

**Medizinischen Fakultät der
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg**

**NLRP3 / ASC Expression bei Hämodialysepatienten
und nierengesunden Bluthochdruckpatienten**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Medizin (Dr.med.)

von Susann Wildgrube

geboren am 18.07.1994 in Lutherstadt Wittenberg

Betreuer: Prof. Dr. med. Girndt

Gutachter*innen:

PD B. Edemir

Prof. S. von Vietinghoff, Bonn

06.04.2021

10.01.2022

Meiner Familie gewidmet

Referat

Das NLRP3 Inflammasom und dessen Komponenten - das Adaptermolekül ASC und die Cysteinprotease Caspase-1 - sind Bestandteil der menschlichen angeborenen Immunabwehr. Inflammasome, welche vor allem in leukozytären immunkompetenten Zellen lokalisiert sind, können nach einem Aktivierungssignal proinflammatorische Zytokine wie IL-1 β sezernieren. Durch diese kann eine permanente Inflammation ausgelöst und die Entstehung von Stoffwechselstörungen, entzündlichen Erkrankungen und chronischen Krankheitsverläufen begünstigt werden. In der vorliegenden prospektiven Querschnittsstudie wird auf das Verhalten des NLRP3 Inflammasoms bei chronischer Niereninsuffizienz näher eingegangen. Dafür wurden 15 chronisch nierenkranke Patienten unter Hämodialysebehandlung rekrutiert und mit einem nach Alter-, Diabetes- und Geschlecht-gematchten Kontrollkollektiv aus 15 nierengesunden Hypertoniepatienten verglichen. Im weiteren Verlauf wurden die Proben mittels klassischer biomolekularer Verfahren untersucht. Ein besonderes Augenmerk wurde dabei auf die Expression des Adaptermoleküls ASC und des Zytokins IL-1 β innerhalb leukozytärer Zellreihen - vor allem in Monozyten und Granulozyten - gelegt. Mit der Studie konnte in den leukozytären Zellen der beiden Patientengruppen eine Expression des NLRP3 Inflammasoms und dessen Komponenten nachgewiesen werden. Die Ergebnisse zeigen in beiden Patientengruppen, dass bei Monozyten v.a. die CD14 $^{++}$ CD16 $^{+}$ Zellen, bei Granulozyten die Neutrophilen in der Lage sind ASC zu exprimieren und so eine Inflammation auslösen können. Beim Vergleich der Patientengruppen konnte nachgewiesen werden, dass sowohl chronisch Nierenkranke, als auch nierengesunde Hypertoniepatienten ASC exprimieren und über das NLRP3 Inflammasom eine Entzündung bedingen können. Bei der weiteren Betrachtung der Ergebnisse fiel auf, dass sich beide Patientengruppen hinsichtlich der ASC Frequenz und Expressionsstärke in den einzelnen Zellreihen unterscheiden. Weiterhin wurde deutlich, dass es keinen signifikanten Unterschied bei systemischen Entzündungszeichen (z.B. CRP) gibt und dass die Gruppe der Nierengesunden trotz erhöhter ASC Werte keine erhöhten Serum-IL-1 β Werte aufweist.

Wildgrube, Susann: NLRP3/ ASC Expression bei Hämodialysepatienten und nierengesunden Bluthochdruckpatienten, Halle (Saale), Univ., Med. Fak., Diss., 69 Seiten, 2021.

Inhaltsverzeichnis

Referat

Abkürzungsverzeichnis.....	III
1 Einleitung	1
1.1 Das angeborene und das erworbene Immunsystem	1
1.1.1 Bedeutung der Monozyten	1
1.1.2 Bedeutung der Granulozyten	2
1.2 Das Inflammasom.....	3
1.2.1 NLRP3 Inflammasom	4
1.2.2 NLRP3 Inflammasom bei chronisch nierenkranken Patienten	7
1.2.3 NLRP3 Inflammasom bei kardiovaskulären Erkrankungen.....	8
1.3 ASC	9
1.4 Zytokine	10
1.4.1 Interleukin-1 β	11
2 Zielstellung	13
3 Material und Methoden.....	14
3.1 Material.....	14
3.2 Methoden.....	22
3.2.1 Klinischer Teil.....	22
3.2.2 Experimenteller Teil	24
3.2.3 Statistische Methoden.....	39
4 Ergebnisse	40
4.1 Eigenschaften der Studiengruppen	40
4.2 Unterschiede zwischen den Studiengruppen	40
4.3 ASC Expression in leukozytären Zellen	42
4.3.1 ASC Expression in Monozyten	42
4.3.2 ASC Expression in den Monozyten-Subgruppen.....	45
4.3.3 ASC Expression in Granulozyten	47

4.3.4	ASC Expression in den Granulozyten-Subgruppen.....	49
4.4	Expression von Genen, die für NLRP3 Inflammasom-Komponenten kodieren	51
4.5	IL-1 β Sezernierung	53
5	Diskussion	55
5.1	Bedeutung leukozytärer Zellen für den Inflammasomkomplex	55
5.1.1	Die Bedeutung der Monozyten.....	55
5.1.2	Die Bedeutung der Granulozyten	57
5.2	Bedeutung der Niereninsuffizienz versus „reiner“ Hypertonie für den NLRP3 Inflammasomkomplex.....	58
5.3	Einschränkungen	59
6	Zusammenfassung	61
7	Literaturverzeichnis	62
8	Thesen.....	69
9	Anhang.....	V
9.1	Publikation	V
9.2	Eidesstaatliche Erklärung.....	VI
9.3	Erklärung über frühere Promotionsversuche	VII
9.4	Danksagung.....	VIII

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bezeichnung
ACTB	Actin Beta
ARB	Angiotensin-Rezeptor-Blocker
ASC	Apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD
ASS	Acetylsalicylsäure
ATP	Adenosintriphosphat
BMI	Body-Mass-Index
BP	Blood pressure
BZ	Blutzucker
CARD	Caspase Recruitment Domain
Caspase-1	IL-1 Converting Enzyme
CCS	Canadian Cardiovascular Society
CD	Cluster of Differentiation
cDNA	Copy DNA
CKD5	Chronic Kidney Disease Stage 5
CKD-5D	CKD-5 under dialysis
CLR	C-type lectin receptor
CRP	C-reaktives Protein
CSF	Colony stimulating factor
DAMP	Damage-associated molecular pattern
DNA	Deoxyribonucleic acid
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
FACS	Fluorescence activated cell sorting
FCS	Foetal calf serum
FSC	Forward Scatter
GFR	Glomeruläre Filtrationsrate
HASC	Anti-ASC
Hb	Hämoglobin
HD	Hämodialyse
HDL	High density lipoprotein
IFN	Interferon
IL	Interleukin
IL-1R	Interleukin-1 Rezeptor

kDa	Kilo-Dalton (Maßeinheit für Proteingröße)
KfH	Kuratorium für Dialyse und Nierentransplantation e.V.
KHK	Koronare Herzkrankheit
KIM	Klinik für Innere Medizin
LDL	Low density lipoprotein
LPS	Lipopolysaccharid
MFI	Mean fluorescence intensity
Mo (1-3)	Monozytensubpopulation (1-3)
mRNA	Messenger Ribonucleic Acid
NaCl	Natriumchlorid
NF- κ B	Nuclear factor `kappa-light-chain-enhancer` of activated B-cells
NLR	NOD-like receptors
NLRP3	NOD-like receptor protein 3
NOD	Nucleotide binding and oligomerization domain
NYHA	New York Heart Association
PAMP	Pathogen-associated molecular pattern
pAVK	Periphere arterielle Verschlusskrankheit
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cell
PBS	Phosphat buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction
PFA	Paraformaldehyd
PRR	Pattern recognition receptors
PYD	PYRIN-Domäne
RIG	Retinoic acid-inducible gene
RNA	Ribonucleic Acid
RLR	RIG-like receptor
ROS	Reactive oxygen species
RPMI	Zellkulturmedium
RT-PCR	Real-time PCR
SD	Standardabweichung ("standard deviation")
SSC	Sideward scatter
Taq	Thermus aquaticus
TLR	Toll-like receptor
TMB	Tetramethylbenzidin
TNF	Tumornekrosefaktor
TOFIE	Time of flight inflammasome evaluation

1 Einleitung

1.1 Das angeborene und das erworbene Immunsystem

Das humane Immunsystem, bestehend aus dem angeborenen und dem erworbenen System, verhindert ein Eindringen von potentiell infektiösen Mikroorganismen. Die angeborene Immunität sichert eine schnelle, aber inkomplette antimikrobielle Abwehr, bis sich die langsamere spezifischere erworbene Immunantwort entwickelt (Fearon und Locksley 1996).

Das angeborene Immunsystem bekämpft Krankheitserreger in frühen Stadien der Infektion. Es ist dem Menschen angeboren und unentbehrlich für die Erhaltung des Lebens, wie es Hirayama et al. 2017 in einem Übersichtsartikel beschreiben. (Hirayama et al. 2017). Weiterhin spielt es eine wichtige Rolle bei der akuten Inflammation, welche durch mikrobielle Infektionen oder Gewebeschädigungen ausgelöst wird (Schenten und Medzhitov 2011). Zu den Zellen des angeborenen Immunsystems gehören neben immunkompetenten Leukozyten auch nicht-immunologische Zellen, wie Epithelzellen, Endothelzellen und Fibroblasten, die Krankheitserreger durch keimbahnkodierte Mustererkennungsrezeptoren (PRR, *pattern recognition receptors*) auf ihrer Oberfläche erfassen können. PRR erkennen zum einen exogene molekulare Pathogen-assoziierte Strukturen (PAMP, *pathogen-associated molecular pattern*) und zum anderen endogene Moleküle, die bei einem Trauma, einer Ischämie oder bei einer Gewebeschädigung freigesetzt werden (DAMP, *damage-associated molecular pattern*) (Takeuchi und Akira 2010; Menu und Vince 2011; Hirayama et al. 2017). Derzeit sind vier unterschiedliche Klassen von PRR-Familien erforscht. Dazu gehören Membranrezeptoren, wie *Toll-like* Rezeptoren (TLR), *C-type lectin* Rezeptoren (CLR), zytosolische Helikasen, wie *retinoic acid-inducible gene (RIG)-I-like* Rezeptoren (RLR) und intrazelluläre Rezeptoren wie *nucleotide binding and oligomerization domain (NOD)-like* Rezeptoren (NLR). Mit Ausnahme mancher NLR wird durch die Mustererkennung von PAMP und DAMP durch die Rezeptoren die Transkription von Genen reguliert. Diese Gene codieren proinflammatorische Zytokine, Typ-1-Interferone, Chemokine und antimikrobielle Proteine, wie es Takeuchi und Akira in ihrem Übersichtsartikel von 2010 beschreiben (Takeuchi und Akira 2010).

1.1.1 Bedeutung der Monozyten

Bei Monozyten handelt es sich um mononukleäre myeloische Zellen (Leukozyten). Diese entstammen aus einer hämatopoetischen Stammzelle im Knochenmark und werden anschließend ins periphere Blut ausgeschwemmt. Periphere Blutmonozyten wandern ins Gewebe und werden zu Makrophagen differenziert. Dort phagozytieren sie

körperfremdes Material und bauen es intrazellulär ab. Weiterhin können aus Monozyten antigenpräsentierende dendritische Zellen im lymphatischen Gewebe entstehen. Somit sind periphere Monozyten an der angeborenen und erworbenen Immunabwehr, an Entzündungen, an der Zytokinproduktion (TNF- α , IL-1, IL-6) und an der Gewebemöostase beteiligt (Belge et al. 2002; Kratofil et al. 2017).

Humane Monozyten lassen sich anhand ihrer Oberflächenmerkmale (CD, *Cluster of Differentiation*) - Antikörper gegen CD14 (Teil des LPS-Rezeptors) und CD16 (Fc III-Rezeptor) - definieren, wie es Ziegler-Heitbrock und Hofer 2013 in ihrer Studie beschreiben. Dadurch ist eine Unterteilung in drei verschiedene Subtypen möglich: CD14⁺⁺CD16⁻ (Mo1); CD14⁺⁺CD16⁺ (Mo2) und CD14⁺CD16⁺⁺ (Mo3). Die Hauptpopulation der humanen Monozyten stellt die Mo1-Gruppe dar (ca. 90%) (Ancuta et al. 2003; Ziegler-Heitbrock und Hofer 2013). Die CD16⁺ Monozyten werden auf Grund ihrer inflammatorischen Eigenschaften als proinflammatorische Monozyten bezeichnet. So sind sie in der Lage inflammatorische Zytokine, wie TNF- α zu produzieren, hingegen sezernieren sie nur geringe Mengen vom antiinflammatorischen Zytokin IL-10 (Frankenberger et al. 1996; Belge et al. 2002). Weiterhin wird angenommen, dass CD16⁺ Monozyten neben Zytokinen auch ein hohes Maß an Chemokinen und Adhäsionsmolekülen freisetzen können, mittels dieser sie am Endothel haften und dieses schädigen können, was wiederum die Entstehung von Gefäßerkrankungen begünstigt. So beschreiben es Merino et al. 2011 in einem Artikel (Merino et al. 2011). Diesen Effekt erläutern Ramírez et al. 2011 bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz. Sie zeigen einen Zusammenhang auf zwischen der erhöhten Menge an CD16⁺ Monozyten und dem vermehrten Auftreten von Gefäßerkrankungen bei diesen Patienten (Ramírez et al. 2011).

1.1.2 Bedeutung der Granulozyten

Granulozyten gehören, ebenso wie Monozyten, zu den weißen Blutkörperchen (Leukozyten). Gebildet werden sie im Knochenmark aus einer multipotenten Vorläuferzelle. Anhand ihrer mikroskopischen Morphologie können folgenden Subtypen unterschieden werden: neutrophile, eosinophile und basophile Granulozyten. Anhand von Oberflächenmerkmalen konnten Neutrophile als CD15⁺CD16⁺ und Eosinophile als CD15⁺CD16⁻ eingeteilt werden (Gustafson et al. 2015).

Neutrophile stellen den Hauptteil von zirkulierenden Immunzellen im menschlichen Körper dar und bilden so die erste Verteidigungsebene gegen Infektionen (Mollinedo et al. 1999). Sie stehen somit im Verdacht, bei der Entstehung und dem Fortschreiten von akuten Infektionen und Entzündungsreaktionen beteiligt zu sein. Des Weiteren wurde in

Studien aufgezeigt, dass eine hohe Neutrophilenzahl mit Erkrankungen, wie beispielsweise kardiovaskulären Erkrankungen und chronischer Niereninsuffizienz einhergeht (Okuyay et al. 2013; Catabay et al. 2017). Eine aktivierte Entzündungsreaktion in Neutrophilen kann zur Freisetzung von Proteasen, Oxidationsmittel, proinflammatorischen Zytokinen und Chemokinen führen. Dies zeigten Mankan et al. 2012 und Bakele et al. 2014 in ihren Studien. Weiterhin stellten sie fest, dass Neutrophile vor allem durch die Expression des NLRP3 Inflammasomkomplexes in der Lage sind, eine Entzündungsreaktion auszulösen (Mankan et al. 2012; Bakele et al. 2014).

Eosinophile gelten als multifunktionelle Leukozyten, die an der Immunabwehr gegen Mikroorganismen beteiligt sind und die Gewebemöostase regulieren können. So spielen sie vor allem bei Krankheiten in den Bereichen Infektionskrankheiten, Allergien, Autoimmunität und Malignität eine wichtige Rolle. Eine meist asymptomatische allergische Reaktion lässt sich bei Hämodialysepatienten beobachten. Diese können mit einer Erhöhung der Eosinophilen gegen Bestandteile des Dialysekreislaufes reagieren (Hildebrand et al. 2016; Gauckler et al. 2018). Die Wirkung der Eosinophilen wird über die Sekretion von immunregulatorischen Zytokinen, Lipidmediatoren und zytotoxischen Granulatproteinen ausgelöst. Die sezernierten Proteine wirken vor allem auf Parasiten und extrazelluläre Mikroorganismen schädlich (Fulkerson und Rothenberg 2013; Ueki et al. 2016).

1.2 Das Inflammasom

Einige NLRs sind in der Lage multimere Komplexe zu bilden, die so genannten Inflammasome. Inflammasome haben eine große Bedeutung für die Aktivierung inflammatorischer Caspasen und Entzündungsmediatoren in Immunzellen. Lokalisiert sind Inflammasome unter anderem in dendritischen Zellen und Makrophagen. Dort sind sie für die angeborene Verteidigung gegen Mikroorganismen verantwortlich (Martinon et al. 2009). Ein Inflammasom ist ein makromolekularer Proteinkomplex, der aus Nukleotidbindenden Oligomerisierungsdomänen (NOD)-ähnlichen Rezeptor-Proteinen aufgebaut ist. Dieser NOD-like Rezeptor (NLR) stellt die Kernkomponente des Inflammasoms dar und sorgt für die Erkennung von mikrobiellen Gefahrensignalen. Der Proteinkomplex ist erforderlich für die Aktivierung von Caspase-1 und daran anschließend für die Reifung und Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen aus der Interleukin-1-Familie: IL-1 β und IL-18 (Yuk und Jo 2013; Vladimer et al. 2013). Eine NLR Inflammasomaktivierung kann an der Entwicklung und Pathogenese von autoimmunen und -inflammatorischen Erkrankungen beteiligt sein, die jedoch noch genauer erforscht

werden müssen, wie es Davis et al. 2011 in ihrem Übersichtsartikel beschreiben (Davis et al. 2011).

1.2.1 NLRP3 Inflammasom

Das NLRP3 Inflammasom – auch bekannt als Nalp3 oder Cryopyrin – ist derzeit am weitesten erforscht und stellt eine Schlüsselplattform dar, die die inflammatorischen Reaktionen auf metabolische Belastungen und angeborene Immunsensoren koordiniert. Dieses Inflammasom, bestehend aus einem NLRP3 Gerüst, dem Adaptermolekül ASC und der Cysteinprotease Caspase-1, ist lokalisiert im Zytosol diverser Immunzellen, wie Makrophagen und dendritischen Zellen, wie es Menu und Vince 2011 in einem Übersichtsartikel beschreiben (Menu und Vince 2011). Die Rekrutierung der Moleküle zur Bildung des Inflammasoms wird durch die N-terminale Effektor-domäne des NLRP3 Gerüsts reguliert. Die NLRP3 Aktivierung führt zu einer Assoziation der Pyrin-Sequenz (PYD) von NLRP3 mit der Pyrin-Sequenz des ASC Moleküls. Dies bewirkt wiederum, dass die C-terminale Caspase-Aktivierungs- und Rekrutierungsdomäne (CARD) von ASC mit der CARD der Procaspase-1 verbunden wird. Hierdurch kommt es zur Autoaktivierung der aktiven tetramerschen Caspase-1, bestehend aus p20- und p10-Fragmenten. Diese Schritte ermöglichen die Selbstoligomerisierung des NLRP3 Inflammasoms. Die aktivierte Form der Caspase-1 bewirkt daraufhin, dass pro-Formen der Zytokine IL-1 β , IL-18 und IL-37 in die aktiven Formen gespalten werden (Menu und Vince 2011; Monteleone et al. 2018). In einigen Studien, wie von Netea et al. 2009, wurde die Zytokinproduktion im Zusammenhang mit dem NLRP3 Inflammasomkomplex in monozytären Zellen näher untersucht. Hierbei wurde herausgefunden, dass die Inflammasomkomponenten eine Bedeutung für eine adäquate Zytokinproduktion aufweisen (Netea et al. 2009).

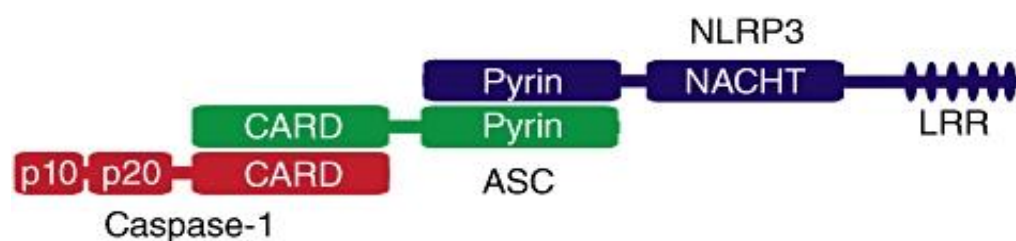


Abb. 1: Schematischer Aufbau des NLRP3 Inflammasoms (Menu und Vince 2011)

Da das NLRP3 Inflammasom durch eine Mehrzahl von endogenen und exogenen Reizen stimuliert wird, kann es als allgemeiner Detektor für zelluläre Belastungen

betrachtet werden. Diese Belastungen resultieren aus Pathogeninfektionen, sterilen Traumata und intrinsischen metabolischen Störungen, wie es Menu und Vince in ihrem Übersichtsartikel 2011 beschreiben (Menu und Vince 2011).

Zu den Stimuli zählen unter anderem bakterielle, virale und pilzliche Pathogene, die in das Zytosol einer Wirtszelle eindringen und so eine Infektion bedingen. Das NLRP3 Inflammasom ist in Studien unter anderem mit Antworten auf folgende Bakterien in Verbindung gebracht worden: *Staphylococcus aureus* (Mariathasan et al. 2006), *Escherichia coli* und *Chlamydia spp* (Abdul-Sater et al. 2009; Davis et al. 2011). Weiterhin löst das Inflammasom eine Immunantwort gegen das Adenovirus (Davis et al. 2011), das Influenza A Virus (Ichinohe et al. 2009) und gegen Pilze, wie *Candida albicans* (Wellington et al. 2014) und *Aspergillus fumigatus* (Davis et al. 2011) aus. Zusätzlich ist gezeigt worden, dass PAMP das NLRP3 Inflammasom stimulieren können. Dazu zählen laut Menu und Vince Pathogen-assoziierte RNA, DNA, porenbildende Toxine und Peptidoglykane (Menu und Vince 2011). Zu den bakteriellen porenbildenden Toxinen zählen beispielsweise Nigericin (*Mariathasan et al. 2006*) und Hämolyisin (*Staphylococcus aureus*) (Craven et al. 2009; Muñoz-Planillo et al. 2009).

Eine weitere wichtige Entdeckung ist die Tatsache, dass endogene Faktoren (DAMP) ebenso an der Aktivierung des Inflammasom-Komplexes beteiligt sind. Dazu zählen unter anderem extrazellulär freigesetztes ATP, Hyaluron, Amyloid- β , Mononatriumurat und Cholesterinkristalle (Halle et al. 2008; Yamasaki et al. 2009; Menu und Vince 2011). Die Aktivierung erfolgt, laut Davis et al. 2011, über die Wahrnehmung der Fehllokalisierung dieser endogenen Moleküle. So sind ATP und Mononatriumurat Bestandteile des Zytosols. Wenn diese allerdings durch das NLRP3 Inflammasom im extrazellulären Raum erfasst werden, wird eine Entzündungsreaktion ausgelöst. Eine ähnliche Reaktion entsteht, wenn extrazelluläre Cholesterinkristalle, Hyaluron und Amyloid- β im Zellinneren erfasst werden (Davis et al. 2011).

Eine weitere Klasse von potentiellen Inflammasomstimuli bilden exogene Umweltreize, wie Asbest, Silikate, UV-B-Strahlung und Aluminiumsalze (Feldmeyer et al. 2007; Eisenbarth et al. 2008; Dostert et al. 2008).

Bei der klassischen NLRP3 Aktivierung handelt es sich um einen zweistufigen Prozess, der räumlich und zeitlich voneinander getrennt ist, wie ihn Guo et al. 2015 in ihrem Übersichtsartikel beschreiben. In den meisten Zelltypen, vor allem in Makrophagen, umfasst der erste Schritt ein Priming. Hierfür initialisiert zuerst ein NF- κ B-aktivierender Stimulus, wie LPS, der an den *Toll-like-Rezeptor 4* (TLR4) bindet, eine verstärkte zelluläre Expression von NLRP3 und pro-IL-1 β . Gleichzeitig wird das Adapterprotein

ASC linear ubiquitiniert und phosphoryliert, damit eine Inflammasomassemblierung stattfinden kann. Nach dem Priming benötigt die klassische NLRP3 Inflammasom-Aktivierung ein zweites, unterschiedliches Signal, um den Inflammasom-Komplex zusammenzubauen und über die Caspase-1 Aktivierung zur IL-1 β Freisetzung und zum Zelluntergang (Pyroptose) zu führen. Als Aktivierungssignal dienen alle, wie im oberen Abschnitt erwähnten Stimuli des Inflammasoms, vor allem exogenes ATP und Nigericin. Gemeinsam ist diesen Stimuli, dass sie zelluläre Mechanismen beeinflussen, um so das Inflammasom zu aktivieren. Zu diesen Mechanismen zählen u.a. die Veränderung der zellulären ionischen Homöostase durch Kalium-Efflux über P2X7-Rezeptoren, Toxin-vermittelte Membranstörungen, Calcium-Einstrom, mitochondriale Dysfunktion und Cathepsin B-Freisetzung nach Destabilisierung von lysosomalen Membranen (Guo et al. 2015; He et al. 2016).

Neuere Studien fanden heraus (siehe Abb. 2), dass vor allem in Monozyten ein alternativer NLRP3 Inflammasom-Aktivierungsweg existiert, der nur durch eine TLR4-Signalgebung ausgelöst wird und keinen zweiten Stimulus benötigt. Gaidt et al. untersuchten in ihrer Studie von 2016 den alternativen Aktivierungsweg innerhalb von humanen Monozyten. Sie fanden heraus, dass es zu einer Entkopplung von Pyroptose und IL-1 β Freisetzung kommt, im Gegensatz zum Alles-oder-Nichts-Prinzip des klassischen Weges. Weiterhin wurde festgestellt, dass die Alternative über eine TRIF-RIPK1-FADD-CASP8-Signalgebung abläuft. Allerdings muss der Effekt von Caspase-8 auf das NLRP3 Inflammasom erst noch in weiteren Studien untersucht werden (Gaidt et al. 2016).

