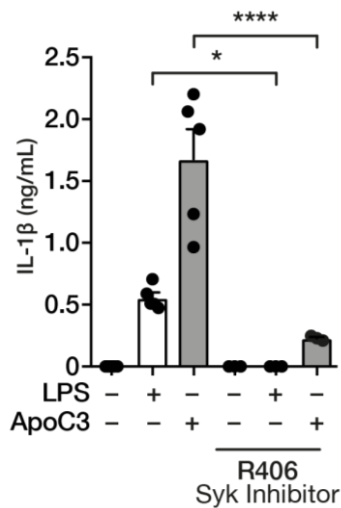


Abb. 41: IL-1 β -Konzentration nach Blocken von Syk. Ermittelte IL-1 β -Konzentration im Überstand von PBMCs, nach einer Stimulation mit ApoC3 (50 μ g/mL, 16 h), mit und ohne LPS-Priming (10 ng/mL, 3 h) und Vorinkubation mit R406 (5 μ M, 1 h). Gemessen mit ELISA (N=3-6). *, P<0.05; ****, P<0.0001 verglichen zu PBMCs in Abwesenheit der entsprechenden Inhibitoren. (Abb. entnommen aus Zewinger et al. Nat Immunol 2020).

5.32 Beitrag von Syk zur ApoC3-vermittelten ROS-Produktion

Bei der alternativen NLRP3-Aktivierung durch Syk konnte eine Beteiligung von NADPH-oxidase-abhängiger ROS-Produktion nachgewiesen werden (Bae, Y.S. et al., 2009). Daher wurde die Bedeutung der aktivierten Proteinkinase Syk bei der ApoC3-induzierten ROS-Produktion überprüft. Der Einsatz von R406, einem Inhibitor der Tyrosinkinase Syk, führt zu einer signifikanten Reduktion der ROS-Produktion (**Abb. 42**).

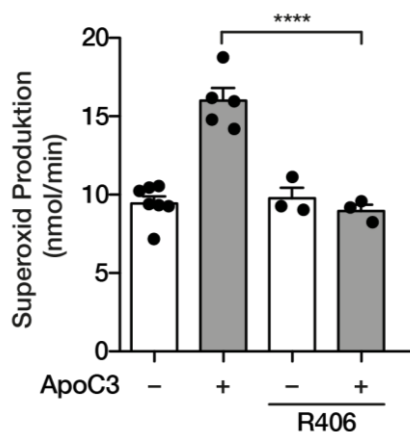


Abb. 42: ROS-Produktion nach Inhibition von Syk. Quantifizierung der ROS-Produktion nach ApoC3-Stimulation (50 μ g/mL, 1 h) in PBMCs und einer Vorinkubation mit R406 (5 μ M, 1 h). Gemessen durch ESR-Spektroskopie (N=3-6). ***, P<0.001, ****, P<0.0001 verglichen zu PBMCs in Abwesenheit der entsprechenden Inhibitoren. (Abb. entnommen aus Zewinger et al. Nat Immunol 2020).

5.33 Aufklärung von zusätzlich involviertem Transmembranadaptor in ApoC3-vermittelter Syk-Aktivierung

Es konnte bereits gezeigt werden, dass eine Aktivierung von Syk über ein Tyrosin-basiertes Bindungsmotiv (Immunoreceptor tyrosine-based activation motif, ITAM) vermittelt wird (Rolli V. et al., 2002). Als positiv allosterisches Enzym erfolgt eine starke Aktivierung von Syk durch das Binden an phosphoryliertes ITAM-Tyrosin, was die Bildung einer positiven Feedback-Schleife am assoziierten Rezeptor zur Folge hat. Sowohl TLR2 als auch TLR4 verfügen nicht über ITAM-Domänen, wodurch die Anwesenheit eines weiteren Adapterproteins zur Syk-vermittelten Aktivierung wahrscheinlich ist. Um eine Involvierung durch ein zusätzliches Adaptermolekül bei der ApoC3-vermittelten TLR4-Aktivierung zu überprüfen, wurden Crosslinking-Experimente in PBMCs nach LPS- und ApoC3-Stimulation durchgeführt. Dabei konnte sowohl nach einer LPS- als auch ApoC3-Stimulation eine zusätzliche Bande von hoher molekularer Masse nachgewiesen werden (**Abb. 43**).

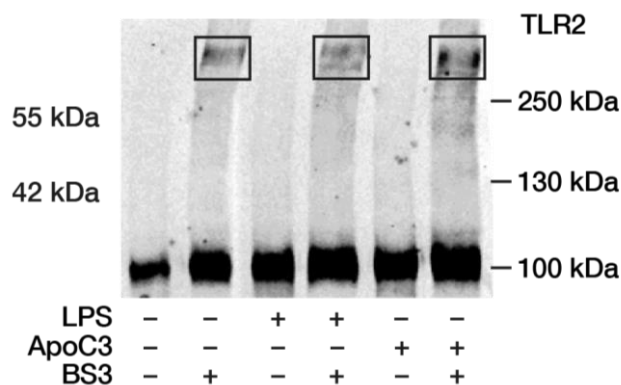


Abb. 43: BS3 Crosslinking nach ApoC3 Stimulation. Antikörperdetektion von TLR2 nach Stimulation mit LPS (10 ng/mL, 1 h), ApoC3 (50 ng/μL, 1 h) in Anwesenheit oder Abwesenheit von BS3 Crosslinker (0,5 mM). Rot markierte Banden wurden zur massenspektrometrischen Analyse isoliert. Repräsentatives Experiment von (N=3) unabhängigen Experimenten. (Abb. entnommen aus Zewinger et al. Nat Immunol 2020).

5.34 SCIMP als Transmembranadaptor-Protein in ApoC3-vermitteltem TLR4 Signalling

Diese Bande wurde ausgeschnitten (**Abb. 43**) und einer Proteomanalyse unterzogen. Durch eine MALDI-TOF massenspektrometrische Analyse konnte in der ausgeschnittenen Bande SCIMP (SLP adaptor and C-terminal Src kinase (CSK)-interacting membrane protein) zusammen mit TLR4 und ApoC3 nachgewiesen werden (**Abb. 44**).

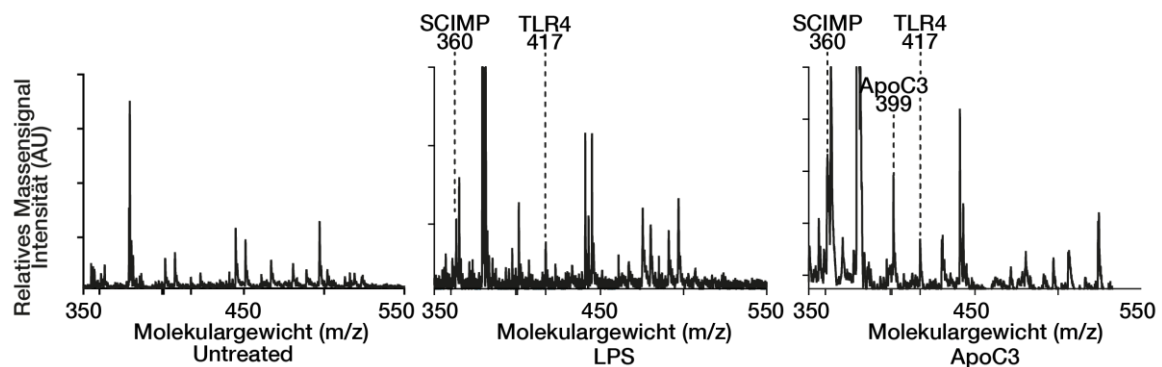


Abb. 44: Massenspektrometrische Analyse nach ApoC3-Stimulation und BS3 Crosslinking. Charakteristische MALDI-TOF massenspektroskopische Aufnahmen von PBMCs nach BS3 Crosslinking und Stimulation mit LPS (10 ng/mL, 1 h) oder ApoC3 (50 ng/μL) sowie Trypsin-Verdau. Pfeile verdeutlichen die Signale von SCIMP-, TLR4- und ApoC3-Fragmenten. (Abb. entnommen aus Zewinger et al. Nat Immunol 2020).

5.35 SCIMP-Expression nach ApoC3-Stimulation

Ob eine Aktivität von SCIMP für das ApoC3-vermittelte TLR-Signalling erforderlich ist wurde in Western Blot-Lysaten von PBMCs nach einer Stimulation mit LPS und ApoC3 überprüft. Sowohl durch die Inkubation mit LPS als auch ApoC3, kann eine deutlich gesteigerte SCIMP-Expression in Western Blot-Lysaten von PBMCs nachgewiesen werden (**Abb. 45**).

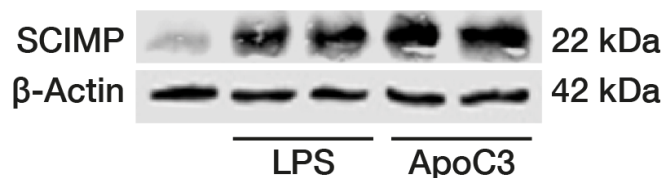


Abb. 45: SCIMP-Expression in PBMCs. Antikörperdetektion von SCIMP in Western Blot-Lysaten von PBMCs nach einer Stimulation mit LPS (10 ng/mL, 1 h) oder ApoC3 (50 μg/mL, 1 h). Als Ladekontrolle wurde β-Aktin (42 kDa) eingesetzt. (Repräsentativer Western Blot von (N=3) Experimenten). (Abb. entnommen aus Zewinger et al. Nat Immunol 2020).

5.36 Interaktionsanalyse von Tyrosin-Kinase Lyn mit Syk nach ApoC3 vermittelter Stimulation

In Makrophagen wurde bereits eine konstitutive Bindung von Syk an die Tyrosin-Kinase Lyn gezeigt. Dabei ist eine Anwesenheit von Lyn für die Tyrosin-Phosphorylierung von TLR4 erforderlich (Luo L. et al., 2017). Eine Interaktion von Syk mit der Tyrosin-Bindungsdomäne von Lyn, wäre als initiativer Schritt zur Phosphorylierung von Syk nach einer ApoC3-vermittelten Aktivierung ebenfalls denkbar. Um dies in PBMCs zu überprüfen, wurde die Interaktion von Lyn und Syk nach einer ApoC3-Stimulation mittels IP im Zeitverlaufsexperiment untersucht. **Abb. 46** zeigt, dass ApoC3 zeitabhängig zur Interaktion zwischen Syk, SCIMP und Lyn führt.

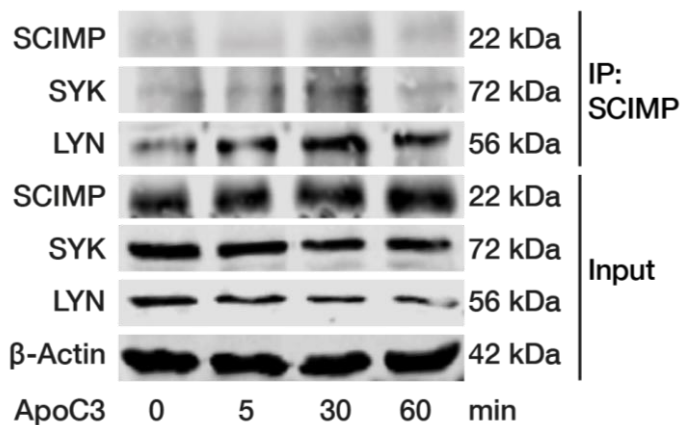


Abb. 46: Immunopräzipitation von SCIMP mit Lyn und Syk nach ApoC3-Stimulation in PBMCs. Co-Präzipitation von Lyn (56 kDa) und Syk (72 kDa) in Immunpräzipitationen von SCIMP (22 kDa) nach Stimulation mit ApoC3 (50 µg/mL) über einen Zeitintervall von 60 min (0 min, 5 min, 30 min, 60 min). Repräsentatives Experiment von (N=3) Experimenten. (Abb. entnommen aus Zewinger et al. Nat Immunol 2020).

5.37 *In vivo* Nachweis von ApoC3-vermittelten Effekten bei der NLRP3-induzierten Immunantwort in humanisierten Mäusen

Da die gezeigte alternative NLRP3 Aktivierung auf das humane System (i.e. humane Monocyten) beschränkt ist, wurden zu Untersuchung der Relevanz dieser Effekte *in vivo* zwei humanisierte murine Modelle verwendet (Hahm E. et al., 2017). Hierzu erfolgte eine Rekonstitution von NOD-SCID-Mäusen mit humanen CD14⁺ Monocyten. Die Reinheit der verwendeten CD14⁺ Monocyten nach MACS Sorting wurde mittels Durchflusszytometrie (**Abb. 47**) überprüft.

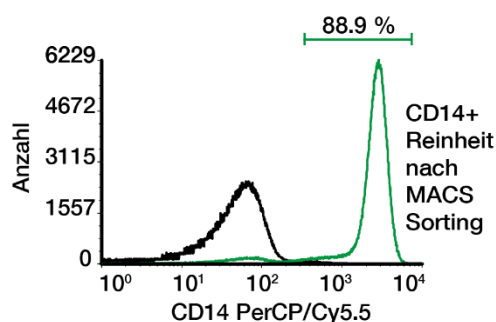


Abb. 47: Reinheit von CD14⁺ humanen Monocyten. Die mittels MACS-sorting erhaltenen Zellen zeigen eine Reinheit von 88.9 % für CD14⁺. Repräsentatives Histogramm nach Durchflusszytometrie von CD14-PerCP/Cy5.5 humaner PBMCs. (Abb. entnommen aus Zewinger et al. Nat Immunol 2020).

Um die Auswirkung von ApoC3 auf die vaskuläre Regeneration zu untersuchen, wurde ein etabliertes perivaskuläres Carotisschädigungs-Modell durchgeführt (vgl. Speer T et al., 2013). Dazu wurden NOD-SCID-Mäusen nach einer perivaskulären Carotisschädigung humane CD14⁺ Monocyten transplantiert und zusätzlich ApoC3 injiziert (**Abb. 48**).

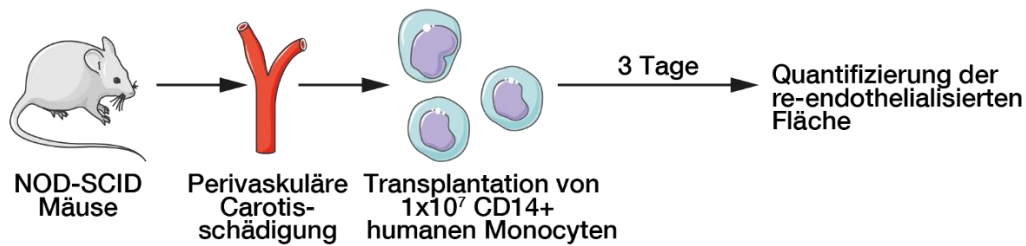


Abb. 48: schematisches Vorgehen beim Modellversuch zur Untersuchung von Effekten auf humane CD14+ Monocyten durch ApoC3 bei der re-Endothelialisierung von geschädigter A. carotis. Humane CD14+ Monocyten (10^7 Zellen pro Maus) wurden zusammen mit ApoC3 ($50 \mu\text{g}/\text{mL}$ Blutvolumen) in die Schwanzvene von NOD-SCID-Mäusen injiziert. Nach drei Tagen wurden re-endothelialisierte Gefäßflächen quantifiziert. (Abb. entnommen aus Zewinger et al. Nat Immunol 2020).

5.38 Effekt von ApoC3 auf normale Monocyten-Funktion bei der re-Endothelialisierung von geschädigtem Carotis-Gewebe

Nach der perivaskulären Carotisschädigung in NOD-SCID Mäusen und Transplantation von humanen CD14+ Monocyten mit gleichzeitiger Injektion von ApoC3 beziehungsweise PBS wurde die re-endothelialisierte Fläche der A. carotis quantifiziert. Die Quantifizierung zeigt eine signifikant geringere re-Endothelialisierung nach Injektion von CD14+ Monocyten zusammen mit ApoC3 verglichen mit der Injektion von PBS (**Abb. 49**).

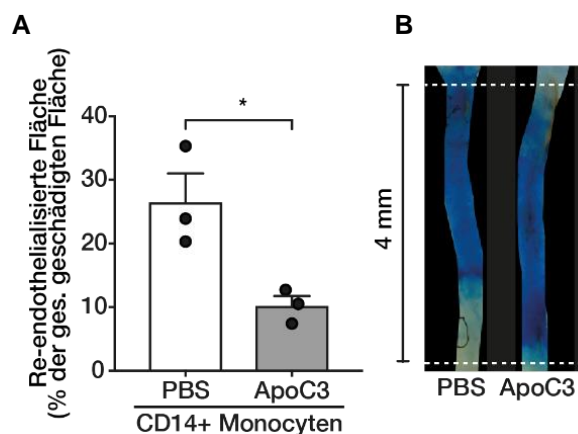


Abb. 49: Re-Endothelialisierung nach perivaskulärer Carotisschädigung in Anwesenheit von ApoC3. (A) Relative Quantifizierung der re-endothelialisierten Gefäßfläche von NOD-SCID-Mäusen drei Tage nach perivaskulärer Carotisschädigung und Injektion von CD14+ Monocyten zusammen mit ApoC3 ($50 \mu\text{g}/\text{mL}$ Blutvolumen), verglichen zur PBS Kontrolle. (B) Repräsentative Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme (N=3). (Abb. entnommen aus Zewinger et al. Nat Immunol 2020).

Ohne eine Transplantation von CD14+ Monocyten konnte kein Unterschied bei der re-Endothelialisierung von geschädigten Carotiden in NOD-SCID-Mäusen nach einer Injektion von PBS und ApoC3 festgestellt werden (**Abb. 50**).

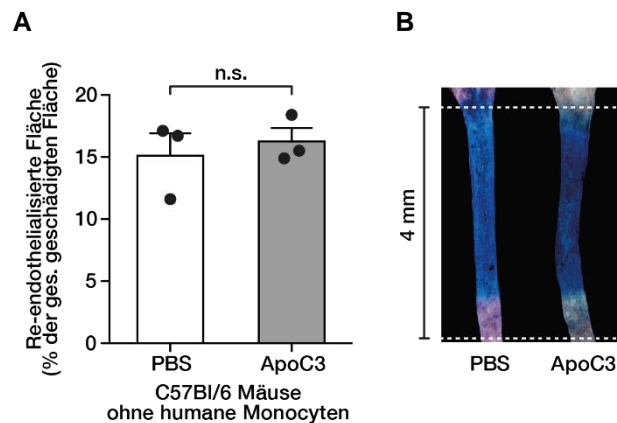


Abb. 50: Re-Endothelialisierung geschädigter Carotiden in Abwesenheit humaner Monocyten. (A) Relative Quantifizierung von re-endothelialisiertem Carotis-Gewebe drei Tage nach perivaskulärer Gefäßschädigung in NOD-SCID-Mäusen und Injektion von ApoC3 (50 μ L/mL Blutvolumen) oder PBS unter Abwesenheit von humanen CD14+ Monocyten. (B) Repräsentative mikroskopische Aufnahme (N=3). (Abb. entnommen aus Zewinger et al. Nat Immunol 2020).

5.39 Untersuchung einer ApoC3-vermittelten Migration humaner Monocyten in murinem Nierengewebe nach unilateraler Ureterligatur

Um Effekte von ApoC3 auf humane CD14+ Monocyten bei einer Nierenschädigung *in vivo* zu untersuchen wurde eine unilaterale Ureterligatur an NOD-SCID-Mäusen als Modellversuch für eine Nierenschädigung vorgenommen (**Abb. 51**).

