

# **Mikropartikel von Inflammasom-aktivierten Endothelzellen reduzieren die Lebensfähigkeit vaskulärer Zellen**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Hohen Medizinischen Fakultät

der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität

Bonn

**Ansgar Nils Ackerschott**

aus Moers

2022

Angefertigt mit der Genehmigung  
der Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Sebastian Zimmer
2. Gutachterin: Prof. Dr. Dr. Veronika Lukacs-Kornek

Tag der Mündlichen Prüfung: 18.03.2022

Aus der Medizinischen Klinik II – Innere Medizin (Kardiologie, Pneumologie)  
Direktor: Prof. Dr. med. Georg Nickenig

Meiner Familie



## Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>8</b>
<b>1. Einleitung</b> .....	<b>12</b>
1.1 Die Bedeutung der Atherosklerose .....	12
1.2 Inflammation und kardiovaskuläre Erkrankungen .....	13
1.2.1 Die Rolle der Inflammation in der Atherosklerose .....	13
1.2.2 Die klinische Anwendung inflammatorischer Biomarker .....	16
1.2.3 Gibt es Hoffnung auf eine antiinflammatorische Therapie?.....	18
1.3 NLRP3-Inflammasom .....	20
1.3.1 Die Mechanismen des NLRP3-Inflammasoms.....	20
1.3.2 Die Bedeutung des NLRP3-Inflammasoms bei verschiedenen Erkrankungen ..	23
1.3.3 Die Bedeutung des NLRP3-Inflammasoms für die Atherosklerose .....	24
1.4 Mikropartikel.....	26
1.4.1 Einführung.....	26
1.4.2 Die Rolle der Mikropartikel in der Atherosklerose .....	28
1.4.3 Die therapeutische Anwendung von Mikropartikeln .....	30
1.5 Ziel der Arbeit.....	31
<b>2. Material und Methoden</b> .....	<b>33</b>
2.1 Zellkultur .....	33
2.1.1 Zellarten .....	33
2.1.2 Zellmedien.....	33
2.2 Chemikalien/Reagenzien .....	33
2.3 Gensonden.....	34
2.4 Verbrauchsmaterialien .....	35
2.5 Puffer/Angesetzte Reagenzien.....	35
2.6 Geräte .....	36
2.7 Software.....	37
2.8 Zellkultur .....	38
2.8.1 Zelltypen.....	38
2.8.1.1 HCAEC.....	38

2.8.1.2 HCASMC.....	38
2.8.2 Zellkulturbedingungen .....	38
2.8.3 Kryokonservierung .....	40
2.9 Stimulation des NLRP3-Inflammasoms.....	40
2.10 Gewinnung und Isolierung von MP .....	41
2.11 Fluoreszenzmikroskopische Darstellung der Inkorporation von MP in vaskuläre Zellen .....	41
2.11.1 Vorbereitung.....	41
2.11.2 Färbung und Mikroskopie.....	41
2.12 Nachweis der Inflammasomaktivierung durch EMP .....	42
2.12.1 RTD-PCR.....	43
2.12.1.1 RNA-Isolierung .....	43
2.12.1.2 Konzentrationsbestimmung der RNA .....	44
2.12.1.3 Reverse Transkription .....	45
2.12.1.4 Real-time quantitative PCR.....	46
2.12.1.5 Relative Quantifizierung der Genexpression .....	47
2.12.2 Humaner IL-1 $\beta$ /IL-1F2 Duoset ELISA .....	47
2.13 Scratch Assay .....	49
2.14 Bestimmung der Lebensfähigkeit EMP-behandelter Zellen.....	50
2.15 Bestimmung der zytotoxischen Effekte von EMP .....	50
2.16 Inhibition des NLRP3-Inflammasoms .....	51
2.17 Durchflusszytometrische Untersuchung von SMCMP .....	51
2.18 Elektronenmikroskopie von SMCMP .....	52
2.19 Statistische Auswertung .....	52
<b>3. Ergebnisse.....</b>	<b>53</b>
3.1 Vorarbeiten.....	53
3.2 Aufnahme von EMP in vaskuläre Zellen .....	54
3.3 EMP beeinträchtigen zelluläre Funktionen und induzieren eine inflammatorische Reaktion in vaskulären Zellen .....	57
3.4 Die Behandlung von EMP mit Inflammasominhibitoren reduziert schädliche zelluläre Effekte.....	62

3.5 Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms in HCASMC vermittelt die Ausschüttung von MP .....	64
3.6 MP Inflammasom-aktivierter glatter Muskelzellen vermitteln zytotoxische Effekte .....	67
<b>4. Diskussion .....</b>	<b>69</b>
4.1 Einleitung .....	69
4.2 EMP von Inflammasom-aktivierten Endothelzellen werden von vaskulären Zellen inkorporiert .....	70
4.3 EMP beeinträchtigen zelluläre Funktionen .....	71
4.4 EMP induzieren eine inflammatorische Reaktion in vaskulären Zellen .....	73
4.5 Inflammasom-aktivierte glatte Muskelzellen setzen MP frei .....	74
4.6 Einordnung der Rolle der MP .....	76
<b>5. Zusammenfassung .....</b>	<b>78</b>
<b>6. Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>79</b>
<b>7. Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>80</b>
<b>8. Literaturverzeichnis .....</b>	<b>81</b>

## Abkürzungsverzeichnis

AHA	American Heart Association
AIM2	Absent in melanoma 2
AKS	Akutes Koronarsyndrom
ALI	Acute lung injury
ApoE	Apolipoprotein E
APPROVe	Adenomatous Polyp Prevention on VIOXX-Studie
ARDS	Acute respiratory distress syndrome
ASC	Apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD
ASS	Acetylsalicylsäure
ATP	Adenosintriphosphat
bis-AAF-R110	Bisalanyl-alanyl-phenylalanyl-rhodamine 110
CABG	Coronary artery bypass graft
CANTOS	Canakinumab Antiinflammatory Thrombosis Outcome Studie
CAPS	Cryopyrin-associated periodic syndrome
CARD	Caspase Recruitment Domain
CD	Cluster of Differentiation
cDNA	complementary DNA
CMMP	Cell-mimicking microparticle(s)
COX-2	Cyclooxygenase-2
CRP	C-reaktives Protein
DAMP	Danger-associated molecular patterns
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
Dil-Ac-LDL	Dil-Acetylated Low Density Lipoprotein

DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonucleic acid
DPBS	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
EMP	Endothelial microparticle(s)
ESC	European Society of Cardiology
g	g-Zahl/Relative Zentrifugalbeschleunigung
GDF-15	Growth Differentiation Factor-15
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Schwefelsäure
HCAEC	Human Coronary Artery Endothelial Cells
HCASMC	Human Coronary Artery Smooth Muscle Cells
HEPES BSS	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure Balanced Salt Solution
HsCRP	Hochsensitives C-reaktives Protein
ICAM-1	Intercellular adhesion molecule-1
ICE	Interleukin-1 converting enzyme
I $\kappa$ B $\alpha$	nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha
IL-1 $\beta$	Interleukin-1 $\beta$
IL-6	Interleukin-6
IL-8	Interleukin-8
IL-18	Interleukin-18
ILG	Isoliquiritigenin
JNK-1	c-Jun N-terminal kinase 1
KHK	Koronare Herzkrankheit

LDL	Low-density Lipoprotein
LPS	Lipopolysaccharide
MMP	Monocytic microparticle(s)
MCP-1	Monocyte chemotactic protein-1
MP	Microparticle(s)
mRNA	messenger RNA
NADPH	Nicotinamidadeninukleotidphosphat
NLRC4	NLR family CARD domain-containing protein 4
NLRP1	NLR family pyrin domain containing 1
NLRP3	NLR family pyrin domain containing 3
NF- $\kappa$ B	nuclear factor $\kappa$ B
PAMP	Pathogen-associated molecular patterns
pAVK	periphere arterielle Verschlusskrankheit
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase chain reaction
PFA	Paraformaldehyd
PLUTO-CHF-Studie	Plavix Use for Treatment Of Congestive Heart Failure
PMP	Platelet-derived microparticle(s)
PRR	Pattern recognition receptor
PYD	Pyrin Domain
RFU	Relative Fluorescence Unit (Fluoreszenzintensität)
RNA	Ribonucleic acid
ROS	Reactive oxygen species
RTD-PCR	Real-time detection PCR
SMCMP	Smooth muscle cell microparticle(s)
SM22- $\alpha$	Smooth muscle protein 22-alpha

TF	Tissue factor
TFPI	Tissue factor pathway inhibitor
TNF	Tumornekrosefaktor
TNS	Trypsin Neutralization Solution
TSG101	Tumor susceptibility gene 101
VCAM-1	Vascular cellular adhesion molecule-1
vWF	von-Willebrand-Faktor

## 1. Einleitung

### 1.1 Die Bedeutung der Atherosklerose

Atherosklerose und ihre Folgeerkrankungen wie koronare Herzkrankheit (KHK) oder Schlaganfall stellen die häufigsten Todesursachen weltweit dar. Im Jahr 2016 waren ischämische Herzerkrankungen und Schlaganfälle alleine für 26,8 % der Todesfälle global verantwortlich. Sie tragen nicht nur seit über 15 Jahren den Spitzenplatz der Todesursachenstatistik, sondern die Anzahl der durch sie verursachten Tode pro Jahr ist in diesem Zeitraum von 12,2 Millionen auf 15,2 Millionen gestiegen (World Health Organization, 2018).

Dem entgegengesetzt lässt sich dank Fortschritten in Prävention und Behandlung kardiovaskulärer Erkrankungen in den vergangenen Jahren in großen Teilen Europas, Nordamerikas, Australiens, Neuseelands und Japans ein anderer Trend dokumentieren, und zwar eine Regression der altersstandardisierten Mortalität kardiovaskulärer Erkrankungen und der KHK (Timmis et al., 2018; Mensah et al., 2017). Grund zu Besorgnis gibt es dennoch, so lässt sich bereits jetzt eine Verlangsamung dieser Entwicklung verzeichnen, und im Angesicht einer steigenden Prävalenz von Adipositas, metabolischen Syndroms und Diabetes Mellitus ist möglicherweise sogar eine Umkehr zu befürchten (Mensah et al., 2017).

Trotz verbesserter Möglichkeiten der Prävention und einer zeitigen, effektiven Therapie sind kardiovaskuläre Erkrankungen auch jetzt noch ein wichtiger Grund für nicht erreichte Lebenserwartungen. Bei Untersuchungen zur frühzeitigen Krankheitsmortalität zeigten sich so kardiovaskuläre Erkrankungen im Zeitraum von 2009-2014 unter allen European Society of Cardiology (ESC)-Mitgliedern als häufigste Todesursache: bei den unter 75-Jährigen waren es 35 %, und bei der Gruppe der unter 65-Jährigen 29 %. Gerade diese Gruppen sind dabei von besonderem Interesse, da sie in der Regel stark von Präventionsmaßnahmen und einer rechtzeitigen Therapie profitieren können (Timmis et al., 2018).

Auch ökonomisch stellen kardiovaskuläre Erkrankungen einen bedeutenden Faktor dar. Während laut American Heart Association (AHA) die geschätzten jährlichen direkten und indirekten Kosten kardiovaskulärer Erkrankungen in den USA im Zeitraum von 2011 bis

2012 noch 316,6 Milliarden US-Dollar betragen, werden für 2030 bereits Kosten von über einer Billionen US-Dollar prognostiziert. Die AHA berichtet, dass die durch kardiovaskuläre Erkrankungen verursachten Gesamtkosten bereits jetzt jede andere Diagnosegruppen übertreffen (Mozaffarian et al., 2016).

Vor dem Hintergrund der medizinischen, gesellschaftlichen und wirtschaftlichen Bedeutung kardiovaskulärer Erkrankungen kommt der Erforschung der Pathogenese, Diagnostik und Therapie der Atherosklerose daher eine besondere Relevanz zu.

Besonders inflammatorische Prozesse haben sich dabei in jüngster Vergangenheit von fundamentaler Bedeutung erwiesen.

## 1.2 Inflammation und kardiovaskuläre Erkrankungen

### 1.2.1 Die Rolle der Inflammation in der Atherosklerose

Die Rolle der Inflammation war lange Zeit ein vernachlässigter Blickpunkt kardiovaskulärer Forschung. Obwohl Rudolf Virchow bereits im 19. Jahrhundert die entzündliche Beschaffenheit des atherosklerotischen Plaques erkannte und postulierte, dass es sich um einen aktiven Prozess handeln müsse, spielte Inflammation für einen Großteil des letzten Jahrhunderts keine bedeutsame Rolle in der Erforschung der Atherosklerose. Lange Zeit dominierte stattdessen das Verständnis des Atheroms als Akkumulation von Cholesterin und thrombozytärer Trümmer die Anschauung des vergangenen Jahrhunderts. Erst zum Ende des 20. Jahrhunderts rückte die Rolle der Inflammation erneut in den Fokus des wissenschaftlichen Interesses (Libby, 2012).

Als Mechanismus in der Initiation der Atherosklerose ist gemäß der 1973 von Russell Ross und John Glomset formulierten Response-to-injury Hypothese weitestgehend eine Schädigung der endothelialen Gefäßauskleidung anerkannt (Furie und Mitchell, 2012). Aufgrund aktueller Erkenntnisse ist jedoch zu berücksichtigen, dass es sich dabei keinesfalls nur um eine endotheliale Denudation handelt, sondern, dass bereits eine endotheliale Dysfunktion als solche Schädigung anzusehen ist. Mögliche Ursachen für eine solche Dysfunktion umfassen unter anderem ein erhöhtes, modifiziertes low-density Lipoprotein (LDL), erhöhtes Homocystein oder freie Radikale verursacht durch

Bluthochdruck oder Diabetes Mellitus. Jede atherosklerotische Läsion ist dabei als ein chronisch-inflammatorischer Prozess der Arterie zu verstehen (Ross, 1999).

Betrachtet man nun die durch die endotheliale Dysfunktion ausgelösten Prozesse, so lassen sich zahlreiche Effekte betrachten.

Bereits in einer frühen Phase der Atherosklerose kommt es zu einer Rekrutierung und transendothelialen Migration inflammatorischer Zellen. Vermittler dieses Prozesses sind die Endothelzellen, welche durch eine erhöhte Expression von Adhäsionsmolekülen wie „vascular cellular adhesion molecule-1“ (VCAM-1) und „intercellular adhesion molecule-1“ (ICAM-1) die Bindung von Leukozyten gestatten (Blankenberg et al., 2003). In der Folge kommt es zu einer Einwanderung von Monozyten in die Intima und Subintima der Gefäße, wo sie sich zu Makrophagen differenzieren. In der Gefäßwand angelangt nehmen sie mithilfe von Scavenger-Rezeptoren oxidiertes LDL und weitere Lipide auf und verwandeln sich in die sogenannten Schaumzellen. Glatte Muskelzellen wandern in die Intima ein und lagern sich um den Schaumzell-Nidus, der durch die Sekretion von Zytokinen, freien Sauerstoffradikalen, Proteasen, Komplement- und Wachstumsfaktoren die Entstehung des atherosklerotischen Plaques und die inflammatorische Reaktion vorantreibt (Tousoulis et al., 2008; Woollard und Geissmann, 2010).

Eine weitere Zellpopulation, die das atherosklerotische Plaque ausmacht, sind T-Zellen. Stimuliert durch die Präsentation von Antigen-Fragmenten und die Einwirkung proinflammatorischer Zytokine kommt es führend zu einer Th1-Reaktion, innerhalb derer sich die T-Zellen in die Th1-Effektor-Zellen umwandeln. Infolge der Differenzierung produzieren die Th1-Effektor-Zellen nun Interferon- $\gamma$ , welches Makrophagen und vaskuläre Zellen zu einer verbesserten Antigenpräsentation bzw. Ausschüttung von Tumor Nekrose Faktor (TNF) und Interleukin-1 (IL-1) veranlasst (Hansson, 2005).

Wie bereits beschrieben kommt es im Verlauf der Atherogenese auch zu einer Einwanderung von glatten Muskelzellen in die Intima. Neben diesem Prozess finden weitere, die glatten Muskelzellen betreffende Anpassungsvorgänge statt. Zum einen kommt es zu einer Umwandlung der glatten Muskelzellen in eine migratorische, proliferative und Matrix-sezernierende Form, zum anderen differenziert ein Teil der glatten Muskelzellen in Makrophagen-ähnliche Zellen, die nicht nur wie Makrophagen aussehen, sondern analog zu diesen eine phagozytotische Aktivität aufweisen (Raggi et al., 2018). Ebenso produzieren glatte Muskelzellen zahlreiche Zytokine wie Interferon- $\gamma$ , IL-1,

Interleukin-18 (IL-18) oder „Monocyte chemotactic protein-1“ (MCP-1) und leisten damit eine stimulierende Funktion bezüglich der Zellmigration, der Expression von Adhäsionsmolekülen, dem „Remodeling“ der extrazellulären Matrix oder der Rekrutierung inflammatorischer Zellen (Doran et al., 2008).

Im weiteren Verlauf der Atherosklerose kann es zu einer Ruptur der atherosklerotischen Plaques kommen, einem Prozess, der als Hauptverursacher der koronarerteriellen Thrombose und der damit verbundenen Komplikationen wie Myokardinfarkt (79 %) und plötzlichem koronaren Tod (65 %) zu sehen ist (Falk et al., 2013). Auch hier kommt der Inflammation eine besondere Rolle zu.

Eine Ruptur des atherosklerotischen Plaques tritt typischerweise dort auf, wo die fibröse Kappe am dünnsten und die Infiltration durch Makrophagen am ausgeprägtesten ist. Verantwortlich gemacht werden dabei zwei Mechanismen: Zum einen der Verlust glatter Muskelzellen, zum anderen die Ausdünnung der fibrösen Kappe durch Makrophagen (Bentzon et al., 2014).

Als wichtiger Faktor bezüglich des Verlustes glatter Muskelzellen des atherosklerotischen Plaques ist die Apoptose selbiger Zellen anzusehen. Dies betreffende Erkenntnisse konnten in einer Studie an transgenen Mäusen gewonnen werden, bei denen der humane Diphtherie-Toxin-Rezeptor unter die Kontrolle des minimalen smooth muscle protein 22-alpha (SM22 $\alpha$ ) - Promoters gesetzt wurde. Nachfolgend wurden sie mit Apolipoprotein E -/- (ApoE-/-)-Mäusen gekreuzt. Unter Einsatz des Diphtherie Toxins konnte so nun die Apoptose von 50-70 % der vaskulären glatten Muskelzellen induziert werden. Die Autoren beschrieben, dass während sich normale Arterien trotz dieses Verlustes weitgehend unbetroffen zeigten, es aber in den transgenen Mäusen zu einer Ausdünnung der fibrösen Kappe, einem Verlust der extrazellulären Matrix und einer ausgeprägten intimalen Inflammation kam (Clarke et al., 2006).

Als mögliche Auslöser der Apoptose von glatten Muskelzellen im Rahmen der Atherosklerose konnten bspw. Ablagerungen von Calciumphosphat-Kristallen, oxidiertes LDL, hochkonzentriertes Stickstoffmonoxid (NO), mechanische Schädigungen oder proinflammatorische Zytokine identifiziert werden (Ewence et al., 2008; Grootaert et al., 2018).

Bedeutsam ist die Apoptose der glatten Muskelzellen jedoch auch für die Funktion der Monozyten. Diese werden nämlich durch die im Rahmen einer Fas-induzierten Apoptose von glatten Muskelzellen freigesetzten MCP-1 und Interleukin-8 (IL-8) zu einer ausgeprägten Migration in die Gefäßwand veranlasst (Schaub et al., 2000).

Eine wichtige Aufgabe der Makrophagen in der Gefäßwand ist die Beseitigung apoptotischer Zellen. Es zeigte sich hierbei jedoch, dass gerade im atherosklerotischen Plaque diese Fähigkeit eingeschränkt ist. Schrijvers et. al (2005) erläutern, dass durch diese Einschränkung das Risiko der postapoptischen Nekrose und die Stimulation weiterer inflammatorischer Prozesse erhöht sein könnte. Gleichzeitig beeinflussen Monozyten selbstständig die Stabilität des atherosklerotischen Plaques. Als mechanistische Grundlage ließ sich hierbei die Wirkung monozytärer Matrix-Metalloproteinasen und Zystein-Proteasen beleuchten, welche im Zusammenhang mit dem Abbau der fibrösen Kappe stehen (Galis et al., 1994; Liu et al., 2004).

Korrespondierend zu diesen Ausführungen zeigte sich in pathologischen Untersuchungen eine erhöhte Infiltration von Makrophagen in den Plaques von Patienten mit instabiler Angina Pectoris oder nicht-Q-Wellen Myokardinfarkt im Vergleich zu Patienten mit stabiler Angina Pectoris (Moreno et al., 1994). Ebenso konnte der Vergleich von humanen ulzerierend-thrombosierenden aortalen Plaques zu intakten aortalen Plaques eine geringere Zahl glatter Muskelzellen (2.8 % vs. 11.8 %) bei gleichzeitig vermehrtem Vorkommen von Monozyten (13.7 % vs. 2.9 %) offenlegen (Davies et al., 1993).

### 1.2.2 Die klinische Anwendung inflammatorischer Biomarker

Die Prävention hat sich als eine der wichtigsten Maßnahmen zur Verhinderung kardiovaskulärer Ereignisse dargestellt. Grundlegend hierfür ist das frühzeitige Erkennen potentieller Betroffener. Eine Möglichkeit dies zu bewerkstelligen, ist das Screening von Biomarkern. Aktuelle Bestrebungen zielen darauf ab, die Nutzbarkeit inflammatorischer Parameter zu überprüfen.

Als wichtiger Parameter hat sich das C-reaktive Protein (CRP) gezeigt, ein Akute-Phase-Protein mit hoher Sensitivität und Ansprechgeschwindigkeit (Pepys und Hirschfield, 2003). Das CRP betreffend konnte eine Metaanalyse der Daten von über 160.000

Menschen, ohne Vorgeschichte vaskulärer Erkrankungen, je einfacher Steigerung der Standardabweichung des hochsensitiven CRP (hsCRP) (logarithmisch normalisiert) eine Zunahme des relativen Risikos der kardiovaskulären Mortalität von 1,55 (95 % CI: 1,37–1,76) offenlegen (The Emerging Risk Factors Collaboration, 2010).

Ein weiterer Einflussfaktor, der umfangreich untersucht wurde, ist der „Growth differentiation factor-15/Macrophage Inhibitory Cytokine 1“ (GDF-15). Untersuchungen an über 16.000 Teilnehmern der PLATO-Studie zur Behandlung des Koronarsyndroms mit Ticagrelor oder Clopidogrel, konnten bezüglich der Menge zirkulierenden GDF-15 einen Zusammenhang zur Ausprägung der KHK, nicht „Coronary Artery Bypass Graft“ (CABG)-bezogenen Blutungen, Myokardinfarkt, Schlaganfall oder Tod herstellen. Dabei betrug die Hazard Ratio des kardiovaskulären Todes pro einfacher Zunahme der Standardabweichung des logarithmierten GDF-15 1.41 (95 % CI: 1,30–1,53) (Hagström et al., 2016).

Ein weiterer potentieller Marker, der umfassend untersucht worden ist, ist Fibrinogen, ein Protein, das neben der Vermittlung von Koagulation und Plättchenaggregation auch inflammatorische Prozesse beeinflusst, bspw. durch Interaktion mit „toll-like receptors“ oder „Cluster of Differentiation 11b/18“ (CD11b/CD18)-vermittelte Aktivierung des „nuclear factor  $\kappa$ B“ (NF $\kappa$ B)-Stoffwechselwegs (Davalos und Akassoglou, 2012). Im Jahr 2005 konnte eine Metanalyse von 31 Studien mit insgesamt über 150.000 Teilnehmern betreffend der Plasma-Konzentration des Fibrinogens eine moderate Assoziation zu KHK, Schlaganfall, vaskulärer und nicht-vaskulärer Mortalität beleuchten (Danesh et al., 2005). Einen weiteren Einblick in das inflammatorische Risiko kardiovaskulärer Erkrankungen gewähren zudem die Menge zirkulierender zellulärer Adhäsionsmoleküle wie ICAM-1, VCAM-1 oder P-Selektin (Hansson, 2005).

Nichtsdestotrotz finden klinische Marker für inflammatorische Prozesse in der Risikoeinschätzung kardiovaskulärer Erkrankungen nur zu geringem Maße Anwendung. Betrachtet man eine Gegenüberstellung der gegenwärtig eingesetzten Systeme zur Einschätzung des Risikos kardiovaskulärer Erkrankungen unter augenscheinlich gesunden Menschen, muss man feststellen, dass sie dort gar nicht zum Einsatz kommen (Tabelle 1).

**Tab.1:** Aktuelle Systeme zur Einschätzung des kardiovaskulären Risikos von offenbar gesunden Personen. Angepasst von Piepoli et al. (2016).

	Framingham <sup>44</sup>	SCORE <sup>28</sup>	ASSIGN – SCORE <sup>45</sup>	QRISK1 <sup>46</sup> & QRISK2 <sup>47</sup>	PROCAM <sup>48</sup>	Pooled Cohort Studies Equations <sup>49</sup>	CUORE <sup>50</sup>	Globorisk <sup>52</sup>
<b>Calculates</b>	10-year risk of CAD events originally. Latest version: 10-year risk of CVD events NCEP ATP III version: 10-year risk of hard coronary events	10-year risk of CVD mortality	10-year risk of CVD events	10-year risk of CVD events. Lifetime risk	Two separate scores calculate 10-year risks of major coronary events and cerebral ischaemic events	10-year risk for a first atherosclerotic CVD event. Lifetime risk	10-year probability of developing a first major CV event (myocardial infarction or stroke)	10 year risk of fatal cardiovascular disease
<b>Age range (years)</b>	30–75	40–65	30–74	35–74	20–75	20–79	35–69	40–84
<b>Variables</b>	Sex, age, total cholesterol, HDL-C, SBP, smoking status, DM, hypertensive treatment	Sex, age, total cholesterol or total cholesterol/HDL-C ratio, SBP, smoking status. Versions for use in high and low-risk countries	Sex, age, total cholesterol, HDL-C, SBP, smoking – no. cigs, DM, area based index of deprivation, family history	QRISK1 - sex, age, total cholesterol to HDL-C ratio, SBP, smoking status, DM, area based index of deprivation, family history, BMI, BP treatment, ethnicity and chronic diseases	Age, sex, LDL-C, HDL-C, DM, smoking, SBP	Age, sex, race (white or other/African American), total cholesterol, HDL-C, SBP, antihypertensive treatment, DM, smoking	Age, sex, SBP, total cholesterol, HDL-C, antihypertensive therapy and smoking habit	Age, sex, smoking, total cholesterol, DM, systolic BP

Als Grund hierfür nennen die 2016 European Guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice, dass die bisher beschriebenen möglichen Biomarker keine oder nur begrenzt belegte Fähigkeit zur Verbesserung der aktuellen Risikostratifikation aufweisen. Eine Ausnahme scheint hier bisher nur hsCRP zu bilden, dessen relatives Risiko sich den klassischen Risikofaktoren annähert. Eine Verbesserung aktueller Risikobewertungssysteme ist durch hsCRP nach Angabe der sechsten gemeinsamen Task Force der ESC und anderer Gesellschaften jedoch nicht zu erwarten (Piepoli et al., 2016).

### 1.2.3 Gibt es Hoffnung auf eine antiinflammatorische Therapie?

Aus den neu gewonnen Erkenntnissen zur Rolle der Inflammation im Rahmen der Atherogenese haben sich zahlreiche Überlegungen entwickelt, wie diesen Vorgängen mit neuen oder aber auch mit schon bekannten Medikamenten begegnet werden kann. Eine besondere Herausforderung dürfte dabei gerade sein, die Balance zwischen einer anti-atherogenen Wirkung und der Vermeidung von Nebenwirkungen und Komplikationen zu wahren.

Ein antiinflammatorischer Wirkstoff der bereits seit langer Zeit weitverbreitet zur Therapie entzündlicher und autoimmunologischer Erkrankungen Anwendung findet, sind Glukokortikoide (Shaikh et al., 2012). Eine Nutzung dieser Wirkstoffe zeigt sich im Rahmen der Atherosklerose jedoch nicht als praktikabel, da Glukokortikoide durch die

Förderung des Auftretens von Hypertension, Hyperglykämie, Hyperlipidämie und zentraler Fettsucht kardiovaskuläre Erkrankungen begünstigen (Ng und Celermajer, 2004). Korrespondierend zeigte sich bei Patienten unter oder nach therapeutischer Anwendung von Glukokortikoiden ein erhöhtes Risiko für Herzversagen (Souverein et al., 2004).