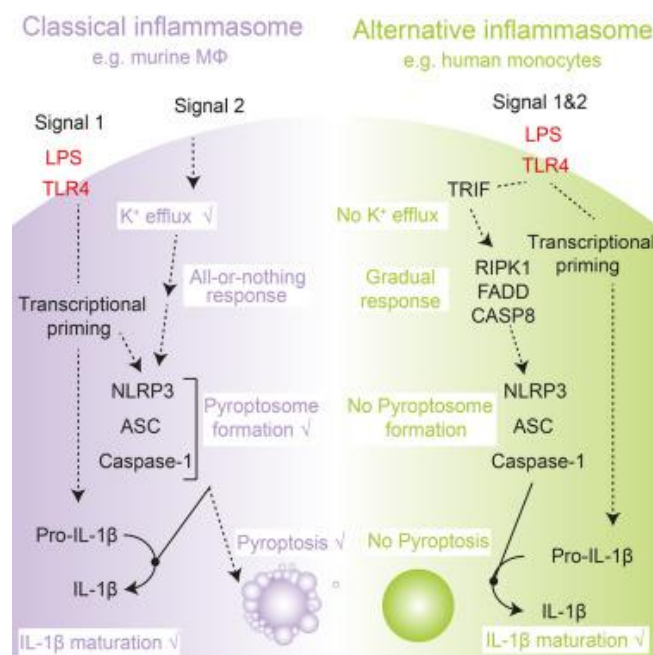


Abb. 2: Inflammasom-Aktivierungswege - klassisch und alternativ (Gaidt et al. 2016)

1.2.2 NLRP3 Inflammasom bei chronisch nierenkranken Patienten

Die chronische Nierenerkrankung (CKD, *chronic kidney disease*) wird international in fünf Stadien, entsprechend der glomerulären Filtrationsrate (GFR), eingeteilt. Im letzten Stadium der Niereninsuffizienz (CKD-5; terminale Niereninsuffizienz) besteht die Indikation zur Dialyse (Hämodialyse, Peritonealdialyse) oder zur Nierentransplantation (Levey et al. 2003). Die CKD wird von einer Reihe komplexer schädlicher Veränderungen, die physiologische und metabolische Funktionen betreffen, begleitet: Abnahme der GFR, Urämie, metabolische Azidose, Insulinresistenz, chronische Entzündung und oxidativer Stress, so Siew und Ikizler 2010 und Slee 2012 in einem Übersichtsartikel (Siew und Ikizler 2010; Slee 2012). Oxidativer Stress steht für ein Ungleichgewicht zwischen überschüssigen freien Oxidationsmitteln (ROS, *reactive oxygen species*) und unzureichendem Abbau dieser Radikale durch antioxidative Systeme (z.B. Vitamin C, Glutathion). Reaktive Sauerstoffspezies werden durch zelluläre Stoffwechselaktivitäten, die Sauerstoff verwenden und durch Umweltfaktoren wie Luftschadstoffe oder Zigarettenrauch entstehen, gebildet. Entfernt werden sie durch verschiedene antioxidative Abwehrmechanismen. Sie agieren in geringeren Konzentrationen als sekundäre Botenstoffe und regulieren intrazelluläre Signaltransduktionswege. In höheren Konzentrationen und im Falle von oxidativem Stress können sie zu metabolischen Dysregulationen, zur Inaktivierung von mitochondrialen Enzymen und zur Schädigung von Lipiden, DNA und Proteinen führen (Valko et al. 2006; Birben et al. 2012). So sind freie Oxidationsmoleküle auch in der Lage zu einer fortschreitenden Nierenschädigung bei CKD zu führen. Schon in einer Studie von 2009 stellten Granata et al. fest, dass CKD-Patienten eine deutliche Dysregulation der mitochondrialen Atmungsmechanismen, die zu erhöhtem oxidativen Stress führen können, aufweisen (Granata et al. 2009). In einer weiteren Studie von Granata et al. von 2015 wurden hämodialysierte CKD-Patienten untersucht und es wurde festgestellt, dass das NLRP3 Inflammasom und somit auch die Zytokinfreisetzung verstärkt bei urämischen Patienten durch eine erhöhte ROS-Produktion aktiviert wird (Granata et al. 2015). Oxidativer Stress und chronische Entzündungen sind somit eng miteinander verbunden und werden als Hauptursache der Langzeitkomplikationen bei Dialysepatienten, wie Atherosklerose und Herz-Kreislauf-Erkrankungen, gesehen (Himmelfarb et al. 2002).

Forscher fanden auch heraus, dass es vor allem bei der Hämodialyse zu zusätzlichen biochemischen Veränderungen kommt, wie es Libetta et al. in einem Übersichtsartikel 2011 beschreiben. So stellen sie folgende Punkte, die für den erhöhten oxidativen Stress

und die damit verbundene verstärkte chronische Entzündung bei der Hämodialyse verantwortlich sind, dar: eine erhöhte ROS-Produktion durch die Biokompatibilität der Behandlung und eine starke Reduzierung von Antioxidantien, da die Hämodialyse ein nichtselektiver Prozess ist und es so zum Verlust von essentiellen Substanzen, wie beispielsweise von Vitamin C, kommt (Libetta et al. 2011). Diese Punkte konnten durch eine Studie von Ogunro et al. 2014 ebenfalls bestätigt werden. So stellten sie des Weiteren fest, dass es während der Hämodialysebehandlung zu Wechselwirkungen von peripheren mononukleären Blutzellen (PBMC) mit biokompatiblen Dialysemembranen und dem Dialysat kommen kann. Dies kann letztendlich eine erhöhte Morbidität und Mortalität bei den Patienten bedingen (Ogunro et al. 2014).

Canaud et al. entwarfen schon 1999 eine Idee, um Langzeitkomplikationen vor allem die chronische Entzündung von Hämodialysepatienten zu verringern. Dazu zählen die Verwendung einer biokompatiblen Membran, ultrareine Dialysate, die extrakorporale Entfernung von ROS und weiteren oxidativen Substanzen und die exogene Supplementation von antioxidativen Vitaminen (Canaud et al. 1999). So wird noch an einer Verbesserung der Hämodialyse geforscht, wie man an diversen Studien und Metaanalysen zu biokompatiblen Membranen, Antioxidantien und der Entfernung von oxidativem Stress sehen kann (Boaz et al. 2000; Bonnefont-Rousselot et al. 2000; Himmelfarb et al. 2003; Heinz et al. 2009).

1.2.3 NLRP3 Inflammasom bei kardiovaskulären Erkrankungen

Die Aktivierung des NLRP3 Inflammasoms kann einen Einfluss auf die Pathophysiologie kardiovaskulärer Erkrankungen, wie Hypertonie, Atherosklerose, myokardialer Ischämie, Kardiomyopathie und Myokardinfarkt haben (Wang et al. 2014; Zhou et al. 2018). So wird das Inflammasom in verschiedenen Zellen des kardiovaskulären Systems vor allem in Kardiomyozyten, Endothelzellen und Immunzellen exprimiert. Des Weiteren spielt das NLRP3 Inflammasom eine wichtige Rolle bei der Pathogenese von kardiovaskulären Risikofaktoren. Dazu zählen unter anderem Diabetes mellitus, Adipositas und Gicht, so Wang et al. 2018 in einem Übersichtsartikel (Wang et al. 2018).

In entwickelten Gesellschaften zählt Atherosklerose zu den häufigsten Todesursachen. Wie Torres et al. 2015 in ihrem Übersichtsartikel feststellen, handelt es sich bei der Atherosklerose um eine fortschreitende kardiovaskuläre Erkrankung, die mit Endotheldysfunktionen und Lipidablagerungen in den Arterien einhergeht. In den Gefäßwänden kommt es zu oxidativen Stress, Entzündungsreaktionen, Makrophageninfiltration in die Gefäßwand und zur Bildung von atherosklerotischen Plaques. Rupturieren diese Plaques, können sie kardiovaskuläre Erkrankungen wie

Herzinfarkt und Schlaganfall verursachen (Torres et al. 2015). Bei der Entstehung der Atherosklerose und deren Fortschreiten spielt vor allem die Entzündung eine entscheidende Rolle, wie es Baldrighi et al. 2017 in ihrem Übersichtsartikel beschreiben (Baldrighi et al. 2017). Bereits 2010 zeigten Duewell et al. im Tierversuch, dass das NLRP3 Inflammasom eine wichtige Rolle beim Voranschreiten der Atherosklerose spielt. So stellten sie fest, dass Cholesterinkristalle, die in allen Stadien der Erkrankung in atherosklerotischen Läsionen nachgewiesen werden konnten, das NLRP3 Inflammasom in Makrophagen aktivieren und so eine IL-1 β Sekretion bedingen. In diesen Läsionen wurden neben Makrophagen dendritischen Zellen auch Neutrophile im Intima-Raum der Gefäße entdeckt. Des Weiteren zeigte die Arbeitsgruppe, dass das oxidierte LDL-Cholesterin über eine Cholesterinkristallisation die Inflammasom-Aktivierung induzieren kann (Duewell et al. 2010). Studien wie von Zheng et al. 2013 und von Bando et al. 2015 zeigen, dass bestimmte atherosklerotische Risikofaktoren mit einem erhöhten NLRP3 Proteinspiegel einhergehen. Dazu zählen Rauchen, Hypertonie, Diabetes mellitus, Hyperurikämie, ein hoher Gesamt- und LDL-Cholesterinspiegel und ein niedriger HDL-Cholesterinspiegel (Zheng et al. 2013; Bando et al. 2015).

1.3 ASC

Eine zentrale Rolle bei der Inflammasom-Struktur spielt das 22-kDa-Adaptermolekül ASC (*apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD*; Pycard) (Masumoto et al. 1999). In Studien konnte beobachtet werden, dass ASC Moleküle vor allem in Milz, Lunge, aber auch im Verdauungstrakt, Haut, Harnblase und Knochenmark lokalisiert sind. Vor allem im peripheren Blut zeigen Leukozyten eine hohe Expression von ASC an. Unter ihnen weisen CD14+ Monozyten das höchste Expressionsniveau auf, während CD3+ Lymphozyten eher einen niedrigeren ASC Spiegel exprimieren (Masumoto et al. 2001). Durch neuere Studien wurde bekannt, dass auch humane Neutrophile in der Lage sind, die Schlüsselkomponenten des Inflammasomkomplexes zu exprimieren und so IL-1 β zu produzieren (Bakele et al. 2014). Die Arbeitsgruppe um Patankar fand 2015 heraus, dass die IL-1 β Produktion in Neutrophilen auch über einen ASC unabhängigen Mechanismus stattfinden kann, welcher in folgenden Studien noch genauer untersucht werden sollte (Patankar et al. 2015).

Das zytosolische ASC Molekül besteht aus zwei verschiedenen Domänen: einer N-terminalen Pyrin-Domäne (PYD) und einer C-terminalen Caspase-Rekrutierungsdomäne (CARD) (Alba 2009). Das ASC Molekül ist durch die Ausbildung homotypischer Wechselwirkungen in der Lage sowohl an der Apoptose als auch am Aufbau des Inflammasom-Komplexes beteiligt zu sein (Park et al. 2007; Alba 2009).

Für die proinflammatorische Wirkung fungiert das ASC Molekül als molekularer Adapter zwischen PYD- und CARD- haltigen Signalmolekülen innerhalb des Inflammasoms, was anschließend zur Caspase-1 Aktivierung und zur Prozessierung und Sekretion von IL-1 β führt. Dafür verknüpft ASC seine PYD-Domäne mit der des NLRs und seine CARD-Domäne mit der von Procaspase-1, wodurch ein Inflammasom-Komplex entsteht (Schroder und Tschopp 2010; Compan et al. 2015). Da den meisten NLR eine CARD-Domäne, die für die Interaktion mit Caspase-1 erforderlich ist, fehlt, ist ASC für den Zusammenbau der meisten Inflammasom-Komplexe vonnöten, wie Hassan und Amer 2011 in ihrem Übersichtsartikel beschreiben (Hassan und Amer 2011). In weiteren Studien, wie beispielsweise von Fernandes-Alnemri et al. 2007 und Bryan et al. 2009, wurde die Funktion des Zelltods durch das ASC vor allem bei einer Zellinfektion untersucht (Pyroptose). Als Reaktion auf eine Stimulation mit proinflammatorischen Stimuli lagert sich das ASC zu einem 4-6 μ m großen ASC Aggregat (*Speck*) als Reaktion auf die NLR-Aktivierung zusammen. Diese zytosolischen ASC Aggregate sind in der Lage, Caspase-1 zu rekrutieren und zu aktivieren, um so eine Pyroptose zu induzieren. Somit kann dieses ASC Aggregat auch als ASC Pyroptosom bezeichnet werden (Fernandes-Alnemri et al. 2007; Bryan et al. 2009). Dieses Phänomen beobachteten ebenfalls Cheng et al. 2010 an Epithelzellen und Sester et al. 2015 in ihrer Studie an Mausmakrophagen (Cheng et al. 2010; Sester et al. 2015). In der Studie von Dick et al. 2016 wurde herausgefunden, dass die Pyroptose in stimulierten Zellen erst innerhalb von 30-60 min auftritt, während die ASC Aggregat-Bildung schon nach ungefähr 3 min abgeschlossen ist. Somit kann angenommen werden, dass die Bildung von ASC Aggregaten dazu dient, ausreichende Mengen an Caspase-1 zu aktivieren, die wiederum ausreichend Zytokine aktivieren, bevor die Zelle lysiert und dadurch abstirbt (Dick et al. 2016).

1.4 Zytokine

Als Zytokine werden Proteine bezeichnet, die im Allgemeinen an der Proliferation, Differenzierung und Signalübertragung zwischen den Zellen des Immunsystems beteiligt sind. Diese werden während einer Entzündungsreaktion im Körper freigesetzt und dienen der Feinabstimmung der spezifischen Immunantwort. Nach Bindung an einen spezifischen Zytokinrezeptor werden zelluläre Prozesse ausgelöst, die u.a. in der Lage sind, inflammatorische Prozesse, den Zellzyklus und die Produktion von Immunmediatoren zu beeinflussen. Zu den Zytokinen werden im Wesentlichen Tumornekrosefaktoren (TNF), Chemokine, Interleukine (IL), Interferone (IFN) und koloniestimulierende Faktoren (CSF) gezählt (Pezzutto et al. op. 2007; Abels 2018).

1.4.1 Interleukin-1 β

Interleukin-1 (IL-1 α und IL-1 β) ist, wie sein Name schon verrät, das erste beschriebene Interleukin. Seit seiner molekularen Identifizierung in der Mitte der 1980er Jahre, wurden seine vielfältigen biologischen Funktionen weiter untersucht. Dinarello stellt schon 1984 in seinem Übersichtsartikel fest, dass es sich bei dem IL-1 um ein Protein mit niedrigem Molekulargewicht (15000 Da) und mit vielfältigen biologischen Aktivitäten handelt (Dinarello 1984a). Diese Aktivitäten umfassen unter anderem die Aktivierung von T-Helferzellen (Mizel 1982), Induktion von Akut-Phase-Proteinen (Dinarello 1984b), B-Zell-Reaktionen (Howard et al. 1983), Neutrophilenmobilisierung und Chemotaxis (Kampschmidt und Upchurch 1980). Des Weiteren gilt IL-1 als Hauptursache für akute und chronische Entzündungen (Dinarello 1998).

Das Zytokin IL-1 β ist als potentes proinflammatorisches Zytokin an Wirtsabwehrreaktionen bei Infektionen und Verletzungen beteiligt. Es wird von einer Vielzahl von Zelltypen produziert und sezerniert, vor allem von Zellen des angeborenen Immunsystems wie Makrophagen und Monozyten. Dies wird schon 1984 in einem Übersichtsartikel von Dinarello beschrieben (Dinarello 1984a). IL-1 β wird als inaktive 31-kDa-Vorstufe auch als pro-IL-1 β benannt (Thornberry et al. 1992; Cheneval et al. 1998). Es wird als Antwort auf einen Entzündungsreiz gebildet und reichert sich intrazellulär an. Die Induktion dieser pro-IL-1 β Expression wird als Initialisierungsschritt bezeichnet. Ein zweites Signal, beispielsweise exogenes ATP oder Nigericin, bewirkt daraufhin den Zusammenbau des Inflammasom-Komplexes. Dieser führt über eine Caspase-1 Aktivierung zur proteolytischen Spaltung des pro-IL-1 β in die aktive Form IL-1 β (Perregaux und Gabel 1994; Cheneval et al. 1998; Bauernfeind et al. 2011).

In den 1990er Jahren stellten Schatz und Dobberstein bei der Analyse des IL-1 β fest, dass dem Zytokin eine typische N-terminale sekretorische Signalsequenz - auch Leader-Sequenz genannt - fehlt. Diese Sequenz ist dafür verantwortlich, dass sekretorische Zytokine in das endoplasmatische Retikulum geleitet werden, von dort aus in den Golgi-Apparat transportiert werden, um dann über sekretorische Wege freigesetzt zu werden (Schatz und Dobberstein 1996). Somit wird angenommen, dass die IL-1 β Freisetzung eher unkonventionellen Sekretionsmechanismen folgt. Monteleone et al. beschreiben 2015 in ihrem Übersichtsartikel die unterschiedlichen Sekretionswege für IL-1 β . So teilen sie die Sekretionsmechanismen in vesikuläre und nicht-vesikuläre Wege ein. Zu den vesikulären Mechanismen zählen u.a. die Exozytose in den extrazellulären Raum. Dies geschieht über sekretorische Lysosomen, multivesikuläre Körper, Exosomen und über Mikrovesikelabgabe und sekretorische Autophagie. Nicht-vesikuläre Transportwege umfassen die IL-1 β Sekretion über die Plasmamembran

(durch direkte Translokation oder durch einen Membrantransporter) oder über die passive Freisetzung während der Zellyse (Monteleone et al. 2015). Allerdings sind viele der Mechanismen noch nicht vollständig geklärt und es gibt noch immer Kontroversen darüber, wie genau IL-1 β aus der Zelle exportiert wird. Damit IL-1 β nach seiner Freisetzung auch inflammatorisch wirken kann, muss es zunächst an den IL-1-Rezeptor (IL-1R) der Zielzellen binden. Dieser erkennt neben IL-1 β auch IL-1 α (Mosley et al. 1987). Anschließend werden Signalkaskaden innerhalb der Zelle ausgelöst, die über eine Hochregulierung von Genprodukten zu einem entzündlichen Zustand führen. So werden beispielsweise Matrixmetalloproteinasen und Cyclooxygenase-2 (Cox-2) aktiviert (Guan et al. 1998; Flannery et al. 1999).

2 Zielstellung

Ziel der vorliegenden Dissertationsarbeit ist es, mit Hilfe einer prospektiven Querschnittsstudie Aussagen zum Verhalten des NLRP3 Inflammasoms und dessen Komponenten bei Hämodialysepatienten zu treffen. Dabei wird im Speziellen auf das Adaptermolekül ASC eingegangen, welches innerhalb des Inflammasomkomplexes agiert und zur Reifung proinflammatorischer Zytokine, wie IL-1 β beiträgt.

Mittels klassischer biochemischer Methoden soll das NLRP3 Inflammasom, insbesondere die ASC und IL-1 β Expression, analysiert werden. Ein besonderes Augenmerk wird dabei auf das Verhalten von leukozytären immunkompetenten Zellen - Monozyten und Granulozyten und deren Subpopulationen - gelegt. Die gewonnenen Ergebnisse werden mit einem Kontrollkollektiv aus nierengesunden Hypertoniepatienten verglichen.

Mit der Studie sollte herausgefunden werden, ob eine Hämodialysebehandlung bei chronischer Niereninsuffizienz eine gesteigerte Inflammation zur Folge hat und ob Unterschiede in der Ausprägung zwischen den einzelnen leukozytären Zellreihen in den betrachteten Patientenkollektiven bestehen.

3 Material und Methoden

3.1 Material

Verbrauchsmaterialien

Tabelle 2: Verbrauchsmaterialien, die für die Studie verwendet wurden

Material	Hersteller
KIMTECH® Science Präzisionswischtücher	Kimberly-Clark Worldwide, Inc., Dallas, USA
Minicooler für PCR-Tubes	Ilona Schubert, Leipzig, D
Pasteurpipetten (Glas)	Carl-Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
Pipettenspitzen 0,5-20 µl Ultra Micro Tips	Ilona Schubert, Leipzig, D
Pipettenspitzen 1-200 µl	Ilona Schubert, Leipzig, D
Pipettenspitzen 100-1250 µl	Ilona Schubert, Leipzig, D
Pipettenspitzen 1-5 ml Makro	Ilona Schubert, Leipzig, D
Reaktionsgefäße 0,5 ml; 1,5 ml EasyFit	Ilona Schubert, Leipzig, D
Zentrifugenröhrchen 15 ml, 50 ml	Ilona Schubert, Leipzig, D
gestopfte Pipettenspitzen 1-100 µl	VWR International, Radnor, USA
S-Monovette - 9ml EDTA; 2,7 ml Serum	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, D
Multi-Adapter	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, D
Sicherheits-Multifly-Kanüle 21G 80 mm	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, D
Mulltupfer-Set, D=3 cm, steril	Fuhrmann GmbH, Much, D
MicroAmp Fast Optical 96 Well Reaction Plate (0,1 ml) VE: 20 Platten	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Handschuhe. Ultra Vinyl, Größe: M	BSN medical GmbH, Hamburg, D
Einmalpipetten (serologische); 5 ml, 10 ml, 25 ml	Greiner bio-one GmbH, Kremsmünster, AUT
PCR-Plate; 96 Well für ABI Cycler	Ilona Schubert, Leipzig, D

BD Falcon, 5 ml Polystyrene Round-Bottom Tube	Corning Science México S.A. de C.V., Reynosa, Mexico
Zymo-Spin IIC Columns	ZymoResearch, Irvine, USA
Zymo-Spin IIIC Columns	ZymoResearch, Irvine, USA
Thermal Sealing Film for PCR Plates	VWR International, Radnor, USA
Tempus™ Blood RNA Tube	Greiner bio-one GmbH, Kremsmünster, AUT

Geräte

Tabelle 3: Geräte, die für die Studie verwendet wurden

Gerät	Hersteller
Rack, MultiRack, (PP) mittel für Zentrifugenröhrchen	Ilona Schubert, Leipzig, D
Signal-Timer	Carl-Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
Microzentrifuge (Gerätetyp: UniFuge)	Carl-Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
Kühlschrank (Gerätetyp: Spezial-468)	Kirsch GmbH, Offenburg, D
Kühlschrank (GT: Labo-100)	Kirsch GmbH, Offenburg, D
Tiefkühlschrank -20 °C (GT: GNP 3056)	Liebherr-Hausgeräte GmbH, Ochsenhausen, D
Tiefkühlschrank -20 °C (GT: KGGSUU41A)	Siemens, München, D
Tiefkühlschrank -80 °C (GT: HERAFreeze)	HERAEUS Instruments, Hanau, D
Tiefkühlschrank -80 °C (GT: MDF-U74V)	Sanyo, München, D
Heraeus Megafuge 11R, Zentrifuge	ThermoFisher Scientific, Schwerte D
Sicherheitswerkbank Labgard Klasse II (GT: NU-437-400)	NuAire, Inc. Plymouth, USA

Universal 320 Tischzentrifuge mit Zyto-System	Hettich GmbH, Tuttlingen, D
Hettich Microliter Centrifuge, Mikro 220R	Hettich GmbH, Tuttlingen, D
Vortexer (GT: Q1)	VWR International, Radnor, USA
Real Time PCR Step one Plus (GT: Primer Express 3,0)	Applied Biosystems Deutschland GmbH, Darmstadt, D
Thermocycler PCR Express (GT: Hybraid)	Thermo Fisher Scientific GmbH, Schwerte, D
MACSQuant TM Analyser (GT: MACSQuant)	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, D
Computertastatur (GT: L100)	DELL GmbH, Frankfurt a.M., D
Computermaus (GT: RX250)	Logitech, Newark, USA
Tecan Infinite M200 Pro Nanoquant	Tecan Trading AG, Männedorf, CHE
Thermomixer (GT: MHR 13)	Ditabis AG, Pforzheim, D
Drucker (Ecosis P2135dn)	Kyocera, Esslingen, D
Rechner (GT: URLA25)	ProSoft Krippner GmbH, Halle, D
Monitor (GT:HP L2445w)	HP Inc., Palo Alto, USA
Gefrierschrank (GT: GNP 3056)	Liebherr GmbH, Biberach an der Riss, D
Pipetus	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG, Eberstadt, D
Kompaktwaage (EMB 600-2)	Kern & Sohn GmbH, Balingen, D
Brutschrank (NU-5510)	NuAire, Inc. Plymouth, USA
HLC Vakuum - Sicherheits - Absaugsystem (GT: AZ04)	Hettich GmbH, Kirchenlengern, D
Vortex Genie 2 (GT: G-560 E)	Bender und Hobein AG, München, D
Eisbehälter für 50 Tubes (1,5/ 2,0 ml)	Ilona Schubert, Leipzig, D

ELx 808 Ultra Microplate Reader	BioTek Instruments, Inc., Winooski, USA
Keyence 8000 Fluoreszenz-Mikroskop	Keyence Deutschland GmbH, Neu-Isenburg, D

Monoklonale Antikörper

Tabelle 4: Liste der verwendeten monoklonalen Antikörper

Monoklonale Antikörper	Klon	Hersteller
Anti-Human - CD15 eFluor450	HI98	eBioscience, Frankfurt, D
Anti-CD3 FITC human	BW 264/56	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, D
Anti-Human-CD14 Pe- Cyanine7	61D3	Affymetrix Inc., San Diego, USA
Human-CD16 APC Conjugate	3G8	Life Technologies Corp., Carlsbad, USA
ASC-Alexa Fluor 488	B3	Santa Cruz Biotechnology, Dallas, USA
PE anti-ASC	HASC-71	BioLegend, San Diego, USA

FITC: Fluoreszeinisothiocyanath; PE: Phycoerythrin; APC: Allophycocyanin; AAD: amino-actinomycin D

Substanzen*Tabelle 5: Substanzen, die für die Studie verwendet wurden*

Substanz	Hersteller
Phosphate Buffered Saline (PBS)	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D
Ethylendiamintetraacetic acid (EDTA)	Roche, Basel, CHE
Ficoll-Paque TM Plus (1,077 g/ ml)	GE Healthcare, Little Chalfont, UK
Fötale Kälber Serum (FCS)	Biochrom GmbH, Berlin, D
Aqua Spüllösung (Ampuwa® Spüllösung)	Fresenius SE & Co. KGaA, Bad Homburg v.d.H., D
Natriumchlorid	Carl-Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
Lipopolysaccharides 0127:B8 E.coli (LPS)	(Sigma-Aldrich) KIM II, UKH, D
Nigericin sodium salt Ready made Solution	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D
Paraformaldehyd (PFA)	Carl-Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
Saponin	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D
MACSQuant Running Buffer	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, D
Washing Solution MACSQuant	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, D
MACSQuant Calibrations Beads	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, D
RMPI 1640, without L-Glutamine	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D
Humanes Serum Albumin (HSA)	CSL Behring GmbH, Marburg, D
Penicillin/ Streptomycin; flüssig	Biochrom GmbH, Berlin, D