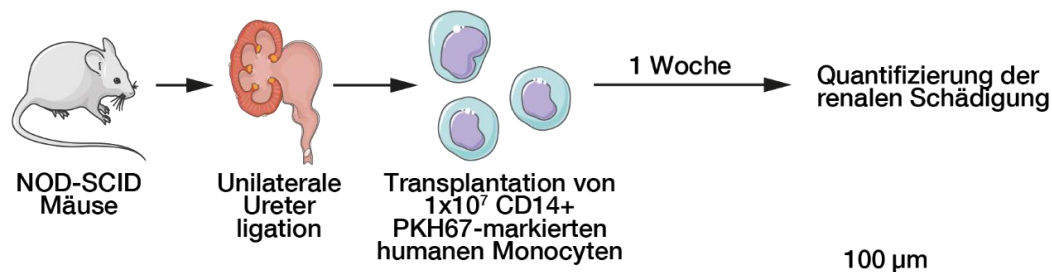


Abb. 51: schematisches Vorgehen nach unilateraler Ureterligatur zur Untersuchung von Effekten auf humane CD14+ Monocyten durch ApoC3 als Modellversuch für Nierenschädigung. NOD-SCID-Mäuse wurden einer unilateralen Ureterligatur, als Modell für eine akute Nierenschädigung unterzogen. Zur Detektion wurden humane CD14+ Monocyten einer immunologischen Fluoreszenzfärbung mit PKH67 unterzogen und transplantiert (107 Zellen pro Maus). Nach einer Woche wurden dilatierte Tubuli quantifiziert. (Abb. entnommen aus Zewinger et al. Nat Immunol 2020).

Zur späteren Lokalisierung im Nierengewebe wurden CD14+ Monocyten vor Applikation mittels PKH67 fluoreszierend gefärbt (**Abb. 52**).

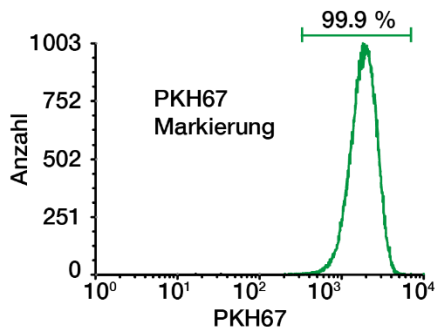


Abb. 52: PKH67-Fluoreszenzfärbung humaner CD14+ Monocyten. Repräsentatives Histogramm nach Durchflusszytometrie von PKH67-markierten CD14+ Monocyten. (Abb. entnommen aus Zewinger et al. Nat Immunol 2020).

Eine Woche nach Ureterligatur wurde eine Quantifizierung der Fläche an dilatierten Tubuli vorgenommen (**Abb. 53**). Dabei ist die Fläche dilatierten Tubuli in der Niere nach einer Injektion von ApoC3 verglichen zur PBS-Kontrolle signifikant größer.

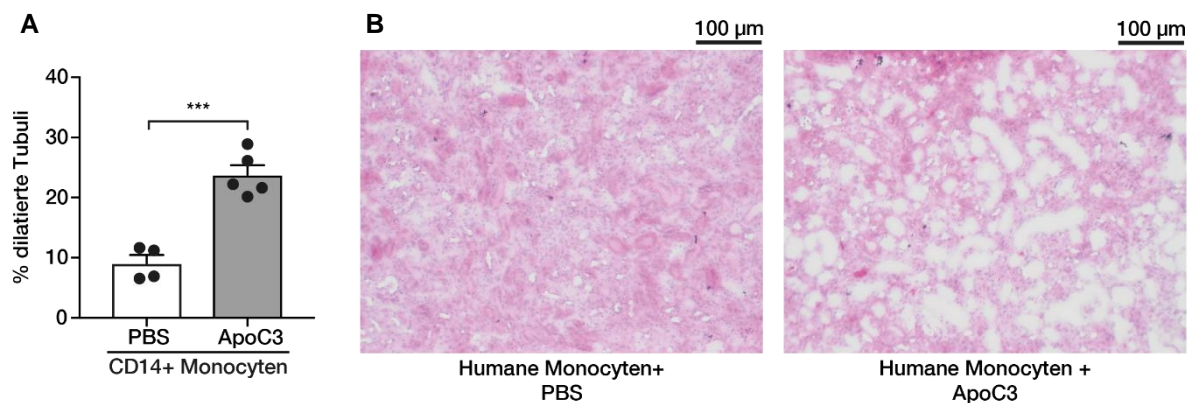


Abb. 53: Nierenschädigung nach unilateraler Ureterligatur. (A) Quantifizierung dilatierten Nierentubuli nach unilateraler Ureterligatur von NOD-SCID-Mäusen nach Transplantation humaner CD14+ Monocyten und Injektion von ApoC3 (50 μ L/mL Blutvolumen) oder PBS. (B) Repräsentative Aufnahme von Hämatoxylin/Eosin-gefärbten Ausschnitten aus muriner Niere. (Abb. entnommen aus Zewinger et al. Nat Immunol 2020).

Gleichzeitig zeigte sich, dass nach ApoC3 Injektion signifikant mehr humane Monocyten in der geschädigten Niere akkumulieren als nach Injektion von PBS (**Abb. 54**).

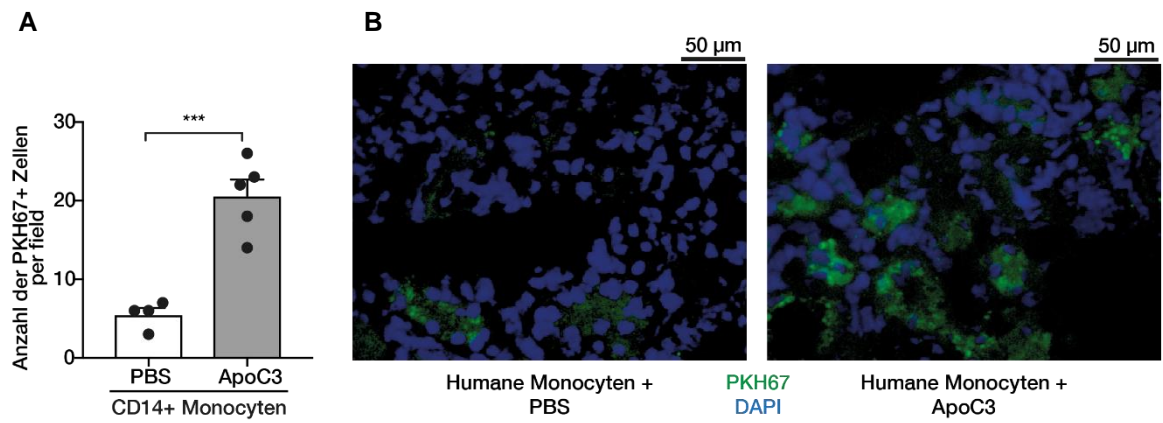


Abb. 54: PKH-67-markierte CD14+ Monocyten in murinem Nierengewebe nach unilateraler Ureterligatur. (A) Quantifizierung von PKH67-markierten Monocyten eine Woche nach unilateraler Ureterligatur und Injektion von ApoC3 (50 μ L/mL Blutvolumen) oder PBS in Nierengewebe von humanisierten NOD-SCID Mäusen. (N=4-5). (B) Repräsentative fluoreszenzmikroskopische Aufnahme. (Abb. entnommen aus Zewinger et al. Nat Immunol 2020).

6 Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein endogener Ligand zur Aktivierung des NLRP3 Inflammasoms entdeckt. Erstmals konnte gezeigt werden, dass ApoC3, ein wichtiger Bestandteil in TRLs, die Heterodimerisierung von TLR2 und TLR4 induziert. Das Heterodimer interagiert dabei mit SCIMP, einem restriktiven immun-transmembranen Adapter-Protein (TRAP), zu einem Heterotrimer wodurch die NLRP3-vermittelte Inflammation initiiert wird. Der neu aufgeschlüsselte Aktivierungsweg verläuft über die SCIMP-LYN-SYK-Achse und der daraus resultierende Ca^{2+} -vermittelte ROS-Produktion. Als Effektor der direkten NLRP3 Interaktion konnte die ROS-vermittelte Beteiligung von TXNIP sowie die damit einhergehende Rekrutierung von RIPK1 und Caspase-8 nachgewiesen werden. In der vorliegenden Studie wurde zudem eine wichtige Relevanz von ApoC3 für die Inflammation und der dadurch verursachten Organschädigung gezeigt. Das vor allem in VLDL enthaltene ApoC3 konnte folglich als ursächlicher Auslöser für eine Vielzahl von Krankheitszuständen, wie Gefäß- und Nierenerkrankungen aufgedeckt werden. Die Beteiligung des endogenen Liganden ApoC3 in Entzündungsprozessen liefert neue Ansatzpunkte in der ursachenrelevanten Entstehung von Atherosklerose und damit assoziierten Krankheiten, wie beispielsweise AMI und CKD zu entgegenen.

6.1 Zusammensetzung und Funktion von VLDL und ApoC3

Very low-density Lipoprotein (VLDL) sind 30-90 nm große Partikel, welche für den Abtransport von Triglyceriden und Cholesterol von der Leber, sowie deren Umverteilung in verschiedene Gewebe verantwortlich sind (Mahley R.W. et al., 1984). Der Hauptanteil an Lipiden im VLDL bilden Triglyceride, welche von der Leber synthetisiert und sezerniert werden (Khetarpal S.A. und Rader D.J., 2015). Die Unlöslichkeit von Triglyceriden im Plasma erfordert, dass diese in sphärischen Makromolekülen (pseudomizelluläre Partikel), den TRLs transportiert werden. Aufgebaut sind diese aus einem hydrophoben Kern, welcher Phospholipide, fettlösliche Antioxidantien, fettlösliche Vitamine und Cholesterinester beinhaltet. Eine hydrophile Hülle, bestehend aus freiem Cholesterol, Phospholipiden und Apolipoprotein umschließt den Kern des Moleküls (Hegele R.A., 2009). Allgemein unterscheiden sich TRLs auf Grund ihrer Zusammensetzung und der daraus resultierenden Größe sowie deren elektrophoretischer Mobilität und Funktion. Relativ auf das Gewicht bezogen, setzt sich VLDL aus Triglyceriden (45-65 %), Phospholipiden (15-20 %), freiem Cholesterol (4-8 %), verestertem Cholesterol (16-22 %), einem Proteinanteil (6-10 %) und den Apolipoproteinen B-100, E, C1, C2, C3 zusammen (Hegele R.A., 2009). Im Plasma fördert die Lipoprotein Lipase (LPL) die Hydrolyse der inneren Triglyceride im VLDL. Dadurch entstehen freie Fettsäuren und sogenannte VLDL-Remnants, welche eine relative Anreicherung von Cholesterol im Verhältnis zu Triglyceriden beinhalten (Wang H. und Eckel R.E., 2009). Eine Aufnahme in die Leber sorgt für eine

Beseitigung von VLDL-Remnants (= IDL). In der Plasma-Zirkulation verbleibende Partikel werden weiter durch die LPL und hepatische Triglycerid-Lipase (HTGL) zu mit Cholesterol-angereichertem LDL ($d = 1.019-1.063$ g/mL) modifiziert (Khetarpal S.A. und Rader D.J., 2015). Wie LDL-Partikel, können auch VLDL-Remnants durch Makrophagen in die Arterienwand aufgenommen werden. Dort können sie ebenfalls zur Entstehung von vaskulärer Inflammation und atherosklerotischer Plaquebildung und -entwicklung beitragen. Im Gegensatz zu LDL Partikeln benötigen VLDL-Remnants für diesen Vorgang keine oxidative Modifikation (Khetarpal S.A. und Rader D.J., 2015).

Der Metabolismus der Plasmalipoproteine wird durch die spezifischen Apolipoproteine reguliert und kontrolliert. Dabei spielt das in der Hülle (Oberfläche) lokalisierte ApoC3 für die Aufnahme und Umverteilung von VLDL eine entscheidende Rolle. Das 8.8 kDa große Lipoprotein ApoC3 wird im Menschen durch das APOC3 Gen codiert und bildet eine Hauptkomponente von VLDL. Dabei ist ApoC3 zudem das im Plasma am stärksten vertretene ApoC (~ 12 mg/dL Plasma). Ferner ist es mit Chylomikronen assoziiert, sowie in HDL und zu einem geringen Anteil in LDL vorhanden (Ooi E.M. et al., 2008; Sacks F.M. et al. 2011; Mahley R.W. et al., 1994; Wyler von Ballmoos et al., 2015). Das hauptsächlich in der Leber und dem Darm synthetisierte 99 Aminosäuren große Vorläufer-Peptid von ApoC3 wird nach Abspaltung seines 20 Aminosäuren großen Signal-Peptids zum ausgereiften Protein prozessiert. Dieses kann als nicht-glycosylierte Isoform (Apo-III0) oder als glycosylierte Isoform mit einem (ApoCIII1) oder zwei (ApoCIII2) Molekülen von Sialinsäure (N-Acetylneuraminsäure) vorliegen (Ooi E.M. et al., 2008; Nicolardi S. et al., 2013; Norata G.D. et al., 2015). Die Regulation der Genexpression von ApoC3 wird durch Insulin, Peroxisom Proliferator-aktiviertem Rezeptor (PPAR) und durch Farnesoid X Rezeptor-Aktivierung (FXR) herunterreguliert (Chen M. et al., 1994; Staels B. et al., 1995; Claudel T. et al., 2003). Die Induktion der Genexpression von ApoC3 wird hingegen durch Glukose vermittelt (Caron S. et al., 2011). Dabei stimulieren Charakteristiken der Insulin-Resistenz, wie ein erhöhter Fettsäure-Fluss zur Leber und Darm die Produktion von TRLs und damit auch von mit TRL assoziiertem ApoC3. Während eines Insulin-resistenten Zustandes kommt es folglich zu einer dysregulierten ApoC3-Expression und Sekretion (Pavlic M. et al., 2008).

ApoC3 reguliert wichtige Prozesse im Metabolismus von TRLs. Dabei übernimmt es eine zentrale Rolle im Plasma-Metabolismus von VLDL, IDL und LDL durch die Inhibition der ApoB/E-Rezeptor-vermittelten Aufnahme von ApoB Lipoproteinen in die Leber (Windler E.E. et al., 1980; Sehayek E. und Eisenberg S., 1991). Gestützt wurde diese am besten untersuchte Eigenschaft von ApoC3 durch diverse transgene Mausexperimente (Aalto-Setälä K. et al., 1992; Aalto-Setälä K. et al., 1996; de Silva et al., 1994). Zudem konnte die Funktion durch Untersuchungen des humanen Lipoprotein-Metabolismus belegt werden (Zheng C. et al., 2007; Zheng C. et al., 2010; Mendivil C.O. et al., 2010). Beim Vorliegen hoher VLDL- und

Chylomikron-Konzentrationen unterbindet ApoC3 deren Hydrolyse durch eine Inhibition der LPL (Ooi E.M. et al., 2008; Jong M.C. et al., 1999). Dies resultiert in einer verminderten Enzymaktivität und erhöhten Anfälligkeit für die Inaktivierung der LPL (Larsson M. et al., 2013; Norata G.D. et al., 2015). Ferner unterbindet ApoC3 die Aufnahme von TRLs in die Leber durch die Inhibition der HTGL. Zudem interagiert ApoC3 mit Rezeptoren, wie dem HDL-Scavenger-Rezeptor Klasse B Typ 1 (SR-BI) und ABCA1-Transporter, die für das Ausschleusen von Cholesterol aus der Zelle verantwortlich sind. ApoC3 hat somit zudem einen potenziellen Effekt auf die Metabolismus-Funktionen von HDL (Kinnunen P.K. und Ehnolm C., 1976; Xu S. et al., 1997; Remaley A.T. et al., 2001).

6.2 Lipoproteine als Regulatoren der Inflammation

Bekannt ist, dass Komponenten von Lipiden und Lipoproteinen, welchen eine kritische Rolle bei der Entstehung von Atherosklerose zukommt, ebenfalls in immunologischen Prozessen des angeborenen, als auch adaptiven Immunsystems involviert sind (Hansson G.K. und Hermansson A., 2011; Tall A.R. und Yvan-Charvet L., 2015; Seimon T.A., 2010; Furnkranz A. et al., 2005). Bei der Bekämpfung pathogener Moleküle in Form von endogenen DAMPs sowie exogenen PAMPs, spielt die Erkennung dieser Strukturen durch PRRs eine entscheidende Rolle. Als Rezeptoren des angeborenen Immunsystems sind diese auch vorwiegend in Zellen des angeborenen Immunsystems wie Monocyten, Makrophagen oder dendritischen Zellen aber auch beispielsweise in Endothelzellen zu finden (Leemans J.C. et al., 2014).

Bedeutende Vertreter der frühen Abwehr von Krankheitserregern sind die hoch konservierten TLRs. Die Familie der TLRs setzt sich im Menschen aus 10 (TLR1-10) Mitgliedern zusammen, wohingegen bislang 12 murine TLRs (TLR1-12) entdeckt wurden. Die Rezeptoren unterscheiden sich bezüglich ihrer Lokalisation als auch in der Art ihrer Liganden. TLR1, TLR2 sowie TLR4-6 sind typischerweise in der Plasmamembran lokalisiert, wohingegen TLR3, TLR7-9 mit intrazellulären Vesikelmembranen, wie beispielsweise endosomalen/lysosomalen Kompartimenten assoziiert sind (De Nardo D., 2015).

Zum einen bestehen TLRs als Typ I Transmembran-Proteine aus einer Ektodomäne, mit Leucin-Rich-Repeat (LRR) Strukturen, welche zur Erkennung von PAMPs dienen. Zum anderen sind die transmembran-Region und die zytosolische TIR-Domäne, zur Aktivierung nachfolgender Signaltransduktionskaskaden, weitere wichtige strukturelle Eigenschaften von TLRs (Kawai T. und Akira S., 2011).

Jeder TLR erkennt ein bestimmtes Repertoire von konservierten, mikrobiellen Molekülen, wobei dieses diverse Organismen wie Protozoen, Bakterien; Pilze sowie Viren umfasst (Beutler B., 2004). TLR4 wurde beispielsweise 1998 als Rezeptor identifiziert, welcher eine immunologische Antwort gegenüber LPS, als integraler Bestandteil der äußeren Zellmembran von Gram-negativen Bakterien zeigte (Poltorak A. et al., 1998).

Es wird angenommen, dass die meisten TLRs zur Initiierung einer nachfolgenden Signalinduktion funktionelle Multimere bilden. Darunter zeigen einige TLRs eine Heteromerbildung, wie beispielsweise TLR2 mit TLR1 oder 6 (Jin M.S. et al., 2007; Kang J.Y. et al., 2009). Dabei wurde gezeigt, dass TLR2 zur Erkennung von triacylierten Lipoproteinen und diacylierten Lipoproteinen mit TLR1 oder 6 heterodimerisiert (Takeuchi, O. et al., 2001; Takeuchi O. et al., 2002). Zur Aktivierung von TLR4 wurde zudem die Bildung eines Homodimers beschrieben (Jin M.S. und Lee J.O., 2008). Des Weiteren kommt es zeitweilig zur Signalkomplexbildung mit non-TIR Untereinheiten. Beispielsweise findet bei der Ligation von LPS eine Komplexbildung von TLR4 mit MD2 statt. Daneben wird bei der Ligandenbindung von PAMPs eine Interaktion von TLRs und assoziierten Scavenger-Rezeptoren, wie beispielsweise CD14 und CD36 mit TLR1 und 2 beschrieben (Beutler B.A., 2009).

Modifiziertes HDL aus Patienten mit CKD konnte bereits als Aktivator einer TLR2-abhängigen Immunantwort belegt werden (Speer T. et al., 2013). Eine Interaktion von TLR4/MD2 mit einer Involvierung von CD14 konnte außerdem für minimal modifiziertes LDL (mmLDL), welches nach einer kurzen, wenig intensiven oxidativen Behandlung entsteht, aufgedeckt werden (Miller Y.I. et al., 2003).

