

Aus der Klinik für Innere Medizin IV – Nieren- und Hochdruckkrankheiten,
Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg/Saar

Direktor: Prof. Dr. Danilo Fliser

**Assoziation zwischen einer genetisch-
determinierten NLRP3-Inflammasom-
vermittelten systemischen Inflammation und
kardiovaskulärer Mortalität**

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Humanmedizin

der Medizinischen Fakultät

der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2024

vorgelegt von:

Isabella Theresa Jaumann

geb. am: 21.10.1992 in Ludwigsburg

Tag der Promotion: 04.07.2024

Dekan: Prof. Dr. Michael D. Menger

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Dr. Thimoteus Speer

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Matthias W. Laschke

Meinen Eltern gewidmet

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS	I
1. ZUSAMMENFASSUNG	1
1.1. DEUTSCHE ZUSAMMENFASSUNG	1
1.2. ABSTRACT	2
2. EINLEITUNG	4
2.1. KARDIOVASKULÄRE ERKRANKUNGEN	4
2.1.1. <i>Epidemiologie</i>	4
2.1.2. <i>Risikofaktoren</i>	4
2.2. PATHOGENESE DER ATHEROSKLEROSE	6
2.2.1. <i>Endotheliale Dysfunktion</i>	6
2.2.2. <i>Inflammation</i>	7
2.3. ROLLE DES ANGEBORENEN IMMUNSYSTEMS BEI DER ENTSTEHUNG DER ATHEROSKLEROSE	9
2.3.1. <i>Angeborenes vs. adaptives Immunsystem</i>	9
2.3.2. <i>Zellen des angeborenen Immunsystems und ihre Rolle bei der Atheroskleroseentstehung</i>	10
2.3.3. <i>Rezeptoren des angeborenen Immunsystems</i>	12
2.3.4. <i>NLRP3-Inflammasom</i>	14
2.4. ZIEL DER ARBEIT	17
3. MATERIAL UND METHODEN	18
3.1. LURIC-STUDIE	18
3.2. GENOTYPISIERUNG IN DER LURIC-STUDIE	18
3.3. AUSWAHL RELEVANTER SNPs	18
3.4. GERMIFS STUDIEN	25
3.5. METAANALYSE ZUR EQTL-VORHERSAGE	27
3.6. SELEKTION VON SNPs MIT ASSOZIATION ZU ERHÖHTEN TRIGLYCERID- UND HARNSÄUREWERTEN	27
3.7. EXPERIMENTELLE VALIDIERUNG DES SNPs	27
3.7.1. <i>Monozytenisolation, -anreicherung und -stimulation</i>	28
3.7.2. <i>Quantitative Realtime-PCR</i>	29

3.7.3.	<i>ELISA</i>	30
3.7.4.	<i>ASC-Speck-Quantifizierung</i>	30
3.7.5.	<i>Perivaskuläres Karotis-Verletzungsmodell an humanisierten Mäusen</i>	31
3.8.	GENOMWEITE METHYLIERUNGSANALYSE.....	31
3.9.	STUDIEN ZUR VALIDIERUNG DER GENETISCHEN ASSOZIATION.....	32
3.10.	STATISTISCHE ANALYSEN	41
4.	ERGEBNISSE	43
4.1.	VARIANTEN IM <i>NLRP3</i> -GEN	43
4.2.	BIOLOGISCHE RELEVANZ VON RS10754555	50
4.2.1.	<i>Biologische Relevanz von rs10754555 in vitro</i>	50
4.2.2.	<i>Biologische Relevanz von rs10754555 in vivo</i>	56
4.3.	ASSOZIATION ZWISCHEN RS10754555 UND DEM RISIKO FÜR KHK.....	58
4.3.1.	<i>Charakteristika der LURIC-Patienten</i>	58
4.3.2.	<i>Assoziation zwischen rs10754555 und dem Risiko für eine (schwere) KHK bei LURIC-Patienten</i>	61
4.3.3.	<i>Validierung der Ergebnisse an GerMIFS-Studiendaten</i>	64
4.4.	ASSOZIATION ZWISCHEN DEM RS10754555 GENOTYP UND KARDIOVASKULÄRER MORTALITÄT.....	65
4.4.1.	<i>Assoziation zwischen dem rs10754555 Genotyp und kardiovaskulärer Mortalität bei LURIC-Patienten</i>	65
4.4.2.	<i>Einfluss verschiedener kardiovaskulärer Risikofaktoren auf die kardiovaskuläre Mortalität</i>	68
4.4.3.	<i>Assoziation zwischen dem rs10754555 Genotyp und kardiovaskulärer Mortalität in zehn prospektiven Studien</i>	69
4.5.	BEKANNTE NLRP3-INFLAMMASOM-AKTIVATOREN UND DIE ASSOZIATION ZWISCHEN RS10754555 UND MORTALITÄT	71
4.5.1.	<i>Assoziation zwischen dem rs10754555 Genotyp und kardiovaskulärer Mortalität abhängig vom ApoC3- und Triglyceridplasma Spiegel</i>	71
4.5.2.	<i>Cox-Regressionsanalyse für kardiovaskuläre Mortalität abhängig von Genotyp und ApoC3- und Triglyceridplasma Spiegel bei LURIC-Patienten</i>	72
4.5.3.	<i>Cox-Regressionsanalyse für kardiovaskuläre Mortalität bei UKBioBank-Teilnehmern abhängig von Genotyp, Triglyceridplasma Spiegel und Alter</i>	74

4.5.4. Cox-Regressionsanalyse für kardiovaskuläre Mortalität abhängig von Genotyp und mit oder ohne genetisch-determiniert erhöhte Plasmatriglyceridspiegel bei UKBioBank-Teilnehmern	77
4.5.5. Assoziation zwischen Plasmatriglyceridspiegeln und kardiovaskulärer Mortalität bei UKBioBank-Teilnehmern abhängig von Alter und Genotyp.....	79
4.5.6. Assoziation zwischen Plasmaharnsäurespiegel, Genotyp und kardiovaskulärer Mortalität bei LURIC- und UKBioBank-Patienten.....	81
4.5.7. Cox-Regressionsanalyse für kardiovaskuläre Mortalität abhängig vom Genotyp, Harnsäureplasmaspiegel und Alter in LURIC- und UKBioBank-Patienten.....	81
4.5.8. Cox-Regressionsanalyse für kardiovaskuläre Mortalität abhängig von Genotyp und genetisch-determiniert erhöhter Harnsäureplasmaspiegel bei UKBioBank-Teilnehmern.....	85
4.5.9. Assoziation zwischen Plasmaharnsäurespiegel und kardiovaskulärer Mortalität abhängig von Genotyp und Alter bei UKBioBank-Teilnehmern.....	86
5. DISKUSSION	88
5.1. NLRP3-INFLAMMASOM UND ATHEROSKLEROSE	88
5.2. ENTSTEHUNG VON INFLAMMATION BEI KARDIOVASKULÄREN UND RENALEN ERKRANKUNGEN	90
5.2.1. NLRP3-Aktivierung durch Triglycerid-reiche Lipoproteine (ApoC3).....	90
5.2.2. NLRP3-Aktivierung durch Harnsäure	91
5.2.3. Dysregulierte Hämatopoese	91
5.2.4. Reprogrammierung des angeborenen Immunsystems.....	92
5.2.5. Klonale Hämatopoese	93
5.3. THERAPEUTISCHE KONSEQUENZEN	94
5.3.1. Inhibition von IL-1 β	95
5.3.2. Inhibition von IL-6	96
5.3.3. Colchicin	97
5.3.4. Methotrexat	98
5.3.5. Etablierte Therapien mit anti-inflammatorischen Effekten.....	99
5.4. AUSBLICK	100
5.4.1. Konsequenzen der vorliegenden Arbeit.....	100
5.4.2. Neue anti-inflammatorische Therapieansätze.....	101
5.5. LIMITATIONEN DER ARBEIT.....	102
5.6. ZUSAMMENFASSUNG.....	102

6. LITERATURVERZEICHNIS	103
7. ABBILDUNGS-/TABELLENVERZEICHNIS	125
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	125
TABELLENVERZEICHNIS	127
8. PUBLIKATION / DANKSAGUNG	131
PUBLIKATION	131
DANKSAGUNG	131
9. LEBENSLAUF	133
10. ANHANG	135

Vorbemerkung

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

Abkürzungsverzeichnis

Abb	Abbildung
AMPK	Adenosin-Monophosphat-aktivierte Proteinkinase
Apo	Apolipoprotein
ASC	Apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD
ATP	Adenosintriphosphat
bcl2	B-cell lymphoma-2
BMI	Body Mass Index
CAD	Coronary artery disease
CAM	Cell adhesion molecule
CARD	Caspase activation and recruitment domain
CAS	Calcium antagonist strategy
CCL	CC-Chemokin-Ligand
CCR	CC-Chemokin-Rezeptor
CD	Cluster of differentiation
CETP	Cholesterylester-Transferprotein
CFU	Colony-forming unit
CHIP	Clonal haematopoiesis of indeterminate potential
CKD	Chronic kidney disease, chronische Nierenerkrankung
CLR	C-type lectin Rezeptor
COX	Cyclooxygenase
(hs)CRP	(Hochsensitives) C-reaktives Protein
CVD	Cardiovascular disease
CXCL	C-X-C motif ligand
DAMP	Damage-associated molecular pattern

DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
eGFR	Estimated (geschätzte) glomeruläre Filtrationsrate
eQTL	Expression quantitative trait locus
FADD	Fas-associated protein with death domain
FDR	False discovery rate
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
GLP	Glucagon-like peptide
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen-koloniestimulierender Faktor
GSDMD	Gasdermin-D
GTEX	Genotype-Tissue Expression
HDL	High density Lipoprotein
HIF	Hypoxie-induzierter Faktor
HIV	Humanes Immundefizienz Virus
HMGB	High mobility group box
HSPC	Hämatopoetische Stamm- und Progenitorzelle
ICAM	Intercellular adhesion molecule
IG	Immunglobulin
IL	Interleukin
INF	Interferon
IRAK	Interleukin-1-Rezeptor-assoziierte Kinase
IRF	Interferon-regulating factor
JAK	Janus-Kinase
KHK	Koronare Herzerkrankung
LDL	Low density Lipoprotein

LFA	Lymphocyte function-associated antigen
LOX	Lectin-like oxLDL receptor
Lp(a)	Lipoprotein(a)
Lp-PLA	Lipoprotein-assozierte Phospholipase
LPS	Lipopolysaccharid
LRP	LDL receptor-related protein
LRR	Leucin-rich repeats
MAC	Macrophage adhesion ligand
MACE	Major adverse event
MAF	Minor allele frequency
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
M-CSF	Makrophagen-koloniestimulierender Faktor
MHC	Major histocompatibility complex
MMP	Matrixmetalloproteinase
mt	mitochondrial
mTOR	Mammalian target of rapamycin
MyD	Myeloid differentiation primary response gene
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NCAS	Non-calcium antagonist strategy
NET	Neutrophil extracellular traps
NFκB	Nuclear factor kappa B
NK	Natürliche Killer (-zellen)
NLR	NOD-like receptor
NLRP	Nucleotide-binding oligomerization domain, leucin rich repeat and pyrin domain containing
NO	Stickstoffmonoxid

NOD	Nucleotide-binding oligomerization domain
NSTEMI	Nicht-ST-Hebungsinfarkt
NTproBNP	N-terminal pro B-type natriuretic peptide
oxLDL	Oxidiertes low density Lipoprotein
PAI	Plasminogen-Aktivator-Inhibitor
PAMP	Pathogen-associated molecular pattern
pAVK	Periphere arterielle Verschlusskrankheit
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
PBMC	Peripheral blood mononuclear cell
PBS	Phosphate-buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction
PRR	Pattern recognition receptor
PYD	Pyrin domain
RIPK	Receptor-interacting serine/threonine-protein kinase
RLR	RIG-I-like Rezeptor
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
SAA	Serumamyloid-A
SCID	Severe combined immunodeficiency
SCIMP	SLP65/SLP76, Csk interacting membrane protein
SEM	Standard error of the mean
SGLT	Sodium dependent glucose co-transporter
SMA	Smooth muscle aktin
SMC	Smooth muscle cell
STAT	Signal Transducers and Activators of Transcription
STEMI	ST-Strecken-Hebungsinfarkt

SNP	Single nucleotide polymorphism
TAK	transforming growth factor beta-aktivierte Kinase
TF	Transkriptionsfaktor
TGF	Transforming growth factor
TH	T-Helferzelle
THP	Tohoku Hospital Pediatrics
TIR	Toll/Interleukin-1-Rezeptor
TLR	Toll-like Rezeptor
TNF	Tumornekrosefaktor
TRAF	Tumornekrosefaktorrezeptorassoziierter Faktor
TRIF	TIR-domain-containing adapter-including IFN- β
TRPM2	Transient receptor potential channel M2
VCAM	vascular adhesion molecule
VLA	Very late antigen

1. Zusammenfassung

1.1. Deutsche Zusammenfassung

Ziel der Arbeit

Inflammation spielt eine wichtige Rolle bei der Entstehung von kardiovaskulären Erkrankungen. Das NOD-like receptor protein-3 (NLRP3) Inflammasom trägt entscheidend zur Entwicklung der Atherosklerose in Tiermodellen bei. Effektormoleküle des NLRP3 Inflammasoms wie Interleukin-1 β (IL-1 β) können gezielt therapeutisch adressiert werden. Die Zusammenhänge zwischen einer genetisch-determinierten Inflammasom-vermittelten systemischen Inflammation und kardiovaskulären Erkrankungen und Tod sind beim Menschen bisher unbekannt.

Methodik

Wir untersuchten die Assoziation zwischen Varianten im *Nlrp3*-Genlocus mit bestehenden kardiovaskulären Erkrankungen und Mortalität bei 538,167 Probanden aus 9 Studien. Die funktionelle Relevanz auf die NLRP3 Inflammasomaktivierung wurde in humanen peripheren mononukleären Zellen (PBMCs) untersucht.

Ergebnisse

Genetische Analysen identifizierten die hochprävalente (MAF 39,9 %) intronische *Nlrp3*-Variante rs10754555 als Regulator der *Nlrp3*-mRNA Expression. Träger der rs10754555 Variante zeigten signifikant höhere Plasmaspiegel des C-reaktiven Proteins (CRP) und des Serum-Amyloid A (SAA). Träger des G-Allels präsentierten eine erhöhte NLRP3-Inflammasomaktivierung in isolierten PBMCs. Bei Trägern der rs10754555 Variante war die Prävalenz der koronaren Herzerkrankung (KHK) im Vergleich zu Nichtträgern signifikant erhöht mit einer signifikanten Interaktion zwischen rs10754555 und dem Alter. Zusätzlich wiesen rs10754555 Träger ein signifikant erhöhtes kardiovaskuläres Mortalitätsrisiko während der Beobachtungszeit auf. Bekannte Aktivatoren des NLRP3 Inflammasoms (z.B. Harnsäure, Triglyceride, ApoC3) modulierten die Assoziation zwischen rs10754555 und der Mortalität.

Schlussfolgerung

Die intronische *Nlrp3*-Variante rs10754555 ist mit einer erhöhten systemischen Inflammation, Inflammasomaktivierung, prävalenter KHK und Mortalität assoziiert. Diese Studie liefert den Nachweis einer substantiellen Rolle einer genetisch mediierten systemischen Inflammation bei

kardiovaskulären Erkrankungen und hebt die Rolle des NLRP3 Inflammasoms als therapeutischen Angriffspunkt hervor.

1.2. Abstract

Aims

Inflammatory pathways play a substantial role in the development of cardiovascular diseases (CVD). One contributor, the NOD-like receptor protein-3 (NLRP3) inflammasome is known to be a key player in the development of atherosclerosis in animal models. Effector cytokines of the NLRP3 inflammasome pathway such as interleukin-1 β (IL-1 β) can be used for targeted therapy. However, the association between a genetically determined inflammasome-mediated systemic inflammation and the development of CVD and mortality due to CVDs in humans is yet unknown.

Methods

We investigated the association between variants in the *Nlrp3* gene locus with prevalent CVD and cardiovascular mortality in 538,167 subjects from 9 studies on individual participant level. The functional relevance on the activation of the NLRP3 inflammasome was explored in monocyte-enriched peripheral blood mononuclear cells (PBMCs).

Results

In genetic analyses, we identified the highly prevalent (MAF 39,9 %) intronic *Nlrp3* variant rs10754555 regulate *Nlrp3* mRNA expression. Carriers of the rs10754555 variant exhibited higher plasma concentrations of C-reactive protein and serum amyloid A. In isolated human PBMCs of the SNP carriers we detected a significantly increased NLRP3 inflammasome activation. In contrast to non-carriers, carriers of the SNP rs10754555 had a significantly higher prevalence of coronary artery disease (CAD) and during the follow up period a significantly greater risk for cardiovascular mortality. Furthermore, we detected a significant interaction between the carrier status and age. Known inflammasome activators like urate, triglycerides, and ApoC3 modulated the association between rs10754555 and cardiovascular mortality.

Conclusion

The presence of the intronic variant rs10754555 within the *Nlrp3* gene shows an association with an increased systemic inflammation, activation of the NLRP3 inflammasome, as well as

prevalent CAD and cardiovascular mortality. Our study demonstrates the crucial role of genetically-determined increased systemic inflammation in the development of cardiovascular diseases and highlights the NLRP3 inflammasome as a potential therapeutic target.

2. Einleitung

2.1. Kardiovaskuläre Erkrankungen

2.1.1. Epidemiologie

Kardiovaskuläre Erkrankungen („cardiovascular disease“ (CVD)) auf dem Boden einer Atherosklerose sind weltweit für die meisten Todesfälle verantwortlich. Die koronare Herzerkrankung (KHK), die zerebrovaskuläre Erkrankung sowie die peripher arterielle Verschlusskrankheit (pAVK) stellen hierunter die verbreitetsten Manifestationen dar [44]. Im Jahre 2016 starben weltweit geschätzt 17,6 Millionen Menschen an den Folgen kardiovaskulärer Erkrankungen. Dies verdeutlicht die erhebliche individuelle und sozioökonomische Belastung dieser Erkrankungen [9]. In Zukunft ist mit einer weiteren Zunahme der Prävalenz kardiovaskulärer Erkrankungen zu rechnen, was zum einen in der älter werdenden Bevölkerung begründet ist als auch an der Zunahme von Menschen mit kardiovaskulären Risikofaktoren [21]. Allerdings kann durch Modifikation der Risikofaktoren das Lebenszeitrisiko für kardiovaskuläre Erkrankungen günstig beeinflusst werden [11].

2.1.2. Risikofaktoren

Die fünf modifizierbaren Risikofaktoren Dyslipidämie, Diabetes mellitus, arterielle Hypertonie, Übergewicht und Rauchen sind für mehr als die Hälfte aller kardiovaskulären Todesfälle verantwortlich. Durch Modifikation dieser Risikofaktoren sind ein großer Anteil der frühzeitigen Myokardinfarkte vermeidbar [99,152]. Die INTERHEART-Studie untersuchte in 52 Ländern weltweit, inwiefern das Auftreten von bestimmten Risikofaktoren mit einem erhöhten Myokardinfarkttrisiko assoziiert ist. Hierbei zeigte sich, dass Nikotinkonsum und eine Dyslipidämie, definiert als erhöhter ApoB/ApoA1-Quotient, mit dem höchsten Risiko einhergehen, gefolgt von Diabetes mellitus, arterieller Hypertonie, psychosozialen Belastungsfaktoren und erhöhtem Bauchumfang [152].

In einer großen Studie mit 1,25 Millionen Patienten konnte gezeigt werden, dass eine arterielle Hypertonie, d.h. ein Blutdruck $\geq 140/90$ mmHg, im Alter von 30 Jahren oder älter mit einem 63,3 %-igen Lebenszeitrisiko einhergeht, eine kardiovaskuläre Erkrankung zu entwickeln. Patienten mit normalem Blutdruck hatten demgegenüber ein Risiko von 46,1 %. Des Weiteren erkrankten Hypertoniker im Schnitt fünf Jahre früher an einer kardiovaskulären Erkrankung [101].

Dyslipidämien, die mit einem erhöhten kardiovaskulären Risiko einhergehen, sind im Wesentlichen ein erhöhtes LDL-Cholesterin sowie eine Hypertriglyceridämie [10,95]. In den letzten Jahren wurde daneben auch die Rolle eines erhöhten Lipoprotein(a)-Spiegels als genetisch determinierter Risikofaktor zunehmend bedeutsam [10,77]. Aktuelle Forschungsprojekte untersuchen zudem den Effekt eines erhöhten Apolipoprotein C3, sowie verschiedene Genotypen von ApoE auf kardiovaskuläre Erkrankungen und Mortalität [87].

Für Nikotinkonsum konnte ein direkter dosisabhängiger Zusammenhang zwischen den pro Tag gerauchten Zigaretten und dem Auftreten von Myokardinfarkt bzw. Schlaganfall hergestellt werden. Allerdings konnte auch gezeigt werden, dass die Abstinenz mit einer Risikoreduktion einhergeht [41,69,139].

Insulinresistenz, Hyperinsulinämie und erhöhte Blutglucosespiegel sind mit einem erhöhten kardiovaskulären Risiko assoziiert. Meta-Analysen zeigten, dass ein manifester Diabetes mellitus mit einem doppelt so hohen Risiko für vaskuläre Erkrankungen assoziiert ist im Vergleich zu Nicht-Diabetikern [114]. Ursächlich hierfür sind Störungen in der Mikrozirkulation mit der Folge mikroangiopathischer Veränderungen. Erschwerend kommt hinzu, dass Patienten mit Diabetes mellitus häufig noch weitere Risikofaktoren wie arterielle Hypertonie, Fettleibigkeit und Hypertriglyceridämie aufweisen [130,140,152].

Die chronische Nierenerkrankung (CKD) ist ebenfalls mit einem erhöhten kardiovaskulären Risiko assoziiert. Das Risiko, ein kardiovaskuläres Ereignis zu erleiden steigt mit dem Grad der Nierenfunktionseinschränkung. Das höchste Risiko haben Hämodialysepatienten [45]. CKD initiiert außerdem proinflammatorische Aktivität und Dyslipidämie, was das Risiko weiter erhöht. Insgesamt sterben mehr als 40 % der Hämodialysepatienten an kardiovaskulären Ereignissen [51].

Ein unabhängiger Risikofaktor ist die Familienanamnese. Diese wird als positiv gewertet, wenn ein erstgradiger Verwandter vor dem 55. (männlich) bzw. vor dem 65. (weiblich) Lebensjahr eine atherosklerotische kardiovaskuläre Erkrankung entwickelt oder an den Folgen einer solchen verstirbt [84]. Allerdings scheint der Einfluss einer positiven Familienanamnese am gesamten Risikoprofil eines Individuums eher gering [123].

2.2. Pathogenese der Atherosklerose

2.2.1. Endotheliale Dysfunktion

Erste Beschreibungen der Pathogenese der Atherosklerose gehen auf die Schriften von Rudolf Virchow zurück, der die Akkumulation von zirkulierenden Lipiden und anderen Plasmabestandteilen für die Endothelveränderungen verantwortlich machte [43]. Im Verlauf wurden die molekularen Mechanismen genauer untersucht und hohe Konzentrationen von LDL als Ursache ausfindig gemacht. ApoB als Bestandteil von zirkulierenden LDL-Partikeln bindet über ionische Wechselwirkungen an Proteoglykane der Extrazellulärmatrix des Endothels. Die LDL-Partikel werden in die Intima aufgenommen, wo sie oxidativen Prozessen ausgesetzt sind. Verantwortlich hierfür sind Myeloperoxidasen, Lipoxygenasen und reaktive Sauerstoffspezies (ROS). Die so entstandenen oxidierten LDL-Partikel induzieren eine Antwort des angeborenen Immunsystems. Sie aktivieren Endothelzellen und Makrophagen, die im folgenden Adhäsionsmoleküle wie E-Selektin und VCAM-1 exprimieren und Chemokine wie CCL2, CCL5, CXCL10 und CX3CL1 ausschütten. Dies führt zur Invasion von zirkulierenden Monozyten, dendritischen Zellen und T-Zellen in die Intima [53]. Dort differenzieren Monozyten vermittelt durch Makrophagen-koloniestimulierendem Faktor (M-CSF) und Granulozyten-Makrophagen-koloniestimulierendem Faktor (GM-CSF) zu Makrophagen. Über die Expression von Scavenger-Rezeptoren können sie nun oxidiertes LDL aufnehmen und sich so zu Schaumzellen entwickeln. Diese gehen zugrunde, sobald ihre Aufnahmekapazität erschöpft ist und bilden dann mit apoptotischen und nekrotischen Zellen, Cholesterinkristallen und extrazellulärem Material den Kern einer atherosklerotischen Plaque. Um den Kern dieser Plaque formieren sich weitere Zellen des Immunsystems. Eine zentrale Rolle in der Plaquebildung spielen auch glatte Muskelzellen. Diese produzieren durch Stimulation mit TGF- β vermittelt Kollagen, was der Plaque mechanische Stabilität verleiht. Instabile Plaques, die mit einem hohen Rupturrisiko einhergehen, besitzen nur eine dünne fibrinöse Kappe, einen großen nekrotischen Kern und weisen eine hohe inflammatorische Aktivität auf [44,53]. Die Entstehung einer atherosklerotischen Plaque ist in **Abbildung 1** dargestellt.

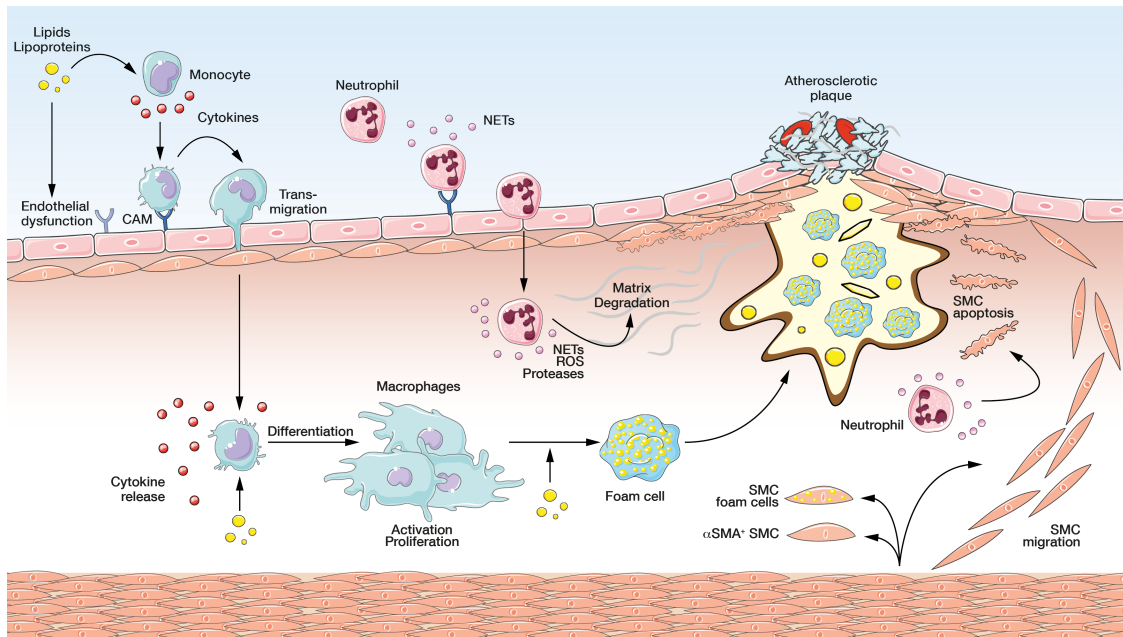


Abb. 1: Entstehung einer atherosklerotischen Plaque, Abbildung entnommen aus Speer *et al.* Nat Rev Nephrol 2022

CD4⁺-T-Zellen, insbesondere TH1-Helferzellen, erkennen (oxidiertes) LDL als Antigen und produzieren Interferon- γ (INF γ) und Tumornekrosefaktor (TNF) und stimulieren Makrophagen zur LDL-Aufnahme. Außerdem führt die Ablagerung von Cholesterinkristallen über eine Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms zur Freisetzung von Interleukin-1 β . Des Weiteren wird Interleukin-6 (IL-6) ausgeschüttet, was zusammen mit anderen Chemokinen in der Leber zur Produktion von Akute-Phase Proteinen wie dem C-reaktiven Protein (CRP) führt. Das NLRP3-Inflammasom stellt somit die Verbindung zwischen Inflammation und Cholesterinmetabolismus in der Pathogenese der Atherosklerose dar [44,52,85].

2.2.2. Inflammation

An den oben beschriebenen Vorgängen sind Komponenten des angeborenen und des erworbenen Immunsystems beteiligt.

In tierexperimentellen Untersuchungen an Apoe^{-/-}-defizienten Mäusen mit SCID („severe combined immunodeficiency“), denen sowohl B- als auch T-Zellen fehlen, konnte im Vergleich zu immunkompetenten Apoe^{-/-}-Mäusen eine reduzierte Atheroskleroseentwicklung beobachtet werden [44,53,102]. Nach adoptivem Transfer von LDL-spezifischen CD4⁺-T-Zellen in die immundefizienten Knockout-Mäuse zeigten sich hingegen ausgeprägte atherosklerotische Veränderungen [156]. Die Beteiligung von TH1-Helferzellen konnte dadurch gezeigt werden, dass Mäuse, die INF γ - oder INF γ -Rezeptor-defizient waren, weniger atherosklerotische Läsionen

aufwiesen. Effekte auf die Ausprägung von atherosklerotischen Veränderungen konnten ebenfalls für Interleukin-12, Interleukin-17 und Interleukin-18 nachgewiesen werden [33,53].

In diversen klinischen Studien wurde der Effekt einer Senkung des CRP auf die kardiovaskuläre Mortalität untersucht. In der Aggrastat-to-Zocor-Studie konnte beobachtet werden, dass Patienten, die nach einem STEMI/NSTEMI erhöhte Konzentrationen des CRPs hatten, ein signifikant erhöhtes Risiko für weitere kardiovaskuläre Ereignisse und Tod aufwiesen. Patienten, die mit Simvastatin behandelt wurden, zeigten im Follow-up niedrigere CRP-Werte, was mit einem besseren Outcome assoziiert war [89].

In der 2008 veröffentlichten JUPITER (Justification for the Use of Statins in Primary Prevention: an Intervention Trial Evaluation Rosuvastatin) -Studie konnte gezeigt werden, dass durch die Gabe von Rosuvastatin eine CRP-Senkung erzielt werden konnte, was unabhängig von der LDL-Senkung zu einer signifikanten Reduktion von kardiovaskulären Ereignissen führte [103].

In der IMPROVE-IT (Improved Reduction of Outcomes: Vytorin Efficacy International Trial) -Studie wurde der Effekt der LDL- und CRP-Senkung unter Simvastatin-Monotherapie und unter der Simvastatin/Ezetimib-Kombinationstherapie untersucht. Unter der Kombinationstherapie konnte das Therapieziel der LDL- und CRP-Senkung häufiger erreicht werden, was mit einem besseren Outcome assoziiert war im Vergleich zu dem Erreichen nur eines Therapieziels. Mit welchem der Substanzen das Therapieziel erreicht wurde, spielte keine Rolle für das Outcome [12]. Durch Gabe des PCSK-9-Hemmers Evolocumab konnte der LDL-Spiegel von Patienten noch weiter abgesenkt werden und somit das kardiovaskuläre Risiko reduziert werden, allerdings ohne Effekt auf das CRP auszuüben [85,113].

Bis dato konnte noch nicht gezeigt werden, dass eine Reduktion der vaskulären Inflammation ohne gleichzeitige LDL-Reduktion zu einer verminderten Rate kardiovaskulärer Ereignisse führt. Dies zu zeigen, war das Ziel der CANTOS (Canakinumab Antiinflammatory Thrombosis Outcome Study) -Studie. Patienten nach Myokardinfarkt wurde Canakinumab, ein humanisierter monoklonaler Antikörper gegen IL-1 β , verabreicht und untersucht, inwiefern rekurrende kardiovaskuläre Ereignisse bei erhöhter inflammatorischer Aktivität, gemessen als erhöhtes CRP, verhindert werden können. Canakinumab führte im Vergleich zu einem Placebo zu einer signifikanten Senkung des CRP ohne gleichzeitige LDL-Senkung. Ab einer Dosis von 150 mg alle drei Monate führt die Gabe von Canakinumab zu einer signifikanten Risikoreduktion für rekurrende kardiovaskuläre Ereignisse, allerdings mit der Gefahr schwerer Infektgeschehen [85,105]. Gleichsam sind die Therapiekosten bei zwar nominal signifikantem, aber schwachem Effekt, so, dass eine weitere Vermarktung von Canakinumab vorerst gestoppt wurde.

In der CIRT (Cardiovascular Inflammation Reduction Trial) -Studie mit niedrigdosiertem Methotrexat konnte keine Senkung der proinflammatorischen Zytokine IL-1 β , IL-6 und CRP erreicht werden, was auch nicht in weniger kardiovaskulären Ereignissen resultierte [109].

In der COLCOT-Studie hingegen konnte bei Patienten mit kürzlich zurückliegendem Myokardinfarkt mittels der Gabe von Colchicin 0,5 mg täglich eine signifikante Reduktion sekundärer ischämischer kardiovaskulärer Ereignisse erzielt werden [137].

2.3. Rolle des angeborenen Immunsystems bei der Entstehung der Atherosklerose

2.3.1. Angeborenes vs. adaptives Immunsystem

Die Charakteristika des angeborenen und adaptiven Immunsystems sind in **Tabelle 1** aufgeführt.

Tab. 1: Vergleich angeborenes und adaptives Immunsystem [65,151]

(NK: natural-killer Zellen, MHC: major histocompatibility complex, TLR: Toll-like-Rezeptor, NLR: nucleotide-binding oligomerization domain(nod) leucine-rich repeat-containing Receptor, RLR: RIG-I-like Rezeptor, CLR: C-type lectin Rezeptor)

	Angeborenes Immunsystem	Adaptives Immunsystem
Reaktion	Unspezifisch	Spezifisch
Zeit	Minuten	Stunden bis Tage
Zelluläre Komponenten	Monozyten Makrophagen Dendritische Zellen NK-Zellen Mastzellen Granulozyten <ul style="list-style-type: none"> • neutrophile • basophile • eosinophile 	T-Lymphozyten <ul style="list-style-type: none"> • Zytotoxische T-Zellen (CD8⁺) • CD4⁺-T-Helferzellen <ul style="list-style-type: none"> ○ TH₁-Helferzellen ○ TH₂-Helferzellen • Regulatorische T-Zellen (T_{reg}) B-Lymphozyten <ul style="list-style-type: none"> • Plasmazellen

Humorale Komponenten	Akute Phase-Proteine Komplementsystem Proinflammatorische Zytokine	Immunglobuline
Rezeptoren	MHC-I, MHC-II Pattern recognition receptors (PRRs): TLRs, NLRs, RLRs, CLR	Ig auf B-Zellen T-Zell-Rezeptor auf T-Zellen

2.3.2. Zellen des angeborenen Immunsystems und ihre Rolle bei der Atherosklero- roseentstehung

2.3.2.1. Monozyten

In der Homöostase zirkulieren Monozyten im Blut, im Knochenmark und der Milz. Bei Entzündungsvorgängen im Rahmen infektiöser Vorgänge oder Zelluntergang migrieren Monozyten in lymphatische und nicht-lymphatische Organe. Dort phagozytieren sie Zellbestandteile oder toxische Moleküle, setzen proinflammatorische Zytokine frei und differenzieren dann auf Reiz von M-CSF und GM-CSF in dendritische Zellen, Makrophagen oder Schaumzellen. Monozyten exprimieren auf ihrer Oberfläche die Chemokin-Rezeptoren CX3CR1, CCR2 und CCR5, die sowohl für die Freisetzung aus dem Knochenmark als auch für die Migration in entzündetes Gewebe relevant sind [150].

Die Gefäßintima produziert in hypoxischem Milieu MAC-1 (macrophage adhesion ligand-1). Dieses interagiert mit endothelialen Adhäsionsmolekülen v.a. im Bereich von Tight junctions, wodurch der Eintritt von Monozyten in die Intima gewährleistet wird [66]. Mittels L-Selektin und den Liganden für E- und P-Selektin, die auf der Endotheloberfläche exprimiert werden, werden Monozyten an atherosklerotische Läsionen rekrutiert. Über die Interaktion zwischen den monozytären Integrinen VLA4 (α_4 -Integrin) und LFA1 (β_2 -Integrin) mit den endothelialen Adhäsionsmolekülen VCAM-1 (vascular adhesion molecule-1) an der Oberfläche und ICAM-1 (intracellular adhesion molecule-1) interzellulär wird die Bindung an das Endothel gewährleistet. Die Expression von VCAM-1 und ICAM-1 wird beispielsweise durch hohe Konzentrationen von oxidiertem LDL stimuliert. Weitere Stimuli für die Monozytenadhäsion sind IL-1 β , TNF, Nikotinkonsum und Angiotensin II [48,150].

2.3.2.2. Makrophagen

Nachdem Monozyten in die Intima und Subintima eingewandert sind, differenzieren sie zu Makrophagen und nehmen über Scavenger-Rezeptoren oxidiertes LDL auf. Dadurch entwickeln sie sich zu Schaumzellen [48].

Die Makrophagen innerhalb einer atherosklerotischen Plaque produzieren proinflammatorischen Zytokine wie TNF α , IL-6, IL-12 und IL-18, wodurch weitere Immunzellen rekrutiert werden. Sie besitzen zudem eine hohe proteolytische Aktivität durch Überexpression von Matrix-Metalloproteinasen (MMP). Dies führt zu einer erhöhten Vulnerabilität der Plaque, was das Rupturrisiko erhöht [19,48].

Über die Expression von CD36 und Scavenger-Rezeptor A1 und B1, sowie LDL receptor-related protein 1 (LRP-1) und lectin-like oxLDL receptor-1 (LOX-1) sind die Makrophagen zur Aufnahme großer Mengen modifizierter Lipoproteine befähigt. Die Abgabe nach extrazellulär erfolgt über die Bindung an Apolipoprotein A-1 (ApoA-1), einem Bestandteil von high-density-Lipoproteinen (HDL). Cholesterinkristalle, die sich in Makrophagen ansammeln, aktivieren das NLRP3-Inflammasom, wodurch IL-1 β und IL-18 freigesetzt wird. Außerdem induzieren Cholesterinkristalle die Bildung sog. NETs (neutrophil extracellular traps), wodurch auf Transkriptionsebene die Produktion von IL-1 α und IL-1 β gesteigert wird [19].

In Abhängigkeit ihrer Mikroumgebung und der intrazellulären Signalwege, die aktiviert werden, können Makrophagen unterschiedliche Phänotypen annehmen. Hierdurch können Makrophagen sowohl eine proatherogene als auch eine protektive Wirkung erfüllen. Auch glatte Muskelzellen können in der Plaque zu Makrophagen-ähnlichen Zellen transdifferenzieren und Makrophagenoberflächenmarker exprimieren [136].

2.3.2.3. Weitere Zelltypen

Bei der Entstehung der Atherosklerose sind noch weitere Zellen des angeborenen Immunsystems beteiligt: Dendritische Zellen sind wie Monozyten und Makrophagen in der Lage, oxidiertes LDL zu internalisieren. Über MHC-II-Proteine präsentieren sie die Antigene an T-Zellen und induzieren so eine Antwort des adaptiven Immunsystems. Sie exprimieren zudem Toll-like Rezeptoren auf ihrer Oberfläche [20,42,131].

Mastzellen bewirken über eine Histaminsekretion eine zunehmende Permeabilität der Endothelzellschicht für zirkulierende LDL-Partikel. Des Weiteren bewirken sie durch die Freiset-

zung von Chemokinen eine Rekrutierung von Leukozyten am Endothel. Über eine Apoptoseinduktion von Schaumzellen und Degradation der extrazellulären Matrix durch proteolytische Enzyme tragen sie erheblich zur Destabilisation der atherosklerotischen Plaque bei [78].

Auch neutrophile Granulozyten aggravieren eine endotheliale Dysfunktion, indem sie die Expression von Adhäsionsmolekülen am Endothel sowie Permeabilitätsänderungen induzieren. Außerdem werden Monozyten und Makrophagen angezogen und eine proinflammatorische Phänotypänderung der Makrophagen initiiert. Durch zusätzliche Modifikation von LDL-Partikeln wird die Schaumzellbildung gefördert und durch Bildung von MMPs die Degradation der Extrazellulärmatrix unterstützt [124]. Über die Bildung von NETs werden antigenpräsentierende Zellen, Endothelzellen und Thrombozyten aktiviert, was eine proinflammatorische Immunantwort bedingt [28].

2.3.3. Rezeptoren des angeborenen Immunsystems

Ein wesentlicher Bestandteil der angeborenen Immunabwehr sind sogenannte „pattern recognition receptors“ (PRRs), die sowohl von körperfremden als auch von körpereigenen Molekülen aktiviert werden können und eine proinflammatorische Zellaktivierung auslösen. Körperfremde Liganden, auch als „pathogen-associated molecular pattern“ (PAMP) bezeichnet, stellen Bestandteile von Bakterien, Viren oder Pilzen dar. Demgegenüber werden körpereigene „damage-associated molecular pattern“ (DAMP) während apoptotischen bzw. nekrotischen Vorgängen oder Zellumbauprozessen freigesetzt. Bei der Erkennung von DAMPs spielen zwei Rezeptoren eine besondere Rolle: Toll-like Rezeptoren (TLRs) und NOD-like Rezeptoren (NLRs) [3,153].

2.3.3.1. Toll-like Rezeptoren

TLRs sind die am besten untersuchten und charakterisierten PRRs. Sie werden in und auf Zellen des angeborenen Immunsystems wie Monozyten, Makrophagen, dendritischen Zellen und Granulozyten, aber auch auf Epithel-, Endothelzellen und Fibroblasten exprimiert. Im Menschen sind zehn TLR-Subtypen (TLR1-10) bekannt [3,17,153]. TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6 und TLR10 sind auf der Zellmembran lokalisiert und interagieren mit mikrobiellen Membranproteinen und bakteriellen Lipoproteinen. TLR3, TLR7, TLR8 und TLR9 werden hingegen auf der endolysosomalen Membran exprimiert und werden durch Nukleinsäuren von Bakterien und Viren aktiviert [91]. Außerdem können TLRs durch endogene Liganden aktiviert werden, wie

sie beispielsweise in der Pathogenese von renalen Erkrankungen eine Rolle spielen. Hierzu gehören nukleäre Bestandteile wie DNA/RNA und Histone, zytosolische Moleküle wie Hitzeschockproteine, aber auch extrazelluläre DAMPs wie Fibrinogen oder auch HDL [3,127,153].

TLRs bestehen aus drei Komponenten: einem N-terminalen extrazellulärem Teil, der für die Bindung des Liganden verantwortlich ist, einem transmembranen Teil und der C-terminalen zytoplasmatischen Toll/Interleukin-1-Rezeptor-Domäne (TIR). Nach Bindung des Liganden dimerisieren die meisten TLRs, was in einer Konformationsänderung der TIR resultiert. Durch Aktivierung des TLRs werden Adaptormoleküle rekrutiert. Von besonderer Bedeutung sind hierbei MyD88 (myeloid differentiation primary response gene 88) und TRIF (TIR-domain-containing adapter-including IFN- β), die unterschiedliche Signalkaskaden bedingen [91,153].

Sobald MyD88 an den TLR gebunden hat, wird die Bildung des Myddosoms initiiert. Dies stellt einen Komplex aus MyD88 und Interleukin-1-Rezeptor-assoziiierter Kinasen (IRAK) 1,2 und 4 dar. Die IRAK-Aktivierung führt zu einer Komplexbildung mit Tumornekrosefaktor-rezeptor-assoziiertem Faktor 6 (TRAF6) und transforming growth factor beta-aktivierter Kinase 1 (TAK1). Daraus resultiert die Induktion von Mitogen-aktivierter Proteinkinase (MAPKs) und NF κ B. Schließlich wird dadurch die Genexpression von inflammatorischen Zytokinen gefördert [91,153].

In der Pathogenese der Atherosklerose spielen TLRs eine entscheidende Rolle. So fungiert oxLDL als Ligand für TLR2 und 4, was die oben beschriebene Signalkaskade in Gang setzt [153]. Außerdem sind TLRs an der Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms beteiligt, was die Freisetzung von IL-1 β induziert [91]. Hierbei hat der Komplex aus TLR4 und 6 sowie dem Scavenger Rezeptor CD36 als regulatorische Einheit eine besondere Bedeutung [119].

2.3.3.2. NOD (Nucleotide-binding oligomerization domain)-like Rezeptoren

NOD-like Rezeptoren sind eine Gruppe von PRRs, die im Zytoplasma lokalisiert sind. Sie bestehen aus einer zentralen NACHT-Domäne, die die Oligomerisation nach Ligandenbindung vermittelt. Am C-terminalen Ende wird durch Leucin-reiche Wiederholungen die Bindung des Liganden gewährleistet. Durch das variable N-terminale Ende werden die Rezeptoren in verschiedene Subklassen unterteilt. Dies kann zum einen eine CARD (caspase activation and recruitment domain), wodurch NOD1 und 2 charakterisiert sind, oder eine PYD (pyrin domain)-Domäne sein. Das Vorhandensein einer PYD definiert die NLRPs. NLRPs sind in der Lage mit ASC und Caspase-1 große oligomere Komplexe zu bilden, die man als Inflammasom bezeichnet [56,153]. Neben der Inflammasombildung haben NLRs noch weitere Funktionen wie

die Induktion der Autophagozytose, Signaltransduktion und Transkriptionsaktivierung [72]. So spielt NLRP3 beispielsweise eine pathophysiologische Rolle bei der Entstehung von akuten, wie kontrastmittelinduzierten, und chronischen, wie diabetischen und hypertensiven, Nierenerkrankungen [71].

Im Unterschied zu einer Aktivierung von NOD1/2-Rezeptoren, die in einer erhöhten Expression von NF κ B resultiert, führt eine Stimulation von NLRP3 zur Freisetzung von IL-1 β und IL-18 [4].