L-Glutamine 10000 u/ml	Lonza, Basel, CHE
Albumin Fraktion V (BSA)	Carl-Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
7-AAD Viability Staining Solution	eBioscience, Frankfurt, D
Natriumazid	Carl-Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
ZR RNA MiniPrep™ (Cat: R1064) RNA Lysis Buffer RNA Prep Buffer RNA Wash Buffer DNA/ RNase freies Wasser Zuymo Spin™ IIC/ III Columns Collection Tubes	ZYMO Research, Freiburg, D
TaqMan Gene Expression Assay Gen: CASP1; Hs00354836_m1; Gen: NLRP3; Hs00918082_m1; Gen: IL-1β; Hs01555411_g1; Gen: PyCARD; Hs01547324_gH; Gen: RPL37a_Hs01102345_m1	Invitrogen/ life technologies, Darmstadt, D
Tempus™ Spin RNA Isolation Reagent Kit RNA Purification Resuspension Solution RNA Purification Wash Solution 1 & 2 Nucleic Acid Purification Elution Solution	Invitrogen/ life technologies, Darmstadt, D
FastGene® Scriptase Base cDNA Kit Oligo dT primer Random hexamer FastGene® Scriptase Basic Buffer FastGene® Scriptase Basic dNTP mixture Rnase Inhibitor Destilliertes Wasser	Nippon Genetics Europe GmbH, Dueren, D

<p>Human IL-1 beta Uncoated ELISA Kit</p> <p>Capture Antibody: vortitriertes, gereinigtes Anti-Human-IL-1β Antikörper</p> <p>Detection Antibody: vortitriertes, Biotin-konjugiertes Anti-Human-IL1β Antikörper</p> <p>IL-1 beta Standard</p> <p>Coating Buffer (Phosphate Buffered Saline (PBS, 10x)</p> <p>5x ELISA/ ELISASPOT Diluent</p> <p>Enzym: Avidin-HRP</p> <p>Substratlg.: Tetramethylbenzidin (TMB)</p> <p>Wasch-Puffer (1x PBS, 0,05 % Tween™-20)</p> <p>Stoplg.: (2 N H₂SO₄)</p>	<p>Invitrogen/ life technologies, Darmstadt, D</p>
<p>Ethanol; absolut</p>	<p>Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D</p>
<p>Ultra Pure Water = Reinstwasser</p>	<p>Biochrom AG, Berlin, D</p>
<p>Fluoroshield with DAPI (DAPI= 4',6-Diamidin-2-phenylindol)</p>	<p>Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D</p>

Puffer und Medien

Tabelle 6: Zusammensetzung der Puffer und Medien, die für die Studie verwendet wurden

Name	Ingredienz	Menge
RMPI-Medium mit 2 % FCS	RMPI-Medium	500 ml
	1 % Penicillin/Streptomycin	5 ml
	1 % Glutamin	5 ml
	2 % FCS	10 ml
FACS-Puffer	PBS	500 ml
	Natriumazid (10%)	3,5 ml
	Bovines Serumalbumin	0,5 g

PBS + 2mM EDTA	PBS	1000 ml
	0,5 mM EDTA-Lsg.	4 ml
Saponin 5%	Saponin	2 g
	PBS	39,72 ml
	Natriumazid (10 %)	0,28 ml
Saponin 4 %	Saponin	1,6 g
	PBS	39,72 ml
	Natriumazid (10 %)	0,28 ml
Saponin 0,1%	FACS-Puffer	100 ml
	Saponinlsg. (5 %)	2 ml
PFA 4 %	Paraformaldehyd	8 g
	PBS	200 ml
PFA 1 %	PFA (4 %)	12,5 ml
	FACS-Puffer	37,5 ml

3.2 Methoden

3.2.1 Klinischer Teil

Studiendesign

Für diese prospektive Querschnittsstudie wurden Patienten eingeschlossen, die sich in ambulanter Dialysebehandlung im Kuratorium für Dialyse und Nierentransplantation e.V. (KfH; Ärztliche Leitung: Prof.Dr.med. Matthias Girndt) befanden. Des Weiteren wurden für die Kontrollgruppen Patienten aus der Klinik für Innere Medizin (KIM) II und III des Universitätsklinikums Halle (UKH) in die Studie mit einbezogen. Diese Patienten wurden nach Alter, Geschlecht und nicht renalen Vorerkrankungen (v.a. einer Diabeteserkrankung) passend zu den Dialysepatienten gematched. Die Patienten wurden über den Studienablauf informiert und eine voraussichtliche Studienteilnahme erörtert.

Folgende Ein- und Ausschlusskriterien waren für eine Studienteilnahme entscheidend:

Einschlusskriterien:

- Lebensalter > 18 Jahren
- Beide Geschlechter
- Einwilligung nach Aufklärung
- Dialysepatienten mit terminaler Niereninsuffizienz (chronische Niereninsuffizienz Grad 5 - GFR < 15 ml/min) seit mindestens 3 Monaten

Ausschlusskriterien:

- Fehlende Kooperationsbereitschaft (Einwilligung)
- Lebensalter < 18 Jahren
- Dialysepatienten mit terminaler Niereninsuffizienz < 3 Monate
- Dialysepatienten mit einem Hb-Wert kleiner als 10 mg/dl bzw. größer als 12 mg/dl
- Bekannte Gichterkrankung
- Bekannte Autoimmunerkrankungen (Lupus erythematodes, Morbus Wegener)
- Bekanntes bösartiges Tumorleiden inkl. Phäochromozytom, außer Hauttumoren
- Einnahme von immunsupprimierenden Medikamenten
- Schwere Infektion (Dialysepatienten: CRP > 40 mg/dl; Kontrollpatienten: CRP >10 mg/ml)
- Psychiatrische oder neurologische Erkrankungen, die die Geschäftsfähigkeit beeinträchtigen

- Bekannte Schwangerschaft oder fehlende Kontrazeption (prämenopausaler Frauen)

An der Querschnittsanalyse nahm ein Kollektiv aus insgesamt 30 Patienten, darunter 15 Hämodialysepatienten (CKD5-D, HD) sowie 15 nierengesunde Personen mit Bluthochdruck (BP) der KIM II und III des UKHs teil.

Die Autorin dieser Dissertation rekrutierte alle teilnehmenden Probanden mit Unterstützung des KfH (PD Dr.med.habil. Fiedler) und der KIM II (Leitung: Prof.Dr.med. Girndt) und III (Leitung: Prof.Dr.med. Sedding) und führte die klinischen und die experimentellen Untersuchungen eigenständig durch.

Der Aufklärungsbogen und der klinische Anamnesebogen - Bestätigung durch die Ethikkommission des Universitätsklinikums Halle - wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Ulrich erstellt.

Studienablauf

Zu Beginn der Studie wurden alle Probanden durch die Autorin und einen Oberarzt der KIM II des UKHs aufgeklärt. Bei Einverständnis wurden den Patienten mehrere Blutproben unter standardisierten Bedingungen abgenommen. Vier 9 ml EDTA-Monovetten wurden zur Bestimmung der PBMC- (Monozyten und Lymphozyten) und Granulozytenzellzahl und zur ASC und IL-1 β Analyse benötigt. Weiterhin bedurfte es der EDTA-Monovetten für eine RNA Analyse mit anschließender Polymerase Kettenreaktion (PCR, *polymerase chain reaction*). Ein 9 ml Tempus Blood RNA Tube wurde zur Stabilisierung und Isolierung von Gesamt-RNA aus Vollblut verwendet, welche für die Genexpressionsanalyse benötigt wurde.

Die Abnahme der Blutproben der Dialysepatienten erfolgte vor der Dialyse durch das KfH-Team. Die Proben der Bluthochdruckpatienten wurden ebenfalls am Morgen von den Ärzten der KIM II und III abgenommen. Gekühlt gelangten die Blutproben in das Labor der KIM II-Nephrologie. Die Zeit zwischen Entnahme und Bearbeitung betrug nicht mehr als zwei Stunden.

Datenerfassung der Studiengruppen

Für die Dokumentation der Probandendaten, die für nephrologische und kardiovaskuläre Erkrankungen typisch sind, wurde ein standardisierter Fragebogen eingesetzt. Dieser Fragebogen behandelte folgende Punkte: Rauchgewohnheiten, Vorhandensein und Medikation eines Diabetes mellitus, Sportgewohnheiten, Schlaganfall oder Herzinfarkt bei dem Probanden selbst und bei Verwandten ersten Grades vor Erreichen des 60.

Lebensjahres und Operationen im Zusammenhang mit arteriellen Verschlusskrankheiten. Probanden, die angaben täglich mehr als eine Zigarette zu rauchen, galten als aktive Raucher. Weitere Fragestellungen betrafen die Einschränkungen des täglichen Lebens durch Brustschmerz (CCS Klassifikation, I-IV), durch Luftnot (NYHA Klassifikation, I-IV) sowie einer Einschränkung durch belastungsabhängige Schmerzen in den Unterschenkeln (pAVK Klassifikation, I-III). Soweit vorhanden, wurden alle weiteren Probandencharakteristika (Medikation, Vorerkrankungen) den ärztlichen Dokumentationen entnommen.

Aus Dokumentationsakten des KfH wurden Daten wie Größe, Gewicht und der daraus berechnete BMI übernommen, sofern sie nicht älter als zwei Wochen waren. Die klinischen Parameter der Probanden von KIM II und III wurden im Anamnesegespräch erfragt oder aus vorhandenen ärztlichen Dokumentationen übernommen. Bei Probanden, die angaben an Diabetes mellitus erkrankt zu sein, die einen nicht-nüchtern Blutzucker größer als 200 mg/dl, einen Nüchtern-Blutzucker größer als 126 mg/dl aufwiesen oder Blutzucker-senkende Medikamente einnahmen, kam es zur Einstufung als Diabetiker.

Mittels Standardverfahren wurden einige Routineparameter sowohl von den Dialysepatienten als auch von der Kontrollgruppe im Zentrallabor des UKH (Leitung: Dr.med. B. Ludwig-Kraus) bestimmt.

Folgende Parameter wurden analysiert: Differentialblutbild, CRP, Harnstoff, Kreatinin, Elektrolyte (Natrium, Kalium, Calcium), Hämoglobin und Hämatokrit.

3.2.2 Experimenteller Teil

Isolation von Lymphozyten, Monozyten und Granulozyten

Im Nachfolgenden ist die Methode zur Zellreihenisolation mittels Durchflusszytometrie näher erläutert. Das für diese Methode verwendete Protokoll ist als Standardverfahren im Labor der Nephrologie des UKHs (Leitung: Dr. C. Ulrich) etabliert.

Das Vollblut aus vier EDTA-Monovetten wurde einem Standardprotokoll der Dichtezentrifugation unterzogen. Unter sterilen Bedingungen kam es zur Verdünnung von je 7 ml des antikoagulierten Vollblutes im Verhältnis 1:3,5 mit PBS + 2 mM EDTA in einem 50 ml Falcon-Gefäß. Anschließend wurde die Lösung mit 13 ml eines Dichtemediums (Ficoll, 1,077 g/ ml) unterschichtet, ohne dass sich dabei die beiden Phasen vermischten. Nach einer erfolgten Zentrifugation (1000 g, 18 °C, 15 min, ohne Bremse) der Falcon-Gefäß wurde der entstandene PBMC-Ring, bestehend aus Lymphozyten und Monozyten entnommen und in ein neues 50er Falcon-Gefäß

überführt. Ebenso wurde mit den Granulozyten, welche sich über der Erythrozytenschicht befanden, verfahren.

In drei folgenden Waschschritten kam es zur Reinigung der PBMC. Dafür wurde das Falcon auf 50 ml mit PBS + 2 mM EDTA aufgefüllt und anschließend dreimal zentrifugiert (300 g, 8 °C, 10 min, mit Bremse). Im nächsten Schritt erfolgte die Aufnahme des entstandenen Zellpellets in 1 ml sterilem RPMI-Medium mit 2 % FCS.

Für die weitere Granulozyten-Reinigung galt es, die restlichen Erythrozyten durch eine 45 sek. dauernde Inkubation mit Aqua Braun zu lysieren. Abgestoppt wurde die Reaktion durch Zugabe von 1,8 % NaCl-Lösung. Die Proben wurden anschließend zentrifugiert (300 g, 8 °C, 10 min, mit Bremse) und nochmals lysiert. Das nach einer letzten Zentrifugation entstandene Zellpellet wurde ebenfalls, wie die PBMC, in 1 ml sterilem RPMI-Medium mit 2 % FCS aufgenommen.

Die Zellzahl- und Zellqualitätsbestimmung erfolgte am MACSQuant Analysator (Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach, Deutschland). Hierfür wurden 10 µl der Proben in 381 µl des FACS-Puffers resuspendiert und mit einer Antikörpermixtur (5 µl Anti-CD3 FITC; 2 µl Anti-CD15 eF450; 1 µl Anti-CD14 Pcy7; 2,5 µl Anti-7-AAD) behandelt und umgehend per FACS-Analyse gemessen.

Prinzip der Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ist ein labormedizinisches Messverfahren, das zur Analyse von verschiedenen Zellarten und deren Charakteristika eingesetzt wird und auf der Aussendung von Lichtsignalen beruht. So wird es beispielsweise für die Erstellung eines kleinen Blutbildes oder eines Differentialblutbildes (Aufteilung in Lymphozyten, Monozyten und Granulozyten) verwendet. Eine andere Bezeichnung für die durchflusszytometrische Analyse ist FACS (*fluorescence activated cell sorting*). FACS ist eine geschützte Handelsmarke der Firma BD Biosciences Heidelberg (Deutschland). Für die in der Studie abgebildete FACS-Analyse wird ein Gerät mit drei Laserquellen und neun optischen Kanälen der Firma Miltenyi Biotec (MACSQuant Analysator, Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach, Deutschland) verwendet.

Eine Differenzierung der unterschiedlichen Zellen des peripheren Blutes ist anhand von Größe, Granularität und antigener Oberflächenmerkmale möglich. Für die Gewinnung monozytärer, lymphozytärer und granulozytärer Zellen aus peripherenvenösem Blut wird eine Dichtegradienten-Zentrifugation durchgeführt. Hierbei kommt es zur Auftrennung der verschiedenen Zellpopulationen anhand ihres spezifischen Gewichtes. Mit Hilfe antigener Oberflächenmerkmale (Einteilung nach der internationalen Klassifikation - CD,

Cluster of Differentiation) können die Zellen noch weiter unterschieden werden. An diese Oberflächenmerkmale binden fluorkonjugierte Antikörper, die durchflusszytometrisch nachweisbar sind. Somit ist es möglich, die verschiedenen leukozytären Zellreihen zu unterscheiden (Adan et al. 2017).

Für die in dieser Studie durchgeführte Zellreihenisolation wurden fluorkonjugierte Antikörper eingesetzt, welche sich gegen humane antigene Strukturen richten. In den Anlagen (Kapitel 9.1) findet sich eine Tabelle, in der die verwendeten Fluorochrome aufgeführt sind. Folgende Antikörper wurden verwendet, um die verschiedenen Zellen sichtbar zu machen: Die Population der Lymphozyten wurde durch einen Antikörper gegen den CD3-Rezeptor markiert und durch die Größe und Granularität der Zellen durchflusszytometrisch bestimmt. Die Gesamtheit der Monozyten konnte mittels Antikörper gegen CD14 (LPS-Rezeptor) und die Gesamtheit der Granulozyten mittels Antikörper gegen CD15 (3-Fucosyl-N-Acetyl-Lactosamin) detektiert werden und die Zellen in der Analyse nach zellcharakteristischen Merkmalen identifiziert werden. Als letzte Zellgruppe galt es, die Population der nicht-lebensfähigen Zellen mittels 7-Aminoactinomycin (7-AAD) zu bestimmen. Dazu zählten Zellen mit beschädigter Zellmembran oder mit gestörtem fehlendem Zellstoffwechsel, die den Farbstoff nicht daran hindern konnten, in die Zelle einzudringen.

Die Grundlage der Durchflusszytometrie bilden Zellen, die sich in Suspension befinden. Diese werden einzeln hintereinander durch eine Messkammer geleitet, in der sie mit einem Laser angestrahlt werden. Dabei verursachen sie ein für jeden Zelltyp spezifisches Streulicht, welches mittels Detektoren nachgewiesen werden kann. Das Streulicht korreliert einerseits mit der Größe, Oberfläche und Granularität der Teilchen (Struktur der Zellmembran) und andererseits mit der durch das Laserlicht angeregten Fluoreszenz der Zellen. Die Fluoreszenz entsteht durch mit Fluoreszenzfarbstoff-markierten Antikörpern, die sich gegen bestimmte Oberflächenmerkmale der Partikel richten. Das entstehende Streulicht kann nach seinen Charakteristika eingeteilt werden in das Vorwärtsstreulicht (FSC, *Forward Scatter*) und das Seitwärtsstreulicht (SSC, *Side Scatter*). FSC ergibt sich aus der Beugung des Lichts und ist abhängig von dem Volumen der Zelle. SSC hingegen ist ein Maß für die Lichtbrechung und gibt Auskünfte über die Granularität der Zelle sowie über die Menge ihrer intrazellulären Vesikel. Anhand dieser Zellcharakteristika kann die untersuchte Zelle schon ungefähr einem Bestandteil des peripheren Blutes (z.B. Monozyten, Lymphozyten und Granulozyten) zugeteilt werden. Eine genauere Einteilung erfolgt anschließend anhand der Fluoreszenzmerkmale. Mit Hilfe von fluoreszenzkonjugierten Antikörpern können verschiedene Oberflächenantigene der Zelle nachgewiesen werden, da die verwendeten Antikörper

über eine Antigen-Antikörper-Reaktion an der jeweiligen Zelle binden. Entscheidend für die Ausprägung des Oberflächenmarkers ist einerseits der Anteil der Zellen, die für diesen Oberflächenmarker positiv sind und andererseits die Expressionsdichte der gebundenen Antikörper auf der jeweiligen Zelle (Adan et al. 2017).

Die Darstellung der Ergebnisse einer FACS-Analyse erfolgt entweder in einem Histogramm oder in einem Dotplot. Jeder einzelne Punkt in dem Dotplot steht für eine gemessene Zelle, eingeteilt nach den Charakteristika Größe und Granularität oder nach der Expression des Oberflächenantigens.

Zellzahlbestimmung und Vitalitätsmessung am Durchflusszytometer MACSQuant®Analyzer

Im ersten Schritt der Arbeit, der Isolation der PBMC und Granulozyten, wurden die einzelnen Zellreihen detektiert (siehe Abb.3). Dies erfolgte anhand der Granularität und Größe der Zellen in einem FSC/SSC Dotplot. Anschließend wurden die Zellreihen anhand ihrer Fluoreszenzmerkmale weiter analysiert. Hierfür wurde die Expressionsdichte von CD3 auf der Ordinate und die von CD14 auf der Abzisse aufgetragen, sodass eine Heterogenität der Zellen erkennbar wurde. Somit wurden CD3+ Zellen als Lymphozyten, CD14+ Zellen als Monozyten und CD3-CD14- Zellen als Granulozyten definiert. In einem weiteren Dotplot wurde die Vitalität der gemessenen Zellen dargestellt. Dies erfolgte durch die Messung des Fluoreszenzmerkmals 7-AAD.

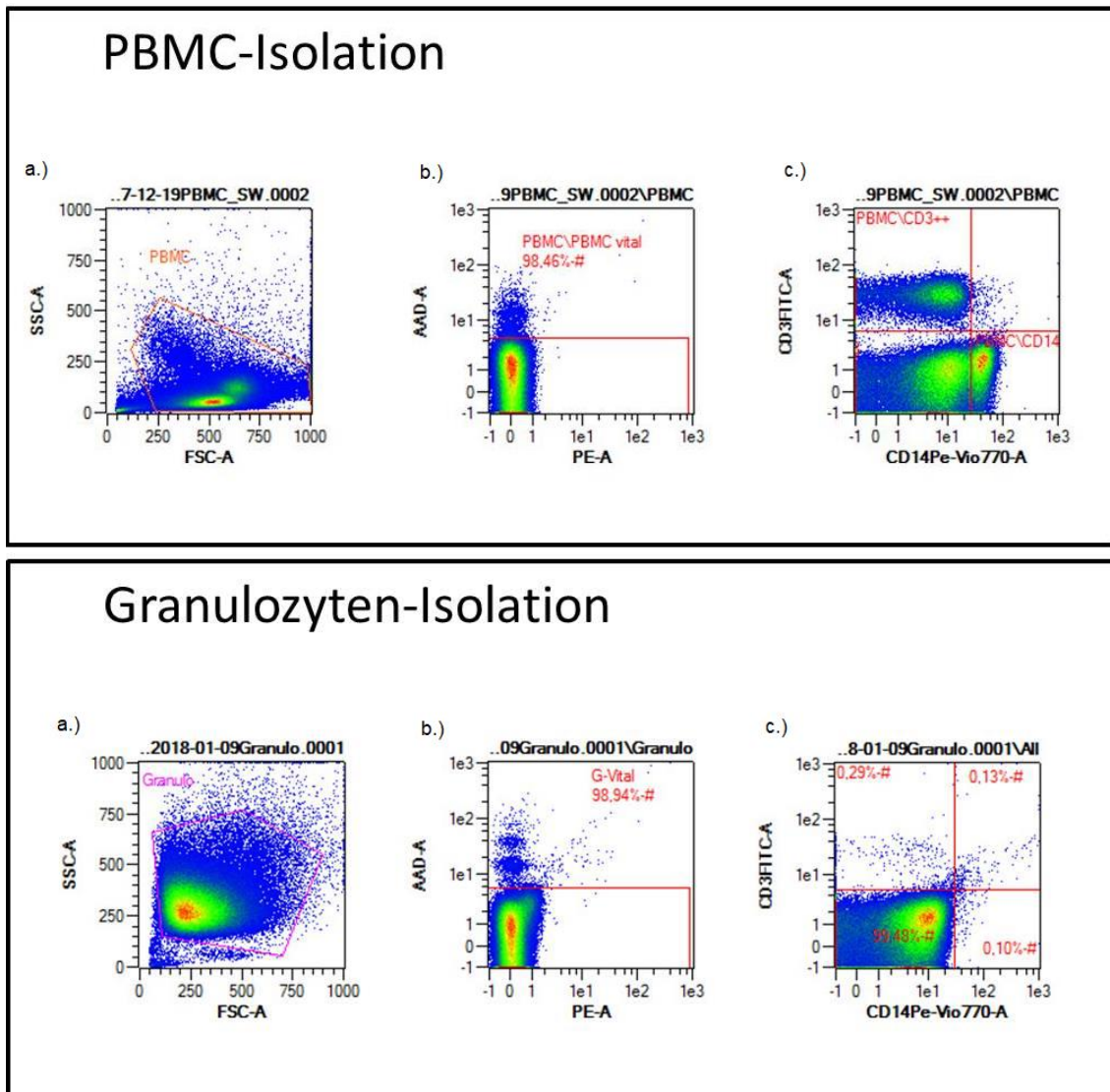


Abb 3.: Gatingstrategie - In der Abbildung wurden die Zellreihen der PBMC und der Granulozyten unterschieden; a.) Unterscheidung im FSC/SSC Dotplot; b.) Messung der Vitalität mittels 7-AAD Gehalt; c.) CD3/CD14 Expression der Zellen

ASC Expressionsanalyse von Lymphozyten, Monozyten und Granulozyten

Für die ASC Analyse in PBMC und Granulozyten bedurfte es der zuvor gemessenen Zellzahlen in der FACS-Analyse. Daraufhin wurden verschiedene Inkubationsansätze in FACS-Röhrchen vorbereitet: drei Proben für die PBMC ASC Analyse; drei für PBMC HASC Analyse (anti-ASC) und drei für die Granulozyten ASC Analyse. Für die Proben wurden jeweils 0,5 Mio. PBMC bzw. 0,2 Mio. Granulozyten mit 1 ml RPMI-Medium mit 2 % FCS inkubiert. Jeder Ansatz enthielt eine negative Kontrolle, eine Probe, die mit 1 µl LPS stimuliert wurde und jeweils eine Probe, die für ca. 4 h im Eisbad inkubierte. Die anderen Proben inkubierten für ca. 4 h bei 37 °C im Brutschrank. Nach abgelaufener Zeit erfolgte die Anfärbung der Zellen mittels Antikörpermixtur (2 µl Anti-CD15 eF450; 1 µl Anti-CD14 Pcy7; 2 µl Anti-CD16 APC). Die Proben, die zuvor mit LPS stimuliert

wurden, wurden nun nochmals mit 1 µl Nigericin (5 µg/µl) stimuliert. Die Proben inkubierten ein weiteres Mal für 45 min im Brutschrank bzw. im Eisbad und wurden anschließend zentrifugiert (300g, 5 min, mit Bremse) und der Überstand verworfen. Damit die Oberflächenfärbung in den folgenden Arbeitsschritten erhalten blieb, kam es zur Fixierung der Antikörper auf der Zelloberfläche mit 0,5 ml einer 1 % PFA-Lösung. Nach erneuter 15 minütiger Inkubation wurden die Proben mit FACS-Puffer behandelt, erneut zentrifugiert und der Überstand verworfen. Im nächsten Schritt erfolgte die Zugabe von 2 ml einer 0,1 % Saponinlösung und die Proben wurden für weitere 20 min im Dunkeln inkubiert. Die verwendete Saponinlösung führte zu einer Komplexbildung in der Zellmembran, wodurch Poren innerhalb der Membran entstanden, durch die Flüssigkeiten in die Zelle einströmen konnten. Nach erneuter Zentrifugation (500 g, 10 min, mit Bremse) wurde zu jeder Probe die entsprechende Antikörpermixtur gegeben: die Proben für die PBMC und Granulozyten ASC Analyse erhielten jeweils 45 µl FACS-Puffer; 2,5 µl Saponin 5 % und 2,5 µl ASC-AF 488. Die Proben für die PBMC HASC-Analyse wurden mit 45 µl FACS-Puffer; 2,5 µl Saponin 5 % und 2,5 µl HASC-PE behandelt. Daraufhin inkubierten die Proben für 30 min im Dunkeln und wurden anschließend mit 2 ml FACS-Puffer versetzt und zentrifugiert (500 g, 10 min, mit Bremse). Die Aufnahme des entstandenen Zellpellets erfolgte in 400 µl FACS-Puffer und die Messung wurde mittels Durchflusszytometrie durchgeführt.

ASC Expressionsanalyse von Monozyten im Durchflusszytometer

Mittels Durchflusszytometrie wurde eine ASC Expressionsanalyse von PBMC durchgeführt (siehe Abb. 4). Im ersten Schritt wurden die PBMC anhand ihrer Granularität und Größe in einem FSC/SSC Dotplot identifiziert. Anschließend konnten die Granulozyten mit Hilfe eines CD14 vs CD15 Dotplots abgegrenzt werden. Die Gesamtheit der Monozyten wurde als CD14+ASC+ definiert und nach den Klonen „clone B3“ und „clone HASC-71“ (anti-ASC) unterschieden. Jeder Klon enthält sowohl eine unstimulierte und eine stimulierte Probe (u4 und s4), als auch eine negativ Kontrolle (Co(u4) und Co(s4)).

