

Aus dem Bereich Translationale Kardio-Renale Medizin
Universität des Saarlandes
Homburg/Saar
Univ.-Prof. Dr. med. Dr. sc. nat. Thimoteus Speer

Die Rolle von Interleukin-1 α bei kardiovaskulären Erkrankungen

Dissertation
Zur Erlangung des Grades einer Doktorin der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2022

vorgelegt von
Fabienne Sabrina Küting
geboren am 9. Juli 1998 in Homburg/Saar

Vorbemerkung

Die in dieser Arbeit erhobenen Daten wurden in Form einer Originalarbeit publiziert (Schunk SJ et al., Circulation, 2021). Bei der Durchführung der Arbeit und bei der Auswertung der Daten wurde ich von Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Dr. sc. nat. Thimoteus Speer und Herrn Dr. Stefan J. Schunk betreut. Der Text und die Abbildungen dieser Dissertationsschrift sind daher in weiten Teilen eine deutsche Reproduktion der Originalarbeiten.

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1 Zusammenfassung/Abstract	1
1.1 Zusammenfassung.....	1
1.2 Abstract.....	2
2 Einleitung	3
2.1 Definition der koronaren Herzkrankheit.....	3
2.1.1 Manifestationsformen der KHK.....	3
2.1.2 Epidemiologie der KHK	3
2.2 Kardiovaskuläre Risikofaktoren	4
2.3 Pathogenese der Atherosklerose.....	6
2.4 Regulation der Leukozyten-Endotheladhäsion.....	8
2.4.1 Selektine	9
2.4.2 Integrine	9
2.4.3 Immunglobulin-Superfamilie	9
2.4.4 Chemokine.....	10
2.5 Interleukin-1 Superfamilie	11
2.5.1 Interleukin-1 β	12
2.5.2 Interleukin-1 α	12
2.6 Zielsetzung	14
3 Material und Methodik	15
3.1 Materialien.....	15
3.1.1 Geräte und Materialien.....	15
3.1.2 Chemikalien und Reagenzien.....	17
3.1.3 Antikörper.....	21
3.1.4 Puffer und Medien.....	22
3.2 Methodik.....	25
3.2.1 Versuchsbedingungen.....	25
3.2.2 Ablauf der Versuche.....	25
3.2.3 Isolation und Stimulation mononukleärer Zellen (PBMCs)	25
3.2.3.1 Isolation von PBMCs	25

3.2.3.2	Stimulation von PBMCs	27
3.2.4	Durchflusszytometrische Quantifizierung.....	27
3.2.4.1	Vorbereitung.....	28
3.2.4.2	Messung.....	28
3.2.5	Interleukin-1 α ELISA	29
3.2.6	Tierexperimente	30
3.2.6.1	Versuchstiere.....	30
3.2.6.2	Peritoneales Inflammationsmodell	30
3.2.6.3	Isolation von Milzmonozyten.....	31
3.2.6.4	Markierung der isolierten Milzmonozyten mit PKH67	32
3.2.6.5	Carotis-Schädigungsmodell	33
3.2.6.6	LAD-Ligaturmodell.....	34
3.2.7	Histologie	35
3.2.7.1	Hämatoxylin-Eosin-Färbungen	35
3.2.7.2	Immunfluoreszenz-Färbungen	36
3.2.8	Kultur von HAECs	37
3.2.9	Leukozyten-Endothel-Adhäsionsassay.....	38
3.2.10	Western Blot	39
3.2.10.1	Western Blot stimulierter PBMCs	39
3.2.10.2	Western Blot stimulierter HAECs.....	41
3.2.11	Statistik	42
4	Ergebnisse	43
4.1	IL-1 α als Mediator der Leukozyteninfiltration in entzündetem Gewebe	43
4.1.2	Sterile Peritonitis	43
4.1.3	Endothelschädigung.....	44
4.2	Stimulantien der IL-1 α Expression und Freisetzung aus Monozyten	45
4.2.1	Pro-IL-1 α Expression und Freisetzung von maturem IL-1 α	45
4.2.1.1	Western Blot stimulierter PBMCs.....	45
4.2.1.2	ELISA stimulierter PBMCs	46
4.2.2	Oberflächenexpression von IL-1 α auf stimulierten PBMCs	47
4.2.3	Hemmung der IL-1 α Sekretion aus PBMCs durch einen NF- κ B-Inhibitor....	48
4.2.4	Einfluss von Calpain und Cathepsin G auf die Prozessierung von IL-1 α	49
4.2.4.1	Einfluss von Calcium-Chelatoren.....	49
4.2.4.2	Einfluss von Calpain- und Cathepsin-Inhibitoren.....	50

4.3	IL-1 α und sein Rezeptor als Vermittler der Leukozyten-Endothel-Adhäsion.....	50
4.3.1	Adhäsion stimulierter Monozyten an humane aortale Endothelzellen	50
4.3.1.2	Adhäsion stimulierter Monozyten (18 h) an HAECs	51
4.3.1.2	Adhäsion stimulierter Monozyten (2 h) an HAECs	52
4.3.2	Endotheliale VCAM-1 Expression.....	53
4.4	IL-1 α stimuliert die Leukozyteninfiltration nach einem akuten Myokardinfarkt	53
4.4.1	IL-1 α Expression im Infarktbereich	54
4.4.2	Myokardiale Leukozyteninfiltration.....	54
4.4.2.1	Inflammatorische Infiltrate im Myokard	54
4.4.2.2	Infiltration F4/80 ⁺ -Makrophagen im Myokard.....	55
5	Diskussion	57
5.1	Regulation der IL-1 α Expression und Sekretion.....	57
5.1.1	Stimulatoren von IL-1 α	57
5.1.2	Rolle des NLRP3 Inflammasoms bei der Sekretion von IL-1 α	58
5.1.3	Effekte von pro-IL-1 α	60
5.1.4	Effekte von maturem IL-1 α	61
5.1.5	Cleavage von pro-IL-1 α	64
5.2	Inflammation beim akuten Myokardinfarkt.....	66
5.2.1	Epidemiologische und klinische Studien.....	66
5.2.2	Effekte verschiedener Leukozytenpopulationen auf die myokardiale Schädigung	68
5.2.2.1	Neutrophile Granulozyten	68
5.2.2.2	Monozyten.....	69
5.2.2.3	Makrophagen	70
5.2.3	Rolle von VCAM-1 bei der myokardialen Schädigung	70
5.3	Anti-inflammatorische Therapieansätze.....	72
5.3.1	Inhibition von IL-1 α	72
5.3.2	Inhibition von IL-1 β	73
5.3.3	Inhibition von IL-6.....	74
5.3.4	Colchicin	74
5.3.5	Methotrexat	75
5.4	Limitationen	76
5.5	Zusammenfassung und Ausblick	76

6 Literaturverzeichnis.....	77
7 Publikationen	92
8 Danksagung	93
9 Lebenslauf.....	94

Abbildungsverzeichnis

	Seite
Abb. 1: Häufigste Todesursachen 2015	4
Abb. 2: Endotheliale Dysfunktion im Rahmen der Atherogenese	6
Abb. 3: Darstellung einer stabilen fibrösen Plaque	7
Abb. 4: Darstellung einer Plaqueruptur mit Einblutung	8
Abb. 5: Ablauf der Versuche	25
Abb. 6: Resultat der Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation	26
Abb. 7: Messprinzip eines Durchflusszytometers	29
Abb. 8: Peritoneales Inflammationsmodell	31
Abb. 9: Carotisschädigungsmodell	33
Abb. 10: LAD-Ligaturmodell	34
Abb. 11: Durchflusszytometrische Quantifizierung der peritonealen Monozyten und Neutrophilen	43
Abb. 12: Durchflusszytometrische Quantifizierung der infiltrierenden PKH67 ⁺ -Monozyten	44
Abb. 13: Repräsentativer Western Blot stimulierter PBMCs	45
Abb. 14: ELISA stimulierter PBMCs	46
Abb. 15: Durchflusszytometrische Quantifizierung der IL-1 α Oberflächenexpression	47
Abb. 16: ELISA stimulierter PBMCs sowohl mit als auch ohne den NF- κ B-Inhibitor Bay11-7082	48
Abb. 17: ELISA stimulierter PBMCs sowohl mit als auch ohne die Ca ²⁺ -Chelatoren BAPTA-AM und EGTA	49
Abb. 18: ELISA stimulierter PBMCs sowohl mit als auch ohne die Calpain-Inhibitoren Z-Leu-Leu-CHO, E-64-d, PD 150606, sowie den Cathepsin G Inhibitor I	50
Abb. 19: Quantifizierung adhärerender PBMCs an HAECs nach Stimulation der Monozyten für 18 h mittels Fluoreszenzmikroskopie	51

Abb. 20:	Quantifizierung adhärerender PBMCs an HAECs nach Stimulation der Monozyten für 2 h mittels Fluoreszenzmikroskopie	52
Abb. 21:	Western Blot stimulierter HAECs zur Quantifizierung der relativen VCAM-1/GAPDH Expression	53
Abb. 22:	Immunhistologische Färbung von Herzen zum Sichtbarmachen der IL-1 α Expression	54
Abb. 23:	HE-Färbung von Herzen zum Sichtbarmachen inflammatorischer Infiltrate	55
Abb. 24:	Immunhistologische Färbung von Herzen zum Sichtbarmachen infiltrierender F4/80 ⁺ -Makrophagen	55
Abb. 25:	Quantifizierung der F4/80 ⁺ -Bereiche in der immunhistologischen Färbung von Herzen	56
Abb. 26:	Zusammenfassung der Effekte von pro-IL-1 α und IL-1 α	64

Tabellenverzeichnis

	Seite
Tabelle 1: Einteilung des chronischen Koronarsyndroms nach der CCS	3
Tabelle 2: Klassifikation der kardiovaskulären Risikofaktoren	5
Tabelle 3: Interleukin-1 Superfamilie mit Rezeptor und Eigenschaft	11
Tabelle 4: Geräte und Materialien	15
Tabelle 5: Chemikalien und Reagenzien	17
Tabelle 6: Antikörper	21
Tabelle 7: Puffer und Medien	22
Tabelle 8: Lösungen für die Milzzellisolation	31
Tabelle 9: Reihe zur Rehydrierung der Präparate	35
Tabelle 10: Reihe zur Entwässerung der Präparate	35
Tabelle 11: Immunfluoreszenz-Färbung Tag 1	36
Tabelle 12: Immunfluoreszenz-Färbung Tag 2	37
Tabelle 13: Puffer und Gele für den Western Blot	39
Tabelle 14: Übersicht der Proteasen zur Spaltung von pro-IL-1 α zu IL-1 α	65

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ABC-Methode	Avidin-Biotin-Komplex-Methode
A.D.	Aqua Dest
AK	Antikörper
AMI	Akuter Myokardinfarkt
Ala	Alanin
APC	Allophycocyanin
AP-1	Aktivator Protein-1
ASC	Apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD
Asp	Asparaginsäure
BSA	Bovines Serum Albumin
BMI	Body Mass Index
CAD	Coronary Artery Disease
CARD	C-terminale Caspase-Rekrutierungsdomäne
CCS	Canadian Cardiovascular Society
CRP	C-reaktives Protein
CSA	Catalysed signal amplification
CVD	Cerebrovaskuläre Erkrankung
DAMPs	Schaden-assoziierte molekulare Muster
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DTT	Dithiothreitol
EBM	Endothelial Basal Medium
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor
EGM	Endothelial Cell Growth Medium
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay

EZM	Extrazellulärmatrrix
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
FBS	Fetales Bovines Serum (fetales Rinderserum)
FSC	Forward Scatter
FITC	Fluorescein-isothiocyanat
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
HAECs	Humane aortale Endothelzellen
HBSS	Hank's balanced salt solution
HDL	High density Lipoprotein
HRP	Horseradish peroxidase
hsCRP	Hochsensitives CRP
ICAM-1	Interzelluläres Adhäsionsmolekül 1
ICE	IL-1 β -converting enzyme
Ig-Domäne	Immunglobulin-Domäne
IgSF	Immunglobulin-Superfamilie
IL	Interleukin
IL-1RAcP	IL-1 receptor accessory protein
IL-1RL1	IL-1 receptor like 1 (ST2)
IL-1Rrp2	IL-1 receptor related protein 2
IL-1R1	Interleukin-1 Rezeptor Typ 1
IRAK4	IL-1 Rezeptor-assozierte Kinase 4
KHK	Koronare Herzkrankheit
LDL	Low-density Lipoprotein
LFA-1	Leukozytenfunktionsantigen 1
LPS	Lipopolysaccharid
LRR	Leucine-rich repeat
MACE	Major adverse cardiac event
MACS	Magnetic activated cell sorting

MAP-Kinase	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MerTK	Myeloid-epithelial-reproductive tyrosine kinase
MFI	Mean fluorescence intensity
MMP	Matrix-Metalloproteinasen
MSU	Natriumurat (monosodium urate)
mTOR	Mammalian target of rapamycin
MyD88	Myeloid differentiation primary response protein 88
NET	Neutrophile extrazelluläre Falle
NF- κ B	Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells
NGAL	Neutrophil gelatinase-associated lipocalin
NLRP3	NOD-like receptor family pyrin domain containing 3
NLS	Nucleus localization signal
Nrf2	Nuclear factor erythroid 2-related factor 2
NTP	N-terminal propiece
OA	Ölsäure (oleic acid)
Ox	Oxalat
PAMPs	Pathogen-assoziierte molekulare Muster
PAVK	Periphere arterielle Verschlusskrankheit
PBMC	Peripheral blood mononuclear cell
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
Phe	Phenylalanin
PRR	Mustererkennungsrezeptoren
PVDF	Polyvinylidendifluorid
PYD	Pyrin domain
RIVA	Ramus interventricularis anterior
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
RT	Raumtemperatur
SASP	Seneszenz-assoziiierter sekretorischer Phänotyp

SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
SH2	Src homology region 2
SHP-1	SH2-domain-containing phosphatase-1
SIGIRR	Single immunoglobulin IL-1R-related receptor
SSC	Sideward Scatter
TCA	Trichloressigsäure
TH1-Zellen	Typ 1-T-Helferzellen
TIR-Domäne	Toll-Interleukin-1-Rezeptor-Domäne
TLR	Toll-like-Rezeptor
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
TRAF6	Tumornekrosefaktor-Rezeptor assoziierter Faktor 6
VCAM-1	Vaskuläres Zelladhäsionsmolekül 1
VLA-4	Spät agierendes Antigen 4 (very late Antigen 4)
VSMC	Vaskuläre glatte Muskelzelle

1 Zusammenfassung/Abstract

1.1 Zusammenfassung

Die koronare Herzerkrankung (KHK) zählt weltweit zu den häufigsten Todesursachen und verursacht enorme Kosten in unserem Gesundheitssystem. Aufgrund des demographischen Wandels wird in den nächsten Jahren mit einem weiteren Anstieg der kardiovaskulären Morbidität und Mortalität gerechnet. Die Atherosklerose gilt als Ursache von kardiovaskulären Erkrankungen. Durch intensive Forschungen wurde belegt, dass sie nicht einfach eine Folge passiver Lipideinlagerungen in der Gefäßwand ist. Vielmehr haben das Immunsystem und eine chronische, systemische Inflammationsreaktion entscheidenden Einfluss auf die Atherogenese. Proinflammatorische Zytokine, vor allem Interleukine, sind an der Initiierung und Aufrechterhaltung der Entzündungskaskade beteiligt. Bisherige Studien befassten sich vor allem mit den Effekten von IL-1 β , während der Einfluss von IL-1 α weitestgehend unerforscht blieb. Ziel dieser Arbeit war es daher die Rolle von IL-1 α als Mediator der Leukozyten-Endotheladhäsion und Inflammation bei kardiovaskulären Erkrankungen zu untersuchen. Die Adhäsion von Leukozyten an das geschädigte Endothel sowie deren Transmigration gilt dabei als entscheidender erster Schritt in der Entstehung der Atherosklerose.

Dazu wurde die Rolle von IL-1 α bei der Leukozyteninfiltration in entzündetem Gewebe, im Bereich einer Endothelschädigung sowie nach einem experimentell induzierten Myokardinfarkt mittels Vergleich von WT- und *Il1a*^{-/-} Mäusen untersucht. Zusätzlich erfolgte eine Analyse der Stimuli zur Steigerung der Oberflächenexpression und Sekretion von IL-1 α bzw. zur Induktion der Leukozyten-Endotheladhäsion mittels VCAM-1. Die Versuchsergebnisse zeigen, dass IL-1 α und nicht IL-1 β Mediator der Leukozyten-Endotheladhäsion ist. Diverse Stimuli wie Oxalat oder Ölsäure führen zu einer signifikant gesteigerten Expression und Sekretion von IL-1 α aus Monozyten. IL-1 α fungiert jedoch nicht nur selbst als Zelladhäsionsmolekül. Es stimuliert auch die endotheliale Expression von VCAM-1 zur Adhäsion zirkulierender Leukozyten. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass die Expression von IL-1 α im infarzierten Areal des Herzens signifikant höher ist als in nicht-ischämischen Bereichen. IL-1 α wurde somit als Treiber der myokardialen Inflammation und Schädigung nach einem akuten Myokardinfarkt identifiziert. Die Ergebnisse legen nahe, dass eine therapeutische Inhibition von IL-1 α als zentralem Regulator der Leukozyten-Endotheladhäsion eine vielversprechende anti-inflammatorische Therapiestrategie darstellt.

1.2 Abstract

Coronary heart disease (CHD) is one of the leading causes of death worldwide and generates enormous costs in our healthcare system. Due to demographic change, a further increase in cardiovascular morbidity and mortality is expected in the coming years. Atherosclerosis is considered to be the cause of cardiovascular diseases. Intensive research has demonstrated that it is not simply a consequence of passive lipid deposition in the vessel wall. Rather, the immune system and a chronic, systemic inflammatory response have a decisive influence on atherogenesis. Proinflammatory cytokines, especially interleukins, are involved in the initiation and maintenance of the inflammatory cascade. Previous studies mainly focussed on the effects of IL-1 β , whereas the influence of IL-1 α remained largely unexplored. Therefore, the aim of this work was to investigate the role of IL-1 α as a mediator of leukocyte endothelial adhesion and inflammation in cardiovascular diseases. The adhesion of leukocytes to the inflamed endothelium as well as their transmigration is considered a crucial first step in the development of atherosclerosis.

To this end, the role of IL-1 α in leukocyte infiltration in inflamed tissue, in the area of endothelial injury and after experimentally induced myocardial infarction was investigated by comparing WT- and *Il1a*^{-/-} mice. In addition, an analysis of stimuli to increase surface expression and secretion of IL-1 α as well as to induce leukocyte endothelial adhesion by VCAM-1 was performed. The experimental results show that IL-1 α , but not IL-1 β , represents a mediator of leukocyte endothelial adhesion. A variety of stimuli such as oxalate or oleic acid lead to a significantly increased expression and release of IL-1 α by monocytes, mediating their endothelial adhesion via IL-1R1. However, IL-1 α not only serves as a cell adhesion molecule itself, it also stimulates endothelial expression of VCAM-1 for the adhesion of circulating leukocytes. Moreover, IL-1 α expression was shown to be significantly higher in the area of myocardial infarction than in non-ischemic areas. IL-1 α was thus identified as a key driver of myocardial inflammation and injury after acute myocardial infarction. The results suggest that therapeutic inhibition of IL-1 α as a central regulator of leukocyte endothelial adhesion may represent a promising anti-inflammatory therapeutic strategy.

2 Einleitung

2.1 Definition der koronaren Herzkrankheit

Bei der koronaren Herzkrankheit (KHK; engl. CAD: Coronary artery disease) handelt es sich um die Manifestation von Atherosklerose an den Herzkranzgefäßen¹. Sie wird durch mindestens eine signifikante Stenose der Arterien (Reduktion des Durchmessers um mehr als die Hälfte) bzw. vollständige Okklusion hervorgerufen². Aus der konsekutiven Reduktion des Blutflusses resultiert eine Koronarinsuffizienz, das heißt ein Ungleichgewicht zwischen Sauerstoffangebot und -bedarf distal der Stenose.

2.1.1 Manifestationsformen der KHK

Durch das variierende Ausmaß der Flusslimitation und Myokardischämie kann sich die KHK klinisch als akutes oder chronisches Koronarsyndrom, jedoch auch als Herzrhythmusstörung präsentieren³. Zum akuten Koronarsyndrom zählen die lebensbedrohlichen Formen der KHK, wie die instabile Angina Pectoris, der Myokardinfarkt und der plötzliche Herztod⁴. Das chronische Koronarsyndrom wird als stabile Angina pectoris bezeichnet und entsprechend der Canadian Cardiovascular Society (CCS) in verschiedene Schweregrade eingeteilt (siehe Tabelle 1)^{3, 5}.

CCS 1	Angina pectoris bei starker körperlicher Belastung
CCS 2	Angina pectoris bei mäßiger körperlicher Belastung
CCS 3	Angina pectoris bei leichter körperlicher Belastung
CCS 4	Ruhschmerz

Tabelle 1: Einteilung des chronischen Koronarsyndroms nach der CCS (in Anlehnung an Knuuti et al., 2019, S. 413-77⁵)

Betroffene zeigen eine interindividuelle Varianz an Symptomen. Anfangs sind sie meist asymptomatisch, Dyspnoe oder den typischen Schmerz retrosternal im Thorax (Angina pectoris, AP) verspüren die Patienten oft erst ab einem kritischen Stenosegrad von 75 %^{1, 4, 6}.

2.1.2 Epidemiologie der KHK

Die koronare Herzerkrankung ist nicht nur in Deutschland, sondern weltweit die häufigste Todesursache und verursacht durch hohe Hospitalisierungsraten enorme Kosten im Gesundheitssystem^{3, 7, 8, 10}. 2015 lag in Deutschland der Anteil der Verstorbenen mit einer Erkrankung des Herz-/Kreislaufsystems an der Gesamtheit der Todesfälle bei 38,5 %. Darüber hinaus

starben 2015 in Deutschland 13,9 % und im Saarland 218,6 Menschen je 100.000 Einwohner an einer ischämischen Herzerkrankung⁸. Eine Statistik aus dem Jahr 2020 zeigt, dass Herz-Kreislauf-Erkrankungen mit einem Anteil von 34 % an der Gesamtheit der Sterbefälle weiterhin die häufigste Todesursache darstellen⁹.

Laut der Global Burden of Disease Study stieg zwischen 2005 und 2015 die Anzahl der weltweiten Todesfälle aufgrund von ischämischen Herzerkrankungen um 16,6 % an. Die altersstandardisierte Sterberate aufgrund einer KHK ging jedoch um 12,8 % zurück. Diese Diskrepanz lässt sich vor allem durch den demographischen Wandel erklären. Eine Zunahme der Todesfälle resultiert aus der Entwicklung der Bevölkerungsstruktur hin zu einer immer älter werdenden Gesellschaft. Wohingegen die Verbesserungen in der Aufklärung und Prävention, als auch Diagnostik und Therapie von KHK zu einem deutlichen Rückgang der altersstandardisierten Mortalitätsrate beigetragen haben¹⁰.

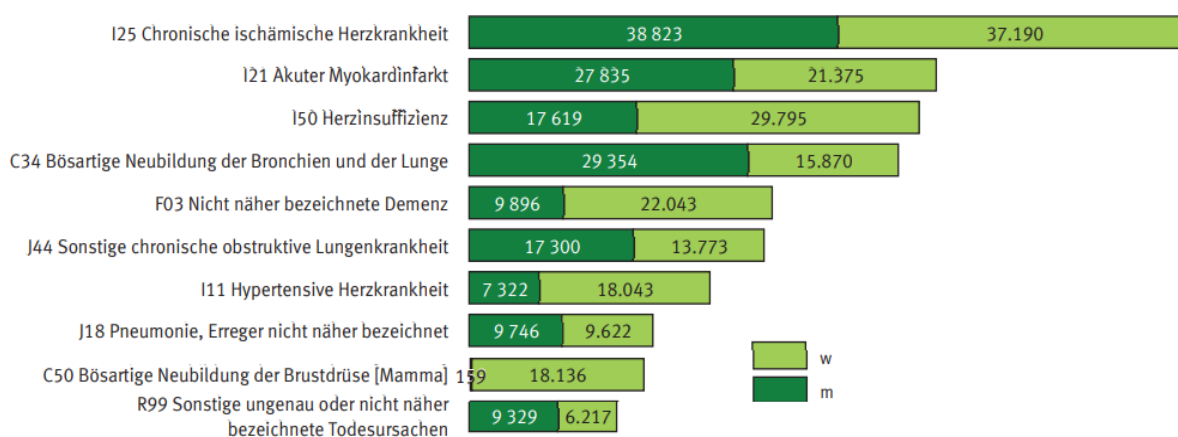


Abb. 1: häufigste Todesursachen 2015 (entnommen aus Pressestelle des Statistischen Bundesamtes, 2017⁸)

2.2 Kardiovaskuläre Risikofaktoren

Das individuelle Risiko für ein kardiovaskuläres Ereignis ergibt sich aus der Interaktion von genetischen und pathophysiologischen Faktoren sowie dem Lebensstil^{11, 12}. Über viele Jahre wurden diese Einflüsse in groß angelegten Studien, wie der Framingham-Heart Studie oder dem MONICA-Projekt, genauer analysiert^{13, 14}.

Die Risikofaktoren lassen sich dabei nicht unabhängig voneinander betrachten, sondern müssen vielmehr durch ihre additive Wirkung als eine kontinuierliche Größe angesehen werden. Eine Risikostratifizierung kann mit Hilfe geeigneter Scores erfolgen⁴.

Klasse	Risikofaktoren
I	Erhöhtes LDL-Cholesterin
	Arterielle Hypertonie
	Rauchen
II	Diabetes Mellitus
	Vermindertes HDL-Cholesterin
	Körperliche Inaktivität
	Adipositas
III	Hypertriglyzeridämie
	Alkoholkonsum
	Stress, ungesunde Ernährung
IV	Zunehmendes Alter
	Männliches Geschlecht
	Positive Familienanamnese

Tabelle 2: Klassifikation kardiovaskulärer Risikofaktoren (in Anlehnung an Erdmann E, 2009, S. 1-11⁴; Herold G, 2022, S. 237-38³; Lechner K et al., 2019, S. 394-406¹⁵)

Eine positive Beeinflussung der unter Klasse I aufgeführten Faktoren führt zur prognostischen Verbesserung des kardiovaskulären Risikos. Eine Abnahme des LDL-Cholesterins um 10 %, bewirkt beispielsweise eine Risikoreduktion um 20 bis 30 %. Neben einer medikamentösen Therapie ist die Compliance des Patienten bezüglich einer Lebensstiländerung von großer Bedeutung. So führt ein vollständiger Nikotinverzicht bereits nach zwei bis vier Jahren zur Halbierung des individuellen kardiovaskulären Risikos^{4, 16}.

Bereits die Framingham-Heart Studie zeigt, dass die Inzidenz für kardiovaskuläre Ereignisse bei Männern mit Diabetes doppelt so hoch wie bei Nicht-Diabetikern ist. Bei diabetischen Frauen ist diese sogar dreimal so groß wie bei entsprechenden nicht-diabetischen Frauen¹⁷.

Lebensstiländerungen wie Alkoholabstinenz, ausreichend Schlaf, eine gesunde Work-Life-Balance und mediterrane Ernährung sind wichtige Bausteine in der Verhinderung von Herz-Kreislauf-Erkrankungen¹⁵. Diese gesundheitsfördernden Maßnahmen wirken sich in Kombination mit einer Gewichtsreduktion auch positiv auf andere Risikofaktoren wie Hypercholesterinämie, Hypertonie und Diabetes Mellitus aus¹⁸. Alter, Geschlecht und eine positive Familienanamnese lassen sich von außen nicht beeinflussen und haben dennoch enorme Auswirkungen auf das kardiovaskuläre Risiko. Mit zunehmendem Alter steigt die Zahl der Herz-Kreislauf-

Erkrankungen bei Männern und Frauen deutlich an. Dies korreliert mit der steigenden Prävalenz von Hypertonie, Hypercholesterinämie, Hypertriglyzeridämie, Diabetes Mellitus und körperlicher Inaktivität im Alter^{19, 20}. Frauen haben durch ihren Östrogenspiegel einen kardioprotektiven Vorteil gegenüber Männern. Das Hormon beeinflusst nicht nur die Lipidspiegel (LDL-Cholesterin ↓ und HDL-Cholesterin ↑), sondern hat auch positive Effekte auf den Glucose-Metabolismus und die endothelialen Zellfunktionen²⁰.

2.3 Pathogenese der Atherosklerose

Die Atherosklerose wird heute nicht mehr als reine Ablagerung von Lipiden in den Gefäßwänden, sondern vielmehr als eine entzündlich-proliferative Systemerkrankung angesehen^{21, 22}. Die international bekannte „Response-to-injury-Hypothese“ („Antwort-auf-Verletzung“, 1976) von Russell Ross, einem amerikanischen Atheroskleroseforscher, geht auf eine Endothelverletzung als Initiator des atherosklerotischen Prozesses zurück²³.

Als Folge des wiederholten Kontaktes der Gefäßwand mit verschiedensten Risikofaktoren (siehe Abschnitt 2.2) entwickelt sich eine endotheliale Dysfunktion mit chronischer Entzündungsreaktion. Daraus resultiert eine vermehrte Permeabilität des Endothels gegenüber Lipoproteinen und anderen Lipidspezies wie LDL^{24, 25}. Zudem ist die Sekretion antiadhäsiver Metabolite, darunter auch Stickstoffmonoxid, aufgrund der Dysfunktion eingeschränkt, sodass eine gesteigerte Expression von Adhäsionsmolekülen zur Leukozyten-Endotheladhäsion (siehe Abschnitt 2.4) führt²⁶. Dies ist der Start eines Circulus vitiosus der vaskulären Inflammation²⁴.

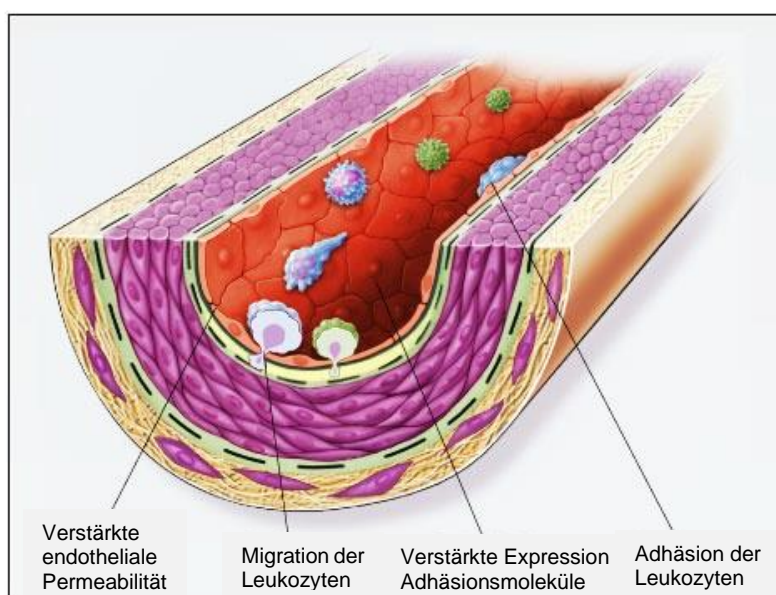


Abb.2: Endotheliale Dysfunktion im Rahmen der Atherogenese (entnommen aus Ross R, 1999, S. 117³³)

Eine Vielzahl an Zytokinen vermittelt die Transmigration der Leukozyten in die Intima, die dort zu Makrophagen differenzieren^{27, 28}. Diese nehmen oxidiertes LDL über Scavenger-Rezeptoren auf und speichern es als Lipidtröpfchen. Aufgrund dessen werden sie als Schaumzellen bezeichnet²⁵. Die lipidbeladenen Makrophagen bilden fatty streaks (Fettstreifen) und führen zu einer Stenose des Gefäßlumens. Letztlich können sie das aufgenommene Cholesterin der Lipoproteine jedoch nicht abbauen, sodass es zu einer Nekrose der Schaumzellen kommt. Dies beschleunigt zudem die Entzündungskaskade durch Freisetzung von Zytokinen wie Tumornekrosefaktor- α (TNF- α), Interleukin-1 α und β (IL-1 α und IL-1 β)^{24, 27, 29}. Folglich spiegelt sich die Ausbreitung des lokalen Inflammationsgeschehens hin zu einer systemischen Reaktion in der Erhöhung von C-reaktivem Protein (CRP) und IL-1 bzw. IL-6 im Blut wider^{30, 31}. Resultierend aus der Inflammation kommt es zur Einwanderung weiterer Entzündungszellen und Lipide. Es bildet sich eine stabile Plaque mit einem Kern aus nekrotischen Zellen und Cholesterinkristallen. Die Hülle der Plaque entsteht aus glatten Muskelzellen der Tunica media, wobei diese zusätzlich von extrazellulärer Matrix sowie Lymphozyten und Makrophagen umgeben sind³². Die fibröse Plaque wächst weiter ins Gefäßlumen ein und wird zunehmend instabiler bis hin zu einer Ruptur²⁴.

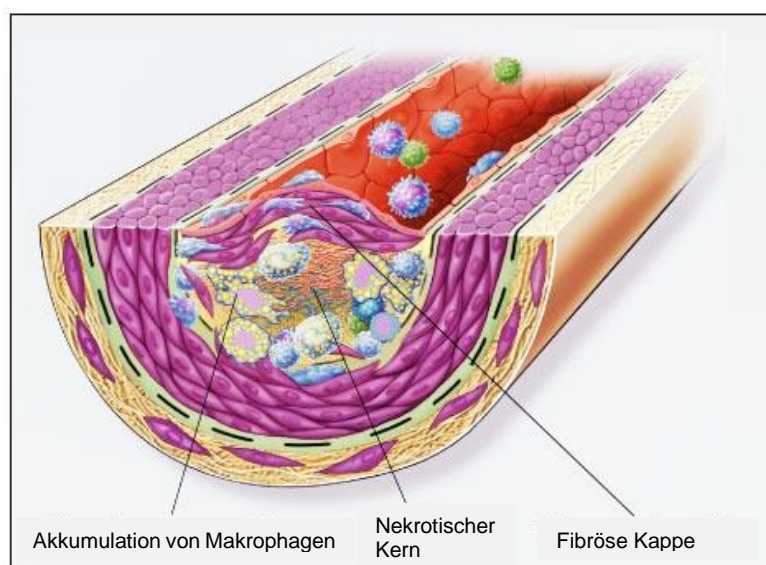


Abb.3: Darstellung einer stabilen fibrösen Plaque (entnommen aus Ross R, 1999, S. 119³³)

Ein Riss der fibrösen Kappe führt zum Kontakt von thrombogenen Oberflächen und Tissue factor mit dem Blut, sodass eine akute Okklusion des Gefäßes entsteht. Schlussfolgernd entwickelt sich daraus das klinische Bild eines Koronarsyndroms, Myokardinfarkts oder Schlaganfalls^{24, 33}.

