Aus dem Institut für Molekulare Kardiologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Univ. Prof. Dr. med. Jürgen Schrader

Purinabhängige Aktivierung des Inflammasoms in epikardialen Progenitorzellen nach Myokardinfarkt

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität
Düsseldorf

vorgelegt von
Stella Leberling
(2023)

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.:
Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker
Erstgutachter: Univ. Prof. Dr. med. Jürgen Schrader
Zweitgutachter: PD Dr. rer. nat. Sebastian Temme

Für meine Eltern,

meinen Bruder

und meinen Partner.

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Hesse, J., Leberling, S., Boden, E., Friebe, D., Schmidt, T., Ding, Z., Dieterich, P., Deussen, A., Roderigo, C., Rose, C.R., Floss, D.M., Scheller, J., Schrader, J., 2017. CD73-derived adenosine and tenascin-C control cytokine production by epicardium-derived cells formed after myocardial infarction. FASEB J. 31, 3040–3053. https://doi.org/10.1096/fj.201601307R

ZUSAMMENFASSUNG

Weltweit führen ischämische Herzerkrankungen, darunter der akute Myokardinfarkt (MI), trotz fortschreitender therapeutischer Möglichkeiten die Todesursachenstatistik an. Die im Rahmen eines MI abgestorbenen Kardiomyozyten werden durch eine bindegewebige Narbe ersetzt, mit der eine Beeinträchtigung der Herzfunktion einhergeht. Im zeitlichen Verlauf drohen Herzschwäche bis hin zum transplantationspflichtigen Herzversagen. Aus dem Epikard stammende Zellen (EPDC) spielen eine zentrale Rolle bei der embryonalen Herzentwicklung und tragen zur Bildung von koronaren Gefäßvorläufern, Fibroblasten und Kardiomyozyten bei. Im erwachsenen Herzen werden EPDC durch MI reaktiviert und gelten als endogene Quelle für Zellen und insbesondere regulatorische parakrine Faktoren, die die umliegenden Zellen im Infarktareal beeinflussen können. Dazu gehört das pro-reparative Zytokin IL-6, dessen Expression in EPDC durch extrazelluläres Adenosin über dessen Rezeptor A_{2B} induziert wird. Generell wird die Bildung von IL-6 in hohem Maße durch das zentrale pro-inflammatorische Zytokin IL-1β bestimmt, das durch Inflammasome gebildet wird. Diese Multiproteinkomplexe mit Caspase-1 als Effektor-Enzym wurden bereits in Kardiomyozyten und kardialen Fibroblasten sowie in nach MI infiltrierenden Immunzellen nachgewiesen. Das NLRP3-Inflammasom ist der klinisch bedeutsamste Inflammasom-Typ und kann unter anderem durch extrazelluläres ATP über die Rezeptoren $P2X_4$ und $P2X_7$ aktiviert werden. EPDC können ATP aktiv freisetzen, insbesondere nach Aktivierung des Adenosin-Rezeptors A_{2B}. Da EPDC eine einzigartige Zellpopulation darstellen, deren vielfältiges biologisches Profil noch nicht vollständig aufgeklärt ist, stellte sich die Frage, ob auch nach MI reaktivierte EPDC ein aktives Inflammasom besitzen und in welchem Maße das purinerge Signalsystem Einfluss auf die mögliche Aktivierung des Inflammasoms in diesen Zellen hat. Darüber hinaus war von Interesse herauszufinden, ob die zuvor beschriebene A_{2B}-Rezeptor-abhängige Induktion von IL-6 in EPDC Inflammasom-abhängig erfolgt.

Um dies zu untersuchen, wurden in kultivierten adulten EPDC, die fünf Tage nach operativ induzierter Ischämie und Reperfusion aus Rattenherzen isoliert wurden, nach Zugabe von Aktivatoren bzw. Inhibitoren des purinergen Signalsystems einerseits Analysen der Genexpression mittels quantitativer *real-time* PCR, andererseits Zytokinmessungen mittels Multiplex-*Assay* durchgeführt. Zudem wurde Caspase-1-Aktivität direkt mittels einer Lumineszenz-basierten Methode nachgewiesen. Die Ergebnisse erbrachten den Nachweis eines aktiven NLRP3-Inflammasoms in EPDC, das durch ATP über seinen Rezeptor $P2X_7$, aber auch in geringerem Maße durch Adenosin über A_{2B}, aktiviert werden kann. Die A_{2B}-Rezeptor-

abhängige IL-6 Induktion schien jedoch in EPDC unabhängig von der Inflammasomaktivität zu sein. Darüber hinaus konnte eine basale Expression von TNC in EPDC nachgewiesen werden.

Zusammengefasst deuten die Ergebnisse darauf hin, dass EPDC durch Bildung von TNC und extrazellulärem ATP ihr Inflammasom autokrin aktivieren könnten und so pro-inflammatorisches IL-1β produzieren. Die Freisetzung parakriner Faktoren hat unmittelbaren Einfluss auf das interstitielle Milieu, dem letztlich alle Zellen im Infarktgebiet ausgesetzt sind, die zusammen die Umbauprozesse nach MI bestimmen. Die weitere Erforschung des Potentials und Regulation der einzigartigen Zellpopulation der EPDC erscheint somit vielversprechend für die Entwicklung neuer therapeutischer Ansätze zur Vermeidung der gefürchteten Langzeitfolgen nach MI.

ABSTRACT

Ischemic heart diseases, including acute myocardial infarction (MI), are in worldwide statistics the leading cause of death, despite advancing therapeutic options. Cardiomyocytes that die in the infarcted area are replaced by a fibrous scar that impairs cardiac function. Over time, there is an increasing risk of cardiac insufficiency up to heart failure requiring a transplant. Epicardium-derived cells (EPDC) play a central role in embryonic heart development and contribute to the formation of coronary artery progenitors, fibroblasts and cardiomyocytes. In the adult heart, EPDCs are reactivated by MI and are thought to be an endogenous source of cells and particularly regulatory paracrine factors that can affect surrounding cells in the infarcted area. These include the pro-reparative cytokine IL-6, whose expression in EPDC is induced by extracellular adenosine via its receptor A_{2B}. In general, the production of IL-6 is highly regulated by the central pro-inflammatory cytokine IL-1β, which is produced by inflammasomes. These multiprotein complexes with caspase-1 as effector enzyme have already been detected in cardiomyocytes and cardiac fibroblasts as well as immune cells that infiltrate after MI. The NLRP3 inflammasome is the clinically most important type of inflammasome and can be activated by extracellular ATP via the receptors $P2X_4$ and $P2X_7$. EPDC can release ATP in an active manner, especially after activation of adenosine receptor A_{2B}. Since EPDC represent a unique cell population whose diverse biological profile has not been fully elucidated yet, the question arose, whether EPDC reactivated after MI also have an active inflammasome and to what extent purinergic signaling influences the potential inflammasome activation in these cells. In addition, there was the question, whether the previously described A_{2B} receptor-dependent induction of IL-6 in EPDC is inflammasome-dependent.

To investigate this, gene expression analyzes using quantitative real-time PCR and cytokine measurements using multiplex assays were performed after addition of purinergic signaling activators or inhibitors in cultivated adult EPDC isolated from rat hearts five days after surgically induced ischemia and reperfusion. In addition, caspase-1 activity was directly assessed using a luminescence-based assay. The results provided evidence of an active NLRP3 inflammasome in EPDC, which can be activated by ATP via its receptor $P2X_7$, but also to a lesser extent by adenosine receptor A_{2B} signaling. However, the A_{2B} receptor-dependent IL-6 induction appeared to be independent of inflammasome activity in EPDC. Additionally, a basal expression of TNC in EPDC could be detected.

Taken together, the results indicate that EPDC might activate their inflammasome in an autocrine manner by production of TNC and extracellular ATP, thereby releasing pro-inflammatory IL-1β. The release of paracrine factors has a direct impact on the interstitial environment to which all cells in the infarcted area are exposed, that together contribute to tissue remodeling after MI.

Further research regarding the potential and regulation of the unique cell population of EPDC may pave the way for the development of new therapeutic approaches targeting the detrimental consequences of MI.

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Einheiten

d	Tag	**mM**	Millimolar
g	Gramm	**ng**	Nanogramm
g	Erdbeschleunigung	**nm**	Nanometer
h	Stunde	**nM**	Nanomolar
kg	Kilogramm	**s**	Sekunde
l	Liter	**U**	*Units*/Einheiten
M	Molar	**w**	Woche
m	Monat	**µg**	Mikrogramm
mg	Milligramm	**µl**	Mikroliter
min	Minute	**µM**	Mikromolar
ml	Milliliter	**µm**	Mikrometer

Weitere Abkürzungen

A_{2A}R	Adenosin-Rezeptor A_{2A}	**CO_2**	Kohlenstoffdioxid
A_{2B}R	Adenosin-Rezeptor A_{2B}	**C_T-Wert**	*Cycle-threshold*
ADA	Adenosindeaminase	**DAMP**	*damage-associated molecular*
ADO	Adenosin		*pattern*
ADP	Adenosin-5‘-diphosphat	**DMSO**	Dimethylsulfoxid
AK	Adenosinkinase	**DNA**	Desoxyribonukleinsäure
AMP	Adenosin-5‘-monophosphat	**E-ADA**	Ekto-Adenosindeaminase
ASC	*Apoptosis-associated speck-like*	**EDTA**	Ethylendiamintetraessigsäure
	protein containing a CARD	**EGTA**	Polyamino-Carbonsäure
ATP	Adenosin-5‘-triphosphat	**EMT**	Epithelial-mesenchymale
ATPase	ATP spaltendes Enzym		Transition
C2TA	*MHC class II transcription*	**EPDC**	*Epicardium-derived cells*
	activator	**FACS**	*Fluorescence Activated Cell*
CARD	*Caspase activation and*		*Sorting* (Durchflusszytometrie)
	recruitment domain	**FBS**	Fötales Bovines Serum
CD	*Cluster of differentiation*	**FGF2**	*Fibroblast growth factor* 2
CD39	Ektonukleosidtriphosphat-	**FW**	*Forward*
	diphosphohydrolase 1	**Gp130**	Glykoprotein 130
CD73	Ekto-5’-Nukleotidase	**GSDMD-NT**	Gasdermin D N-Terminus
cDNA	Komplementäre DNA	**HEPES**	Biologischer Puffer

HET-E	*Incompatibility locus protein from Podospora anserina*
IL	Interleukin
IL-1R	IL-1-Rezeptor
IL-1R-AcP	IL-1R *accessory protein*
IL-1Ra	IL-1R Antagonist
K^+	Kalium
KCl	Kaliumchlorid
LPS	Lipopolysaccharid
LRR	*Leucin rich repeat*-Domäne
$MgCl_2$	Magnesiumchlorid
MI	Myokardinfarkt
NACHT	*NTPase domain, containing NAIP, C2TA, HET-E, TP1*
NaCl	Natriumchlorid
NAD	Nikotinamidadenindinukleotid
$NaHCO_3$	Natriumhydrogencarbonat
NAIP	*NLP family apoptosis inhibitor protein*
NFκB	*Nuclear factor kappa B*
NLP	*Nep1-like protein*
NLRP3	*NOD-like receptor family, pyrin-domain containing* 3
NOD	*Nucleotide-binding and oligo-merization domain*
NTC	*Non-Template-Control*
NTPase	Nukleosidtriphosphat spaltendes Enzym
$P2X_4R$	ATP-Rezeptor $P2X_4$
$P2X_7R$	ATP-Rezeptor $P2X_7$
$P2Y_2R$	UTP/ATP-Rezeptor $P2Y_2$
PAMP	*Pathogen-associated molecular pattern*
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
pH	Maß für den sauren/basischen Charakter einer Lösung
PRR	*Pattern recognition receptor*
PYD	Pyrin-Domäne
qRT-PCR	Quantitative *real-time polymerase chain reaction*
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	*Reactive oxygen species*
rpm	*Rounds per minute*
RT	Reverse Transkriptase
RV	*Reverse*
SEM	*Standard Error of the Mean*; Standardfehler des Mittelwerts
SMA	*α-smooth-muscle-actin*
TLR	*Toll-like* Rezeptor
TNC	Tenascin-C
TP1	Telomerase-assoziiertes Protein
UDP	Uridindiphosphat
UTP	Uridintriphosphat
VEGF	*Vascular endothelial growth factor*

INHALT

1 EINLEITUNG 1

1.1 Der Myokardinfarkt 1

1.2 EPDC (*epicardium-derived cells*) 2

1.3 Das purinerge Signalsystem 4

1.4 Das NLRP3-Inflammasom 7

1.4.1 Aufbau 7

1.4.2 Aktivierung 8

1.4.3 Die Rolle des NLRP3-Inflammasoms im Myokardinfarkt 11

1.5 Interleukine 12

1.5.1 IL-1β 12

1.5.2 IL-6 13

1.6 Ziele dieser Arbeit 13

2 MATERIAL UND METHODEN 15

2.1 Geräte und Apparaturen 15

2.2 Verbrauchsmaterialien 15

2.3 Chemikalien 16

2.4 Zellkulturmedien und Lösungen 17

2.5 *Kits* für Versuche und Messungen 17

2.6 Software 17

2.7 Gewinnung von EPDC 18

2.7.1 Tierversuche 18

2.7.2 Induktion des Herzinfarkts (Ischämie/Reperfusions-Modell) 18

2.7.3 Isolierung und Kultivierung der EPDC 18

2.8 Genexpressionsanalyse 19

2.8.1 Stimulationsbedingungen 19

2.8.2 RNA-Isolation 20

2.8.3 Bestimmung der RNA-Konzentration 21

2.8.4 Reverse Transkription 21

2.8.5 Quantitative *Real-Time* PCR 22

2.9 Analyse der Zytokinsekretion 25

2.9.1 Stimulationsbedingungen 25

2.9.2 Multiplex-*Assay* 25

2.10 Analyse der Caspase-1 Aktivität 27

2.10.1 Stimulationsbedingungen 27

2.10.2 Lumineszenz-*Assay* 28
2.11 Statistische Datenanalyse 29

3 ERGEBNISSE 30

3.1 Adenosin und ATP stimulieren die Expression von Pro-IL-1β und IL-6 in EPDC 30
3.2 EPDC exprimieren die Inflammasom-Komponenten NLRP3, ASC und Caspase-1 33
3.3 Adenosin und ATP stimulieren die Sekretion von IL-1β in EPDC 34
3.4 Die Sekretion von IL-1β in EPDC ist NLRP3-Inflammasom-abhängig 36
3.5 Das Inflammasom in EPDC beeinflusst die Sekretion von IL-6 38
3.6 Aktivierung des Inflammasoms in EPDC unter Serum-freien Bedingungen 40
3.7 Nachweis der Caspase-1-Aktivität in EPDC mittels Lumineszenz 41

4 DISKUSSION 43

4.1 EPDC exprimieren die notwendigen Komponenten für die Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms 43
4.2 Tenascin-C, ATP und Adenosin induzieren in EPDC die Pro-IL-1β-Expression *via* TLR4 43
4.3 ATP induziert in EPDC Inflammasom-abhängig die IL-1β-Sekretion durch Aktivierung des $P2X_7$-Rezeptors 45
4.4 Adenosin induziert in EPDC durch Aktivierung des A_{2B}-Rezeptors Inflammasom-unabhängig eine IL-6-Sekretion 46
4.5 Zusammenfassung und Ausblick 46

LITERATURVERZEICHNIS 50

1 Einleitung

1.1 Der Myokardinfarkt

Weltweit führen ischämische Herzkrankheiten, darunter der Myokardinfarkt (MI), die Liste der Todesursachenstatistik an (Weltgesundheitsorganisation, 2020). Zwar konnte die Sterblichkeit durch einen MI durch stetiges Fortschreiten von Diagnostik und Therapie in den letzten Jahrzehnten deutlich gesenkt werden, dennoch belegte der akute MI mit einem Anteil von 4,7% Platz vier der häufigsten Todesursachen 2019 in Deutschland, was 44.282 Verstorbenen entspricht (Deutsche Herzstiftung, 2021). Trotzdem die Therapie des akuten MI heutzutage weit fortgeschritten ist versterben weiterhin viele Patienten in der Frühphase. Die Patienten, die überleben, haben ein hohes Risiko in der Folge ein Herzversagen zu entwickeln. Entsprechend ist weitere Forschung zur Entwicklung zielgerichteter Therapieansätze nach MI angezeigt.

Das Herz ist ein muskuläres Hohlorgan, das kontinuierlich Blut durch den Körper pumpt, um diesen mit Sauerstoff und Nährstoffen zu versorgen. Um diese Leistung vollbringen zu können ist das Herz selbst auf eine hohe Sauerstoff- und Nährstoffversorgung angewiesen. Dafür ist es von einem Geflecht von Blutgefäßen umgeben, den Koronararterien, die sich kranzartig um das Herz legen. Die rechten und linken Hauptstämme entspringen direkt aus der Aortenwurzel und verzweigen sich im Verlauf vielfach bis zu einem dichten Kapillarnetz. Hier findet der Sauerstoffaustausch mit den Herzmuskelzellen (Kardiomyozyten) statt. Kommt es nun zu einem Verschluss einer der Koronararterien, zum Beispiel durch Bildung eines Plaques, wird das von ihr versorgte Gebiet nicht mehr ausreichend mit Sauerstoff und Nährstoffen versorgt. In dessen Folge sterben Kardiomyozyten ab.

Nekrotische Kardiomyozyten und geschädigte Extrazelluläre Matrix setzen Schaden-assoziierte Botenstoffe (*Damage-associated molecular patterns* = DAMPs) frei, woraufhin eine komplexe Reihe von Vorgängen zur Wundheilung eingeleitet wird. So wird die angeborene Immunabwehr in den umliegenden Zellen aktiviert und die Infiltration von Leukozyten in die Infarktregion gesteigert. Zudem werden die zahlreichen kardialen Fibroblasten aktiviert. So wird dafür gesorgt, dass die abgestorbenen Kardiomyozyten abgebaut und proinflammatorische Zyto- und Chemokine freigesetzt werden (Prabhu and Frangogiannis, 2016). In dieser ersten Phase des MI kommt es zu einer starken Entzündungsreaktion. In Fibroblasten wird das Inflammasom aktiviert und so Interleukin (IL)-1β sezerniert. Dieses und andere freigesetzte proinflammatorische Zytokine verzögern die Transition in Myofibroblasten, bis abgestorbene Kardiomyozyten und Matrixtrümmer aus der Infarktregion beseitigt sind (Shinde and Frangogiannis, 2014). Im Anschluss werden die zuvor eingewanderten Leukozyten von Makrophagen beseitigt und die nächste Phase der Wundheilung eingeleitet (Prabhu and Frangogiannis, 2016).

In dieser zweiten Phase der Wundheilung nach MI klingt die Inflammation ab und die Narbenbildung rückt in den Vordergrund. In dieser Phase sind Fibroblasten der vorherrschende Zelltyp. Sie differenzieren zu Myofibroblasten (Prabhu and Frangogiannis, 2016). Es konnte nachgewiesen werden, dass sich auch epikardiale Progenitorzellen aus dem aktivierten Epikard, *epicardium-derived-cells* (EPDC), die die Infarktregion besiedeln, in besonderem Maße in Myofibroblasten transdifferenzieren (Ruiz-Villalba et al., 2015). Myofibroblasten exprimieren neben kontraktilen Proteinen, wie *α-smooth-muscle-actin* (SMA), in hohem Maße Matrixproteine, so dass eine bindegewebige Narbe gebildet wird (Shinde and Frangogiannis, 2014). Dieses Narbengewebe ist nicht kontraktionsfähig und nimmt somit nicht mehr aktiv an der Herzaktion teil. In Folge dessen kommt es im Verlauf nach MI zu einer eingeschränkten linksventrikulären Pumpleistung, woraufhin die Herzwand dilatiert und weiteren Umbauprozessen unterliegt (Hashimoto et al., 2018). Diese Umbauprozesse nach MI werden unter dem Begriff *Remodeling* zusammengefasst (Cohn et al., 2000). Aktuelle medikamentöse Therapien nach MI haben das Ziel, das *Remodeling* zu verlangsamen oder zu reduzieren um das drohende Herzversagen zu verzögern bzw. zu verhindern. Im Endstadium bleibt jedoch oft nur eine Herztransplantation als einzige Therapieoption.

1.2 EPDC (epicardium-derived cells)

Wie in Abbildung 1 schematisch dargestellt kommt es nach einem MI im Randbereich des Infarktgebietes zu einer Aktivierung des einschichtigen intakten Epikards. Von dort aus wird eine neue Epikardschicht über dem Infarktgebiet gebildet. Einige Zellen des Epikards durchlaufen eine epithelial-mesenchymale-Transition (EMT) und bilden so epikardiale Vorläuferzellen, sogenannte EPDC. Diese wandern in den subepikardialen Raum (van Wijk et al., 2012). Hierdurch verdickt sich die subepikardiale Zellschicht deutlich und erreicht nach vier bis sieben Tagen ihr Maximum von 120-150 µm (Z. Ding et al., 2016). Zudem differenzieren sich aktivierte EPDC in glatte Muskelzellen, Fibroblasten und Myofibroblasten. Ob sie darüber hinaus auch in das Myokard immigrieren und in Kardiomyozyten differenzieren ist bisher nicht abschließend geklärt (Limana et al., 2007), wobei Smart et al., 2011 zeigen konnten, dass sich nach MI aktivierte EPDC durch Stimulation mit Thymosin β4 zu Kardiomyozyten weiterentwickelten (Smart et al., 2011). Im Umfeld des MI setzen EPDC funktionell wichtige parakrine Faktoren frei, wie die Wachstumsfaktoren *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) und *Fibroblast Growth Factor 2* (FGF2), die eine gesteigerte Angiogenese im umliegenden Gewebe induzieren (Zhou et al., 2011). Dabei unterliegt die Sekretion von VEGF einer A_{2B}-Rezeptor ($A_{2B}R$) vermittelten Regulation durch Adenosin (Hesse et al., 2017).

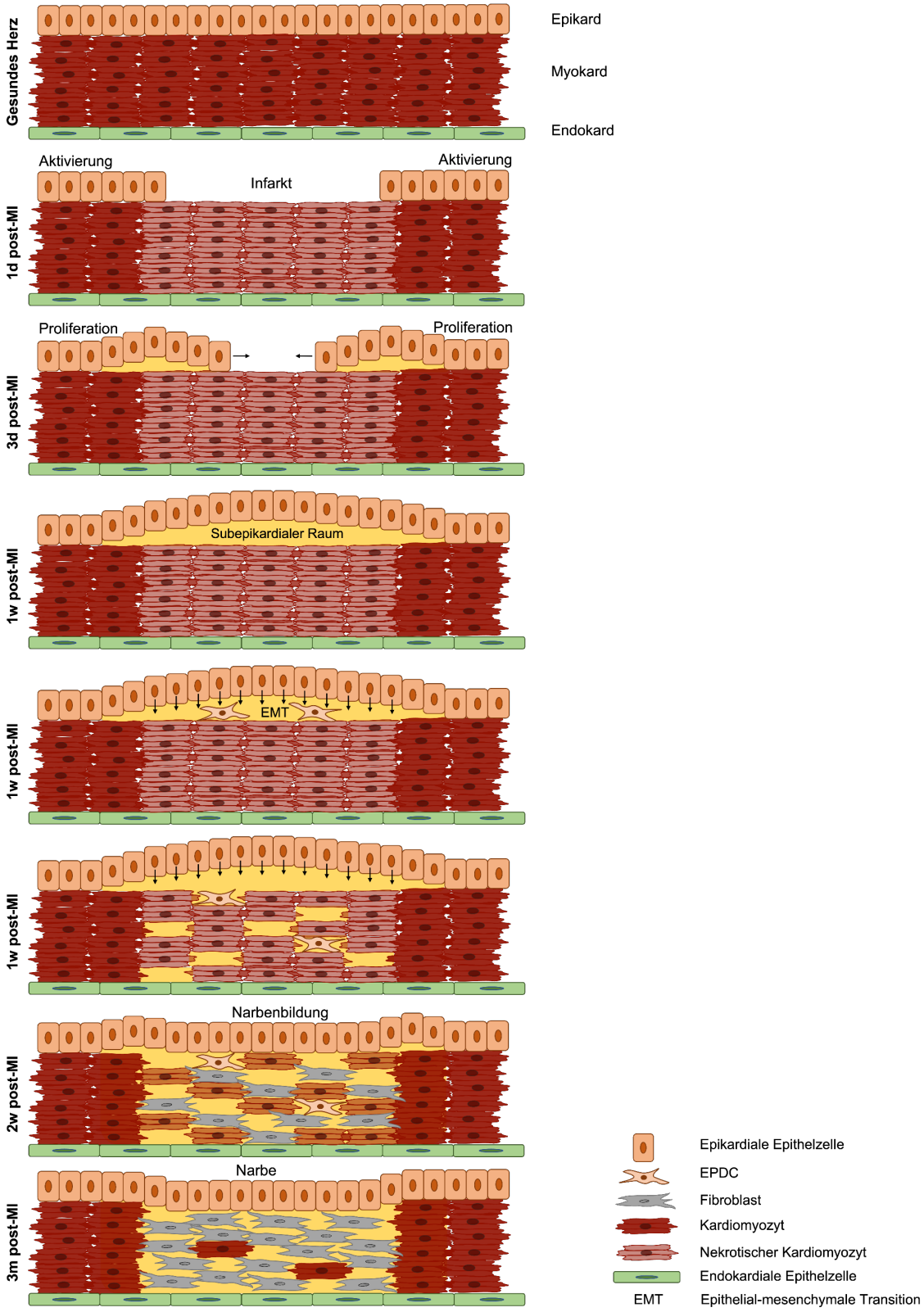

Abb. 1: Schematische Darstellung der strukturellen Veränderungen nach Myokardinfarkt (MI) im zeitlichen Verlauf (adaptiert nach van Wijk et al., 2012). Nach MI wird das im Randbereich des Infarktgebietes gelegene einschichtige Epikard aktiviert und eine neue Epikardschicht ausgebildet. Einige Zellen des aktivierten Epikards durchlaufen eine epithelial-mesenchymale Transition (EMT) und bilden so epikardiale Vorläuferzellen, sogenannten EPDC. Diese wandern in das infarzierte Myokard ein und differenzieren im Infarktgebiet unter Anderem zu Fibroblasten und sind so maßgeblich an der Narbenbildung nach MI beteiligt. d: Tage; w: Wochen; m: Monate.