Gating-Schema ASC-positive Monozyten

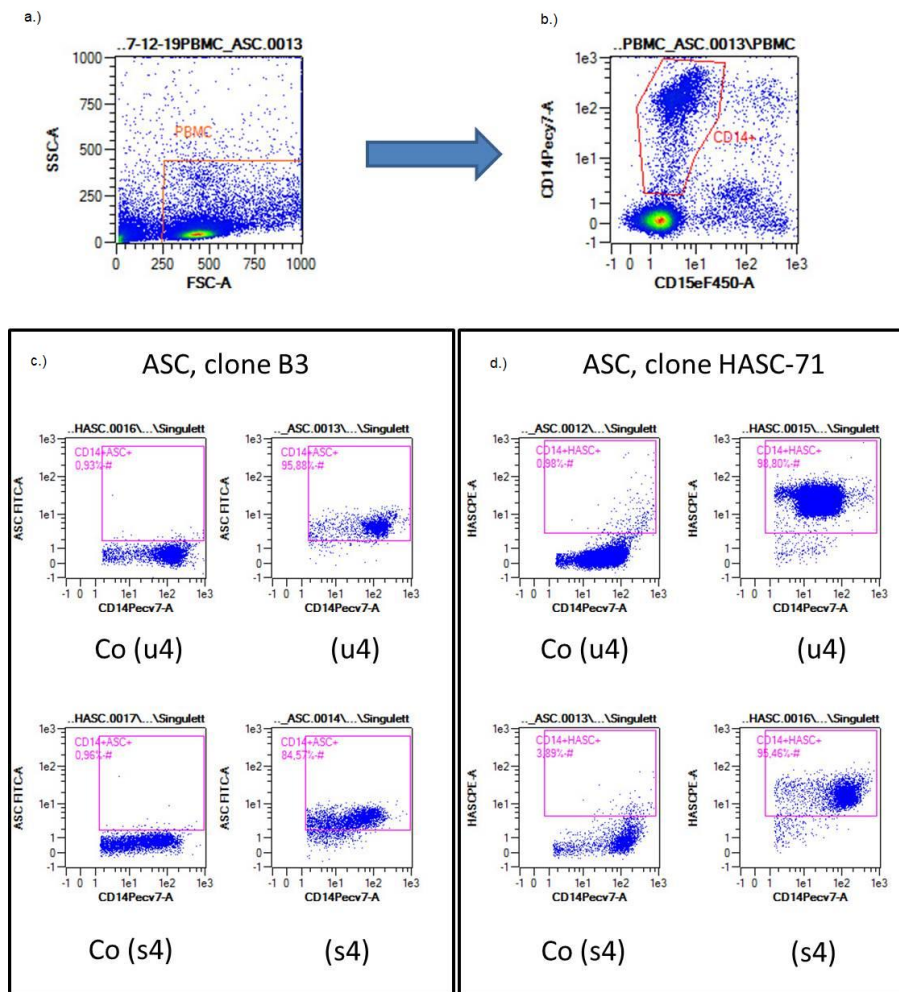


Abb.4: Gatingstrategie - Diese wurde in der Abbildung nach CD14 und ASC/ HASC aufgetrennt, dargestellt. Jeder Punkt entspricht einer Zelle. a.) PBMC; b.) CD14+ Monozyten; c.) CD14+ASC+ Monozyten unstimuliert und stimuliert; d.) CD14+HASC+ Monozyten unstimuliert und stimuliert

ASC (clone B3) Expressionsanalyse von Monozytensubgruppen im Durchflusszytometer

Die Gesamtheit der Monozyten wurde in der vorherigen durchflusszytometrischen Analyse als CD14+ASC+ definiert und mit Hilfe weiterer Dotplots konnte eine Differenzierung der Monozyten stattfinden (siehe Abb. 5 a. und b.). Hierfür wurde die Expressionsdichte der antigenen Oberflächenstruktur CD14 (LPS-Rezeptor) über der Oberflächenstruktur CD16 (FCγIII-Rezeptor) aufgetragen. In diesem Dotplot zeigte sich die Gesamtheit der Monozytenpopulation nicht mehr als homogene Masse, sondern eine Heterogenität war entstanden. Diese erlaubte eine weitere Einteilung der Monozyten in Subpopulationen. In der durchflusszytometrischen Messung wurden die

Monozytengruppen jeweils im unstimulierten und im stimulierten Zustand analysiert. Des Weiteren wurde auch eine CD14+ASC- Probe (Negativkontrolle) mitgemessen.

Die folgenden Subpopulationen konnten mittels Gatingstrategie differenziert werden:

- Hohe CD14 Expression, geringe CD16 Expression = CD14++CD16- Monozyten (Mo1) (Abb. 5 c)
- Hohe CD14 Expression, hohe CD16 Expression = CD14++CD16+ Monozyten (Mo2) (Abb. 5 d)
- Niedrige CD14 Expression, hohe CD16 Expression = CD14+CD16++ Monozyten (Mo3) (Abb. 5 e)

Gating-Schema ASC-positive Monozytensubgruppen

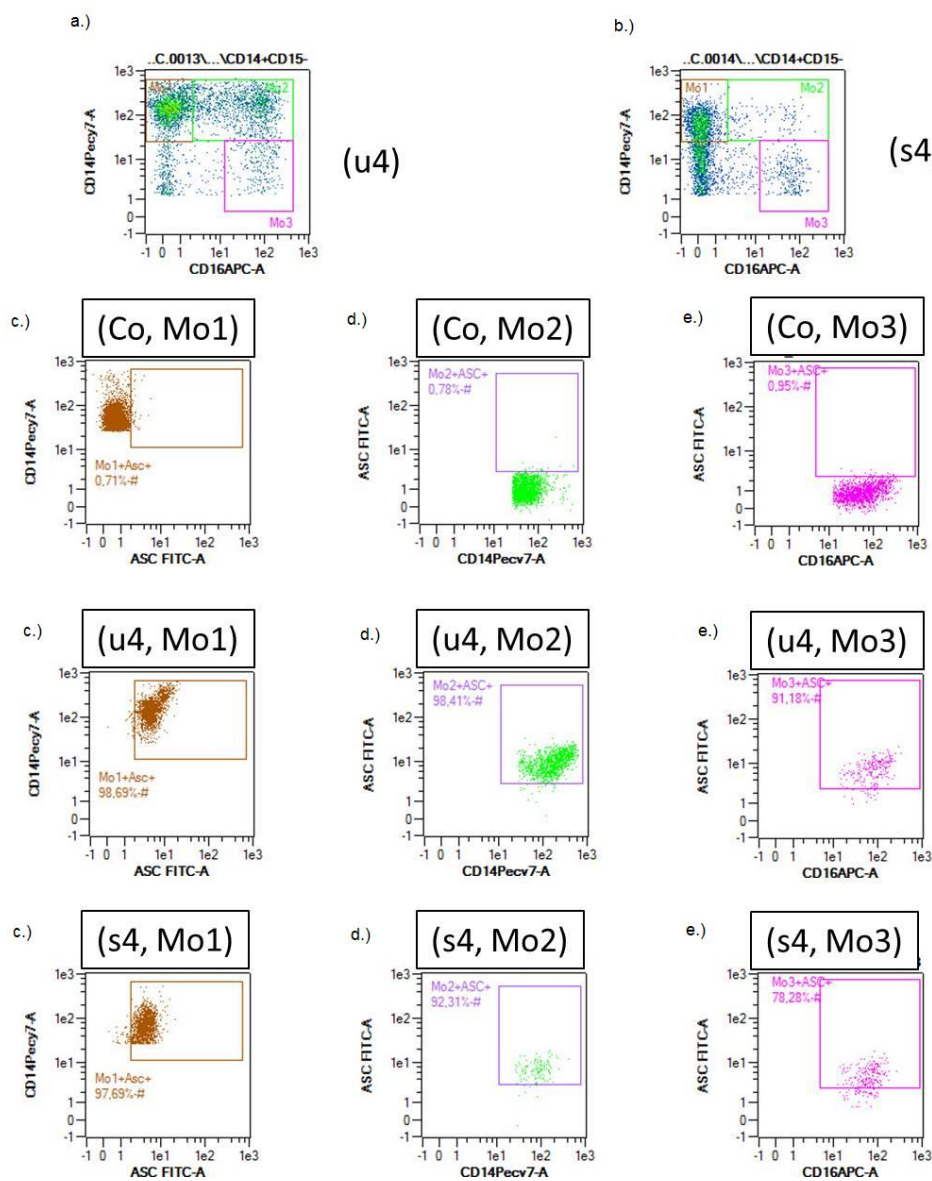


Abb.5: Gatingstrategie - Diese wurde in der Abbildung nach CD14 und ASC Expression aufgetrennt, abgebildet. Jeder Punkt stellt einen Monozyten dar. a.) Monozytensubpopulationen unstimuliert; b.) Monozytensubpopulationen stimuliert; c.) Mo1; d.) Mo2; e.) Mo3

ASC (clone B3) Expressionsanalyse von Granulozytensubgruppen im Durchflusszytometer

Im ersten Schritt der durchflusszytometrischen Analyse der Granulozyten konnten diese mittels FSC/SSC Dotplot anhand ihrer Größe und Granularität identifiziert werden (siehe Abb. 6). Anschließend erfolgte in einem CD14/CD15 Dotplot die PBMC-Exkludierung. Es fand eine Betrachtung im unstimulierten und eine im stimulierten Zustand statt.

In der weiteren Analyse konnten die Granulozyten nun anhand ihrer CD15/CD16 und ASC Expression in verschiedene Untergruppen untergliedert werden. Zuerst gab es in einem CD15/CD16 Dotplot eine Unterscheidung zwischen Eosinophilen (CD15+CD16-) und Neutrophilen Granulozyten (CD15+CD16+). Anschließend fand eine Untersuchung der beiden Zellgruppen anhand der ASC Expression statt. Die Durchflusszytometrie wurde sowohl bei unstimulierten (u4), als auch bei stimulierten (s4) Zellen durchgeführt und eine Negativkontrolle (Co) wurde ebenfalls mit analysiert.

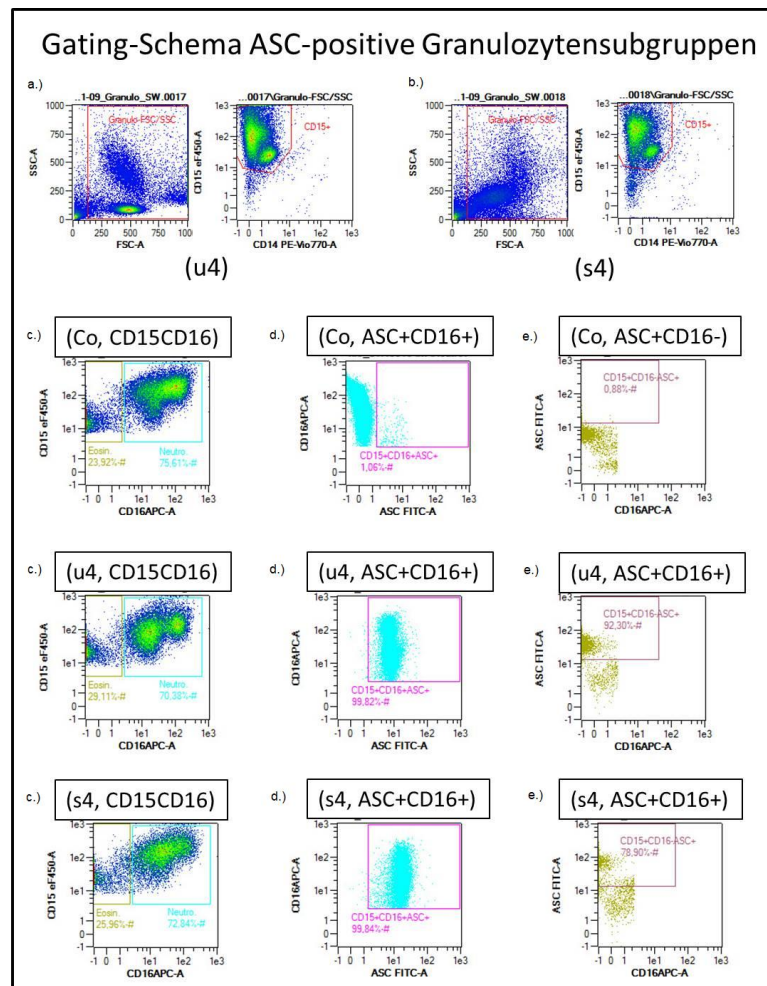


Abb.6: Gatingstrategie - In dieser Abbildung wurden die Granulozyten anhand ihrer CD15 und CD16 Expression dargestellt. a.) Gesamtheit der Granulozyten unstimuliert; b.) Gesamtheit der Granulozyten stimuliert; c.) Aufteilung der Granulozyten in Neutrophile und Eosinophile; d.) Neutrophile mit ASC Expression; e.) Eosinophile mit ASC Expression

TOFIE-Analyse inklusiver Immunfluoreszenz-mikroskopischer Darstellung

Die TOFIE-Analyse (*Time of flight inflammasome evaluation*) erfolgte durchflusszytometrisch in einem FSC-H vs FSC-A Plot. Ihr liegt nach Sester et al. 2015 die Überlegung zu Grunde, dass es bei NLRP3 Aktivierung zu einer Zusammenlagerung mehrerer ASC Molekülen kommt, die damit im Durchflusszytometer anhand ihrer größeren „Fläche“ (*area*) nachweisbar sind (Sester et al. 2015). Die Zellen wurden anschließend auch mittels Immunfluoreszenzmikroskopie analysiert. Hierzu wurden Zytospin-Präparate angefertigt.

Je 1 Mio. Zellen wurden in RPMI mit 2 % FCS für 4 h bei 37 °C inkubiert. Die Zellen wurden nach Zugabe von 2 ml PBS und anschließender Zentrifugation (300 g, 5 min) geerntet. Darauffolgend wurden sie mittels 4 % Paraformaldehyde und 4 % Sucrose für 10 min bei Raumtemperatur fixiert. Nach einem Waschschrift (2 ml PBS) wurden die Zellen mit 0,5 % BSA in PBS für 5 min blockiert, abermals gewaschen und mittels 0,05 % Triton-X-100 Lösung in PBS für 5 min bei Raumtemperatur lysiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 2 ml PBS abgestoppt. Die Zellen wurden anschließend bei 500 g für 5 min pelletiert und in 50 µl PBS + 0,2 % HSA aufgenommen. Nach Zugabe von je 3 µl ASC-PE wurden die Proben für 30 min gefärbt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 2 ml PBS und anschließender Zentrifugation (500 g, 5 min) abgestoppt. Das Pellet wurde in 50 µl PBS resuspendiert und auf einen Objektträger mit Filterkarte aufgebracht (Zentrifugieren: Zytospin bei 180 g, 10 min). Nach Abtropfen wurden die Präparate 15 min luftgetrocknet und mit einem Tropfen Fluoroshield eingedeckelt. Die Proben wurden mittels Keyence 8000 Fluoreszenz-Mikroskop (Keyence Deutschland GmbH, Neu-Isenburg, Deutschland) analysiert.

IL-1 β Analyse aus Zellkulturüberstand

Für die IL-1 β Analyse aus Zellkulturüberständen wurde der Human IL-1beta Uncoated ELISA-Kit (Invitrogen/ life technologies, Darmstadt, Deutschland) verwendet. Dieser KIT der 2. Generation enthält alle nötigen Reagenzien, Standards und Verdünnungsmittel zur Durchführung quantitativer Enzyme-Linked Immunosorbent Assays (ELISA). Mittels diesem ist es möglich, den exakten Proteinspiegel in Proben (Serum, Plasma und Zellkulturüberständen) zu messen. Weiterhin kann der ELISA die gespaltene, reife Form von der ungespaltenen pro-Form des menschlichen IL-1 β unterscheiden (Thermofischer 2018a).

Bevor der ELISA durchgeführt werden konnte, mussten die Zellkulturüberstände aus Zellproben gewonnen werden. Hierfür wurden jeweils zwei Proben - eine unstimulierte und eine stimulierte - mit je 2 Mio. PBMC und zwei Proben mit je 2 Mio. Granulozyten

mit 1 ml RPMI-Medium mit 2 % FCS versetzt. Anschließend erfolgte die Stimulation je einer PBMC- und einer Granulozyten-Probe mittels 1 µl LPS und die Inkubation aller Proben für ca. 4 h bei 37 °C im Brutschrank. Nach erfolgter Inkubationszeit wurden die stimulierten Proben mit 2 µl Nigericin angeregt und anschließend alle vier Proben zentrifugiert (300 g, 5 min, mit Bremse). Anschließend konnten die Zellkulturüberstände für den ELISA verwendet werden. Die Aufnahme der entstandenen Zellpellets erfolgte in 400 µl RNA Lysispuffer. Die Lösung wurde in 1,5 ml Eppendorf Tubes transferiert und konnte bis zur RNA Isolation bei -20 °C eingefroren werden.

Zu Beginn des ELISA-Versuchs wurden folgende Reagenzien vorbereitet. Coating Buffer wurde 1:10 in deionisiertem Wasser verdünnt. In dem entstandenen Coating Buffer konnte dann der Capture Antibody gelöst werden (1:250). Anschließend wurden 100 µl des Capture Antibody in jedes Well einer 96-Well Platte (Corning™ Costar™ 9018) pipettiert und die Platte verschlossen bei 4 °C über Nacht (24 h) inkubiert. Nach dieser Inkubationszeit wurde die Well-Platte in drei aufeinanderfolgenden Waschschritten mit 250 µl pro Well Waschpuffer gewaschen. Für den Waschpuffer wurde vorher PBS mit 0,05 % Tween versetzt. Im nächsten Schritt wurde das ELISA/ELISASPOT-Verdünnungsmittel (1:5 mit deionisiertem Wasser) hergestellt. Davon wurden in jedes Well 200 µl aufgetragen und die Platte eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die IL-1β Standards in einer zweifachen seriellen Verdünnung aufgetragen. Daran anschließend erfolgte die Übertragung von 100 µl einer jeden Proben pro Well. Als Proben dienten hier die Zellkulturüberstände von PBMC und Granulozyten, jeweils im unstimulierten und im stimulierten Zustand. Außerdem wurden noch zwei Wells, die als Blank dienten, mit 100 µl ELISA-ELISASPOT-Verdünnungsmittel gefüllt. Danach inkubierte die verschlossene Well-Platte nochmals bei 4 °C über Nacht (für 24 h). Im nächsten Schritt wurde die Platte erneut mit je 250 µl pro Well Waschpuffer in fünf Waschschritten gewaschen, um dann 100 µl Detection Antibody in die gereinigten Wells auftragen zu können. Dafür erfolgte vorher die Verdünnung des Detection Antibodys mit 1:250 ELISA/ELISASPOT-Verdünnungsmittel. Nach erneuter einstündiger Inkubation bei Raumtemperatur und fünf folgenden Waschgängen wurden 100 µl des Avidin-HRP-Konzentrats (Enzym) pro Well aufgetragen. Auch das Enzym wurde zuvor mit ELISA/ELISASPOT-Verdünnungsmittel (1:250) verdünnt. Die verschlossene Platte inkubierte nochmals für 30 min bei Raumtemperatur. Nach Ablauf der Zeit wurde die Platte nochmals gewaschen und anschließend wurde in jedes Well 100 µl der Tetramethylbenzidin (TMB)-Substrat-Lösung pipettiert. Nach weiteren 15 min Inkubationszeit wurde die Reaktion mit 50 µl Stop-Lösung (2 N H₂SO₄) abgestoppt und

die Platte bei 450 nm am Ultra Microplate Reader (BioTek Instruments, Inc., Winooski, USA) gemessen.

RNA Isolation mittels ZR RNA MINI Prep

Für die RNA Isolation wurde der ZR RNA MINI Prep (ZYMO Research, Freiburg, Deutschland) verwendet. Für diesen Versuch wurden die Proben, wie im vorhergehenden Versuch (IL-1 β aus Zellkulturüberstand) beschrieben, behandelt.

Die eingefrorenen Proben der Zellpellets wurden aufgetaut, resuspendiert und im nächsten Schritt zentrifugiert (12000 g, 20 °C, 1 min, mit Bremse). Das Lysat wurde anschließend in ein Zymo-Spin TM IIC Column mit Collection Tube überführt, zentrifugiert und 800 μ l einer 100 % Ethanollösung zu dem Durchfluss gegeben, um so die Hydrathülle der DNA aufzulösen. 600 μ l des Mixes wurden in ein Zymo-Spin TM IIC Column mit Collection Tube pipettiert, zentrifugiert und daran anschließend die restlichen 600 μ l des Mixes in das gleiche Column überführt. Nach erneuter Zentrifugation (12000 g, 1 min, mit Bremse) wurde der entstandene Durchfluss verworfen und 400 μ l RNA Pep Buffer zu den Proben gegeben. Nun erfolgten zwei Waschschriffe mittels 800 μ l RNA Wasch Buffer. Um das Zymo-Spin TM IIC Column komplett zu entleeren, bedurfte es zwei weiterer Zentrifugationsschritte (12000, 2 min, mit Bremse). Anschließend fand die Platzierung des IIC Columns in ein RNA/ DNase freies Tube statt und 30 μ l DNA/ RNAse freies Wasser wurden auf die Column Membran aufgetragen. Eine nochmalige Zentrifugation bedurfte es, um die RNA aus dem Column zu eluieren. Die isolierte RNA konnte im Anschluss daran am Tecan Infinite M200 Pro Nanoquant Thermoblock (Tecan Trading AG, Männedorf, Schweiz) gemessen oder bis zur Weiterverarbeitung bei -80 °C gelagert werden.

RNA Isolation mittels TEMPUS Spin

Den Studienteilnehmern wurde für die RNA Isolation Blut mittels Tempus™ Blood RNA Tube (Invitrogen/life technologies, Darmstadt, Deutschland) abgenommen. Das Tempus™ Blood RNA System dient der Stabilisierung und Isolierung der zellulären RNA aus Vollblut. Durch die Stabilisierung der RNA mittels Stabilisierungsreagenz kann eine Genexpression analysiert werden. Wenn das Blut sich mit dieser Reagenz vermischt, tritt sofort die Lyse ein. Ein weiterer Effekt der Reagenz ist, dass die zelluläre RNAse inaktiviert wird und eine Selektion vorgenommen wird - so verbleiben DNA und Proteine in der Lösung, während die RNA ausfällt (Thermofischer 2018b).

Die Patientenproben wurden nach Abnahme invertiert und anschließend bei Raumtemperatur für 2 h gelagert, um eine ausreichende Lyse der Blutzellen

sicherzustellen. Daraufhin konnten sie für einen Tag bei 4 °C und anschließend aufrecht stehend bei -20 °C bis zur Weiterverarbeitung eingefroren werden.

Für die Weiterverwendung des Tempus Tubes war es von Nöten, dieses bei Raumtemperatur über eine gewisse Zeit aufzutauen. Im ersten Schritt der RNA Isolation musste die Probe aufgereinigt werden. Hierfür wurden ca. 3 ml PBS-Buffer zur Probe gegeben und anschließend zentrifugiert (2443 g, 30 min). Der Überstand wurde verworfen und das entstandene Zellpellet mit einem RNA Resuspensions Buffer versetzt und mittels Vortex-Mixer gelöst.

Im zweiten Schritt der Isolation wurde die Probe in ein Collection-Tube mit Filter überführt, welcher vorher mit 100 µl RNA Purification Wasch Solution¹ benetzt wurde. Anschließend erfolgten mehrere Waschschrte mit RNA Purification Wash Solution 1 und 2. Nach jedem durchgeführten Waschschrte fand eine Zentrifugation der Lösung (16000 g, 1 min) statt und der entstandene Überstand wurde aus dem Tube verworfen. Ein folgender Zentrifugationsschrte (16000 g, 1 min) sorgte für das Trocknen der Membran. Daraufhin kam es zur Zugabe von 100 µl einer Nucleic Acid Purification Elution Solution auf den Filter, welcher für 2 min bei 70 °C im Thermoblock inkubiert wurde. Ein abschließender Zentrifugationsschrte diente der RNA Eluierung.

Die entstandene RNA Lösung wurde in ein neues 1,5 ml Eppendorf Tube transferiert, um mögliche Verunreinigungen zu vermeiden. Bis zum weiteren Gebrauch wurde die Probe auf Eis gelagert oder für eine spätere Verarbeitung bei -80 °C eingefroren.

RNA Konzentrationsmessung

Zur Ermittlung der RNA Konzentration und Reinheit wurde eine Infinite NanoQuant Plate und ein Infinite M200 PRO NanoQuant Reader sowie die i-control-Microplate Reader Software der Firma Tecan (Tecan Trading AG, Männedorf, Schweiz) verwendet. Die Messung einer jeden RNA Probe erfolgte als Doppelbestimmung mittels Absorptionsspektrometrie. Das Absorptionsmaximum von RNA befindet sich bei 260 nm, das von Proteinen bei 280 nm. Die Reinheit der RNA kann über den Quotienten OD₂₆₀ (optische Dichte) und OD₂₈₀ errechnet werden (Caprez et al. 2018). Der Quotient liegt idealerweise zwischen 1,8 und 2,0. In die Studie wurden nur Proben miteinbezogen, die in diesem Bereich gemessen wurden.

Auf die Pipettierfelder der Infinite NanoQuant Plate wurden zur Eichung zuallererst je 2 µl Elution Solution pipettiert. Anschließend wurde die Lösung entfernt und die Felder mit je 2 µl der zu messenden RNA Probe belegt. Nach abgeschlossener

Konzentrationsbestimmung wurden die RNA Proben bis zur Weiterverarbeitung bei -80 °C gelagert.

cDNA Synthese

In einem weiteren Versuch wurde die zuvor isolierte und gemessene RNA in cDNA umgewandelt. Hierfür fand eine Umschreibung von jeweils 300 ng RNA (RNA aus dem Tempus Spin) und je 100 ng RNA (RNA aus ZR RNA MINI Prep) mittels High Capacity cDNA Reverse Transkription Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) in cDNA statt.