2.3.4. NLRP3-Inflammasom

2.3.4.1. Komponenten

Das NLRP3 Inflammasom besteht aus drei Komponenten. Hierzu gehört NLRP3, das Adaptorprotein ASC (apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD) sowie Caspase-1, die für die IL-1 β -Maturation verantwortlich ist [76].

NLRP3 besteht aus neun C-terminalen LRRs, einer zentralen NACHT-Domäne und der N-terminalen PYD. Die NACHT-Domäne vermittelt über eine ATPase-Aktivität die Oligomerisation zum Inflammasom [76].

Das Adaptormolekül ASC besitzt sowohl eine PYD- als auch eine CARD-Domäne. Über PYD-PYD-Interaktion wird die Verbindung zwischen ASC und NLRP3 hergestellt. Die Interaktion von ASC mit aktivem NLRP3 führt zur Polymerisation des Proteinkomplexes. Die Procaspase-1 wird anschließend über eine CARD-CARD-Interaktion rekrutiert und in die aktive Caspase-1 überführt [76,86].

Caspase-1 ist in der Lage, IL-1 β , IL-18 und IL-33 zu prozessieren [79]. Außerdem führt sie über die Freisetzung von Gasdermin-D (GSDMD) zum pyroptotischen Zelltod [71].

2.3.4.2. Aktivierungswege

Es werden drei verschiedene Aktivierungswege des NLRP3-Inflammasoms beschrieben: der kanonische, nicht-kanonische und der alternative Weg.

Der kanonische Aktivierungsweg erfordert zwei Signale. Das erste Signal wird über TLR, MyD88 und/oder Zytokinrezeptoren, wie dem TNF-Rezeptor vermittelt. Über die Aktivierung von NF κ B wird die pro-IL-1 β - und NLRP3-Transkription induziert. Das zweite Signal führt zur NLRP3-Inflammasom-Oligomerisation, wodurch Caspase-1 aktiviert wird und die Freiset-

zung von IL-1 β und IL-18 stimuliert wird. Durch Caspase-1 wird außerdem die Pyroptose induziert und die Freisetzung von HMGB1 (high mobility group box 1), einem proinflammatorischen Protein getriggert [100]. Mehrere Stimuli sind in der Lage, Signal 2 zu liefern. Hierzu gehören ein Kalium-Ausstrom aus der Zelle, eine erhöhte Zellpermeabilität, die Destabilisierung von Lysosomen, die Zerstörung von Mitochondrien mit der Freisetzung von mitochondrialer DNA und Cardiolipin sowie die Produktion von ROS (reactive oxygen species) in den Mitochondrien [90,153]. Die verschiedenen Aktivierungswege sind schematisch in **Abbildung 2** dargestellt.

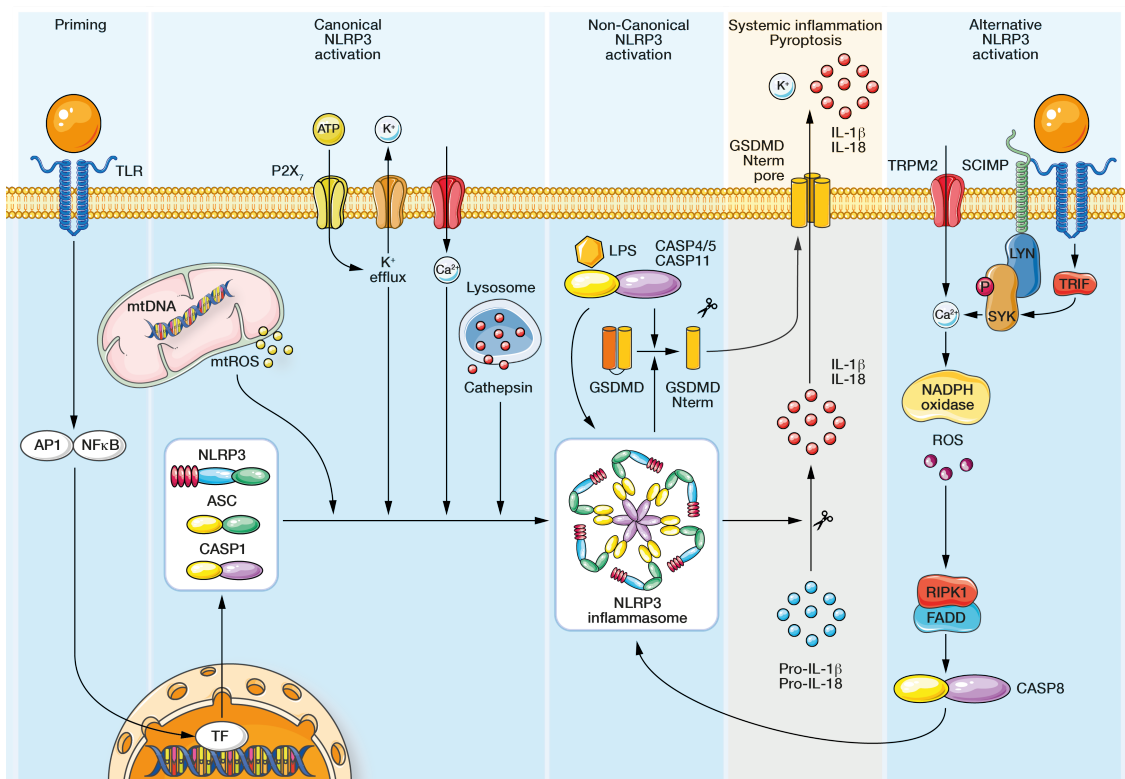


Abb. 2: Aktivierungswege des NLRP3-Inflammasoms, Abbildung entnommen aus Speer *et al.* Nat Rev Nephrol 2022

Der nicht-kanonische Aktivierungsweg besteht ebenfalls aus zwei Schritten. Im ersten Schritt wird durch gram-negative Bakterien der TLR4-MyD88- und der TRIF-Weg aktiviert. Dies führt zur nukleären Translokation von NF κ B, wodurch die Transkription der Gene von IL-1 β , IL-18, NLRP3, IRF3 und IRF7 initiiert wird. Der IRF3-7-Komplex induziert die Expression von INF α und β . Diese binden an ihren Rezeptor und aktivieren so den JAK/STAT-Signalweg.

Dies führt zur Transkription des Caspase-11-Gens. In einem zweiten Schritt wird die Caspase-11 durch beispielsweise Lipopolysaccharide (LPS) von gramnegativen Bakterien aktiviert. Caspase-11 induziert die Pyroptose über die Prozeption von Gasdermin und HMGB1, sowie der Freisetzung von IL-1 α . Über eine Aktivierung des NLRP3-ASC-Caspase-1-Wegs führt sie zudem zur Freisetzung von IL-1 β [100].

In Makrophagen sind zwei Signale notwendig, um über den kanonischen oder den nicht-kanonischen Aktivierungsweg, die IL-1 β -Freisetzung zu induzieren. In Monozyten ist hingegen noch ein alternativer Weg bekannt. So sind sie in der Lage, nach Stimulation mit einem TLR2- oder TLR4-Liganden wie beispielsweise LPS direkt IL-1 β freizusetzen ohne ein zweites Signal zu benötigen. Ursächlich hierfür ist das Vorliegen einer bereits aktivierten Caspase-1 [92,155].

2.3.4.3. Bekannte Liganden

Das NLRP3-Inflammasom kann direkt von Liganden oder über die Bindung von Liganden an TLRs, v.a. TLR2 und TLR4, aktiviert werden [80]. Intrazelluläre Liganden, die zu einer Aktivierung des Inflammasoms führen, sind Nukleinsäuren aus dem Zellkern oder Mitochondrium, Histone, ATP, Hitzeschockprotein 60 und 70 und Harnsäure. Extrazelluläre DAMPs stellen beispielsweise Moleküle aus dem Fettstoffwechsel dar. Hierzu gehören oxLDL, modifiziertes HDL sowie gesättigte und ungesättigte Fettsäuren. Weitere Liganden sind Cholesterin- und Oxalatkristalle, Glykoproteine wie Fibrinogen und Fibronectin, Glykosaminoglykane wie Heparansulfat und Hyaluron, Amyloid β , Serum Amyloid A, Uromodulin und Versican [3,39,153].

2.3.4.4. Effektorzytokine (IL-1 β , IL-18)

Nach Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms prozessiert Caspase-1 die Effektorzytokine IL-1 β und IL-18. IL-1 β entfaltet seine Rolle als proinflammatorisches Zytokin an mehreren Stellen. So aktiviert es die Genexpression der Cyclooxygenase-2 (COX-2), Phospholipase A2 und die induzierbare NO-Synthase. Dies führt mittels einer vermehrten NO-Bildung und Prostaglandin-Synthese zu den klinischen Kardinalzeichen der Entzündung [25].

IL-1 β vermittelt über eine verstärkte Expression der Adhäsionsmoleküle ICAM-1 und VCAM-1 sowie die Produktion von Chemokinen das Rekrutment und die Infiltration von Immunzellen aus dem Blut ins Gewebe. An der glatten Gefäßmuskulatur wirkt IL-1 β als Proliferationsstimulus, sodass sich die glatten Muskelzellen vermehren. Über eine Autoinduktion vermittelt IL-1 β in glatten Gefäßmuskelzellen und Endothelzellen seine eigene verstärkte Genexpression [83]. Außerdem ist es an der Differenzierung der myelischen Zellreihen im Knochenmark beteiligt und wirkt in der Angiogenese mit [25,47].

IL-1 β spielt des Weiteren eine entscheidende Rolle in der Aktivierung des humoralen Arms der angeborenen Immunabwehr. Es induziert die Bildung von IL-6, welches wiederum in der Leber zur Ausschüttung von Akute-Phase-Proteinen wie CRP, Fibrinogen und Plasminogen-Aktiva-tor-Inhibitör führt [47].

IL-18 ist IL-1 β strukturell sehr ähnlich und wird ebenfalls durch Caspase-1 in seine aktive Form überführt [47]. Es vermittelt als Ko-Stimulator die IFN- γ -Ausschüttung und kann sowohl eine TH₁- als auch TH₂-Antwort triggern. Außerdem ist es aufgrund seiner strukturellen Ähnlichkeit ebenfalls zu den IL-1 β -Effekten fähig [25].

2.4. Ziel der Arbeit

Das NLRP3-Inflammasom ist ein zentraler Bestandteil des angeborenen Immunsystems. In klinischen Studien wie der JUPITER-, der CANTOS- oder der COLCOT-Studie konnte gezeigt werden, dass eine Reduktion der Inflammation im Sinne einer CRP- oder IL-1 β -Senkung zu einer Reduktion kardiovaskulärer Ereignisse geführt hat [103,105,137].

Die klinische Relevanz einer lebenslang erhöhten, genetisch-determinierten Inflammasomakti-vierung ist allerdings bislang noch nicht untersucht. Außerdem ist unklar, ob SNPs (single nu-cleotide polymorphisms) im *Nlrp3* Genlocus mit einer verstärkten Inflammasomaktivierung einhergehen und somit auch mit einer erhöhten kardiovaskulären Mortalität assoziiert sind.

Ziel dieser Arbeit ist es, SNPs im *Nlrp3*-Gen zu identifizieren, die mit einer erhöhten Inflam-masomaktivierung einhergehen und zu untersuchen, inwiefern diese mit einem erhöhten kardi-ovaskulären Risiko und kardiovaskulärer Mortalität einhergehen.

3. Material und Methoden

3.1. LURIC-Studie

In der Ludwigshafen Risk and Cardiovascular Health (LURIC)-Studie, einer prospektiven Kohortenstudie, wurden zwischen 1997 und 2000 3061 Teilnehmer rekrutiert. Eingeschlossen wurden Patienten deutscher Abstammung mit einem akuten Koronarsyndrom, die sich einer Koronarangiographie unterzogen haben. Der mediane Follow-up-Zeitraum betrug 9,9 Jahre. Patienten mit akuten Erkrankungen, die nicht einem akuten Koronarsyndrom zuzuordnen waren, wurden ebenso ausgeschlossen wie Patienten mit Tumorerkrankungen und anderen chronischen, nicht-kardiologischen Krankheitsbildern innerhalb der letzten fünf Jahre. Informationen bezüglich der Todesursachen der Teilnehmer im Nachbeobachtungszeitraum wurden den Todesbescheinigungen entnommen. Die kardiovaskuläre Mortalität wurde definiert als der Tod an einem Myokardinfarkt, plötzlicher Herztod, Tod nach einer Koronarintervention, Schlaganfall oder anderen Erkrankungen, die einer kardiovaskulären Ursache geschuldet sind [149,154].

Am Tag der Koronarangiographie erfolgte die venöse Blutentnahme. Hierbei wurden Parameter der klinischen Chemie wie beispielsweise hsCRP und SAA bestimmt. Die Studie wurde in Übereinstimmung mit der Deklaration von Helsinki durchgeführt und durch die Ethikkommission der Ärztekammer Rheinland-Pfalz in Deutschland genehmigt. Eine schriftliche Einverständniserklärung der Teilnehmer wurde vorausgesetzt [149,154].

Diese Studie dient als Grundlage zur Untersuchung der Assoziation von SNPs im *Nlrp3* Genlocus mit sowohl der Prävalenz als auch Schwere einer KHK und kardiovaskulärer Mortalität.

3.2. Genotypisierung in der LURIC-Studie

Die Genotypisierung in der LURIC-Studie wurde mithilfe des Affymetrix Human SNP-Array 6.0 durchgeführt. IMPUTE2 wurde verwendet, um fehlende Genotypen zu imputieren. Als Referenz für die Imputation wurden die Daten aus dem Phase I 1000 Genom Panel verwendet, das 2012 in *Nature* veröffentlicht wurde [1].

3.3. Auswahl relevanter SNPs

Insgesamt wurden 112 SNP-Varianten im *Nlrp3* Genlocus identifiziert. Um seltene Allele auszuschließen, wurden lediglich SNPs mit einer Häufigkeit des selteneren Allels (minor allele

frequency, MAF) >0,05 ausgewählt. Um die SNPs genauer zu charakterisieren, wurde Haplo-Reg 4.1 verwendet. Das Programm liefert Vorhersagen über die biologischen Funktionen des SNPs. Wie in **Abbildung 3** dargestellt, zeigt HaploReg 4.1 Überlappungen des SNPs mit epigenetischen Histonmarkern (aktive Promotoren und Enhancern, H3K9ac, H3K4me1 und H3K27ac), DNase I Peaks, Transkriptionsfaktorbindungen und Transkriptionsfaktorbindungsstellen [146].

Query SNP: **rs10754555** and variants with $r^2 \geq 0.8$

chr	pos (hg38)	LD (r ²)	LD (D)	variant	Ref	Alt	AFR freq	AMR freq	ASN freq	EUR freq	SiPhy cons	Promoter histone marks	Enhancer histone marks	DNase	Proteins bound	Motifs changed	NHGRI/EBI GWAS hits	GRASP QTL hits	Selected eQTL hits	GENCODE genes	dbSNP func annot
1	247421341	1	1	rs10754555	G	C	0.47	0.58	0.63	0.61		4 tissues	6 tissues	BRST,BLD					2 hits	NLRP3	intronic

Abb. 3: Auszug aus HaploReg 4.1 für den SNP rs10754555 [157]

Fokussiert wurde auf humane Monozyten, da diese den Hauptzelltyp für die NLRP3-vermittelte IL-1 β -Sekretion darstellen und somit direkt für die systemische Inflammation verantwortlich sind. Um die Effekte der identifizierten SNPs auf die Expression des *Nlrp3*-Gens zu untersuchen, wurden eQTLs („expression quantitative trait locus“) mithilfe der GTEx Datenbank und des eQTL-Browsers abgefragt [49,147]. Das Ergebnis dieser Abfrage ist in **Abbildung 4** zu sehen.

Gencode Id	Gene Symbol	Variant Id	SNP	P-Value	NES	Tissue	Actions
ENSG00000162711.16	NLRP3	chr1_247421341_G_C_b38	rs10754555 dbSNP	9.8e-10	-0.35	Cells - Cultured fibroblasts	eQTL violin plot, IGV Browser, Multi-tissue eQTL Plot

Abb. 4: Auszug aus der GTEx Datenbank für den SNP rs10754555 [158]

Die Untersuchung des SNPs rs10754555 erfolgte in der GTEx-Datenbank an Fibroblasten in der Zellkultur. Im eQTL-Browser erfolgte die Untersuchung an Vollblutproben, worin die Monozyten enthalten sind, die im Weiteren untersucht werden sollen. In **Abbildung 5** ist ein Auszug aus dem eQTL-Browser eingefügt.

Cis-eQTLs

P-value	SNP	SNP Chr. Chr.	SNP Chr. Position	Probe	Probe Chr. Chr.	Probe Chr. position	SNP Alleles	Minor Allele	Z-score	Gene name	FDR
2.3239084956667304E-6	rs10754555	1	245651266	34201541	1	245678629	C/G	G	4.72	NLRP3	0.00
9.100559780413108E-5	rs10754555	1	245651266	10100351	1	245678601	C/G	G	3.91	NLRP3	0.04

Abb. 5: Auszug aus dem eQTL-Browser für den SNP rs10754555 [147,159]

Oben genanntes Vorgehen wurde für alle 112 SNPs durchgeführt und die SNPs anhand des in **Abbildung 6** aufgeführten Scores klassifiziert. Dieser ist angelehnt an das Scoring-System der RegulomeDB-Datenbank [13].

Score	Funktion
1a	eQTL (vorhergesagt vom Blood eQTL Browser und GTEX) + TF-Bindung + passendes TF-Motiv + DNase Peak
1b	eQTL (vorhergesagt vom Blood eQTL Browser und GTEX) + TF-Bindung oder passendes TF-Motiv + DNase Peak
1c	eQTL (vorhergesagt vom Blood eQTL Browser und GTEX) + TF-Bindung + passendes TF-Motiv
1d	eQTL (vorhergesagt vom Blood eQTL Browser und GTEX) + TF-Bindung oder passendes TF-Motiv oder DNase Peak
2a	eQTL (vorhergesagt vom Blood eQTL Browser oder GTEX) + TF-Bindung + passendes TF-Motiv + DNase Peak
2b	eQTL (vorhergesagt vom Blood eQTL Browser oder GTEX) + TF-Bindung oder passendes TF-Motiv
2c	eQTL (vorhergesagt vom Blood eQTL Browser oder GTEX) + TF-Bindung + passendes TF-Motiv + DNase Peak
2d	eQTL (vorhergesagt vom Blood eQTL Browser oder GTEX) + TF-Bindung oder passendes TF-Motiv oder DNase Peak
3a	TF-Bindung + passendes TF-Motiv + DNase Peak
3b	TF-Bindung oder passendes TF-Motiv + DNase Peak
4	TF-Bindung + passendes TF-Motiv

5	TF-Bindung oder DNase Peak oder passendes TF-Motiv
6	andere

Abb. 6: Scoring-System der SNPs, modifiziert nach [13]

In **Tabelle 2** sind die identifizierten SNPs im *Nlrp3*-Genlocus der LURIC-Patienten dargestellt. Die Informationen zur SNP-Funktion sind HaploReg 4.1 entnommen. Die Blut eQTL p-Werte entstammen dem Blood eQTL Browser, die besten eQTL p-Werte stammen aus der GTEX-Datenbank.

Tab. 2: SNPs im *Nlrp3* Genlocus von Teilnehmern der LURIC-Studie (n=3061) und ihre vorhergesagte biologische Funktion (gelb: selektierter SNP für weitere Analysen, grau: SNPs mit einer MAF <0,05)

SNP ID	Position (GRCh37)	MAF	Ref. Allele	Effektallele	Promotor Histonmarker in hu-	Enhancer Histonmarker in hu-	DNase Peak	TF-Bindung	Passendes TF-Motiv	Blut eQTL p-Wert	bester eQTL p-Wert	dbSNP Funktion	Score	HR (95 % CI)	p-Wert
rs1075455 5	24758464 3	0.398 7	C	G	X	X	X			2.32E-06	9.80E-10	int- ro- nisch	1d	1.13 (1.03-1.24)	0.011
rs10754558	24761203 6	0.429 6	C	G			X	X	X	0.001 1	N/A	3'- UTR	2a	0.94 (0.86-1.03)	0.193
rs12044934	24758459 8	0.120 5	T	G	X	X	X	X	X	N/A	1.10E-10	int- ro- nisch	2a	1.08 (0.94-1.24)	0.268
rs12060377	24759314 2	0.056 8	A	G	X	X	X		X	0.002	N/A	int- ro- nisch	2b	0.96 (0.78-1.17)	0.689
rs10159239	24760705 2	0.476 8	A	G		X	X			1.68E-17	N/A	int- ro- nisch	2d	0.96 (0.88-1.05)	0.394
rs4925547	24761243 5	0.390 9	A	T					X	N/A	0.000007 1	int- ro- nisch	2d	1.05 (0.95-1.15)	0.334
rs10802501	24761220 2	0.148 8	T	A					X	0.002	N/A	3'- UTR	2d	0.99 (0.87-1.12)	0.854
rs28556841	24759675 0	0.069 1	G	A	X	X	X			N/A	3.30E-07	int- ro- nisch	2d	1.03 (0.87-1.23)	0.713
rs79796552	24758301 0	0.052 4	A	G	X	X			X	N/A	7.50E-08	int- ro- nisch	2d	0.97 (0.79-1.20)	0.797
rs72771996	24759397 8	0.064 0	G	A	X	X	X	X	X	N/A	N/A	int- ro- nisch	3a	0.83 (0.68-1.02)	0.069
rs77795397	24759727 6	0.419 1	A	G	X	X	X		X	N/A	N/A	int- ro- nisch	3b	1.01 (0.92-1.11)	0.869
rs3835304	24759765 6	0.346 1	T	TG	X	X	X		X	N/A	N/A	int- ro- nisch	3b	0.99 (0.90-1.09)	0.897

Material und Methode

rs10802498	24759725 8	0.311	C	G	X	X	X		X	N/A	N/A	intro- nisch	3b	1.05 (0.95- 1.16)	0.330
rs68078384	24759682 4	0.288 5	A	C	X	X	X		X	N/A	N/A	intro- nisch	3b	1.00 (0.90- 1.11)	0.984
rs12117378	24759728 1	0.228 7	A	G	X	X	X		X	N/A	N/A	intro- nisch	3b	1.05 (0.94- 1.17)	0.352
rs57798344	24759848 4	0.222 1	G	A	X	X	X		X	N/A	N/A	intro- nisch	3b	1.08 (0.97- 1.21)	0.163
rs28681541	24759713 9	0.163 5	A	G	X	X	X		X	N/A	N/A	intro- nisch	3b	1.08 (0.95- 1.22)	0.224
rs11370518 7	24760174 9	0.140 6	A	C	X	X	X		X	N/A	N/A	intro- nisch	3b	0.99 (0.86- 1.13)	0.846
rs56083970	24760703 0	0.134 4	G	C		X	X		X	N/A	N/A	intro- nisch	3b	1.03 (0.90- 1.17)	0.679
rs74154644	24760512 7	0.102 7	C	T	X	X	X		X	N/A	N/A	intro- nisch	3b	0.90 (0.77- 1.06)	0.203
rs79053406	24759726 4	0.099 3	C	T	X	X	X		X	N/A	N/A	intro- nisch	3b	0.87 (0.74- 1.02)	0.088
rs11350338 2	24759721 6	0.075 9	C	G	X	X	X		X	N/A	N/A	intro- nisch	3b	0.97 (0.82- 1.16)	0.768
rs3738447	24758896 0	0.063 2	G	A	X	X	X		X	N/A	N/A	intro- nisch	3b	0.93 (0.77- 1.14)	0.497
rs79881253	24759714 9	0.055 7	T	G	X	X	X		X	N/A	N/A	intro- nisch	3b	0.99 (0.81- 1.21)	0.932
rs14778609 5	24759841 5	0.054 8	A	G	X	X	X		X	N/A	N/A	intro- nisch	3b	1.13 (0.93- 1.37)	0.211
rs12079994	24757990 8	0.054 2	G	A	X	X	X		X	N/A	N/A	intro- nisch	3b	1.01 (0.83- 1.24)	0.894
rs75109973	24761112 3	0.075 9	A	G		X		X	X	N/A	N/A	intro- nisch	4	1.00 (0.84- 1.19)	0.963
rs4925661	24760673 9	0.450 7	G	A		X			X	N/A	N/A	intro- nisch	5	0.93 (0.85- 1.02)	0.144
rs10925023	24759805 1	0.435 3	G	T	X	X			X	N/A	N/A	intro- nisch	5	0.93 (0.85- 1.02)	0.109
rs10925018	24759543 1	0.429 8	C	T	X	X			X	N/A	N/A	intro- nisch	5	0.92 (0.84- 1.01)	0.070
rs14148963 6	24759194 7	0.429 3	G	GA	X	X			X	N/A	N/A	intro- nisch	5	0.93 (0.84- 1.02)	0.111
rs56015600	24760188 6	0.414 6	G	A	X	X			X	N/A	N/A	intro- nisch	5	0.97 (0.88- 1.06)	0.469
rs6673762	24759342 0	0.242 2	C	T	X	X			X	N/A	N/A	intro- nisch	5	1.07 (0.96- 1.19)	0.214
rs12119956	24760851 9	0.225 1	T	G	X	X			X	N/A	N/A	intro- nisch	5	0.93 (0.83- 1.04)	0.206
rs14804038 7	24759703 5	0.215 3	C	T	X	X			X	N/A	N/A	intro- nisch	5	1.04 (0.93- 1.16)	0.465
rs19952344 5	24758246 5	0.207 6	T	TA	X	X			X	N/A	N/A	intro- nisch	5	1.00 (0.89- 1.12)	0.998
rs7512998	24758322 1	0.183 1	T	C	X	X			X	N/A	N/A	intro- nisch	5	1.04 (0.93- 1.17)	0.480
rs61841187	24760079 1	0.144 2	T	C	X	X			X	N/A	N/A	intro- nisch	5	1.02 (0.90- 1.16)	0.774
rs72771997	24759762 9	0.122 2	C	T	X	X	X			N/A	N/A	intro- nisch	5	0.95 (0.83- 1.10)	0.511
rs12062001	24759451 4	0.104 2	A	T	X	X			X	N/A	N/A	intro- nisch	5	1.09 (0.94- 1.26)	0.259

Material und Methode

rs61841185	24759695 4	0.104 2	G	A	X	X			X	N/A	N/A	intro- nisch	5	1.08 (0.93- 1.24)	0.322
rs7516771	24759652 7	0.098 6	A	G	X	X			X	N/A	N/A	intro- nisch	5	1.13 (0.98- 1.31)	0.098
rs20138204 8	24758949 3	0.087 7	TG	T	X	X			X	N/A	N/A	intro- nisch	5	0.83 (0.70- 0.98)	0.030
rs18148785 4	24759705 4	0.086 5	C	T	X	X			X	N/A	N/A	intro- nisch	5	1.02 (0.87- 1.20)	0.779
rs18944068 3	24759705 0	0.085 9	A	G	X	X			X	N/A	N/A	intro- nisch	5	1.03 (0.88- 1.21)	0.685
rs72771993	24758957 1	0.056 5	C	T	X	X			X	N/A	N/A	intro- nisch	5	0.96 (0.79- 1.18)	0.721
rs79490472	24759455 6	0.056 0	C	T	X	X			X	N/A	N/A	intro- nisch	5	1.01 (0.83- 1.23)	0.925
rs13890055 7	24758187 2	0.054 5	G	A	X	X			X	N/A	N/A	5'- UTR	5	1.10 (0.91- 1.34)	0.324
rs11527462 3	24759201 5	0.054 2	G	A	X	X			X	N/A	N/A	intro- nisch	5	1.08 (0.88- 1.31)	0.465
rs19972477 6	24759219 1	0.050 9	T	TC	X	X			X	N/A	N/A	intro- nisch	5	1.11 (0.91- 1.35)	0.297
rs56188865	24760627 6	0.365 4	T	C		X				N/A	N/A	intro- nisch	6	0.99 (0.90- 1.09)	0.901
rs72771992	24758154 2	0.108 6	T	G	X	X				N/A	N/A	5'- UTR	6	0.95 (0.82- 1.11)	0.530
rs20177689 7	24760440 6	0.043 9	CCTT T	C	X	X			X	N/A	N/A	intro- nisch	5	1.05 (0.84- 1.31)	0.669
rs79086538	24758979 5	0.043 9	T	C	X	X			X	N/A	N/A	intro- nisch	5	1.00 (0.80- 1.25)	0.978
rs12124866	24759732 9	0.043 6	T	C	X	X	X		X	N/A	N/A	intro- nisch	3b	1.12 (0.91- 1.38)	0.277
rs20105342 3	24761165 9	0.041 1	CAG	C		X	X	X	X	N/A	N/A	intro- nisch	3a	1.12 (0.90- 1.39)	0.321
rs4925651	24758692 0	0.038 3	G	T	X	X			X	N/A	N/A	intro- nisch	5	1.08 (0.86- 1.36)	0.509
rs35433972	24759010 3	0.036 1	C	T	X	X			X	N/A	N/A	intro- nisch	5	0.84 (0.65- 1.10)	0.208
rs14579327 5	24758593 4	0.035 1	A	G	X	X			X	N/A	N/A	intro- nisch	5	0.95 (0.74- 1.22)	0.704
rs74154643	24760231 6	0.032 5	G	A	X	X			X	N/A	N/A	intro- nisch	5	1.19 (0.93- 1.52)	0.159
rs60418626	24761198 1	0.031 0	TC	T		X	X	X	X	N/A	N/A	3'- UTR	3a	1.13 (0.88- 1.46)	0.329
rs20006626 1	24760699 6	0.029 7	TGAG	T		X	X		X	N/A	N/A	intro- nisch	3b	1.10 (0.85- 1.43)	0.481
rs12745606	24760905 3	0.027 7	T	A	X	X	X		X	N/A	N/A	intro- nisch	3b	0.84 (0.62- 1.13)	0.242
rs76911796	24759718 0	0.027 2	T	C	X	X	X		X	N/A	N/A	intro- nisch	3b	1.05 (0.80- 1.39)	0.718
rs12403988	24758618 6	0.025 6	C	T	X	X			X	N/A	N/A	intro- nisch	5	1.02 (0.76- 1.36)	0.910
rs72772001	24760035 3	0.025 4	C	T	X	X			X	N/A	N/A	intro- nisch	5	1.16 (0.88- 1.53)	0.306
rs20111021 1	24759652 2	0.025 4	G	GA	X	X			X	N/A	N/A	intro- nisch	5	0.98 (0.73- 1.31)	0.876
rs14856073 6	24759718 1	0.022 5	G	A	X	X	X		X	N/A	N/A	intro- nisch	3b	1.12 (0.83- 1.50)	0.463

Material und Methode

rs74772537	247598769	0.0223	C	T	X	X	X	X	X	N/A	N/A	intronsch	3a	0.87 (0.63-1.20)	0.398
rs76743559	247591691	0.0223	A	G		X	X		X	N/A	N/A	intronsch	3b	1.02 (0.75-1.38)	0.905
rs34777555	247599139	0.0182	G	C	X	X				N/A	N/A	intronsch	6	0.89 (0.62-1.27)	0.513
rs147219646	247594440	0.0156	C	T	X	X				N/A	N/A	intronsch	6	1.48 (1.07-2.06)	0.018
rs189866429	247594416	0.0151	G	A	X	X			X	N/A	N/A	intronsch	5	0.89 (0.60-1.33)	0.580
rs187001840	247591473	0.0150	T	C		X	X		X	N/A	N/A	intronsch	3b	0.89 (0.60-1.33)	0.581
rs146357284	247610829	0.0148	G	T		X	X		X	N/A	N/A	intronsch	3b	0.95 (0.65-1.40)	0.810
rs116502550	247581560	0.0140	A	T	X	X			X	N/A	N/A	5'-UTR	5	1.13 (0.78-1.65)	0.518
rs147775898	247597229	0.0132	C	T	X	X	X		X	N/A	N/A	intronsch	3b	0.94 (0.62-1.43)	0.779
rs148478875	247587982	0.0122	C	T	X	X				N/A	N/A	synonym	6	0.92 (0.60-1.41)	0.705
rs41303141	247586487	0.0119	T	C	X	X	X		X	N/A	N/A	intronsch	3b	0.80 (0.50-1.27)	0.337
rs180705418	247611496	0.0109	G	C		X	X	X	X	N/A	N/A	intronsch	3a	0.61 (0.36-1.05)	0.074
rs61841189	247608148	0.0098	C	T	X	X	X			N/A	N/A	intronsch	5	0.60 (0.33-1.09)	0.091
rs4925658	247603416	0.0089	T	G	X	X	X	X	X	N/A	N/A	intronsch	3a	1.15 (0.72-1.84)	0.551
rs77123264	247600998	0.0088	C	T	X	X	X	X	X	N/A	N/A	intronsch	3a	1.17 (0.73-1.86)	0.516
rs41311573	247587771	0.0086	C	T	X	X			X	N/A	N/A	synonym	5	0.81 (0.47-1.40)	0.448
rs182771627	247592181	0.0084	C	T	X	X			X	N/A	N/A	intronsch	5	1.07 (0.66-1.76)	0.775
rs121908147	247587343	0.0081	G	A	X	X			X	N/A	N/A	missense	5	0.88 (0.51-1.52)	0.640
rs200373688	247597150	0.0080	G	GA	X	X	X		X	N/A	N/A	intronsch	3b	0.75 (0.41-1.36)	0.339
rs114917495	247600813	0.0076	G	T	X	X	X		X	N/A	N/A	intronsch	3b	0.67 (0.36-1.25)	0.204
rs139190726	247582749	0.0071	G	A	X	X			X	N/A	N/A	intronsch	5	1.22 (0.73-2.04)	0.437
rs150420303	247605673	0.0065	T	G	X	X	X		X	N/A	N/A	intronsch	3b	1.06 (0.61-1.83)	0.842
rs181369593	247590087	0.0058	C	T	X	X			X	N/A	N/A	intronsch	5	0.79 (0.41-1.52)	0.483
rs140014493	247589118	0.0058	C	G	X	X			X	N/A	N/A	intronsch	5	0.94 (0.50-1.75)	0.840
rs3806266	247587065	0.0055	G	A	X	X			X	N/A	N/A	intronsch	5	1.31 (0.76-2.26)	0.338
rs191582990	247592335	0.0052	C	T	X	X			X	N/A	N/A	intronsch	5	1.44 (0.83-2.48)	0.196
rs182887509	247606056	0.0052	A	C		X			X	N/A	N/A	intronsch	5	0.97 (0.50-1.88)	0.934
rs116010734	247609341	0.0049	G	A	X	X	X			N/A	N/A	intronsch	5	1.59 (0.92-2.75)	0.097

rs18773401	24759986	0.0049	G	A	X	X			N/A	N/A	intromisch	6	0.76 (0.36-1.61)	0.476
rs13940836	24760843	0.0047	C	T	X	X		X	N/A	N/A	intromisch	5	1.42 (0.78-2.57)	0.251
rs19250837	24759325	0.0045	C	G	X	X		X	N/A	N/A	intromisch	5	1.85 (1.09-3.14)	0.021
rs11685774	24758938	0.0044	A	G	X	X			N/A	N/A	intromisch	6	1.01 (0.50-2.03)	0.977
rs18122936	24758555	0.0042	C	T	X	X		X	N/A	N/A	intromisch	5	0.89 (0.42-1.87)	0.752
rs11140020	24758814	0.0037	C	T	X	X	X	X	N/A	N/A	synonym	3b	1.21 (0.60-2.43)	0.586
rs13952309	24759494	0.0035	C	T	X	X		X	N/A	N/A	intromisch	5	1.55 (0.80-2.99)	0.191
rs18570386	24758953	0.0032	A	G	X	X		X	N/A	N/A	intromisch	5	1.30 (0.62-2.74)	0.487
rs11789822	24760287	0.0032	T	C	X	X	X	X	N/A	N/A	intromisch	3b	1.04 (0.46-2.31)	0.930
rs13909320	24760279	0.0032	T	C	X	X	X	X	N/A	N/A	intromisch	3b	0.99 (0.44-2.21)	0.984
rs13855599	24759365	0.0031	C	T	X	X	X	X	N/A	N/A	intromisch	3b	1.05 (0.47-2.34)	0.903
rs74974762	24760934	0.0011	C	T	X	X	X		N/A	N/A	intromisch	5	2.38 (0.89-6.35)	0.083
rs18017747	24758778	0.0011	G	A	X	X			N/A	N/A	synonym	6	0.42 (0.06-2.99)	0.387
rs14833232	24760537	0.0011	G	A	X	X			N/A	N/A	intromisch	6	0.00 (0.00- Inf)	0.983
rs11415840	24759757	0.0006	C	A	X	X	X		N/A	N/A	mis-sense	5	0.00 (0.00- Inf)	0.981
rs60844398	24759206	0.0003	G	A	X	X		X	N/A	N/A	intromisch	5	2.28 (0.32-16.24)	0.408

Für die weitere Arbeit wurden SNPs mit einem Score von 1 ausgewählt. Dies trifft nur für den SNP rs10754555 zu. Die Validierung dieses SNPs erfolgte durch den im Folgenden beschriebenen experimentellen Ansatz. Die Daten für die Assoziation zwischen rs10754555, Promotor- oder Enhancer Histonmarker und DNase-Hypersitivität in CD14+ humanen Monozyten wurde vom Roadmap Epigenetics Project bezogen (<http://www.roadmapepigenomics.org>).

3.4. GerMIFS Studien

Die GerMIFS (German Myocardial Infarction Family Study) Studien sind genomweite Assoziationsstudien und untersuchen Myokardinfarktpatienten mit frühem Erkrankungsalter und positiver Familienanamnese, sowie Kontrollpatienten. In dieser Arbeit wurden die Daten aus den GerMIFS-Studien II-VII herangezogen.

GerMIFS-II [34]: Eingeschlossen wurden Männer und Frauen mit erlittenem Herzinfarkt und frühem Erkrankungsalter (<60 Jahre). Rekrutiert wurden die Probanden nach Krankenhausaufnahme zur Akuttherapie eines Herzinfarktes oder in kardiologischen Rehabilitationskliniken.

Eine positive Familienanamnese für kardiovaskuläre Erkrankungen lag in 59,4% der Fälle vor. Die Kontrollprobanden entstammten der Lübecker Bevölkerung.

GerMIFS-III [35]: Untersucht wurden Patienten aus der KORA-Datenbank, welche einen nicht-tödlichen Myokardinfarkt erlitten haben und bei denen DNA-Proben vorlagen. Hospitalisierte Infarktüberlebende zwischen 26 und 74 Jahren wurden routinemäßig in die KORA-Datenbank eingeschlossen. Als Kontrollen dienten Probanden aus der Allgemeinbevölkerung aus der Augsburg KORA S4/F4- und der PopGen-Datenbank.

GerMIFS-IV [94]: Eingeschlossen wurden Patienten, die für eine Koronarangiographie stationär aufgenommen wurden. Abhängig vom Befund erfolgte die Einteilung in KHK oder Myokardinfarkt (mind. 50%ige Stenose eines der großen Herzkranzgefäße) und Erkrankungsalter (<65 Jahre bei Männern, <70 Jahre bei Frauen). Die Kontrollpopulation entstammt der Berlin Aging Study II (BASE-II).

GerMIFS-V [160]: Patienten aus dem Münchner Myokardinfarkt Kollektiv, die in diese Studie eingeschlossen wurden, wurden zwischen 1993 und 2002 am Deutschen Herzzentrum München und der 1. Medizinischen Klinik rechts der Isar der Technischen Universität München rekrutiert und koronarangiographiert. Die Diagnose eines Myokardinfarktes wurde gestellt, wenn ein mehr als 20-minütiger Thoraxschmerz kombiniert mit einer ST-Streckenhebung oder eine pathologischen Q-Zacke im Oberflächen-EKG vorlag. Patienten mit Myokardinfarkt mussten entweder eine angiographisch verschlossene, zum Infarktgebiet passende, Koronararterie vorweisen oder regionale Wandbewegungsstörungen passend zur Infarktlokalisierung im EKG besitzen, oder beides. Die Kontrollkohorte bestand aus Probanden der Allgemeinbevölkerung, die Teil des Cooperative Health Research in Augsburg und Umgebung waren.

GerMIFS-VI [14]: Eingeschlossen wurden Patienten, die für eine Koronarangiographie hospitalisiert wurden. Abhängig vom Befund der Koronarangiographie (Stenose >50% des Diameters in mindestens einer Koronararterie) erfolgte die Einteilung in KHK oder Myokardinfarkt. Die Kontrollpopulation bestand aus Probanden, bei denen eine KHK angiographisch ausgeschlossen wurde und bei denen kein Vorhofflimmern vorlag.

GerMIFS-VII [82]: Eingeschlossen wurden Patienten, die sich einer Koronarangiographie unterzogen haben und entweder eine KHK oder einen Myokardinfarkt, d.h. eine >50%ige Stenose in mindestens einer Koronararterie, vorwiesen. Einschlusskriterium war außerdem ein junges Erkrankungsalter, eine Mehrgefäß-KHK, ein vorangegangener Myokardinfarkt oder Zustand

nach Bypass-Operation und/oder Abwesenheit von klassischen kardiovaskulären Risikofaktoren. Die Kontrollpopulation bestand aus KHK-freien Personen aus der Heinz-Nixdorf-Recall Studie und stammten aus dem Gebiet Essen, Nordrhein-Westfalen.

Alle Studien wurden durch die lokalen Ethikkomitees bewilligt und alle Teilnehmer gaben ihr schriftliches Einverständnis zur genetischen Untersuchung. Alle Studien wurden in Anlehnung an die Deklaration von Helsinki durchgeführt.

3.5. Metaanalyse zur eQTL-Vorhersage

Die eQTL-Vorhersage für rs10754555 wurde an 36 Datensätzen des eQTL-Genkonsortiums validiert, welches insgesamt 31.556 Teilnehmer enthält [144]. In dieser Analyse zeigte der SNP rs10754555 *cis*-eQTL-Effekte auf das *Nlrp3*-Gen. Die Analysen wurden sowohl an Vollblutproben als auch an PBMCs durchgeführt [144,147]. Die Assoziation zwischen den SNP-Genkombinationen wurde mithilfe der nichtparametrischen Spearman-Korrelation bestimmt, bei der der SNP-Trägerstatus als kontinuierliche Variable (d.h. 0, 1, 2) angesehen wurde. In dieser Analyse wurden jene *cis*-eQTLs als signifikant betrachtet, die in mindestens zwei Kohortenstudien eine Falscherkennungsrate (FDR, false discovery rate) $<0,05$ auf Genebene, was einem $p < 1,829 \times 10^{-5}$ entspricht, aufwiesen. Die Spearman-Korrelationskoeffizienten wurden in Z-Scores konvertiert. Außerdem erfolgte eine Korrektur für multiples Testen.

3.6. Selektion von SNPs mit Assoziation zu erhöhten Triglycerid- und Harnsäurewerten

Ausgewählt wurden fünf häufige SNPs im *Apoc3*-Genlocus (rs734104, rs4520, rs5142, rs5141, rs5128), welche mit erhöhten Triglycerid-Plasmakonzentrationen assoziiert sind [122]. Des Weiteren wurden zwei SNPs im *SLC2A9*-Locus (rs16890979, rs6449213) und ein SNP im *ABCG2*-Locus (rs2231142) selektiert, welche mit erhöhten Harnsäure-Plasmakonzentrationen assoziiert sind. Ein genetischer Risikoscore für erhöhte Triglycerid- und Harnsäurekonzentrationen wurde generiert. Dieser wurde durch die Anzahl an Allelen, die mit erhöhten Triglycerid- und Harnsäurekonzentrationen vergesellschaftet sind, bestimmt [24]. Der Risikoscore wurde auf 1 dichotomisiert (≤ 1 vs. > 1).

3.7. Experimentelle Validierung des SNPs

Um den Effekt von rs10754555 auf die *Nlrp3*-Genexpression und die NLRP3-Inflammasomaktivierung zu untersuchen, wurden Monozyten aus dem peripheren Blut (peripheral blood mononuclear cells (PBMCs)) aus frisch gewonnenem EDTA-Blut isoliert. Dieses

stammte von 348 Patienten mit akutem Myokardinfarkt (STEMI und NSTEMI), die sich auf der kardiologischen Intensivstation des Universitätsklinikums des Saarlandes in Deutschland befanden. Die Blutproben wurden innerhalb von 24 h nach der Koronarangiographie asserviert. Als gesunde Kontrollgruppe dienten Angestellte des Universitätsklinikums des Saarlandes, die keine Anzeichen oder Symptome für kardiovaskuläre Erkrankungen aufwiesen. Ausgeschlossen wurden Patienten mit akuten oder chronischen infektiösen sowie malignen Erkrankungen.

Mittels des QIAmp Blood Kit (Qiagen) wurde die genomische DNA aus dem Vollblut isoliert. Die Genotypisierung erfolgte mit dem TaqMan Assay. Die Analyse der Fluoreszenzdaten erfolgte mithilfe der Allelischen Diskriminierungssoftware 7500 v.2.3.

Alle Probanden gaben ihr schriftliches Einverständnis zur Teilnahme an der Studie ab. Die Studie wurde von der lokalen Ethikkommission bewilligt (155/33).

3.7.1. Monozytenisolation, -anreicherung und -stimulation

Mittels der Ficoll (Lonza, Lymphozyten Separationsmedium) Dichte-Gradientenzentrifugation wurden die PBMCs aus dem EDTA-Blut isoliert. 1×10^6 Zellen wurden zur Durchführung des ELISA in 200 μ l Vollmedium (RPMI Glutamax, 10 % fetales Rinderserum, Penicillin/Streptomycin, 10 mM HEPES, allesamt von Gibco) resuspendiert und auf eine 96 Well-Mikrotiterplatte aufgetragen. Nach einer Stunde wurden nicht-adhärenente Zellen (überwiegend Lymphozyten) entfernt und das Vollmedium durch 200 μ l „Hungermedium“ (RPMI Glutamax, Penicillin/Streptomycin, 10 mM HEPES, allesamt von Gibco) ausgetauscht. Der Anteil an CD14⁺ Monozyten wurde durchflusszytometrisch unter Verwendung eines Anti-CD14 PerCP-Cy5.5 markierten Antikörpers (BioLegend, #325622) quantifiziert. Das Ergebnis der Durchflusszytometrie ist in **Abbildung 7** dargestellt.