Die Infarkt-induzierte Aktivierung des Epikards rekapituliert ein embryonales Programm der Herzentwicklung (Gittenberger-de Groot et al., 2010). Das Herz entwickelt sich aus einem primitiven endokardialen Herzschlauch, der allmählich von einem Myokardmantel umgeben wird. Aus der proepikardialen Anlage, dem Proepikard, entwickelt sich das Epikard und überwächst die Myokardanlage sekundär (Moore, Keith L. et al., 2007). Für die regelhafte Weiterentwicklung des Myokards und der Koronararterien sind Signale aus dem Epikard notwendig. Auch hier entstehen aus einigen Zellen des Epikards durch EMT die epikardialen Vorläuferzellen EPDC, die in den subepikardialen Raum und ins Myokard wandern (Carmona et al., 2010) und von dort aus Einfluss auf die embryonale kardiale Entwicklung nehmen. So gehen aus ihnen diverse Zellen des kardiovaskulären Systems hervor, darunter interstitielle Fibroblasten, glatte Muskelzellen der Gefäßwand (u. A. der Koronarien), Endothelzellen und Kardiomyozyten (Zhou et al., 2008; Smart et al., 2013) (Abb. 2).

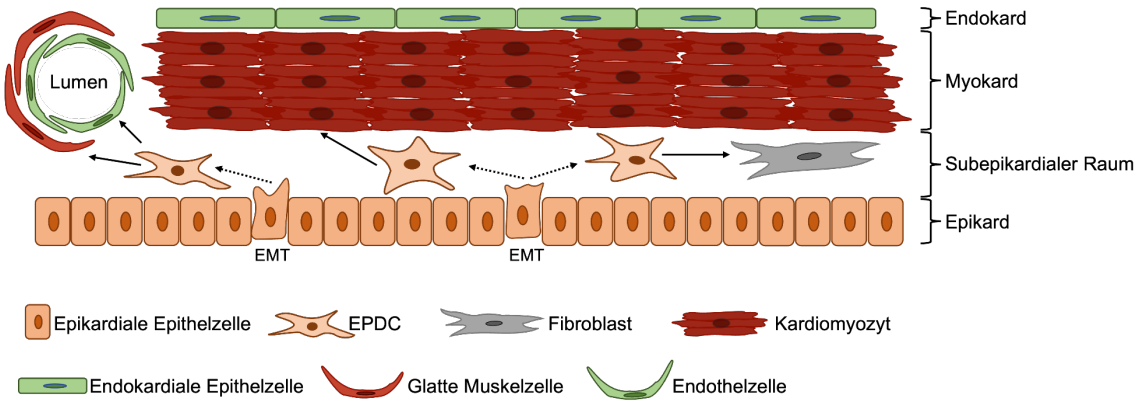

Abb. 2: Schematische Darstellung des Ursprungs und der Differenzierung embryonaler *epicardium-derived cells* (EPDC). EPDC gehen aus Zellen des Epikards hervor, indem diese eine epithelial-mesenchymale Transition (EMT) durchlaufen und wandern in den subepikardialen Raum. Von hier aus differenzieren sie im Rahmen der embryonalen Herzentwicklung in verschiedene Zellreihen: Glatte Gefäßmuskelzellen, Endothelzellen, Fibroblasten und Kardiomyozyten

1.3 Das purinerge Signalsystem

Das natürlich vorkommende Molekül Adenosin-5‘-triphosphat (ATP) ist ein Nukleotid bestehend aus der Purinbase Adenin, einem Zuckermolekül und drei Phosphatresten. Es ist der universelle Energielieferant des Körpers und in jeder lebenden Zelle vorhanden. Der Großteil des im Körper vorkommendem ATP befindet sich intrazellulär (3-10 mM) (Bours et al., 2006) und dient der Energiebereitstellung. Dort wird im Rahmen der Atmungskette durch enzymatische Abspaltung der Phosphatreste Energie freigesetzt, die für weitere Stoffwechselprozesse genutzt wird. Nach Abspaltung aller drei Phosphatgruppen entsteht das Nukleosid Adenosin (Horn, 2009). Die

extrazelluläre Konzentration von ATP ist deutlich geringer (400-700 nM), die seines Metaboliten Adenosin sogar noch geringer (40-80 nM) (Bours et al., 2006). Im extrazellulären Raum werden ATP und seine Metabolite über die membranständigen Enzyme Ektonukleosid-triphosphatdiphosphohydrolase 1 (CD39) bzw. Ekto-5‘-Nukleotidase (CD73) hydrolysiert, wodurch letztlich Adenosin entsteht. Adenosin kann nun über einen Nukleosidtransporter entlang eines Konzentrationsgefälles in die Zelle bzw. aus der Zelle transportiert, oder weiter zu Inosin abgebaut werden (Abb. 3). So kann ein dynamisches, physiologisches Gleichgewicht der Metabolite aufrecht erhalten werden.

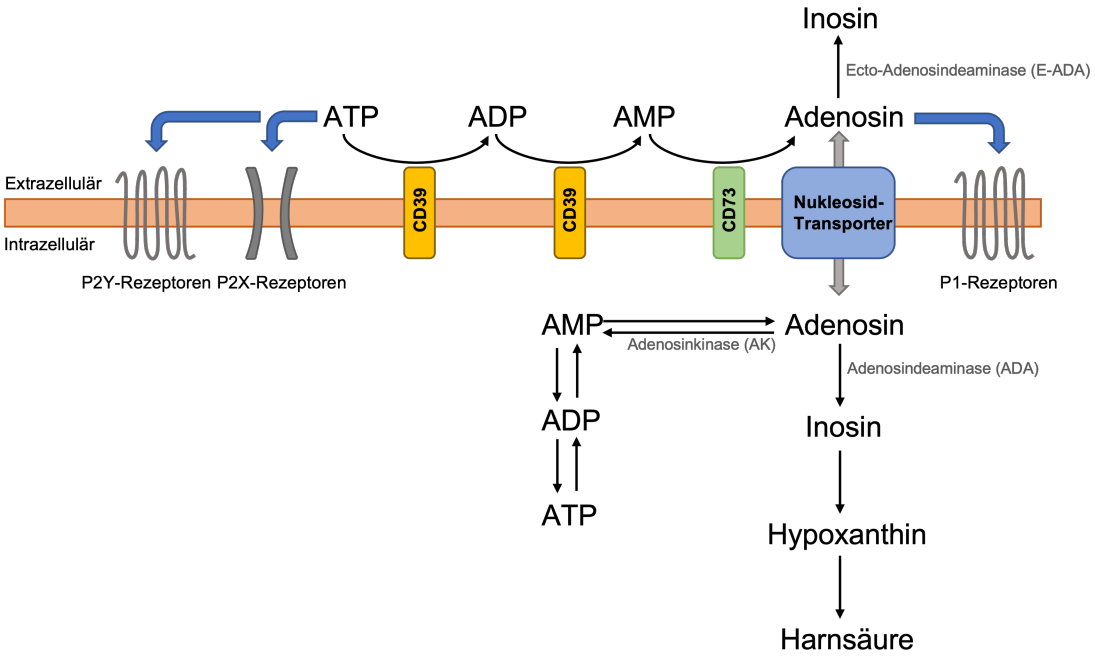

Abb. 3: Vereinfachte, schematische Darstellung des Metabolismus von ATP zu Adenosin. Extrazelluläres Adenosin-5‘-Triphosphat (ATP) ist ein Ligand der purinergen P2X- und P2Y-Rezeptorfamilie. Zudem wird extrazelluläres ATP durch die membranständige Ektonukleosidtriphosphatdiphosphohydrolase 1 (CD39) über Adenosin-5‘-Diphosphat (ADP) zu Adenosin-5‘-Monophosphat (AMP) hydrolysiert, welches durch die Ekto-5‘-Nukleotidase (CD73) zu Adenosin hydrolysiert wird. Adenosin kann nun extrazellulär an die purinerge P1-Rezeptorfamilie binden oder durch die Ekto-Adenosindeaminase (E-ADA) irreversibel zu Inosin katalysiert werden. Durch einen Nukleosid-Transporter gelangt Adenosin einem Konzentrationsgradienten folgend in die Zelle. Dort wird es entweder durch die Adenosinkinase (AK) wieder zu AMP phosphoryliert oder durch die intrazelluläre Adenosin-Deaminase (ADA) irreversibel zu Inosin degradiert, das dann über Hypoxanthin weiter zu Harnsäure abgebaut wird.

Ihre Wirkung entfalten ATP und seine Metabolite über eine Vielzahl unterschiedlicher membranständiger Rezeptoren. Es gibt zwei purinerge Rezeptorfamilien, P1- und P2-Rezeptoren, die sich jeweils in weitere Subtypen unterteilen und ihre jeweiligen Liganden (Tabelle 1) mit unterschiedlicher Affinität binden. Nahezu jede Zelle exprimiert purinerge Rezeptoren auf ihrer

Oberfläche, das jeweilige Muster unterscheidet sich jedoch stark zwischen den Zellarten. Auch die entfaltete Wirkung nach Rezeptorbindung ist abhängig von der jeweiligen Zielzelle sowie der Konzentration des Liganden (Bours et al., 2006). Sowohl bei P1- als auch bei P2Y-Rezeptoren handelt es sich um G-Protein-gekoppelte 7-Transmembranhelix-Rezeptoren, die nach Aktivierung durch ihre Liganden eine intrazelluläre Signalkaskade in Gang setzen. P2X-Rezeptoren hingegen sind ligandengesteuerte Ionenkanäle, die nach Bindung ihres Liganden ATP eine für Kationen (z. B. Natrium-, Kalzium- und Kaliumionen) unselektive Pore in der Membran bilden (Di Virgilio et al., 2001).

Rezeptorsubtyp	Physiologische Liganden
P1-Rezeptoren	
A_1	Adenosin, Inosin
A_{2A}	Adenosin, Inosin
A_{2B}	Adenosin
A_3	Adenosin, Inosin
P2-Rezeptoren	
P2X	
$P2X_{1-7}$	ATP
P2Y	
$P2Y_1$	ADP
$P2Y_2$	UTP, ATP
$P2Y_4$	UTP, ATP, UDP
$P2Y_6$	UDP, UTP
$P2Y_{11}$	ATP
$P2Y_{12}$	ADP
$P2Y_{13}$	ADP, ATP
$P2Y_{14}$	UDP-Glukose

Tabelle 1: Übersicht der purinergen P1- und P2-Rezeptor-Subtypen und deren physiologische Liganden (nach Bours et al., 2006). ATP: Adenosin-5'-Triphosphat; ADP: Adenosin-5'-Diphosphat; UTP: Uridintriphosphat; UDP: Uridindiphosphat.

Im extrazellulären Raum fungieren sowohl ATP als auch Adenosin als wichtige Regulatoren entzündlicher und immunologischer Prozesse im Körper. Im Rahmen von zum Beispiel Inflammation, Hypoxie, Ischämie sowie Gewebeschäden können die extrazellulären Nukleotid- und Nukleosid-Konzentrationen bis in den mikromolaren Bereich ansteigen (Bours et al., 2011). Als zentraler Mediator des Immunsystems entfaltet Adenosin eine überwiegend anti-inflammatorische und somit protektive Wirkung, wobei für den Rezeptor-Subtyp A_{2B} auch von einem pro-inflammatorischen Effekt berichtet wurde (Pasquini et al., 2021). Im Gegensatz zu Adenosin hat ATP eine überwiegend pro-inflammatorische Wirkung. Neben der Induktion der

Migration neutrophiler Leukozyten und der Stimulation von Expression und Sekretion pro-inflammatorischer Zytokine wie IL-1β, fungiert ATP selbst als DAMP und triggert so das angeborene Immunsystem (Bours et al., 2011). Insbesondere der $P2X_7R$-vermittelten Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms kommt eine zentrale Bedeutung der pro-inflammatorischen Wirkung von ATP zu (Labasi et al., 2002). Eine Störung des dynamischen Gleichgewichts des purinergen Systems zugunsten der pro-inflammatorischen Komponente spielt bei der Entwicklung von Autoimmunkrankheiten eine tragende Rolle (Di Virgilio, 2013).

Hesse et al. konnten 2017 zeigen, dass nach MI reaktivierte EPDC aus Rattenherzen ein spezifisches Muster an purinergen Rezeptoren exprimieren. Aus der Gruppe der P1-Rezeptoren insbesondere A_{2A} und A_{2B} sowie aus der Gruppe der P2-Rezeptoren $P2X_4$, $P2X_7$ und $P2Y_2$. Nach Stimulation des Adenosinrezeptors A_{2B} mit einem spezifischen Agonisten konnte eine gesteigerte Sekretion von IL-6 und IL-10 beobachtet werden. Interessanterweise steigerte die Stimulation des A_{2B}-Rezeptors auch die Freisetzung von ATP und Nikotinamidadenindinukleotid (NAD) aus intrazellulären Vesikeln (Hesse et al., 2017), was zu der von Pasquini et al. berichteten pro-inflammatorischen Komponente dieses Rezeptorsubtyps zu passen scheint.

1.4 Das NLRP3-Inflammasom

1.4.1 Aufbau

Inflammasome sind zytoplasmatische Multiproteinkomplexe, die dem angeborenen Immunsystem angehören und überwiegend in Makrophagen und dendritischen Zellen zu finden sind (Kummer et al., 2007). Sie wurden erstmals durch Martinon im Jahr 2002 beschrieben (Martinon et al., 2002). Nach Aktivierung prozessieren sie die proinflammatorischen Interleukine pro-IL-1β und pro-IL-18 in deren aktive Form (de Zoete et al., 2014). Es gibt verschiedene Unterformen der Inflammasome, darunter das NLRP3-Inflammasom, welches in dieser Arbeit im Fokus steht.

NLRP3-Inflammasome sind Proteinkomplexe, die sich aus dem Sensorprotein *NOD-like receptor family, pyrin domain containing* 3 (NLRP3), dem Bindeprotein *apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD* (ASC) und dem Effektorenzym Caspase-1 zusammensetzen (Schroder et al., 2010).

NLRP3 ist einer von vier bekannten *inflammasome-forming pattern recognition receptors* (PRR) (Elliott and Sutterwala, 2015). Es setzt sich aus einer *leucin rich repeat*-Domäne (LRR) am C-Terminus, einer zentralen NACHT (NAIP, C2TA, HET-E, TP1)-Domäne sowie einer Pyrin-Domäne (PYD) am N-Terminus zusammen (Mangan, MSJ et al., 2018). Man geht davon aus, dass mit der LRR-Domäne exogene Pathogene oder sterile Agenzien direkt oder indirekt erkannt

werden und der Zusammenbau und die Aktivierung des Inflammasoms eingeleitet wird. Die NACHT-Domäne besitzt unter anderem eine ATPase-Funktion und ist an der Oligomerisation von NLRP3 beteiligt (Duncan et al., 2007). Die PYD hält das NLRP3 einerseits in seiner inaktiven Form und wird andererseits nach Aktivierung für die Bindung an das Bindeprotein ASC benötigt (Hafner-Bratkovič et al., 2018). ASC setzt sich ebenfalls aus einer PYD sowie aus einer *caspase activation and recruitment*-Domäne (CARD) zusammen. Wird nun ein aktivierendes Agens erkannt verbindet sich die PYD des NLRP3 mit der PYD des ASC. Dieses wiederum interagiert mit seiner CARD mit der CARD der noch inaktiven pro-Caspase-1. Diese drei Proteine bilden Oligomere, die sich wiederum zu einem Multiproteinkomplex zusammensetzen, dem Inflammasom (Elliott and Sutterwala, 2015) (Abb. 4). Durch die so entstandene räumliche Nähe der pro-Caspase-1-Proteine spalten sich diese selbst zu aktiver Caspase-1 (Latz et al., 2013). Diese spaltet nun die inaktiven Vorstufen pro-IL-1β und pro-IL-18 zu aktivem IL-1β bzw. IL-18.

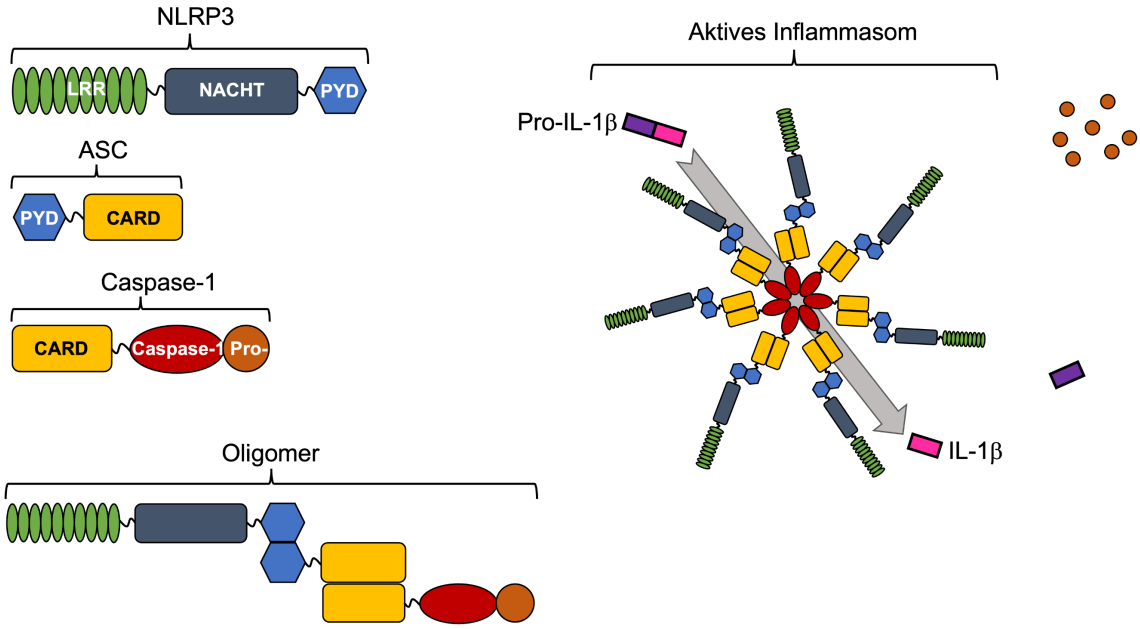

Abb. 4: Schematische Darstellung des NLRP3-Inflammasoms. Das NLRP3-Inflammasom besteht aus drei Komponenten die sich zu Oligomeren zusammenfügen: dem Sensorprotein NLRP3, dem Bindeprotein ASC und dem noch inaktiven Effektorenzym Pro-Caspase-1. Sieben dieser Oligomere fügen sich zu dem Multiproteinkomplex des Inflammasoms zusammen, wodurch Caspase-1 durch Autolyse aktiviert wird. Das nun aktive Inflammasom spaltet inaktives Pro-IL-1β zu aktivem IL-1β. NLRP3: NOD-*like receptor family, pyrin domain containing 3*; ASC: *apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD*; LRR: *leucin rich repeat-Domäne*; NACHT: *(NAIP, C2TA, HET-E, TP1)*-Domäne; PYD: *Pyrin-Domäne*; CARD: *caspase activation and recruitment*-Domäne; IL: Interleukin.

1.4.2 Aktivierung

Die Mechanismen zur Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms sind sehr komplex und bis heute nicht vollständig verstanden. Aktuell geht man von verschiedenen Signalwegen aus, dem kanonischen Signalweg, dem nicht-kanonischen Signalweg und dem alternativen Signalweg

(Seoane et al., 2020). Die vorliegende Arbeit befasst sich vorzugsweise mit dem kanonischen Signalweg. Beim diesem Signalweg sind zwei Schritte zur NLRP3-Inflammasomaktivierung notwendig, wie in Abbildung 5 vereinfacht dargestellt: das *Priming* und schließlich die Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms an sich, wobei beide Schritte nacheinander oder simultan ablaufen können (Lin et al., 2014).

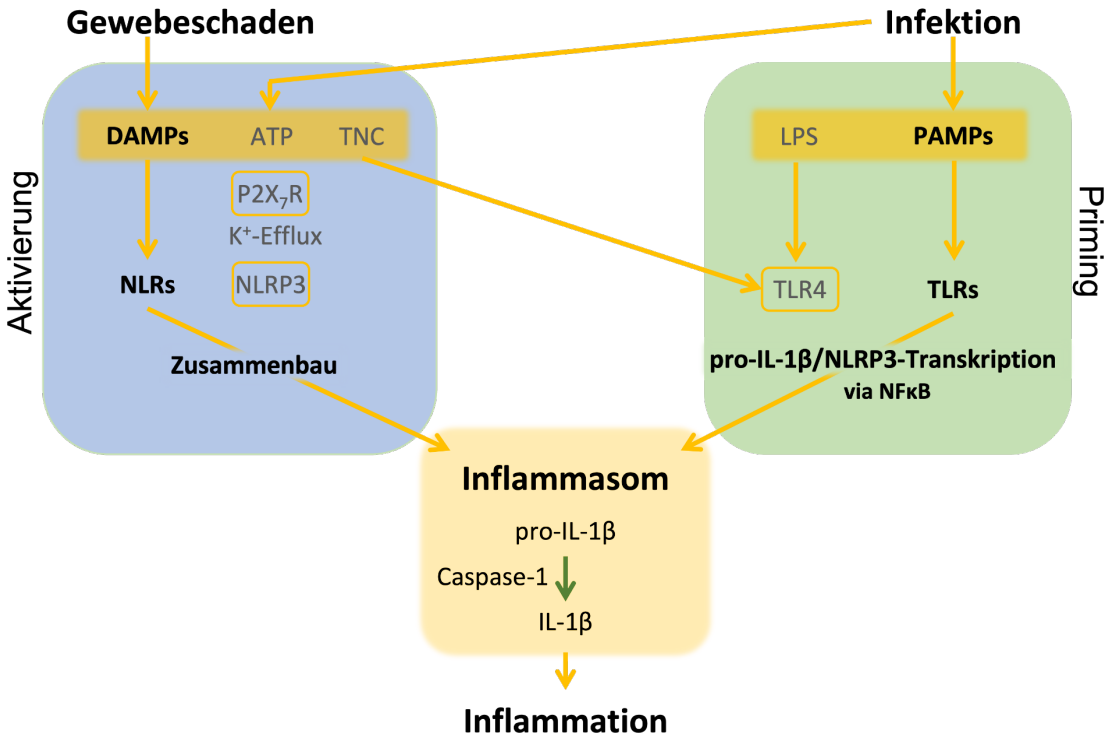

Abb. 5: Schematische Darstellung der NLRP3-Inflammasomaktivierung. Für die Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms sind zwei Schritte notwendig: 1. Das *Priming* zur Bereitstellung von pro-IL-1β als Substrat für Caspase-1 und NOD-*like-receptor family, pyrin domain containing* 3 (NLRP3) als Baustein für das Inflammasom. 2. Die Aktivierung von NOD-*like receptors* (NLRs), die den Zusammenbau des Inflammasomkomplexes auslöst. Im Rahmen des *Primings* werden diverse *Pathogen associated molecular patterns* (PAMPs) durch *Toll-like receptors* (TLRs) erkannt und *via Nuclear factor kappa* B (NFκB) die Transkription von pro-IL1β bzw. NLRP3 gesteigert. Ein typisches PAMP ist bakterielles Lipopolysaccharid (LPS), das über den TLR4 das Priming vermitteln kann. Aber auch das matrizelluläre Protein Tenascin-C (TNC) als bekannter körpereigener Aktivator von TLR4 kann bei sterilen Entzündungen das *Priming* aktivieren. Im Rahmen der Aktivierung triggern diverse *Damage associated molecular patterns* (DAMPs) über NLRs den Zusammenbau des Inflammasomkomplexes. Zu den DAMPs zählt nach Gewebeschaden auftretendes extrazelluläres Adenosin-5'-Triphosphat (ATP), das über seinen Rezeptor $P2X_7$ ($P2X_7R$) eine unselektive Pore in die Zellmembran einbaut und so einen Kaliumausstrom verursacht. Zu den als Sensorprotein dienenden NLRs gehört NLRP3, das diverse DAMPs erkennt, inkl. den durch $P2X_7R$-vermittelten Kaliumausstrom, und den Zusammenbau des Inflammasomkomplexes einleitet. Das nun aktive NLRP3-Inflammasom spaltet durch aktive Caspase-1 die inaktive Vorstufe pro-IL-1β in aktives IL-1β, das im Wesentlichen eine pro-inflammatorische Wirkung besitzt. Allgemeine Begriffe zum Mechanismus der Inflammasomaktivierung sind in schwarzer Schrift und fettgedruckt formatiert. Begriffe zum angeführten Beispiel einer LPS- und ATP-vermittelten Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms sind in grauer Schrift dargestellt. IL: Interleukin; K^+: Kalium.