Für diese Umschreibung in cDNA wurde ein Mastermix hergestellt. Hierfür wurde die entsprechende RNA Menge von 300 ng bzw. 100 ng mit 1 µl oligo dT primer und 1 µl Random hexamer versetzt. Anschließend erfolgte die Inkubation der Proben bei 42 °C für 10 min. Für diesen Schritt fand der Thermocycler PCR Express (Thermo Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland) Verwendung. Nach Ablauf dieser Inkubationszeit wurden folgende Substanzen zu der RNA hinzugefügt: 2 µl 10x FastGene® Scriptase Basic buffer; 2 µl dNTP mixture (10 mM); 1 µl FastGene® Scriptase Basic (200 units) und 0,5 µl Rnase Inhibitor. Das Gesamtvolumen einer Probe sollte 20 µl betragen, wenn dieses nicht erreicht wurde, wurde das fehlende Volumen durch Nuklease-freies Wasser ersetzt. Anschließend inkubierten die Proben erneut bei 42 °C für 60 min, danach bei 90 °C für 5 min. Nach dieser Zeit wurden die Proben auf 4 °C heruntergekühlt bis zur Weiterverarbeitung. Wenn diese nicht am selben Tag erfolgte, erfolgte die Einfrierung der Proben bei -20 °C.

quantitative Real-time PCR (RT-PCR)

Die RT-PCR stellt ein Verfahren dar, welches der Amplifikation von Nukleinsäuren dient. Das Prinzip beruht auf der herkömmlichen PCR und einer weiteren Quantifizierung der aus der RNA transkribierten DNA. Das Grundprinzip geht auf K.Mullis von 1986 zurück:

Im ersten Schritt der PCR werden die doppelsträngigen cDNA-Stränge mittels Denaturierung bei 95 °C aufgespalten, sodass zwei Einzelstrang-DNA-Matrizen entstehen. Nach Absenkung der Temperatur auf 60 °C lagern sich die dazugegebenen synthetischen Oligonukleotid - Primer am 3'-Ende an (Annealing). Diese Primer markieren den Startpunkt für die Polymerisation. Anschließend wird die Temperatur auf ein Arbeitsoptimum von 72 °C für die Taq-Polymerase erneut erhöht. Die thermostabile Taq-Polymerase beginnt nun mit der Synthese der komplementären DNA-Stränge vom angelagerten Primer aus. Das Ergebnis der PCR ist eine neu entstandene DNA, die exakt der ursprünglichen Template-DNA entspricht. Die beschriebenen Reaktionsschritte werden zyklisch wiederholt und somit die DNA-Matrize exponentiell

amplifiziert. Die Amplifizierung erfolgt an beiden cDNA-Strängen. Somit kommt es im ersten Elongationsschritt zu einer Verdopplung der DNA-Menge und nach Zyklus-Wiederholung zu einer Vervierfachung, usw. (Mullis et al. 1986). Bei der quantitativen RT-PCR kommt es zu einer Quantifizierung der Genprodukte, die mittels Fluoreszenzmessungen während eines PCR-Zyklus in Echtzeit durchgeführt wird. Hierfür werden sogenannte FRET-Sonden (Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer) während der RT-PCR eingesetzt. FRET bedeutet, dass ein Donor-Fluorchrom (Reporter) - durch eine Lichtquelle stimuliert - einen Energieteil an ein Akzeptor-Fluorchrom weiterleitet. Donor- und Akzeptor- Fluorchrom müssen sich hierfür in hinreichender Nähe zueinander befinden. Somit wird die Sonde an einem Ende mit einem Akzeptor-, am anderen Ende mit einem Reporter-Fluoreszenzfarbstoff markiert. Die verwendete Taq-Polymerase besitzt eine Polymeraseaktivität und eine 5'3'-Exonuklease-Aktivität. Gleichzeitig zu der Gegenstrangsynthese baut sie die Sonden ab. Dadurch entfernen sich Akzeptor und Reporter zunehmend voneinander, was eine geringere Energieabgabe an den Akzeptor zur Folge hat. Dies hat wiederum in jedem Zyklus die Folge, dass am Elongationsende die zunehmende Reporter-Fluoreszenz gemessen wird (Bernard und Wittwer 2000).

Für den Versuch wurden je 1 µl cDNA und je 9 µl einer FRET-Sonde auf eine 96 Well PCR-Platte aufgetragen. Folgende Sonden wurden für diesen Versuch verwendet: ACTB (β-Aktin); RPL37a; Pycard (ASC); NLRP3; Caspase 1 und IL-1β. Anschließend wurde die Platte mit Hilfe eines Thermal Sealing Films verschlossen und zentrifugiert und daraufhin mittels StepOne Plus (life technologies) gemessen. Die Messung erfolgte in Doppelwerten und sowohl eine Negativ-Kontrolle, als auch eine interne Kontrolle wurden auf jeder 96 Well Platte mit aufgetragen. Die RT-PCR lief unter folgenden Bedingungen im Fast Modus: 95 °C/ 10 min und 40x (95 °C/ 10 sek; 60 °C/ 1 min) und die Auswertung erfolgte mittels DataAssist™ Software Version 3.0 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA).

Für eine relative Quantifizierung wurden die Housekeeping Gene β-Aktin und RPL37a als endogener Standard verwendet. Daraus ergab sich der ΔCt (cycle treshold)-Wert wie folgt:

$$\Delta Ct_{Zielgen} = Ct_{Zielgen} - Ct_{Housekeepinggen} (Mean)$$

Die ΔCt -Werte der einzelnen Gene und Monozytengruppen wurden auf eine interne Kontrolle normiert. Daraus wurde ein Relatives Vielfaches der Gen-Expression errechnet:

$$RQ_{Zielgen} = \frac{2^{-\Delta Ct_{Zielgen}}}{2^{-\Delta Ct_{interne\ Kontrolle}}}$$

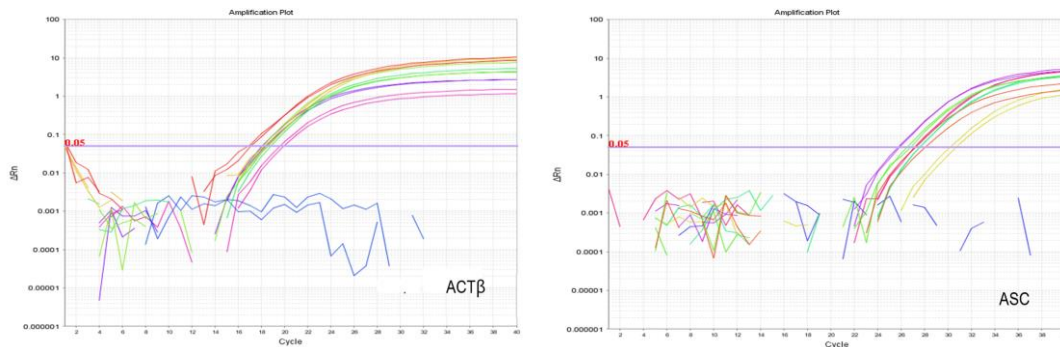


Abb.7: Logarithmierte Darstellung der Fluoreszenzsignale der RT-PCR für β -Aktin und ASC mit Treshold

Der Treshold (siehe Abb. 7 die blaue Linie) wurde für die Zielgene β -Aktin und ASC bei 0,05 festgesetzt. Die Zyklanzahl, in welcher das Fluoreszenzsignal die Treshold-Linie passierte, wurde als Ct-Wert festgelegt.

3.2.3 Statistische Methoden

Die in der Arbeit angegebenen Ergebnisse sind, wenn nichts Anderes angegeben ist, als Mittelwert \pm Standardabweichung (SD) ausgedrückt. Um wesentliche Unterschiede in klinischen und demografischen Merkmalen zu bewerten, wurde der gepaarte T-Test (bei gepaarten Ergebnissen) oder der Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test (bei nicht gepaarten Ergebnissen) durchgeführt. Die statistische Auswertung und Erstellung der Diagramme erfolgte mit der Software SPSS 21.0 (SPSS Inc., Chicago, USA) und GraphPad Prism 6.0 Statistik-Software (GraphPad Software Inc., La Jolla, USA). Alle Werte, die innerhalb des Signifikanzniveaus von 5 % ($p < 0,05$) lagen, wurden als statistisch signifikant eingestuft und mit einem Stern markiert.

4 Ergebnisse

4.1 Eigenschaften der Studiengruppen

Die gesammelten Daten über klinische, laborchemische und immunphänotypische Charakteristika der untersuchten Patientenkollektive wurden für eine bessere Darstellung in Tabelle 1 zusammengefasst. Insgesamt nahmen 30 Probanden an der Studie teil, davon 15 chronisch nierenkranke Patienten der Stufe 5 (HD-Patienten) sowie 15 nierengesunde Kontrollprobanden (BP-Patienten). Die Gruppe der Kontrollpersonen setzte sich aus nierengesunden Hypertoniepatienten, die sich entweder zur Hypertoniebehandlung auf den Stationen der KIM II und III oder zur regelmäßigen ambulanten Hypertonieberatung im UKH befanden, zusammen.

4.2 Unterschiede zwischen den Studiengruppen

In der Tabelle 1 wurden die Studienkollektive HD- und BP- Patienten anhand verschiedener Parameter miteinander verglichen.

Bei der näheren Betrachtung der Monozytensubpopulationen wurde kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Patientenkollektiven deutlich. Hingegen zeigten sich die Eosinophilen (CD15+CD16-) signifikant erhöht in der HD-Gruppe ($p= 0.035$). Bei den Neutrophilen (CD15+CD16+) ließ sich ein solcher Effekt nicht erkennen ($p= 0.5416$). Bei der Analyse der eingenommenen Medikamente beider Gruppen fielen signifikante Unterschiede, bei Beta-Blockern ($p= 0.005$), Diuretika ($p= 0.035$) und Vitamin D ($p= 0.001$) auf.

Tabelle 1: Vergleich CKD5-Gruppe mit der Kontrollgruppe

Charakteristika	CKD5-D HD (N=15)	Kontrollen BP (N=15)	Statistik
Alter	59,7±13,9	60,0±10,6	0,807
Geschlecht (% weiblich)	46,7	46,7	1,000
Diabetes (%)	13,3	13,3	1,000
Hypertonie (%)	100	100	1,000
Schlaganfall (%)	0	6,7	1,000
KHK (%)	0	6,7	1,000
pAVK (%)	0	0	1,000
Raucher (%)	60,0	33,3	0,273
BMI (kg/m ²)	26,8±5,4	30,3±5,6	0,122
CRP (mg/l)	6,8±13,0	2,1±1,4	0,311
Harnstoff (mmol/l)	22,4±5,4	4,7±0,9	0,001
Kreatinin (µmol/l)	873,6±241,9	80,8±11,8	0,001
Hämoglobin (mmol/l)	7,1±0,5	8,6±1,1	0,001
Hämatokrit (l/l)	0,3±0,02	0,4±0,05	0,001
Calcium (mmol/l)	1,5±0,5	2,4±0,09	0,001
Natrium (mmol/l)	139,4±3,4	141,8±2,9	0,014
Kalium (mmol/l)	5,1±0,6	4,0±0,5	0,001
Leukozyten (G/µl)	6,6±2,3	6,0±1,9	0,511
Mo1+ASC+ (%)	89,2±11,2	96,3±4,1	0,083
Mo2+ASC+ (%)	93,5±5,2	96,7±3,4	0,080
Mo3+ASC+ (%)	97,0±2,4	96,1±4,3	0,787
Eosinophile (%)	89,4±8,3	79,1±9,8	0,035
Neutrophile (%)	97,2±2,8	97,1±6,4	0,542
ACE-Hemmer (%)	6,7	6,7	1,000
ARB (%)	66,7	60,0	1,000
Statine (%)	26,7	33,3	1,000
ASS (%)	33,3	26,7	1,000
Beta-Blocker (%)	93,3	40,0	0,005
Diuretika (%)	46,7	6,7	0,035
Ca-Kanal-Blocker (%)	33,3	46,7	0,710
Vitamin D (%)	100,0	0	0,001

4.3 ASC Expression in leukozytären Zellen

Im Folgenden wurde die ASC Expression in den verschiedenen leukozytären Zellen - PBMC, Granulozyten und deren Subpopulationen - von Hämodialysepatienten bestimmt. Alle gewonnenen Ergebnisse wurden mit denen des Kontrollkollektives (nierengesunde Hypertoniepatienten) verglichen. Die Betrachtung erfolgte unter unstimulierten Bedingungen sofort und nach vierstündiger Inkubation und unter stimulierten Bedingungen nach vierstündiger Inkubation. Stimuliert wurden die Zellen mittels LPS und Nigericin, um so eine optimale Stimulation des Inflammasomkomplexes zu gewährleisten.

Die ASC Expression wurde zum einen als Frequenz (Anzahl der positiven Zellen) und zum anderen als mittlere Fluoreszenzintensität (MFI, *mean fluorescence intensity*) angegeben. Diese ist ein Maß für die Menge gebundenen Fluoreszenzfarbstoffes pro Partikel. Die dargestellten Boxplots zeigen den Mittelwert \pm Standardabweichung (SD).

4.3.1 ASC Expression in Monozyten

Innerhalb der isolierten PBMC wurde die Zellpopulation der Monozyten durchflusszytometrisch als CD14+ detektiert. Bei der Betrachtung der Monozyten in beiden Patientengruppen in Tabelle 2 zeigt sich kein signifikanter Unterschied, es wurde nahezu die gleiche Anzahl an Zellen isoliert ($p= 0.324$). Ebenso verhält es sich mit der Vitalität der Zellen, die in beiden Gruppen bei ca. 99% lag.

Tabelle 2: PBMC - Isolationsvalidierung

	CKD5-D (HD)	Kontrollen (BP)	Statistik
Anzahl isolierter PBMC (Mio/ 27 ml VB)	38,33 \pm 18,19	32,45 \pm 9,27	0,324
CD14+ Monozyten an PBMC (Mio)	6,79 \pm 2,99	5,76 \pm 2,31	0,365
Vitalität PBMC (%)	99,54 \pm 0.3	99,76 \pm 0.31	0,105

ASC Frequenz und Expressionsdichte der Monozyten

Wie in der Abb. 8 dargestellt, ist unter unstimulierten Bedingungen (uP(T0)) die Frequenz der Monozyten, die ASC exprimieren, bei HD- und BP-Patienten nahezu gleich (a.). Nach erfolgter Inkubation (uP (T4)) lässt sich eine beginnende Reduktion der ASC Frequenz erkennen, die durch eine Stimulation der Zellen noch verstärkt wird (sP (T4)). Aber es ist klar ersichtlich, dass die BP-Patienten unter stimulatorischen Bedingungen (sP (T4)) eine signifikant höhere CD14+ASC+Frequenz aufweisen.

Bei der Betrachtung der mittleren Expressionsdichte pro Zelle (MFI) wird deutlich, dass die HD-Patienten unter allen Bedingungen durchgängig signifikant niedrigere Werte im Vergleich zu BP-Patienten aufweisen (b.). Des Weiteren fällt auf, dass es generell unter Stimulation zu einer Downregulation der ASC Expression kommt (HD (uP (T4)): $4,4 \pm 0,4$ vs HD (sP (T4)): $3,9 \pm 0,4$, ($p < 0,001$); BP (uP (T4)): $5,4 \pm 1,6$ vs BP (sP (T4)): $4,7 \pm 1,5$, ($p < 0,05$)).

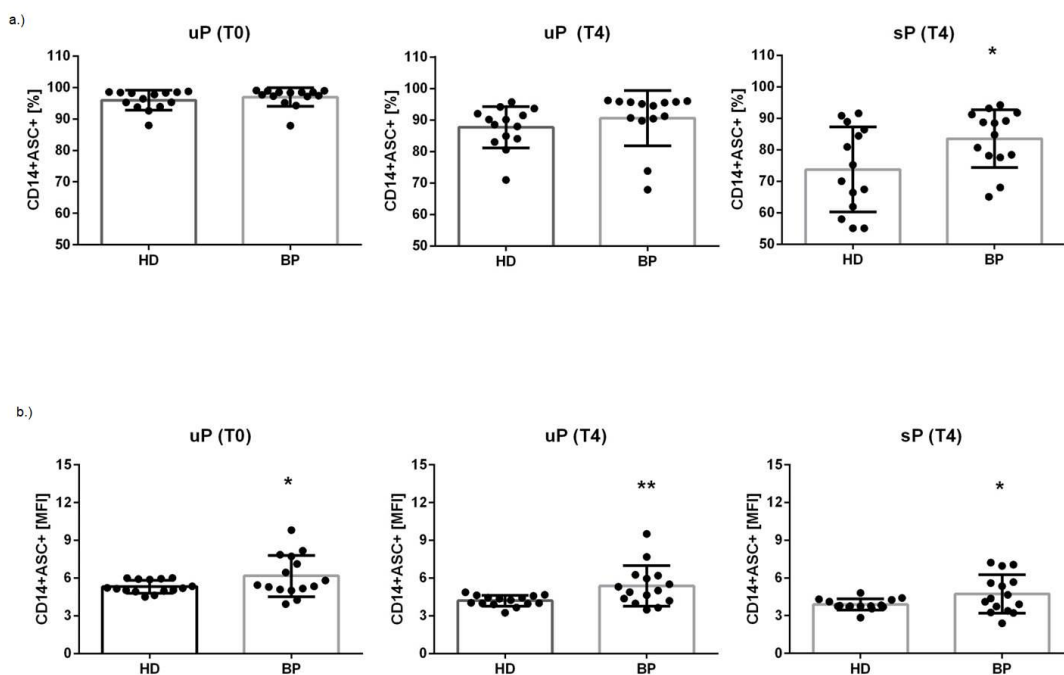


Abb. 8: a.) ASC Frequenz (%) und b.) ASC Expressionsdichte pro Zelle (MFI) in der Monozyten-Gesamtpopulation, im Vergleich HD- zu BP-Patienten, unter unstimulierten Bedingungen (uP (T0)), unter unstimulierten Bedingungen nach vierstündiger Inkubationszeit (uP (T4)) und unter stimulierten Bedingungen nach vierstündiger Inkubationszeit (sP (T4))

TOFIE der Monozyten

In Abb. 9 ist die Inflammasomaktivierung in Form von ASC Aggregatbildung mittels dargestellt. Bei BP- im Vergleich zu HD-Patienten ist eine signifikant höhere ASC Aggregatbildung unter basalen wie stimulatorischen Bedingungen nachweisbar. Die

Inflammasomaktivierung in Form von ASC Aggregaten steigt in beiden Gruppen unter Stimulation nicht an (HD (uP (T4)): $0,04 \pm 0,05$ vs HD (sP(T4)): $0,05 \pm 0,09$, ($p < 0,875$); BP (uP (T4)): $0,36 \pm 0,68$ vs BP (sp(T4)): $0,21 \pm 0,32$, ($p < 0,932$)).

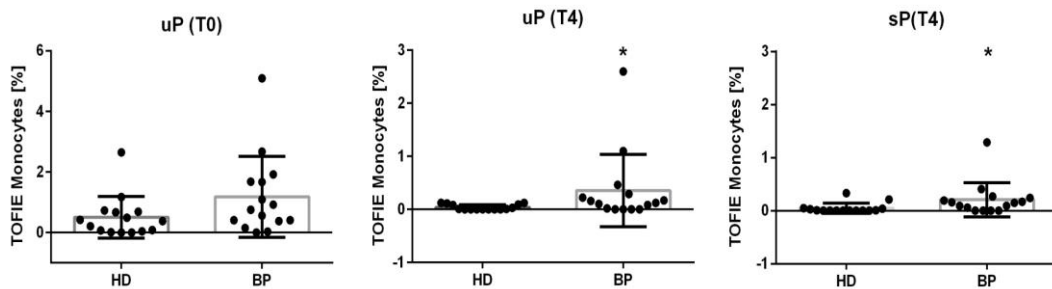
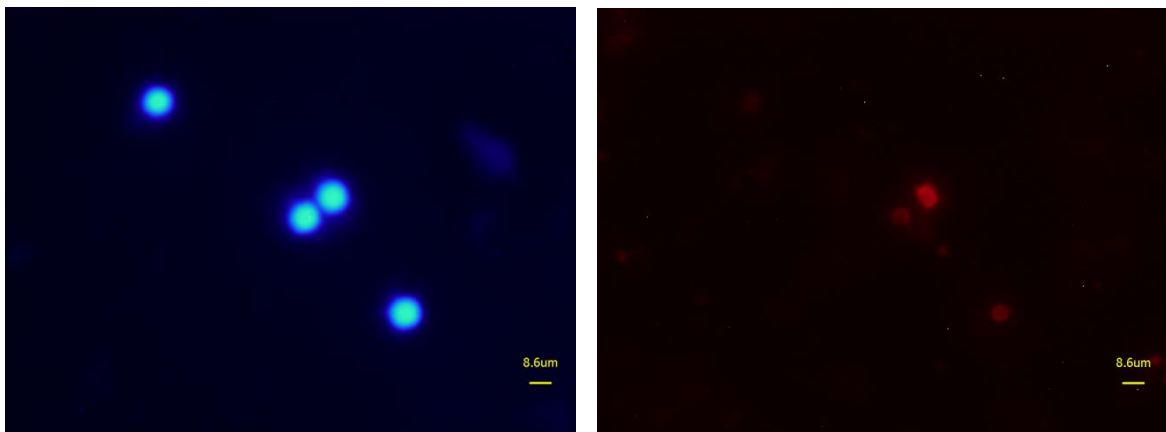


Abb. 9: Frequenz (%) TOFIE-positiver Monozyten, vergleichende Darstellung von HD- und BP-Patienten, unter unstimulierten (uP (T₀), uP (T₄)) und stimulierten (sP (T₄)) Bedingungen

Immunfluoreszenzmikroskopie zum Nachweis der ASC Expression

Zur besseren Darstellung des ASC Adapter-Proteins in Monozyten eines HD-Patienten wurden unter unstimulierten Bedingungen Zytospinpräparate angefertigt. In Abb. 10 sind in Fluoroshield eingebettete Monozyten (a.) und ihre ASC Expression (b.) von einem HD-Patienten exemplarisch dargestellt. Unterschiede in den Präparaten von HD- und BP-Patienten waren nicht ersichtlich.



a.) DAPI

b.) ASC

Abb. 10: Darstellung der ASC Expression in Monozyten von Hämodialysepatienten mittels Zytospinpräparat: a.) Anfärbung von Monozyten mittels DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol); b.) ASC Expression der Monozyten

4.3.2 ASC Expression in den Monozyten-Subgruppen

Die Monozyten-Gesamtpopulation wurde anhand der zellulären Oberflächenexpression von CD14 und CD16 in verschiedene Subpopulationen unterteilt. Die daraus entstandenen drei Subpopulationen wurden als Mo1, Mo2 und Mo3 bezeichnet. Vergleicht man die ASC Expressionsstärke pro Zelle der einzelnen Subgruppen, so ragt Mo2 mit der höchsten Expressionsdichte sowohl bei HD- als auch BP-Patienten heraus (HD- Mo1: $5,5 \pm 0,4$ vs Mo2: $10,0 \pm 3,0$ vs Mo3: $7,8 \pm 1,4$, ($p < 0,001$); BP- Mo1: $6,0 \pm 1,3$ vs Mo2: $11,2 \pm 2,8$ vs Mo3: $8,1 \pm 2,0$, ($p < 0,001$)).

Die Analyse des ASC Moleküls bei Mo1 (CD14⁺⁺CD16⁻) zeigt, dass HD-Patienten im Vergleich zu den BP-Patienten im Durchschnitt signifikant geringere Werte aufweisen - sowohl bei der Frequenz (Abb. 11a.) als auch bei der Expressionsdichte pro Zelle (Abb. 11b.). Beiden betrachteten Patientenkollektiven ist gemeinsam, dass es zu einer geringgradigen Downregulation der ASC Expression bei Stimulation kommt.

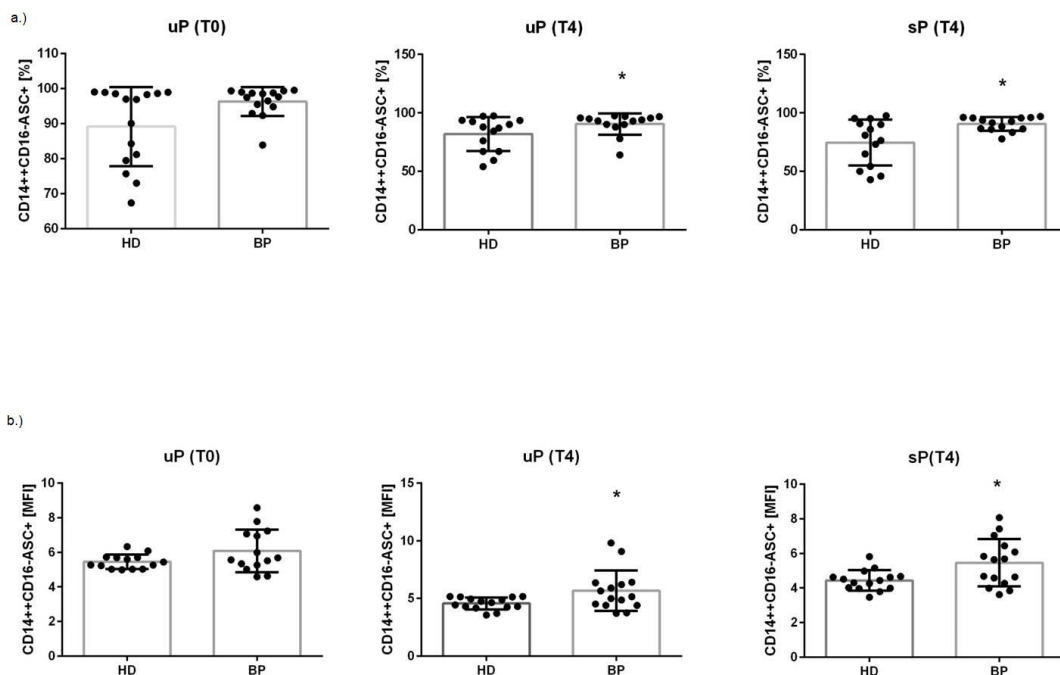


Abb. 11: a.) ASC Frequenz (%) und b.) ASC Expressionsdichte pro Zelle (MFI) in der Monozyten-Subgruppe Mo1 - CD14⁺⁺CD16⁻, im Vergleich HD- zu BP-Patienten, unter unstimulierten (uP (T0); uP (T4)) und stimulierten (sP (T4)) Bedingungen

Innerhalb der Subpopulation Mo2 (CD14⁺⁺CD16⁺) lässt sich ein ähnlicher Effekt, wie bei Mo1 feststellen (Abb.12). So weisen auch hier die HD-Patienten eine signifikant geringere ASC Expression bei der Frequenz (12a.) und bei der Expressionsdichte (12b.) unter allen Bedingungen im Vergleich zu BP-Patienten auf. Hierbei zeigt sich ebenso eine Downregulation der ASC Expression in beiden Kollektiven bei Stimulation.