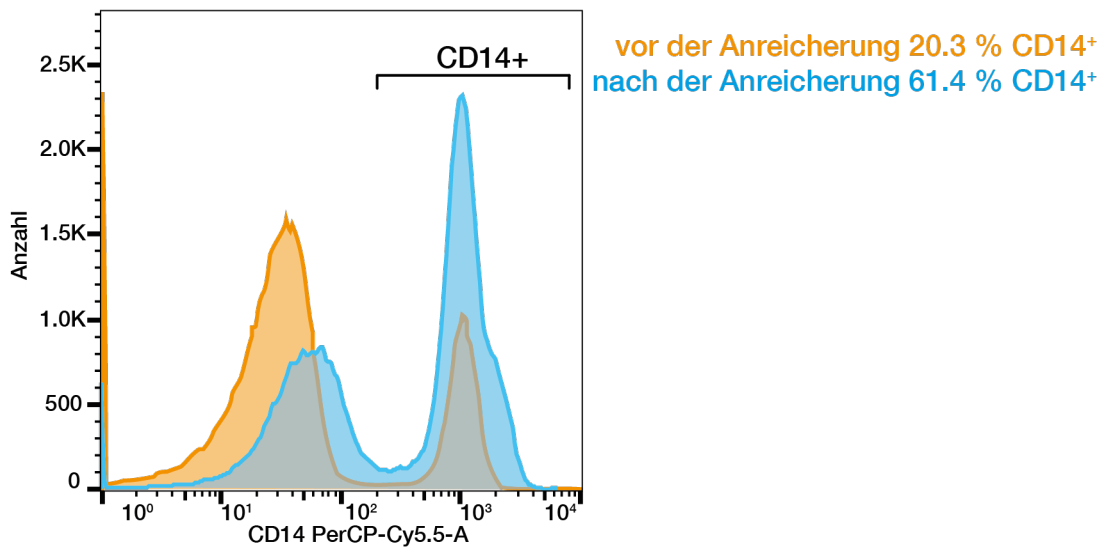


Abb. 7: Anteil der CD14⁺ Monozyten an den isolierten PBMCs nach Ficoll Dichtegradientenzentrifugation bestimmt mittels Durchflusszytometrie, Abbildung entnommen aus Schunk *et al.* Eur Heart J 2021

Anschließend wurden die PBMCs für drei Stunden mit 10 ng/mL hochreinem Lipopolysaccharid (LPS, Invivogen) inkubiert. Im nächsten Schritt wurden die Zellen entweder für eine Stunde mit 5 mM ATP (Invivogen), für eine Stunde mit 1 μ M Nigericin (Invivogen) oder für 3 h mit 100 μ g/ml Mononatriumharnsäurekristallen (Invivogen) stimuliert. Die Überstände wurden im Anschluss für den ELISA verwendet.

3.7.2. Quantitative Realtime-PCR

Frisch isolierte menschliche PBMCs wurden mit Trizol (Invitrogen) lysiert. Mithilfe der Methanol/Chloroform-Methode wurde im Anschluss die RNA isoliert. Mittels des DyNAmo cDNA Synthese-Kits (ThermoFisher, #F470L) wurde entsprechend den Herstellerangaben 1 μ g RNA in cDNA revers transkribiert. Die quantitative Realtime-PCR wurde mit dem SYBR Green Maxima Kit (ThermoScientific, #FERK0253) und dem Mx3000P Real-Time PCR System (Stratagene) durchgeführt. Für die PCR wurden folgende Primer verwendet:

- humanes *Asc*:
 - vorwärts 5'-CTCCTCAGTCGGCAGCCAAG-3'
 - rückwärts 5'-TGTGACCCTCGCGATAAGC-5'
- humanes *Nlrp3*:
 - vorwärts 5'-TGGGACTGAAGCACCTGTTG-3'

- rückwärts 5'-CAACATGCTGATGTGAGGCAD-3'
- humanes *Hprt1*:
 - vorwärts 5'-AGGACTGAACGTCTTGCTCG-3'
 - rückwärts 5'-GAGCACACAGAGGGCTACAA-3'

3.7.3. ELISA

Die Konzentration von IL-1 β , TNF und IL-6 im Überstand der isolierten PBMCs wurde entsprechend den Herstellerangaben mittels handelsüblichen ELISA-Kits gemessen (R&D Systems, #DY201-05, #DY-210, #DY-206). Die IL-18-Plasmaspiegel wurden ebenfalls mittels ELISA bestimmt (R&D Systems, #DY318-05). Die IL-1 β -Plasmaspiegel wurden mittels des hochsensitiven IL-1 β ELISA quantifiziert (#BE58011, IBL International). Die Kreuzreaktivität des IL-1 β ELISA (R&D Systems) mit Pro-IL-1 β beträgt 6,3 %, die des IL-18 ELISAs mit Pro-IL-18 0,5 %, so den Herstellangaben zu entnehmen. Für den hochsensitiven IL-1 β ELISA ist keine Kreuzreaktivität mit Pro-IL-1 β beschrieben.

3.7.4. ASC-Speck-Quantifizierung

ASC-Specks wurden im Plasma quantifiziert analog der Methode, die durch Basiorka et al. beschrieben wurde, mit wenigen Modifikationen [8]. Es wurden 300 μ g Plasmaprotein mit PBS auf ein endgültiges Volumen von 300 μ l verdünnt. Die Färbung wurde mittels Alexa Fluor-488-gelabelten Anti-ASC-Antikörpern (Santa Cruz Biotechnology, #sc-514414, Verdünnung 1:500) durchgeführt. Nach einstündiger Inkubation bei 37 °C wurde eine Durchflusszytometrie unter Verwendung von BD FACS Canto II durchgeführt. Als Kontrolle diente ein muriner IgG1 Alexa Fluor 488 Isotyp (Santa Cruz Biotechnology, #sc-3890). Analysen wurden mithilfe von FlowJo durchgeführt. 10 μ l Beads mit einer Größe von 0,5 und 0,9 μ m Größe wurden hinzugefügt, um die Größe der ASC-Specks zu bestimmen (Biotec, MegaMix, #7801). Als Kontrolle wurden GFP (grün fluoreszierendes Protein) -markierte ASC-Specks von ASC-GFP-exprimierenden THP-1-Zellen isoliert, welche zuvor mit LPS und Nigericin behandelt wurden. THP-1-ASC-GFP-Zellen exprimieren ein 37,6 kDa großes ASC::GFP Fusionsprotein, welches die Visualisierung von ASC-Specks ermöglicht. Die ASC::GFP Expression wird durch ein IFN- β Minimalpromotor verbunden mit fünf NF κ B bindenden Elementen gesteuert. GFP ist mit einer sechs Aminosäure langen Verbindung an das C-terminale Ende des humanen ASC-Proteins gebunden, um Interferenzen mit der ASC-Funktionalität zu verhindern (Invivogen, #thp-ascgfp). Um die Alexa Fluor-488-gefärbten ASC-Specks oder die ASC-GFP-Specks zu

visualisieren, wurde ein Zeiss Axio Imager 2 Fluoreszenzmikroskop verwendet. **Abbildung 8** zeigt die Durchflusszytometrie der ASC-Speck-Quantifizierung.

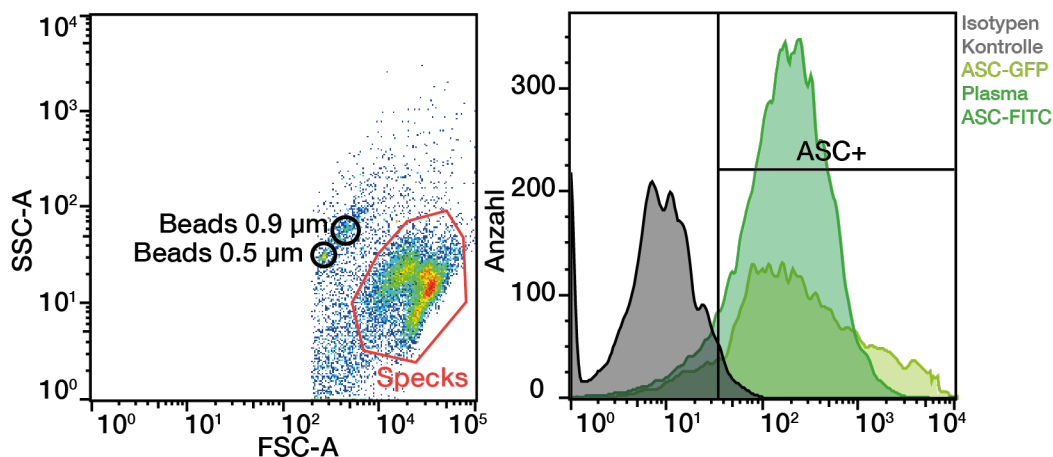


Abb. 8: Repräsentative Durchflusszytometrie der ASC-Speck-Quantifizierung im Plasma. Abbildung entnommen aus Schunk *et al.* Eur Heart J 2021

3.7.5. Perivaskuläres Karotis-Verletzungsmodell an humanisierten Mäusen

NOD-SCID Mäuse wurden von Janvier-Labs erworben. Die Tierexperimente wurden vom Landesamt für Verbraucherschutz des Saarlandes genehmigt. NOD-SCID Mäuse wurden einer unilateralen Karotisverletzung zugeführt, wie unter [155] beschrieben. Hierbei wird mit einer bipolaren Pinzette auf einer Länge von 4 mm ein elektrischer Impuls von 2 W auf die linke Arteria carotis communis appliziert, wodurch es zu einem Verlust des Endothels in diesem Bereich kommt. Vier Stunden später wurden in die Mäuse 10^7 frisch isolierte PBMCs entweder von Nicht-Trägern oder homozygoten rs10754555 Trägern durch intravenöse Injektion transplantiert. 72 Stunden später wurden die Mäuse mit Evans Blau Farbe perfundiert, um das reendothelialisierte Areal der geschädigten A. carotis zu quantifizieren. Die NLRP3 Proteinexpression in den transplantierten PBMCs wurde mittels Westernblotanalyse bestimmt [155].

3.8. Genomweite Methylierungsanalyse

Die DNA-Methylierungsanalyse wurde mithilfe des Illumina Human Methylation EPIC Bead-Chip durchgeführt. Zur Qualitätskontrolle der Methylierungsdaten wurde die CPACOR Pipeline verwendet [81]. Von der Analyse ausgeschlossen wurden Proben mit einer Antwortrate ≤ 95 % ($n=3$) und Proben, die geschlechtliche Unstimmigkeiten zeigten ($n=2$). Des Weiteren

wurden CpGs (Cytosin-Phosphat-Guanin-Dinukleotid) ausgeschlossen, die in der Nähe, d.h. 1-2 Basenpaare, eines genetischen Polymorphismus der europäischen Bevölkerung liegen, der mit einer Häufigkeit von >0,01% vorkommt. Nicht berücksichtigt wurden außerdem Proben mit einem Detektions-p-Wert >0,05 in mindestens 1 % der Proben. Anschließend erfolgte die Quartilsnormalisierung. Nach Durchführung der Qualitätskontrolle wurden Beta-Werte entsprechend der folgenden Formel berechnet: $Beta = M/(M+U+100)$, wobei M für das methylierte und U für das unmethylierte Signal steht. Die Leukozytenzahl wurde mit Hilfe des Houseman Algorithmus [60], welcher im „minfi“ R Paket implementiert wurde, geschätzt. Als Kovariate wurde die geschätzte Leukozytenzahl in den Regressionsanalysen berücksichtigt. Um den Batch-Effekt und technische Effekte zu korrigieren, wurde eine Hauptkomponentenanalyse an der Intensität von Kontrollproben durchgeführt. Im Folgenden wurden die ersten 30 Hauptkomponenten als lineare Prädiktoren für die Regressionsanalysen miteingeschlossen.

3.9. Studien zur Validierung der genetischen Assoziation

Die Assoziation zwischen den SNPs und der Gesamt- und kardiovaskulären Sterblichkeit wurde in unterschiedlichen Kohorten untersucht. Da diese Studie eine genzentrierte und keine genomweite Assoziationsstudie darstellt, kann keine genomweite Signifikanz erreicht werden. Aufgrund des experimentellen Charakters der Studie wurde kein multiples Testen durchgeführt und somit unadjustierte p-Werte angegeben.

Die Ergebnisse der Studie wurden an Teilnehmern der UKBioBank (n=483.258) und an den Teilnehmern von acht weiteren Studien validiert. Dies geschah sowohl auf individuellem Niveau in einer genzentrierten Herangehensweise (n=39.755). Im Folgenden sind die Validierungsstudien im Detail dargestellt.

GerMIFS

Anzahl der Teilnehmer an der genetischen Studie	12076
Medianer Follow-up Zeitraum	N/A, Querschnittsstudie
% Verluste während dem Follow-up	N/A, Querschnittsstudie
Methode der Genotypisierung	Unterschiedliche Methoden abhängig von der Primärstudie
Studie zur Primär- oder Sekundärprävention?	Fall-Kontroll-Studie

Insgesamt wurden die Daten zum Genotyp auf Individualebene aus 6 Fall-Kontroll-Studien zu koronarer Herzerkrankung eingeholt. Alle Teilnehmer stammen aus Deutschland (GerMIFS (German Myocardial Infarction Family Studies) II [34], III (KORA) [35], IV [94], V [160], VI [14], VII [82]). Informationen bezüglich der KHK-Manifestation wurden den Patientenakten entnommen. Insgesamt wurden die Daten von 5687 Kontrollen und 6389 Patienten verwendet. Für die Analysen zur Assoziation zwischen dem rs10754555 Genotyp und dem Vorhandensein einer KHK wurde ein logistisches Modell mithilfe von PLINK verwendet.

UKBioBank

Anzahl der Teilnehmer an der genetischen Studie	483258
Medianer Follow-up Zeitraum	3783 Tage
% Verluste während dem Follow-up	3,8%
Methode der Genotypisierung	Applied Biosystems UK BiLEVE Axiom Array
Studie zur Primär- oder Sekundärprävention?	Primärprävention (bevölkerungsbasiert)
Referenz	[132]

Die UKBioBank ist eine prospektive bevölkerungsbasierte Studie, die insgesamt 502219 Teilnehmer im Alter zwischen 37 und 73 Jahren umfasst. Zwischen 2007 und 2010 wurden in 22 Zentren im Vereinigten Königreich Teilnehmer rekrutiert. Das Vorhandensein einer KHK wurde durch die ICD-10 Codes I20-25 definiert. Tödliche kardiovaskuläre Ereignisse, d.h. die kardiovaskuläre Mortalität, wurde durch die ICD-10 Codes I20-25 und I60-64 definiert. Entnommen wurden die Informationen den Todesbescheinigungen.

ARIC Studie

Anzahl der Teilnehmer an der genetischen Studie	9345
Medianer Follow-up Zeitraum	9959 Tage
% Verluste während dem Follow-up	0%
Methode der Genotypisierung	Affymetrix Genome-Wide Human SNP Array 6.0

Studie zur Primär- oder Sekundärprävention?	Primärprävention
Referenz	[59]
Definition kardiovaskulärer Mortalität	Plötzlicher Herztod, tödlicher Myokardinfarkt, tödliche KHK

Die Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Studie ist eine bevölkerungsbasierte Studie, die 15.792 Teilnehmer im Alter von 45-65 Jahren zum Rekrutierungszeitpunkt umfasst. Mittels Stichprobenauswahl wurden die Teilnehmer aus vier Städten rekrutiert: Forsyth County, NC; Jackson, MS; northwestern suburbs von Minneapolis, MN; Washington County, MD. Teilnehmer, die nicht mit der Verwendung ihrer DNA für wissenschaftliche Zwecke einverstanden waren, wurden ebenso wie Afroamerikaner (AA) und Teilnehmer mit fehlenden Genotyp-Informationen und/oder kovariaten Phänotypdaten von der Analyse ausgeschlossen. Übrig blieben die Daten von 9345 Teilnehmern. Der mediane Follow-up-Zeitraum betrug 9959 Tage. Die kardiovaskuläre Mortalität wurde als plötzlicher Herztod, tödlicher Myokardinfarkt und tödliche KHK definiert.

CDCS Studie

Anzahl der Teilnehmer an der genetischen Studie	2001
Medianer Follow-up Zeitraum	1839 Tage
% Verluste während dem Follow-up	1,5%
Methode der Genotypisierung	Taqman SNP genotyping assay
Studie zur Primär- oder Sekundärprävention?	Sekundärprävention
Referenz	[32]
Definition kardiovaskulärer Mortalität	Tod an einem kardiovaskulären Ereignis (KHK, Herzinsuffizienz, plötzlicher Herztod, Schlaganfall)

Die Coronary Disease Cohort Studie (CDCS) stellt eine Kohortenstudie mit 2140 Patienten dar, die sich mit instabiler Angina pectoris oder Myokardinfarkt am Christchurch oder Auckland Hospital (Neuseeland) zwischen 2002 und 2009 vorstellten. Einschlusskriterien waren ischämische Beschwerden plus eine oder mehrere der folgenden Auffälligkeiten: EKG-Veränderungen (ST-Senkungen oder -Hebungen $\geq 0,5$ mm, T-Wellen-Inversion über ≥ 3 mm in

≥3 Ableitungen oder ein Linksschenkelblock), erhöhte kardiale Nekroseparameter, eine vorbestehende KHK, Alter ≥65 Jahre und Diabetes mellitus oder eine vaskuläre Vorerkrankung. Ausgeschlossen wurden Patienten, die aufgrund einer anderen schweren Erkrankung eine geschätzte Lebenserwartung von <3 Jahren hatten. Anthropometrische Messungen, klinische Befunde inklusive Echokardiographie sowie neurohumorale Marker wurden einmalig zu Beginn erhoben, als die Teilnehmer in einem stabilen Zustand waren (ca. ein Monat nach dem Krankenhausaufenthalt). Die Studie wurde durch die New Zealand Multi-region Ethikkommission (CTY/02/02/018) geprüft und von allen Teilnehmern wurde eine schriftliche Einwilligung unterzeichnet. Registriert wurde die Studie im Australian New Zealand Clinical Trials Register (ACTRN12605000431628). Von 2001 Studienteilnehmern sind die genotypischen Daten für rs10754555 bekannt. Bei 1400 Teilnehmern waren alle Kovariaten vorhanden und wurden somit in die aktuellen Analysen miteinbezogen. Die klinischen Verläufe wurden mittels direktem Follow-up und den Informationen des New Zealand Health Information Service für mindestens drei Jahre (im Median 5 Jahre) nachvollzogen. 31 Patienten, d.h. 1,5%, schieden während des Follow-up-Zeitraumes aus. Die kardiovaskuläre Mortalität wurde als Tod an einer kardiovaskulären Ursache definiert, eingeschlossen darin wurden auch KHK, Herzinsuffizienz, plötzlicher Herztod und Schlaganfall.

Dal-OUTCOMES Studie

Anzahl der Teilnehmer an der genetischen Studie	3952
Medianer Follow-up Zeitraum	31 Monate
% Verluste während dem Follow-up	0%
Methode der Genotypisierung	Illumina Infinium HumanOmni2.5Exome-8v1_A BeadChip
Studie zur Primär- oder Sekundärprävention?	Sekundärprävention
Referenz	[117]

Die dal-OUTCOMES Studie ist eine randomisierte, kontrollierte Studie an 15.871 Patienten, die kürzlich ein akutes Koronarsyndrom durchgemacht haben. Diese erhielten entweder den CETP (Cholesterylester-Transferprotein) -Inhibitor Dalcetrapib oder ein Placebo in Kombination mit der bestmöglichen evidenzbasierten Therapie. Alle Patienten dieser Studie waren an

einer KHK erkrankt. Das Einschlusskriterium war ein akutes Koronarsyndrom. Dies wurde definiert als ein akutes Koronarereignis zum Studieneintritt und eine Vorgeschichte des Patienten für eine akute myokardiale Ischämie. Diabetes wurde zum Studieneintritt definiert als Diabetes, der behandelt oder unbehandelt ist. Als lipidsenkende Therapie wurde eine Therapie mit Statin oder Ezetimib zum Studieneintritt definiert. 3952 Patienten unter 65 Jahre, bei denen genotypische Informationen vorhanden waren, wurden in die aktuelle Analyse einbezogen. Die Studienprotokolle wurden durch die Kontrollbehörden der relevanten Institutionen oder die Ethikkommission überprüft. Alle Patienten gaben ihr schriftliches Einverständnis zur Studie.

EMORY Studie

Anzahl der Teilnehmer an der genetischen Studie	934 Kaukasier
Medianer Follow-up Zeitraum	1655 Tage
% Verluste während dem Follow-up	26% wurden während dem 5-jährigen Follow-up Zeitraum zensiert
Methode der Genotypisierung	Illumina Multi-Ethnic Global Array
Studie zur Primär- oder Sekundärprävention?	Sekundärprävention
Referenz	[75]
Definition kardiovaskulärer Mortalität	Tod durch Herzinfarkt, plötzlicher Herztod, Tod nach kardiovaskulärer Intervention, Schlaganfall, andere kardiovaskuläre Ereignisse

Die Emory Cardiovascular BioBank (EmCAB) ist ein prospektives Register von Patienten, die sich an drei Emory Healthcare Zentren einer Koronarangiographie unterzogen haben. Seit der Einrichtung 2003 wurden mehr als 7000 Patienten eingeschlossen. Patienten mit angeborenen Herzfehlern, schwerer Klappenerkrankung, schwerer Anämie, kürzlich zurückliegender Transfusion, Myokarditis und aktiver inflammatorischer Erkrankung wurden ebenso ausgeschlossen wie Patienten, die nicht in der Lage oder gewillt waren, die schriftliche Einverständniserklärung zu unterzeichnen (nahezu 5%). Die eingeschlossenen Patienten wurden ein und 5 Jahre nach Studieneinschluss telefonisch nachverfolgt. Zusätzlich wurden Informationen aus Behandlungsunterlagen, dem Social Security Death Index, dem State Record, aus Todesanzeigen und Todesbescheinigungen sowie durch Befragung von Angehörigen gesammelt, um die Details zu

den kardiovaskulären Ereignissen zu verifizieren. Die Studie wurde durch das Institutional Review Board (IRB) der Emory Universität (Atlanta, Georgia, USA) genehmigt und die Genehmigung jährlich überprüft. Alle Teilnehmer willigten schriftlich ein. Bei 934 Kaukasier lagen genotypische Daten vor und wurden somit in die aktuelle Analyse eingeschlossen. Der mediane Follow-up Zeitraum betrug 5 Jahre, 26% der Patienten wurden zensiert. Die kardiovaskuläre Mortalität wurde als plötzlicher Herztod, tödlicher Myokardinfarkt, Tod durch Herzinsuffizienz oder Tod im Anschluss an eine Koronarintervention sowie Schlaganfall definiert.

INVEST Studie

Anzahl der Teilnehmer an der genetischen Studie	742 hellhäutige Menschen
Medianer Follow-up Zeitraum	13,9 Jahre
% Verluste während dem Follow-up	2,5%
Methode der Genotypisierung	Illumina Omni Express Exome imputiert auf 1000 Genomes Phase 1 Version 3; die Dateien wurden in PLINK-Format überführt und rs10754555 ausgewählt
Studie zur Primär- oder Sekundärprävention?	Sekundärprävention
Referenz	[64]
Definition kardiovaskulärer Mortalität	Primärer Endpunkt: Tod (jede Ursache), nicht-tödlicher Myokardinfarkt, nicht-tödlicher Schlaganfall Sekundärer Endpunkt: Tod an kardiovaskulärer Erkrankung

Die INVEST Studie ist eine randomisierte, unverblindete Endpunktstudie an 22576 hypertensiven KHK-Patienten über 50 Jahre, die entweder eine Therapie mit einem Calciumantagonisten (calcium antagonist strategy (CAS)) oder ohne (non-calcium antagonist strategy (NCAS)) erhielten. Die Patienten wurden entweder in die CAS (Verapamil)- oder NCAS (Atenolol)-Gruppe randomisiert. Die Blutdruckziele lehnten sich an den 6. Report des Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation and Treatment of High Blood Pressure (JNC VI) an. Ziel war ein Blutdruck <140/90mmHg, bei Diabetes oder chronischer Nierenerkrankung

<130/85mmHg. Wurden diese nicht erreicht, so wurde die CAS-Gruppe zusätzlich mit Trandolapril, die NCAS-Gruppe zusätzlich mit Hydrochlorothiazid behandelt. Trandolapril wurde bevorzugt bei Patienten mit Herzinsuffizienz, Diabetes oder chronischer Nierenerkrankung. In die aktuelle Analyse wurden weiße Patienten einbezogen, bei denen die Daten der Genotypisierung vorlagen.

PLATO Studie

Anzahl der Teilnehmer an der genetischen Studie	9980
Medianer Follow-up Zeitraum	362 Tage
% Verluste während dem Follow-up	0%
Methode der Genotypisierung	Illumina HumanOmni2.5-4v1 (Omni2.5) BeadChip (Illumina, San Diego, CA, USA)
Studie zur Primär- oder Sekundärprävention?	Sekundärprävention
Referenz	[145]
Definition kardiovaskulärer Mortalität	Tod an einer kardiovaskulären oder zerebrovaskulären Erkrankung und Tod unbekannter Ursache

Die PLATO Studie ist eine randomisierte, doppelblinde Multicenter-Studie, die Ticagrelor mit Clopidogrel zur Prävention eines kardiovaskulären Ereignisses verglichen hat. Eingeschlossen wurden 18624 Patienten, die sich mit einem akuten Koronarsyndrom mit oder ohne ST-Hebungen im Krankenhaus vorstellten. Bei 9980 Patienten lagen die Daten der Genotypisierung vor, sodass ein Einschluss in die aktuellen Analysen erfolgte. Die Studie wurde in Einvernehmen mit der Deklaration von Helsinki durchgeführt und vom zuständigen Kontrollausschuss geprüft. Ein schriftliches Einverständnis der Teilnehmer wurde vorausgesetzt.

STABILITY Studie

Anzahl der Teilnehmer an der genetischen Studie	10786
Medianer Follow-up Zeitraum	3,7 Jahre
% Verluste während dem Follow-up	0%

Methode der Genotypisierung	HumanOmniExpressExome-8v1 array
Studie zur Primär- oder Sekundärprävention?	Sekundärprävention
Referenz	[161]
Definition kardiovaskulärer Mortalität	Tod durch Schlaganfall, Arrhythmien, plötzlicher Herztod (beobachtet/unbeobachtet), Myokardinfarkt, Herzinsuffizienz, Lungenarterienembolie, pAVK, Komplikationen einer kardiovaskulären Intervention

Die STABILITY Studie ist eine multinationale, doppelblinde Studie, in die 15828 Patienten mit stabiler KHK eingeschlossen wurden. Die Patienten wurden randomisiert in eine Darapladib- oder Placebo-Gruppe. Bei 10786 Patienten wurden genotypische Daten erhoben. Diese wurden in die aktuelle Analyse einbezogen. In der STABILITY Studie wurden alle Patienten entsprechend den gültigen Leitlinien zur Sekundärprävention der KHK behandelt. Während der Studie wurden Standardmesswerte erhoben, um die Adhärenz zu den Leitlinien zu kontrollieren. Die Studie wurde vom zuständigen Kontrollausschuss genehmigt. Eine schriftliche Einverständniserklärung wurde von den Teilnehmern unterzeichnet.

PROSPER Studie

Anzahl der Teilnehmer an der genetischen Studie	5244
Medianer Follow-up Zeitraum	1241 Tage
% Verluste während dem Follow-up	0%
Methode der Genotypisierung	Illumina 660K BeadChip
Studie zur Primär- oder Sekundärprävention?	50% Primär-, 50% Sekundärprävention
Referenz	[120,121,141]
Definition kardiovaskulärer Mortalität	Definitiver Tod an einer KHK (einer oder beide der folgenden Kriterien müssen erfüllt sein): a) Todesbescheinigung oder gleichwertiges Dokument mit übereinstimmender

	<p>zugrundeliegender oder unmittelbarer Ursache und: (1) vorherige Hospitalisation aufgrund eines definitiven oder gesicherten Myokardinfarkt; (2) vorhergehende Angina pectoris oder vermuteter oder definitiver Myokardinfarkt, wenn kein anderer Grund als eine KHK als Todesursache in Frage kommt; und (3) Obduktionsergebnis mit arterieller Thrombose und/oder akutem Myokardinfarkt. B) plötzlicher und unerwarteter Tod (alle 3 Bedingungen gefordert): (1) Tod innerhalb einer Stunde nach Symptombeginn oder zuletzt gesehen ohne Symptome; (2) keine bekannte nicht-atherosklerotische akute oder chronisch Erkrankung, die letal sein könnte; (3) ein unerwarteter Tod bei einer Person, die nicht innerhalb der letzten 24h vor ihrem Tod an einem Krankenhaus oder sonstiger Gesundheitseinrichtung wegen akuter Erkrankung in Behandlung war</p> <p>Tod an einer anderen vaskulären Erkrankung: Todesbescheinigung oder äquivalentes Dokument mit übereinstimmender zugrundeliegender oder unmittelbarer Ursache und adäquater Dokumentation der Geschehnisse vor dem Todeseintritt</p>
--	---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

Die PROSPER Studie ist eine prospektive, multizentrische, randomisierte, placebo-kontrollierte Studie, die untersuchen sollte, inwiefern eine Therapie mit Pravastatin das Risiko für große kardiovaskuläre Ereignisse bei älteren Patienten verringert. Zwischen Dezember 1997 und Mai 1999 wurden in Schottland (Glasgow), Irland (Cork) und in den Niederlanden (Leiden) Männer und Frauen zwischen 70 und 82 Jahren rekrutiert. Voraussetzung war eine vorbestehende kardiovaskuläre Erkrankung oder ein erhöhtes Risiko für eine solche Erkrankung auf-

grund von Nikotinabusus, arterieller Hypertonie oder Diabetes. Insgesamt wurden 5804 Personen randomisiert entweder zu Pravastatin oder Placebo. Im anschließendem PHASE Projekt erfolgte die Genomuntersuchung. In die akutellen Analysen wurden nur Patienten unter 65 Jahren einbezogen. Die Studie wurde von den Ethikkommissionen der beteiligten Zentren geprüft und alle Patienten gaben ihr schriftliches Einverständnis.

3.10. Statistische Analysen

Kontinuierliche Variablen wurden als Mittelwert \pm Standardabweichung angegeben, vorausgesetzt es lag eine Normalverteilung der Daten vor. Im Falle von nicht normalverteilten Daten wurden Median und Interquartilsabstand (IQR) angegeben. Kategoriale Variablen wurden als Häufigkeiten angegeben. Differenzen zwischen kontinuierlichen Variablen wurden entweder mittels einfacher Varianzanalyse oder dem Kruskal Wallis Test untersucht. Mit dem Chi-Quadrat-Test wurden Unterschiede zwischen kategorialen Variablen untersucht. Um alters- und geschlechtsadjustierte Mittelwerte für hsCRP und SAA in Bezug auf den rs10754555 SNP-Trägerstatus zu bestimmen, wurden generalisierte lineare Modelle verwendet. In der LURIC Studie wurde die Assoziation zwischen dem rs10754555 Genotyp und der Prävalenz einer KHK, schweren KHK oder Myokardinfarkt sowie Mortalität mittels logistischer und Cox-Regression bestimmt. Eine schwere KHK wurde hierbei definiert als eine visuell eingeschätzte $\geq 50\%$ Stenose der Koronararterien während der Koronarangiographie. Um den Einfluss des Alters zu bewerten, wurde die Interaktion zwischen dem SNP rs10754555 Trägerstatus und dem Alter in die jeweiligen Untersuchungen miteinbezogen. Außerdem wurden die Patienten in zwei Gruppen unterteilt: in der LURIC Studie in Patienten über und unter 60 Jahre (entsprechend dem unteren Tertial) und in der UKBioBank Studie in Patienten über und unter 50 Jahre (entsprechend dem untersten Quartil). Die univariaten und multivariaten Analysen wurden adjustiert für das Alter der Patienten, das Geschlecht, das Vorhandensein eines Diabetes mellitus, den systolischen Blutdruck, den Body-Mass-Index (BMI), einen Nikotinabusus, die geschätzte glomeruläre Filtrationsrate (eGFR), das LDL-Cholesterin (LDL-C), das hsCRP, das Vorhandensein einer KHK sowie für einen vorherigen Myokardinfarkt.

In den experimentellen Studien wurde zur Untersuchung eines signifikanten Unterschieds zwischen den rs10754555 Genotypen zuerst eine einfaktorische Varianzanalyse durchgeführt, gefolgt vom Dunnett Post-hoc Test.

Die Verteilung der verschiedenen Genotypen wurde auf Abweichungen vom Hardy-Weinberg Äquilibrium mittels des Chi-Quadrat-Tests untersucht (<https://ihg.helmholtz-muenchen.de/cgi-bin/hw/hwa1.pl>).

Um zu untersuchen, ob eine Assoziation zwischen dem rs10754555 Trägerstatus und erhöhter kardiovaskulärer Mortalität besteht, wurden Metaanalysen durchgeführt. Es wurden Hazard Ratios und Standardfehler bestimmt, die in multivariaten adjustierten Cox-Regressionsanalysen auf Patientenebene in jeder Studie berechnet wurden. Das STATA Paket „metan“ wurde verwendet, um standardnormalverteilte Random-Effekt gewichtete Metaanalysen durchzuführen. Die Heterogenität zwischen den einzelnen Studien wurde als I^2 angegeben [58]. Um „Small Study Effects“ auszuschließen, wurde der Egger Test durchgeführt, der im STATA Paket „metabias“ enthalten ist. Methylierungsanalysen wurden mittels multivariater linearer Regressionsanalysen durchgeführt, wobei der β -Wert, der den Methylierungsstatus anzeigt und Werte zwischen 0 (unmethyliert) und 1 (methyliert) annimmt, als unabhängige Variable R betrachtet wird. Alle anderen Analysen wurden mit der SPSS-Version 21.0 und R Version 3.3.3 durchgeführt. Das Signifikanzniveau wurde auf 0,05 festgelegt.

4. Ergebnisse

4.1. Varianten im *Nlrp3*-Gen

In der LURIC-Studie wurden Patienten rekrutiert, die sich einer Koronarangiographie unterzogen haben. Aus einer Kohorte von 3061 Teilnehmern wurden SNPs im *Nlrp3*-Gen selektiert. Das schematische Vorgehen von der SNP-Identifikation bis zur experimentellen Validierung ist in **Abbildung 9** dargestellt.

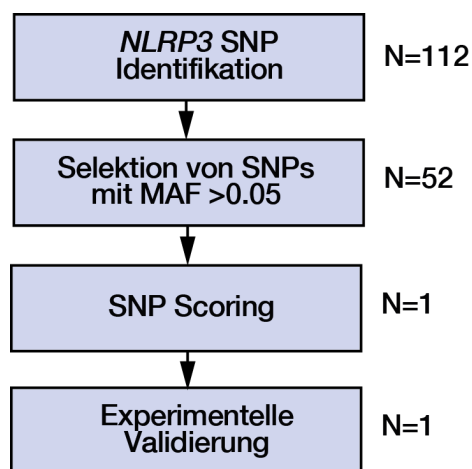


Abb. 9: Schematisches Vorgehen von der SNP-Identifikation bis zur experimentellen Validierung, Abbildung entnommen aus Schunk *et al.* Eur Heart J 2021

Insgesamt wurden 112 SNPs im *Nlrp3*-Gen identifiziert. Um seltene Allele auszuschließen, wurden nur solche SNPs ausgewählt, die eine MAF (minor allele frequency) $> 0,05$ aufwiesen. Diese Kriterien wurden von insgesamt 52 SNPs erfüllt. Im Anschluss erfolgte ein Scoring der SNPs. Dies erfolgte, wie bereits in Material- und Methodik-Teil beschrieben, angelehnt an das Scoring-System der Regulome-Datenbank. Auswahlkriterium für die weiteren Analysen war ein Score von 1. Dies erfüllte lediglich der SNP rs10754555, welcher dann für die experimentelle Validierung herangezogen wurde.

Für rs10754555 konnte ein signifikanter Zusammenhang mit einer erhöhten Gesamtmortalität nachgewiesen werden, wie in **Abbildung 10** gezeigt ist. In diesem Volcano Plot ist die Assoziation zwischen den 112 in der LURIC-Studie identifizierten *Nlrp3*-SNPs und der Gesamtsterblichkeit dargestellt, berechnet mittels univariater Cox-Regressionsmodelle.

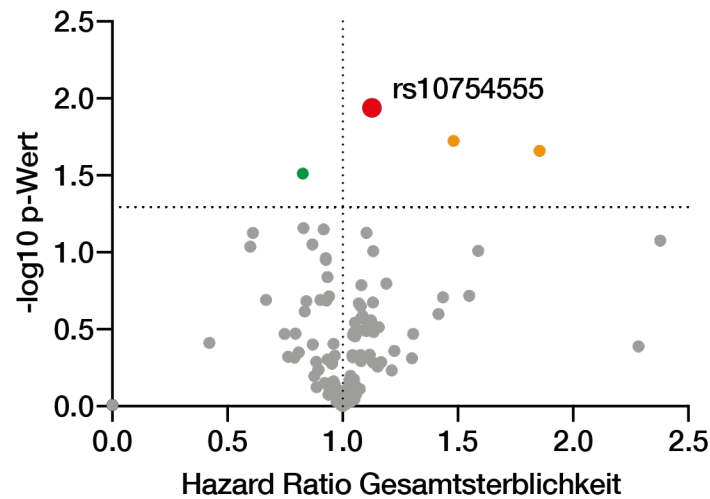


Abb. 10: Assoziation von rs10754555 mit der Gesamtsterblichkeit, Abbildung entnommen aus Schunk *et al.* Eur Heart J 2021

Um den eQTL-Effekt von rs10754555 auf die *Nlrp3*-Expression zu validieren, wurde die Assoziation zwischen rs10754555 und der *Nlrp3*-mRNA-Expression sowohl in Vollblut als auch in PBMCs untersucht. Dies erfolgte in 36 Kohorten, welche insgesamt 31556 Probanden enthielten, die im eQTL-Gen-Konsortium enthalten waren [144]. Der cis-eQTL-Effekt für NLRP3 im Vollblut ist in **Abbildung 11** dargestellt.

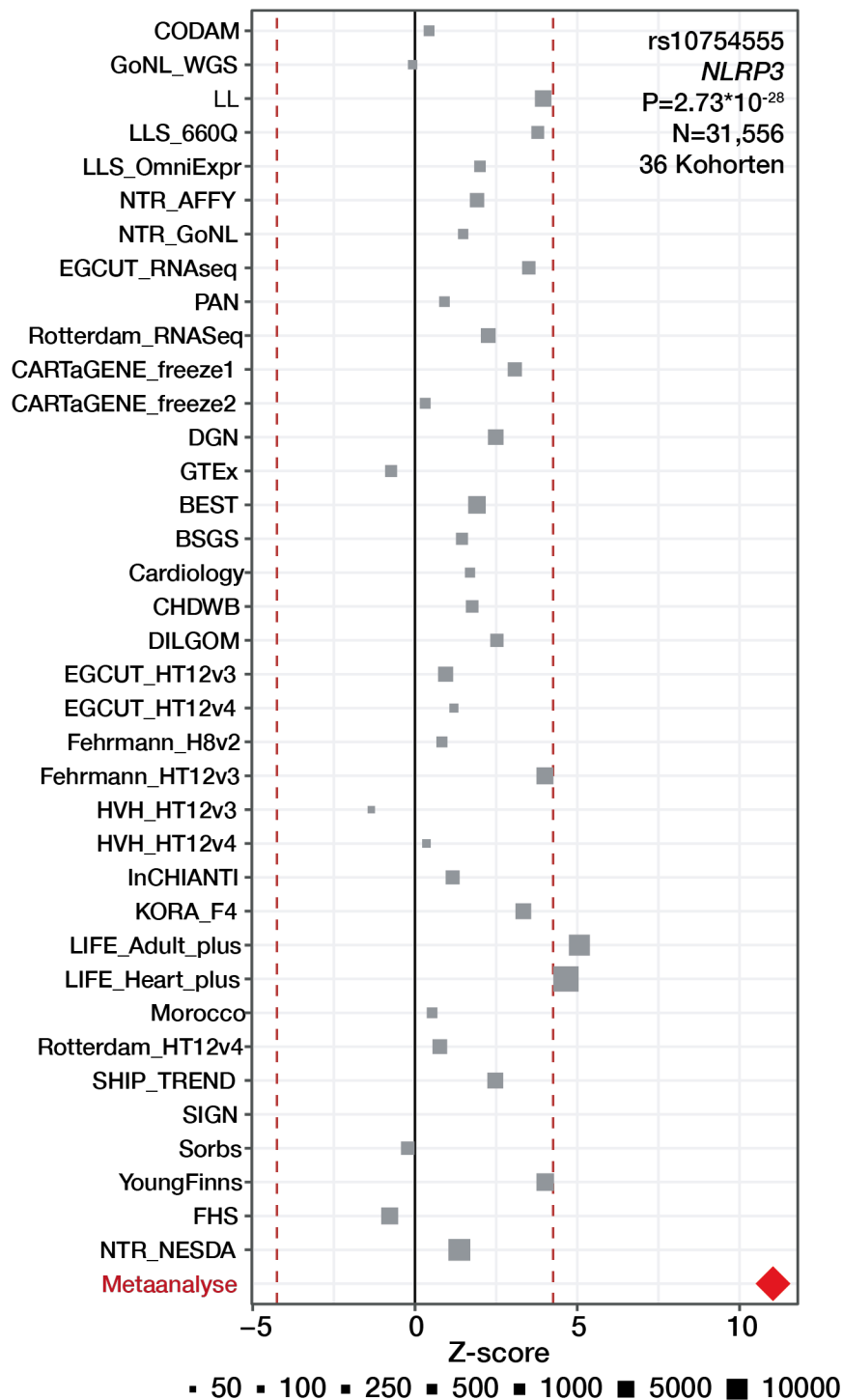


Abb. 11: cis-eQTL Effekt für NLRP3 im Vollblut, Abbildung entnommen aus Schunk *et al.* Eur Heart J 2021

In dieser Analyse zeigte rs10754555 einen signifikanten eQTL-Effekt auf die *Nlrp3*-Expression (Z-Score 11,03, FDR <0,05, $p=2,73 \cdot 10^{-28}$).

Die Allel- und Genotypenhäufigkeit waren konsistent mit dem Hardy-Weinberg-Äquilibrium, detailliert aufgeführt in **Tabelle 3**.

Tab. 3: Allel-/Genotypenhäufigkeit und Hardy-Weinberg-Äquilibrium für rs10754555 von LURIC-Teilnehmern

	Allelhäufigkeit		Genotypenhäufigkeit			Hardy-Weinberg-Äquilibrium p-Wert
	C	G	CC	CG	GG	
N=3061	3681 (60,1%)	2441 (39,9%)	1106 (36,1%)	1469 (48,0%)	486 (15,9%)	0,999

HaploReg 4.1 sagte für rs10754555 eine Assoziation mit der DNA-Methylierung voraus. In **Tabelle 4** sind die genomweiten Methylierungsanalysen dargestellt.

Tab. 4: Assoziation zwischen der rs10754555 *Nlrp3*-Genvariante und der Methylierung im *Nlrp3*-Genlocus innerhalb von genomweiten Methylierungsanalysen bei 1262 Teilnehmern der LURIC Studie (SEM= standard error of the mean; FDR=false discovery rate)

IlmnID	BETA	SEM	p-Wert	FDR p-Wert	Position (GRCh37)
cg05615449	0.045334469	0.004870431	6.25267E-20	2.18843E-18	247601478
cg19845212	-0.00980795	0.001398745	3.97113E-12	6.94948E-11	247578503
cg16389578	0.010330377	0.001750247	4.69597E-09	5.47863E-08	247598641
cg18183941	-0.00640765	0.001184223	7.60799E-08	6.65699E-07	247578552
cg18126557	0.00545235	0.001155897	2.68299E-06	1.87809E-05	247611842
cg19134764	0.00222652	0.000490016	6.10032E-06	3.55852E-05	247582035

Ergebnisse

cg00789037	-0.003533938	0.000986511	0.000354677	0.00164034	247580310
cg21806273	-0.003591059	0.001006585	0.000374935	0.00164034	247578953
cg21991396	-0.003860941	0.001135606	0.000696922	0.002710251	247581417
cg07313373	-0.001872852	0.000568175	0.001009329	0.003532653	247579131
cg18678599	-0.004064383	0.001250986	0.001191392	0.003790792	247581456
cg24104249	0.003133336	0.000980939	0.001439646	0.004198966	247600998
cg11628370	0.005881772	0.001887053	0.001872269	0.005040725	247609300
cg21824010	-0.003111005	0.001030742	0.002597876	0.00649469	247578859
cg26112639	-0.001886143	0.000763975	0.013697155	0.031960027	247580106
cg09226051	0.013609347	0.005904729	0.02135157	0.046706559	247611502
cg05396897	0.009525451	0.004389216	0.030193476	0.062163039	247611448
cg11422335	0.007329541	0.004192193	0.080661591	0.156841982	247611517
cg14413862	0.00086233	0.000551615	0.118257793	0.217843302	247582066
cg00448525	-0.001788711	0.001185208	0.131519583	0.23015927	247581408
cg12280471	0.001346971	0.00092385	0.145110393	0.241850656	247587794
cg10877667	0.000534592	0.000385452	0.165730105	0.252544443	247579439
cg23087653	0.001135519	0.000819173	0.165957777	0.252544443	247581883
cg06487775	0.000898007	0.000674992	0.183647869	0.267819808	247595137
cg06710101	0.000712549	0.000567924	0.209855264	0.29379737	247587253

Ergebnisse

cg07164722	-0.000503734	0.000495231	0.309283366	0.416342993	247587378
cg18793688	-0.00021645	0.000262189	0.409229527	0.53048272	247588074
cg09418290	0.000208405	0.000292104	0.475701757	0.582733257	247579319
cg21919599	-0.000270473	0.000385303	0.482836128	0.582733257	247579312
cg03466998	-0.000861347	0.001593357	0.588896047	0.687045388	247580074
cg03505654	0.000182325	0.000579431	0.753074544	0.850245453	247579608
cg19023876	-0.00011129	0.000460034	0.808886566	0.884719681	247611931
cg25602756	-5.50464E-05	0.000494477	0.911379794	0.942584962	247611881
cg10155695	-5.50894E-05	0.000520042	0.915653963	0.942584962	247582028
cg15081929	-3.18609E-05	0.000882242	0.971197989	0.971197989	247585044

Hierbei war rs10754555 mit einer signifikant erhöhten Methylierung der CpG-Insel mit der ID cg05615449 innerhalb des *Nlrp3*-Genlocus assoziiert ($p=2,2 \cdot 10^{-16}$ für heterozygote rs10754555 Träger im Vergleich zu Nicht-Trägern).