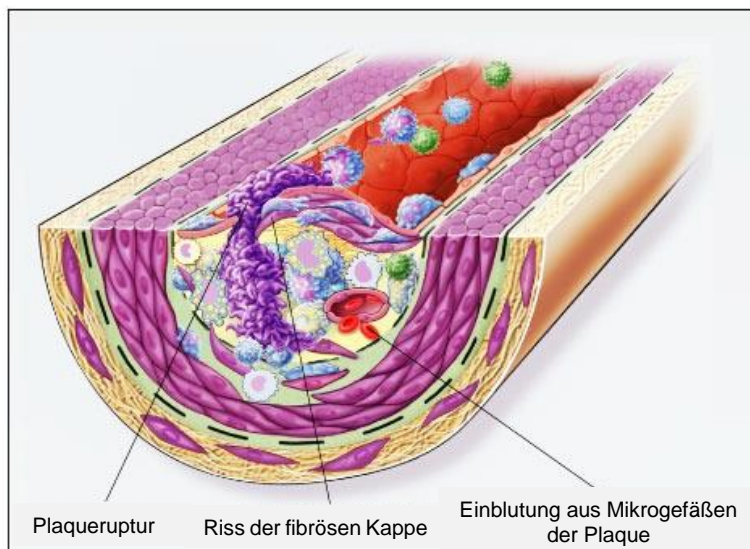


Abb.4: Darstellung einer Plaqueruptur mit Einblutung (entnommen aus Ross R, 1999, S. 121³³)

2.4 Regulation der Leukozyten-Endotheladhäsion

Die Leukozyten-Endotheladhäsion und Migration der Leukozyten in den subendothelialen Raum bildet die Grundlage jeder inflammatorischen Reaktion und somit auch der Atherogenese. Der mehrstufige Adhäsionsprozess beginnt mit einer läsionsnahen Anhaftung von Monozyten und Lymphozyten und endet mit der Akkumulation der Zellen in der Intima^{33, 34}. Diese Reaktionen werden von verschiedenen Adhäsionsmolekülen vermittelt (siehe Abschnitt 2.4.1 bis 2.4.4), deren lösliche Formen beispielsweise auch im Blut von Patienten mit manifester Atherosklerose vermehrt nachzuweisen sind³⁵.

Der erste Schritt nach einer Endothelverletzung ist die transiente Adhäsion von Leukozyten aus dem Blut. Dafür binden die an die Endothelzellen gebundenen Selektine, E- und P-Selektin, an Leukozyten und das vaskuläre Zelladhäsionsmolekül 1 (VCAM-1) aus der Immunglobulin-Superfamilie (IgSF) interagiert mit Integrinen auf der Oberfläche der Leukozyten. Dies erlaubt eine erste Anhaftung und das Rollen der Zellen an der Gefäßwand sowie deren Aktivierung^{36, 37}.

In der zweiten Stufe stimulieren vom umliegenden Gewebe freigesetzte und auf der Endotheloberfläche exprimierte Chemokine eine Vielzahl an Integrinen auf der Oberfläche von Leukozyten. Folglich kommt es zu einer Konformationsänderung der Integrine, welche die Adhäsion der Zellen verstärkt und einen Arrest der Leukozyten mit sich bringt^{36, 38}.

Im dritten Schritt erfolgt eine feste Bindung der Leukozyten an die Endothelzellen. Dafür notwendig ist die Interaktion der aktivierten Integrine mit ihren Rezeptoren an der Gefäßwand. So bindet beispielsweise das β 1-Integrin „spät agierendes Antigen 4“ (VLA-4, very late Antigen 4)

an VCAM-1 und das β 2-Integrin „Leukozytenfunktions-Antigen 1“ (LFA-1) an das interzelluläre Adhäsionsmolekül 1 bzw. 2 (ICAM-1 bzw. -2). Aus der Bindung resultiert die Aktivierung weiterer Signalmoleküle und Lockerung junktionaler Bindungen zwischen den Endothelzellen. Dies ermöglicht letztlich die Transmigration der Leukozyten über die Endothelzellbarriere³⁸.

2.4.1 Selektine

Selektine initiieren den Leukozyten-Endotheladhäsionsprozess. Es handelt sich dabei um drei transmembrane Glykoproteine, wobei man sie entsprechend ihrer Ursprungszellen in Endothel- (E-), Plättchen- (P-) und Leukozyten- (L-) Selektin unterscheidet. Der N-Terminus dient als Kohlenhydratbindungsstelle (Lektin-Domäne) und fungiert Ca^{2+} -abhängig, weshalb eine Einteilung in die Gruppe der C-Lektine erfolgt. Zudem ist die Wachstumsfaktor-ähnliche-Domäne (EGF-Domäne, engl. epidermal growth factor) am Vorgang der Adhäsion beteiligt³⁹.

2.4.2 Integrine

Integrine vermitteln sowohl in der frühen als auch der späten Phase der Inflammation eine Bindung von Leukozyten an das Endothel. Strukturell stellen sie ein $\alpha\beta$ -Heterodimer mit einer nicht-kovalenten Bindung der Ketten dar. β 2-Integrine werden von allen Leukozyten exprimiert, wohingegen β 1-Integrine nur auf eosinophilen Monozyten und Lymphozyten vorkommen. Bevor sie ihre volle Wirkung entfalten können, ist eine Aktivierung einschließlich Konformationsänderung zwingend notwendig. Im Rahmen der Atherogenese sind vor allem die Bindung des β 1-Integrins VLA-4 (α 4 β 1) an VCAM-1 und des β 2-Integrins LFA-1 (α L β 2) an ICAM-1 bzw. ICAM-2 von Bedeutung⁴⁰.

2.4.3 Immunglobulin-Superfamilie

Die Grundlage der Leukozyten-Endotheladhäsion bildet die Bindung der Integrine an Moleküle der IgSF (Immunglobulin-Superfamilie) auf den Endothelzellen. Die Proteine unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Funktion, weisen jedoch als Gemeinsamkeit eine Variation Immunglobulin-ähnlicher Domänen (Ig-Domänen) auf. Die für die Atherosklerose bedeutsamen Mitglieder der IgSF sind das VCAM-1 mit sieben, das ICAM-1 mit fünf und das ICAM-2 mit zwei Ig-Domänen, wobei die erste Domäne immer die für die Integrinbindung erforderliche Oberflächenstruktur besitzt. Aufgrund der endothelialen Inflammation ausgeschüttete Chemokine führen zu einer gesteigerten und läsionsnahen Expression von VCAM-1 und ICAM-1. ICAM-2 hingegen ist konstitutiv und ohne den Einfluss inflammatorischer Stimuli auf der Endothelzellmembran exprimiert⁴¹.

2.4.4 Chemokine

Chemokine sind kleine chemotaktische Zytokine bestehend aus vier Cysteinresten, die über Disulfidbrücken verknüpft sind. Die Position der ersten beiden Cysteinreste dient der Unterscheidung in die beiden Untergruppen. Bei den CC-Chemokinen sind sie zusammenhängend angeordnet, bei den CXC-Chemokinen jedoch durch eine weitere Aminosäure getrennt⁴². Die Effekte dieser Moleküle werden über heptahelikale G-Protein gekoppelte Rezeptoren vermittelt, die ihrerseits zu einer Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration führen.

Chemotaktische Zytokine fungieren bei der Leukozyten-Endotheladhäsion in einer Schlüsselrolle, denn sie aktivieren nicht nur die Leukozyten, sondern darüber hinaus die Integrin-Moleküle. Sie sind somit essentiell für die Rekrutierung, vorläufige und endgültige Bindung der Leukozyten sowie deren Migration⁴³.

2.5 Interleukin-1 Superfamilie

Interleukin-1 wurde als erstes Zytokin seiner Art beschrieben und zunächst unter Namen wie „endogenes Pyrogen“, „Hämatopoietin 1“ oder „endogener Leukozytenmediator“ geführt. 1980 erfolgte die molekulare Identifikation und kurze Zeit später die Anerkennung seiner entscheidenden Rolle bei der angeborenen und adaptiven Immunantwort⁴⁴.

Zum jetzigen Zeitpunkt sind elf Mitglieder der Interleukin-1 Superfamilie bekannt, wobei deren Funktion nicht durch ihre Struktur, sondern vielmehr durch ihre Wirkung als Agonisten oder Antagonisten an den IL-1 Rezeptoren bestimmt ist. Daraus resultierend wird sieben Zytokinen eine proinflammatorische und vier eine anti-inflammatorische Eigenschaft zugesprochen (siehe Tabelle 3). Mit Ausnahme von IL-18 und IL-33 sind alle Mitglieder auf dem langen Arm von Chromosom 2 codiert⁴⁵. Die unterschiedlichen Eigenschaften sind von großer Bedeutung, denn die Interleukine sind nicht nur proinflammatorische Mediatoren im Rahmen von Pathologien wie Autoimmunerkrankungen, Infektionen und degenerativen Erkrankungen. Sie wirken vielmehr auch physiologisch zum Beispiel bei der Apoptose, dem nicht-inflammatorischen Zelltod, mit^{45, 46, 47}.

Name	Familiename	Rezeptor, Co-Rezeptor	Eigenschaft
IL-1 α	IL-1F1	IL-1R1, IL1RAcP	Agonisten Proinflammatorisch
IL-1 β	IL-1F2	IL-1R1, IL1RAcP	
IL-18	IL-1F4	IL-18R α , IL-18R β	
IL-33	IL-1F11	IL1RL1 (ST2), IL-1RAcP	
IL-36 α	IL-1F6	IL-1Rrp2, IL-1RAcP	
IL-36 β	IL-1F8	IL-1Rrp2, IL-1RAcP	
IL-36 γ	IL-1F9	IL-1Rrp2, IL-1RAcP	
IL-1Ra	IL-1F3	IL-1R1	Antagonisten Anti-inflammatorisch
IL-36Ra	IL-1F5	IL-1Rrp2 (IL-36R)	
IL-38	IL-1F10	IL-1Rrp2 (IL-36R)	
IL-37	IL-1F7	IL-18R α , TIR8 (SIGIRR), IL-1R8)	Anti-inflammatorisch

Tabelle 3: Interleukin-1 Superfamilie mit Rezeptor und Eigenschaft (in Anlehnung an Garlanda et al., 2013, S. 1003-18⁴⁶)

IL-1R1 = IL-1 receptor type 1, IL-1RAcP = IL-1 receptor accessory protein, IL-1RL1 = IL-1 receptor like 1 (ST2), IL-1Rrp2 = IL-1 receptor related protein 2, TIR8 = Toll-IL1-receptor-domain 8, SIGIRR = single immunoglobulin IL-1R-related receptor

2.5.1 Interleukin-1 β

Interleukin-1 β ist als proinflammatorisches Zytokin ein zentraler Regulator der Reaktion des Immunsystems im Rahmen von Infektionen und Zellschädigungen. Hierbei induziert IL-1 β beispielsweise Fieber, den Anstieg von Akutphase-Proteinen oder neutrophilen Granulozyten^{44, 48}.

Es wird als pro-IL-1 β von einer Vielzahl an Zellen wie Monozyten, Makrophagen und dendritischen Zellen sezerniert und schließlich von multimeren Proteinkomplexen, den Inflammasomen, prozessiert⁴⁷. Voraussetzung dafür sind zwei Signale zur Aktivierung und Zusammensetzung des Inflammasoms: Das erste Signal erfolgt durch exogene Pathogen-assoziierte molekulare Muster (PAMPs, pathogen associated molecular patterns) oder endogene Schaden-assoziierte molekulare Muster (DAMPs, damage associated molecular patterns), die Mustererkennungszepatoren (PRR, pattern recognition receptor) aktivieren. Dies führt zur Expression von pro-IL-1 β , der biologisch inaktiven Vorläuferform. Erst das zweite Signal, welches durch den erneuten Kontakt der Zelle mit einem PAMP oder DAMP entsteht, initiiert die Prozessierung von pro-IL-1 β zum biologisch aktiven IL-1 β ⁴⁸.

Die proteolytische Spaltung von pro-IL-1 β (31 kDa) erfolgt durch die Cysteinprotease Caspase-1, früher IL-1 β -converting enzyme (ICE) genannt⁴⁸. Der cytosolische Multiproteinkomplex Inflammasom sorgt zuvor für die entscheidende Aktivierung von Caspase-1. Das NLRP3-Inflammasom (NOD-like receptor family pyrin domain containing 3 inflammasome) ist hierbei das meist untersuchte seiner Art und kommt in myeloiden Zellen wie Makrophagen oder Monozyten vor⁴⁹. Nach Abspaltung des aktiven IL-1 β (17 kDa) wird dies direkt aus der Zelle freigesetzt, sodass das reife und biologisch aktive IL-1 β seine systemisch-proinflammatorische Wirkung entfalten kann^{48, 50, 51}.

2.5.2 Interleukin-1 α

Interleukin-1 α wird von einer Vielzahl von Zellen wie Monozyten, Endothelzellen oder auch Lymphozyten exprimiert und agiert als proinflammatorisches Zytokin vor allem juxtakrin bzw. parakrin. Die Expression und auch Sekretion können durch Wachstumsfaktoren, proinflammatorische oder Stress-induzierte Stimuli in kurzer Zeit gesteigert werden. Aus der proteolytischen Spaltung der Vorläuferform pro-IL-1 α (31 kDa) resultiert IL-1- α NTP (N-terminal IL-1 α propiece, 16 kDa) und reifes IL-1 α (17 kDa). Die Ca²⁺-abhängige Protease Calpain spaltet pro-IL-1 α an der Stelle Phe118 (Phenylalanin) sowohl intra- als auch extrazellulär, alternativ findet eine extrazelluläre Spaltung durch Granzym B an der Aminosäure Asp103 (Asparaginsäure) statt⁵². Aber auch neutrophile Proteasen wie Cathepsin G sind im Rahmen von Entzündungsgeschehen an der Prozessierung von IL-1 α beteiligt⁵³.

Pro-IL-1 α und matures IL-1 α sind beide biologisch aktive Liganden des IL-1R1 mit identischen Wirkungsweisen. Der Rezeptor besteht aus extrazellulären Ig-Domänen und einer zytoplasmatischen TIR-Domäne. Nach Bindung des Liganden an IL-1R1 erfolgt die Dimerisierung des Rezeptors und das Adapterprotein IL1RAcP wird rekrutiert. Das Zusammentreffen der beiden TIR-Domänen im Heterodimer führt über Signalproteine wie myeloid differentiation primary response protein 88 (MyD88), IL-1R-assoziierte Kinase 4 (IRAK4) oder Tumornekrosefaktor-Rezeptor assoziierter Faktor 6 (TRAF6) zur Aktivierung des NF- κ B- (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells) und des MAP-Kinase-Wegs (Mitogen-aktivierter Proteinkinase Weg). Daraus resultierend startet eine Kaskade der sterilen Entzündung mittels Freisetzung proinflammatorischer Zytokine^{44, 54}.

Zytosolisches pro-IL-1 α gilt als Alarmin der Zelle, um auf eine Zellschädigung aufmerksam zu machen. Pro-IL-1 α und nach der Spaltung IL-1- α NTP besitzen beide ein Kernlokalisierungssignal (NLS, nucleus localization signal) und können im Kern unabhängig vom IL-1R1-Signalweg die Transkription von Genen für proinflammatorische Signale steigern. In glatten Muskelzellen der Gefäße ist beispielsweise pro-IL-1 α an den intrazellulären inhibitorischen Rezeptor IL-1R2 gebunden ist, sodass es durch Maskierung des NLS im Zytosol verbleibt. IL-1 α agiert außerdem membrangebunden als Alarmin auf der Oberfläche von aktivierten Monozyten. Dadurch stimuliert es über den IL-1R1-Signalweg benachbarte Zellen im Rahmen von lokalen Entzündungsprozessen⁵².

Kommt es zur Nekrose von Zellen, wird pro-IL-1 α passiv ins Zytosol freigesetzt. Dadurch entsteht eine IL-1R1-abhängige Inflammationsreaktion mit der Rekrutierung und Einwanderung von Immunzellen ins umliegende verletzte Gewebe. Hingegen bei der Apoptose, dem programmierten Zelltod, wird das Interleukin in den Zellkern transportiert, an Chromatin gebunden und seine Freisetzung verhindert, sodass eine entzündliche Reaktion zunächst ausbleibt⁵⁵.

IL-1 α nimmt eine wesentliche Rolle im Rahmen der sterilen Entzündung, vor allem bei inflammatorischen Erkrankungen wie der Atherosklerose oder ischämischen Schäden nach Myokardinfarkt, ein. Grund dafür ist die Tatsache, dass ein inflammatorischer Circulus vitiosus Ursache der ausgeprägten Gewebeschäden ist und unter anderem über den IL-1 α -IL-1R1 Signalweg initiiert wird^{52, 56}.

2.6 Zielsetzung

Vielfältige Untersuchungen haben gezeigt, dass es bei Patienten mit kardio-renalen Vorerkrankungen trotz maximaler lipidsenkender Therapie zu weiteren kardiovaskulären Ereignissen kommt. Es persistiert ein hohes residuales Risiko. Die sterile systemische Entzündung stellt dabei einen wichtigen pathogenetischen Faktor dar⁵⁷. Diese Erkenntnisse machen es notwendig die Rolle von Interleukin-1 α bei der systemischen Inflammation und insbesondere bei kardiovaskulären Erkrankungen genauer zu untersuchen.

Ziel der vorliegenden Promotionsarbeit ist es:

1. Stimuli der IL-1 α -Oberflächenexpression auf Monozyten und IL-1 α -Freisetzung zu identifizieren,
2. die Rolle von IL-1 α bei der Leukozyteninfiltration in entzündetem Gewebe und der Leukozytenadhäsion an Endothelzellen zu analysieren und
3. die Effekte von IL-1 α auf die Entstehung einer Entzündungsreaktion beim akuten Myokardinfarkt zu untersuchen.

3 Material und Methodik

3.1 Materialien

3.1.1 Geräte und Materialien

Gerät/Material	Hersteller
Autoklav	Zirbus technology GmbH, Bad Grund (Harz), DE
Beatmungsgerät	Hugo Sachs Elektronik GmbH, March, DE
Bipolar-Pinzette	Erbe Elektromedizin GmbH, Tübingen, DE
Dampfgarer (95 °C)	Philips GmbH, Hamburg, DE
Deckgläser	Paul Marienfeld GmbH & Co.KG, Lauda Königshofen, DE
Durchflusszytometer FACS Canto II	Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA
Einmalskalpell	B. Braun SE, Melsungen, DE
Elektrophorese Power Supply	Bio-Rad Laboratories, Hercules, Kalifornien, USA
ELISA 96-Well Platten	Greiner Bio-One International GmbH, Frickenhausen, DE
Falcon-Rundbodenröhrchen	Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA
Falcon-Zellkulturflaschen	Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA
Falcon-Zellsieb	Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA
Falcon-Zentrifugenröhrchen	Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA
Färbegestell für Objektträger	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
Filterpapier	Whatman plc, Maidstone, GB

Fluoreszenzscanner	LI-COR Biosciences GmbH, Lincoln, Nebraska, USA
GentleMACS C-Tube	Miltenyi Biotec B.V. & Co. KG, Bergisch Gladbach, DE
GentleMACS Octo Dissociator	Miltenyi Biotec B.V. & Co. KG, Bergisch Gladbach, DE
Glasküvette	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
Inkubator (37°C)	Binder GmbH, Tuttlingen, DE
Inkubator (56 °C)	Heraeus Holding GmbH, Hanau, DE
MACS Holder	Miltenyi Biotec B.V. & Co. KG, Bergisch Gladbach, DE
Mikroskop Axio Imager 2	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Oberkochen, DE
Mikrotom	SLEE medical GmbH, Mainz, DE
Mini-PROTEAN Tetra Cell	Bio-Rad Laboratories, Hercules, Kalifornien, USA
Neubauerzählkammer	LO - Laboroptik Ltd, Lancing, GB
Nitrocellulosemembran	GE Healthcare Life Sciences, Buckinghamshire, GB
Paraffin-Ausgießstation MPS/P2	SLEE medical GmbH, Mainz, DE
pH-Messgerät	Mettler-Toledo, Columbus, Ohio, USA
Pipette	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, DE
Präseparationsfilter (30 µm)	Miltenyi Biotec B.V. & Co. KG, Bergisch Gladbach, DE
PVDF-Membran	Merck Millipore, Burlington, Massachusetts, USA
Schüttler PMR-30 Plattform Rocker	Grant Bio, Oregon, USA

Sicherheitswerkbank Airstream Esco class II BSC	Biomedis Vertriebsgesellschaft GmbH, Gießen, DE
Sunrise Mikrotiterplatten-Photometer	Tecan Trading AG, Männedorf, CH
Thermomixer comfort	Eppendorf AG, Hamburg, DE
Trockenfutter Ratte/Maus 10mm Pellets	Altromin Spezialfutter GmbH & Co. KG, Lage, DE
Waage	Mettler-Toledo, Columbus, Ohio, USA
Zentrifuge Megafuge 1.0 R	Heraeus Holding GmbH, Hanau, DE
Zentrifuge 5804 R	Eppendorf AG, Hamburg, DE

Tabelle 4: Geräte und Materialien

3.1.2 Chemikalien und Reagenzien

Chemikalien/Reagenzien	Hersteller
Aceton	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
Ammoniumchlorid 4N	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
Aqua Dest	B. Braun SE, Melsungen, DE
Bay 11-7082, #t1rl-b82	InvivoGen, San Diego, USA
Bovines Serum Albumin	PAA Laboratories, Cölbe, DE
Bromphenolblau	Merck KGaA, Darmstadt, DE
Ca ²⁺ -Chelator BAPTA-AM, #BCBW1114V	Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, Missouri, USA
Ca ²⁺ -Chelator EGTA, #4100-OP	Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, Missouri, USA

Calpain-Inhibitor E-64-d, #BML-PI107	Enzo Life Sciences GmbH, Lörrach, DE
Calpain-Inhibitor PD 150606, #sc-222133	Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas, USA
Calpain-Inhibitor Z-Leu-Leu-CHO, #BMP-PI116	Enzo Life Sciences GmbH, Lörrach, DE
Cathepsin G Inhibitor I, #219372	Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, Missouri, USA
CD11b microbeads, #130-049-601	Miltenyi Biotec B.V. & Co. KG, Bergisch Gladbach, DE
Dimethylsulfoxid	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
DMEM	Gibco/Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
ELISA Kit: Human-IL-1 α /IL-1F1 DuoSet, #DY200	R&D Systems, Minneapolis, Minnesota, USA
Endothelial Basal Medium	Lonza Group AG, Basel, CH
Endothelial Cell Growth Medium	Lonza Group AG, Basel, CH
Entellan Schnelleindeckmedium	Merck KGaA, Darmstadt, DE
Eosin G-Lösung 0,5% wässrig	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
Ethanol	Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, Missouri, USA
F _c -Blocker	Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA
Fetales Bovines Serum	Gibco/Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
Fibronectin	Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, Missouri, USA
Ficoll Separationsmedium	PromoCell bioscience alive GmbH, Heidelberg, DE
Formaldehyd	Alfa Aesar GmbH, Karlsruhe, DE

Glycin	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
HAECs	Lonza Group AG, Clonetics, Basel, CH
Haemalaunlösung nach Mayer	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
HBSS	Gibco/Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
HEPES	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
Isofluran	Piramal Critical Care Deutschland GmbH, Hallbergmoos, DE
Kaliumhydrogencarbonat	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
Ketamin	Zoetis Deutschland GmbH, Berlin, DE
LPS-EB Ultrapure	InvivoGen, San Diego, USA
Mercaptoethanol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
Natriumazid	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, DE
Natrium-Chlorid	VWR International, Radnor, Pennsylvania, USA
Natrium-Citrat	Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, Missouri, USA
Oxalat	Alfa Aesar, Massachusetts, USA
Penicillin/Streptomycin	Gibco/Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
Phosphatgepufferte Salzlösung	Gibco/Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
PKH67 labeling kit, #MINI67-1KT	Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, Missouri, USA
RPMI-1640 GlutaMAX	Gibco/Life Technologies, Carlsbad, CA, USA

Salzsäure 1N	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
SDS	Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, Missouri, USA
Spleen Dissociation Kit, #130-095-926	Miltenyi Biotec B.V. & Co. KG, Bergisch Gladbach, DE
Texas Red Streptavidin	Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA
TRIS-Hydrochlorid	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
TrypanBlau	Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, Missouri, USA
Trypsin	Gibco/Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
TSA Biotin System	Akoya Biosciences, Marlborough, Massachusetts, USA
Tumornekrosefaktor- α	R&D Systems, Minneapolis, Minnesota, USA
Tween 20	Fisher Scientific GmbH, Schwerte, DE
Vectashield Antifade Mounting Medium	Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA
Vybrant Dil Zellmarkierungslösung	Invitrogen by Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Wasserstoff-Peroxid-Lösung 30%	Fisher Scientific GmbH, Schwerte, DE
Western Blot-Blockierungspuffer	LI-COR Biosciences GmbH, Lincoln, Nebraska, USA
Xylazin	Bayer AG, Leverkusen, DE
Xylol	Aug. Hedinger GmbH & Co. KG, Stuttgart, DE
Zymosan	Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, Missouri, USA

Tabelle 5: Chemikalien und Reagenzien

3.1.3 Antikörper

Antikörper	Hersteller
Anti-human β -Actin Antikörper, #sc-47778, clone C4	Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas, USA
APC Anti-mouse Ly-6C Antikörper, #128025, clone HK1.4	BioLegend, San Diego, USA
F4/80 Antikörper, #14-4801-82, clone BM8	Invitrogen by Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Goat Anti-human VCAM-1 Antikörper, #BBA19, polyklonal	R&D Systems, Minneapolis, Minnesota, USA
Goat Anti-Rabbit IgG sekundärer Antikörper, #31820, polyklonal	Invitrogen by Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Goat Anti-Rat IgG sekundärer Antikörper, #31830, polyklonal	Invitrogen by Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Human IL-1 α Antikörper, Anti-hIL-1 α -IgG, #mabg-hil1a, clone 7D4	InvivoGen, San Diego, USA
Human IL-1R1 Antikörper, #AB-269-NA, polyklonal	R&D Systems, Minneapolis, Minnesota, USA
IL-1 α Antikörper, #CSB-PA009537, polyklonal	Cusabio Technology LLC, Houston, Texas, USA
IL-1 α FITC Antikörper, #11-7118-82, clone 364/3B3-14	eBioscience, Frankfurt, DE
IRDye 800CW Donkey Anti-Goat IgG sekundärer Antikörper, #926-32214, polyklonal	LI-COR Biosciences GmbH, Lincoln, Nebraska, USA
IRDye 800CW Donkey Anti-Rabbit IgG sekundärer Antikörper, #926-32213, polyklonal	LI-COR Biosciences GmbH, Lincoln, Nebraska, USA
IRDye 680RD Goat Anti-Mouse IgG sekundärer Antikörper, #926-68070, polyklonal	LI-COR Biosciences GmbH, Lincoln, Nebraska, USA
Mouse Anti-human Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (Anti-GAPDH), #MAB374, clone 6C5	Merck Millipore, Burlington, Massachusetts, USA

PE Anti-mouse Ly-6G Antikörper, #127607, clone 1A8	BioLegend, San Diego, USA
Rabbit Anti-human IL-1 α Antikörper, #ab9614, polyklonal	Abcam, Cambridge, GB

Tabelle 6: Antikörper

3.1.4 Puffer und Medien

Puffer/Medium	Rezept
Ammoniumchlorid Lysepuffer (0,155 M)	500 ml H ₂ O 4,15 g NH ₄ Cl 0,5006 g KHCO ₃ 0,1 ml EDTA-Lösung pH auf 7,4 einstellen
EDTA-Lösung (0,5 M)	186,1 g EDTA 800 ml H ₂ O pH auf 8,0 einstellen auf 1000 ml auffüllen und autoklavieren
ELISA Assay Diluent	1 % BSA in PBS
ELISA Avidin-HRP-Lösung	1 μ l Avidin HRP 999 μ l Assay Diluent
ELISA Coating-Puffer	200 μ l 5x Carbonatpuffer 800 μ l H ₂ O
ELISA Fixationsantikörperlösung	5 μ l Fixationsantikörperansatz 995 μ l Coating-Puffer
ELISA Detektionsantikörperlösung	5 μ l Detektionsantikörperansatz 995 μ l Assay Diluent
ELISA Substratlösung	25 μ l H ₂ O ₂ 25 μ l Tetramethylbenzidin
ELISA Waschpuffer	500 ml PBS 0,25 ml Tween 20
FACS Färbepuffer	200 μ l FACS-Puffer APC anti-mouse Ly-6C Antikörper PE anti-mouse Ly-6G Antikörper Antikörper PKH67-FITC Antikörper IL-1 α FITC

FACS Waschpuffer	500 ml PBS 5% (v/v) FBS 0,5% (w/v) BSA 0,007 (v/v) NaN ₃
HEPES-Puffer	2,3831 g HEPES 8,766 g NaCl 0,8 g Natriumazid 800 ml ddH ₂ O pH auf 7,5 einstellen mit A.D. auf 1000 ml auffüllen
MACS-Puffer	PBS 0,5 % BSA 2 mM EDTA pH auf 7,2 einstellen
Natrium-Citrat-Puffer	2,914 g Natrium-Citrat 1000 ml ddH ₂ O pH auf 6,0 einstellen 0,5 ml Tween 20
Probenpuffer (Lämmli-Puffer, 1x)	6,25 ml Tris (1 M) 25 ml Glycerin (25 %) 10 mg Bromphenolblau 2 g SDS (2 %) 5 ml β-Mercaptoethanol Mit ddH ₂ O auf 100 ml auffüllen
5 % Sammelgel	1,36 ml Polyacrylamid (30 %) 5,44 ml ddH ₂ O 1,04 ml Tris 0,08 ml SDS (10 %) 0,08 ml APS (10 %) 0,008 ml TEMED
SDS-Running-Puffer	30.2 g Tris (250 mM) 144 g Glycin (1,92 M) 10 g SDS (1 %) mit ddH ₂ O auf 1 l auffüllen

TNB-Blocking-Puffer	1,576 TRIS-HCl (0,1 M) 0,876 NaCl (0,15 M) in 100 ml ddH ₂ O auflösen pH auf 7,5 einstellen 0,5 g Blocking Reagenz (0,5 %)
1x Transferpuffer	100 ml 10x Transferpuffer 200 ml Ethanol (20 %) 1 l ddH ₂ O
10x Transferpuffer	29,27 g Glycin (390 mM) 58,15 g Tris (480 mM) 3,7 g SDS (0,037 %) 1 l ddH ₂ O
10 % Trenngel	2 ml Polyacrylamid (30 %) 2,38 ml ddH ₂ O 1,5 ml Tris 0,06 ml SDS (10 %) 0,06 ml APS (10 %) 0,0024 ml TEMED
15 % Trenngel	8 ml Polyacrylamid (30 %) 5,44 ml ddH ₂ O 4 ml Tris 0,16 ml SDS (10 %) 0,16 ml APS (10 %) 0,0016 ml TEMED
Verdünnungsmedium	500 mg PBS 5 ml EDTA-Lösung (0,5 M)
Western Blot-Lysepuffer	50 mmol/l Tris 150 mmol/l NaCl 1 mmol/l EDTA 0,5 % NP-40 Protease- und Phosphataseinhibitoren
Western Blot-Waschpuffer	500 ml PBS 500 µl Tween 20 (0,05 %)
Zellkulturmedium (Vollmedium)	500ml RPMI 10% FBS 1% Penicillin/Streptomycin 10 mM HEPES-Puffer

Tabelle 7: Puffer und Medien

3.2 Methodik

3.2.1 Versuchsbedingungen

Die aufgeführten Versuche sind, sofern nicht anders angegeben, unter sterilen Bedingungen und bei 20 °C Raumtemperatur (RT) im Labor für translationale kardio-renale Medizin durchgeführt worden.

Die Tierversuche wurden nach § 8 des Tierschutzgesetzes unter der Versuchsnummer 31/2016 bewilligt. Die Haltung und Herkunft der Tiere ist in Abschnitt 3.2.6.1 beschrieben.

3.2.2 Ablauf der Versuche

Zum besseren Verständnis der im folgenden Kapitel beschriebenen Versuche dient Abb. 5:

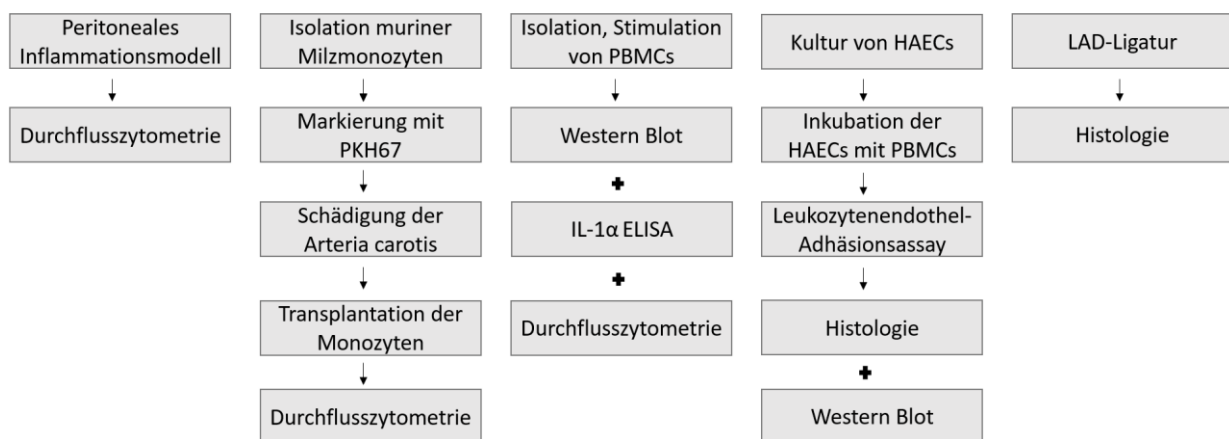


Abb. 5: Ablauf der Versuche

3.2.3 Isolation und Stimulation mononukleärer Zellen (PBMCs)

3.2.3.1 Isolation von PBMCs

Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (PBMCs, engl. peripheral blood mononuclear cells) sind einkernige Zellen und entsprechen Lymphozyten und Monozyten. Zur Isolation von PBMCs eignet sich das physikalische Trennverfahren der Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation. Ficoll, ein Saccharose-Epichlorhydrin-Copolymer, fungiert mit einer Dichte von 1.077 g/ml als Separationsmedium zwischen Erythrozyten/Granulozyten zum einen und PBMCs/Plasma/Verdünnungsmedium (PBS + 0,5 M EDTA) zum anderen. Ziel ist es die unterschiedlichen Blutbestandteile anhand ihres Dichtegradienten aufzutrennen und am Ende PBMCs zu isolieren.