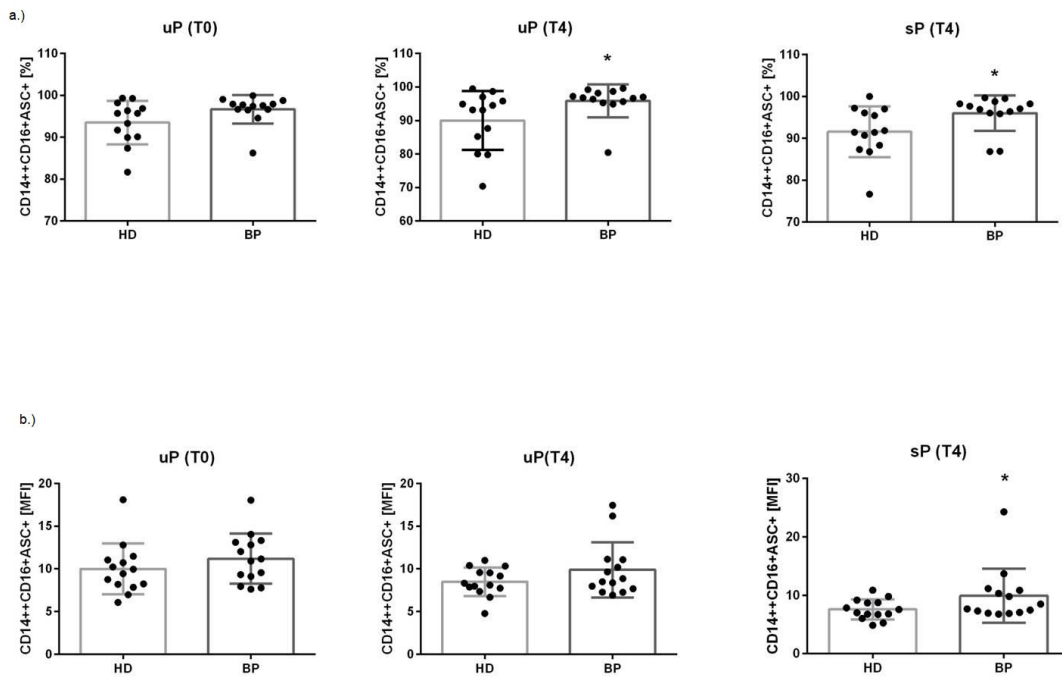


Abb. 12: a.) ASC Frequenz (%) und b.) ASC Expressionsdichte pro Zelle (MFI) in der Monozyten-Subgruppe Mo2 - CD14⁺⁺CD16⁺, im Vergleich HD- zu BP-Patienten, unter unstimulierten (uP (T0), uP (T4)) und stimulierten (sP (T4)) Bedingungen

Zu der dritten Subpopulation Mo3 werden all diejenigen Monozyten gezählt, die CD14⁺CD16⁺⁺ sind (Abb. 13). Unter unstimulierten Bedingungen (uP (T0), uP (T4)) zeigen beide Gruppen nahezu gleiche Werte für die Frequenz (a.) und für die Fluoreszenzintensität (b.).

Nach Stimulation der Mo3-Zellen weisen auch hier wieder die BP-Patienten eine höhere ASC Expression auf. Wie in den anderen Subpopulationen kommt es bei der Mo3-Gruppe zu einer ASC Downregulation innerhalb der beiden Patientengruppen nach erfolgter Stimulation.

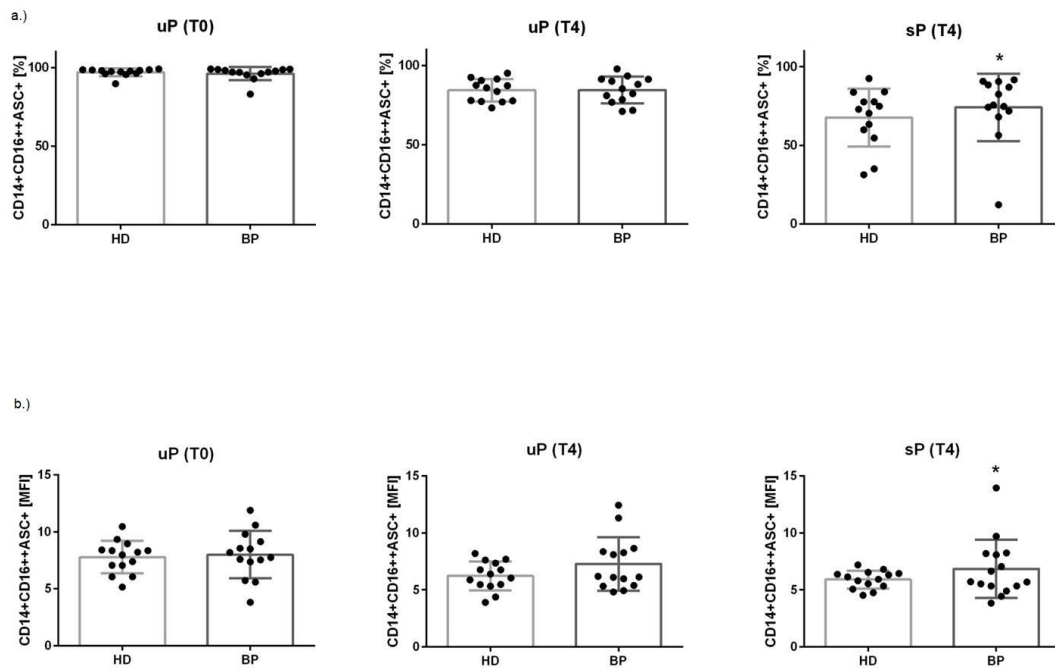


Abb. 13: a.) ASC Frequenz (%) und b.) ASC Expressionsdichte pro Zelle (MFI) in der Monozyten-Subgruppe Mo3 - CD14+CD16++, im Vergleich HD- zu BP-Patienten, unter unstimulierten (uP (T0), uP (T4)) und stimulierten (sP (T4)) Bedingungen

4.3.3 ASC Expression in Granulozyten

Die Population granulozytärer Zellen wurde durchflusszytometrisch als CD15+CD14-CD3- detektiert. Die Anzahl isolierter Granulozyten innerhalb der beiden Patientenkollektive ist nicht signifikant unterschiedlich ($p=0.77$). Gleichermäßen verhält es sich mit der Vitalität der isolierten Zellen ($p=0.1085$) (Tabelle 3).

Tabelle 3: Granulozyten - Isolationsvalidierung

CD15+	CKD5-D (HD)	Kontrollen (BP)	Statistik
Anzahl isolierter Zellen (Mio/27ml)	30,8±20,84	28,82±12,9	0,77
Vitalität (%)	98,35±1,63	97,03±3,25	0,1085

ASC Frequenz und Expressionsdichte der Granulozyten

Die Frequenz ASC positiver Granulozyten ist unter basalen (uP (T0), uP (T4)) wie unter stimulatorischen Bedingungen (sP (T4)) in beiden Patientenkollektiven nahezu gleich und liegt bei fast 100 Prozent (Abb. 14a.). Jedoch zeigen die Granulozyten der

nierengesunden Hypertoniepatienten eine signifikant höhere ASC Expressionsdichte pro Zelle (Abb. 14b.). Auffällig ist, dass beide Patientenkollektive mit einer ASC Hochregulation auf eine Stimulation reagieren (HD (uG (T4)): 5,3 vs HD (sG (T4)): 11,0±2,2, ($p < 0,047$); BP (uG (T4)): 7,6±4,3 vs BP (sG (T4)): 15,4±4,9, ($p < 0,012$)).

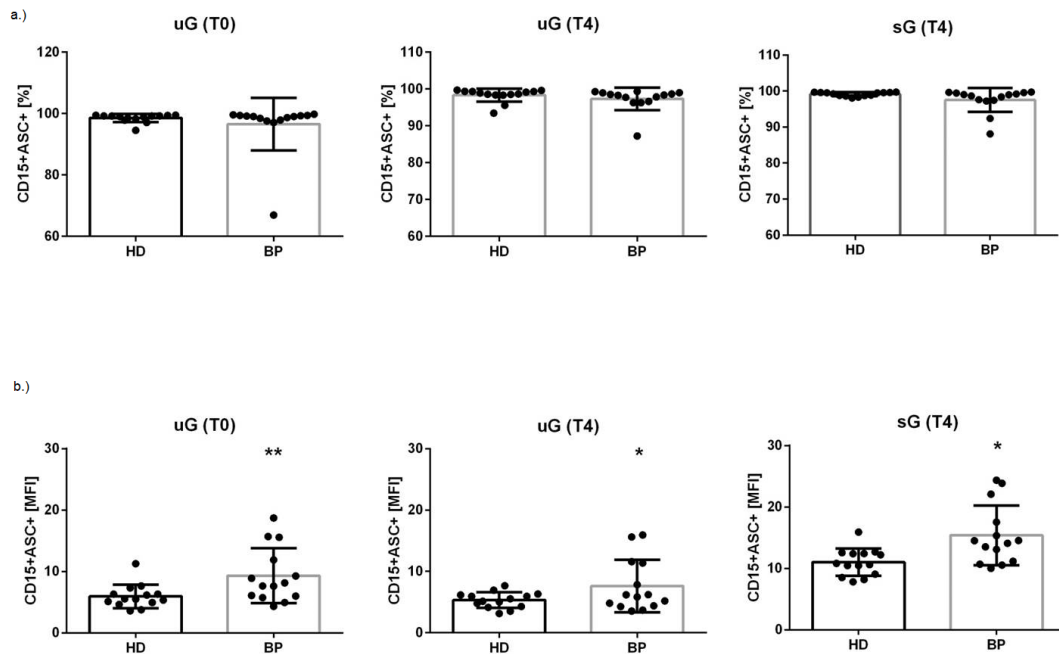


Abb. 14: a.) ASC Frequenz (%) und b.) ASC Expressionsdichte pro Zelle (MFI) in der Granulozyten-Gesamtpopulation. Vergleichende Darstellung von HD- und BP-Patienten, unter unstimulierten (uG (T0), uG (T4)) und stimulierten (sG (T4)) Bedingungen

TOFIE der Granulozyten

Die Daten der TOFIE-Analyse der Granulozyten zeigen keine signifikanten Unterschiede in der ASC Aggregatbildung, weder unter basalen (uG) noch stimulatorischen Bedingungen (sG) (Abb. 15).

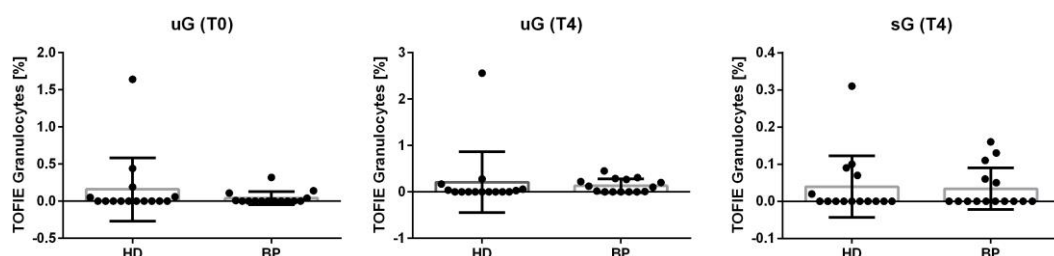
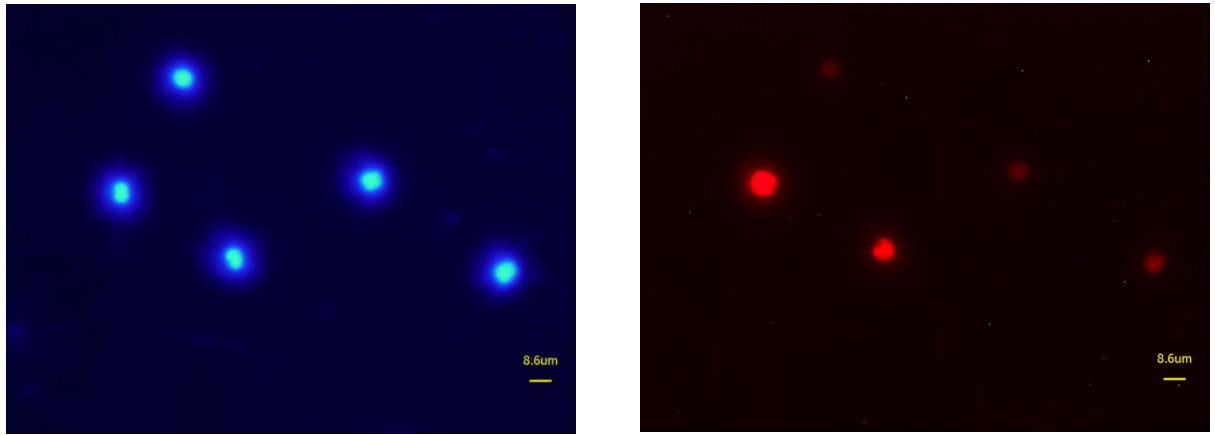


Abb. 15: Frequenz (%) TOFIE-positiver Granulozyten, Vergleich von HD- zu BP-Patienten, unter unstimulierten (uG (T0), uG (T4)) und stimulierten (sG (T4)) Bedingungen

Immunfluoreszenzmikroskopie zum Nachweis der ASC Expression

In Abb. 16 sind in Fluoroshield eingebettete Granulozyten (a.) und ihre ASC Expression (b.) von einem HD-Patienten exemplarisch dargestellt. Unterschiede in den Präparaten von HD- und BP-Patienten waren nicht ersichtlich.



a.) DAPI

b.) ASC

Abb. 16: Darstellung der ASC Expression in Granulozyten von Hämodialysepatienten mittels Zytospinpräparat: a.) Anfärbung von Granulozyten mittels DAPI; b.) ASC Expression der Granulozyten

4.3.4 ASC Expression in den Granulozyten-Subgruppen

In einem nächsten Schritt werden die Granulozyten-Subgruppen der HD- und BP-Patienten genauer untersucht. Dabei lassen sich zwei Gruppen ermitteln: zum einen die CD15+CD16- Eosinophilen und zum anderen die CD15+CD16+ Neutrophilen.

Die Frequenz eosinophiler ASC exprimierender Granulozyten ist unter basalen (uG) Bedingungen bei HD-Patienten signifikant höher im Vergleich zu hypertonen nierengesunden Patienten (Abb. 17a.). Unter stimulatorischen (sG) Bedingungen ist die Frequenz ASC positiver Granulozyten nicht signifikant unterschiedlich in beiden Gruppen. Die ASC Expressionsdichte ist auf niedrigem Niveau signifikant höher in der Nierengesundengruppe (Abb. 17b.). Des Weiteren fällt auf, dass es generell unter Stimulation zu keiner signifikanten Veränderung der eosinophilen ASC Expression kommt (HD (uG (T4)): $62,8 \pm 11,8$ vs HD (sG (T4)): $68,0 \pm 18,4$, ($p < 0,307$); BP (uG (T4)): $62,4 \pm 32,0$ vs BP (sG (T4)): $85,1 \pm 40,3$, ($p < 0,11$)).

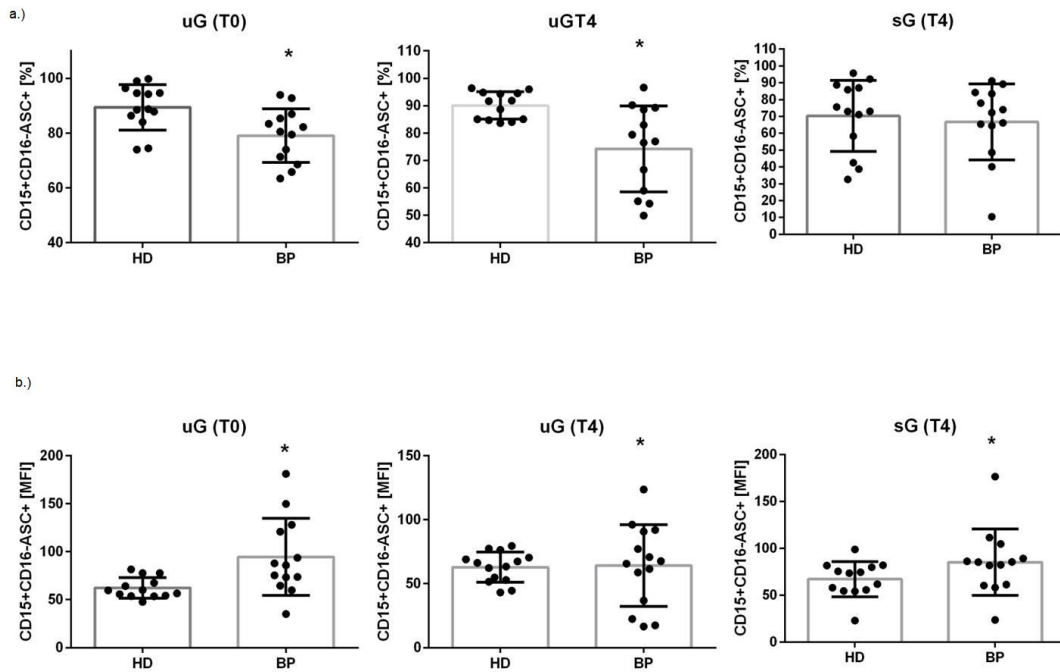


Abb. 17: a.) ASC Frequenz (%) und b.) ASC Expressionsdichte pro Zelle (MFI) in Eosinophilen Granulozyten - CD15+CD16-, verglichen werden HD- und BP-Patienten, unter unstimulierten (uG (T0), uG (T4)) und stimulierten (sG (T4)) Bedingungen

Die Frequenz neutrophiler ASC exprimierender Granulozyten ist bei HD-Patienten im Vergleich zu nierengesunden BP-Patienten nicht signifikant unterschiedlich (Abb. 18a.). Die Expressionsdichte pro Zelle hingegen ist sowohl basal (uG) als auch unter stimulatorischen (sG) Bedingungen bei Hämodialysepatienten signifikant erniedrigt (Abb. 18b.). Im Gegensatz zu den Eosinophilen fällt auf, dass es unter Stimulation zu einer signifikanten Hochregulation der neutrophilen ASC Expression kommt (HD (uG (T4)): $5,2 \pm 1,3$ vs HD (sG (T4)): $11,5 \pm 2,3$, ($p < 0,001$); BP (uG (T4)): $7,4 \pm 4,1$ vs BP (sG (T4)): $16,3 \pm 4,8$, ($p < 0,001$)).

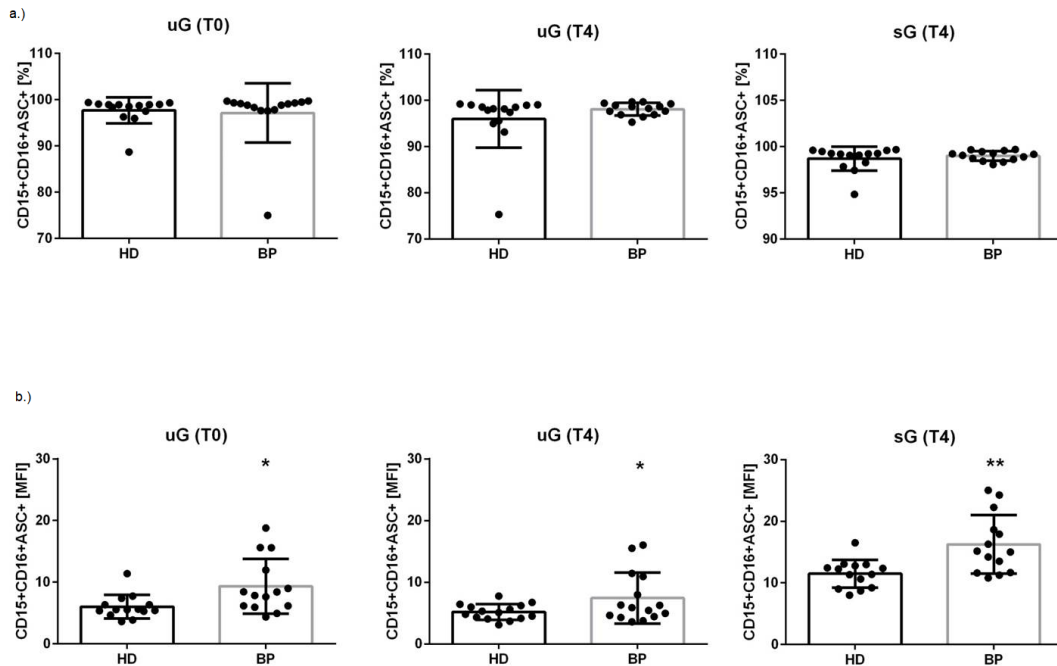


Abb.18: a.) ASC Frequenz (%) und b.) ASC Expressionsstärke pro Zelle (MFI) in Neutrophilen - CD15+CD16+, verglichen werden HD- und BP-Patienten, unter unstimulierten (uG(T0), uG(T4)) und stimulierten (sG(T4)) Bedingungen

4.4 Expression von Genen, die für NLRP3 Inflammasom-Komponenten kodieren

Mittels RT-PCR wurden die mRNA Spiegel von NLRP3, ASC und Interleukin-1 β in Monozyten und Granulozyten von HD-Patienten im Vergleich zu nierengesunden BP-Patienten gemessen. Nierengesunde Hypertoniepatienten weisen sowohl in Gesamtleukozyten (Abb. 19a.), als auch in isolierten unstimulierten PBMC (Abb. 19b.) im Vergleich zu Hämodialysepatienten ein signifikant höheres Niveau für die IL-1 β -mRNA Expression auf, wohingegen Sensor und Adapter mRNA Expression nicht unterschiedlich sind. Unter stimulatorischen Bedingungen ergab die mRNA Expressionsanalyse keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden Patientengruppen (Abb. 19c.).

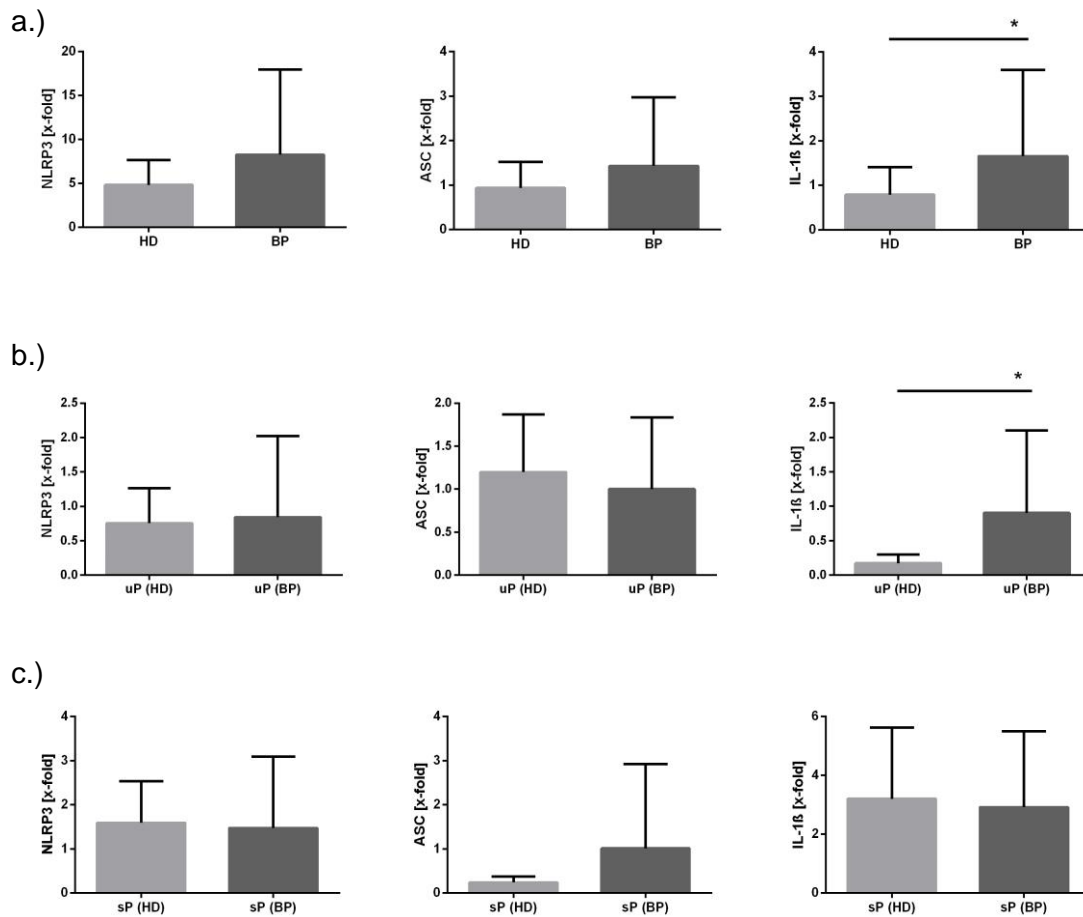


Abb. 19: Darstellung des Expressionsniveaus von NLRP3, ASC und IL-1 β in Monozyten, im Vergleich HD- und BP-Patienten, a.) leukozytäre Gesamtanalyse (Tempus); b.) PBMC unter unstimulierten (uP) und c.) PBMC unter stimulierten Bedingungen (sP)

Die Analyse der Granulozyten in Abb. 20a. zeigt, dass das Expressionsniveau für NLRP3 bei BP-Patienten unter basalen Bedingungen im Vergleich zu HD-Patienten nicht signifikant erhöht ist. Das Expressionsniveau für ASC und IL-1 β ist in der Gruppe der HD-Patienten erhöht. Eine Stimulation der Granulozyten mit LPS und Nigericin bewirkt in beiden Kollektiven eine Hochregulation der Expression, wobei der Grad der Hochregulation zu keinen signifikanten Unterschieden in den beiden Kohorten führt (Abb. 20b.).

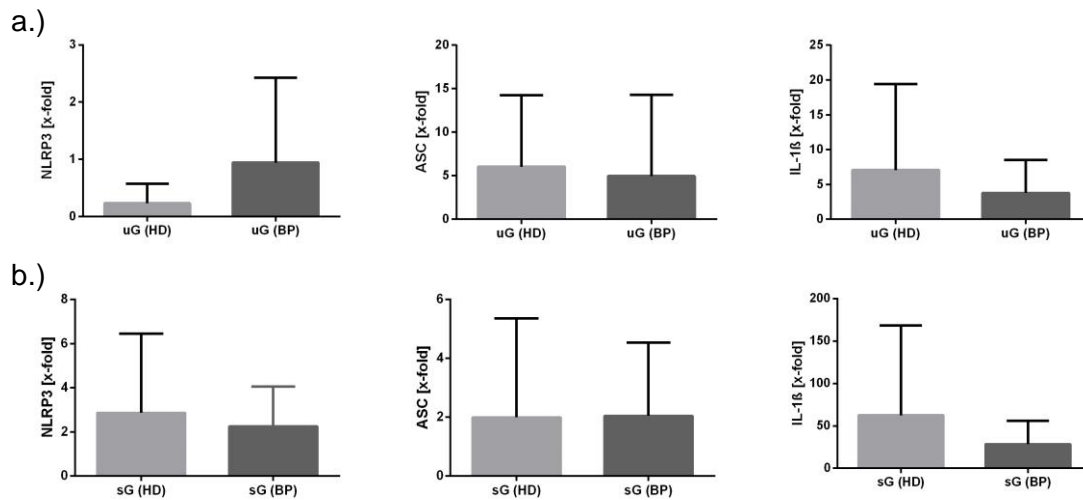


Abb. 20: Darstellung des Expressionsniveaus von NLRP3, ASC und IL-1 β in Granulozyten, im Vergleich HD- und BP-Patienten, a.) unter unstimulierten (uG) und b.) unter stimulierten Bedingungen (sG)

4.5 IL-1 β Sezernierung

Die IL-1 β Freisetzung wurde im Serum und in Zellkulturüberständen gemessen. Der IL-1 β Serumspiegel zwischen HD- und BP-Patienten ist nicht signifikant unterschiedlich (Abb. 21).