Daten des Roadmap Epigenomics Projekt deuten darauf hin, dass rs10754555 mit Promotor- und Enhancer-Histon-Markern und einer DNase-Hypersensitivität assoziiert ist, was in **Abbildung 12** dargestellt ist.

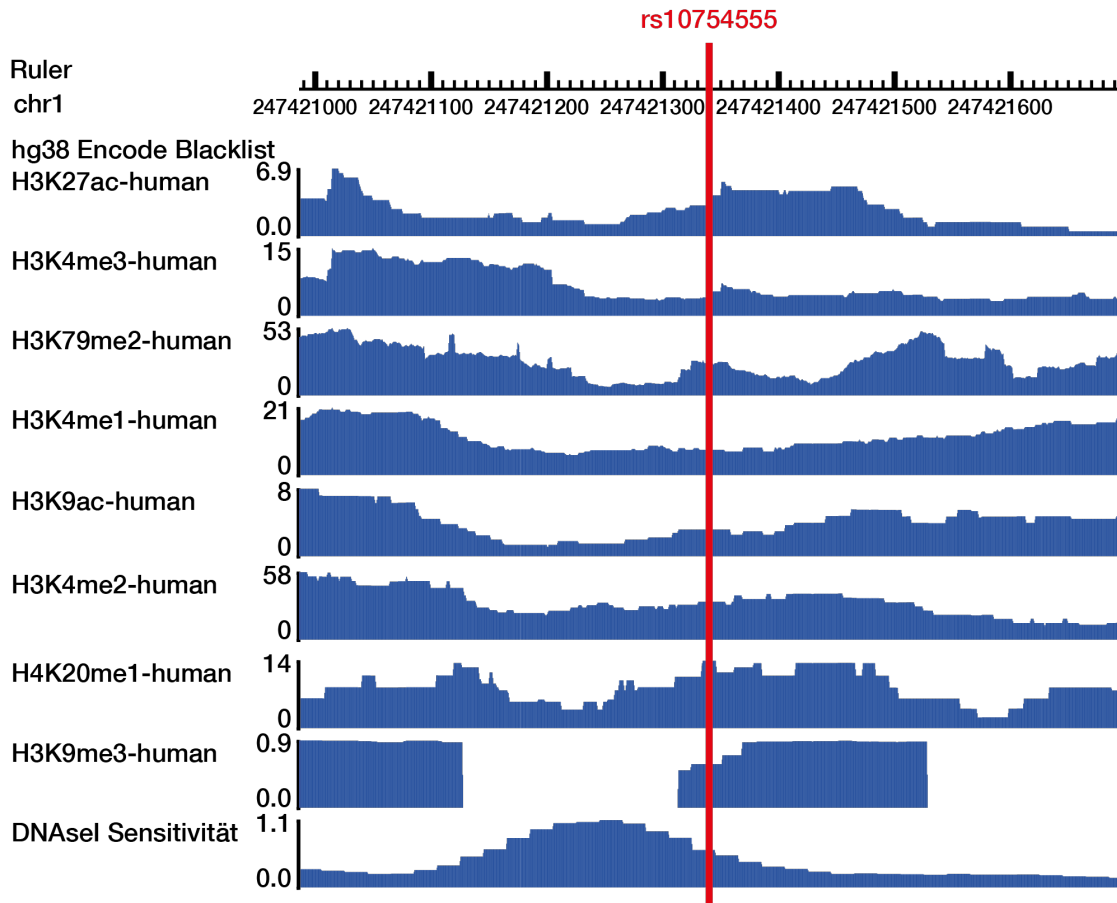


Abb. 12: Assoziation von rs10754555 mit Promotor und Enhancer-Histonmarkern, sowie mit DNase Tracks, abgeleitet vom Roadmap Epigenomics Project in humanen CD14+ Monozyten, Abbildung entnommen aus Schunk *et al.* Eur Heart J 2021

Außerdem zeigten homozygote rs10754555 Träger, wie in **Abbildung 13** zu sehen, eine signifikant höhere Konzentration der Entzündungsparameter hsCRP und SAA im Blut im Vergleich zu Nicht-Trägern. Dies deutet darauf hin, dass diese Genvariante mit einer erhöhten systemischen pro-inflammatorischen Wirkung assoziiert ist. Angegeben sind in der folgenden Abbildung die alters- und geschlechtsadjustierten Mittelwerte von hsCRP und SAA bei Teilnehmern der LURIC-Studie.

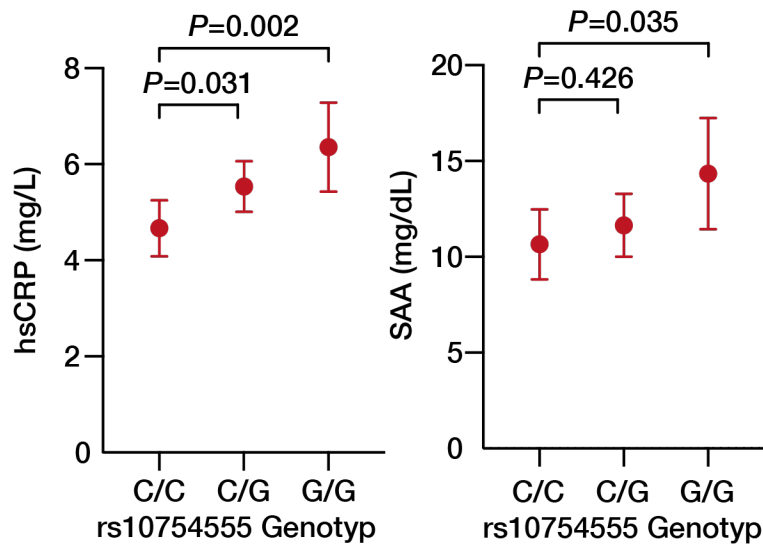


Abb. 13: rs10754555 Genotyp und Konzentration von hsCRP und SAA, Abbildung entnommen aus Schunk *et al.* Eur Heart J 2021

4.2. Biologische Relevanz von rs10754555

4.2.1. Biologische Relevanz von rs10754555 *in vitro*

Um die biologische Relevanz der rs10754555 Variante zu untersuchen, wurden Monozyten von 348 Probanden isoliert. Untersucht wurde, wie in **Abbildung 14** dargestellt, die Assoziation zwischen dem rs10754555 Trägerstatus und der Inflammationaktivierung.

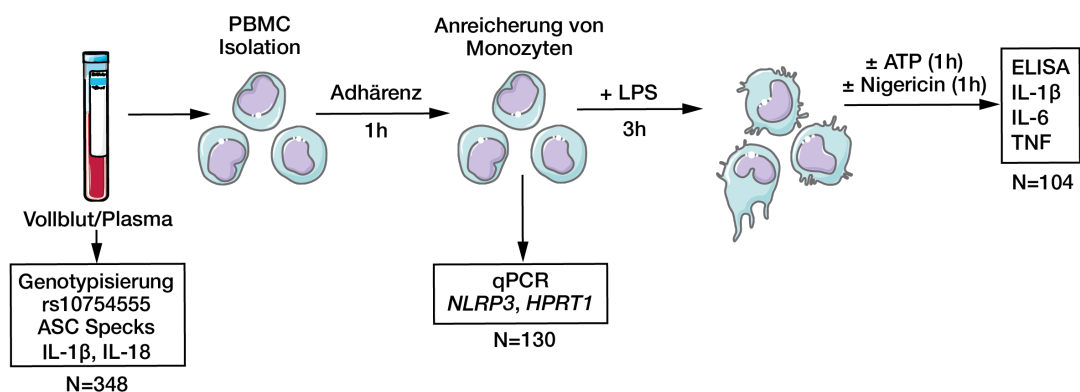


Abb. 14: Monozytenisolation und -stimulation, Abbildung entnommen aus Schunk *et al.* Eur Heart J 2021

Die Charakteristika der Probanden, deren Blutproben für die experimentellen Untersuchungen herangezogen wurden, sind in **Tabelle 5** nach Genotypen getrennt dargestellt.

Tab. 5: Charakteristika der Probanden für die experimentelle Untersuchung nach Genotypen getrennt

	rs10754555 C/C (n=69)	rs10754555 C/G (n=163)	rs10754555 G/G (n=116)	p-Wert
Alter	60,4±13,4	61,3±14,6	62,5±14,7	0,632
Geschlecht (% männlich)	64,8	71,6	73,2	0,448
BMI (kg/m ²)	28,7±6,4	29,7±4,2	28,6±5,1	0,253
Gesamtcholesterin (mg/dL)	195±46,3	190±45	182±44	0,146
Triglyceride (mg/dL)	138 (99)	140 (99)	133 (70)	0,201
LDL-Cholesterin (mg/dL)	127±39	120±42	114±37	0,113
HDL-Cholesterin	50±17	51±17	50±18	0,890
eGFR (ml/min/1,73m ²)	84,6±22,8	80,2±24,2	80,2±24,6	0,404
hsCRP (mg/mL)	4,9 (8,0)	6,5 (17,8)	8,7 (27,5)	0,174
KHK (%)	77,5	76,0	78,2	0,689
Diabetes (%)	36,1	35,2	34,0	0,803
Lipidsenkende Therapie (%)	1,8	3,9	6,2	0,415
Rauchen (%)	37,5	33,6	28,9	0,527
Arterielle Hypertonie (%)	69,6	70,3	72,2	0,933

Im Anschluss wurde die relative Expression der mRNA für *Nlrp3/Hprt1* und *Asc/Hprt1* für die verschiedenen rs10754555 Genotypen in frisch isolierten Monozyten untersucht. Es konnte,

wie in **Abbildung 15** dargestellt, gezeigt werden, dass die *Nlrp3*-mRNA-Expression in heterozygoten und homozygoten Trägern des G-Allels höher war im Vergleich zu der in PBMCs von Nicht-Trägern.

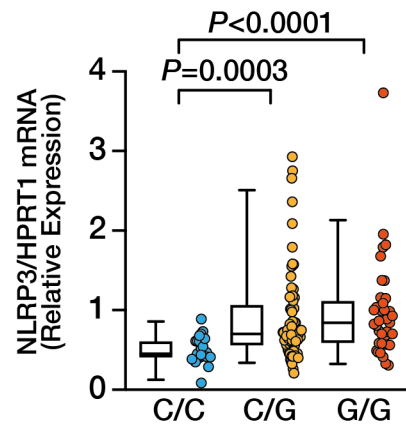


Abb. 15: *Nlrp3*-mRNA-Expression in frisch isolierten PBMCs, Abbildung entnommen aus Schunk *et al.* Eur Heart J 2021

Bedeutend ist zudem, dass die Plasmaspiegel von IL-18 und IL-1 β als NLRP3-abhängige Zytokine bei G-Allel-Trägern signifikant erhöht waren. In **Abbildung 16** sind die Plasmaspiegel in Abhängigkeit des Genotyps dargestellt.

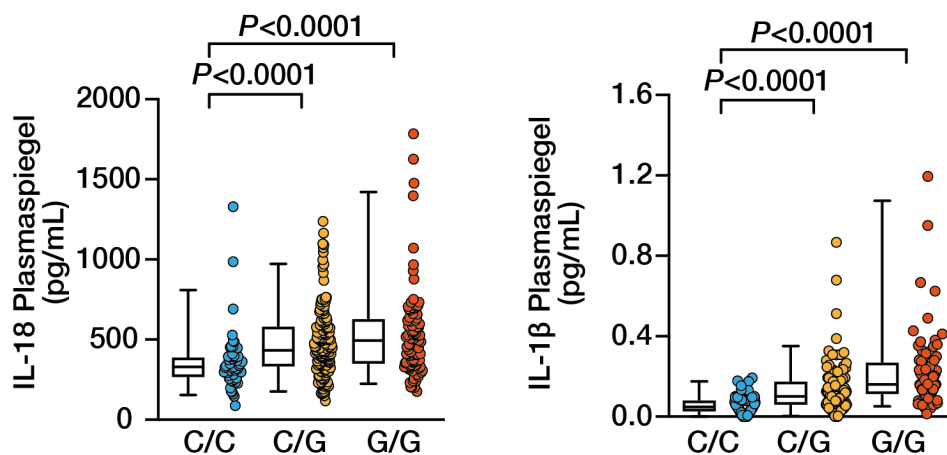


Abb. 16: Plasmaspiegel von IL-18 und IL-1 β abhängig vom rs10754555 Genotyp, Abbildung entnommen aus Schunk *et al.* Eur Heart J 2021

Um die NLRP3-Inflammasom-Aktivierung abhängig vom rs10754555-Trägerstatus zu bewerten, wurden die ASC-Specks im Plasma quantifiziert. Hierzu erfolgte initial eine Fluoreszenzmikroskopie mit markierten ASC-Specks aus Plasma und GFP-ASC im Überstand von THP-1-Zellen. Das Ergebnis ist in **Abbildung 17** dargestellt.

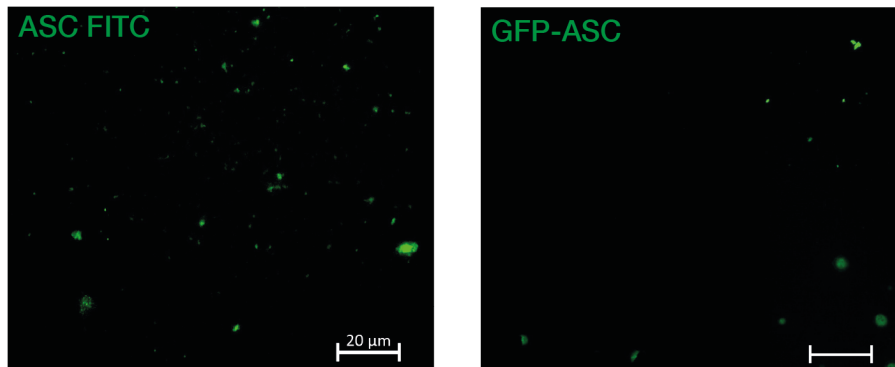


Abb. 17: Repräsentative Fluoreszenzmikroskopie von Alexa Fluor-488-markierten ASC-Specks aus Plasma und GFP-ASC im Überstand von THP-1-Zellen (repräsentativ von drei unabhängigen Experimenten), Abbildung entnommen aus Schunk *et al.* Eur Heart J 2021

Im Anschluss wurde die mittlere Fluoreszenz-Intensität von ASC-Specks in Abhängigkeit vom rs10754555 Genotyp ermittelt. **Abbildung 18** zeigt, dass das rs10754555 G-Allel mit signifikant mehr ASC-Specks im Plasma assoziiert war.

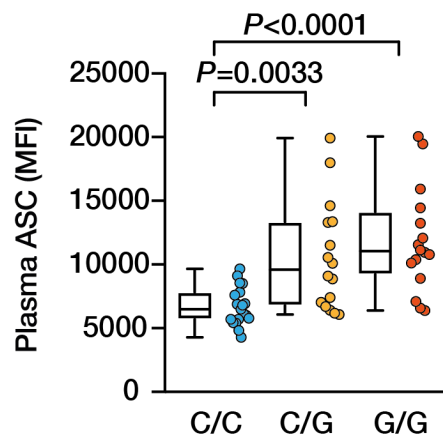


Abb. 18: Mittlere Fluoreszenz-Intensität (MFI) von ASC-Specks in Plasmaproben abhängig vom rs10754555 Genotyp, Abbildung entnommen aus Schunk *et al.* Eur Heart J 2021

Dies führt zu der Annahme, dass ein hetero- und homozygoter Trägerstatus für rs10754555 mit einer erhöhten Expression der NLRP3-Inflammasomkomponenten in Monozyten assoziiert ist.

Im nächsten Schritt wurde die Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms untersucht. Hierzu wurden die isolierten Monozyten mit bekannten Inflammasomaktivatoren (d.h. LPS, ATP und Nigericin) stimuliert. Gemessen wurde im Anschluss die IL-1 β -Freisetzung im Zellkulturüberstand. **Abbildung 19** zeigt, dass nach Stimulation mit LPS, LPS und ATP, sowie LPS und Nigericin die Monozyten von heterozygoten und homozygoten *Nlrp3* rs10754555 Trägern signifikant mehr IL-1 β freisetzen als Monozyten von Nicht-Trägern. Hierdurch wird die funktionelle Relevanz der rs10754555 *Nlrp3* Genvariante hervorgehoben.

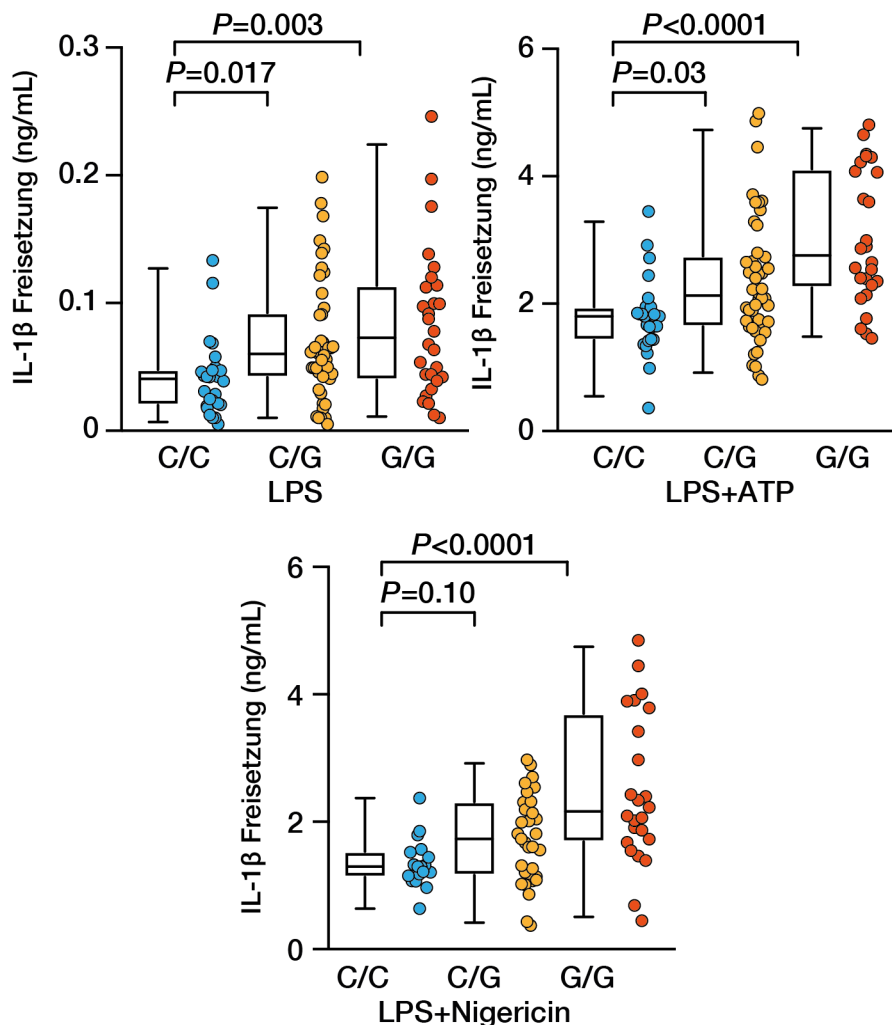


Abb. 19: Konzentration von IL-1 β im Überstand von frisch isolierten PBMCs nach Stimulation mit LPS (10ng/ml, 3h), LPS (3h) und ATP (5mM, 1h), LPS (3h) und Nigericin (1 μ M, 1h). Jeder Punkt repräsentiert einen individuellen Patienten, die Kastenrahmen stehen für das 5. und 95. Perzentil, Abbildung entnommen aus Schunk *et al.* Eur Heart J 2021

Unstimulierte Monozyten sezernierten keine detektierbaren Konzentrationen von IL-1 β . Um die Spezifität dieser Resultate zu ermitteln, wurde die IL-6 und Tumornekrosefaktor- α (TNF- α)-Freisetzung im Zellkulturüberstand quantifiziert. Es zeigte sich, wie in **Abbildung 20** zu sehen ist, kein Unterschied in den Konzentrationen dieser NLRP3-Inflammasom-unabhängigen Zytokine in Abhängigkeit des rs10754555 Trägerstatus.

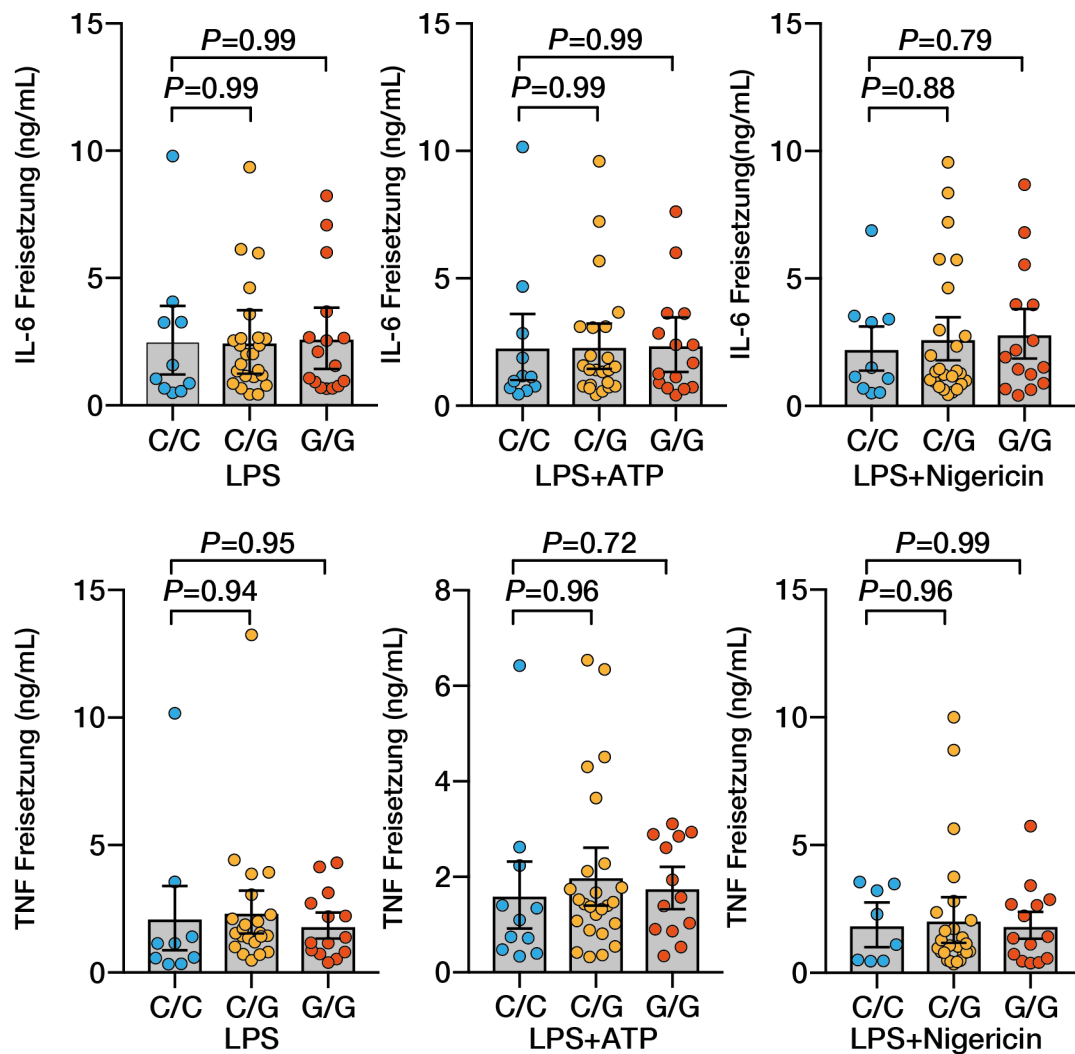


Abb. 20: Konzentration von IL-6 und TNF- α im Überstand von frisch isolierten PBMCs nach Stimulation mit LPS (10ng/ml, 3h), LPS (3h) und ATP (5mM, 1h), LPS (3h) und Nigericin (1 μ M, 1h). Jeder Punkt repräsentiert einen individuellen Patienten, angegeben werden Mittelwert \pm 95% Konfidenzintervall, Abbildung entnommen aus Schunk *et al.* Eur Heart J 2021

4.2.2. Biologische Relevanz von rs10754555 *in vivo*

Um die Relevanz von rs10754555 *in vivo* zu überprüfen, wurden in immuninkompetente NOD-SCID-Mäusen humane PBMCs von Nicht-Trägern des SNPs und PBMCs von homozygoten rs10754555 Trägern transplantiert. Im Anschluss wurden die Mäuse der perivaskulären Carotis-Schädigung zugeführt. Hierbei handelt es sich um ein Mausmodell für Reendothelialisierung, welche NLRP3-abhängig ist [155]. Der experimentelle Versuchsaufbau ist in **Abbildung 21** schematisch dargestellt.

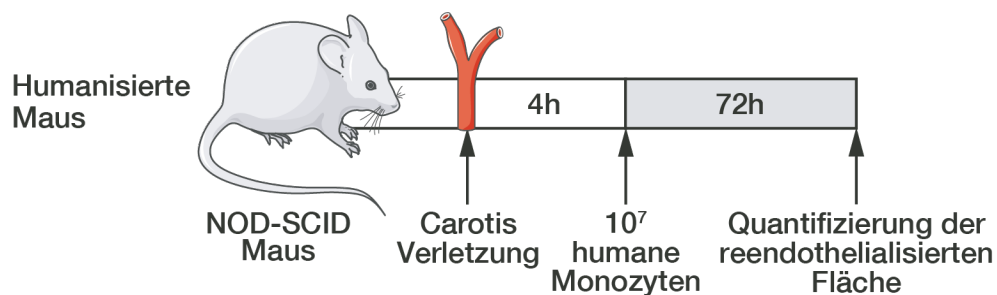


Abb. 21: Experimenteller Ablauf des Mausmodells zur perivaskulären Carotis-Verletzung in NOD-SCID-Mäusen, welchen humane PBMCs transplantiert wurden (d.h. humanisierte Mäuse), Abbildung entnommen aus Schunk *et al.* Eur Heart J 2021

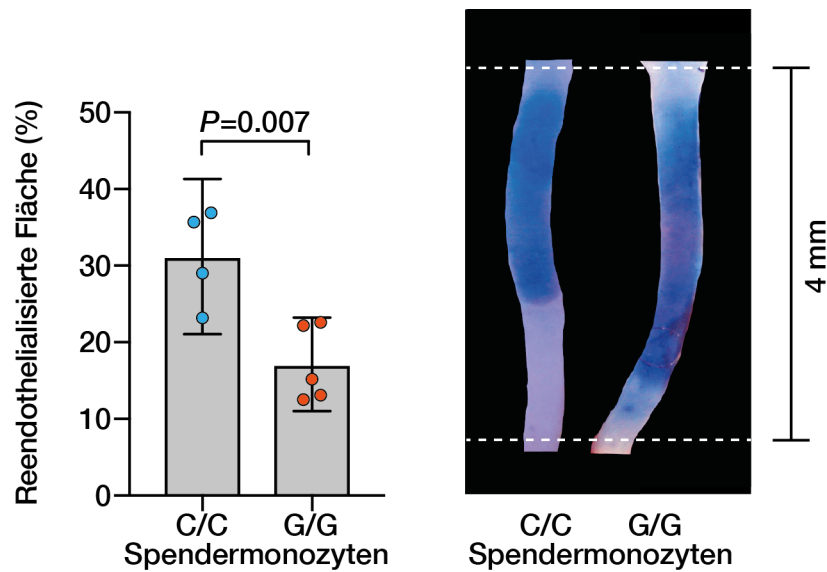


Abb. 22: Reendothelialisierte Fläche 72h nach Carotis-Verletzung in humanisierten Mäusen und repräsentative Mikrophotographie, Abbildung entnommen aus Schunk *et al.* Eur Heart J 2021

Abbildung 22 verdeutlicht, dass die Reendothelialisierung in den humanisierten Mäusen, in die PBMCs von homozygoten rs10754555 Trägern transplantiert wurden, signifikant vermindert war. Bei den homozygoten SNP-Trägern war die NLRP3-Proteinexpression höher im Vergleich zu Nichtträgern. Das Ergebnis des Western Blot ist in **Abbildung 23** dargestellt.

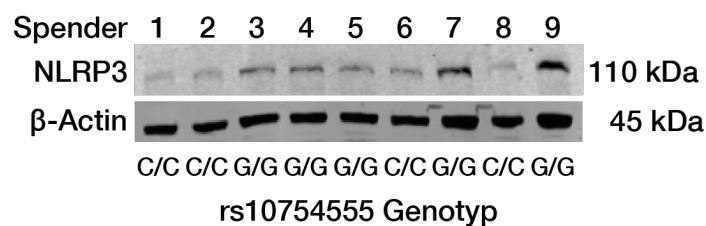


Abb. 23: Western Blot der NLRP3-Proteinexpression in transplantierten PBMCs von neun individuellen Spendern. Mittelwert \pm 95%-Konfidenzintervall, Abbildung entnommen aus Schunk *et al.* Eur Heart J 2021

4.3. Assoziation zwischen rs10754555 und dem Risiko für KHK

4.3.1. Charakteristika der LURIC-Patienten

In **Tabelle 6** sind die Charakteristika der Patienten der LURIC-Studie getrennt nach rs10754555 Genotyp, BMI und eGFR dargestellt. In **Tabelle 7** erfolgte zusätzlich eine Einteilung in zwei Gruppen entsprechend des Alters in <60 Jahre und ≥60 Jahre.

Tab. 6: Charakteristika der Patienten der LURIC-Studie getrennt nach rs10754555 Genotyp, BMI (body mass index), eGFR (estimated glomerular filtration rate)

	Alle Patienten (n=3061)	rs10754555 (C/C) (n=1106)	rs10754555 (C/G) (n=1469)	rs10754555 (G/G) (n=486)	p-Wert
Alter	62,7±10,6	62,7±10,5	62,7±10,6	62,8±11,0	0,954
Geschlecht (%) männlich)	70,0	70,7	69,6	69,8	0,883
BMI (kg/m²)	27,5±4,1	27,5±4,0	27,6±4,1	27,0±3,8	0,138
Systolischer Blutdruck (mmHg)	141±24	142±23	141±24	140±24	0,524
Gesamtcholesterin (mg/dL)	190 (51)	191 (54)	192 (50)	188 (49)	0,486
Triglyceride (mg/dL)	146 (92)	150 (92)	146 (91)	141 (88)	0,308
HDL- Cholesterin (mg/dL)	39±11	38±11	39±11	39±11	0,180
LDL-Cholesterin (mg/dL)	117±34	118±35	116±33	115±36	0,227
HbA1c (%)	6,3±1,2	6,4±1,3	6,3±1,2	6,3±1,2	0,071

Ergebnisse

eGFR (ml/min/1,73m²)	81,7±20,1	80,9±20,5	82,3±19,7	82,0±21,1	0,203
KHK (%)	79,0	77,8	79,6	80,0	0,249
Diabetes (%)	40,4	43,1	38,7	39,3	0,064
Lipidsenkende Therapie (%)	49,0	48,0	48,8	51,6	0,217
Rauchen (%)	63,6	62,9	64,5	62,5	0,850
Arterielle Hyper- tonie (%)	72,7	73,6	73,3	68,7	0,085

Tab. 7: Charakteristika der Patienten der LURIC-Studie getrennt nach rs10754555 Genotyp und Alter (</≥60 Jahre)

	Alter <60 Jahre			Alter ≥60 Jahre		
	rs107545 55 (C/C)	rs107545 55 (C/G)	rs107545 55 (G/G)	rs107545 55 (C/C)	rs107545 55 (C/G)	rs107545 55 (G/G)
Alter	51,4±7,3	51,7±6,9	51,2±7,6	68,9±5,8	69,3±6,0	69,4±6,0
Geschlecht (% männlich)	79,9	74,1	78,4	65,7	67,0	64,8
BMI (kg/m²)	27,9±4,3	27,4±4,2	26,9±3,9	27,3±3,8	27,6±4,1	27,0±3,8
Systolischer Blutdruck (mmHg)	132±21	131±22	129±21	147±23	147±22	146±24
Gesamtcho- lesterin (mg/dl)	197,5±41, 0	192,7±40, 0	194±40,5	191,7±39, 3	191,4±36, 7	189,7±40, 9
Triglyceride (mg/dl)	156,0 (107,0)	154,0 (105,0)	142,5 (89,0)	145,0 (88,0)	141,0 (88,0)	138,0 (89,0)

Ergebnisse

HDL-Cholesterin (mg/dl)	36,9±9,4	38,2±10,4	39,3±12,6	38,9±11,0	39,4±11,1	38,7±10,4
LDL-Cholesterin (mg/dl)	119,5±36,5	115,0±34,8	118,4±36,1	117,0±34,9	116,6±32,2	113,2±35,5
HbA1c (%)	6,1±1,4	6,1±1,0	6,1±1,2	6,5±1,3	6,4±1,3	6,4±1,2
eGFR (ml/min/1,73 m²)	92,8±18,4	93,8±16,8	96,0±16,2	74,4±18,6	75,4±17,9	74,0±19,3
KHK (%)	68,6	71,5	76,7	82,8	84,5	81,9
Diabetes (%)	29,8	29,9	28,4	50,3	44,0	45,5
Lipidsenkende Therapie (%)	49,4	49,7	53,4	47,3	48,2	50,6
Rauchen (%)	73,3	73,2	79,0	57,3	59,3	53,3
Arterielle Hypertonie (%)	59,1	58,7	54,0	81,4	82,2	77,0

Die MAF (G) für rs10754555 betrug 39,9 %. Die Prävalenz der klassischen kardiovaskulären Risikofaktoren wie Alter, Geschlecht, BMI, Rauchen und arterielle Hypertonie sowie Parameter des Lipidstoffwechsels unterschieden sich nicht zwischen Trägern und Nicht-Trägern des rs10754555 *Nlrp3*-G-Allels. **Tabelle 8** zeigt, dass kein signifikanter Unterschied in der Dauermedikation der Teilnehmer zwischen den unterschiedlichen Genotypengruppen bestand.

Tab. 8: Pharmakotherapie der LURIC-Teilnehmer abhängig vom rs10754555 Genotyp

Medikation	rs10754555 Genotyp			p-Wert
	C/C	C/G	G/G	
ACE-Hemmer	54,8	52,9	53,0	0,613

AT2-Rezeptor-Antagonist	4,2	4,4	5,6	0,440
Betablocker	64,3	62,3	63,5	0,605
Calciumantagonist	16,4	15,6	16,1	0,847
Statin	46,2	47,3	49,9	0,388
Lipidsenkende Therapie (alle)	48,0	48,8	51,6	0,403
Diuretika	28,5	29,4	28,9	0,883

4.3.2. Assoziation zwischen rs10754555 und dem Risiko für eine (schwere) KHK bei LURIC-Patienten

In **Abbildung 24** dargestellt wird nun das Risiko einer (schweren) KHK als Funktion des rs10754555 Genotyps.

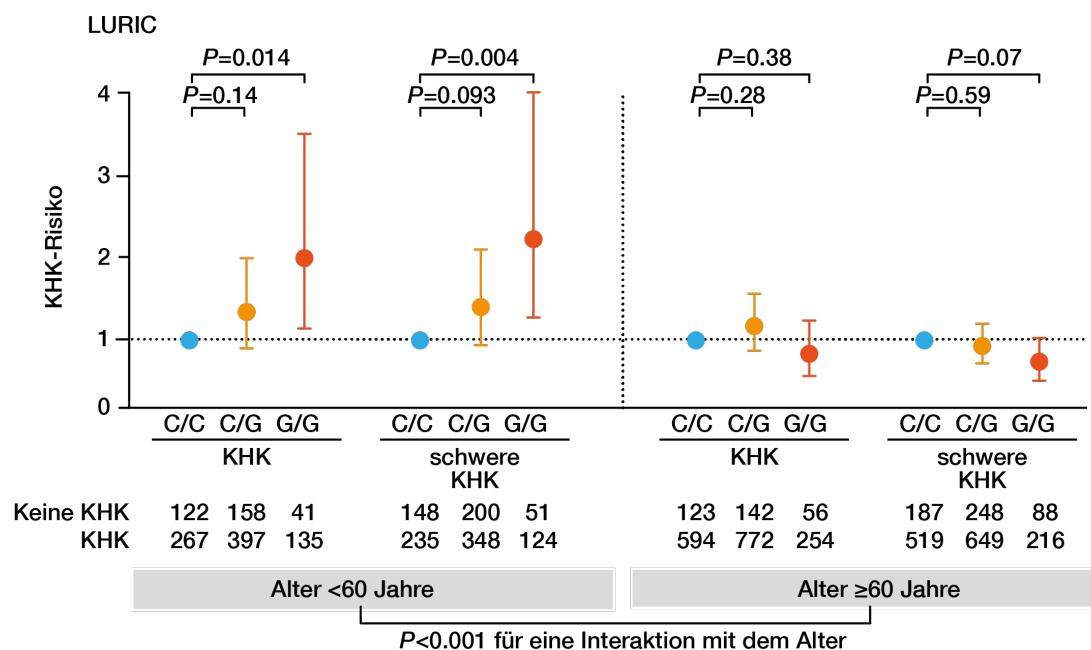


Abb. 24: Odds Ratio für die Prävalenz einer KHK und schweren KHK (definiert als visuelle Stenose $\geq 50\%$ in der Koronarangiographie) in Abhängigkeit vom rs10754555

Genotyp bei 3061 Teilnehmern der LURIC-Studie; Einteilung nach Alter in zwei Gruppen bei 60 Jahren (erstes Altersterzil), Abbildung entnommen aus Schunk *et al.* Eur Heart J 2021

Betrachtet man nun die Odds Ratio für eine prävalente (**Tabelle 9a**) und schwere (**Tabelle 9b**) KHK, definiert als visuell mindestens 50%-ige Stenose in der Koronarangiographie, so zeigt sich, dass im Vergleich zu Nicht-Trägern das Risiko für rs10754555 Träger an einer (schweren) KHK erkrankt zu sein signifikant erhöht war. Diese Assoziation konnte allerdings nur für Patienten unter 60 Jahren gezeigt werden (OR für eine KHK: 2,04, 95%-KI 1,15-3,61; OR für eine schwere KHK: 2,28, 95%-KI 1,29-4,01). Für über 60-Jährige konnte diese Assoziation nicht gezeigt werden (OR für eine KHK: 0,83, 95%-KI 0,55-1,25; OR für eine schwere KHK: 0,73, 95%-KI 0,49-1,03). Geteilt wurde hierbei das LURIC-Kollektiv von 3061 Teilnehmern in Patienten über und unter 60 Jahren (erstes Alterstertial). Dass diese Assoziation für über 60-jährige Patienten nicht gezeigt werden konnte, deutet darauf hin, dass rs10754555 einen altersabhängigen Effekt auf die Entwicklung von atherosklerotischen kardiovaskulären Erkrankungen aufweist ($p < 0,001$ für die Altersinteraktion).

Tab. 9a: Logistische Regressionsanalysen für eine prävalente KHK abhängig vom rs10754555 Genotyp in der LURIC-Studie (Model 1 adjustiert für Alter, Geschlecht, Diabetes, Rauchen, systolischer Blutdruck, BMI, lipidsenkende Therapie, LDL-Cholesterin, Myokardinfarkt und eGFR), p-Wert für die Interaktion (rs10754555 x Alter) $< 0,001$

Model	<i>Nlrp3</i> rs10754555 SNP	Prävalente KHK			
		Alter < 60 Jahre (n=1023)		Alter ≥ 60 Jahre (n=2038)	
		HR (95%-KI)	p-Wert	HR (95%-KI)	p-Wert
Crude	C/C	1	Ref.	1	Ref.
	C/G	1,20 (0,89-1,60)	0,234	1,08 (0,84-1,40)	0,548
	G/G	1,61	0,028	0,91	0,606

Ergebnisse

		(1,05-2,46)		(0,65-1,29)	
Model 1	C/C	1	Ref.	1	Ref.
	C/G	1,36 (0,90-2,04)	0,141	1,18 (0,87-1,59)	0,282
	G/G	2,04 (1,15-3,61)	0,014	0,83 (0,55-1,25)	0,378

Tab. 9b: Logistische Regressionsanalysen für eine prävalente schwere KHK abhängig vom rs10754555 Genotyp in der LURIC-Studie (Model 1 adjustiert für Alter, Geschlecht, Diabetes, Rauchen, systolischer Blutdruck, BMI, lipidsenkende Therapie, LDL-Cholesterin, Myokardinfarkt, eGFR), p-Wert für die Interaktion (rs10754555 x Alter) <0,001

Model	<i>Nlrp3</i> rs10754555 SNP	Prävalente schwere KHK			
		Alter < 60 Jahre (n=1023)		Alter ≥ 60 Jahre (n=2038)	
		HR (95%-KI)	p-Wert	HR (95%-KI)	p-Wert
Crude	C/C	1	Ref.	1	Ref.
	C/G	1,16 (0,87-1,53)	0,308	0,92 (0,74-1,14)	0,457
	G/G	1,64 (1,09-2,44)	0,016	0,88 (0,66-1,18)	0,383
Model 1	C/C	1	Ref.	1	Ref.
	C/G	1,42 (0,94-2,15)	0,093	0,93 (0,71-1,21)	0,586
	G/G	2,28 (1,29-4,01)	0,004	0,73 (0,49-1,03)	0,073

4.3.3. Validierung der Ergebnisse an GerMIFS-Studiendaten

Diese Erkenntnisse wurden in den GerMIFS Studien II-VII bekräftigt. validiert in **Abbildung 25** und **Tabelle 10** dargestellt, konnte auch hier gezeigt werden, dass rs10754555 mit einem erhöhten Risiko für KHK bei unter 60-Jährigen assoziiert war (OR 1,12, 95%-KI 1,02-1,22).

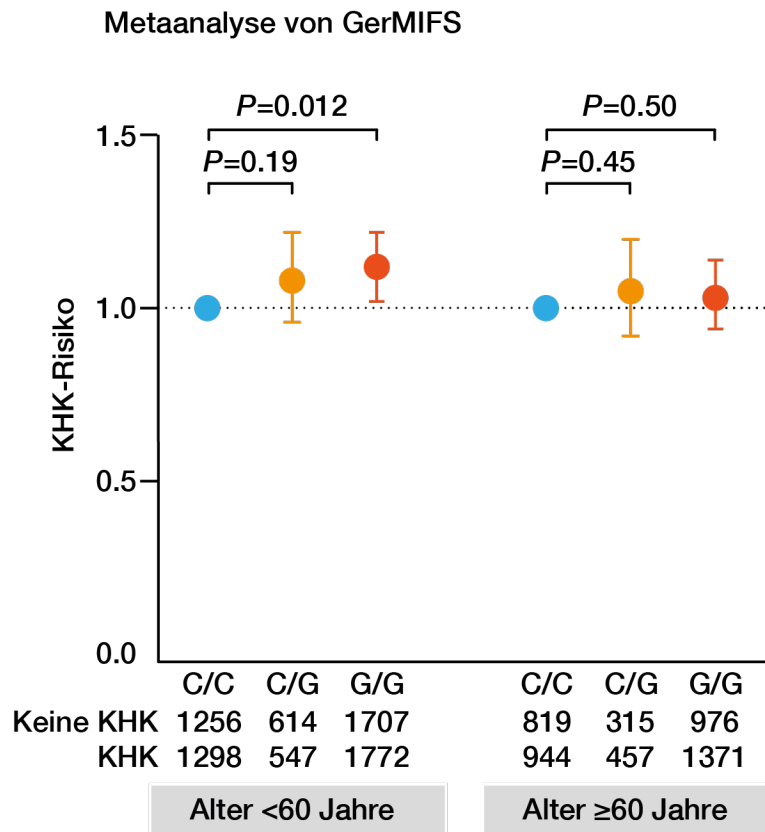


Abb. 25: Metaanalyse von 12076 Teilnehmern mit vorhandenen individuellen Patientendaten, welche in die GerMIFS-Studien eingeschlossen wurden, Ergebnisse adjustiert für Alter und Geschlecht, Abbildung entnommen aus Schunk *et al.* Eur Heart J 2021

Tab. 10: Logistische Regressionsanalyse für eine prävalente KHK abhängig vom rs10754555 Genotyp bei den GerMIFS-Studienteilnehmern, Model 1 adjustiert für Alter und Geschlecht

Model	<i>Nlrp3</i> rs10754555	Prävalente KHK

SNP					
		Alter <60 Jahre (N=7194)		Alter ≥60 Jahre (N=4882)	
		OR (95%-KI)	p-Wert	OR (95%-KI)	p-Wert
Crude	C/C	1	Ref.	1	Ref.
	C/G	1,08 (0,98-1,20)	0,128	1,03 (0,91-1,17)	0,639
	G/G	1,08 (1,00-1,16)	0,041	1,00 (0,92-1,10)	0,952
Model 1	C/C	1	Ref.	1	Ref.
	C/G	1,08 (0,96-1,22)	0,189	1,05 (0,92-1,20)	0,445
	G/G	1,12 (1,02-1,22)	0,012	1,03 (0,94-1,14)	0,502

4.4. Assoziation zwischen dem rs10754555 Genotyp und kardiovaskulärer Mortalität

4.4.1. Assoziation zwischen dem rs10754555 Genotyp und kardiovaskulärer Mortalität bei LURIC-Patienten

Vorabgehend konnte bereits gezeigt werden, dass eine altersabhängige Assoziation zwischen dem rs10754555 Genotyp und dem Vorliegen einer KHK besteht. Inwiefern diese ebenfalls für die kardiovaskuläre Mortalität besteht, soll im Folgenden untersucht werden.