Dafür wurde zuvor gewonnenes Vollblut mit dem Verdünnungsmedium im Verhältnis 1:1 in ein 50 ml-Zentrifugenröhrchen pipettiert. Das enthaltene EDTA hemmt die Gerinnung. Je 15 ml

Separationsmedium in zwei Falcon-Röhrchen wurden anschließend präzise, unter Beachtung der Trennschicht, mit dem Gemisch überschichtet. Es folgte die erste Zentrifugation für 30 min bei RT, 400 G und ohne Bremse, um die aufgetrennten Schichten beim Abbremsen der Rotoren nicht erneut zu vermischen. Die Erythrozyten und Granulozyten sammeln sich, wie in Abb. 6 dargestellt, durch ihre hohe Dichte unter dem Trennmedium. PBMCs akkumulieren zwischen diesem und der obersten Schicht aus Plasma, PBS und EDTA.

Nach dem Verwerfen der Plasmaschicht bleiben die PBMCs als dünne weißliche Schicht auf dem Ficoll-Trennmedium zurück. Diese wurde mit einer 10 ml-Spritze in ein frisches Falcon-Gefäß entnommen. Es wurde mit PBS + EDTA auf 50 ml aufgefüllt und für 10 min bei 4 °C, 400 G und mit Bremse zentrifugiert. Gefolgt auf das Entfernen des Überstandes wurde das Zellpellet in 2,5 ml PBS + EDTA resuspendiert und in einem Falcon-Röhrchen mittels Verdünnungsmedium auf 15 ml aufgefüllt. Die erneute Zentrifugation für 10 min, bei 4 °C, 300 G und mit der Bremse diente dem Entfernen von Zellpartikeln und Thrombozyten. Noch einmal wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet in 2 ml PBS resuspendiert. Durch Inkubation mit 6 ml Ammoniumchlorid für 10 min bei 4 °C erfolgte die Lyse der Erythrozyten. Diese wurden nach der Zentrifugation für 10 min bei 4 °C, 400 G und mit Bremse abgesaugt. Die dadurch isolierten PBMCs wurden in 10 ml Medium (RPMI Glutamax + 10 % fetales Rinderserum (FBS) + Penicillin/Streptomycin + 10 mM HEPES) resuspendiert und in einer Neubauerzählkammer quantifiziert.

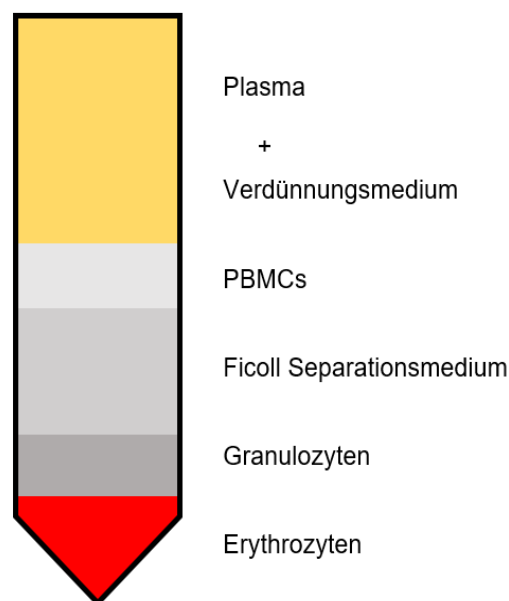


Abb. 6: Resultat der Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation

3.2.3.2 Stimulation von PBMCs

Die Stimulation der PBMCs dient der Untersuchung des Effektes verschiedener Stimulantien auf die pro-IL-1 α Expression und die Freisetzung von maturem IL-1 α aus Monozyten. Dafür wurden 1×10^6 PBMCs in 10 ml Medium gegeben und in einer 96-well Mikrotiterplatte in 200 μ l Medium ausgesät. Es erfolgte die Inkubation für eine Stunde bei 37 °C. Die mononukleären Zellen setzten sich am Boden der Wells ab. Nicht-adhärenente Zellen und Zelldebris wurden durch den Wechsel des Mediums (RPMI Glutamax + Penicillin/Streptomycin + 10 mM HEPES) separiert. Das frische Medium enthielt kein FBS mehr.

Die Stimulation der Zellen erfolgte schließlich durch Inkubation mit hochreinem Lipopolysaccharid (LPS, 100 ng/ml, 18 h), Tumornekrosefaktor- α (TNF- α , 5 ng/ml, 18 h), LPS + Ölsäure (LPS Priming, 100 ng/ml, 18 h; OA, 100 μ M, 4 h), LPS + Oxalat (LPS Priming, 100 ng/ml, 18 h; Ox, 100 μ g/ml, 4 h) bzw. Ox (100 μ g/ml, 4 h) und OA (100 μ M, 4 h). Ölsäure wurde in Cremophor, einem nicht-ionischen Tensid, gelöst und so in die Formulierung eingebunden. Die Stimulation der PBMCs wurde zusätzlich in Anwesenheit von Bay 11-7082 (Invivogen, #tlrl-b82, 10 μ M), einem irreversiblen Inhibitor von NF- κ B, durchgeführt.

Zur Untersuchung des Einflusses der Ca²⁺-abhängigen Proteasen Calpain und Cathepsin G auf die Prozessierung von IL-1 α wurden PBMCs erneut, wie oben beschrieben, stimuliert. Jedoch erfolgte dies unter Hinzugabe der Ca²⁺-Chelatoren BAPTA-AM (Sigma-Aldrich, #BCBW1114V, 10 μ M) und EGTA (Sigma Aldrich, #4100-OP, 20mM), der Calpain-Inhibitoren Z-Leu-Leu-CHO (Enzo Life Sciences, #BMP-PI116, 1,2 μ M), E-64-d (Enzo Life Sciences, #BML-PI107, 50 μ g/ml), PD 150606 (Santa Cruz, #sc-222133, 100 μ g/ml) sowie des Cathepsin G Inhibitors I (Sigma Aldrich, #219372, 50 μ g/ml). Durch Zentrifugation der Mikrotiterplatte für 10 min bei 400 G wurde der Überstand für die späteren Messungen der pro-IL-1 α Expression und Sekretion von maturem IL-1 α nach Stimulation gewonnen. Dieser wurde zunächst bei -80 °C gelagert.

3.2.4 Durchflusszytometrische Quantifizierung

Die Grundlage einer durchflusszytometrischen Messung bildet die Emission von Streulicht in verschiedenen Winkeln und Fluoreszenzsignalen unterschiedlicher Intensität, sobald eine Zelle den Laserstrahl passiert. Nach der Registrierung durch Detektoren werden die Events als Punkte in einem Streudiagramm präsentiert. Dies ermöglicht die quantitative Darstellung von Zellen aufgegliedert nach verschiedenen Merkmalen. Zur quantitativen Analyse der Oberflächenexpression von IL-1 α auf PBMCs (siehe Abschnitt 3.2.3), der peritonealen Monozyten und Neutrophilen (siehe Abschnitt 3.2.6.2) bzw. der PKH67⁺-markierten Monozyten (siehe Abschnitt 3.2.6.4) dient das FACS (Fluorescence Activated Cell Sorting) Canto II der Firma BD sowie die Software FlowJo 10.5.3.

3.2.4.1 Vorbereitung

Zur Vorbereitung wurden 1×10^6 PBMCs bzw. Monozyten/Neutrophile in je zwei FACS-Röhrchen mit FACS-Puffer gewaschen. Um unterschiedliche Fluoreszenzsignale zur späteren Einteilung in Subpopulationen zu erhalten, gaben wir je nach Versuch verschiedene fluoreszenzmarkierte Antikörper für 45 min bei 4 °C hinzu. Zu diesen zählten die Antikörper IL-1 α FITC (eBioscience, #11-7118-82, clone 364/3B3-14, 5 μ g/ml), APC Anti-mouse Ly-6C Antikörper (Biolegend, #128025, clone HK1.4, 1 μ g/ml), PE Anti-mouse Ly-6G Antikörper (Biolegend, #127607, clone 1A8, 1 μ g/ml) sowie der Antikörper PKH67-FITC (Sigma-Aldrich Corporation, #MINI67-1KT, 5 μ M).

Nach der Färbung einer Probe mit Färbepuffer fand eine weitere Waschung beider Proben mit dem FACS-Puffer statt. Vor der eigentlichen Messung wurden die Zellen mit je 300 μ l Formaldehyd für 20 min bei 4 °C fixiert und in FACS-Puffer resuspendiert.

3.2.4.2 Messung

Schließlich erfolgte die Durchflusszytometrie. Hierbei werden die Proben mittels Druck durch eine feine Küvette geleitet. Die Zellen treffen dabei einzeln im 90° Winkel auf einen Laserstrahl. Anhand des FSC-Detektors (Forward Scatter, Vorwärtsstreulicht) und seiner Aufnahme von Lichtstrahlen, die in einem 180° Winkel abgehen, lassen sich Aussagen über die Größe der Zellen treffen. Lichtstrahlen, die in einem 90° Winkel abgelenkt werden, erfasst der SSC-Detektor (Sideward Scatter, Seitwärtsstreulicht). Dies dient der Charakterisierung der Granularität.

Die mit der Probe inkubierten Fluorochrome emittieren Lichtsignale unterschiedlicher Wellenlänge. Durch ein System mehrerer teildurchlässiger Spiegel treffen diese auf weitere Detektoren (siehe Abb. 7). Dadurch konnten Monozyten und Neutrophile oder auch die Oberflächenexpression von IL-1 α quantifiziert werden. Die Menge der gebundenen Antikörper spiegelt sich in der Intensität der emittierten Fluoreszenzsignale wider. Es erfolgte auch eine Messung der ungefärbten Zellen zur Bestimmung der Mean fluorescence intensity (MFI) anhand des Vergleiches mit der gefärbten Probe.

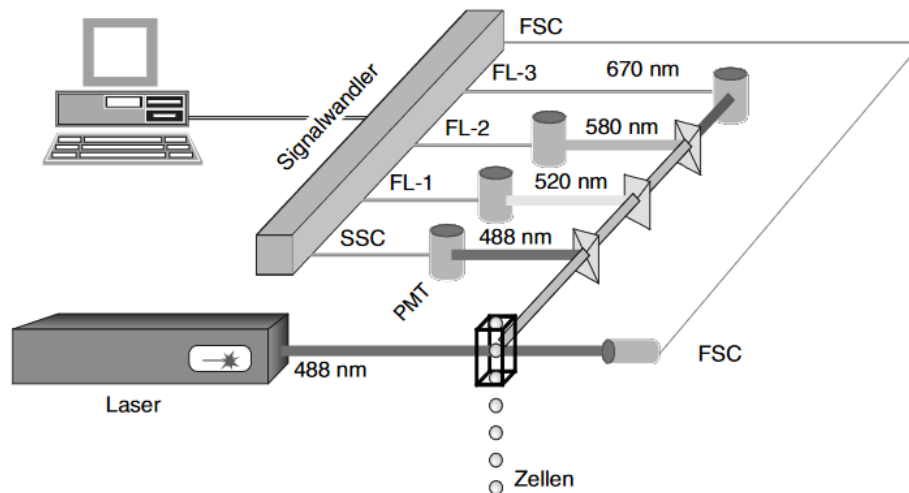


Abb. 7: Messprinzip eines Durchflusszytometers (entnommen aus Rothe G, 2007, S. 30⁵⁸)

3.2.5 Interleukin-1 α ELISA

ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) in der weit verbreiteten Sandwich-Methode nutzt zwei verschiedene Antikörper (Capture AK, Detection AK). Beide binden an unterschiedliche Epitope des gesuchten Antigens. Das Antigen lässt sich anschließend mit Hilfe einer Farbreaktion nachweisen und anhand der Signalstärke quantifizieren. Für das Nachweisverfahren von IL-1 α mittels ELISA fand der bei -80 °C gelagerte Überstand (siehe Abschnitt 3.2.3) sowie das ELISA Kit von R&D systems (Human-IL-1 α /IL-1F1 Duoset, #DY200) Verwendung.

Zunächst wurde eine 96-well Mikrotiterplatte mit je 50 μ l des Capture-Antikörpers bei 4 °C über Nacht inkubiert. Es schloss sich ein dreifacher Waschvorgang mit Puffer (500 ml PBS + 0,25 ml 0,05 % Tween 20) an. Mehrfache Waschvorgänge wurden nach jedem weiteren Schritt vorgenommen, um ungebundene Antikörper oder auch Antigen zu entfernen.

Aus der Zugabe von je 100 μ l Assay Diluent (1 % BSA in PBS) für eine Stunde resultierte die Blockade unspezifischer Bindungsstellen. An einen weiteren Waschschrift angeschlossen, wurden je 50 μ l des Zellüberstandes der zuvor isolierten und stimulierten PBMCs bzw. 50 μ l der Set-Standardreihe für zwei Stunden hinzugegeben. Die Standardreihe ermöglicht durch bekannte Antigenkonzentrationen eine quantitative Einordnung der später photometrisch bestimmten optischen Extinktion. Es folgte ein weiterer Waschschrift und eine einstündige Inkubation mit dem Detection-Antikörper. Dieser band das am Capture-Antikörper gebundene IL-1 α . Um eine Farbreaktion zu erhalten, musste nach einem weiteren Waschschrift eine Streptavidin-HRP-Lösung (Meerrettichperoxidase, engl. horseradish peroxidase) beigemischt werden, die eine hohe Affinität für den biotinylierten F_c-Teil des Detection-Antikörper hat. Nach einem neuerlichen Waschvorgang wurde je 50 μ l Substratlösung (H₂O₂ und Tetramethylbenzidin im Verhältnis 1:1) hinzugefügt.

Nach 20 min kam es durch die HRP zur Oxidation von Tetramethylbenzidin und somit einem blauen Farbumschlag. Schwefelsäure diente dabei als Stopp-Lösung der enzymatischen Reaktion und führte zu einer Gelbfärbung. Mittels Photometer wurde die Lichtabsorption bei 450 nm und 570 nm Wellenlänge gemessen. Dadurch wurde die Konzentration von IL-1 α im Überstand nach dem Lambert-Beerschen Gesetz im Vergleich zur Standardreihe bestimmt.

3.2.6 Tierexperimente

3.2.6.1 Versuchstiere

Für die Tierversuche wurden *Il1a*^{-/-} Mäuse von Manfred Kopf (ETHZ Zürich, Schweiz) sowie passende C57/BL6-Wildtypmäuse aus der Tierhaltung der Universität des Saarlandes zur Verfügung gestellt. Zu dem Zeitpunkt der Versuche waren die Mäuse in einem Alter zwischen acht bis zwölf Wochen. Während der Versuche wurden die Tiere in Einzelkäfigen in den Räumen des Labors für experimentelle und translationale kardio-renale Medizin der Universität des Saarlandes gehalten. Zu jeder Zeit wurden die entsprechenden gesetzlichen Regelungen einschließlich des Tierschutzgesetzes beachtet (Genehmigung: 31/2016).

3.2.6.2 Peritoneales Inflammationsmodell

Zur Untersuchung des Einflusses von IL-1 α auf die Leukozyteninfiltration in entzündetem Gewebe wurde eine sterile Peritonitis an Wildtyp (WT)- und *Il1a*^{-/-} Mäusen induziert (siehe Abb. 8). Dafür wurde den Mäusen je 300 μ l steriles PBS oder je 200 μ g/ml Zymosan in 300 μ l PBS intraperitoneal gespritzt. PBS dient dabei als Kontrolle, Zymosan hingegen als Pyrogen. Nach sechs Stunden erfolgte die Narkotisierung der Mäuse mit Isofluran und die Desinfektion der Bauchhaut mittels Ethanol. Die Bauchhöhle wurde ohne Verletzung des Peritoneums vorsichtig eröffnet. Daraufhin schloss sich eine peritoneale Lavage mit 5 ml PBS inklusive 2 mM EDTA sowie eine Bauchmassage für 2 min zur Mobilisierung der Zellen an. Die mit einer Kanüle aufgenommene Lavage-Flüssigkeit wurde in ein 15 ml Falcon-Röhrchen überführt und zunächst auf Eis gelagert. Zur Quantifizierung der Zellzahl wurde eine Verdünnung im Verhältnis 1:10 aus 50 μ l TrypanBlau, 40 μ l PBS und 10 μ l Zellen erstellt und in eine Neubauerzählkammer gegeben. Durch Zählung der Zellen innerhalb der großen Quadrate, Errechnen eines Mittelwertes und Multiplikation mit 10^5 ergab sich die Zellzahl pro ml.

Nach Blockade des F $_c$ -Rezeptors zur Verhinderung unspezifischer Antikörperbindungen wurden die peritonealen Zellen mit den immunfluoreszierenden Antikörpern APC Anti-mouse Ly-6C (Biolegend, #128025, clone HK1.4, 1 μ g/ml) und PE Anti-mouse Ly-6G (BioLegend, #127607, clone 1A8, 1 μ g/ml) für 45 min inkubiert. Es schloss sich die Quantifizierung der Zellpopulationen mittels Durchflusszytometrie an (siehe Abschnitt 3.2.4).

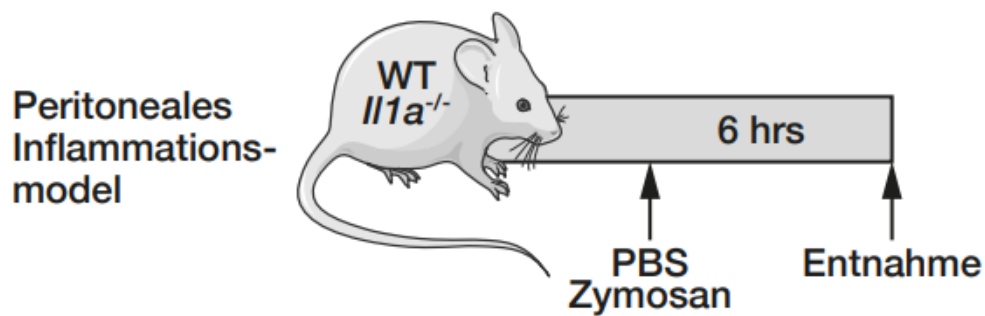


Abb.8: Peritoneales Inflammationsmodell (entnommen aus Schunk SJ et al., Circulation, 2021⁵⁹)

3.2.6.3 Isolation von Milzmonozyten

Zur Vorbereitung des Carotis-Schädigungsmodells (siehe Abschnitt 3.2.6.5) wurden CD11b⁺-Monozyten mittels Magnetic activated cell sorting (MACS) jeweils aus WT- und *Il1a*^{-/-} Mäusen isoliert. Die Grundlage der magnetischen Zellsortierung bildet die Inkubation der Zellsuspension mit Magnetpartikeln, sogenannten Microbeads. Diese sind an Antikörper mit einer hohen Affinität für die Oberflächenstruktur bestimmter Zellen gekoppelt. Beim Fluss durch eine Säule, umgeben von einem Dauermagneten, werden die markierten Zellen im magnetischen Feld zurückgehalten, sodass eine positive Selektion erfolgt. Folgende Lösungen waren dafür anzusetzen (siehe Tabelle 8):

Enzym A	Auflösen des lyophilisierten Pulvers in 1 ml 1x Puffer S
Enzym D	Auflösen des lyophilisierten Pulvers in 3 ml 1x Puffer S
MACS-Puffer	MACS BSA-Stammlösung in autoMACS-Spüllösung im Verhältnis 1:20 verdünnen, im Sonikator entgasen (enthält PBS, 0,5 % BSA, 2 mM EDTA; pH 7,2)
1x Puffer S	1 ml 20x Puffer S in 19 ml ddH ₂ O

Tabelle 8: Lösungen für die Milzzellisolation

Zunächst wurde eine Einzelzellsuspension der Milz mit Hilfe des Spleen Dissociation Kit (Miltenyi Biotec, #130-095-926) gewonnen. Dafür wurde die zuvor entnommene Milz in ein C-Tube mit 2,4 ml Puffer S, 50 µl Enzym D und 15 µl Enzym A zur Einleitung des enzymatischen Verdauens gegeben. Es folgte eine mechanische Dissoziation des Organs unter Einwirkung von Hitze (37 °C) im gentleMACS Octo Dissociator. Das Gefäß wurde kopfüber hingestellt, sodass sich die Milz direkt am Rotor befand und es zur optimalen Auflösung des Gewebes kam. Daraufhin schloss sich eine kurze Zentrifugation zur Lösung von Ablagerungen am Boden des

C-Tube an. Die Probe wurde resuspendiert und durch einen 30 µm Präseparations-Filter in ein 15 ml Röhrchen gefüllt. Nach Reinigung des Filters mit 2,5 ml Puffer S wurde dieser verworfen, die Zellsuspension mit MACS-Puffer gewaschen und für 5 min bei 4 °C und 300 G zentrifugiert.

Um CD11b⁺-Monozyten aus der Einzelzellsuspension zu isolieren, wurden diese schließlich in 80 µl MACS-Puffer resuspendiert und mit 20 µl CD11b⁺-Microbeads (Miltenyi Biotec, #130-049-601) für 15 min bei 4 °C inkubiert. Die Microbeads waren an Antikörper mit hoher Affinität für CD11b⁺-Monozyten gekoppelt. Es folgte eine Waschung mit MACS-Puffer und eine Zentrifugation für 5 min bei 4 °C und 300 G. Der Überstand wurde verworfen, die Zellen in 500 µl MACS-Puffer resuspendiert und erneut durch den 30 µm Präseparations-Filter filtriert. Nach Platzierung einer Säule im MACS Holder wurde diese mit 3 ml MACS-Puffer äquilibriert und ein Falcon-Gefäß darunter gestellt. Der im Holder enthaltene Dauermagnet erzeugt dabei das magnetische Feld innerhalb der Säule. Es erfolgte die Übertragung der Zellsuspension und dreimaliges Spülen mit je 3 ml MACS-Puffer. Die mit den Microbeads markierten Zellen werden durch den Magneten in der Säule zurückgehalten und die unmarkierten Zellen im Falcon-Röhrchen aufgefangen.

Durch Entfernen der Säule aus dem MACS Holder und somit auch aus dem magnetischen Feld konnten die markierten Zellen mit Hilfe von 3 ml MACS-Puffer in ein frisches Falcon-Gefäß gespült werden. Die Reinheit der Zellisolation wurde in einer durchflusszytometrischen Messung (siehe Abschnitt 3.2.4) validiert.

3.2.6.4 Markierung der isolierten Milzmonozyten mit PKH67

Zur späteren Identifikation der isolierten CD11b⁺-Monozyten an der geschädigten Arteria (A.) carotis communis wurden diese mit dem fluoreszierenden Farbstoff PKH67 (PKH67 labeling kit, Sigma Aldrich, #MINI67-1KT) gefärbt.

Dafür erfolgte nach Waschung der Zellen mit serumfreiem Medium eine Zentrifugation für 5 min bei 400 G. Der Überstand wurde bis auf circa 25 µl verworfen. Das Zellpellet wurde in 1 ml Diulent C resuspendiert und mit 4 µl PKH67-Färbelösung inkubiert. Durch Zugabe von 1 ml BSA-Lösung (1 %) wurde die Färbung gestoppt und das Gemisch für 10 min bei RT und 400 G zentrifugiert. Nach zweimaligem Waschen mit Vollmedium wurden die Zellen umgehend zur Transplantation im Carotis-Schädigungsmodell genutzt.

3.2.6.5 Carotis-Schädigungsmodell

Das Carotis-Schädigungsmodell dient der Analyse des Einflusses von IL-1 α auf die Leukozytenadhäsion im Bereich einer Gefäßläsion. Der Eingriff wurde unter Inhalationsnarkose mit Isofluran durchgeführt. Es wurden WT- und *Il1a*^{-/-} Mäuse verwendet (siehe Abb. 9).

Die Maus wurde in Rückenlage mit gestrecktem Hals fixiert und linksseitig rasiert. Nach großzügiger Desinfektion erfolgte ein Schnitt von kaudal nach kranial, sodass nach der Präparation der Glandula submandibularis und des M. sternocleidomastoideus die Vagina carotica als Bindegewebshülle um die Vena jugularis interna, den Nervus vagus und die A. carotis communis sichtbar wurde. Die linke A. carotis communis wurde nach ihrer Präparation aus dem Bindegewebe auf einer Strecke von 4 mm mit einer 2 Watt Bipolar-Pinzette perivaskulär geschädigt. Dies resultierte in einer Endothelschädigung der Arterie.

Im nächsten Schritt wurden vier Stunden nach der Carotis-Schädigung 1×10^6 der zuvor isolierten und PKH67⁺-markierten CD11b⁺- Milzmonozyten (siehe Abschnitt 3.2.6.3, 3.2.6.4) über den orbitalen Venenplexus injiziert. Dabei wurde den WT-Mäusen Monozyten aus *Il1a*^{-/-} Mäusen injiziert und vice versa. 18 Stunden später wurde die linke A. carotis communis nach erneuter Freipräparation entnommen. Dafür fand eine Abtrennung des Gefäßes sowohl oberhalb der Bifurkation in die A. carotis interna und externa als auch unterhalb des verletzten Abschnittes statt. Das Gefäß wurde in einem Puffer aus Kollagenasen I, XI, Hyaluronidase und DNase für eine Stunde bei 37 °C unter sanfter Bewegung verdaut. Es schloss sich eine Siebung der Zellen durch ein 70 μ m Zellsieb an. Zum Schluss wurden die infiltrierten PKH67⁺-Monozyten mittels Durchflusszytometrie (siehe Abschnitt 3.2.4) quantifiziert.

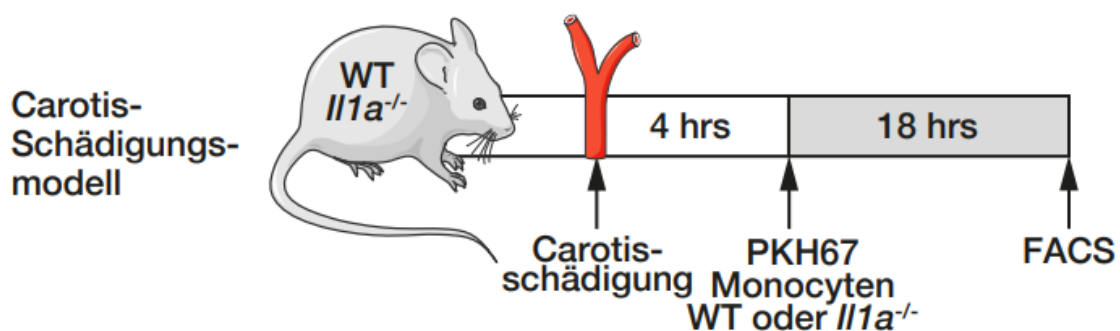


Abb.9: Carotisschädigungsmodell (entnommen aus Schunk SJ et al., Circulation, 2021⁵⁹)

3.2.6.6 LAD-Ligaturmodell

Um die Rolle von IL-1 α bei einem akuten Myokardinfarkt zu untersuchen, wurde durch eine Ligatur der LAD (RIVA, Ramus interventricularis anterior) ein Myokardinfarkt induziert. Zur Kontrolle und für die spätere Auswertung dient eine Scheinoperation bei der lediglich das Perikard eröffnet wurde (siehe Abb. 10).

Die Anästhesie der WT- und *Il1a*^{-/-} Mäuse wurde mit einer Kombination von jeweils 100 mg/kg Ketamin und 10 mg/kg Xylazin durchgeführt. Die Beatmung erfolgte mit einem Volumen von 200 μ l und einer Rate von 120 pro min. Nach Fixierung der Maus in Rückenlage und großzügiger Desinfektion wurde der Thorax auf der linken Seite rasiert. Zur Eröffnung des Thorax diente ein Schnitt auf Höhe des vierten Intercostalraums links, parallel zum Verlauf der Rippen. Bevor das Perikard eröffnet wurde, erfolgte eine Durchtrennung der Muskeln und die Lunge wurde zur Seite geschoben. Unter Zuhilfenahme eines Mikroskops fand die Ligatur der LAD durch Abbinden mittels eines Fadens statt. Die Induktion einer Ischämie wurde durch bläulich-livide Verfärbung distal der LAD und Abnahme der Kontraktivität der Vorderwand des linken Ventrikels sichtbar. Zum Schluss erfolgte bei allen Mäusen, sowohl nach LAD-Ligatur als auch nach Scheinoperation, ein Wundverschluss.

Drei Tage später wurden die Herzen nach Einleitung einer erneuten Anästhesie und letztlich zervikaler Dislokation zur weiteren histologischen Aufbereitung (siehe Abschnitt 3.2.7) entnommen.

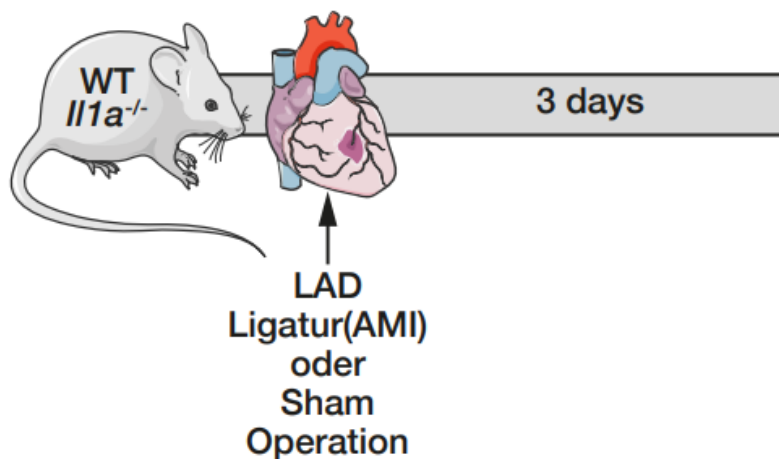


Abb.10: LAD-Ligaturmodell (entnommen aus Schunk SJ et al., Circulation, 2021⁵⁹)

3.2.7 Histologie

Hämatoxylin-Eosin (HE) sowie die Immunfluoreszenz-Färbungen (F4/80, IL-1 α) werden mit dem Mikroskop Zeiss Axio Imager 2 und der Software ZEN ausgewertet. Zur Quantifikation dient die Software Image J. Vorbereitend für alle Färbungen werden die Präparate in Paraffin eingebettet und Schnitte mit einer Dicke von 3 μ m am Mikrotom angefertigt. Letztlich werden diese auf Objektträger aufgezogen.

3.2.7.1 Hämatoxylin-Eosin-Färbungen

Die HE-Färbung besteht aus zwei Einzelfärbungen. Während die Schnitte zunächst bei 56 °C im Brutschrank antrockneten, wurde die Färbereihe aufgebaut. Die Objektträger wurden mit Xylol entparaffiniert und mit Alkohol in absteigender Konzentration sowie Aqua Dest (A.D.) rehydriert (siehe Tabelle 9).

Xylol	Xylol	100 % Alkohol	100 % Alkohol	90 % Alkohol	80 % Alkohol	70 % Alkohol	Aqua Dest
10 min	10 min	5 min	5 min	5 min	5 min	5 min	5 min

Tabelle 9: Reihe zur Rehydrierung der Präparate

Es folgte die Färbung mit saurem Hämalan nach Mayer für 10 min zur Markierung der Zellkerne. Danach wurden die Objektträger für 15 min in Leitungswasser gestellt. Zur Gegenfärbung schloss sich eine Eosinlösung (0,1 %) für 1 min an. Aufgrund ihrer Azidität wurde diese jedoch nicht mehr von den Zellkernen, sondern lediglich vom Zytoplasma und Bindegewebe aufgenommen. Die Präparate wurden anschließend in aufsteigender Alkoholreihe bis hin zu Xylol entwässert (siehe Tabelle 10). Letzter Schritt war das Eindecken mit dem Medium (Entellan, Schnelleindeckmedium).

Aqua Dest	70 % Alkohol	80 % Alkohol	90 % Alkohol	100 % Alkohol	100 % Alkohol	Xylol	Xylol
spülen	spülen	spülen	spülen	5 min	5 min	10 min	10 min

Tabelle 10: Reihe zur Entwässerung der Präparate

3.2.7.2 Immunfluoreszenz-Färbungen

Die Immunfluoreszenz-Färbungen erfolgen indirekt über zwei Tage mittels der ABC-Methode (Avidin-Biotin-Komplex-Methode) mit Tyramid-Signalverstärkung (CSA, catalysed signal amplification). Bestimmte Proteine werden dabei über eine Verbindung aus Antigen-primärer Antikörper-sekundärer Antikörper-Enzymkomplex-fluoreszierender Farbstoff und einem zwischengeschalteten Amplifikationsreagenz angefärbt.

Tag 1:

Zunächst trockneten die Objektträger im Brutschrank bei 56 °C für eine Stunde an. Es folgte eine Reihe zur Entfernung des Paraffins und Rehydrierung der Präparate (siehe Tabelle 11).

Xylol	Xylol	100 % Alkohol	100 % Alkohol	90 % Alkohol	80 % Alkohol	70 % Alkohol	Aqua Dest	3 % H ₂ O ₂	Aqua Dest
10 min	10 min	5 min	5 min	5 min	5 min	5 min	1 min	5 min	1 min

Tabelle 11: Immunfluoreszenz-Färbung Tag 1

H₂O₂ dient dabei der Blockierung der endogenen Peroxidase. Anschließend wurden die Objektträger für 20 min bei 95 °C im Na-Citrat-Puffer belassen und für 10 min im Puffer abgekühlt. Es schloss sich eine Spülung mit A.D. für 4 min und phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) für 5 min an. Zur Blockade unspezifischer Proteinbindungsstellen wurden die Objektträger mit TNB-Puffer für 30 min bei RT inkubiert. Über Nacht wurden die Schnitte schließlich mit den primären Antikörpern F4/80 (Invitrogen, #14-4801-82, clone BM8, 10 µg/ml) und IL1-α (Cusabio, #CSB-PA009537, polyklonal, 10 µg/ml) bedeckt. Die Lagerung erfolgte in einer feuchten Kammer bei 4 °C.