Als *Priming* wird die *Toll-like-Receptor* 4 (TLR4)-vermittelte Steigerung der Expression sowohl von pro-IL-1β als Substrat für Caspase-1, als auch des essentiellen Bausteins NLRP3 verstanden. Aus früheren Arbeiten ist bereits bekannt, dass bakterielles Lipopolysaccharid (LPS) als *Priming*-Stimulus die Transkription und Expression von pro-IL-1β triggert (Zasłona et al., 2017). Neben diesem exogenen Stimulus kann das *Priming* auch durch endogene Stimuli, wie das extrazelluläre Matrixprotein Tenascin-C (TNC) als bekannter TLR4-Ligand, erfolgen (Midwood et al., 2009). Während die basalen Expressionsraten von ASC und pro-Caspase-1 in der Zelle relativ hoch sind und somit für das Inflammasom jederzeit ausreichend verfügbar sind, ist die basale Expressionsrate von NLRP3 in der Zelle sehr gering. Damit ist NLRP3 der limitierende Faktor für den Zusammenbau des NLRP3-Inflammasoms bei Auftreten eines aktivierenden Stimulus (Hornung and Latz, 2010). In Maus-Makrophagen konnte gezeigt werden, dass eine TLR4-vermittelte *Nuclear factor kappa* B (NF-κB)-Aktivierung eine entscheidende Rolle bei der Expression von NLRP3 spielt (Bauernfeind et al., 2009).

Die Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms kann durch eine Vielzahl unterschiedlicher Stressoren erfolgen. Darunter sind Bestandteile aus Bakterien, Viren, Pilzen und Protozoen, die *Pathogen-associated molecular patterns* (PAMPs). Neben diesen exogenen Liganden gibt es jedoch auch eine Vielzahl an endogenen Agenzien, die *Damage-associated molecular patterns* (DAMPs) (Boza et al., 2016). Wegen dieser großen Anzahl verschiedener Aktivatoren geht man davon aus, dass nicht alle direkt durch den Sensor erkannt werden, sondern dass einige das Inflammasom indirekt aktivieren. Hier haben sich drei Modelle als wahrscheinlich erwiesen, die folgend näher erläutert werden: das Ionen-Fluss-Modell, das Lysosom-Ruptur-Modell sowie das *reactive oxygen species* (ROS)-Modell (de Zoete et al., 2014).

Im Ionen-Fluss-Modell spielen Ionenverschiebungen zwischen extra- und intrazellulärem Raum eine Rolle. Insbesondere ein Kaliumausstrom aus der Zelle wurde als relevanter Auslöser für die Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms identifiziert. Dieser wird in besonderem Maße durch extrazelluläres ATP über den $P2X_7R$ vermittelt (Di Virgilio, 2013). Durch die nach ATP-Bindung gebildete unselektive Pore in der Zellmembran kommt es zu einem starken und schnellen Kaliumausstrom aus der Zelle. Neben Kalium scheint auch Calcium eine Rolle bei der Inflammasomaktivierung zu spielen, wobei die Mechanismen bisher nicht ausreichend erforscht sind (Elliott and Sutterwala, 2015).

Beim Lysosom-Ruptur-Modell werden Pathogene phagozytiert und im Lysosom abgebaut. Ist dieses System fehlerhaft oder überlastet, rupturieren die mit Pathogenen und proteolytischen Enzymen gefüllten Lysosomen im Zytosol (Latz et al., 2013). Eines dieser Enzyme, Cathepsin B, wurde als Trigger für die folgende Inflammasomaktivierung identifiziert, wobei der genaue Wirkmechanismus bisher ungeklärt ist (Halle et al., 2008). Hoegen et al. beschrieben 2011, dass

eine Destabilisierung von Lysosomen oder die Neutralisation des sauren intralysosomalen pH ausreichen, um Cathepsin B freizusetzen, auch wenn die Membran des Lysosoms nicht rupturiert (Hoegen et al., 2011).

Beim ROS-Modell werden durch verschiedene Mechanismen Sauerstoffradikale in erhöhter Konzentration gebildet und freigesetzt, so dass die Zelle oxidativem Stress ausgesetzt wird. Dieser scheint ein Trigger für die Inflammasomaktivierung zu sein. Die genauen Mechanismen sind bisher jedoch wenig verstanden und werden kontrovers diskutiert (de Zoete et al., 2014). Es wird vermutet, dass ROS eine Rolle im Rahmen des *Priming* innehaben, in dem sie die Genexpression von NLRP3 beeinflussen (Bauernfeind et al., 2011).

Nach Aktivierung und Zusammenbau des Inflammasomkomplexes spaltet aktivierte Caspase-1 pro-IL-1β und pro-IL-18 in deren aktive Form IL-1β bzw. IL-18. Neben den pro-inflammatorischen Zytokinen IL-1β und IL-18 spaltet aktive Caspase-1 zudem das Protein Gasdermin D, dessen N-Terminus eine porenbildende Funktion hat und durch Oligomerisation von 16 Untereinheiten eine Pore (GSDMD-NT-Pore) mit einem Innendurchmesser von 10-14 nm in die Zellmembran inseriert (J. Ding et al., 2016). Über diese Pore wird einerseits das durch Caspase-1 aktivierte IL-1β bzw. IL-18 sezerniert, anderseits gelangen darüber weitere Zellinhalte aus der Zelle heraus. Durch die Größe der Pore wird die normale Permeabilität der Zellmembran aufgehoben, so dass extrazelluläres Wasser in die Zelle einströmt und diese anschwillt. Werden nur wenige dieser Poren in die Zellmembran eingebaut, so kann die Zelle durch natürliche Reparaturmechanismen gegensteuern und so die Integrität der Zellmembran wiederherstellen. Bei einer zu großen Anzahl an Poren versagen diese Mechanismen jedoch, was letztlich zur Lyse und somit zum Zelltod führt. Diese Gasdermin D-abhängige Form des Zelltods ist eine inflammatorische Variante des programmierten Zelltods, die Pryoptose (Huang et al., 2021).

1.4.3 Die Rolle des NLRP3-Inflammasoms im Myokardinfarkt

Wie in Kapitel 1.1 bereits erwähnt kommt es in der frühen Phase des MI zu einer starken Entzündungsreaktion. Im Rahmen des durch die Ischämie verursachten Zelluntergangs wird neben Zelltrümmern vermehrt ATP aus den absterbenden Kardiomyozyten freigesetzt. In der Frühphase des MI aktiviert ATP über den $P2X_7R$ in Leukozyten, Endothelzellen und Fibroblasten der Infarktregion das Inflammasom (Mezzaroma et al., 2011), das zu den notwendigen Heilungsprozessen nach MI entscheidend beiträgt (Mauro et al., 2019). Auch die Zelltrümmer werden als DAMPs durch NLRP3 erkannt und somit das Inflammasom aktiviert. Neben dieser initialen Entzündungsphase nach Ischämie und anschließender Reperfusion konnten Mezzaroma et al., 2011 nachweisen, dass nach etwa sieben Tagen auch in an die Infarktregion angrenzenden überlebenden Kardiomyozyten das NLRP3-Inflammasom und somit Caspase-1 aktiviert wurde.

Im Gegensatz zu anderen Zellarten sezernierten Kardiomyozyten jedoch kein IL-1β, was bereits Kawaguchi et al., 2011 beobachteten. Stattdessen führte die Aktivierung von Caspase-1 zur Pryoptose der Kardiomyozyten, was in einem zusätzlichen Untergang von funktionalem Myokard und somit weiterer Ausdehnung des Infarktareals resultierte. Dies wiederum hatte vermehrtes *Remodeling* und somit letztlich progredientes Herzversagen zur Folge. In weiterführenden Versuchen konnten Mezzaroma et al. durch pharmakologische Hemmung bzw. Stummschalten der RNA von $P2X_7R$ bzw. NLRP3 die Aktivierung des Inflammasoms hemmen und dadurch weiteren Myokarduntergang und somit die Ausdehnung des Infarktareals reduzieren (Mezzaroma et al., 2011). Somit ist das NLRP3-Inflammasom nicht nur an der Vermittlung und Aufrechterhaltung der Entzündung und Heilung in der Frühphase des MI beteiligt, sondern hat maßgeblichen Einfluss auf das folgende *Remodeling* und somit das Ausmaß der Herzschädigung.

1.5 Interleukine

Interleukine (IL) gehören zu der Gruppe der Zytokine. Sie zählen zu den Peptidhormonen und sind lösliche Proteine die als Botenstoffe der Zellen des Immunsystems fungieren. Sie sind beteiligt an Immun- und Entzündungsreaktionen und vermitteln ihre Wirkung über meist spezifische Rezeptoren auf den Zielzellen. Aktuell sind 38 Interleukine bekannt mit jeweils spezifischen Rezeptoren und entsprechenden spezifischen Wirkungen (Akdis et al., 2016). Im Folgenden wird auf die für diese Arbeit relevanten IL-1β und IL-6 eingegangen.

1.5.1 IL-1β

IL-1 ist ein stark pro-inflammatorisches Zytokin, das nahezu jeden Zelltyp beeinflusst. Dabei ist der Grat zwischen gesunder entzündlicher Reaktion und schädlicher Wirkung für den Körper sehr schmal. Folglich müssen Expression, Sekretion und Wirkung von IL-1 strengen Kontrollmechanismen unterliegen. Es gibt zwei IL-1-Subtypen, IL-1α und IL-1β. Beide werden als Vorstufen Pro-IL-1α bzw. Pro-IL-1β exprimiert und im Zytosol durch Abspalten des Pro-Teils in ihre reife Form katalysiert. Im Falle von Pro-IL-1β erfolgt dies durch Inflammasom-abhängige Caspase-1-Aktivität (de Zoete et al., 2014). Während IL-1α überwiegend im Zytosol verbleibt und erst im Rahmen des nekrotischen Zelltods in den extrazellulären Raum gelangt (Rider et al., 2011), wird durch Caspase-1 aktiviertes IL-1β durch die ebenfalls Caspase-1-abhängig gebildete GSDMD-NT-Pore sezerniert. Sowohl IL-1α als auch IL-1β binden an zwei Rezeptortypen, Interleukin-1-Rezeptor I (IL-1RI) und Interleukin-1-Rezeptor II (IL-1RII). Beide Rezeptoren kommen sowohl membrangebunden, als auch löslich vor. Nach Bindung von IL-1 an IL-R1I wird ein Komplex mit dem IL-1R *accessory protein* (IL-1R-AcP) gebildet und eine intrazelluläre Signalkaskade in Gang gesetzt. IL-1RII entfaltet nach Bindung von IL-1 hingegen

keine Wirkung. Neben IL-1 kann zudem auch ein natürlich vorkommender, löslicher IL-Rezeptor-Antagonist (IL-1Ra) an IL-1RI binden (Dinarello, 1996) und ihn für zirkulierendes IL-1 blockieren. Obwohl sowohl IL-1α als auch IL-1β an dieselben Rezeptoren binden, entfalten sie dennoch unterschiedliche Wirkungen. Im Rahmen der proinflammatorischen Wirkung nach Zelluntergang ist IL-1α für die Einleitung der Inflammation hauptverantwortlich, während IL-1β für die Verstärkung der Entzündungsreaktion verantwortlich ist (Rider et al., 2011). Darüber hinaus beeinflusst IL-1β die Expression und Sekretion weiterer Zytokine. So wurde nachgewiesen, dass es die Produktion von IL-6 in verschiedenen Zellarten reguliert, darunter glatte Muskelzellen, Fibroblasten und Skelettmuskelzellen (Luo et al., 2003). Klinische Bedeutung hat IL-1β bei der Entstehung von zahlreichen Auto-Inflammatorischen Erkrankungen, unter Anderem Diabetes mellitus Typ II, Gicht, Familiäres Mittelmeerfieber, Still-Syndrom und viele weitere (Dinarello, 2009).

1.5.2 IL-6

IL-6 ist ein Zytokin, dass sowohl pro- als auch anti-inflammatorische Eigenschaften besitzt (Luo et al., 2003). Es wird lokal im Bereich zum Beispiel einer Inflammation gebildet und sendet mit seiner pleiotropen Wirkung ein Warnsignal an den gesamten Körper. Es gibt zwei IL-6-Rezeptortypen, den membranständigen IL-6-Rezeptor und den löslichen IL-6-Rezeptor. Beide vermitteln ihre intrazelluläre Wirkung durch das membranständige Glykoprotein Gp130 (Kang et al., 2020). Mit dem Blutfluss gelangt IL-6 in die Leber und induziert dort rasch die Bildung von Akut-Phase-Proteinen. Zudem ist es in die Regulation des Serumeisenspiegels involviert und reduziert diesen, was bei länger anhaltender Inflammation zu einer Anämie führt. Erreicht IL-6 das Knochenmark regt es hier zum einen die Reifung von Megakaryozyten und somit die Freisetzung von Thrombozyten an. Zum Anderen fördert es die Differenzierung verschiedener Immunzellen wie $CD4^+$- und $CD8^+$-T-Zellen, T-Follikuläre-Helferzellen sowie aktivierter B-Zellen in Antikörper-produzierende Plasmazellen (Tanaka et al., 2014) und hat so einen entscheidenden Anteil an der zellulären Immunantwort.

1.6 Ziele dieser Arbeit

Der akute MI stellt trotz stetig weiterentwickelter therapeutischer und interventioneller Möglichkeiten hohe Herausforderungen an die moderne Medizin. Insbesondere die Beeinflussung der Langezeitfolgen nach überlebter akuter Phase des MI steht weltweit im Fokus intensiver Forschung. Schon heute zielen medikamentöse Kombinationstherapien darauf ab, die gefürchteten Umbauprozesse nach MI, das *Remodeling*, einzudämmen, und so ein drohendes Herzversagen zu verhindern. Nach ischämiebedingtem Absterben von Kardiomyozyten im

Infarktareal werden verschiedene kardial ansässige sowie infiltrierende Zellen akquiriert, die die Umbauprozesse auf unterschiedliche Weise beeinflussen. So werden zum Beispiel in Leukozyten, Endothelzellen und Fibroblasten der Infarktregion Inflammasome aktiviert und so eine Entzündungsreaktion in Gang gesetzt. Neben diesen Zellen spielen auch die aus dem Epikard stammenden EPDC, die nach MI reaktiviert werden, eine wichtige Rolle, da sie mit der Sekretion parakriner Faktoren das interstitielle Milieu der Infarktregion und somit die umliegenden Zellen beeinflussen und so auch die Gefäßneubildung anregen.

Das Repertoire der biologischen Aktivität von EPDC und ihre Regulation ist bislang noch nicht vollständig aufgeklärt. In Vorarbeiten der Arbeitsgruppe konnten ATP und Adenosin als Signalmoleküle für EPDC identifiziert werden, die über ein spezifisches Repertoire von purinergen Rezeptoren auf der Zelloberfläche wirken. Die Aktivierung des Adenosin-spezifischen Rezeptors A_{2B} resultiert in der Expression und Sekretion verschiedener pro-inflammatorischer Zytokine wie IL-6 und IL-1β. Darüber hinaus bauen EPDC im Rahmen des extrazellulären Purinstoffwechsels ATP zu Adenosin ab.

Im Rahmen dieser Arbeit sollen zwei wesentliche Fragen geklärt werden, um das Gesamtbild der biologischen Aktivität von EPDC zu ergänzen:

1. Besitzen die durch MI aktivierten EPDC ein aktives Inflammasom und welche Rolle spielt das purinerge Signalsystem im Rahmen der Inflammasomaktivierung?
2. Erfolgt die bereits zuvor nachgewiesene A_{2B}R-abhängige Induktion von IL-6 in EPDC Inflammasom-abhängig?

Aufgrund ihrer vielseitigen Rolle im Rahmen des akuten MI könnte die gezielte Regulation von EPDC und ihrer parakrinen Aktivität einen direkten Einfluss auf das Ausmaß der Narbenbildung und des *Remodeling* nach MI haben. Die vorliegende Arbeit soll die Inflammasomaktivierung in EPDC beleuchten und so einen möglichen Beitrag zur Entwicklung neuer Therapieansätze zum Erhalt funktionellen Myokardgewebes nach MI leisten.

2 Material und Methoden

2.1 Geräte und Apparaturen

Gerät	Hersteller
Autoklav	F. & M. Lautenschläger (Köln, DE) 5169
Bio-Plex Gerät	Bio-Rad Laboratories (Hercules, USA) Bio-Plex 200 System
Bio-Plex Wasch-Station	Bio-Rad Laboratories (Hercules, USA) Pro II Wash Station
Inkubator	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA) Heracell 150 i
Luminometer	BMG Labtech GmbH (Offenburg, DE) FLUOstar OPTIMA
Mikroskop	Olympus (Hamburg, DE) CKX31
NanoDrop2000	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Pipettierhilfen	Eppendorf (Hamburg, DE) Easypet
	Eppendorf (Hamburg, DE) Multipette Xstream
	Eppendorf (Hamburg, DE) Research
Plattenschüttler	IKA-Werke GmbH (Staufen, DE) MTS 2/4 digital
Real-Time PCR *Cycler*	Applied Biosystems (Foster City, USA) StepOne Plus
Röhrchenrotator	Miltenyi Biotec GmbH (Bergisch Gladbach, DE) MACSmix
Sterilbank	Labogene (Lynge, DK) Scanlaf Mars Pro, Cytosafe Class 2
Thermocycler	Eppendorf (Hamburg, DE) Mastercycler epgradient S
Tischzentrifugen	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, DE)
Vortexer	VWR International GmbH (Darmstadt, DE)
Wasserbad	Memmert (Schwabach, DE)
Zentrifugen	Eppendorf (Hamburg, DE) 5415R
	Eppendorf (Hamburg, DE) 5424R
	Eppendorf (Hamburg, DE) 5810R
	Hettich Zentrifugen (Tuttlingen, DE) Universal 320R
	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA) Heraeus Megafuge 16R

Tabelle 2: Verwendete Geräte und Apparaturen.

2.2 Verbrauchsmaterialien

Material	Hersteller
6-*Well*-Platten	Greiner Bio-One (Frickenhausen, DE)
24-*Well*-Platten	Greiner Bio-One (Frickenhausen, DE)
96-*Well*-Platten	Corning Incorporated (Corning, USA) Costar 3610
	StarLab (Hamburg, DE) ABI FAST Systems
Klebefolie	Bio-Rad Laboratories (Hercules, USA) Microseal „B“
Multistepperspitzen	Eppendorf (Hamburg, DE) Combitips Plus

Parafilm	Bemis (Neenah, USA)
Pipettenspitzen	StarLab (Hamburg, DE)
Reaktionsgefäße	Sarstedt (Nürnbrecht, DE)
Spritzen	B. Braun (Melsungen, DE)
Spritzenaufsatzfilter 0,2 µm	Sartorius (Göttingen, DE) Minisart *Syringe* Filter
Stabpipetten	Corning Incorporated (Corning, USA)
Zellkulturflaschen T75, T175	Greiner Bio-One (Frickenhausen, DE)
Zellsieb 70 µm	Sartorius (Göttingen, DE)
Zentrifugenröhrchen	Greiner Bio-One (Frickenhausen, DE)

Tabelle 3: Verwendete Verbrauchsmaterialien.

2.3 Chemikalien

Alle nicht in Tabelle 4 aufgeführten Chemikalien wurden entweder von Carl Roth (Karlsruhe, DE), Merck Millipore (Darmstadt, DE) oder Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA) bezogen.

Chemikalie	**Hersteller**
2-Mercapto-Ethanol	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, DE)
Collagenase CLS II	Biochrom GmbH (Berlin, DE)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, DE)
Dismozon	Paul Hartmann AG (Heidenheim, DE)
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Gibco, Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Ethanol (99,9% und 70%)	Merck Millipore (Darmstadt, DE)
FACSClean	BD Biosciences (Erembodegem, BE)
Fötales Bovines Serum (FBS) Superior	Biochrom GmbH (Berlin, DE)
GlutaMAX (100x)	Gibco, Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Isofluran	Actavis GmbH (Langenfeld, DE)
Isopropanol	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, DE)
Panserin 401	PAN-Biotech GmbH (Aidenbach, DE)
Penicillin/Streptomycin	Gibco, Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) 1x	BioFroxx GmbH (Einhausen, DE)
Sheath Fluid (Bio-Plex)	Bio-Rad Laboratories (Hercules, USA)
Takyon ROX Probe Mastermix dTTP Blue	Eurogentec (Seraing, BE)
Trypsin-EDTA (1x)	Gibco, Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)

Tabelle 4: Verwendete Chemikalien.

2.4 Zellkulturmedien und Lösungen

Zellkulturmedium/Puffer	Zusammensetzung
EPDC-Medium	DMEM, *high glucose* (4500 mg/l) 30 % FBS 100 U/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin 2 mM Glutamax
Serumfreies Medium	Panserin 401 100 U/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin 2 mM Glutamax
Waschpuffer EPDC-Isolation	10 mM HEPES 4 mM $NaHCO_3$ 30 mM 2,3-butanedione-monoxime 11 mM Glukose 0,3 mM EGTA 126 mM NaCl 4,4 mM KCl 1 mM $MgCl_2$
Kollagenase-Lösung	PBS 1x 1200 U/ml Collagenase CLS II

Tabelle 5: Verwendete Zellkulturmedien und Lösungen und deren Zusammensetzung.

2.5 Kits für Versuche und Messungen

Kit	Hersteller	Bestellnummer
Bio-Plex Pro *Reagent Kit*	Bio-Rad Laboratories (Hercules, USA)	171-304070
Caspase-Glo 1 *Inflammasome Assay*	Promega Corporation (Madison, USA)	G9951
QuantiTect *Reverse Transcription Kit*	Qiagen (Hilden, DE)	205310
RNeasy Plus Micro Kit	Qiagen (Hilden, DE)	74034

Tabelle 6: Für die Versuche und Messungen verwendete *Kits*.

2.6 Software

Software	Verwendung	Hersteller
Bio-Plex Manager 6.0	Bio-Plex Analyse	Bio-Rad Laboratories (Hercules, USA)
Excel 2010/2016	Statistische Auswertung	Microsoft (Redmond, USA)
NanoDrop 2000	Bestimmung der RNA-Konzentration	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Optima - Data Analysis	Datenauswertung	BMG Labtech GmbH (Offenburg, DE)
Optima Version 2.20	Messung der Lumineszenz	BMG Labtech GmbH (Offenburg, DE)

PowerPoint 2016/2019	Abbildungserstellung	Microsoft (Redmond, USA)
Prism 5	Graphenerstellung	GraphPad (La Jolla, USA)
StepOne Plus V 2.3	PCR-Analyse	Applied Biosystems (Foster City, USA)
Word 2016/2019	Textverarbeitung	Microsoft (Redmond, USA)

Tabelle 7: Verwendete Software.

2.7 Gewinnung von EPDC

2.7.1 Tierversuche

Die in dieser Arbeit verwendeten EPDC wurden aus operativ infarzierten Rattenherzen gewonnen. Alle Tierversuche wurden durch das Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen genehmigt (AZ: 84-02.04.2014.A174). Für die vorliegende Arbeit wurden ausschließlich in der Zentralen Einrichtung für Tierforschung und Tierschutzaufgaben der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf gehaltene männliche Ratten (Wistar) mit einem Körpergewicht von 220-280 g und einem Alter von 12-16 Wochen verwendet. Als Nahrung erhielten die Tiere standardisiertes Pelletfutter und Wasser *ad libitum*.

2.7.2 Induktion des Herzinfarkts (Ischämie/Reperfusions-Modell)

Die Induktion des Herzinfarkts wurde nach bereits beschriebenem Protokoll durchgeführt (Z. Ding et al., 2016). Die Ratten wurden in eine Buprenorphin-unterstütze Isofluran-Narkose versetzt, der Brustkorb eröffnet und der *Ramus interventricularis anterior* der linken Koronararterie ligiert. Nach 60 min Ischämie wurde die Durchblutung durch Lösen der Ligatur wiederhergestellt, der Brustkorb verschlossen und die Narkose beendet. Im Anschluss erfolgte eine weiterführende Analgesie mit Buprenorphin über fünf Tage.

2.7.3 Isolierung und Kultivierung der EPDC

Die EPDC wurden fünf Tage nach Ischämie und Reperfusion aus den Rattenherzen isoliert. Nach Tötung der Tiere durch eine finale Narkose mit Ketamin 100mg/kg und Rompun 10mg/kg wurde das Herz unter der Sterilbank entnommen und mit einem Waschpuffer (siehe Kapitel 2.4) retrograd durch die Aorta gespült, um Blutreste zu entfernen. Lunge, Fettgewebe, Thymus, Aorta und Vorhöfe wurden vorsichtig entfernt. Um die EPDC von der Herzoberfläche zu lösen, wurde das ventrikuläre Gewebe in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen mit 10 ml Kollagenase-Lösung (siehe Kapitel 2.4) überführt und bei 37°C mit 12 rpm rotiert. Nach 20 min wurde der Verdau-Prozess durch Zugabe von 3 ml FBS gestoppt. Die so erhaltene Zellsuspension wurde zunächst durch ein

70 µm-Zellsieb gefiltert und im Anschluss für 5 min bei 500*g* zentrifugiert. Nach Absaugen des Überstandes wurde das Zellpellet in 10 ml EPDC-Medium (siehe Kapitel 2.4) resuspendiert, in eine T75 Zellkulturflasche überführt und bei 37°C, 5% CO_2 und relativer Luftfeuchte von 95% kultiviert. Nach 48 Stunden erfolgte ein Mediumwechsel, um kontaminierende Fremdzellen wie Erythrozyten und Immunzellen aus der Kultur zu entfernen. Bei der Isolierung der EPDC haben nur Dr. Julia Hesse und Madeleine Schyrba geholfen.

EPDC sind adhärente Zellen, das heißt, sie wachsen am Flaschenboden an und müssen enzymatisch abgelöst werden. Sobald sie eine Konfluenz von 90% erreicht hatten, wurden sie gesplittet. Dafür wurde das Medium abgesaugt, die Zellen mit 5 ml PBS vorsichtig gewaschen und anschließend für 3-5 min bei 37°C mit 5 ml Trypsin-EDTA abgelöst. Durch Zugabe von 10 ml EPDC-Medium wurde die enzymatische Reaktion des Trypsins gestoppt. Die Zellsuspension wurde in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt und 5 min bei 350*g* zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet in EPDC-Medium resuspendiert und die Zellen in Kulturflaschen ausgesät. Unter regelmäßigem Splitten bzw. Passagieren alle 3-4 Tage wurden die Zellen bis zu drei Wochen kultiviert.