Die Spezifität der einzelnen TLRs wurde bislang weitestgehend entziffert und die nachfolgenden Signaltransduktionsmechanismen aufgeklärt (Beutler B., 2004). Nach dem Binden eines Liganden, kommt es zur Dimerisierung von TLRs/IL-1R und der daraus resultierenden Konformationsänderung, welche die Rekrutierung von nachgeschalteten Signalwegen veranlasst (Akira S. und Takeda K., 2004). Hierbei werden die fünf bislang beschriebenen TIR-Domäne enthaltenden Adapterproteine MyD88, MAL, TRIF, TRAM und SARM involviert (Jin M.S. und Lee J.O., 2008; De Nardo D., 2015). Dabei wurde zudem das B-Zell Adaptorprotein für PI3K als möglicher sechster TLR-Adaptor vorgeschlagen (Troutman, T.D. et al., 2012). Die Übertragung von Signalen erfolgt über TIR-TIR Interaktion. Weiterstgehend aktivieren diese Adaptern hauptsächlich die zwei Signalwege über MyD88 oder TRIF (Toll/IL-1R domain-containing adaptor-inducing IFN- β). Beide Signalwege sind für die Rekrutierung der Proteinkinasen MAPKs und IKKs verantwortlich. Diese wiederum initiieren die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren und die daran anschließende Produktion von Chemokinen, Typ I IFNs oder inflammatorischen Zytokinen, wie IL-1 β (Beutler B.A., 2009; Beutler B. A., 2009). Mit Ausnahme von TLR3 interagieren alle TLRs mit MyD88 (Kawai T. und Akira S., 2010).

Als einziger TLR-Rezeptor initiiert TLR4 sowohl TRIF-, TRAM-, MyD88- als auch MAL-Signalling, wodurch er als Prototyp für TRIF und MyD88 angesehen wird (Yamamoto M. et al., 2003a; Yamamoto M. et al., 2003b; Horng T. et al. 2002; Hoebe K. et al., 2003).

TLR4 aktiviert MyD88 nicht direkt, sondern über das Adaptorprotein MyD88-adaptor-like protein (MAL). Ferner wird TLR4-TRIF-Signalling ebenfalls indirekt über das Adaptorprotein

TRIF-related adaptor molecule (TRAM) rekrutiert (O'Neill L. A. und Bowie A. G., 2007; O'Neill et al., 2013). Eine TLR-vermittelte Aktivierung von MyD88 führt zum Zusammenschluss einer oligomeren TLR-Plattform, dem Myddosom. Dieses setzt sich aus IRAK1, 2 und 4 zusammen, wobei IRAK1 mit TRAF6 interagiert, was zur Aktivierung von TAK1 und schließlich zur Rekrutierung von MAPKs und nachfolgender NF- κ B-Aktivierung führt (De Nardo D., 2015). Durch diesen Aktivierungsschritt werden zelluläre Abwehrmechanismen in Gang gesetzt mit der Förderung akuter inflammatorischer Prozesse und der damit einhergehenden Rekrutierung von weiteren Immunzellen und Lymphozyten zum Entzündungsherd. Folglich kann eine angemessene inflammatorische Antwort auf ein spezifisches Pathogen geliefert werden (De Nardo D., 2015).

Für die Vermittlung einer TLR4-abhängigen, aber MyD88-unabhängigen Aktivierung der NF- κ B- und IFN- β -Produktion ist TRIF verantwortlich (Yamamoto M. et al., 2002.; Yamamoto M. et al. 2003a). Zudem spielt es eine Rolle bei der TLR3-abhängigen IFN- β -Produktion (Oshiumi H. et al., 2003). Dabei ermöglichen TIR-TIR Interaktionen die Organisation von Signalkomplexen bestehend aus TLRs, zytosolischem TRAM und TRIF. Die TRIF nachgeschalteten Signaltransduktionsmechanismen führen ferner zur Aktivierung verschiedener Transkriptionsfaktoren, wie NF- κ B, IRF3 und AP-1, was zur Produktion von Zytokinen und Typ-I IFN führt sowie die Reifung von myeloischen dendritischen Zellen (MDC) stimuliert (Yamamoto M. et al. 2003a; Sato S. et al., 2003; Fitzgerald K. A. et al., 2003).

Neben TLRs welche häufig an der Zelloberfläche exprimiert werden, existieren weiterhin intrazelluläre PRRs, die NLRs. Diese assemblieren in Folge einer Aktivierung zu Multi-Protein Signalkomplexen (Plattformen), den Inflammasomen, welche für die Prozessierung und Sekretion inflammatorischer Zytokine, wie IL-1 β und IL-18 verantwortlich sind (Hansson G.K. und Hermansson A., 2011). Als bekannter Vertreter konnte gezeigt werden, dass NLRP3 durch Cholesterin-Kristalle in Makrophagen aktiviert wird (Düwell P. et al., 2010; Rajamaki K. et al., 2010). Zudem wurde gezeigt, dass die Phagozytose von oxLDL-Partikeln in humanen Makrophagen eine NLRP3-vermittelte IL-1 β -Sekretion bewirkt. Dabei ist die Initiierung abhängig von der Erzeugung reaktiver oxidativer Spezies und steht in Zusammenhang mit der bekannten NLRP3-Aktivierung über den Cathepsin B Signalweg (Jiang Y. et al., 2012). Eine Verstärkung der NLRP3-vermittelten Immunantwort durch Inkubation mit oxLDL konnte zudem durch die Assoziation von oxLDL mit Immunkomplexen in der humanen Makrophagen-Zelllinie THP-1 nachgewiesen werden (Rhoads J.P. et al., 2017).

Die Aktivierung einer TLR-vermittelten Inflammation durch native Lipoproteine, wurde in der vorliegenden Arbeit durch eine Inkubation von humanen PBMCs mit HDL, LDL und VLDL untersucht. Das bislang am besten charakterisierte NLRP3 Inflammasom kontrolliert nach einer Aktivierung die Reifung der (IL)-1 Zytokine IL-1 β und IL-18 (Jo E.-K. et al., 2016). Als äußerst relevantes Schlüsselzytokin für die Induktion einer NLRP3 vermittelten Immunantwort,

wurde die stimulatorische Wirkung nativer Lipoproteine auf die Prozessierung und Sekretion von IL-1 β analysiert. Unter Verwendung physiologisch relevanter Konzentrationen, konnte nach einer Stimulation mit nativem HDL keine IL-1 β -Sekretion im Überstand von PBMCs festgestellt werden. Die LDL-Stimulation initiierte hingegen eine mäßige IL-1 β -Sekretion in PBMCs, wobei diese nach der Stimulation mit VLDL stärker IL-1 β in den Überstand sekretierten.

In einer Studie konnte bereits gezeigt werden, dass auch oxidierte Phospholipide, oxLDL, gesättigte Fettsäuren und Lipoprotein(a) über einen CD36- und TLR2-gekoppelten Mechanismus Apoptose in Makrophagen induzieren (Seimon T.A., 2010). In der vorliegenden Studie wurde eine Delipidierung von VLDL vorgenommen, um herauszufinden, ob die Lipid- oder Proteinfraktion für die IL-1 β -vermittelte Immunantwort in PBMCs verantwortlich ist. Durch die Stimulation von PBMCs mit nativem VLDL, verglichen zu delipidiertem VLDL, konnte kein Unterschied bei der IL-1 β -Sekretion von PBMCs gemessen werden. Demnach lässt sich der gezeigte Effekt auf die stimulative Wirkung der Proteinfraktion von VLDL zurückführen. Die Proteinfraktion von VLDL beinhaltet die regulativ wirkenden Apolipoproteine B-100, E, C1, C2, C3 (Hegele R.A., 2009). Eine bereits veröffentlichte Proteomanalyse von Plasma Lipoprotein-Frakturen untersuchte die Abundanz der heterogenen Apolipoprotein-Familie in VLDL. Anhand von Proteomanalysen konnten dabei ApoC3, ApoE und ApoC2, als die in VLDL am stärksten vertretenen Proteine nachgewiesen werden (Lepedda A.J. et al., 2013). Durch die in der vorliegenden Studie vorgenommene Stimulation humaner PBMCs mit den Apolipoproteinen C3, E und C2 konnte lediglich nach einer Inkubation mit ApoC3 eine Sekretion von IL-1 β im Überstand von PBMCs belegt werden. Zudem konnte durch eine elektrophoretische Auftrennung verschiedener Lipoprotein-Präparationen von HDL, LDL und VLDL nach Western Blot-Transfer und Antikörperinkubation das Vorkommen von ApoC3 in allen VLDL-Aufreinigungen bestätigt werden. Dabei waren lediglich sehr schwache oder keine ApoC3-Banden in HDL und LDL nachweisbar. ApoC3, als das im Plasma am stärksten vertretene ApoC, konnte somit ebenfalls als das am stärksten vertretene Apolipoprotein in VLDL bestätigt werden.

ApoC3 wurde infolgedessen als mögliche Ursache der vorliegenden IL-1 β stimulierenden Wirkung von nativem VLDL angenommen. Daher wurde der stimulierende Effekt durch eine Inkubation humaner PBMCs mit Konzentrationen, wie sie in Patienten mit atherosklerotischen Erkrankungen, wie beispielsweise CKD oder AMI vorliegen verifiziert. Hierbei konnte eine deutlich konzentrationsabhängige IL-1 β -Sekretion in humanen PBMCs beobachtet werden. Hingegen war der gezeigte Effekt überraschenderweise in murinen BMDMs weitestgehend vernachlässigbar. Diese Beobachtung steht im Einklang mit bisherigen Studien über beträchtliche Unterschiede zwischen der humanen und murinen Inflammation-Aktivierung (Khare S. et al., 2012; Sha W. et al., 2014; Wang H. et al., 2013). Zudem wurde mit der

getesteten Konzentration auch ein zeitabhängiger, rascherer Anstieg im Zeitfenster zwischen 3 und 6 h, verglichen zu LPS gemessen. Die Unterschiede in der Kinetik zwischen LPS und ApoC3 in Folge einer Inkubation humaner PBMCs bestärken zudem die Annahme, dass die ApoC3-vermittelte Stimulation eine alternative NLRP3-aktivierende Signaltransduktion involviert.

6.3 Mechanismen der Inflammasom-Aktivierung

Als wichtige intrazelluläre PRRs sind die Mitglieder der NLRs in der Lage zu Multiprotein-Komplexen zu assemblieren. Die sogenannten Inflammasome spielen eine wichtige Rolle als Vermittler der angeborenen Immunantwort durch die Zytokin-induzierte Rekrutierung von Immunzellen. Zudem kommt es zur Aktivierung der erworbenen Immunabwehr sowie möglicherweise einer nachfolgend pathologischen Wirkung bei der Entstehung entzündungsbedingter Erkrankungen (Martinon F. et al., 2002; Wang L. et al., 2002).

Die NLR-Familie im Menschen setzt sich aus 22 Mitgliedern zusammen, wobei in der Maus bislang 34 Mitglieder beschrieben wurden (Ting J.P. et al., 2008). Die Bildung des NLRP3-Inflammasoms, als einer der bekanntesten Inflammasom-Plattformen, erfolgt unter Zusammenschluss des PRR-Sensors mit dem PYD-CARD Adaptor-Protein ASC und Caspase-1 (Martinon F. et al., 2002; Kayagaki N. et al., 2011).

Der Zusammenschluss und die damit einhergehende Aktivierung des NLRP3-Proteinkomplexes initiiert die proteolytische Spaltung von inaktiver Pro-Caspase-1 zur aktivierten Caspase-1 p10/20. Diese fungiert als Initiator für die Prozessierung der Zytokin-Vorläufer Pro-IL1 β und Pro IL-18 in ihre bioaktive Form (Martinon F. et al., 2002; Wang L. et al., 2002). In der vorliegenden Arbeit konnte die ApoC3-vermittelte Rekrutierung von Caspase-1 zur IL-1 β -Prozessierung verifiziert werden, was die durch ApoC3-induzierte NLRP3-Aktivierung bestätigt.

Eine beobachtete Konsequenz der klassischen Inflammasom-Aktivierung stellt das Auslösen einer schnellen, proinflammatorischen Form von nekrotischem Zelltod, der Pyroptose dar. Die Induktion von Pyroptose erfolgt nach Inflammasom-Aktivierung durch Aggregieren von ASC-Dimeren zu einem sogenannten großen, supramolekularen Pyroptosom, welches als Aktivierungsmatrix von Pro-Caspase-1 dient (Fernandes-Alnemri T. et al., 2007). Infolgedessen induziert aktivierte Caspase-1 p10/20 die Spaltung von Pro-IL-1 β , welches für die Vermittlung von Pyroptose verantwortlich ist (Latz E. et al., 2013). In der vorliegenden Arbeit konnte, abweichend von dem in Makrophagen klassischerweise auftretenden Effekt, keine pyroptotische Antwort durch eine ApoC3-vermittelte NLRP3-Aktivierung nachgewiesen werden.

Als Folge der Phosphorylierung des Adaptor-Proteins ASC nach klassischer NLRP3-Aktivierung wird zudem die Bildung von Speck-ähnlichen ASC-Aggregaten beschrieben. Dabei

handelt es sich um makromolekulare ASC-Dimere, welche als zytosolische Aggregate in Folge der NLRP3-Aktivierung entstehen (Hara H. et al., 2013). Dieser Effekt konnte nach einer ApoC3-Stimulation ebenfalls nicht beobachtet werden, was die Vermutung einer alternativen Inflammasom-Aktivierung unterstützt.

Das NLRP3-Inflammasom kann durch diverse Stimuli aktiviert werden. Vorab wurde gezeigt, dass eine Ligation von TLR-Liganden, wie mikrobielle Stimuli oder Muramyl-Dipeptid keine direkte Aktivierung von NLRP3 bewirkt, diese aber einen notwendigen Priming-Effekt auf NLRP3 und dessen Rekrutierung hat (Bauernfeind F.G. et al., 2009).

In Studien konnte zudem gezeigt werden, dass FAS-assoziiertes death domain Protein (FADD) und Caspase-8 ebenfalls die Induktion der NLRP3-Expression während des Primings regulieren (Allam R. et al., 2014; Gurung P. et al., 2014; Lemmers B., 2007).

Ferner konnte eine NLRP3-Aktivierung in Makrophagen durch ATP, Poren-formende Toxine und feste Partikeln, lediglich nach einer Vorbehandlung mit mikrobiellen Stimulanzen, wie LPS oder Zytokinen erfolgen (Bauernfeind F.G. et al., 2009; Harder J. et al., 2009; Franchi L. et al., 2009).

Im Vorfeld wurden bereits eine Reihe pathologischer Wirkstoffe, wie beispielsweise Cholesterol-Kristalle, oxLDL und Harnsäurekristalle als Induktoren einer NLRP3-abhängigen IL-1 β -Sekretion in murinen Makrophagen über das klassische NLRP3-Signalling identifiziert. Die Folge sind Krankheitszustände, wie sie bei Atherosklerose und weiteren vielfältigen neuro- und autoinflammatorischen Krankheiten vorliegen (Düwell P. et al. 2010; Jiang Y., 2012; Martinon F. et al., 2006).

Die bisher entdeckten, physiologisch relevanten Inflammasom-aktivierenden Wirkstoffe, stimulieren demnach NLRP3 ebenso nicht direkt, sondern nach dem Priming mit TLR-aktivierenden Liganden, wie beispielsweise LPS und der damit einhergehenden NF- κ B- und MAPK-abhängigen Genexpression der Inflammasom-Komponenten NLRP3, ASC und Pro-Caspase-1, sowie den Zytokin-Proformen IL-1 β , IL-18 und IL-33 (Zewinger S. et al., 2015b). Daraus resultiert eine lokale Entzündung in den betroffenen arteriellen Gefäßwänden und Gelenken, die auf einzelne Kompartimente begrenzt ist (Düwell P. et al., 2010; Martinon F. et al., 2006).

Für die klassische NLRP3-Aktivierung wird folglich ein räumlich und zeitlich unabhängiges zwei-Signal-Modell beschrieben. Das erste Signal stellt demnach der Rezeptor-induzierte (bspw. TLR) Priming-Schritt, durch die Vorbehandlung mit mikrobiellen oder endogenen Molekülen, zur NF- κ B-abhängigen Genexpression dar (He Y. et al., 2016).

Das zweite Signal, welches die Oligomerisierung von NLRP3 initiiert, wird über bislang fünf identifizierte Mechanismen vermittelt. Dazu gehören der häufig beobachtete zelluläre K⁺-Efflux (Muñoz-Planillo R. et al., 2013; Pétrilli V. et al., 2007), die mitochondriale Translokation (Misawa T. et al., 2013; Subramanian N. et al., 2013; Zhou R. et al., 2011), die mitochondriale

Dysfunktion und damit assoziierte ROS (Zhou R. et al., 2011). Außerdem wurden die phagolysosomale Destabilisierung und zytosolische Freisetzung von Cathepsinen nach Verdau großer, partikulärer Agonisten (Hornung V. et al., 2008), sowie die Freisetzung mitochondrialer DNA (mtDNA) oder des mitochondrialen Phospholipids Cardiolipin (Iyer S.S. et al., 2013; Nakahira K. et al., 2011; Shimada K. et al., 2012) beschrieben.

In der vorliegenden Arbeit konnte kein K⁺-Efflux durch eine ApoC3-vermittelte NLRP3-Aktivierung als notwendiger sowie ausreichender Effektormechanismus der klassischen Inflammasom-Aktivierung nachgewiesen werden. Dies deutet weiterhin auf eine alternative ApoC3-vermittelte Inflammasom-Aktivierung.

Als wichtiger Priming-Ligand der NLRP3-Aktivierung konnten neuere Studien LPS als direkten, zytosolischen Effektor von Caspase-11 in Maus und der dazu im Menschen orthologen Caspase-4 und Caspase-5 sowie die daran anschließenden Ereignisse der NLRP3-Aktivierung und nekrotischem Zelltod identifizieren (Kayagaki et al., 2011; Shi et al., 2014). Der Mechanismus beruht dabei auf dem zytosolischen Binden der CARD-Domäne und der damit einhergehenden Caspase-Oligomerisierung und Aktivierung (Shi et al., 2014). Dieser vom klassischen zwei-Signal-Modell abweichende Mechanismus wird als nicht-kanonische NLRP3-Aktivierung bezeichnet (Lamkanfi M. und Dixit, V.M., 2014; Storek K.M. und Monack D.M., 2015).

Eine weitere Studie, bei der ein vom klassisch-kanonischen NLRP3-Aktivierungsverlauf abweichender Mechanismus belegt wurde, konnte eine über TLR4-vermittelte NLRP3-Aktivierung in humanen Monocyten nachweisen (Gaidt M.M. et al., 2016). Diese alternative Inflammasom-Aktivierung unterliegt der NLRP3 vorgeschalteten Beteiligung der TLR4-TRIF-RIPK1-FADD-CASP8-Achse, was anhand genetischer Analysen eines monozytären Transdifferenzierungssystems gezeigt werden konnte (Gaidt M.M. et al., 2016). In diesem Zusammenhang konnten zudem keine klassischen Faktoren der Inflammasom-Rekrutierung, wie Pyroptose und K⁺-Efflux nachgewiesen werden. Die in der Studie propagierte direkt durch LPS vermittelte Caspase-Oligomerisierung mit der daran anschließenden IL-1 β -Sekretion, stellt somit eine weitere alternative Inflammasomaktivierung zu dem vor allem im murinen System etablierten zweistufigen Signalmodell dar.

In der vorliegenden Arbeit konnte ApoC3, als ein alternativer, physiologisch relevanter Stimulus der NLRP3-Aktivierung identifiziert werden, welcher beide Signalschritte der klassischen NLRP3 Aktivierung vermittelt. Als Signal 1 ermöglichte die Vorinkubation mit ApoC3 eine durch Nigargin induzierte NLRP3-vermittelte IL-1 β -Sekretion.

Dabei induzierte ApoC3 eine Dosis-abhängige, sukzessive IL-1 β -Sekretion. Im Gegensatz dazu wird bei dem Aktivierungsprozess der klassisch-kanonischen NLRP3-Aktivierung eine alles oder nichts Antwort beschrieben (Liu T. et al., 2014). Dieser Effekt untermauert erneut

eine alternative, ApoC3-vermittelte NLRP3-Aktivierung in PBMCs, welche jedoch in murinen BMDMs vernachlässigbar zu sein scheint.