Tag 2:

Am nächsten Tag wurden die Objektträger für eine Stunde bei 37 °C in den Brutschrank gegeben. Es wurden verschiedene Lösungen zur Bildung des Avidin-Biotin-Komplexes und Sichtbarmachen des markierten Antigens im Wechsel mit PBS-Spülung auf die Objektträger pipettiert (siehe Tabelle 12).

Sekundärer AK, TNB-Puffer (1:200)	30 min
PBS	10 min
Streptavidin-HRP, TNB-Puffer (1:100)	30 min
PBS	10 min
Tyramid (Stammlösung, Amplification Diluent; 1:50)	10 min
PBS	10 min
SA-Fluorophore (Texas Red, HEPES-Puffer; 1:50)	30 min, 37 °C
PBS	10 min

Tabelle 12: Immunfluoreszenzfärbung Tag 2

Die Tabelle zeigt die durch mehrere Schritte erzielte Kopplung von ABC und Peroxidase an den biotinylierten sekundären Antikörper. Avidin fungiert hierbei als Vermittler zwischen dem biotinylierten sekundären Antikörper und der Verbindung aus Biotin und Peroxidase. Zur Signalverstärkung wurde biotinyliertes Tyramid hinzugegeben, welches nach der Umwandlung durch die Peroxidase in Anwesenheit von H_2O_2 an die Antikörper koppelt. Dadurch steht eine Vielzahl an Biotinmolekülen für die Bindung des Fluoreszenzfarbstoffes Texas Red zur Verfügung. Als sekundäre Antikörper wurden der biotinylierte Goat Anti-Rabbit IgG sekundärer Antikörper (Invitrogen, #31820, polyklonal, 5 µg/ml) und der ebenfalls biotinylierte Goat Anti-Rat IgG sekundärer Antikörper (Invitrogen, #31830, polyklonal, 5 µg/ml) verwendet. Letzter Schritt war das Eindecken mit Antifade Mounting Medium und DAPI zur Gegenfärbung der Zellkerne in blau.

3.2.8 Kultur von HAECs

Um den Einfluss von IL-1 α und seinem Rezeptor auf die endotheliale Leukozytenadhäsion im menschlichen Modell zu untersuchen, wurden humane aortale Endothelzellen (HAECs) von Clonetics kultiviert. Im nachfolgenden Leukozyten-Endothel-Adhäsionsassay (siehe Abschnitt 3.2.9) wurde zudem die Zahl adhärrierender PBMCs sowie die VCAM-1 Expression von HAECs analysiert.

Die Kultur der Zellen erfolgte in zwei Schritten. Zunächst wurde die Zellkulturflasche mit Fibronektin in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) für 15 min bei 37 °C beschichtet. Das Medium wurde anschließend durch 20 ml Zellkulturmedium, bestehend aus Endothelial Cell Growth Medium-2 (EGM-2) versetzt mit 10 % FBS, ausgetauscht. Fibronektin unterstützt hierbei die Zelladhäsion und -ausbreitung der HAECs. Das Auftauen der gefrorenen HAECs

fand in einem Wasserbad statt, sodass diese mit einer Einmalpipette in die vorbereitete Zellkulturflasche gegeben werden konnten. In einem Rhythmus von zwei bis drei Tagen wurde das Medium erneuert.

In einem zweiten Schritt, nach Erreichen einer Konfluenz von 80 %, wurden die Zellen weiter passagiert. Das Zellkulturmedium wurde verworfen und die Zellen mit 6 ml vorgewärmtem Hank's balanced salt solution (HBSS) gewaschen. Nach Zugabe von 4 ml Trypsin-EDTA (0,05 %) für 5 min bei 37 °C lösten sich die Zellen. Weitere 4 ml EGM wurden zur Neutralisation von Trypsin hinzugegeben und das Gemisch zentrifugiert. Folglich konnte die Zellkultur im Verhältnis 1:4 aufgeteilt werden.

3.2.9 Leukozyten-Endothel-Adhäsionsassay

Zwei Tage vor dem Versuch wurden die kultivierten HAECs in einer mit Fibronectin beschichteten 8-well Zellkulturplatte in 400 µl Zellkulturmedium ausgesät. Dabei wurden 10⁴ Zellen pro Well ausgesät. 24 h vorher schloss sich ein Wechsel des Mediums an, sodass die Zellen in Endothelial Basal Medium (EBM) ohne FBS und Wachstumsfaktoren arretiert wurden.

Ein Tag vor dem Adhäsionsassay wurden auch die PBMCs vorbereitet. Die Isolation und Stimulation der PBMCs mit TNF-α (5 ng/ml, 18 h), LPS + OA (LPS Priming, 100 ng/ml, 18 h bzw. 2h; OA, 100 µM, 4 h), LPS + Ox (LPS Priming, 100 ng/ml, 18 h bzw. 2h; Ox, 100 µg/ml, 4 h) bzw. Ox (100 µg/ml, 4 h) und OA (100 µM, 4 h) erfolgte wie in Abschnitt 3.2.3 beschrieben. Anschließend wurden die Zellen mit je 2 ml PBS von der Platte gelöst und in ein 15 ml Falcon-Röhrchen überführt. Nach der Zentrifugation für 10 min bei 37 °C und 400 G wurde der Überstand verworfen, das Zellpellet in 2 ml Starvationsmedium aufgelöst und eine Zellzählung vorgenommen. Es folgte die Verdünnung auf 10⁶ Zellen pro ml. Zur Identifikation der adhären- den PBMCs unter dem Mikroskop wurden die Zellen mit 5 µl Vybrant Dil Zellmarkierungs- lösung, einem lipophilen und orange-rot fluoreszierenden Farbstoff, für 20 min bei 37 °C inkubi- ert. Nach erneuter Zentrifugation für 10 min bei 37 °C und 400 G schloss sich eine zweima- lige Waschung des Zellpellets mit je 5 ml Starvationsmedium an.

Um den Einfluss von IL-1α und seinem Rezeptor IL-1R1 auf die endotheliale Leukozytenad- häsion zu untersuchen, wurde ein Teil der vorbereiteten PBMCs mit dem blockierenden Hu- man IL-1α-Antikörper (Invivogen, Anti-hIL-1α-IgG, #mabg-hil1a, clone 7D4, 1 µg/ml) bzw. ein Teil der HAECs mit dem blockierenden Human IL-1R1-Antikörper (R&D systems, #AB-269-NA, polyklonal, 10 µg/ml) für eine Stunde vorinkubiert. Letztlich wurden je 120.000 der Dil-markierten PBMCs zu je 100 µl HAECs in Starvationsmedium gegeben und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Nicht-adhären- te Zellen wurden am nächsten Tag durch Waschen entfernt. Vor der eigentlichen Zählung der adhären- den Zellen in vier zufällig gewählten Feldern

erfolgte eine Gegenfärbung der HAECs mit Hilfe von DAPI mounting medium. Die Auszählung fand unter dem Fluoreszenzmikroskop (Axio Imager 2) statt.

3.2.10 Western Blot

Die Western Blot-Methode dient der Quantifizierung der Proteinexpression. Das zu untersuchende Proteingemisch wird mit Hilfe der Gel-Elektrophorese anhand verschiedener Eigenschaften (z.B. Masse oder Ladung) aufgetrennt und die erzeugten Proteinbanden auf eine Trägermembran übertragen. Das Protein von Interesse wird schließlich durch Antikörperbindung und eine gekoppelte Farbreaktion immunologisch sichtbar gemacht.

3.2.10.1 Western Blot stimulierter PBMCs

Der im Folgenden beschriebene Western Blot wurde zur Quantifizierung der pro-IL-1 α -Expression und dessen Prozessierung in matures IL-1 α entsprechend stimulierter PBMCs (siehe Abschnitt 3.2.3) durchgeführt. Verschiedene Puffer und Gele waren zuvor anzusetzen (siehe Tabelle 13):

Lysepuffer	50 mmol/l Tris (pH 7,5) 150 mmol/l NaCl 1 mmol/l EDTA 0,5 % NP-40 Protease- und Phosphataseinhibitoren
Probenpuffer (Lämmli-Puffer, 1x)	6,25 ml Tris (1 M) 25 ml Glycerin (25 %) 10 mg Bromphenolblau 2 g SDS (2 %) 5 ml β -Mercaptoethanol Mit ddH ₂ O auf 100 ml auffüllen
5 % Sammelgel	1,36 ml Polyacrylamid (30 %) 5,44 ml ddH ₂ O 1,04 ml Tris 0,08 ml SDS (10 %) 0,08 ml APS (10 %) 0,008 ml TEMED

10x SDS Running-Puffer	30,2 g Tris (250 mM) 144 g Glycin (1,92 M) 10 g SDS (1 %) mit ddH ₂ O auf 1 l auffüllen
1x Transferpuffer	100 ml 10x Transferpuffer 200 ml Ethanol (20 %) 1 l ddH ₂ O bei 4 °C lagern
10x Transferpuffer	29,27 g Glycin (390 mM) 58,15 g Tris (480 mM) 3,7 g SDS (0,037 %) 1 l ddH ₂ O bei 4 °C lagern
10 % Trenngel	2 ml Polyacrylamid (30 %) 2,38 ml ddH ₂ O 1,5 ml Tris 0,06 ml SDS (10 %) 0,06 ml APS (10 %) 0,0024 ml TEMED
15 % Trenngel	8 ml Polyacrylamid (30 %) 5,44 ml ddH ₂ O 4 ml Tris 0,16 ml SDS (10 %) 0,16 ml APS (10 %) 0,0016 ml TEMED
Western Blot-Waschpuffer	500 ml PBS 500 µl Tween 20 (0,05 %)

Tabelle 13: Puffer und Gele für den Western Blot

Zur Vorbereitung der Proben für die spätere Quantifizierung der Proteinexpression erfolgte zunächst die Lyse der PBMCs mittels Lysepuffer (50 mmol/l Tris, 150 mmol/l NaCl, 1 mmol/l EDTA, 0,5 % NP-40, Protease- und Phosphataseinhibitoren). Nach der Abzentrifugation der Zellbestandteile für 5 min bei 4 °C und 120000 G wurde der Überstand in je 50 µl Probenpuffer (Lämmli-Puffer, 1x) aufgenommen und für 5 min bei 95 °C inkubiert. Die Proteinproben wurden schließlich für 2 min mit Ultraschall behandelt.

Anschließend wurden die Proteine mittels 10 % bzw. 15 % Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) entsprechend ihrer Molekülmasse aufgetrennt. Dazu

wurden die Gele mit den Proben beladen und mit SDS-Runningpuffer überschichtet. Schließlich wurde eine konstante Spannung von 120 V für 2 h angelegt. Das SDS-Detergens ist dabei so stark negativ geladen, dass die Eigenladung der Proteine überdeckt wird und eine elektrophoretische Trennung lediglich nach der Molekülmasse der Proteine überhaupt möglich ist. Im Sammelgel kommt es zur Fokussierung der Proteine, wohingegen im Trenngel eine Separierung erfolgt. Je höher die Konzentration der Gele ist, desto kleiner sind die Poren und desto langsamer die Laufgeschwindigkeit der Proteine.

Vor dem Transfer der Proteine auf eine Nitrocellulosemembran (0,2 µm) wurden die Gele für 10 min im 1x Transferpuffer äquilibriert. Die Blot-Box wurde mit 1 Schwamm, 3 Lagen Filterpapier, den Polyacrylamidgelen, der Nitrocellulosemembran sowie erneut 3 Lagen Filterpapier und 1 Schwamm befüllt. Dabei ist zu beachten, dass die einzelnen Schichten luftblasenfrei übereinander gelegt werden. Die Box wurde mit 1x Transferpuffer gefüllt und ein Eisblock eingestellt. Der eigentliche Transfer fand für 30 min bei einer konstanten Spannung von 100 V und 4 °C statt.

Nach dem Transfer wurde die Membran dreimal für je 5 min in PBS gewaschen. Um die noch freien Bindungsstellen der Membran zu blockieren, erfolgte eine Benetzung dieser mit Blockierungs-Puffer für 1 h bei RT. Anschließend schloss sich ein vierfacher Waschvorgang mit Waschpuffer für je 5 min an. Zum Sichtbarmachen der Proteinbanden wurde die Membran mit den Primärantikörpern Rabbit Anti-human IL-1α (Abcam, #ab9614, polyklonal, 1:1000) und Anti-human β-Actin (SantaCruz biotechnology, #sc-47778, clone C4, 1:2000) über Nacht inkubiert. Der Nachweis von β-Actin im Zelllysate dient dabei als Ladungskontrolle. Am nächsten Tag wurde die Membran erneut mit Waschpuffer gewaschen und schließlich mit den Sekundärantikörpern IRDye 800CW Donkey Anti-Rabbit IgG sekundärer Antikörper (LI-COR, #926-32213, polyklonal, 1:15000) sowie IRDye 680RD Goat Anti-Mouse IgG sekundärer Antikörper (LI-COR, #926-68070, polyklonal, 1:15000) inkubiert. Es erfolgte ein erneuter Waschschritt. Letztlich wurde die Membran im Fluoreszenzscanner (LI-COR) eingescannt und so die an den Proteinen gebundenen Antikörper sichtbar gemacht.

3.2.10.2 Western Blot stimulierter HAECs

Zur Untersuchung des Einflusses verschiedener Stimulantien auf die VCAM-1 Expression von HAECs wurde ein weiterer Western Blot durchgeführt. Dafür wurden die zuvor kultivierten HAECs (siehe Abschnitt 3.2.8) mit PBS, TNF-α (5 ng/ml) und steigenden Konzentrationen an IL-1α (1, 10, 100 ng/ml) bzw. PBS, TNF-α (5 ng/ml), LPS (100 ng/ml), Ox (100 µg/ml), LPS + Ox (LPS Priming, 100 ng/ml; Ox, 100 µg/ml), OA (100 µM) und LPS + OA (LPS Priming, 100 ng/ml; OA, 100 µM) für vier Stunden inkubiert. Anschließend schloss sich eine Zentrifugation der stimulierten HAECs für 10 min bei 400 G an.

Das weitere Vorgehen wurde bereits im Abschnitt 3.2.10.1 (Western Blot stimulierter PBMCs) beschrieben. Im Unterschied zum vorherigen Western Blot wurde jedoch eine Polyvinylidendifluorid-Membran (PVDF-Membran) verwendet. Diese wurde vor der Benutzung zur Reduktion der Hydrophobie für 5 min mit Methanol aktiviert. Zum Nachweis von VCAM-1 im Zelllysate diente der Primärantikörper Goat Anti-human VCAM-1 (R&D systems, #BBA19, polyklonal, 1:2000) und als Kontrollantikörper Mouse Anti-human Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (Anti-GAPDH, Millipore, #MAB374, clone 6C5, 1:20000). Zum Sichtbarmachen der an die Proteine gekoppelten Primärantikörper wurden die Sekundärantikörper IRDye 800CW Donkey Anti-Goat IgG sekundärer Antikörper (LI-COR, #926-32214, polyklonal, 1:15000) sowie IRDye 680RD Goat Anti-Mouse IgG sekundärer Antikörper (LI-COR, #926-68070, polyklonal, 1:15000) verwendet.

3.2.11 Statistik

Die statistische Datenanalyse erfolgte mit dem Programm IBM SPSS Statistics 25 und GraphPad Prism 5. Das Signifikanzniveau wurde auf 5 % festgelegt und ein zweiseitiger P-Wert $<0,05$, als statistisch signifikant definiert. Alle Messungen wurden mehrfach wiederholt und erfolgten aus verschiedenen Proben.

Zur Validierung der statistischen Signifikanz der aus den gewonnenen Daten erhobenen Werte wurden diese verschiedenen Tests unterzogen. Statistische Unterschiede im Falle von mehr als zwei Gruppen untersuchte die einfache Varianzanalyse (One-Way ANOVA) bzw. für zwei Gruppen der t-Test nach Student. Mit Dunnett's post-hoc-Test, einem Signifikanztest, erfolgte im Anschluss an die Varianzanalyse ein paarweiser Vergleich der Mittelwerte. Zur Prüfung der statistischen Unterschiede bei Versuchen mit zwei unabhängigen Faktoren (z.B. Wildtyp versus *Il1a^{-/-}*) wurde die zweifaktorielle Varianzanalyse (Two-Way ANOVA) und im Anschluss Sidak's Test für multiple Mittelwertsvergleiche angewandt. Die Resultate der durchflusszytometrischen Untersuchung und des ELISA wurden in Punkt- bzw. Balkendiagrammen dargestellt.

4 Ergebnisse

4.1 IL-1 α als Mediator der Leukozyteninfiltration in entzündetem Gewebe

4.1.2 Sterile Peritonitis

Um den Einfluss von IL-1 α auf die Leukozyteninfiltration in entzündetem Gewebe zu untersuchen, wurde eine sterile Peritonitis durch intraperitoneale Applikation von Zymosan in WT- und *Il1a*^{-/-} Mäusen induziert. Nach sechs Stunden erfolgte die durchflusszytometrische Quantifizierung der peritonealen Monozyten und Neutrophilen in der gewonnenen Lavage-Flüssigkeit.

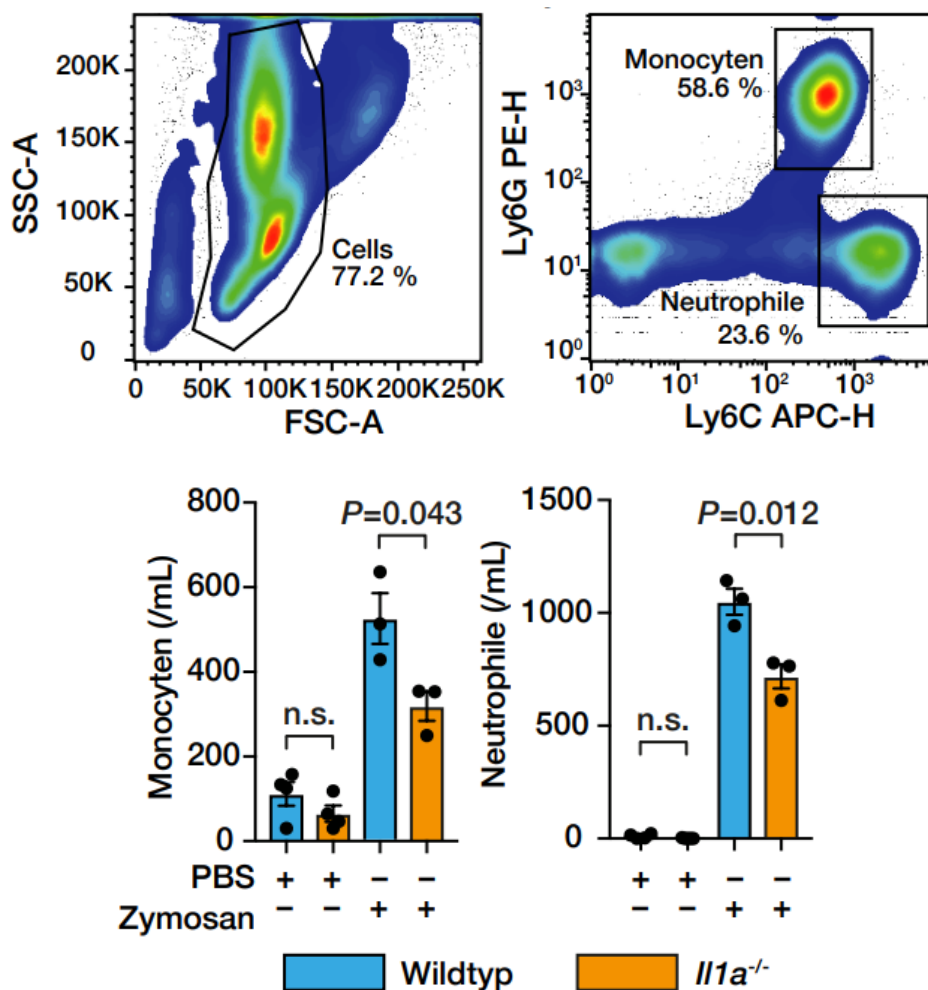


Abb. 11: Durchflusszytometrische Quantifizierung der peritonealen Monozyten und Neutrophilen (pro ml) von WT- (blau) und *Il1a*^{-/-} (orange) Mäusen nach Gabe von PBS (300 μ l) und Zymosan (200 μ g/ml in 300 μ l PBS) (N=3-4 pro Gruppe) (entnommen aus Schunk SJ et al., Circulation, 2021⁵⁹)

Nach der Gabe von Zymosan zeigt sich eine signifikante Reduktion der peritonealen Monozyten- und Neutrophilenzahl in *Il1a*^{-/-} Mäusen im Vergleich zu WT-Mäusen. Nach der Injektion von PBS (Kontrolle) lässt sich jedoch kein signifikanter Unterschied in der Anzahl der Monozyten und Neutrophilen von WT- und *Il1a*^{-/-} Mäusen nachweisen (siehe Abb. 11).

4.1.3 Endothelschädigung

Zur Analyse der Rolle von IL-1 α bei der Leukozytenadhäsion im Bereich einer Endothelläsion wurde die *A. carotis communis* sowohl von WT- als auch *Il1a*^{-/-} Mäusen auf einer Strecke von 4 mm perivaskulär geschädigt. Vier Stunden danach erfolgte die Injektion von zuvor isolierten und PKH67⁺-markierten CD11b⁺-Milzmonozyten. 18 Stunden später wurde die *A. carotis* entnommen, verdaut und es erfolgte eine durchflusszytometrische Quantifizierung der infiltrierenden PKH67⁺-Monozyten an.

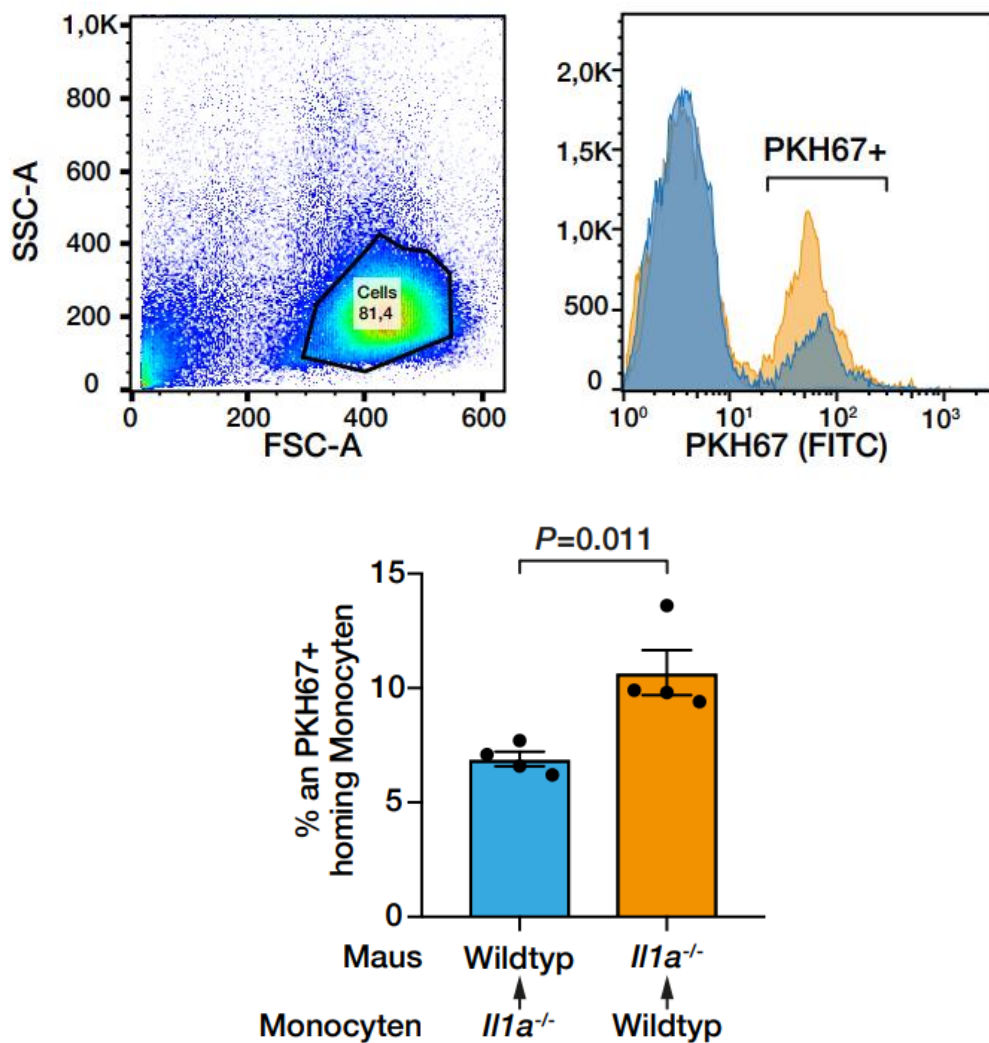


Abb. 12: Durchflusszytometrische Quantifizierung der infiltrierenden PKH67⁺-Monozyten (in %) aus der geschädigten *A. carotis communis* von WT- als auch *Il1a*^{-/-} Mäusen (N=4 pro Gruppe) (entnommen aus Schunk SJ et al., *Circulation*, 2021⁵⁹)

In Abb. 12 ist zu sehen, dass der Anteil der infiltrierenden PKH67⁺-Monozyten im Bereich der Endothelschädigung von WT-Mäusen, die Monozyten aus *Il1a*^{-/-} Mäusen erhalten haben, signifikant niedriger ist als die entsprechende Monozytenanzahl in *Il1a*^{-/-} Mäusen, in die Zellen aus WT-Mäusen injiziert wurden.

4.2 Stimulantien der IL-1 α Expression und Freisetzung aus Monozyten

4.2.1 Pro-IL-1 α Expression und Freisetzung von maturem IL-1 α

Um verschiedene Stimulantien der IL-1 α Sekretion zu identifizieren, wurden PBMCs mit PBS, TNF- α (5 ng/ml, 18 h), LPS (100 ng/ml, 18 h), LPS + Ox (LPS Priming, 100 ng/ml, 18 h; Ox 100 μ g/ml, 4 h), LPS + OA (LPS Priming, 100 ng/ml, 18 h; OA 100 μ M, 4 h) bzw. Ox (100 μ g/ml, 4 h) und OA (100 μ M, 4 h) inkubiert. Anschließend erfolgte eine Quantifizierung der pro-IL-1 α -Expression und dessen Prozessierung in matures IL-1 α im Zelllysate mittels Western Blot und ELISA.

4.2.1.1 Western Blot stimulierter PBMCs

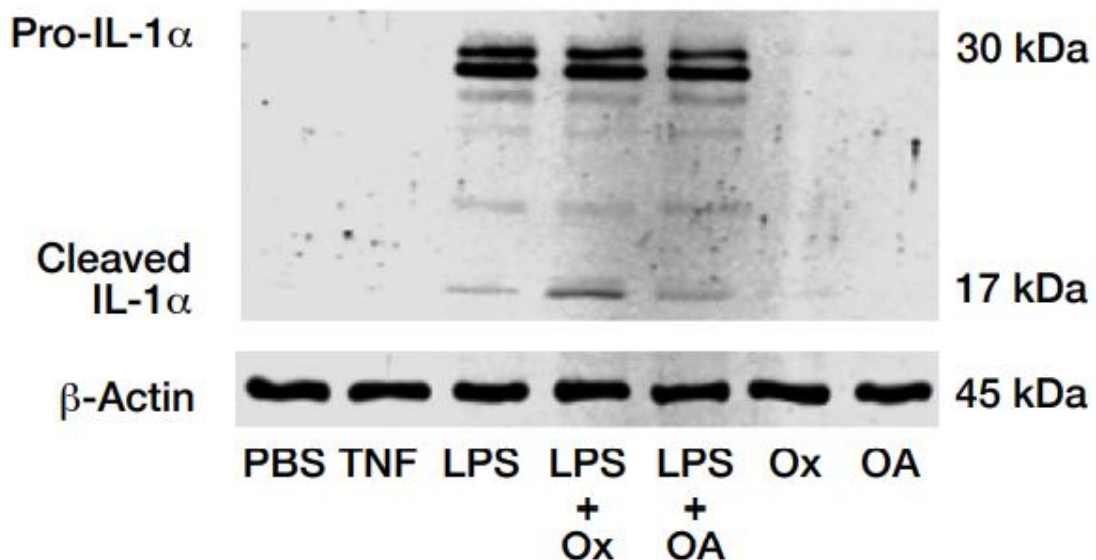


Abb. 13: Repräsentativer Western Blot stimulierter PBMCs zur Quantifizierung der pro-IL-1 α Expression und dessen Prozessierung in IL-1 α im Zelllysate (repräsentativ für 3 unabhängige Experimente) (entnommen aus Schunk SJ et al., *Circulation*, 2021⁵⁹)

Wie in Abb. 13 visualisiert, führt die Stimulation der PBMCs mit LPS, LPS + Ox und LPS + OA zu einer vermehrten Expression von pro-IL-1 α (30 kDa). Gleichzeitig wird durch LPS + Ox und LPS + OA auch eine gesteigerte Prozessierung von maturem IL-1 α (17 kDa) induziert. Die Stimulation mit PBS, TNF- α sowie Ox und OA ohne vorherige Zugabe von LPS erzielt keine vermehrte Expression von pro-IL-1 α . Der Nachweis von β -Actin dient dabei als Ladekontrolle.

4.2.1.2 ELISA stimulierter PBMCs

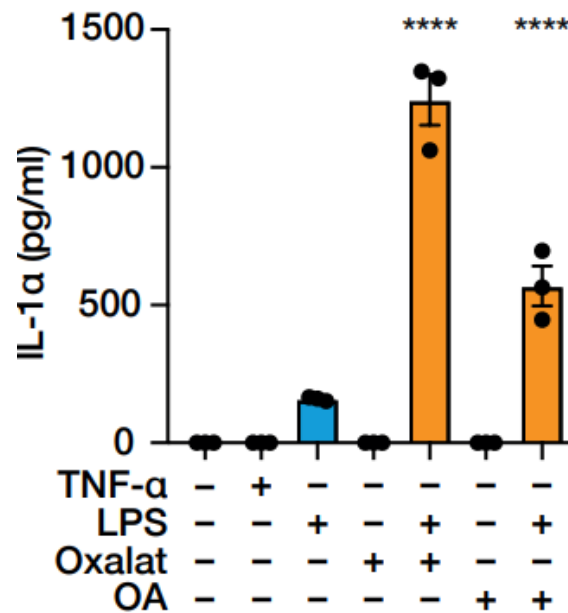


Abb. 14: ELISA stimulierter PBMCs zur Quantifizierung der Sekretion von maturem IL-1 α in den Zellkulturüberstand (in pg/ml), **** P<0.0001 für den Vergleich mit unstimulierten PBMCs (N=3 pro Gruppe) (entnommen aus Schunk SJ et al., Circulation, 2021⁵⁹)

Die Stimulation der Monozyten mit LPS + Ox sowie LPS + OA induziert eine signifikante Steigerung der Freisetzung von maturem IL-1 α in den Zellkulturüberstand im Vergleich zu den unstimulierten Zellen. Nach der Stimulation mit TNF- α , LPS, Ox und OA ohne vorherige Zugabe von LPS lässt sich jedoch kein signifikanter Unterschied in der Freisetzung von IL-1 α im Vergleich zu unstimulierten PBMCs nachweisen (siehe Abb. 14).

4.2.2 Oberflächenexpression von IL-1 α auf stimulierten PBMCs

Zur quantitativen Analyse entsprechend stimulierter PBMCs (siehe Abschnitt 4.2.1) erfolgte eine durchflusszytometrische Quantifizierung der Oberflächenexpression von IL-1 α .

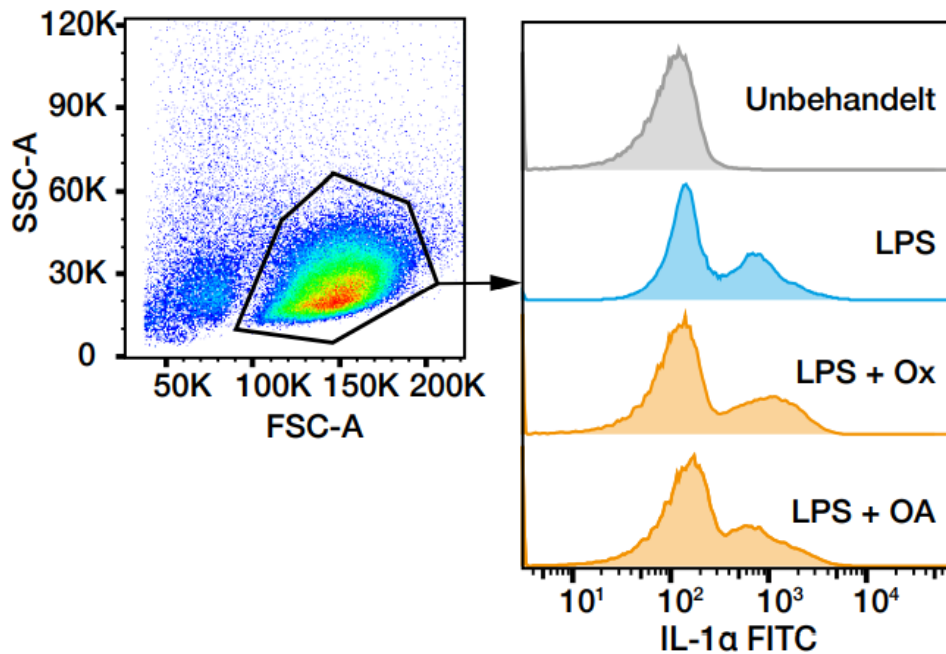


Abb. 15: Durchflusszytometrische Quantifizierung der IL-1 α Oberflächenexpression stimulierter PBMCs (repräsentativ für 3 unabhängige Experimente) (entnommen aus Schunk SJ et al., Circulation, 2021⁵⁹)

Wie in Abb. 15 dargestellt, führt die Stimulation der PBMCs mit LPS, LPS + Ox und LPS + OA zu einer deutlich gesteigerten Oberflächenexpression von IL-1 α auf Monozyten im Vergleich zu nicht-stimulierten Zellen.

4.2.3 Hemmung der IL-1 α Sekretion aus PBMCs durch einen NF- κ B-Inhibitor

Um die Rolle von NF- κ B bei der Sekretion von IL-1 α aus Monozyten zu untersuchen, wurden PBMCs unter Hinzugabe des irreversiblen NF- κ B-Inhibitors Bay11-7082 entsprechend der vorherigen Versuche (siehe Abschnitt 4.2.1) stimuliert. Anschließend wurde IL-1 α im Zellkulturüberstand mittels ELISA quantifiziert.