Zur Bestimmung der Zellzahl wurde eine Neubauer-Zählkammer verwendet. Von den resuspendierten Zellen wurden 10 µl auf die Zählkammer aufgetragen und die vier Eckquadranten unter dem Auflichtmikroskop gezählt. Die Werte wurden gemittelt, so dass man die Zellzahl in 0,1 µl erhält. Anschließend wurde die Zellzahl auf 1 ml hochgerechnet.

$$\left(\frac{Q1+Q2+Q3+Q4}{4}\right) \times 10.000 = \text{Zellen/ml}$$

Alle Arbeiten mit den Zellen wurden unter der Sterilbank durchgeführt. Die Kultivierungs- bzw. Inkubationsbedingungen sind in allen Versuchen stets 37°C, 5% CO_2 und eine relative Luftfeuchtigkeit von 95%. Wenn nicht anders angegeben, wurde für die Versuche EPDC-Medium verwendet.

2.8 Genexpressionsanalyse

2.8.1 Stimulationsbedingungen

Um die Expression von Genen nach Stimulation bzw. Inhibition zu untersuchen, wurden die Zellen mit spezifischen Stimulatoren bzw. Inhibitoren (Tabelle 8) behandelt. Für die Genexpressionsversuche wurden $1{,}2 \times 10^5$ Zellen/3 ml pro *Well* in 6-*Well*-Platten ausgesät und inkubiert, bis sie in den *Wells* ca. 90% Konfluenz erreicht hatten. Je nach Zellpräparation der

verwendeten Zellen dauerte dies 1-2 Tage. Anschließend wurde das Medium aus den *Wells* abgesaugt und entweder 2 ml mit Inhibitoren versetztes Medium oder 2 ml Medium ohne Zusatz zur Präinkubation für 1 h auf die Zellen gegeben. Nach Ablauf der Präinkubation wurden die Überstände abgesaugt, die entsprechenden Stimulatoren bzw. Inhibitoren (Tabelle 8) in 2 ml Medium in die *Wells* gegeben und die Zellen für weitere 6 h inkubiert.

Bezeichnung	Beschreibung	Konz.	Hersteller
2-ThioUTP tetrasodium salt	$P2Y_2R$-Agonist	2 µM	Tocris (Bristol, UK)
5-BDBD	$P2X_4R$-Antagonist	20 µM	Tocris (Bristol, UK)
A740003	$P2X_7R$-Antagonist	100 nM	Tocris (Bristol, UK)
BAY 60-6583	$A_{2B}R$-Agonist	25 µM	Tocris (Bristol, UK)
BzATP triethylammonium salt	Stabiles ATP-Analog	100 µM	Tocris (Bristol, UK)
CGS 21680 hydrochloride	$A_{2A}R$-Agonist	1 µM	Tocris (Bristol, UK)
CLI-095	TLR4-Inhibitor	1 µg/ml	InvivoGen (San Diego, USA)
LPS-EB Ultrapure	TLR4-Ligand	10 ng/ml	InvivoGen (San Diego, USA)
Tenascin-C	Matrizelluläres Protein	10 µM	Merck (Darmstadt, DE)

Tabelle 8: Für die Genexpressionsanalyse verwendete Substanzen und deren Arbeitskonzentrationen.

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Überstände abgesaugt, die *Wells* je zwei Mal mit 1 ml kaltem PBS gewaschen, und die restliche Flüssigkeit sorgfältig entfernt. Die 6-*Well*-Platten mit den behandelten EPDC wurden mit Parafilm verschlossen und bei -80°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

2.8.2 RNA-Isolation

Um die Expression verschiedener Gene in EPDC zu untersuchen, wurde zunächst die RNA aus den Zellen isoliert. Dafür wurde das RNeasy Plus Micro Kit von Qiagen (Hilden, DE) nach Herstellerangaben verwendet. Die bei -80°C eingefrorenen *Well*-Platten mit den behandelten EPDC wurden auf Eis aufgetaut und die Zellen mit je 600 µl RLT-Plus-Puffer, versetzt mit 6 µl 2-Mercapto-Ethanol, durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren lysiert. Das Zelllysat wurde auf in Sammelröhrchen platzierte *gDNA Eliminator Mini Spin Columns* geladen und für 30 s bei 15.000*g* zentrifugiert. Die *gDNA Eliminator Mini Spin Columns* wurden verworfen und der Durchfluss in den Sammelröhrchen mit je 600 µl 70% Ethanol versetzt. Von dieser Mischung wurden mehrmals maximal 700 µl auf *RNeasy MinElute Spin Columns* (Säulen) geladen, für 15 s bei 15.000*g* zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Anschließend folgten drei Schritte, um die Säulenmembran zu waschen. Hierzu wurden die Säulen zunächst mit 700 µl RW1-Puffer beladen und für 15 s bei 15.000*g* zentrifugiert. Danach wurden 500 µl RPE-Puffer auf die Säulen

gegeben und erneut für 15 s bei 15.000*g* zentrifugiert. Nachfolgend wurden die Säulen mit 500 µl 80% Ethanol beladen und für 2 min bei 15.000*g* zentrifugiert. Der Durchfluss wurde nach jedem Schritt verworfen. Anschließend wurden die Säulen zum Trocken für 5 min bei 15.000*g* zentrifugiert und in neuen Sammelröhrchen platziert. Zur Elution der RNA wurden 35 µl RNase-freies Wasser auf die Säulen geladen und für 2 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Säulen für 1 min bei 15.000*g* zentrifugiert und das Eluat mit der isolierten RNA auf Eis gelagert. Zur Konzentrationsbestimmung der RNA erfolgte eine Quantifizierung mittels Spektralphotometer unmittelbar im Anschluss. Danach wurde die RNA bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

2.8.3 Bestimmung der RNA-Konzentration

Die Konzentration der aus den EPDC isolierten RNA wurde mittels NanoDrop2000 spektralphotometrisch bestimmt. Die RNA Konzentration wird dabei anhand der Absorption bei 260 nm ermittelt. Eine Absorptionseinheit A_{260} entspricht 40 µg RNA/ml. Daraus folgt:

$$c\left[\frac{\mu g\ RNA}{ml}\right] = A_{260} \times 40$$

Darüber hinaus gibt die Methode Aufschluss über die Reinheit der gemessenen Probe. Dazu wird die Absorption bei verschiedenen Wellenlängen gemessen. Nukleinsäuren absorbieren Licht bei 260 nm, Proteine oder Alkohole bei 280 nm. Der Absorptionsquotient A_{260}/A_{280} sollte bei reiner RNA bei 1,9 - 2,1 liegen. Liegt er weit darunter, zeigt dies eine Verunreinigung der Probe mit z.B. Proteinen oder Alkohol an. Die Errechnung der Konzentration und des Quotienten erfolgte automatisch durch die NanoDrop2000 Software.

2.8.4 Reverse Transkription

Die isolierte RNA wurde mit Hilfe des QuantiTect *Reverse Transcription Kits* von Qiagen (Hilden, DE) in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben. Zunächst wurden die in Tabelle 9 aufgeführten Komponenten nach Angaben des Herstellers zusammengefügt und für 2 min bei 42°C im Thermocycler inkubiert. Der enthaltene *gDNA Wipeout Buffer* eliminiert in diesem Schritt kontaminierende genomische DNA aus den RNA-Proben. Anschließend wurden den Ansätzen die Komponenten der Tabelle 9 zugefügt und die Ansätze zunächst für 15 min bei 42°C im Thermocycler inkubiert. Die im Reaktionsansatz enthaltenen *Primer* lagern sich an die RNA an und die Reverse Transkriptase (Tabelle 10) setzt die RNA in cDNA um. Dabei katalysiert sie bei der Reaktion zwei Schritte. Zum einen eine RNA-abhängige DNA-Polymerase-Aktivität, bei der die cDNA von der RNA-Vorlage transkribiert wird. Zum anderen eine hybridabhängige Exoribonuklease-Aktivität (RNase H), bei der die RNA in dem entstandenen RNA/DNA-Hybrid

degradiert wird, so dass die umgeschriebene cDNA übrigbleibt. Nicht hybridisierte RNA ist von der RNase H-Aktivität nicht betroffen und steht der DNA-Polymerase weiter zur Verfügung. Im letzten Schritt werden die Proben für 3 min bei 95°C inkubiert um die Reverse Transkriptase zu inaktivieren. Zusätzlich zu den Proben wurden eine Negativkontrolle, die kein Enzym enthielt, sowie eine *Non-Template-Control* (NTC), die keine RNA enthielt, mitgeführt. Die entstandene cDNA wurde 2:3 mit RNase-freiem Wasser verdünnt und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

Komponente	Volumen
Template RNA	500 ng
gDNA Wipeout Buffer	2 µl
RNase-freies Wasser	12 µl

Tabelle 9: Ansatz für 14 µl RNA Lösung.

Komponente	Volumen
Reverse Transkriptase	1 µl
RT *Buffer* (5x)	4 µl
RT *Primer* Mix	1 µl

Tabelle 10: Ansatz für 6 µl Reverse Transkriptase Lösung.

2.8.5 Quantitative *Real-Time* PCR

Die quantitative *Real-Time* PCR (qRT-PCR) dient zur Bestimmung der vorliegenden Anzahl an Transkriptkopien eines bestimmten Gens in einer cDNA-Probe. Üblicherweise wird dafür ein sogenannter TaqMan-PCR *Assay* verwendet (Livak et al., 1995), bei dem eine fluorogene Sonde mit einem Reporter-Farbstoff am 5′-Ende und einem *Quencher*-Farbstoff am 3′-Ende spezifisch an die Zielsequenz in der cDNA bindet. Wegen der räumlichen Nähe zueinander unterdrückt das *Quencher*-Signal durch einen Fluoreszenz-Energietransfer das Signal des Reporters. Durch die 5′-3′-Exonuklease-Aktivität der AmpliTaq DNA-Polymerase wird die Sonde von der cDNA entfernt, während der neue DNA-Strang synthetisiert wird. Dabei werden Reporter und *Quencher* räumlich voneinander getrennt, so dass das Signal des Reporters nicht mehr unterdrückt wird und somit detektiert werden kann. Die gemessene Fluoreszenz ist dabei direkt proportional zur Anzahl freigesetzter Reporter-Moleküle und somit zur Menge an Transkripten mit der Zielsequenz in der Probe. Zu Beginn der PCR ist nur wenig DNA vorhanden, so dass die Fluoreszenz das Hintergrundsignal nicht übersteigt. Durch die Reaktion wird die DNA jedoch in jedem Zyklus vervielfältigt und somit steigt auch das gemessene Fluoreszenzsignal. Die Zykluszahl, bei der die gemessene Fluoreszenz einer Probe zum ersten Mal über das Hintergrundsignal ansteigt, wird als C_T-Wert (*cycle-threshold*) bezeichnet. Je kleiner also der C_T-Wert, desto früher übersteigt die

Fluoreszenz das Hintergrundsignal, und umso mehr Kopien des untersuchten Transkripts waren ursprünglich in der Probe enthalten.

Durchführung der qRT-PCR

Die qRT-PCR wurde mit einem Reaktionsvolumen von 10 µl durchgeführt. Pro Probe wurden drei technische Replikate gemessen. Zunächst wurde ein *Target* Mix (Tabelle 11) hergestellt und je 9 µl in eine auf Eis gelagerte 96-*Well*-Platte vorgelegt. Die verwendeten *Primer* und Sonden sind in Tabelle 12 aufgeführt. Anschließend wurde je 1 µl cDNA zu dem *Target* Mix in die *Wells* pipettiert und die 96-*Well*-Platte mit Klebefolie versiegelt. In einer Plattenzentrifuge wurde die Platte für 1 min bei 1000*g* zentrifugiert, anschließend in den *Real-Time* PCR *Cycler* gestellt und die Reaktion gestartet.

Die Reaktion wurde mit folgendem Programm durchgeführt:

Aktivierungsschritt	10 min	95°C	
Denaturierung	15 s	95°C	40 Zyklen
Hybridisierung + Elongation	1 min	60°C	

Pre-designed	**Volumen**
Takyon ROX *Probe* Mastermix (2x)	5 µl
Primer/Sonde Mix (TaqMan *Assay*)	0,5 µl
RNase-freies Wasser	3,5 µl
Nicht *pre-designed*	
Takyon ROX *Probe* Mastermix (2x)	5 µl
FW/RV *Primer*	1,8 µl
Sonde	0,4 µl
RNase-freies Wasser	1,8 µl

Tabelle 11: Komponenten für einen 9 µl *Target* Mix.

Target	Hersteller	Bestellnummer/Sequenz
ASC/Pycard	Applied Biosystems (Foster City, USA)	Rn00597229_g1
Caspase-1	Applied Biosystems (Foster City, USA)	Rn00562724_m1
pro-IL-1β	Applied Biosystems (Foster City, USA)	Rn00580432_m1
IL-6	Applied Biosystems (Foster City, USA)	Rn01410330_m1
NLRP3	Applied Biosystems (Foster City, USA)	Rn04244620_m1
TNC	Applied Biosystems (Foster City, USA)	Rn01454947_m1
β-actin Primer FW	Biomers.net GmbH (Ulm, DE)	CCCTGGCTCC TAGCACCAT
β-actin Primer RV	Biomers.net GmbH (Ulm, DE)	GAGCCACCAA TCCACACAGA
β-actin Sonde	Biomers.net GmbH (Ulm, DE)	ATCAAGATCATTGC TCCTCCTGAGCGC

Tabelle 12: Für die qRT-PCR verwendete TaqMan Assays (pre-designed), Primer und Sonden.

Auswertung

Um die Genexpression verschiedener Proben miteinander vergleichen zu können, wurde die Methode der relativen Quantifizierung (ΔC_T-Methode), eine Variation der Livak-Methode, angewendet (Livak and Schmittgen, 2001). Dabei wird die Expression der Zielgene auf ein endogenes Referenzgen, d.h. ein Gen, das in jeder Zelle gleichermaßen exprimiert und nicht reguliert wird, normalisiert. In dieser Arbeit wurde *β-actin* als Referenzgen verwendet. Zunächst wurde für jede Probe, sowohl Ziel- als auch Referenzgen, der C_T-Wert durch die StepOnePlus Software V2.3 bestimmt. Aus den drei C_T-Werten der technischen Replikate wurde dann jeweils der Mittelwert ermittelt. Danach wurde die Differenz zwischen Referenz- und Zielgen gebildet (ΔC_T-Wert).

$$\Delta C_T = C_{T\ \text{Referenzgen}} - C_{T\ \text{Zielgen}}$$

Liegt die Effizienz der qRT-PCR Reaktion bei 100%, verdoppelt sich die Menge der DNA bei jedem Zyklus. Das bedeutet, ein C_T-Wert, der um eine Einheit kleiner ist als ein zweiter C_T-Wert, entspricht der doppelten Menge an DNA. Es handelt sich somit um einen exponentiellen Anstieg. Um dies bei der Auswertung zu berücksichtigen, wird die relative Expression eines Zielgens zum Referenzgen als $2^{\Delta CT}$-Wert angegeben. Die so erhaltenen Werte wurden anschließend entweder auf die Expression in der Kontrolle (Ratio) oder auf die Expression in LPS-behandelten Zellen (%LPS) normiert und graphisch aufgetragen.

2.9 Analyse der Zytokinsekretion

2.9.1 Stimulationsbedingungen

Um die Zytokinsekretion nach Inflammasomaktivierung zu untersuchen, wurden die Zellen mit spezifischen Stimulatoren bzw. Inhibitoren behandelt (Tabelle 13). Für die Versuche wurden in EPDC-Medium 0,3 × 10^5 Zellen/500µl pro *Well* in 12-*Well*-Platten ausgesät. Im weiteren Versuchsverlauf wurde entweder EPDC-Medium oder Serum-freies Medium (siehe Kapitel 2.4) verwendet. Am Folgetag erfolgte für 16 h ein *Priming* der Zellen mit 10 ng/ml LPS in 400 µl Medium, um ausreichend Pro-IL-1β als Substrat für die Caspase-1 zur Verfügung zu stellen. Anschließend wurde der LPS-Ansatz aus den *Wells* abgesaugt und entweder 400 µl Medium mit Inhibitoren oder 400 µl Medium ohne Zusatz für 1 h zur Präinkubation in die entsprechenden *Wells* gegeben. Während der Zeit der Präinkubation wurden die Stimulationsansätze angesetzt und anschließend auf die Zellen gegeben. Die Ansätze wurden für 24 h inkubiert. Die Zellen wurden regelmäßig unter dem Auflichtmikroskop bezüglich morphologischer Veränderungen und Reaktion auf die verschiedenen Substanzen kontrolliert und die Beobachtungen dokumentiert. Nach Beendigung der Inkubationszeit wurden die Zellüberstände mit Hilfe einer Pipette vorsichtig aus den *Wells* in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und für 5 min bei 500*g* bei 4°C zentrifugiert. Die Überstände wurden wiederum vorsichtig in je zwei 200 µl Reaktionsgefäße überführt und bei -80°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

Bezeichnung	Beschreibung	Konz.	Hersteller
2-ThioUTP tetrasodium salt	$P2Y_2R$-Agonist	2 µM	Tocris (Bristol, UK)
5-BDBD	$P2X_4R$-Antagonist	20 µM	Tocris (Bristol, UK)
A740003	$P2X_7R$-Antagonist	100 nM	Tocris (Bristol, UK)
BAY 60-6583	$A_{2B}R$-Agonist	25 µM	Tocris (Bristol, UK)
BzATP triethylammonium salt	Stabiles ATP-Analog	100 µM	Tocris (Bristol, UK)
CRID3 sodium salt	Inflammasom-Inhibitor	50 µM	Tocris (Bristol, UK)
LPS-EB Ultrapure	TLR4-Ligand	10 ng/ml	InvivoGen (San Diego, USA)
Z-WEHD-FMK	Caspase-1-Inhibitor	50 µM	R&D Systems (Minneapolis, USA)

Tabelle 13: Für die Analyse der Zytokinsekretion verwendete Substanzen und deren Arbeitskonzentrationen.

2.9.2 Multiplex-*Assay*

Zur Bestimmung der Zytokinkonzentration in den Zellüberständen wurde das Bio-Plex-Suspension-Array-System von Bio-Rad Laboratories (Hercules, USA) verwendet, in dem mehrere Proteine gleichzeitig in einer Probe analysierbar sind. Bei dieser Methode sind

monoklonale Primärantikörper kovalent an fluoreszierende Magnetkügelchen (*Beads*) gebunden. Die *Beads* tragen, je nach dem gegen welches Protein ihre Antikörper gerichtet sind, eine eigene spezifische Farbkodierung. Binden Proteine an die Primärantikörper auf den *Beads*, können sie mit einem biotinylierten Sekundärantikörper detektiert und durch ein fluoreszierendes Streptavidin-Phycoerythrin (PE)-Konjugat sichtbar gemacht werden. Die Messung erfolgt in einem speziellen Durchflusszytometer (Bio-Plex 200 Multiplex-System), welches gleichzeitig die Farbe der *Beads* erkennt und die Intensität der Streptavidin-PE-Fluoreszenz bestimmt. Dabei ermöglicht die Farbkodierung die Identifikation des gebundenen Proteins, dessen Menge mittels einer Standardkurve anhand der Streptavidin-PE-Fluoreszenz-Intensität ermittelt werden kann.

Durchführung Bio-Plex *Assay*

Für die Messung wurde das Bio-Plex Pro *Reagent Kit* verwendet (Tabelle 6). Die Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben laut Bio-Plex Pro *Cytokine Assay Instructional Manual*. Die verwendeten Substanzen sind in Tabelle 14 aufgeführt. Alle Proben wurden als technische Duplikate gemessen.

Zunächst wurden die Proben auf Eis aufgetaut. Anschließend wurden die *Beads* in *Assay Buffer* verdünnt und je 50 µl der *Beads*-Lösung in die *Wells* einer 96-*Well*-Mikrotiter-Platte (Flachboden, Bio-Plex) pipettiert. Die Platte wurde mit einem *Wash Buffer* gewaschen. Dieser und alle weiteren Waschschritte wurden mit der Bio-Plex Pro II Wasch-Station (Bio-Rad) durchgeführt. Dabei wird die Mikrotiterplatte auf eine magnetische Trägerplatte gestellt, wodurch die *Beads* während der Waschschritte in den *Wells* fixiert werden. Nach dem Waschen wurden je 50 µl der Proben in die *Wells* zu den *Beads* pipettiert und für 1 h bei 850 rpm geschüttelt. Während der Inkubationszeit wurden die Detektionsantikörper in *Detection-Antibody-Diluent* verdünnt. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die Platte gewaschen, 25 µl der Antikörper-Lösung in die *Wells* pipettiert und die Platte für 30 min bei 850 rpm geschüttelt. Anschließend wurde Streptavidin-PE in *Assay Buffer* verdünnt und davon 50 µl nach dem Waschen der Platte in die *Wells* pipettiert. Die Platte wurde für weitere 10 min bei 850 rpm geschüttelt und anschließend gewaschen. Zum Schluss wurden 125 µl *Assay Buffer* in die *Wells* pipettiert, die Platte für 30 s bei 850 rpm geschüttelt und in das Bio-Plex Gerät gestellt. Die Messung erfolgte mit der Software Bio-Plex Manager 6.0 und der Einstellung *high RP1 target*.

Bezeichnung	Komponenten	Bestellnummer
Bio-Plex Pro *Rat Cytokine* IL-1β	*Conjugated Magnetic Beads (20x)*	171L1008M
	Detection Antibodies	
Bio-Plex Pro *Rat Cytokine* IL-6	*Conjugated Magnetic Beads (20x)*	171L1012M
	Detection Antibodies	
Bio-Plex Pro *Rat Standards*		171NZ0001

Tabelle 14: Für den Bio-Plex-Assay verwendete Substanzen (Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA).

Auswertung

Anhand einer Standardkurve errechnet die Software aus der Intensität der detektierten Fluoreszenz die Konzentration der analysierten Zytokine. Die Standards zur Errechnung der Standardkurve wurden entweder anhand einer Standardverdünnungsreihe parallel zu den Proben gemessen, oder sie wurden aus vorherigen Messungen in die Software geladen. Aus den technischen Duplikaten der Zytokinkonzentrationen einer Probe wurde der Mittelwert errechnet und dieser anschließend auf die Konzentrationen in den Überständen der Kontrolle (Ratio) oder von BzATP-behandelten Zellen (%BzATP) normiert.

2.10 Analyse der Caspase-1 Aktivität

2.10.1 Stimulationsbedingungen

Um die Aktivität der Caspase-1 und somit des Inflammasoms nach Stimulation zu untersuchen, wurden die EPDC mit spezifischen Stimulatoren bzw. Inhibitoren behandelt (Tabelle 15). Dafür wurden 0,2 × 10^5 Zellen/200 µl pro *Well* in einer weißen 96-*Well*-Platte mit klarem Boden ausgesät und für 24 h inkubiert. Anschließend wurde für 4 h ein *Priming* mit 500 ng/ml LPS in 200 µl Medium durchgeführt. Nach 3 h wurden die Inhibitoren zur Präinkubation in die entsprechenden *Wells* hinzugefügt und die Zellen für weitere 60 min inkubiert. Nach Ablauf der insgesamt 4 h wurde die LPS-Lösung abgesaugt und die Stimulatoren bzw. Inhibitoren in 100 µl Medium in die *Wells* gegeben und für 3 h inkubiert.

Bezeichnung	Beschreibung	Konz.	Hersteller
Ac-YVAD-cmk	Caspase-1-Inhibitor	50 µM	InvivoGen (San Diego, USA)
BAY 60-6583	A_{2B}R-Agonist	25 µM	Tocris (Bristol, UK)
BzATP triethylammonium salt	Stabiles ATP-Analog	100 µM	Tocris (Bristol, UK)
LPS-EB Ultrapure	TLR4-Ligand	500 ng/ml	InvivoGen (San Diego, USA)

Tabelle 15: Für die Analyse der Caspase-1 Aktivität verwendete Substanzen und deren Arbeitskonzentrationen.

2.10.2 Lumineszenz-*Assay*

Zur Analyse der Caspase-1-Aktivität wurde der Caspase-Glo 1 *Inflammasome Assay* von Promega (Madison, USA) durchgeführt. Mit dieser biolumineszenten Methode kann die Aktivität der Caspase-1 selektiv bestimmt werden. Das Caspase-Glo 1 *Reagent* lysiert die Zellen, worauf hin die aktivierten Caspasen freigesetzt werden. Das im *Reagent* enthaltene luminogene Substrat Z-WEHD-Aminoluciferin wird an der Tetrapeptid-Sequenz „WEHD“ erkannt und hinter ihr durch die Caspase-1 gespalten (Abb. 6). Dieses Tetrapeptid setzt sich aus den Aminosäuren Tryptophan (W), Glutaminsäure (E), Histidin (H) und Aspartat (D) zusammen und wurde als das präferierte Erkennungsmotiv für Caspase-1 identifiziert (Rano et al., 1997). Der ebenfalls im *Reagent* enthaltene Proteasominhibitor MG-132 verhindert die Spaltung des Substrats durch die unspezifische Aktivität von Proteasomen. Das durch die Spaltung freigesetzte Aminoluciferin dient nun der im *Reagent* enthaltenen Luciferase als Substrat, was zu einem detektierbaren Lichtsignal führt, das proportional zur Caspase-1 Aktivität ist.