Während einem medianen Follow-up-Zeitraum von 9,9 Jahren verstarben 911 Teilnehmer der LURIC-Studie (29,8%), 560 davon an einer kardiovaskulären Erkrankung. Die Gesamtsterblichkeit (**Tabelle 11a**) und die kardiovaskuläre Mortalität (**Tabelle 11b**) war sowohl bei heterozygoten (Hazard Ratio (HR): 1,26, 95%-KI: 1,08-1,45 und 1,22, 95%-KI: 1,01-1,47) als auch bei homozygoten (HR: 1,31, 95%-KI: 1,08-1,59 und 1,35, 95%-KI: 1,07-1,72) rs10754555 Trägern signifikant erhöht.

Tab. 11a: Cox-Regressionsanalysen für die Gesamtsterblichkeit abhängig vom rs10754555 Genotyp (Model 1: adjustiert für Alter und Geschlecht; Model 2: adjustiert für Model 1, Diabetes, Rauchen, systolischer Blutdruck, BMI, lipidsenkende Therapie, LDL-Cholesterin, prävalente KHK, Myokardinfarkt, eGFR)

Model	<i>Nlrp3</i> rs10754555 SNP	Gesamtsterblichkeit		
		Ereignisse/ Patientenzahl	HR (95%-KI)	p-Wert
Crude	C/C	302/1106	1	...
	C/G	448/1469	1,14 (0,99-1,32)	0,071
	G/G	161/486	1,26 (1,04-1,53)	0,018
Model 1	C/C	302/1106	1	...
	C/G	448/1469	1,15 (0,99-1,33)	0,058
	G/G	161/486	1,26 (1,04-1,53)	0,018
Model 2	C/C	302/1106	1	...
	C/G	448/1469	1,26 (1,08-1,45)	0,002
	G/G	161/486	1,31 (1,08-1,59)	0,006

Tab. 11b: Cox-Regressionsanalysen für die kardiovaskuläre Mortalität abhängig vom rs10754555 Genotyp (Model 1: adjustiert für Alter und Geschlecht; Model 2: adjustiert für Model 1, Diabetes, Rauchen, systolischer Blutdruck, BMI, lipidsenkende Therapie, LDL-Cholesterin, prävalente KHK, Myokardinfarkt, eGFR)

Model	<i>Nlrp3</i> rs10754555 SNP	Kardiovaskuläre Mortalität		
		Ereignisse/ Patientenzahl	HR (95%-KI)	p-Wert
Crude	C/C	188/1099	1	...
	C/G	172/1461	1,10 (0,91-1,32)	0,329
	G/G	104/484	1,31 (1,03-1,67)	0,027
Model 1	C/C	188/1099	1	...
	C/G	172/1461	1,10 (0,92-1,33)	0,300
	G/G	104/484	1,31 (1,03-1,66)	0,028
Model 2	C/C	188/1099	1	...
	C/G	172/1461	1,22 (1,01-1,47)	0,042
	G/G	104/484	1,35 (1,07-1,72)	0,013

Die erhöhte Sterblichkeit wird einer erhöhten kardiovaskulären Mortalität zugeschrieben, da andere Todesursachen wie Tod an einer Tumorerkrankung oder Infektion nicht mit dem Vorliegen einer rs10754555 Variante assoziiert waren, was in **Tabelle 12** aufgeführt ist.

Tab. 12: Cox-Regressionsanalysen für die Sterblichkeit an Tumorerkrankungen oder Infektionen abhängig vom rs10754555 Genotyp bei LURIC-Teilnehmern (Model 1: adjustiert für Alter, Geschlecht, Diabetes, Rauchen, systolischer Blutdruck, BMI, lipidsenkende Therapie, LDL-Cholesterin, prävalente KHK, Myokardinfarkt, eGFR)

Model	<i>Nlrp3</i> rs10754555 SNP	Tödliche Tumorerkrankungen		Tödliche Infektionserkrankungen	
		HR (95%-KI)	p-Wert	HR (95%-KI)	p-Wert
Crude	C/C	1	...	1	...
	C/G	1,26 (0,87-1,84)	0,220	0,91 (0,55-1,51)	0,711
	G/G	1,20 (0,72-2,00)	0,488	1,02 (0,52-2,02)	0,944
Model 1	C/C	1	...	1	...
	C/G	1,30 (0,89-1,90)	0,170	1,05 (0,63-1,75)	0,866
	G/G	1,22 (0,73-2,04)	0,446	1,07 (0,54-2,11)	0,849

4.4.2. Einfluss verschiedener kardiovaskulärer Risikofaktoren auf die kardiovaskuläre Mortalität

In **Abbildung 26** ist ein Vergleich der Effekte des rs10754555 Genotyps und anderer kardiovaskulärer Risikofaktoren auf die kardiovaskuläre Mortalität dargestellt.

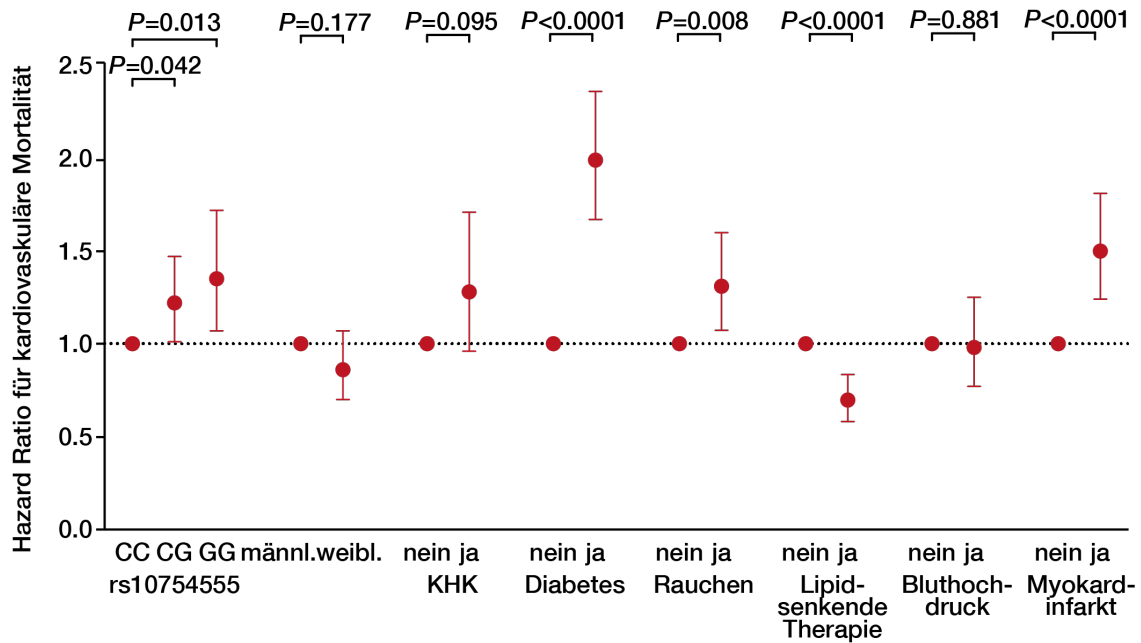


Abb. 26: Hazard ratio ($\pm 95\%$ -KI) für die kardiovaskuläre Mortalität für rs10754555 Träger im Vergleich zu anderen kardiovaskulären Risikofaktoren oder prädisponierenden Faktoren abgeleitet von multivariaten adjustierten Cox-Regressionsmodellen aus der LURIC-Studie. Adjustiert für Alter, Geschlecht, Diabetes, Raucherstatus, systolischer Blutdruck, BMI, lipidsenkende Therapie, LDL-Cholesterin, Myokardinfarkt, eGFR, wo zutreffend, Abbildung entnommen aus Schunk *et al.* Eur Heart J 2021

4.4.3. Assoziation zwischen dem rs10754555 Genotyp und kardiovaskulärer Mortalität in zehn prospektiven Studien

Des Weiteren wurde die Assoziation zwischen dem rs10754555 Genotyp und der kardiovaskulären Mortalität in zehn prospektiven klinischen Studien untersucht. Diese schlossen insgesamt 526091 Teilnehmer mit oder ohne prävalente KHK ein. Die Charakteristika der einzelnen Studienteilnehmer sind in den **Tabellen 26-34** im Anhang detailliert aufgeführt. Additive genetische Modelle zeigten, dass der rs10754555 Genotyp mit einer signifikant erhöhten kardiovaskulären Mortalität einhergeht. Dies konnte sowohl bei Teilnehmern der Sekundärpräventionsstudien (HR 1,14, 95%-KI: 1,07-1,21) als auch bei Teilnehmern der Primärpräventionsstudien (HR 1,06, 95%-KI: 1,01-1,11) gezeigt werden. Eine signifikante Heterogenität bestand nicht ($I^2=22,2\%$, $p=0,253$ für die Sekundärpräventionsstudien und $I^2=0,0\%$, $p=0,999$ für die Primärpräventionsstudien). „Small-study effects“ wurden mittels Egger Test ($p=0,341$ für die Metaanalyse zur kardiovaskulären Mortalität in den Sekundärpräventionsstudien) ausgeschlossen. Die Metaanalyse ist in **Abbildung 27** dargestellt.

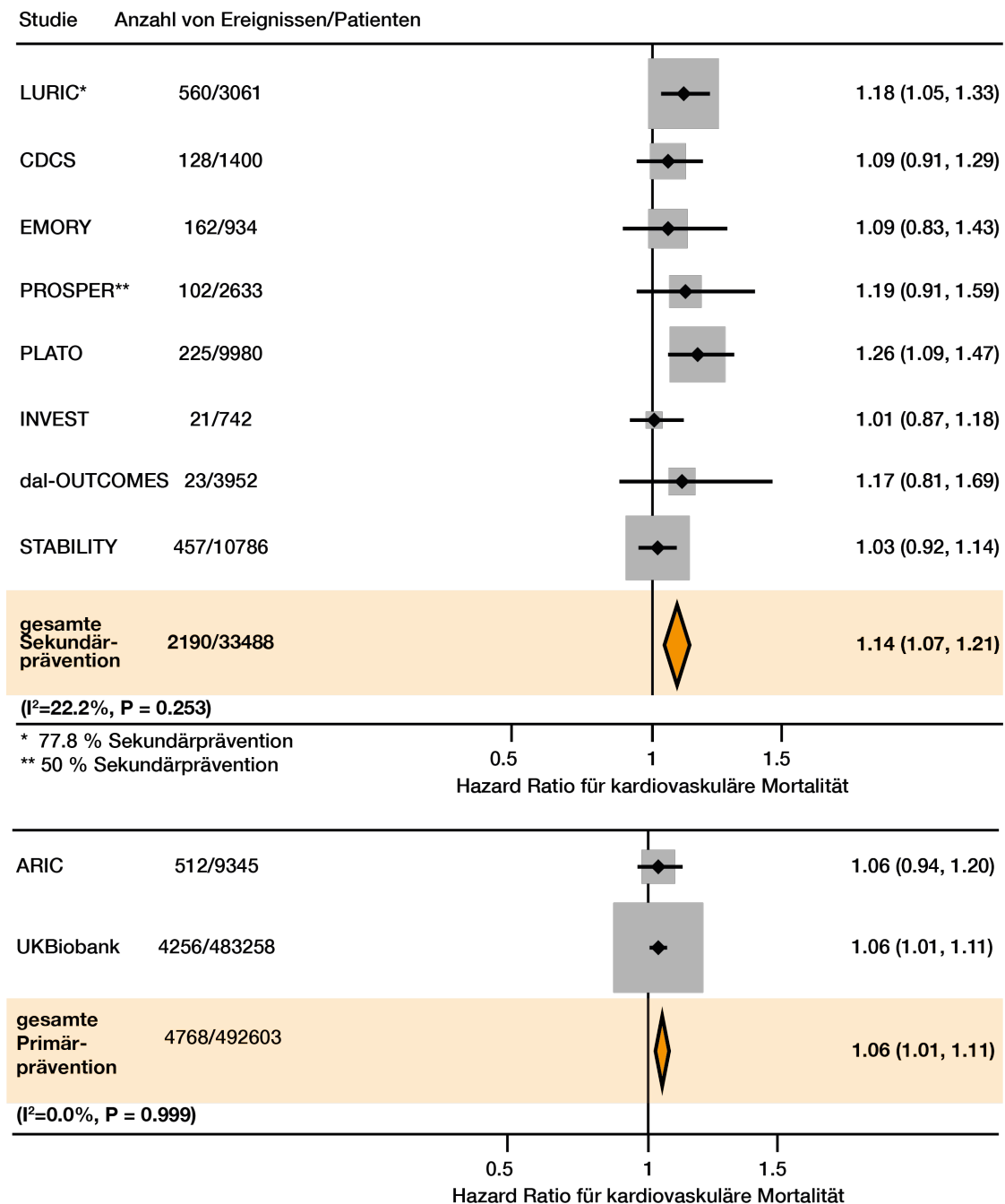


Abb. 27: Metaanalyse der kardiovaskulären Mortalität assoziiert mit dem rs10754555 Genotyp in den Sekundär- (1.) und Primärpräventionsstudien (2.). Gezeigt sind die Hazard Ratios für kardiovaskuläre Mortalität assoziiert mit dem rs10754555 Genotyp in 33488 Teilnehmern von 8 Studien, welche Patienten mit prävalenter KHK (d.h. Sekundärprävention) und 492603 Teilnehmer von zwei Studien aus der Allgemeinbevölkerung, eingeschlossen. Die Analysen aus jeder einzelnen Studie wurden für Alter und Geschlecht adjustiert, Abbildung entnommen aus Schunk *et al.* Eur Heart J 2021

4.5. Bekannte NLRP3-Inflammasom-Aktivatoren und die Assoziation zwischen rs10754555 und Mortalität

Mittlerweile wurden diverse Aktivatoren des NLRP3-Inflammasoms identifiziert, von denen ApoC3, Triglyceride und Harnsäure für die Entwicklung von kardiovaskulären Erkrankungen von besonderer Relevanz sind. Nachfolgend wurde die Assoziation zwischen dem rs10754555 Genotyp und kardiovaskulärer Mortalität abhängig der ApoC3-, Triglycerid- und Harnsäureplasmaspiegel untersucht. In der LURIC-Studie war der rs10754555 Genotyp lediglich bei den Patienten mit erhöhter kardiovaskulärer Mortalität verbunden, bei denen erhöhte ApoC3- und Triglyceridplasmaspiegel vorlagen.

4.5.1. Assoziation zwischen dem rs10754555 Genotyp und kardiovaskulärer Mortalität abhängig vom ApoC3- und Triglyceridplasmaspiegel

Abbildung 28a zeigt die Assoziation zwischen dem Genotyp und kardiovaskulärer Mortalität bei Patienten der LURIC-Studie abhängig vom ApoC3-Plasmaspiegel.

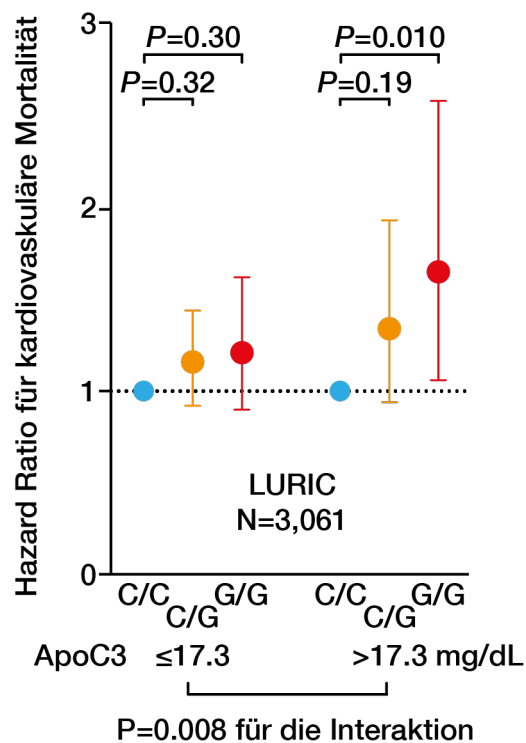


Abb. 28a: Assoziation zwischen dem rs10754555 Genotyp und kardiovaskulärer Mortalität bei 3061 LURIC-Patienten, unterteilt in Patienten mit niedrigem ($\leq 17,3$ mg/dL, Quartil 1-3) und hohem ($> 17,3$ mg/dL, Quartil 4) ApoC3-Plasmaspiegel, Abbildung entnommen aus Schunk *et al.* Eur Heart J 2021

Abbildung 28b zeigt die Assoziation zwischen dem Genotyp und kardiovaskulärer Mortalität bei LURIC- und UKBioBank-Patienten abhängig vom Triglycerid-Plasmaspiegel.

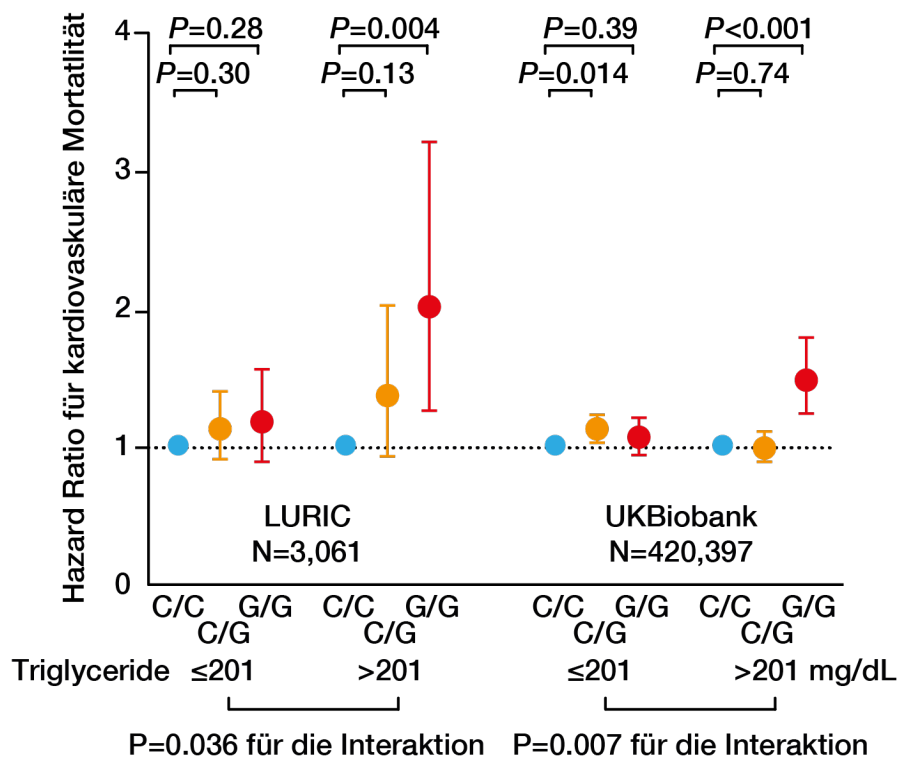


Abb. 28b: Assoziation zwischen dem rs10754555 Genotyp und kardiovaskulärer Mortalität in der LURIC-Studie und bei 483258 Teilnehmern der UK-BioBank, unterteilt in Probanden mit niedrigen (≤ 201 mg/dL, Quartil 1-3) und hohen (> 201 mg/dL, Quartil 4) Triglycerid-Plasmaspiegeln, Abbildung entnommen aus Schunk *et al.* Eur Heart J 2021

4.5.2. Cox-Regressionsanalyse für kardiovaskuläre Mortalität abhängig von Genotyp und ApoC3- und Triglyceridplasma Spiegel bei LURIC-Patienten

Im Folgenden sind die Cox-Regressionsanalysen für die kardiovaskuläre Mortalität in Abhängigkeit des Genotyps und entweder dem ApoC3- (**Tabelle 13**) oder dem Triglycerid-Plasmaspiegel (**Tabelle 14**) bei Patienten der LURIC-Studie dargestellt.

Tab. 13: Cox-Regressionsanalyse für kardiovaskuläre Mortalität abhängig vom rs10754555 Genotyp bei Patienten der LURIC-Studie unterteilt nach dem ApoC3-Plasmaspiegel, Model 1 adjustiert für Alter und Geschlecht, Model 2 adjustiert für

Model 1, Diabetes, Rauchen systolischer Blutdruck, BMI, lipidsenkende Therapie, LDL-Cholesterin, prävalente KHK, Myokardinfarkt und eGFR

Model	<i>Nlrp3</i> rs10754555 SNP	Kardiovaskuläre Mortalität			
		ApoC3 ≤17,3mg/dL		ApoC3 >17,3mg/dL	
		HR (95%- KI)	p-Wert	HR (95%- KI)	p-Wert
Crude	C/C	1	...	1	...
	C/G	1,06 (0,85- 1,31)	0,634	1,20 (0,84- 1,71)	0,326
	G/G	1,20 (0,90- 1,61)	0,208	1,57 (1,02- 2,43)	0,041
Model 1	C/C	1	...	1	...
	C/G	1,05 (0,85- 1,31)	0,643	1,22 (0,85- 1,75)	0,273
	G/G	1,17 (0,88- 1,56)	0,281	1,66 (1,07- 2,57)	0,023
Model 2	C/C	1	...	1	...
	C/G	1,12 (0,90- 1,40)	0,320	1,28 (0,89- 1,83)	0,186
	G/G	1,16 (0,87- 1,55)	0,302	1,79 (1,15- 2,79)	0,010

Tab. 14: Cox-Regressionsanalyse für kardiovaskuläre Mortalität abhängig vom rs10754555 Genotyp bei Patienten der LURIC-Studie unterteilt nach dem Triglycerid-Plasmaspiegel, Model 1 adjustiert für Alter und Geschlecht, Model 2 adjustiert für Model 1, Diabetes, Rauchen systolischer Blutdruck, BMI, lipidsenkende Therapie, LDL-Cholesterin, prävalente KHK, Myokardinfarkt und eGFR

Model	<i>Nlrp3</i> rs10754555 SNP	Kardiovaskuläre Mortalität			
		Triglyceride ≤201mg/dL		Triglyceride >201mg/dL	
		HR (95%- KI)	p-Wert	HR (95%- KI)	p-Wert
Crude	C/C	1	...	1	...
	C/G	1,07 (0,86- 1,32)	0,544	1,19 (0,81- 1,75)	0,373
	G/G	1,17 (0,88- 1,55)	0,276	1,82 (1,15- 2,88)	0,011
Model 1	C/C	1	...	1	...
	C/G	1,06 (0,86- 1,32)	0,567	1,30 (0,89- 1,92)	0,177
	G/G	1,19 (0,90- 1,57)	0,235	1,78 (1,12- 2,81)	0,014
Model 2	C/C	1	...	1	...
	C/G	1,12 (0,90- 1,39)	0,304	1,36 (0,92- 2,01)	0,125
	G/G	1,17 (0,88- 1,55)	0,276	2,00 (1,25- 3,19)	0,004

4.5.3. Cox-Regressionsanalyse für kardiovaskuläre Mortalität bei UKBioBank-Teilnehmern abhängig von Genotyp, Triglyceridplasmaspiegel und Alter

Die vorangehend gezeigten Ergebnisse wurden an den Probanden der UKBioBank bestätigt. Sie waren altersunabhängig und zeigten sich zudem bei Probanden mit erhöhten Triglyceridwerten aufgrund von SNPs im *Apoc3* Genlocus (**Tabelle 17**).

Nachfolgend sind die Cox-Regressionsanalysen für die kardiovaskuläre Mortalität bei Patienten der UKBioBank abhängig vom Genotyp und erhöhten Triglyceridplasmaspiegeln (**Tabelle 15**), sowie erhöhten Triglyceridplasmaspiegeln und dem Alter (**Tabelle 16**) aufgeführt.

Tab. 15: Cox-Regressionsanalyse für kardiovaskuläre Mortalität abhängig vom rs10754555 Genotyp bei Probanden der UKBioBank-Studie unterteilt nach dem Triglycerid-Plasmaspiegel, Model 1 adjustiert für Alter und Geschlecht, Model 2 adjustiert für Model 1, Diabetes, Rauchen systolischer Blutdruck, BMI, lipidsenkende Therapie, LDL-Cholesterin, prävalente KHK, Myokardinfarkt und eGFR

Model	<i>Nlrp3</i> rs10754555 SNP	Kardiovaskuläre Mortalität			
		Triglyceride ≤201mg/dL		Triglyceride >201mg/dL	
		HR (95%- KI)	p-Wert	HR (95%- KI)	p-Wert
Crude	C/C	1	...	1	...
	C/G	1,11 (1,01- 1,21)	0,024	1,36 (1,22- 1,52)	<0,001
	G/G	1,05 (0,93- 1,19)	0,452	2,05 (1,71- 2,46)	<0,001
Model 1	C/C	1	...	1	...
	C/G	1,11 (1,02- 1,22)	0,014	1,12 (1,00- 1,25)	0,050
	G/G	1,06 (0,94- 1,20)	0,334	1,69 (1,41- 2,03)	<0,001
Model 2	C/C	1	...	1	...
	C/G	1,12 (1,02- 1,22)	0,014	0,98 (0,88- 1,10)	0,740
	G/G	1,06 (0,93- 1,20)	0,385	1,47 (1,23- 1,78)	<0,001

Tab. 16: Cox-Regressionsanalyse für kardiovaskuläre Mortalität abhängig vom rs10754555 Genotyp bei Probanden der UKBioBank-Studie unterteilt nach dem Triglycerid-Plasmaspiegel und dem Alter, Model 1 adjustiert für Alter und Geschlecht, Model 2 adjustiert für Model 1, Diabetes, Rauchen systolischer Blutdruck, BMI, lipidsenkende Therapie, LDL-Cholesterin, prävalente KHK, Myokardinfarkt und eGFR

Model	<i>Nlrp3</i> rs10754555 SNP	Alter <60 Jahre				Alter ≥60 Jahre			
		Triglyceride ≤201 mg/dL		Triglyceride >201 mg/dL		Triglyceride ≤201 mg/dL		Triglyceride >201 mg/dL	
		HR (95%- KI)	p- Wert	HR (95%- KI)	p- Wert	HR (95%- KI)	p- Wert	HR (95%- KI)	p- Wert
Crude	C/C	1	...	1	...	1	...	1	...
	C/G	0,88 (0,76- 1,01)	0,077	1,59 (1,31- 1,93)	<0,001	1,04 (0,95- 1,15)	0,389	1,20 (1,05- 1,37)	0,009
	G/G	0,86 (0,70- 1,07)	0,170	2,36 (1,74- 3,21)	<0,001	0,90 (0,78- 1,05)	0,185	1,81 (1,44- 2,28)	<0,001
Model 1	C/C	1	...	1	...	1	...	1	...
	C/G	0,96 (0,83- 1,10)	0,533	1,17 (0,99- 1,41)	0,120	1,06 (0,96- 1,17)	0,218	1,09 (0,96- 1,25)	0,196
	G/G	0,94 (0,76- 1,16)	0,557	1,73 (1,28- 2,36)	<0,001	0,92 (0,79- 1,07)	0,296	1,65 (1,31- 2,08)	<0,001

Model	C/C	1	...	1	...	1	...	1	...
2									
	C/G	0,99 (0,86- 1,15)	0,964	0,94 (0,78- 1,15)	0,560	1,09 (0,99- 1,21)	0,078	0,99 (0,87- 1,14)	0,951
	G/G	1,00 (0,81- 1,24)	0,999	1,42 (1,05- 1,93)	0,025	0,95 (0,82- 1,11)	0,545	1,49 (1,18- 1,87)	0,001

Tab. 17: Assoziation von SNPs mit der Triglyceridkonzentration bei Probanden der UKBioBank, adjustiert für Alter und Geschlecht

SNP	Gen	MAF	Beta (SE)	p-Wert	R²
rs734104	<i>APOC3</i>	0,83	-0,121 (0,003)	<1,01x10 ⁻³²⁰	4,9%
rs4520	<i>APOC3</i>	0,71	-0,115 (0,002)	<1,01x10 ⁻³²⁰	5,1%
rs5142	<i>APOC3</i>	0,87	-0,179 (0,004)	<1,01x10 ⁻³²⁰	5,1%
rs5141	<i>APOC3</i>	0,87	-0,195 (0,004)	<1,01x10 ⁻³²⁰	5,2%
rs5128	<i>APOC3</i>	0,88	-0,182 (0,004)	<1,01x10 ⁻³²⁰	5,1%

4.5.4. Cox-Regressionsanalyse für kardiovaskuläre Mortalität abhängig von Genotyp und mit oder ohne genetisch-determiniert erhöhte Plasmatriglyceridspiegel bei UKBioBank-Teilnehmern

Nachfolgend sind die Cox-Regressionsanalysen für die kardiovaskuläre Mortalität abhängig vom Genotyp bei Patienten der UKBiobank mit oder ohne genetisch-determiniert erhöhten Plasmatriglyceridspiegeln (**Tabelle 18**) aufgeführt.

Tab. 18: Cox-Regressionsanalyse für kardiovaskuläre Mortalität abhängig vom rs10754555 Genotyp bei Probanden der UKBioBank-Studie unterteilt nach Probanden mit oder ohne genetisch-determiniert erhöhten Triglyceridplasmaspiegeln, Model 1 adjustiert für Alter und Geschlecht, Model 2 adjustiert für Model 1, Diabetes, Rauchen systolischer Blutdruck, BMI, lipidsenkende Therapie, LDL-Cholesterin, prävalente KHK, Myokardinfarkt und eGFR, Interaktion zwischen rs10754555 und genetisch-determinierten Triglyceridplasmaspiegeln p=0,036

Model	<i>Nlrp3</i> rs10754555 SNP	Kardiovaskuläre Mortalität			
		Genetisch determiniert niedrige Triglyceride		Genetisch determiniert hohe Triglyceride	
		Median (IQR) der Triglyceride		129,5 (96,1) mg/dL	
		152,1 (128,6) mg/dL			
		HR (95%-KI)	p-Wert	HR (95%-KI)	p-Wert
Crude	C/C	1	...	1	...
	C/G	1,04 (0,97-1,12)	0,309	2,06 (0,86-4,89)	0,103
	G/G	1,08 (0,98-1,20)	0,137	2,66 (0,96-7,32)	0,059
Model 1	C/C	1	...	1	...
	C/G	1,05 (0,97-1,13)	0,240	2,08 (0,88-4,96)	0,097
	G/G	1,09 (0,99-1,21)	0,093	2,85 (1,03-7,86)	0,043
Model 2	C/C	1	...	1	...
	C/G	1,04 (0,97-1,12)	0,248	2,01 (0,85-4,79)	0,114

	G/G	1,09 (0,99- 1,21)	0,096	2,81 (1,02- 7,77)	0,046
--	------------	----------------------	-------	----------------------	-------

Es zeigte sich, dass bei den Probanden der UK-BioBank erhöhte Plasmatriglyceridwerte mit einer erhöhten kardiovaskulären Mortalität (HR 1,17, 95%-KI: 1,08-1,26) in der Gesamtbevölkerung assoziiert waren. Der stärkste Effekt konnte bei homozygoten rs10754555 Trägern beobachtet werden (HR 1,57, 95%-KI: 1,30-1,90).

4.5.5. Assoziation zwischen Plasmatriglyceridspiegeln und kardiovaskulärer Mortalität bei UKBioBank-Teilnehmern abhängig von Alter und Genotyp

In **Tabelle 19a** und **b** ist die Assoziation zwischen den Plasmatriglyceridspiegeln und der kardiovaskulären Mortalität bei UKBioBank-Teilnehmern in Abhängigkeit vom Alter und Genotyp aufgeführt.

Tab. 19a: Assoziation zwischen den Plasmatriglyceridspiegeln und kardiovaskulärer Mortalität bei Teilnehmern der UKBioBank abhängig vom Alter. Gezeigt ist die Hazard Ratio für Triglyceride >201 mg/dL mit Triglyceriden ≤201 mg/dL als Referenz, Model 1: adjustiert für Alter und Geschlecht, Model 2: adjustiert für Alter, Geschlecht, Diabetes, Rauchen, systolischer Blutdruck, BMI, lipidsenkende Therapie, LDL-Cholesterin, Myokardinfarkt, eGFR

Model	gesamt		Alter			
			<60 Jahre		≥60 Jahre	
	HR (95%-KI)	p-Wert	HR (95%-KI)	p-Wert	HR (95%-KI)	p-Wert
Crude	1,52 (1,41- 1,64)	<0,0001	1,79 (1,58- 2,03)	<0,0001	1,33 (1,22- 1,46)	<0,0001
Model 1	1,25 (1,16- 1,35)	<0,0001	1,32 (1,16- 1,50)	<0,0001	1,22 (1,11- 1,34)	<0,0001
Model 2	1,17 (1,08- 1,26)	<0,0001	1,15 (1,01- 1,31)	0,040	1,17 (1,06- 1,28)	0,001

Tab. 19b: Assoziation zwischen den Plasmatriglyceridspiegeln und kardiovaskulärer Mortalität bei Teilnehmern der UKBioBank abhängig vom rs10754555 Genotyp. Gezeigt ist die Hazard Ratio für Triglyceride >201 mg/dL mit Triglyceriden ≤201 mg/dL als Referenz, Model 1: adjustiert für Alter und Geschlecht, Model 2: adjustiert für Alter, Geschlecht, Diabetes, Rauchen, systolischer Blutdruck, BMI, lipidsenkende Therapie, LDL-Cholesterin, Myokardinfarkt, eGFR

Model	gesamt		rs10754555 Genotyp					
			C/C		C/G		G/G	
	HR (95%- KI)	p-Wert	HR (95%- KI)	p-Wert	HR (95%- KI)	p-Wert	HR (95%- KI)	p-Wert
Crude	1,52 (1,41- 1,64)	<0,0001	1,54 (1,36- 1,74)	<0,0001	1,36 (1,22- 1,52)	<0,0001	2,05 (1,71- 2,46)	<0,0001
Model 1	1,25 (1,16- 1,35)	<0,0001	1,28 (1,14- 1,45)	<0,0001	1,12 (0,99- 1,25)	0,052	1,69 (1,40- 2,03)	<0,0001
Model 2	1,17 (1,08- 1,26)	<0,0001	1,19 (1,05- 1,35)	0,007	1,05 (0,93- 1,17)	0,430	1,57 (1,30- 1,90)	<0,0001

4.5.6. Assoziation zwischen Plasmaharnsäurespiegel, Genotyp und kardiovaskulärer Mortalität bei LURIC- und UKBioBank-Patienten

Vergleichbare Ergebnisse konnten erzielt werden, nachdem die Teilnehmer der LURIC- und UKBioBank-Studie dichotomisiert wurden abhängig von ihrem Plasmaharnsäurespiegel und dem SNP-Trägerstatus, der mit erhöhten Harnsäurespiegeln assoziiert ist. Das Ergebnis ist in **Abbildung 29** dargestellt.

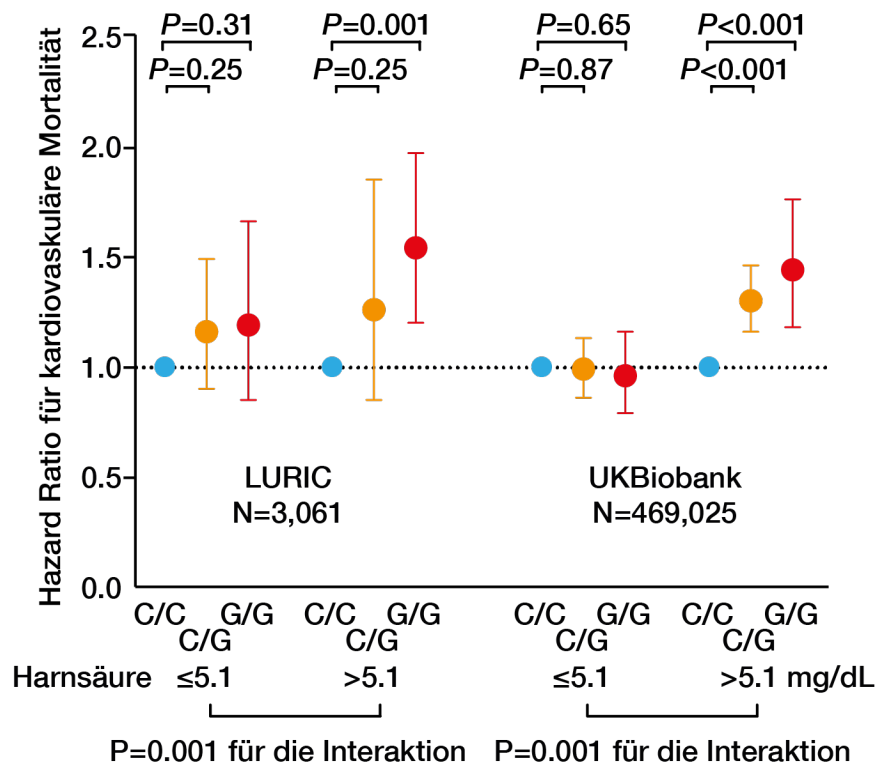


Abb. 29: Assoziation zwischen dem rs10754555 Genotyp und kardiovaskulärer Mortalität in der LURIC und UKBioBank-Studie, unterteilt in Probanden mit niedrigen ($\leq 5,1$ mg/dL, Quartil 1-3) und hohen ($>5,1$ mg/dL, Quartil 4) Plasmaharnsäurespiegeln. Die Interaktion bezieht sich auf die Interaktion zwischen ApoC3, Triglyceriden oder Harnsäure und rs10754555, was in die Cox-Regressionsmodelle einbezogen wurde, Abbildung entnommen aus Schunk *et al.* Eur Heart J 2021

4.5.7. Cox-Regressionsanalyse für kardiovaskuläre Mortalität abhängig vom Genotyp, Harnsäureplasmaspiegel und Alter in LURIC- und UKBioBank-Patienten

In den folgenden Tabellen sind die Cox-Regressionsanalysen aufgeführt für die kardiovaskuläre Mortalität abhängig vom Genotyp und dem Harnsäure-Plasmaspiegel bei LURIC-

Teilnehmern (**Tabelle 20**) und UKBioBank-Probanden (**Tabelle 21**). In **Tabelle 22** ist zusätzlich noch die Altersabhängigkeit bei UKBioBank-Probanden integriert.

Tab. 20: Cox-Regressionsanalyse für kardiovaskuläre Mortalität abhängig vom rs10754555 Genotyp bei Probanden der LURIC-Studie unterteilt nach dem Harnsäure-Plasmaspiegel, Model 1 adjustiert für Alter und Geschlecht, Model 2 adjustiert für Model 1, Diabetes, Rauchen systolischer Blutdruck, BMI, lipidsenkende Therapie, LDL-Cholesterin, prävalente KHK, Myokardinfarkt und eGFR

Model	<i>Nlrp3</i> rs10754555 SNP	Kardiovaskuläre Mortalität			
		Harnsäure ≤5,1 mg/dL		Harnsäure >5,1 mg/dL	
		HR (95%- KI)	p-Wert	HR (95%- KI)	p-Wert
Crude	C/C	1	...	1	...
	C/G	1,07 (0,83- 1,37)	0,599	1,43 (0,97- 2,09)	0,071
	G/G	1,14 (0,81- 1,58)	0,453	1,81 (1,42- 2,30)	<0,001
Model 1	C/C	1	...	1	...
	C/G	1,09 (0,85- 1,40)	0,492	1,33 (0,90- 1,95)	0,152
	G/G	1,15 (0,83- 1,61)	0,401	1,68 (1,32- 2,14)	<0,001
Model 2	C/C	1	...	1	...
	C/G	1,16 (0,90- 1,49)	0,248	1,26 (0,85- 1,85)	0,245
	G/G	1,19 (0,85- 1,66)	0,309	1,54 (1,20- 1,97)	0,001

Tab. 21: Cox-Regressionsanalyse für kardiovaskuläre Mortalität abhängig vom rs10754555 Genotyp bei Probanden der UKBioBank-Studie unterteilt nach dem Harnsäure-Plasmaspiegel, Model 1 adjustiert für Alter und Geschlecht, Model 2 adjustiert für Model 1, Diabetes, Rauchen systolischer Blutdruck, BMI, lipidsenkende Therapie, LDL-Cholesterin, prävalente KHK, Myokardinfarkt und eGFR

Model	<i>Nlrp3</i> rs10754555 SNP	Kardiovaskuläre Mortalität			
		Harnsäure ≤5,1 mg/dL		Harnsäure >5,1 mg/dL	
		HR (95%- KI)	p-Wert	HR (95%- KI)	p-Wert
Crude	C/C	1	...	1	...
	C/G	0,99 (0,86- 1,13)	0,849	2,47 (2,21- 2,75)	<0,001
	G/G	0,95 (0,78- 1,15)	0,593	2,69 (2,21- 3,28)	<0,001
Model 1	C/C	1	...	1	...
	C/G	0,99 (0,87- 1,14)	0,928	1,40 (1,25- 1,56)	<0,001
	G/G	0,96 (0,79- 1,16)	0,662	1,53 (1,25- 1,87)	<0,001
Model 2	C/C	1	...	1	...
	C/G	0,99 (0,86- 1,13)	0,864	1,30 (1,16- 1,46)	<0,001
	G/G	0,96 (0,79- 1,16)	0,648	1,44 (1,18- 1,76)	<0,001

Tab. 22: Cox-Regressionsanalyse für kardiovaskuläre Mortalität abhängig vom rs10754555 Genotyp bei Probanden der UKBioBank-Studie unterteilt nach dem Harnsäure-Plasmaspiegel und dem Alter, Model 1 adjustiert für Alter und Geschlecht, Model 2 adjustiert für Model 1, Diabetes, Rauchen systolischer Blutdruck, BMI, lipidsenkende Therapie, LDL-Cholesterin, prävalente KHK, Myokardinfarkt und eGFR

Model	<i>Nlrp3</i> rs10754555 SNP	Alter <60 Jahre				Alter ≥60 Jahre			
		Harnsäure ≤5,1 mg/dL		Harnsäure >5,1 mg/dL		Harnsäure ≤5,1 mg/dL		Harnsäure >5,1 mg/dL	
		HR (95%- KI)	p- Wert	HR (95%- KI)	p- Wert	HR (95%- KI)	p- Wert	HR (95%- KI)	p- Wert
Crude	C/C	1	...	1	...	1	...	1	...
	C/G	0,99 (0,79- 1,26)	0,977	2,57 (2,13- 3,11)	<0,001	0,99 (0,84- 1,17)	0,893	2,11 (1,85- 2,41)	<0,001
	G/G	0,93 (0,71- 1,38)	0,933	3,05 (2,18- 4,26)	<0,001	0,94 (0,74- 1,19)	0,592	2,23 (1,74- 2,84)	<0,001
Model 1	C/C	1	...	1	...	1	...	1	...
	C/G	1,01 (0,80- 1,28)	0,916	1,37 (1,12- 1,67)	0,002	0,99 (0,83- 1,16)	0,859	1,40 (1,22- 1,61)	<0,001
	G/G	1,01 (0,72- 1,41)	0,975	1,62 (1,15- 2,28)	0,005	0,93 (0,7- 1,19)	0,582	1,48 (1,15- 1,89)	0,002

Model 2	C/C	1	...	1	...	1	...	1	...
	C/G	0,99 (0,78- 1,25)	0,929	1,28 (1,05- 1,57)	0,014	0,99 (0,83- 1,16)	0,861	1,30 (1,13- 1,49)	<0,001
	G/G	0,99 (0,71- 1,38)	0,934	1,60 (1,14- 2,25)	0,007	0,94 (0,74- 1,20)	0,616	1,37 (1,07- 1,75)	0,013

4.5.8. Cox-Regressionsanalyse für kardiovaskuläre Mortalität abhängig von Genotyp und genetisch-determiniert erhöhter Harnsäureplasmaspiegel bei UKBioBank-Teilnehmern

Tabelle 23 zeigt die Assoziation zwischen SNPs und der Harnsäurekonzentration bei UKBioBank-Probanden.

Tab. 23: Assoziation von SNPs mit der Harnsäurekonzentration bei Probanden der UKBioBank, adjustiert für Alter und Geschlecht

SNP	Gen	MAF	Beta (SE)	p-Wert	R ²
rs16890979	<i>SLC2A9</i>	0,20	22,73 (0,16)	<1,01x10 ⁻³²⁰	17,4%
rs6449213	<i>SLC2A9</i>	0,84	24,69 (0,18)	<1,01x10 ⁻³²⁰	17,0%
rs2231142	<i>SLC2A9</i>	0,10	14,08 (0,22)	<1,01x10 ⁻³²⁰	7,8%

Tabelle 24 zeigt die Cox-Regressionsanalyse für die kardiovaskuläre Mortalität in Abhängigkeit des Genotyps der UKBioBank-Probanden mit dem Vorhandensein bzw. Fehlens eines genetisch-determiniert erhöhten Harnsäureplasmaspiegel.

Tab. 24: Cox-Regressionsanalyse für kardiovaskuläre Mortalität abhängig vom rs10754555 Genotyp bei Probanden der UKBioBank-Studie unterteilt nach Probanden mit oder ohne genetisch-determiniert erhöhten Harnsäureplasmaspiegeln, Model 1 adjustiert für Alter und Geschlecht, Model 2 adjustiert für Model 1, Diabetes, Rauchen systolischer Blutdruck, BMI, lipidsenkende Therapie, LDL-Cholesterin, prävalente KHK, Myokardinfarkt und eGFR, Interaktion zwischen rs10754555 und genetisch-determinierten Harnsäureplasmaspiegeln p=0,043

Model	<i>Nlrp3</i>	Kardiovaskuläre Mortalität
--------------	--------------	-----------------------------------

	rs10754555 SNP				
		Genetisch determiniert niedrige Harnsäure		Genetisch determiniert hohe Harnsäure	
Median (IQR) der Harnsäure		4,8 (1,8) mg/dL		5,3 (1,8) mg/dL	
		HR (95%- KI)	p-Wert	HR (95%- KI)	p-Wert
Crude	C/C	1	...	1	...
	C/G	1,03 (0,89- 1,19)	0,727	1,13 (1,00- 1,27)	0,051
	G/G	0,99 (0,80- 1,23)	0,947	1,21 (1,03- 1,43)	0,021
Model 1	C/C	1	...	1	...
	C/G	1,03 (0,89- 1,19)	0,720	1,12 (0,99- 1,27)	0,056
	G/G	1,01 (0,82- 1,25)	0,718	1,22 (1,04- 1,44)	0,017
Model 2	C/C	1	...	1	...
	C/G	1,03 (0,89- 1,19)	0,718	1,12 (0,99- 1,26)	0,059
	G/G	1,02 (0,83- 1,26)	0,861	1,21 (1,03- 1,43)	0,021

4.5.9. Assoziation zwischen Plasmaharnsäurespiegel und kardiovaskulärer Mortalität abhängig von Genotyp und Alter bei UKBioBank-Teilnehmern

Die Assoziation zwischen dem Plasmaharnsäurespiegel und kardiovaskulärer Mortalität bei Teilnehmern der UKBioBank-Studie ist in Abhängigkeit von Alter und Genotyp in **Tabelle 25** dargestellt.