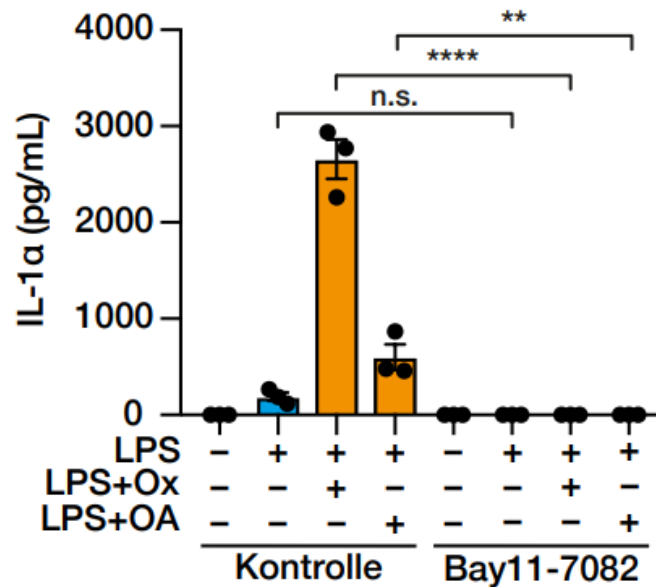


Abb. 16: ELISA stimulierter PBMCs sowohl mit als auch ohne den NF- κ B-Inhibitor Bay11-7082 (10 μ M) zur Quantifizierung der IL-1 α Freisetzung in den Zellkulturüberstand (in pg/ml), ** P<0.01, ** P<0.0001 für den Vergleich zu PBMCs ohne Hinzugabe eines Inhibitors (N=3 pro Gruppe) (entnommen aus Schunk SJ et al., Circulation, 2021⁵⁹)**

Durch die Inkubation der mit LPS + Ox und LPS + OA stimulierten PBMCs mit dem NF- κ B-Inhibitor Bay11-7082 kommt es zu einer vollständigen Suppression der Sekretion von IL-1 α in den Zellkulturüberstand im Vergleich zur Stimulation ohne Hinzugabe eines Inhibitors (siehe Abb. 16).

4.2.4 Einfluss von Calpain und Cathepsin G auf die Prozessierung von IL-1 α

Zur Analyse des Einflusses der Proteasen Calpain und Cathepsin G auf die Sekretion von IL-1 α erfolgte eine erneute Stimulation von PBMCs (siehe Abschnitt 4.2.1) unter Hinzugabe verschiedener Protease-Inhibitoren. Da Calpain und Cathepsin G Ca²⁺-abhängig aktiviert werden, wurde auch eine Stimulation in Anwesenheit von Ca²⁺-Chelatoren durchgeführt.

Dazu zählten die Ca²⁺-Chelatoren BAPTA-AM (10 μ M) und EGTA (20mM) sowie die Calpain-Inhibitoren Z-Leu-Leu-CHO (1,2 μ M), E-64-d (50 μ g/ml), PD 150606 (100 μ g/ml) und der Cathepsin G Inhibitor I (50 μ g/ml). Die Quantifizierung von IL-1 α im Zellkulturüberstand erfolgte mittels ELISA.

4.2.4.1 Einfluss von Calcium-Chelatoren

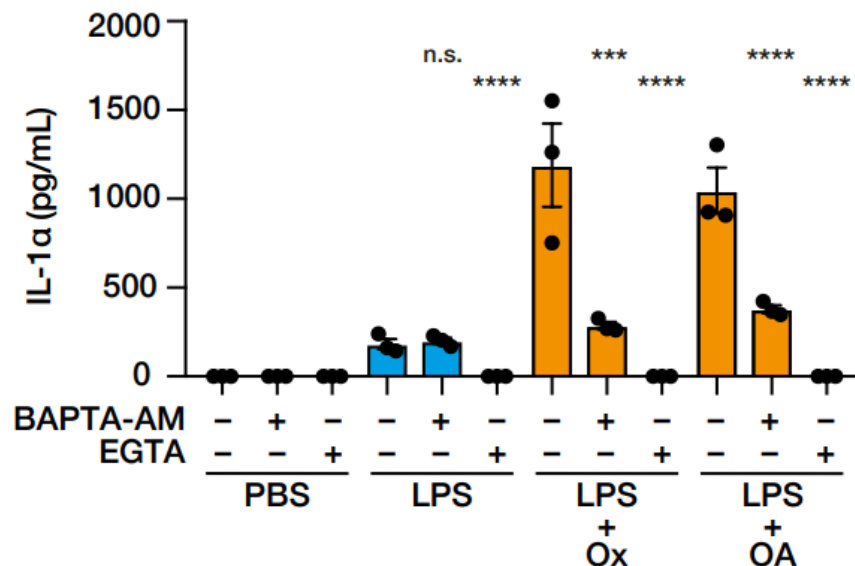


Abb. 17: ELISA stimulierter PBMCs sowohl mit als auch ohne die Ca²⁺-Chelatoren BAPTA-AM und EGTA zur Quantifizierung der IL-1 α Konzentration im Zellkulturüberstand (in pg/ml), *** P<0.001, **** P<0.0001 für den Vergleich zu PBMCs in Abwesenheit der Ca²⁺-Chelatoren (N=3 pro Gruppe) (entnommen aus Schunk SJ et al., Circulation, 2021⁵⁹)

Nach der Stimulation der Monozyten mit LPS + Ox bzw. LPS + OA in Anwesenheit eines Ca²⁺-Chelators (BAPTA-AM oder EGTA) lässt sich eine signifikante Reduktion der Sekretion von IL-1 α in den Überstand im Vergleich zur Stimulation ohne Ca²⁺-Chelator nachweisen (siehe Abb. 17).

4.2.4.2 Einfluss von Calpain- und Cathepsin-Inhibitoren

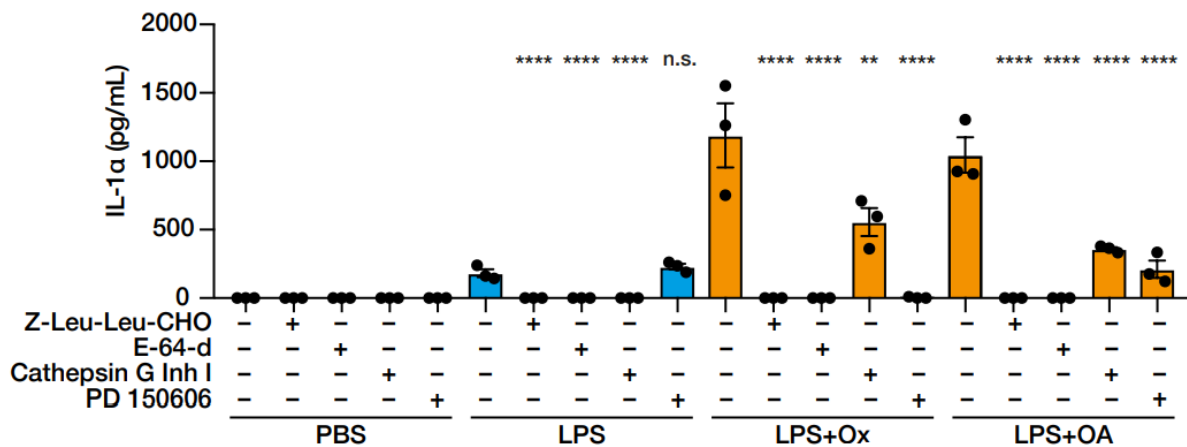


Abb. 18: ELISA stimulierter PBMCs sowohl mit als auch ohne die Calpain-Inhibitoren Z-Leu-Leu-CHO, E-64-d, PD 150606 sowie den Cathepsin G Inhibitor I zur Quantifizierung der IL-1 α Freisetzung in den Zellkulturüberstand (in pg/ml), ** P<0.001, ** P<0.0001 für den Vergleich zu Zellen in Abwesenheit des entsprechenden Inhibitors (N=3 pro Gruppe) (entnommen aus Schunk SJ et al., Circulation, 2021⁵⁹)**

Die Freisetzung von IL-1 α aus PBMCs, die mit LPS + Ox bzw. LPS + OA stimuliert wurden, ist unter zusätzlicher Einwirkung eines Calpain-Inhibitors (Z-Leu-Leu-CHO, E-64-d, PD 150606) oder dem Cathepsin G Inhibitor I signifikant reduziert im Vergleich zu stimulierten Zellen ohne Zugabe eines Inhibitors (siehe Abb. 18).

4.3 IL-1 α und sein Rezeptor als Vermittler der Leukozyten-Endothel-Adhäsion

4.3.1 Adhäsion stimulierter Monozyten an humane aortale Endothelzellen

Um den Einfluss von IL-1 α und seinem Rezeptor IL-1R1 auf die endotheliale Leukozytenadhäsion zu untersuchen, wurden PBMCs entsprechend vorheriger Versuche (siehe Abschnitt 4.2.1) stimuliert und anschließend über Nacht mit humanen aortalen Endothelzellen inkubiert. Die Auszählung der adhärierenden Monozyten erfolgte fluoreszenzmikroskopisch, wofür die PBMCs zuvor mittels Dil markiert und die HAECs mit Hilfe von DAPI Mounting Medium gegengefärbt wurden.

4.3.1.2 Adhäsion stimulierter Monozyten (18 h) an HAECs

Die Stimulation der Monozyten wurde mittels TNF- α (5 ng/ml, 18 h), LPS (100 ng/ml, 18 h), LPS + OA (LPS Priming, 100 ng/ml, 18 h; OA 100 μ M, 4 h) und LPS + Ox (LPS Priming, 100 ng/ml, 18 h; Ox 100 μ g/ml, 4 h) durchgeführt. Zur Identifikation des jeweiligen Einflusses von IL-1 α und seinem Rezeptor IL-1R1 wurde ein Teil der PBMCs mit dem blockierenden Human IL-1 α -Antikörper (1 μ g/ml) bzw. ein Teil der HAECs mit dem blockierenden Human IL-1R1-Antikörper (10 μ g/ml) für eine Stunde vorinkubiert.

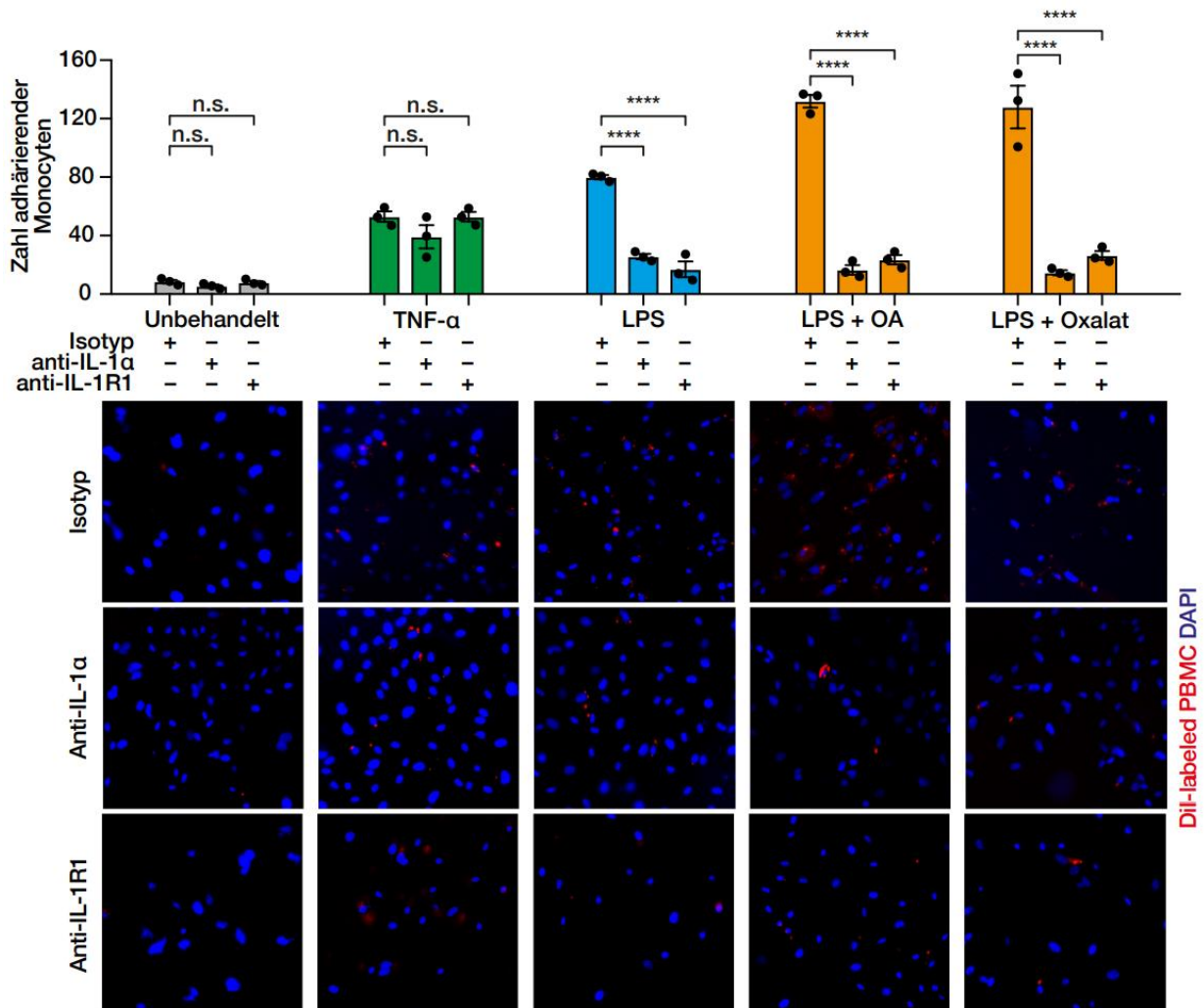


Abb. 19: Quantifizierung adhärerender PBMCs an HAECs nach Stimulation der Monozyten für 18 h mittels Fluoreszenzmikroskopie, in Anwesenheit des blockierenden Human IL-1 α -Antikörper (1 μ g/ml), des blockierenden Human IL-1R1-Antikörper (10 μ g/ml) bzw. einer Isotyp-Kontrolle, ** P<0.0001 für den Vergleich zu Zellen in Abwesenheit von Anti-IL-1 α oder Anti-IL-1R1 Antikörpern (N=3 pro Gruppe) (entnommen aus Schunk SJ et al., Circulation, 2021⁵⁹)**

Die Stimulation der Monozyten mit LPS, LPS + OA bzw. LPS + Ox führt, wie in Abb. 19 dargestellt, zu einer vermehrten Adhäsion der Zellen an die humanen aortalen Endothelzellen. Nach der Inkubation mit dem blockierenden Human IL-1 α -Antikörper und dem blockierenden

Human IL-1R1-Antikörper lässt sich jedoch eine signifikante Verminderung der adhärenenden Monozyten im Vergleich zur Isotyp-Kontrolle nachweisen. Unbehandelte und mit TNF- α stimulierte PBMCs zeigen sowohl in der Isotyp-Kontrolle als auch nach der Zugabe der Antikörper keine signifikanten Unterschiede in der Adhäsion an HAECs.

4.3.1.2 Adhäsion stimulierter Monozyten (2 h) an HAECs

Um etwaige zeitabhängige Effekte von IL-1 α auf die Monozyten-Endotheladhäsion zu untersuchen, wurden die Adhäsionsexperimente wiederholt, wobei die Monozyten nur für zwei Stunden mit den HAECs inkubiert wurden.

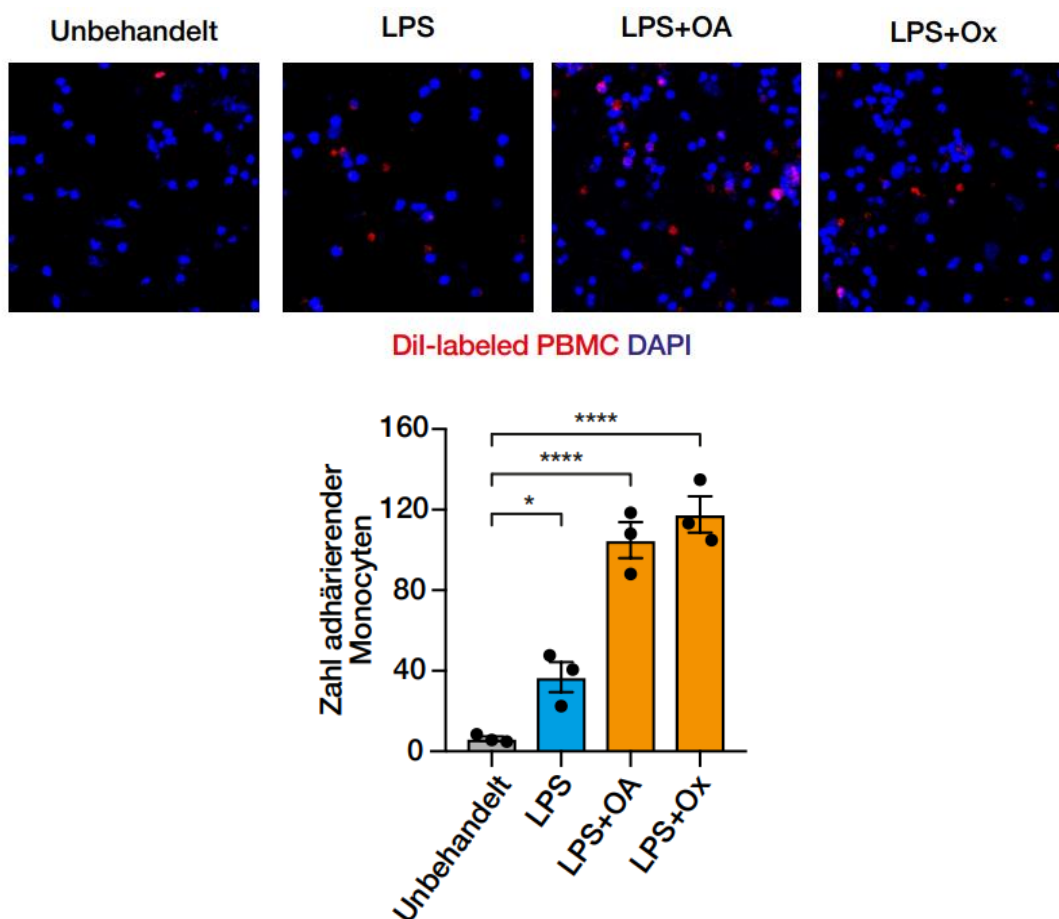


Abb. 20: Quantifizierung adhärenender PBMCs an HAECs nach Stimulation der Monozyten für 2 h mittels Fluoreszenzmikroskopie, * P<0.05, ** P<0.0001 für den Vergleich zu unbehandelten Zellen (N=3 pro Gruppe) (entnommen aus Schunk SJ et al., Circulation, 2021⁵⁹)**

Wie in Abb. 20 zu sehen, bewirkt auch eine verkürzte Stimulation (2 h) mit LPS, LPS + OA bzw. LPS + Ox bereits eine signifikant erhöhte Adhäsion von Monozyten an Endothelzellen im Vergleich zu unbehandelten Zellen. Diese Experimente zeigen, dass IL-1 α eine wichtige Rolle bei der Monozyten-Endotheladhäsion einnimmt.

4.3.2 Endotheliale VCAM-1 Expression

Um nun zu untersuchen, ob von Monozyten sezerniertes IL-1 α auch einen Einfluss auf die endotheliale Expression von Zelladhäsionsmolekülen hat, wurde die endotheliale VCAM-1 Expression quantifiziert. Hierzu wurden HAECs mit PBS, TNF- α (5 ng/ml) und steigenden Konzentrationen an IL-1 α (1, 10, 100 ng/ml) bzw. PBS, TNF- α (5 ng/ml), LPS (100 ng/ml), Ox (100 μ g/ml), LPS + Ox (LPS Priming, 100 ng/ml; Ox, 100 μ g/ml), OA (100 μ M) und LPS + OA (LPS Priming, 100 ng/ml; OA, 100 μ M) für vier Stunden inkubiert. Anschließend wurde die Expression von VCAM-1 als zentralem Zelladhäsionsmolekül mittels Western Blot quantifiziert.

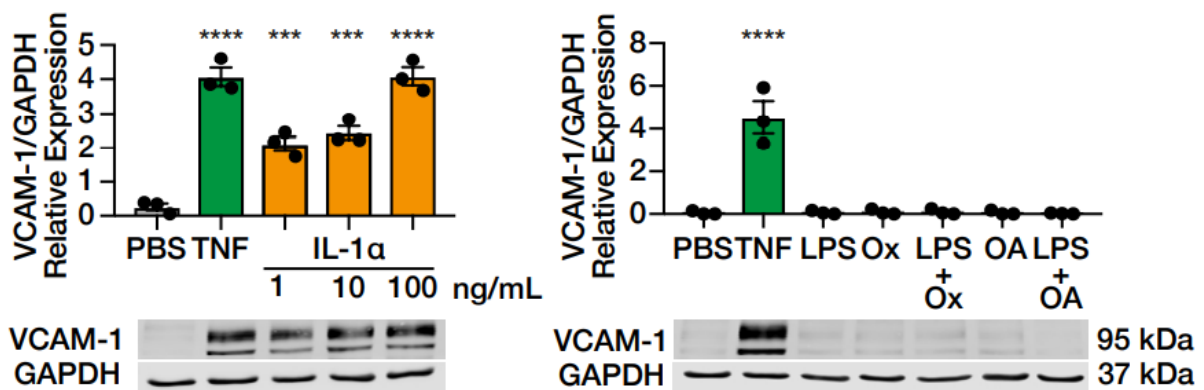


Abb. 21: Western Blot stimulierter HAECs zur Quantifizierung der relativen VCAM-1/GAPDH Expression, * P<0.001, **** P<0.0001 für den Vergleich zu PBS-behandelten Zellen (N=3 pro Gruppe) (entnommen aus Schunk SJ et al., Circulation, 2021⁵⁹)**

Die Inkubation der HAECs mit TNF- α bzw. steigenden Konzentrationen von IL-1 α führt zu einer signifikant gesteigerten VCAM-1 Expression auf den Endothelzellen im Vergleich zur Inkubation mit PBS (Kontrolle). Die Stimulation mit LPS, Ox, LPS + Ox, OA oder auch LPS + OA hat jedoch keinen Einfluss auf die relative VCAM-1/GAPDH Expression. Dies lässt annehmen, dass das von den stimulierten Monozyten sezernierte IL-1 α die VCAM-1 Expression auf HAECs und dadurch die Leukozyten-Endotheladhäsion induziert, die IL-1 α Stimulantien (LPS, Ox, LPS + Ox, OA und LPS + OA) selbst jedoch keinen Effekt auf die endotheliale VCAM-1 Expression haben (siehe Abb. 21).

4.4 IL-1 α stimuliert die Leukozyteninfiltration nach einem akuten Myokardinfarkt

Zur Analyse des Einflusses von IL-1 α auf die myokardiale Leukozyteninfiltration nach einem akuten Myokardinfarkt erfolgte eine Ligatur der LAD sowohl an WT- als auch an *Il1a*^{-/-} Mäusen. Als Kontrolle diente eine Scheinoperation bei der lediglich das Perikard eröffnet wurde. Zum Sichtbarmachen der Infiltrate wurden die Herzen drei Tage später entnommen und histologisch aufbereitet.

4.4.1 IL-1 α Expression im Infarktbereich

Um die IL-1 α Expression im Myokard nach der LAD-Ligatur im Vergleich zur Scheinoperation zu beurteilen, wurden die entnommenen Herzen mit dem primären Antikörper IL1- α (10 μ g/ml) immunfluoreszenzgefärbt. Die Gegenfärbung erfolgte mit DAPI.

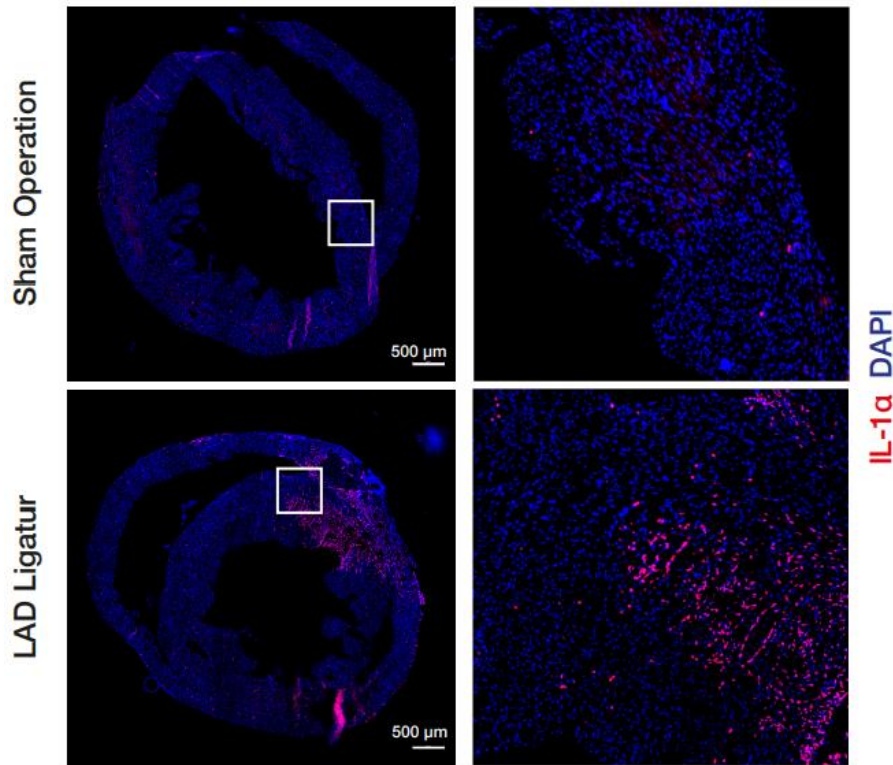


Abb. 22: Immunhistologische Färbung von Herzen zum Sichtbarmachen der IL-1 α Expression (rot) nach der LAD-Ligatur oder Sham-Operation (repräsentativ für 4 unabhängige Experimente) (entnommen aus Schunk SJ et al., Circulation, 2021⁵⁹)

Wie in Abb. 22 dargestellt, ist die Expression von IL-1 α (rot) nach der LAD-Ligatur im Infarkt-bereich deutlich vermehrt. Im Vergleich dazu ist kein IL-1 α in den nicht-ischämischen Bereichen des Myokards bzw. nach der Scheinoperation nachweisbar.

4.4.2 Myokardiale Leukozyteninfiltration

4.4.2.1 Inflammatorische Infiltrate im Myokard

Um die Rolle von IL-1 α als Mediator der myokardialen Leukozyteninfiltration zu untersuchen, wurden die Herzen der WT- und *Il1a*^{-/-} Mäuse drei Tage nach der LAD-Ligatur bzw. der Scheinoperation entnommen und die inflammatorischen Zellinfiltrate mittels HE-Färbung sichtbar gemacht.

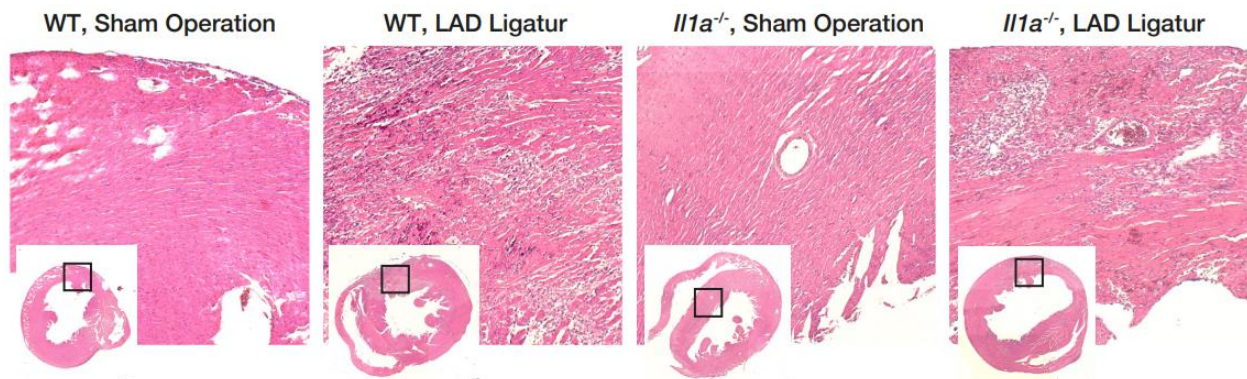


Abb. 23: HE-Färbung von Herzen zum Sichtbarmachen inflammatorischer Infiltrate nach der LAD-Ligatur oder Sham-Operation an WT- und *//1a^{-/-}* Mäusen (repräsentativ für 5-7 unabhängige Experimente) (entnommen aus Schunk SJ et al., *Circulation*, 2021⁵⁹)

Nach der LAD-Ligatur als Modell eines akuten Myokardinfarktes zeigen die Herzen von *//1a^{-/-}* Mäusen signifikant weniger entzündliche Infiltrate als die der WT-Mäuse. Daraus lässt sich ableiten, dass eine IL-1 α -Defizienz zu einer deutlich reduzierten Inflammation nach einem Myokardinfarkt führt. In den Herzen von WT- als auch *//1a^{-/-}* Mäusen lassen sich nach der Scheinoperation keine relevanten inflammatorischen Zellinfiltrate nachweisen (siehe Abb. 23).

4.4.2.2 Infiltration F4/80⁺-Makrophagen im Myokard

Zur Quantifizierung der myokardialen Makrophagen-Infiltration in WT- und *//1a^{-/-}* Mäusen nach der LAD-Ligatur bzw. der Scheinoperation wurden die Herzen mit dem primären Antikörper F4/80 (Invitrogen, 10 μ g/ml) immunfluoreszenzgefärbt.

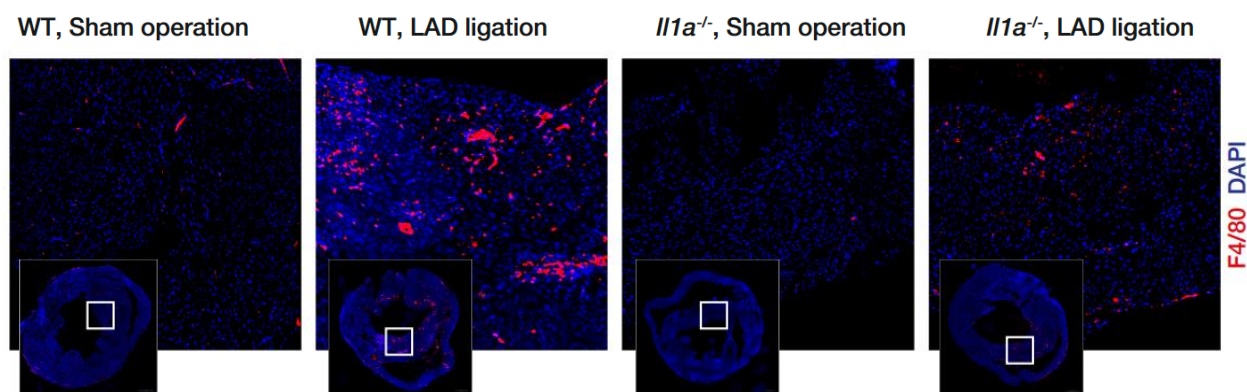


Abb. 24: Immunhistologische Färbung F4/80-positiver Makrophagen (rot) nach der LAD-Ligatur oder Sham-Operation an WT- und *//1a^{-/-}* Mäusen (repräsentativ für 5-7 unabhängige Experimente) (entnommen aus Schunk SJ et al., *Circulation*, 2021⁵⁹)

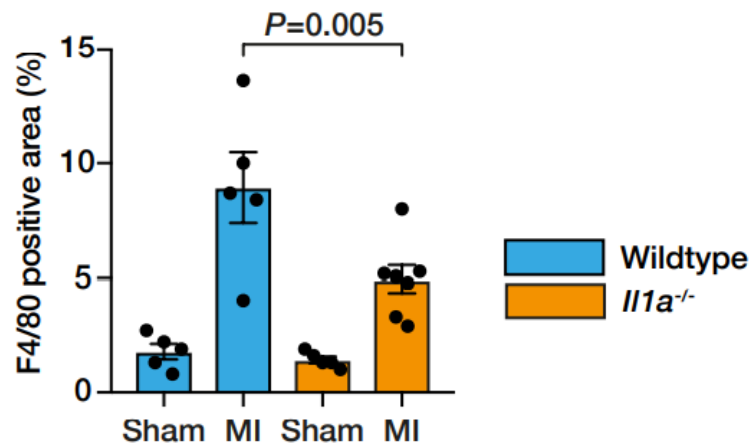


Abb. 25: Quantifizierung der myokardialen F4/80-positiven Fläche nach der LAD-Ligatur oder Sham-Operation in WT- und *Il1a*^{-/-} Mäusen (in %). $P=0.005$ für den Vergleich von WT- und *Il1a*^{-/-} Mäusen (repräsentativ für 5-7 unabhängige Experimente) (entnommen aus Schunk SJ et al., *Circulation*, 2021⁵⁹)

Wie in Abb. 24 und 25 dargestellt, kommt es nach einem akuten Myokardinfarkt bei *Il1a*^{-/-} Mäusen zu einer signifikant geringeren Infiltration des Herzens mit F4/80⁺-Makrophagen im Vergleich zu WT-Mäusen. Nach der Scheinoperation ist jedoch kein signifikanter Unterschied im Vergleich von WT- und *Il1a*^{-/-} Mäusen nachzuweisen.

5 Diskussion

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde erstmals eine zentrale Rolle von IL-1 α als Mediator der sterilen systemischen Entzündung bei kardiovaskulären Erkrankungen nachgewiesen. Es wurde gezeigt, dass Stimuli wie Oxalat und Ölsäure zu einer signifikant gesteigerten Expression und Freisetzung von IL-1 α führen. Gleichsam konnte nachgewiesen werden, dass IL-1 α die Leukozyten-Endotheladhäsion nicht nur über die Aktivierung von Endothelzellen und somit Steigerung der VCAM-1 Expression vermittelt, sondern auch selbst als Zelladhäsionsmolekül fungiert. Die Expression von IL-1 α im infarzierten Areal des Herzens war zudem signifikant höher als in nicht-ischämischen Bereichen, sodass IL-1 α als Treiber der myokardialen Inflammation nach einem akuten Myokardinfarkt identifiziert wurde. Diese Ergebnisse zeigen die Relevanz eines möglichen anti-inflammatorischen Therapieansatzes durch die Inhibition von IL-1 α und anderen Mitgliedern der Interleukin-1 Superfamilie in der Behandlung von kardiovaskulären Erkrankungen.