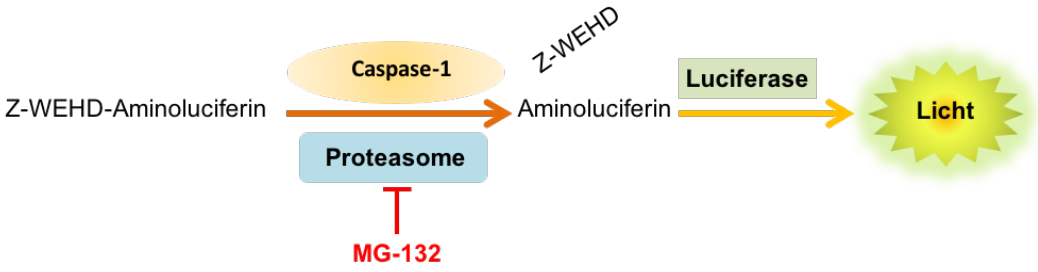

Abb. 6: Schematische Darstellung des Prinzips des Caspase-Glo 1 *Inflammasome Assays*. Das Substrat Z-WEHD-Aminoluciferin wird durch die Caspase-1 aufgespalten in Z-WEHD und Aminoluciferin. Letzteres dient der Luciferase als Substrat und führt zu einem Lichtsignal. Die unspezifische Aktivität von Proteasomen wird durch den Inhibitor MG-132 gehemmt.

Durchführung Caspase-Glo 1 *Inflammasome Assay*

Das Caspase-Glo 1 *Inflammasome Assay* wurde den Herstellerangaben entsprechend nach dem *Technical Manual* (Stand 09/15) von Promega durchgeführt. Zunächst wurde das lyophilisierte Z-WEHD-Substrat in dem mitgelieferten Caspase-Glo 1 Puffer resuspendiert, dann aliquotiert und bei -20°C bis zur Verwendung gelagert. Der im Kit enthaltene Proteasominhibitor MG-132 wurde ebenfalls aliquotiert und bei -20°C gelagert. Am Tag des Versuchs wurden das in Puffer gelöste Substrat und der Inhibitor MG-132 zum Caspase-Glo 1 *Reagent* zusammengefügt und anschließend eine äquivalente Menge zu den Stimulationsansätzen in die Wells mit den behandelten Zellen hinzupipettiert. Die Platte wurde für 30 s bei 300-500 rpm geschüttelt, 30 min lichtgeschützt bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend in das Luminometer gestellt und gemessen. Zur Bestimmung der Hintergrundlumineszenz wurde zu jeder Probe der entsprechende

Blank ohne Zellen, aber mit Reaktionsansatz und Caspase-Glo *Reagent* gemessen. Alle Proben und *Blanks* wurden als technische Duplikate angesetzt. Um die vollständige Wirkung der Inhibitoren sicherzustellen, erfolgten die Messungen 60, 90 und 120 min nach Zugabe des Caspase-Glo 1 *Reagents*. Die Platte wurde zwischen den Messungen im Luminometer belassen.

Auswertung

Die Messung der Lumineszenz erfolgte mit dem Luminometer FLUOstar OPTIMA von BMG Labtech (Offenburg, DE) und der Optima Software Version 2.20. Die Messzeit pro *Well* betrug 3 s. Die gemessenen Werte wurden an die Optima – Data Analysis Software übertragen und die Werte der technischen Duplikate gemittelt. Die Hintergrundlumineszenz der *Blanks* wurde von den gemittelten Werten abgezogen und diese *Blank*-korrigierten Werte anschließend auf den Wert der Kontrolle normiert. Für die Auswertung wurden die Daten der Messungen nach 120 min verwendet.

2.11 Statistische Datenanalyse

Die statistische Datenanalyse erfolgte mit dem Programm Excel 2010/2016 (Microsoft, Redmond, USA). Alle Ergebnisse sind als Einzelwerte (Punkteplots) oder Mittelwerte (Säulendiagramme) mit *Standard Error of the Mean* (SEM) angegeben. Zur statistischen Analyse wurde ein gepaarter, zweiseitiger *t*-Test angewendet. P-Werte <0,05 wurden als statistisch signifikant angesehen.

3 Ergebnisse

3.1 Adenosin und ATP stimulieren die Expression von Pro-IL-1β und IL-6 in EPDC

Bisher ist nicht bekannt, ob nach MI reaktivierte EPDC ein funktionelles Inflammasom besitzen. Folglich richtet sich der Fokus dieser Arbeit auf die Frage, ob kultivierte EPDC ein aktives Inflammasom bilden können, wie es aktiviert werden kann und welchen Einfluss es auf die IL-6-Sekretion hat. Bei IL-6 handelt es sich um ein Haupt-*Target* von IL-1β, dem Endprodukt eines aktiven Inflammasoms. In früheren Arbeiten des Instituts konnte außerdem gezeigt werden, dass EPDC ein spezifisches Muster an ATP- und Adenosin-Rezeptoren auf ihrer Oberfläche exprimieren (Hesse et al., 2017). Durch Stimulation mit dem A_{2B}R-Agonisten BAY 60-6583 für 24 h wurde sowohl die Expression als auch die Sekretion von IL-6 gesteigert. Um den Einfluss der auf den EPDC exprimierten purinergen Rezeptoren auf die IL-6-Expression zu untersuchen, wurden EPDC für 6 h mit spezifischen Agonisten bzw. Inhibitoren verschiedener purinerger Rezeptoren behandelt (Tabelle 13, Seite 25). Nach dem Ernten der Zellen wurde die RNA isoliert, mittels reverser Transkription in cDNA umgeschrieben und anschließend eine qRT-PCR durchgeführt.

Wie in Abbildung 7A zu sehen, steigerte der A_{2B}R-Agonist BAY 60-6583 in Übereinstimmung mit früheren Beobachtungen deutlich die IL-6-Expression. Die Stimulation des A_{2A}R mit dem spezifischen Agonisten CGS-21680 hatte dagegen keinen Einfluss auf die IL-6-Expression. Das stoffwechselstabile, aber nicht-selektive ATP-Analog BzATP erhöhte die IL-6-Expression signifikant, während der spezifische $P2Y_2$R-Agonist 2-Thio-UTP keine Wirkung zeigte. Um die BzATP-vermittelte Aktivierung der IL-6-Expression einem ATP-Rezeptor zuordnen zu können, wurde BzATP mit verschiedenen spezifischen Inhibitoren kombiniert. Während der $P2X_4$R-Inhibitor 5-BDBD die Wirkung von BzATP nicht beeinflusste, zeigte der $P2X_7$R-Inhibitor A740003 einen Trend zur Inhibition. Der TLR4-Ligand LPS bewirkte eine deutliche Erhöhung der IL-6-Expression (Hesse et al., 2017).

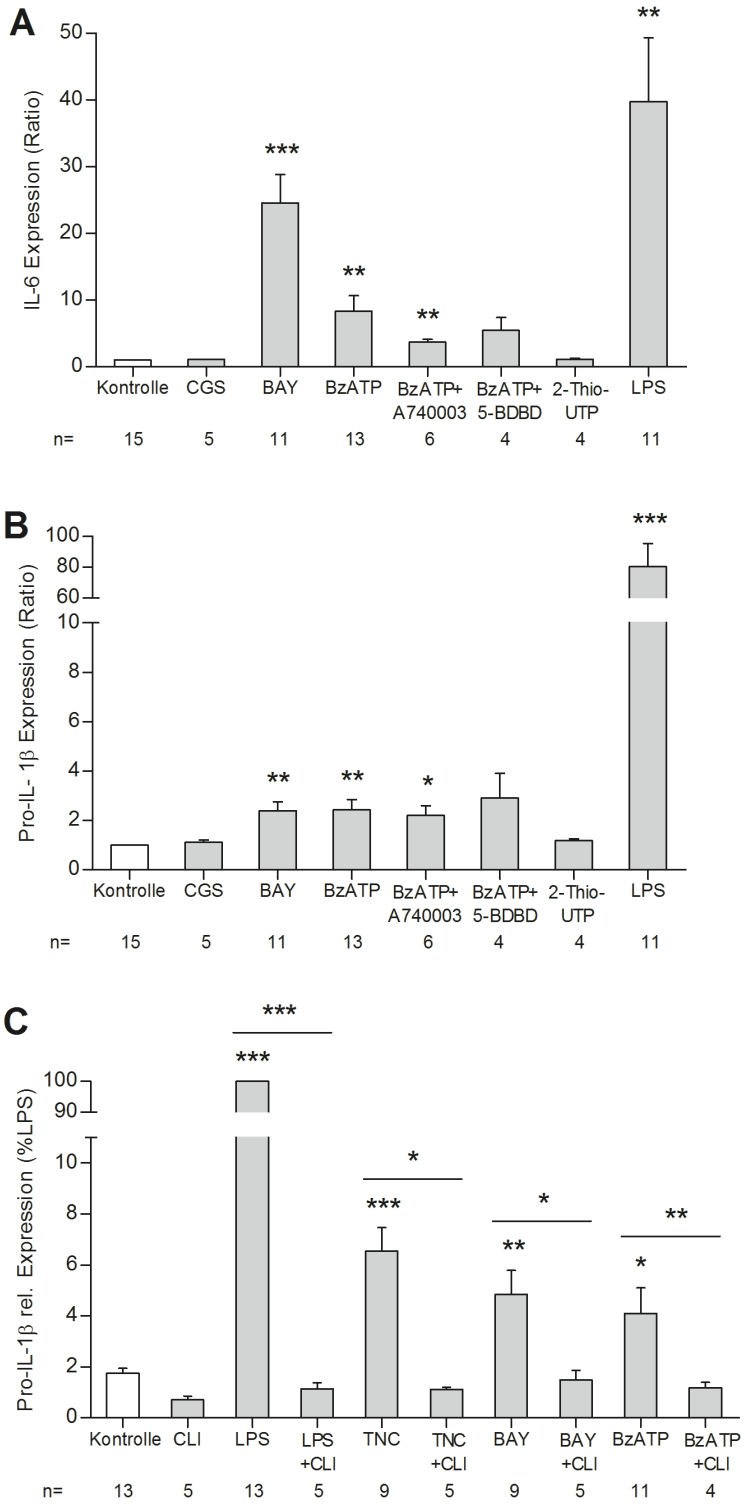

Abb. 7: Analyse der IL-6- und IL-1β-Expression in EPDC nach Adenosin- und ATP-Rezeptor-Aktivierung mittels quantitativer *Real-Time* PCR. Einfluss der Adenosin- und ATP-Rezeptor-spezifischen Agonisten bzw. Inhibitoren auf die IL-6- (**A**) bzw. Pro-IL-1β-Expression (**B**), normiert auf die Kontrolle (Ratio). **C**) Einfluss des *Toll-like receptor* 4 (TLR4)-*Signaling*-Inhibitors CLI-095 auf die Pro-IL-1β-Expression nach Stimulation, normiert auf die Pro-IL-1β-Expression nach Stimulation mit LPS (%LPS). Dargestellt als Mittelwerte ± SEM. *p < 0,05 **p < 0,01 ***p < 0,001. CGS: CGS 21680 *hydrochloride* – Adenosin-Rezeptor A_{2A}-Agonist; BAY: BAY 60-6583 – Adenosin-Rezeptor A_{2B}-Agonist; BzATP: BzATP *triethylammonium salt* - stabiles ATP-Analog; 2-Thio-UTP: 2-ThioUTP *tetrasodium salt* – ATP-Rezeptor $P2Y_2$-Agonist; A740003: ATP-Rezeptor $P2X_7$-Inhibitor; 5-BDBD: ATP-Rezeptor $P2X_4$-

Inhibitor; LPS: LPS-EB Ultrapure – Lipopolysaccharid – TLR4-Ligand; TNC: Tenascin-C – Matrizelluläres Protein – TLR4-Ligand; CLI: CLI-095 – TLR4-*Signaling*-Inhibitor; IL: Interleukin.

Eine Grundvoraussetzung für eine Inflammasomaktivierung ist, dass in der Zelle ausreichend Pro-IL-1β als Substrat für Caspase-1 zur Verfügung steht. Aus diesem Grund wurde außerdem die Pro-IL-1β-Expression nach Stimulation der auf den EPDC exprimierten Adenosin- und ATP-Rezeptoren untersucht. Dafür wurden EPDC für 6 h mit Stimulatoren bzw. Inhibitoren inkubiert (Tabelle 13, Seite 25). Als Positiv-Kontrolle wurden EPDC mit dem bekannten TLR4-Liganden LPS stimuliert, der in experimentellen Studien oft zur Inflammasomaktivierung als Induktor der Pro-IL-1β-Expression verwendet wird (Di Virgilio, 2013). Wie in Abbildung 7B dargestellt, reagierten EPDC auf die Stimulation mit LPS mit einer starken Aktivierung der Pro-IL-1β-Expression. Auch der spezifische A_{2B}R-Agonist BAY 60-6583 sowie das ATP-Analog BzATP konnten die Pro-IL-1β-Expression erhöhen. Der BzATP-vermittelte Effekt konnte weder durch den $P2X_4$R-Inhibitor 5-BDBD, noch durch den $P2X_7$R-Inihibitor A740003 inhibiert werden. Des Weiteren zeigten weder die gezielte Stimulation des $P2Y_2$R mit 2-Thio-UTP, noch das ATP-Analog ATPγS (nicht dargestellt) einen Effekt auf die Pro-IL-1β-Expression (Hesse et al., 2017).

Ein MI, in dessen Folge EPDC gebildet werden, induziert normalerweise eine sterile Entzündung. Folglich sind keine typischen PAMPs wie LPS zur Aktivierung von TLR4 und somit zur Stimulation der Pro-IL-1β-Expression vorhanden. Für eine Inflammasomaktivierung nach MI wäre es daher notwendig, dass die Pro-IL-1β-Expression durch endogene Faktoren stimuliert wird. Das endogene matrizelluläre Protein TNC wird im gesunden adulten Myokard nicht exprimiert, jedoch kommt es nach Gewebeschädigung, wie z.B. MI, zu einer starken TNC-Expression im Myokard (Imanaka-Yoshida, 2012). Um den Einfluss von TNC auf die Pro-IL-1β-Expression in EPDC zu untersuchen, wurden EPDC für 6 h mit TNC inkubiert und anschließend eine qRT-PCR durchgeführt (Abb. 7C). Es zeigte sich, dass TNC die Expression von Pro-IL-1β in EPDC signifikant erhöhte, das Ausmaß des Effektes im Vergleich zu LPS jedoch geringer war. Der TLR4-*Signaling*-Inhibitor CLI-095, der über die intrazelluläre Domäne des TLR4 die Signal-weiterleitende Kaskade hemmt, hob sowohl die Wirkung von LPS, als auch die Wirkung von TNC auf. Überraschenderweise wurden auch die stimulierenden Effekte des A_{2B}R-Agonisten BAY 60-6583 und von BzATP auf die Pro-IL-1β-Expression durch den TLR4-*Signaling*-Inhibitor CLI-095 blockiert (Abb. 7C). Um zu untersuchen, ob EPDC selbst eine Quelle von TNC sein können, wurde die TNC-Expression in unstimulierten EPDC mittels qRT-PCR analysiert. Wie in Abbildung 8A zu sehen, ist eine TNC-Expression in EPDC nachweisbar (Hesse et al., 2017).

3.2 EPDC exprimieren die Inflammasom-Komponenten NLRP3, ASC und Caspase-1

Bei Inflammasomen handelt es sich um einen Proteinkomplex, der aus mehreren Komponenten zusammengesetzt ist. Die Komponenten des NLRP3-Inflammasoms sind das Sensorprotein NLRP3, das Bindeprotein ASC und das Effektorenzym Caspase-1. Wie in Abbildung 8B dargestellt, konnte mittels qRT-PCR die Expression der drei Komponenten in unstimulierten EPDC nachgewiesen werden.

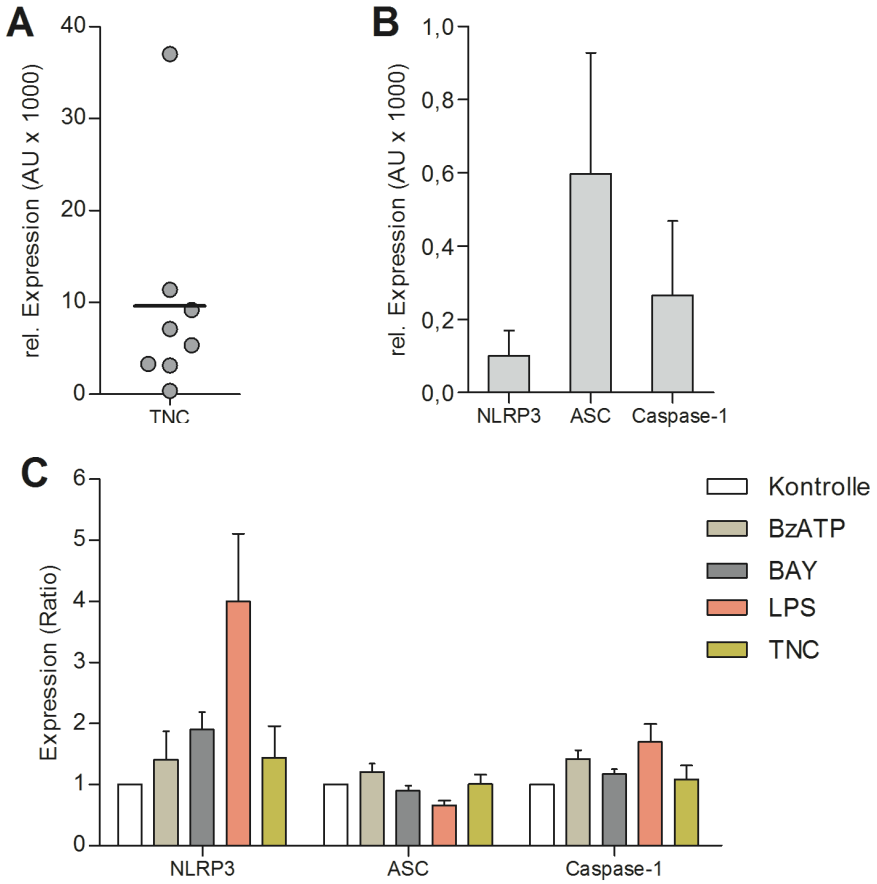

Abb. 8: Expression der Inflammasomkomponenten und TNC in EPDC. Quantitative *Real-Time* PCR. Basale Expression von **A**) Tenascin-C (TNC) (n=8) und **B**) den Inflammasomkomponenten (n=5) in unstimulierten EPDC. **C**) Regulation der Inflammasomkomponenten durch die zuvor ermittelten Aktivatoren der Pro-IL-1β-Expression (n=5), normiert auf die Kontrolle (Ratio). Dargestellt als Einzelwerte mit Mittelwert (**A**) bzw. Mittelwerte ± SEM (**B**+**C**). EPDC: *Epicardium-derived cells*; BAY: BAY 60-6583 – Adenosin-Rezeptor A_{2B}-Agonist; BzATP: BzATP *triethylammonium salt* – stabiles ATP-Analog; LPS: LPS-EB Ultrapure – Lipopolysaccharid – TLR4-Ligand; TNC: Tenascin-C – Matrizelluläres Protein – TLR4-Ligand; NLRP3: NOD-*like receptor family, pyrin domain containing 3* – Sensorprotein; ASC: *apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD* – Bindeprotein; Caspase-1: Effektorenzym.

Um zu untersuchen, ob die Expression der Komponenten einer Regulation durch purinerges oder TLR4-*Signaling* unterliegt, wurden EPDC für 6 h mit dem A_{2B}R-Agonisten BAY 60-6583, dem ATP-Analog BzATP, dem TLR4-Liganden LPS und dem matrizellulären Protein TNC inkubiert und die Expression von NLRP3, ASC und Caspase-1 anschließend mittels qRT-PCR bestimmt. Wie in Abbildung 8C zu sehen, waren für BAY 60-6583, BzATP, LPS und TNC keine regulatorischen Effekte auf die Expression von ASC und Caspase-1 detektierbar. Die Expression von NLRP3 wurde alleine durch LPS reguliert, während die anderen Faktoren auch hier keinen Effekt zeigten. Der beobachtete Effekt von LPS war mit einem p-Wert = 0,053 bei einem n = 5 nicht signifikant.

3.3 Adenosin und ATP stimulieren die Sekretion von IL-1β in EPDC

In den bisherigen Versuchen konnte gezeigt werden, dass in EPDC die Inflammasomkomponenten NLRP3, ASC und Caspase-1 exprimiert werden und die Pro-IL-1β-Expression stimuliert werden kann. Aktive Inflammasome setzen die unreife Vorstufe Pro-IL-1β in reifes IL-1β um, welches anschließend von der Zelle sezerniert wird und dessen Konzentration im Überstand der Zellen bestimmt werden kann. Für andere Zelltypen ist bereits bekannt, dass ATP sowohl über den $P2X_4R$ (Chen et al., 2013; de Rivero Vaccari et al., 2012), als auch über den $P2X_7R$ (Próchnicki et al., 2016) das Inflammasom aktivieren kann. Um zu untersuchen, ob die auf den EPDC exprimierten Adenosin- und ATP-Rezeptoren das Inflammasom in EPDC aktivieren können, wurden EPDC zunächst 16 h mit LPS *geprimt*, um sicherzustellen, dass ausreichend Pro-IL-1β als Substrat für Caspase-1 in den Zellen vorhanden ist. Anschließend wurden die Zellen für weitere 24 h mit dem A_{2B}R-Agonisten BAY 60-6583, dem ATP-Analog BzATP, dem spezifische $P2Y_2$R-Agonisten 2-Thio-UTP sowie den spezifischen Inhibitoren A740003 ($P2X_7R$) und 5-BDBD ($P2X_4R$) inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die IL-1β- bzw. IL-6-Konzentration mittels eines Bio-Plex in den Zellkultur-Überständen bestimmt. Abbildung 9A fasst die Ergebnisse zur IL-1β-Sekretion aus EPDC nach Stimulation bzw. Inhibition der Adenosin- bzw. ATP-Rezeptoren zusammen. BzATP steigerte die IL-1β-Sekretion um das 7,7-fache, was auf eine Aktivierung des Inflammasoms in EPDC schließen lässt. Allerdings war eine hohe Variabilität im Ausmaß des BzATP-vermittelten Effektes innerhalb der verschiedenen EPDC-Präparationen festzustellen. Der spezifische $P2X_7R$-Inhibitor A740003 senkte den Effekt von BzATP auf die IL-1β-Sekretion um 77%, während der $P2X_4R$-Inhibitor 5-BDBD keine Wirkung aufwies. 2-Thio-UTP als spezifischer $P2Y_2$R-Agonist hatte auf die IL-1β-Sekretion keinen Einfluss. Der A_{2B}R-Agonist BAY 60-6583 steigerte die IL-1β-Sekretion signifikant, aber mit 1,8-fach im Ausmaß deutlich geringer als BzATP. Der $P2X_7R$-Inhibitor

A740003 schien den BAY 60-6583-vermittelten Effekt aufzuheben. Der $P2X_4R$-Inhibitor 5-BDBD zeigte dagegen auch hier keine Wirkung (Hesse et al., 2017).

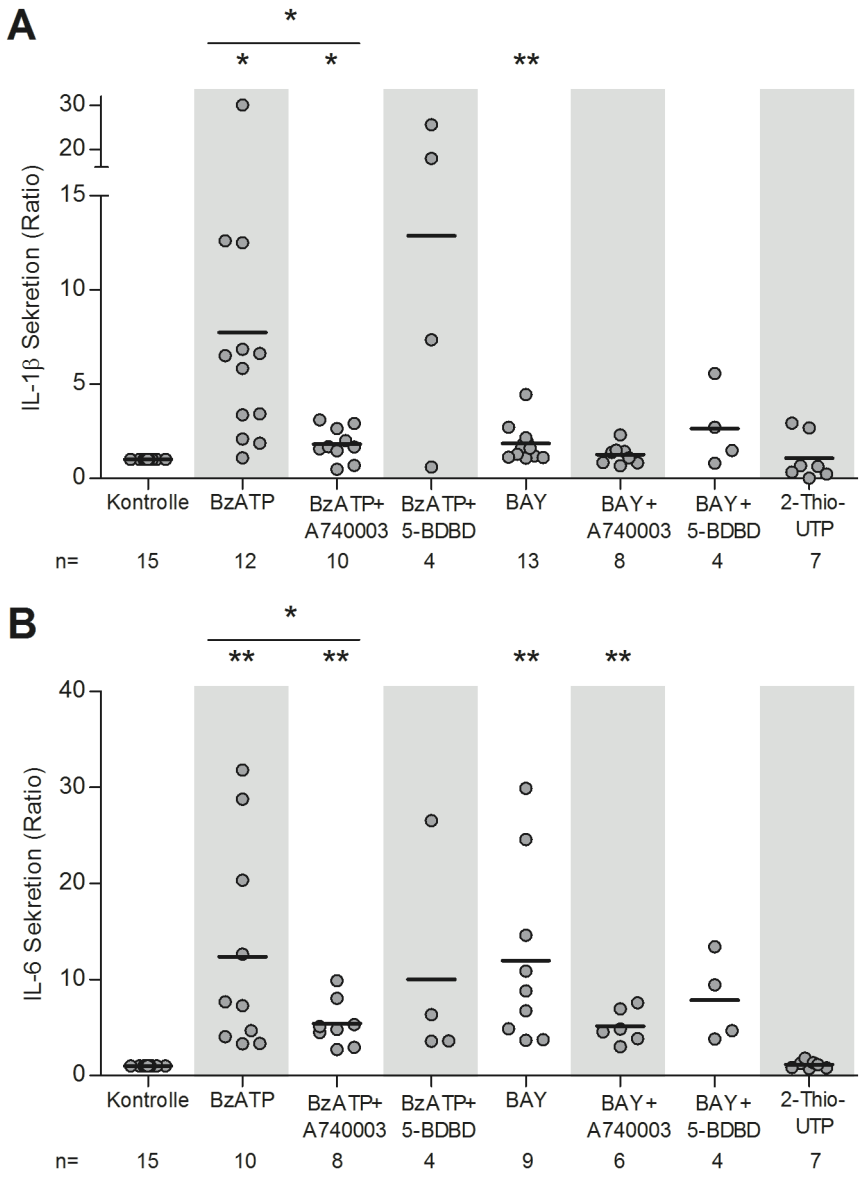

Abb. 9: Analyse der Sekretion von IL-1β und IL-6 nach Adenosin- und ATP-Rezeptor-Aktivierung im Bio-Plex. In Zellüberständen wurden die **A)** IL-1β-Sekretion und die **B)** IL-6-Sekretion nach Aktivierung bzw. Inhibition der auf EPDC exprimierten Adenosin- und ATP-Rezeptoren gemessen. Die Werte wurden auf die Kontrolle normiert und als Einzelwerte mit Mittelwert dargestellt. *$p < 0,05$ **$p < 0,01$. EPDC: *Epicardium-derived cells*; BzATP: BzATP *triethylammonium salt* – stabiles ATP-Analog; BAY: BAY 60-6583 – Adenosin-Rezeptor A_{2B}-Agonist; 2-Thio-UTP: 2-ThioUTP *tetrasodium salt* – ATP-Rezeptor $P2Y_2$-Agonist; A740003: ATP-Rezeptor $P2X_7$-Inhibitor; 5-BDBD: ATP-Rezeptor $P2X_4$-Inhibitor; IL: Interleukin.