Eine weitere Wirkstoffklasse, die bezüglich eines positiven therapeutischen Effektes geprüft wurde, sind Cyclooxygenase-2 (COX-2)-Hemmer. Auch hierbei wurden Überlegungen angestellt, welche die diametralen Effekte einer COX-2-Inhibition diskutierten. So stellt sich zwar im atherosklerotischen Plaque eine Überexpression der COX-2 dar, jedoch könnte eine Inhibition des Enzyms zu Reduktion von Prostazyklin, zu einem Anstieg des Blutdrucks und zu einer Destabilisierung des atherosklerotischen Plaques führen. Näher nachgegangen wurde dieser Überlegung im Rahmen der APPROVe-Studie (Adenomatous Polyp Prevention on VIOXX-Studie) zur Untersuchung der Hypothese, dass die Einnahme von Rofecoxib die Rekurrenz adenomatöser Polypen unter Patienten mit einer Vorgeschichte kolorektaler Adenome reduzieren könne. Dabei zeigte sich in der Rofecoxib-Gruppe 1,5 thrombotische Ereignisse pro 100 Patientenjahren im Vergleich zu 0,78 in der Placebo-Gruppe. Das entsprechend relative Risiko wurde mit 1,92 ermittelt. Als thrombotische Ereignisse wurden tödlicher und nichttödlicher Herzinfarkt, instabile Angina pectoris, plötzlicher Herztod, tödlicher und nichttödlicher Schlaganfall, transitorische ischämische Attacke (TIA), periphere arterielle Thrombosen, periphere venöse Thrombosen und pulmonale Embolien definiert (Bresalier et al., 2005).

Es gibt jedoch auch Beispiele, die die positiven Effekte einer antiinflammatorischen Therapie illustrieren konnten. Eine Kombinationstherapie bestehend aus niedrigdosiertem Colchicin (0,5 mg), Aspirin und/oder Clopidogrel und Statinen zeigte sich so bspw. bei Patienten mit stabiler Angina Pectoris zur Reduktion sekundärer kardiovaskulärer Ereignisse als erfolgreich (Nidorf et al., 2013). Gleichmaßen stellte sich bei Patienten mit kürzlich zurückliegendem Myokardinfarkt unter Colchicin-Therapie mit 0,5 mg pro Tag ein geringeres Risiko für ischämische kardiovaskuläre Ereignisse als bei Placebo-Einnahme dar (Tardif et al., 2019).

Zahlreiche Studien legen ebenso nahe, dass Statine kardiovaskuläre Erkrankungen neben ihrer Wirkung auf den Lipidhaushalt auch durch antiinflammatorische Eigenschaften positiv beeinflussen (Jain und Ridker, 2005).

Ein von Lipiden unabhängiger Weg in der Kreation einer neuen antiinflammatorischen Therapie wurde jedoch erst vor Kurzem in der Canakinumab Antiinflammatory Thrombosis Outcome Studie (CANTOS) besprochen. Im Rahmen einer randomisierten, Doppelblind-Studie mit 10.061 Patienten mit vorangegangenem Herzinfarkt und mit hsCRP von  $\geq 2$  mg/l wurde die Rekurrenz kardiovaskulärer Ereignisse unter Therapie mit Canakinumab untersucht (Ridker et al., 2017). Canakinumab ist ein monoklonaler Antikörper der gegen IL-1 $\beta$  gerichtet ist, ein Molekül, welches als wichtiger Mediator im Rahmen von Infektion und Entzündung fungiert, und infolge einer Aktivierung des „NLR family pyrin domain containing 3“ (NLRP3)-Inflammasoms freigesetzt wird (Dhimolea, 2010; Hoffman und Wanderer, 2010). Im Rahmen der Studie wurden unter Behandlung mit 150 mg Canakinumab signifikante Effekte bezüglich der primären Wirksamkeitsendpunkte (nichttödlicher Myokardinfarkt, nichttödlicher Schlaganfall, kardiovaskulärer Tod) beobachtet (HR vs. Placebo: 0.85). Ebenso wurden die sekundären Wirksamkeitsendpunkte (Kombination primärer Endpunkte mit instabiler Angina pectoris, die zu einer dringlichen Revaskularisation führte) erreicht (HR vs. Placebo, 0.83). Bei mit der Therapie assoziierter höherer Inzidenz tödlicher Infektion war jedoch kein signifikanter Unterschied in der Gesamtmortalität festzustellen (Ridker et al., 2017).

Obwohl die CANTOS-Studie erstmalig die therapeutische Bedeutung des NLRP3 - Inflammasoms offenbaren konnte, verdeutlichen ihre Ergebnisse nur die Notwendigkeit die Wirkungspfade des NLRP3-Inflammasoms genauer zu beleuchten.

### 1.3 NLRP3-Inflammasom

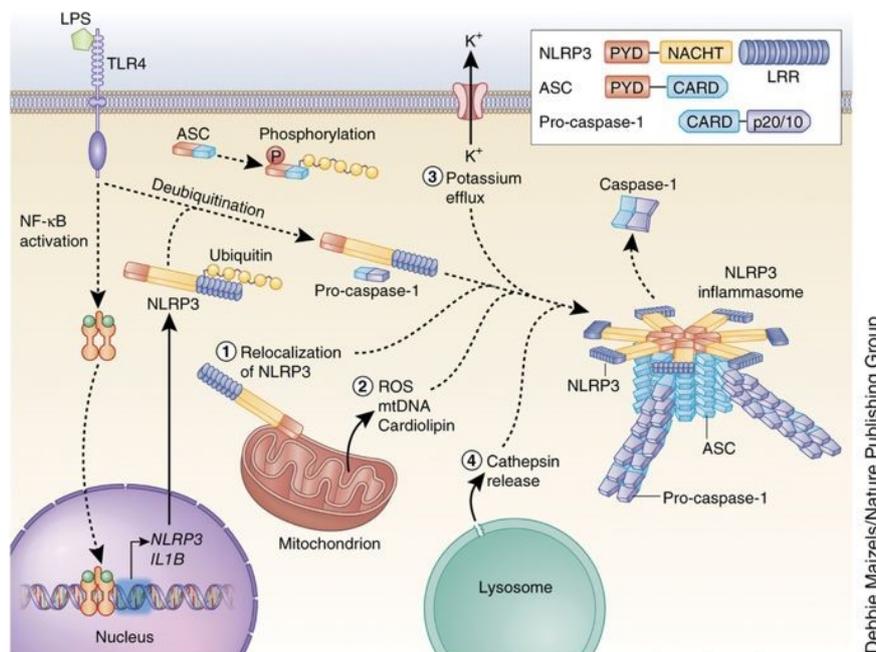
#### 1.3.1 Die Mechanismen des NLRP3-Inflammasoms

Das NLRP3-Inflammasom ist ein multimerer Proteinkomplex, der eine essentielle Rolle in der Immunabwehr und Vermittlung inflammatorischer Reaktionen spielt. Infolge der Wahrnehmung von Gefahrensignalen oder Pathogenen verursacht er die Freisetzung der Zytokine IL-1 $\beta$  und IL-18 sowie einen Zelltod durch Pyroptose (Broz und Dixit, 2016).

Der Begriff des Inflammasoms wurde erstmals im Jahre 2002 in Untersuchungen zum Mechanismus der Spaltung von pro-IL-1 $\beta$  durch Caspase-1 etabliert, wobei der Aufbau des „NLR family pyrin domain containing 1“ (NLRP1)-Inflammasoms offengelegt werden konnte (Martinon et al., 2002). Das NLRP1-Inflammasom gehört mit dem NLRP3-Inflammasom zu einer Familie von mehreren Proteinkomplexen. Eine Differenzierung der verschiedenen Mitglieder lässt sich hierbei durch ihre jeweiligen einzigartigen „pattern recognition receptors“ (PRRs) vornehmen. Unterscheiden lassen sich die Rezeptoren NLRP1, „NLR family CARD domain-containing protein 4“ (NLRC4), NLRP3, „Absent in melanoma 2“ (AIM2) und Pyrin, nach denen die kanonischen Inflammasome auch benannt wurden (Broz und Dixit, 2016).

Die Aktivierung des Inflammasoms geschieht in einem zweischrittigen Prozess aus „Priming“ und anschließender Oligomerisierung (Broz und Dixit, 2016; Guo et al., 2015). Als „Priming“ fungiert zunächst eine Aktivierung von PRRs. Diese befinden sich auf der Oberfläche von Makrophagen, Epithelzellen, dendritischen Zellen, Neutrophilen oder auch Endothelzellen (Lowe et al., 2002; Patel et al., 2017). Die Aktivierung der Zellen erfolgt dabei durch die Stimulation der jeweiligen PRRs mit „Pathogen-associated molecular patterns“ (PAMPs) oder „Danger-associated molecular patterns“ (DAMPs) (Guo et al., 2015; Patel et al., 2017). Das „Priming“ setzt anschließend zwei Prozesse in Gang. Zum einen kommt es zu einer Aktivierung von NF- $\kappa$ B, eines Transkriptionsfaktors, zum anderen zu einer Deubiquitinierung von NLRP3 (Guo et al., 2015). NF- $\kappa$ B liegt gewöhnlicherweise sequestriert durch inhibitorische Proteine der I $\kappa$ B-Familie inaktiv im Zytoplasma der Zelle vor. Infolge der Wirkung eines adäquaten Stimulus kommt es jedoch zur Aktivierung eines I $\kappa$ B-Kinase-Komplexes, welcher I $\kappa$ B phosphoryliert. Dies wiederum löst einen ubiquitinabhängigen Abbau durch das Proteasom aus, infolgedessen NF- $\kappa$ B in den Nukleus gelangt (Liu et al., 2017). Dort angekommen reguliert NF- $\kappa$ B die Expression von inflammatorischen Zytokinen, Chemokinen, Zelladhäsionsmolekülen und Immunrezeptoren (Pahl, 1999). Ein Mediator, dessen Expression gefördert wird, und welcher selber Bestandteil des Inflammasoms ist, ist NLRP3. Dieses wird in dem besagten zweiten Prozess deubiquitiniert, und damit funktionsfähig gemacht (Guo et al., 2015; Py et al., 2013). Nach dem Abschluss des „Primings“ bedarf es zur Initiierung der Oligomerisierung des NLRP3-Inflammasoms eines zweiten Stimulus. Als solche etabliert sind hierbei die

Freisetzung mitochondrialer Faktoren wie „Reactive oxygen species“ (ROS), „desoxyribonucleic acid“ (DNA) oder Kardiolipin ins Zytosol der Zelle, der Ausfluss von Kalium durch Ionen-Kanäle, sowie die Freisetzung von Kathepsin infolge der Schädigung lysosomaler Membranen. Durch „Pyrin Domain“ (PYD-PYD)-Interaktion vermittelt NLRP3 anschließend die Aggregation von „apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD“ (ASC) in Prion-ähnliche Filamente. An den neu entstanden ASC-Filamenten bilden sich nun durch „Caspase Recruitment Domain“ (CARD-CARD)-Interaktion Pro-Caspase-1 Filamente. Es kommt infolgedessen zur autoproteolytischen Aktivierung von pro-Caspase-1 (Guo et al., 2015).



**Abb. 1:** Mechanismus der Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms (Guo et al., 2015).

Im Weiteren vermittelt Caspase-1 selber mehrere Mechanismen. Neben der Prozessierung von Interleukinen wie IL-1 $\beta$ , aufgrund derer es initial den Name „Interleukin-1 converting enzyme“ (ICE) erhalten hatte, vermittelt die aktivierte Caspase-1 das Auftreten der Pyroptose (Broz und Dixit, 2016; Howard et al., 1991). Die Pyroptose ist als Form des Zelltods abzugrenzen von der Apoptose. Während es im Rahmen der Apoptose zu einer nukleären und zytoplasmatischen Kondensation sowie einer zellulären Aufsplitterung in apoptotische Körper kommt, die von anderen Zellen abgebaut werden, stellt sich die Pyroptose als lytischer Prozess dar (Fink und

Cookson, 2005). Es kommt zur Bildung von Poren in der zellulären Membran und anschließend, infolge des Einströmens von Ionen und Wassers, zu einer Ruptur der Membran (Jorgensen und Miao, 2015). Im Gegensatz zur Apoptose handelt es sich um einen inflammatorischen Prozess (Fink und Cookson, 2005; Jorgensen und Miao, 2015). Zentraler Vermittler dieses Prozesses ist Gasdermin D. Gasdermin D wird durch die humanen Caspase 1, 4/5 sowie die murine Caspase 11 aktiviert (Liu et al., 2016; Shi et al., 2015). Gasdermin D wiederum bindet an Phosphatidylserin-, Cardiolipin-, oder Phosphatidylinositolphosphathaltige Membranen, wo es zu einer Bildung von Poren führt. Die Bindung erfolgt dabei an Phospholipiden der Innenseite zellulärer Membranen. Durch diesen Mechanismus wird ein etwaiger Tod umgebender Zellen infolge der Freisetzung des Enzyms verhindert (Liu et al., 2016). Für die Freisetzung von IL-1 $\beta$  hat Gasdermin eine ebenso wichtige Bedeutung. So konnte gezeigt werden, dass GasderminD $-/-$  „bone-marrow-derived macrophages“ zwar in der Lage sind IL-1 $\beta$  zu produzieren, nicht jedoch dieses zu sekretieren (Shi et al., 2015).

### 1.3.2 Die Bedeutung des NLRP3-Inflammasoms bei verschiedenen Erkrankungen

Eine maßgebliche Beteiligung des NLRP3-Inflammasoms ließ sich bereits im Rahmen zahlreicher Erkrankungen nachweisen. Einen bekanntlich positiven Effekt weist die Aktivierung des Enzymkomplexes dabei in der Abwehr von bakteriellen, parasitären, mykotischen oder viralen Infektionen auf. Andererseits haben sich Mutationen des NLRP3-Inflammasoms verantwortlich gezeigt eine erhöhte Aktivität des Enzyms und damit das Auftreten von sogenannten „Cryopyrin-associated periodic syndromes“ (CAPS) nach sich zu ziehen. Unter die CAPS fallen dabei bspw. das Muckle-Wells Syndrom, das familiäre kälteinduzierte autoinflammatorische Syndrom oder das chronisch-infantile neuro-kutaneo-artikuläre Syndrom, welche sich durch rezidivierendes Fieber, urtikarielle Hautausschläge, Gelenk- und Augenbeschwerden, Amyloidose oder aber auch schwere neurologische Symptome auszeichnen (Menu und Vince, 2011). Auch bei anderen Autoimmunerkrankungen scheint das NLRP3-Inflammasom eine Rolle zu spielen. Im Rahmen des systemischen Lupus erythematodes zeigten sich so bspw. erhöhte Level zirkulierenden IL-1 $\beta$  (McCarthy et

al., 2014). In einer weiteren Studie konnte darüber hinaus eine Verbesserung des klinischen Bildes und serologischer Parameter durch Inhibition des zugehörigen Rezeptors mittels Anakinra gezeigt werden (Ostendorf et al., 2005).

Doch nicht nur bei Erkrankungen bei denen Inflammation offenkundig die ausschlaggebende Rolle spielt, ließ sich die Involvierung des Inflammasoms offenlegen. Auch bei Gicht, Diabetes Mellitus Typ II oder Morbus Alzheimer besitzt das NLRP3-Inflammasom eine essentielle Rolle (Heneka et al., 2013; Menu und Vince, 2011). Bei diesen Erkrankungen kommt es durch die Anhäufung von Mediatoren wie Mononatriumurat, gesättigten Fettsäuren oder Amyloid beta Peptiden zu einer Aktivierung des Enzymkomplexes im Sinne einer sterilen Inflammation (Chen und Nuñez, 2010; Menu und Vince, 2011). Eine solche sterile Inflammation zeigt sich ebenfalls im Rahmen der Atherosklerose (Chen und Nuñez, 2010).

### 1.3.3 Die Bedeutung des NLRP3-Inflammasoms für die Atherosklerose

Die Atherosklerose und ihre Folgeerkrankungen sind charakterisiert durch das Auftreten und die Akkumulation proinflammatorischer Mediatoren wie oxidiertem LDL, Cholesterin, freier Fettsäuren oder Adenosintriphosphat (ATP) (Ferrari et al., 2015; Lopaschuk et al., 1994; Small, 1988; Toshima et al., 2000). Es konnte gezeigt werden, dass neben diesen Substanzen zahlreiche weitere für kardiovaskuläre Erkrankungen typische Einflussfaktoren, wie Scherstress oder Ischämie NFκB bzw. das NLRP3-Inflammasom aktivieren können (Duewell et al., 2010; Gabriel et al., 1999; Lan et al., 1994; Liu et al., 2014; Perregaux D, 1994; Wen et al., 2011).

Es stellt sich also gezwungenermaßen die Frage, welche Rolle das NLRP3-Inflammasoms in der Entstehung und Progression der Atherosklerose einnimmt.

Untersuchungen zur Expression von NLRP3 konnten darstellen, dass Patienten mit Atherosklerose eine vermehrte Expression des NLRP3-Inflammasoms aufweisen. Es zeigte sich hierbei eine positive Korrelation zur Schwere der KHK und dem Vorhandensein atherosklerotischer Risikofaktoren (Zheng et al., 2013). Korrespondierend zu diesen Beobachtungen konnten anhand von Endarteriektomie-Präparaten von Plaques der Arteria Carotis erhöhte Expressionen von Bestandteilen bzw. Endprodukten des NLRP3-

Inflammasoms offengelegt werden (Varghese et al., 2016). Ebenso konnte der Nachweis eines erhöhten Vorkommens von IL-1 $\beta$ -Protein in atherosklerotisch veränderten Koronararterien erbracht werden (Galea et al., 1996).

Im Rahmen der Atherosklerose trägt das NLRP3-Inflammasom auf vielfältige Weise zur Krankheitsprogression bei.

Ein wichtiger Mechanismus der Atherogenese ist wie beschrieben die Ablagerung von Lipiden und die damit einhergehende Entstehung von Schaumzellen. Erst vor Kurzem konnte diesbezüglich die Beobachtung gemacht werden, dass eine Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms in Makrophagen zu einer Steigerung ihrer Empfänglichkeit zur Ablagerung von Lipiden und ihrer Fähigkeit zu migrieren führt. Dies könnte so potentiell die Entstehung von Schaumzellen akzelerieren (Li et al., 2014). Auch auf die Exposition zellulärer Adhäsionsmoleküle auf der Oberfläche vaskulärer Zellen ließ sich ein fördernder Einfluss des Inflammasoms feststellen. Es zeigte sich nämlich, dass Stimulation von glatten Muskelzellen mit IL-1 $\beta$  zu einer vermehrten Expression von VCAM-1 und ICAM-1 führen konnte. Dies wiederum führte zu einer Steigerung ihrer Kapazität zur Adhäsion von Monozyten und Neutrophilen (Wang et al., 1995).

Auch ein Einfluss des Inflammasoms auf die Kalzifizierung glatter Muskelzellen ließ sich darstellen. So konnte nämlich durch NLRP3-Ribonukleinsäure (RNA)-Interferenz die Verkalkung der Zellen *in vitro* verhindert werden (Wen et al., 2013).

Umso interessanter stellt sich folglich also dar, dass auch *in vivo* durch die Hemmung des NLRP3-Inflammasoms die atherosklerotische Plaquebildung von Mäusen reduziert werden konnte. In einer Studie von Zheng et al. (2014) wurden Untersuchungen zur Entwicklung von Atherosklerose an ApoE-defizienten Mäusen durchgeführt, an denen mithilfe von Lentiviren ein „Gene-Silencing“ (RNA-Interferenz) von NLRP3 durchgeführt wurde. Hierbei zeigte sich eine Reduktion der Plaque-Entstehung und der Produktion von IL-1 $\beta$  und IL-18, sowie ein verringertes Vorkommen von Makrophagen und Lipiden in der atherosklerotischen Läsion, bei erhöhtem Anteil glatter Muskelzellen.

Korrespondierend zu diesen Erkenntnissen konnte in einer Studie von Kirii et al. (2003) mithilfe von IL-1 $\beta$ -defizienten ApoE $^{-/-}$ /IL-1 $\beta$  $^{-/-}$  -Mäusen eine Reduktion der atherosklerotischen Läsionen um 33 % im Bereich der Aortenklappen offengelegt werden.

## 1.4 Mikropartikel

### 1.4.1 Einführung

Ein weiterer Mediator der im vergangenen Jahrzehnt die Schlagzeilen wissenschaftlicher Journale jeglicher Fachrichtungen geprägt hat sind „Microparticles“ (MP) (Mooberry und Key, 2016; Hargett und Bauer, 2013). Definiert sind MP als Vesikel einer Größe von 100-1000 nm, welche von der Zellmembran eukaryotischer Zellen infolge eines spezifischen Stimulus oder des Auftretens der Apoptose absprießen. Sie besitzen eine intakte Phospholipidmembran in deren Außenseite sie Phosphatidylserin sowie Antigene, spezifisch zu ihren Elternzellen, darbieten (Mooberry und Key, 2016). MP zeichnen sich durch ein ubiquitäres Vorkommen aus (Cocucci und Meldolesi, 2015).

Eine Freisetzung von MP erfolgt als Reaktion auf eine Vielfalt biochemischer Prozesse. Darunter zählen neben Differenzierung, Seneszenz oder Apoptose der Zelle ebenso externe Einflüsse wie prothrombotische oder proinflammatorische Stimuli (Mause und Weber, 2010).

Die Lipidkomposition der intakten, zellulären Membran ist im Regelfall asymmetrisch und wird durch die Einwirkung von Flippasen und Floppasen reguliert. Dabei zeigt sich in der äußeren Schicht der Doppelmembran ein vermehrtes Vorkommen von Phosphatidylcholin und Sphingomyelin, während in der inneren Schicht vor allen Dingen Phosphatidylserin und Phosphatidylethanolamin zu finden sind (Morel et al., 2011).

Im Rahmen der vorgenannten aktivierenden zellulären Prozesse kann es zu einer Reorganisation der Membran mit einer Translokation von Phosphatidylserin in die äußere Membran kommen, ein Vorgang, der durch Kalzium-abhängige Inhibition der Aminophospholipid-Translokase und Aktivierung von Floppasen und Scramblasen vermittelt wird. Simultan zu diesen Vorgängen kommt es weiterhin zu einer Aktivierung der Kalzium-abhängigen Enzyme Calpain und Gelsolin. Diese bewirken eine Ablösung membranverankerter Proteine vom Zytoskelett und gestatten damit eine Absprossung der Vesikel (Mause und Weber, 2010).

Ihre Funktion als Signaltransduktionmechanismus erfüllen die MP dabei durch den Transfer ihrer Inhaltsstoffe wie Zytokinen, Chemokinen, Enzymen, „messenger RNA“ (mRNA) oder microRNA, sowie durch die Übertragung membranverankerter Moleküle. Die MP sind dabei keinesfalls als simples Abbild der elterlichen Zelle zu verstehen.

Vielmehr sind sie Produkt eines selektiven Zusammenbaus, der sich abhängig zeigt vom spezifischen Stimulus ihrer Freisetzung und der Mikroumgebung ihrer Ursprungszelle (Mause und Weber, 2010).

Wichtig ist es unter den extrazellulären Vesikeln MP von Apoptosekörperchen und Exosomen zu differenzieren. Eine gewisse Ähnlichkeit zu MP lässt sich bei den Apoptosekörperchen finden. Apoptosekörperchen werden im Rahmen des programmierten Zelltodes von den sterbenden Zellen freigesetzt und zeichnen sich durch einen Durchmesser von 50-5000 nm aus. Ihre Oberfläche weist innerhalb der äußeren Schicht der Doppelmembran eine erhöhte Konzentration von Phosphatidylserin auf (Kalra et al., 2012). Eine Abgrenzung zu MP lässt sich hierbei jedoch durch die Detektierbarkeit von Organellen, fragmentierter genomischer DNA, Histonen, Thrombospondin oder des Komplementfaktors C3b vornehmen. Charakteristische Marker der MP sind im Gegensatz dazu Annexin V, Integrine, Glykoprotein 1b, P-Selektin oder VCAMP3 (Jaiswal und Sedger, 2019).

Ein grundsätzlicher Unterschied zu den vorgenannten Vesikeltypen findet sich bei Exosomen bereits in ihrer Formierung. Die 40-100 nm im Durchmesser messenden Exosomen lagern in „Multivesicular bodies“ vor, welche durch die Einwärtssprossung kleiner Membranbereiche später Endosomen entstehen und schließlich durch Exozytose freigegeben werden (Kalra et al., 2012; Cocucci und Meldolesi, 2015). Charakteristische Marker sind Alix, Rab, CD63, „Tumor susceptibility gene 101“ (TSG 101) (Jaiswal und Sedger, 2019).

MP können sowohl aus Zellkultur-Medium als auch aus Patientenproben wie Blut, Liquor oder Speichel gewonnen werden (Szatanek et al., 2015). Methodisch hat sich zu ihrer Isolation seit langem die differentielle Zentrifugation bewährt, bei der man mithilfe sequenzieller Zentrifugation eine Sedimentation der verschiedenen Bestandteile erzielt. Die Auftrennung erfolgt dabei beruhend auf der Größe und Dichte der Partikel (Livshits et al., 2015). Durch den Einsatz dieser Methodik ist ebenfalls möglich zwischen den zuvor benannten Vesikel-Populationen zu differenzieren (Jaiswal und Sedger, 2019).

Zur letztlichen Identifikation und Charakterisierung der MP haben sich bisher mehrere Methoden etabliert. Dazu zählen neben der Durchflusszytometrie und Western Blots die Transmissionselektronenmikroskopie, welche eine simultane Bestimmung der Größe und Morphologie der MP erlaubt (Crescitelli et al., 2013).

#### 1.4.2 Die Rolle der Mikropartikel in der Atherosklerose

Seit der Entdeckung der MP im Jahre 1967 durch Peter Wolf ist das Verständnis bezüglich ihres Beitrages zu Homöostase aber auch Pathogenese stetig gewachsen. Erhöhte Zahlen zirkulierender MP lassen sich dabei gerade im Rahmen von Erkrankungen mit erhöhtem thrombembolischen Risiko oder vaskulärer Schädigung, so auch der Atherosklerose, vorfinden (Diamant et al., 2004).

Ein Zusammenhang zwischen kardiovaskulären Risikofaktoren, Lebensstilfaktoren und MP ließ sich bereits in zahlreichen Studien demonstrieren.

Bei sowohl gesunden Rauchern, als auch bei Rauchern mit bei beginnender Lungenschädigung reduzierter Diffusionskapazität zeigen sich so bspw. erhöhte Konzentrationen von „Endothelial microparticles“ (EMP) apoptotischer Herkunft (Gordon et al., 2011). Es stellte sich darüber hinaus eine durch EMP beeinträchtigte Efferozytose apoptotischer Zellen durch Monozyten dar (Serban et al., 2016).

Ein weiterer Risikofaktor der einer umfassender Untersuchung unterzogen wurde, ist die Adipositas. Hier konnte nicht nur in Untersuchungen an adipösen Individuen erhöhte Level von MP detektiert werden, sondern auch bereits bei jungen, normalgewichtigen Männer nach Einnahme zwei aufeinanderfolgender fettreicher Mahlzeiten erhöhte Konzentrationen zirkulierender MP offengelegt werden (Goichot et al., 2006; Tushuizen et al., 2006).

Als weiterer krankheitsfördernder Faktor stellt sich der Diabetes Mellitus Typ I und II dar. Ein Unterschied lässt sich hierbei in der Zusammensetzung der MP und in ihrer prokoagulatorischen Aktivität finden. So zeigen Typ I-Diabetes-Patienten eine signifikant erhöhte Zahl gesamter, thrombozytärer und endothelialer MP mit prokoagulatorischer Aktivität, wobei Typ II-Diabetes Patienten hingegen nur eine erhöhte Gesamtzahl von MP ohne erhöhte Gerinnungsaktivität vorweisen konnten (Sabatier et al., 2002). Durch Untersuchungen betreffend arterieller Hypertonie konnte ebenfalls ein Einfluss erhöhter Blutdrücke auf die Freisetzung von endothelialen und thrombozytären MP offengelegt werden (Preston et al., 2003).