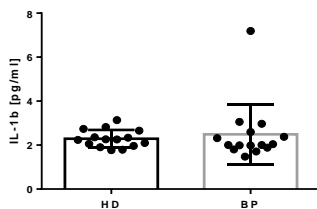
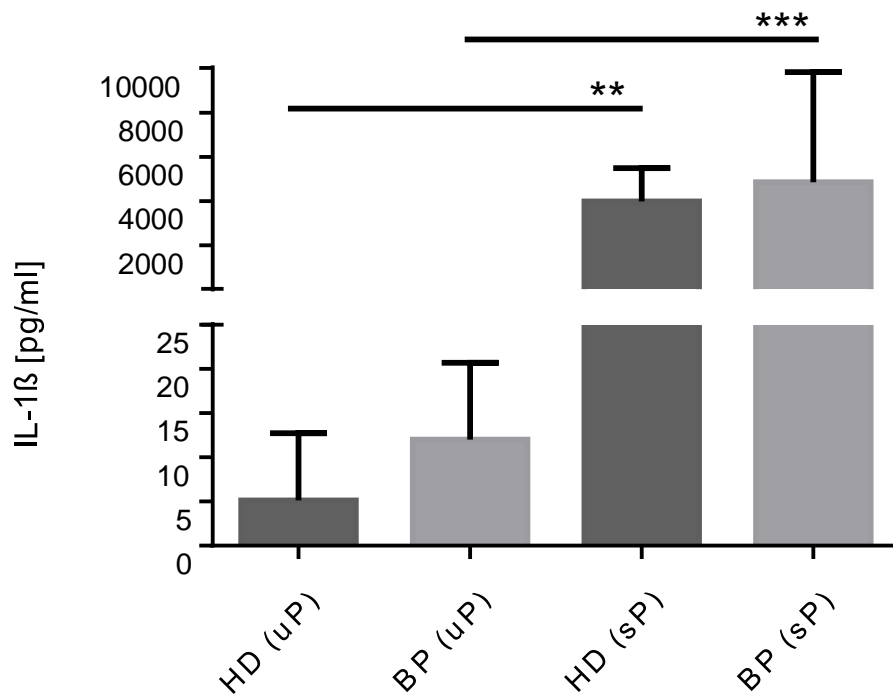


Abb. 21: Darstellung der IL-1 β Serumspiegel bei HD-Patienten, im Vergleich zu BP-Patienten

Die IL-1 β Analyse der Zellkulturüberstände ist in Abb. 22 dargestellt. Hierbei zeigt sich, dass in Monozyten (Abb. 22a.), aber auch in Granulozyten (Abb. 22b.) des nierengesunden Kontrollkollektivs, mehr IL-1 β unter unstimulierten und stimulierten Bedingungen im Vergleich zu HD-Patienten freigesetzt wird. Des Weiteren fällt auf, dass eine Stimulation der Zellproben mittels LPS und Nigericin zu einer signifikant höheren Zytokinsekretion in Monozyten und Granulozyten beider Patientenkollektive führt. Monozyten sezernieren unter allen Bedingungen bis zu 600-fach mehr IL-1 β im Vergleich zu Granulozyten.

a.)



b.)

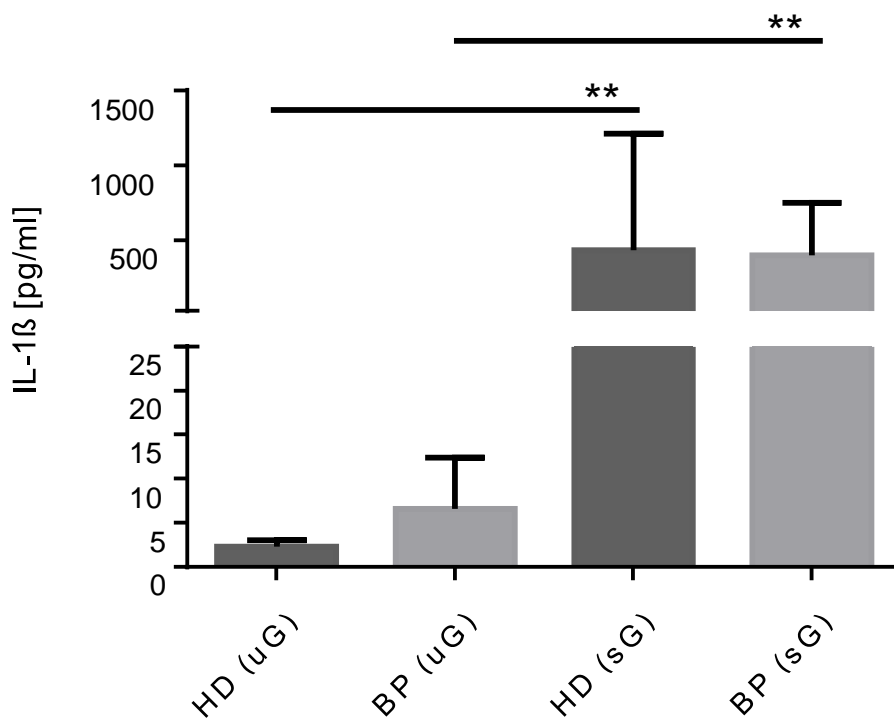


Abb 22: Darstellung der IL-1β Expression a.) in Monozyten und b.) in Granulozyten im Vergleich HD- und BP-Patienten

5 Diskussion

In der vorliegenden prospektiven Querschnittsstudie, die mittels klassischer biomolekularer Untersuchungsmethoden durchgeführt wurde, wurde die NLRP3 Inflammasomaktivität bei chronisch nierenkranken Patienten im Vergleich zu nierengesunden Hypertoniepatienten untersucht. Innerhalb des NLRP3 Inflammasom-Komplexes wurden als wichtige Komponenten das Adaptermolekül ASC, welches durch Aggregatbildung unmittelbar an der Aktivierung des Komplexes beteiligt ist sowie das Aktivierungsendprodukt - das proinflammatorische Zytokin IL-1 β - in den Fokus genommen. Dabei wurden neben den einzelnen Aktivitäten auch die mRNA Expressionen der jeweiligen Inflammasomkomponenten betrachtet. Die gewonnenen Ergebnisse über die untersuchten Studiengruppen, Zellreihen und einzelnen NLRP3 Inflammasomkomponenten (ASC, IL-1 β) wurden in den Kontext zu bisherigen Forschungsergebnissen gesetzt.

5.1 Bedeutung leukozytärer Zellen für den Inflammasomkomplex

5.1.1 Die Bedeutung der Monozyten

Monozyten sind immunkompetente Zellen, die an der angeborenen Immunabwehr teilnehmen. Mittels durchflusszytometrischer Analyse können die Zellen innerhalb der isolierten PBMC als CD14⁺ detektiert werden. Wie von Ancuta et al. 2003 sowie Ziegler-Heitbrock und Hofer 2013 beschrieben, lassen sich Monozyten anhand der Oberflächenmerkmale CD14 und CD16 in drei Subpopulationen - CD14⁺⁺CD16⁻ (Mo1), CD14⁺⁺CD16⁺ (Mo2) und CD14⁺CD16⁺⁺ (Mo3) - aufteilen (Ancuta et al. 2003; Ziegler-Heitbrock und Hofer 2013). In unseren Daten konnten wir belegen, dass Monozyten ASC konstitutiv exprimieren. Darüber hinaus konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass dies auf alle Monozytensubpopulation zutrifft, wobei Mo2 Zellen die höchste Expression aufweisen (ASC Expressionsdichte Mo2>Mo3>Mo1). Eine Form der Aktivierungsmessung stellt die sogenannte TOFIE-Analyse dar. In der Analyse können NLRP3 Aktivierungszustände anhand der ASC Zusammenlagerung nach Aktivierung (sogenannte „Specks“) durchflußzytometrisch analysiert werden. Unsere Daten zeigen, dass Monozyten nicht nur in der Lage sind, das Adaptermolekül zu exprimieren, sondern auch zur ASC Aggregatbildung fähig sind und damit den Anstoß zur proinflammatorischen IL-1 β Freisetzung geben können. Somit passen sich unsere Ergebnisse in Untersuchungen, wie beispielsweise von Belge et al. 2002 ein. In dieser Studie konnte die Arbeitsgruppe aufzeigen, dass CD16⁺ Monozyten (Mo2 und Mo3) signifikant mehr proinflammatorische Zytokine produzieren im Vergleich zu CD16⁻ Monozyten. So

beschrieben sie CD16+ Monozyten als Hauptakteure einer Aktivierung des Immunsystems (Belge et al. 2002).

Ein weiterer Effekt der Monozyten, der in einigen Studien schon beschrieben wurde, ist das Inflammasomverhalten nach Aktivierung. Für eine ausreichende Aktivierung des NLRP3 Inflammasomkomplexes und der Freisetzung von IL-1 β wurde deshalb eine zweifache Stimulation der Zellen mittels LPS und Nigericin durchgeführt (klassischer NLRP3 Aktivierungs-Pathway). Dieses Vorgehen wurde schon in Studien von Perregaux und Gabel 1994 und Cheneval et al. 1998 näher beschrieben. So zeigten sie, dass ein entzündlicher Stimulus, wie LPS, große intrazelluläre Speicher von pro-IL-1 β induzieren kann. Allerdings bedarf es eines zweiten Stimulus', wie Nigericin oder ATP, der aktiviertes reifes IL-1 β freisetzt (Perregaux und Gabel 1994; Cheneval et al. 1998). Diesen Effekt konnten wir in der vorliegenden Studie bestätigen. So kam es nach erfolgter Stimulation und Inkubation der PBMC in beiden Probandengruppen zu einer Zunahme der IL-1 β Zytokinproduktion. Bei der Betrachtung des Inflammasomkomplexes ließ sich hingegen in beiden Patientenkollektiven eine Abnahme der monozytären ASC Expression nach Stimulation erkennen. Dieser Effekt, der sowohl auf Proteinebene als auch bei der TOFIE-Analyse zu sehen ist, wurde so noch nicht beschrieben. Er deutet darauf hin, dass möglicherweise eine Art „shut-down-Mechanismus“ zu Grunde liegt, der eine überschießende ASC Aggregatbildung verhindern kann. Netea et al. zeigten 2009, dass eine Inhibition der monozytären ASC und NLRP3 Expression die IL-1 β Freisetzung auch nach LPS-Stimulation signifikant reduzieren kann (Netea et al. 2009). Die Notwendigkeit von Inflammasomkomponenten für die Zytokinsekretion konnte schon in früheren Studien, wie beispielsweise von Mariathasan et al. 2004 und Sutterwala et al. 2006 aufgezeigt werden. So stellten sie fest, dass das NLRP3 Inflammasom und ASC für die Zytokinproduktion unverzichtbar zu sein scheinen, da es ansonsten zu einer fehlerhaften Zytokinreifung kommt (Mariathasan et al. 2004; Sutterwala et al. 2006) .

In einem nächsten Schritt der Studie wurden die Monozytenpopulationen und deren ASC Expression innerhalb der beiden Studiengruppen - chronisch nierenkranke Patienten unter Hämodialysebehandlung und nierengesunde Hypertoniepatienten - miteinander verglichen. Dabei konnten signifikante Unterschiede zwischen den Alters-, Geschlechts- und Diabetes-gematchten Kollektiven festgestellt werden. So wiesen chronisch Nierenkranke eine signifikant geringere ASC Expression auf Proteinebene auf. Die RNA Expression war zwar nicht signifikant unterschiedlich in beiden Gruppen, jedoch die ASC Aggregatbildung - als maßgeblicher Aktivierungsplattformgeber war erniedrigt.

Somit scheint überraschenderweise eine niedrigere monozytäre NLRP3 Inflammasom-Aktivierung bei den multimorbiden Dialysepatienten im Vergleich zu den hypertonen

Patienten möglich zu sein. Generell ist bekannt, dass kardiovaskuläre Erkrankungen, unabhängig von einer Niereninsuffizienz, den NLRP3 Inflammasom aktivieren können (Liu et al. 2017). Der enge Zusammenhang zwischen renalen Erkrankungen und den damit assoziierten kardiovaskulären Erkrankungen bei Dialysepatienten ließen uns spekulieren, dass der Grad der Inflammasomaktivierung bei Dialysepatienten höher oder zumindest gleichstark zu den gematchten Hypertonikern ausfällt. Die Analyse von ASC als Adapterprotein und als Aktivierungsmarker des NLRP3 Inflammasoms ist unseres Erachtens in bisherigen Studien ungenügend betrachtet. Inwiefern sich „unser“ ASC Befund auf das Endprodukt des NLRP3 Inflammasoms auswirkt, wird nachfolgend noch diskutiert werden.

5.1.2 Die Bedeutung der Granulozyten

Neben der Monozytenpopulation wurden in der Studie auch Granulozyten analysiert. Die Gesamtheit der Granulozyten konnte durchflusszytometrisch als CD15⁺ detektiert werden. Mittels anti-CD15 und -CD16 Färbung wurden zwei Gruppen identifiziert: CD15⁺CD16⁻ (Eosinophile) und CD15⁺CD16⁺ (Neutrophile). Diese Einteilung wurde ebenfalls schon in einer früheren Studie durchgeführt (Gustafson et al. 2015). Obwohl Neutrophile zu den am häufigsten vorkommenden Zellen bei Infektionen und Entzündungen im menschlichen Körper zählen, ist ihre Rolle bei der Inflammasomaktivierung und dessen Komponenten noch nicht genauer erforscht. So richtete sich ein Teil der Studie der Untersuchung des NLRP3 Inflammasomkomplexes in Neutrophilen. Um Aussagen über das Inflammasomverhalten treffen zu können, wurde auch hier die ASC und IL-1 β Expression in den Zellen bestimmt. Dabei zeigten sich bei Neutrophilen höhere Frequenz-Werte ASC⁺ Zellen und niedrigere Expressionsdichten pro Zelle im Vergleich zu den eosinophilen Granulozyten. Durch eine Stimulation der Zellen mittels LPS und Nigericin (zweifach Stimulation wie bei den Monozyten) wurde die ASC Expression innerhalb der Neutrophilen hochreguliert, was eine Verstärkung der Inflammation bedeutet. Die durchgeführte Stimulation bewirkte in der Granulozytengesamtpopulation ebenfalls eine Zunahme der IL-1 β Sekretion. Somit konnte nachgewiesen werden, dass Neutrophile auf eine Entzündungsreaktion oder Infektion des Körpers mit einer verstärkten Inflammasomaktivierung reagieren. Dieser Effekt bestätigt die bisherigen Erkenntnisse von Mankan et al. 2012 und Bakele et al. 2014, dass Neutrophile die Hauptakteure der Immunabwehr innerhalb der Granulozytenpopulation darstellen. Sie sind in der Lage, das NLRP3 Inflammasom und dessen Komponenten zu aktivieren und so über Zytokine, wie IL-1 β proinflammatorisch zu wirken (Mankan et al. 2012; Bakele et al. 2014). Im Widerspruch zu diesen

Erkenntnissen steht die Studie von Patankar et al. 2015. Diese Arbeitsgruppe stellte im Mausmodell fest, dass Neutrophile zur IL-1 β Sekretion einen ASC unabhängigen Weg nutzen (Patankar et al. 2015). In künftigen Studien sollte deshalb nochmals genauer auf die Inflammasomaktivität in Neutrophilen eingegangen werden, da die Auswirkungen von Neutrophilen zur gesamten IL-1 β Produktion und ihre Mechanismen noch weitgehend unklar sind.

Es ist bekannt, dass Neutrophile als Hauptentzündungszellen auch einen Einfluss auf chronische Erkrankungen wie eine chronische Niereninsuffizienz aufweisen. Dies wurde in Studien, wie beispielsweise von Reddan et al. 2003 und Catabay et al. 2017, festgestellt. So zeigten sie, dass chronisch nierenkranke Patienten unter Hämodialysebehandlung eine erhöhte Neutrophilenzahl aufweisen. Diese ist Ausdruck einer verstärkten Entzündungsreaktion im Körper und scheint mit einem erhöhten Mortalitätsrisiko verbunden zu sein (Reddan et al. 2003; Catabay et al. 2017). Der für eine solche Entzündungsreaktion ursächliche NLRP3 Inflammasomkomplex wurde in Neutrophilen noch nicht näher betrachtet. Unsere Daten zeigen eine erhöhte ASC Frequenz bei chronisch Nierenkranken im Vergleich zu nierengesunden Hypertoniepatienten einerseits und eine erniedrigte ASC Expressionsstärke pro Zelle (MFI) andererseits. Durch diese etwas ambivalenten Daten lässt sich bei Einbezug der ASC Aggregatbildung, die in beiden Patientenkollektiven nicht unterschiedlich ist, eher mutmaßen, dass die granulozytäre NLRP3 Aktivierung zwischen beiden Gruppen nicht unterschiedlich ist. Dass ein Zusammenhang zwischen chronisch kardiovaskulären Erkrankungen, wie Hypertonie und einer systemischen Entzündung im Körper - ausgelöst durch Neutrophile - besteht, bleibt unbenommen (Imtiaz et al. 2012; Okyay et al. 2013). Inwiefern eine NLRP3 Inflammasomaktivierung dazu beiträgt, obliegt weiteren Studien.

5.2 Bedeutung der Niereninsuffizienz versus „reiner“ Hypertonie für den NLRP3 Inflammasomkomplex

Unsere Studie untersucht die Bedeutung der Inflammasomaktivierung von immunkompetenten Zellen (ASC Aggregatbildung, IL-1 β Freisetzung) bei Nierenkranken im Vergleich zu einer gematchten Gruppe von nierengesunden Hypertonikern. Wichtig für die Deutung der Daten erscheint uns auch die Tatsache, dass keine signifikanten Unterschiede bezüglich systemischer Entzündungszeichen zwischen beiden Gruppen zu finden waren.

Studien, die die NLRP3 Inflammasom-Aktivierung zwischen Hämodialysepatienten im Vergleich zu Gesunden analysiert haben, stellen ein signifikant erhöhtes

Expressionsniveau für das NLRP3 Inflammasom fest (Granata et al. 2015). Dieser Effekt wurde ebenfalls in vorherigen Studien, wie von Vilaysane et al. 2010, belegt. Die Arbeitsgruppe von Vilaysane et al. betrachtete hierbei, ob humane Nierenerkrankungen zu einer erhöhten NLRP3 Inflammasomexpression führen. Sie konnten mit ihrer Studie aufzeigen, dass eine Nierenerkrankung eine Hochregulation des Inflammasoms im Körper bewirkt und dies eine chronische Entzündungsreaktion auslösen kann (Vilaysane et al. 2010).

Unsere Ergebnisse zeigen eine stärkere monozytäre Aktivierung des NLRP3 Komplexes (ASC Aggregatbildung) bei nierengesunden Hypertonikern. Das ist überraschend, da die Multimorbidität der Dialyspatienten durchaus die Vermutung zulässt, dass eine stärkere bzw. zumindest eine gleichstarke Aktivierung des NLRP3 Inflammasoms bei diesen Patienten zu erwarten wäre. Jedoch ist die Komplexität der kardiovaskulären Erkrankung - auch ohne Nierenbeteiligung - nicht zu unterschätzen. So untersuchten beispielsweise Zheng et al. 2013 den Zusammenhang zwischen der NLRP3 Inflammasomexpression im Aortengewebe und kardiovaskulären Risikofaktoren. Dabei fanden sie heraus, dass an Hypertonie oder Diabetes erkrankte Patienten und Raucher eine stark erhöhte NLRP3 Expression im Vergleich zu gesunden Kontrollpatienten aufweisen (Zheng et al. 2013). In einer weiteren Studie von Bando et al. 2015 wird gezeigt, dass lebensstilbedingte Erkrankungen - Hypertonie, Diabetes, Hyperlipidämie - die NLRP3 Inflammasomaktivität im subkutanen Fettgewebe fördern und dadurch die Schwere der koronaren Atherosklerose negativ beeinflussen (Bando et al. 2015). Auch hier bedarf es weiterer Studien, die die genaueren Mechanismen und Einflussfaktoren kardiovaskulärer Risikofaktoren auf die NLRP3 Inflammasomexpression untersuchen.

Interessanterweise münden die signifikant höheren ASC Aktivierungswerte bei nierengesunden Hypertonikern in unserer Studie nicht in höhere IL-1 β Spiegel. Beide Gruppen - HD- und BP-Patienten - besitzen nahezu identische IL-1 β Spiegel. Dies legt den Verdacht nahe, dass bei Dialysepatienten über NLRP3 unabhängigen Weg IL-1 β produziert werden muss bzw. dass bei den Nierengesunden ein Mechanismus vorliegt, der zur Begrenzung der IL-1 β Ausschüttung beiträgt.

5.3 Einschränkungen

Die geringe Anzahl an Probanden, die an der Pilotstudie teilgenommen haben, sollte als Einschränkung dieser Studie berücksichtigt werden. Die gewonnenen Daten geben dennoch einen ersten Überblick über das Inflammasomverhalten, insbesondere der ASC Expression, in den verschiedenen leukozytären Zellreihen bei niereninsuffizienten Patienten unter Dialysebehandlung. Ebenso konnte der Einfluss einer kardiovaskulären

Erkrankung - Hypertonie - auf die Aktivität des NLRP3 Inflammasomkomplexes aufgezeigt werden. Hier kann als weitere Einschränkung gesehen werden, dass die Studie nicht berücksichtigt, wie sich weitere kardiovaskuläre Risikofaktoren, wie das Rauchverhalten oder eine Diabeteserkrankung auf das NLRP3 Inflammasom auswirken. Prospektive Studien in größerem Maßstab sind erforderlich, um genauere Schlussfolgerungen ziehen zu können.

6 Zusammenfassung

In den letzten Jahren wurde zunehmend herausgefunden, dass die Aktivierung des NLRP3 Inflammasoms bei der Immunabwehr eine große Rolle spielt. So wird es im Körper durch eine Vielzahl von Stimuli aktiviert und ist in der Lage, über die Sekretion proinflammatorischer Zytokine wie IL-1 β eine permanente Inflammation auszulösen. Folgen einer solchen Inflammation sind chronische Entzündungsprozesse, Homöostasestörungen und eine Beeinträchtigung der Organfunktion. Jüngere Studien messen der Inflammasomaktivierung auch bei chronischen Nierenerkrankungen eine große Bedeutung bei (Chang et al. 2014; Granata et al. 2015). Mit der vorliegenden Studie wollte die Arbeitsgruppe deshalb herausfinden, inwieweit eine NLRP3 Inflammasomaktivierung einen Effekt auf chronisch Nierenkranke unter Hämodialysebehandlung aufweist. Ein besonderes Augenmerk wurde dabei auf die einzelnen Inflammasomkomponenten - das Adaptermolekül ASC und das proinflammatorische Zytokin IL-1 β - gelegt. Weiterhin sollte untersucht werden, ob eine Inflammasomaktivierung einer bestimmten leukozytären Zellreihe zugeschrieben werden kann. Die Arbeitsgruppe rekrutierte für diese prospektive Querschnittsstudie 15 Hämodialysepatienten. Die zu untersuchenden Blutproben wurden klassischen biomolekularen Methoden unterzogen. Die gewonnenen Ergebnisse wurden mit denen eines gematchten Kontrollkollektivs nierengesunder Hypertoniepatienten verglichen. Zusammenfassend lässt sich aus den gewonnenen Ergebnissen der Studie schließen, dass sowohl Monozyten als auch Granulozyten in der Lage sind das NLRP3 Inflammasom und dessen Komponenten zu exprimieren und somit eine Inflammation in beiden Patientenkollektiven auszulösen. Monozyten und Granulozyten sind jedoch hinsichtlich ihres ASC Expressionsgrades unter Stimulation verschieden und es existieren Unterschiede bei ASC Frequenzen und -Expressionsdichten innerhalb der einzelnen Zellreihen. Beim Vergleich der Patientenkollektive zeigen unsere Ergebnisse deutlich, dass sich beide Patientenkollektive - chronisch Nierenkranke und nierengesunde Hypertoniker - hinsichtlich der NLRP3 Inflammasomaktivierung und ASC Frequenz voneinander unterscheiden. Obwohl Nierengesunde höhere ASC Werte aufweisen, resultieren daraus keine erhöhten Serum-IL-1 β Spiegel. Auffällig ist auch, dass es keinen signifikanten Unterschied bei systemischen Entzündungszeichen, wie CRP gibt.

Abschließend lässt sich sagen, dass es künftig weiterer Studien bedarf, die besonders den Einfluss kardiovaskulärer Erkrankungen auf eine NLRP3 Inflammasomaktivierung untersuchen.