In den gleichen Versuchen wurde der Einfluss von purinergen Rezeptoren auf die Sekretion von IL-6 gemessen. Wie Abbildung 9B zeigt steigerte BzATP die IL-6-Sekretion signifikant um das 12,4-fache. Der $P2X_7R$-Inhibitor A740003 konnte diesen Effekt hemmen, während der $P2X_4R$-

Inhibitor 5-BDBD keinen Einfluss auf den stimulierenden Effekt von BzATP zeigte. Der $P2Y_2R$-Agonist 2-Thio-UTP hatte keinen Effekt auf die IL-6-Sekretion. In Übereinstimmung mit den bisherigen Beobachtungen des Instituts steigerte der $A_{2B}R$-Agonist BAY 60-6583 die IL-6-Sekretion signifikant (12-fach) (Hesse et al., 2017).

3.4 Die Sekretion von IL-1β in EPDC ist NLRP3-Inflammasom-abhängig

Die Spaltung der unreifen Vorstufe Pro-IL-1β in reifes IL-1β erfolgt durch das Enzym Caspase-1. Um zu bestätigen, dass die in Kapitel 3.3 beschriebene IL-1β-Sekretion von EPDC nicht nur Inflammasom-abhängig im Allgemeinen erfolgt, sondern im speziellen ein NLRP3-Inflammasom in EPDC aktiv ist, wurden zwei verschiedene Inflammasom-Inhibitoren, Z-WEHD-FMK und CRID3 eingesetzt. Der allgemeine Inflammasom-Inhibitor Z-WEHD-FMK bindet mit dem Erkennungsmotiv „WEHD“ gezielt an aktive Caspase-1 in Inflammasomen und hemmt diese irreversibel. Der spezielle NLRP3-Inflammasom-Inhibitor CRID3 hemmt die ASC-Oligomerisation in NLRP3-Inflammasomen und somit den Zusammenbau dieses spezifischen Inflammasomtyps. Dafür wurden EPDC zunächst für 16 h mit LPS stimuliert und anschließend für weitere 24 h mit den oben beschriebenen Aktivatoren der IL-1β-Sekretion sowie den obigen spezifischen Inflammasom-Inhibitoren inkubiert. Wie in Abbildung 10A zu sehen ist führte weder die Stimulation der EPDC mit BzATP, noch die Stimulation mit dem $A_{2B}R$-Agonist BAY 60-6583 zu einer signifikanten Steigerung der IL-1β-Sekretion. Auch die spezifischen Inflammasom-Inhibitoren Z-WEHD-FMK und CRID3 zeigten folglich keine signifikanten Effekte.

Wie bereits in Kapitel 3.3 beschrieben, fielen bei der Betrachtung der Einzelwerte der IL-1β-Sekretion nach Stimulation mit BzATP auch in diesem Versuchsansatz starke Unterschiede zwischen den EPDC-Präparationen auf (Abb. 10A). Die einzelnen Präparationen sind hier als Punkteplot aufgetragen, wobei jede Präparation in einer anderen Farbe dargestellt ist. Dabei fällt auf, dass zwei EPDC-Präparationen mit einem deutlichen Anstieg der IL-1β-Sekretion nach Stimulation mit BzATP reagierten, nämlich EPDC 1 (rot) und EPDC 3 (blau). Die restlichen EPDC-Präparationen zeigten keine Reaktion auf die Stimulation mit BzATP.

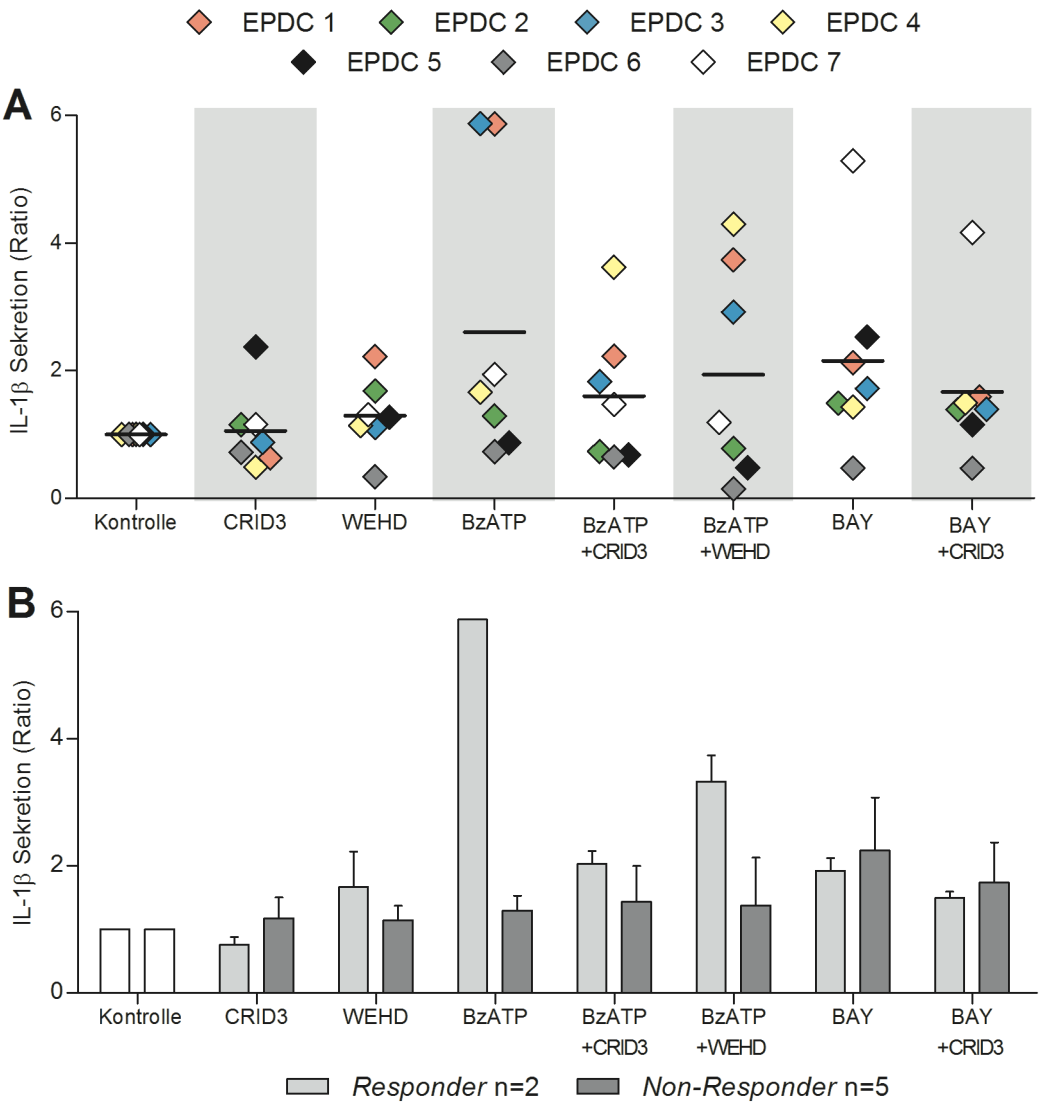

Abb. 10: Analyse der Sekretion von IL-1β nach Inflammasomaktivierung oder –inhibition im Bio-Plex. A) Die in dieser Versuchsreihe verwendeten EPDC-Präparationen wurden auf die Kontrolle normiert (Ratio) und als Einzelwerte mit Mittelwert aufgetragen. n=7 **B)** Die in A) dargestellten EPDC-Präparationen wurden in zwei Gruppen zusammengefasst: Zum einen die *Responder* (EPDC 1 + 3), die positiv auf die Stimulation mit BzATP reagierten, und zum zweiten die *Non-Responder* (EPDC 2 + 4-7), die keine Reaktion auf die Stimulation mit BzATP zeigten. Dargestellt als Mittelwerte ± SEM. EPDC: *Epicardium-derived cells*; CRID3: CRID3 *sodium salt* – Inflammasom-Inhibitor; WEHD: Z-WEHD-FMK – Caspase-1-Inhibitor; BzATP: BzATP *triethylammonium salt* – stabiles ATP-Analog; BAY: BAY 60-6583 – Adenosin-Rezeptor A_{2B}-Agonist; IL: Interleukin.

Wegen der hohen Variabilität der Daten wurden die EPDC-Präparationen in Abbildung 10B in zwei Gruppen geteilt. In der ersten Gruppe (*Responder*) befinden sich die EPDC-Präparationen 1 und 3, bei denen die IL-1β-Sekretion nach Stimulation mit BzATP um das 5,8-fache gesteigert war. Die zweite Gruppe (*Non-Responder*) zeigt die restlichen EPDC-Präparationen, die auf die Stimulation mit BzATP nicht mit einer Steigerung der IL-1β-Sekretion reagiert haben. Betrachtet

man nun die *Responder*-Gruppe, fällt auf, dass die durch BzATP induzierte IL-1β-Sekretion sowohl durch den Caspase-1-Inhibitor Z-WEHD-FMK, als auch durch den NLRP3-Inflammasom-Inhibitor CRID3 nahezu auf das Niveau der unbehandelten Kontrollzellen reduziert wurde. In der *Non-Responder*-Gruppe zeigten die eingesetzten Inhibitoren keine Wirkung. Der A_{2B}R-Agonist BAY 60-6583 rief in beiden Gruppen eine leichte Steigerung der IL-1β-Sekretion hervor, die durch den NLRP3-Inflammasom-Inhibitor CRID3 nicht hemmbar war. Der Effekt von Z-WEHD-FMK auf die BAY 60-6583-vermittelte Steigerung konnte nicht bestimmt werden, da sich diese Kombination als toxisch für die Zellen erwies. Dies war wohl auf die Konzentration von DMSO, die notwendig war um beide Substanzen zu lösen, zurückzuführen. Ein Kontrollansatz mit alleiniger DMSO-Gabe in gleicher Konzentration zeigte die gleiche Toxizität.

3.5 Das Inflammasom in EPDC beeinflusst die Sekretion von IL-6

In Abbildung 9B konnte gezeigt werden, dass die Sekretion von IL-6 in EPDC, wie die Sekretion von IL-1β, durch die Aktivierung des ATP-Rezeptors $P2X_7$ auf EPDC stimuliert werden konnte. Nachdem in Kapitel 3.4 gezeigt wurde, dass die IL-1β-Sekretion durch EPDC Inflammasom-abhängig ist, wurde im nächsten Schritt der Einfluss von verschiedenen Agonisten bzw. Inhibitoren auf die Sekretion von IL-6, dem Haupt-*Target* von IL-1β, untersucht. Dazu wurde in Zellüberständen (siehe Kapitel 3.4) die IL-6-Konzentration mittels Bio-Plex bestimmt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 11A als Punkteplot dargestellt. Das Ausmaß der IL-6-Sekretion nach Stimulation mit BzATP und dem A_{2B}R-Agonisten BAY 60-6583 variierte stark zwischen den verschiedenen EPDC-Präparationen, ähnlich wie es bereits in vorherigen Versuchen (Abb. 9B) zu beobachten war. Im direkten Vergleich mit der IL-1β-Sekretion (Abb. 10A) fällt auf, dass die EPDC-Präparationen 1 und 3, die auf Stimulation mit BzATP mit einer gesteigerten IL-1β-Sekretion reagierten, auch am deutlichsten die IL-6-Sekretion nach BzATP steigerten. Fasst man alle Präparationen zusammen, lässt sich jedoch auch in Abbildung 11A kein signifikanter Effekt der Inflammasom-Inhibitoren Z-WEHD-FMK und CRID3 nachweisen.

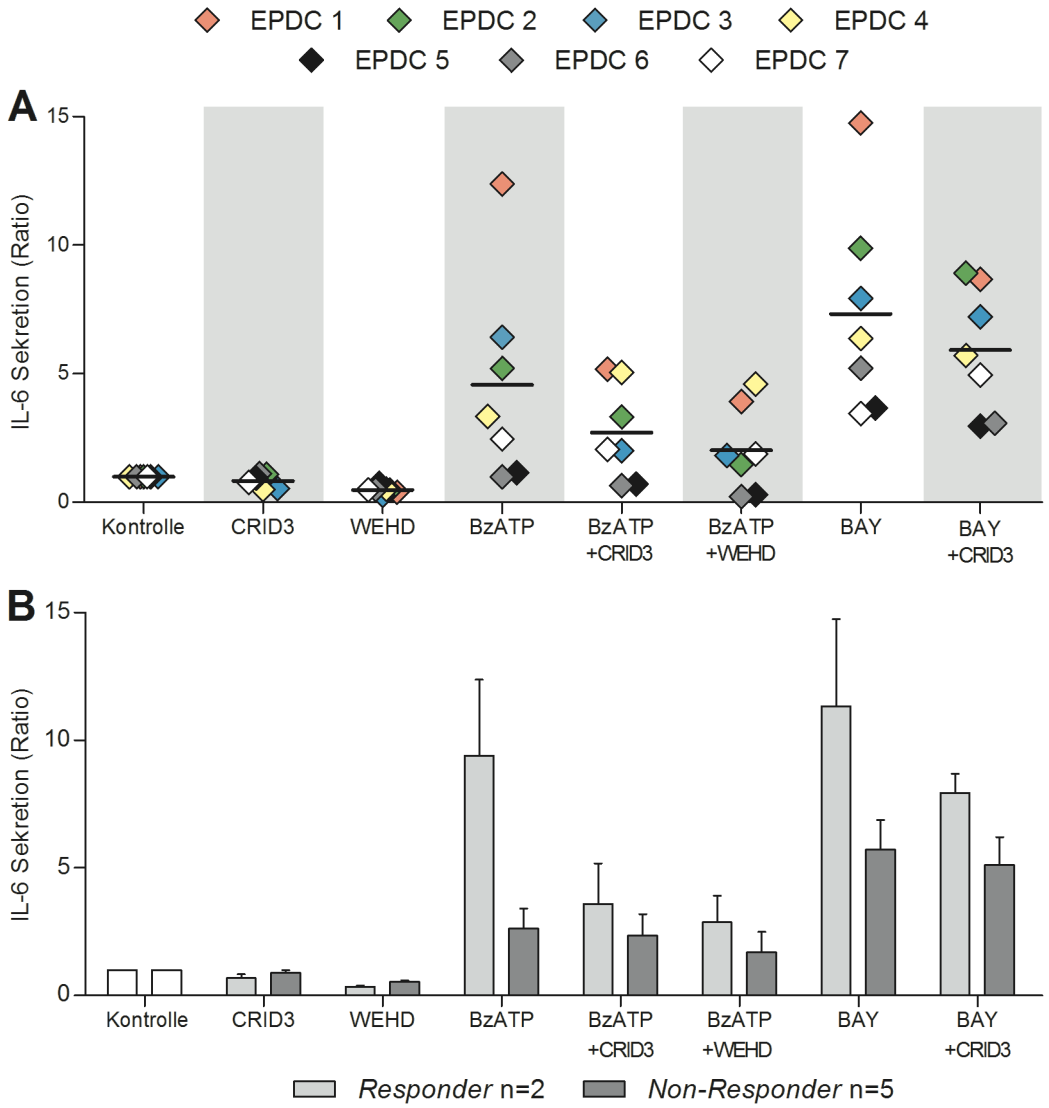

Abb. 11: IL-6-Sekretion nach Inflammasomaktivierung und –inhibition im Bio-Plex. A) Die Gesamtheit der in dieser Versuchsreihe verwendeten EPDC-Präparationen wurde auf die Kontrolle normiert (Ratio) und als Einzelwerte mit Mittelwert aufgetragen. **B)** Die in A) dargestellten EPDC-Präparationen wurden in zwei Gruppen zusammengefasst: *Responder* (EPDC 1 + 3), die auf die Stimulation mit BzATP mit einer Steigerung der IL-1β-Sekretion reagierten, und *Non-Responder* (EPDC 2 + 4-7), die auf die Stimulation mit BzATP keine Steigerung der IL-1β-Sekretion zeigten. Dargestellt als Mittelwerte ± SEM. *p < 0,05. EPDC: *Epicardium-derived cells*; CRID3: CRID3 *sodium salt* – Inflammasom-Inhibitor; WEHD: Z-WEHD-FMK – Caspase-1-Inhibitor; BzATP: BzATP *triethylammonium salt* – stabiles ATP-Analog; BAY: BAY 60-6583 – Adenosin-Rezeptor A_{2B}-Agonist; IL: Interleukin.

In Abbildung 11B sind die Ergebnisse zu den einzelnen EPDC-Präparationen analog zu Abbildung 10B in zwei Gruppen eingeteilt: EPDC 1 und 3 mit Steigerung der IL-1β-Sekretion nach Stimulation mit BzATP (*Responder*) und die restlichen EPDC-Präparationen ohne Steigerung der IL-1β-Sekretion nach Stimulation mit BzATP (*Non-Responder*). Während sowohl der Caspase-1-Inhibitor Z-WEHD-FMK als auch der NLRP3-Inflammasom-Inhibitor CRID3 die durch BzATP hervorgerufene Steigerung der IL-6-Sekretion in der *Responder*-Gruppe deutlich

hemmten, war auch auf die IL-6-Sekretion in der *Non-Responder*-Gruppe kein hemmender Einfluss der Inhibitoren erkennbar. Das Ausmaß der Hemmung war jedoch geringer als bei der IL-1β-Sekretion, wo annähernd auf das Kontrollniveau gesenkt wurde. Der A_{2B}R-Agonist BAY 60-6583 erhöhte in beiden Gruppen die IL-6-Sekretion, deutlicher jedoch in der *Responder*-Gruppe. In dieser Gruppe ist auch ein Trend zur Inhibition durch den Inflammasom-Inhibitor CRID3 auf den Effekt von BAY 60-6583 erkennbar. In der *Non-Responder*-Gruppe zeigte sich dieser Trend nicht.

3.6 Aktivierung des Inflammasoms in EPDC unter Serum-freien Bedingungen

Die Ursache für die beobachtete hohe Variabilität der verschiedenen EPDC-Präparationen in der Reaktion auf einen BzATP-Stimulus ist unklar. In den Versuchen wurden die Zellen stets in EPDC-Medium stimuliert und analysiert. Wie in Tabelle 5 (Seite 17) aufgeführt enthält EPDC-Medium 30% FBS und somit unkontrollierbare Faktoren, die die Reaktion der Zellen beeinflussen könnten. Um Komponenten des FBS als Ursache der Variabilität auszuschließen, wurden die EPDC-Präparationen 5-7 parallel zu Kapitel 3.4 in dem Serum-freien Medium Panserin 401 stimuliert und mittels Bio-Plex analysiert. In Abbildung 12A kann man erkennen, dass die EPDC-Präparationen 5-7 auf die Stimulation mit BzATP mit einer Steigerung der IL-1β-Sekretion um das 24,5-fache reagierten. Somit fiel die Reaktion deutlich stärker aus, als bei der Stimulation der EPDC-Präparationen 5-7 in Serum-haltigem EPDC-Medium (Abb. 10A), wo lediglich eine Steigerung um das 1,2-fache beobachtet werden konnte.

Sowohl der NLRP3-Inflammasom-Inhibitor CRID3 als auch der Caspase-1-Inhibitor Z-WEHD-FMK konnten die durch BzATP-induzierte IL-1β-Sekretion deutlich hemmen (Abb. 12A). Bei einer Normierung auf die IL-1β-Sekretion BzATP-stimulierter Zellen sind diese signifikant (Abb. 12B). Der NLRP3-Inflammasom-Inhibitor CRID3 senkte die BzATP-induzierte IL-1β-Sekretion signifikant um 64%, der Caspase-1-Inhibitor um 39%. Die mit dem A_{2B}R-Agonisten BAY 60-6583 behandelten Zellen wiesen morphologische Veränderungen im Sinne einer Apoptose auf und waren somit nicht zuverlässig auswertbar.

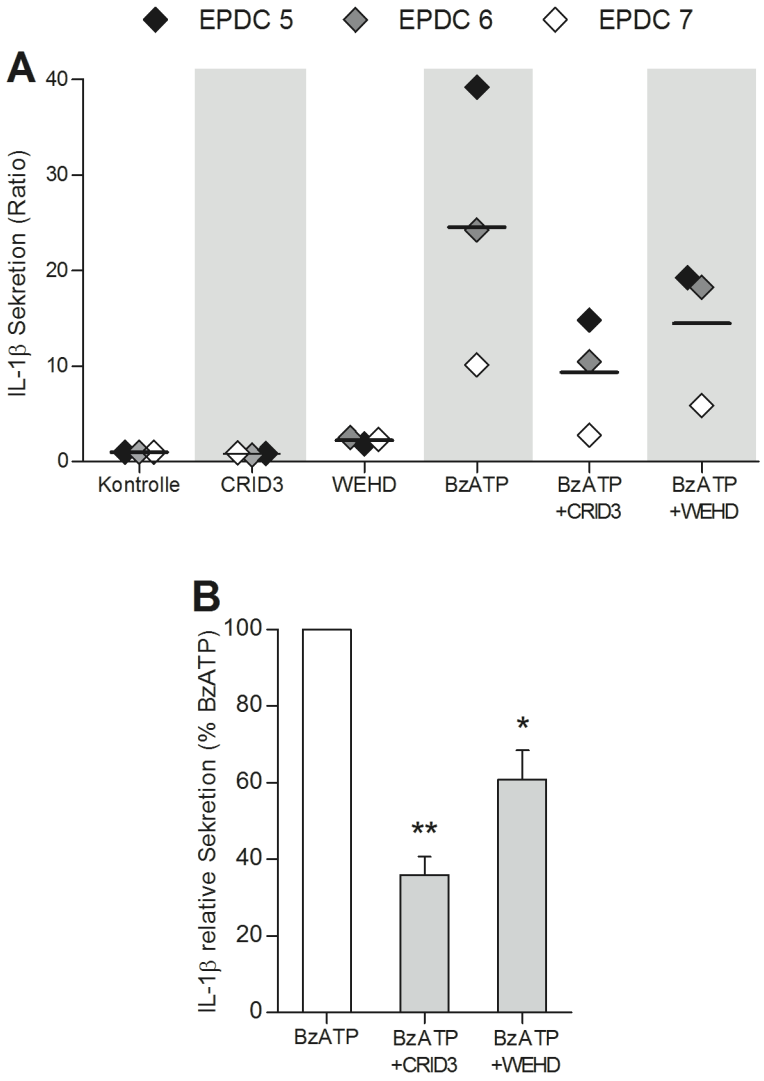

Abb. 12: IL-1β-Sekretion nach Inflammasomaktivierung und –inhibition in Serum-freien Medium. Bio-Plex zur Bestimmung der Zytokinkonzentration in Zellüberständen. **A)** Die EPDC-Präparationen auf die Kontrolle normiert (Ratio) und als Einzelwerte mit Mittelwert aufgetragen. **B)** Um die Wirkung der Inhibitoren zu verdeutlichen wurde auf die BzATP-induzierte IL-1β-Sekretion normiert (%BzATP), n=3. Dargestellt als Mittelwerte ± SEM. *p < 0,05 **p < 0,01. EPDC: *Epicardium-derived cells*; CRID3: CRID3 *sodium salt* – Inflammasom-Inhibitor; WEHD: Z-WEHD-FMK – Caspase-1-Inhibitor; BzATP: BzATP *triethylammonium salt* – stabiles ATP-Analog; IL: Interleukin.

3.7 Nachweis der Caspase-1-Aktivität in EPDC mittels Lumineszenz

Um die bisherigen Ergebnisse bezüglich des Vorhandenseins und der Aktivierbarkeit von Inflammasomen in EPDC zu untermauern, wurde eine weitere Methode zur Analyse der Inflammasomaktivität eingesetzt: das Kit Caspase-Glo 1 *Inflammasome Assay* (Promega). Bei dieser Methode spaltet die aktive Caspase-1 ein spezifisches Substrat, wobei am Ende der Reaktion ein messbares Lichtsignal erzeugt wird (siehe Abb. 6). Dazu wurden EPDC, entsprechend dem Protokoll des Herstellers, zunächst für 4 h mit hochdosiertem LPS *geprimt* und

anschließend für 3 h mit BzATP und dem Caspase-1-Inhibitor Ac-YVAD-cmk in Serum-haltigem EPDC-Medium inkubiert. Anschließend wurde die Lumineszenz mittels Luminometer bestimmt. Diese erzeugte Lumineszenz ist proportional zur aktiven Caspase-1. Im Gegensatz zu der zuvor angewendeten Zytokinmessung ist diese Methode unabhängig von Sekretionsmechanismen und somit ein direkter Nachweis von aktiver Caspase-1.