Doch nicht nur bei vorgenannten Risikofaktoren ist eine Beteiligung von MP evident. Auch in der Endstrecke kardiovaskulärer Erkrankungen wie dem akuten Koronarsyndrom (AKS), Schlaganfall oder der peripheren arteriellen Verschlusskrankheit (pAVK) zeigten

sich erhöhte Zahlen zirkulierender MP (Mallat et al., 2000; Simak et al., 2006; Stępień et al., 2012; Tan et al., 2009).

Ein grundlegender Mechanismus dieser pathologischen Prozesse liegt in den prothrombotischen Eigenschaften von MP. Bei Patienten mit AKS konnte mithilfe von Prothrombinase Assays eine erhöhte prokoagulatorische Aktivität von MP detektiert werden (Mallat et al., 2000). Gleichmaßen konnten Untersuchungen am Plasma und an Karotis-Endarteriektomiepräparaten von 26 Patienten beleuchten, dass jeweils in Blut als auch im atherosklerotischen Plaque „Tissue factor“ (TF)-präsentierende MP mit Thrombin-generierenden Eigenschaft vorzufinden sind. Im Plaque war dabei korrelierend zur Distribution der verschiedenen MP-Klassen eine zweifach erhöhte Gerinnungsaktivität zu messen (Leroyer et al., 2007). Weiterhin konnte dargestellt werden, dass leukozytäre MP selber in der Lage sind TF-Expression auf Endothelzellen in einem c-Jun N-terminal kinase 1 (JNK-1)-abhängigen Mechanismus zu induzieren. Simultan wurde dabei als inflammatorische Reaktion die Freisetzung der Zytokine Interleukin-6 (IL-6) und der MCP-1 stimuliert (Mesri und Altieri, 1999). Darüber hinaus stellen sich MP als Auslöser endothelialer Dysfunktion dar. MP von Patienten mit Myokardinfarkt inhibierten so die Fähigkeit zur Relaxation von murinen Aortenpräparaten durch Störung des endothelialen NO-Signaltransduktionsweges (Boulanger et al., 2001). Grundlage hierfür liegt möglicherweise in der Fähigkeit von MP die Produktion von Superoxiden durch Übertragung von Nicotinamidadenindinukleotidphosphat (NADPH)-Oxidasen zu induzieren (Brodsky et al., 2004).

Doch auch auf inflammatorische Prozesse haben MP damit einen Einfluss. So führte die Injektion von NADPH-haltigen EMP, gewonnen unter hyperglykämischen Konditionen, in Plaques von Mäuseaorten zu einer vermehrten Infiltration durch Makrophagen sowie eine verstärkte Expression von VCAM-1 und ICAM-1 (Jansen et al., 2013a).

Da erhöhte Zahlen zirkulierender MP zur Entstehung und Progression kardiovaskulärer Erkrankungen beitragen, stellt sich folglich die Frage, wie sich der Einsatz etablierter Therapieoptionen auf die Freisetzung bzw. Zusammensetzung von MP auswirkt.

Zur Prüfung dieses Sachverhaltes wurden die Effekte von Statinen untersucht. Hierbei zeigte sich, dass eine lipidreduzierende, primär-präventionelle Therapie an hypercholesterinämischen Patienten sowohl die Zahl zirkulierender MP, als auch das

Vorkommen oberflächlicher, prothrombotischer ( $\alpha_{IIb}\beta_3$ -Integrin) und proinflammatorischer ( $\alpha_M$ -Integrin) Marker reduzieren konnte (Suades et al., 2017). Korrespondierend dazu ließ sich bei Diabetes mellitus Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz des Grades 3-4 erhöhte Zahlen von „Platelet-derived microparticles“ (PMP), Monocytic microparticles (MMP) und EMP detektieren, welche infolge einer Therapie mit Simvastatin verringert werden konnten. Eine damit einhergehende Reduktion von TF, CD40L, P-Selektin kann dabei möglicherweise proinflammatorische und prothrombotische Effekte der MP mindern (Almquist et al., 2016).

Gleichermaßen wurden Untersuchungen bezüglich des Einflusses antihypertensiver Therapien angestellt. Dabei ließ sich nicht nur im Tierversuch eine Reduktion von MP nach Behandlung mit Aliskiren, Nebivolol oder Olmesartan detektieren (Jain et al., 2017), ebenso konnte bei Untersuchungen am Blut von Patienten mit Hypertonie unter Therapie mit Eprosartan eine Reduktion von PMP offengelegt werden (Labiós et al., 2004). Auch eine duale Plättchenhemmung mittels Acetylsalicylsäure (ASS) und Clopidogrel konnte im Rahmen der PLUTO-CHF-Studie (Plavix Use for Treatment Of Congestive Heart Failure) eine Reduktion zirkulierender MP erzielen, während bei Untersuchungen an Patienten mit KHK bereits ASS aber nicht Etoricoxib eine Reduktion zirkulierender EMP und PMP bewirken konnte (Bulut et al., 2011; Serebruany et al., 2003).

#### 1.4.3 Die therapeutische Anwendung von Mikropartikeln

Nicht zu verschweigen ist jedoch, dass auch den MP ein Potential zur therapeutischen Anwendung innewohnt. Ein Ansatz ist dabei der Einsatz synthetischer MP.

Erfolgreich appliziert wurde dieses Konzept bspw. erst vor Kurzem in einem Maus-Modell-Versuch zum Einsatz von „synthetic cell-mimicking microparticles“ (CMMP) bei Myokardinfarkt. Im Rahmen der Studie wurden künstliche MP mit stammzellähnlichen Inhaltsstoffen und Membraneigenschaften erzeugt. Nach intramyokardialer Injektion zeigte sich ein erfolgreicher Erhalt lebensfähigen Myokards und eine Steigerung der kardialen Funktion ähnlich einer Stammzelltherapie. Grundlegend ist bei diesen Versuchen die Überlegung durch Verzicht auf Stammzellen immunogene sowie tumorogene Risiken zu vermeiden (Tang et al., 2017). Doch nicht nur synthetische MP

zeigen ein großes Potential für eine künftige klinische Anwendung. Auch körpereigene MP zeigen sich als vielversprechend nach etwaiger Modifikation therapeutisch eingesetzt zu werden.

Ein Beispiel für die Anwendung dieses Konzeptes ließ sich hierbei im Einsatz von „Tumour cell-derived drug-encapsulating MP“ zeigen, welche zur Verabreichung von Chemotherapeutika mit Erfolg eingesetzt werden konnten. Die jeweiligen MP wurden hierbei jeweils aus murinen Leberkarzinom-Zellen Linie H22 und humanen Ovar-Karzinom-Zellen Linie A2780 durch Behandlung mit Methotrexat, Camptothecin oder Cisplatin und anschließender Bestrahlung mit ultraviolettem Licht gewonnen. Anschließend erfolgte eine intraperitoneale Injektion der MP bei Mäusen mit korrespondierenden Tumoren. Bemerkenswerterweise blieben therapietypische Nebenwirkungen aus, während Tumorzellen effektiv abgetötet werden konnten (Tang et al., 2012).

## 1.5 Ziel der Arbeit

Inflammation ist ein grundlegender Mechanismus der Pathogenese sämtlicher kardiovaskulärer Erkrankungen. Nichtsdestotrotz ist der Mangel an anti-inflammatorischen Therapieansätzen bezeichnend für den rudimentären Stand der aktuellen Forschung.

Entgegen des zunehmenden Wissens um die elementare Rolle des NLRP3-Inflammasoms und der MP in der Atherogenese, ist die Lücke um das Wissen zwischen vermehrter Inflammasomaktivierung, der Freisetzung von MP und ihrer Effekte eine solche, die es noch zu schließen gilt.

Eine Spezies von MP die sich bei Patienten mit kardiovaskulären Risikofaktoren oder Erkrankungen regelhaft als erhöht darstellen, sind EMP (Mikirova, 2011; Diamant et al., 2004). Es konnte sich bereits zeigen, dass EMP nicht nur als unabhängiger Prädiktor für das Auftreten kardiovaskulärer Ereignisse bei Patienten mit stabiler KHK dienen können, sondern auch dazu nützlich sein können, für kardiovaskuläre Erkrankungen vulnerable Patienten zu identifizieren (Nozaki et al., 2009; Sinning et al., 2011).

In Voruntersuchungen zu der vorliegenden Forschungsarbeit wurde durch Dr. Philipp Pfeifer und Sophia Katharina Ebert bereits die Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms in Endothelzellen und die daraufhin stattfindende Sekretion von MP beleuchtet. Es konnte hier gezeigt werden, dass Endothelzellen infolge einer Aktivierung des Inflammasoms Caspase-1-haltige Mikropartikel freisetzen, welche nach Aufnahme in Endothelzellen eine Reduktion der Lebensfähigkeit selbiger Zellen bewirken.

Ziel der vorliegenden Forschungsarbeit ist es nun, die Effekte und zugrundeliegenden molekularen Wirkmechanismen von MP, freigesetzt von Inflammasom-aktivierten Endothelzellen, weiter offenzulegen. Zentraler Gegenstand der Untersuchung ist dabei der Einfluss der EMP auf vaskuläre Zellen, HASMC (human coronary artery smooth muscle cells) und HCAEC (human coronary artery endothelial cells). Das vordringliche Bestreben dieser Arbeit ist es, die molekularbiologischen Interaktionsmechanismen genauer zu beleuchten, um somit einen Beitrag zur Erschaffung neuer therapeutischer Möglichkeiten zur Behandlung und Prävention der Atherosklerose zu leisten.

Wesentliche Punkte, die dazu bearbeitet werden sollten, umfassten:

- 1) Aufklärung der biologischen Effekte der MP Inflammasom-aktivierter HCAEC.
- 2) Nachweis der Inflammasomaktivierung bei HCASMC und HCAEC, die mithilfe von MP Inflammasom-aktivierter HCAEC stimuliert worden sind.
- 3) Eruiierung der Mechanismen, durch welche MP Inflammasom-aktivierter Endothelzellen die biologischen Effekte von Zielzellen beeinflussen.
- 4) Prüfung des Vorliegens einer zu HCAEC kongruenten Freisetzung von MP durch Inflammasom-aktivierte HCASMC

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Zellkultur

#### 2.1.1 Zellarten

- HCAEC (PromoCell GmbH, Heidelberg, Deutschland)
- HCASMC (PromoCell; Provitro, provitro AG, Berlin, Deutschland)

#### 2.1.2 Zellmedien

- Endothelial Cell Growth Medium MV (PromoCell)
- Growth Medium MV SupplementMix (PromoCell)
- Smooth Muscle Cell Growth Medium 2 (PromoCell)
- Growth Medium 2 SupplementMix (PromoCell)
- Smooth muscle cell growth medium, basal (Provitro)
- Smooth muscle cell growth Supplement-Mix, FCS (Provitro)
- Antibiotics (Provitro)
- DetachKit (PromoCell)
- HEPES Buffered Saline Solution (PromoCell)
- Trypsin / EDTA 0.04 % / 0.03 % (PromoCell)
- Trypsin-EDTA (0.05 %), phenol red (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA)

### 2.2 Chemikalien/Reagenzien

- Lipopolysaccharides from Escherichia coli O55:B5 (Sigma Aldrich, St. Louis, USA)
- Nigericin sodium salt (Sigma Aldrich)
- gibco™ PBS (10 X), pH 7.4 (Thermo Fisher Scientific)
- gibco™ DBPS (1 X) (Thermo Fisher Scientific)
- Fibronectin
- DMSO (AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland)

- Invitrogen™ UltraPure™ DNase/RNase-Free Distilled Water (Thermo Fisher Scientific)
- VECTASHIELD® Antifade Mounting Medium with DAPI (Vector Laboratories, Burlingame, USA)
- Diluent C for General Membrane Labeling (Sigma Aldrich)
- PKH26 Red Fluorescent Cell Linker Kit for General Cell Membrane Labeling (Sigma Aldrich)
- PKH67 Green Fluorescent Cell Linker Kit for General Cell Membrane Labeling (Sigma Aldrich)
- Omniscript RT Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland)
- Primer "random" p(dN)<sub>6</sub> (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland)
- Applied Biosystems™ TaqMan™ Gene Expression Master Mix (Thermo Fisher Scientific)
- RNasin® Ribonuclease Inhibitors (Promega, Madison, USA)
- dNTP-Mix (Qiagen)
- Human IL-1 beta/IL-1F2 DuoSet ELISA (R&D Systems, Inc., Minneapolis, USA)
- Substrate Reagent Pack (R&D Systems, Inc.)
- CellTiter-Blue® Cell Viability Assay (Promega)
- MultiTox-Fluor Multiplex Cytotoxicity Assay (Promega)
- AnnexinV (BD Biosciences, Franklin Lakes, USA)
- AnnexinV Binding Buffer (BD Biosciences)
- Ethanol, ROTIPURAN® ≥99,8 %, p.a (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland)
- Schwefelsäure, 1 mol/l - 2 N Maßlösung (Carl Roth GmbH + CO. KG)
- TWEEN® 20 (Sigma Aldrich)
- BSA Fraction V USA origin (PAA Cell Culture Company, Cambridge, UK)

### 2.3 Gensonden

Alle im Rahmen dieser Arbeit genutzten Gensonden sind aufgeführt im Kapitel Methoden, Sektion 2.12.1.4 Real-time quantitative PCR.

## 2.4 Verbrauchsmaterialien

- Adhesive Clear PCR Seal (Biozym, Oldendorf, Deutschland)
- BD Trucount™ Tubes (BD Biosciences)
- CELLSTAR® Polypropylen Röhrchen, 15ml und 50ml (Greiner bio-one,
- CryoPure Gefäß 1,6ml (SARSTEDT AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland)
- Deckgläser 18x18mm (Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen, Deutschland)
- Eppendorf Tubes/Safe-Lock-Tubes 1,5ml, 2ml, 5ml (Eppendorf, Hamburg, Deutschland)
- Objektträger geschnitten, mattrand, 76x26mm (Engelbrecht Medizin- und Labortechnik GmbH, Edermünde, Deutschland)
- Nitril® BestGen®-Schutzhandschuhe (Meditrade, Kiefersfelden, Deutschland)
- Nunc™ F96 MicroWell™ Polystyrolplate (Thermo Fisher Scientific)
- Pipettenspitzen, verschiedene Größen in µl (Nerbe Plus, Winsen/Luhe, Deutschland)
- Pipette, 10ml (Greiner Bio-One, Solingen, Deutschland)
- PCR 96-Well TW-MT-Platte (Biozym)
- RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland)
- Spezialvernichtungsbeutel/Autoklavierbeutel (Nerbe Plus)
- Sterile Syringe Filter w/ 0,2µm Polyethersulfone membrane (VWR Internation, Radnor, USA)
- Stripette, 5ml und 25ml (Corning Incorporated, New York, USA)
- Zellkulturflaschen, 25cm<sup>2</sup> bzw. 75cm<sup>2</sup> Wachstumsoberfläche (TPP, Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Schweiz)
- Zellkulturschale, 60,1cm<sup>2</sup> Wachstumsoberfläche (TPP)
- Zellkulturtestplatten, 6 Well-, 12 Well- und 24 Well-Format (TPP)
- Zellschaber (SARSTEDT AG & Co. KG)

## 2.5 Pufferlösungen/angesetzte Reagenzien

HCL 37%

10M NaOH4% PFAWash Buffer

- 0.05% Tween® 20 in PBS
- pH 7.4

Reagent Diluent

- 1% BSA in PBS
- pH 7.4
- filtriert (0,2µm)

## 2.6 Geräte

**Tab. 2:** Laborgeräte

Gerät	Modell	Hersteller
Brutschrank	Steri-Cycle CO <sub>2</sub> -Incubator	Thermo Fisher
Durchflusszytometer	BD FACSCalibur Flow Cytometer	BD Biosciences
Heiz-/ Magnetrührplatte	ARE Aluminum Hot Plate Stirrer	Velp Scientifica
Kühl- und Gefrierschränke		Liebherr Thermo Fisher Siemens Bosch
Mikroplattenleser	Infinite M200	Tecan
Mikroskop	Axiovert 200M Axiovert 40 CFL	Zeiss
Mikroskop-Controller	MAC 5000 Controller	Ludl Electronic products ltd.
Nukleinsäure-Messgerät	NanoDrop™ 2000c	PeqLab
PCR-Cycler	Mastercycler vapo.protect	Eppendorf
pH-Meter	S20 - SevenEasy™ pH	Mettler Toledo
Pipettierhilfen	Research plus 12-ch/30-300µl	Eppendorf
Real-Time PCR System	7500 Fast Real Time PCR System	Applied Biosystems
Sterile Arbeitsbank	MSC-Advantage™ 1.2 Class II Microbial Safety Cabinet	Thermo Fisher
Vortex	2x <sup>3</sup>	Velp Scientifica
Waage		Sartorius
Zentrifugen	Centrifuge 5810R Centrifuge 5430R MiniSpin® plus Labofuge® 400R Megafuge 1.0	Eppendorf  Heraeus

## 2.7 Software

- Axiovision 4.8 software (Carl Zeiss Jena GmbH, Oberkochen, Deutschland)
- ZEN 2.3 software (Carl Zeiss Jena GmbH)
- GraphPad Prism 6.02 (GraphPad Software, San Diego, USA)
- Microsoft Office – Excel (Microsoft, Redmond, USA)
- 7500 Software V2.3 (Thermo Fisher)
- Magellan™ (Männedorf, Schweiz)
- FlowJo (BD)

## 2.8 Zellkultur

### 2.8.1 Zelltypen

#### 2.8.1.1 HCAEC

HCAEC sind primäre humane koronararterielle Endothelzellen, isoliert aus den Gefäßen eines einzelnen Spenders. HCAEC wurden bezogen von PromoCell. Sie wachsen adhärent und sind vom Hersteller auf das Vorkommen folgender Merkmale geprüft:

- vWF (von-Willebrand-Faktor)
- CD31
- Dil-Acetylated Low Density Lipoprotein (Dil-Ac-LDL)- Aufnahme

#### 2.8.1.2 HCASMC

HCASMC sind glatte Muskelzellen der Tunica Media koronararterieller Gefäße und entstammen von einem menschlichen Spender. Sie wurden von Provitro und PromoCell erworben. HCASMC wachsen adhärent. Von PromoCell bezogene HCASMC sind vom Hersteller auf das Vorkommen des folgenden Merkmals geprüft:

- Smooth muscle  $\alpha$ -Actin

### 2.8.2 Zellkulturbedingungen

Sämtliche zellbiologischen Arbeiten wurden unter sterilen Bedingungen unter einer Arbeitsbank durchgeführt. HCAEC und HCASMC wurden unter Standard-Kultur-Bedingungen (Temperatur: 37 °C, Atmosphäre: 5 % CO<sub>2</sub>) in ihrem jeweils zugehörigen Wachstumsmedium mit adäquatem Supplement-Mix kultiviert.

Zunächst wurden die kommerziell erworbenen, kryokonservierten Zellen durch die technischen Laboratoriumsassistentinnen Theresa Schmitz und Anna Flender bis zur Passage vier bzw. fünf subkultiviert. Anschließend wurden die Zellen entweder umgehend

übernommen oder durch die Laboratoriumsassistentinnen kryokonserviert. Zur Expansion der für die Versuche verfügbaren Zellen wurden diese auf Zellkulturschalen weiter subkultiviert.

Für diesen Zweck wurden zunächst die Reagenzien „2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure Balanced Salt Solution“ (HEPES BSS), Trypsin/Ethylendiamintetraacetat (Trypsin/EDTA 0,04 %/ 0,03 %) und „Trypsin Neutralization Solution“ (TNS, 0,05 % Trypsin Inhibitor) für mindestens 30 Minuten bei Raumtemperatur erwärmt. Nachfolgend wurde nun das Medium aspiriert und die Zellen mit drei Milliliter HEPES BSS gewaschen. Nach erneuter Aspiration des HEPES BSS erfolgte anschließend zur Ablösung der adhärennten Monolayer von Zellen die Zugabe von fünf Millilitern Trypsin/EDTA. Die Zellen wurden hierzu für fünf Minuten bei 37 °C inkubiert. In der Folge wurde die Lösung der Zellen unter einem Lichtmikroskop geprüft und ggf. weiterhin anhaftende Zellen durch behutsames Beklopfen der Schale gelöst. Zur Neutralisierung des Trypsins/EDTA wurde nun eine äquivalente Menge TNS hinzugegeben und die Zellen durch den Transfer in ein Zentrifugenröhrchen geerntet. Nachfolgend wurde der Überstand bei 200 g (g-Zahl/Relative Zentrifugalbeschleunigung) für acht Minuten zentrifugiert. Das durch den Zentrifugationsvorgang erhaltene Zellpellet wurde nun im Verhältnis eins zu vier auf neue Zellkulturplatten ausgesät. Bei der Nutzung von HCASMC der Firma Provitro kam statt HEPES BSS „Phosphate Buffered Saline“ (PBS) als Puffer zum Einsatz. Die Ablösung der Zellen erfolgte mithilfe von Trypsin/EDTA (0,05 %), wobei selbiges nachfolgend mit Vollmedium neutralisiert wurde. Alle weiteren Schritte sind in Einklang mit dem zuvor beschriebenen Protokoll. Ein Austausch des Mediums wurde jeden zweiten Tag vorgenommen. Zur Anwendung in Versuchen kamen Zellen der Passage sechs oder sieben bei einer Konfluenz von ca. 80-90%.

### 2.8.3 Kryokonservierung

Zur Kryokonservierung der Zellen wurden diese zunächst nach obenstehendem Protokoll gelöst. Nachfolgend wurden die Zellen bei einer Konzentration von 500.000 Zellen/ml in Einfriermedium (90 % Kulturmedium, 10 % Dimethylsulfoxid (DMSO)) resuspendiert. Dabei diente DMSO gemäß den Erkenntnissen von Lovelock et al. (1959) zum Schutz der Zellen vor einer Schädigung durch den Gefrierprozess. Jeweils ein Milliliter der Zellsuspension wurde in Kryoröhrchen aliquotiert und bei -80 °C gelagert. Zur erneuten Nutzung der Zellen wurden selbige in der Zellkultur durch Benetzung und wiederholtes Pipettieren mit adäquatem Wachstumsmedium zum Auftauen gebracht und in ein Röhrchen überführt. Nach Zentrifugation der Suspension wurde das dabei erhaltene Zellpellet zur Eliminierung von residualem zytotoxischen DMSO (Galvao et al., 2014) mit PBS gewaschen, das Zellpellet in Medium resuspendiert und die Zellen letztlich auf eine neue Kulturplatte überführt.

### 2.9 Stimulation des NLRP3-Inflammasoms

HCAEC bzw. HCASMC wurden zur Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms zunächst mit 1 µg/ml Lipopolysacchariden (LPS) für vier Stunden stimuliert. Anschließend erfolgte die Zugabe von Nigericin mit einer Zielkonzentration von 20 µM für weitere vier Stunden. Das Versuchprotokoll ist angelehnt an die Publikationen von Murakami et al. (2012) und Zhou et al. (2010). Die optimale Stimulationsdauer konnte in Versuchen, die dem Projekt vorangegangen waren, durch Dr. Philipp Pfeifer ermittelt werden. Die morphologischen Veränderungen von HCAEC infolge einer Inflammasomstimulation wurden mittels Lichtmikroskopie unter Anwendung des Zeiss Axiovert 200M-Mikroskops und der AxioVision 4.8 - sowie ZEN 2.3-Software dokumentiert.

## 2.10 Gewinnung und Isolierung von MP

Die Isolation der MP orientierte sich in ihrer Durchführung an den Ausführungen von Jansen et. al. (2013b). Zur Gewinnung von MP wurden HCAEC und HCASMC in Zehnzentimeter-Schalen (ca. 1.000.000 Zellen) entsprechend des vorangehenden Passus stimuliert. Im Anschluss daran wurde der Überstand der aktivierten Zellen gesammelt. Zur Elimination von Zelltrümmern wurde selbiger zunächst bei 1.500 g bei 4 °C für 15 Minuten zentrifugiert. Der dabei entstandene Überstand wurde nun in weitere Reaktionsgefäße übertragen und bei 20.000 g und 4 °C für weitere 40 Minuten zentrifugiert, um ein MP-Pellet zu gewinnen. Zuletzt wurden die isolierten MP mit sterilem PBS gewaschen.

## 2.11 Fluoreszenzmikroskopische Darstellung der Inkorporation von MP in vaskuläre Zellen

### 2.11.1 Vorbereitung

Vorbereitend zu dem Versuch war es notwendig die HCAEC und HCASMC auf eine mit sterilen Glasplättchen versehene 24 Well Platte auszusäen. Da Glasplättchen im Gegensatz zu regulären Zellkultur-Platten keine physikalisch-modifizierte Wachstumsfläche haben, wurden die Glasplättchen mit 200 µl einer 0,5 % Fibronectin-Lösung (verdünnt mit PBS) für 45 Minuten vorbehandelt. Nachfolgend konnten die zu untersuchenden Zellen ausgesät werden.

### 2.11.2 Färbung und Mikroskopie

EMP wurden isoliert und gewaschen, jeglicher Überstand wurde entfernt. Das gewonnene MP-Pellet wurde in 250 µl Diluent C, einer iso-osmotischen Lösung zur Erhöhung der Färbbarkeit, vorsichtig resuspendiert. Nach vollständiger Dispersion erfolgte die Zugabe von 250 µl einer  $6 \times 10^{-6}$  M Lösung PKH26 (Emissionsmaximum 567 nm), einem rot fluoreszierenden Farbstoff, welcher sich aufgrund seiner aliphatischen Eigenschaften in die Lipidmembran von Zellen, oder wie in diesem Fall MP, einbringen

kann. Bei einer finalen Konzentration von  $3 \times 10^{-6}$  M PKH26 wurde die Suspension für fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Um die Färbereaktion zum Stillstand zu bringen wurde nachfolgend ein Milliliter des endothelialen Wachstumsmediums, angereichert mit dem zugehörigen Supplement-Mix, hinzugeben und die MP-Lösung bei 15.000 g und  $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$  für 15 Minuten zentrifugiert. Anschließend wurde das isolierte Pellet mit Wachstumsmedium gewaschen, in selbigem, ohne Zusatz des Supplement-Mixes, resuspendiert und letztlich auf die jeweiligen Zielzellen, HCAEC und HCASMC, gegeben. Im Vorfeld dazu waren die zuvor genannten HCAEC und HCASMC auf Glasplättchen in 24-Well-Platten ausgetragen und mithilfe von  $2 \times 10^{-6}$  M PKH67 (Emissionsmaximum 502 nm), einem grün-fluoreszierenden Membranfarbstoff, für zehn Minuten bei Raumtemperatur gefärbt worden. Die markierten Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen und in dem jeweiligen Medium ohne Supplement-Mix kultiviert. HCAEC und HCASMC wurden mit den gefärbten EMP für jeweils zwei, vier oder sechs Stunden behandelt. Zum finalen Zeitpunkt wurde das Medium aus den Wells abgenommen, die Zellen einmal mit PBS gewaschen und anschließend mit  $300 \text{ }\mu\text{l}$  4 % Paraformaldehyd (PFA) zur Fixierung der Zellen für zehn Minuten bei  $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Im Folgenden wurde das PFA abgenommen, die Zellen erneut mit PBS gewaschen und die mit Zellen bewachsenen Deckgläser zur Anfärbung der Zellkerne auf mit 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI, Emissionsmaximum 460 nm) -versehene Objektträger transferiert. Aufnahmen wurden mithilfe konfokaler Fluoreszenzmikroskopie unter Nutzung des Zeiss Axiovert 200M-Mikroskops und der AxioVision 4.8 - sowie ZEN 2.3-Software angefertigt. Darüber hinaus wurden nach sechsstündiger Behandlung der HCASMC und HCAEC Z-Stapel-Bilder mit einer axialen Stapelhöhe von jeweils  $170 \text{ }\mu\text{m}$  über 72 Schnittbilder (HCASMC) bzw. 86 Schnittbilder (HCAEC) erstellt.

## 2.12 Nachweis der Inflammasomaktivierung durch EMP

Zur Evaluation einer etwaigen Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms durch EMP wurden HCAEC und HCASMC für vier bzw. acht Stunden mit MP stimuliert und nachfolgend „Real-time detection polymerase chain reaction“ (RTD-PCR)- und „Enzyme linked immunosorbent assay“ (ELISA)-Experimente durchgeführt.