Tab. 25: Assoziation zwischen den Plasmaharnsäurespiegeln und kardiovaskulärer Mortalität bei Teilnehmern der UKBioBank abhängig von Alter und rs10754555 Genotyp. Gezeigt ist die Hazard Ratio für Harnsäure >5,1 mg/dL mit Harnsäure ≤5,1 mg/dL als Referenz, Model 1: adjustiert für Alter und Geschlecht, Model 2: adjustiert für Alter, Geschlecht, Diabetes, Rauchen, systolischer Blutdruck, BMI, lipidsenkende Therapie, LDL-Cholesterin, Myokardinfarkt, eGFR

Mo- del	Gesamt		Alter				rs10754555 Genotyp					
			<60 Jahre		≥60 Jahre		C/C		C/G		G/G	
	HR (95 %- KI)	p- Wer t	HR (95 %- KI)	p- Wer t	HR (95 %- KI)	p- Wer t	HR (95 %- KI)	p- Wer t	HR (95 %- KI)	p- Wer t	HR (95 %- KI)	p- Wert
Cru- de	2,41 (2,2 3- 2,59)	<0,0 001	2,65 (2,3 3- 3,01)	<0,0 001	2,01 (1,8 3- 2,20)	<0,0 001	2,24 (1,9 9- 2,53)	<0,0 001	2,46 (2,2 1- 2,75)	<0,0 001	2,69 (2,2 1- 3,28)	<0,00 01
Mo- del1	1,38 (1,2 8- 1,50)	<0,0 001	1,46 (1,2 6- 1,69)	<0,0 001	1,34 (1,2 2- 1,48)	<0,0 001	1,31 (1,1 4- 1,49)	<0,0 001	1,41 (1,2 5- 1,59)	<0,0 001	1,57 (1,2 7- 1,96)	<0,00 01
Mo- del2	1,22 (1,1 2- 1,32)	<0,0 001	1,30 (1,1 2- 1,50)	<0,0 001	1,17 (1,0 6- 1,29)	<0,0 02	1,14 (1,0 0- 1,31)	0,05 0	1,26 (1,1 2- 1,42)	0,00 02	1,37 (1,1 0- 1,70)	<0,00 01

5. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit konnte der SNP rs10754555 im *Nlrp3*-Inflammasom Genlocus identifiziert werden, der unabhängig von anderen kardiovaskulären Risikofaktoren mit einer erhöhten systemischen Inflammation assoziiert ist. Es konnte gezeigt werden, dass rs10754555 mit einer höheren *NLRP3* mRNA-Expression, höheren IL-18-Plasmaspiegeln, erhöhter ASC-Speckbildung und Inflammasomaktivierung in humanen PBMCs einhergeht. Zusätzlich konnte beobachtet werden, dass Mäuse nach Transplantation mit Monozyten von homozygoten rs10754555 Trägern eine reduzierte Re-Endothelialisierung nach Carotis-Schädigung aufweisen.

In einer großen genetischen Assoziationsstudie konnte gezeigt werden, dass rs10754555 mit einem erhöhten KHK-Risiko einhergeht. Hierbei handelte es sich um einen altersabhängigen Effekt der bei jüngeren Personen prädominierte. Eine wichtige Erkenntnis war zudem, dass der rs10754555 Trägerstatus mit einer erhöhten kardiovaskulären Mortalität assoziiert ist. Dies deutet auf eine relevante Rolle des angeborenen Immunsystems in der Pathogenese von kardiovaskulären Erkrankungen hin.

Zusammengefasst konnte in dieser Arbeit ein Zusammenhang zwischen einer genetisch-determinierten systemischen Inflammation und der Prävalenz und des Outcomes kardiovaskulärer Erkrankungen hergestellt werden.

5.1. NLRP3-Inflammasom und Atherosklerose

Die Entstehung der Atherosklerose ist gekennzeichnet durch eine chronische Inflammation unter Beteiligung von Zellen und Effektormolekülen des angeborenen Immunsystems. Resultierend aus einer Infiltration der Gefäßwand durch Immunzellen, Lipidablagerungen und Proliferationen der glatten Gefäßmuskelzellen kommt es zur Ausbildung einer atherosklerotischen Plaque in der Gefäßwand [118]. Eine schematische Darstellung liefert **Abbildung 30**. Als Auslöser inflammatorischer Prozesse gelten körpereigene Moleküle, die bei Zell- oder Gewebeuntergang, sowie metabolischen Ungleichgewichten freigesetzt werden. Hierzu gehören u.a. Cholesterinkristalle, Kalziumpräzipitate, Komponenten der extrazellulären Matrix, ATP, aber auch oxidierte LDL-Partikel [47]. In einer wegweisenden Studie konnte zum einen gezeigt werden, dass sich Cholesterinkristalle in atherosklerotischen Plaques ablagern, als auch via Internalisierung in Makrophagen mit Auslösen einer lysosomalen Schädigung die Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms bewirken [29]. Dieses besteht, wie in **Abbildung 30** gezeigt, aus Caspase-1,

NLRP3 und ASC und führt zu einer Prozessierung von pro-IL-1 β und pro-IL-18 in maturiertes IL-1 β und IL-18. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Individuen, die heterozygote oder homozygote Träger des SNPs rs10754555 im *Nlrp3*-Genlocus waren, signifikant höhere Plasma-Konzentrationen der Inflammasom-abhängigen Zytokine IL-1 β und IL-18 aufwiesen. Gleichzeitig war die Zahl der zirkulierenden ASC-Specks als Marker einer Inflammasom-Aktivierung erhöht.

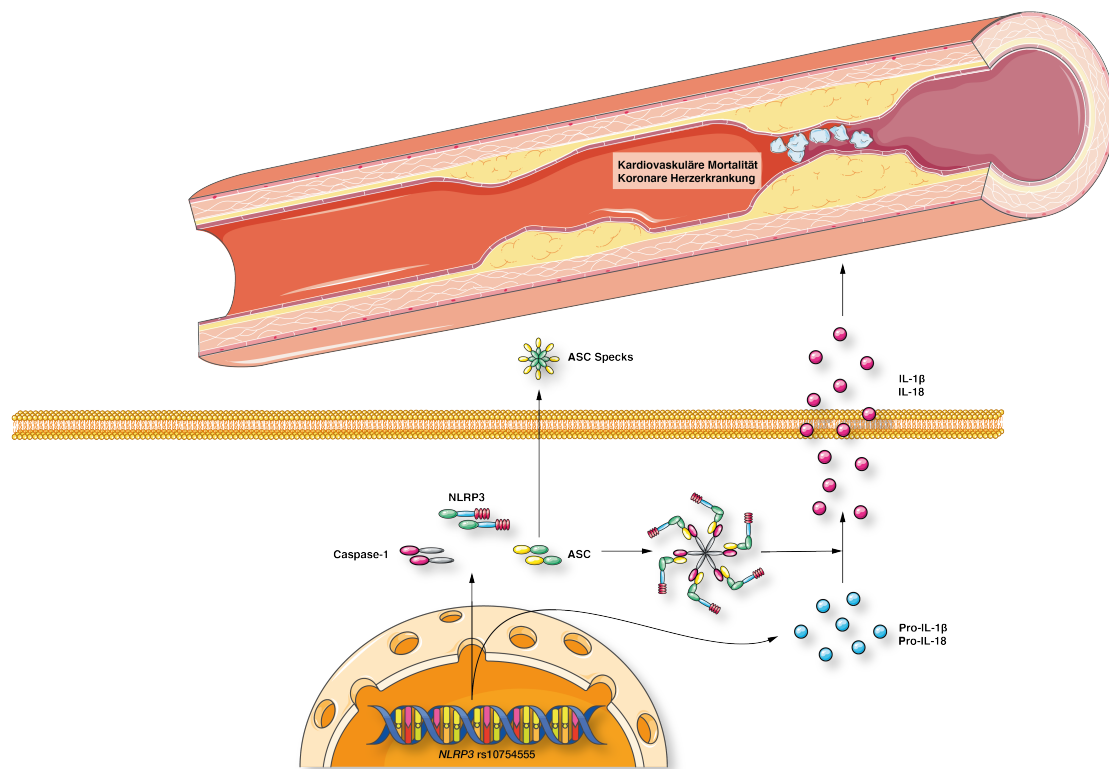


Abb. 30: NLRP3-Inflammasom-abhängige Entstehung atherosklerotischer Plaque, Abbildung entnommen aus Schunk *et al.* Eur Heart J 2021

IL-1 β ist in der Lage, sekundäre Mediatoren des Immunsystems zu aktivieren und somit den humoralen Arm des innate Immunsystems zu stimulieren. Besonders hervorzuheben ist an dieser Stelle IL-6. IL-6 induziert in der Leber die Bildung von Akut-Phase-Proteinen, v.a. CRP, Fibrinogen und Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-Typ I (PAI-I). IL-18 ähnelt IL-1 β sowohl strukturell als auch biologisch. IL-18 und IL-1 β sind beide in der Lage, die NET-Bildung anzuregen, um so erneut das NLRP3-Inflammasom zu aktivieren, wodurch sich die systemische Inflammation selbst weiter unterhält [47].

Im Tiermodell mit LDL-defizienten Mäusen entwickelten *Nlrp3*-, *Asc*-, *Il1b*- und *Il1a*-defiziente Mäuse deutlich weniger atherosklerotische Veränderungen [29]. Kongruente Ergebnisse konnten in dem in dieser Arbeit durchgeführten perivaskulären Carotisverletzungsmodell erzielt werden. Hierbei zeigte sich die Reendothelialisierung in humanisierten Mäusen, denen PBMCs von homozygoten SNP-Trägern transplantiert wurden, signifikant vermindert.

5.2. Entstehung von Inflammation bei kardiovaskulären und renalen Erkrankungen

5.2.1. NLRP3-Aktivierung durch Triglycerid-reiche Lipoproteine (ApoC3)

Wie eingehend beschrieben, sind drei Aktivierungswege für das NLRP3-Inflammasom bekannt: der kanonische, der nicht-kanonische und der alternative Aktivierungsweg.

ApoC3 als Bestandteil triglyceridreicher Lipoproteine ist in der Lage, über den alternativen Aktivierungsweg das NLRP3-Inflammasom in humanen Monozyten zu stimulieren und somit eine IL-1 β -Freisetzung zu bewirken. Ähnlich der Stimulation mit LPS ist auch bei der Inflammasomaktivierung durch ApoC3 keine vorheriges Primingsignal notwendig, was nahelegt, dass ApoC3 selbst als Ligand für die Inflammasomaktivierung fungieren kann. Über Caspase-8 und einer Dimerisierung von TLR-2 und TLR-4 kann der alternative Aktivierungsweg initiiert werden. Hierfür notwendig ist zusätzlich das Toll-like-Rezeptor-Adaptermolekül SCIMP. ApoC3 induziert über die Bindung von SCIMP mit den Tyrosinkinase Lyn und Syk einen Calciumeinstrom in die Zelle, wodurch die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies induziert wird, was letztlich Caspase-8 aktiviert und zu einer Zusammenlagerung der NLRP3-Inflammasomkomponenten führt. Zusätzlich ist ApoC3 in der Lage, humane Monozyten für eine klassische Inflammasomaktivierung zu primen [155]. Den beschriebenen Effekt scheint ApoC3 allerdings nur zu haben, wenn es in seiner freien, nicht an Lipidpartikel gebundenen Form vorliegt [62].

In der vorliegenden Arbeit konnte ebenfalls gezeigt werden, dass der Effekt von rs10754555 auf die Mortalität zunimmt, wenn ApoC3- oder Triglyceridkonzentrationen erhöht sind, was die Relevanz von ApoC3 als Aktivator des NLRP3-Inflammasoms unterstreicht.

In einer weiteren Arbeit unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass ApoC3 von Patienten mit chronischer Nierenerkrankung zusätzlich posttranslational guanidinyliert ist, was dessen proinflammatorische Effekte verstärkt. Zusätzlich induziert posttranslational guanidinylier-

tes ApoC3 (gApoC3) eine renale Fibrose und verhindert Reparationsvorgänge von geschädigtem Endothel *in vivo*. Zusätzlich sind höhere Guanidinyll-Lysin Konzentrationen im ApoC3 mit einer erhöhten Mortalität und erhöhten Rate renaler und kardiovaskulärer Ereignisse assoziiert [115].

5.2.2. NLRP3-Aktivierung durch Harnsäure

Harnsäure als Endprodukt des Purinstoffwechsels kann bei hohen Konzentrationen als Mononatriumkristall ausfallen. Sowohl die Uratkristalle als auch lösliches Urat sind in der Lage, das NLRP3-Inflammasom zu aktivieren. Reguliert wird dies über den AMPK (AMP-aktivierte Proteinkinase) -mTOR (mammalian target of rapamycin) -Signalweg. Lösliches Urat supprimiert die Aktivität der AMPK, was zu einer mTOR-Aktivierung führt. Dies resultiert in einer gesteigerten Bildung von ROS in Mitochondrien und Induktion von HIF-1 α (hypoxia-inducible-factor-1 α). Die Bildung von ROS induziert eine Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms, HIF-1 α führt zu einer gesteigerten Transkription und Translation von pro-IL-1 β [73].

In der vorliegenden Arbeit konnte dies bestätigt werden. So zeigten PBMCs nach Stimulation mit LPS und Mononatriumurat eine deutlich höhere IL-1 β -Sekretion als nach alleiniger Stimulation mit LPS. Des Weiteren konnte sowohl bei Teilnehmern der LURIC- als auch der UKBioBank-Studie, die erhöhte Harnsäurespiegel aufwiesen und homozygote Träger des SNPs waren, eine signifikant erhöhte kardiovaskuläre Mortalität nachgewiesen werden.

5.2.3. Dysregulierte Hämatopoese

Monozyten und Makrophagen spielen eine herausragende Rolle in der Entstehung der Atherosklerose, indem sie ins Gewebe einwandern und zu Schaumzellen werden. Während bei der stabilen Atherosklerose eine chronische Stimulation durch native oder oxidierte Lipoproteine eine Migration von Monozyten und Makrophagen in die Gefäßwand induziert, kommt es bei einer Plaqueruptur zu einer massiven Infiltration von Monozyten und Makrophagen in das ischämische Gewebe. Der Untergang von Herzmuskelzellen setzt Moleküle und Triggerstoffe frei, wodurch weitere Leukozyten derselben Klasse rekrutiert werden. Somit verschiebt sich das Leukozytenprofil im ischämischen Herzen erheblich von Makrophagen und dendritischen Zellen hin zu inflammatorischen Leukozyten, was mit einer Erhöhung der kardiovaskulären Mortalität korreliert [135]. Der hohe Bedarf an Leukozyten führt zu einer Differenzierung von hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen (HSPC) im Knochenmark und einem Shift hin zur Myelopoese [31,128]. Bei Patienten mit kardiovaskulären Erkrankungen zeigte sich zudem

das Progenitorpotential, gemessen an den „colony-forming units/granulocyte-monocyte (CFU-GM)“, erhöht [143].

Der durch Stress, Schmerz und eingeschränkte linksventrikuläre Funktion nach akutem Myokardinfarkt induzierte erhöhte Sympathikotonus führt über β_3 -Adrenorezeptoren zu einer verstärkten Freisetzung von HSPCs in die Blutbahn und Einwanderung in die Milz, wo die extramedulläre Monozytenproduktion angeregt wird. Zusätzlich führt dies zu einer Reduktion des Chemokin (C-X-C motif) Ligand 12 (CXCL12), der die hämatopoetischen Stammzellen im Knochenmark im Ruhemodus hält [30]. In der Folge führt eine gesteigerte Proliferation der hämatopoetischen Stammzellen zu einer erhöhten Freisetzung von Neutrophilen und inflammatorischen Monozyten und folgender Akkumulation in atherosklerotischen Plaques, resultierend in einer hierdurch erhöhten Plaquevulnerabilität mit erhöhtem Infarktrisiko [55]. Interessanterweise führt auch Diabetes mellitus zu einer Reduktion der CXCL12-Expression und somit zu einer gesteigerten HSPC-Proliferation [61]. Die gesteigerte metabolische Aktivität in Knochenmark und Milz konnte sowohl (sub-)akut als auch nach >12 Monaten nach Myokardinfarkt mittels PET-Bildgebung dargestellt werden [143].

Die ins Infarktgewebe eingewanderten Neutrophilen sezernieren zudem S100A8/A9, was chemotaktisch auf u.a. Monozyten wirkt. Des Weiteren ist S100A8/A9 in der Lage, das NLRP3-Inflammasom zu primen, was zu einer erhöhten IL-1 β -Sekretion führt. IL-1 β wiederum bindet an den IL-1-Rezeptor auf HSPC und stimuliert die Myelopoese [129].

Zusammengefasst führt diese dysregulierte Hämatopoese zu einer weiteren Progression der Atherosklerose und steht so in direktem Zusammenhang mit kardiovaskulären Erkrankungen.

5.2.4. Reprogrammierung des angeborenen Immunsystems

Mehrere Jahrzehnte ging man davon aus, dass lediglich das erworbene Immunsystem ein immunologisches Gedächtnis aufweist. Neuere Studien deuten allerdings darauf hin, dass auch das angeborene Immunsystem eine Reprogrammierung durchlaufen kann und sich somit eine „Trained innate immunity“ ausbilden kann [126].

Ein westlicher Ernährungsstil, β -Glucan und Bacillus Calmette-Guérin (BCG) induzieren eine systemische Inflammation, welche sowohl via NLRP3-Inflammasom und folgender IL-1 β -Produktion als auch über die Produktion von GM-CSF zu einer Proliferation myeloider Progenitorzellen führt. Zusätzliche epigenetische Veränderungen sorgen für die überwiegende Proliferation der myeloiden Leukozyten im Vergleich zur lymphoiden Zelllinie. Nach erneuter

Stimulation mit beispielsweise LPS sind „trainierte“ Individuen zu einer akzelerierten Immunreaktion fähig [126].

Den Einfluss des westlichen Ernährungsstils auf das angeborene Immunsystem haben Christ et al. an *Ldlr*-defizienten Mäusen untersucht. Nach Fütterung einer westlichen Diät konnte eine systemische Inflammation generiert werden, welche nach Rückkehr zur Standard-Diät nicht mehr nachweisbar war. Allerdings führten die durch die westliche Diät induzierte Reprogrammierung des Transkriptoms und des Epigenoms in den myeloiden Progenitorzellen nach erneuter Stimulation zu einer gesteigerten Proliferation und verstärkter Antwort des angeborenen Immunsystems auch nach Beendigung der westlichen Diät. Bei *Ldlr*-/*Nlrp3*-defizienten Mäusen konnten diese Effekte nicht beobachtet werden, was die Rolle des NLRP3-Inflammasoms bei der Reprogrammierung des angeborenen Immunsystems unterstreicht [18].

Diese Erkenntnis trägt zum Verständnis der Auswirkungen kardiovaskulärer Risikofaktoren auf die Ausbildung kardiovaskulärer Krankheiten bei. So bewirkt beispielsweise eine Hyperlipidämie eine langanhaltende Veränderung des hämatopoetischen Systems selbst wenn der Risikofaktor eliminiert wird [18,128]. Dies konnte eine 2021 veröffentlichte Studie aus Tansania unterlegen. Hierbei konnte gezeigt werden, dass die städtische im Vergleich zur ländlichen Bevölkerung einen proinflammatorischen Immunphänotyp auf Transkriptom- und Sekretomebene besitzt. Ursächlich ist unter anderem ein Unterschied in den Ernährungsgewohnheiten, die in der urbanen Bevölkerung weniger Pflanzen-basiert ist. Nach Stimulation mit Bakterien, Pilzen oder TLR-Agonisten setzten die Leukozyten der urbanen Bevölkerung deutlich höhere Konzentrationen proinflammatorischer Zytokine frei als die der ländlichen Bevölkerung, bei denen das antiinflammatorische Zytokin IL-10 stärker sezerniert wurde [138].

5.2.5. Klonale Hämatopoese

Alter ist ein Risikofaktor für die Entwicklung von Malignomen und kardiovaskulären Erkrankungen [68]. Während des Alterungsprozesses des hämatopoetischen Systems kommt es zu einer Akkumulation somatischer Mutationen in Genen, die für die Regulation der Hämatopoese verantwortlich sind (z.B. *Tet2*, *Dnmt3a*, *Asx11*, *Tp53*, *Jak2*). Dies kann zu einer klonalen Expansion von HSPCs führen. Derartige Mutationen liegen in ca. 10% der über 70-Jährigen vor. Die Anwesenheit solcher Mutation in Abwesenheit hämatologischer Veränderungen wird als „Clonal haematopoiesis of indeterminate potential“ (CHIP) bezeichnet [67].

CHIP-Träger weisen ein 1,9-fach erhöhtes Risiko auf, eine KHK zu entwickeln, und ein 4-fach erhöhtes Risiko, einen frühen Myokardinfarkt (<50 Jahre) zu erleiden im Vergleich zu Nicht-

Trägern [68]. CHIP stellt zudem einen unabhängigen Risikofaktor für ein schlechteres Outcome bei Patienten mit bereits bestehender atherosklerotischer kardiovaskulärer Erkrankung dar. Besonders betroffen sind hierbei Patienten mit einer Mutation im *Tet2*-Gen oder Genen, die für das Spliceosom kodieren (*SF3B1/SRSF2/U2AF1*). Mit einer erhöhten Gesamtsterblichkeit assoziiert waren CHIP-Mutation in Genen, die für DNA-Reparaturmechanismen kodieren (PPM1D/Tp53) [50].

Die Transplantation von Knochenmark von *Tet2*-defizienten Mäusen in *Ldlr*-defiziente Mäuse führte zu einer deutlichen Größenzunahme der atherosklerotischen Plaque. Zusätzlich konnte in *Tet2*-defizienten Makrophagen eine deutlich höhere NLRP3-Inflammasom-vermittelte IL-1 β -Sekretion nachgewiesen werden. Diese konnte durch den spezifischen NLRP3-Inhibitor MCC950 reduziert werden und schwächte so den CHIP-Effekt auf die Bildung atherosklerotischer Läsionen ab [40]. In einer Subgruppe von Probanden der CANTOS-Studie konnte bei Patienten mit *Tet2* CHIPs eine deutlichere Reduktion von MACE (major adverse cardiovascular events) nach Therapie mit Canakinumab beobachtet werden als bei Patienten mit anderen CHIP-Subtypen bzw. ohne CHIP [50,133].

In klinischen Studien wiesen Patienten mit Mutationen im *Tet2*- oder *Dnmt3a*-Gen eine schnellere Verschlechterung der Herzinsuffizienz, eine höhere Hospitalisierungsrate sowie eine gesteigerte Herzinsuffizienz-assoziierte Mortalität auf und zwar unabhängig, ob die Ätiologie ischämisch oder nicht-ischämisch war [98]. Mittels single-cell RNA-Sequenzierung konnte außerdem gezeigt werden, dass das Vorhandensein somatischer Mutationen im *Tet2*- oder *Dnmt3a*-Gen in peripheren Monozyten bei Patienten mit Aortenklappenstenose oder Herzinsuffizienz mit einem proinflammatorischen Phänotyp einhergeht. So waren unter anderem die Gene, die für das NLRP3-Inflammasom und die Zytokine IL-1 β , IL-6 und IL-8 kodieren, hochreguliert [2].

5.3. Therapeutische Konsequenzen

Die zuvor beschriebenen Erkenntnisse heben die Bedeutung von inflammatorischen Vorgängen und die Aktivierung des angeborenen Immunsystems in der Pathogenese kardiovaskulärer Erkrankungen hervor. Dass zielgerichtete Therapien gegen spezifische inflammatorische Komponenten einen prognostischen Vorteil auf das kardiovaskuläre Outcome von Patienten haben, wurde erstmals in der Canakinumab Anti-Inflammatory Thrombosis Outcome Study (CANTOS) gezeigt [105].

5.3.1. Inhibition von IL-1 β

Als Effektorzytokin des NLRP3-Inflammasoms ist IL-1 β von besonderem Interesse einer zielgerichteten antiinflammatorischen Therapie. Drei Substanzen spielen hier eine klinische Rolle durch Hemmung der IL-1-Wirkung: Canakinumab (s. unten), Anakinra (ein rekombinanter IL-1-Rezeptorantagonist) und Rilonacept (ein löslicher IL-1 β -Trap) [26]. Eine kleine Studie an Hämodialysepatienten konnte zeigen, dass durch Therapie mit Anakinra eine signifikante Reduktion von hsCRP und IL-6 gelang [63]. Rilonacept reduzierte bei Patienten mit CKD im Stadium 3 und 4 signifikant den hsCRP-Spiegel im Vergleich zu Placebo und verbesserte die flussvermittelte Dilatation der Arteria brachialis als Marker der endothelialen Dysfunktion [96].

Die CANTOS-Studie ist eine multinationale, randomisierte, placebo-kontrollierte, doppelblinde Studie. Eingeschlossen wurden 10061 Patienten nach stattgehabtem Myokardinfarkt (<30 Tage vor Randomisierung) und erhöhtem hsCRP (≥ 2 mg/l) unter bereits bestehender aggressiver Sekundärprävention inkl. lipidsenkender Therapie. Die Patienten wurden randomisiert in einen Placebo- oder Canakinumab (50 mg vs. 150 mg vs. 300 mg) -Arm. Canakinumab, ein humaner monoklonaler IL-1 β -Antikörper, wurde alle 3 Monate subkutan verabreicht. Der primäre Endpunkt der Studie war das erste Auftreten eines nicht-letalen Myokardinfarkts oder Schlaganfall sowie der Tod an einer kardiovaskulären Erkrankung [105]. In der Dosis von 150 mg und 300 mg führte Canakinumab zu einer signifikanten Reduktion des primären Endpunktes (HR: 0,85, 95%-KI: 0,76-0,96, p=0,007). Einen signifikanten Effekt auf den Blutdruck oder den LDL- bzw. HDL-Spiegel konnte nicht beobachtet werden. Ebenso zeigte sich kein Unterschied in der Gesamtsterblichkeit zwischen der Placebo- und den Canakinumab-Gruppen. Allerdings konnte unter Canakinumab dosisabhängig eine signifikante Reduktion von hsCRP und IL-6 erzielt werden. Als Nebenwirkung wurden in den Canakinumab-Gruppen signifikant mehr Todesfälle beobachtet, welche Infektionen und Septikämien geschuldet waren. Eine erhöhte Rate an opportunistischen Infektionen oder Tuberkulose-Reaktivierungen konnten nicht beobachtet werden [105], was bei anderen immunmodulatorischen Substanzen wie Steroiden oder TNF α -Blockern durchaus der Fall ist. Dies unterstreicht den Unterschied zwischen einer antiinflammatorischen und einer immunsuppressiven Therapie.

Die CANTOS-Studie zeigt damit eindrücklich und erstmals den Benefit einer zielgerichteten antiinflammatorischen Therapie bei Patienten mit KHK. Den größten Vorteil hatten in der CANTOS-Studie die Patienten, bei denen unter Canakinumab eine Senkung des hsCRP und des IL-6 erzielt werden konnte, d.h. die Patienten mit dem größten antiinflammatorischen Ansprechen [107,108]. Während Canakinumab eine dosisabhängige Senkung von IL-6 induzierte,

blieb der IL-18-Spiegel unverändert. Beide sind allerdings mit einem erhöhten Risiko für künftige kardiovaskuläre Ereignisse assoziiert, sodass davon auszugehen ist, dass trotz einer IL-1 β -Inhibition weiterhin ein residuelles inflammatorisches Risiko besteht. Dies unterstreicht die Notwendigkeit von Therapeutika, die auch diese Signalwege adressieren, wie beispielsweise Inhibitoren des NLRP3-Inflammasoms [110].

Zusätzlich konnte in der CANTOS-Studie beobachtet werden, dass die Inzidenz von Arthritiden, Gicht und Osteoarthritis in der Canakinumab-Gruppe deutlich geringer war, was durch die Reduktion der niedriggradigen chronischen Inflammation durch IL-1 β -Inhibition zu erklären ist [105]. Interessanterweise zeigte sich durch Canakinumab zusätzlich eine dosisabhängige Reduktion der Mortalität an Tumorerkrankungen, insbesondere an Bronchialkarzinomen. Man geht davon aus, dass die Progression, der Grad des invasiven Wachstums sowie das Ausmaß der Metastasierung durch Canakinumab reduziert wird [106]. Der Einfluss von IL-1 β bei der Karzinogenese, Tumorwachstum, Invasivität und bei der Interaktion zwischen Tumor- und Wirtszelle ist bereits aus experimentellen Studien bekannt [5]. Somit könnte eine IL-1 β -Inhibition in Zukunft auch in der Therapie von onkologischen Erkrankungen eine Rolle spielen.

5.3.2. Inhibition von IL-6

Als Konsequenz der positiven Effekte der CANTOS-Studie auf die Prävention kardiovaskulärer Ereignisse durch IL-1 β -Inhibition, weckt auch das nachfolgend aktivierte IL-6 als Ziel einer therapeutischen Intervention das Interesse der aktuellen Forschung [104]. Der IL-6-Rezeptor-Antikörper Tocilizumab konnte in einer kleinen Studie an NSTEMI-Patienten eine Reduktion von hsCRP und Troponin nach perkutaner Koronarintervention (PCI) zeigen [74]. In der ASSAIL-MI-Studie konnte bei STEMI-Patienten ein positiver Effekt von Tocilizumab auf das nach Reperfusionstherapie erhaltene Myokardgewebe und die mikrovaskuläre Obstruktion erzielt werden ohne Beeinflussung der Infarktgröße (gemessen mittels MRT und anhand kardialer Nekroseparameter (CK-MB, Troponin T)) [15].

Die Auswirkungen einer IL-6-Inhibition mit dem neuen humanisierten monoklonalen IL-6-Antikörper Ziltivekimab bei Patienten mit hohem kardiovaskulärem Risiko wurde in der RESCUE-Studie untersucht. Die RESCUE-Studie ist eine randomisierte, doppel-blinde Phase II-Studie. Eingeschlossen wurden Patienten mit einer moderaten bis schweren CKD (Stadium 3-5) und einem hsCRP ≥ 2 mg/l. Randomisiert wurde in Placebo und Ziltivekimab 7,5 mg vs. 15 mg vs. 30 mg subkutan alle 4 Wochen. Nach 12 Wochen konnte hsCRP dosisabhängig um 77 %, 88 % und 92 % gesenkt werden im Vergleich zu 4 % in der Placebo-Gruppe. Zusätzlich

konnte eine dosisabhängige Reduktion von Fibrinogen, Serumamyloid A, Haptoglobin, sekretorische Phospholipase A2 und Lp(a) beobachtet werden. Relevante Sicherheitsbedenken ergaben sich nicht. Zudem zeigte sich kein Effekt auf die Gesamtcholesterin/HDL-Ratio [111].

In Folge der RESCUE-Studie wurde 2021 die ZEUS (Ziltivekimab Cardiovascular Outcomes Study) -Studie initiiert, welche 6200 Patienten mit CKD im Stadium 3-4 und erhöhten hsCRP-Spiegeln einschließt und Ziltivekimab (15 mg s.c. alle 4 Wochen) vs. Placebo vergleicht. Untersucht werden sollen die Auswirkungen eines reduzierten IL-6-Spiegels durch Ziltivekimab auf die Anzahl kardiovaskulärer Ereignisse (Myokardinfarkt, Schlaganfall, Tod an kardiovaskulärem Ereignis). Als sekundärer Endpunkt sollen die Effekte einer IL-6-Inhibition auf die Progression der CKD (Änderung der GFR und Albumin/Kreatinin-Ratio im Urin) untersucht werden. Das Ende der Studie wird in 10/2025 erwartet [112].

5.3.3. Colchicin

Im Gegensatz zu Canakinumab oder Ziltivekimab ist die antiinflammatorische Wirkung von Colchicin weniger spezifisch. Es hemmt die Polymerisation von Mikrotubuli, wodurch intrazelluläre Transportvorgänge gestört werden. Zudem stört es die Chemotaxis von Neutrophilen, die Adhäsion an geschädigtes Endothel und hemmt die Freisetzung proinflammatorischer Zytokine u.a. durch NLRP3-Inflammasominhibition. In der Therapie der Gicht oder des familiären Mittelmeerfiebers wird Colchicin seit vielen Jahren eingesetzt und im Vergleich zu einer zielgerichteten Therapie kostengünstig [23].

Der Einfluss von Colchicin in der Sekundärprävention nach kardiovaskulärem Ereignis wurde in der COLCOT [137]- und LoDoCo2 [93]-Studie untersucht. In die COLCOT-Studie wurden 4745 Patienten innerhalb von 30 Tage nach stattgehabtem Myokardinfarkt eingeschlossen und in eine Colchicin-Gruppe (0,5 mg/Tag per os) und Placebo randomisiert. Der kombinierte Endpunkt aus Tod an einer kardiovaskulären Erkrankung, überlebter Herzstillstand, Myokardinfarkt, Schlaganfall und Hospitalisation bei Angina pectoris mit Notwendigkeit zur koronaren Revaskularisation war in der Colchicin-Gruppe signifikant reduziert (HR: 0,77, 95%-KI: 0,61-0,96, $p=0,02$). Allerdings traten unter Colchicin mehr gastrointestinale (Diarrhoe, Übelkeit, Erbrechen) unerwünschte Arzneimittelwirkungen und eine höhere Rate an Pneumonien auf [137]. In der LoDoCo2-Studie wurde die Risikoreduktion durch Colchicin in gleicher Dosis bei Patienten mit chronischer KHK untersucht. In diese randomisierte, kontrollierte, doppelblinde Studie wurden 5522 Patienten eingeschlossen. Colchicin reduzierte den primären kardi-

ovaskulären Endpunkt (kombiniert aus Tod an kardiovaskulärer Erkrankung, spontanem Myokardinfarkt, ischämischer Schlaganfall, ischämiebedingte koronare Revaskularisation) um 31% im Vergleich zu Placebo (HR: 0,69, 95%-KI: 0,57-0,83, $p < 0,001$). Die in der COLCOT-Studie unter Colchicin vermehrt aufgetretenen unerwünschten Arzneimittelwirkungen traten in der LoDoCO2-Studie in der Colchicin-Gruppe nicht vermehrt auf. Allerdings traten in der Colchicin-Gruppe mehr nicht kardiovaskulär-verursachte Todesfälle auf [93].

In einer Metaanalyse von insgesamt 5 Studien mit insgesamt 11816 Patienten zeigte sich unter Colchicintherapie eine Risikoreduktion von Myokardinfarkt, Schlaganfall und Tod an einem kardiovaskulären Ereignis von insgesamt 25% (RR: 0,75, 95%-KI: 0,61-0,92, $p = 0,005$). In der Colchicin-Gruppe war die Rate an tödlichen kardiovaskulären Ereignissen geringer, allerdings zeigte sich eine Erhöhung der Todesfälle, deren Ursache nicht kardiovaskulären Ereignissen geschuldet ist. Die Ursache hierfür ist bislang unklar [38].

Aufgrund der eingeschränkten Clearance von Colchicin bei chronischer Nierenerkrankung und somit erhöhtem Toxizitätsrisiko (v.a. Myotoxizität [36]), wird Colchicin als antiinflammatorische Therapieoption bei CKD-Patienten auch in Zukunft vermutlich keine Rolle spielen.

5.3.4. Methotrexat

Auf Basis der Erkenntnisse der CANTOS-Studie, dass eine Reduktion der Inflammation kardiovaskuläre Ereignisse verhindern kann, wurde in der CIRT (Cardiovascular Inflammation Reduction Trial-Studie) der Effekt von niedrig-dosiertem Methotrexat (15-20 mg/Woche) vs. Placebo auf den kombinierten kardiovaskulären Endpunkt (Myokardinfarkt, Schlaganfall, Hospitalisation bei instabiler Angina pectoris mit Notwendigkeit der koronaren Revaskularisation, kardiovaskulärer Tod) untersucht. Eingeschlossen wurden 4786 Patienten nach stattgehabtem Myokardinfarkt oder Mehrgefäß-KHK und zusätzlich bestehendem Diabetes mellitus Typ 2 oder metabolischem Syndrom. Es zeigte sich, dass niedrig-dosiertes Methotrexat weder die Konzentrationen von IL-1 β , IL-6 und hsCRP senken konnte, noch führte es zu weniger kardiovaskulären Ereignissen im Vergleich zu Placebo. Allerdings kam es unter Methotrexat häufiger zu einer Erhöhung der Leberwerte, Abfall der Leukozyten und des Hämatokrits und einer erhöhten Inzidenz von kutanen Nicht-Basalzellkarzinomen [109].

Dies führt respektive der positiven Ergebnisse aus der CANTOS-, COLCOT- und LoDoCo2-Studie zu der Annahme, dass durch eine spezifische Inhibition der NLRP3-IL-1 β -IL-6-CRP-Signalkaskade eine langfristigen Atheroprotektion bewirkt werden kann.

5.3.5. Etablierte Therapien mit anti-inflammatorischen Effekten

Neben den neuen und vielversprechenden zielgerichteten Therapien existieren eine Reihe etablierter Medikamente, welche ebenfalls antiinflammatorische Effekte aufweisen und so einen Stellenwert in der Therapie von kardiovaskulären Erkrankungen haben.

Eine wichtige Substanzgruppe sind Statine. So konnte in der JUPITER-Studie bei scheinbar gesunden Probanden ohne bekannte Hyperlipidämie aber mit erhöhtem hsCRP durch Gabe von Rosuvastatin die Inzidenz schwerer kardiovaskulärer Ereignisse gesenkt werden [103]. Bei Patienten mit CKD führte eine Therapie mit Atorvastatin neben einem lipidsenkenden Effekt zu einer Reduktion der hsCRP-, IL-1 β - und TNF α -Spiegel [46]. Unabhängig von der LDL-Senkung besitzen Statine pleiotrope Effekte. So verbessern sie die endotheliale Dysfunktion, erhöhen die NO-Verfügbarkeit, haben antioxidative Eigenschaften, hemmen inflammatorische Signalwege und stabilisieren atherosklerotische Plaques [22].

Bei Patienten mit Hypercholesterinämie und hohem kardiovaskulären Risiko, die trotz maximal tolerierter Statintherapie zusätzlich mit Ezetimib und Bempedoinsäure behandelt wurden, konnte neben einer deutlichen LDL-Senkung zusätzlich eine Reduktion des hsCRP-Spiegels beobachtet werden [7].

SGLT2 (Sodium-Glucose-Cotransporter 2) -Inhibitoren haben sowohl einen Benefit für Patienten mit CKD als auch bei Patienten mit Herzinsuffizienz. So reduzieren sie das Risiko des Fortschreitens der CKD und das Risiko einer Hospitalisation bei Herzinsuffizienz, unabhängig vom Vorliegen eines Diabetes mellitus und unabhängig vom Stadium der CKD und Herzinsuffizienz [142]. Man geht davon aus, dass hierfür auch eine antiinflammatorische Wirkung verantwortlich ist. So konnte bei Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2 und hohem kardiovaskulären Risiko nach Gabe von Empagliflozin eine deutlich reduzierte IL-1 β -Sekretion aus Makrophagen beobachtet werden, was eine Inhibition des NLRP3-Inflammasoms nahelegt [70]. Für Canagliflozin konnte gezeigt werden, dass es die Plasmaspiegel von TNF-Rezeptor-1, IL-6, Matrixmetalloproteinase 7 und Fibronectin 1 senken kann [54].

Sowohl für SGLT2-Hemmer als auch für GLP (Glucagon-like peptide) -1-Rezeptor-Agonisten sind antiinflammatorische, aber auch antioxidative Eigenschaften beschrieben. Dies hat positive Auswirkungen auf die (durch Diabetes vorgeschädigten) Nieren, Herz, Gefäße, Leber und Fettgewebe [148].

In der FIDELIO-DKD-Studie konnte für den selektiven Mineralokortikoidantagonisten Furosemid eine Reduktion der Progression einer diabetischen Nephropathie und eine Reduktion der

kardiovaskulären Ereignisse beschrieben werden. Es ist davon auszugehen, dass auch hierbei antiinflammatorische Wirkmechanismen eine Rolle spielen [6].

In Zukunft könnte die Kombination einer maximal tolerierten lipidsenkenden Therapie mit einer suffizienten Inhibition inflammatorischer Mechanismen eine Strategie in der Entwicklung neuer pharmakologischer Therapieregime sein. Dies könnte zum einen durch Kombination der verschiedenen Medikamente oder durch Entwicklung bispezifischer monoklonaler Antikörper erreicht werden [128].

5.4. Ausblick

5.4.1. Konsequenzen der vorliegenden Arbeit

Die Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms und Freisetzung seiner Effektorzytokine vermittelt eine sterile Inflammation, welche die Entwicklung der Atherosklerose fördert und mit einer erhöhten Rate an kardiovaskulären Ereignissen einhergeht. Wie zuvor beschrieben existieren eine Reihe von unspezifischen (z.B. Colchicin) und spezifischen (z.B. Canakinumab, Ziltivekimab) Inhibitoren des Inflammasoms bzw. IL-1 β oder IL-6 mit einer antiinflammatorischen Wirkung.

Zum einen sind die neuen zielgerichteten Therapien mit hohen Therapiekosten verbunden und zum anderen können unerwünschte Arzneimittelwirkungen auftreten, sodass eine genaue Patientenselektion und Abschätzung des individuellen kardiovaskulären Risikos vor Therapieeinleitung essentiell sind.

Das Screening auf genetische Varianten, wie hier beispielsweise auf den SNP rs10754555, mit erhöhter NLRP3-Aktivierung und folglich erhöhten IL-1 β und IL-18-Spiegeln könnte möglicherweise dazu beitragen, Menschen mit genetisch-bedingt erhöhtem kardiovaskulärem Risiko zu identifizieren. Insbesondere könnte dies für Menschen von Vorteil sein, die ohnehin erhöhte Plasmaspiegel von bekannten NLRP3-Inflammasomaktivatoren (z.B. ApoC3, Triglyceride, Urat) haben.

Wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden konnte, spielt die Identifikation genetischer Varianten vor allem in jüngerem Alter eine entscheidende Rolle, da hier der Einfluss einzelner Genpolymorphismen noch den Einfluss der klassischen kardiovaskulären Risikofaktoren überwiegt. Durch Einleitung einer spezifischen Therapie könnte so eventuell der klinische Verlauf günstig beeinflusst werden.

Eine weitere Möglichkeit, die geeigneten Patienten zu selektieren, wäre die Messung der Ansprechrate auf die antiinflammatorische Therapie. So könnte beispielsweise durch Messung der Effektorzytokine IL-1 β , IL-6, IL-18 und des hsCRP die Menschen identifiziert werden, die langfristig von einer antiinflammatorischen Therapie profitieren.

5.4.2. Neue anti-inflammatorische Therapieansätze

Aufgrund der Vielzahl an beteiligten Signalkaskaden und -molekülen existieren auch diverse mögliche therapeutische Angriffspunkte, so sind mittlerweile verschiedene Substanzen in experimenteller Erprobung [88].

Ein neuer, sehr spezifischer Ansatzpunkt ist die direkte Inhibition des NLRP3-Inflammasoms beispielsweise durch MCC950. MCC950 blockiert den kanonischen und den nicht-kanonischen Aktivierungsweg sowohl in murinen als auch in humanen Makrophagen *in vitro* [134]. Allerdings musste eine Phase II-Studie von MCC950 zur Therapie der rheumatoiden Arthritis aufgrund einer medikamentös-induzierten Hepatotoxizität abgebrochen werden, was zeigt, dass die Übertragbarkeit vom Tier auf den Menschen eine weitere Herausforderung darstellt [88].

Eine weitere Substanzgruppe, die hinsichtlich ihrer antiinflammatorischen Wirkung untersucht wird, sind die Janus Kinase (JAK)-Inhibitoren. Sie spielen eine entscheidende Rolle in der Downstream-Signalkaskade proinflammatorisch wirksamer Zytokine, u.a. IL-6. Sie stellen in Zukunft mögliche Therapieoptionen bei der rheumatoiden Arthritis, Psoriasis und chronisch entzündlichen Darmerkrankungen dar [116]. Im Mausmodell mit *Jak*^{V617F}-induzierter Atherosklerose führte die JAK1/2-Inhibition zu einer Reduktion der IL-18-Spiegel, steigerte allerdings den Cholesterinspiegel. Die Größe der atherosklerotischen Plaques wurde zwar dezent kleiner, allerdings nahm die Plaque-Instabilität durch Vergrößerung des nekrotischen Kerns zu [37].

Bei Patienten nach STEMI konnte mit dem p38 Mitogen-aktivierten Kinase (MAPK)-Inhibitor Losmapimod eine Reduktion des hsCRP und NTproBNP erzielt werden [16], allerdings konnte keine Reduktion der Rate schwerer kardiovaskulärer Ereignisse beobachtet werden [97].

Ein weiterer spannender Ansatz sind sog. Senolytika. Darunter versteht man Verbindungen, die mit Proteinen, die in seneszenten Zellen ein Weiterleben induzieren, interagieren und somit eine Apoptose auslösen können. Die vielversprechendsten Substanzen in der kardiovaskulären Forschung sind aktuell der Bcl2-Inhibitor Navitoclax und die Kombination aus dem Tyrosinkinaseinhibitor Dasatinib und Quercetin [27]. Sie reduzieren zum einen die Anzahl seneszenten Zellen und führen außerdem zu einer Abnahme der zirkulierenden Plasmaspiegel von u.a. IL-1 α und IL-6 [57].