Abbildung 13 zeigt einen signifikanten Anstieg der Caspase-1-Aktivität in EPDC nach Stimulation mit BzATP im Vergleich zur Kontrolle. Der Caspase-1-Inhibitor Ac-YVAD-cmk reduzierte die BzATP-induzierte Inflammasomaktivierung signifikant um 38%. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen aus der Analyse der IL-1β-Sekretion (siehe Kapitel 3.3) sprechen diese Resultate für eine BzATP-vermittelte Aktivierung von Inflammasomen in EPDC.

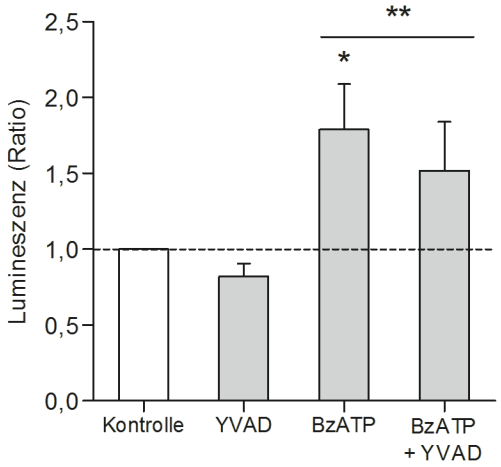

Abb. 13: Caspase-1-Aktivität nach Stimulation bzw. Inhibition des Inflammasoms in EPDC in Serum-haltigem EPDC-Medium. Lumineszenz-*Assay* zur Bestimmung der Caspase-1-Aktivität. Die *Blank*-korrigierten Werte wurden auf die Kontrolle normiert (Ratio) und als Mittelwerte ± SEM dargestellt. n=3. *p < 0,05 **p < 0,01. EPDC: Epicardium-derived cells; BzATP: BzATP *triethylammonium salt* – stabiles ATP-Analog; YVAD: Ac-YVAD-cmk – Caspase-1-Inhibitor.

4 Diskussion

4.1 EPDC exprimieren die notwendigen Komponenten für die Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms

Sowohl für die Aktivierung als auch für den Zusammenbau eines funktionellen NLRP3-Inflammasoms sind essentielle Komponenten notwendig. Zum einen müssen die entsprechenden Rezeptoren, die die diversen DAMPs als aktivierendes Agens erkennen, auf der Zelloberfläche vorhanden sein. In Vorarbeiten des Instituts konnte gezeigt werden, dass durch einen MI reaktivierte EPDC ein spezifisches Muster an purinergen Rezeptoren exprimieren, insbesondere die Adenosin-Rezeptoren A_{2A} und A_{2B} sowie die ATP-Rezeptoren $P2X_4$, $P2X_7$ und $P2Y_2$.. Darüber hinaus konnten sie erstmals zeigen, dass EPDC nach Aktivierung des Adenosin-Rezeptors A_{2B} ATP aus intrazellulären Vesikeln sezernieren (Hesse et al., 2017). Zum anderen müssen die für den Zusammenbau des Inflammasoms notwendigen Bausteine (siehe Kapitel 1.4.1) in ausreichender Menge vorhanden sein. In den in dieser Arbeit durchgeführten Experimenten konnte gezeigt werden, dass in EPDC die Inflammasomkomponenten ASC, NLRP3 und Caspase-1 basal exprimiert werden (Abb. 8B). Durch LPS schien die Expression von NLRP3 gesteigert zu werden, während die Expression der übrigen Inflammasomkomponenten keiner Regulation unterlag (Abb. 8C). Diese Beobachtung ist im Einklang mit Angaben der Literatur, in der die Expression von NLRP3 im Rahmen des *Priming* TLR4-abhängig gesteigert wird (Bauernfeind et al., 2009). Des Weiteren konnte auch eine basale Expression des matrizellulären Proteins TNC in unstimulierten EPDC nachgewiesen werden (Abb. 8A). Interessanterweise wird TNC im nicht infarzierten Myokard nicht exprimiert; lediglich nach einem MI findet sich eine starke Expression von TNC in myokardialen Fibroblasten (Imanaka-Yoshida, 2012).

4.2 Tenascin-C, ATP und Adenosin induzieren in EPDC die Pro-IL-1β-Expression via TLR4

Für die Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms sind zwei Schritte notwendig, die Aktivierung durch ein aktivierendes Agens und das *Priming* zur Bereitstellung von NLRP3 als essentiellen Baustein sowie Pro-IL-1β als Substrat für Caspase-1. Aus der Literatur ist bekannt, dass der TLR4-Ligand LPS die Pro-IL-1β-Expression steigert, was zur Untersuchung des Inflammasoms in Zellkulturexperimenten zum *Priming* der Zellen genutzt wird (Zasłona et al., 2017). Wie in Abbildung 14 schematisch zusammengefasst, reagierten auch EPDC auf Gabe von LPS mit einer Erhöhung der Pro-IL-1β-Expression (Abb. 7B). In den vorliegenden Versuchen konnte gezeigt werden, dass die Pro-IL-1β-Expression in EPDC auch durch das matrizelluläre Protein TNC über

TLR4 stimuliert wird (Abb. 7C). Da EPDC TNC selbst exprimieren, deutet dies darauf hin, dass sie im sterilen Umfeld eines MI selbst für das notwendige *Priming* zur Inflammasomaktivierung sorgen könnten. In den Versuchen konnte außerdem gezeigt werden, dass auch eine Aktivierung des Adenosin-Rezeptors A_{2B} bzw. der ATP-Rezeptoren die Pro-IL-1β-Expression steigern (Abb. 7C). Überraschenderweise ließ sich diese Pro-IL-1β-Induktion durch den TLR4-Inhibitor CLI-095 vollständig auf Kontrollniveau senken (Abb. 7C), was auf die Beteiligung des TLR4-Signalwegs auch für die Effekte von Adenosin und ATP hindeutet. Die purinergen Rezeptoren $P2X_4$, $P2X_7$ und $P2Y_2$ schienen hingegen keine Rolle zu spielen (Abb. 7B). Die Signalwege, über die sowohl ATP als auch Adenosin TLR4 aktivieren können, sind bisher nicht bekannt.

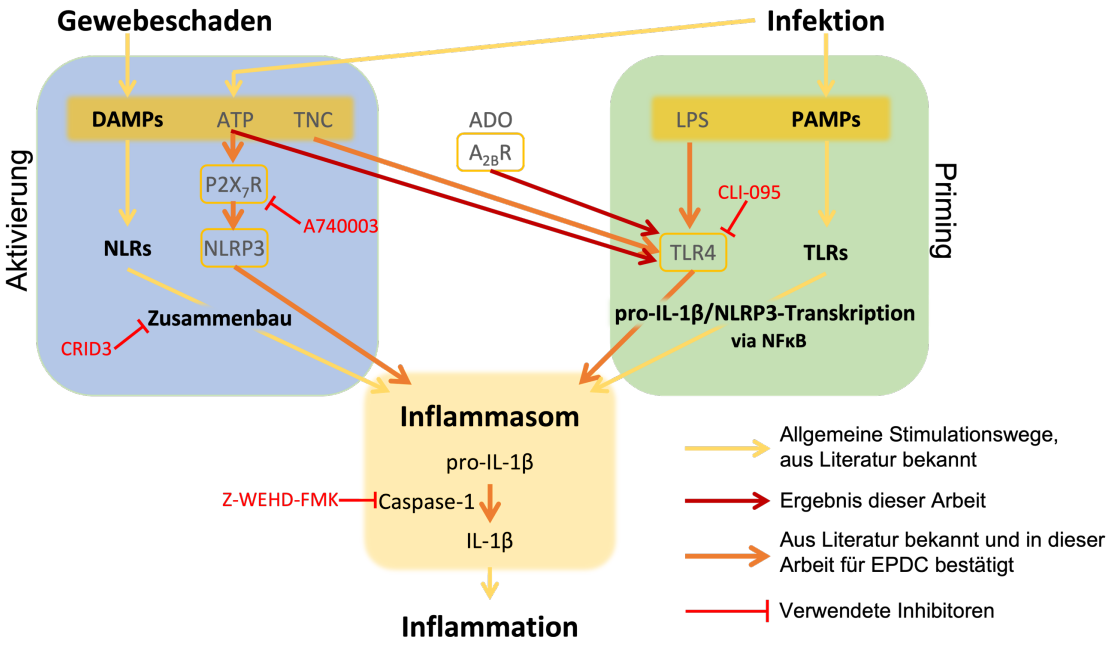

Abb. 14: Schematische Zusammenfassung der Ergebnisse dieser Arbeit zur NLRP3-Inflammasomaktivierung in EPDC. Für die Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms sind zwei Schritte notwendig: 1. Das *Priming* zur Bereitstellung von pro-IL-1β als Substrat für Caspase-1 und NOD-*like-receptor family, pyrin domain containing* 3 (NLRP3) als Baustein für das Inflammasom. 2. Die Aktivierung und somit der Zusammenbau des Inflammasomkomplexes. Die durch den Zusammenbau aktivierte Caspase-1 spaltet inaktives pro-IL-1β zu aktivem IL-1β, welches im Anschluss ausgeschüttet wird und zur Inflammation führt. Neben den aus der Literatur für andere Zelltypen bekannten allgemeinen Signalwegen (gelbe Pfeile) konnte in dieser Arbeit für EPDC nachgewiesen werden, dass auch Adenosin-5'-Triphosphat (ATP) und Adenosin (ADO) *Toll-like receptor* 4 (TLR4)-vermittelt die Expression von pro-IL-1β steigern (dunkelrote Pfeile). Darüber hinaus konnten die bereits aus anderen Zelltypen bekannten spezifischen Signalwege für EPDC in dieser Arbeit bestätigt werden (orange Pfeile). Allgemeine Begriffe zum Mechanismus der Inflammasomaktivierung sind in schwarzer Schrift und fettgedruckt formatiert. Begriffe zum angeführten Beispiel einer LPS- und ATP-vermittelten Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms sind in grauer Schrift dargestellt. EPDC: *Epicardium-derived cells*; DAMPs: *Damage associated molecular patterns*; TNC: Tenascin-C- Matrizelluläres Protein – TLR4-Ligand; $P2X_7R$: ATP-Rezeptor $P2X_7$; NLRs: NOD-*like-receptors*; $A_{2B}R$: Adenosin-Rezeptor A_{2B}; PAMPs: *Pathogen associated molecular patterns*; LPS: Lipopolysaccharid – TLR4-Ligand; TLRs: *Toll-like receptors*; NFκB: *Nuclear factor kappa* B; Caspase-1: Effektorenzym; IL: Interleukin; A740003: ATP-Rezeptor $P2X_7$-Inhibitor; CRID3: CRID3 *sodium salt* – Inflammasom-Inhibitor; CLI-095: TLR4-*Signaling*-Inhibitor; Z-WEHD-FMK: Caspase-1-Inhibitor.

4.3 ATP induziert in EPDC Inflammasom-abhängig die IL-1β-Sekretion durch Aktivierung des $P2X_7$-Rezeptors

EPDC exprimieren auf ihrer Zelloberfläche ein spezifisches Repertoire an purinergen Rezeptoren (Hesse et al., 2017). Zudem konnte in der vorliegenden Arbeit nachgewiesen werden, dass EPDC die notwendigen Komponenten für ein NLRP3-Inflammasom exprimieren und die essentiellen Signalwege zum Schritt des *Primings* für die Inflammasomaktivierung vorhanden sind (siehe Kapitel 4.1 und 4.2). Aus der Literatur ist für andere Zelltypen, wie z. B. Monozyten und Makrophagen, bekannt, dass ATP sowohl über den $P2X_4R$ (Chen et al., 2013; de Rivero Vaccari et al., 2012) als auch über den $P2X_7R$ (Próchnicki et al., 2016) das Inflammasom aktivieren kann (vergleiche Abb. 14). In den in dieser Arbeit durchgeführten Versuchen konnte gezeigt werden, dass die Steigerung der Sekretion von IL-1β in EPDC durch das nicht-selektive ATP-Analog BzATP über den $P2X_7R$ vermittelt wird (Abb. 9A). Die ebenfalls auf EPDC exprimierten Rezeptoren $P2X_4$ und $P2Y_2$ schienen an der ATP-vermittelten Steigerung der IL-1β-Sekretion nicht beteiligt zu sein. Nachdem nachgewiesen werden konnte, dass in EPDC die ATP-induzierte IL-1β-Sekretion über den $P2X_7R$ vermittelt wird, konnte in den folgenden Versuchen die Beteiligung des NLRP3-Inflammasoms daran in EPDC bestätigt werden (Abb. 10 und Abb. 12). Zur Untermauerung des Vorhandenseins eines aktiven Inflammasoms in EPDC konnte außerdem aktive Caspase-1 nach Stimulation mit BzATP nachgewiesen werden (Abb. 13). Darüber hinaus ließ sich auch eine geringe (1,8-fach), jedoch signifikante Steigerung der IL-1β-Sekretion durch Stimulation des Adenosin-Rezeptors A_{2B} beobachten (Abb. 9A). Interessanterweise konnte die $A_{2B}R$-vermittelte Steigerung von IL-1β zumindest teilweise durch Hemmung des ATP-Rezeptors $P2X_7$ reduziert werden. Ein Zusammenhang mit einer Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms ließ sich jedoch nicht nachweisen (Abb. 10).

In den Versuchen zum Nachweis einer Inflammasom-abhängigen Steigerung der IL-1β-Sekretion fand sich, dass nicht alle EPDC-Zellpräparationen auf die Stimulation mit BzATP gleichförmig mit einer Steigerung der IL-1β-Sekretion reagiert haben. In der Auswertung wurden deshalb zwei Gruppen gebildet, die sogenannten *Responder* und die *Non-Responder* (Abb. 10). Die hohe Variabilität der Stimulierbarkeit durch ATP zeigt sich deutlich, wenn die Ergebnisse als Punkteplots aufgetragen werden (Abb. 9A). Die Gründe für die starke Variabilität sind unklar. Es könnte sein, dass in dem verwendeten Zellkulturmedium mit 30% FBS unbekannte Faktoren enthalten sind, die z.B. die Stabilität von BzATP oder die Aktivierung der ATP-Rezeptoren beeinflussen. Aus diesem Grund wurde eine Versuchsreihe mit Serum-freiem-Medium durchgeführt. Bei den verwendeten EPDC-Präparationen handelt es sich um die bereits im Vorversuch verwendeten Präparationen 5-7, die unter serumhaltigen Bedingungen nur mit einer 1,2-fachen Steigerung der IL-1β-Sekretion auf die Stimulation mit ATP reagiert hatten (Abb. 9A). Unter serumfreien Bedingungen ließ sich nun eine deutliche Steigerung der IL-1β-Sekretion um

durchschnittlich das 24,5-fache beobachten (Abb. 12). Auch wenn alle Zellpräparationen eine im Vergleich zu serumhaltigen-Bedingungen deutliche Steigerung der IL-1β-Sekretion zeigen, ist auch hier eine ausgeprägte Variabilität der Ergebnisse feststellbar. Insgesamt deuten diese Versuche darauf hin, dass Bestandteile des Serums erheblich die ATP-induzierte IL-1β-Sekretion beeinflussen könnten.

4.4 Adenosin induziert in EPDC durch Aktivierung des A_{2B}-Rezeptors Inflammasom-unabhängig eine IL-6-Sekretion

Neben der Sekretion von IL-1β nach Inflammasomaktivierung wurde auch der Einfluss des Inflammasoms auf die Sekretion von IL-6 in EPDC untersucht. In Vorarbeiten des Instituts konnte bereits gezeigt werden, dass die IL-6-Expression durch Aktivierung des Adenosin-Rezeptors A_{2B} signifikant gesteigert werden kann (Hesse et al., 2017). Diese Beobachtung war in den in dem Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Versuchen reproduzierbar (Abb. 7). Neben der gesteigerten Genexpression von IL-6 ließ sich auch die Sekretion von IL-6-Protein durch Aktivierung des Adenosin-Rezeptors A_{2B} signifikant um das 12-fache erhöhen (Abb. 9B). Auch eine Aktivierung des $P2X_7R$ resultierte in einer Steigerung der IL-6-Sekretion (12,4-fach) (Abb. 9B). Wie bei der Untersuchung der Inflammasom-abhängigen Sekretion von IL-1β (Abb. 9A), kam es auch bei den Experimenten zur IL-6-Sekretion zu einer hohen Variabilität der Effekte zwischen den verschiedenen EPDC-Zellpräparationen (Abb. 9B). Dementsprechend wurden auch hier zur besseren Auswertbarkeit der Ergebnisse eine Unterteilung in *Responder* und *Non-Responder* vorgenommen.

Während eine pharmakologische Inhibition des Inflammasoms mit durchschnittlich -19% für alle Präparationen bzw. -29% für die *Responder*-Gruppe kaum einen Einfluss auf die $A_{2B}R$-vermittelte IL-6-Induktion zu zeigen schien, zeigte sich für die BzATP-vermittelte IL-6-Induktion in der *Responder*-Gruppe eine Reduktion um -62% durch den Inflammasomhibitor CRID3 (Abb. 11). Ein ähnlicher Effekt war beim Einsatz eines Caspase-1-Inhibitors (WEHD) zu beobachten, der die BzATP-vermittelte IL-6-Induktion in der *Responder*-Gruppe mit -69% ebenfalls nahezu auf das Kontrollniveau absenkte (Abb. 11). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die ATP-vermittelte Sekretion von IL-6 in EPDC Inflammasom-abhängig ist, während die Adenosin-vermittelte IL-6-Induktion über den $A_{2B}R$ unabhängig von einer Inflammasomaktivität erfolgt.

4.5 Zusammenfassung und Ausblick

Wie in Abbildung 15 zusammengefasst dargestellt, konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass EPDC ein funktionelles NLRP3-Inflammasom besitzen, das durch ATP über $P2X_7R$ aktiviert werden kann und die Sekretion von IL-1β sowie IL-6 vermittelt. Darüber hinaus konnte

eine basale Expression von TNC in EPDC nachgewiesen werden, was darauf hindeutet, dass EPDC nach MI in der Lage sein könnten, den notwendigen *Priming*-Schritt zur Aktivierung des Inflammasoms autokrin zu stimulieren.

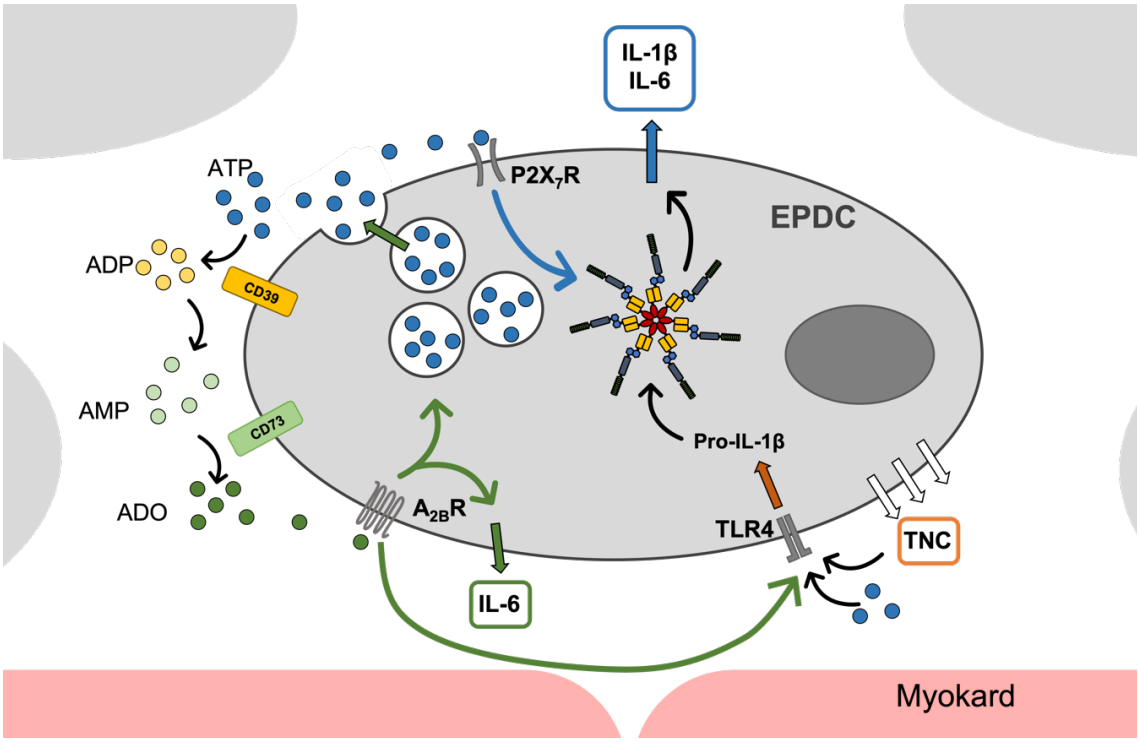

Abb. 15: Modell der Inflammasomaktivierung sowie der ATP- und Adenosin-vermittelten Sekretion von IL-6 in EPDC (adaptiert nach Hesse et al., 2017). Nach Myokardinfarkt aktivierte EPDC exprimieren auf ihrer Oberfläche membranständige Enzyme des purinergen Stoffwechsels (CD39 bzw. CD73), die Adenosin-5'-Triphosphat (ATP) zu Adenosin (ADO) abbauen, sowie die purinergen Rezeptoren $P2X_7$ ($P2X_7R$) und A_{2B} ($A_{2B}R$). Über $A_{2B}R$ induziert Adenosin zum einen eine Sekretion von IL-6, zum anderen die Freisetzung von ATP aus intrazellulären Vesikeln. Extrazelluläres ATP kann über den $P2X_7R$ das NLRP3-Inflammasom aktivieren, in Folge dessen die Zytokine IL-1β und IL-6 ausgeschüttet werden. Das matrizelluläre Protein Tenascin-C (TNC) induziert über *Toll-like*-Rezeptor 4 (TLR4) die Expression von Pro-IL-1β als Substrat für das Inflammasom. Auch Adenosin (über $A_{2B}R$) und ATP können die Induktion der Pro-IL-1β-Expression TLR4-abhängig vermitteln. EPDC: *Epicardium-derived cells*; ADP: Adenosin-5'-Diphosphat; AMP: Adenosin-5'-Monophosphat; CD39: Ektonukleosid-triphosphatdiphosphohydrolase; CD73: Ekto-5'-Nukleotidase; IL: Interleukin.

Dafür spricht zudem die Beobachtung, dass sowohl ATP als auch Adenosin über den TLR4 das *Priming* stimulieren. ATP könnten somit zwei wichtige Rollen im Rahmen der Inflammasomaktivierung in EPDC zukommen, zum einen beim *Priming*, zum anderen bei der Aktivierung und dem Zusammenbau des Inflammasoms (siehe auch Abb. 14). Auch Adenosin könnte bei der Inflammasomaktivierung eine wichtige Rolle spielen. Die IL-1β- und insbesondere die IL-6-Sekretion erfolgte nach Aktivierung des $A_{2B}R$ zwar nicht Inflammasom-abhängig. Allerdings können EPDC nach Aktivierung des $A_{2B}R$ ATP aus intrazellulären Vesikeln freisetzen (Hesse et al., 2017), welches wiederum dann $P2X_7R$-abhängig das Inflammasom aktivieren

könnte (Abb. 15). Für diesen Zusammenhang spricht die Beobachtung, dass die A_{2B}R-abhängige Steigerung der IL-1β-Sekretion durch Hemmung des $P2X_7$R komplett aufgehoben werden konnte (Abb. 9A).

Einschränkend sei aber auch erwähnt, dass die gewählten Agonisten bzw. die Inhibitoren in einigen der vorliegenden Versuchsreihen teils eine hohe Varianz in ihrer Wirkung aufwiesen (Kapitel 3.3, 3.4 und 3.5). Entsprechend basieren die vorliegenden Ergebnisse nach der Unterteilung in *Responder*- und *Non-Responder*-Gruppen zum Teil auf sehr niedrigen n-Zahlen. Um die Ergebnisse und die entsprechenden Schlussfolgerungen zu untermauern wäre eine Erhöhung der n-Zahlen mit weiteren Versuchsreihen sinnvoll.

Dennoch deuten die vorliegenden Ergebnisse darauf hin, dass nach MI aus nekrotischen Zellen freigesetztes ATP an $P2X_7$R, aber auch TLR4, binden und somit Inflammasome in EPDC aktivieren könnte, was zu einer Sekretion von IL-1β und IL-6 führt und proinflammatorisch auf das umliegende Gewebe wirken könnte. Im Rahmen der durch den MI entstandenen Hypoxie wird jedoch auch der extrazelluläre Abbau von ATP zu Adenosin durch die membranständigen Ektoenzyme CD39 und CD73 stark gesteigert, was zu einer erhöhten extrazellulären Adenosin-Konzentration führt (Eltzschig et al., 2013). Dieses wiederum könnte im Verlauf über A_{2B}R eine starke IL-6-Sekretion induzieren, ohne das Inflammasom und somit auch eine IL-1β-Sekretion zu aktivieren. Somit könnte eine Umwandlung des primären proinflammatorischen Signals (durch ATP) hin zu einem pro-reparativen Signal (durch Adenosin) erfolgen.