### 2.12.1 RTD-PCR

Die RTD-PCR ist eine Methode zur Quantifizierung von Gen-Kopien unter Zuhilfenahme von Echtzeitmessungen. Im Gegensatz zu früher etablierten Methoden zur Bestimmung der Genexpression bietet die RT-PCR den Vorteil eines geschlossenen Reaktionssystems und einer zur Amplifikation simultan ablaufenden Messung. Damit sind die Proben einem geringeren Risiko der Kontamination ausgesetzt. Die Messung selber erfolgt während der logarithmischen Phase der Genamplifikation, welche anhand der Intensität eines Fluoreszenzsignals ermittelt wird. Grundlage ist hierbei der Einsatz einer zweifach-markierten, fluoreszierenden, nicht verlängerbaren Hybridisierungssonde, wobei einer der Farbstoffe als sogenannter Reporter und der andere als Quencher fungiert. Aufgrund der 5'-Nuklease-Aktivität der Taq-Polymerase kommt es bei der Degradation der Probe zur Emission eines Fluoreszenzsignals, welches sich quantifizieren lässt (Heid et al., 1996).

#### 2.12.1.1 RNA-Isolierung

Vorbereitend zur quantifizierenden Bestimmung eines Genproduktes mithilfe einer RTD-PCR ist die Aufreinigung der zu untersuchenden RNA-Proben notwendig. Zur Isolation der RNA aus dem Probenmaterial wurde als Silikat-Membran-basierte Prozedur das RNeasy mini kit eingesetzt.

Zunächst wurden die zu untersuchenden Zellen durch die Zugabe von 350 µl RLT-Buffer lysiert. Es handelt sich hierbei um eine einer Guanidin-Isothiocyanat-basierte Substanz, welche die Bindung an die Silikat-Gel-basierte Membran der Mikrotubes unterstützt. Zur Homogenisierung des Lysats wurde selbiges nachfolgend fünfmalig auf- und abpipettiert. Anschließend wurde ein äquivalentes Volumen von 70 % Ethanol hinzugefügt und das Lysat durch erneutes Pipettieren gemischt. Nachfolgend wurden 700 µl der Probe in je eine *RNeasy spin column*, platziert innerhalb einer 2 ml *Collection tube*, transferiert, welche nun für 15 Sekunden bei 8000 g zentrifugiert wurden. Der Durchfluss konnte anschließend verworfen werden.

Im Folgeschritt wurde eine Waschung der Silika-Membran der *RNeasy spin column* mithilfe 700 µl RW1 Buffer vorgenommen, wobei im Gegensatz zu RNA andere, nichtspezifisch gebundenen Substanzen, wie Proteine, Kohlenhydrate oder Fettsäure, ausgelöst und ausgeschwemmt wurden. Es erfolgte ein erneuter Zentrifugationsschritt für 15 Sekunden bei 8000 g. Der Durchfluss konnte erneut beseitigt werden.

Zusätzlich fand nun ein weiterer Waschschrift statt. Hierbei wurden 500 µl eines mit Ethanol angereicherten RPE-Buffer, der ebenfalls als Waschpuffer fungiert, hinzugefügt, erneut für 15 Sekunden bei 8000 g zentrifugiert und der Überstand entsorgt.

Es erfolgte danach eine Wiederholung dieses Waschschriftes. Hierbei wurde die Dauer der Zentrifugation auf zwei Minuten verlängert, um eine Trocknung der Silikat-Membran und eine Eliminierung von residualem Ethanol zu gewährleisten.

Zuletzt wurde die *RNeasy spin column* in einer neuen *Collection-tube* platziert. Zur Auslösung der RNA aus der Membran wurden 30 µl RNase freies Wasser auf die Membran gegeben und für eine Minute bei 8000 g zentrifugiert. Das RNA-Eluat wurde bei -80 °C gelagert.

#### 2.12.1.2 Konzentrationsbestimmung der RNA

Zur Bestimmung der RNA-Konzentration wurde ein Nanodrop Spektrophotometer 2000c eingesetzt.

Es wurden jeweils ein Mikroliter der zu untersuchenden Proben auf dem dafür vorgesehen Messsockel aufgetragen, und basierend auf der Absorption bei 260 nm spektrophotometrisch die Konzentration der RNA-Probe bestimmt. Aufschluss über den Grad der Reinheit der RNA gab der 260 nm/ 280 nm Quotient, wobei ein Quotient von zwei indizierend für einen hohen Reinheitsgrad der RNA war. Dementsprechend ließen sich ausgehend von einer Abweichung dieses Wertes Rückschlüsse auf eine potentielle Protein-Kontamination der Probe ziehen.

Bei der Messung der Proben diente als initial aufgetragene Blindprobe zwei Milliliter des als Lösungsmittel verwendeten RNase freien Wassers. Die zu untersuchenden RNA-Proben wurden während der Messung auf Eis gelagert.

### 2.12.1.3 Reverse Transkription

Da RNA nicht als Template im Rahmen einer quantifizierenden RTD-PCR nutzbar ist, wurde die Synthese der korrespondierenden „complementary DNA“ (cDNA) mithilfe des Omniscript RT Kit (Qiagen) vorgenommen. Grundlegend ist hierbei die Funktion der reversen Transkriptase, einem multifunktionalen Enzym, welches in RNA-haltigen Retroviren vorzufinden ist und die Fähigkeit besitzt, RNA in einzelsträngige cDNA umzuschreiben (Mullard, 2008). Als „Primer“ fungierten Oligo dT-Nukleotide, die charakteristischerweise an das 3'-Ende der Poly(A)-Region der mRNA hybridisieren (Nam et al., 2002).

Zunächst wurden die RNA-Proben auf Eis platziert aufgetaut. Nachfolgend wurde zur Präparation der Reverse-Transkription-Reaktion ein Master-Mix gemäß folgender Tabelle angesetzt.

**Tab. 3:** Ansatz des Master-Mix

Komponente	Volumen/Reaktion
10x Buffer RT	2 µl
dNTP Mix (5 mM)	2 µl
Oligo dT Primer (10 µM)	2 µl
RNase inhibitor (10 units/µl)	0,2 µl
Omniscript RT	1 µl
RNase free water	0,8 µl
Gesamtmenge	8 µl

Anschließend wurden je 8 µl des Master-Mixes in den Mikroreaktionsgefäßen vorgelegt und 12 µl der RNA-Probe beigemischt. Der Reaktionsansatz wurde durch fünf-sekündiges Vortexen vermischt und danach unter Zuhilfenahme des Mastercycler PCR-Cycler für 60 Minuten bei 37 °C inkubiert.

Als Matrize zur reversen Transkription wurden RNA-Proben in Konzentrationen zwischen 50 ng bis 2 µg verwendet. Sämtliche Proben und Reaktionsansätze wurden zur Vermeidung einer frühzeitigen Degradation oder vorzeitig einsetzenden Synthese von cDNA auf Eis gelagert. Die Lagerung der cDNA-Proben erfolgte bei -20 °C.

#### 2.12.1.4 Real-time quantitative PCR

Die quantitative RTD-PCR ist eines der wichtigsten Verfahren zur Analyse der Genexpression. Während in der traditionellen PCR eine Bestimmung der RNA erst am Endpunkt möglich ist, erlaubt der Einsatz der RTD-PCR eine Bestimmung der RNA-Amplifikation während sie abläuft (Heid et al., 1996).

Zur Amplifikation der einzelsträngigen cDNA bedienen wir uns des TaqMan™ Gene expression master mix unter Nutzung des Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System. Die cDNA wurde zunächst im Verhältnis 1:10 verdünnt und nachfolgend eine PCR-Platte in Triplikaten mit 9 µl pro Well beschichtet. Nachfolgend wurden pro Well 11 µl einer zuvor aus TaqMan™ Gene expression master mix (10 µl) und Gensonde (1 µl) angesetzten Mixtur hinzu pipettiert. Dann wurde die PCR-Platte versiegelt und kurz zentrifugiert. Basierend auf früheren Ergebnissen und Erfahrungen der Arbeitsgruppe konnte die Zahl der Amplifikationszyklen auf 40 festgelegt werden. Dabei wurde folgender Amplifikationszyklus angewandt:

**Tab. 4:** Ablauf eines Amplifikationszyklus

00.20 Minuten	50 °C
10.15 Minuten	95 °C
01.00 Minuten	60 °C

Im Rahmen der Forschungsarbeit wurde die Expression der folgenden Zielgene (sämtliche Sonden von Thermofisher) untersucht:

**Tab. 5:** Untersuchte Zielgene

<b>Gencode</b>	<b>Sonde</b>
Caspase 1	Casp1 FAM Hs00354836
NLR family pyrin domain containing 3	NLRP3 FAM Hs00918082
Interleukin 1 beta	IL1 $\beta$ FAM Hs01555410
Vascular cell adhesion molecule 1	VCAM1 FAM Hs00365486
Intercellular adhesion molecule 1	ICAM1 FAM Hs00164932
Eukaryotic 18S rRNA	18s FAM Hs03003631

Als Negativkontrollen wurden PCR-Proben ohne DNA-Template angesetzt.

#### 2.12.1.5 Relative Quantifizierung der Genexpression

Zur Bestimmung der relativen Expression der untersuchten Zielgene wurde die  $\Delta$ CT-Methode herangezogen. Eukaryotische 18S rRNA wurde als konstitutiv exprimiertes Gen zur Normalisierung der CT-Werte der untersuchten Zielgene genutzt.

#### 2.12.2 Humaner IL-1 $\beta$ /IL-1F2 DuoSet ELISA

ELISA sind mikroplattenbasierte Techniken zur Detektion und Quantifizierung von Proteinen, Peptiden oder anderer Antigene. Das im Rahmen dieser Arbeit verwendete humane IL1 $\beta$ /IL-1F2-DuoSet ELISA basiert auf dem Prinzip des Sandwich-ELISA.

Zur Messung der Ausschüttung von IL-1 $\beta$  durch EMP-aktivierte HCASMC wurde der Überstand selbiger Zellen gesammelt und nachfolgend dem humanen IL1 $\beta$ /IL-1F2-DuoSet ELISA unterzogen. Als Standard fungierte rekombinantes humanes IL-1 $\beta$ . Sämtliche Proben wurden als Dubletten aufgetragen. Die Durchführung erfolgte gemäß der Anweisung des Herstellers.

Zusammenfassend:

Zunächst wurde der „Capture-Antikörper“ zur Arbeitskonzentration von 4 µg/ml in PBS verdünnt und unmittelbar nachfolgend eine 96-Mikrowellplatte mit 100 µl/Well des verdünnten Antikörpers beschichtet. Die Platte wurde mithilfe eines „PCR Seals“ versiegelt und über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Am Folgetag wurde der „Capture-Antikörper“ entfernt und sämtliche Wells in insgesamt drei Durchläufen mithilfe einer Mehrkanalpipette mit jeweils 300 µl „Wash Buffer“ gewaschen. Residuale Flüssigkeit wurde durch vorsichtiges Ausklopfen gegen ein Papiertuch entfernt. Zur Blockierung wurde 300 µl „Reagent Diluent“ pro Well hinzugegeben. Die Platte wurde nochmals versiegelt und für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Ablauf der Zeit erfolgte eine Wiederholung des zuvor beschriebenen Waschschrilles.

Im Anschluss dieser vorbereitenden Schritte konnten nun je 100 µl der zu untersuchenden Proben, sowie die in „Reagent Diluent“ gelösten Standards aufgetragen werden. Gemäß der Angabe des Herstellers erfolgten Verdünnungen des rekombinanten, humanen IL-1β im Verhältnis eins zu zwei, mit folgenden Konzentrationen:

**Tab. 6:** Ansatz des rekombinanten humanen IL-1β-Standard

	<b>Konzentration</b>
1.	250 pg/ml
2.	125 pg/ml
3.	62,5 pg/ml
4.	31,3 pg/ml
5.	15,6 pg/ml
6.	7,81 pg/ml
7.	3,91 pg/ml

Nach Versiegelung und Inkubation der Platte über weitere zwei Stunden erfolgte eine erneute Wiederholung des Waschschrilles gefolgt von der Zugabe von jeweils 100 µl des „Detection-Antikörpers“, gelöst in „Reagent Diluent“, in einer Gebrauchskonzentration von 200 ng/ml. Im Anschluss folgte eine erneute Versiegelung der Platte mit zweistündiger Inkubationszeit.

Auf die nachfolgend durchgeführte dreimalige Waschung der Platte erfolgte nun die Zugabe von je 100 µl Streptavidin-HRP in einer Verdünnung von 1:40. Zur Inkubation wurde die Platte erneut versiegelt und unter Vermeidung der Einstrahlung direkten Lichtes für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Platte wurde anschließend erneut gewaschen.

Daraufhin wurden pro Well 100 µl der aus H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und Tetramethylbenzidin (Verhältnis 1:1) bestehenden Substrat-Lösung hinzugesetzt, und unter Schutz vor der Einstrahlung direkten Lichtes für weitere 20 Minuten inkubiert. Letztlich wurden je 50 µl 2 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (Schwefelsäure) zur Beendigung der Farbreaktion beigemischt. Die optische Dichte wurde bei einer Wellenlänge von 450 nm und einer Wellenlängenkorrektur von 540 nm mithilfe des Multidetektionsreaders Tecan Infinite M200 ermittelt.

### 2.13 Scratch Assay

Beim Scratch Assay handelt es sich um eine einfache Methode zur Beurteilung der Migrationsfähigkeit von Zellen *in vitro*. Hierbei wird einer konfluenten „Monolayer“ Zellen eine Läsion beigefügt und unter Versuchsbedingungen die Veränderung selbiger über die Zeit verfolgt.

Das in dieser Arbeit dargestellte Scratch Assay wurde in Anlehnung an das von Liang et al. (2007) beschriebene Protokoll durchgeführt.

Die zelluläre Einzelschicht von HCASMC wurde mithilfe einer Pipettenspitze der Größe ein Milliliter strichförmig und geradlinig ausgekratzt. Als Orientierungspunkt war zuvor bereits mittels Fineliner auf der Rückseite des jeweiligen Wells eine Markierung gesetzt worden. Zelltrümmer wurden durch einen Austausch des Mediums und eine Waschung der Zellen entfernt.

Nachfolgend wurden erste mikroskopische Bilder als Referenzwerte für spätere Berechnungen angefertigt. Anschließend wurden HCASMC mit EMP für verschiedene Zeiträume stimuliert, Bilder der Läsionen angefertigt und diese im Hinblick auf die prozentuale Veränderung der zellfreien Fläche mithilfe der Axiovision 4.8-Software analysiert.

## 2.14 Bestimmung der Lebensfähigkeit EMP-behandelter Zellen

Die Lebensfähigkeit EMP-behandelter HCASMC und HCAEC wurde unter Zuhilfenahme des CellTiter-Blue® Cell Viability Assay ermittelt. Beruhend auf der Eignung lebensfähiger Zellen zur Metabolisierung des Redoxindikators Resazurin zu Resorufin ermöglicht der CellTiter-Blue® Cell Viability Assay durch Messung der Fluoreszenzintensität einen Rückschluss auf die Zahl lebendiger Zellen. Zur Durchführung dieses Versuches wurden HCASMC zunächst für acht und HCAEC für vier Stunden mit EMP behandelt. Hierbei dienten unbehandelte Zellen als Kontrolle. Nachfolgend wurden jeweils 10 µl der CellTiter-Blue®-Reagenz zu einem Milliliter Medium, in dem die Zellen inkubiert wurden, hinzugegeben. Nach zwei weiteren Stunden Inkubation unter Standard-Kultur-Bedingungen wurden jeweils 10 µl des Überstandes in Triplikaten in jeweils ein Well einer Nunc™ F96 MicroWell™ Polystyrolplatte überführt, welche zuvor zur Reduktion der Intensität der Fluoreszenzsignale mit 90 µl PBS pro Well befüllt worden war. Die Fluoreszenzintensität wurde bei 560 nm/ 590 nm (Exzitation/Emission) mithilfe des Multidetektionsreaders Tecan Infinite M200 multimode plate reader gemessen.

## 2.15 Bestimmung der zytotoxischen Effekte von EMP

Die von HCASMC und HCAEC durch Behandlung mit EMP erlittenen zytotoxischen Effekte wurden mittels MultiTox-Fluor Multiplex Cytotoxicity Assay (Promega, Madison, USA) analysiert. Der MultiTox-Fluor Assay macht sich hierbei die Freisetzung von sogenannten „Dead-Cell-Proteasen“ zu Nutze. Zellen deren Membran im Rahmen von Apoptose bzw. Nekrose ihre Integrität verlieren, setzen „Dead-Cell-Proteasen“ frei. Das MultiTox-Fluor Assay stellt mit Bisalanlyl-alanyl-phenylalanyl-rhodamine 110 (bis-AAF-R110) ein fluorogenes, zellimpermeables Peptidsubstrat zur Verfügung, welches in Präsenz toter, aber nicht von lebendigen Zellen umgesetzt wird.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde zunächst HCAEC und HCASMC in 12-Well-Platten mit EMP für vier bzw. acht Stunden koinkubiert. Je Well, befüllt mit einem Milliliter Medium, wurde daraufhin 20 µl der fünffachen MultiTox-Fluor-Versuchsreagenz hinzugefügt. Nach einer Inkubationszeit von 30 Minuten bei 37 °C, wurden jeweils dreimal 100 µl pro Well

der 12 Well-Platte in Form von Triplikaten in die Kavitäten einer Nunc™ F96 MicroWell™ Polystyrolplatte transferiert. Die Fluoreszenz wurde gemessen bei einer Wellenlänge von 485 nm/ 520 nm (Exzitation/Emission) durch Einsatz eines Multidetektionsreaders.

#### 2.16 Inhibition des NLRP3-Inflammasoms

Durch den Einsatz von Inhibitoren können durch das NLRP3-Inflammasom vermittelte Stoffwechselwege inhibiert werden. Einer dieser Inhibitoren ist Isoliquiritigenin (ILG), welches antiinflammatorische, -karzinogene und -histaminische Effekte aufweisen soll (Kumar et al., 2007). Es wird berichtet, dass es neben der Translokation und Aktivierung des NF- $\kappa$ B ebenfalls das NLRP3-Inflammasom auf dem Level von NLRP3 oder Upstream hemmt (Honda et al., 2014; Kumar et al., 2007).

Für dieses Experiment wurden HCAEC und HCASMC in 12-Wellplatten genutzt. EMP wurden isoliert und mit ILG (Invivogen, San Diego, USA) in einer Konzentration von 5  $\mu$ g/ml, diluiert in PBS, für 30 Minuten unter Standard-Kultur-Bedingungen behandelt. Nachfolgend wurden die EMP durch Zentrifugation bei 20.000 g für 40 Minuten unter einer Temperatur von 4°C erneut pelletiert. Das Pellet wurde mithilfe von PBS gewaschen und letztlich auf die Zellen überführt. Die Wirkung der EMP wurde nach vier bzw. acht Stunden mittels MultiTox-Fluor Multiplex Cytotoxicity Assay gemäß Sektion 2.15 begutachtet. Mit PBS-behandelte EMP dienten bei diesem Versuch als Kontrolle. Morphologische Veränderungen der jeweiligen Versuchsgruppen wurden lichtmikroskopisch evaluiert.

#### 2.17 Durchflusszytometrische Untersuchung von SMCMP

„Smooth muscle cell microparticles“ (SMCMP) wurden aus dem Überstand von HCASMC gemäß Abschnitt 3.3. isoliert, mit PBS gewaschen und letztlich in 50  $\mu$ l PBS gelöst. Nachfolgend wurden der Suspension 5  $\mu$ l AnnexinV hinzugefügt, kurz gevortext und dann für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 200  $\mu$ l AnnexinV Binding Buffer hinzu pipettiert. Die Proben wurden in Trucount-Tubes transferiert und mithilfe BD Facscalibur gemessen.

Eine Analyse der Messdaten wurde unter Zuhilfenahme von FloJo durch Theresa Schmitz vorgenommen.

Die Zahl der SMCMP wurde berechnet gemäß der Gleichung:

$$\left( \frac{\text{Number of AnnexinV positive events}}{\text{Number of events in bead region}} \right) \times \left( \frac{\text{Number of Trucountbeads per test}}{\text{Test volume}} \right)$$

## 2.18 Elektronenmikroskopie von SMCMP

Elektronenmikroskopische Aufnahmen von SMCMP wurden mit der freundlichen Hilfe des pathologischen Instituts des Universitätsklinikum Bonn angefertigt. SMCMP waren zuvor nach dem unter Abschnitt 3.3 beschriebenen Protokoll gewonnen worden.

## 2.19 Statistische Auswertung

Sämtliche Daten werden dargestellt als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes (SEM). Die statistische Analyse wurde in Form eines zweiseitigen ungepaarten T-Tests vollzogen. Ein Vergleich von  $\geq 3$  Gruppen untereinander wurde mithilfe von one-way analysis of variance (ANOVA), gefolgt von einer Post Hoc-Analyse mittels Tukey's-test durchgeführt. Bei Vergleich mehrerer Gruppen mit einer Kontrollgruppe wurde der Dunnett's multiple comparisons test angewandt. Bei allen Berechnungen wurden P-Werte von  $<0.05$  als statistisch signifikant determiniert. Die statistische Auswertung erfolgte mithilfe des Programmes GraphPad Prism 6.02.

### 3. Ergebnisse

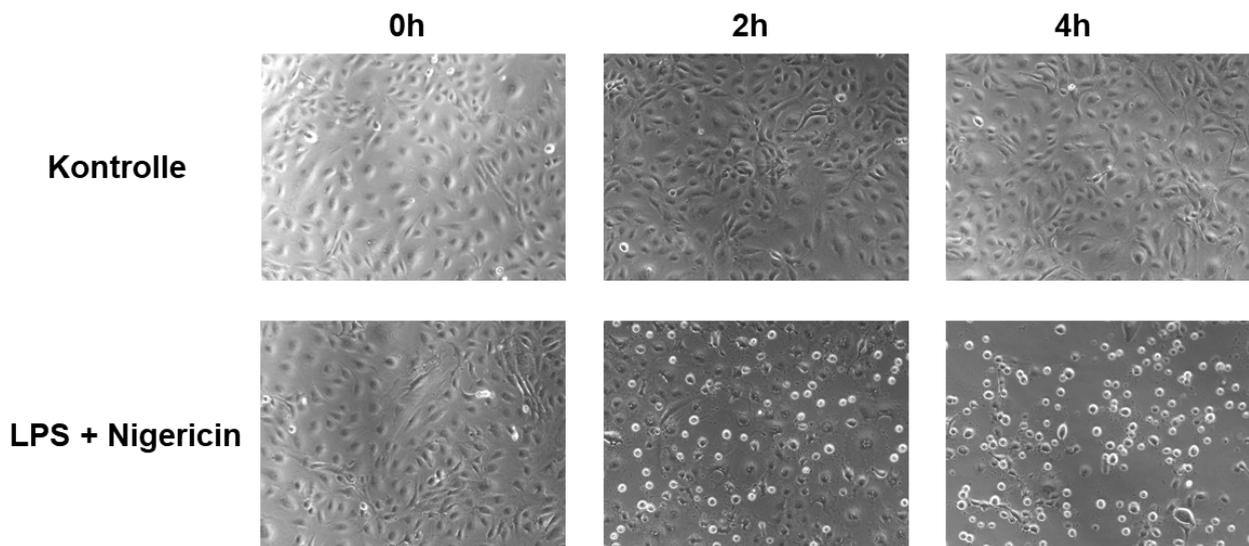
#### 3.1 Vorarbeiten

In Untersuchungen, welcher der vorliegenden Forschungsarbeit vorangegangen sind, konnte durch Herrn Dr. Philipp Pfeifer und Frau Sophia Katharina Ebert die Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms in Endothelzellen und die daraufhin stattfindende Sekretion von MP demonstriert werden.

Zur Untersuchung des Sachverhaltes wurden koronararterielle Endothelzellen mit LPS und Nigericin stimuliert. Zur Überprüfung der charakteristischen Initiation des NF- $\kappa$ B-Stoffwechselweges wurden nachfolgend RTD-PCR-Experimente durchgeführt, die eine Hochregulation Inflammasom-spezifischer mRNAs zur Darstellung bringen konnten. Ebenso gelang es durch Western-Blot-Experimente die Freisetzung gespaltener, aktiver Caspase-1 zu veranschaulichen. Der hier induzierte Vorgang der Inflammasomaktivierung zieht das Eintreten der Pyroptose nach sich (Abb. 2).

Nachfolgend wurde untersucht, ob es infolge der Inflammasomaktivierung der Endothelzellen zu einer Freisetzung von MP gekommen war. Hierbei zeigte sich in durchflusszytometrischen Experimenten eine zeitabhängige Freisetzung selbiger. Die Identifikation der MP erfolgte im Vergleich mit fluoreszierenden Polystyrol-MP, mit definierten Größen von einem bis sechs Mikrometern. Validiert wurden die Ergebnisse durch elektronenmikroskopische Aufnahmen, die mit der freundlichen Hilfe des Instituts für Pathologie angefertigt wurden.

Zur näheren Betrachtung des mikropartikulären Inhalts wurden erneut Western-Blots zur Hilfe genommen. Hierbei konnte dargelegt werden, dass MP aktive Caspase-1 enthalten. Nachfolgende Untersuchungen konnten weiterhin eine Inkorporation der EMP in HCAEC sowie eine nachfolgende Reduktion der Lebensfähigkeit selbiger Zellen zur Darstellung bringen. Es kamen hier sowohl Viability als auch Scratch Assays zur Anwendung.



**Abb. 2:** Lichtmikroskopische Darstellung der Pyroptose von Inflammasom-aktivierten HCAEC. HCAEC wurden zunächst für 4h mit LPS (1  $\mu\text{g/ml}$ ) und nachfolgend mit Nigericin (20  $\mu\text{M}$ ) für die angezeigten Zeiträume stimuliert. Nach Ablauf der entsprechenden Stimulationsdauer wurden lichtmikroskopische Aufnahmen durchgeführt. Vergrößerung: 20 x.

### 3.2 Aufnahme von EMP in vaskuläre Zellen

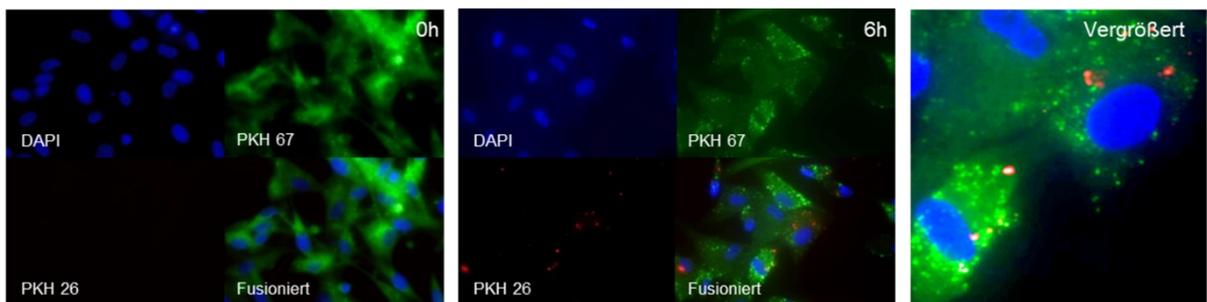
Die Inkorporation von MP stellt einen charakteristischen Mechanismus der durch sie vermittelten Signaltransduktion dar. Nachdem eine Aufnahme von EMP in HCAEC bereits in Vorarbeiten durch Frau Sophia Katharina Ebert demonstriert werden konnte, sollte in der aktuellen Untersuchung selbiges für HCASMC evaluiert werden. Zur Verifikation der Beobachtungen wurde die Untersuchung an den HCAEC wiederholt und um eine Darstellung mittels Z-Stapel-Aufnahmen ergänzt.