Weitere vielversprechende antiinflammatorische Angriffspunkte adressieren die Immun-Checkpoint-Modulation, die Bildung von NETs, die Modulation von Chemokin-Signalkaskaden mit Änderung der Leukozyten-Endothel-Adhäsion und Stimulation der Makrophagen-Efferozytose [125].

5.5. Limitationen der Arbeit

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass das NLRP3-Inflammasom als potentieller Risikofaktor die Entstehung kardiovaskulärer Erkrankungen und Mortalität fördert. Dennoch sind weitere Studien notwendig, die zeigen, dass insbesondere Träger des SNPs rs10754555 von einer spezifischen antiinflammatorischen Therapie profitieren.

In dieser Studie war das Vorhandensein des SNPs rs10754555 mit einer erhöhten Mortalität verbunden. Aufgrund des Studiendesigns können allerdings keine Aussagen darüber getroffen werden, inwiefern eine Assoziation zwischen dem SNP-Trägerstatus und nicht-tödlichen kardiovaskulären Ereignissen besteht.

Der altersabhängige Effekt von rs10754555 auf das kardiovaskuläre Risiko konnte aufgrund eines eingeschränkten Zugangs zu den individuellen Patientendaten nicht an dem gesamten Kollektiv der CARDIoGRAM-Studie validiert werden. Aufgrund dessen wurde die Interaktion am Kollektiv der GerMIFS Studien (N=6389 KHK-Patienten und N=5687 Kontrollpatienten) validiert, welches Teil des CARDIoGRAM-Konsortiums war.

5.6. Zusammenfassung

Das zentrale Ergebnis dieser Arbeit ist der Nachweis, dass eine genetisch-determinierte sterile Inflammation, welche durch spezifische zelluläre Aktivierungswege (v.a. NLRP3) vermittelt wird, mit einer höheren KHK-Prävalenz und einer erhöhten kardiovaskulären Mortalität assoziiert ist. Besonders eindrücklich konnte diese Assoziation in der jüngeren Bevölkerungsgruppe (<60 Jahre) gezeigt werden. Denn vor allem in dieser Altersgruppe dominiert der Einfluss der genetischen Prädisposition auf die Entstehung einer kardiovaskulären Erkrankung gegenüber den bekannten kardiovaskulären Risikofaktoren, welche durch Lebensstil und Umwelteinflüsse auf den Körper einwirken.

Diese Schlussfolgerungen heben die Rolle des NLRP3-Inflammasoms als pathophysiologisch wichtigen Schlüsselpunkt in der Entwicklung kardiovaskulärer Erkrankungen heraus und markieren einen möglichen individuellen therapeutischen Angriffspunkt für Patienten mit einem durch Inflammation vermitteltem hohem kardiovaskulären Risiko.

6. Literaturverzeichnis

1. Abecasis GR, Auton A, Brooks LD, DePristo MA, Durbin RM, Handsaker RE, Kang HM, Marth GT, McVean GA, 1000 Genomes Project Consortium (2013) An integrated map of genetic variation from 1 , 092 human genomes. *Nature* 491:56–65
2. Abplanalp WT, Cremer S, John D, Hoffmann J, Schuhmacher B, Merten M, Rieger MA, Vasa-Nicotera M, Zeiher AM, Dimmeler S (2021) Clonal Hematopoiesis-Driver DNMT3A Mutations Alter Immune Cells in Heart Failure. *Circ Res* 128:216–228
3. Anders H-J, Schaefer L (2014) Beyond Tissue Injury-Damage-Associated Molecular Patterns, Toll-Like Receptors, and Inflammasomes Also Drive Regeneration and Fibrosis. *Journal of the American Society of Nephrology* 25:1387–1400
4. Andrade-Oliveira V, Foresto-Neto O, Watanabe IKM, Zatz R, Câmara NOS (2019) Inflammation in Renal Diseases: New and Old Players. *Front Pharmacol* 10:1–19
5. Apte RN, Dotan S, Elkabets M, White MR, Reich E, Carmi Y, Song X, Dvozkina T, Krelin Y, Voronov E (2006) The involvement of IL-1 in tumorigenesis, tumor invasiveness, metastasis and tumor-host interactions. *Cancer and Metastasis Reviews* 25:387–408
6. Bakris GL, Agarwal R, Anker SD, Pitt B, Ruilope LM, Rossing P, Kolkhof P, Nowack C, Schloemer P, Joseph A, Filippatos G (2020) Effect of Finerenone on Chronic Kidney Disease Outcomes in Type 2 Diabetes. *New England Journal of Medicine* 383:2219–2229
7. Ballantyne CM, Laufs U, Ray KK, Leiter LA, Bays HE, Goldberg AC, Stroes ESG, MacDougall D, Zhao X, Catapano AL (2020) Bempedoic acid plus ezetimibe fixed-dose combination in patients with hypercholesterolemia and high CVD risk treated with maximally tolerated statin therapy. *Eur J Prev Cardiol* 27:593–603
8. Basiorka AA, McGraw KL, Abbas-Aghababazadeh F, McLemore AF, Vincelette ND, Ward GA, Eksioğlu EA, Sallman DA, Ali N Al, Padron E, Pinilla-Ibarz J, Komrokji R, Masala E, Santini V, Kosmider O, Fontenay M, Fenaux P, Sokol L, Wei S, Fridley B, List AF (2018) Assessment of ASC specks as a putative biomarker of pyroptosis in myelodysplastic syndromes: an observational cohort study. *Lancet Haematol* 5:e393–e402

9. Benjamin EJ, Muntner P, Alonso A, Bittencourt MS, Callaway CW, Carson AP, Chamberlain AM, Chang AR, Cheng S, Das SR, Delling FN, Djousse L, Elkind MSV, Ferguson JF, Fornage M, Jordan LC, Khan SS, Kissela BM, Knutson KL, Kwan TW, Lackland DT, Lewis TT, Lichtman JH, Longenecker CT, Loop MS, Lutsey PL, Martin SS, Matsushita K, Moran AE, Mussolino ME, O'Flaherty M, Pandey A, Perak AM, Rosamond WD, Roth GA, Sampson UKA, Satou GM, Schroeder EB, Shah SH, Spartano NL, Stokes A, Tirschwell DL, Tsao CW, Turakhia MP, VanWagner LB, Wilkins JT, Wong SS, Virani SS (2019) Heart Disease and Stroke Statistics-2019 Update: A Report From the American Heart Association.
10. Berman AN, Blankstein R (2019) Optimizing Dyslipidemia Management for the Prevention of Cardiovascular Disease: a Focus on Risk Assessment and Therapeutic Options. *Curr Cardiol Rep* 21:110
11. Berry JD, Dyer A, Cai X, Garside DB, Ning H, Thomas A, Greenland P, Van Horn L, Tracy RP, Lloyd-Jones DM (2012) Lifetime Risks of Cardiovascular Disease. *New England Journal of Medicine* 366:321–329
12. Bohula EA, Giugliano RP, Cannon CP, Zhou J, Murphy SA, White JA, Tershakovec AM, Blazing MA, Braunwald E (2015) Achievement of dual low-density lipoprotein cholesterol and high-sensitivity c-reactive protein targets more frequent with the addition of ezetimibe to simvastatin and associated with better outcomes in IMPROVE-IT. *Circulation* 132:1224–1233
13. Boyle AP, Hong EL, Hariharan M, Cheng Y, Schaub MA, Kasowski M, Karczewski KJ, Park J, Hitz BC, Weng S, Cherry JM, Snyder M (2012) Annotation of functional variation in personal genomes using RegulomeDB. *Genome Res* 22:1790–1797
14. Brænne I, Willenborg C, Tragante V, Kessler T, Zeng L, Reiz B, Kleinecke M, Von Ameln S, Willer CJ, Laakso M, Wild PS, Zeller T, Wallentin L, Franks PW, Salomaa V, Dehghan A, Meitinger T, Samani NJ, Asselbergs FW, Erdmann J, Schunkert H (2017) A genomic exploration identifies mechanisms that may explain adverse cardiovascular effects of COX-2 inhibitors. *Sci Rep* 7:1–9
15. Broch K, Anstensrud AK, Woxholt S, Sharma K, Tøllefsen IM, Bendz B, Aakhus S, Ueland T, Amundsen BH, Damås JK, Berg ES, Bjørkelund E, Bendz C, Hopp E, Kleveland O, Stensæth KH, Opdahl A, Kløw NE, Seljeflot I, Andersen GØ, Wiseth R, Aukrust P, Gullestad L (2021) Randomized Trial of Interleukin-6 Receptor Inhibition in Patients

- With Acute ST-Segment Elevation Myocardial Infarction. *J Am Coll Cardiol* 77:1845–1855
16. Cavender MA, O'Donoghue ML, Abbate A, Aylward P, Fox KA, Glaser RX, Park J-G, Lopez-Sendon J, Steg PG, Sabatine MS, Morrow DA (2022) Inhibition of p38 MAP kinase in patients with ST-elevation myocardial infarction – findings from the LATITUDE–TIMI 60 trial. *Am Heart J* 243:147–157
 17. Chen J-Q, Szodoray P, Zeher M (2016) Toll-Like Receptor Pathways in Autoimmune Diseases. *Clin Rev Allergy Immunol* 50:1–17
 18. Christ A, Günther P, Lauterbach MAR, Duester P, Biswas D, Pelka K, Scholz CJ, Oosting M, Haendler K, Baßler K, Klee K, Schulte-Schrepping J, Ulas T, Moorlag SJCFM, Kumar V, Park MH, Joosten LAB, Groh LA, Riksen NP, Espevik T, Schlitzer A, Li Y, Fitzgerald ML, Netea MG, Schultze JL, Latz E, Conceptualization AC, Methodology EL,; Software EL,; Investigation JLS; (2018) Western Diet Triggers NLRP3-Dependent Innate Immune Reprogramming HHS Public Access. *Cell* 172:162–175
 19. Cochain C, Zerneck A (2017) Macrophages in vascular inflammation and atherosclerosis. *Pflugers Arch* 469:485–499
 20. Cybulsky MI, Cheong C, Robbins CS (2016) Macrophages and Dendritic Cells: Partners in Atherogenesis. *Circ Res* 118:637–652
 21. Dahlöf B (2010) Cardiovascular Disease Risk Factors: Epidemiology and Risk Assessment. *American Journal of Cardiology* 105:3A-9A
 22. Davignon J (2004) Beneficial cardiovascular pleiotropic effects of statins. *Circulation* 109:III39-43
 23. Deftereos SG, Beerkens FJ, Shah B, Giannopoulos G, Vrachatis DA, Giotaki SG, Siasos G, Nicolas J, Arnott C, Patel S, Parsons M, Tardif JC, Kovacic JC, Dangas GD (2022) Colchicine in Cardiovascular Disease: In-Depth Review. *Circulation* 145:61–78
 24. Dehghan A, Köttgen A, Yang Q, Hwang SJ, Kao WL, Rivadeneira F, Boerwinkle E, Levy D, Hofman A, Astor BC, Benjamin EJ, van Duijn CM, Witteman JC, Coresh J, Fox CS (2008) Association of three genetic loci with uric acid concentration and risk of gout: a genome-wide association study. *The Lancet* 372:1953–1961
 25. Dinarello CA (2009) Immunological and Inflammatory Functions of the Interleukin-1 Family. *Annu Rev Immunol* 27:519–550

26. Dinarello CA, van der Meer JWM (2013) Treating inflammation by blocking interleukin-1 in humans. *Semin Immunol* 25:469–484
27. Dookun E, Passos JF, Arthur HM, Richardson GD (2022) Therapeutic Potential of Senolytics in Cardiovascular Disease. *Cardiovasc Drugs Ther* 36:187–196
28. Döring Y, Soehnlein O, Weber C (2017) Neutrophil extracellular traps in atherosclerosis and atherothrombosis. *Circ Res* 120:736–743
29. Duewell P, Kono H, Rayner KJ, Sirois CM, Vladimer G, Bauernfeind FG, Abela GS, Franchi L, Nüez G, Schnurr M, Espevik T, Lien E, Fitzgerald KA, Rock KL, Moore KJ, Wright SD, Hornung V, Latz E (2010) NLRP3 inflammasomes are required for atherogenesis and activated by cholesterol crystals. *Nature* 464:1357–1361
30. Dutta P, Courties G, Wei Y, Leuschner F, Gorbатов R, Robbins CS, Iwamoto Y, Thompson B, Carlson AL, Heidt T, Majmudar MD, Lasitschka F, Etzrodt M, Waterman P, Waring MT, Chicoine AT, Van Der Laan AM, Niessen HWM, Piek JJ, Rubin BB, Butany J, Stone JR, Katus HA, Murphy SA, Morrow DA, Sabatine MS, Vinegoni C, Moskowitz MA, Pittet MJ, Libby P, Lin CP, Swirski FK, Weissleder R, Nahrendorf M (2012) Myocardial infarction accelerates atherosclerosis. *Nature* 487:325–329
31. Dutta P, Sager HB, Stengel KR, Naxerova K, Courties G, Saez B, Silberstein L, Heidt T, Sebas M, Sun Y, Wojtkiewicz G, Feruglio PF, King K, Baker JN, Van Der Laan AM, Borodovsky A, Fitzgerald K, Hulsmans M, Hoyer F, Iwamoto Y, Vinegoni C, Brown D, Di Carli M, Libby P, Hiebert SW, Scadden DT, Swirski FK, Weissleder R, Nahrendorf M (2015) Myocardial infarction activates CCR2⁺ hematopoietic stem and progenitor cells. *Cell Stem Cell* 16:477–487
32. Ellis KL, Pilbrow AP, Frampton CM, Doughty RN, Whalley GA, Ellis CJ, Palmer BR, Skelton L, Yandle TG, Palmer SC, Troughton RW, Richards AM, Cameron VA (2010) A common variant at chromosome 9p21.3 is associated with age of onset of coronary disease but not subsequent mortality. *Circ Cardiovasc Genet* 3:286–293
33. Engelbertsen D, Rattik S, Wigren M, Vallejo J, Marinkovic G, Schiopu A, Björkbacka H, Nilsson J, Bengtsson E (2017) IL-1R and MyD88 signalling in CD4⁺ T cells promote Th17 immunity and atherosclerosis. *Cardiovasc Res* 114:180–187
34. Erdmann J, Großhennig A, Braund PS, König IR, Hengstenberg C, Hall AS, Linsel-Nitschke P, Kathiresan S, Wright B, Trégouët DA, Cambien F, Bruse P, Aherrahrou Z,

- Wagner AK, Stark K, Schwartz SM, Salomaa V, Elosua R, Melander O, Voight BF, O'Donnell CJ, Peltonen L, Siscovick DS, Altshuler D, Merlini PA, Peyvandi F, Bernardinelli L, Ardissino D, Schillert A, Blankenberg S, Zeller T, Wild P, Schwarz DF, Tiret L, Perret C, Schreiber S, Mokhtari NE El, Schäfer A, März W, Renner W, Bugert P, Klüter H, Schrezenmeir J, Rubin D, Ball SG, Balmforth AJ, Wichmann HE, Meitinger T, Fischer M, Meisinger C, Baumert J, Peters A, Ouwehand WH, Deloukas P, Thompson JR, Ziegler A, Samani NJ, Schunkert H (2009) New susceptibility locus for coronary artery disease on chromosome 3q22.3. *Nat Genet* 41:280–282
35. Erdmann J, Willenborg C, Nahrstaedt J, Preuss M, König IR, Baumert J, Linsel-Nitschke P, Gieger C, Tennstedt S, Belcredi P, Aherrahrou Z, Klopp N, Loley C, Stark K, Hengstenberg C, Bruse P, Freyer J, Wagner AK, Medack A, Lieb W, Großhennig A, Sager HB, Reinhardt A, Schäfer A, Schreiber S, El Mokhtari NE, Raaz-Schrauder D, Illig T, Garlachs CD, Ekici AB, Reis A, Schrezenmeir J, Rubin D, Ziegler A, Wichmann HE, Doering A, Meisinger C, Meitinger T, Peters A, Schunkert H (2011) Genome-wide association study identifies a new locus for coronary artery disease on chromosome 10p11.23. *Eur Heart J* 32:158–168
36. Fernández-Cuadros ME, Goizueta-San-Martin G, Varas-de-Dios B, Casique-Bocanegra LO, Manrique-de-Lara-Cadiñanos P, Albaladejo-Florin MJ, Algarra-López R, Pérez-Moro OS (2019) Colchicine-Induced Rhabdomyolysis: Clinical, Biochemical, and Neurophysiological Features and Review of the Literature. *Clin Med Insights Arthritis Musculoskelet Disord* 12:1179544119849883
37. Fidler TP, Xue C, Yalcinkaya M, Hardaway B, Abramowicz S, Xiao T, Liu W, Thomas DG, Hajebrahimi MA, Pircher J, Silvestre-Roig C, Kotini AG, Luchsinger LL, Wei Y, Westerterp M, Snoeck HW, Papapetrou EP, Schulz C, Massberg S, Soehnlein O, Ebert B, Levine RL, Reilly MP, Libby P, Wang N, Tall AR (2021) The AIM2 inflammasome exacerbates atherosclerosis in clonal haematopoiesis. *Nature* 592:296–301
38. Fiolet ATL, Opstal TSJ, Mosterd A, Eikelboom JW, Jolly SS, Keech AC, Kelly P, Tong DC, Layland J, Nidorf SM, Thompson PL, Budgeon C, Tijssen JGP, Cornel JH (2021) Efficacy and safety of low-dose colchicine in patients with coronary disease: a systematic review and meta-analysis of randomized trials. *Eur Heart J* 42:2765–2775

39. Frevert CW, Felgenhauer J, Wygrecka M, Nastase M V, Schaefer L (2018) Danger-Associated Molecular Patterns Derived From the Extracellular Matrix Provide Temporal Control of Innate Immunity. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 66:213–227
40. Fuster JJ, MacLauchlan S, Zuriaga MA, Polackal MN, Ostriker AC, Chakraborty R, Wu CL, Sano S, Muralidharan S, Rius C, Vuong J, Jacob S, Muralidhar V, Robertson AAB, Cooper MA, Andrés V, Hirschi KK, Martin KA, Walsh K (2017) Clonal hematopoiesis associated with TET2 deficiency accelerates atherosclerosis development in mice. *Science* (1979) 355:842–847
41. Gellert C, Schöttker B, Müller H, Holleczeck B, Brenner H (2013) Impact of smoking and quitting on cardiovascular outcomes and risk advancement periods among older adults. *Eur J Epidemiol* 28:649–658
42. Gil-Pulido J, Zerneck A (2017) Antigen-presenting dendritic cells in atherosclerosis. *Eur J Pharmacol* 816:25–31
43. Gimbrone MA, García-Cardena G (2016) Endothelial Cell Dysfunction and the Pathobiology of Atherosclerosis. *Circ Res* 118:620–636
44. Gisterå A, Hansson GK (2017) The immunology of atherosclerosis. *Nat Rev Nephrol* 13:368–380
45. Go AS, Chertow GM, Fan D, McCulloch CE, Hsu C (2004) Chronic Kidney Disease and the Risks of Death, Cardiovascular Events, and Hospitalization. *New England Journal of Medicine* 351:1296–1305
46. Goicoechea M, de Vinuesa SG, Lahera V, Cachofeiro V, Gómez-Campderá F, Vega A, Abad S, Luño J (2006) Effects of Atorvastatin on Inflammatory and Fibrinolytic Parameters in Patients with Chronic Kidney Disease. *Journal of the American Society of Nephrology* 17:S231–S235
47. Grebe A, Hoss F, Latz E (2018) NLRP3 inflammasome and the IL-1 pathway in atherosclerosis. *Circ Res* 122:1722–1740
48. Groh L, Keating ST, Joosten LAB, Netea MG, Riksen NP (2018) Monocyte and macrophage immunometabolism in atherosclerosis. *Semin Immunopathol* 40:203–214
49. GTEx CT (2015) GTEx pilot analysis: Multitissue gene regulation in humans. *Science* (1979) 348:648–660

50. Gumuser ED, Schuermans A, Cho SMJ, Sporn ZA, Uddin MM, Paruchuri K, Nakao T, Yu Z, Haidermota S, Hornsby W, Weeks LD, Niroula A, Jaiswal S, Libby P, Ebert BL, Bick AG, Natarajan P, Honigberg MC (2023) Clonal Hematopoiesis of Indeterminate Potential Predicts Adverse Outcomes in Patients With Atherosclerotic Cardiovascular Disease. *J Am Coll Cardiol* 81:1996–2009
51. Hakeem A, Bhatti S, Chang SM (2014) Screening and Risk Stratification of Coronary Artery Disease in End-Stage Renal Disease. *JACC Cardiovasc Imaging* 7:715–728
52. Hansson GK (2005) Mechanisms of disease: Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *New England Journal of Medicine* 352:1685-1695
53. Hansson GK, Hermansson A (2011) The immune system in atherosclerosis. *Nat Immunol* 12:204–212
54. Heerspink HJL, Perco P, Mulder S, Leierer J, Hansen MK, Heinzl A, Mayer G (2019) Canagliflozin reduces inflammation and fibrosis biomarkers: a potential mechanism of action for beneficial effects of SGLT2 inhibitors in diabetic kidney disease. *Diabetologia* 62:1154–1166
55. Heidt T, Sager HB, Courties G, Dutta P, Iwamoto Y, Zaltsman A, Von Zur Muhlen C, Bode C, Fricchione GL, Denninger J, Lin CP, Vinegoni C, Libby P, Swirski FK, Weisleder R, Nahrendorf M (2014) Chronic variable stress activates hematopoietic stem cells. *Nat Med* 20:754–758
56. Heim VJ, Stafford CA, Nachbur U (2019) NOD Signaling and Cell Death. *Front Cell Dev Biol* 7:1–15
57. Hickson LTJ, Langhi Prata LGP, Bobart SA, Evans TK, Giorgadze N, Hashmi SK, Herrmann SM, Jensen MD, Jia Q, Jordan KL, Kellogg TA, Khosla S, Koerber DM, Lagnado AB, Lawson DK, LeBrasseur NK, Lerman LO, McDonald KM, McKenzie TJ, Passos JF, Pignolo RJ, Pirtskhalava T, Saadiq IM, Schaefer KK, Textor SC, Victorelli SG, Volkman TL, Xue A, Wentworth MA, Wissler Gerdes EO, Zhu Y, Tchkonja T, Kirkland JL (2019) Senolytics decrease senescent cells in humans: Preliminary report from a clinical trial of Dasatinib plus Quercetin in individuals with diabetic kidney disease. *EBioMedicine* 47:446–456
58. Higgins JPT, Thompson SG, Deeks JJ, Altman DG (2003) Measuring inconsistency in meta-analyses. *BMJ* 327:557–560

59. Hill C, Gerardo D, James F, Tyroler HA, Chambless LE, Romm J, Disanto AR, Barr K, Bergsten J, Conrad J, Elliott R, Furr D, Hafer B, Haire A, Jensen J, Johnson P, Marlow J, Monger B, Mooney D, Posey D, Sofley C, Tatum C, Toledo A, Langford H, Asken B, Blackburn F, Bowman C, Feild L, Franklin R, Hathorn D, Howell R, Nelson M, Overman V, Oxner S, Pitts D, Shelton G, Edlavitch S, Cram K, Reed L, Murton G, Nabulsi A, Bowers M, Kuehl B, Hamele H, Christman C, Costa D, Har- S, Markam T, Neuing J (1989) THE ATHEROSCLEROSIS RISK IN COMMUNITIES (ARIC) STUDY : DESIGN AND OBJECTIVES. 129(4):687-702
60. Houseman EA, Kile ML, Christiani DC, Ince TA, Kelsey KT, Marsit CJ (2016) Reference-free deconvolution of DNA methylation data and mediation by cell composition effects. BMC Bioinformatics 17:1–15
61. Hoyer FF, Zhang X, Coppin E, Vasamsetti SB, Modugu G, Schloss MJ, Rohde D, McAlpine CS, Iwamoto Y, Libby P, Naxerova K, Swirski FK, Dutta P, Nahrendorf M (2020) Bone marrow endothelial cells regulate myelopoiesis in diabetes mellitus. Circulation 142:244–258
62. Hsu CC, Shao B, Kanter JE, He Y, Vaisar T, Witztum JL, Snell-Bergeon J, McInnes G, Bruse S, Gottesman O, Mullick AE, Bornfeldt KE (2023) Apolipoprotein C3 induces inflammasome activation only in its delipidated form. Nat Immunol 24:408–411
63. Hung AM, Ellis CD, Shintani A, Booker C, Ikizler TA (2011) IL-1 β Receptor antagonist reduces inflammation in hemodialysis patients. Journal of the American Society of Nephrology 22:437–442
64. International T, Invest VS, Handberg EM, Cooper-dehoff RM, Marks RG, Kowey P, Messerli FH, Mancia G, Cangiano L, Bristol HA, Kolb HR, Bakris GL, Cohen JD, Parmley WW (2003) A Calcium Antagonist vs a Non – Calcium. 290(21):2805-16
65. Iwasaki A, Medzhitov R (2015) Control of adaptive immunity by the innate immune system. Nat Immunol 16:343–353
66. Jaipersad AS, Lip GYH, Silverman S, Shantsila E (2014) The Role of Monocytes in Angiogenesis and Atherosclerosis. J Am Coll Cardiol 63:1–11
67. Jaiswal S, Fontanillas P, Flannick J, Manning A, Grauman P V., Mar BG, Lindsley RC, Mermel CH, Burt N, Chavez A, Higgins JM, Moltchanov V, Kuo FC, Kluk MJ, Henderson B, Kinnunen L, Koistinen HA, Ladenvall C, Getz G, Correa A, Banahan BF,

- Gabriel S, Kathiresan S, Stringham HM, McCarthy MI, Boehnke M, Tuomilehto J, Haiman C, Groop L, Atzmon G, Wilson JG, Neuberger D, Altshuler D, Ebert BL (2014) Age-Related Clonal Hematopoiesis Associated with Adverse Outcomes. *New England Journal of Medicine* 371:2488–2498
68. Jaiswal S, Natarajan P, Silver AJ, Gibson CJ, Bick AG, Shvartz E, McConkey M, Gupta N, Gabriel S, Ardissino D, Baber U, Mehran R, Fuster V, Danesh J, Frossard P, Saleheen D, Melander O, Sukhova GK, Neuberger D, Libby P, Kathiresan S, Ebert BL (2017) Clonal Hematopoiesis and Risk of Atherosclerotic Cardiovascular Disease. *New England Journal of Medicine* 377:111–121
69. Kenfield SA, Wei EK, Rosner BA, Glynn RJ, Stampfer MJ, Colditz GA (2010) Burden of smoking on cause-specific mortality: application to the Nurses Health Study. *Tob Control* 19:248–254
70. Kim SR, Lee SG, Kim SH, Kim JH, Choi E, Cho W, Rim JH, Hwang I, Lee CJ, Lee M, Oh CM, Jeon JY, Gee HY, Kim JH, Lee BW, Kang ES, Cha BS, Lee MS, Yu JW, Cho JW, Kim JS, Lee Y ho (2020) SGLT2 inhibition modulates NLRP3 inflammasome activity via ketones and insulin in diabetes with cardiovascular disease. *Nat Commun* 11(1):2127
71. Kim YG, Kim SM, Kim KP, Lee SH MJ (2019) The Role of Inflammasome-Dependent and Inflammasome-Independent NLRP3 in the Kidney. *Cells* 8:1–16
72. Kim YK, Shin JS, Nahm MH (2016) NOD-like receptors in infection, immunity, and diseases. *Yonsei Med J* 57:5–14
73. Kimura Y, Yanagida T, Onda A, Tsukui D, Hosoyamada M, Kono H (2020) Soluble Uric Acid Promotes Atherosclerosis via AMPK (AMP-Activated Protein Kinase)-Mediated Inflammation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 40:570–582
74. Kleveland O, Kunszt G, Bratlie M, Ueland T, Broch K, Holte E, Michelsen AE, Bendz B, Amundsen BH, Espevik T, Aakhus S, Damås JK, Aukrust P, Wiseth R, Gullestad L (2016) Effect of a single dose of the interleukin-6 receptor antagonist tocilizumab on inflammation and troponin T release in patients with non-ST-elevation myocardial infarction: A double-blind, randomized, placebo-controlled phase 2 trial. *Eur Heart J* 37:2406–2413

75. Ko YA, Hayek S, Sandesara P, Samman Tahhan A, Quyyumi A (2017) Cohort profile: The Emory Cardiovascular Biobank (EmCAB). *BMJ Open* 7:1–7
76. Komada T, Muruve DA (2019) The role of inflammasomes in kidney disease. *Nat Rev Nephrol* 15:501–520
77. König M, Joshi S, Leistner DM, Landmesser U, Sinning D, Steinhagen-Thiessen E, Demuth I (2019) Cohort profile: role of lipoproteins in cardiovascular disease—the Lipid-Cardio study. *BMJ Open* 9:e030097
78. Kovanen PT (2019) Mast Cells as Potential Accelerators of Human Atherosclerosis—From Early to Late Lesions. *Int J Mol Sci* 20:4479
79. Lamkanfi M, Dixit VM (2014) Mechanisms and Functions of Inflammasomes. *Cell* 157:1013–1022
80. Latz E, Xiao T, Stutz A (2013) Activation and regulation of the inflammasomes. *Nat Rev Immunol* 13:397–411
81. Lehne B, Drong AW, Loh M, Zhang W, Scott WR, Tan ST, Afzal U, Scott J, Jarvelin MR, Elliott P, McCarthy MI, Kooner JS, Chambers JC (2015) A coherent approach for analysis of the Illumina HumanMethylation450 BeadChip improves data quality and performance in epigenome-wide association studies. *Genome Biol* 16:1–12
82. Li L, Pang S, Zeng L, Güldener U, Schunkert H (2021) Genetically determined intelligence and coronary artery disease risk. *Clinical Research in Cardiology* 110:211–219
83. Libby P (2017) Interleukin-1 Beta as a Target for Atherosclerosis Therapy: Biological Basis of CANTOS and Beyond. *J Am Coll Cardiol* 70:2278–2289
84. Lloyd-Jones DM, Nam B-H, D’Agostino Sr RB, Levy D, Murabito JM, Wang TJ, Wilson PWF, O’Donnell CJ (2004) Parental Cardiovascular Disease as a Risk Factor for Cardiovascular Disease in Middle-aged Adults A Prospective Study of Parents and Offspring. *JAMA* 291:2204–2211
85. Lorenzatti A, Servato ML (2018) Role of anti-inflammatory interventions in coronary artery disease: Understanding the Canakinumab Anti-inflammatory Thrombosis Outcomes Study (CANTOS). *European Cardiology Review* 13:38–41

86. Lu A, Magupalli V, Ruan J, Yin Q, Maninjay K, Vos M, Schröder GF, Fitzgerald KA, Wu H, Egelman EH (2014) Unified Polymerization Mechanism for the Assembly of ASC-dependent Inflammasomes. *Cell* 156:1193–1206
87. Lüscher TF (2019) Frontiers in lipid research: lipoprotein(a), apolipoprotein C-III and E, and PCSK9 and inflammation. *Eur Heart J* 40:2741–2744
88. Mangan MSJ, Olhava EJ, Roush WR, Seidel HM, Glick GD, Latz E (2018) Targeting the NLRP3 inflammasome in inflammatory diseases. *Nat Rev Drug Discov* 17:588–606
89. Morrow DA, De Lemos JA, Sabatine MS, Wiviott SD, Blazing MA, Shui A, Rifai N, Califf RM, Braunwald E (2006) Clinical relevance of C-reactive protein during follow-up of patients with acute coronary syndromes in the Aggrastat-to-Zocor Trial. *Circulation* 114:281–288
90. Muñoz-Planillo R, Kuffa P, Martínez-Colón G, Smith B, Rajendiran T, Núñez G (2013) K⁺ Efflux Is the Common Trigger of NLRP3 Inflammasome Activation by Bacterial Toxins and Particulate Matter. *Immunity* 38:1142–1153
91. Nardo D De (2015) Toll-like receptors: Activation, signalling and transcriptional modulation. *Cytokine* 74:181–189
92. Netea MG, Nold-Petry CA, Nold MF, Joosten LAB, Opitz B, Van Der Meer JHM, Van De Veerdonk FL, Ferwerda G, Heinhuis B, Devesa I, Joel Funk C, Mason RJ, Kullberg BJ, Rubartelli A, Van Der Meer JWM, Dinarello CA (2009) Differential requirement for the activation of the inflammasome for processing and release of IL-1 β in monocytes and macrophages. *Blood* 113:2324–2335
93. Nidorf SM, Fiolet ATL, Mosterd A, Eikelboom JW, Schut A, Opstal TSJ, The SHK, Xu X-F, Ireland MA, Lenderink T, Latchem D, Hoogslag P, Jerzewski A, Nierop P, Whelan A, Hendriks R, Swart H, Schaap J, Kuijper AFM, van Hessen MWJ, Saklani P, Tan I, Thompson AG, Morton A, Judkins C, Bax WA, Dirksen M, Alings M, Hankey GJ, Budgeon CA, Tijssen JGP, Cornel JH, Thompson PL (2020) Colchicine in Patients with Chronic Coronary Disease. *New England Journal of Medicine* 383:1838–1847
94. Nikpay M, Goel A, Won HH, Hall LM, Willenborg C, Kanoni S, Saleheen D, Kyriakou T, Nelson CP, CHopewell J, Webb TR, Zeng L, Dehghan A, Alver M, MArmasu S, Auro K, Bjonnes A, Chasman DI, Chen S, Ford I, Franceschini N, Gieger C, Grace C, Gustafsson S, Huang J, Hwang SJ, Kim YK, Kleber ME, Lau KW, Lu X, Lu Y, Lyytikäinen

- LP, Mihailov E, Morrison AC, Pervjakova N, Qu L, Rose LM, Salfati E, Saxena R, Scholz M, Smith A v., Tikkanen E, Uitterlinden A, Yang X, Zhang W, Zhao W, de Andrade M, de Vries PS, van Zuydam NR, Anand SS, Bertram L, Beutner F, Dedoussis G, Frossard P, Gauguier D, Goodall AH, Gottesman O, Haber M, Han BG, Huang J, Jalilzadeh S, Kessler T, König IR, Lannfelt L, Lieb W, Lind L, MLindgren C, Lokki ML, Magnusson PK, Mallick NH, Mehra N, Meitinger T, Memon FUR, Morris AP, Nieminen MS, Pedersen NL, Peters A, Rallidis LS, Rasheed A, Samuel M, Shah SH, Sinisalo J, ESTirrup K, Trompet S, Wang L, Zaman KS, Ardissino D, Boerwinkle E, Borecki IB, Bottinger EP, Buring JE, Chambers JC, Collins R, Cupples L, Danesh J, Demuth I, Elosua R, Epstein SE, Esko T, Feitosa MF, Franco OH, Franzosi MG, Granger CB, Gu D, Gudnason V, SHall A, Hamsten A, Harris TB, LHazen S, Hengstenberg C, Hofman A, Ingelsson E, Iribarren C, Jukema JW, Karhunen PJ, Kim BJ, Kooner JS, Kullo IJ, Lehtimäki T, Loos RJF, Melander O, Metspalu A, März W, Palmer CN, Perola M, Quertermous T, Rader DJ, Ridker PM, Ripatti S, Roberts R, Salomaa V, Sanghera DK, Schwartz SM, Seedorf U, Stewart AF, Stott DJ, Thiery J, Zalloua PA, O'Donnell CJ, Reilly MP, Assimes TL, Thompson JR, Erdmann J, Clarke R, Watkins H, Kathiresan S, McPherson R, Deloukas P, Schunkert H, Samani NJ, Farrall M (2015) A comprehensive 1000 Genomes-based genome-wide association meta-analysis of coronary artery disease. *Nat Genet* 47:1121–1130
95. Nordestgaard BG, Varbo A (2014) Triglycerides and cardiovascular disease. *The Lancet* 384:626–635
96. Nowak KL, Chonchol M, Ikizler TA, Farmer-Bailey H, Salas N, Chaudhry R, Wang W, Smits G, Tengedal I, Dinarello CA, Hung AM (2017) IL-1 inhibition and vascular function in CKD. *Journal of the American Society of Nephrology* 28:971–980
97. O'Donoghue ML, Glaser R, Cavender MA, Aylward PE, Bonaca MP, Budaj A, Davies RY, Dellborg M, Fox KAA, Gutierrez JAT, Hamm C, Kiss RG, Kovar F, Kuder JF, Im KA, Lepore JJ, Lopez-Sendon JL, Ophuis TO, Parkhomenko A, Shannon JB, Spinar J, Tanguay J-F, Ruda M, Steg PG, Theroux P, Wiviott SD, Laws I, Sabatine MS, Morrow DA (2016) Effect of Losmapimod on Cardiovascular Outcomes in Patients Hospitalized With Acute Myocardial Infarction. *JAMA* 315(15):1591-9
98. Pascual-Figal DA, Bayes-Genis A, Díez-Díez M, Hernández-Vicente Á, Vázquez-Andrés D, de la Barrera J, Vazquez E, Quintas A, Zuriaga MA, Asensio-López MC, Dopazo A, Sánchez-Cabo F, Fuster JJ (2021) Clonal Hematopoiesis and Risk of Progression of

- Heart Failure With Reduced Left Ventricular Ejection Fraction. *J Am Coll Cardiol* 77:1747–1759
99. Patel SA, Winkel M, Ali MK, Narayan KMV, Mehta NK (2015) Cardiovascular Mortality Associated With 5 Leading Risk Factors: National and State Preventable Fractions Estimated From Survey Data. *Ann Intern Med* 163:245–253
 100. Pellegrini C, Antonioli L, Lopez-Castejon G, Blandizzi C, Fornai M (2017) Canonical and non-canonical activation of NLRP3 inflammasome at the crossroad between immune tolerance and intestinal inflammation. *Front Immunol* 8:36
 101. Rapsomaniki E, Timmis A, George J, Pujades-Rodriguez M, Shah AD, Denaxas S, White IR, Caulfield MJ, Deanfield JE, Smeeth L, Williams B, Hingorani A, Hemingway H (2014) Blood pressure and incidence of twelve cardiovascular diseases: Lifetime risks, healthy life-years lost, and age-specific associations in 1·25 million people. *The Lancet* 383:1899–1911
 102. Reardon CA, Blachowicz L, White T, Cabana V, Wang Y, Lukens J, Bluestone J, Getz GS (2001) Effect of immune deficiency on lipoproteins and atherosclerosis in male apolipoprotein E-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 21:1011–1016
 103. Ridker PM, Danielson E, Fonseca FAH, Genest J, Gotto AM, Kastelein JJP, Koenig W, Libby P, Lorenzatti AJ, MacFadyen JG, Nordestgaard BG, Shepherd J, Willerson JT, Glynn RJ (2008) Rosuvastatin to Prevent Vascular Events in Men and Women with Elevated C-Reactive Protein. *New England Journal of Medicine* 359:2195–2207
 104. Ridker PM (2016) From C-Reactive Protein to Interleukin-6 to Interleukin-1: Moving Upstream to Identify Novel Targets for Atheroprotection. *Circ Res* 118:145–156
 105. Ridker PM, Everett BM, Thuren T, MacFadyen JG, Chang WH, Ballantyne C, Fonseca F, Nicolau J, Koenig W, Anker SD, Kastelein JJP, Cornel JH, Pais P, Pella D, Genest J, Cifkova R, Lorenzatti A, Forster T, Kobalava Z, Vida-Simiti L, Flather M, Shimokawa H, Ogawa H, Dellborg M, Rossi PRF, Troquay RPT, Libby P, Glynn RJ (2017) Anti-inflammatory Therapy with Canakinumab for Atherosclerotic Disease. *New England Journal of Medicine* 377:1119–1131
 106. Ridker PM, MacFadyen JG, Thuren T, Everett BM, Libby P, Glynn RJ, Ridker P, Lorenzatti A, Krum H, Varigos J, Siostrzonek P, Sinnaeve P, Fonseca F, Nicolau J, Gotcheva N, Genest J, Yong H, Urina-Triana M, Milicic D, Cifkova R, Vettus R, Koenig

- W, Anker SD, Manolis AJ, Wyss F, Forster T, Sigurdsson A, Pais P, Fucili A, Ogawa H, Shimokawa H, Veze I, Petrauskiene B, Salvador L, Kastelein J, Cornel JH, Klemsdal TO, Medina F, Budaj A, Vida-Simiti L, Kobalava Z, Otasevic P, Pella D, Lainscak M, Seung K-B, Commerford P, Dellborg M, Donath M, Hwang J-J, Kultursay H, Flather M, Ballantyne C, Bilazarian S, Chang W, East C, Everett B, Forgosh L, Glynn R, Harris B, Libby P, Ligueros M, Thuren T, Bohula E, Charmarathi B, Cheng S, Chou S, Danik J, McMahon G, Maron B, Ning M, Olenchock B, Pande R, Perlstein T, Pradhan A, Rost N, Singhal A, Taqueti V, Wei N, Burris H, Cioffi A, Dalseg AM, Ghosh N, Gralow J, Mayer T, Rugo H, Fowler V, Limaye AP, Cosgrove S, Levine D, Lopes R, Scott J, Thuren T, Ligueros M, Hilker R, Tamesby G, Mickel C, Manning B, Woelcke J, Tan M, Manfreda S, Ponce T, Kam J, Saini R, Banker K, Salko T, Nandy P, Tawfik R, O'Neil G, Manne S, Jirvankar P, Lal S, Nema D, Jose J, Collins R, Bailey K, Blumenthal R, Colhoun H, Gersh B, Glynn RJ (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. *The Lancet* 390:1833–1842
107. Ridker PM, MacFadyen JG, Everett BM, Libby P, Thuren T, Glynn RJ, Ridker PM, MacFadyen JG, Everett BM, Libby P, Thuren T, Glynn RJ, Kastelein J, Koenig W, Genest J, Lorenzatti A, Varigos J, Siostrzonek P, Sinnaeve P, Fonseca F, Nicolau J, Gotcheva N, Yong H, Urina-Triana M, Milicic D, Cifkova R, Vettus R, Anker SD, Manolis AJ, Wyss F, Forster T, Sigurdsson A, Pais P, Fucili A, Ogawa H, Shimokawa H, Veze I, Petrauskiene B, Salvador L, Cornel JH, Klemsdal TO, Medina F, Budaj A, Vida-Simiti L, Kobalava Z, Otasevic P, Pella D, Lainscak M, Seung K-B, Commerford P, Dellborg M, Donath M, Hwang J-J, Kultursay H, Flather M, Ballantyne C, Bilazarian S, Chang W, East C, Forgosh L, Harris B, Ligueros M (2018) Relationship of C-reactive protein reduction to cardiovascular event reduction following treatment with canakinumab: a secondary analysis from the CANTOS randomised controlled trial. *The Lancet* 391:319–328
108. Ridker PM, Libby P, MacFadyen JG, Thuren T, Ballantyne C, Fonseca F, Koenig W, Shimokawa H, Everett BM, Glynn RJ (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* 39:3499–3507

109. Ridker PM, Everett BM, Pradhan A, MacFadyen JG, Solomon DH, Zaharris E, Mam V, Hasan A, Rosenberg Y, Iturriaga E, Gupta M, Tsigoulis M, Verma S, Clearfield M, Libby P, Goldhaber SZ, Seagle R, Ofori C, Saklayen M, Butman S, Singh N, Le May M, Bertrand O, Johnston J, Paynter NP, Glynn RJ (2019) Low-Dose Methotrexate for the Prevention of Atherosclerotic Events. *New England Journal of Medicine* 380:752–762
110. Ridker PM, MacFadyen JG, Thuren T, Libby P (2020) Residual inflammatory risk associated with interleukin-18 and interleukin-6 after successful interleukin-1 β inhibition with canakinumab: further rationale for the development of targeted anti-cytokine therapies for the treatment of atherothrombosis. *Eur Heart J* 41:2153–2163
111. Ridker PM, Devalaraja M, Baeres FMM, Engelmann MDM, Hovingh GK, Ivkovic M, Lo L, Kling D, Pergola P, Raj D, Libby P, Davidson M (2021) IL-6 inhibition with ziltivekimab in patients at high atherosclerotic risk (RESCUE): a double-blind, randomised, placebo-controlled, phase 2 trial. *The Lancet* 397:2060–2069
112. Ridker PM (2021) From RESCUE to ZEUS: Will interleukin-6 inhibition with ziltivekimab prove effective for cardiovascular event reduction? *Cardiovasc Res* 117:e138–e140
113. Sabatine MS, Giugliano RP, Keech AC, Honarpour N, Wiviott SD, Murphy SA, Kuder JF, Wang H, Liu T, Wasserman SM, Sever PS, Pedersen TR (2017) Evolocumab and Clinical Outcomes in Patients with Cardiovascular Disease. *New England Journal of Medicine* 376:1713–1722
114. Sarwar N, Gao P, Kondapally Seshasai SR, Gobin R, Kaptoge S, Di Angelantonio E, Ingelsson E, Lawlor DA, Selvin E, Stampfer M, Stehouwer CDA, Lewington S, Pennells L, Thompson A, Sattar N, White IR, Ray KK, Danesh J, Tipping RW, Ford CE, Pressel SL, Folsom AR, Chambless LE, Wagenknecht LE, Panagiotakos DB, Pitsavos C, Chryschoou C, Stefanadis C, Knuiman M, Whincup PH, Wannamethee SG, Morris RW, Kiechl S, Willeit J, Oberhollenzer F, Mayr A, Wald N, Ebrahim S, Yarnell JW, Gallacher J, Casiglia E, Tikhonoff V, Nietert PJ, Sutherland SE, Bachman DL, Keil JE, de Boer IH, Kizer JR, Mukamal KJ, Tybjaerg-Hansen A, Nordestgaard BG, Benn M, Frikk-Schmidt R, Giampaoli S, Palmieri L, Panico S, Vanuzzo D, Pilotto L, Gómez de la Cámara A, Rubio MA, Simons L, McCallum J, Friedlander Y, Fowkes FGR, Lee AJ, Taylor J, Guralnik JM, Phillips CL, Wallace R, Blazer DG, Khaw KT, Brenner H, Raum E, Müller H, Rothenbacher D, Jansson JH, Wennberg P, Nissinen A, Donfrancesco C,