5.1 Regulation der IL-1 α Expression und Sekretion

IL-1 α wird in seiner Vorläuferform als pro-IL-1 α , nach der Spaltung als matures IL-1 α bzw. N-terminales IL-1- α NTP sowohl im Zytosol als auch im Nukleus verschiedener Zellen exprimiert^{52, 60}. Dabei übernimmt IL-1 α wichtige intrazelluläre Funktionen, agiert aber auch membrangebunden auf der Oberfläche von Monozyten, Lymphozyten und Endothelzellen^{60, 61}. IL-1 α kann zudem mittels Induktion durch verschiedene Stimuli über einen Inflammasom-abhängigen wie auch davon unabhängigen Weg exprimiert bzw. sezerniert werden⁶².

5.1.1 Stimulatoren von IL-1 α

In der vorliegenden Arbeit konnte belegt werden, dass die Stimulation von Monozyten mit LPS, LPS + Oxalat und LPS + Ölsäure zu einer gesteigerten Expression von pro-IL-1 α und auch Freisetzung von maturem IL-1 α führt. Die Versuche erbrachten zudem den Nachweis, dass eine alleinige Stimulation mit Oxalat oder Ölsäure nicht ausreichend ist, um eine signifikante Steigerung der Expression bzw. Sekretion zu erreichen, sondern ein vorheriges Priming der Zellen mittels LPS als ein erstes Stimulationssignal erfolgen muss (siehe Abschnitt 4.2). Dies untermauert die Hypothese, dass LPS die intrazelluläre Expression von pro-IL-1 α über die Bindung an TLR4 sowie die Induktion des Transkriptionsfaktors NF- κ B induziert und darüber hinaus Stimulatoren, wie in dieser Arbeit Oxalat oder Ölsäure, über diverse Proteasen an der Prozessierung und Sekretion von IL-1 α beteiligt sind^{62, 63}.

Erkenntnisse weiterer Studien diskutieren eine Vielzahl anderer Stimuli, wobei IL-1 α sowohl auf der Ebene der Expression als auch der Prozessierung und Sekretion hoch- bzw. herunterreguliert werden kann. Zu den Stimuli zählen Liganden von TLRs, oxidativer Stress oder auch

inflammatorische Zytokine, wie IL-1 α selbst^{64, 65}. TLRs erkennen bestimmte exogene PAMPs, z.B. Lipopolysaccharide auf der Oberfläche von gram-negativen Bakterien bzw. Hitzeschockproteine und auch endogene DAMPs. Resultierend daraus aktivieren sie das angeborene Immunsystem zur Induktion einer inflammatorischen Immunantwort inklusive der Stimulation von IL-1 α ^{66, 67}. Oxidativer Stress im Sinne eines Ungleichgewichts zwischen reaktiven Sauerstoffspezies (ROS, engl. reactive oxygen species) und Antioxidantien führt zur Hochregulation der Transkriptionsfaktoren NF- κ B sowie Aktivator Protein-1 (AP-1), die wiederum eine Induktion von Zytokinen wie IL-1 α , Chemokinen, Adhäsionsmolekülen und weiteren Mediatoren der sterilen Inflammation nach sich ziehen^{68, 69}.

Körpereigene Fettsäuren aus nekrotischen Adipozyten führen ebenfalls zur Stimulation von IL-1 α und somit zur Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten und Makrophagen⁷⁰. In einer weiteren Studie wurden die typischerweise in atherosklerotischen Plaques vorhandenen Fettsäuren (Palmitin-, Stearin-, Öl-, Arachidon- und Linolsäure) hinsichtlich ihres Einflusses auf die Freisetzung von IL-1 α untersucht. In diesem Zusammenhang wurde beobachtet, dass die drei ungesättigten Fettsäuren Ölsäure, Linolsäure und Arachidonsäure die Expression von IL-1 α durch Entkopplung der mitochondrialen Atmungskette mit anschließender Freisetzung von intrazellulärem Ca²⁺ aktivieren. Schließlich führt Ca²⁺ zur Aktivierung der Protease Calpain, die für die Prozessierung von pro-IL-1 α zu maturem IL-1 α verantwortlich ist. In der Versuchsreihe wurde außerdem gezeigt, dass eine gesteigerte Expression der Vorläuferform pro-IL-1 α von einem vorherigen Priming der Zellen mit LPS (Signal 1) abhängig ist und die Ölsäure folglich das zweite Signal zur anschließenden Prozessierung und Sekretion von IL-1 α vermittelt⁷¹. Darüber hinaus wurde in einer weiteren Studie festgestellt, dass extrazelluläre Cholesterinkristalle im Rahmen der Atherosklerose die Freisetzung von IL-1 α durch Induktion des eigentlich stress-protektiven Transkriptionsfaktors nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) steigern. Dadurch erhalten sie die systemische Entzündung aufrecht⁷².

Diese Beobachtungen führen zu der in der vorliegenden Arbeit nachgewiesenen Annahme, dass IL-1 α , welches durch die an der Atherosklerose beteiligten Lipide stimuliert wird, Mediator der vaskulären Inflammation im Rahmen der Atherogenese ist.

5.1.2 Rolle des NLRP3 Inflammasoms bei der Sekretion von IL-1 α

Das NLRP3 Inflammasom setzt sich aus dem Sensorprotein NLRP3 [nucleotide-binding oligomerization-domain (NOD), leucine-rich repeat (LRR)-, and pyrin domain (PYD)-containing protein 3], dem Adapterprotein ASC (Apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD) und der Protease Caspase-1 zusammen und ist unter anderem an der Prozessierung von IL-1 β beteiligt^{73, 74}. So wird pro-IL-1 β nach der Aktivierung und Zusammensetzung des NLRP3

Inflammasoms durch zwei Signale mittels der zuvor aktivierten Cysteinprotease Caspase-1 in seine aktive Form gespalten (siehe Abschnitt 2.5.1)⁴⁸.

Wie bereits vielfach nachgewiesen, induzieren diverse NLRP3-Stimuli, z.B. ATP, das bakterielle Toxin Nigericin, der fakultativ pathogene Erreger *Candida albicans* oder Moleküle wie Alum, Kieselsäure oder Natriumuratkristalle (MSU, engl. monosodium urate crystals), die Sekretion von IL-1 β und auch IL-1 α ^{75, 76}. Demnach erfolgt die Freisetzung von IL-1 α sowohl über einen Inflammasom-abhängigen wie auch davon unabhängigen Weg^{62, 75}.

Eine weitere Studie untersuchte die unterschiedlichen Interaktionen zwischen der Sekretion von IL-1 α und den Komponenten des NLRP3 Inflammasoms je nach NLRP3-Stimulus. Die Studienergebnisse zeigten, dass ATP und das bakterielle Toxin Nigericin vermutlich über einen K⁺-Efflux bzw. die Erhöhung von ROS zur Aktivierung des Inflammasoms führen und in Abhängigkeit von Caspase-1 die Sekretion von IL-1 α induzieren. Wichtig dabei hervorzuheben ist, dass die Prozessierung von IL-1 α unabhängig von der Proteaseaktivität von Caspase-1 ist, weshalb die katalytische Inhibition von Caspase-1 im Gegensatz zu einer Caspase-1-Defizienz keinen Einfluss auf die IL-1 α Sekretion hat. Vielmehr bestimmt die Aktivierung des NLRP3 Inflammasoms und die Interaktion von Caspase-1 mit anderen Proteinen die intrazelluläre Prozessierung von IL-1 α mittels Calpain sowie die anschließende Sekretion⁷⁶. ATP agiert dabei über die Bindung des purinergergen Kationenkanals P2X7, wodurch es zur Zusammensetzung und Aktivierung des NLRP3 Inflammasoms kommt⁷⁷.

Kristalline Moleküle, wie Alum oder Kieselsäure, sind ebenfalls Aktivatoren des NLRP3 Inflammasoms. Als Resultat der Phagozytose dieser Moleküle durch Makrophagen kommt es zu einer lysosomalen Destabilisierung und zur Freisetzung von Cathepsinen. Zudem werden vermutlich diverse Ionenkanäle, wie der TRPM2-Kanal, aktiv, sodass es zu einem Einstrom von Ca²⁺-Ionen kommt. Das NLRP3 Inflammasom wird mittels dieser beiden Signale aktiviert und es kommt zur Sekretion von IL-1 β und auch IL-1 α ^{78, 79}. Es wird jedoch diskutiert, dass die Freisetzung von IL-1 α nach der Stimulation mit kristallinen Molekülen unabhängig von der Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms ist und direkt durch die Ca²⁺-Abhängigkeit von Calpain beeinflusst wird⁷⁶.

Auch die Phagozytose von MSU-Kristallen, welche typischerweise im Rahmen einer Hyperurikämie auftreten, aktiviert das NLRP3 Inflammasom. Durch den erniedrigten pH-Wert in den Phagolysosomen kommt es nach aktuellen Erkenntnissen zu einer Freisetzung von Na⁺-Ionen sowie passiv zum Einstrom von H₂O, sodass die Konzentration der K⁺-Ionen unter den Schwellenwert zur Aktivierung des Inflammasoms fällt. Es resultiert die Sekretion von IL-1 β , wobei gleichzeitig die Prozessierung und Freisetzung von IL-1 α über einen vermutlich Inflammasom-unabhängigen Weg induziert wird^{76, 80}.

Durch akute und chronische Entzündungen, aber auch Ischämien kommt es zu einer Erniedrigung des pH-Wertes im Gewebe, sodass eine lokale Ansäuerung resultiert. Eine weitere Studie zeigte, dass dadurch eine rasche Azidose im Cytosol von Makrophagen mit folgender Aktivierung des NLRP3 Inflammasoms und Caspase-1 entsteht. Auch hier wird ein Ausstrom von K^+ -Ionen als Aktivierungsmechanismus diskutiert. Eine lokale extrazelluläre Azidose führt demnach über die Induktion des NLRP3 Inflammasoms zur Prozessierung und Sekretion von IL-1 β , IL-18 sowie IL-1 α und agiert somit als endogenes Signal zur Aktivierung des Immunsystems⁸¹.

Im Rahmen eines akuten Myokardinfarktes fungieren anfallende Zelldebris sowie aus den nekrotischen Zellen freigesetztes pro-IL-1 α als DAMPs. Sie steigern über den TLR oder den IL-1R1 mittels Aktivierung von Transkriptionsfaktoren wie NF- κ B die Expression der Komponenten des Inflammasoms. Das NLRP3 Inflammasom wird zu Beginn der Ischämie vor allem durch den K^+ -Ausstrom und später auch mittels lysosomaler Destabilisierung oder aus nekrotischen Zellen bzw. Leukozyten freigesetztem ATP aktiviert⁸². Resultierend daraus induziert die aktivierte Caspase-1 durch Spaltung des Proteins Gasdermin D die Bildung einer Plasmamembranpore, wodurch es zum inflammatorischen Zelltod (Pyroptose) weiterer Kardiomyozyten kommt. Dies bedingt die Expansion des Infarktgebietes. Gleichsam erfolgt eine Freisetzung von Zytokinen wie IL-1 β und IL-18, aber auch IL-1 α ⁸³.

Folglich werden aktuell mehrere Mechanismen der Aktivierung des NLRP3 Inflammasoms durch diverse Stimuli diskutiert, die die Prozessierung und Sekretion von Interleukinen (IL-1 α , IL-1 β , IL-18) und somit eine inflammatorische Reaktion nach sich ziehen⁸⁴:

- Ausstrom von Ionen wie Kalium und Chlorid
- Einstrom von Ionen wie Natrium und Calcium
- erhöhte Produktion von ROS, oxidativer Stress
- lysosomale Destabilisierung

5.1.3 Effekte von pro-IL-1 α

IL-1 α wird zunächst als Vorläuferform pro-IL-1 α (31 kDa) konstitutiv in verschiedenen Zellen, z.B. Epithelzellen des Gastrointestinaltraktes, der Leber, Lunge, Niere und auch Endothelzellen, exprimiert. Dabei ist es das einzige Interleukin, welches sowohl sezerniert als auch im Zytosol, Nukleus und auf der Plasmamembran exprimiert wird^{46, 85}. Pro-IL-1 α ist im Gegensatz zu den Vorläuferformen der anderen Mitglieder der Interleukin-1 Superfamilie wie beispielsweise pro-IL-1 β biologisch aktiv und wirkt dadurch als Mediator diverser inflammatorischer Reaktionen⁵².

Pro-IL-1 α gilt als Alarmin der Zelle und wird beim Untergang von nekrotischen Zellen im Rahmen einer Hypoxie oder Gewebeschäden sezerniert bzw. auf der Oberfläche von Zellen mit oxidativen oder metabolischem Stress präsentiert^{52, 86}. Durch die Bindung an den IL-1R1 wird eine Inflammationskaskade initiiert. Benachbarte Zellen wie Makrophagen und dendritische Zellen setzen folglich Chemokine frei, die zur Einwanderung von peripheren inflammatorischen Zellen (Monozyten, neutrophile Granulozyten) ins Gewebe führen^{87, 88}. Die eingewanderten Zellen verstärken nicht nur die Hypoxie, sondern beginnen auch unabhängig vom IL-1R1 mit der Sekretion von IL-1 α und IL-1 β . Dadurch entsteht ein Circulus vitiosus der Inflammation, der wiederum zu ausgeprägten Gewebeschäden beiträgt⁵². Durch die Bindung von pro-IL-1 α an den cytosolischen IL-1R2 lässt sich diese exzessive inflammatorische Reaktion jedoch auch zelltypspezifisch limitieren^{89, 90}.

Um im Zuge der Apoptose, dem programmierten nicht-inflammatorischen Zelltod, die Sekretion von pro-IL-1 α zu verhindern, wird dieses in den Zellkern transportiert und an Chromatin gebunden. Pro-IL-1 α trägt dafür am N-Terminus ein Kernlokalisierungssignal (NLS, nucleus localization signal). Die durch diverse Stimuli aktivierten Signalwege führen anschließend zur Bildung von Apoptosekörpern, welche die fragmentierten Zellstücke und auch pro-IL-1 α enthalten^{90, 91}. Zur Aufrechterhaltung der Homöostase im Organismus werden die Apoptosekörper letztlich im Rahmen der Efferozytose phagozytiert⁹². Es kann jedoch auch, z.B. durch oxidativen Stress oder Ischämie, zu einer Störung des Gleichgewichtes aus der Freisetzung von Apoptosekörpern und deren Phagozytose kommen, sodass eine sekundäre Nekrose resultiert. Dadurch erfolgt die Sekretion und Prozessierung von pro-IL-1 α aus den Apoptosekörpern und es entsteht eine sekundäre inflammatorische Reaktion⁹¹.

Extrazelluläre Stimuli, wie Zytokine und auch TLR-Liganden, bewirken ebenfalls eine Translokation von pro-IL-1 α entsprechend seines NLS in den Zellkern. Dort stimuliert pro-IL-1 α die Transkription von NF- κ B und auch AP-1, sodass die Synthese weiterer proinflammatorischer Zytokine unabhängig vom IL-1R1 erfolgt^{52, 55, 93}.

Zusammenfassend lässt sich anhand dieser Studien feststellen, dass der Vorläuferform von IL-1 α (pro-IL-1 α) bereits eine vielseitige Funktion im Rahmen der Initiierung und Aufrechterhaltung inflammatorischer Prozesse zukommt. Auch die Vorläuferform von IL-1 α birgt daher ein vielversprechendes Potenzial für zukünftige Ansätze einer anti-inflammatorischen Therapie.

5.1.4 Effekte von maturem IL-1 α

IL-1 α zählt zu den elf Mitgliedern der Interleukin-1 Superfamilie und nimmt bei diversen physiologischen als auch pathologischen Prozessen im Organismus eine entscheidende Rolle ein⁹⁰. Nach der Prozessierung von pro-IL-1 α zu maturem IL-1 α (siehe Abschnitt 5.1.5) erfolgt die

Bindung von IL-1 α an den IL-1R1. Durch die Dimerisierung der beiden TIR-Domänen des Rezeptors und die Rekrutierung von IL1RAcP werden weitere Adapterproteine (MyD88, IRAK und TRAF6) rekrutiert, sodass es zur Aktivierung verschiedener Signalwege wie dem NF- κ B- oder MAPK-Weg kommt. Diese sind sowohl an der Sekretion weiterer proinflammatorischer Zytokine wie IL-6 oder TNF- α und der Transkription von Genen wie der Cyclooxygenase-2 als auch an der Regulation von Zellwachstum und Apoptose beteiligt^{44, 94}.

In einer aktuellen Studie mit *Ptpn6^{spin}*-Mäusen wurde gezeigt, dass die Mutation der Proteintyrosinphosphatase SHP-1 (Src homology region 2 (SH2)-domain-containing phosphatase-1) eine chronische Entzündung auslöst, die durch einen sich selbst verstärkenden inflammatorischen Zyklus entsteht. Dabei initiiert RIPK-1 über den NF- κ B- und MAPK-Signalweg die Sekretion proinflammatorischer Zytokine, vor allem von IL-1 α , die folglich weitere inflammatorische Zellen in den Bereich der Entzündung rekrutieren und die Inflammation verstärken^{95, 96}. Dies führte zu der Annahme, dass IL-1 α und das angeborene Immunsystem eine tragende Rolle im Rahmen von autoinflammatorischen und autoimmunen Erkrankungen erfüllen^{90, 95}. Zu den autoinflammatorischen Erkrankungen zählen beispielsweise das familiäre Mittelmeerfieber (FMF), das Hyperimmunglobulin-D-Syndrom (HIDS), die Cryopyrin-assoziierten periodischen Syndrome (CAPS) und das TNF-Rezeptor-assoziierte periodische Syndrom (TRAPS)⁹⁷.

Darüber hinaus hat IL-1 α auch einen signifikanten proinflammatorischen Einfluss auf die Atherogenese und demnach auf die typischerweise durch Atherosklerose ausgelösten Pathologien wie die Koronare Herzkrankheit (KHK), die periphere arterielle Verschlusskrankheit (pAVK) oder zerebrovaskuläre Erkrankungen (CVD)⁹⁸. In der vorliegenden Arbeit wurde IL-1 α als Mediator der Leukozyten-Endotheladhäsion identifiziert. Doch IL-1 α induziert nicht nur die Expression von VCAM-1 auf Endothelzellen, sondern fungiert auch selbst als Zelladhäsionsmolekül (siehe Abschnitt 4.3).

Weitere Studien legen nahe, dass IL-1 α je nach Stadium der Atherosklerose unterschiedliche Auswirkungen auf die Plaquebildung, -stabilität und die resultierende Gefäßstenosierung hat^{99, 100}. Durch die Aktivierung der Endothelzellen im Rahmen der endothelialen Dysfunktion und auch die Nekrose der Schaumzellen wird vermehrt IL-1 α produziert. Dadurch erfolgt die Expression von Zelladhäsionsmolekülen, die Rekrutierung von weiteren inflammatorischen Zellen und vaskulären glatten Muskelzellen (VSMCs, engl. vascular smooth muscle cells) sowie eine erhöhte Sekretion von Matrix-Metalloproteinasen (MMP)^{100, 101}. Die MMPs sorgen für den Abbau von extrazellulärer Matrix und sind an der Migration der Leukozyten sowie dem arteriellen Remodeling beteiligt. Es wurde außerdem beobachtet, dass sie zu einer Destabilisierung der Plaque durch Abbau der fibrösen Kappe beitragen¹⁰². In frühen Läsionen bewirkt IL-1 α vermutlich eine kompensatorische Vergrößerung des Gefäßes mittels nach außen gerichtetem Remodeling, sodass sich zunächst keine blutflusslimitierende Stenose bildet¹⁰⁰.

Eine weitere Studie untersuchte die Effekte von IL-1 α auf die zelluläre Seneszenz. Diese ist durch einen permanenten Arrest des Zellzyklus, z.B. aufgrund von Zellaalterung, DNA-Schäden oder oxidativem Stress, charakterisiert. Seneszente VSMCs, die typischerweise auch in atherosklerotischen Plaques zu finden sind, stimulieren die autokrine Sekretion von IL-1 α . Dadurch wird wiederum der Seneszenz-assoziierte sekretorische Phänotyp (SASP) der VSMCs induziert. Der SASP ist hierbei durch seine proinflammatorische Wirkung mittels Sekretion von Zytokinen (IL-1, IL-6) und Chemokinen, aber auch durch eine geringere Freisetzung von Kollagen und eine erhöhte Produktion von MMP-9 mit resultierender Destabilisierung der Plaque gekennzeichnet. Folglich induzieren IL-1 α und der SASP einen sich selbst aufrechterhaltenden Zyklus der Inflammation und nehmen eine tragende Rolle beim Myokardinfarkt ein¹⁰³.

Im Rahmen der zellulären Seneszenz wird die Zellteilung protektiv gestoppt, um eine maligne Transformation zu verhindern¹⁰³. Kommt es hingegen zu einer Akkumulation von seneszenten Zellen und somit zu einer intrazellulären Erhöhung des Proteins S100A13, wird die Expression von membrangebundenem IL-1 α signifikant erhöht. Dies induziert sowohl den NF- κ B-Weg als auch den SASP. Verschiedene Untersuchungen zeigten, dass das S100A13-Protein in diversen Krebsformen, z.B. im Schilddrüsenkarzinom, dem malignen Melanom oder dem Bronchialkarzinom, hochreguliert ist. Durch die dadurch angetriebenen Signalwege von IL-1 α trägt es vermutlich sowohl zur Proliferation als auch zur Metastasierung von Malignomen bei¹⁰⁴. Zusätzlich wurde beobachtet, dass Rapamycin, ein Inhibitor des Proteins mammalian target of rapamycin (mTOR), die Translation von membrangebundenem IL-1 α reduziert, sodass die Aktivierung des NF- κ B- Signalweges und des SASP verringert wird¹⁰⁵.

Außerdem agiert IL-1 α als eine direkte Verbindung zwischen dem Immunsystem und der Gerinnungskaskade. Es wurde beobachtet, dass pro-IL-1 α , welches z.B. von Makrophagen, Keratinozyten und Thrombozyten am Ort der Gerinnung präsentiert oder freigesetzt wird, durch Thrombin in matures IL-1 α (aktives 18 kDa Fragment) gespalten wird. Folglich trägt das aktivierte IL-1 α nach einem akutem Thrombozytenverbrauch zu einer rapiden Thrombopoese mittels IL-1-abhängiger Fragmentierung von Megakaryozyten bei. Gleichsam erfolgt durch Thrombin-aktiviertes IL-1 α auch eine Rekrutierung von Immunzellen. Die akutellen Erkenntnisse beschränken sich jedoch auf die spezifischen Situationen des akuten Thrombozytenverbrauchs sowie der Wundheilung. Zukünftig sind weitere Studien zur Untersuchung der Thrombin-induzierten Aktivierung von IL-1 α im Rahmen von diversen Pathologien wie einer Sepsis, eines assoziierten ARDS oder auch der Atherogenese nötig¹⁰⁶.

Die Abb. 26 veranschaulicht den zuvor beschriebenen und in der vorliegenden Arbeit nachgewiesenen Einfluss von IL-1 α als proinflammatorisches Zytokin:

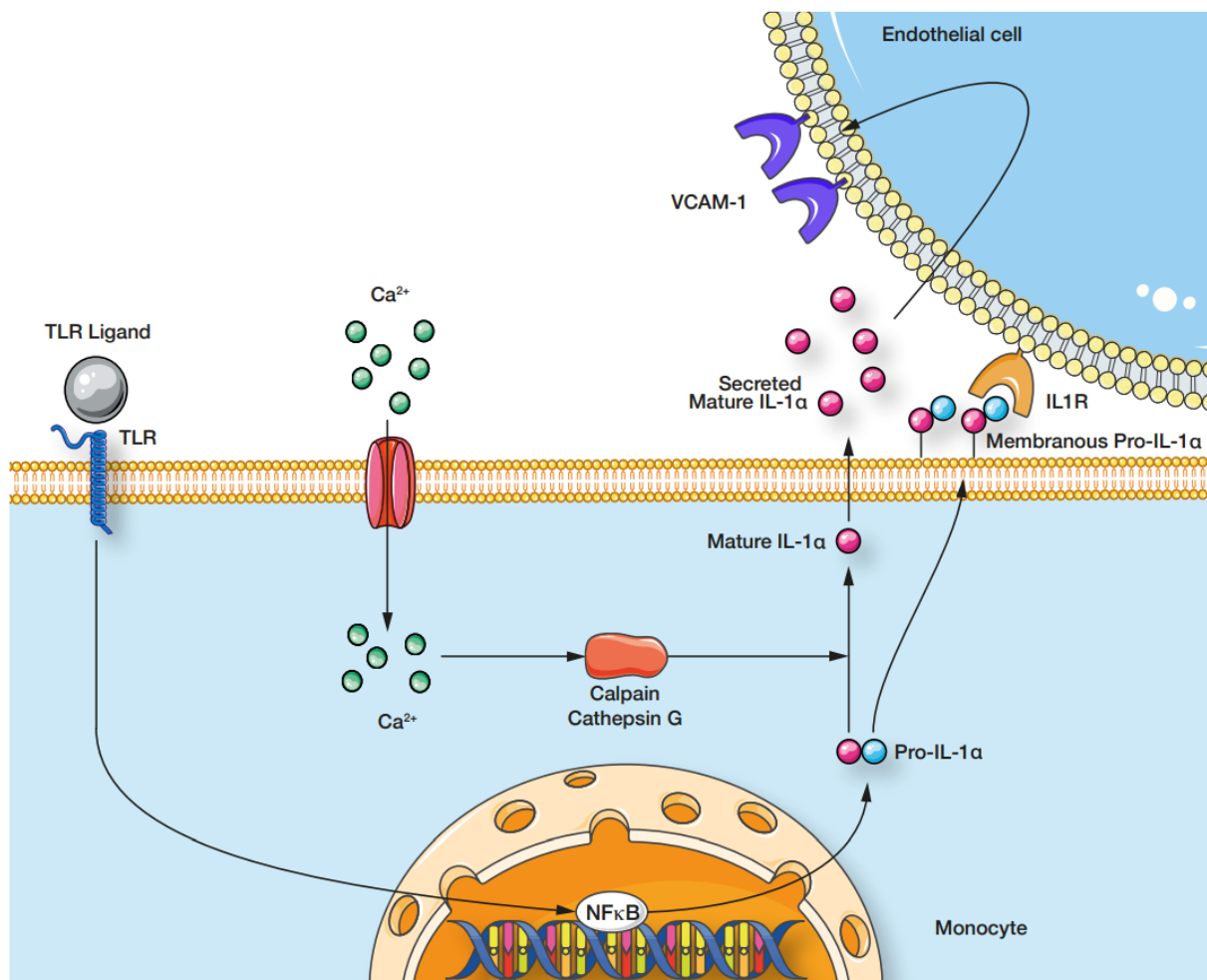


Abb. 26: Zusammenfassung der Effekte von pro-IL-1 α und IL-1 α (entnommen aus Schunk SJ et al., *Circulation*, 2021⁵⁹)

5.1.5 Cleavage von pro-IL-1 α

Die Vorläuferform pro-IL-1 α wird durch verschiedene Zelltyp-spezifische bzw. Gewebe-assoziierte Proteasen zu maturem IL-1 α prozessiert (siehe Tabelle 14). Dabei unterscheidet sich die resultierende aktive Form von IL-1 α je nach Protease nur um wenige Aminosäuren und die Spaltung erfolgt an Aminosäuren um den N-Terminus. Matures IL-1 α zeigt unabhängig von der spaltenden Protease eine höhere biologische Aktivität als pro-IL-1 α , wobei die Vorläuferform trotzdem bereits biologisch aktiv ist¹⁰⁷.

Protease	Eigenschaft
Calpain	spaltet pro-IL-1 α an der Stelle Phe118, Ca ²⁺ -abhängige Aktivierung
Granzym B	induziert den Zelltod, spaltet pro-IL-1 α an der Stelle Asp103, in Granula von zytotoxischen Lymphozyten und NK-Zellen enthalten
Elastase	spaltet pro-IL-1 α an der Stelle Ala101, Teil der azurophilen Granula von neutrophilen Granulozyten zur Pathogenabwehr
Cathepsin G	Teil der azurophilen Granula von neutrophilen Granulozyten zur Pathogenabwehr
Proteinase-3	Teil der azurophilen Granula von neutrophilen Granulozyten zur Pathogenabwehr
Chymase	spaltet pro-IL-1 α an der Stelle Phe116, wird bei der Mastzelldegranulation freigesetzt
Caspase-5 bzw. -11	spalten pro-IL-1 α an der Stelle Asp106 bzw. Asp103, induzieren die IL-1 α Sekretion bei der nicht-kanonischen Inflammation-Aktivierung und dem SASP
Thrombin	spaltet pro-IL-1 α an Prolin-reicher-Sequenz zu IL-1 α (18 kDa), induziert lokale Inflammation und Thrombopoese

Tabelle 14: Übersicht der Proteasen zur Spaltung von pro-IL-1 α zu IL-1 α (in Anlehnung an Chiu JW et al., 2021, S. 92¹⁰⁸)

In der vorliegenden Arbeit wurde durch die Inkubation stimulierter PBMCs mit Ca²⁺-Chelatoren und Inhibitoren von Calpain und Cathepsin G nachgewiesen, dass die Sekretion von proinflammatorischem IL-1 α aus Monozyten von der Prozessierung durch die Ca²⁺-abhängige Cysteinprotease Calpain bzw. die Serinprotease Cathepsin G abhängig ist (siehe Abschnitt 4.2.4).

Die Serinprotease Granzym B, die in Granula von cytotoxischen T-Lymphozyten und NK-Zellen zu finden ist, induziert den Zelltod infizierter Zellen. Zudem führt sie über die Spaltung von pro-IL-1 α zu maturem IL-1 α auch zur Verstärkung inflammatorischer Reaktionen. Dies wird vor allem in der Abwehr von Pathogenen oder der Nekrose von Zellen deutlich¹⁰⁹.

Darüber hinaus wurde festgestellt, dass IL-1 α im Rahmen einer Inflammationsreaktion die Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten vermittelt, welche Proteasen wie Elastase, Cathepsin G und Proteinase-3 aus ihren azurophilen Granula freisetzen. Schließlich initiieren die Proteasen durch Prozessierung von IL-1 α einen sich selbst verstärkenden Zyklus der Inflammation^{110, 111}.

Zusätzlich führen auch Mastzellen mittels der Sekretion von Proteasen wie Chymase zur Spaltung von pro-IL-1 α zu IL-1 α und folglich zur Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten an den Ort der Entzündung^{112, 113}. Wie eine Studie zeigte, sind die IL-1 α spaltenden Proteasen der Mastzellen und neutrophilen Granulozyten, z.B. in der Bronchiallavage von Patienten mit Cystischer Fibrose, einer Infektion mit *Pseudomonas aeruginosa* oder Bronchiektasen, vermehrt nachzuweisen^{109, 112}.

Die Cysteinproteasen Caspase-5 und Caspase-11 vermitteln im Rahmen der nicht-kanonischen Aktivierung des Inflammasoms durch intrazelluläre Bakterien oder internalisiertes LPS auch die Prozessierung und Sekretion von IL-1 α . Zudem induzieren sie die Spaltung und Freisetzung von IL-1 α im Zuge des SASP und steigern die biologische Aktivität des Zytokins. Caspase-5 ist das menschliche Homolog zur murinen Caspase-11^{114, 115}. Wie in Abschnitt 5.1.4 erläutert, spaltet Thrombin pro-IL-1 α an einer Prolin-reichen-Sequenz in ein 18 kDa Fragment. Dieses weist vermutlich eine ähnliche biologische Aktivität wie das durch andere Proteasen erzeugte mature IL-1 α (17 kDa) auf und stimuliert eine lokale inflammatorische Reaktion sowie die Thrombopoese zur Aufrechterhaltung der Homöostase^{108, 116}.

5.2 Inflammation beim akuten Myokardinfarkt

Lokale und systemische inflammatorische Reaktionen nehmen eine signifikante Rolle im Rahmen des akuten Myokardinfarkts ein. Sie tragen sowohl zur Atherogenese und der Induktion eines thrombotischen Verschlusses als auch zur Entstehung von Primär- und Sekundärschäden des ischämischen Herzens durch Remodeling-Prozesse bei. In den letzten Jahren wurde in diversen Studien die Korrelation zwischen inflammatorischen Parametern wie hochsensitivem CRP (hsCRP), Interleukinen, Zellzahlen von Monozyten, Makrophagen, neutrophilen Granulozyten und der Morbidität sowie Mortalität von Patienten im Zusammenhang mit kardiovaskulären Ereignissen nachgewiesen^{117, 118}.

5.2.1 Epidemiologische und klinische Studien

In der Physicians' Health Studie von 1997 wurde die Konzentration von CRP, einem systemischen Marker der Inflammation, bei gesunden Männern bestimmt. Schließlich wurde über einen Zeitraum von acht Jahren verfolgt, ob ein relevantes kardiovaskuläres Ereignis auftritt. Dabei kam es zu der Beobachtung, dass ein höherer CRP-Wert mit einem gesteigerten Risiko für einen Myokardinfarkt, Schlaganfall oder eine venöse Thrombose einhergeht und demnach als Prädiktor für kardiovaskuläre Ereignisse anzusehen ist¹¹⁹.

Eine nachfolgende Analyse der Studie untersuchte die Konzentration an IL-6, welches die Synthese von Akutphase-Proteinen in der Leber stimuliert. Auch hier konnte gezeigt werden,

dass eine höhere Konzentration des proinflammatorischen Interleukins mit einem höheren Risiko für einen zukünftigen Myokardinfarkt einhergeht. Wichtig hervorzuheben ist, dass diese Prädiktoren nicht von den typischen kardiovaskulären Risikofaktoren, wie z.B. Cholesterin, Body Mass Index (BMI) oder einer Hypertonie, abhängig sind¹²⁰.

Diverse Studien demonstrierten darüber hinaus den Einfluss proinflammatorischer Marker auf den Zustand von Patienten direkt und auch Jahre nach einem kardiovaskulären Ereignis. So wurde in der SOLID-TIMI 52 Studie (Stabilization of Plaque Using Darapladib-Thrombolysis in Myocardial Infarction 52) die IL-6-Konzentration von Patienten mit einem akuten Koronarsyndrom gemessen und gleichzeitig das Auftreten eines MACE, einer Herzinsuffizienz oder dem kardiovaskulären Tod erfasst. Die Ergebnisse verdeutlichen, dass Patienten im oberen Quartil der IL-6-Konzentration ein um 57% erhöhtes Risiko für MACE bzw. ein zweifach gesteigertes Risiko für einen kardiovaskulären Tod oder die Entwicklung einer Herzinsuffizienz haben¹²¹. Eine Post-hoc Analyse der STABILITY Studie (Stabilization of Atherosclerotic Plaque by Initiation of Darapladib Therapy) identifizierte IL-6 als zuverlässigen Biomarker zur Vorhersage von Morbidität und Mortalität im Rahmen von kardiovaskulären Ereignissen¹²².