Nach Isolation von MP aus dem Überstand Inflammasom-aktivierter HCAEC wurde zur Überprüfung ihrer Aufnahme durch HCASMC und HCAEC sowohl MP als auch vaskuläre Zielzellen einer immunhistochemischen Färbung mithilfe fluoreszierender Membranfarbstoffe unterzogen. EMP aus dem Überstand Inflammasom-aktivierter HCAEC wurden mit PKH26 (rot) gefärbt und mit PKH67-gefärbten (grün) HCASMC und HCAEC inkubiert. Die Nuklei wurden mit DAPI (blau) gefärbt. Es zeigte sich hierbei unter mikroskopischer Darstellung die Inkorporation von EMP in ihre Zielzellen (Abb.3 und 4, A). Bei der Betrachtung der Präparate nach 0 h, 2 h, 4 h und 6 h ließ sich überdies eine

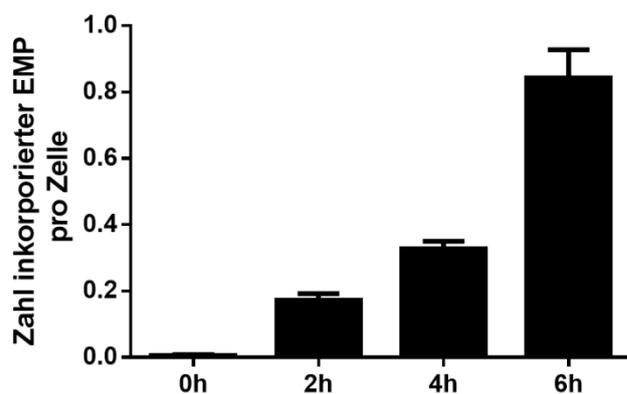
von der Stimulationszeit abhängige, zunehmende Zahl von MP pro Zelle ermitteln (Abb.3 und 4, B).

Zur Sicherstellung einer tatsächlichen Inkorporation der MP durch ihre Zielzellen wurden die Präparate vor Fixierung mehreren Waschschrinen zur Lösung nicht-adhärenter oder nicht-aufgenommener EMP unterzogen. Überdies wurden Z-Stapel-Aufnahmen angefertigt. Diese erlaubten durch die mikroskopische Aufnahme des Probenmaterials bei verschiedenen Fokussierungsentfernungen die digitale Konstruktion einer dritten Ebene bzw. eine dreidimensionale Visualisierung der Zellen. So ließ sich durch eine orthogonale Projektion des Z-Stapels die Aufnahme der MP validieren (Abb. 3 und 4, C).

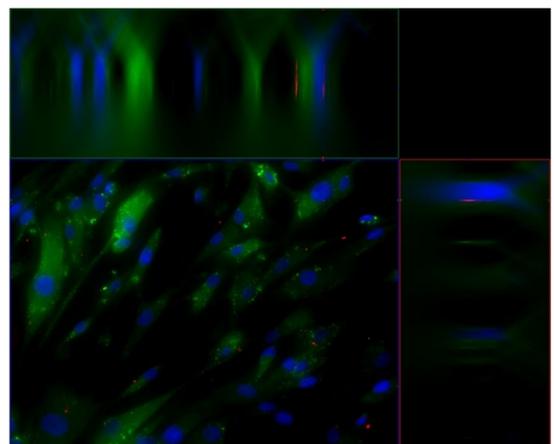
A



B



C

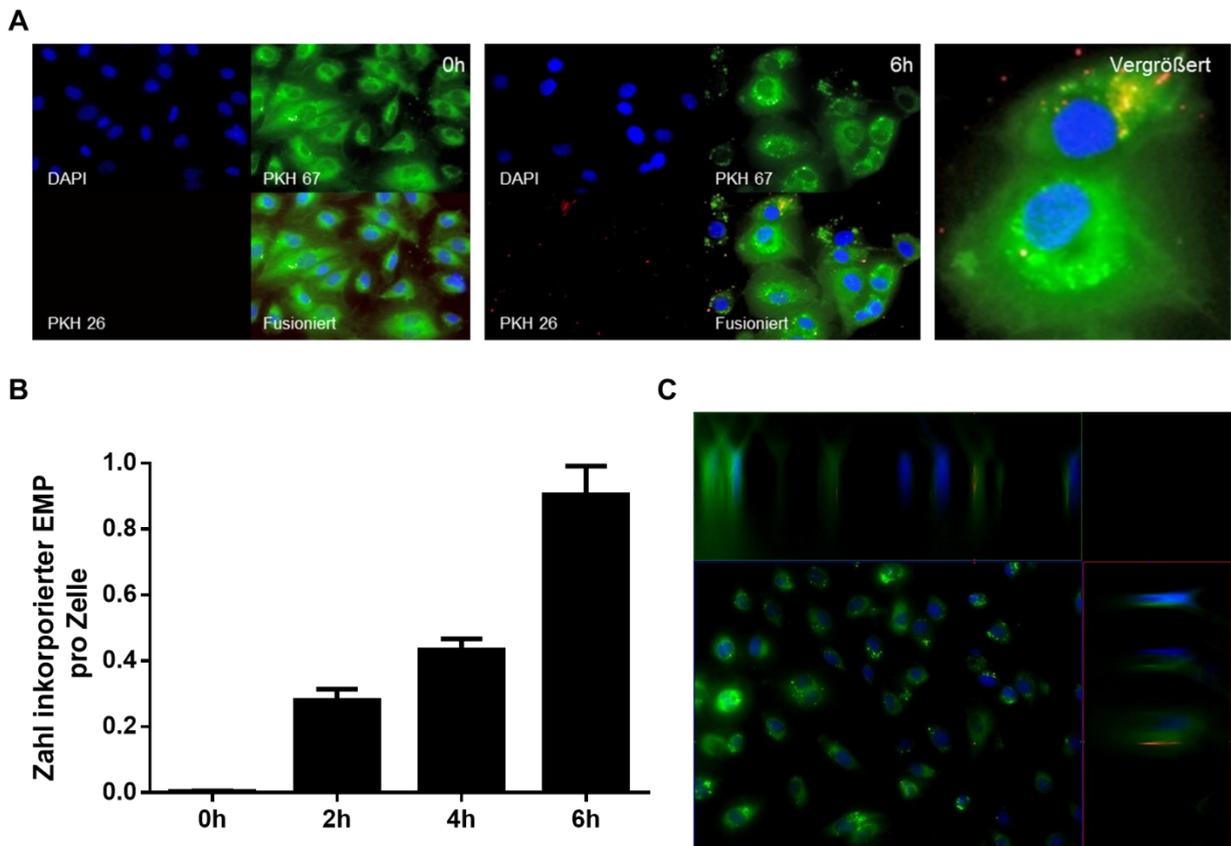


**Abb. 3:** Untersuchung der Inkorporation von EMP in HCASMC

**A:** EMP aus dem Überstand Inflammasom-aktivierter HCAEC wurden mit PKH26 (rot) gefärbt und mit PKH67-gefärbten (grün) HCASMC (A-C) koinkubiert. Die Nuklei wurden mit DAPI (blau) gefärbt. Mikroskopische Aufnahmen zu den Zeitpunkten 0 h bzw. 6 h Behandlung.

**B:** EMP werden in zeitabhängiger Weise von HCASMC aufgenommen. Die Daten sind dargestellt als Mittelwert  $\pm$  SEM.

**C:** Z-Stapel-Aufnahmen wurden nach sechsständiger Behandlung angefertigt, hier dargestellt in Form orthogonaler Projektionen. Zentrales Bild: X-Y-Ebene; rechtes Bild: Y-Z-Ebene; oberes Bild: X-Z-Ebene. Stapel über 72 Schnittbilder (170  $\mu$ m). Vergrößerung: 20 x.

**Abb. 4:** Untersuchung der Inkorporation von EMP in HCAEC

**A:** EMP aus dem Überstand Inflammasom-aktivierter HCAEC wurden mit PKH26 (rot) gefärbt und mit PKH67-gefärbten (grün) HCAEC (A-C) koinkubiert. Die Nuklei wurden mit DAPI (blau) gefärbt. Mikroskopische Aufnahmen zu den Zeitpunkten 0 h bzw. 6 h Behandlung.

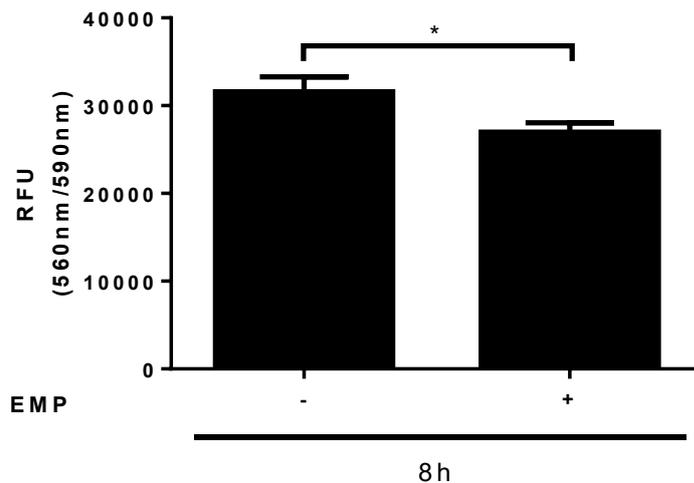
**B:** EMP werden in zeitabhängiger Weise von HCAEC aufgenommen. Die Daten sind dargestellt als Mittelwert  $\pm$  SEM.

**C:** Z-Stapel-Aufnahmen wurden nach sechsständiger Behandlung angefertigt, hier dargestellt in Form orthogonaler Projektionen. Zentrales Bild: X-Y-Ebene; rechtes Bild: Y-Z-Ebene; oberes Bild: X-Z-Ebene. Stapel über 86 Schnittbilder (170  $\mu$ m). Vergrößerung: 20 x.

### 3.3 EMP beeinträchtigen zelluläre Funktionen und induzieren eine inflammatorische Reaktion in vaskulären Zellen

In Untersuchungen zu den zellulären Effekten, die durch die EMP evoziert worden waren, zeigten sich mehrere schädliche Effekte.

Durch den Einsatz des CellTiter-Blue® Cell Viability Assay ließ sich so eine Reduktion der Lebensfähigkeit von HCASMC nach Behandlung mit EMP nach 8 h demonstrieren (Abb. 5). Hierbei zeigte sich basierend auf der linearen Beziehung von Fluoreszenz und Anzahl lebender Zellen eine signifikante Verminderung der Fluoreszenzintensität (RFU) bei 560<sub>Ex</sub>/590<sub>Em</sub> für HCASMC (RFU: 31571 ± 1699 gegen RFU: 26968 ± 1067; N=11 pro Gruppe; p=0,0327).



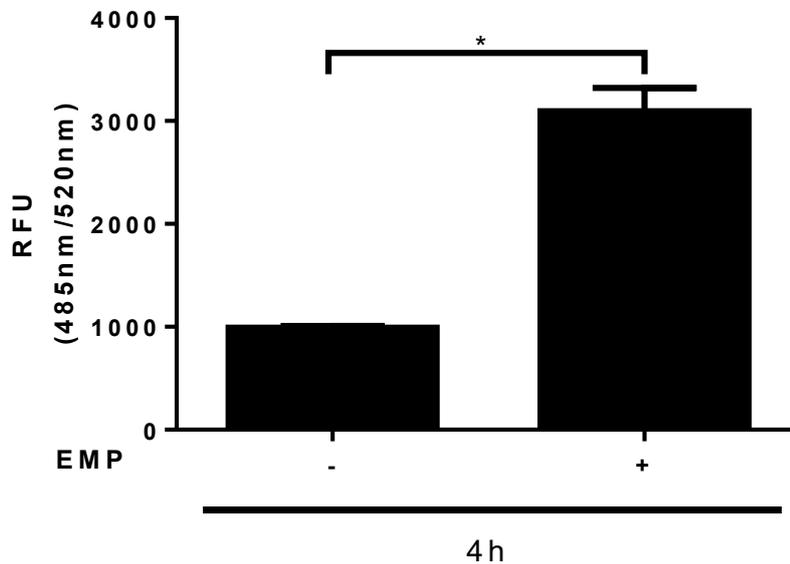
**Abb. 5:** Bestimmung der Lebensfähigkeit EMP-behandelter HCASMC

HCASMC wurden für 8 h mit EMP behandelt. Die Messung der Zellviabilität erfolgte unter Einsatz des CellTiter-Blue® Cell Viability Assay. Dargestellt ist der Verlust der Fluoreszenzintensität (RFU).

Die Daten sind dargestellt als Mittelwert ±SEM. n=11 pro Gruppe, \*p<0,05.

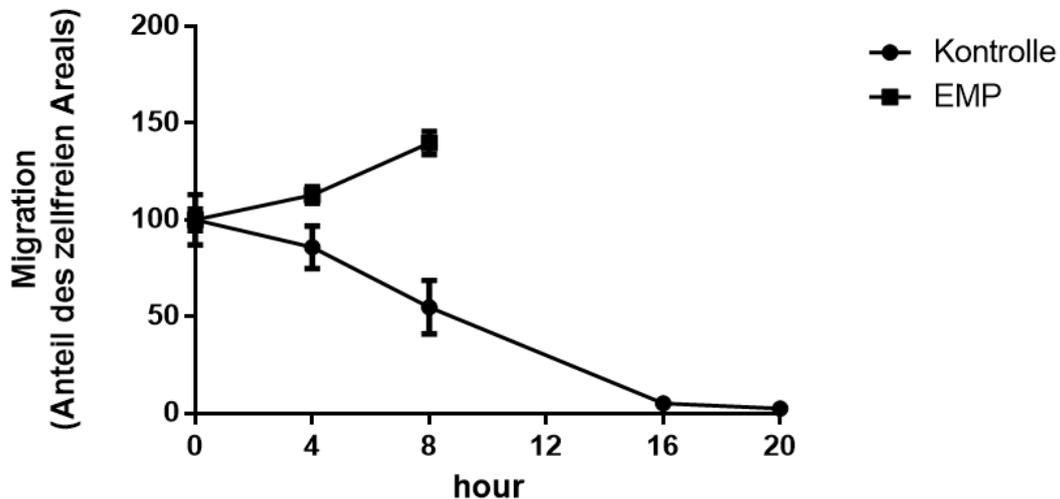
In Kongruenz zu dieser Beobachtung ließ sich mithilfe des MultiTox-Fluor Multiplex Cytotoxicity Assay nach vier Stunden eine zellschädigende Wirkung von EMP auf HCAEC messen (Abb. 6). Hierbei ließ sich ein, in diesem Fall proportional zur Anzahl toter Zellen

verhaltendes, intensiviertes Fluoreszenzsignal bei  $485_{\text{Ex}}/520_{\text{Em}}$  detektieren (RFU:  $990,5 \pm 17,73$  gegen RFU:  $3095 \pm 225,8$ ; N=4 pro Gruppe;  $p < 0,0001$ ).



**Abb. 6:** Bestimmung der Zytotoxizität von EMP-behandelten HCAEC  
HCAEC wurden für 4 h mit EMP behandelt. Die Messung der Zytotoxizität erfolgte mithilfe des MultiTox-Fluor Multiplex Cytotoxicity Assay. Dargestellt ist die Zunahme der Fluoreszenzintensität (RFU).  
Die Daten sind dargestellt als Mittelwert  $\pm$ SEM. n=4 pro Gruppe, \* $p < 0,05$ .

Neben diesen Effekten ließ sich unter Zuhilfenahme von Scratch Assays bei EMP-behandelten HCASMC ebenso eine Reduktion ihrer Fähigkeit zu migrieren und proliferieren feststellen (Abb. 7). Es zeigte sich im Rahmen des Versuches eine Ausweitung der Läsion der „Monolayer“ EMP-behandelter HCASMC, so dass sich nach acht Stunden eine mikroskopische Messung als nicht mehr praktikabel darstellte. Vergleichend dazu kam es bei unbehandelten HCASMC nach 20 Stunden zu einem Verschluss der zellfreien Fläche.



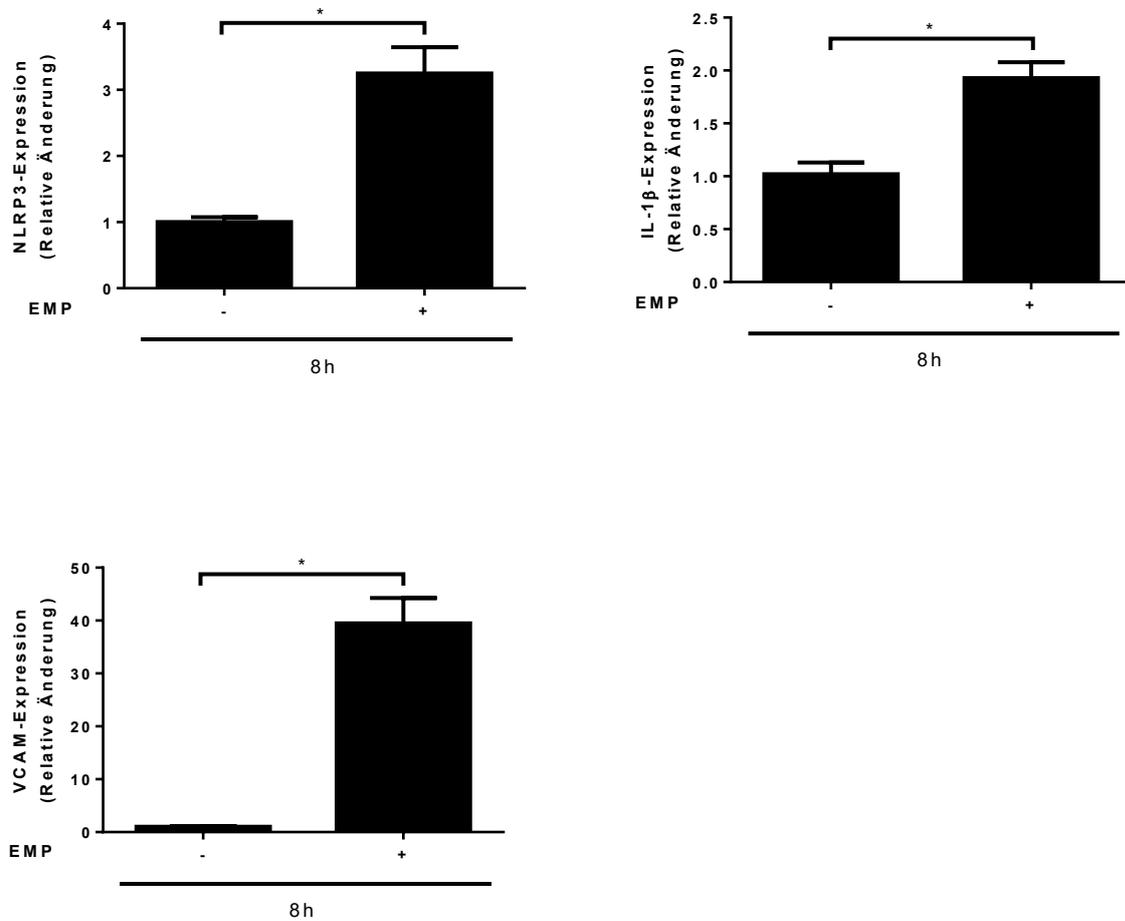
**Abb. 7:** Scratch Assay EMP-behandelter HCASMC

HCASMC wurden mit EMP behandelt. Mikroskopische Aufnahmen wurden nach 0 h, 4 h, 8 h, 16 h und 20 h angefertigt. Dargestellt ist die Relation der jeweiligen Läsion zur initialen zellfreien Fläche.

Die Daten sind dargestellt als Mittelwert  $\pm$ SEM. n=8-9 pro Gruppe.

Zur genaueren Aufklärung, der den zuvor beschriebenen Beobachtungen zugrundeliegenden Mechanismen, wurden nachfolgend RTD-PCR-Experimente durchgeführt. Hierbei wurde gezielt die Expression von Genen untersucht, welche durch den NF- $\kappa$ B-Stoffwechselweg reguliert werden bzw. im Rahmen inflammatorischer Prozesse der Atherosklerose eine Rolle spielen.

Mithilfe dieser Experimente ließen sich so erhöhte mRNA-Konzentrationen von NLRP3, IL-1 $\beta$  und VCAM bei für acht Stunden mit EMP stimulierten HCASMC eruieren (Abb. 8). Hierbei zeigte sich in sämtliche Messungen die relative Expression als signifikant gesteigert (NLRP3:  $1,000 \pm 0,07466$  gegen  $3,247 \pm 0,3984$ ,  $p < 0,0001$ ; IL-1 $\beta$ :  $1,020 \pm 0,1095$  gegen  $1,929 \pm 0,1490$ ,  $p < 0,0001$ ; VCAM:  $1,000 \pm 0,1364$  gegen  $39,46 \pm 4,815$ ,  $p < 0,0001$ ; für alle Versuche N=11 pro Gruppe).

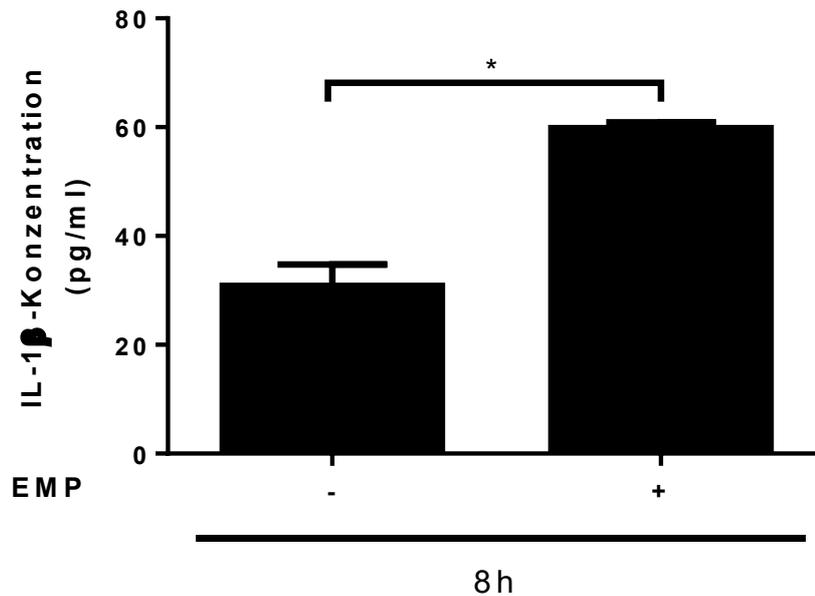


**Abb. 8:** Genexpression EMP-behandelter HCASMC

HCASMC wurden für 8 h mit EMP behandelt. Die Expression der NF- $\kappa$ B-regulierten mRNAs NLRP3, IL-1 $\beta$  und VCAM wurde mittels RTD-PCR quantifiziert.

Die Daten sind dargestellt als Mittelwert  $\pm$ SEM. n=11 pro Gruppe, \*p<0,05.

Zur Prüfung der Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms wurde überdies der Überstand von EMP-behandelten HCASMC IL-1 $\beta$ -ELISA-Experimenten unterzogen (Abb. 9). Es kam dabei eine signifikant gesteigerte Sekretion desselbigen Zytokins zur Darstellung (IL-1 $\beta$  (pg/ml):  $30,83 \pm 3,925$  gegen  $59,80 \pm 1,075$ ; N=5 pro Gruppe; p=0.0001).

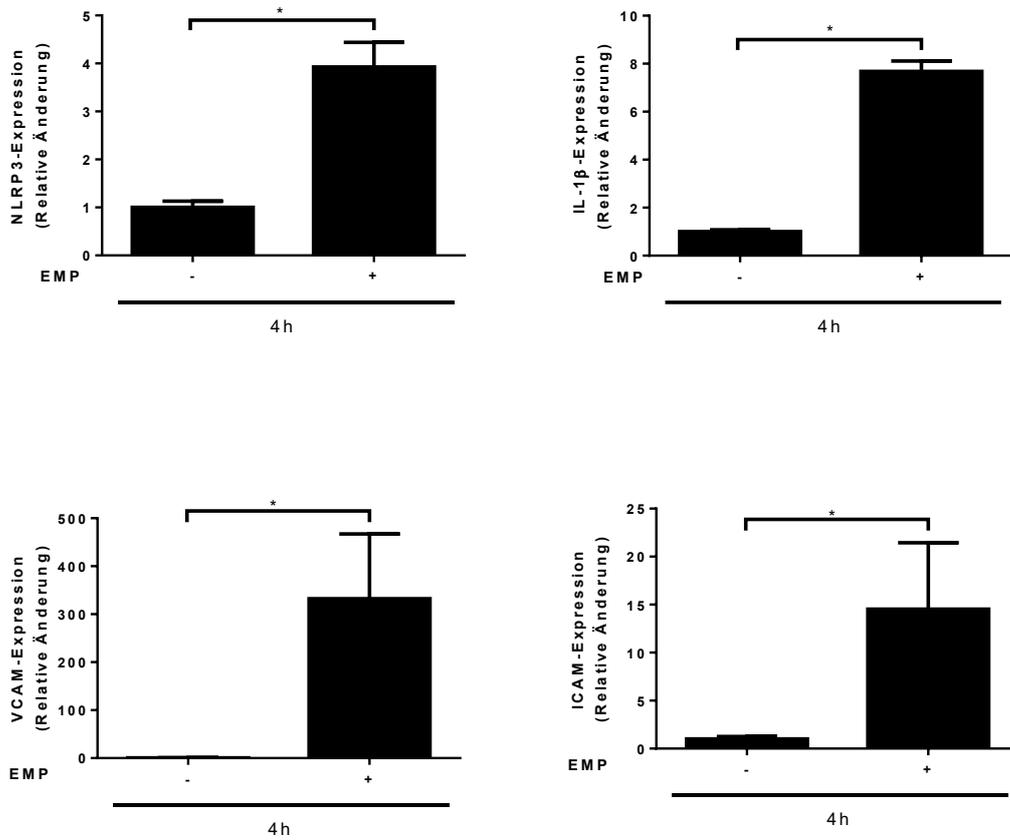


**Abb. 9:** IL-1 $\beta$ -Ausschüttung durch EMP-stimulierte HCASMC

HCASMC wurden für 8 h mit EMP behandelt. Die Sekretion von IL-1 $\beta$  wurde mithilfe eines IL1 $\beta$ /IL-1F2-DuoSet ELISA ermittelt.

Die Daten sind dargestellt als Mittelwert  $\pm$ SEM. n=5 pro Gruppe, \*p<0,05.

Übereinstimmend zu diesen Ergebnissen ließ sich in kongruenten RTD-PCRs von EMP-stimulierten HCAEC ebenfalls eine signifikant erhöhte Expression von NLRP3, IL-1 $\beta$ , VCAM und ICAM nach einer Stimulationsdauer von vier Stunden feststellen (Abb. 10) (NLRP3: 1,000  $\pm$  0,1321; N=4 gegen 3,927  $\pm$  0,5117; N=5, p= 0,0017 ; IL-1 $\beta$ : 1,000  $\pm$  0,07755; N=5 gegen 7,678  $\pm$  0,4349; N=5, p<0,0001; VCAM: 0,7950  $\pm$  0,1064; N=8 gegen 332,4  $\pm$  134,8; N=8; p=0,0275; ICAM: 1,000  $\pm$  0,2516; N=10 gegen 14,53  $\pm$  6,911; N=8; p=0,0425).

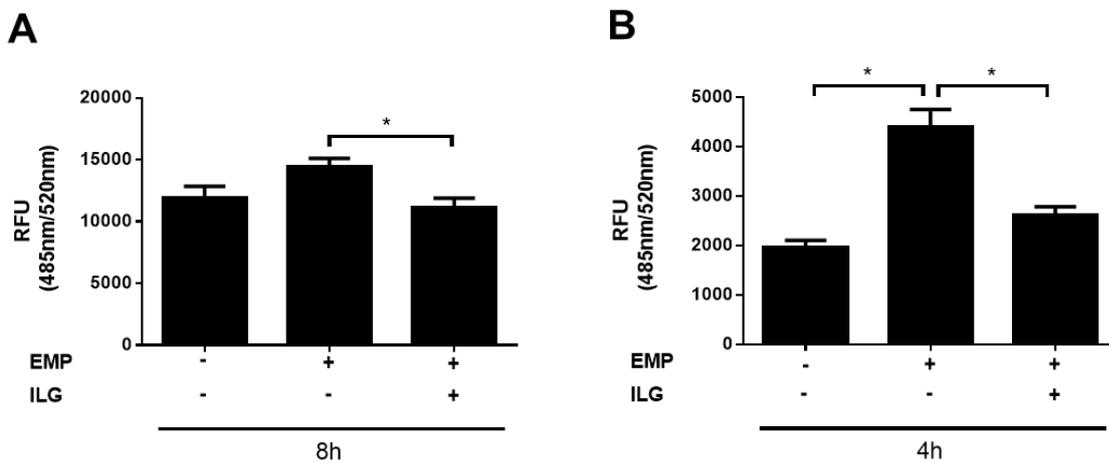


**Abb. 10:** Genexpression EMP-behandelter HCAEC  
 HCAEC wurden mit EMP behandelt. Die Expression der NF- $\kappa$ B-regulierten mRNAs NLRP3, IL-1 $\beta$  VCAM und ICAM wurde mithilfe RTD-PCR quantifiziert.  
 Die Daten sind dargestellt als Mittelwert  $\pm$ SEM. n=4-10 pro Gruppe, \*p<0,05.