Neben der lokalen Entzündung induziert ApoC3 zusätzlich die systemische Entzündung, was seine große physiologische Relevanz für den Beitrag zur Entstehung von Atherosklerose und weiteren entzündungsbedingten Erkrankungen verdeutlicht. ApoC3, als ein wichtiger Regulator des Lipoprotein-Metabolismus, konnte bereits mit Hypertriglyceridämie und dem Vorschreiten von CVD in Zusammenhang gebracht werden (Ooi E.M. et al., 2008; Kohan A.B., 2015). Eine Reihe klinischer Studien konnten dabei ein großes Potenzial von ApoC3 als kardiovaskulären Risikofaktor identifizieren (Sacks F.M., et al., 2000; Lee S.J. et al., 2003, Onat A., et al., 2003; Gerber Y. et al., 2003; Scheffer P.G. et al., 2008; Olivieri O. et al., 2010; Mendivil C.O et al., 2011). ApoC3 ist außerdem in verschiedenen Prozessen zur Stimulation von Atherogenese und vaskulärer Inflammation involviert (Sacks F.M. et al., 2011). Als Bestandteil von LDL kann ApoC3 das Binden von LDL an vaskuläres Proteoglykan vermitteln und somit das Verbleiben von LDL in der Arterienwand fördern (Hiukka A. et al., 2009). Neben Hypertriglyceridämie korrelieren erhöhte ApoC3-Level außerdem mit Insulin-Resistenz und Fettleibigkeit. Dabei scheinen ApoB Lipoproteine mit ApoC3 wegen ihrer verhältnismäßig geringen Plasmakonzentration das Risiko zu erhöhen (Lee S.J., et al., 2003; Mendivil C.O. et al., 2011). Pollin et al. konnten diese Hypothese durch die Entdeckung, dass Menschen mit genetischer Defizienz von ApoC3 geringere TG-Level, erniedrigte LDL Cholesterol-Level, sowie reduzierte Atherosklerose zeigen belegen (Pollin et al., 2008). Außerdem sind loss of function Mutationen von ApoC3 mit einem geringeren Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen assoziiert (Jorgensen A.B. et al., 2014; TG and HDL Working Group of the Exome Sequencing Project et al., 2014).

6.4 TLR-Signalling (Signal 1)

Klassischerweise kommt es bei einer TLR-Aktivierung zur beschriebenen Homo- oder Heterodimerisierung. Dabei bildet TLR4 für gewöhnlich Homodimere, wohingegen eine Aktivierung von TLR2 eine Heterodimerisierung mit TLR1 oder TLR6 bedingt (Jin M.S. et al., 2007; Jin M.S. und Lee J.O., 2008; Kang J.Y et al., 2009).

Die Frage welcher TLR-Rezeptor ApoC3-induziertes Signalling vermittelt, konnte in der vorliegenden Arbeit mit einer Beteiligung von TLR2 und TLR4 beantwortet werden. Anhand einer Co-Lokalisationsstudie konnte eine Assoziation von TLR2 und TLR4 nach einer Stimulation mit ApoC3 nachgewiesen werden. Die Co-Lokalisation von TLR2/4 in Form einer Heterodimerisierung nach ApoC3-Stimulation, ließ sich weiterhin durch eine MALDI-TOF massenspektrometrische Analyse bestätigen. Somit vermittelt ApoC3 eine neue Form der TLR2/TLR4 Heterodimerisierung als Initiator der NF- κ B-abhängigen Expression von Pro-IL-1 β

sowie von Komponenten des NLRP3-Inflammasoms. Durch die massenspektrometrische Analyse konnte nach ApoC3-Stimulation zudem die Assoziation von SCIMP einem Mitglied der Transmembranadaptor-Proteine (TRAP) mit TLR2 und TLR4 nachgewiesen werden. Die Mitglieder der TRAP sind strukturell verwandt, weisen aber keine enzymatische Funktion auf. Ferner ist die Proteinfamilie sehr heterogen und unterscheidet sich in Hinblick auf ihre Expressionsmuster, Interaktionspartner und biologische Rolle. Dennoch haben sie die gemeinsame Funktion, Protein-Protein-Interaktionen zu ermöglichen und folglich als Effektormoleküle die induzierbare Rekrutierung von Proteinen oder Proteinkomplexen in spezifischen membranannahen Kompartimenten und Mikrodomänen, meist in Form einer Phosphorylierung zu fördern. Dadurch sind sie maßgeblich an der Induktion von Signaltransduktionsmechanismen beteiligt (Stepanek O. et al., 2014).

SCIMP ist das derzeit am besten untersuchte Mitglied der pTRAP (palmitoylated TRAP) Subfamilie. Es konnte bereits gezeigt werden, dass SCIMP mit der Familie der Src Kinasen (SFKs) assoziiert und Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC-) Klasse-II Signalling in B-Zellen und Dectin-1 Signalling in Dendritischen Zellen reguliert (Draber P. et al., 2011; Kralova J. et al., 2016).

Eine ApoC3-vermittelte Aktivität von SCIMP konnte in der vorliegenden Arbeit weiter verifiziert werden. SCIMP wurde bereits als Transmembran-Adaptor identifiziert, welcher an die TIR-Domäne von TLR4 bindet, was zur Initiierung einer proinflammatorischen Zytokin-Produktion in Makrophagen und Dendritischen Zellen führt (Luo L. et al., 2017; Kralova J. et al., 2016).

Somit triggert ApoC3 die Heterodimerisierung des Signalkomplexes bestehend aus TLR2 und TLR4 zusammen mit SCIMP, abweichend von der für TLR4 klassischerweise beschriebenen Homodimerisierung (TLR4/TLR4 Homodimer) (Peri F. und Calabrese V., 2014). Die Möglichkeit einer theoretischen Heterodimerisierung, durch eine Interaktion intrazellulärer TLR-Domänen und anschließender Signaltransduktion, konnte zuvor belegt werden (Lee H.K. et al., 2004). Latz et al. konnten zudem für TLR9 zeigen, dass eine Liganden-induzierte konformelle Änderung in Form einer Dimersierung die Aktivierung von TLR9 und folglich Induktion der Signaltransduktion reguliert (Latz E. et al., 2007). ApoC3 ist demnach der erste Ligand, der diese Art von Interaktion zwischen TLR2 und TLR4 unter Involvierung von SCIMP vermittelt. Zudem konnte in dieser Arbeit eine Heterodimerisierung von TLR2 zu TLR1 oder TLR6 bei der ApoC3-vermittelten Inflammasom-Aktivierung ausgeschlossen werden, wie sie häufig zur funktionellen Aktivierung von TLRs vorausgesetzt wird (Jin M.S. et al., 2007; Jin M.S. und Lee J.O., 2008; Kang et al., 2009).

Auf Grund der Abwesenheit von bekannten Effekten der klassischen Inflammasom-Aktivierung nach einer Stimulation mit ApoC3, wurde die Involvierung von Caspase-8 auf Grundlage der bereits bekannten NLRP3-Aktivierung über die alternative TLR4-TRIF-RIPK1-FADD-CASP8-Achse untersucht (Gaidt M.M. et al., 2016).

In der vorliegenden Studie konnte eine Inhibition von in der Kaskade beteiligter Aktivierungsschritte die ApoC3-vermittelte IL-1 β -Sekretion unterbinden. Dadurch kann eine Beteiligung von Caspase-8 nach einer ApoC3-Stimulation in PBMCs bestätigt werden.

Für Caspase-8 wird unter anderem eine wichtige Rolle in der Vermittlung von Apoptose beschrieben (Tummers B. und Green D.R., 2017). Der extrinsische Signalweg von Apoptose wird durch sogenannte Todesrezeptoren (death receptor bzw. activator) auf der Zellmembran vermittelt (Tummers B. und Green D.R., 2017). Dabei werden ein Teil der Mitglieder der tumor necrosis factor receptor superfamily (TNFRSF) ligiert, zu welcher unter anderem der tumor necrosis factor (TNF) Rezeptor-1 (TNFR1, TNFRSF1a), CD95 (TNFRSF6, Apo-1, and Fas), TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) Receptor-1 und -2 (TRAIL-R1/2; DR4/5, und TNFRSF10a/b), DR3 (TNFRSF25), und DR6 (TNFRSF21) gehören. Durch die Aktivierung von Caspase-8 (Initiator Caspase) wird in diesem Mechanismus anschließend Caspase-3 aktiviert, was wiederum zur nachfolgenden Prozessierung von Zielproteinen und letztendlich Apoptose führt. Extrinsische Apoptose beruht auf der Bildung des DISC-Komplexes (death inducing signaling complex), welcher durch den Zusammenschluss von FADD (Fas associated via death domain) und Caspase-8 gebildet wird (Tummers B. und Green D.R., 2017).

Die am besten untersuchte nicht-apoptotische Funktion von FADD und Caspase-8 ist die Repression von Nekroptose-Signalling, wobei eine Inhibition von Caspase-8 zur Todesrezeptor oder von TLR-Signalling nachgeschalteter Nekroptose führt (Mocarski E.S. et al., 2015; Feltham R. et al, 2017).

Die in der vorliegenden Arbeit untersuchte, alternative ApoC3-vermittelte NLRP3-Aktivierung involviert demnach ohne Beteiligung weiterer Liganden ebenfalls die Rekrutierung von Caspase-8. Die ApoC3-induzierte Involvierung von Caspase-8 als Folge einer TLR4-Aktivierung wird dabei durch die Heterodimerisierung von TLR2/4 mit der Beteiligung von SCIMP ermöglicht. Welche nachgeschalteten Signaltransduktionsschritte genau zur Rekrutierung von Caspase-8 führen, wurden in weiteren Analysen näher aufgeschlüsselt.

6.5 Signal 2

Obwohl SCIMP nicht über ein sogenanntes immunoreceptor tyrosine-based activation motif (ITAM-Domäne) verfügt, ist SCIMP in Makrophagen konstitutiv mit der Tyrosin-Kinase Lyn, einem Mitglied der Src-Familie assoziiert. Diese Interaktion ist für die Tyrosin-Phosphorylierung von TLR4 und damit TLR-abhängige Zytokin-Produktion erforderlich (Lou L. et al., 2017). Zudem konnte eine konstitutive Assoziation zwischen SCIMP mit der SH3-Domäne von Lyn-Kinase in B-Zellen aufgedeckt werden. Nach einer Stimulation des MHC-Klasse-II konnte dabei eine Phosphorylierung von SCIMP an verschiedenen Tyrosin-Resten gezeigt werden (Draber P. et al., 2011). Bereits bekannt ist, dass Lyn die Tyrosin-Kinase Syk direkt phosphoryliert (Amoui M. et al., 1997; Gauld S.B. und Cambier J.C., 2004). Studien konnten

dabei aufdecken, dass die Rekrutierung und Aktivierung von Lyn bereits durch eine einzelne ITAM-Tyrosin-Phosphorylierung erfolgt, wohingegen ein Binden und Aktivieren von Syk eine duale ITAM-Phosphorylierung erfordert (Johnson et al., 1995; Pao et al., 1998). Die Tyrosin-Kinase Syk interagiert mit Proteinen und Rezeptoren, welche ITAM-Domänen aufweisen (Fitzpatrick E., 2015). Die allgemeine Aktivierung von Syk folgt der Stimulation verschiedener PRRs, insbesondere von C-Typ Lectin-Rezeptoren. Syk ist daher maßgeblich an der Induktion einer Genexpression proinflammatorischer Zytokine involviert. In welchem Ausmaß Syk bei der Aktivierung des NLRP3 Inflammasoms beteiligt ist, konnte bislang noch nicht eindeutig geklärt werden (Shio M.T. et al., 2009; Hara H. et al., 2013; Gross O. et al., 2009). In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die LPS- als auch ApoC3-vermittelte IL-1 β -Sekretion eine Syk-abhängige ROS-Produktion erfordert. Eine Rolle von Syk-vermitteltem ROS konnte dabei ebenfalls für eine Inflammasom-Aktivierung während Pilzinfektionen beschrieben werden (Gross O. et al., 2009). Die Aktivierung von Syk verläuft dabei über ITAM-gekoppelte mykotische Pattern-Recognition Rezeptoren. Zudem konnte die Aktivierung des allosterischen Enzyms Syk, durch ein Binden von ITAM in B-Zell-Rezeptor-vermittelter Signaltransduktion gezeigt werden (Rolli V. et al., 2002). Ferner ist Syk für die Phosphorylierung von ASC, einem wichtigen Faktor der Inflammasom-Aktivierung, verantwortlich (Shio M.T. et al., 2009; Hara H. et al., 2013).

In der vorliegenden Studie konnte gezeigt werden, dass die ApoC3-vermittelte Signaltransduktion über die direkte Interaktion von SCIMP mit der Tyrosin-Kinase Lyn verläuft, welche wiederum für die Phosphorylierung von Syk-Kinase verantwortlich ist. Dieser gebildete Komplex bestehend aus SCIMP-LYN-Syk induziert die Produktion von intrazellulären ROS, was als vorgeschaltetes Ereignis der alternativen, Caspase-8-abhängigen Inflammasom-Aktivierung identifiziert wurde. Eine Involvierung von Syk bei der Aktivierung von Ca²⁺-Influx, konnte bereits in anderen etablierten Modellen gezeigt werden (Kulathu Y. et al., 2008). Der in der vorliegenden Arbeit untersuchte Mechanismus ist ebenfalls von Ca²⁺-induzierter Caspase-8 Prozessierung abhängig. Dies wurde durch die starke Reduktion von prozessierter Caspase-8 nach Inhibition von Syk, TRPM2, sowie in Anwesenheit von EGTA deutlich. Dabei konnte ein potenzieller, nicht-kanonischer Effekt auf die NLRP3-Aktivierung durch BAPTA-AM ausgeschlossen werden (Katsnelson M.A. et al., 2015). Die Abhängigkeit des Ca²⁺-Influx von Syk wurde somit, wie zuvor in anderen Signaltransduktionsmechanismen der NLRP3-Aktivierung, für den alternativen Weg der vorliegenden Arbeit ebenfalls deutlich.

Die Beteiligung von Ca²⁺-Ionen als Second-Messenger ist eine essenzielle Komponente in vielen zellulären Signaltransduktionskaskaden. Eine wichtige Rolle spielen intrazelluläre Ca²⁺-Ströme vor allem bei der Vermittlung von extrazellulären Stimuli, wie bei der Aktivierung von G-Protein gekoppelten Rezeptoren und T cell antigen receptor (TCR) (Werry T. D. et al., 2003; Gallo E. M et al., 2006; Gardner P. 1989; Wang C., 2003). Allgemein involviert der kanonische

Signalweg die Beteiligung von Phosphatidylinositol was eine Ligand-Rezeptor Interaktion vermittelt und somit zur Freisetzung von Ca^{2+} aus einem intrazellulären Kompartiment führt. Ein Fluss von Ionen wie beispielsweise K^{+} -Efflux, Ca^{2+} -Signalling, Na^{+} -Influx und auch Cl^{-} -Efflux wurden vorab als kritische Vorgänge in der Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms identifiziert (Muñoz-Planillo R. et al., 2013; Murakami T. et al., 2012; Katsnelson M. und Dubyak G., 2013; Green J.P. et al., 2018). Es wurde bereits gezeigt, dass Ca^{2+} -Signalling für die Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms erforderlich ist. Dabei konnte nachgewiesen werden, dass eine Hemmung der Ca^{2+} -Mobilisierung die Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms heruntersetzt. Ein Effekt auf das NLRC4 und AIM2-Inflammasom konnte hingegen widerlegt werden (Murakami T. et al., 2012; Lee G.S. et al., 2012). Murakami et al. konnten die Interaktion von Inositoltriphosphat (IP₃), ein Produkt der Phospholipase C (PLC)-vermittelten Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat-Hydrolyse, mit dem Rezeptor IP₃R am Endoplasmatischen Reticulum (ER) und der damit einhergehenden Förderung der Ca^{2+} -Mobilisierung und NLRP3-Inflammasom Aktivierung feststellen (Murakami T. et al., 2012). Dabei konnte nicht geklärt werden, wie eine Ca^{2+} -Mobilisierung zur Aktivierung von NLRP3 führt. Weitere Studien konnten eine Rolle der übermäßigen Freisetzung von ER Ca^{2+} -Ionen belegen, was mit der Überfrachtung von mitochondrialen Ca^{2+} -Speichern einhergeht. Somit wird die mitochondriale Ruptur ausgelöst, was wiederum zur Produktion von mitochondrialem ROS führt und schließlich als wesentlicher Trigger das NLRP3-Inflammasom aktiviert (Lemasters J.J. et al., 2009; Camello-Almaraz C. et al., 2006; Csordás G. und Hajnóczky G., 2009). Hingegen konnte eine weitere Studie beweisen, dass Ca^{2+} -Signalling entbehrlich für die Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms zu sein scheint. Somit konnte BAPTA, ein starker Ca^{2+} -Chelator und Puffer von zytosolischem Ca^{2+} unabhängig von seiner Funktion als Ca^{2+} -Chelator die NLRP3 Inflammasom-Aktivität und IL-1 β -Prozessierung hemmen (Katsnelson M. A. et al., 2015). In einer 2017 veröffentlichten Studie von Balswin A.G. et al. wurde gezeigt, dass 2-Aminoethoxydiphenyl borate (2 APB), ein zellpermeabler, niedermolekularer Inhibitor der Ca^{2+} -Homeostase mit unterschiedlichen Wirkorten die NLRP3-Aktivität unterdrückt. Dies konnte unabhängig von seiner Möglichkeit zur Inhibition des IP₃R beobachtet werden (Baldwin A. G. et al., 2017).

Ca^{2+} -Ionen spielen bei der Liganden-induzierten Aktivierung von NLRP3 eine entscheidende Rolle. Beispielsweise sind sie essenziell für die klassische NLRP3-Aktivierung durch Kristalle. Dabei vermitteln sie die Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms, durch die Induktion von mitochondrialen ROS. In diesem Zusammenhang konnte gezeigt werden, dass ROS ebenfalls für die Aktivierung des Kationenkanals TRPM2 in der Plasmamembran und damit einhergehend für den Influx von Ca^{2+} -Ionen verantwortlich ist (Zhong Z. et al., 2013). Weitere Follow-up Studien konnten zusätzliche Stimuli identifizieren, welche das NLRP3-Inflammasom im Zusammenhang mit Ca^{2+} -Signalling aktivieren (Triantafyllou K. et al., 2013; Abdul-Sater A.A.

et al., 2013; Ito M. et al., 2012; Rossol M. et al., 2012). Um den genauen Mechanismus des Ca^{2+} -Signalling in der Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms aufzuschlüsseln sind weitere Studien notwendig.

Der durch Lyn/Syk-induzierte Ca^{2+} -Influx und die damit einhergehende ROS-Produktion konnte in der vorliegenden Arbeit als vorgeschaltetes Ereignis zur Aktivierung einer Caspase-8-abhängigen, alternativen NLRP3-Aktivierung aufgeschlüsselt werden.

Als weiteres intrazelluläres Signal, das in der Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms beteiligt ist, konnte in vielen Studien oxidativer Stress in Form von ROS nachgewiesen werden. Anfänglich wurde der Ursprung von intrazellulären ROS, welche zur NLRP3-Aktivierung beitragen, hauptsächlich dem NADPH-Oxidase-System zugeschrieben. Dabei zeigen jedoch sowohl murine als auch humane NADPH-defiziente Zellen eine unveränderte NLRP3-Aktivierung (Latz E., 2010; van Bruggen R. et al., 2010). Eine neuere Studie konnte in einem Schädel-Hirn-Trauma-Modell nachweisen, dass die Expression von NLRP3 nach einer Deletion der NOX2 reduziert war. Ferner wurde die NLRP3-TXNIP-Interaktion im zerebralen Cortex von Mäusen nach einem ischämischen Schlaganfall beeinträchtigt, aber nicht im Endothel der Nabelschnurvene, was auf eine gewebespezifische Rolle von zytosolischem ROS bei der NLRP3-Aktivierung schließen lässt (Ma M.M. et al., 2017). Weitere Studien konnten vor allem eine Assoziation zwischen mitochondrialem ROS und einer Aktivierung von NLRP3 nachweisen (Zhou et al., 2011; Nakahira K. et al., 2011). In der klassischen NLRP3-Aktivierung bleibt die genaue Rolle von ROS bislang teilweise kontrovers, da ROS hierbei lediglich bei dem transkriptionellen Priming-Schritt erforderlich zu sein scheint und weniger für die post-translationale NLRP3-Aktivierung als solche (Bauernfeind F. et al., 2011).