7 Literaturverzeichnis

- Abdul-Sater AA, Koo E, Häcker G, Ojcius DM (2009) Inflammasome-dependent Caspase-1 Activation in Cervical Epithelial Cells Stimulates Growth of the Intracellular Pathogen *Chlamydia trachomatis**. *The Journal of biological chemistry* 284:26789–26796.
- Abels B (2018) Zytokine. <http://flexikon.doccheck.com/de/Zytokine>. Zugriff am 14. August 2018 um 10:28 Uhr.
- Adan A, Alizada G, Kiraz Y, Baran Y, Nalbant A (2017) Flow cytometry: basic principles and applications. *Critical reviews in biotechnology* 37:163–176.
- Alba E de (2009) Structure and interdomain dynamics of apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD (ASC). *The Journal of biological chemistry* 284:32932–32941.
- Ancuta P, Rao R, Moses A, Mehle A, Shaw SK, Luscinskas FW, Gabuzda D (2003) Fractalkine preferentially mediates arrest and migration of CD16+ monocytes. *The Journal of experimental medicine* 197:1701–1707.
- Bakele M, Joos M, Burdi S, Allgaier N, Pöschel S, Fehrenbacher B, Schaller M, Marcos V, Kümmerle-Deschner J, Rieber N, Borregaard N, Yazdi A, Hector A, Hartl D (2014) Localization and functionality of the inflammasome in neutrophils. *The Journal of biological chemistry* 289:5320–5329.
- Baldrighi M, Mallat Z, Li X (2017) NLRP3 inflammasome pathways in atherosclerosis. *Atherosclerosis* 267:127–138.
- Bando S, Fukuda D, Soeki T, Nishimoto S, Uematsu E, Matsuura T, Ise T, Tobiume T, Yamaguchi K, Yagi S, Iwase T, Yamada H, Wakatsuki T, Shimabukuro M, Sata M (2015) Expression of NLRP3 in subcutaneous adipose tissue is associated with coronary atherosclerosis. *Atherosclerosis* 242:407–414.
- Bauernfeind F, Ablasser A, Bartok E, Kim S, Schmid-Burgk J, Cavlar T, Hornung V (2011) Inflammasomes: current understanding and open questions. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 68:765–783.
- Belge K-U, Dayyani F, Horelt A, Siedlar M, Frankenberger M, Frankenberger B, Espevik T, Ziegler-Heitbrock L (2002) The Proinflammatory CD14+CD16+DR++ Monocytes Are a Major Source of TNF. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 168:3536–3542.
- Bernard PS, Wittwer CT (2000) Homogeneous Amplification and Variant Detection by Fluorescent Hybridization Probes. *Clinical Chemistry* 46:147–148.
- Birben E, Sahiner UM, Sackesen C, Erzurum S, Kalayci O (2012) Oxidative stress and antioxidant defense. *The World Allergy Organization journal* 5:9–19.
- Boaz M, Smetana S, Weinstein T, Matas Z, Gafter U, Iaina A, Knecht A, Weissgarten Y, Brunner D, Fainaru M, Green MS (2000) Secondary prevention with antioxidants of cardiovascular disease in endstage renal disease (SPACE): randomised placebo-controlled trial. *The Lancet* 356:1213–1218.
- Bonnefont-Rousselot D, Lehmann E, Jaudon MC, Delattre J, Perrone B, Rechke JP (2000) Blood oxidative stress and lipoprotein oxidizability in haemodialysis patients: effect of the use of a vitamin E-coated dialysis membrane. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association* 15:2020–2028.

- Bryan NB, Dorfleutner A, Rojanasakul Y, Stehlik C (2009) Activation of inflammasomes requires intracellular redistribution of the apoptotic speck-like protein containing a caspase recruitment domain. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 182:3173–3182.
- Canaud B, Cristol J, Morena M, Leray-Moragues H, Bosc J, Vaussenat F (1999) Imbalance of oxidants and antioxidants in haemodialysis patients. *Blood purification* 17:99–106.
- Caprez S, Menzel U, Li Z, Grad S, Alini M, Peroglio M (2018) Isolation of high-quality RNA from intervertebral disc tissue via pronase predigestion and tissue pulverization. *JOR spine* 1:e1017.
- Catabay C, Obi Y, Streja E, Soohoo M, Park C, Rhee CM, Kovesdy CP, Hamano T, Kalantar-Zadeh K (2017) Lymphocyte Cell Ratios and Mortality among Incident Hemodialysis Patients. *American journal of nephrology* 46:408–416.
- Chang A, Ko K, Clark MR (2014) The emerging role of the inflammasome in kidney diseases. *Current opinion in nephrology and hypertension* 23:204–210.
- Cheneval D, Ramage P, Kastelic T, Szelestenyi T, Niggli H, Hemmig R, Bachmann M, MacKenzie A (1998) Increased Mature Interleukin-1 β (IL-1 β) Secretion from THP-1 Cells Induced by Nigericin Is a Result of Activation of p45 IL-1 β -converting Enzyme Processing. *J. Biol. Chem.* 273:17846–17851.
- Cheng J, Waite AL, Tkaczyk ER, Ke K, Richards N, Hunt AJ, Gumucio DL (2010) Kinetic properties of ASC protein aggregation in epithelial cells. *Journal of cellular physiology* 222:738–747.
- Compan V, Martín-Sánchez F, Baroja-Mazo A, López-Castejón G, Gomez AI, Verkhatsky A, Brough D, Pelegrín P (2015) Apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD forms specks but does not activate caspase-1 in the absence of NLRP3 during macrophage swelling. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 194:1261–1273.
- Craven RR, Gao X, Allen IC, Gris D, Bubeck-Wardenburg J, McElvania-TeKippe E, Ting JP, Duncan JA (2009) *Staphylococcus aureus* alpha-hemolysin activates the NLRP3-inflammasome in human and mouse monocytic cells. *PloS one* 4:e7446.
- Davis BK, Wen H, Ting JP-Y (2011) The inflammasome NLRs in immunity, inflammation, and associated diseases. *Annual review of immunology* 29:707–735.
- Dick MS, Sborgi L, Rühl S, Hiller S, Broz P (2016) ASC filament formation serves as a signal amplification mechanism for inflammasomes. *Nature communications* 7:11929.
- Dinarello CA (1984a) Interleukin-1. *Reviews of infectious diseases* 6:51–95.
- Dinarello CA (1984b) Induction of acute phase reactants by interleukin-1. *Journal of Inflammation Reserach* 8:203–225.
- Dinarello CA (1998) Interleukin-1 beta, interleukin-18, and the interleukin-1 beta converting enzyme. *Annals of the New York Academy of Sciences* 856:1–11.
- Dostert C, Pétrilli V, van Bruggen R, Steele C, Mossman BT, Tschopp J (2008) Innate immune activation through Nalp3 inflammasome sensing of asbestos and silica. *Science (New York, N.Y.)* 320:674–677.
- Duewell P, Kono H, Rayner KJ, Sirois CM, Vladimer G, Bauernfeind FG, Abela GS, Franchi L, Nuñez G, Schnurr M, Espevik T, Lien E, Fitzgerald KA, Rock KL, Moore KJ, Wright SD, Hornung V, Latz E (2010) NLRP3 inflammasomes are required for atherogenesis and activated by cholesterol crystals. *Nature* 464:1357–1361.

- Eisenbarth SC, Colegio OR, O'Connor W, Sutterwala FS, Flavell RA (2008) Crucial role for the Nalp3 inflammasome in the immunostimulatory properties of aluminium adjuvants. *Nature* 453:1122–1126.
- Fearon DT, Locksley RM (1996) The instructive role of innate immunity in the acquired immune response. *Science (New York, N.Y.)* 272:50–53.
- Feldmeyer L, Keller M, Niklaus G, Hohl D, Werner S, Beer H-D (2007) The inflammasome mediates UVB-induced activation and secretion of interleukin-1beta by keratinocytes. *Current biology : CB* 17:1140–1145.
- Fernandes-Alnemri T, Wu J, Yu J-W, Datta P, Miller B, Jankowski W, Rosenberg S, Zhang J, Alnemri ES (2007) The pyroptosome: a supramolecular assembly of ASC dimers mediating inflammatory cell death via caspase-1 activation. *Cell death and differentiation* 14:1590–1604.
- Flannery CR, Little CB, Caterson B, Hughes CE (1999) Effects of culture conditions and exposure to catabolic stimulators (IL-1 and retinoic acid) on the expression of matrix metalloproteinases (MMPs) and disintegrin metalloproteinases (ADAMs) by articular cartilage chondrocytes. *Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology* 18:225–237.
- Frankenberger M, Sternsdorf T, Pechumer H, Pforte A, Ziegler-Heitbrock HW (1996) Differential cytokine expression in human blood monocyte subpopulations: a polymerase chain reaction analysis. *Blood* 87:373–377.
- Fulkerson PC, Rothenberg ME (2013) Targeting eosinophils in allergy, inflammation and beyond. *Nature reviews. Drug discovery* 12:117–129.
- Gaidt MM, Ebert TS, Chauhan D, Schmidt T, Schmid-Burgk JL, Rapino F, Robertson AAB, Cooper MA, Graf T, Hornung V (2016) Human Monocytes Engage an Alternative Inflammasome Pathway. *Immunity* 44:833–846.
- Gauckler P, Shin JI, Mayer G, Kronbichler A (2018) Eosinophilia and Kidney Disease: More than Just an Incidental Finding? *Journal of Clinical Medicine* 7.
- Granata S, Zaza G, Simone S, Villani G, Latorre D, Pontrelli P, Carella M, Schena FP, Grandaliano G, Pertosa G (2009) Mitochondrial dysregulation and oxidative stress in patients with chronic kidney disease. *BMC genomics* 10:388.
- Granata S, Masola V, Zoratti E, Scupoli MT, Baruzzi A, Messa M, Sallustio F, Gesualdo L, Lupo A, Zaza G (2015) NLRP3 inflammasome activation in dialyzed chronic kidney disease patients. *PLoS one* 10:e0122272.
- Guan Z, Buckman SY, Miller BW, Springer LD, Morrison AR (1998) Interleukin-1 β -induced Cyclooxygenase-2 Expression Requires Activation of Both c-Jun NH 2-terminal Kinase and p38 MAPK Signal Pathways in Rat Renal Mesangial Cells. *J. Biol. Chem.* 273:28670–28676.
- Guo H, Callaway JB, Ting JP-Y (2015) Inflammasomes: mechanism of action, role in disease, and therapeutics. *Nature medicine* 21:677–687.
- Gustafson MP, Lin Y, Maas ML, van Keulen VP, Johnston PB, Peikert T, Gastineau DA, Dietz AB (2015) A method for identification and analysis of non-overlapping myeloid immunophenotypes in humans. *PLoS one* 10:e0121546.
- Halle A, Hornung V, Petzold GC, Stewart CR, Monks BG, Reinheckel T, Fitzgerald KA, Latz E, Moore KJ, Golenbock DT (2008) The NALP3 inflammasome is involved in the innate immune response to amyloid-beta. *Nature immunology* 9:857–865.
- Hassan H, Amer AO (2011) Cell intrinsic roles of apoptosis-associated speck-like protein in regulating innate and adaptive immune responses. *TheScientificWorldJournal* 11:2418–2423.

- He Y, Hara H, Núñez G (2016) Mechanism and Regulation of NLRP3 Inflammasome Activation. *Trends in biochemical sciences* 41:1012–1021.
- Heinz J, Kropf S, Luley C, Dierkes J (2009) Homocysteine as a risk factor for cardiovascular disease in patients treated by dialysis: a meta-analysis. *American journal of kidney diseases : the official journal of the National Kidney Foundation* 54:478–489.
- Hildebrand S, Corbett R, Duncan N, Ashby D (2016) Increased prevalence of eosinophilia in a hemodialysis population: Longitudinal and case control studies. *Hemodialysis international. International Symposium on Home Hemodialysis* 20:414–420.
- Himmelfarb J, Stenvinkel P, Ikizler TA, Hakim RM (2002) The elephant in uremia: oxidant stress as a unifying concept of cardiovascular disease in uremia. *Kidney international* 62:1524–1538.
- Himmelfarb J, Kane J, McMonagle E, Zaltas E, Bobzin S, Boddupalli S, Phinney S, Miller G (2003) Alpha and gamma tocopherol metabolism in healthy subjects and patients with end-stage renal disease. *Kidney international* 64:978–991.
- Hirayama D, Iida T, Nakase H (2017) The Phagocytic Function of Macrophage-Enforcing Innate Immunity and Tissue Homeostasis. *International journal of molecular sciences* 19.
- Howard M, Mizel SB, Lachman L, Ansel J, Johnson B, Paul WE (1983) Role of interleukin 1 in anti-immunoglobulin-induced B cell proliferation. *The Journal of experimental medicine* 157:1529–1543.
- Ichinohe T, Lee HK, Ogura Y, Flavell R, Iwasaki A (2009) Inflammasome recognition of influenza virus is essential for adaptive immune responses. *The Journal of experimental medicine* 206:79–87.
- Intiaz F, Shafique K, Mirza SS, Ayoob Z, Vart P, Rao S (2012) Neutrophil lymphocyte ratio as a measure of systemic inflammation in prevalent chronic diseases in Asian population. *International archives of medicine* 5:2.
- Kampschmidt RF, Upchurch HF (1980) Rate of Clearance of Circulating Leukocytic Endogenous Mediator in the Rat. *Experimental Biology and Medicine* 164:537–539.
- Kratofil RM, Kubes P, Deniset JF (2017) Monocyte Conversion During Inflammation and Injury. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 37:35–42.
- Levey AS, Coresh J, Balk E, Kausz AT, Levin A, Steffes MW, Hogg RJ, Perrone RD, Lau J, Eknoyan G (2003) National Kidney Foundation practice guidelines for chronic kidney disease: evaluation, classification, and stratification. *Annals of internal medicine* 139:137–147.
- Libetta C, Sepe V, Esposito P, Galli F, Dal Canton A (2011) Oxidative stress and inflammation: Implications in uremia and hemodialysis. *Clinical biochemistry* 44:1189–1198.
- Liu D, Zeng X, Li X, Mehta JL, Wang X (2017) Role of NLRP3 inflammasome in the pathogenesis of cardiovascular diseases. *Basic research in cardiology* 113:5.
- MACS Miltenyi Biotec (2018). <https://www.miltenyibiotec.com/CA-en/products/macs-flow-cytometry/flow-cytometers/macsquant-analyzer-10/macsquant-r-analyzer-10.html>. Zugriff am 27. August 2018 um 10:13 Uhr.
- Mankan AK, Dau T, Jenne D, Hornung V (2012) The NLRP3/ASC/Caspase-1 axis regulates IL-1 β processing in neutrophils. *European journal of immunology* 42:710–715.
- Mariathasan S, Newton K, Monack DM, Vucic D, French DM, Lee WP, Roose-Girma M, Erickson S, Dixit VM (2004) Differential activation of the inflammasome by caspase-1 adaptors ASC and Ipaf. *Nature* 430:213–218.

- Mariathasan S, Weiss DS, Newton K, McBride J, O'Rourke K, Roose-Girma M, Lee WP, Weinrauch Y, Monack DM, Dixit VM (2006) Cryopyrin activates the inflammasome in response to toxins and ATP. *Nature* 440:228–232.
- Martinon F, Mayor A, Tschopp J (2009) The inflammasomes; Guardians of the body. *Annual review of immunology* 27:229–265.
- Masumoto J, Taniguchi S, Ayukawa K, Sarvotham H, Kishino T, Niikawa N, Hidaka E, Katsuyama T, Higuchi T, Sagara J (1999) ASC, a Novel 22-kDa Protein, Aggregates during Apoptosis of Human Promyelocytic Leukemia HL-60 Cells. *J. Biol. Chem.* 274:33835–33838.
- Masumoto J, Taniguchi S, Nakayama J, Shiohara M, Hidaka E, Katsuyama T, Murase S, Sagara J (2001) Expression of apoptosis-associated speck-like protein containing a caspase recruitment domain, a pyrin N-terminal homology domain-containing protein, in normal human tissues. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society* 49:1269–1275.
- Menu P, Vince JE (2011) The NLRP3 inflammasome in health and disease; The good, the bad and the ugly. *Clinical and experimental immunology* 166:1–15.
- Merino A, Buendia P, Martin-Malo A, Aljama P, Ramirez R, Carracedo J (2011) Senescent CD14+CD16+ monocytes exhibit proinflammatory and proatherosclerotic activity. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 186:1809–1815.
- Mizel SB (1982) Interleukin I and T Cell Activation. *Immunological reviews* 63:51–72.
- Mollinedo F, Borregaard N, Boxer LA (1999) Novel trends in neutrophil structure, function and development. *Immunology Today* 20:535–537.
- Monteleone M, Stow JL, Schroder K (2015) Mechanisms of unconventional secretion of IL-1 family cytokines. *Cytokine* 74:213–218.
- Monteleone M, Stanley AC, Chen KW, Brown DL, Bezbradica JS, Pein JB von, Holley CL, Boucher D, Shakespear MR, Kapetanovic R, Rolfes V, Sweet MJ, Stow JL, Schroder K (2018) Interleukin-1 β Maturation Triggers Its Relocation to the Plasma Membrane for Gasdermin-D-Dependent and -Independent Secretion. *Cell reports* 24:1425–1433.
- Mosley B, Urdal DL, Prickett KS, Larsen A, Cosman D, Conlon PJ, Gillis S, Dower SK (1987) The interleukin-1 receptor binds the human interleukin-1 alpha precursor but not the interleukin-1 beta precursor. *J. Biol. Chem.* 262:2941–2944.
- Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H (1986) Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology* 51 Pt 1:263–273.
- Muñoz-Planillo R, Franchi L, Miller LS, Núñez G (2009) A critical role for hemolysins and bacterial lipoproteins in *Staphylococcus aureus*-induced activation of the Nlrp3 inflammasome. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 183:3942–3948.
- 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, Funk CJ, 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.
- Ogunro PS, Olujobo FA, Ajala MO, Oshodi TT (2014) The effect of a membrane dialyzer during hemodialysis on the antioxidant status and lipid peroxidation of patients with end-stage renal disease. *Saudi journal of kidney diseases and transplantation : an official publication of the Saudi Center for Organ Transplantation, Saudi Arabia* 25:1186–1193.

- Okuy GU, Inal S, Oneç K, Er RE, Paşaoğlu O, Paşaoğlu H, Derici U, Erten Y (2013) Neutrophil to lymphocyte ratio in evaluation of inflammation in patients with chronic kidney disease. *Renal failure* 35:29–36.
- Park HH, Lo Y-C, Lin S-C, Wang L, Yang JK, Wu H (2007) The death domain superfamily in intracellular signaling of apoptosis and inflammation. *Annual review of immunology* 25:561–586.
- Patankar YR, Mabaera R, Berwin B (2015) Differential ASC requirements reveal a key role for neutrophils and a noncanonical IL-1 β response to *Pseudomonas aeruginosa*. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology* 309:L902-13.
- Perregaux D, Gabel CA (1994) Interleukin-1 beta maturation and release in response to ATP and nigericin. Evidence that potassium depletion mediated by these agents is a necessary and common feature of their activity. *J. Biol. Chem.* 269:15195–15203.
- Pezzutto A, Ulrichs T, Burmester G-R, Wirth J (op. 2007) *Taschenatlas der Immunologie; Grundlagen - Labor - Klinik*. Thieme, Stuttgart, New York.
- Ramírez R, Carracedo J, Merino A, Soriano S, Ojeda R, Alvarez-Lara MA, Martín-Malo A, Aljama P (2011) CD14+CD16+ monocytes from chronic kidney disease patients exhibit increased adhesion ability to endothelial cells. *Contributions to nephrology* 171:57–61.
- Reddan DN, Klassen PS, Szczech LA, Coladonato JA, O'Shea S, Owen WF, Lowrie EG (2003) White blood cells as a novel mortality predictor in haemodialysis patients. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association* 18:1167–1173.
- Schatz G, Dobberstein B (1996) Common principles of protein translocation across membranes. *Science (New York, N.Y.)* 271:1519–1526.
- Schenten D, Medzhitov R (2011) The control of adaptive immune responses by the innate immune system. *Advances in immunology* 109:87–124.
- Schroder, Kate; Tschopp, Jurg (2010): The inflammasomes. In: *Cell* 140 (6), S. 821–832.
- Sester DP, Thygesen SJ, Sagulenko V, Vajjhala PR, Cridland JA, Vitak N, Chen KW, Osborne GW, Schroder K, Stacey KJ (2015) A novel flow cytometric method to assess inflammasome formation. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 194:455–462.
- Siew ED, Ikizler TA (2010) Insulin resistance and protein energy metabolism in patients with advanced chronic kidney disease. *Seminars in dialysis* 23:378–382.
- Slee AD (2012) Exploring metabolic dysfunction in chronic kidney disease. *Nutrition & metabolism* 9:36.
- Sutterwala FS, Ogura Y, Szczepanik M, Lara-Tejero M, Lichtenberger GS, Grant EP, Bertin J, Coyle AJ, Galán JE, Askenase PW, Flavell RA (2006) Critical role for NALP3/CIAS1/Cryopyrin in innate and adaptive immunity through its regulation of caspase-1. *Immunity* 24:317–327.
- Takeuchi O, Akira S (2010) Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell* 140:805–820.
- Thermofischer (2018a) <http://www.thermofisher.com/order/catalog/product/88-7261-88>. Zugriff am 03. August 2020 um 18:27 Uhr.
- Thermofischer (2018b) <http://www.thermofisher.com/order/catalog/product/4342792>. Zugriff am 03. August 2020 um 18:05 Uhr.

- Thornberry NA, Bull HG, Calaycay JR, Chapman KT, Howard AD, Kostura MJ, Miller DK, Molineaux SM, Weidner JR, Aunins J (1992) A novel heterodimeric cysteine protease is required for interleukin-1 beta processing in monocytes. *Nature* 356:768–774.
- Torres N, Guevara-Cruz M, Velázquez-Villegas LA, Tovar AR (2015) Nutrition and Atherosclerosis. *Archives of medical research* 46:408–426.
- Ueki S, Tokunaga T, Fujieda S, Honda K, Hirokawa M, Spencer LA, Weller PF (2016) Eosinophil ETosis and DNA Traps: a New Look at Eosinophilic Inflammation. *Current allergy and asthma reports* 16:54.
- Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M (2006) Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-biological interactions* 160:1–40.
- Vilaysane A, Chun J, Seamone ME, Wang W, Chin R, Hirota S, Li Y, Clark SA, Tschopp J, Trpkov K, Hemmelgarn BR, Beck PL, Muruve DA (2010) The NLRP3 inflammasome promotes renal inflammation and contributes to CKD. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 21:1732–1744.
- Vladimer GI, Marty-Roix R, Ghosh S, Weng D, Lien E (2013) Inflammasomes and host defenses against bacterial infections. *Current opinion in microbiology* 16:23–31.
- Wang, Lili; Qu, Peng; Zhao, Jian; Chang, Yeting (2014): NLRP3 and downstream cytokine expression elevated in the monocytes of patients with coronary artery disease. In: *Archives of medical science : AMS* 10 (4), S. 791–800.
- Wang Z, Hu W, Lu C, Ma Z, Jiang S, Gu C, Acuña-Castroviejo D, Yang Y (2018) Targeting NLRP3 (Nucleotide-Binding Domain, Leucine-Rich-Containing Family, Pyrin Domain-Containing-3) Inflammasome in Cardiovascular Disorders. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 38:2765–2779.
- Wellington M, Koselny K, Sutterwala FS, Krysan DJ (2014) *Candida albicans* triggers NLRP3-mediated pyroptosis in macrophages. *Eukaryotic cell* 13:329–340.
- Yamasaki K, Muto J, Taylor KR, Cogen AL, Audish D, Bertin J, Grant EP, Coyle AJ, Misaghi A, Hoffman HM, Gallo RL (2009) NLRP3/cryopyrin is necessary for interleukin-1beta (IL-1beta) release in response to hyaluronan, an endogenous trigger of inflammation in response to injury. *J. Biol. Chem.* 284:12762–12771.
- Yuk J-M, Jo E-K (2013) Crosstalk between autophagy and inflammasomes. *Molecules and cells* 36:393–399.
- Zheng F, Xing S, Gong Z, Xing Q (2013) NLRP3 inflammasomes show high expression in aorta of patients with atherosclerosis. *Heart, lung & circulation* 22:746–750.
- Zhou W, Chen C, Chen Z, Pasqua L, Jiang J, Wu Z, Zhao M, Chen Y (2018) NLRP3: A Novel Mediator in Cardiovascular Disease. *Journal of immunology research* 2018:5702103.
- Ziegler-Heitbrock L, Hofer TPJ (2013) Toward a refined definition of monocyte subsets. *Frontiers in immunology* 4:23.

8 Thesen

1. Leukozytäre Zellreihen (Monozyten und Granulozyten) verfügen über eine Expression des Adaptermoleküls ASC.
2. Monozyten und Granulozyten unterscheiden sich im ASC Expressionsgrad unter Stimulation.
3. Monozyten exprimieren ASC und bilden ASC Aggregate für die proinflammatorische IL-1 β Freisetzung.
4. Neutrophile Granulozyten haben im Vergleich zu eosinophilen Granulozyten unterschiedliche ASC Frequenzen und Expressionsdichten.
5. Chronisch Nierenkranke unterscheiden sich in ihrer signifikant geringeren monozytären NLRP3 Inflammasomaktivierung von nierengesunden Patienten.
6. ASC Frequenz und Expressionsstärke pro Zelle von Neutrophilen ist bei chronisch Nierenkranken signifikant geringer als bei nierengesunden Patienten.
7. Zwischen den Gruppen gibt es keinen signifikanten Unterschied bei systemischen Entzündungszeichen (CRP).
8. Nierengesunde zeigen trotz höherer ASC Werte keine erhöhten Serum-IL-1 β Spiegel.

9 Anhang

9.1 Publikation

Ulrich C, Wildgrube S, Fiedler R, Seibert E, Kneser L, Fick S, Schäfer C, Markau S, Trojanowicz B, Girndt M (2020) NLRP3 Inflammasome Activation in Hemodialysis and Hypertensive Patients with Intact Kidney Function. *Toxins* 12.

9.2 Eidesstaatliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, Susann Wildgrube, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet.

Ich versichere, dass ich für die inhaltliche Erstellung der vorliegenden Arbeit nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- und Beratungsdiensten (Promotionsberater oder anderer Personen) in Anspruch genommen habe. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Halle (Saale), den 06.04.2021

Susann Wildgrube

9.3 Erklärung über frühere Promotionsversuche

Ich versichere hiermit, dass ich keinen vorausgegangenen Promotionsversuch unternommen habe und dass kein Promotionsversuch an einer anderen wissenschaftlichen Einrichtung läuft.

Halle (Saale), den 06.04.2021

Susann Wildgrube

9.4 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich meinen besonderen Dank nachstehenden Personen entgegenbringen, ohne deren Mithilfe die Anfertigung dieser Promotion nicht zustande gekommen wäre.

Hiermit möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. Matthias Girndt dafür bedanken, dass ich die vorliegende Arbeit unter seiner Leitung in der Universitäts- und Poliklinik für Innere Medizin II verfassen durfte.

Herrn Dr. rer.nat. Christof Ulrich danke ich für die Themenstellung, die hervorragende Betreuung der Dissertation und für die mühevollen Arbeit des Korrekturlesens.

Frau Manuela Hajri danke ich für die freundschaftliche Arbeitsatmosphäre, die stete Hilfsbereitschaft im Labor sowie für die geduldige Beantwortung all meiner Fragen.

Bedanken möchte ich mich weiterhin bei allen Schwestern und Ärzten des KfH, der Bluthochdruckambulanz, der kardiologischen Ambulanz und bei den Ärzten und Schwestern der Stationen der Inneren Klinik II und III des Universitätsklinikums für die freundliche Zusammenarbeit.

Bei meiner Familie und meinen Freunden möchte ich mich ganz herzlich bedanken für die uneingeschränkte, liebevolle und vielseitige Unterstützung während meines Studiums.

Vielen lieben Dank!