### 3.4 Die Behandlung von EMP mit Inflammasomeninhibitoren reduziert schädliche zelluläre Effekte

Um zu prüfen, ob die zuvor beschriebenen Effekte durch die Übertragung mikropartikulärer Inflammasomenbestandteile erklärbar sind, wurden EMP nach ihrer Isolation mit dem Inflammasominhibitor ILG behandelt. Zur Vermeidung der Übertragung residualen ILGs auf die Zielzellen wurde bei den nachfolgend erneut pelletierten EMP sorgfältig der Überstand entfernt, und die EMP mit PBS gereinigt. Um einen Vergleich mit unbehandelten EMP anzustellen, wurden die Zielzellen jeweils mit unbehandelten als auch ILG-behandelten EMP stimuliert.

In anschließend durchgeführten Zytotoxizitätsmessungen zeigte sich eine signifikante Minderung der Fluoreszenzintensität, entsprechend einer reduzierten Zahl abgestorbener HCASMC und HCAEC, nach Behandlung der EMP mit ILG (HCASMC: EMP +, ILG – gegen EMP +, ILG +; Mean Diff.: 3288; 95 % CI of diff.: 511,1 to 6064; N=11 pro Gruppe ; HCAEC: EMP +, ILG – gegen EMP +, ILG +; Mean Diff.: 1791; 95 % CI of diff.: 943,4 to 2639, N=9-10 pro Gruppe). Durch die Behandlung von EMP mittels eines Inflammasominhibitoren ließen sich so die apoptotischen Effekte reduzieren (Abb. 11)

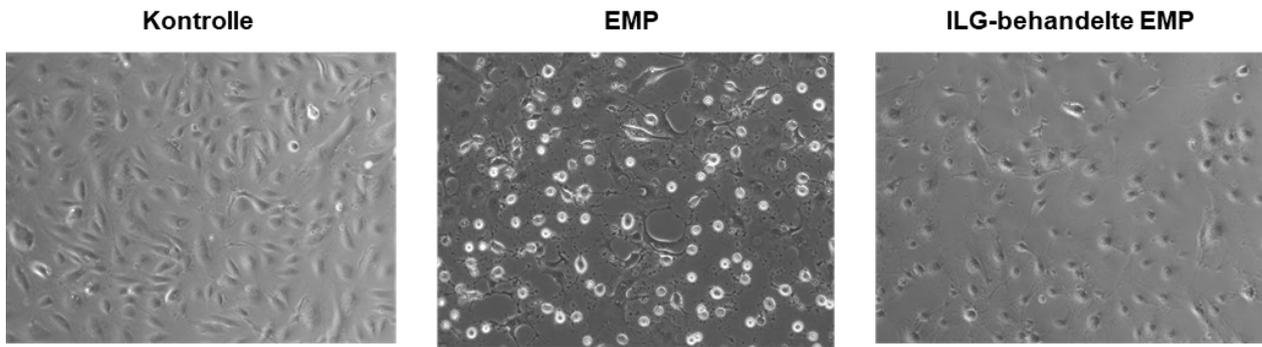


**Abb. 11:** Unterdrückung zytotoxischer Effekte von EMP durch Behandlung mit Inflammasominhibitoren.

EMP wurden mit ILG behandelt und anschließend mit HCASMC (A) und HCAEC (B) für 8 h bzw. 4 h kokubiert. Die Messung der Zytotoxizität erfolgte mithilfe des MultiTox-Fluor Multiplex Cytotoxicity Assay. Abgebildet ist die Fluoreszenzintensität (RFU).

Die Daten sind dargestellt als Mittelwert  $\pm$ SEM. HCASMC n=11 pro Gruppe, HCAEC n=9-10 pro Gruppe, \* $p < 0,05$ .

Auch morphologisch ergab sich ebenfalls Anhalt für eine Reduktion der zytotoxischen Effekte unter vorgenannter Behandlung. Lichtmikroskopisch konnte so bspw. eine Reduktion der pyroptischen Veränderungen der HCAEC zur Darstellung gebracht werden (Abb. 12).



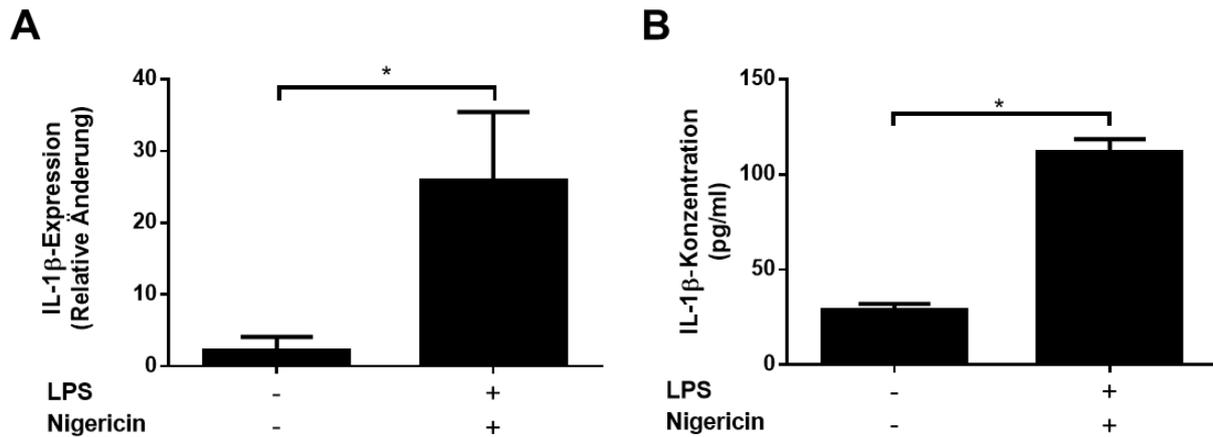
**Abb. 12:** Lichtmikroskopische Darstellung des Einflusses einer ILG-Behandlung auf die pyroptischen Effekte von EMP  
HCAEC wurden für 4h mit EMP bzw. ILG-behandelten EMP behandelt. Nach Ablauf der entsprechenden Stimulationsdauer wurden lichtmikroskopische Aufnahmen durchgeführt. Vergrößerung: 20 x.

### 3.5 Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms in HCASMC vermittelt die Ausschüttung von Mikropartikeln

Glatte arterielle Muskelzellen sind von der Freisetzung von MP nicht ausgeschlossen. Nachdem in Vorversuchen zu dieser Arbeit bereits erfolgreich gezeigt werden konnte, dass HCAEC infolge einer Inflammasomaktivierung Mikropartikel freisetzen, konnte nun in HCASMC eine durch diese Mikropartikel vermittelte Inflammasomaktivierung dargestellt werden.

Aufgrund dieser Beobachtung war es für uns von Interesse zu prüfen, ob HCASMC ebenso durch Aktivierung des Inflammasoms Mikropartikel freisetzen.

Zu diesem Zweck wurden HCASMC auf konventionelle Weise mit LPS und Nigericin stimuliert. Der Nachweis einer Aktivierung des Inflammasoms wurde mithilfe von RTD-PCR-Experimenten und IL-1 $\beta$ -ELISA erbracht, welche eine Hochregulation und vermehrte Ausschüttung von IL-1 $\beta$  abbildeten (Abb. 13). Der Unterschied zur unbehandelten Kontrollgruppe war hierbei signifikant (RTD-PCR IL-1 $\beta$ :  $2,173 \pm 0,6388$ ; N=9 gegen  $25,84 \pm 9,600$ ; N=7;  $p=0,0138$ ; ELISA IL-1 $\beta$  (pg/ml):  $28,76 \pm 3,277$ ; N=18 gegen  $111,8 \pm 6,757$ ; N=18;  $p<0,0001$ ).



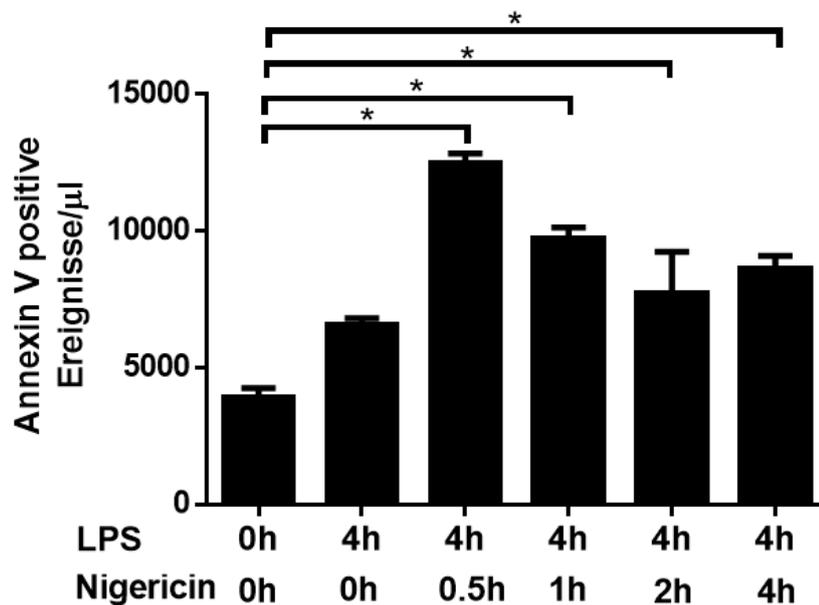
**Abb. 13:** Aktivierung des Inflammasoms in HCASMC

HCASMC wurden mit LPS (1 µg/ml) für 4 h vorbereitet und anschließend für weitere 4 h mit Nigericin (20 µM) stimuliert. Die Expression von IL-1β wurde mithilfe RTD-PCR untersucht (A). Zur Bestimmung der Sekretion von IL-1β wurden ELISA-Experimente durchgeführt (B). Die Daten sind dargestellt als Mittelwert ±SEM. RTD-PCR n=7-9 pro Gruppe, ELISA: n=18 pro Gruppe, \*p<0,05.

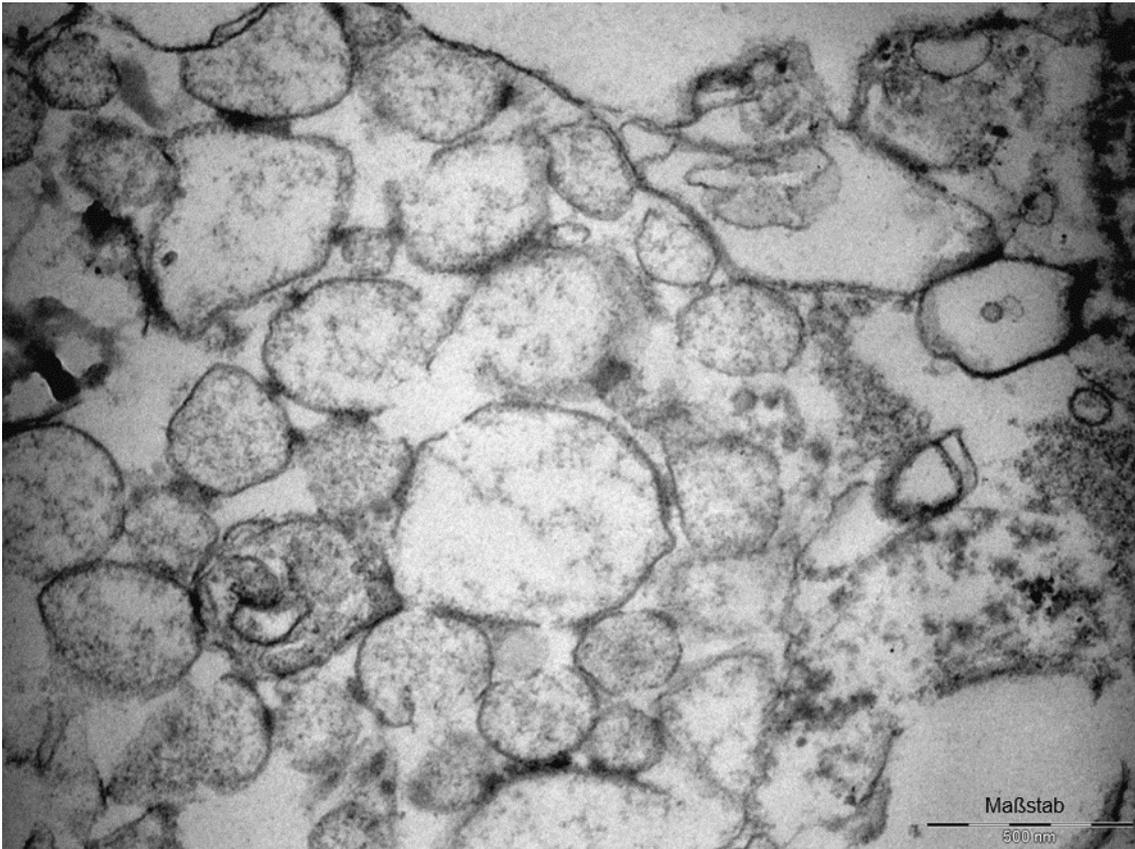
Zur Prüfung einer durch die Inflammasomaktivierung hervorgerufenen Abspaltung von MP wurde anschließend der Überstand auf das Vorkommen selbiger untersucht. Hierzu wurden MP isoliert und durchflusszytometrischen Untersuchungen unterzogen. Durch AnnexinV-Färbung des auf der Oberfläche von MP vermehrt exponierten Phosphatidylserin ließ sich eine gesteigerte Freisetzung von MP demonstrieren (Abb. 14). So zeigte sich nach 30-minütiger Stimulation mit Nigericin nach abgeschlossenem Priming der Zellen mit LPS die höchste Zahl von Mikropartikeln. Im weiteren Verlauf der Untersuchung ließen sich ebenfalls in Relation zur unbehandelten Kontrolle signifikant erhöhte Zahlen von Mikropartikeln bestimmen (Tab. 7). Die Analyse der Messwerte erfolgte mittels Dunnett's multiple comparisons test.

**Tab. 7:** Statistische Auswertung der Ausschüttung von MP durch Inflammasom-aktivierte HCASMC

	Mean Diff.	95 % CI of diff.
Kontrolle gegen 4 h LPS + 0 h Nigericin	- 2700	- 5414 to 14,55
Kontrolle gegen 4 h LPS + 0,5 h Nigericin	- 8565	- 11280 to -5851
Kontrolle gegen 4 h LPS + 1 h Nigericin	- 5801	- 8515 to -3087
Kontrolle gegen 4 h LPS + 2 h Nigericin	- 3802	- 6516 to -1088
Kontrolle gegen 4 h LPS + 4 h Nigericin	- 4716	- 7430 to -2001

**Abb. 14:** Ausschüttung von MP durch Inflammasom-aktivierte HCASMC  
HCASMC wurden mit LPS (1 µg/ml) und Nigericin (20 µM) für die angezeigten Zeiträume stimuliert. Die Ausschüttung von Mikropartikeln wurde mithilfe Durchflusszytometrie bestimmt. Die Daten sind dargestellt als Mittelwert ±SEM. n=6 pro Gruppe, \*p<0,05.

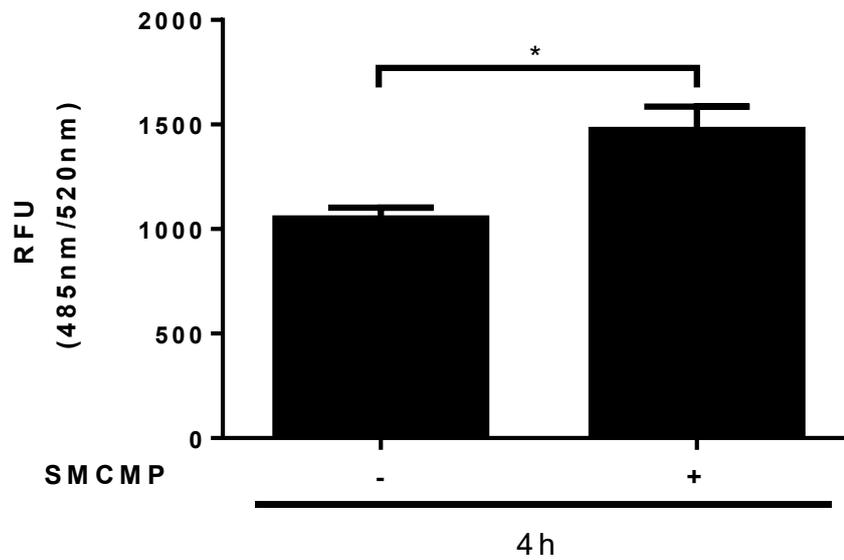
Zuletzt erfolgte eine weitere Charakterisierung der SMCMP unter Zuhilfenahme elektronenmikroskopischer Techniken. Hier stellten sich die MP in der für sie charakteristischen Größe von 100-1000 nm dar (Abb. 15).



**Abb. 15:** Elektronenmikroskopische Darstellung von SMCMP  
 HCASMC wurden mit LPS (1  $\mu\text{g/ml}$ ) für 4 h vorbereitet und anschließend für weitere 4 h mit Nigericin (20  $\mu\text{M}$ ) stimuliert. SMCMP wurden aus dem Überstand isoliert und mittels Elektronenmikroskopie zur Darstellung gebracht.

### 3.6 Mikropartikel Inflammasom-aktivierter glatter Muskelzellen vermitteln zytotoxische Effekte

Um zuletzt der Hypothese nachzugehen, ob SMCMP korrespondierend zu EMP zellschädigende Effekte vermitteln, wurden HCAEC mit SMCMP stimuliert und anschließend eine Zytotoxizitätsmessung durchgeführt. Es zeigte sich hierbei erneut die Apoptose-induzierende Wirkung von Mikropartikeln Inflammasom-aktivierter Zellen (Abb. 16). Die Ergebnisse waren signifikant (RFU:  $1051 \pm 51,29$  gegen RFU:  $1473 \pm 112,7$ ; N=6 pro Gruppe,  $p=0,0066$ ).



**Abb. 16:** Bestimmung der Zytotoxizität von SMCMP-behandelten HCAEC  
HCAEC wurden für 4 h mit MP Inflammasom-aktivierter HCASMC behandelt. Die Messung der Zytotoxizität erfolgte mithilfe des MultiTox-Fluor Multiplex Cytotoxicity Assay. Dargestellt ist die Zunahme der Fluoreszenzintensität (RFU).  
Die Daten sind dargestellt als Mittelwert  $\pm$ SEM. n=6 pro Gruppe, \*p<0,05.

## 4. Diskussion

### 4.1 Einleitung

Mit der vorliegenden Forschungsarbeit kann aufgezeigt werden, dass eine Inflammasomaktivierung in Endothelzellen durch mikropartikelvermittelte, interzelluläre Kommunikation übertragbar ist und in den Empfängerzellen den Zelltod hervorruft.

Wird die vaskuläre Homöostase durch inflammatorische Stimuli aus dem Gleichgewicht gebracht, so sind es typischerweise Endothelzellen, die unmittelbar durch eine erhöhte Expression zellulärer Adhäsionsmoleküle wie ELAM-1 oder VCAM reagieren, und somit die Bindung durch Monozyten erlauben (Bevilacqua MP et al., 1987; Li et al., 1993). Ebenso erfolgt durch Endothelzellen die Bildung und Freisetzung von IL-1 $\beta$ , welches im Rahmen kardiovaskulärer Erkrankungen wiederum eine Vielzahl schädlicher Effekte nach sich zieht (Bujak und Frangogiannis, 2009; Galea et al., 1996). Grundlegend hierfür ist die bei der Atherosklerose charakteristischerweise vorzufindende Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms (Bujak und Frangogiannis, 2009; Varghese et al., 2016).

In Voruntersuchungen der Arbeitsgruppe gelang es eine solche Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms durch Stimulation mit Inflammasomaktivatoren zu erzielen, und eine damit einhergehend erhöhte Expression und Produktion proinflammatorischer Mediatoren zu demonstrieren.

Ein weiterer Mechanismus, durch welchen Endothelzellen zur Atherogenese beitragen, ist die Freisetzung von MP (Paudel et al., 2016). Zahlreiche Regulatoren dieses Signaltransduktionsmechanismus konnten bereits offengelegt werden, darunter TNF- $\alpha$ , CRP, Thrombin, Plasminogen activator inhibitor-1, urämische Toxine oder Scherstress (Dignat-George und Boulanger, 2011). Dank der Vorarbeiten innerhalb der Arbeitsgruppe konnte eine Freisetzung von MP durch Endothelzellen infolge Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms demonstriert werden. Darüber hinaus konnte in nachfolgenden Untersuchungen zur Charakterisierung der EMP beleuchtet werden, dass diese aktive Caspase-1 enthalten.

## 4.2 EMP von Inflammasom-aktivierten Endothelzellen werden von vaskulären Zellen inkorporiert

Endothelzellen sind sowohl als Auskleidung aller Gefäße, als auch als Regulator des Stoffaustauschs, der Gerinnung und des Blutdrucks kontinuierlich dem Blutstrom und damit MP exponiert. Gleiches gilt jedoch auch für glatte Muskelzellen, welche durch das Auftreten superfizieller Erosionen oder Plaque-Ruptur regelmäßig dem Blutstrom ausgesetzt sind. Als Grundlage der Signalübermittlung ist neben dieser systemischen Kommunikation auch die Möglichkeit einer parakrinen Kommunikation anzunehmen (Arderiu et al., 2015).

Ein charakteristischer, der Signalübermittlung durch MP zugrundeliegender Mechanismus, ist hierbei die Aufnahme der MP durch ihre Zielzellen mittels Clathrin-abhängiger sowie Clathrin-unabhängiger Endozytose (Mathieu et al., 2019).

Der Nachweis der Inkorporation von EMP durch ihre Zielzellen, HCASMC und HCAEC, gelang durch immunhistochemische Färbungen mithilfe der Membranfarbstoffe PKH 26 und PKH67. Durch anschließend durchgeführte mikroskopische Untersuchungen konnte die Aufnahme der EMP zur Darstellung gebracht werden. Validiert wurde die tatsächliche Aufnahme der Mikropartikel dabei zum einen durch mehrfache Waschung der Präparate vor ihrer Fixierung, zum anderen durch Z-Stapel aufnahmen, welche eine dreidimensionale Darstellung der jeweiligen Zielzellen gestatteten.

Bei Stimulation der Zielzellen für verschiedene Zeiträume zeigte sich, korrespondierend zu den Ergebnissen von Jansen et. al (Jansen et al., 2012), neben der Aufnahme von EMP durch Endothelzellen zusätzlich eine zeitabhängige Aufnahme selbiger. In Kontrast zu den Ergebnissen von Desai et al. (1997) zur Untersuchung der Aufnahme bioabbaubarer Polylactid-co-Glycolid-Mikropartikel (PLGA) durch Caco-2-Zellen ließ sich im Rahmen dieses Projektes kein etwaiger zeitabhängiger Plateau-Effekt darstellen. Anzumerken ist jedoch, dass es sich bei PLGA-Mikropartikeln um ein Drug-Carrier-System handelt und dieses somit gänzlich anderen Stoffwechselschritten unterworfen sein könnte.

Beruhend auf den ausgeprägten zellschädigenden Wirkungen von EMP hätte sich eine über den angewandten Beobachtungszeitraum hinausreichende Inkubationszeit vermutlich auch als nicht weiter aufschlussreich gezeigt.

### 4.3 EMP beeinträchtigen zelluläre Funktionen

Die Rolle der EMP ist im Rahmen der Atherosklerose als ambig zu verstehen. Während zahlreiche Untersuchungen die prothrombotischen und -inflammatorischen Eigenschaften von EMP demonstrieren konnten, gelang es in anderen Studien ihre reparativen und antiapoptotischen Eigenschaften zu beleuchten (Dignat-George und Boulanger, 2011; Jansen et al., 2013b; Jansen et al., 2012). Eine Erklärung dieses Zusammenhangs findet sich darin, dass EMP als Produkt eines selektiven Zusammenbaus zu verstehen sind, der sich abhängig zeigt vom spezifischen Stimulus der Mikropartikelfreisetzung und der Mikroumwelt der Ursprungszelle (Mause und Weber, 2010).

Aufgrund der proinflammatorischen und proapoptotischen Funktion der von EMP enkapsulierten Caspase-1 richtete sich der Fokus der vorliegenden Untersuchungen zunächst auf potentielle zellschädigende Einflüsse (Broz und Dixit, 2016).

Eine zellschädigende Wirkung von EMP ließ sich mithilfe mehrerer Methoden verifizieren. Nach Stimulation von HCASMC mit EMP konnte so unter Verwendung von Viability Assays eine signifikante Reduktion der Lebensfähigkeit der Zielzellen beleuchtet werden. Korrespondierend dazu zeigte sich nach Behandlung von HCAEC mit EMP eine Zunahme der Zytotoxizität. Weiterhin beobachteten wir unter Zuhilfenahme von Scratch Assays, dass es infolge der Behandlung von HCASMC mit EMP zu einer Erweiterung der initial zugefügten Läsion gekommen war, während sich bei der unbehandelten Gruppe eine Schließung derselbigen zeigte.

Eine proapoptotische Wirkung von Mikropartikeln ließ sich bereits in verschiedenen Studien zur Darstellung bringen. Eine Studie an 36 Patienten, welche infolge eines Herzstillstandes erfolgreich reanimiert wurden, konnte so neben einer Zunahme von MMP, PMP und EMP-Zell-Konjugaten eine Zelltod-fördernde Wirkung der MP offenlegen. Eine genauere Differenzierung der MP-Gattungen mit Betrachtung von möglicherweise untereinander differierenden Effekten erfolgte dabei jedoch nicht (Fink et al., 2011).

Betreffend der MMP konnte eine weitere Studie die proapoptotischen Wirkungen selbiger beleuchten. MMP wurden dabei durch das Hungern von THPs bzw. durch sequenzielle Stimulation mittels LPS und der Kalzium-Ionophore A23187 generiert. Es zeigte sich dabei in beiden Fällen ein proapoptotischer Effekt auf EC.

Zwar konnten im Rahmen der vorgenannten Studie korrespondierend zu den Resultaten dieser Arbeit proapoptotische Effekte endotoxinvermittelter Mikropartikel detektiert werden, jedoch erfolgte in diesem Fall nicht der Nachweis einer etwaigen Inflammasomaktivierung. Weiterhin beschränkte sich die Charakterisierung der Mikropartikel auf das Vorkommen von TF und konnte nicht näher den Mechanismus zur Initiation der Apoptose der EC beleuchten (Aharon et al., 2008). Anzumerken bleibt, dass es sich im Falle der vorgenannten Studie am Ehesten nicht um eine Inflammasomvermittelte MP-Freisetzung handelt. So konnte nämlich gezeigt werden, dass ein durch  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionophoren bzw.  $\text{Ca}^{2+}$ -mobilisierende G-Protein-gekoppelte Rezeptoren erhöhtes zytosolisches  $\text{Ca}^{2+}$  kein suffizientes Signal für eine Inflammasomaktivierung darstellt. Ein  $\text{K}^+$ -Efflux, wie er beispielsweise durch Nigericin hervorgerufen wird, erfüllt diese Bedingung hingegen (Katsnelson et al., 2015).

Weitere Untersuchungen bezüglich proapoptotischer Effekte von Mikropartikeln konnten in einem Nager-Modell zur chronischen zerebralen Hypoperfusion erhöhte Konzentration Caspase-3 haltiger Mikropartikel nachweisen. Diese konnten in mikrovaskulären Endothelzellen und Nierenzellen den Zelltod hervorrufen. Die proapoptotischen Effekte wurden dabei durch Behandlung mit Caspase-3-Inhibitoren reduziert (Schock et al., 2014).

Obwohl Caspase-3 als Mediator des intrinsischen und extrinsischen Apoptose-Wegs nicht unmittelbar einem inflammatorischen Zelltod zuzuordnen ist, zeigen jüngste Untersuchungen jedoch zahlreiche Gemeinsamkeiten in der Endstrecke des Zelltodes. Während Gasdermin D durch Caspase-1 zur Induktion der Pyroptose infolge Inflammasomstimulation aktiviert wird, so wird Gasdermin E durch Caspase-3 zur Induktion der Pyroptose wegen des Auftretens der Apoptose aktiviert. Bemerkenswerterweise stellt Gasdermin D dabei einen zusätzlichen Aktivator von Caspase-3 dar (Rogers et al., 2019).