Die aktuellen Leitlinien der Therapie nach einem akuten Myokardinfarkt sehen vor allem die Reduktion des LDL-Cholesterins vor. In einer Post-hoc Analyse der randomisierten, kontrollierten FOURIER Studie (Further Cardiovascular Outcomes Research With PCSK9 Inhibition in Patients With Elevated Risk) wurde jedoch nachgewiesen, dass sowohl die Konzentration des LDL-Cholesterins als auch die der proinflammatorischen Marker wie hsCRP unabhängig voneinander mit einem erhöhten kardiovaskulären Risiko assoziiert sind. Daher ergibt sich die Annahme, dass ein wegweisender Erfolg zur Verbesserung der Prognose nach einem AMI erst durch eine kombinierte Reduktion des residualen Cholesterin- sowie des inflammatorischen Risikos erzielt wird¹²³. Eine Subanalyse der CIRT Studie (Cardiovascular Inflammation Reduction Trial) zeigte, dass die Höhe der Biomarker LDL-Cholesterin, IL-6 und hsCRP trotz einer umfangreichen medikamentösen Therapie inklusive Statine, AT-1 Inhibitoren, Betablockern und Thrombozytenaggregationshemmern bzw. perkutaner Koronarintervention mit dem Auftreten eines erneuten kardiovaskulären Ereignisses korreliert. Diese Erkenntnisse untermauern die Relevanz einer Kombination lipidsenkender und anti-inflammatorischer Medikamente für das zukünftige therapeutische Vorgehen in der Behandlung kardiovaskulärer Erkrankungen^{124, 125}.

In dem klinischen Abschnitt der Studie von Schunk SJ et al. zur Rolle von IL-1 α bei kardiovaskulären Erkrankungen wurde nachgewiesen, dass die Expression von IL-1 α auf der Oberfläche von Monozyten bzw. die Expression der mRNA von IL-1 α in Monozyten von Patienten nach einem AMI oder mit einer schweren Nierenerkrankung im Vergleich zu gesunden Probanden signifikant höher ist. Daraus resultierte ein erhöhtes Risiko für atherosklerotisch bedingte kardiovaskuläre Ereignisse und eine reduzierte linksventrikuläre Ejektionsfraktion im

mehrfährigen Beobachtungszeitraum nach dem Infarkt⁵⁹. Diese Feststellung diene als Ausgangspunkt für die in dieser Arbeit durchgeführten tierexperimentellen Versuche zur Rolle von IL-1 α bei der Leukozyten-Endotheladhäsion sowie der Inflammationsreaktion nach einem akuten Myokardinfarkt.

5.2.2 Effekte verschiedener Leukozytenpopulationen auf die myokardiale Schädigung

Die vorliegende Arbeit konnte erstmals eine zentrale Rolle von IL-1 α als Mediator der Leukozyten-Endotheladhäsion im Rahmen von kardiovaskulären Erkrankungen belegen. So führte die experimentelle Induktion eines akuten Myokardinfarkts zu einer signifikant gesteigerten Expression von IL-1 α und der Rekrutierung inflammatorischer Zellen, wie Monozyten, Makrophagen und neutrophile Granulozyten, ins Infarktareal. Vice versa unterdrückte eine IL-1 α -Defizienz die Ausbildung solcher inflammatorischen Zellinfiltrate (siehe Abschnitt 4.4). Eine genauere Untersuchung der Infiltrate führte zu der Hypothese, dass die einzelnen Leukozytenpopulationen vermutlich einen unterschiedlichen Einfluss auf die verschiedenen Phasen nach einem akuten Myokardinfarkt (Inflammation, Heilung, Remodeling) haben. Sie können je nach Zeitpunkt sowohl proinflammatorisch wirken und dadurch die myokardiale Schädigung verstärken als auch anti-inflammatorisch und pro-angiogenetisch zur Koordination der Heilung¹²⁶.

5.2.2.1 Neutrophile Granulozyten

Neutrophile Granulozyten sind der prozentual größte Anteil an Leukozyten in unserem Körper. Kommt es infolge eines akuten Myokardinfarktes zu einer Nekrose von Kardiomyozyten werden die neutrophilen Granulozyten als erste Immunzellen mittels endogener DAMPs und anderen Alarminen, vor allem IL-1 α , innerhalb weniger Stunden in den infarzierten Bereich rekrutiert. Daraus resultiert ein sich selbst verstärkender inflammatorischer Circulus vitiosus. Die rekrutierten Granulozyten verstärken nämlich die Granulopoese durch Sekretion inflammatorischer Mediatoren¹²⁷. Eine erhöhte Anzahl an neutrophilen Granulozyten korreliert positiv mit dem Ausmaß der myokardialen Schädigung und der Mortalität infolge des Infarktes. Zu Beginn der inflammatorischen Phase nach dem akuten Myokardinfarkt erzeugen die neutrophilen Granulozyten durch einen oxidativen Burst eine große Menge an ROS bzw. proteolytischen Enzyme, die die inflammatorische Reaktion und Gewebeschädigung forcieren. Gleichsam führen die Sauerstoffradikale zur Rekrutierung weiterer inflammatorischer Zellen^{126, 128}.

Es werden zwei verschiedene Phänotypen der neutrophilen Granulozyten unterschieden. In der akuten Phase nach einem Myokardinfarkt erfolgt durch die Aktivierung des TLR4 eine gesteigerte Polarisation der neutrophilen Granulozyten hin zum N1-Phänotyp. Dieser ist durch

die Sekretion proinflammatorischer Zytokine, darunter IL-1 α , IL-1 β und TNF- α , sowie Proteinasen wie MMPs charakterisiert, welche das frühe Remodeling sowie die Expansion des Infarktgebietes durch Degradation der Extrazellulärmatrix (EZM) aggravieren. Es startet eine proteolytische und inflammatorische Kaskade. In der ersten Woche nach dem Infarkt verschiebt sich das Verhältnis der beiden Subtypen jedoch zunehmend hin zum N2-Phänotyp. Dieser ist durch seine anti-inflammatorische Wirkung mittels IL-10 und seinen positiven Effekt auf den Heilungsprozess geprägt^{129, 130}.

Darüber hinaus sind neutrophile Granulozyten in der Lage mittels NETose sogenannte neutrophile extrazelluläre Traps (NETs, engl. neutrophil extracellular traps) freizusetzen. Dabei handelt es sich um Partikel aus doppelsträngiger DNA (dsDNA), Histonen sowie neutrophilen Proteasen. NETs verstärken die endotheliale Dysfunktion und Thrombogenität in Abhängigkeit von IL-1 α , sodass die Rekrutierung weiterer inflammatorischer Zellen erneut gesteigert wird^{131, 132}. Eine klinische Studie beobachtete außerdem, dass höhere Konzentrationen des NET-Markers dsDNA im Serum von Patienten nach einem AMI mit einem größeren Infarktgebiet, einem adversen linksventrikulären Remodeling und einer schlechteren Prognose einhergehen¹³³.

5.2.2.2 Monozyten

Monozyten zirkulieren im Blut und differenzieren nach ihrer Migration in den infarzierten Bereich zu Makrophagen. Sie sind Teil des mononukleär-phagozytären Systems und in der Akutphase des Myokardinfarktes an der Beseitigung von Zelldebris und der Degradation von EZM beteiligt¹²⁶.

Die Rekrutierung zweier verschiedener Subtypen von Monozyten mit pro- bzw. anti-inflammatorischer Wirkung wird durch Chemokine und ihre Rezeptoren beeinflusst. In der frühen Phase des Myokardinfarktes (Tag 1-3) akkumulieren Ly6C^{high}-Monozyten via CCR2. Charakterisiert werden sie durch eine erhöhte Proteaseaktivität zum Abbau von EZM und der Beseitigung von Zelldebris, sowie eine gesteigerte Expression proinflammatorischer Mediatoren, z.B. IL-1 α und TNF- α ^{134, 135}. In der späten Phase (ab Tag 5) dominieren Ly6C^{low}-Monozyten via CX3CR1 den infarzierten Bereich. Sie weisen anti-inflammatorische und pro-angiogenetische Eigenschaften auf. Dazu zählen beispielsweise erhöhte Level des vaskulären Wachstumsfaktors VEGF zur Eindämmung der inflammatorischen Schädigung und Initiierung von Reparaturprozessen^{135, 136}.

5.2.2.3 Makrophagen

Makrophagen sind, wie auch die Monozyten, Teil des mononukleär-phagozytären Systems. Durch die Versuche der vorliegenden Arbeit wurde deutlich, dass es nach einem akuten Myokardinfarkt in Abhängigkeit von IL-1 α zu einer signifikanten Infiltration von Makrophagen in den infarzierten Bereich kommt (siehe Abschnitt 4.4.2). In der ersten Woche nach einem AMI differenziert der überwiegende Anteil der Makrophagen aus den zuvor aus dem Blut rekrutierten Monozyten. Durch die vorangegangene Ischämie kommt es nämlich zur Nekrose eines umfassenden Anteils an gewebständigen Makrophagen. Nach dem Abklingen der akuten Phase erfolgt jedoch eine erneute Differenzierung gewebständiger Makrophagen aus lokalen Vorläuferzellen. Diese entfalten schließlich ihren positiven Effekt auf die Heilung vor allem durch die Induktion der Angiogenese und Proliferation von Kardiomyozyten¹³⁷.

Es werden zwei Subtypen von Makrophagen mit unterschiedlichem Einfluss auf die Inflammation unterschieden. Die in der akuten Phase des AMI eingewanderten Ly6C^{high}-Monozyten differenzieren vor allem zu M1-Makrophagen. Diese sezernieren proinflammatorische Mediatoren, darunter IL-1, IL-6, IL-12 oder auch TNF- α , sowie Proteasen wie MMPs zur Beseitigung von Zelldebris und zur Degradation von EZM. Zudem aktivieren sie Typ 1-T-Helferzellen (Th1-Zellen) im Rahmen der Immunantwort. Gleichsam differenzieren die anti-inflammatorischen Ly6C^{low}-Monozyten zu M2-Makrophagen, die durch die Freisetzung von IL-10, VEGF und TGF- β 1 zur Eindämmung der Entzündungsreaktion, Infarktgröße und Neoangiogenese beitragen. Außerdem führen sie über die Sekretion von Wachstumsfaktoren zur Aktivierung von Myofibroblasten und damit zur Ausbildung einer kollagenen Narbe¹³⁸.

Weitere Studien kamen zu dem Erkenntnis, dass das von den neutrophilen Granulozyten freigesetzte NGAL (Neutrophil Gelatinase-associated Lipocalin) die Expression des Phagozytorezeptors MerTK (Myeloid-epithelial-reproductive Tyrosine Kinase) auf reparativen Makrophagen induziert. Die daraus resultierende Phagozytose von apoptotischen Kardiomyozyten und Neutrophilen sowie Zelldebris im Rahmen eines AMI trägt zur Reduktion der Inflammation und damit zu einer besseren Wundheilung und Prognose bei. Dies unterstreicht die Relevanz einer Wiederherstellung der physiologischen Zellhomöostase im Rahmen von inflammatorischen Erkrankungen^{139, 140}.

5.2.3 Rolle von VCAM-1 bei der myokardialen Schädigung

Das vaskuläre Zelladhäsionsmolekül 1 (VCAM-1) gehört zur Gruppe der Immunglobulin-Superfamilie und wird konstitutiv auf Endothelzellen exprimiert. VCAM-1 ist ein transmembranöses Glykoprotein und ein wichtiger Ligand für Integrine auf Leukozyten. Im Rahmen inflammatorischer Prozesse vermittelt VCAM-1 die Adhäsion und transendotheliale Migration von Leukozyten^{141, 142}. Wie in dieser Arbeit nachgewiesen wurde, führt IL-1 α und auch das

proinflammatorische Zytokin TNF- α zu einer signifikant gesteigerten Expression von VCAM-1 auf Endothelzellen. Somit agieren die proinflammatorischen Mediatoren IL-1 α und TNF- α als Vermittler der Leukozyten-Endotheladhäsion (siehe Abschnitt 4.3.2).

In der akuten Phase des Infarktes kommt es innerhalb kürzester Zeit zu einer Ischämie, Nekrose und dem Funktionsverlust des infarzierten Myokards. Daraus resultierend startet eine proinflammatorische Signaltransduktionskaskade. Die sezernierten Zytokine wie IL-1 α und TNF- α , das oxidierte LDL der rupturierten Plaque oder auch die durch die Obstruktion des Gefäßes induzierte Schubspannung führen über die Produktion von ROS und Aktivierung von NF- κ B zu einer erhöhten Expression von VCAM-1^{143, 144}. Die Steigerung der Expression von VCAM-1 auf der Oberfläche der Endothelzellen benötigt zwischen 4–6 h und erreicht ihr Maximum nach 12–18 h, wobei sie über mehrere Tage hochreguliert bleibt¹⁴⁵. Durch die Interaktion der hochaffinen Form des α 4 β 1-Integrins auf Leukozyten mit dem Zelladhäsionsmolekül VCAM-1 auf Endothelzellen erfolgt eine feste Bindung der Zellen ans Endothel. Darüber hinaus kommt es auch zu der Aktivierung des G-Proteins Rac1 sowie der Aktivierung von MMPs über H₂O₂¹⁴⁶. Schließlich erfolgt sowohl die Transmigration von Leukozyten in den infarzierten Bereich sowie die Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine als auch die Degradation von EZM. Demnach ist die myokardiale Schädigung nicht nur eine Folge der ischämiebedingten Nekrose von Kardiomyozyten, sondern auch der umfangreichen Rekrutierung von inflammatorischen Leukozyten mittels VCAM-1^{146, 147}.

Weitere Studien zeigen, dass es im Rahmen eines AMI unverzüglich (< 30 min) zu einer deutlichen Steigerung der Freisetzung VCAM-1 enthaltender extrazellulärer Vesikel (EVs) aus Endothelzellen kommt. Die Anzahl dieser ist proportional zum Ausmaß der myokardialen Schädigung. Die endothelialen EVs führen in der Milz in Abhängigkeit von VCAM-1 zur Mobilisierung sowie Aktivierung von neutrophilen Granulozyten und Monozyten. Somit haben die EVs eine tragende Rolle im Mechanismus der frühen Rekrutierung von Immunzellen durch VCAM-1 in den Infarktbereich^{148, 149}.

Außerdem hat das Zelladhäsionsmolekül einen entscheidenden Einfluss auf die Entwicklung einer myokardialen Schädigung und Expansion des Infarktgebietes nach einer Revaskularisierung (ischämischer Reperfusionsschaden). In einer Studie wurde beobachtet, dass es innerhalb weniger Minuten nach einer durchgeführten Reperfusion infolge eines Ca²⁺-Einstroms, der Produktion von ROS und einer pH-Wert-Änderung zu einer mitochondrialen Dysfunktion und Nekrose von weiteren Kardiomyozyten im Myokard kommt. Zusätzlich führte die gesteigerte Expression von VCAM-1 zur Rekrutierung weiterer inflammatorischer Zellen und zur Aggravation der Entzündungsreaktion^{150, 151}. Der dadurch ausgelöste Reperfusionsschaden umfasst daher sowohl reversible Pathologien wie ventrikuläre Arrhythmien oder eine kontraktile Dysfunktion (myocardial stunning) als auch irreversible Schädigungen wie mikrovaskuläre Obstruktionen und weitere Zellnekrosen, die das adverse Remodeling begünstigen¹⁵².

5.3 Anti-inflammatorische Therapieansätze

Die Ursache der Atherosklerose ist nicht mehr nur als eine passive Ablagerung von Lipiden in der Gefäßwand anzusehen. Vielmehr ist es eine durch Zytokine vermittelte entzündlich-proliferative Systemerkrankung¹⁵³. Charakteristisch ist die Bildung einer Plaque, die sowohl modifizierte Lipide als auch Bindegewebe und Immunzellen enthält. Persistierende inflammatorische Stimuli wie IL-1 α , IL-1 β oder auch IL-6 initiieren ein wesentliches Attribut kardiovaskulärer Erkrankungen – die chronische Inflammation¹⁵⁴. Neben einer leitliniengerechten lipidsenkenden Therapie ist es wichtig, das Augenmerk auch auf anti-inflammatorische Therapieansätze in Form einer Immuntherapie zu richten, um das weiterhin hohe residuelle, inflammatorische Risiko von Patienten mit kardiovaskulären Erkrankungen zu senken und die Prognose dieser Patienten signifikant zu verbessern^{155, 156}.

5.3.1 Inhibition von IL-1 α

Die vorliegende Arbeit untersuchte die Rolle von IL-1 α bei der systemischen Inflammation, insbesondere bei kardiovaskulären Erkrankungen. Das Interleukin entfaltet seine Wirkung nicht nur über den IL1-R1-Signalweg, sondern induziert auch unabhängig davon die Sekretion proinflammatorischer Zytokine. Zudem zeigten unsere Versuche erstmalig, dass IL-1 α auch selbst als Zelladhäsionsmolekül agiert. Durch Inhibition von IL-1 α und seinem Rezeptor IL1-R1 bzw. durch eine Defizienz von IL-1 α kam es zu einer signifikant geringeren Leukozyten-Endotheladhäsion sowie Inflammation und myokardialen Schädigung im Rahmen induzierter kardiovaskulärer Ereignisse (siehe Abschnitt 4.3 und 4.4). Die beschriebenen Ergebnisse bieten somit einen vielversprechenden Ansatz für zukünftige anti-inflammatorische Therapiekonzepte mittels Inhibition von IL-1 α .

Im Rahmen mehrerer Studien wurde die Wirksamkeit des humanen monoklonalen Antikörpers MABp1, der selektiv gegen IL-1 α gerichtet ist, analysiert. Es wurde festgestellt, dass die Inhibition von IL-1 α und seiner inflammatorischen Signalkaskade bei Patienten mit fortgeschrittenem kolorektalem Karzinom zu einer deutlichen Verbesserung der Lebensqualität und des klinischen Zustands in Bezug auf Schmerzen, Fatigue und Kachexie führt^{157, 158}. Darüber hinaus eröffnete eine Phase-III-Studie zu Rilonacept, einem Fusionsprotein, welches IL-1 α und IL-1 β bindet, eine neue Perspektive in der Behandlung einer Perikarditis. In der multizentrischen Studie wurde nachgewiesen, dass Rilonacept durch Unterbindung des IL-1-Signalweges zu einer signifikanten Reduktion des Schmerzlevels sowie der CRP-Konzentration im Rahmen einer rezidivierenden Perikarditis führt. Gleichsam verringert es das relative Risiko für Rezidive im Vergleich zu Placebo um 96 %^{159, 160}.

Die VCUART-3 Studie (The Virginia Commonwealth University-Anakinra Remodeling Trial-3) zeigte, dass durch die Gabe des rekombinanten IL-1-Rezeptorantagonist Anakinra eine

signifikante Reduktion der hsCRP-Konzentration und systemischen Inflammation im Rahmen eines akuten STEMI erreicht wird^{161, 162}. Zudem resultiert aus der Inhibition der Effekte von IL-1 α sowie IL-1 β bei Patienten nach einem AMI eine beschleunigte Senkung der Leukozytenzahl mit einer relativen Reduktion der neutrophilen Granulozyten sowie Erhöhung der Anzahl der eosinophilen Granulozyten. Dies führt zu einer verbesserten Prognose hinsichtlich der linksventrikulären Funktion und Hospitalisierung bzw. Tod durch eine sich in der Folge entwickelnde Herzinsuffizienz¹⁶³. Diese Erkenntnisse zusammen mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit verdeutlichen die Relevanz anti-inflammatorischer Therapiestrategien mittels spezifischer Inhibition von IL-1 α , um die entzündliche Signalkaskade zuverlässig zu unterbinden.

5.3.2 Inhibition von IL-1 β

Die randomisierte, Placebo-kontrollierte CANTOS Studie (Canakinumab Antiinflammatory Thrombosis Outcome Study) untersuchte die Wirksamkeit des gegen IL-1 β gerichteten Antikörpers Canakinumab. Sie erbrachte erstmals den Beweis für die über viele Jahre kontrovers diskutierte atherosklerotische Inflammationshypothese. Dadurch lieferte die Studie sowohl eine Erklärung für die Pathogenese der Atherosklerose als auch das weiterhin hohe residuale Risiko für erneute kardiovaskuläre Ereignisse trotz maximaler lipidsenkender Therapie bei Patienten mit kardiovaskulären Vorerkrankungen. Sie bietet außerdem einen neuen vielversprechenden anti-inflammatorischen Therapieansatz in der Behandlung von atherosklerotisch bedingten Pathologien als auch malignen Erkrankungen¹⁶⁴.

Canakinumab ist ein humaner monoklonaler Antikörper, der gegen IL-1 β gerichtet ist und bisher vor allem in der Therapie von rheumatischen Erkrankungen oder auch bei CAPS eingesetzt wird. Die CANTOS Studie zeigte, dass Canakinumab bei Patienten mit vorangegangenen Myokardinfarkt sowie einer erhöhten Konzentration an CRP (≥ 2 mg/l) das Risiko für rezidivierende kardiovaskuläre Ereignisse im Vergleich zu Placebo um 15 % senkt. Der Antikörper nimmt keinen Einfluss auf die Lipidkonzentration, stellt aber einen wichtigen ergänzenden Therapieansatz zur etablierten Lipidsenkung bei Patienten mit residualem inflammatorischem Risiko dar¹⁶⁵. Substudien zu CANTOS identifizierten die durch spezifische Inhibition von IL-1 β erzielte Blockade des IL-6-Signalweges als Mechanismus der signifikanten Reduktion des Restrisikos für MACE. Die Inhibition von IL-6 unterbindet nämlich die Synthese von CRP in der Leber und verhindert dadurch die Initiierung einer Akutphase-Reaktion. Resultierend daraus wurde eine positive Korrelation zwischen der erzielten Höhe der Reduktion des IL-6- bzw. CRP-Spiegels durch Canakinumab und der Senkung des Risikos für erneute kardiovaskuläre Ereignisse beobachtet^{166, 167}.

In einer weiteren Post-hoc-Analyse wurde außerdem festgestellt, dass Canakinumab die Krebssterblichkeit und vor allem die Inzidenz für das Bronchialkarzinom im Vergleich zur Placebo-Gruppe signifikant reduziert. Es wird jedoch vermutet, dass die Inhibition von IL-1 β und somit die Reduktion von IL-6 sowie CRP keinen direkten Effekt auf die Onkogenese hat. Vielmehr wird wohl die Progression, Invasivität und Metastasierung von Bronchialkarzinomen durch Eindämmung der inflammatorischen Reaktion reduziert. Jedoch bedingte Canakinumab im Vergleich zur Placebo-Gruppe eine erhöhte Inzidenz an tödlichen Infektionen bzw. ein gesteigertes Sepsisrisiko¹⁶⁸.

5.3.3 Inhibition von IL-6

Ein Meilenstein in unserem Verständnis der Atherogenese stellt die CANTOS-Studie dar. Sie belegt erstmals die tragende Rolle des IL-1-IL-6-Signalweges bei der Plaqueformation, -progression und -ruptur. Folglich ist es eine logische Konsequenz die kardioprotektiven Effekte der Inhibition von IL-6 als anti-inflammatorischen Therapieansatz in der Behandlung von Patienten mit kardio-renalen Erkrankungen näher zu untersuchen¹⁶⁹.

Im Rahmen der RESCUE Studie, einer Phase-II-Studie, wurden Patienten mit einer chronischen Nierenerkrankung im Stadium 3 oder 4 und einer gleichzeitig erhöhten Konzentration an hsCRP (≥ 2 mg/l) mit dem gegen IL-6 gerichteten humanen monoklonalen Antikörper Ziltivekimab behandelt. Ziltivekimab führte im Studienzeitraum von 12 Wochen im Vergleich zu Placebo dosisabhängig zu einer signifikanten Reduktion des hsCRP und auch anderer Marker, darunter Fibrinogen, Haptoglobin, Serum Amyloid A, sekretorische Phospholipase A2 und Lipoprotein (a)¹⁷⁰.

Seit August 2021 untersucht die über mehrere Jahre angelegte ZEUS Studie (Ziltivekimab Cardiovascular Outcomes Study), eine Phase-III-Studie, ob die durch Ziltivekimab erreichbare Reduktion von IL-6 tatsächlich zu einer Senkung kardiovaskulärer Ereignisse wie dem Myokardinfarkt, Schlaganfall oder kardiovaskulären Tod führt. Die eingeschlossenen Patienten weisen auch hier eine chronische Nierenerkrankung im Stadium 3 oder 4 sowie eine gleichzeitig erhöhte Konzentration an hsCRP auf. Mittels Messung der GFR und des Albumin-Kreatinin-Quotienten wird zusätzlich als zweiter Endpunkt beobachtet, ob die Reduktion von IL-6 auch eine verlangsamte Progression der chronischen Nierenerkrankung zur Folge hat¹⁷¹.

5.3.4 Colchicin

Colchicin, das Gift der Herbstzeitlosen, ist ein anti-inflammatorisches Alkaloid und ein Mitosehemmer. Es unterdrückt die Bildung von Mikrotubuli über die Inhibition der Tubulin-Polymerisation und konzentriert sich vor allem in neutrophilen Granulozyten. Daher wird es bereits

erfolgreich in der Therapie von akuten Gichtanfällen, dem familiären Mittelmeerfieber oder auch der Perikarditis eingesetzt. Darüber hinaus deuten aktuelle Studien auf einen vielversprechenden Nutzen von Colchicin in der anti-inflammatorischen Therapie von kardiovaskulären Erkrankungen hin¹⁷².

So zeigte die Placebo-kontrollierte COLCOT Studie (Colchicine Cardiovascular Outcomes Trial), dass Colchicin als Ergänzung zur Post-AMI-Standardtherapie das Risiko für kardiovaskuläre Ereignisse, im Wesentlichen für eine Hospitalisierung wegen Angina Pectoris oder für einen Schlaganfall, bei Patienten mit einem stattgehabten Myokardinfarkt innerhalb der letzten 30 Tage signifikant reduziert¹⁷³. Eine Subanalyse der Studie ergab, dass ein möglichst früher Therapiebeginn mit Colchicin, innerhalb der ersten drei Tage nach dem Myokardinfarkt, das Risiko für ischämische kardiovaskuläre Ereignisse sogar um 48 % senkt¹⁷⁴. Die LoDoCo2 Studie (Low-Dose Colchicine 2 Trial) replizierte dieses Ergebnis bei Patienten mit einer stabilen koronaren Herzerkrankung. Sie untermauert somit die positiven Ergebnisse der CANTOS- und COLCOT-Studie zur Prävention atherothrombotischer Komplikationen mittels eines anti-inflammatorischen Therapieansatzes^{175, 176}.

5.3.5 Methotrexat

Methotrexat ist ein Folsäureantagonist und wird in niedriger Dosierung als Immunsuppressivum bei Autoimmunerkrankungen wie der rheumatoiden Arthritis, systemischem Lupus Erythematoses oder auch der Psoriasis eingesetzt¹⁷⁷.

Die Placebo-kontrollierte CIRT Studie (Cardiovascular Inflammation Reduction Trial) untersuchte die Hypothese, dass Methotrexat bei Patienten mit bekannter koronarer Herzerkrankung und zusätzlichem Diabetes mellitus Typ 2 oder metabolischem Syndrom das Risiko für schwere kardiovaskuläre Komplikationen reduziert. Die Ergebnisse der Studie zeigten jedoch, dass Methotrexat keinen Einfluss auf die Konzentration der inflammatorischen Biomarker IL-1 β , IL-6 und hsCRP hat. Demnach wurde in der Studie auch keine Reduktion kardiovaskulärer Ereignisse beobachtet. Betrachtet man die Einschlusskriterien der Studienteilnehmer genauer, stellt man fest, dass im Gegensatz zur CANTOS-Studie keine Selektion der Patienten hinsichtlich einer bestehenden residualen Entzündung erfolgt ist^{166, 177}.

Dies führt zu der Schlussfolgerung, dass es für zukünftige Therapiekonzepte atherosklerotisch bedingter Erkrankungen unerlässlich ist die Mechanismen inflammatorischer Signalwege genauer zu untersuchen. Erst dadurch kann eine individuelle Therapieauswahl erfolgen.

5.4 Limitationen

Die vorliegende Arbeit hat Limitationen. So untersuchten die Maus- und Zellkulturmodelle vor allem die Rolle von IL-1 α bei der frühen Inflammation, die typischerweise in den ersten Tagen nach einem kardiovaskulären Ereignis ihr Maximum erreicht. Der Einfluss von IL-1 α auf spätere Phasen der entzündlichen Kaskade, Remodelingprozesse und langfristige Folgeerkrankungen war nicht Gegenstand dieser Arbeit und muss durch weitere Studien untersucht werden. Zudem handelt es sich hierbei um tierexperimentelle Versuche der Grundlagenforschung. Die Ergebnisse und die daraus ableitbaren anti-inflammatorischen Therapieansätze benötigen eine weitere Validierung in klinischen Studien an Patienten.

5.5 Zusammenfassung und Ausblick

Als eine wichtige Ursache der Atherosklerose gilt eine durch proinflammatorische Interleukine vermittelte Entzündungsreaktion. Diese Arbeit konnte erstmals nachweisen, dass IL-1 α ein Mediator der Leukozyten-Endotheladhäsion ist und somit die inflammatorische Kaskade im Rahmen der Atherogenese initiiert und aufrechterhält. IL-1 α vermittelt die Adhäsion nicht nur über eine erhöhte Expression von VCAM-1, sondern fungiert auch selbst als Zelladhäsionsmolekül. Darüber hinaus wurden verschiedene Stimuli wie Oxalat und Ölsäure sowie die zugrunde liegenden Mechanismen, die zu einer gesteigerten Expression und Sekretion von IL-1 α führen, identifiziert. Es wurde außerdem gezeigt, dass es durch die Inhibition von IL-1 α zu einer signifikanten Reduktion inflammatorischer Infiltrate nach einem akuten Myokardinfarkt kommt. Dies führt folglich auch zu einer geringeren myokardialen Schädigung.

Die vorliegende Arbeit leistet somit einen Beitrag zum Verständnis der Pathophysiologie kardio-renalener Erkrankungen und der Entwicklung anti-inflammatorischer Therapiestrategien. Die Modulation von IL-1 α stellt einen vielversprechenden Therapieansatz sowohl in der Prävention kardiovaskulärer Erkrankungen als auch in der Behandlung akuter kardiovaskulärer Ereignisse dar. Selektive Inhibitoren von IL-1 α wurden bereits in mehreren Studien hinsichtlich ihrer anti-inflammatorischen Wirksamkeit untersucht und werden in der Behandlung diverser Erkrankungen eingesetzt. Es ist nun von besonderer Relevanz spezifische Inhibitoren von IL-1 α im Rahmen klinischer Studien an Patienten zu testen.

6 Literaturverzeichnis

1. Bundesärztekammer (BÄK), Kassenärztliche Bundesvereinigung (KBV), Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften (AWMF) (2019) Nationale VersorgungsLeitlinie Chronische KHK-Langfassung. 5(1):12-4.
2. Sibbing D, Massberg S (2015) Springer Reference Innere Medizin: Stabile koronare Herzerkrankung. Berlin, Heidelberg: Springer Verlag.
3. Herold G (2022) Innere Medizin. Köln: Gerd Herold Verlag.
4. Erdmann E (2009) Klinische Kardiologie. Berlin, Heidelberg: Springer Verlag.
5. Knuuti J, Wijns W, Saraste A, Capodanno D et al. (2020) 2019 ESC Guidelines for the diagnosis and management of chronic coronary syndromes. Eur Heart J. 41(3):407-77.
6. Davies SW (2001) Clinical presentation and diagnosis of coronary artery disease: stable angina. Br Med Bull. 59(1):17-27.
7. Timmis A, Townsend N, Gale C, Torbica A et al. (2020) European Society of Cardiology: Cardiovascular Disease Statistics 2019. Eur Heart J. 41(1):12-85.
8. Pressestelle des Statistischen Bundesamtes (2017) Todesursachenstatistik. Wiesbaden: Statistisches Bundesamt (Destatis).
9. Pressestelle des Statistischen Bundesamtes (2021) Todesursachenstatistik. Wiesbaden: Statistisches Bundesamt (Destatis).
10. GBD 2015 Mortality and Causes of Death Collaborators (2016) Global, regional, and national life expectancy, all-cause mortality, and cause-specific mortality for 249 causes of death, 1980-2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. Lancet. 388(10053):1459-544.
11. Bolli A, Di Domenico P, Pastorino R, Busby G et al. (2021) Risk of Coronary Artery Disease Conferred by Low-Density Lipoprotein Cholesterol Depends on Polygenic Background. Circulation. 143(14):1452-54.
12. Glass C, Witztum J (2001) Atherosclerosis: The Road Ahead. Cell. 104(4):503–516.
13. Grundy SM, Balady GJ, Criqui MH, Fletcher G et al. (1998) Primary prevention of coronary heart disease: guidance from Framingham. Circulation. 97(18):1876-87.

14. The WHO MONICA Principal Investigators (1988) Monitoring Trends and Determinants in Cardiovascular Disease: A Major International Collaboration. *J Clin Epidemiol.* 41(2):105-14.
15. Lechner K, von Schacky C, McKenzie AL, Worm N et al. (2019) Lifestyle factors and high-risk atherosclerosis: Pathways and mechanisms beyond traditional risk factors. *Eur J Prev Cardiol.* 27(4):394-406.
16. Piepoli MF, Hoes AW, Agewall S, Albus C (2016) European Guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice. *Eur Heart J.* 37(29):2315-81.
17. Kannel W, McGee D (1979) Diabetes and cardiovascular risk factors: the Framingham study. *Circulation.* 59(1):8-13.
18. Wilson PWF, D'Agostino RB, Sullivan L, Parise H et al. (2002) Overweight and obesity as determinants of cardiovascular risk: The Framingham Experience. *Arch Intern Med.* 162(16):1867-72.
19. Lloyd-Jones DM, Larson MG, Beiser A, Levy D (1999) Lifetime risk of developing coronary heart disease. *Lancet.* 353(9147):89-92.
20. Jousilahti P, Vartiainen E, Tuomilehto J, Puska P (1999) Sex, age, cardiovascular risk factors, and coronary heart disease: a prospective follow-up study of 14,786 middle-aged men and women in Finland. *Circulation.* 99(9):1165-72.
21. Libby P, Theroux P (2005) Pathophysiology of Coronary Artery Disease. *Circulation.* 111(25):3481-88.
22. Hansson GK, Hermansson A (2011) The immune system in atherosclerosis. *Nat Immunol.* 12(3):204-12.
23. Ross R, Glomset J, Harker L (1977) Response to injury and atherogenesis. *Am J Pathol.* 86(3):675-84.
24. Weber C, Zernecke A, Libby P (2008) The multifaceted contributions of leukocyte subsets to atherosclerosis: lessons from mouse models. *Nat Rev Immunol.* 8(10):802-15.
25. Libby P (2003) Vascular biology of atherosclerosis: overview and state of the art. *The Am J Cardiol.* 91(3):3-6.
26. Kaperonis EA, Liapis CD, Kakisis JD, Dimitroulis D (2006) Inflammation and Atherosclerosis. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 31(4):386-93.