In der vorliegenden Arbeit konnte die ApoC3-induzierte ROS-Produktion als initialer Faktor für das Binden von TXNIP an NLRP3 aufgedeckt werden, eine Interaktion der NLRP3-Aktivierung, die vorangehend bereits beschrieben wurde (Zhou R. et al., 2010). Bei der Inflammasom-Aktivierung im humanen Immunsystem konnte TXNIP im Zusammenhang mit oxidativem Stress zuvor ebenfalls eine wichtige Rolle zugeschrieben werden (Tseng H.H. et al., 2016; Zhou R. et al., 2010). Eine Funktion von TXNIP bei der ApoC3-vermittelten Inflammasom-Aktivierung, konnte durch eine gesteigerte Proteinexpression nach ApoC3 Stimulation im Western Blot nachgewiesen werden. Zudem bestätigte die reduzierte Proteinexpression von TXNIP in Western Blot Lysaten humaner PBMCs, durch den Einsatz des Antioxidans NAC, dem Ca^{2+} -Chelator BAPTA-AM und dem Syk-Inhibitor R406, die Abhängigkeit der inhibierten Signaltransduktionsmechanismen zur Aktivierung von TXNIP. Eine Bindung von TXNIP an NLRP3 in humanen PBMCs als Antwort auf eine ApoC3 Stimulation konnte durch eine IP und anschließenden Western Blot gezeigt werden. Zusammengefasst lässt sich somit ein neuer Signaltransduktionsmechanismus zur ApoC3-vermittelten NLRP3 Aktivierung zeigen. Ein Zusammenspiel der TRPM2 vermittelten Ca^{2+} Freisetzung kann über die Ca^{2+} -aktivierten

Kinasen Syk und eine Aktivierung von NOX-basierter ROS Produktion induzieren. Diese induziert ein Binden von TXNIP an NLRP3. Während TXNIP eine überflüssige Funktion bei der klassischen Inflammasom-Aktivierung in BMDMs zu haben scheint, konnte dieses in der vorliegenden Studie als vermittelndes Schlüsselprotein aufgedeckt werden (Masters S.L. et al., 2010). Somit bindet TXNIP als Signal 2 direkt an NLRP3, was dessen funktionellen Zusammenbau bewirkt und folglich eine Prozessierung und Sezernierung von Zytokinen fördert.

6.6 Bedeutung der Ergebnisse

ApoC3 konnte in der vorliegenden Arbeit als Stimulus der NLRP3-Aktivierung aufgedeckt werden, der beide Signale der NLRP3-Aktivierung, das heißt für den transkriptionellen Priming-Schritt sowie die post-translationale NLRP3-Aktivierung liefert. Somit konnte durch eine alleinige Stimulation mit ApoC3 eine Wirkung als Signal 1 und der dadurch induzierten Genexpression von Inflammasom-Komponenten und Pro-IL1- β gezeigt werden. Zusätzlich konnte durch die alleinige Stimulation mit ApoC3 die NLRP3-vermittelte Sezernierung von IL-1 β und Caspase-1 nachgewiesen werden. Dies stellt zu den bislang veröffentlichten, klassischen Formen der NLRP3-Aktivierung einen alternativen Aktivierungsmechanismus dar. Hierbei wurde im Vergleich zur klassischen NLRP3-Aktivierung keine Alles-oder-nichts-Antwort bei der Inflammasom-Aktivierung beobachtet (Liu T. et al., 2014). Vielmehr konnte eine graduelle, dosisabhängige IL-1 β -Sekretion als Antwort auf eine ApoC3-vermittelte NLRP3-Aktivierung festgestellt werden. In der vorliegenden Studie konnte des Weiteren aufgeschlüsselt werden, dass ApoC3 nicht zur Induktion klassischer Ereignisse der Inflammasom-Aktivierung beiträgt. Folglich konnten die Spaltung von Gasdermin D, die Bildung des supramolekularen Pyroptosoms, der Prozess der Pyroptose sowie Kalium-Efflux nicht nachgewiesen werden. Der alternativ beobachtete Signalweg wird hingegen über die TLR4-TRIF-RIPK1-FADD-Caspase-8-Achse vermittelt. Die genauen Prozesse der Signalvermittlung konnten im Zuge der Arbeit noch nicht aufgedeckt werden und bieten somit in Zukunft eine weiterhin wichtige Forschungsgrundlage. Dennoch konnte durch die vorliegenden Ergebnisse eine Rolle des Syk-abhängigen Ca²⁺-Influx und der damit einhergehenden ROS-Produktion aufgedeckt werden. In der vorliegenden Arbeit konnte eine ApoC3-induzierte Heterotrimerisierung zwischen TLR2, TLR4 mit SCIMP nachgewiesen werden. Hierzu wurde im Vorfeld bereits veröffentlicht, dass das Transmembran-Adaptor-Protein SCIMP nach einer LPS-Stimulation über eine TIR-Domäne an TLR4 bindet, was folglich zur inflammatorischen Zytokin-Produktion in Makrophagen und Dendritischen Zellen führt (Lou L. et al., 2017; Kralova J. et al., 2016). SCIMP besitzt keine ITAM-Domäne, wodurch Syk folglich nicht direkt durch SCIMP phosphoryliert wird. SCIMP aktiviert Syk hingegen indirekt über die vorgeschaltete Interaktion mit Lyn-Kinase, welche für die anschließende

Phosphorylierung von Syk verantwortlich ist (Amoui M. et al., 1997). Im Zuge dieser Arbeit konnte folglich ein neuer NLRP3-vermittelnder Aktivierungsmechanismus aufgedeckt werden. ApoC3, als ein wichtiger Bestandteil in TG-reichen Lipoproteinen, vermittelt die bislang noch unbekannte Induktion der Heterotrimerisierung zwischen TLR2/TLR4 und SCIMP zur NF- κ B und MAPK regulierten Genexpression und Aktivierung von NLRP3. Der ApoC3 Signaltransduktionsmechanismus involviert die Aktivierung von TRPM2 vermitteltem Ca^{2+} Influx und der damit einhergehenden Aktivierung von Syk, die wiederum für die Vermittlung von NOX-induzierter ROS-Produktion verantwortlich sind. Aufgrund der erhöhten ROS-Level konnte eine Aktivierung des Schlüsselproteins TXNIP gezeigt werden, welches durch direktes Binden an NLRP3 dessen funktionellen Zusammenbau induziert (Zhou R. et al., 2010). Der endogene Ligand ApoC3 kann somit unabhängig von Priming eine Sezernierung von Zytokinen und dadurch ausgelöste Immunantwort einleiten.

Die pathophysiologische Relevanz der durch ApoC3-vermittelten Immunantwort konnte in der vorliegenden Studie mittels humanisierter Mausmodelle untermauert werden. Dazu wurden in zwei Krankheitsmodellen unter der Verwendung von humanisierten Monocyten eine ApoC3-vermittelte Aktivierung von NLRP3 induziert. Anhand dieser Ergebnisse kann ApoC3 eine wichtige Bedeutung bei der vaskulären Regeneration zugesprochen werden. Zudem kann ein starker Zusammenhang in der Entstehung von Artherosklerose geschlussfolgert werden (Gimbrone M. A., 2016). In dem zweiten Modell der unilateralen Ureterligatur führte eine ApoC3-vermittelte Monocytenaktivierung zu einer erhöhten Nierenschädigung. Die ApoC3-vermittelten Effekte auf die endotheliale Regeneration oder Nierenschädigung konnten bei Wildtyp-Mäusen ohne humane Monocyten hingegen nicht beobachtet werden. Die Ergebnisse der beiden Krankheitsmodelle beweisen die Notwendigkeit einer Interaktion zwischen ApoC3 und humanen Monocyten, die als Ursache für die Entstehung inflammatorischer Organschädigungen verantwortlich ist. Die in den in vitro und in vivo Experimenten angewandte ApoC3 Konzentration entspricht der in VLDL gezeigten physiologisch wirksamen Konzentration und unterstreichen somit zudem die pathologische Relevanz von ApoC3 (Juntti-Berggren L. et al., 2004; Zheng C. et al., 2013). Durch die Verwendung von ApoC3 von verschiedenen Herstellern, sowie ApoC3 aufgereinigt aus humanem Plasma, der Durchführung von Endotoxin-Tests, Endotoxinentfernung und proteomische Analysen von ApoC3, konnte die Anwesenheit von zusätzlichen Verunreinigungen in den Analysen der vorliegenden Arbeit ausgeschlossen werden.

Die Ergebnisse der beiden Krankheitsmodelle und klinischen Studie belegen eine hohe Bedeutung von ApoC3 in der Entstehung und Progression Atherosklerose-assoziiierter Krankheiten. Dies steht im Einklang mit einer Reihe von humanen Studien, bei denen APOC3 loss-of-function-Mutationen zu einer überzeugenden Reduktion der Triglycerid-Plasmakonzentrationen und damit einhergehend verbesserten Kardioprotektion führten (Pollin

T.I. et al., 2008; Jorgensen A. B. et al., 2012; TG and HDL Working Group of the Exome Sequencing Project et al., 2014; Saleheen D. et al., 2017; Jorgensen A.B. et al., 2014; Khetarpal S.A. et al., 2017; Pechlaner R. et al., 2017). ApoC3 kann folglich als wesentlicher Risikofaktor für kardiovaskuläre Krankheiten angesehen werden. Darüber hinaus entwickelten Khetarpal et al. einen monoklonalen Antikörper, der an Lipoprotein gebundenes, humanes ApoC3 bindet und dadurch zur Reduktion der Triglyceridspiegel im Blut führt (Khetarpal S.A. et al., 2017). In einer weiteren Studie konnte anhand eines Diabetes Mellitus Typ 1 Mausmodells gezeigt werden, dass ApoC3-Level basal erhöht sind und diese mittels einer intensiven Insulin Therapie erniedrigt werden können. Die erniedrigten ApoC3-Level zeigten einen präventiven Effekt auf die Ausbildung von Atherosklerose in einem Mausmodell zur Beschleunigung der T1DM-bedingten Atherosklerose (Kanter J.E. et al., 2019). In Übereinstimmung mit der vorliegenden Studie konnte des Weiteren gezeigt werden, dass lediglich ApoC3 in VLDL und LDL von besonderer pathophysiologischer Relevanz ist (Wyler von Ballmoos et al., 2015).

Diese Ergebnisse lassen ApoC3 eine bedeutende Rolle als therapeutisches Target bei der zukünftigen Behandlung und Prävention von Atherosklerose-assoziierten Krankheiten zukommen. Entsprechend der vorherigen Ergebnisse korrelierte ApoC3 in den klinischen Studien der vorliegenden Arbeit, mit einer erhöhten Mortalitätsrate in Patienten bei denen eine Koronarangiographie durchgeführt wurde. Folglich könnten die in klinischen Entwicklungsprozessen getesteten anti-sense Nukleotide gegen ApoC3 zukünftig ein vielversprechender Ansatzpunkt als therapeutische Intervention gegen Atherosklerose-assoziierte Erkrankungen darstellen (Gaudet D. et al., 2015; Graham M.J. et al., 2013). Übereinstimmend konnte in einem Modell zu systemischen Entzündungsprozessen eine erfolgreiche Blockade von IL-1 β oder IL1-R, als wirksame Antikörper-basierte Therapie bestätigt werden (Alexander M.R. et al., 2012; Hung A.M. et al., 2011; Larsen C.M. et al., 2007). Mögliche klinische Vorteile solcher Therapien, wurden kürzlich in den Ergebnissen einer klinischen Studie offengelegt. (Ridker P.M. et al., 2017).

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit verdeutlichen die Wichtigkeit von ApoC3 als ein potenzielles therapeutisches Zielprotein, um die Inflammation und inflammatorische Organschädigung in vaskulären und renalen Erkrankungen zu unterbinden. Basierend auf den gewonnenen Ergebnissen, könnte die Inhibition von ApoC3 beispielsweise durch anti-sense Nukleotide zur Vorbeugung von Inflammasom-Aktivierung als neu therapeutische Intervention herangezogen werden. Ferner könnte ApoC3 dabei helfen, Patienten zu identifizieren, die durch eine Behandlung einen potenziellen Vorteil hätten, beispielsweise durch die IL-1 β -Inhibition mittels Canakinumab (Ridker P.M. et al., 2017). Zusammengefasst konnte durch die Ergebnisse der vorliegende Arbeit ApoC3 als ein neuer Mediator der alternativen Inflammasom-Aktivierung in humanen Monocyten aufgedeckt werden. Der alternative

Signalweg verläuft über eine Heterotrimerisierung von TLR2, TLR4 und SCIMP, was schließlich in einer Organschädigung resultiert. Diese Ergebnisse sind nicht nur für ApoC3 relevant, sondern erweitern das generelle Verständnis der Signalwege, welche für die alternative Inflammation aktivierung von Bedeutung sind.

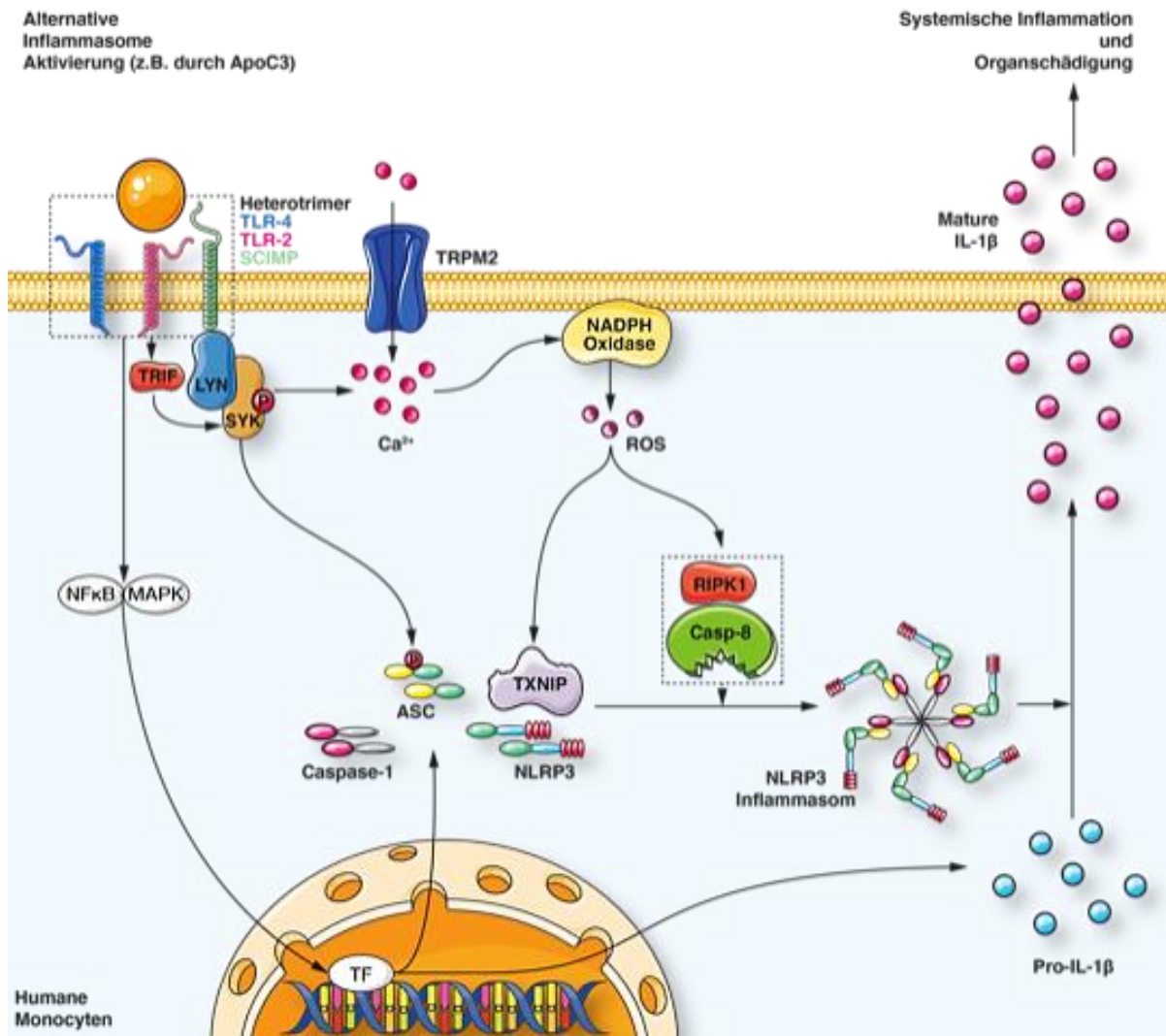


Abb.55: Alternative Inflammation Aktivierung durch ApoC3. (Abb. entnommen aus Zewinger et al. Nat Immunol 2020).

7 Literaturverzeichnis

- Aalto-Setälä, K., Fisher, E.A., Chen, X., Chajek-Shaul, T., Hayek, T., Zechner R., Walsh A., Ramakrishnan, R., Ginsberg H.N., Breslow J.L., (1992).** Mechanism of hypertriglyceridemia in human apolipoprotein (apo) CIII transgenic mice. Diminished verylow densitylipoprotein fractional catabolic rate associated with increasedapo CIII and reduced apo E on the particles. *J. Clin. Invest* 90(5): 1889-900.
- Aalto-Setälä, K., Weinstock, P.H., Bisgaier, C.L., Wu, L., Smith, J.D., Breslow, J.L., (1996).** Further characterization of the metabolic properties of triglyceride-rich lipoproteins from human and mouse apoC-III transgenic mice. *J Lipid Res* 37(8): 1802-11.
- Abdul-Sater, A.A. et al., (2013).** Cyclic-di-GMP and cyclic-di-AMP activate the NLRP3 inflammasome. *EMBO reports* 14(10): 900–6.
- Ajibade, A.A., Wang, H.Y., Wang, R.F., (2013).** Cell type-specific function of TAK1 in innate immune signaling. *Trends Immunol* 34(7): 307-16.
- Akira, S. & Takeda, K., (2004).** Toll-like receptor signaling. *Nature Reviews Immunology* 4: 499-511.
- Akira, S., Takeda, K., Kaisho, T., (2001).** Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity, *Nat. Immunol* 2(8): 675-80.
- Alberts, B. Johnson, A, Lewis, J., Raff, M., Roberts K., Walter, P., (2011).** Molekularbiologie der Zelle. Wiley-Blackwell; 5. Edition, Kapitel 25, S. 1763 f.
- Alnemri, E.S., Livingston, D.J., Nicholson, D.W., Salvesen, G., Thornberry, N.A., Wong, W.W., Yuan, J., (1996).** Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell* 87(2): 171.
- Alexander, M.R., Moehle, C.W., Johnson, J.L., Yang, Z., Lee, J.K., Jackson, C.L. & Owens, G.K., (2012).** Genetic inactivation of IL-1 signaling enhances atherosclerotic plaque instability and reduces outward vessel remodeling in advanced atherosclerosis in mice. *J Clin Invest* 122(1): 70-79.
- Allam, R., Lawlor, K.E., Yu, E.C., Mildenhall, A.L., Moujalled, D.M., Lewis, R.S., Ke, F., Mason, K.D., White, M.J., Stacey, K.J., Strasser, A., O'Reilly, LA., Alexander, W., Kile, B.T., Vaux, D.L., Vince, J.E., (2014).** Mitochondrial apoptosis is dispensable for NLRP3 inflammasome activation but non-apoptotic caspase-8 is required for inflammasome priming. *EMBO Rep* (9): 982-90.
- Amoui, M., Draberova, L., Tolar, P. & Draber, P., (1997).** Direct interaction of Syk and Lyn protein tyrosine kinases in rat basophilic leukemia cells activated via type I Fc epsilon receptors. *Eur J Immunol* 27(1): 321-328.
- Anderson, J.L., Adams, A.D., Antman, S.M. et al. ACC/AHA, (2007).** Guidelines for the management of patients with unstable angina/non ST-elevation myocardial infarction: A report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (Writing Committee to Revise the 2002 Guidelines for the Management of Patients With Unstable Angina/Non ST-Elevation Myocardial Infarction): Developed in collaboration with the American College of Emergency Physicians, the Society for Cardiovascular Angiography: 10.3122/jabfm.2015.02.140189 Diagnosis and Management of Acute Coronary Syndrome 291phy and Interventions, and the Society of Thoracic Surgeons: Endorsed by the American Association of Cardiovascular and Pulmonary Rehabilitation and the Society for Academic Emergency Medicine. *Circulation* 116: e148–e304.