Ein zur vorliegenden Arbeit kongruenter Befund zur Rolle Caspase-1-haltiger Mikropartikel konnte jedoch in einem Modell zur Acute lung injury/Acute respiratory distress syndrome ((ALI/ARDS) gewonnen werden. Hierbei wurden Caspase-1-haltige Mikropartikel aus dem Überstand LPS-stimulierter THP-1s gewonnen. Bei nachfolgender Behandlung von Endothelzellen zeigte sich dabei die Induktion des Zelltodes (Mitra et al., 2015).

Methodisch ist anzumerken, dass in dieser Forschungsarbeit im Rahmen des Scratch Assays entgegen der weitverbreiteten Praxis des Einsatzes eines reduziert-supplementierten Wachstumsmediums zur Minimierung der Zell-Proliferation stattdessen der Einsatz eines Vollmediums erfolgte (Liang et al., 2007). Beweggründe waren hierbei zum einen die Vermeidung eines zur Wirkung der EMP potentiell additiven Einflusses auf Apoptose und Zellablösung, sowie zum anderen das Interesse sowohl Migration als auch Proliferation gleichzeitig beurteilen zu wollen, da sie Prozesse sind, die gleichermaßen zur Atherogenese beitragen.

In Anbetracht unterschiedlich ausgeprägter Proliferationsindizes in frühen und späten atherosklerotischen Läsionen und der damit einhergehenden pathologischen Implikationen könnte sich eine gesonderte Unterteilung dieser Prozesse für zukünftige Untersuchungen dennoch als nützlich darstellen (Bennett et al., 2016).

#### 4.4 EMP induzieren eine inflammatorische Reaktion in vaskulären Zellen

Die Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms ist ein ausführlich untersuchter Prozess, der durch eine Vielzahl verschiedener Stimuli initiiert wird. Darunter fallen Bakterien, Viren, Zytokine, physikalischer und oxidativer Stress, Medikamente sowie viele weitere Mediatoren (Pahl, 1999).

Durch den Nachweis einer erhöhten Expression der NF- $\kappa$ B-regulierten Gene NLRP3, IL-1 $\beta$ , VCAM und ICAM durch HCASMC und HCAEC, sowie durch den Nachweis einer gesteigerten Sekretion von IL-1 $\beta$  durch HCASMC konnte der Beweis einer Inflammasomaktivierung infolge einer Stimulation mit Mikropartikeln Inflammasom-aktivierter Zellen nun in dieser Untersuchung erbracht werden (Broz und Dixit, 2016; Pahl, 1999; Qiao et al., 2012).

Eine NF- $\kappa$ B-induzierende Wirkung konnte bereits für verschiedene Gattungen von Mikropartikeln nachgewiesen werden. In einer Studie von Tesse et. al (2005) an MP von apoptotischen T-Zellen von Diabetes Mellitus Patienten konnte so beispielsweise eine Fas/FasL-medierte Aktivierung des NF- $\kappa$ B-Stoffwechselfads nachgewiesen werden. Es

zeigte sich dabei eine vaskuläre Hyporeaktivität infolge einer reduzierten Expression von NOS und COX-2. Die Autoren nahmen dabei einen partiellen Schutz vor den zytotoxischen Effekten der Fas/FasL-Interaktion durch erhöhte Konzentrationen von NO an. Obwohl hierbei eine zur vorliegenden Untersuchung ähnliche Interaktion beleuchtet werden konnte, sind die Komponenten der MP der Studie nicht vollständig beschrieben. Weiterhin bleibt offen, durch welchen genauen Mechanismus die Apoptose der T-Zellen induziert wurde. Eine Apoptose der Zielzellen wurde nicht beschrieben.

Doch auch hinsichtlich der Ausschüttung Inflammasom-regulierter Mediatoren durch die Einwirkung von Mikropartikeln konnten bereits Erkenntnisse gewonnen werden. Untersuchungen von Scanu et al. (2008) konnten dabei demonstrieren, dass MP stimulierte T-Zellen in der Lage sind die Freisetzung von TNF und IL-1 $\beta$  durch Monozyten zu induzieren. Während es ihnen dabei gelang die antiinflammatorische Wirkung von HDL in der Behandlung der Zielzellen offenzulegen und zu zeigen, dass die MP TNF aber kein IL-1 $\beta$  enthielten, blieben die zugrundeliegenden Mechanismen ihrer Beobachtungen zu weitesten Teilen unbeleuchtet.

Ein weiterer Aktivator des NF- $\kappa$ B-Stoffwechselwegs, welcher durch die Vorarbeiten der Arbeitsgruppe als Bestandteil Inflammasom-aktivierter EMP eruiert werden konnte, ist jedoch Caspase-1 selber. Anhalt für eine mögliche Interaktion der Caspase-1 mit den Zielzellen gibt hier die Arbeit von Lamkanfi et al. (2004) welche die Aktivierung des Promotors NF- $\kappa$ Bs durch Interaktion der Caspase-recruitment domain mit RIP2 offenlegen konnte.

#### 4.5 Die Behandlung von EMP mit Inflammasomeninhibitoren reduziert schädliche zelluläre Effekte

Um nun zu untersuchen, ob eine Übertragung des NLRP3-Inflammasoms als Ursache der schädlichen biologischen Effekte bestimmt werden könnte, wurde nun der NLRP3-Inflammasominhibitor ILG zur Behandlung isolierter Mikropartikel eingesetzt. Dabei stellte sich eine Reduktion der zytotoxischen Effekte infolge der Behandlung der EMP mit ILG dar.

ILG stellt als Substanz eine Chalkon dar, welches aus chinesischem Süßholz (*Glycyrrhiza uralensis*) gewonnen wird (Honda et al., 2014). Für ILG ist beschrieben, dass es neben antiinflammatorischen ebenso antikarzinogene als auch antihistaminische Effekte vermittelt. Der Wirkung ILGs liegt dabei mechanistisch die Inhibition der Translokation und Aktivierung von NF- $\kappa$ B durch Blockierung der Phosphorylierung und nachfolgender Degradation von „nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha“ ( $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ ) zugrunde (Kumar et al., 2007). Weiterhin stellt ILG einen Inhibitor des NLRP3-Inflammasoms auf Ebene von NLRP3 bzw. Upstream dar (Honda et al., 2014).

Anzumerken ist, dass die vorliegende Untersuchung nicht genau differenzieren kann, auf welchen spezifischen Bestandteil des Inflammasoms die Inhibition durch ILG abzielt. Ein weiteres Ziel könnte eine TNF- $\alpha$ -induzierte Produktion ROS verkörpern (Kumar et al., 2007).

Trotz dieser Limitation zeigt sich die Arbeit dabei jedoch in Einklang mit der 2014 erschienenen Studie von Exline et al., (2014) zur proapoptotischen Rolle Caspase-1-haltiger MP aus dem Blut von Patienten mit Sepsis. Gleichermäßen konnte eine im Folgejahr veröffentlichte Untersuchung zur Wirkung von Caspase-1-haltigen MP ebenfalls Apoptose-induzierende Effekte im Rahmen eines ARDS-Modells belegen (Mitra et al., 2015). In beiden Fällen gelang es dabei durch den Einsatz des Caspase-1-spezifischen Inhibitors YVAD-CMK die Apoptose der jeweiligen Zielzellen um 30% bzw. 50% zu reduzieren (Exline et al., 2014; Mitra et al., 2015).

#### 4.6 Inflammasom-aktivierte glatte Muskelzellen setzen MP frei

Da MP als ubiquitärer Kommunikationsmechanismus fungieren, erfolgte zuletzt die Prüfung, ob eine Freisetzung von MP durch HCASMC infolge einer Inflammasomaktivierung zu erzielen sei. Dabei zeigte sich infolge der erfolgreichen Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms mittels LPS und Nigericin eine erhöhte Freisetzung von MP. Kongruent zu MP Inflammasom-aktivierter EC zeigten sich diese in der Lage zytotoxische Effekte auszuüben.

Anzumerken ist, dass hierbei keine nähere Charakterisierung der MP erfolgt ist. Obwohl die beobachteten Effekte ein zu den EMP ähnliches Erscheinungsbild nahelegt, sollten zukünftig nähere Untersuchungen zum Zusammenbau der SMCMP ebenfalls nützlich sein, differentielle Packvorgänge verschiedener Zelltypen aufzuklären.

#### 4.7 Einordnung der Rolle der EMP

Da beobachtet werden konnte, dass EMP zytotoxische Effekte auf ihre Zielzellen ausüben, stellt sich gezwungenermaßen die Frage, welche Bedeutung dies für die Atherosklerose hat, bei der die Apoptose von Endothelzellen und glatten Muskelzellen ein grundlegender Mechanismus ist.

Infolge der Apoptose von Endothelzellen kommt es zu einer Störung der Barrierefunktion derselbigen mit nachfolgender Infiltration durch Leukozyten und Ablagerung von LDL. Weiterhin entsteht ein prokoagulant Milieu durch eine Umverteilung Phosphatidylserin auf die Zelloberfläche bei einem gleichzeitig auftretendem Verlust antikoagulativer Faktoren wie Thrombomodulin oder „Tissue factor pathway inhibitor“ (TFPI). Durch das erhöhte Risiko einer Thrombusbildung trägt dieser Mechanismus zu einem erhöhten Risiko einer vaskulären Okklusion bei (Paone et al., 2019).

Im Atherom wohnt glatten Muskelzellen als Hauptproduzent der extrazellulären Matrix eine stabilisierende Funktion inne. Während anzunehmen ist, dass die Apoptose glatter Muskelzellen zu einer Reduktion der Plaquelast in frühen Stadien der Erkrankung führt, so ist es gleichermaßen ein Risikofaktor für Plaqueruptur in späteren Stadien (van der Wal, 1999). Abgesehen von dem erhöhten Risiko einer Plaqueruptur, fördert die Apoptose glatter Muskelzellen vaskuläre Kalzifikation, Koagulation und die aneurysmatische Degeneration der Gefäße (Flynn et al., 1997; López-Candales et al., 1997; Proudfoot et al., 2000).

Einen Hinweis auf einen Zusammenhang erhöhter Zahlen zirkulierender MP und dem Auftreten kardiovaskulärer Ereignisse konnte dabei schon in verschiedenen Studien gezeigt werden. Bei Untersuchungen an Patienten mit stabiler KHK konnten so bspw. CD31<sup>+</sup>/annexin V<sup>+</sup>-MP als Prädiktoren für das Auftreten von major adverse cardiovascular and cerebral event (MACCE) dargestellt werden (Sinning et al., 2011). Es wurde entdeckt,

dass CD31<sup>+</sup>/annexin V<sup>+</sup>-MP bei Patienten mit KHK mit Endothelzellapoptose und -dysfunktion korrelieren (Werner et al., 2006). Ein ähnlicher Zusammenhang konnte von Nozaki et al. (2009) in einer weiteren Studie dargestellt werden, welche CD144-EMP als unabhängigen Prädiktor für kardiovaskuläre Ereignisse bei Patienten mit hohem Risiko für KHK identifizierte.

Obwohl zunächst angenommen wurde, dass die Rolle der Caspase-1 als eher insignifikant zu betrachten sei, da sich die Entwicklung Caspase-1-defizienter Mäuse als unbeeinträchtigt zeigte, gibt es zunehmende Evidenz für die fundamentale Rolle der Caspase-1 als Mediator von Atherosklerose und Pyroptose (Düwell et al., 2010; Guo et al., 2006; Hendriks et al., 2015; Kuida et al., 1995; Shi et al., 2017; Usui et al., 2012).

Bereits in 1995 gelang es Y.J. Geng und P. Libby die Kollokalisierung von Caspase-1 in apoptotischen Zellen des fortgeschrittenen menschlichen Atheroms darzustellen. Während sie nur annehmen konnten, dass Caspase-1 zum Zelltod durch die Bildung von IL-1 $\beta$  beigetragen hatte, hat man heute ein besseres Verständnis der durch Caspase-1 initiierten proapoptotischen Vorgänge (Geng und Libby, 1995).

Untersuchungen, ob apoptotische Zellen des Atheroms nicht nur höhere Konzentrationen von Caspase-1, sondern auch Zellmarker, übertragen von Mikropartikeln anderer Zellen, darbieten, könnte Licht darauf werfen, ob die in vitro gewonnenen Erkenntnisse dieser Forschungsarbeit auf den Menschen übertragbar sind. Dies sollte Gegenstand zukünftiger Untersuchungen sein.

## 5. Zusammenfassung

MP, freigesetzt von Inflammasom-aktivierten Endothelzellen, werden von Endothelzellen und glatten Muskelzellen inkorporiert, was zu einer Reduktion ihrer Lebensfähigkeit sowie ihrer Fähigkeit zu migrieren und proliferieren führt. Damit einhergehend stellt sich eine Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms dar, was aufzeigt, dass MP selbst in der Lage sind, eine Inflammasomaktivierung zu initialisieren. Bemerkenswerterweise werden die zytotoxischen Effekte von MP durch die Behandlung mittels eines Inflammasominhibitors reduziert. Dies signalisiert, dass Inflammasombestandteile innerhalb der MP für die apoptotischen Effekte verantwortlich zu machen sind.

Diese Resultate unterstreichen die immunologische Rolle der Endothelzellen und zeigen auf, dass eine Inflammasomaktivierung durch MP-vermittelte interzelluläre Kommunikation übertragbar ist und in den Empfängerzellen den Zelltod hervorruft.

Es ist demzufolge anzunehmen, dass MP, die infolge von Inflammasomaktivierung freigesetzt werden, eine wesentliche Rolle in der Entstehung und Progression der Atherosklerose innehaben.

Mithilfe dieses Forschungsprojektes ist es somit gelungen, die Wissenslücke bezüglich des Zusammenhangs vermehrter Aktivierung des Inflammasoms und erhöhter Zahlen zirkulierender MP bei Patienten mit kardiovaskulären Erkrankungen weiter zu überbrücken. Zudem erlaubt sie Rückschlüsse auf biologische Effekte, mit denen MP Krankheitsentstehung und Progression vorantreiben.

Es gibt jedoch weiterhin Herausforderungen und Fragen, denen es sich zu stellen gilt. Von besonderem Interesse sollte es sein, die Einflussfaktoren der Freisetzung von Caspase-1-haltigen MP genauer zu beleuchten, besonders im Hinblick auf Erkrankung, Krankheitsstadium oder auch Medikation, um ein besseres Verständnis für die Beeinflussbarkeit der MP-Freisetzung und ihre Wirkung auf den Krankheitsprogress zu erlangen.

## 6. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Mechanismus der Aktivierung des NRLP3-Inflammasoms .....	22
Abb. 2: Lichtmikroskopische Darstellung der Pyroptose von Inflammasom-aktivierten HCAEC.....	54
Abb. 3: Untersuchung der Inkorporation von EMP in HCASMC.....	55
Abb. 4: Untersuchung der Inkorporation von EMP in HCAEC.....	56
Abb. 5: Bestimmung der Lebensfähigkeit EMP-behandelter HCASMC .....	57
Abb. 6: Bestimmung der Zytotoxizität von EMP-behandelten HCAEC.....	58
Abb. 7: Scratch Assay EMP-behandelter HCASMC.....	59
Abb. 8: Genexpression EMP-behandelter HCASMC .....	60
Abb. 9: IL-1 $\beta$ -Ausschüttung durch EMP-stimulierte HCASMC .....	61
Abb. 10: Genexpression EMP-behandelter HCAEC .....	62
Abb. 11: Unterdrückung zytotoxischer Effekte von EMP durch Behandlung mit Inflammasominhibitoren .....	63
Abb. 12: Lichtmikroskopische Darstellung des Einflusses einer ILG-Behandlung auf die pyroptotischen Effekte von EMP.....	64
Abb. 13: Aktivierung des Inflammasoms in HCASMC.....	65
Abb. 14: Ausschüttung von MP durch Inflammasom-aktivierte HCASMC.....	66
Abb. 15: Elektronenmikroskopische Darstellung von SMCMP.....	67
Abb. 16: Bestimmung der Zytotoxizität von SMCMP-behandelten HCAEC.....	68

## 7. Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Aktuelle Systeme zur Einschätzung des kardiovaskulären Risikos von offenbar gesunden Personen .....	18
Tab. 2: Laborgeräte.....	36
Tab. 3: Ansatz des Master-Mix.....	45
Tab. 4: Ablauf eines Amplifikationszyklus .....	46
Tab. 5: Untersuchte Zielgene .....	47
Tab. 6: Ansatz des rekombinanten humanen IL-1 $\beta$ -Standard .....	48
Tab. 7: Statistische Auswertung der Ausschüttung von MP durch Inflammasom-aktivierte HCASMC.....	66

## 8. Literaturverzeichnis

Aharon A, Tamari T, Brenner B. Monocyte-derived microparticles and exosomes induce procoagulant and apoptotic effects on endothelial cells. *Thromb Haemost.* 2008. 100: 878–885

Almquist T, Mobarrez F, Jacobson SH, Wallén H, Hjendahl P. Effects of lipid-lowering treatment on circulating microparticles in patients with diabetes mellitus and chronic kidney disease. *Nephrol. Dial. Transplant.* 2016. 31: 944–952

Arderiu G, Peña E, Badimon L. Angiogenic microvascular endothelial cells release microparticles rich in tissue factor that promotes postischemic collateral vessel formation. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology.* 2015. 35: 348–357

Bennett MR, Sinha S, Owens GK. Vascular Smooth Muscle Cells in Atherosclerosis. *Circulation research.* 2016. 118: 692–702

Bentzon JF, Otsuka F, Virmani R, Falk E. Mechanisms of plaque formation and rupture. *Circulation research.* 2014. 114: 1852–1866

Bevilacqua MP, Pober JS, Mendrick DL, Cotran RS, Gimbrone Jr. MA. Identification of an inducible endothelial-leukocyte adhesion molecule. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1987. 84: 9238–9242

Blankenberg S, Barboux S, Tiret L. Adhesion molecules and atherosclerosis. *Atherosclerosis.* 2003. 170: 191–203

Boulanger CM, Scoazec A, Ebrahimian T, Henry P, Mathieu E, Tedgui A, Mallat Z. Circulating Microparticles From Patients With Myocardial Infarction Cause Endothelial Dysfunction. *Circulation.* 2001. 104: 2649–2652

Bresalier RS, Sandler RS, Quan H, Bolognese JA, Oxenius B, Horgan K, Lines C, Riddell R, Morton D, Lanas A, Konstam MA, Baron JA. Cardiovascular events associated with rofecoxib in a colorectal adenoma chemoprevention trial. *The New England journal of medicine*. 2005. 352: 1092–1102

Brodsky SV, Zhang F, Nasjletti A, Goligorsky MS. Endothelium-derived microparticles impair endothelial function in vitro. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*. 2004. 286: H1910-5

Broz P, Dixit VM. Inflammasomes: mechanism of assembly, regulation and signalling. *Nature Reviews Immunology*. 2016. 16: 407-420

Bujak M, Frangogiannis NG. The role of IL-1 in the pathogenesis of heart disease. *Archivum immunologiae et therapiae experimentalis*. 2009. 57: 165–176

Bulut D, Becker V, Mügge A. Acetylsalicylate reduces endothelial and platelet-derived microparticles in patients with coronary artery disease. *Canadian journal of physiology and pharmacology*. 2011. 89: 239–244

Chen GY, Nuñez G. Sterile inflammation: sensing and reacting to damage. *Nature reviews. Immunology*. 2010. 10: 826–837

Clarke MCH, Figg N, Maguire JJ, Davenport AP, Goddard M, Littlewood TD, Bennett MR. Apoptosis of vascular smooth muscle cells induces features of plaque vulnerability in atherosclerosis. *Nature Medicine*. 2006. 12: 1075–1080

Cocucci E, Meldolesi J. Ectosomes and exosomes. *Trends in cell biology*. 2015. 25: 364–372

Crescitelli R, Lässer C, Szabó TG, Kittel A, Eldh M, Dianzani I, Buzás EI, Lötvall J. Distinct RNA profiles in subpopulations of extracellular vesicles: apoptotic bodies, microvesicles and exosomes. *Journal of extracellular vesicles*. 2013. 2

Danesh J, Lewington S, Thompson SG, Lowe GDO, Collins R, Kostis JB, Wilson AC, Folsom AR, Wu K, Benderly M, Goldbourt U, Willeit J, Kiechl S, Yarnell JWG, Sweetnam PM, Elwood PC, Cushman M, Psaty BM, Tracy RP, Tybjaerg-Hansen A, Haverkate F, Maat MPM de, Fowkes FGR, Lee AJ, Smith FB, Salomaa V, Harald K, Rasi R, Vahtera E, Jousilahti P, Pekkanen J, D'Agostino R, Kannel WB, Wilson PWF, Tofler G, Arocha-Piñango CL, Rodriguez-Larralde A, Nagy E, Mijares M, Espinosa R, Rodriguez-Roa E, Ryder E, Diez-Ewald MP, Campos G, Fernandez V, Torres E, Marchioli R, Valagussa F, Rosengren A, Wilhelmsen L, Lappas G, Eriksson H, Cremer P, Nagel D, Curb JD, Rodriguez B, Yano K, Salonen JT, Nyysönen K, Tuomainen T-P, Hedblad B, Lind P, Loewel H, Koenig W, Meade TW, Cooper JA, Stavola B de, Knottenbelt C, Miller GJ, Bauer KA, Rosenberg RD, Sato S, Kitamura A, Naito Y, Palosuo T, Ducimetiere P, Amouyel P, Arveiler D, Evans AE, Ferrieres J, Juhan-Vague I, Bingham A, Schulte H, Assmann G, Cantin B, Lamarche B, Després J-P, Dagenais GR, Tunstall-Pedoe H, Woodward M, Ben-Shlomo Y, Davey Smith G, Palmieri V, Yeh JL, Rudnicka A, Ridker P, Rodeghiero F, Tosetto A, Shepherd J, Ford I, Robertson M, Brunner E, Shipley M, Feskens EJM, Kromhout D, Dickinson A, Ireland B, Juzwishin K, Kaptoge S, Lewington S, Memon A, Sarwar N, Walker M, Wheeler J, White I, Wood A. Plasma fibrinogen level and the risk of major cardiovascular diseases and nonvascular mortality. *JAMA*. 2005. 294: 1799–1809

Davalos D, Akassoglou K. Fibrinogen as a key regulator of inflammation in disease. *Seminars in immunopathology*. 2012. 34: 43–62

Davies MJ, Richardson PD, Woolf N, Katz DR, Mann J. Risk of thrombosis in human atherosclerotic plaques: Role of extracellular lipid, macrophage, and smooth muscle cell content. *British heart journal*. 1993. 69: 377–381

Desai MP, Labhassetwar V, Walter E, Levy RJ, Amidon GL. The Mechanism of Uptake of Biodegradable Microparticles in Caco-2 Cells Is Size Dependent. *Pharmaceutical Research*. 1997. 14: 1568–1573

Dhimolea E. Canakinumab. *mAbs*. 2010. 2: 3–13

Diamant M, Tushuizen ME, Sturk A, Nieuwland R. Cellular microparticles: new players in the field of vascular disease? *Eur J Clin Invest*. 2004. 34: 392–401

Dignat-George F, Boulanger CM. The many faces of endothelial microparticles. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2011. 31: 27–33

Doran AC, Meller N, McNamara CA. Role of smooth muscle cells in the initiation and early progression of atherosclerosis. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2008. 28: 812–819

Duewell P, Kono H, Rayner KJ, Sirois CM, Vladimer G, Bauernfeind FG, Abela GS, Franchi L, Nuñez G, Schnurr M, Espevik T, Lien E, Fitzgerald KA, Rock KL, Moore KJ, Wright SD, Hornung V, Latz E. NLRP3 inflammasomes are required for atherogenesis and activated by cholesterol crystals. *Nature*. 2010. 464: 1357–1361

Ewence AE, Bootman M, Roderick HL, Skepper JN, McCarthy G, Epple M, Neumann M, Shanahan CM, Proudfoot D. Calcium phosphate crystals induce cell death in human vascular smooth muscle cells. *Circulation research*. 2008. 103: e28-34

Exline MC, Justiniano S, Hollyfield JL, Berhe F, Besecker BY, Das S, Wewers MD, Sarkar A. Microvesicular caspase-1 mediates lymphocyte apoptosis in sepsis. *PloS one*. 2014. 9: e90968

Falk E, Nakano M, Bentzon JF, Finn AV, Virmani R. Update on acute coronary syndromes: the pathologists' view. *European heart journal*. 2013. 34: 719–728

Ferrari D, Vitiello L, Idzko M, La Sala A. Purinergic signaling in atherosclerosis. *Trends in molecular medicine*. 2015. 21: 184–192

Fink K, Feldbrügge L, Schwarz M, Bourgeois N, Helbing T, Bode C, Schwab T, Busch H-J. Circulating annexin V positive microparticles in patients after successful cardiopulmonary resuscitation. *Critical Care*. 2011. 15: R251

Fink SL, Cookson BT. Apoptosis, pyroptosis, and necrosis: Mechanistic description of dead and dying eukaryotic cells. *Infection and immunity*. 2005. 73: 1907–1916

Flynn PD, Byrne CD, Baglin TP, Weissberg PL, Bennett MR. Thrombin Generation by Apoptotic Vascular Smooth Muscle Cells. *Blood*. 1997. 89: 4378–4384

Furie MB, Mitchell RN. Plaque attack: One hundred years of atherosclerosis in The American Journal of Pathology. *Am J Pathol*. 2012. 180: 2184–2187

Gabriel C, Justicia C, Camins A, Planas AM. Activation of nuclear factor- $\kappa$ B in the rat brain after transient focal ischemia. *Molecular Brain Research*. 1999. 65: 61–69

Galea J, Armstrong J, Gadsdon P, Holden H, Francis SE, Holt CM. Interleukin-1 $\beta$  in Coronary Arteries of Patients With Ischemic Heart Disease. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 1996. 16: 1000–1006

Galis ZS, Sukhova GK, Lark MW, Libby P. Increased expression of matrix metalloproteinases and matrix degrading activity in vulnerable regions of human atherosclerotic plaques. *The Journal of clinical investigation*. 1994. 94: 2493–2503

Galvao J, Davis B, Tilley M, Normando E, Duchon MR, Cordeiro MF. Unexpected low-dose toxicity of the universal solvent DMSO. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2014. 28: 1317–1330

Geng YJ, Libby P. Evidence for apoptosis in advanced human atheroma. Colocalization with interleukin-1 beta-converting enzyme. *Am J Pathol*. 1995. 147: 251–266

Goichot B, Grunebaum L, Desprez D, Vinzio S, Meyer L, Schlienger JL, Lessard M, Simon C. Circulating procoagulant microparticles in obesity. *Diabetes & Metabolism*. 2006. 32: 82–85

Gordon C, Gudi K, Krause A, Sackrowitz R, Harvey B-G, Strulovici-Barel Y, Mezey JG, Crystal RG. Circulating Endothelial Microparticles as a Measure of Early Lung Destruction in Cigarette Smokers. *Am J Respir Crit Care Med*. 2011. 184: 224–232

Grootaert MOJ, Moulis M, Roth L, Martinet W, Vindis C, Bennett MR, Meyer GRY de. Vascular smooth muscle cell death, autophagy and senescence in atherosclerosis. *Cardiovascular Research*. 2018. 114: 622–634

Guo H, Callaway JB, Ting JP-Y. Inflammasomes: mechanism of action, role in disease, and therapeutics. *Nature Medicine*. 2015. 21: 677 EP -

Guo H, Pétrin D, Zhang Y, Bergeron C, Goodyer CG, LeBlanc AC. Caspase-1 activation of caspase-6 in human apoptotic neurons. *Cell death and differentiation*. 2006. 13: 285–292

Hagström E, James SK, Bertilsson M, Becker RC, Himmelmann A, Husted S, Katus HA, Steg PG, Storey RF, Siegbahn A, Wallentin L. Growth differentiation factor-15 level predicts major bleeding and cardiovascular events in patients with acute coronary syndromes. *European heart journal*. 2016. 37: 1325–1333

Hansson GK. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *The New England journal of medicine*. 2005. 352: 1685–1695

Hargett LA, Bauer NN. On the origin of microparticles. *Pulmonary circulation*. 2013. 3: 329–340

Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM. Real time quantitative PCR. *Genome research*. 1996. 6: 986–994

Hendrikx T, Jeurissen MLJ, van Gorp PJ, Gijbels MJ, Walenbergh SMA, Houben T, van Gorp R, Pöttgens CC, Stienstra R, Netea MG, Hofker MH, Donners MMPC, Shiri-Sverdlov R. Bone marrow-specific caspase-1/11 deficiency inhibits atherosclerosis development in Ldlr(-/-) mice. *The FEBS journal*. 2015. 282: 2327–2338