27. Libby P, Ridker PM, Hansson GK (2011) Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis. *Nature*. 473(7347):317-25.
28. Zernecke A, Shagdarsuren E, Weber C (2008) Chemokines in atherosclerosis: an update. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 28(11):1897-908.
29. Osterud B, Bjorklid E (2003) Role of Monocytes in Atherogenesis. *Physiol Rev*. 83(4):1069-112.
30. Böcker W, Denk H, Heitz PU, Moch H (2008) *Pathologie*. München: Urban & Fischer in Elsevier Verlag.
31. Hansson GK, Libby P (2006) The immune response in atherosclerosis: a double-edged sword. *Nat Rev Immunol*. 6(7):508-19.
32. Stary HC, Chandler AB, Glagov S, Guyton JR et al. (1994) A definition of initial, fatty streak and intermediate lesions of atherosclerosis. *Circulation*. 89(5):2462-78.
33. Ross R (1999) Atherosclerosis - an inflammatory disease. *N Engl J Med*. 340(2):115-26.
34. Cybulsky MI, Gimbrone MA (1991) Endothelial expression of a mononuclear leukocyte adhesion molecule during atherogenesis. *Science*. 251(4995):788-91.
35. Al-Saady N, Leatham E, Gupta S, Kwan JT et al. (1999) Monocyte expression of tissue factor and adhesion molecules: the link with accelerated coronary artery disease in patients with chronic renal failure. *Heart*. 81(2):134-40.
36. Nakashima Y, Raines EW, Plump AS, Breslow JL et al. (1998) Upregulation of VCAM-1 and ICAM-1 at Atherosclerosis-Prone Sites on the Endothelium in the ApoE-Deficient Mouse. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 18(5):842-51.
37. Shi C, Pamer EG (2011) Monocyte recruitment during infection and inflammation. *Nat Rev Immunol*. 11(11):762-74.
38. Lawson C, Wolf S (2009) ICAM-1 signaling in endothelial cells. *Pharmacol Rep*. 61(1):22-32.
39. McEver RP, Moore KL, Cummings RD (1995) Leukocyte trafficking mediated by selectin-carbohydrate interactions. *J Biol Chem*. 270(19):11025-8.
40. Ley K (1996) Molecular mechanisms of leukocyte recruitment in the inflammatory process. *Cardiovasc Res*. 32(4):733-42.
41. Wang J, Springer TA (1998) Structural specializations of immunoglobulin superfamily members for adhesion to integrins and viruses. *Immunol Rev*. 163:197-215.

42. Baggiolini M, Dewald B, Moser B (1997) Human chemokines: an update. *Annu Rev Immunol.* 15:675-705.
43. Baggiolini M (1998) Chemokines and leukocyte traffic. *Nature.* 392(6676):565-8.
44. Sims JE, Smith DE (2010) The IL-1 family: regulators of immunity. *Nat Rev Immunol.* 10(2):89-102.
45. Dinarello CA (2009) Immunological and Inflammatory Functions of the Interleukin-1 family. *Annu Rev Immunol.* 27:519-50.
46. Garlanda C, Dinarello CA, Mantovani A (2013) The interleukin-1 family: back to the future. *Immunity.* 39(6):1003-18.
47. Dinarello C, Arend W, Sims J, Smith D et al. (2010) IL-1 family nomenclature. *Nat Immunol.* 11(11):973.
48. Castejon GL, Brough D (2011) Understanding the mechanism of IL-1 β secretion. *Cytokine Growth Factor Rev.* 22(4):189-95.
49. Zoete MR, Palm NW, Zhu S, Flavell RA (2014) Inflammasomes. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 6(12):1-22.
50. Libby P (2017) Interleukin-1 Beta as a Target for Atherosclerosis Therapy. *J Am Coll Cardiol.* 70(18):2278-89.
51. Black RA, Kronheim SR and Sleath PR (1989) Activation of interleukin-1 β by a co-induced protease. *FEBS Lett.* 247(2):386-390.
52. Di Paolo NC, Shayakhmetov DM (2016) Interleukin 1 α and the inflammatory process. *Nat Immunol.* 17(8):906-13.
53. Clancy DM, Sullivan GP, Moran HBT, Henry CM et al. (2018) Extracellular Neutrophil Proteases Are Efficient Regulators of IL-1, IL-33, and IL-36 Cytokine Activity but Poor Effectors of Microbial Killing. *Cell Rep.* 22(11):2937-50.
54. Greenfeder SA, Nunes P, Kwee L, Labow M et al. (1995) Molecular cloning and characterization of a second subunit of the interleukin 1 receptor complex. *J Biol Chem.* 270(23):13757-65.
55. Cohen I, Rider P, Carmi Y, Braiman A et al. (2010) Differential release of chromatin-bound IL-1 α discriminates between necrotic and apoptotic cell death by the ability to induce sterile inflammation. *Proc Natl Acad Sci USA.* 107(6):2574-9.

56. Chen CJ, Kono H, Golenbock D, Reed G et al. (2007) Identification of a key pathway required for the sterile inflammatory response triggered by dying cells. *Nat Med.* 13(7):851-6.
57. Pradhan AD, Aday AW, Rose LM, Ridker PM (2018) Residual Inflammatory Risk on Treatment With PCSK9 Inhibition and Statin Therapy. *Circulation.* 138(2): 141-49.
58. Rothe G (2007) Technische und methodische Grundlagen der Durchflusszytometrie. In: Sack U, Tarnok A, Rothe G (eds) *Zelluläre Diagnostik: Grundlagen, Methoden und klinische Anwendungen der Durchflusszytometrie.* Basel: Karger Verlag.
59. Schunk SJ, Triem S, Schmit D, Zewinger S et al. (2021) Interleukin-1 α (IL-1 α) is a Central Regulator of Leukocyte-Endothelial Adhesion in Myocardial Infarction and in Chronic Kidney Disease. *Circulation.* 144(11):893-908.
60. Conlon PJ, Grabstein KH, Alpert A, Prickett KS et al. (1987) Localization of human mononuclear cell interleukin 1. *J Immunol.* 139(1):98-102.
61. Zola H, Flego L, Wong YT, Macardle PJ et al. (1993) Direct demonstration of membrane IL-1 alpha on the surface of circulating B lymphocytes and monocytes. *J Immunol.* 150(5):1755–62.
62. Fettelschoss A, Kistowska M, LeibundGut-Landmann S, Beer HD et al. (2011) Inflammasome activation and IL-1 β target IL-1 α for secretion as opposed to surface expression. *Proc Natl Acad Sci USA.* 108(44):18055-60.
63. Carlsen TG, Kjærsgaard P, Jørgensen TL, Foldbjerg R et al. (2015) Interleukin-1 α activation and localization in lipopolysaccharide-stimulated human monocytes and macrophages. *J Immunol.* 422:59-71.
64. Malik A, Kanneganti TD (2018) Function and regulation of IL-1 α in inflammatory diseases and cancer. *Immunol Rev.* 281(1):124-37.
65. Weber A, Wasiliew P, Kracht M (2010) Interleukin-1 (IL-1) pathway. *Sci Signal.* 3(105):1-6.
66. Cohen P (2014) The TLR and IL-1 signalling network at a glance. *J Cell Sci.* 127(11):2383-90.
67. Makkouk A, Abdelnoor AM (2009) The potential use of Toll-like receptor (TLR) agonists and antagonists as prophylactic and/or therapeutic agents. *Immunopharmacol Immunotoxicol.* 31(3):331-8.
68. Cai H, Harrison DG (2000) Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. *Circ Res.* 87(10):840-4.

-
69. Morena M, Delbosc S, Dupuy AM, Canaud B et al. (2005) Overproduction of reactive oxygen species in end-stage renal disease patients: a potential component of hemodialysis-associated inflammation. *Hemodial Int.* 9(1):37-46.
 70. Tynan GA, Hearnden CH, Oleszycka E, Lyons CL et al. (2014) Endogenous oils derived from human adipocytes are potent adjuvants that promote IL-1 α -dependent inflammation. *Diabetes.* 63(6):2037-50.
 71. Freigang S, Ampenberger F, Weiss A, Kanneganti TD et al. (2013) Fatty acid-induced mitochondrial uncoupling elicits inflammasome-independent IL-1 α and sterile vascular inflammation in atherosclerosis. *Nat Immunol.* 14(10):1045-53.
 72. Freigang S, Ampenberger F, Spohn G, Heer S et al. (2011) Nrf2 is essential for cholesterol crystal-induced inflammasome activation and exacerbation of atherosclerosis. *Eur J Immunol.* 41(7):2040-51.
 73. Paik S, Kim JK, Silwal P, Sasakawa C et al. (2021) An update on the regulatory mechanisms of NLRP3 inflammasome activation. *Cell Mol Immunol.* 18(5):1141-60.
 74. Liu D, Zeng X, Li X, Mehta JL et al. (2018) Role of NLRP3 inflammasome in the pathogenesis of cardiovascular diseases. *Basic Res Cardiol.* 113(1):5.
 75. Tapia VS, Daniels MJD, Palazón-Riquelme P, Dewhurst M et al. (2019) The three cytokines IL-1 β , IL-18, and IL-1 α share related but distinct secretory routes. *J Biol Chem.* 294(21):8325-35.
 76. Groß O, Yazdi AS, Thomas CJ, Masin M et al. (2012) Inflammasome activators induce interleukin-1 α secretion via distinct pathways with differential requirement for the protease function of caspase-1. *Immunity.* 36(3):388-400.
 77. Di Virgilio F, Dal Ben D, Sarti AC, Giuliani AL et al. (2017) The P2X7 Receptor in Infection and Inflammation. *Immunity.* 47(1):15-31.
 78. Hornung V, Bauernfeind F, Halle A, Samstad EO et al. (2008) Silica crystals and aluminum salts activate the NALP3 inflammasome through phagosomal destabilization. *Nat Immunol.* 9(8):847-56.
 79. Zhong Z, Zhai Y, Liang S, Mori Y et al. (2013) TRPM2 links oxidative stress to NLRP3 inflammasome activation. *Nat Commun.* 4:1611.
 80. Schorn C, Frey B, Lauber K, Janko C et al. (2011) Sodium overload and water influx activate the NALP3 inflammasome. *J Biol Chem.* 286(1):35-41.

-
81. Rajamäki K, Nordström T, Nurmi K, Åkerman K et al. (2013) Extracellular acidosis is a novel danger signal alerting innate immunity via the NLRP3 inflammasome. *J Biol Chem.* 288(19):13410-9.
 82. Toldo S, Mauro AG, Cutter Z, Abbate A (2018) Inflammasome, pyroptosis, and cytokines in myocardial ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 315(6):H1553-H1568.
 83. Bergsbaken T, Fink SL, Cookson BT (2009) Pyroptosis: host cell death and inflammation. *Nat Rev Microbiol.* 7(2):99-109.
 84. Yang Y, Wang H, Kouadir M, Song H et al. (2019) Recent advances in the mechanisms of NLRP3 inflammasome activation and its inhibitors. *Cell Death Dis.* 10(2):128.
 85. Rider P, Carmi Y, Voronov E, Apte RN (2013) Interleukin-1 α . *Semin Immunol.* 25(6):430-8.
 86. Rider P, Kaplanov I, Romzova M, Bernardis L et al. (2012) The transcription of the alarmin cytokine interleukin-1 alpha is controlled by hypoxia inducible factors 1 and 2 alpha in hypoxic cells. *Front Immunol.* 3:290.
 87. Kim B, Lee Y, Kim E, Kwak A, Ryoo S et al. (2013) The Interleukin-1 α Precursor is Biologically Active and is Likely a Key Alarmin in the IL-1 Family of Cytokines. *Front Immunol.* 4:391.
 88. Burzynski LC, Humphry M, Bennett MR, Clarke MC et al. (2015) Interleukin-1 α Activity in Necrotic Endothelial Cells Is Controlled by Caspase-1 Cleavage of Interleukin-1 Receptor-2: Implications for Allograft Rejection. *J Biol Chem.* 290(41):25188-96.
 89. Zheng Y, Humphry M, Maguire JJ, Bennett MR et al. (2013) Intracellular interleukin-1 receptor 2 binding prevents cleavage and activity of interleukin-1 α , controlling necrosis-induced sterile inflammation. *Immunity.* 38(2):285-95.
 90. Cavalli G, Colafrancesco S, Emmi G, Imazio M et al. (2021) Interleukin 1 α : a comprehensive review on the role of IL-1 α in the pathogenesis and treatment of autoimmune and inflammatory diseases. *Autoimmun Rev.* 20(3):102763.
 91. Berda-Haddad Y, Robert S, Salers P, Zekraoui L et al. (2011) Sterile inflammation of endothelial cell-derived apoptotic bodies is mediated by interleukin-1 α . *Proc Natl Acad Sci USA.* 108(51):20684-9.
 92. Xu X, Lai Y, Hua ZC et al. (2019) Apoptosis and apoptotic body: disease message and therapeutic target potentials. *Biosci Rep.* 39(1):BSR20180992.

-
93. Werman A, Werman-Venkert R, White R, Lee JK et al. (2004) The precursor form of IL-1 α is an intracrine proinflammatory activator of transcription. *Proc Natl Acad Sci USA*. 101(8):2434-9.
 94. O'Neill LA (2008) The interleukin-1 receptor/Toll-like receptor superfamily: 10 years of progress. *Immunol Rev*. 226:10-8.
 95. Croker BA, Lawson BR, Rutschmann S, Berger M et al. (2008) Inflammation and autoimmunity caused by a SHP1 mutation depend on IL-1, MyD88, and a microbial trigger. *Proc Natl Acad Sci USA*. 105(39):15028-33.
 96. Lukens JR, Vogel P, Johnson GR, Kelliher MA et al. (2013) RIP1-driven autoinflammation targets IL-1 α independently of inflammasomes and RIP3. *Nature*. 498(7453):224-7.
 97. Dinarello CA, Van der Meer JW (2013) Treating inflammation by blocking interleukin-1 in humans. *Semin Immunol*. 25(6):469-84.
 98. Wolf D, Ley K (2019) Immunity and Inflammation in Atherosclerosis. *Circ Res*. 124(2):315-27.
 99. Alexander MR, Moehle CW, Johnson JL, Yang Z et al. (2012) Genetic inactivation of IL-1 signaling enhances atherosclerotic plaque instability and reduces outward vessel remodeling in advanced atherosclerosis in mice. *J Clin Invest*. 122(1):70-9.
 100. Vromman A, Ruvkun V, Shvartz E, Wojtkiewicz G et al. (2019) Stage-dependent differential effects of interleukin-1 isoforms on experimental atherosclerosis. *Eur Heart J*. 40(30):2482-91.
 101. Lusis AJ (2000) Atherosclerosis. *Nature*. 407(6801):233-41.
 102. Wang X, Khalil RA (2018) Matrix Metalloproteinases, Vascular Remodeling, and Vascular Disease. *Adv Pharmacol*. 81:241-330.
 103. Gardner SE, Humphry M, Bennett MR, Clarke MC (2015) Senescent Vascular Smooth Muscle Cells Drive Inflammation Through an Interleukin-1 α -Dependent Senescence-Associated Secretory Phenotype. *Arterioscler Thromb Vascular Biol*. 35(9):1963-74.
 104. Su Y, Xu C, Sun Z, Liang Y et al. (2019) S100A13 promotes senescence-associated secretory phenotype and cellular senescence via modulation of non-classical secretion of IL-1 α . *Aging*. 11(2):549-72.

105. Laberge RM, Sun Y, Orjalo AV, Patil CK et al. (2015) MTOR regulates the pro-tumorigenic senescence-associated secretory phenotype by promoting IL1A translation. *Nat Cell Biol.* 17(8):1049-61.
106. Burzynski LC, Humphry M, Pyrillou K, Wiggins KA et al. (2019) The Coagulation and Immune Systems Are Directly Linked through the Activation of Interleukin-1 α by Thrombin. *Immunity.* 50(4):1033-42.
107. Pyrillou K, Burzynski LC, Clarke MCH (2020) Alternative Pathways of IL-1 Activation, and Its Role in Health and Disease. *Front Immunol.* 11:613170.
108. Chiu JW, Binte Hanafi Z, Chew LCY, Mei Y et al. (2021) IL-1 α Processing, Signaling and Its Role in Cancer Progression. *Cells.* 10(1):92.
109. Afonina IS, Tynan GA, Logue SE, Cullen SP et al. (2011) Granzyme B-dependent proteolysis acts as a switch to enhance the proinflammatory activity of IL-1 α . *Mol Cell.* 44(2):265-78.
110. Afonina IS, Müller C, Martin SJ, Beyaert R (2015) Proteolytic Processing of Interleukin-1 Family Cytokines: Variations on a Common Theme. *Immunity.* 42(6):991-1004.
111. Korkmaz B, Horwitz MS, Jenne DE, Gauthier F (2010) Neutrophil elastase, proteinase 3, and cathepsin G as therapeutic targets in human diseases. *Pharmacol Rev.* 62(4):726-59.
112. Lin TJ, Garduno R, Boudreau RT, Issekutz AC (2002) *Pseudomonas aeruginosa* activates human mast cells to induce neutrophil transendothelial migration via mast cell-derived IL-1 alpha and beta. *J Immunol.* 169(8):4522-30.
113. Caughey GH (2007) Mast cell tryptases and chymases in inflammation and host defense. *Immunol Rev.* 217:141-54.
114. Wiggins KA, Parry AJ, Cassidy LD, Humphry M et al. (2019) IL-1 α cleavage by inflammatory caspases of the noncanonical inflammasome controls the senescence-associated secretory phenotype. *Aging Cell.* 18(3):e12946.
115. Chan AH, Schroder K (2020) Inflammasome signaling and regulation of interleukin-1 family cytokines. *J Exp Med.* 217(1):e20190314.
116. Conway EM (2019) Thrombin: Coagulation's master regulator of innate immunity. *J Thromb Haemost.* 17(11):1785-89.

-
117. Koenig W (2020) Persistent inflammatory residual risk despite aggressive cholesterol-lowering therapy: further evidence fuelling the dual target concept. *Eur Heart J.* 41(31):2962-64.
 118. Alfaddagh A, Martin SS, Leucker TM, Michos ED et al. (2020) Inflammation and cardiovascular disease: From mechanisms to therapeutics. *Am J Prev Cardiol.* 4:100130.
 119. Ridker PM, Cushman M, Stampfer MJ, Tracy RP et al. (1997) Inflammation, aspirin, and the risk of cardiovascular disease in apparently healthy men. *N Engl J Med.* 336(14):973-9.
 120. Ridker PM, Rifai N, Stampfer MJ, Hennekens CH (2000) Plasma concentration of interleukin-6 and the risk of future myocardial infarction among apparently healthy men. *Circulation.* 101(15):1767-72.
 121. Fanola CL, Morrow DA, Cannon CP, Jarolim P et al. (2017) Interleukin-6 and the Risk of Adverse Outcomes in Patients After an Acute Coronary Syndrome: Observations From the SOLID-TIMI 52 (Stabilization of Plaque Using Darapladib-Thrombolysis in Myocardial Infarction 52) Trial. *J Am Heart Assoc.* 6(10):e005637.
 122. Held C, White HD, Stewart RAH, Budaj A et al. (2017) Inflammatory Biomarkers Interleukin-6 and C-Reactive Protein and Outcomes in Stable Coronary Heart Disease: Experiences From the STABILITY (Stabilization of Atherosclerotic Plaque by Initiation of Darapladib Therapy) Trial. *J Am Heart Assoc.* 6(10):e005077.
 123. Bohula EA, Giugliano RP, Leiter LA, Verma S et al. (2018) Inflammatory and Cholesterol Risk in the FOURIER Trial. *Circulation.* 138(2):131-40.
 124. Ridker PM, MacFadyen JG, Glynn RJ, Bradwin G et al. (2020) Comparison of interleukin-6, C-reactive protein, and low-density lipoprotein cholesterol as biomarkers of residual risk in contemporary practice: secondary analyses from the Cardiovascular Inflammation Reduction Trial. *Eur Heart J.* 41(31):2952-61.
 125. Arnold N, Lechner K, Waldeyer C, Shapiro MD et al. (2021) Inflammation and Cardiovascular Disease: The Future. *Eur Cardiol.* 16:e20.
 126. Zhang Y, Wen W, Liu H (2020) The Role of Immune Cells in Cardiac Remodeling After Myocardial Infarction. *J Cardiovasc Pharmacol.* 76(4):407-13.
 127. Ma Y (2021) Role of Neutrophils in Cardiac Injury and Repair Following Myocardial Infarction. *Cells.* 10(7):1676.

-
128. Frodermann V, Nahrendorf M (2017) Neutrophil-macrophage cross-talk in acute myocardial infarction. *Eur Heart J.* 38(3):198-200.
 129. Ma Y, Yabluchanskiy A, Iyer RP, Cannon PL et al. (2016) Temporal neutrophil polarization following myocardial infarction. *Cardiovasc Res.* 110(1):51-61.
 130. Daseke MJ 2nd, Chalise U, Becirovic-Agic M, Salomon JD et al. (2021) Neutrophil signaling during myocardial infarction wound repair. *Cell Signal.* 77:109816.
 131. Folco EJ, Mawson TL, Vromman A, Bernardes-Souza B et al. (2018) Neutrophil Extracellular Traps Induce Endothelial Cell Activation and Tissue Factor Production Through Interleukin-1 α and Cathepsin G. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 38(8):1901-12.
 132. Döring Y, Libby P, Soehnlein O (2020) Neutrophil Extracellular Traps Participate in Cardiovascular Diseases: Recent Experimental and Clinical Insights. *Circ Res.*126(9):1228-1241.
 133. Helseth R, Shetelig C, Andersen GØ, Langseth MS et al. (2019) Neutrophil Extracellular Trap Components Associate with Infarct Size, Ventricular Function, and Clinical Outcome in STEMI. *Mediators Inflamm.* 2019:7816491.
 134. Panizzi P, Swirski FK, Figueiredo JL, Waterman P et al. (2010) Impaired infarct healing in atherosclerotic mice with Ly-6C(hi) monocytosis. *J Am Coll Cardiol.* 55(15):1629-38.
 135. Nahrendorf M, Swirski FK, Aikawa E, Stangenberg L et al. (2007) The healing myocardium sequentially mobilizes two monocyte subsets with divergent and complementary functions. *J Exp Med.* 204(12):3037-47.
 136. Ma Y, Mouton AJ, Lindsey ML (2018) Cardiac macrophage biology in the steady-state heart, the aging heart, and following myocardial infarction. *Transl Res.*191:15-28.
 137. Dick SA, Macklin JA, Nejat S, Momen A et al. (2019) Self-renewing resident cardiac macrophages limit adverse remodeling following myocardial infarction. *Nat Immunol.* 20(1):29-39.
 138. Lafuse WP, Wozniak DJ, Rajaram MVS (2020) Role of Cardiac Macrophages on Cardiac Inflammation, Fibrosis and Tissue Repair. *Cells.* 10(1):51
 139. DeBerge M, Yeap XY, Dehn S, Zhang S et al. (2017) MerTK Cleavage on Resident Cardiac Macrophages Compromises Repair after Myocardial Ischemia Reperfusion Injury. *Circ Res.* 121(8):930-40.

140. Horckmans M, Ring L, Duchene J, Santovito D et al. (2017) Neutrophils orchestrate post-myocardial infarction healing by polarizing macrophages towards a reparative phenotype. *Eur Heart J.* 38(3):187-97.
141. Price DT, Loscalzo J (1999) Cellular adhesion molecules and atherogenesis. *Am J Med.* 107(1):85-97.
142. Chávez-Sánchez L, Espinosa-Luna JE, Chávez-Rueda K, Legorreta-Haquet MV et al. (2014) Innate immune system cells in atherosclerosis. *Arch Med Res.* 45(1):1-14.
143. Kong DH, Kim YK, Kim MR, Jang JH et al. (2018) Emerging Roles of Vascular Cell Adhesion Molecule-1 (VCAM-1) in Immunological Disorders and Cancer. *Int J Mol Sci.* 19(4):1057.
144. Cerutti C, Ridley AJ (2017) Endothelial cell-cell adhesion and signaling. *Exp Cell Res.* 358(1):31-38.
145. Fries JW, Williams AJ, Atkins RC, Newman W et al. (1993) Expression of VCAM-1 and E-selectin in an in vivo model of endothelial activation. *Am J Pathol.* 143(3):725-37.
146. Cook-Mills JM, Marchese ME, Abdala-Valencia H (2011) Vascular cell adhesion molecule-1 expression and signaling during disease: regulation by reactive oxygen species and antioxidants. *Antioxid Redox Signal.* 15(6):1607-38.
147. Thygesen K, Alpert JS, Jaffe AS, Chaitman BR et al. (2018) Fourth Universal Definition of Myocardial Infarction (2018). *Circulation.* 138(20):e618-e651.
148. Akbar N, Braithwaite AT, Corr EM, Koelwyn GJ et al. (2022) Rapid neutrophil mobilization by VCAM-1+ endothelial extracellular vesicles. *Cardiovasc Res.* 4:cvac012.
149. Akbar N, Digby JE, Cahill TJ, Tavare AN et al. (2017) Endothelium-derived extracellular vesicles promote splenic monocyte mobilization in myocardial infarction. *JCI Insight.* 2(17):e93344.
150. Han D, Kang SH, Yoon CH, Youn TJ et al. (2022) Attenuation of ischemia-reperfusion injury by intracoronary chelating agent administration. *Sci Rep.* 12(1):2050.
151. Bulluck H, Yellon DM, Hausenloy DJ (2016) Reducing myocardial infarct size: challenges and future opportunities. *Heart.* 102(5):341-8.
152. Hausenloy DJ, Yellon DM (2013) Myocardial ischemia-reperfusion injury: a neglected therapeutic target. *J Clin Invest.* 123(1):92-100.

-
153. Hansson GK (2017) Inflammation and Atherosclerosis: The End of a Controversy. *Circulation*. 136(20):1875-77.
 154. Libby P (2021) Inflammation in Atherosclerosis-No Longer a Theory. *Clin Chem*. 67(1):131-42.
 155. Ridker PM (2017) How Common Is Residual Inflammatory Risk? *Circ Res*. 120(4):617-19.
 156. Engelen SE, Robinson AJB, Zurke YX, Monaco C (2022) Therapeutic strategies targeting inflammation and immunity in atherosclerosis: how to proceed?. *Nat Rev Cardiol*. 31:1–21.
 157. Hickish T, Andre T, Wyrwicz L, Saunders M et al. (2017) MABp1 as a novel antibody treatment for advanced colorectal cancer: a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 study. *Lancet Oncol*. 18(2):192-201.
 158. Hong DS, Hui D, Bruera E, Janku F et al. (2014) MABp1, a first-in-class true human antibody targeting interleukin-1 α in refractory cancers: an open-label, phase 1 dose-escalation and expansion study. *Lancet Oncol*. 15(6):656-66.
 159. Klein AL, Imazio M, Cremer P, Brucato A et al. (2021) Phase 3 Trial of Interleukin-1 Trap Rilonacept in Recurrent Pericarditis. *N Engl J Med*. 384(1):31-41.
 160. Fava AM, Reyaldean R, Lo Presti S, Goyal A et al. (2022) Rilonacept for the treatment of recurrent pericarditis. *Expert Opin Biol Ther*. 22(1):7-16.
 161. Van Tassell BW, Lipinski MJ, Appleton D, Roberts CS et al. (2018) Rationale and design of the Virginia Commonwealth University-Anakinra Remodeling Trial-3 (VCU-ART3): A randomized, placebo-controlled, double-blinded, multicenter study. *Clin Cardiol*. 41(8):1004-8.
 162. Abbate A, Trankle CR, Buckley LF, Lipinski MJ et al. (2020) Interleukin-1 Blockade Inhibits the Acute Inflammatory Response in Patients With ST-Segment-Elevation Myocardial Infarction. *J Am Heart Assoc*. 9(5):e014941.
 163. Del Buono MG, Damonte JI, Trankle CR, Kadariya D et al. (2022) Effect of interleukin-1 blockade with anakinra on leukocyte count in patients with ST-segment elevation acute myocardial infarction. *Sci Rep*. 12(1):1254.
 164. Verma S, Leiter LA, Bhatt DL (2017) CANTOS Ushers in a New Calculus of Inflammasome Targeting for Vascular Protection-and Maybe More. *Cell Metab*. 26(5):703-5.

-
165. Ridker PM, Everett BM, Thuren T, MacFadyen JG et al. (2017) Antiinflammatory Therapy with Canakinumab for Atherosclerotic Disease. *N Engl J Med.* 377(12):1119-31.
 166. Ridker PM, MacFadyen JG, Everett BM, Libby P et al. (2018) Relationship of C-reactive protein reduction to cardiovascular event reduction following treatment with canakinumab: a secondary analysis from the CANTOS randomised controlled trial. *Lancet.* 391(10118):319-28.
 167. Ridker PM, Libby P, MacFadyen JG, Thuren T et al. (2018) Modulation of the interleukin-6 signalling pathway and incidence rates of atherosclerotic events and all-cause mortality: analyses from the Canakinumab Anti-Inflammatory Thrombosis Outcomes Study (CANTOS). *Eur Heart J.* 39(38):3499-3507.
 168. Ridker PM, MacFadyen JG, Thuren T, Everett BM et al. (2017) Effect of interleukin-1 β inhibition with canakinumab on incident lung cancer in patients with atherosclerosis: exploratory results from a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet.* 390(10105):1833-42.
 169. Ridker PM, Rane M (2021) Interleukin-6 Signaling and Anti-Interleukin-6 Therapeutics in Cardiovascular Disease. *Circ Res.* 128(11):1728-46.
 170. Ridker PM, Devalaraja M, Baeres FMM, Engelmann MDM et al. (2021) IL-6 inhibition with ziltivekimab in patients at high atherosclerotic risk (RESCUE): a double-blind, randomised, placebo-controlled, phase 2 trial. *Lancet.* 397(10289):2060-69.
 171. Ridker PM (2021) From RESCUE to ZEUS: will interleukin-6 inhibition with ziltivekimab prove effective for cardiovascular event reduction? *Cardiovasc Res.* 117(11):e138-e140.
 172. Bouabdallaoui N, Tardif JC (2021) Colchicine in the Management of Acute and Chronic Coronary Artery Disease. *Curr Cardiol Rep.* 23(9):120.
 173. Tardif JC, Kouz S, Waters DD, Bertrand OF et al. (2019) Efficacy and Safety of Low-Dose Colchicine after Myocardial Infarction. *N Engl J Med.* 381(26):2497-505.
 174. Bouabdallaoui N, Tardif JC, Waters DD, Pinto FJ et al. (2020) Time-to-treatment initiation of colchicine and cardiovascular outcomes after myocardial infarction in the Colchicine Cardiovascular Outcomes Trial (COLCOT). *Eur Heart J.* 41(42):4092-99.
 175. Russell MD, Bukhari M, Shah AM, Galloway JB (2021) Colchicine and the heart: old friends, old foes. *Rheumatology (Oxford).* 60(5):2035-36.

176. Nidorf SM, Fiolet ATL, Mosterd A, Eikelboom JW et al. (2020) Colchicine in Patients with Chronic Coronary Disease. *N Engl J Med.* 383(19):1838-47.
177. Ridker PM, Everett BM, Pradhan A, MacFadyen JG et al. (2019) Low-Dose Methotrexate for the Prevention of Atherosclerotic Events. *N Engl J Med.* 380(8):752-62.

7 Publikationen

Schunk SJ, Triem S, Schmit D, Zewinger S, Sarakpi T, Becker E, Hütter G, Wrublewsky S, **Küting F**, Hohl M, Alansary D, Prates Roma L, Lipp P, Möllmann J, Lehrke M, Laschke MW, Menger MD, Kramann R, Boor P, Jahn-Dechent W, März W, Böhm M, Laufs U, Niemeyer BA, Fliser D, Ampofo E, Speer T (2021) Interleukin-1 α Is a Central Regulator of Leukocyte-Endothelial Adhesion in Myocardial Infarction and in Chronic Kidney Disease. *Circulation*. 144(11):893-908.

8 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich einigen wichtigen Personen danken, ohne deren Unterstützung diese Dissertation nicht möglich gewesen wäre.

Zunächst gilt ein besonderer Dank meinem Doktorvater Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Dr. sc. nat. Thimoteus Speer für die Vergabe des Themas und die Möglichkeit in seiner Arbeitsgruppe mitzuwirken. Er hat mich stets mit seiner Expertise und wertvollen Ratschlägen unterstützt.

Weiterhin danke ich meinem Betreuer Herrn Dr. Stefan J. Schunk für die kompetente Betreuung meiner Dissertation.

Ein großer Dank gilt außerdem der Biologin M. Sc. Sarah Triem und den MTAs Caroline Ab-bosh, Ellen Becker, Andreas Hauck und Claudia Noll für die ausführliche Einarbeitung und stets geduldige Hilfe. Zudem möchte ich mich herzlich bei Andrea Lothschütz für Ihre Unterstützung in organisatorischen und bürokratischen Angelegenheiten bedanken.

Nicht zuletzt gilt ein besonderer Dank meiner Familie, vor allem meinen Eltern Dietmar und Annette Küting sowie meinem Bruder Daniel Küting, die mich auf meinem Weg durch das Studium begleitet und die Fortschritte dieser Arbeit mit großem Enthusiasmus verfolgt haben. Ich danke außerdem meinem Partner Sebastian Meiser für die liebevolle Unterstützung. Er hat mich immer wieder ermutigt, geduldig zugehört und war stets an meiner Seite.

9 Lebenslauf

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

Tag der Promotion: 16. November 2022

Dekan: Herr Prof. Dr. med. Michael D. Menger

Berichterstatter: Herr Prof. Dr. med. Dr. sc. nat. Thimoteus Speer
Herr Prof. Dr. med. Matthias W. Laschke