Neben EPDC sind im Infarktgebiet weitere kardial ansässige, aber auch nach MI eingewanderte Zelltypen aktiv. In Leukozyten, kardialen Fibroblasten, Endothelzellen und auch Kardiomyozyten wurde Inflammasomaktivität nachgewiesen (Takahashi, 2019). Im Rahmen dieser Arbeit und in Vorarbeiten des Instituts konnte gezeigt werden, dass EPDC TNC bilden und dieses auch in den interstitiellen Raum sezerniert wird (Hesse et al., 2017). Da im Rahmen der sterilen Entzündung bei einem MI die für das *Priming* notwendigen PAMPs zur Aktivierung des TLR4-Signalweges nicht vorhanden sind, könnten EPDC als endogene Quelle für den TLR4-Liganden TNC dienen und so das notwendige *Priming* in anderen Zellarten im Infarktgebiet fördern. Dies hätte eine gesteigerte Inflammasomaktivität und entsprechend erhöhte Entzündungsreaktion zu Folge. Zudem konnte 2021 erstmals ein direkter Zusammenhang zwischen einem gesteigerten TNC-Level im Infarktgebiet und der Caspase-1-abhängigen Pryoptose von Kardiomyozyten nachgewiesen werden, und dass eine verminderte Konzentration von TNC eine verminderte Pryoptoserate der Kardiomyozyten zur Folge hatte (Xu et al., 2021). Auch hier könnte die EPDC-abhängige Induktion von TNC eine wichtige Rolle spielen.

Um herauszufinden, in wie weit die für EPDC nachgewiesenen Signalwege zur Aktivierung des Inflammasoms, insbesondere das *Priming* durch autokrine TLR4-abhängige Signalinduktion

durch TNC sowie durch ATP und Adenosin, auch für andere Zellarten zutreffen, sind weitere Forschungen notwendig. Ebenso wäre es wichtig zu wissen, ob die *in vitro*-Ergebnisse auf die *in vivo*-Situation übertragbar sind, und ob sich daraus neue therapeutische Angriffspunkte zur Beeinflussung der Langzeitfolgen nach MI ergeben könnten. Eine pharmakologische Regulation der Purin-abhängigen Zytokinsekretion von EPDC könnte therapeutisches Potential zur Beeinflussung des kardialen *Remodelings* nach MI haben.

Zusammengefasst spielen nach MI reaktivierte EPDC möglicherweise eine wichtige Rolle in der Gewebsumbildung: Einerseits sind EPDC durch Purin-abhängige Inflammasomaktivität an der Regulation der Entzündungsreaktion nach MI beteiligt. Andererseits können sie durch Freisetzung parakriner Faktoren wie VEGF, aber insbesondere auch TNC, über das interstitielle Milieu im Infarktgebiet einen direkten Einfluss auf die umliegenden Zellen und deren Schicksal und Funktion ausüben, und somit letztlich die Qualität der kardialen Heilung nach MI bestimmen. Die weitere Erforschung des Potentials und Regulation der einzigartigen Zellpopulation der EPDC erscheint somit aussichtsreich für die Entwicklung neuer therapeutischer Ansätze, um den gefürchteten Langzeitfolgen nach MI entgegenzuwirken.

Literaturverzeichnis

Akdis, M., Aab, A., Altunbulakli, C., Azkur, K., Costa, R.A., Crameri, R., Duan, S., Eiwegger, T., Eljaszewicz, A., Ferstl, R., Frei, R., Garbani, M., Globinska, A., Hess, L., Huitema, C., Kubo, T., Komlosi, Z., Konieczna, P., Kovacs, N., Kucuksezer, U.C., Meyer, N., Morita, H., Olzhausen, J., O'Mahony, L., Pezer, M., Prati, M., Rebane, A., Rhyner, C., Rinaldi, A., Sokolowska, M., Stanic, B., Sugita, K., Treis, A., van de Veen, W., Wanke, K., Wawrzyniak, M., Wawrzyniak, P., Wirz, O.F., Zakzuk, J.S., Akdis, C.A., 2016. Interleukins (from IL-1 to IL-38), interferons, transforming growth factor β, and TNF-α: Receptors, functions, and roles in diseases. J. Allergy Clin. Immunol. 138, 984–1010. https://doi.org/10.1016/j.jaci.2016.06.033

Bauernfeind, F., Bartok, E., Rieger, A., Franchi, L., Núñez, G., Hornung, V., 2011. Cutting Edge: Reactive Oxygen Species Inhibitors Block Priming, but Not Activation, of the NLRP3 Inflammasome. J. Immunol. 187, 613–617. https://doi.org/10.4049/jimmunol.1100613

Bauernfeind, F.G., Horvath, G., Stutz, A., Alnemri, E.S., MacDonald, K., Speert, D., Fernandes-Alnemri, T., Wu, J., Monks, B.G., Fitzgerald, K.A., Hornung, V., Latz, E., 2009. Cutting edge: NF-kappaB activating pattern recognition and cytokine receptors license NLRP3 inflammasome activation by regulating NLRP3 expression. J. Immunol. Baltim. Md 1950 183, 787–791. https://doi.org/10.4049/jimmunol.0901363

Bours, M.J.L., Dagnelie, P.C., Giuliani, A.L., Wesselius, A., Di Virgilio, F., 2011. P2 receptors and extracellular ATP: a novel homeostatic pathway in inflammation. Front. Biosci.-Sch. 1443–1456. https://doi.org/10.2741/235

Bours, M.J.L., Swennen, E.L.R., Di Virgilio, F., Cronstein, B.N., Dagnelie, P.C., 2006. Adenosine 5′-triphosphate and adenosine as endogenous signaling molecules in immunity and inflammation. Pharmacol. Ther. 112, 358–404. https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2005.04.013

Boza, P., Ayala, P., Vivar, R., Humeres, C., Cáceres, F.T., Muñoz, C., García, L., Hermoso, M.A., Díaz-Araya, G., 2016. Expression and function of toll-like receptor 4 and inflammasomes in cardiac fibroblasts and myofibroblasts: IL-1β synthesis, secretion, and degradation. Mol. Immunol. 74, 96–105. https://doi.org/10.1016/j.molimm.2016.05.001

Carmona, R., Guadix, J.A., Cano, E., Ruiz-Villalba, A., Portillo-Sánchez, V., Pérez-Pomares, J.M., Muñoz-Chápuli, R., 2010. The embryonic epicardium: an essential element of cardiac development. J. Cell. Mol. Med. 14, 2066–2072. https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2010.01088.x

Chen, K., Zhang, Jianguo, Zhang, W., Zhang, Jinhua, Yang, J., Li, K., He, Y., 2013. ATP-P2X4 signaling mediates NLRP3 inflammasome activation: A novel pathway of diabetic nephropathy. Int. J. Biochem. Cell Biol. 45, 932–943. https://doi.org/10.1016/j.biocel.2013.02.009

Cohn, J.N., Ferrari, R., Sharpe, N., 2000. Cardiac remodeling—concepts and clinical implications: a consensus paper from an international forum on cardiac remodeling. J. Am. Coll. Cardiol. 35, 569–582. https://doi.org/10.1016/S0735-1097(99)00630-0

de Rivero Vaccari, J.P., Bastien, D., Yurcisin, G., Pineau, I., Dietrich, W.D., De Koninck, Y., Keane, R.W., Lacroix, S., 2012. P2X4 Receptors Influence Inflammasome Activation after Spinal Cord Injury. J. Neurosci. 32, 3058–3066. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4930-11.2012

de Zoete, M.R., Palm, N.W., Zhu, S., Flavell, R.A., 2014. Inflammasomes. Cold Spring Harb. Perspect. Biol. 6, a016287. https://doi.org/10.1101/cshperspect.a016287

Deutsche Herzstiftung, 2021. Deutscher Herzbericht 2020, 32nd ed. Thieme.

Di Virgilio, F., 2013. The Therapeutic Potential of Modifying Inflammasomes and NOD-Like Receptors. Pharmacol. Rev. 65, 872–905. https://doi.org/10.1124/pr.112.006171

Di Virgilio, F., Chiozzi, P., Ferrari, D., Falzoni, S., Sanz, J.M., Morelli, A., Torboli, M., Bolognesi, G., Baricordi, O.R., 2001. Nucleotide receptors: an emerging family of regulatory molecules in blood cells. Blood 97, 587–600. https://doi.org/10.1182/blood.V97.3.587

Dinarello, C., 1996. Biologic basis for interleukin-1 in disease. Blood 87, 2095–2147. https://doi.org/10.1182/blood.V87.6.2095.bloodjournal8762095

Dinarello, C.A., 2009. Immunological and Inflammatory Functions of the Interleukin-1 Family. Annu. Rev. Immunol. 27, 519–550. https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.021908.132612

Ding, J., Wang, K., Liu, W., She, Y., Sun, Q., Shi, J., Sun, H., Wang, D.-C., Shao, F., 2016. Pore-forming activity and structural autoinhibition of the gasdermin family. Nature 535, 111–116. https://doi.org/10.1038/nature18590

Ding, Z., Temme, S., Quast, C., Friebe, D., Jacoby, C., Zanger, K., Bidmon, H.-J., Grapentin, C., Schubert, R., Flögel, U., Schrader, J., 2016. Epicardium-Derived Cells Formed After Myocardial Injury Display Phagocytic Activity Permitting In Vivo Labeling and Tracking. Stem Cells Transl. Med. 5, 639–650. https://doi.org/10.5966/sctm.2015-0159

Duncan, J.A., Bergstralh, D.T., Wang, Y., Willingham, S.B., Ye, Z., Zimmermann, A.G., Ting, J.P.-Y., 2007. Cryopyrin/NALP3 binds ATP/dATP, is an ATPase, and requires ATP binding to mediate inflammatory signaling. Proc. Natl. Acad. Sci. 104, 8041–8046. https://doi.org/10.1073/pnas.0611496104

Elliott, E.I., Sutterwala, F.S., 2015. Initiation and perpetuation of NLRP3 inflammasome activation and assembly. Immunol. Rev. 265, 35–52. https://doi.org/10.1111/imr.12286

Eltzschig, H.K., Bonney, S.K., Eckle, T., 2013. Attenuating myocardial ischemia by targeting A2B adenosine receptors. Trends Mol. Med. 19, 345–354. https://doi.org/10.1016/j.molmed.2013.02.005

Gittenberger-de Groot, A.C., Winter, E.M., Poelmann, R.E., 2010. Epicardium-derived cells (EPDCs) in development, cardiac disease and repair of ischemia. J. Cell. Mol. Med. 14, 1056–1060. https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2010.01077.x

Hafner-Bratkovič, I., Sušjan, P., Lainšček, D., Tapia-Abellán, A., Cerović, K., Kadunc, L., Angosto-Bazarra, D., Pelegrin, P., Jerala, R., 2018. NLRP3 lacking the leucine-rich repeat domain can be fully activated via the canonical inflammasome pathway. Nat. Commun. 9, 5182. https://doi.org/10.1038/s41467-018-07573-4

Halle, A., Hornung, V., Petzold, G.C., Stewart, C.R., Monks, B.G., Reinheckel, T., Fitzgerald, K.A., Latz, E., Moore, K.J., Golenbock, D.T., 2008. The NALP3 inflammasome is involved in the innate immune response to amyloid-β. Nat. Immunol. 9, 857–865. https://doi.org/10.1038/ni.1636

Hashimoto, H., Olson, E.N., Bassel-Duby, R., 2018. Therapeutic approaches for cardiac regeneration and repair. Nat. Rev. Cardiol. 15, 585–600. https://doi.org/10.1038/s41569-018-0036-6

Hesse, J., Leberling, S., Boden, E., Friebe, D., Schmidt, T., Ding, Z., Dieterich, P., Deussen, A., Roderigo, C., Rose, C.R., Floss, D.M., Scheller, J., Schrader, J., 2017. CD73-derived adenosine and tenascin-C control cytokine production by epicardium-derived cells formed after myocardial infarction. FASEB J. 31, 3040–3053.

https://doi.org/10.1096/fj.201601307R

Hoegen, T., Tremel, N., Klein, M., Angele, B., Wagner, H., Kirschning, C., Pfister, H.-W., Fontana, A., Hammerschmidt, S., Koedel, U., 2011. The NLRP3 Inflammasome Contributes to Brain Injury in Pneumococcal Meningitis and Is Activated through ATP-Dependent Lysosomal Cathepsin B Release. J. Immunol. 187, 5440–5451. https://doi.org/10.4049/jimmunol.1100790

Horn, F., 2009. Biochemie des Menschen - Das Lehrbuch für das Medizinstudium, 4th ed. Georg Thieme Verlag, Stuttgart.

Hornung, V., Latz, E., 2010. Critical functions of priming and lysosomal damage for NLRP3 activation. Eur. J. Immunol. 40, 620–623. https://doi.org/10.1002/eji.200940185

Huang, Y., Xu, W., Zhou, R., 2021. NLRP3 inflammasome activation and cell death. Cell. Mol. Immunol. 18, 2114–2127. https://doi.org/10.1038/s41423-021-00740-6

Imanaka-Yoshida, K., 2012. Tenascin-C in cardiovascular tissue remodeling: from development to inflammation and repair. Circ. J. Off. J. Jpn. Circ. Soc. 76, 2513–2520.

Kang, S., Narazaki, M., Metwally, H., Kishimoto, T., 2020. Historical overview of the interleukin-6 family cytokine. J. Exp. Med. 217, e20190347. https://doi.org/10.1084/jem.20190347

Kawaguchi, M., Takahashi, M., Hata, T., Kashima, Y., Usui, F., Morimoto, H., Izawa, A., Takahashi, Y., Masumoto, J., Koyama, J., others, 2011. Inflammasome activation of cardiac fibroblasts is essential for myocardial ischemia/reperfusion injury. Circulation 123, 594–604.

Kummer, J.A., Broekhuizen, R., Everett, H., Agostini, L., Kuijk, L., Martinon, F., Bruggen, R. van, Tschopp, J., 2007. Inflammasome Components NALP 1 and 3 Show Distinct but Separate Expression Profiles in Human Tissues Suggesting a Site-specific Role in the Inflammatory Response. J. Histochem. Cytochem. 55, 443–452. https://doi.org/10.1369/jhc.6A7101.2006

Labasi, J.M., Petrushova, N., Donovan, C., McCurdy, S., Lira, P., Payette, M.M., Brissette, W., Wicks, J.R., Audoly, L., Gabel, C.A., 2002. Absence of the P2X $_7$ Receptor Alters Leukocyte Function and Attenuates an Inflammatory Response. J. Immunol. 168, 6436–6445. https://doi.org/10.4049/jimmunol.168.12.6436

Latz, E., Xiao, T.S., Stutz, A., 2013. Activation and regulation of the inflammasomes. Nat. Rev. Immunol. 13, 397–411. https://doi.org/10.1038/nri3452

Limana, F., Zacheo, A., Mocini, D., Mangoni, A., Borsellino, G., Diamantini, A., De Mori, R., Battistini, L., Vigna, E., Santini, M., Loiaconi, V., Pompilio, G., Germani, A., Capogrossi, M.C., 2007. Identification of Myocardial and Vascular Precursor Cells in Human and Mouse Epicardium. Circ. Res. 101, 1255–1265. https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.107.150755

Lin, K.-M., Hu, W., Troutman, T.D., Jennings, M., Brewer, T., Li, X., Nanda, S., Cohen, P., Thomas, J.A., Pasare, C., 2014. IRAK-1 bypasses priming and directly links TLRs to rapid NLRP3 inflammasome activation. Proc. Natl. Acad. Sci. 111, 775–780. https://doi.org/10.1073/pnas.1320294111

Livak, K.J., Flood, S.J., Marmaro, J., Giusti, W., Deetz, K., 1995. Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization. PCR Methods Appl. 4, 357–362.

Livak, K.J., Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. Methods San Diego Calif 25,

402–408. https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262

Luo, G., Hershko, D.D., Robb, B.W., Wray, C.J., Hasselgren, P.-O., 2003. IL-1beta stimulates IL-6 production in cultured skeletal muscle cells through activation of MAP kinase signaling pathway and NF-kappa B. Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. 284, R1249-1254. https://doi.org/10.1152/ajpregu.00490.2002

Mangan, MSJ, Olhava, EJ, Roush, WR, Seidel, HM, Glick, GD, Latz, E, 2018. Targeting the NLRP3 inflammasome in inflammatory diseases. Nat. Rev. Drug Discov. 17, 588–606. https://doi.org/10.1038/nrd.2018.97

Martinon, F., Burns, K., Tschopp, J., 2002. The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta. Mol. Cell 10, 417–426.

Mauro, A.G., Bonaventura, A., Mezzaroma, E., Quader, M., Toldo, S., 2019. NLRP3 Inflammasome in Acute Myocardial Infarction: J. Cardiovasc. Pharmacol. 74, 175–187. https://doi.org/10.1097/FJC.0000000000000717

Mezzaroma, E., Toldo, S., Farkas, D., Seropian, I.M., Van Tassell, B.W., Salloum, F.N., Kannan, H.R., Menna, A.C., Voelkel, N.F., Abbate, A., 2011. The inflammasome promotes adverse cardiac remodeling following acute myocardial infarction in the mouse. Proc. Natl. Acad. Sci. 108, 19725–19730. https://doi.org/10.1073/pnas.1108586108

Midwood, K., Sacre, S., Piccinini, A.M., Inglis, J., Trebaul, A., Chan, E., Drexler, S., Sofat, N., Kashiwagi, M., Orend, G., Brennan, F., Foxwell, B., 2009. Tenascin-C is an endogenous activator of Toll-like receptor 4 that is essential for maintaining inflammation in arthritic joint disease. Nat. Med. 15, 774–780. https://doi.org/10.1038/nm.1987

Moore, Keith L., Vidhya, T., Persaud, N., 2007. Embryologie. Entwicklungsstadien - Frühentwicklung - Organogenese - Klinik, 5th ed. Elsevier Urban & Fischer, München - Jena.

Pasquini, S., Contri, C., Borea, P.A., Vincenzi, F., Varani, K., 2021. Adenosine and Inflammation: Here, There and Everywhere. Int. J. Mol. Sci. 22, 7685. https://doi.org/10.3390/ijms22147685

Prabhu, S.D., Frangogiannis, N.G., 2016. The Biological Basis for Cardiac Repair After Myocardial Infarction From Inflammation to Fibrosis. Circ. Res. 119, 91–112.

Próchnicki, T., Mangan, M.S., Latz, E., 2016. Recent insights into the molecular mechanisms of the NLRP3 inflammasome activation. F1000Research 5. https://doi.org/10.12688/f1000research.8614.1

Rano, T.A., Timkey, T., Peterson, E.P., Rotonda, J., Nicholson, D.W., Becker, J.W., Chapman, K.T., Thornberry, N.A., 1997. A combinatorial approach for determining protease specificities: application to interleukin-1beta converting enzyme (ICE). Chem. Biol. 4, 149–155.

Rider, P., Carmi, Y., Guttman, O., Braiman, A., Cohen, I., Voronov, E., White, M.R., Dinarello, C.A., Apte, R.N., 2011. IL-1α and IL-1β Recruit Different Myeloid Cells and Promote Different Stages of Sterile Inflammation. J. Immunol. 187, 4835–4843. https://doi.org/10.4049/jimmunol.1102048

Ruiz-Villalba, A., Simón, A.M., Pogontke, C., Castillo, M.I., Abizanda, G., Pelacho, B., Sánchez-Domínguez, R., Segovia, J.C., Prósper, F., Pérez-Pomares, J.M., 2015. Interacting Resident Epicardium-Derived Fibroblasts and Recruited Bone Marrow Cells Form Myocardial Infarction Scar. J. Am. Coll. Cardiol. 65, 2057–2066. https://doi.org/10.1016/j.jacc.2015.03.520

Schroder, K., Zhou, R., Tschopp, J., 2010. The NLRP3 Inflammasome: A Sensor for Metabolic Danger? Science 327, 296–300. https://doi.org/10.1126/science.1184003

Seoane, P.I., Lee, B., Hoyle, C., Yu, S., Lopez-Castejon, G., Lowe, M., Brough, D., 2020. The NLRP3–inflammasome as a sensor of organelle dysfunction. J. Cell Biol. 219, e202006194. https://doi.org/10.1083/jcb.202006194

Shinde, A.V., Frangogiannis, N.G., 2014. Fibroblasts in myocardial infarction: A role in inflammation and repair. J. Mol. Cell. Cardiol. 70, 74–82. https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2013.11.015

Smart, N., Bollini, S., Dubé, K.N., Vieira, J.M., Zhou, B., Davidson, S., Yellon, D., Riegler, J., Price, A.N., Lythgoe, M.F., Pu, W.T., Riley, P.R., 2011. De novo cardiomyocytes from within the activated adult heart after injury. Nature 474, 640–644. https://doi.org/10.1038/nature10188

Smart, N., Dubé, K.N., Riley, P.R., 2013. Epicardial progenitor cells in cardiac regeneration and neovascularisation. Vascul. Pharmacol. 58, 164–173. https://doi.org/10.1016/j.vph.2012.08.001

Takahashi, M., 2019. Cell-Specific Roles of NLRP3 Inflammasome in Myocardial Infarction: J. Cardiovasc. Pharmacol. 74, 188–193. https://doi.org/10.1097/FJC.0000000000000709

Tanaka, T., Narazaki, M., Kishimoto, T., 2014. IL-6 in Inflammation, Immunity, and Disease. Cold Spring Harb. Perspect. Biol. 6, a016295–a016295. https://doi.org/10.1101/cshperspect.a016295

van Wijk, B., Gunst, Q.D., Moorman, A.F.M., van den Hoff, M.J.B., 2012. Cardiac regeneration from activated epicardium. PloS One 7, e44692. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0044692

Weltgesundheitsorganisation, 2020. The top 10 causes of death (Statistik).

Xu, M., Ye, Z., Zhao, X., Guo, H., Gong, X., Huang, R., 2021. Deficiency of tenascin-C attenuated cardiac injury by inactivating TLR4/NLRP3/caspase-1 pathway after myocardial infarction. Cell. Signal. 86, 110084. https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2021.110084

Zasłona, Z., Pålsson-McDermott, E.M., Menon, D., Haneklaus, M., Flis, E., Prendeville, H., Corcoran, S.E., Peters-Golden, M., O'Neill, L.A.J., 2017. The Induction of Pro-IL-1β by Lipopolysaccharide Requires Endogenous Prostaglandin E2 Production. J. Immunol. Baltim. Md 1950. https://doi.org/10.4049/jimmunol.1602072

Zhou, B., Honor, L.B., He, H., Ma, Q., Oh, J.-H., Butterfield, C., Lin, R.-Z., Melero-Martin, J.M., Dolmatova, E., Duffy, H.S., von Gise, A., Zhou, P., Hu, Y.W., Wang, G., Zhang, B., Wang, L., Hall, J.L., Moses, M.A., McGowan, F.X., Pu, W.T., 2011. Adult mouse epicardium modulates myocardial injury by secreting paracrine factors. J. Clin. Invest. 121, 1894–1904. https://doi.org/10.1172/JCI45529

Zhou, B., Ma, Q., Rajagopal, S., Wu, S.M., Domian, I., Rivera-Feliciano, J., Jiang, D., von Gise, A., Ikeda, S., Chien, K.R., Pu, W.T., 2008. Epicardial progenitors contribute to the cardiomyocyte lineage in the developing heart. Nature 454, 109–113. https://doi.org/10.1038/nature07060

DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denen bedanken, ohne dessen Unterstützung diese Arbeit niemals hätte realisiert werden können.

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. Jürgen Schrader, der es mir ermöglichte, meine Promotion im Institut für Molekulare Kardiologie durchzuführen. Neben seiner fachlichen Expertise hat mir insbesondere seine warmherzige und offene Art in Zeiten voller Zweifel und Verzagen die notwendige Ermutigung und Hoffnung wiedergeben können, dieses Projekt letztlich abzuschließen.

Mein ebenfalls herzlicher Dank gilt PD Dr. Sebastian Temme, der sich ohne zu zögern bereiterklärt hat, als Zweitgutachter meine Promotion zu betreuen.

Ein besonders großer Dank gebührt meiner Betreuerin Dr. Julia Hesse. Sie hat mir nicht nur mit vielfältigem Rat und Wissen, sondern auch mit Spaß, Freundschaft und unendlicher Geduld zur Seite gestanden. Durch ihre konstruktiven Korrekturen, aber insbesondere auch ihre herzlichen Anmerkungen am Rande der Dissertationsschrift hat sie mich wieder und wieder auf den richtigen Pfad zurück gelenkt und mich so schlussendlich ins Ziel gebracht.

Des Weiteren möchte ich mich bei Christina Paulitschek bedanken. Mit ihr waren selbst die längsten Tage im Institut kurzweilig und unterhaltsam. Dazu beigetragen haben nicht zuletzt Liegestühle im Lager, lilafarbene Elefanten auf dem Flur und Geweihe und Weihnachtsgurken auf der Weihnachtsfeier.

Nicht zuletzt gebührt mein größter Dank meinen Eltern, Angelika und Heiner Leberling. Von Kindesbeinen an habt ihr mich uneingeschränkt unterstützt und mir immer die Möglichkeit gegeben, meinen eigenen Weg zu gehen, auch wenn dieser nicht immer euren Vorstellungen entsprach. Mein Dank gilt auch meinem großen Bruder Alex, der mir nicht nur ein toller Bruder, sondern auch ein guter Berater in allen Lebenslagen war und weiterhin ist. Abschließend möchte ich mich bei meinem Partner Jens bedanken. Deine unermüdliche Unterstützung und bedingungslose Liebe, gerade in der schwersten und dunkelsten Zeit, haben mir den nötigen Halt und die Zuversicht gegeben, diesen Weg bis zum Ende gehen zu können.