- Salomaa V, Harald K, Jousilahti P, Vartiainen E, Woodward M, D'Agostino RB, Vasan RS, Fox CS, Pencina MJ, Bladbjerg E, Jørgensen T, Møller L, Jespersen J, Dankner R, Chetrit A, Lubin F, Wilhelmsen L, Eriksson H, Svärdsudd K, Welin L, Rosengren A, Lappas G, Björkelund C, Lissner L, Bengtsson C, Cremer P, Nagel D, Strandberg TE, Tilvis RS, Miettinen TA, Kiyohara Y, Arima H, Doi Y, Ninomiya T, Rodriguez B, Dekker JM, Nijpels G, Rimm E, Pai JK, Sato S, Iso H, Kitamura A, Noda H, Goldbourt U, Nyyssönen K, Tuomainen TP, Salonen JT, Deeg D, Poppelaars JL, Meade TW, Hedblad B, Berglund G, Engström G, Verschuren WMM, Blokstra A, Cushman M, Psaty BM, Shea S, Döring A, Koenig W, Meisinger C, Mraz W, Bas Bueno-De-Mesquita H, Fletcher A, Kuller LH, Grandits G, Selmer R, Tverdal A, Nystad W, Gillum R, Mussolino M, Hankinson S, Manson JE, Cooper JA, Bauer KA, Davidson KW, Kirkland S, Shaffer J, Korin MR, Holme I, Ducimetiere P, Jouven X, Bakker SJL, Gansevoort RT, Hillege HL, Crespo CJ, Garcia Palmieri MR, Amouyel P, Arveiler D, Evans A, Ferrières J, Schulte H, Assmann G, Westendorp RG, Buckley BM, Packard CJ, Cantin B, Lammarche B, Després JP, Dagenais GR, Barrett-Connor E, Wingard DL, Bettencourt R, Gudnason V, Aspelund T, Sigurdsson G, Thorsson B, Trevisan M, Wittteman J, Kardys I, Breteler M, Hofman A, Tunstall-Pedoe H, Tavendale R, Lowe GDO, Howard B V., Zhang Y, Best L, Umans J, Ben-Shlomo Y, Davey-Smith G, Onat A, Hergenç G, Can G, Njølstad I, Mathiesen EB, Løchen ML, Wilsgaard T, Zethelius B, Risérus U, Berne C, Gaziano JM, Ridker P, Ulmer H, Diem G, Concin H, Tosetto A, Rodeghiero F, Tinker L, Liu S, Marmot M, Clarke R, Collins R, Brunner E, Shipley M, Buring J, Shepherd J, Cobbe SM, Ford I, Robertson M, Marin Ibañez A, Feskens EJM, Kromhout D, Walker M, Alexander M, Erqou S, Haycock P, Perry PL, Thompson SG, Watson S, Wood AM, Wormser D (2010) Diabetes mellitus, fasting blood glucose concentration, and risk of vascular disease: A collaborative meta-analysis of 102 prospective studies. *The Lancet* 375:2215–2222
115. Schunk SJ, Hermann J, Sarakpi T, Triem S, Lellig M, Hahm E, Zewinger S, Schmit D, Becker E, Mollmann J, Lehrke M, Kramann R, Boor P, Lipp P, Laufs U, Marz W, Reiser J, Jankowski J, Fliser D, Speer T, Jankowski V (2021) Guanidinylated apolipoprotein C3 (ApoC3) associates with kidney and vascular injury. *Journal of the American Society of Nephrology* 32:1–15

116. Schwartz DM, Kanno Y, Villarino A, Ward M, Gadina M, O'Shea JJ (2017) JAK inhibition as a therapeutic strategy for immune and inflammatory diseases. *Nat Rev Drug Discov* 16:843–862
117. Schwartz GG, Olsson AG, Abt M, Ballantyne CM, Barter PJ, Brumm J, Chaitman BR, Holme IM, Kallend D, Leiter LA, Leitersdorf E, McMurray JJV, Mundl H, Nicholls SJ, Shah PK, Tardif JC, Wright RS (2012) Effects of dalcetrapib in patients with a recent acute coronary syndrome. *New England Journal of Medicine* 367:2089–2099
118. Sharma BR, Kanneganti TD (2021) NLRP3 inflammasome in cancer and metabolic diseases. *Nat Immunol* 22:550–559
119. Sheedy FJ, Grebe A, Rayner KJ, Kalantari P, Ramkhelawon B, Carpenter SB, Becker CE, Ediriweera HN, Mullick AE, Golenbock DT, Stuart LM, Latz E, Fitzgerald KA, Moore KJ (2013) CD36 coordinates NLRP3 inflammasome activation by facilitating intracellular nucleation of soluble ligands into particulate ligands in sterile inflammation. *Nat Immunol* 14:812-20
120. Shepherd J, Blauw GJ, Murphy MB, Cobbe SM, Bollen ELEM, Buckley BM, Ford I, Jukema JW, Hyland M, Gaw A, Lagaay AM, Perry IJ, MacFarlane PW, Meinders AE, Sweeney BJ, Packard CJ, Westendorp RGJ, Twomey C, Stott DJ (1999) The design of a prospective study of pravastatin in the elderly at risk (PROSPER). *American Journal of Cardiology* 84:1192–1197
121. Shepherd J, Blauw GJ, Murphy MB, Bollen ELEM, Buckley BM, Cobbe SM, Ford I, Gaw A, Hyland M, Jukema JW, Kamper AM, Macfarlane PW, Meinders AE, Norrie J, Packard CJ, Perry IJ, Stott DJ, Sweeney BJ, Twomey C, Westendorp RGJ (2002) Pravastatin in elderly individuals at risk of vascular disease (PROSPER): A randomised controlled trial. *Lancet* 360:1623–1630
122. Silbernagel G, Scharnagl H, Kleber ME, Hoffmann MM, Delgado G, Stojakovic T, Gary T, Zeng L, Ritsch A, Zewinger S, Speer T, Schunkert H, Landmesser U, März W, Grammer TB (2020) Common APOC3 variants are associated with circulating ApoC-III and VLDL cholesterol but not with total apolipoprotein B and coronary artery disease. *Atherosclerosis* 311:84–90
123. Sivapalaratnam S, Boekholdt SM, Trip MD, Sandhu MS, Luben R, Kastelein JJP, Wareham NJ, Khaw KT (2010) Family history of premature coronary heart disease and risk prediction in the EPIC-Norfolk prospective population study. *Heart* 96:1985–1989

124. Soehnlein O (2012) Multiple roles for neutrophils in atherosclerosis. *Circ Res* 110:875–888
125. Soehnlein O, Libby P (2021) Targeting inflammation in atherosclerosis — from experimental insights to the clinic. *Nat Rev Drug Discov* 20:589–610
126. Song WM, Colonna M (2018) Immune Training Unlocks Innate Potential. *Cell* 172:3–5
127. Speer T, Rohrer L, Blyszczuk P, Shroff R, Kuschnerus K, Kränkel N, Kania G, Zewinger S, Akhmedov A, Shi Y, Martin T, Perisa D, Winnik S, Müller MF, Sester U, Wernicke G, Jung A, Gutteck U, Eriksson U, Geisel J, Deanfield J, von Eckardstein A, Lüscher TF, Fliser D, Bahlmann FH, Landmesser U (2013) Abnormal High-Density Lipoprotein Induces Endothelial Dysfunction via Activation of Toll-like Receptor-2. *Immunity* 38:754–768
128. Speer T, Dimmeler S, Schunk SJ, Fliser D, Ridker PM (2022) Targeting innate immunity-driven inflammation in CKD and cardiovascular disease. *Nat Rev Nephrol* 18:762–778
129. Sreejit G, Abdel-Latif A, Athmanathan B, Annabathula R, Dhyani A, Noothi SK, Quaiife-Ryan GA, Al-Sharea A, Pernes G, Dragoljevic D, Lal H, Schroder K, Hanaoka BY, Raman C, Grant MB, Hudson JE, Smyth SS, Porrello ER, Murphy AJ, Nagareddy PR (2020) Neutrophil-Derived S100A8/A9 Amplify Granulopoiesis after Myocardial Infarction. *Circulation* 141:1080–1094
130. Strain WD, Paldánus PM (2018) Diabetes, cardiovascular disease and the microcirculation. *Cardiovasc Diabetol* 17:1–10
131. Subramanian M, Tabas I (2014) Dendritic cells in atherosclerosis. *Semin Immunopathol* 36:93–102
132. Sudlow C, Gallacher J, Allen N, Beral V, Burton P, Danesh J, Downey P, Elliott P, Green J, Landray M, Liu B, Matthews P, Ong G, Pell J, Silman A, Young A, Sprosen T, Peakman T, Collins R (2015) UK Biobank: An Open Access Resource for Identifying the Causes of a Wide Range of Complex Diseases of Middle and Old Age. *PLoS Med* 12:1–10
133. Svensson EC, Madar A, Campbell CD, He Y, Sultan M, Healey ML, Xu H, D’Aco K, Fernandez A, Wache-Mainier C, Libby P, Ridker PM, Beste MT, Basson CT (2022)

- TET2 -Driven Clonal Hematopoiesis and Response to Canakinumab: An Exploratory Analysis of the CANTOS Randomized Clinical Trial. *JAMA Cardiol* 7:521–528
134. Swanson K V., Deng M, Ting JPY (2019) The NLRP3 inflammasome: molecular activation and regulation to therapeutics. *Nat Rev Immunol* 19:477–489
135. Swirski FK, Nahrendorf M (2013) Leukocyte behavior in atherosclerosis, myocardial infarction, and heart failure. *Science* (1979) 339:161–166
136. Tabas I, Bornfeldt KE (2016) Macrophage Phenotype and Function in Different Stages of Atherosclerosis. *Circ Res* 118:653–667
137. Tardif J-C, Kouz S, Waters DD, Bertrand OF, Diaz R, Maggioni AP, Pinto FJ, Ibrahim R, Gamra H, Kiwan GS, Berry C, López-Sendón J, Ostadal P, Koenig W, Angoulvant D, Grégoire JC, Lavoie M-A, Dubé M-P, Rhainds D, Provencher M, Blondeau L, Orfanos A, L’Allier PL, Guertin M-C, Roubille F (2019) Efficacy and Safety of Low-Dose Colchicine after Myocardial Infarction. *N Engl J Med* 2019:2497–2505
138. Temba GS, Kullaya V, Pecht T, Mmbaga BT, Aschenbrenner AC, Ulas T, Kibiki G, Lyamuya F, Boahen CK, Kumar V, Joosten LAB, Schultze JL, van der Ven AJ, Netea MG, de Mast Q (2021) Urban living in healthy Tanzanians is associated with an inflammatory status driven by dietary and metabolic changes. *Nat Immunol* 22:287–300
139. Teo KK, Ounpuu S, Hawken S, Pandey MR, Valentin V, Hunt D, Diaz R, Rashed W, Freeman R, Jiang L, Zhang X, Yusuf S (2006) Tobacco use and risk of myocardial infarction in 52 countries in the INTERHEART study: a case-control study. *The Lancet* 368:647–658
140. The Emerging Risk Factors Collaboration (2011) Diabetes Mellitus, Fasting Glucose, and Risk of Cause-Specific Death. *New England Journal of Medicine* 364:829–841
141. Trompet S, de Craen AJM, Postmus I, Ford I, Sattar N, Caslake M, Stott DJ, Buckley BM, Sacks F, Devlin JJ, Slagboom PE, Westendorp RGJ, Jukema JW (2011) Replication of LDL GWAs hits in PROSPER/PHASE as validation for future (pharmaco)genetic analyses. *BMC Med Genet* 12:131
142. van der Aart-van der Beek AB, de Boer RA, Heerspink HJL (2022) Kidney and heart failure outcomes associated with SGLT2 inhibitor use. *Nat Rev Nephrol* 18:294–306

143. Van Der Valk FM, Kuijk C, Verweij SL, Stiekema LCA, Kaiser Y, Zeerleder S, Nahrendorf M, Voermans C, Stroes ESG (2017) Increased haematopoietic activity in patients with atherosclerosis. *Eur Heart J* 38:425–432a
144. Võsa U, Claringbould A, Westra HJ, Bonder MJ, Deelen P, Zeng B, Kirsten H, Saha A, Kreuzhuber R, Kasela S, Pervjakova N, Alvaes I, Fave MJ, Agbessi M, Christiansen M, Jansen R, Seppälä I, Tong L, Teumer A, Schramm K, Hemani G, Verlouw J, Yaghootkar H, Sönmez R, Brown A, Kukushkina V, Kalnapenkis A, Rieger S, Porcu E, Kronberg-Guzman J, Kettunen J, Powell J, Lee B, Zhang F, Arindrarto W, Beutner F, Brugge H, Dmitreva J, Elansary M, Fairfax BP, Georges M, Heijmans BT, Kähönen M, Kim Y, Knight JC, Kovacs P, Krohn K, Li S, Loeffler M, Marigorta UM, Mei H, Momozawa Y, Müller-Nurasyid M, Nauck M, Nivard M, Penninx B, Pritchard J, Raitakari O, Rotzchke O, Slagboom EP, Stehouwer CDA, Stumvoll M, Sullivan P, 't Hoen PAC, Thiery J, Tönjes A, van Dongen J, van Iterson M, Veldink J, Völker U, Wijmenga C, Swertz M, Andiappan A, Montgomery GW, Ripatti S, Perola M, Kutalik Z, Dermizakis E, Bergmann S, Frayling T, van Meurs J, Prokisch H, Ahsan H, Pierce B, Lehtimäki T, Boomsma D, Psaty BM, Gharib SA, Awadalla P, Milani L, Ouwehand W, Downes K, Stegle O, Battle A, Yang J, Visscher PM, Scholz M, Gibson G, Esko T, Franke L (2018) Unraveling the polygenic architecture of complex traits using blood eQTL meta-analysis. *bioRxiv* 1–57
145. Wallentin L, Becker RC, Budaj A, Cannon CP, Emanuelsson H, Held C, Horrow J, Husted S, James S, Katus H, Mahaffey KW, Scirica BM, Skene A, Steg PG, Storey RF, Harrington RA (2009) Ticagrelor versus Clopidogrel in Patients with Acute Coronary Syndromes. *New England Journal of Medicine* 361:1045–1057
146. Ward LD, Kellis M (2012) HaploReg: A resource for exploring chromatin states, conservation, and regulatory motif alterations within sets of genetically linked variants. *Nucleic Acids Res* 40:930–934
147. Westra HJ, Peters MJ, Esko T, Yaghootkar H, Schurmann C, Kettunen J, Christiansen MW, Fairfax BP, Schramm K, Powell JE, Zernakova A, Zernakova D V., Veldink JH, Van Den Berg LH, Karjalainen J, Withoff S, Uitterlinden AG, Hofman A, Rivadeneira F, Hoen PAC, Reinmaa E, Fischer K, Nelis M, Milani L, Melzer D, Ferrucci L, Singleton AB, Hernandez DG, Nalls MA, Homuth G, Nauck M, Radke D, Völker U, Perola M, Salomaa V, Brody J, Suchy-Dacey A, Gharib SA, Enquobahrie DA, Lumley T, Montgomery GW, Makino S, Prokisch H, Herder C, Roden M, Grallert H, Meitinger T,

- Strauch K, Li Y, Jansen RC, Visscher PM, Knight JC, Psaty BM, Ripatti S, Teumer A, Frayling TM, Metspalu A, Van Meurs JBJ, Franke L (2013) Systematic identification of trans eQTLs as putative drivers of known disease associations. *Nat Genet* 45:1238–1243
148. Winiarska A, Knysak M, Nabrdalik K, Gumprecht J, Stompór T (2021) Inflammation and oxidative stress in diabetic kidney disease: The targets for SGLT2 inhibitors and GLP-1 receptor agonists. *Int J Mol Sci* 22(19):10822
149. Winkelmann BR, März W, Boehm BO, Zotz R, Rosetta BM, Cf B, Pharm I, Universitätsklinik BBM, Variagenics DC, The FT, Centre S, Pharm HTA, Curagen HT, R JRC, Pharm JVM, Chrysalis KS, Trans DNX, Rc L, Corp D, Logic LGG, Roche LKH, Albert MW, Glycosciences MCO (2001) Rationale and design of the LURIC study prognosis of cardiovascular disease A Supplement to Pharmacogenomics. 1–73
150. Woollard KJ, Geissmann F (2010) Europe PMC Funders Group Monocytes in atherosclerosis: subsets and functions. *Nature Review of Cardiology* 7:77–86
151. Yatim KM, Lakkis FG (2015) A Brief Journey through the Immune System. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology* 10:1274–1281
152. Yusuf PS, Hawken S, Ôunpuu S, Dans T, Avezum A, Lanans F, McQueen M, Budaj A, Pais P, Varigos J, Lisheng L (2004) Effect of potentially modifiable risk factors associated with myocardial infarction in 52 countries (the INTERHEART study): Case-control study. *Lancet* 364:937–952
153. Zewinger S, Schumann T, Fliser D, Speer T (2015) Innate immunity in CKD-associated vascular diseases. *Nephrology Dialysis Transplantation* 31:1813–1821
154. Zewinger S, Kleber ME, Tragante V, McCubrey RO, Schmidt AF, Direk K, Laufs U, Werner C, Koenig W, Rothenbacher D, Mons U, Breitling LP, Brenner H, Jennings RT, Petrakis I, Triem S, Klug M, Filips A, Blankenberg S, Waldeyer C, Sinning C, Schnabel RB, Lackner KJ, Vlachopoulou E, Nygård O, Svingen GFT, Pedersen ER, Tell GS, Sinisalo J, Nieminen MS, Laaksonen R, Trompet S, Smit RAJ, Sattar N, Jukema JW, Groesdonk H V, Delgado G, Stojakovic T, Pilbrow AP, Cameron VA, Richards AM, Doughty RN, Gong Y, Cooper-DeHoff R, Johnson J, Scholz M, Beutner F, Thiery J, Smith JG, Vilmundarson RO, McPherson R, Stewart AFR, Cresci S, Lenzini PA, Spertus JA, Olivieri O, Girelli D, Martinelli NI, Leiberer A, Saely CH, Drexel H, Mündlein A, Braund PS, Nelson CP, Samani NJ, Kofink D, Hofer IE, Pasterkamp G, Quyyumi AA, Ko Y-A, Hartiala JA, Allayee H, Tang WHW, Hazen SL, Eriksson N, Held C, Hagström

- E, Wallentin L, Åkerblom A, Siegbahn A, Karp I, Labos C, Pilote L, Engert JC, Brophy JM, Thanassoulis G, Bogaty P, Szczeklik W, Kaczor M, Sanak M, Virani SS, Ballantyne CM, Lee V-V, Boerwinkle E, Holmes M V, Horne BD, Hingorani A, Asselbergs FW, Patel RS, Krämer BK, Scharnagl H, Fliser D, März W, Speer T (2017) Relations between lipoprotein(a) concentrations, LPA genetic variants, and the risk of mortality in patients with established coronary heart disease: a molecular and genetic association study. *Lancet Diabetes Endocrinol* 5:534–543
155. Zewinger S, Reiser J, Jankowski V, Alansary D, Hahm E, Triem S, Klug M, Schunk SJ, Schmit D, Kramann R, Körbel C, Ampofo E, Laschke MW, Selejan S-R, Paschen A, Herter T, Schuster S, Silbernagel G, Sester M, Sester U, Aßmann G, Bals R, Kostner G, Jahnen-Dechent W, Menger MD, Rohrer L, März W, Böhm M, Jankowski J, Kopf M, Latz E, Niemeyer BA, Fliser D, Laufs U, Speer T (2020) Apolipoprotein C3 induces inflammation and organ damage by alternative inflammasome activation. *Nat Immunol* 21:30–41
156. Zhou X, Robertson AKL, Hjerpe C, Hansson GK (2006) Adoptive transfer of CD4+ T cells reactive to modified low-density lipoprotein aggravates atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26:864–870
157. HaploReg v4.1. URL: <https://pubs.broadinstitute.org/mammals/haploreg/haploreg.php> , abgerufen am: 09.02.2020
158. GTEx Portal. URL: <https://www.gtexportal.org/home/snp/rs10754555>, abgerufen am: 09.02.2020
159. Blood eQTL browser. URL: <https://genenetwork.nl/bloodeqtlbrowser/>, abgerufen am: 09.02.2020
160. Myokardial Infarction Genetics Consortium Investigators; Stitzel NO, Won HH, Morrison AC, Peloso GM, Do R, Lange LA, Fontanillas P, Gupta N, Duga S, Goel A, Farrall M, Saleheen D, Ferrario P, König I, Asselta R, Merlini PA, Marziliano N, Notarangelo MF, Schick U, Auer P, Assimes TL, Reilly M, Wilensky R, Rader DJ, Hovingh GK, Meitinger T, Kessler T, Kastrati A, Laugwitz KL, Siscovick D, Rotter JI, Hazen SL, Tracy R, Cresci S, Spertus J, Jackson R, Schwartz SM, Natarajan P, Crosby J, Muzny D, Ballantyne C, Rich SS, O'Donnell CJ, Abecasis G, Sunaev S, Nickerson DA, Buring JE, Ridker PM, Chasman DI, Austin E, Kullo IJ, Weeke PE, Shaffer CM, Bastarache LA, Denny JC, Roden DM, Palmer C, Deloukas P, Lin DY, Tang ZZ, Erdman J, Schunkert

- H, Danesh J, Marrugat J, Elosua R, Ardissino D, McPherson R, Watkins H, Reiner AP, Wilson JG, Altshuler D, Gibbs RA, Lander ES, Boerwinkle E, Gabriel S, Kathiresan S (2014) Inactivating Mutations in NPC1L1 and Protection from Coronary Heart Disease . *New England Journal of Medicine* 371:2072–2082
161. STABILITY Investigators: White HD, Held C, Stewart R, Tarka E, Brown R, Davies RY, Budaj A, Harrington RA, Steg PG, Ardissino D, Armstrong PW, Avezum A, Aylward PE, Bryce A, Chen H, Chen MF, Corbalan R, Dalby AJ, Danchin N, De Winter RJ, Denchev S, Diaz R, Elisaf M, Flather MD, Goudev AR, Granger CB, Grinfeld L, Hochman JS, Husted S, Kim HS, Koenig W, Linhart A, Lonn E, López-Sendón J, Manolis AJ, Mohler ER 3rd, Nicolau JC, Pais P, Parkhomenko A, Pedersen TR, Pella D, Ramos-Corrales MA, Ruda M, Sereg M, Siddique S, Sinnaeve P, Smith P, Sritara P, Swart HP, Sy RG, Teramoto T, Tse HF, Watson D, Weaver WD, Weiss R, Viigimaa M, Vinereanu D, Zhu J, Cannon CP, Wallentin L (2014) Darapladib for Preventing Ischemic Events in Stable Coronary Heart Disease. *New England Journal of Medicine* 370:1702–1711

7. Abbildungs-/Tabellenverzeichnis

Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1** Entstehung einer atherosklerotischen Plaque
- Abb. 2** Kanonischer Aktivierungsweg des NLRP3-Inflammasoms
- Abb. 3** Auszug aus HaploReg 4.1 für den SNP rs10754555
- Abb. 4** Auszug aus der GTEx Datenbank für den SNP rs10754555
- Abb. 5** Auszug aus dem eQTL-Browser für den SNP rs10754555
- Abb. 6** Scoring-System der SNPs
- Abb. 7** Anteil der CD14⁺ Monozyten an den isolierten PBMCs nach Ficoll Dichtegradientenzentrifugation bestimmt mittels Durchflusszytometrie
- Abb. 8** Repräsentative Durchflusszytometrie der ASC-Speck-Quantifizierung im Plasma

- Abb. 9** Schematisches Vorgehen von der SNP-Identifikation bis zur experimentellen Validierung
- Abb. 10** Assoziation von rs10754555 mit der Gesamtsterblichkeit
- Abb. 11** Cis-eQTL Effekt für NLRP3 im Vollblut
- Abb. 12** Assoziation von rs10754555 mit Promotor und Enhancer-Histonmarkern, sowie mit DNase Tracks, abgeleitet vom Roadmap Epigenomics Project in humanen CD14+ Monozyten
- Abb. 13** rs10754555 Genotyp und Konzentration von hsCRP und SAA
- Abb. 14** Monozytenisolation und -stimulation
- Abb. 15** *Nlrp3*-mRNA-Expression in frisch isolierten PBMCs
- Abb. 16** Plasmaspiegel von IL-18 und IL-1 β abhängig vom rs10754555 Genotyp
- Abb. 17** Repräsentative Fluoreszenzmikroskopie von Alexa Fluor-488-markierten ASC-Specks aus Plasma und GFP-ASC im Überstand von THP-1-Zellen
- Abb. 18** Mittlere Fluoreszenz-Intensität (MFI) von ASC-Specks in Plasmaproben abhängig vom rs10754555 Genotyp
- Abb. 19** Konzentration von IL-1 β im Überstand von frisch isolierten PBMCs nach Stimulation mit LPS, LPS und ATP, LPS und Nigericin
- Abb. 20** Konzentration von IL-6 und TNF- α im Überstand von frisch isolierten PBMCs nach Stimulation mit LPS, LPS und ATP, LPS und Nigericin
- Abb. 21** Experimenteller Ablauf des Mausmodells zur perivaskulären Carotis-Verletzung in NOD-SCID-Mäusen
- Abb. 22** Reendothelialisierte Fläche 72h nach Carotis-Verletzung in humanisierten Mäusen und repräsentative Mikrophotographie
- Abb. 23** Western Blot der NLRP3-Proteinexpression in transplantierten PBMCs von neun individuellen Spendern
- Abb. 24** Odds Ratio für die Prävalenz einer KHK und schweren KHK in Abhängigkeit vom rs10754555 Genotyp in 3061 LURIC-Teilnehmern

- Abb. 25** Metaanalyse von 12076 Teilnehmern mit vorhandenen Patientendaten, welche in die GerMIFS-Studien eingeschlossen wurden
- Abb. 26** Hazard ratio ($\pm 95\%$ -KI) für die kardiovaskuläre Mortalität für rs10754555 Träger im Vergleich zu anderen kardiovaskulären Risikofaktoren oder prädisponierenden Faktoren abgeleitet von multivariaten adjustierten Cox-Regressionsmodellen aus der LURIC-Studie
- Abb. 27** Metaanalyse der kardiovaskulären Mortalität assoziiert mit dem rs10754555 Genotyp in den Sekundär- und Primärpräventionsstudien
- Abb. 28a** Assoziation zwischen dem rs10754555 Genotyp und kardiovaskulärer Mortalität bei 3061 LURIC-Patienten, unterteilt in Patienten mit niedrigem und hohem ApoC3-Plasmaspiegel
- Abb. 28b** Assoziation zwischen dem rs10754555 Genotyp und kardiovaskulärer Mortalität in der LURIC-Studie und bei 483258 Teilnehmern der UKBioBank, unterteilt in Patienten mit niedrigem und hohem Triglycerid-Plasmaspiegel
- Abb. 29** Assoziation zwischen dem rs10754555 Genotyp und kardiovaskulärer Mortalität in der LURIC und UKBioBank-Studie, unterteilt in Probanden mit niedrigen und hohen Plasmaharnsäurespiegeln
- Abb. 30** NLRP3-Inflammasom-abhängige Entstehung atherosklerotischer Plaque

Tabellenverzeichnis

- Tab. 1** Vergleich angeborenes und adaptives Immunsystem
- Tab. 2** SNPs im *Nlrp3*-Genlocus von Teilnehmern der LURIC-Studie und ihre vorhergesagte biologische Funktion
- Tab. 3** Allel-/Genotypenhäufigkeit und Hardy-Weinberg-Äquilibrium für rs10754555 von LURIC-Teilnehmern
- Tab. 4** Assoziation zwischen der rs10754555 *Nlrp3*-Genvariante und der Methylierung im *Nlrp3*-Genlocus innerhalb von genomweiten Methylierungsanalysen bei 1262 Teilnehmern der LURIC Studie

- Tab. 5** Charakteristika der Probanden für die experimentelle Untersuchung nach Genotypen getrennt
- Tab. 6** Charakteristika der LURIC-Patienten getrennt nach rs10754555 Genotyp, BMI, eGFR
- Tab. 7** Charakteristika der LURIC-Patienten getrennt nach rs10754555 und Alter
- Tab. 8** Pharmakotherapie der LURIC-Teilnehmer abhängig vom rs10754555 Genotyp
- Tab. 9a** Logistische Regressionsanalysen für eine prävalente KHK abhängig vom rs10754555 Genotyp in der LURIC-Studie
- Tab. 9b** Logistische Regressionsanalysen für eine prävalente schwere KHK abhängig vom rs10754555 Genotyp in der LURIC-Studie
- Tab. 10** Logistische Regressionsanalysen für eine prävalente KHK abhängig vom rs10754555 Genotyp bei den GerMIFS-Studienteilnehmern
- Tab. 11a** Cox-Regressionsanalysen für die Gesamtsterblichkeit abhängig vom rs10754555 Genotyp
- Tab. 11b** Cox-Regressionsanalysen für die kardiovaskuläre Mortalität abhängig vom rs10754555 Genotyp
- Tab. 12** Cox-Regressionsanalysen für die Sterblichkeit an Tumorerkrankungen und Infektionen abhängig vom rs10754555 Genotyp bei LURIC-Teilnehmern
- Tab. 13** Cox-Regressionsanalyse für kardiovaskuläre Mortalität abhängig vom rs10754555 Genotyp bei Patienten der LURIC-Studie unterteilt nach dem ApoC3-Plasmaspiegel
- Tab. 14** Cox-Regressionsanalyse für kardiovaskuläre Mortalität abhängig vom rs10754555 Genotyp bei Patienten der LURIC-Studie unterteilt nach dem Triglycerid-Plasmaspiegel
- Tab. 15** Cox-Regressionsanalyse für kardiovaskuläre Mortalität abhängig vom rs10754555 Genotyp bei Probanden der UKBioBank-Studie unterteilt nach dem Triglycerid-Plasmaspiegel

- Tab. 16** Cox-Regressionsanalyse für kardiovaskuläre Mortalität abhängig vom rs10754555 Genotyp bei Probanden der UKBioBank-Studie unterteilt nach dem Triglycerid-Plasmaspiegel und dem Alter
- Tab. 17** Assoziation von SNPs mit der Triglyceridkonzentration bei Probanden der UK-BioBank
- Tab. 18** Cox-Regressionsanalyse für kardiovaskuläre Mortalität abhängig vom rs10754555 Genotyp bei Probanden der UKBioBank-Studie unterteilt nach Probanden mit oder ohne genetisch-determiniert erhöhten Triglyceridplasmaspiegeln
- Tab. 19a** Assoziation zwischen den Plasmatriglyceridspiegeln und kardiovaskulärer Mortalität bei Teilnehmern der UKBioBank abhängig vom Alter
- Tab. 19b** Assoziation zwischen den Plasmatriglyceridspiegeln und kardiovaskulärer Mortalität bei Teilnehmern der UKBioBank abhängig vom rs10754555 Genotyp
- Tab. 20** Cox-Regressionsanalyse für kardiovaskuläre Mortalität abhängig vom rs10754555 Genotyp bei Probanden der LURIC-Studie unterteilt nach dem Harnsäure-Plasmaspiegel
- Tab. 21** Cox-Regressionsanalyse für kardiovaskuläre Mortalität abhängig vom rs10754555 Genotyp bei Probanden der UKBioBank-Studie unterteilt nach dem Harnsäure-Plasmaspiegel
- Tab. 22** Cox-Regressionsanalyse für kardiovaskuläre Mortalität abhängig vom rs10754555 Genotyp bei Probanden der UKBioBank-Studie unterteilt nach dem Harnsäure-Plasmaspiegel und dem Alter
- Tab. 23** Assoziation von SNPs mit der Harnsäurekonzentration bei Probanden der UKBioBank
- Tab. 24** Cox-Regressionsanalyse für kardiovaskuläre Mortalität abhängig vom rs10754555 Genotyp bei Probanden der UKBioBank-Studie unterteilt nach Probanden mit oder ohne genetisch-determiniert erhöhten Harnsäureplasmaspiegeln
- Tab. 25** Assoziation zwischen den Plasmaharnsäurespiegeln und kardiovaskulärer Mortalität bei Teilnehmern der UKBioBank abhängig von Alter und rs10754555 Genotyp

- Tab. 26** Charakteristika der ARIC-Teilnehmer getrennt nach rs10754555 Trägerstatus
- Tab. 27** Charakteristika der CDCS-Teilnehmer getrennt nach rs10754555 Trägerstatus
- Tab. 28** Charakteristika der dal-OUTCOMES-Teilnehmer getrennt nach rs10754555 Trägerstatus
- Tab. 29** Charakteristika der EMORY-Teilnehmer getrennt nach rs10754555 Trägerstatus
- Tab. 30** Charakteristika der INVEST-Teilnehmer getrennt nach rs10754555 Trägerstatus
- Tab. 31** Charakteristika der PLATO-Teilnehmer getrennt nach rs10754555 Trägerstatus
- Tab. 32** Charakteristika der PROSPER-Teilnehmer getrennt nach rs10754555 Trägerstatus
- Tab. 33** Charakteristika der STABILITY-Teilnehmer getrennt nach rs10754555 Trägerstatus
- Tab. 34** Charakteristika der UKBioBank-Teilnehmer getrennt nach rs10754555 Trägerstatus

8. Publikation / Danksagung

Publikation

Schunk SJ, Kleber ME, März W, Pang S, Zewinger S, Triem S, Ege P, Reichert MC, Krawczyk M, Weber SN, Jaumann I, Schmit D, Sarakpi T, Wagenpfeil S, Kramann R, Boerwinkle E, Ballantyne CM, Grove ML, Tragante V, Pilbrow AP, Richards AM, Cameron VA, Doughty RN, Dubé MP, Tardif JC, Feroz-Zada Y, Sun M, Liu C, Ko YA, Quyyumi AA, Hartiala JA, Tang WHW, Hazen SL, Allayee H, McDonough CW, Gong Y, Cooper-DeHoff RM, Johnson JA, Scholz M, Teren A, Burkhardt R, Martinsson A, Smith JG, Wallentin L, James SK, Eriksson N, White H, Held C, Waterworth D, Trompet S, Jukema JW, Ford I, Stott DJ, Sattar N, Cresci S, Spertus JA, Campbell H, Tierling S, Walter J, Ampofo E, Niemeyer BA, Lipp P, Schunkert H, Böhm M, Koenig W, Fliser D, Laufs U, Speer T; eQTLGen consortium; BIOS consortium. Genetically determined NLRP3 inflammasome activation associates with systemic inflammation and cardiovascular mortality. *Eur Heart J.* 2021 May 7;42(18):1742-1756. doi:10.1093/eurheartj/ehab107. PMID: 33748830; PMCID: PMC8244638.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Menschen bedanken, die mich bei der Anfertigung dieser Dissertation unterstützt und begleitet haben.

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Dr. Thimoteus Speer für die ausgezeichnete Betreuung, sowie die hervorragende Unterstützung bei der Umsetzung der gesamten Arbeit.

Mein Dank gilt ebenso den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des nephrologischen Labors am Universitätsklinikum des Saarlandes für ihre wissenschaftliche Unterstützung und die Möglichkeit, labortechnische Grundkenntnisse zu erwerben. Des Weiteren möchte ich mich bei den Patientinnen und Patienten, sowie Beschäftigten des UKS bedanken, die durch ihre Bereitschaft zur Blutentnahme an der Entstehung der Arbeit mitgewirkt haben.

Meinen Geschwistern und Freunden danke ich für ihre Geduld und ihre ermutigenden Zusprüche während des Studiums, der täglichen Arbeit und dem Anfertigen dieser Dissertationsarbeit.

Und zuletzt möchte ich mich ganz besonderes bei meinen Eltern bedanken, die mir meinen Lebensweg ermöglichten, auf deren Unterstützung ich zu jeder Zeit zählen konnte und denen ich diese Arbeit widmen möchte.

9. Lebenslauf

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

10. Anhang

Tab. 26: Charakteristika der ARIC-Teilnehmer getrennt nach rs10754555 Trägerstatus

Parameter	rs10754555 Wildtyp (C/C)	rs10754555 Heterozygot (C/G)	rs10754555 Homozygot (G/G)	p-Wert
Anzahl (n)	3525	4449	1371	
Charakteristika				
Alter	54,2±5,7	54,4±5,7	54,4±5,7	0,308
Geschlecht (% männlich)	47,5	47,7	45,8	0,543
KHK (%)	4,9	5,3	5,1	0,753
Diabetes (%)	8,8	8,4	9,3	0,592
Rauchen (%)	24,9	24,9	23,5	0,543
BMI (kg/m²)	26,9±4,7	27,0±4,9	27,0±4,7	0,011
LDL- Cholesterin (mg/dL)	137,4±37,2	137,9±38,6	136,6±37,0	0,034
Lipidsenkende Therapie (%)	3,3	3,5	3,7	0,814
Outcome				
Tod während Follow-up (%)	42,1	44,4	45,2	0,063
Kardiovaskulärer Tod (%)	5,0	6,0	5,0	0,087

Tab. 27: Charakteristika der CDCS-Teilnehmer getrennt nach rs10754555 Trägerstatus

Parameter	rs10754555 Wildtyp (C/C)	rs10754555 Heterozygot (C/G)	rs10754555 Homozygot (G/G)	p-Wert
Anzahl (n)	745	959	297	
Charakteristika				
Alter	66,6±12,1	66,9±12,1	67,1±12,9	0,818
Geschlecht (% männlich)	72,2	71,2	71,4	0,899
KHK (%)	100	100	100	-
Diabetes (%)	17,2	16,0	16,9	0,789
Rauchen (%)	5,4	6,5	7,4	0,418
BMI (kg/m²)	27,8±5,4	27,3±4,7	27,3±4,9	0,121
LDL- Cholesterin (mg/dL)	113,7±39,4	112,5±40,2	114,5±37,9	0,784
Lipidsenkende Therapie (%)	46,9	45,5	46,1	0,845
Outcome				
Tod während Follow-up (%)	22,4	22,9	28,6	0,084
Kardiovaskulärer Tod (%)	13,4	12,8	16,8	0,208

Tab. 28: Charakteristika der dal-OUTCOMES-Teilnehmer getrennt nach rs10754555 Trägerstatus

Parameter	rs10754555	rs10754555	rs10754555	p-Wert
------------------	-------------------	-------------------	-------------------	---------------

Anhang

	Wildtyp (C/C)	Heterozygot (C/G)	Homozygot (G/G)	
Anzahl (n)	1479	1860	613	
Charakteristika				
Alter	55,4±5,3	55,8±5,3	55,9±5,2	0,043
Geschlecht (% männlich)	82,1	83,9	81,9	0,305
KHK (%)	100	100	100	-
Diabetes (%)	22,3	21,8	20,6	0,612
Rauchen (%)	69,5	70,9	71,2	0,518
BMI (kg/m²)	29,3±5,2	29,1±5,1	29,0±4,8	0,244
LDL-Cholesterin (mg/dL)	76,1±25,1	76,5±25,4	76,1±26,3	0,893
Lipidsenkende Therapie (%)	94,6	95,4	96,5	0,089
Outcome				
Tod während Follow-up (%)	2,2	2,4	2,2	0,913
Kardiovaskulärer Tod (%)	0,9	1,4	1,0	0,304

Tab. 29: Charakteristika der EMORY-Teilnehmer getrennt nach rs10754555 Trägerstatus

Parameter	rs10754555 Wildtyp (C/C)	rs10754555 Heterozygot (C/G)	rs10754555 Homozygot (G/G)	p-Wert
Anzahl (n)	362	427	145	

Charakteristika				
Alter	66,7±11,5	67,4±11,1	66,7±11,6	0,646
Geschlecht (% männlich)	65	66	66	0,904
KHK (%) (>50% Ste- nose)	62	63	69	0,345
Diabetes (%)	44	35	33	0,012
Rauchen (%)	69	71	70	0,720
BMI (kg/m²)	28,6±5,8	28,6±5,7	28,2±5,8	0,753
LDL- Cholesterin (mg/dL)	93,4±35,7	91,6±34,9	87,1±33,4	0,227
Lipidsenkende Therapie (%)	69	69	75	0,334
Outcome				
Tod während Follow-up (%)	26	31	25	0,190
Kardiovaskulä- rer Tod (%)	16	20	13	0,101

Tab. 30: Charakteristika der INVEST-Teilnehmer getrennt nach rs10754555 Trägerstatus

Parameter	rs10754555 Wildtyp (C/C)	rs10754555 Heterozygot (C/G)	rs10754555 Homozygot (G/G)	p-Wert
Anzahl (n)	273	344	125	
Charakteristika				

Anhang

Alter	70,0±9,9	69,0±9,4	70,0±10,2	0,349
Geschlecht (% männlich)	49,5	42,4	44,0	0,210
KHK (%)	100,0	100,0	100,0	n/a
Diabetes (%)	18,7	20,4	19,2	0,869
Rauchen (%)	47,3	49,4	48,0	0,863
BMI (kg/m²)	29,2±5,8	28,9±5,5	28,4±5,0	0,374
Lipidsenkende Therapie (%)	51,7	51,5	52,8	0,966
Outcome				
Tod während Follow-up (%)	42,5	43,0	42,4	0,988
Kardiovaskulärer Tod (%)	2,6	3,2	2,4	0,851

Tab. 31: Charakteristika der PLATO-Teilnehmer getrennt nach rs10754555 Trägerstatus

Parameter	rs10754555 Wildtyp (C/C)	rs10754555 Heterozygot (C/G)	rs10754555 Homozygot (G/G)	p-Wert
Anzahl (n)	3504	4818	1658	
Charakteristika				
Alter	62,7±11,1	62,3±11,9	62,7±10,9	0,124
Geschlecht (% männlich)	70,0	69,0	69,0	0,681
KHK (%)	27,0	27,0	27,0	0,824
Diabetes (%)	23,0	22,0	25,0	0,058

Anhang

Rauchen (%)	62,0	61,0	59,0	0,449
BMI (kg/m²)	28,3±4,5	28,2±4,6	28,2±4,6	0,352
LDL-Cholesterin (mg/dL)	126,6±43,2	126,6±42,8	127,3±46,3	0,945
Lipidsenkende Therapie (%)	80,0	80,0	80,0	0,994
Outcome				
Tod während Follow-up (%)	4,0	3,0	5,0	0,001
Kardiovaskulärer Tod (%)	3,0	3,0	5,0	0,002

Tab. 32: Charakteristika der PROSPER-Teilnehmer getrennt nach rs10754555 Trägerstatus

Parameter	rs10754555 Wildtyp (C/C)	rs10754555 Heterozygot (C/G)	rs10754555 Homozygot (G/G)	p-Wert
Anzahl (n)	977	1282	374	
Charakteristika				
Alter	72,5 (1,4)	72,6 (1,3)	72,4 (1,4)	0,227
Geschlecht (% männlich)	49,1	46,8	47,3	0,539
KHK (%)	13,2	13,8	10,2	0,181
Diabetes (%)	9,1	11,3	12,0	0,151
Rauchen (%)	30,4	31,8	37,2	0,057
BMI (kg/m²)	27,0 (4,0)	27,0 (4,3)	26,7 (4,2)	0,433

Anhang

LDL-Cholesterin (mg/dL)	146,95 (30,9)	146,95 (30,9)	146,95 (30,9)	0,407
Lipidsenkende Therapie (%)	51,1	48,5	48,9	0,470
Outcome				
Tod während Follow-up (%)	7,5	9,0	9,6	0,317
Kardiovaskulärer Tod (%)	3,0	4,4	4,3	0,179

Tab. 33: Charakteristika der STABILITY-Teilnehmer getrennt nach rs10754555 Trägerstatus

Parameter	rs10754555 Wildtyp (C/C)	rs10754555 Heterozygot (C/G)	rs10754555 Homozygot (G/G)	p-Wert
Anzahl (n)	3963	5101	1722	
Charakteristika				
Alter	64,4±9,2	64,2±9,4	64,2±9,2	0,547
Geschlecht (% männlich)	3230 (82,0)	4187 (82,0)	1413 (82,0)	
KHK (%)	3963 (100)	5101 (100)	1722 (100)	
Diabetes (%)	1572 (40)	2006 (39)	657 (38)	0,557
Rauchen (%)	808 (20)	1105 (22)	364 (21)	0,334
BMI (kg/m²)	29,4±5,1	29,4±5,1	29,5±4,9	0,452
LDL-Cholesterin (mg/dL)	84,3±32,5	85,8±34,4	86,2±32,1	0,140

Anhang

Lipidsenkende Therapie (%)	3856 (97)	4959 (97)	1672 (97)	0,694
Outcome				
Tod während Follow-up (%)	265 (7)	334 (7)	123 (7)	0,694
Kardiovaskulärer Tod (%)	166 (4)	213 (4)	78 (5)	0,805

Tab. 34: Charakteristika der UKBioBank-Teilnehmer getrennt nach rs10754555-Trägerstatus

Parameter	gesamt (n=483258)	rs10754555 (C/C) (n=185376)	rs10754555 (C/G) (n=227603)	rs10754555 (G/G) (n=70279)
Alter	56,5±8,1	56,7±8,1	56,5±8,1	56,5±8,1
Geschlecht (% männlich)	45,8	45,9	45,7	45,7
BMI (kg/m²)	26,9±4,6	27,0±4,6	26,9±4,5	27,0±4,7
Systolischer Blutdruck (mmHg)	140±20	140±20	140±20	140±20
Gesamtcholesterin (mg/dL)	222±43	222±43	222±43	222±43
Triglyceride (mg/dL)	58(43)	58(43)	58(43)	58(43)
HDL- Cholesterin (mg/dL)	55±16	55±16	55±16	55±16

Anhang

LDL-Cholesterin (mg/dL)	140±35	140±35	140±35	140±35
HbA1c (mmol/mol)	36,1±6,8	36,1±6,6	36,1±6,8	36,2±7,1
Kreatinin (mg/dL)	0,82±0,21	0,82±0,20	0,82±0,21	0,82±0,21
Diabetes (%)	5,2	5,1	5,3	5,4
Lipidsenkende Therapie (%)	25,9	25,9	26,0	25,8
Rauchen (%)	45,3	45,3	45,3	45,3
Hypertonie (%)	27,0	27,0	27,0	27,0