Heneka MT, Kummer MP, Stutz A, Delekate A, Schwartz S, Vieira-Saecker A, Griep A, Axt D, Remus A, Tzeng T-C, Gelpi E, Halle A, Korte M, Latz E, Golenbock DT. NLRP3 is activated in Alzheimer's disease and contributes to pathology in APP/PS1 mice. *Nature*. 2013. 493: 674–678

Hoffman HM, Wanderer AA. Inflammasome and IL-1beta-mediated disorders. *Current allergy and asthma reports*. 2010. 10: 229–235

Honda H, Nagai Y, Matsunaga T, Okamoto N, Watanabe Y, Tsuneyama K, Hayashi H, Fujii I, Ikutani M, Hirai Y, Muraguchi A, Takatsu K. Isoliquiritigenin is a potent inhibitor of NLRP3 inflammasome activation and diet-induced adipose tissue inflammation. *Journal of leukocyte biology*. 2014. 96: 1087–1100

Howard AD, Kostura MJ, Thornberry N, Ding GJ, Limjuco G, Weidner J, Salley JP, Hogquist KA, Chaplin DD, Mumford RA. IL-1-converting enzyme requires aspartic acid residues for processing of the IL-1 beta precursor at two distinct sites and does not cleave 31-kDa IL-1 alpha. *The Journal of Immunology*. 1991. 147: 2964

Jain M, Bhosale V, Tripathi D, Singh H, Pal N, Hanif K, Jagavelu K. Antihypertensive Drugs Aliskiren, Nebivolol, and Olmesartan Reduce Hypertension by Reducing Endothelial Microparticles and Regulating Angiogenesis. *Journal of cardiovascular pharmacology*. 2017. 70: 176–183

Jain MK, Ridker PM. Anti-Inflammatory Effects of Statins. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2005. 4: 977–987

Jaiswal R, Sedger LM. Intercellular Vesicular Transfer by Exosomes, Microparticles and Oncosomes - Implications for Cancer Biology and Treatments. *Frontiers in oncology*. 2019. 9: 125

Jansen F, Yang X, Franklin BS, Hoelscher M, Schmitz T, Bedorf J, Nickenig G, Werner N. High glucose condition increases NADPH oxidase activity in endothelial microparticles that promote vascular inflammation. *Cardiovascular Research*. 2013a. 98: 94–106

Jansen F, Yang X, Hoelscher M, Cattelan A, Schmitz T, Proebsting S, Wenzel D, Vosen S, Franklin BS, Fleischmann BK, Nickenig G, Werner N. Endothelial microparticle-mediated transfer of MicroRNA-126 promotes vascular endothelial cell repair via SPRED1 and is abrogated in glucose-damaged endothelial microparticles. *Circulation*. 2013b. 128: 2026–2038

Jansen F, Yang X, Hoyer FF, Paul K, Heiermann N, Becher MU, Abu Hussein N, Kobschull M, Bedorf J, Franklin BS, Latz E, Nickenig G, Werner N. Endothelial microparticle uptake in target cells is annexin I/phosphatidylserine receptor dependent and prevents apoptosis. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2012. 32: 1925–1935

Jorgensen I, Miao EA. Pyroptotic cell death defends against intracellular pathogens. *Immunological reviews*. 2015. 265: 130–142

Kalra H, Simpson RJ, Ji H, Aikawa E, Altevogt P, Askenase P, Bond VC, Borràs FE, Breakefield X, Budnik V, Buzas E, Camussi G, Clayton A, Cocucci E, Falcon-Perez JM, Gabrielsson S, Gho YS, Gupta D, Harsha HC, Hendrix A, Hill AF, Inal JM, Jenster G, Krämer-Albers E-M, Lim SK, Llorente A, Lötvall J, Marcilla A, Mincheva-Nilsson L, Nazarenko I, Nieuwland R, Nolte-'t Hoen ENM, Pandey A, Patel T, Piper MG, Pluchino S, Prasad TSK, Rajendran L, Raposo G, Record M, Reid GE, Sánchez-Madrid F, Schiffelers RM, Siljander P, Stensballe A, Stoorvogel W, Taylor D, Thery C, Valadi H, van Balkom BWM, Vázquez J, Vidal M, Wauben MHM, Yáñez-Mó M, Zoeller M, Mathivanan S. Vesiclepedia. *PLoS biology*. 2012. 10: e1001450

Katsnelson MA, Rucker LG, Russo HM, Dubyak GR. K<sup>+</sup> efflux agonists induce NLRP3 inflammasome activation independently of Ca<sup>2+</sup> signaling. *J Immunol*. 2015. 194: 3937–3952

Kirii H. Lack of Interleukin-1beta Decreases the Severity of Atherosclerosis in ApoE-Deficient Mice. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2003. 23: 656–660

Kuida K, Lippke J, Ku G, Harding M, Livingston DJ, S.-S. and Su M, Flavell R. Altered Cytokine Export and Apoptosis in Mice Deficient in Interleukin-1b Converting Enzyme. *Science (New York, N.Y.)*. 1995. 267

Kumar S, Sharma A, Madan B, Singhal V, Ghosh B. Isoliquiritigenin inhibits IkappaB kinase activity and ROS generation to block TNF-alpha induced expression of cell adhesion molecules on human endothelial cells. *Biochemical pharmacology*. 2007. 73: 1602–1612

Labiós M, Martínez M, Gabriel F, Guiral V, Munoz A, Aznar J. Effect of eprosartan on cytoplasmic free calcium mobilization, platelet activation, and microparticle formation in hypertension. *American journal of hypertension*. 2004. 17: 757–763

Lamkanfi M, Kalai M, Saelens X, Declercq W, Vandenabeele P. Caspase-1 activates nuclear factor of the kappa-enhancer in B cells independently of its enzymatic activity. *The Journal of biological chemistry*. 2004. 279: 24785–24793

Lan QX, Mercurius KO, Davies PF. Stimulation of Transcription Factors NFkB and AP1 in Endothelial Cells Subjected to Shear Stress. *Biochemical and biophysical research communications*. 1994. 201: 950–956

Leroyer AS, Isobe H, Lesèche G, Castier Y, Wassef M, Mallat Z, Binder BR, Tedgui A, Boulanger CM. Cellular origins and thrombogenic activity of microparticles isolated from

human atherosclerotic plaques. *Journal of the American College of Cardiology*. 2007. 49: 772–777

Li H, Cybulsky MI, Gimbrone MA, Libby P. An atherogenic diet rapidly induces VCAM-1, a cytokine-regulatable mononuclear leukocyte adhesion molecule, in rabbit aortic endothelium. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 1993. 13: 197–204

Li X, Zhang Y, Xia M, Gulbins E, Boini KM, Li P-L. Activation of Nlrp3 inflammasomes enhances macrophage lipid-deposition and migration. *PloS one*. 2014. 9: e87552

Liang C-C, Park AY, Guan J-L. In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. *Nature Protocols*. 2007. 2: 329-333

Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2012. 32: 2045–2051

Liu J, Sukhova GK, Sun J-S, Xu W-H, Libby P, Shi G-P. Lysosomal cysteine proteases in atherosclerosis. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2004. 24: 1359–1366

Liu T, Zhang L, Joo D, Sun S-C. NF- $\kappa$ B signaling in inflammation. *Signal Transduction And Targeted Therapy*. 2017. 2: 17023 EP -

Liu W, Yin Y, Zhou Z, He M, Dai Y. OxLDL-induced IL-1 beta secretion promoting foam cells formation was mainly via CD36 mediated ROS production leading to NLRP3 inflammasome activation. *Inflammation research*. 2014. 63: 33–43

Liu X, Zhang Z, Ruan J, Pan Y, Magupalli VG, Wu H, Lieberman J. Inflammasome-activated gasdermin D causes pyroptosis by forming membrane pores. *Nature*. 2016. 535: 153-158

Livshits MA, Khomyakova E, Evtushenko EG, Lazarev VN, Kulemin NA, Semina SE, Generozov EV, Govorun VM. Isolation of exosomes by differential centrifugation: Theoretical analysis of a commonly used protocol. *Scientific Reports*. 2015. 5: 17319

Lopaschuk GD, Collins-Nakai R, Olley PM, Montague TJ, McNeil G, Gayle M, Penkoske P, Finegan BA. Plasma fatty acid levels in infants and adults after myocardial ischemia. *American Heart Journal*. 1994. 128: 61–67

López-Candales A, Holmes DR, Liao S, Scott MJ, Wickline SA, Thompson RW. Decreased vascular smooth muscle cell density in medial degeneration of human abdominal aortic aneurysms. *Am J Pathol*. 1997. 150(3): 993–1007

Lovelock JE, Bishop MWH. Prevention of Freezing Damage to Living Cells by Dimethyl Sulphoxide. *Nature*. 1959. 183: 1394–1395

Lowe EP, Wei D, Rice PJ, Li C, Kalbfleisch J, Browder IW, Williams DL. Human vascular endothelial cells express pattern recognition receptors for fungal glucans which stimulates nuclear factor kappaB activation and interleukin 8 production. Winner of the Best Paper Award from the Gold Medal Forum. *The American surgeon*. 2002. 68: 508–517

Mallat Z, Benamer H, Hugel B, Benessiano J, Steg PG, Freyssinet J-M, Tedgui A. Elevated Levels of Shed Membrane Microparticles With Procoagulant Potential in the Peripheral Circulating Blood of Patients With Acute Coronary Syndromes. *Circulation*. 2000. 101: 841–843

Martinon F, Burns K, Tschopp J. The Inflammasome. *Molecular Cell*. 2002. 10: 417–426  
Mathieu M, Martin-Jaular L, Lavieu G, Théry C. Specificities of secretion and uptake of exosomes and other extracellular vesicles for cell-to-cell communication. *Nature Cell Biology*. 2019. 21: 9–17

Mause SF, Weber C. Microparticles: protagonists of a novel communication network for intercellular information exchange. *Circulation research*. 2010. 107: 1047–1057

McCarthy EM, Smith S, Lee RZ, Cunnane G, Doran MF, Donnelly S, Howard D, O'Connell P, Kearns G, Ní Gabhann J, Jefferies CA. The association of cytokines with disease

activity and damage scores in systemic lupus erythematosus patients. *Rheumatology*. 2014. 53: 1586–1594

Mensah GA, Wei GS, Sorlie PD, Fine LJ, Rosenberg Y, Kaufmann PG, Mussolino ME, Hsu LL, Addou E, Engelgau MM, Gordon D. Decline in Cardiovascular Mortality. *Circulation research*. 2017. 120: 366–380

Menu P, Vince JE. The NLRP3 inflammasome in health and disease. *Clinical and experimental immunology*. 2011. 166: 1–15

Mesri M, Altieri DC. Leukocyte microparticles stimulate endothelial cell cytokine release and tissue factor induction in a JNK1 signaling pathway. *The Journal of biological chemistry*. 1999. 274: 23111–23118

Mikirova N. Increased Level of Circulating Endothelial Micro particles and Cardiovascular Risk Factors. *J Clinic Experiment Cardiol*. 2011. 02

Mitra S, Wewers MD, Sarkar A. Mononuclear Phagocyte-Derived Microparticulate Caspase-1 Induces Pulmonary Vascular Endothelial Cell Injury. *PloS one*. 2015. 10: e0145607

Mooberry MJ, Key NS. Microparticle analysis in disorders of hemostasis and thrombosis. *Cytometry. Part A : the journal of the International Society for Analytical Cytology*. 2016. 89: 111–122

Morel O, Jesel L, Freyssinet J-M, Toti F. Cellular Mechanisms Underlying the Formation of Circulating Microparticles. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2011. 31: 15–26

Moreno PR, Falk E, Palacios IF, Newell JB, Fuster V, Fallon JT. Macrophage infiltration in acute coronary syndromes. Implications for plaque rupture. *Circulation*. 1994. 90: 775–778

Mozaffarian D, Benjamin EJ, Go AS, Arnett DK, Blaha MJ, Cushman M, Das SR, Ferranti S de, Després J-P, Fullerton HJ, Howard VJ, Huffman MD, Isasi CR, Jiménez MC, Judd SE, Kissela BM, Lichtman JH, Lisabeth LD, Liu S, Mackey RH, Magid DJ, McGuire DK, Mohler ER, Moy CS, Muntner P, Mussolino ME, Nasir K, Neumar RW, Nichol G, Palaniappan L, Pandey DK, Reeves MJ, Rodriguez CJ, Rosamond W, Sorlie PD, Stein J, Towfighi A, Turan TN, Virani SS, Woo D, Yeh RW, Turner MB. Heart Disease and Stroke Statistics-2016 Update. *Circulation*. 2016. 133: e38-360

Mullard A. Do the flip. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2008. 9: 500-501

Murakami T, Ockinger J, Yu J, Byles V, McColl A, Hofer AM, Horng T. Critical role for calcium mobilization in activation of the NLRP3 inflammasome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2012. 109: 11282–11287

Nam DK, Lee S, Zhou G, Cao X, Wang C, Clark T, Chen J, Rowley JD, Wang SM. Oligo(dT) primer generates a high frequency of truncated cDNAs through internal poly(A) priming during reverse transcription. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2002. 99: 6152–6156

Ng MKC, Celermajer DS. Glucocorticoid treatment and cardiovascular disease. *Heart*. 2004. 90: 829–830

Nidorf SM, Eikelboom JW, Budgeon CA, Thompson PL. Low-dose colchicine for secondary prevention of cardiovascular disease. *Journal of the American College of Cardiology*. 2013. 61: 404–410

Nozaki T, Sugiyama S, Koga H, Sugamura K, Ohba K, Matsuzawa Y, Sumida H, Matsui K, Jinnouchi H, Ogawa H. Significance of a Multiple Biomarkers Strategy Including Endothelial Dysfunction to Improve Risk Stratification for Cardiovascular Events in Patients at High Risk for Coronary Heart Disease. *Journal of the American College of Cardiology*. 2009. 54: 601–608

Ostendorf B, Iking-Konert C, Kurz K, Jung G, Sander O, Schneider M. Preliminary results of safety and efficacy of the interleukin 1 receptor antagonist anakinra in patients with severe lupus arthritis. *Annals of the rheumatic diseases*. 2005. 64: 630–633

Pahl HL. Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors. *Oncogene*. 1999. 18: 6853–6866

Paone S, Baxter AA, Hulett MD, Poon IKH. Endothelial cell apoptosis and the role of endothelial cell-derived extracellular vesicles in the progression of atherosclerosis. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2019. 76: 1093–1106

Patel MN, Carroll RG, Galván-Peña S, Mills EL, Olden R, Triantafilou M, Wolf AI, Bryant CE, Triantafilou K, Masters SL. Inflammasome Priming in Sterile Inflammatory Disease. *Trends in molecular medicine*. 2017. 23: 165–180

Paudel KR, Panth N, Kim D-W. Circulating Endothelial Microparticles. *Scientifica*. 2016. 2016: 8514056

Pepys MB, Hirschfield GM. C-reactive protein. *The Journal of clinical investigation*. 2003. 111: 1805–1812

Perregaux D GCA. Interleukin-1 beta maturation and release in response to ATP and nigericin. Evidence that potassium depletion mediated by these agents is a necessary and common feature of their activity. *J Biol Chem*. 1994. 269: 15195–15203

Piepoli MF, Hoes AW, Agewall S, Albus C, Brotons C, Catapano AL, Cooney M-T, Corrà U, Cosyns B, Deaton C, Graham I, Hall MS, Hobbs FDR, Løchen M-L, Löllgen H, Marques-Vidal P, Perk J, Prescott E, Redon J, Richter DJ, Sattar N, Smulders Y, Tiberi M, van der Worp HB, van Dis I, Verschuren WMM, Binno S. 2016 European Guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice. *European heart journal*. 2016. 37: 2315–2381

Preston RA, Jy W, Jimenez JJ, Mauro LM, Horstman LL, Valle M, Aime G, Ahn YS. Effects of Severe Hypertension on Endothelial and Platelet Microparticles. *Hypertension*. 2003. 41: 211–217

Proudfoot D, Skepper JN, Hegyi L, Bennett MR, Shanahan CM, Weissberg PL. Apoptosis Regulates Human Vascular Calcification In Vitro. *Circulation research*. 2000. 87: 1055–1062

Py BF, Kim M-S, Vakifahmetoglu-Norberg H, Yuan J. Deubiquitination of NLRP3 by BRCC3 critically regulates inflammasome activity. *Molecular Cell*. 2013. 49: 331–338

Qiao Y, Wang P, Qi J, Zhang L, Gao C. TLR-induced NF- $\kappa$ B activation regulates NLRP3 expression in murine macrophages. *FEBS letters*. 2012. 586: 1022–1026

Raggi P, Genest J, Giles JT, Rayner KJ, Dwivedi G, Beanlands RS, Gupta M. Role of inflammation in the pathogenesis of atherosclerosis and therapeutic interventions. *Atherosclerosis*. 2018. 276: 98–108

Ridker PM, Everett BM, Thuren T, MacFadyen JG, Chang WH, Ballantyne C, Fonseca F, Nicolau J, Koenig W, Anker SD, Kastelein JJP, Cornel JH, Pais P, Pella D, Genest J, Cifkova R, Lorenzatti A, Forster T, Kobalava Z, Vida-Simiti L, Flather M, Shimokawa H, Ogawa H, Dellborg M, Rossi PRF, Troquay RPT, Libby P, Glynn RJ. Antiinflammatory Therapy with Canakinumab for Atherosclerotic Disease. *The New England journal of medicine*. 2017. 377: 1119–1131

Rogers C, Erkes DA, Nardone A, Aplin AE, Fernandes-Alnemri T, Alnemri ES. Gasdermin pores permeabilize mitochondria to augment caspase-3 activation during apoptosis and inflammasome activation. *Nature Communications*. 2019. 10: 1689

Ross R. Atherosclerosis--an inflammatory disease. *The New England journal of medicine*. 1999. 340: 115–126

Sabatier F, Darmon P, Hugel B, Combes V, Sanmarco M, Velut J-G, Arnoux D, Charpiot P, Freyssinet J-M, Oliver C, Sampol J, Dignat-George F. Type 1 And Type 2 Diabetic Patients Display Different Patterns of Cellular Microparticles. *Diabetes*. 2002. 51: 2840–2845

Scanu A, Molnarfi N, Brandt KJ, Gruaz L, Dayer J-M, Burger D. Stimulated T cells generate microparticles, which mimic cellular contact activation of human monocytes. *Journal of leukocyte biology*. 2008. 83: 921–927

Schaub FJ, Han DKM, Conrad Liles W, Adams LD, Coats SA, Ramachandran RK, Seifert RA, Schwartz SM, Bowen-Pope DF. Fas/FADD-mediated activation of a specific program of inflammatory gene expression in vascular smooth muscle cells. *Nature Medicine*. 2000. 6: 790–796

Schock SC, Edrissi H, Burger D, Cadonic R, Hakim A, Thompson C. Microparticles generated during chronic cerebral ischemia deliver proapoptotic signals to cultured endothelial cells. *Biochemical and biophysical research communications*. 2014. 450: 912–917

Schrijvers DM, Meyer GRY de, Kockx MM, Herman AG, Martinet W. Phagocytosis of apoptotic cells by macrophages is impaired in atherosclerosis. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2005. 25: 1256–1261

Serban KA, Rezania S, Petrusca DN, Poirier C, Cao D, Justice MJ, Patel M, Tsvetkova I, Kamocki K, Mikosz A, Schweitzer KS, Jacobson S, Cardoso A, Carlesso N, Hubbard WC, Kechris K, Dragnea B, Berdyshev EV, McClintock J, Petrache I. Structural and functional characterization of endothelial microparticles released by cigarette smoke. *Scientific Reports*. 2016. 6: 31596

Serebruany VL, Malinin AI, Jerome SD, Lowry DR, Morgan AW, Sane DC, Tanguay J-F, Steinhubl SR, O'Connor CM. Effects of clopidogrel and aspirin combination versus aspirin alone on platelet aggregation and major receptor expression in patients with heart failure. *American Heart Journal*. 2003. 146: 713–720

Shaikh S, Verma H, Yadav N, Jauhari M, Bullangowda J. Applications of Steroid in Clinical Practice. *ISRN Anesthesiology*. 2012. 2012: 1–11

Shi J, Gao W, Shao F. Pyroptosis. *Trends in biochemical sciences*. 2017. 42: 245–254  
Shi J, Zhao Y, Wang K, Shi X, Wang Y, Huang H, Zhuang Y, Cai T, Wang F, Shao F. Cleavage of GSDMD by inflammatory caspases determines pyroptotic cell death. *Nature*. 2015. 526: 660–665

Simak J, Gelderman MP, Yu H, Wright V, Baird AE. Circulating endothelial microparticles in acute ischemic stroke: a link to severity, lesion volume and outcome. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH*. 2006. 4: 1296–1302

Sinning J-M, Losch J, Walenta K, Bohm M, Nickenig G, Werner N. Circulating CD31+/Annexin V+ microparticles correlate with cardiovascular outcomes. *European heart journal*. 2011. 32: 2034–2041

Small DM. George Lyman Duff memorial lecture. Progression and regression of atherosclerotic lesions. Insights from lipid physical biochemistry. *Arteriosclerosis*. 1988. 8: 103–129

Souverain PC, Berard A, van Staa TP, Cooper C, Egberts ACG, Leufkens HGM, Walker BR. Use of oral glucocorticoids and risk of cardiovascular and cerebrovascular disease in a population based case-control study. *Heart (British Cardiac Society)*. 2004. 90: 859–865

Stępień E, Stankiewicz E, Zalewski J, Godlewski J, Żmudka K, Wybrańska I. Number of Microparticles Generated During Acute Myocardial Infarction and Stable Angina Correlates with Platelet Activation. *Archives of Medical Research*. 2012. 43: 31–35

Suades R, Padró T, Alonso R, Mata P, Badimon L. Lipid-lowering therapy with statins reduces microparticle shedding from endothelium, platelets and inflammatory cells. *Thromb Haemost*. 2017. 110: 366–377

Szatanek R, Baran J, Siedlar M, Baj-Krzyworzeka M. Isolation of extracellular vesicles. *International journal of molecular medicine*. 2015. 36: 11–17

Tan KT, Tayebjee MH, Lynd C, Blann AD, Lip GYH. Platelet microparticles and soluble P selectin in peripheral artery disease. *Annals of Medicine*. 2009. 37: 61–66

Tang J, Shen D, Caranasos TG, Wang Z, Vandergriff AC, Allen TA, Hensley MT, Dinh P-U, Cores J, Li T-S, Zhang J, Kan Q, Cheng K. Therapeutic microparticles functionalized with biomimetic cardiac stem cell membranes and secretome. *Nature Communications*. 2017. 8: 13724

Tang K, Zhang Y, Zhang H, Xu P, Liu J, Ma J, Lv M, Li D, Katirai F, Shen G-X, Zhang G, Feng Z-H, Ye D, Huang B. Delivery of chemotherapeutic drugs in tumour cell-derived microparticles. *Nature Communications*. 2012. 3: 1282

Tardif J-C, Kouz S, Waters DD, Bertrand OF, Diaz R, Maggioni AP, Pinto FJ, Ibrahim R, Gamra H, Kiwan GS, Berry C, López-Sendón J, Ostadal P, Koenig W, Angoulvant D, Grégoire JC, Lavoie M-A, Dubé M-P, Rhoads D, Provencher M, Blondeau L, Orfanos A, L'Allier PL, Guertin M-C, Roubille F. Efficacy and Safety of Low-Dose Colchicine after Myocardial Infarction. *The New England journal of medicine*. 2019. 381: 2497–2505

Tesse A, Martínez MC, Hugel B, Chalupsky K, Muller CD, Meziani F, Mitolo-Chieppa D, Freyssinet J-M, Andriantsitohaina R. Upregulation of proinflammatory proteins through NF-kappaB pathway by shed membrane microparticles results in vascular hyporeactivity. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2005. 25: 2522–2527

The Emerging Risk Factors Collaboration. C-reactive protein concentration and risk of coronary heart disease, stroke, and mortality: an individual participant meta-analysis. *The Lancet*. 2010. 375: 132–140

Timmis A, Townsend N, Gale C, Grobbee R, Maniadakis N, Flather M, Wilkins E, Wright L, Vos R, Bax J, Blum M, Pinto F, Vardas P. European Society of Cardiology: Cardiovascular Disease Statistics 2017. *European heart journal*. 2018. 39: 508–579

Toshima S-i, Hasegawa A, Kurabayashi M, Itabe H, Takano T, Sugano J, Shimamura K, Kimura J, Michishita I, Suzuki T, Nagai R. Circulating Oxidized Low Density Lipoprotein Levels. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2000. 20: 2243–2247

Tousoulis D, Charakida M, Stefanadis C. Endothelial function and inflammation in coronary artery disease. *Postgraduate Medical Journal*. 2008. 84: 368–371

Tushuizen ME, Nieuwland R, SCHEFFER PG, Sturk A, HEINE RJ, Diamant M. Two consecutive high-fat meals affect endothelial-dependent vasodilation, oxidative stress and cellular microparticles in healthy men. *Journal of thrombosis and haemostasis*. 2006. 4: 1003–1010

Usui F, Shirasuna K, Kimura H, Tatsumi K, Kawashima A, Karasawa T, Hida S, Sagara J, Taniguchi S'i, Takahashi M. Critical role of caspase-1 in vascular inflammation and development of atherosclerosis in Western diet-fed apolipoprotein E-deficient mice. *Biochemical and biophysical research communications*. 2012. 425: 162–168

van der Wal A. Atherosclerotic plaque rupture – pathologic basis of plaque stability and instability. *Cardiovascular Research*. 1999. 41: 334–344

Varghese GP, Folkersen L, Strawbridge RJ, Halvorsen B, Yndestad A, Ranheim T, Krohg-Sørensen K, Skjelland M, Espevik T, Aukrust P, Lengquist M, Hedin U, Jansson J-H, Fransén K, Hansson GK, Eriksson P, Sirsjö A. NLRP3 Inflammasome Expression and Activation in Human Atherosclerosis. *Journal of the American Heart Association*. 2016. 5: e003031

Wang X, Feuerstein GZ, Gu J-L, Lysko PG, Yue T-L. Interleukin-1 $\beta$  induces expression of adhesion molecules in human vascular smooth muscle cells and enhances adhesion of leukocytes to smooth muscle cells. *Atherosclerosis*. 1995. 115: 89–98

Wen C, Yang X, Yan Z, Zhao M, Yue X, Cheng X, Zheng Z, Guan K, Dou J, Xu T, Zhang Y, Song T, Wei C, Zhong H. Nalp3 inflammasome is activated and required for vascular smooth muscle cell calcification. *International journal of cardiology*. 2013. 168: 2242–2247

Wen H, Gris D, Lei Y, Jha S, Zhang L, Huang MT-H, Brickey WJ, Ting JP-Y. Fatty acid-induced NLRP3-ASC inflammasome activation interferes with insulin signaling. *Nature immunology*. 2011. 12: 408-415

Werner N, Wassmann S, Ahlers P, Kosiol S, Nickenig G. Circulating CD31+/Annexin V+ Apoptotic Microparticles Correlate With Coronary Endothelial Function in Patients With Coronary Artery Disease. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2006. 26: 112–116

Woollard KJ, Geissmann F. Monocytes in atherosclerosis. *Nature reviews. Cardiology*. 2010. 7: 77–86

World Health Organization. 2018. Global Health Estimates 2016 Summary Tables: Global Deaths by Cause, Age and Sex, 2000-2016. Verfügbar unter [https://www.who.int/healthinfo/global\\_burden\\_disease/estimates/en/](https://www.who.int/healthinfo/global_burden_disease/estimates/en/) (Zugriffsdatum: 14.05.2019)

Zheng F, Xing S, Gong Z, Mu W, Xing Q. Silence of NLRP3 suppresses atherosclerosis and stabilizes plaques in apolipoprotein E-deficient mice. *Mediators of inflammation*. 2014. 2014: 507208

Zheng F, Xing S, Gong Z, Xing Q. NLRP3 inflammasomes show high expression in aorta of patients with atherosclerosis. *Heart, lung & circulation*. 2013. 22: 746–750

Zhou R, Yazdi AS, Menu P, Tschopp J. A role for mitochondria in NLRP3 inflammasome activation. *Nature*. 2010. 469: 221-225