- Akira, S., Uematsu, S. & Takeuchi, O., (2006).** Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 124(4): 783–801.
- Bae, Y.S., Lee, J.H., Choi, S.H., Kim, S., Almazan, F., Witztum, J.L. & Miller, Y.I., (2009).** Macrophages generate reactive oxygen species in response to minimally oxidized low density lipoprotein: toll-like receptor 4- and spleen tyrosine kinase-dependent activation of NADPH oxidase 2. *Circ Res* 104(2): 210-8, 21p following 218.
- Baldwin, A.G. et al., (2017).** Boron-Based Inhibitors of the NLRP3 Inflammasome. *Cell Chem Boil* 24(11): 1321–1335.
- Bauernfeind, F.G., Horvath, G., Stutz, A., Alnemri, E.S., MacDonald, K., Speert, D., Fernandes-Alnemri, T., Wu, J., Monks, B.G., Fitzgerald, K.A. et al., (2009).** Cutting edge: NF-kappaB activating pattern recognition and cytokine receptors license NLRP3 inflammasome activation by regulating NLRP3 expression. *J. Immunol* 183(2): 787–791.
- Bauernfeind, F., Bartok, E., Rieger, A., Franchi, L., Núñez, G., Hornung, V., (2011).** Cutting edge: reactive oxygen species inhibitors block priming, but not activation, of the NLRP3 inflammasome. *J Immunol* 187(2): 613–617.
- Beutler, B.A., (2009).** TLRs and innate immunity. *Blood* 113(7): 1399–1407.
- Burns, K. et al., (1998).** MyD88, an adapter protein involved in interleukin-1 signalling. *J Biol Chem* 273(20): 12203–12209.
- Camello-Almaraz, C., Gomez-Pinilla, P. J., Pozo, M. J. & Camello, P. J., (2006).** Mitochondrial reactive oxygen species and Ca²⁺ signaling. *Am J Physiol Cell Physiol* 291(5): C1082–C1088.
- Cerretti, D.P., Kozlosky, C.J., Mosley, B., Nelson, N., Van Ness, K., Greenstreet, T.A., March, C.J., Kronheim, S.R., Druck, T., Cannizzaro, L.A. et al., (1992).** Molecular cloning of the interleukin-1 beta converting enzyme. *Science* 256(5053): 97-100.
- Cooney, R.N. & Shumate, M., (2006).** The inhibitory effects of interleukin-1 on growth hormone action during catabolic illness, *Vitam Horm* 74: 317-40.
- Csordás, G. & Hajnóczky, G., (2009).** SR/ER–mitochondrial local communication: calcium and ROS. *Biochim Biophys. Acta Bioenerg* 1787(11): 1352–1362.
- Cybulsky, M. I. & Gimbrone, M., (1991).** Endothelial Expression of a Mononuclear Leukocyte Adhesion Molecule During Atherogenesis. *Science* 251(4995): 788-91.
- De Nardo, D., (2015).** Toll-like receptors: activation, signalling and transcriptional modulation. *Cytokine* 74(2): 181–189.
- de Silva, H.V., Lauer, S.J., Wang, J., Simonet, W.S, Weisgraber, K.H., Mahley, R.W., Taylor, J.M., (1994).** Overexpression of human apolipoprotein C-III in transgenic mice results in an accumulation of apolipoprotein B48 remnants that is corrected by excess apolipoprotein E. *J Biol Chem* 269(3): 2324–2335.
- Dinarello, C.A., Gatti, S., Bartfai, T., (1999).** Fever: links with an ancient receptor. *Curr Biol* 9(4): R147–R150.
- Dinarello, C.A., (1998).** Interleukin-1 beta, interleukin-18, and the interleukin-1 beta converting enzyme. *Ann NY Acad Sci* 856: 1–11.

- Dinarello, C.A., Ikejima, T., Warner, S.J., Orencole, S.F., Lonnemann, G., Cannon, J.G., Libby P., (1987).** Interleukin 1 induces interleukin 1. I. Induction of circulating interleukin 1 in rabbits in vivo and in human mononuclear cells in vitro. *J Immunol* 139(6): 1902-10.
- Dinarello, C.A., (2009).** Immunological and Inflammatory Functions of the Interleukin-1 Family. *Annu. Rev. Immunol* 27: 519-550.
- Dinarello, C.A., (2011).** A clinical perspective of IL-1beta as the gatekeeper of inflammation, *Eur J Immunol* 41(5): 1203–1217.
- Dong, Z.M., Chapman, S.M., Brown, A.A., Frenette, P.S., Hynes, R.O., Wagner, D.D., (1998).** The combined role of P- and E-selectins in atherosclerosis. *J Clin Invest* 102(1): 145–152.
- Draber, P., Vonkova, I., Stepanek, O., Hrdinka, M., Kucova, M., Skopcova, T., Otahal, P., Angelisova, P., Horejsi, V., Yeung, M., Weiss, A., Brdicka T., (2011).** SCIMP, a Transmembrane Adaptor Protein Involved in Major Histocompatibility Complex Class II Signaling. *Mol Cell Biol* 31(22): 4550–4562.
- Duewell, P., Kono, H., Rayner, K.J. et al., (2010).** NLRP3 inflammasomes are required for atherogenesis and activated by cholesterol crystals. *Nature* 464(7293): 1357–1361.
- Jin, M. S. et al., (2007).** Crystal structure of the TLR1–TLR2 heterodimer induced by binding of a tri-acylated lipopeptide. *Cell* 130(6):1071-82.
- Jin, M. S. & Lee, J.O., (2008).** Structures of the Toll-like receptor family and its ligand complexes. *Immunity* 29(2):182-91.
- Jo, E.-K., Jin, K.K., Dong-Min, S., Chihiro, S. (2016).** Molecular mechanisms regulating NLRP3 inflammasome activation. *Cellular & Molecular Immunology* 13: 148–159.
- Juntti-Berggren, L., Refai, E., Appelskog, I., Andersson, M., Imreh, G., Dekki, N., Uhles, S., Yu, L., Griffiths, W.J., Zaitsev, S., Leibiger, I., Yang, S.N., Olivecrona, G., Jörnvall, H., (2004).** Apolipoprotein CIII promotes Ca²⁺-dependent beta cell death in type 1 diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(27): 10090-10094.
- Fearon, D.T., Locksley, R.M., (1996).** The instructive role of innate immunity in the acquired immune response. *Science* 272(5258): 50-53.
- Feltham, R., Vince, J.E. & Lawlor, K.E., (2017).** Caspase-8: not so silently deadly. *Clin Transl Immunology* 6(1): e124.
- Fernandes-Alnemri, T., Wu, J., J-W, Yu J.W., Datta, P., Miller, B., Jankowski, W., Rosenbergm S., Zhang, J., Alnemri, E.S., (2007).** The pyroptosome: a supramolecular assembly of ASC dimers mediating inflammatory cell death via caspase-1 activation. *Cell Death Differ* 14(9): 1590-604.
- Fitzgerald, K.A., Rowe, D.C., Barnes, B.J., Caffrey, D.R., Visintin, A., Latz, E., Monks, B., Pitha, P.M., Golenbock, D.T., (2003).** LPS-TLR4 signaling to IRF-3/7 and NF-kappaB involves the Toll adapters TRAM and TRIF. *J Exp Med* 198(7): 1043–1055.
- Fitzpatrick, E., (2015).** Editorial: Flexible Syk: turning on and off the inflammasome as needed. *J Leukoc Biol* 97(5): 821-824.

- Franchi, L., Eigenbrod, T., Núñez, G., (2009).** Cutting Edge: TNF-alpha Mediates Sensitization to ATP and Silica via the NLRP3 Inflammasome in the Absence of Microbial Stimulation. *J Immunol* 183(2): 792–796.
- Gabay, C., Lamacchia, C., Palmer, G., (2010).** IL-1 pathways in inflammation and human diseases, *Nat Rev Rheumatol* 6(4): 232–241.
- Gaidt, M.M., Ebert, T.S., Chauhan, D., Schmidt, T., Schmid-Burgk, J.L., Rapino, F., Robertson, A.A., Cooper, M.A., Graf, T. & Hornung, V., (2016).** Human Monocytes Engage an Alternative Inflammasome Pathway. *Immunity* 44(4): 833-846.
- Gallo, E.M., K. Cante-Barrett & Crabtree G.R., (2006).** Lymphocyte calcium signaling from membrane to nucleus. *Nat Immunol* 7(1): 25–32.
- Gardner, P., (1989).** Calcium and T lymphocyte activation. *Cell* 59: 15–20.
- Gaudet, D., Alexander, V.J., Baker, B.F., Brisson, D., Tremblay, K., Singleton, W., Geary, R.S., Hughes, S.G., Viney, N.J., Graham, M.J. et al., (2015).** Antisense Inhibition of 20 Apolipoprotein C-III in Patients with Hypertriglyceridemia. *N Engl J Med* 373(5): 438-447.
- Gauld, S.B. & Cambier, J.C., (2004).** Src-family kinases in B-cell development and signaling. *Oncogene* 23(48): 8001–8006.
- Gerber, Y., Goldbourt U., Segev, S., Harats, D., (2003).** Indices related to apo CII and CIII serum concentrations and coronary heart disease: a casecontrol study. *Prev Med* 37(1): 18-22.
- Gimbrone, M.A. Jr & Garcia-Cardena, G., (2016).** Endothelial cell dysfunction and the pathobiology of atherosclerosis. *Circ Res* 118(4): 620–636.
- Glomset, J.A., (1968).** The plasma lecithin: cholesterol acyltransferase reaction. *J Lipid Res* 9(2): 155–167.
- Gordon, D.J., Rifkind, B.M., (1989).** High-density lipoprotein: the clinical implications of recent studies, *New Engl J Med* 321(19): 1311-6.
- Graham, M.J., Lee, R.G., Bell, T.A., 3rd, Fu, W., Mullick, A.E., Alexander, V.J., Singleton, W., Viney, N., Geary, R., Su, J. et al., (2013).** Antisense oligonucleotide inhibition of apolipoprotein C-III reduces plasma triglycerides in rodents, nonhuman primates, and humans. *Circ Res* 112(11): 1479-1490.
- Green, J.P. et al., (2018).** Chloride regulates dynamic NLRP3-dependent ASC oligomerization and inflammasome priming. *Proc Natl Acad Sci USA* 115(40): E9371–E9380.
- Gross, O., Poeck, H., Bscheider, M., Dostert, C., Hanneschlager, N., Endres, S., Hartmann, G., Tardivel, A., Schweighoffer, E., Tybulewicz, V. et al., (2009).** Syk kinase signalling couples to the Nlrp3 inflammasome for anti-fungal host defence. *Nature* 459(7245): 433-6.
- Gurung, P., Anand, P.K., Malireddi, R.K., Vande Walle, L., Van Opdenbosch, N., Dillon, C.P., Weinlich R., Green, D.R., Lamkanfi, M., Kanneganti, T.D., (2014).** FADD and caspase-8 mediate priming and activation of the canonical and noncanonical Nlrp3 inflammasomes. *J Immunol* 192(4):1835-46.
- Hansson, G.K., Hermansson, A., (2011).** The immune system in atherosclerosis. *Nat Immunol* 12(3): 204–212.

- Hahm, E., Wie, C., Fernandez, I., Li, J., Tardi, N.J., Tracy, M., Wadhwani, S., Cao, Y., Peev, V., Zloza, A., Lusciaks, J., Hayek, S.S., O'Connor, C., Bitzer, M., Gupta, V., Sever, S., Sykes, D.B., Scadden, D.T., Reiser, J., (2017). Bone marrow-derived immature myeloid cells are a main source of circulating suPAR contributing to proteinuric kidney disease. *Nat Med* 23(1): 100-106.
- Hannum, C.H., Wilcox, C.J., Arend, W.P., Joslin, F.G., Dripps, D.J., Heimdal, P.L. et al., (1990). Interleukin-1 receptor antagonist activity of a human interleukin-1 inhibitor. *Nature* 343(6256): 336–340.
- Hara, H., Tsuchiya, K., Kawamura, I., Fang, R., Hernandez-Cuellar, E., Shen, Y., Mizuguchi, J., Schweighoffer, E., Tybulewicz, V. & Mitsuyama, M., (2013). Phosphorylation of the adaptor ASC acts as a molecular switch that controls the formation of speck-like aggregates and inflammasome activity. *Nat Immunol* 14(12): 1247-1255.
- Harder, J. Franchi, L., Muñoz-Planillo, R., Park, J.H., Reimer, T., Núñez, G., (2009). Activation of the Nlrp3 inflammasome by *Streptococcus pyogenes* requires streptolysin O and NF-kappa B activation but proceeds independently of TLR signaling and P2X7 receptor. *J Immunol* 183(9): 5823–5829.
- He, Y., Hara, H., & Núñez, G., (2016). Mechanism and regulation of NLRP3 inflammasome activation. *Trends Biochem Sci* 41(12): 1012–1021.
- Hegele, R.A., Connelly, P.W., Hanley, A.J., Sun, F., Harris, S.B., Zinman, B., (1997). Common genomic variation in the APOC3 promoter associated with variation in plasma lipoproteins. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 17(11): 2753–2758.
- Hegele, R. A., (2009). Plasma lipoproteins: genetic influences and clinical implications. *Nat Rev Genet* 10(2):109-21.
- Hiukka, A., Stahlman, M., Pettersson, C., Levin, M., Adiels, M., Teneberg, S., Leinonen, E. S., Hultén, L. M., Wiklund, O. & Oresic, M. et al., (2009). ApoCIII-enriched LDL in type 2 diabetes displays altered lipid composition, increased susceptibility for sphingomyelinase, and increased binding to biglycan. *Diabetes* 58(9): 2018 – 2026.
- Hoebe, K., Janssen, E. M., Kim, S. O., Alexopoulou, L., Flavell, R. A., Han, J., Beutler, B., (2003). Upregulation of costimulatory molecules induced by lipopolysaccharide and double-stranded RNA occurs by Trif-dependent and Trif-independent pathways. *Nat Immunol* 4(12): 1223–1229. 27.
- Hoffman, H.M., Mueller, J.L., Broide, D.H., Wanderer, A.A., Kolodner, R.D., (2001). Mutation of a new gene encoding a putative pyrin-like protein causes familial cold autoinflammatory syndrome and Muckle-Wells syndrome. *Nat Genet* 29(3): 301–5.
- Hoffmann, J.A., (2003). The immune response of *Drosophila*. *Nature* 426(6962): 33–38.
- Hornig, T., Barton, G. M., Flavell, R. A., Medzhitov, R., (2002). The adaptor molecule TIRAP provides signalling specificity for Toll-like receptors. *Nature* 420(6913): 329–333.
- Hornung, V., Bauernfeind, F., Halle, A., Samstad, E.O., Kono, H., Rock, K.L., Fitzgerald, K.A., Latz, E., (2008). Silica crystals and aluminum salts activate the NALP3 inflammasome through phagosomal destabilization. *Nat Immunol* 9(8): 847–856.
- Hung, A.M., Ellis, C.D., Shintani, A., Booker, C. & Ikizler, T.A., (2011). IL-1beta receptor

- antagonist reduces inflammation in hemodialysis patients. *J Am Soc Nephrol* 22(3): 437-442.
- Ito, M., Yanagi, Y., Ichinohe T., (2012).** Encephalomyocarditis virus viroporin 2B activates NLRP3 inflammasome. *PLoS pathogens* 8(8): e1002857.
- Iyer, S.S., He, Q., Janczy, J.R., Elliott, E.I. Zhong, Z., Olivier, A.K., Sadler, J.J., Knepper-Adrian, V., Han, R., Qiao, L., Eisenbarth, S.C., Nauseef, W.M., Cassel, S.L., Sutterwala, F.S., (2013).** Mitochondrial cardiolipin is required for Nlrp3 inflammasome activation. *Immunity* 39(2): 311-323.
- Jin, M.S., Kim, S.E., Heo, J.Y., Lee, M.E., Kim, H.M., Paik, S.G., Lee, H. & Lee, J.O., (2007).** Crystal structure of the TLR1-TLR2 heterodimer induced by binding of a tri-acylated lipopeptide. *Cell* 130(6): 1071-1082.
- Jin, M.S., & Lee, J.O., (2008).** Structures of the toll-like receptor family and its ligand complexes. *Immunity* 29(2): 182-191.
- Jiang, Y., Wang, M., Huang, K., Zhang, Z., Shao, N., Zhang, Y., Wang, W., Wang, S., (2012).** Oxidized low-density lipoprotein induces secretion of interleukin-1 β by macrophages via reactive oxygen species-dependent NLRP3 inflammasome activation. *Biochem Biophys Res Commun* 425(2): 121-6.
- Jo, E.-K., Kim, J.K., Dong-Min, Shin, D.-M. & Sasakawa, C., (2016).** Molecular mechanisms regulating NLRP3 inflammasome activation. *Cell Mol Immunol* 13(2): 148-59.
- Johnson, S.A., Pleiman, C.M., Pao, L., Schneringer, J., Hippen, K. & Cambier, J.C., (1995).** Phosphorylated immunoreceptor signaling motifs (ITAMs) exhibit unique abilities to bind and activate Lyn and Syk tyrosine kinases. *J. Immunol* 155(10): 4596–4603.
- Johnson, R.J., (1997).** Cytokines, growth factors and renal injury: Where do we go now? *Kidney Int Suppl* 63: S2-S6.
- Jong, M.C., Hofker, M.H, Havekes, L.M., (1999).** Role of ApoCs in lipoprotein metabolism: functional differences between ApoC1, ApoC2, and ApoC3. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 19(3): 472-484.
- Jorgensen, A.B., Frikke-Schmidt, R., Nordestgaard, B.G. & Tybjaerg-Hansen A., (2014).** Loss-of-function mutations in APOC3 and risk of ischemic vascular disease. *N Engl J Med* 371(1): 32-41.
- Juntti-Berggren, L., Refai, E., Appelskog, I., Andersson, M., Imreh, G., Dekki, N., Uhles, S., Yu, L., Griffiths, W.J., Zaitsev, S. et al., (2004).** Apolipoprotein CII 5 I promotes Ca²⁺-dependent beta cell death in type 1 diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(27): 10090-10094.
- Kang, J.Y., Nan, X., Jin, M.S., Youn, S.J., Ryu, Y.H., Mah, S., Han, S.H., Lee, H., Paik, S.G. & Lee, J.O., (2009).** Recognition of lipopeptide patterns by Toll-like receptor 2-Toll-like receptor 6 heterodimer. *Immunity* 31(6): 873-884.
- Katsnelson, M. & Dubyak, G., (2013).** Cytosolic K⁺ and extracellular Na⁺ as regulators of NLRP3 inflammasome activation and the IL-1 β secretion response of macrophages to crystalline stimuli. *FASEB J* 27(S1): 138.8–8.
- Katsnelson, M.A., Rucker, L.G., Russo, H.M. & Dubyak, G.R., (2015).** K⁺ efflux agonists induce NLRP3 inflammasome activation independently of Ca²⁺ signaling. *J Immunol* 194(8): 3937-3952.

- Kawagoe, T. et al., (2008).** Sequential control of Toll-like receptor–dependent responses by IRAK1 and IRAK2. *Nat Immunol* 9(6): 684–691.
- Kawai, T. & Akira, S., (2010).** The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: Update on Toll-like receptors. *Nat Immunol* 11(5): 373–384.
- Kawai, T. & Akira, S., (2011).** Toll-like Receptors and Their Crosstalk with Other Innate Receptors in Infection and Immunity. *Immunity* 34(5): 637–650.
- Kayagaki, N., Warming, S., Lamkanfi, M., Vande Walle, L., Louie, S., Dong, J., Newton, K., Qu, Y., Liu, J., Heldens, S. et al., (2011).** Non-canonical inflammasome activation targets caspase-11. *Nature* 479(7371): 117–121.
- Khare, S., Dorfleutner, A., Bryan, N.B., Yun, C., Radian, A.D., de Almeida, L., Rojanasakul, Y., Stehlik, C., (2012).** An NLRP7-containing inflammasome mediates recognition of microbial lipopeptides in human macrophages. *Immunity* 36(3):464-76.
- Khetarpal, S.A., Rader, D.J., (2015).** Triglyceride-Rich Lipoproteins and Coronary Artery Disease Risk New Insights From Human Genetics. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 35(2): e3-e9.
- Khetarpal, S. A. et al., (2017).** A human APOC3 missense variant and monoclonal antibody accelerate apoC-III clearance and lower triglyceride-rich lipoprotein levels. *Nat Med* 23(9): 1086–1094.
- Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) CKD Work Group, (2013).** KDIGO 2012 Clinical Practice for the Evaluation and Management of Chronic Kidney Disease. *Kidney Int Suppl* 3(1): 1-150.
- Kinnunen, P.K. & Ehnolm, C., (1976).** Effect of serum and C-apoproteins from very low density lipoproteins on human postheparin plasma hepatic lipase. *FEBS Lett* 65(3): 354 – 357.
- Kohan, A.B., (2015).** ApoC-III: a potent modulator of hypertriglyceridemia and cardiovascular disease. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* 22(2): 119–125.
- Kralova, J.,Fabisik, M., Skopcova, T., Malissen, B., Brdicka, T., (2016).** The Transmembrane Adaptor Protein SCIMP Facilitates Sustained Dectin-1 Signaling in Dendritic Cells. *J Biol Chem* 291(32): 16530–16540.
- Kufer, T.A., Banks, D.J., Philpott, D.J., (2006).** Innate immune sensing of microbes by Nod proteins. *Ann N Y Acad Sci* 1072:19–27.
- Kulathu, Y., Hobeika, E., Turchinovich, G., Reth M., (2008).** The kinase Syk as an adaptor controlling sustained calcium signalling and B-cell development. *EMBO J.* 27(9):1333-44.
- Kurts, C., Panzer, U., Anders, H.J. et al., (2013).** The immune system and kidney disease: basic concepts and clinical implications. *Nat Rev Immunol* 13(10): 738–753.
- Larsson, M., Vorrsjö, E., Talmud, P., Lookene, A., Olivecrona G., (2013).** Apolipoproteins C-I and C-III inhibit lipoprotein lipase activity by displacement of the enzyme from lipid droplets. *J Biol Chem* 288(47): 33997–34008.
- Larsen, C.M., Faulenbach, M., Vaag, A., Volund, A., Ehses, J.A., Seifert, B., Mandrup-Poulsen, T. & Donath, M.Y., (2007).** Interleukin-1-receptor antagonist in type 2 diabetes mellitus. *N Engl J Med* 356(15): 1517-1526.

- Liu, T., Yamaguchi, Y., Shirasaki, Y., Shikada, K., Yamagishi, M., Hoshino, K., Kaisho, T., Takemoto, K., Suzuki, T., Kuranaga, E., Ohara, O., Miura, M., (2014).** Single-cell imaging of caspase-1 dynamics reveals an all-or-none inflammasome signaling response. *Cell Rep.* 8(4):974-82.
- Lamkanfi, M. & Dixit, V.M., (2012).** Inflammasomes and their roles in health and disease. *Annu Rev Cell Dev Biol* 28: 137–161.
- Lamkanfi, M. & Dixit, V.M., (2014).** Mechanisms and functions of inflammasomes. *Cell* 157(5):1013-22.
- Latz, E., Verma, A., Visintin, A., Gong, M., Sirois, C.M., Klein, D.C., Monks, B.G., McKnight, C.J., Lamphier, M.S., Duprex, W.P. et al., (2007).** Ligand-induced conformational changes allosterically activate Toll-like receptor 9. *Nat Immunol* 8(7): 772-779.
- Latz E., (2010).** NOX-free inflammasome activation. *Blood* 116(9): 1393-1394.
- Latz, E., Xiao, T.S., Stutz A., (2013).** Activation and regulation of the inflammasomes. *Nat Rev Immunol* 13(6): 397-411.
- Lee, H.K., Dunzendorfer, S. & Tobias, P.S., (2004).** Cytoplasmic domain-mediated dimerizations of toll-like receptor 4 observed by beta-lactamase enzyme fragment complementation. *J Biol Chem* 279(11): 10564-10574.
- Lee, S.J., Campos, H., Moye, L.A., Sacks, F.M., (2003).** LDL containing apolipoprotein CIII is an independent risk factor for coronary events in diabetic patients. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23(5): 853–858.
- Lee, G. S. et al., (2012).** The calcium-sensing receptor regulates the NLRP3 inflammasome through Ca^{2+} and cAMP. *Nature* 492(7427): 123-7.
- Leemans, J.C., Kors, L., Anders, H.J. et al., (2014).** Pattern recognition receptors and the inflammasome in kidney disease. *Nat Rev Nephrol* 10(7): 398–414.
- Lemasters, J.J., Theruvath, T. P., Zhong, Z. & Nieminen, A. L., (2009).** Mitochondrial calcium and the permeability transition in cell death. *Biochim Biophys Acta Bioenerg* 1787(11): 1395–1401.
- Lemmers, B., Salmena, L., Bidère, N., Su, H., Matysiak-Zablocki, E., Murakami, K., Ohashi, P.S., Jurisicova, A., Lenardo, M., Hakem, R., Hakem, A., (2007).** Essential role for caspase-8 in Toll-like receptors and NFkappaB signaling. *J Biol Chem* 282(10): 7416-23.
- Lepedda, A.J., Nieddu, G., Zinellu, E., DeMuro, P., Piredda, F. Guarino, A., Spirito, R., Carta, F., Turrini, F., Formato, M., (2013).** Proteomic Analysis of Plasma-Purified VLDL, LDL, and HDL Fractions from Atherosclerotic Patients Undergoing Carotid Endarterectomy: Identification of Serum Amyloid A as a Potential Marker. *Oxid Med Cell Longev* 385214.
- Levey, A.S., Eckardt, K.U., Tsukamoto, Y., Levin, A., Coresh, J., Rossert, J., De Zeeuw, D., Hostetter, T.H., Lameire, N., Eknoyan, G., (2005).** Definition and classification of chronic kidney disease: a position statement from Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO). *Kidney Int* 67(6): 2089-100.
- Li, H., Cybulsky M. I., Gimbrone M. & Libby P., (1993)** An atherogenic diet rapidly induces VCAM-1, a cytokine-regulatable mononuclear leukocyte adhesion molecule, in rabbit aortic endothelium. *Arterioscler Thromb* 13(2): 197–204.

- Liu, Y., (2004).** Epithelial to mesenchymal transition in renal fibrogenesis: Pathologic significance, molecular mechanism, and therapeutic intervention. *J Am Soc Nephrol* 15(1): 1–12.
- Libby, P., (2001).** Current concepts of the pathogenesis of the acute coronary syndromes. *Circulation* 104(3): 365-372.
- Libby, P. Ridker, P.M. & Hansson, G.K., (2011).** Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis. *Nature* 473(7347): 317-25.
- Libby, P., (2012).** Inflammation in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 32(9): 2045–2051.
- Luo, L., Bokil N.J., Wall, A.-A., Kapetanovic, R., Lansdaal, N. M., Marceline, F., Burgess, B.J., Tong, S.J., Guo, Z., Alexandrov, K., Ross, I.L., Hibbs, M.L., Stow, J.L., Sweet, M.J., (2017).** SCIMP is a transmembrane non-TIR TLR adaptor that promotes proinflammatory cytokine production from macrophages. *Nature communications* 8: 14133.
- Lusis, A. J., (2000).** Atherosclerosis. *Nature* 407(6801): 233–241.
- Ma, M.W., Wang, J., Dhandapani, K.M., Brann, D.W., (2017).** NADPH Oxidase 2 Regulates NLRP3 Inflammasome Activation in the Brain after Traumatic Brain Injury. *Oxid Med Cell Longev* 2017: 057609.
- Mahley, R.W., Innerarity, T.L., Rall, S.C. Jr., Weisgraber, K.H., (1984).** Plasma lipoproteins: apolipoprotein structure and function. *J Lipid Res* 25(12): 1277-94.
- Man, S.M. & Kanneganti, T.D., (2015).** Regulation of inflammasome activation. *Immunol Rev* 265(1): 6-21.
- Man, S.M. & Kanneganti, T.D., (2016).** Converging roles of caspases in inflammasome activation, cell death and innate immunity. *Nat Rev Immunol* 16(1): 7-21.
- Manduteanu, I., Simionescu, M., (2012).** Inflammation in atherosclerosis: a cause or a result of vascular disorders? *J Cell Mol Med* 16(9): 1978-90.
- Martinon, F., Burns, K., Tschopp, J., (2002).** The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta. *Mol. Cell* 10(2): 417-426.
- Martinon, F. & Tschopp, J., (2007).** Inflammatory caspases and inflammasomes: master switches of inflammation. *Cell Death Differ* 14(1): 10–22.
- Masters, S. L. et al., (2010).** Activation of the NLRP3 inflammasome by islet amyloid polypeptide provides a mechanism for enhanced IL-1 β in type 2 diabetes. *Nat Immunol* 11(10): 897–904.
- Medzhitov, R., (2007).** Recognition of microorganisms and activation of the immune response. *Nature* 449(7164): 819-826.
- Medzhitov, R., (2008).** Origin and physiological roles of inflammation. *Nature* 454(7203): 428-35.
- Mendivil, C.O., Zheng, C., Furtado, J., Lel, J., Sacks, F.M., (2010).** Metabolism of very-low-density lipoprotein and low-density lipoprotein containing apolipoprotein C-III and not other small apolipoproteins. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 30(2): 239–245.

- Mendivil, C.O., Rimm, E.B., Furtado, J., Chiuve, S.E., Sacks, F.M., (2011).** Low-density lipoproteins containing apolipoprotein C-III and the risk of coronary heart disease. *Circulation* 124(19): 2065–2072.
- Miller, N.E., Thelle, D.S., Forde, O.H., Mjos, O.D., (1977).** The Tomso heart study: high density lipoproteins and coronary heart disease: a prospective case control study. *Lancet* 1(8019): 965-8.
- Miller, Y.I., Viriyakosol, S., Binder, C.J., Feramisco, J.R., Kirkland, T.N., Witztum, J.L., (2003).** Minimally Modified LDL Binds to CD14, Induces Macrophage Spreading via TLR4/MD-2, and Inhibits Phagocytosis of Apoptotic Cells*. *J Biol Chem* 278(3): 1561-8.
- Misawa, T., Takahama, M., Kozaki, T., Lee, H., Zou, J., Saitoh, T. & Akira, S., (2013).** Microtubule-driven spatial arrangement of mitochondria promotes activation of the NLRP3 inflammasome. *Nat Immunol* 14(5): 454–460.
- Mocarski, E.S., Guo, H. & Kaiser, W.J., (2015).** Necroptosis: The Trojan Horse in Cell Autonomous Antiviral Host Defense. *Virology* 479-480: 160-6.
- Muñoz-Planillo, R., Kuffa, P., Martínez-Colón, G., Smith, B.L., Rajendiran, T.M. & Nuñez G., (2013).** K⁺ efflux is the common trigger of NLRP3 inflammasome activation by bacterial toxins and particulate matter. *Immunity* 38(6): 1142–1153.
- Murakami, T. et al., (2012).** Critical role for calcium mobilization in activation of the NLRP3 inflammasome. *Proc Natl Acad Sci USA* 109(28): 11282–11287.
- Murphy K. und Weaver C., (2018).** Janeway Immunologie. Springer Spektrum; 9. Auflage, Kapitel 1, S. 19 (23: 3–46), Kapitel 4, S. 178f. (23: 177–220), Kapitel 11, S. 597 (23: 47–93), Kapitel 1, S. 17.
- Nakahira, K., Haspel, J.A., Rathinam, V.A., Lee, S.J., Dolinay, T., Lam, H.C., Englert, J.A., Rabinovitch, M., Cernadas, M., Kim, H.P. et al., (2011).** Autophagy proteins regulate innate immune responses by inhibiting the release of mitochondrial DNA mediated by the NALP3 inflammasome. *Nat Immunol* 12(3): 222–230.
- National Kidney Foundation, (2002).** K/DOQI clinical practice guidelines for chronic kidney disease: evaluation, classification, and stratification. *Am J Kidney Dis* 39(2 Suppl 1): S1-266.
- Norata, G.D., Tsimikas, S., Pirillo, A., Captanpano, A.L., (2015).** Apolipoprotein C-III: From pathophysiology to pharmacology. Review. *Trends in Pharmacol Science* 36(10): 675-687.
- Ohto, U. Fukase, K., Miyake, K., Satow, Y., (2007).** Crystal structures of human MD-2 and its complex with antiendotoxic lipid IVa. *Science* 316(5831): 1632-4.
- O'Neill, L. A. & Bowie, A. G. (2007).** The family of five: TIR-domaincontaining adaptors in Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol* 7(5): 353–364.
- O'Neill, L. A., Golenbock, D., Bowie, A. G., (2013).** The history of Tolllike receptors-redefining innate immunity. *Nat Rev Immunol* 13(6): 453–460.
- Olivieri, O., Martinelli, N., Girelli, D., et, (2010).** Apolipoprotein C-III predicts cardiovascular mortality in severe coronary artery disease and is associated with an enhanced plasma thrombin generation. *J Thromb Haemost* 8(3): 463–471.

- Onat, A., Hergenc, G., Sansoy, V. et al., (2003).** Apolipoprotein C-III, a strong discriminant of coronary risk in men and a determinant of the metabolic syndrome in both genders. *Atherosclerosis* 168(1): 81–89.
- Ooi, E.M., Barrett, H.R., Chan, D. C. Watts, G.F., (2008).** Apolipoprotein C-III: understanding an emerging cardiovascular risk factor. *Clin Sci (Lond)* 114(10): 611–624.
- Ortiz, A., Covic, A., Fliser, D. et al., (2014).** Epidemiology, contributors to, and clinical trials of mortality risk in chronic kidney failure. *Lancet* 383(9931): 1831-43.
- Oshiumi, H., Sasai, M., Shida, K., Fujita, T., Matsumoto, M., Seya, T., (2003).** TIR-containing adapter molecule (TICAM)-2, a bridging adapter recruiting to toll-like receptor 4 TICAM-1 that induces interferon-beta. *J Biol Chem* 278(50): 49751–49762.
- Oshiumi, H., Matsumoto, M., Funami, K., Akazawa, T., Seya, T., (2003).** TICAM-1, an adaptor molecule that participates in Toll-like receptor 3-mediated interferon-beta induction. *Nat Immunol* 4(2): 161–167.
- Pao, L.I. & Cambier, J.C., (1997).** Syk, but not Lyn, recruitment to B cell antigen receptor and activation following stimulation of CD45- B cells. *J Immunol* 158(6): 2663–2669.
- Pechlaner, R. et al., (2017).** Very-low-density lipoprotein-associated apolipoproteins predict cardiovascular events and are lowered by inhibition of APOC-III. *J Am Coll Cardiol* 69(7): 789–800.
- Peri, F. & Calabrese, V., (2014).** Toll-like Receptor 4 (TLR4) modulation by synthetic and natural compounds: an update. *J Med Chem* 57(9): 3612–3622.
- Pétrilli, V., Papin, S., Dostert, C., Mayor, A., Martinon, F., Tschopp, J., (2007).** Activation of the NALP3 inflammasome is triggered by low intracellular potassium concentration. *Cell Death Differ* 14(9): 1583–1589.
- Pinkau, T., Hilgers, K.F., Veelken, R., Mann, J.F., (2004).** How does minor renal dysfunction influence cardiovascular risk and the management of cardiovascular disease? *J Am Soc Nephrol* 15(3): 517-23.
- Pollin, T.I., Damcott, C.M., Shen, H. et al., (2008).** A null mutation in human APOC3 confers a favorable plasma lipid profile and apparent cardioprotection. *Science* 322(5908): 1702–1705.
- Poltorak, A., He, X., Smirnova, I., Liu, M.Y., Van Huffel, C., Du, X., Birdwell, D., Alejos, E., Silva, M., Galanos, C., Freudenberg, M., Ricciardi-Castagnoli, P., Layton, B., Beutler, B., (1998).** Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science* 282(5396): 2085-8.
- Rader, D.J. & Daugherty, A., (2008).** Translating molecular discoveries into new therapies for atherosclerosis. *Nature* 451(7181): 904-13.
- Rajamaki, K., Lappalainen J., Oörni K., Välimäki E., Matikainen S., Kovanen P.T., Eklund K.K., (2010).** Cholesterol crystals activate the NLRP3 inflammasome in human macrophages: a novel link between cholesterol metabolism and inflammation. *PLoS ONE* 5(7): e11765.
- Remaley, A.T., Stonik, J.A., Demosky, S.J., Neufeld, E.B., Bocharov, A.V., Vishnyakova, T.G., Eggerman, T.L., Patterson, A.P., Duverger, N.J., Santamarina-Fojo, S. et al., (2001).** Apolipoprotein specificity for lipid efflux by the human ABCA1 transporter. *Biochem Biophys Res Commun* 280(3): 818 – 823.

- Rhoads, J.P., Lukens, J.R., Wilhelm, A.J., Moore, J.M., Mendez-Fernandez, Y., Thirumala-Devi, Kanneganti, T.-D., Amy, S. Major, A.S., (2017).** Oxidized Low-Density Lipoprotein Immune Complex Priming of the Nlrp3 Inflammasome Involves TLR and FcγR Cooperation and Is Dependent on CARD9. *J Immunol* 198(5): 2105-2114.
- Ridker, P. M. et al., (2017).** Antiinflammatory therapy with canakinumab for atherosclerotic disease. *N Engl J Med* 377(12): 1119–1131.
- Romo, R. M., Perez-Martinez, D., Castillo Ferrer, C., (2016).** Innate immunity in vertebrates: an overview. *Immunology* 148: 125–39.
- Rolli, V., Gallwitz, M., Wossning, T., Flemming, A., Schamel, W. W. A., Zürn, C., Reth, M. (2002).** Amplification of B cell antigen receptor signaling by a Syk/ITAM positive feedback loop. *Mol Cell* 10(5): 1057-1069.
- Ross, R., (1999).** Atherosclerosis – an inflammatory disease. *N Engl J Med* 340(2): 115–126.
- Rossol, M. et al., (2012).** Extracellular Ca²⁺ is a danger signal activating the NLRP3 inflammasome through G protein-coupled calcium sensing receptors. *Nature communications* 3(1): 1329.
- Sacks, F.M., Alaupovic, P., Moye, L.A., Cole, T.G., Sussex, B., Stampfer, M.J., Pfeffer, M.A. & Braunwald, E., (2000).** VLDL, apolipoproteins B, CIII, and E, and risk of recurrent coronary events in the Cholesterol and Recurrent Events (CARE) trial. *Circulation* 102(16): 1886 – 1892.
- Sacks, F.M., Zheng, C. & Cohn, J.S., (2011).** Complexities of plasma apolipoprotein C-III metabolism. *J Lipid Res* 52(6): 1067-1070.
- Scheffer, P.G., Teerlink, T., Dekker, J.M. et al., (2008).** Increased plasma apolipoprotein C-III concentration independently predicts cardiovascular mortality: the Hoorn Study. *Clin Chem* 54:1325–1330.
- Saleheen, D. et al., (2017).** Human knockouts and phenotypic analysis in a cohort with a high rate of consanguinity. *Nature* 544(7649): 235–239.
- Saravia, J., Chapman, N.M., Chi, H., (2019).** Helper T cell differentiation. *Cell Mol Immunol* 16(7): 634-643.
- Sato, S., Sugiyama, M., Yamamoto, M., Watanabe, Y., Kawai, T., Takeda, K., Akira, S., (2003).** Toll/IL-1 receptor domain-containing adaptor inducing IFN-beta (TRIF) associates with TNF receptor-associated factor 6 and TANK-binding kinase 1, and activates two distinct transcription factors, NF-kappa B and IFN-regulatory factor-3, in the Toll-like receptor signaling. *J Immunol* 171(8): 4304–4310.
- Schroder, K. & Tschopp, J., (2010).** The Inflammasomes. *Cell* 140(6): 821–832.
- Sehayek, E. & Eisenberg, S., (1991).** Mechanisms of inhibition by apolipoprotein C of apolipoprotein E-dependent cellular metabolism of human triglyceride-rich lipoproteins through the low density lipoprotein receptor pathway. *J Biol Chem* 266(27): 18259 – 18267.
- Seimon, T.A., Nadolski, M.J., Liao, X., Magallon, J., Nguyen, M., Feric, N.T., Koschinsky, M.L., Harkewicz, R., Witztum, J.L., Tsimikas, S., Golenbock, D., Moore, K.J., Tabas, I., (2010).** Atherogenic Lipids and Lipoproteins Trigger CD36-TLR2 Dependent Apoptosis in Macrophages Undergoing Endoplasmic Reticulum Stress. *Cell Metab* 12(5): 467–482.

- Sha, W., Mitoma, H., Hanabuchi, S., Bao, M., Wenig, L., Sugimoto, N., Liu, Y., Zhang, Z., Zhong, J., Sun, B., Liu, Y.-J., (2014).** Human NLRP3 inflammasome senses multiple types of bacterial RNAs. *PNAS* 111(45): 16059-16064.
- Sheedy, F.J., Moore, K.J., (2013).** IL-1 signaling in atherosclerosis: sibling rivalry, *Nat Immunol* 14(10): 1030-2.
- Sheedy, F.J., Grebe, A., Rayner, K.J., Kalantari, P., Ramkhalawon, B., Carpenter, S.B., Becker, C.E., Ediriweera, H.N., Mullick, A.E., Golenbock, D.T. et al., (2013).** CD36 coordinates NLRP3 inflammasome activation by facilitating intracellular nucleation of soluble ligands into particulate ligands in sterile inflammation. *Nat Immunol* 14(8): 812-820.
- Shi, J., Zhao, Y., Wang, Y., Gao, W., Ding, J., Li, P., Hu, L., Shao, F., (2014).** Inflammatory caspases are innate immune receptors for intracellular LPS. *Nature* 514(7521):187-92.
- Shimada, K., Crother, T.R., Karlin, J., Dagvadorj, J., Chiba, N., Chen, S., Ramanujan, V.K., Wolf, A.J., Vergnes, L., Ojcius, D.M. et al. (2012).** Oxidized mitochondrial DNA activates the NLRP3 inflammasome during apoptosis. *Immunity* 36(3): 401–414.
- Shimazu, R. et al., (1999).** MD-2, a molecule that confers lipopolysaccharide responsiveness on Toll-like receptor 4. *J Exp Med* 189(11): 1777–1782.
- Shio, M. T., Eisenbarth, S. C., Savaria, M., Vinet, A. F., Bellemare, M. J., Harder, K. W., Sutterwala, F. S., Bohle, D. S., Descoteaux, A., Flavell, R. A., Olivier, M., (2009)** Malarial hemozoin activates the NLRP3 inflammasome through Lyn and Syk kinases. *PLoS Pathog* 5(8): e1000559.
- Shroff, R., Speer, T., Colin, S., Charakida, M., Zewinger, S., Staels, B., Chinetti-Gbaguidi, G., Hettrich, I., Rohrer, L., O'Neill, F., McLoughlin, E., Long, D., Shanahan, C.M., Landmesser, U., Fliser, D., Deanfield, J.E., (2014).** HDL in Children with CKD Promotes Endothelial Dysfunction and an Abnormal Vascular Phenotype. *J Am Soc Nephrol* 25(11): 2658–2668.
- Simon, J., Amde, M., Poggio, E.D., (2011).** Interpreting the estimated glomerular filtration rate in primary care: benefits and pitfalls. *Cleve Clin J Med* 78(3): 189-95.
- Speer, T., Rohrer, L., Blyszczuk, P. et al., (2013).** Abnormal high-density lipoprotein induces endothelial dysfunction via activation of Toll-like receptor-2. *Immunity* 38(4): 754-68.
- Stepanek, O., Draber, P., Horejsi, V., (2014).** Palmitoylated transmembrane adaptor proteins in leukocyte signaling. *Cell Signal* 26(5): 895–902.
- Stevens, L.A., Levey, A.S., (2009).** Current status and future perspectives for CKD testing. *Am J Kidney Dis* 53(3 Suppl 3): S17-26.
- Storek, K.M. & Monack, D.M., (2015).** Bacterial recognition pathways that lead to inflammasome activation. *Immunol Rev* 265(1): 112-29.
- Subramanian, N., Natarajan, K., Clatworthy, M.R., Wang, Z., Germain, R.N., (2013).** The adaptor MAVS promotes NLRP3 mitochondrial localization and inflammasome activation. *Cell* 153(2): 348–361.
- Tabas, I., Williams K. J. & Boren J., (2007).** Subendothelial lipoprotein retention as the initiating process in atherosclerosis: update and therapeutic implications. *Circulation* 116(16): 1832–1844.

- Tabas, I., (2010).** Macrophage death and defective inflammation resolution in atherosclerosis. *Nature Rev. Immunol* 10(1): 36–46.
- Takeuchi, O., Kawai, T., Muhlradt, P.F., Morr, M., Radolf, J.D., Zychlinsky, A., Takeda, K., Akira, S., (2001).** Discrimination of bacterial lipoproteins by Toll-like receptor 6. *Int Immunol* 13(7): 933–940.
- Takeuchi, O., Sato, S., Horiuchi, T., Hoshino, K., Takeda, K., Dong, Z., Modlin, R.L., Akira, S., (2002).** Cutting Edge: Role of Toll-Like Receptor 1 in Mediating Immune Response to Microbial Lipoproteins. *J Immunol* 169(1):10-4.
- Takeuchi, O., Akira, S., (2010).** Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell* 140(6): 805-20.
- Tall, A.R., Yvan-Charvet, L., (2015).** Cholesterol, inflammation and innate immunity. *Nat Rev Immunol* 15(2): 104-16.
- TG, HDL Working Group of the Exome Sequencing Project, N.H.L., Blood, I., Crosby, J., Peloso, G.M., Auer, P.L., Crosslin, D.R., Stitzel, N.O., Lange, L.A., Lu, Y. et al., (2014).** Loss-of-function mutations in APOC3, triglycerides, and coronary disease. *N Engl J Med* 371(1): 22-31.
- Thornberry, N.A., Bull, H.G., Calaycay, J.R., Chapman, K.T., Howard, A.D., Kostura, M.J., Miller, D.K., Molineaux, S.M., Weidner, J.R., Aunins, J. et al., (1992).** A novel heterodimeric cysteine protease is required for interleukin-1 beta processing in monocytes. *Nature* 356(6372): 768-74.
- Ting, J.P., Lovering, R.C., Alnemri, E.S., Bertin, J., Boss, J.M., Davis, B.K., Flavell, R.A., Girardin, S.E., Godzik, A., Harton, J.A., Hoffman, H.M., Hugot, J.P., Inohara, N., Mackenzie, A., Maltais, L.J., Nunez, G., Ogura, Y., Otten, L.A., Philpott, D., Reed, J.C., Reith, W., Schreiber, S., Steimle, V., Ward, P.A., (2008).** The NLR gene family: a standard nomenclature. *Immunity* 28(3):285-7.
- Tosi, M.F., (2005).** Innate immune responses to infection. *J Allergy Clin Immunol* 116(2): 241-9
- Triantafilou, K. et al., (2013).** The complement membrane attack complex triggers intracellular Ca²⁺ fluxes leading to NLRP3 inflammasome activation. *J Cell sci* 126(Pt 13): 2903–13.
- Troutman, T. D., Hu, W., Fulenchek, S., Yamazaki, T., Kurosaki, T., Bazan, J. F., Pasare, C., (2012).** Role for B-cell adapter for PI3K (BCAP) as a signaling adapter linking Toll-like receptors (TLRs) to serine/ threonine kinases PI3K/Akt. *Proc Natl Acad Sci USA* 109(1): 273–278.
- Tseng, H.H., Vong, C.T., Kwan, Y.W., Lee, S.M. & Hoi, M.P., (2016).** TRPM2 regulates 20 TXNIP-mediated NLRP3 inflammasome activation via interaction with p47 phox under high glucose in human monocytic cells. *Sci Rep* 6: 35016.
- Tummers, B., Green, D.R., (2017).** Caspase-8: regulating life and death. *Immunol Rev.* 277(1): 76-89.
- van Bruggen, R., Köker, M.Y., Jansen, M., van Houdt, M., Roos, D., Kuijpers, T.W., van den Berg, T.K., (2010).** Human NLRP3 inflammasome activation is Nox1-4 independent. *Blood* 115(26): 5398e5400.

- Vassalotti, J.A., Stevens, L.A., Levey, A.S., (2007).** Testing for chronic kidney disease: a position statement from the National Kidney Foundation. *Am J Kidney Dis* 50(2): 169-80.
- Verstak, B., Hertzog, P., Mansell, A., (2007).** Toll-like receptor signalling and the clinical benefits that lie within. *Inflamm Res* 56(1): 1-10.
- Watson, A.D., Leitinger, N., Navab, M., Faull, K.F., Hörkkö, S., Witztum, J.L., Palinski, W., Schwenke, D., Salomon, R.G., Sha, W., Subbanagounder, G., Fogelman, A.M., Berliner, J.A., (1997).** Structural identification by mass spectrometry of oxidized phospholipids in minimally oxidized low density lipoprotein that induce monocyte/endothelial interactions and evidence for their presence in vivo. *J Biol Chem* 272(21): 13597–13607.
- Wang, L. Manji, G.A., Grenier, J.M., Al-Garawi, A., Merriam, S., Lora, J.M., Geddes, B.J., Briskin, M., DiStefano, P.S., Bertin, J., (2002).** PYPAF7, a novel PYRIN-containing Apaf1-like protein that regulates activation of NF-kappa B and caspase-1-dependent cytokine processing. *J Biol Chem* 277(33): 29874-80.
- Wang, C., Mooney, J.L., Meza-Romero, R., Chou, Y.K., Huan, J., Vandenbark, A.A., Offner, H. & Burrows, G. G., (2003).** Recombinant TCR ligand induces early TCR signaling and a unique pattern of downstream activation. *J Immunol* 171(4): 1934–1940.
- Wang, H., Eckel, R.E., (2009).** Lipoprotein lipase: from gene to obesity. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 297(2): E271–E288.
- Wang, H., Mao, L., Meng, G., (2013).** The NLRP3 Infl ammasome activation in human or mouse cells, sensitivity causes puzzle. *Protein Cell* 4(8): 565–568.
- Weber, C., Zerneck, A., Libby, P., (2008).** The multifaceted contributions of leukocyte subsets to atherosclerosis: lessons from mouse models. *Nat Rev Immunol* 8(10): 802–815.
- Weiner, D.E., Tighiouart, H., Elsayed, E.F. et al., (2008).** Inflammation and cardiovascular events in individuals with and without chronic kidney disease. *Kidney Int* 73(12): 1406–1412.
- Werry, T. D., Wilkinson, G. F. & Willars, G. B., (2003).** Mechanisms of cross-talk between G-protein-coupled receptors resulting in enhanced release of intracellular Ca²⁺. *Biochem J* 374(Pt 2): 281-96.
- Windler, E.E., Kovanen, P.T., Chao, Y.S., Brown, M.S., Havel, R.J., Goldstein, J.L., (1980).** The estradiol-stimulated lipoprotein receptor of rat liver. A binding site that membrane mediates the uptake of rat lipoproteins containing apoproteins B and E. *J Biol Chem* 255(21): 10464–10471.
- Wyler von Ballmoos, M.C., Haring, B. Sacks F.M., (2015).** The risk of cardiovascular events with increased apolipoprotein CIII: A systematic review and meta-analysis. *J Clin Lipidol* 9(4): 498–510.
- Xu, S., Laccotripe, M., Huang, X., Rigotti, A., Zannis, V. I., Krieger, M., (1997).** Apolipoproteins of HDL can directly mediate binding to the scavenger receptor SR-BI, an HDL receptor that mediates selective lipid uptake. *J Lipid Res* 38(7): 1289–1298.
- Yamamoto, M., Sato, S., Mori, K., Hoshino, K., Takeuchi, O., Takeda, K., Akira, S., (2002).** Cutting edge: a novel Toll/IL-1 receptor domain-containing adapter that preferentially activates the IFN-beta promoter in the Toll-like receptor signaling. *J Immunol* 169(12): 6668-72.

- Yamamoto, M., Sato, S., Hemmi, H., Hoshino, K., Kaisho, T., Sanjo, H., Takeuchi, O., Sugiyama, M., Okabe, M., Takeda, K., Akira, S., (2003a).** Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent Toll-like receptor signaling pathway. *Science* 301(5633): 640-3.
- Yamamoto, M., Sato, S., Hemmi, H., Uematsu, S., Hoshino, K., Kaisho, T., Takeuchi, O., Takeda, K., Akira, S., (2003b).** TRAM is specifically involved in the Toll-like receptor 4-mediated MyD88-independent signaling pathway. *Nat Immunol* 4(11): 1144-50.
- Zewinger, S., Speer, T., Kleber, M.E., Scharnagl, H., Woitas, R., Lepper, P.M., Pfahler, K., Seiler, S., Heine, G.H., März, W., Silbernagel, G., Fliser, D., (2014).** HDL cholesterol is not associated with lower mortality in patients with kidney dysfunction. *J Am Soc Nephrol* 25(5): 1073–1082.
- Zewinger, S., Drechsler, C., Kleber, M.E., Dressel, A., Riffel, J. Triem, S., Lehmann, M., Kopecky, C. Saemann, M.D., Lepper, P.M. et al., (2015a).** Serum amyloid A: high-density 10 lipoproteins interaction and cardiovascular risk. *Eur Heart J* 36(43): 3007-16.
- Zewinger, S., Schumann, T., Fliser, D. & Speer, T., (2015b).** Innate immunity in CKD-associated vascular diseases. *Nephrol Dial Transplant* 31(11): 1813-1821.
- Zewinger, S. et al., (2017).** Relations between lipoprotein(a) concentrations, LPA genetic variants, and the risk of mortality in patients with established coronary heart disease: a molecular and genetic association study. *Lancet Diabetes Endocrinol* 5(7): 534-543.
- Zewinger, S. et al., (2020).** Apolipoprotein C3 induces inflammation and organ damage by alternative inflammasome activation. *Nat Immunol* 21(1): 30-41.
- Zheng, C., Khoo, C., Ikewaki, K., Sacks, F.M., (2007).** Rapid turnover of apolipoprotein C-III-containing triglyceride-rich lipoproteins Downloaded from www.jlr.org at no account, on August 16, 2016 1070 *Journal of Lipid Research* Volume 52, 2011 contributing to the formation of LDL subfractions. *J Lipid Res* 48(5): 1190 – 1203.
- Zheng, C., Khoo, C., Furtado, J. & Sacks, F.M., (2010).** Apolipoprotein C-III and the metabolic basis for hypertriglyceridemia and the dense low-density lipoprotein phenotype. *Circulation* 121(15): 1722–1734.
- Zheng, C., Azcutia, V., Aikawa, E., Figueiredo, J.L., Croce, K., Sonoki, H., Sacks, F.M., Lusinskas, F.W. & Aikawa, M., (2013).** Statins suppress apolipoprotein CIII-induced vascular endothelial cell activation and monocyte adhesion. *Eur Heart J* 34(8): 615-624.
- Zhong, Z., Zhai, Y., Liang, S., Mori, Y., Han, R., Sutterwala, F.S. & Qiao, L., (2013).** TRPM2 links oxidative stress to NLRP3 inflammasome activation. *Nat Commun* 4: 1611.
- Zhou, R., Tardivel, A., Thorens, B., Choi, I. & Tschopp, J., (2010).** Thioredoxin-interacting protein links oxidative stress to inflammasome activation. *Nat Immunol* 11(2): 136-140.
- Zhou, R., Yazdi, A.S., Menu, P. & Tschopp, J., (2011).** A role for mitochondria in NLRP3 inflammasome activation. *Nature* 469(7329): 221-5.

8 Publikationen

Zewinger, S. et al., (2017). Relations between lipoprotein(a) concentrations, LPA genetic variants, and the risk of mortality in patients with established coronary heart disease: a molecular and genetic association study. *Lancet Diabetes Endocrinol* 5(7): 534–543.

Zewinger, S. et al., (2020). Apolipoprotein C3 induces inflammation and organ damage by alternative inflammasome activation. *Nature Immunology* 21(1): 30–41.

9 Danksagung

Zuerst möchte ich mich bei meinem Betreuer Prof. Dr. med. Dr. sc. nat. Thimoteus Speer für seine große Unterstützung bedanken. Ein großer Dank gilt zudem Prof. Dr. med. Danilo Fliser für die Möglichkeit als Wissenschaftliche Mitarbeiterin im nephrologischen Forschungslabor der Klinik für Innere Medizin IV – Nieren- und Hochdruckkrankheiten – des Universitätsklinikums des Saarlandes an der vorliegenden Arbeit forschen zu dürfen.

Zudem möchte ich mich herzlich bei Dr. rer. nat. Dalia Alansary und Prof. Dr. rer. nat. Barbara Niemeyer aus dem Center for Integrative Physiology and Molecular Medicine (CIPMM) der Universität des Saarlandes für die gute Unterstützung in der praktischen Umsetzung bedanken. Ebenso danke ich Prof. Dr. rer. nat. Vera Jankowski aus dem Institut für Molekulare Herz Kreislaufforschung („Institute for Molecular Cardiovascular Research IMCAR“) in Aachen für die gelungene Zusammenarbeit.

Ein großes Dankeschön geht an meine Freunde und Kollegen aus der Forschungsgruppe für die gute Zusammenarbeit und schöne Zeit, die wir zusammen verbringen durften. Vor allem möchte ich mich bei Claudia und Ellen bedanken, die mich bei der praktischen Umsetzung der Experimente mit höchstem Engagement unterstützt haben. Insbesondere danke ich Sarah die mir nicht nur als Kollegin, sondern vor allem als gute Freundin eine größtmögliche Unterstützung war. Ich möchte außerdem den medizinischen Doktoranden Anna und Tobias für die zuverlässige und gute Zusammenarbeit danken.

Meiner Familie danke ich, da sie immer für mich da ist und mich in allem unterstützt.

10 Lebenslauf

Aus datenschutzrechtlichen Gründen wird der Lebenslauf in der elektronischen Fassung der Dissertation nicht veröffentlicht.

11 Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere hiermit an Eides statt, dass ich die von mir eingereichte Doktorarbeit und die von mir namentlich gekennzeichneten Teile selbständig verfasst und ausschließlich die angegebenen Hilfsmittel benutzt habe.

Mölschbach, den 22.11.2021

(Mira Klug)

12 Einverständniserklärung

Ich erkläre mich einverstanden/~~nicht einverstanden~~, dass meine Doktorarbeit an Personen, die nicht mittelbar oder unmittelbar an meiner Prüfung beteiligt sind, ausgeliehen wird.

Mölschbach, den 22.11.2021

(Mira Klug)

Kolloquiumsvermerk:

Tag der Promotion: 13.04.2022

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Michael D. Menger

Berichterstatter: Prof. Dr. Thimoteus Speer

Prof. Dr. Matthias Laschke